

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI



**OSTEODEJENERATİF HASTALIKLARIN TEDAVİSİNDE
KULLANILMAK ÜZERE TASARLANAN BİYOBOZUNUR Mg-Y-RE
ALAŞIMLARININ hFOB1.19 HÜCRE HATTI ÜZERİNE OLAN
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Leyla ATAÇ

Danışman

Doç. Dr. Bülent GÖGEBAKAN

HATAY 2016

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**OSTEODEJENERATİF HASTALIKLARIN TEDAVİSİNDE
KULLANILMAK ÜZERE TASARLANAN BİYOBOZUNUR Mg-Y-RE
ALAŞIMLARININ hFOB1.19 HÜCRE HATTI ÜZERİNE OLAN
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Leyla ATAÇ

Danışman

Doç. Dr. Bülent GÖGEBAKAN

Bu tez çalışması TÜBİTAK 213M699 nolu proje ile desteklenmiştir.

HATAY 2016

Kabul ve Onay

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA ve GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

OSTEODEJENERATİF HASTALIKLARIN TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE TASARLANAN BİYOBOZUNUR Mg-Y-RE ALAŞIMLARININ hFOB1.19 HÜCRE HATTI ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

Yüksek Lisans Tezi

Leyla ATAÇ

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 14/07/ 2016 günü sözlü olarak yapılan
tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi Jüri Başkanı: Doç. Dr. Bülent GÖGEBAKAN
Üye: Doç. Dr. Mustafa ULAŞLI
Üye: Doç. Dr. Osman ŞAHİN

Bu tez, Enstitümüz Moleküler Biyokimya ve Genetik Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

.../.../2016

Doç. Dr. Yaşar ERGÜN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca desteğini esirgemeyen, bilimsel alandaki öğretilerinin dışında hayatımın her alanı için bana yol gösteren değerli danışmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Bülent GÖGEBAKAN'a,

Bu tez çalışmasında kullanılan alışımların temininde gösterdikleri duyarlılıktan dolayı Doç. Dr. Osman ŞAHİN'e,

Yüksek lisans süreci boyunca desteklerini esirgemeyen Sayın Hocam Doç. Dr. Müzeyyen İZMİRLİ'ye,

Gerek tez çalışmalarım gerekse kendisiyle birlikte çalıştığım süre boyunca katkılarından dolayı Kübra GÜNDÜZ'e,

Hayallerimin gerçekleşmesi için beni koşulsuz ve sabırla destekleyen canım babam Bilal ATAÇ'a, canım annem Münire ATAÇ'a ve ablalarım Meryem, Atra, Emine ve Selda'ya

Sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| Kabul ve Onay | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | viii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | ix |
| ÖZET | xi |
| ABSTRACT..... | xii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1.Kemiğin Yapısı | 4 |
| 2.2. Kemik Hücreleri..... | 5 |
| 2.2.1.Osteoblastlar..... | 5 |
| 2.2.2.Osteositler | 6 |
| 2.2.3. Osteoklastlar..... | 7 |
| 2.3. Kemik Yeniden Biçimlendirilmesi (Remodeling) ve Mekanizması..... | 8 |
| 2.3.1. Kemik Remodelingte RANK/RANKL/OPG Sistemi | 12 |
| 2.4.1. Osteoartrit..... | 15 |
| 2.4.1. Osteoartrit Epidemiyolojisi | 16 |
| 2.4.2. Osteoartrit Etyopatogenezi..... | 16 |
| 2.4.3. Osteoartritte Risk faktörleri..... | 18 |
| 2.4.4.Osteoartritin Ekonomiye Etkisi..... | 19 |
| 2.4.5. Osteoartritte Korunma ve Tedavi..... | 20 |

| | |
|--|----|
| 2.5. Biyobozunur Malzemeler | 21 |
| 2.5.1. Magnezyum Alaşımları | 23 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 28 |
| 3.1. hFOB1.19 Hücre Kültürü | 28 |
| 3.2. Partikül Süspansiyonunun Hazırlanması | 28 |
| 3.3. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi | 28 |
| 3.4. Protein seviyesinin belirlenmesi | 29 |
| 3.5. Kantitatif Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT- PCR) | 29 |
| 3.6. İstatistiksel Analiz | 30 |
| 4. BULGULAR | 32 |
| 4.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi | 32 |
| 4.1.1. Mg-Y-RE-12 Alaşımının hFOB1.19 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi | 32 |
| 4.1.2. Mg-Y-RE-13 Alaşımının hFOB1.19 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi | 32 |
| 4.1.3. Mg-Y-RE-24 Alaşımının hFOB1.19 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi | 33 |
| 4.1.4. Mg-Y-RE Alaşımlarının 1000 µg/ml Konsantrasyonunun hFOB1.19 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi | 34 |
| 4.2. Osteoblastik Aktivitede Rol Alan Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi | 35 |
| 4.2.1. Mg-Y-RE-12 Alaşımının Osteoblastik Aktivitede Rol Alan Genlere Etkisi | 35 |
| 4.2.2. Mg-Y-RE-13 Alaşımının Osteoblastik Aktivitede Rol Alan Genlere Etkisi | 37 |
| 4.2.3. Mg-Y-RE-24 Alaşımının Osteoblastik Aktivitede Rol Alan Genlere Etkisi | 39 |
| 4.3. Osteoblastik Aktivitede Rol Alan Protein Düzeylerinin Belirlenmesi | 40 |
| 4.3.1. Mg-Y-RE Alaşımlarının BMP-2 Protein Düzeyine Etkileri | 40 |
| 4.3.2. Mg-Y-RE Alaşımlarının MMP-1 Protein Düzeyine Etkileri | 42 |
| 4.3.3. Mg-Y-RE Alaşımlarının OPG Protein Düzeyine Etkileri | 44 |
| 4.3.4. Mg-Y-RE Alaşımlarının BMP-7, RANKL, IL-1β, TNF-α ve TGF-β Protein Düzeylerine Etkileri | 46 |

| | |
|--------------------|----|
| 5. TARTIŞMA | 47 |
| 6. SONUÇ | 54 |
| 7. KAYNAKLAR | 55 |
| ÖZGEÇMİŞ | 64 |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1. Kemik dokusunu sindiren osteoklastlar..... | 8 |
| Şekil 2.2. Kemik oluşumu..... | 9 |
| Şekil 2.3. Kemik remodeling | 10 |
| Şekil 2.4. RANK/RANKL/OPG sistemi ve osteoblastlar tarafından osteoklast öncüllerinin düzenlenmesi. | 15 |
| Şekil 4.1. Mg-Y-RE-12 alaşımının hFOB1.19 hücre canlılığı üzerine olan etkisi. | 32 |
| Şekil 4.2. Mg-Y-RE-13 alaşımının hFOB1.19 hücre canlılığı üzerine olan etkisi. | 33 |
| Şekil 4.3. Mg-Y-RE-24 alaşımının hFOB1.19 hücre canlılığı üzerine olan etkisi. | 33 |
| Şekil 4.4. Mg-Y-RE alaşımlarının 1000 µg/ml konsantrasyonlarının 72. saatte hFOB1.19 hücre canlılığı üzerine olan etkisi. | 34 |
| Şekil 4.5. Mg-Y-RE-12 alaşımının osteoblastik aktivite rol alan genlere etkisi. | 36 |
| Şekil 4.6. Mg-Y-RE-13 alaşımının osteoblastik aktivite rol alan genlere etkisi. | 38 |
| Şekil 4.7. Mg-Y-RE-24 alaşımının osteoblastik aktivite rol alan genlere etkisi. | 39 |
| Şekil 4.8. Mg-Y-RE alaşımlarının BMP-2 protein düzeyine etkileri. | 41 |
| Şekil 4.9. Mg-Y-RE alaşımlarının MMP-1 protein düzeyine etkileri. | 43 |
| Şekil 4.10. Mg-Y-RE alaşımlarının OPG protein düzeyine etkileri. | 45 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Çizelge 4.1. Mg-Y-RE alaşımlarının hFOB1.19 hücre canlılığı üzerine olan etkisi. | 35 |
| Çizelge 4.2. Mg-Y-RE-12 alaşımının osteoblastik aktivite rol alan genlere etkisi. | 37 |
| Çizelge 4.3. Mg-Y-RE-13 alaşımının osteoblastik aktivite rol alan genlere etkisi..... | 38 |
| Çizelge 4.4. Mg-Y-RE-24 alaşımının osteoblastik aktivite rol alan genlere etkisi..... | 40 |
| Çizelge 4.5. Mg-Y-RE alaşımlarının BMP-2 protein düzeyine etkileri | 42 |
| Çizelge 4.6. Mg-Y-RE alaşımlarının MMP-1 protein düzeyine etkileri | 44 |
| Çizelge 4.7. Mg-Y-RE alaşımlarının OPG protein düzeyine etkileri. | 46 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|--------------------------------|--|
| BMP | Kemik morfojenetik protein |
| BGLAP | Kemik gama-karboksil glutamat (gla) protein |
| BMU | Temel çok hücreli birimler |
| CBFA1 | Core-bağlayıcı faktörü alfa alt birimi 1 |
| Ce | Seryum |
| CILP | Kıkırdak ara tabaka protein |
| COMP | Kıkırdak oligomerik matriks proteini |
| CSF-1 | Koloni uyarıcı faktör 1 |
| CTX-II | Tip II kollajenin çapraz bağlı N-telopeptiti |
| DMEM/F-12 | Dulbecco modifiye edilmiş/F12 |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| Dy | Disporsiyum |
| ECM | Ekstrasellüler matriks |
| ELISA | Enzim bağlı immüno sorbent analizi |
| Er | Terbiyum |
| Eu | Evropiyum |
| FCS | Fetal buzağı serumu |
| Gd | Gadolinyum |
| GM-CSF | Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör |
| GPa | Giga paskal |
| HBSS | Hank's balanced tuz çözeltisi |
| H₂ | Hidrojen |
| HO | Holmiyum |
| IFN-α | İnterferon alfa |
| IFN-γ | İnterferon gamma |
| IGF-1 | İnsülin benzeri büyüme faktörü I |
| IL | İnterlökin |
| ISO | Uluslararası standardizasyon örgütü |
| iNOS | İndüklenebilir nitrik oksit sentaz |
| İVP | İntravenöz pyelografi |
| L | Litre |
| La | Lantan |
| Lu | Lutesyum |
| M-CSF | Makrofaj koloni uyarıcı faktör |
| Mg | Magnezyum |
| Mg(Cl)₂ | Magnezyum klorür |
| Mg(OH)₂ | Magnezyum hidroksit |

| | |
|-----------------|---|
| Mg-Y-RE | Magnezyum-Yitriyum-Rare Earth (Nadir Toprak) |
| mmol | Mili mol |
| MMP | Matriks metalo peptidaz |
| MRI | Manyetik rezonans görüntüleme |
| MTT | 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromide |
| Nd | Neodimyum |
| NFATC1 | Aktive edilmiş T-hücrelerinin nükleer faktörü 1 |
| NF-κB | Nükleer faktör kapa β |
| Ni | Nikel |
| NSAİD | Steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçlar |
| OA | Osteoartrit |
| OCN | Osteokalsin |
| OPG | Osteoprotegerin |
| OPN | Osteopontin |
| OSX | Osterix |
| PCR | Polimeraz zincir tepkimesi |
| PLLA | Poli L-laktik asit |
| PLGA | Poli laktik-ko-glikolik asit |
| Pr | Praseodim |
| PRELP | Prolin arginin açısından zengin uçlu lösin tekrarlı protein |
| PTH | Para tiroid hormon |
| RANK | Nükleer faktör κβ reseptör aktivatörü |
| RANKL | NF-kappa-β ligandının reseptör aktivatörü |
| RE | Nadir Toprak |
| RUNX-2 | Runt ile ilgili transkripsiyon faktörü 2 |
| SIBLING | Small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein |
| SF | Serum barındırmayan ortam |
| Sm | Samaryum |
| SSP1 | Salgılanmış fosfoprotein 1 |
| SV40 | Simian virüsü |
| Tb | Terbiyum |
| TGF-β | Transforme edici büyüme faktörü beta |
| Tm | Tulyum |
| TNF | Tümör nekroz faktörü |
| TNFR | Tümör nekroz faktörü reseptörü |
| TNFRS | Tümör nekroz faktörü reseptörü süper-familiyası |
| TRAP | Tartarat-dirençli asit fosfataz |
| VEGF | Vasküler endotelial büyüme faktörü |
| Y | İtriyum |
| Yb | İterbiyum |
| QRT- PCR | Kantitatif reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu |

ÖZET

Osteodejeneratif Hastalıkların Tedavisinde Kullanılmak Üzere Tasarlanan Biyobozunur Mg-Y-RE Alaşımlarının hFOB1.19 Hücre Hattı Üzerine Olan Etkisi

Osteoartrit (OA) kıkırdakta erozyon, skleroz, osteofit oluşumu, sinoviyal membran ve kapsül yapısındaki değişikliklerle tanımlanan kronik dejeneratif bir süreçtir. Bu hastalığın tedavisinde cerrahi tedavi son seçenektir. Cerrahi tedavide çeşitli maddelerden yapılmış implantlar diz bölgesine yerleştirilmektedir. Ülkemiz OA tedavisinde kullanılan bu implantlar açısından büyük ölçüde dışa bağımlıdır. Bu durum sağlık harcamalarına büyük yük bindirmektedir. Bu çalışmada osteoblast hücre hattı olan hFOB1.19 hücrelerini, OA tedavisinde implant olarak kullanılmak için üretilen Mg-Y-RE alaşımlarına maruz bırakarak, bu alaşımların biyo-uyumunun belirlenmesini amaçladık. hFOB1.19 hücre dizileri Mg-Y-RE-12, Mg-Y-RE-13 ve Mg-Y-RE-24 alaşımlarına, 24-72 saat süreyle, 0-1000 µg/ml dozlarda maruz bırakıldı ve bu alaşımların hücre canlılığı üzerine etkileri MTT yöntemiyle belirlendi. Hücre canlılığı üzerinde etkili maruziyet süresini, etkisiz olan en yüksek doz ile etkili en yüksek dozu (72. saat, 400 µg/ml ve 1000 µg/ml) kullanarak, bu alaşımların osteoblastik aktivitede görevli genlerin ekspresyon miktarı ve protein seviyelerine etkileri sırasıyla qRT-PCR ve ELISA yöntemiyle belirlendi. Mg-Y-RE-12 hiçbir maruziyet süresinde ve dozunda hücre canlılığını etkilemezken, Mg-Y-RE-13 ve Mg-Y-RE-24 alaşımlarının zamana ve doza bağlı olarak hücre canlılığını baskıladığını bulduk. Her üç alaşım BMP2, MMP1, SSP1, OPG ve RANKL gen ekspresyon seviyelerini arttırmıştır. Mg-Y-RE-13 ve -24'ün MGP gen ekspresyon miktarını da arttırdığı bulundu. Sadece Mg-Y-RE-12 BMP2 ve Mg-Y-RE-24 MMP1 protein seviyelerini arttırdığını bulduk. Her üç alaşım OPG seviyesini arttırmıştır, BMP7, RANKL, IL-1β, TNF-α ve TGF-β protein seviyelerini etkilememiştir. Sonuç olarak Mg-Y-RE-12 alaşımı hücre canlılığını etkilememektedir ancak osteoblast aktivitesini yapım yönüne teşvik etmektedir. Bu bulgular ülkemizde ilk defa tasarlanan Mg-Y-RE alaşımlarından özellikle Mg-Y-RE-12 alaşımından üretilen implantların osteodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Mg-Y-RE, osteoartrit, hFOB1.19, hücre canlılığı, osteoblastik aktivite

ABSTRACT

The Effect of Biodegradable Mg-Y-RE Alloys, Designed for Use in Treatment of Osteodegenerative Disease, on hFOB1.19 Cell Line

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative process which is characterized by cartilage erosion, sclerosis, osteophyte formation and alterations in the composition of synovial membrane and capsule. Surgery is last option for the disease to treatment. Implants made of different materials are placed into the knee region by that surgical procedure. But our country is dependent on abroad with respect to these implant materials used in the treatment of OA. This situation loads major burden on health care costs. In this study; we aimed to determine the biocompatibility of various Mg-Y-RE alloys produced to use in the treatment of OA by exposing hFOB1.19 cell line that osteoblast cell line. We exposed hFOB1.19 cell lines to Mg-Y-RE-12, Mg-Y-RE-13 and Mg-Y-RE-24 alloys for 24-72 hours between 0-1000 mg/ml doses and the effects of these alloys on cell viability were measured by MTT assay. By using the non-effective highest dose, effective highest dose with effective exposure time and on cell viability (400 μ g/ml, 1000 μ g/ml and 72. hours), we determined the effects of referred alloys on the proteins and genes involved in osteoblastic activity by ELISA and qRT-PCR respectively. While Mg-Y-RE-12 alloy did not suppress cell viability at any dose and exposure time; Mg-Y-RE-13 and Mg-Y-RE-24 alloys suppressed cell viability depending on dose and exposure time. All three alloys increased BMP2, MMP1, SSP1, OPG, RANKL gene expression levels. Mg-Y-RE-13 and Mg-Y-RE-24 alloys also increased MGP gene expression. Besides, only Mg-Y-RE-12 and Mg-Y-RE-24 alloys increased BMP-2 and MMP-1 protein levels respectively. While all three alloys increased OPG protein level, they did not affect BMP-7, RANKL, IL-1, TNF- α and TGF- β protein levels. As a result, Mg-Y-RE-12 alloys didn't affect hFOB1.19 cell viability and promotes osteoblast activity to the formation direction. These findings suggest that Mg-Y-RE alloys especially Mg-Y-RE-12 alloys, which will be produced in our country first time, can be used in the treatment of osteodegenerative disease.

Keywords: Mg-Y-RE, osteoarthritis, hFOB1.19, cell viability, osteoblastic activity

1. GİRİŞ

Osteoartrit (OA) eklem kıkırdağının dejenerasyonu, osteofit formasyonu ve bunların sonucunda eklem boşluğunda daralma ile karakterize, yaygın olarak görülen dejeneratif eklem hastalığıdır (Castaneda ve ark. 2012). Günümüzde hareketsiz yaşamın artması sonucunda obezitenin artması; gelişen hayat standartlarının yükselmesiyle ortalama yaşam süresinin artması osteodejeneratif hastalıkların görülme sıklığının artmasına neden olmuştur. Ayrıca cinsiyet, etnik köken, yaşam tarzı da hastalığın artmasına neden olabilmektedir. Diğer yandan hastalığın tedavisinin ve hasta bakımının ekonomik boyutu çok yönlüdür. Osteodejeneratif hastalıkların tedavisine yapılan harcamalar tüm dünyada giderek artmaktadır. Dünya genelinde 1997’de artritler ve diğer romatizmal hastalıklara bağlı tıbbi harcamalar 233,5 milyar dolar iken, 2003’de 321,8 milyar dolara yükselmiştir. Bu harcamaların önemli bir bölümü OA’ya aittir. Örneğin kalça artroplastisinin 2005’den 2030’a %174, diz artroplastisinin %673 artacağı tahmin edilmektedir. 2007 yılında hazırlanan sağlık harcamaları ile ilgili bir raporda diz ve kalça artroplastilerinin yıllık toplam maliyeti yaklaşık 15,6 milyar dolar olduğu rapor edilmiştir (Bitton 2009). Osteodejeneratif hastalıkların tedavi yöntemleri farmakolojik ve non-farmakolojik olmak üzere ikiye ayrılır. Farmakolojik tedaviler arasında olan eklem içi glukokortikoid ve hyaluronan enjeksiyonu haftalar ya da aylar süren önemli semptomatik yararlar sağlamaktadır. Farmakolojik ve nonfarmakolojik tedavilere rağmen ağrının kontrol altına alınamadığı durumlarda (eklem hareket yeteneğinin geri dönüşümsüz bozulduğu hastalarda) eklem replasmanı yapılmaktadır (Kenneth 2007). Ancak bu müdahaleler de sadece 6-12 ay gibi bir süre rahatlama sağlamaktadır ve bu süre sonunda hastalık tekrar görülebilmektedir.

Dünyada osteodejeneratif hastalıkların tedavisinde en güncel yaklaşım implant kullanımındır. İmplantlar; (i) doku hasarlıysa hasarlı dokuyu desteklemek ve böylelikle dokunun kendini yenileme sürecine katkı sağlamak (ii) doku hasarı geri dönüşebileceği noktayı geçmişse dokuya mekanik destek sağlayarak kaybolan dokunun görevini yapması için kullanılmaktadır (Butler ve ark. 2000). Bugüne kadar implant üretiminde paslanmaz

çelik, alüminyum, polimer maddeler gibi çeşitli malzemeler denenmiştir. Ancak bu maddeler hem uygulama sırasında kırılabilirliklerinden dolayı hem de biyouyumlulukları zayıf oldukları için sorunlara neden olmuşlardır. Ayrıca uygulamalarından sonra biyobozunur olmamaları ya da bozunmalarının ardından dokunun yenilenmesine izin vermemeleri de kullanımlarını kısıtlamıştır. Diğer implant materyallerinin yukarıda sayılan sakıncalarından dolayı kullanımı kısıtlanırken biyouyumlu ve biyobozunur özelliğe sahip implant materyalleri geliştirilmesi için çabalar artmıştır. Günümüzde ise biyouyumlu ve biyobozunur özelliğe sahip malzemelerden üretilmiş implantlar sağladıkları avantajlardan dolayı kullanımları son derece yaygın hale gelmiştir. Biyobozunur malzemeler arasında en çok rağbet gören biyobozunur/biyouyumlu özelliğe sahip magnezyum alaşımlarıdır. Magnezyum (Mg) tabanlı materyaller düşük modüler yapıya sahip olmaları ve magnezyumun mekaniksel özellikleri kortikal kemiğin yapısına çok yakın olması nedeniyle stres düzeyini korumaya yardımcı olmaktadır. Sahip olduğu gerilme kuvveti açısından magnezyum tabanlı materyaller polimerlerden daha fazla güçlüdürler, zaman içerisinde bozunmaları ilk mekaniksel özelliklerinde herhangi bir değişime neden olmamaktadır (Zberg ve ark. 2009, Hort ve ark. 2010). En önemli özellikleri ise magnezyum tabanlı materyaller biyouyumludurlar ve polimerler ile karşılaştırıldığında bozunmalarından sonra kemik oluşumunu teşvik edebilmektedirler (Witte ve ark. 2005, Zhang ve ark. 2009). Magnezyum alaşımlarının bu özellikleri implant malzemesi olarak kullanılmasını sağlamıştır.

Osteodejeneratif hastalıkların tedavisinde ilk seçenek olarak farmakolojik ajanlar kullanılır. Hastalık ilerledikçe cerrahi tedavi ihtimali ön plana çıkar. Cerrahi tedavide implant tekniği sık kullanılan bir yöntemdir. Ancak ülkemiz osteodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılan implantlar açısından büyük ölçüde dışa bağımlıdır. Bu durum sağlık harcamalarına ciddi yük bindirmektedir. Bu nedenle osteodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılacak biyouyumlu/biyobozunur özelliğe sahip yeni implant materyallerinin geliştirilmesi için çalışmalar hız kazanmıştır. Böylelikle implant materyalleri için dışa bağımlılığın önü kesilmesi hedeflenmektedir.

Bu çalışmamızdaki amacımız osteodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılan biyobozunur/biyouyumlu implantlar açısından ülkemizin dışa bağımlılığını azaltacak ve ilk defa üretilen olan Mg-Y-RE alaşımlarının osteoblastik ve osteodejeneratif markerlar

üzerine etkilerini *in vitro* ortamda kemik yapım hücresi olan hFOB1.19 hücre hattını kullanarak belirlemektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1.Kemiğin Yapısı

Kemik, hidroksiapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) formdaki kalsiyum fosfat ile mineralize olmuş, özelleşmiş en sert bağ doku tipidir. Kemik, çeşitli mekaniksel fonksiyonlara sahiptir. Yetişkin iskeletinin esas yapısını oluşturan kemik dokusu, kasları destekler, kafatasının üst kısmı ve göğüs kafesi boşluklarında olduğu gibi yaşamsal önem taşıyan organları korur ve kan hücrelerini üreten kemik iliğini barındırır (Junqueira ve Carneiro 2009). Kemik dokusu yoğun bir damar ağı içerir ve metabolik açıdan oldukça aktif durumdadır. Kemik kalsiyum, fosfat ve diğer iyonları depolar ve bu önemli iyonların vücut sıvılarındaki konsantrasyonlarının sabit tutulabilmesi için kontrollü olarak salınmalarını ya da absorbe edilmelerini sağlar. Ayrıca kemikler, iskelet kası kasılmaları ile oluşan kuvvetleri çoğaltarak bunları vücut hareketlerine dönüştürebilen sistemdir. Bu mineralleşmiş doku iskelete mekanik ve metabolik işlevler kazandırır (Datta ve ark. 2008, Junqueira ve Carneiro 2009). İskelet eklemler ile birbirine tutturulmuş olup, kaslar tarafından desteklenen uzun ve yassı kemiklerden oluşmuştur. Histolojik olarak kortikal ve trabeküler kemik olmak üzere iki tip olgun kemik vardır. Kortikal kemik (kompakt kemik) yoğun ve düzenli bir yapıya sahiptir; trabeküler kemik (süngerimsi kemik) ise kortikal kemiğe göre daha hafiftir, yoğunluğu daha azdır ve daha düzensiz bir yapıya sahiptir.

Kortikal kemik uzun kemiklerin gövdesinde ve yassı kemiklerin yüzeyinde bulunur. Havers kanal sisteminin etrafında eşmerkezli kanal sisteminden (osteon) oluşur ve osteonlarda birbiri ile volkmann kanalları aracılığıyla bağlanırlar. Havers kanalları nörovasküler yapılar olan kan damarları, lenf damarları, sinirler ve bağ doku içerir. Her havers kanalı kemik matriksinin kemik yaprakçıkları (lamellae) veya halka denilen eş merkezli yapılar tarafından çevrelenmiştir. Lamellae içerisinde lakuna denilen ince boşluklarda osteositler bulunmaktadır.

Trabeküler kemik ise uzun kemiklerin uçlarında ve yassı kemiklerin iç kısımlarında bulunur. Trabekül denilen barlar ve tabakalar içermektedir. Trabeküller stres çizgisinde sıralanır ve kuvvete karşı dayanıklılık sağlar. Genellikle her kemik trabeküler kemiği ve modüler kaviteyi örten dış kortikal tabakaya sahiptir. Bu kortikal tabakaya periosteum

denilmektedir. Periosteum iki katman içermektedir: dış fibröz tabaka ve osteojenik kapasiteye sahip olan, yeni kemik oluşum süreci olarak bilinen periost apozisyona izin veren iç tabaka. Korteksin iç yüzeyi endosteum olarak bilinir ve kemik endosteal yüzey rezorpsiyona uğrama eğilimindedir. Hem periosteum hem de endosteum osteoblast ve osteoklast ile onların prekürsör hücrelerini barındırırlar (Datta ve ark. 2008)

2.2. Kemik Hücreleri

2.2.1. Osteoblastlar

Kemik dokunun formasyonundan sorumlu hücreler olan osteoblastlar çeşitli özel transkripsiyon faktörleri vasıtasıyla pluripotent mezenşimal kök hücrelerden farklılaşırlar (Owen 1988, Caplan 1991). Pluripotent mezenşimal kök hücrelerin osteoblast soy hattına dönüşmesinde osteoblastlarda yüksek derecede eksprese olan Cbfa1 (core-binding factor α 1) transkripsiyon faktörü rol alır (Banerjee ve ark. 1997, Ducky ve ark. 1997). Multi potent mezenşimal kök hücrelerin erken fazda osteoblastik soy hatlarına dönüşmesinde tip I kollajen, osteopontin (OPN), kemik sialoprotein ve osteokalsin (OCN) gibi kemik matriks proteinlerinin ekspresyonunu up-regüle eden major transkripsiyon faktörü olan Runx-2 (runt-related transcription factor 2) sorumludur (Ducky ve ark. 1997, Komori ve ark. 1997). Erken fazda osteoblast farklılaşmasında gerekli olan ancak osteoblast farklılaşmasının son fazında farklılaşmayı inhibe eden molekül osterix (Osx) transkripsiyon faktörüdür (Ogawa ve ark. 1993, Komori 2003). Ayrıca osteoblast farklılaşmasında, olgunlaşmasında ve çoğalmasında c-myc, c-jun, c-fos gibi protoonkogenler, çinko parmak proteinleri, runt-domain proteinleri, kemik morfogenik proteinler (BMP; bone morpho genetic protein), hücre büyüme faktörleri ile hedgehog proteinleri, kononikal wingless/ β -katenin de rol alır. Bu faktörler hücrenin fenotipine ve olgunlaşma fazına bağlı olarak değişkenlik sergileyebilir (Centrella ve ark. 1994, Cheng ve ark. 1994, Aubin ve ark. 1996, Ambrosetti ve ark. 2008).

Osteoblastlar kemik formasyon sürecinde ekstrasellüler matriks (ECM) minerilizasyonunun ve kemik remodelingin düzenlenmesinde kritik role sahiptir. Kemik

formasyonu boyunca olgun osteoblastlar ECM'nin en büyük kısmını oluşturan tip I kollajen sentezlemesinin yanı sıra kollajen olmayan, proteoglikan, glikoprotein, OCN, OPN ve kemik sialoprotein de salgılar (Franze'n A ve Heinegard D 1985, Chapurlat ve Confavreux 2016).

Aktif olarak kemik matriksi salgılayan osteoblastlar kübik hücrelerdir, sitoplazmaları bazofiliktir, büyük golgi organelleri ve bol miktarda kaba endoplazmik retikulumları vardır, kemik matriksinin depolanmasına yardımcı olan vezikül trafiğine özelleşmiş membran yapısına sahiplerdir (Anderson 2003). Üretim işlevleri azalmaya başladığında ise yassılaşılarak bazofilik özelliği azalma başlar. Kemik matriksi sentezlemeyen osteoblastlar ise yassı şekle sahiplerdir, ancak kolaylıkla aktif durumları için tipik kübik biçimlerine dönebilirler (Junqueira ve Carneiro 2009). Osteoblastlar ya yeni meydana gelmiş matriks ile aşamalı olarak sarılarak osteositlere dönüşürler ya da apoptoz ile ölürler (Manolagas 2000).

2.2.2.Osteositler

Osteositler osteoblast soy hattı hücrelerinin tamamen farklılaşmış, non-proliferatif hücreleridir. Osteoblastların osteositlere dönüşmesi ossifikasyonun durumuna bağlıdır. Yani olgun osteoblast oluşuktan sonra ya osteosite ya da apoptotik osteoblasta dönüşür (Manolagas 2000). Osteositler hem mineralize kemik matriksinde hem de yeni oluşmuş kemikte bulunurlar. Osteoblastlardan daha küçüktürler, sitoplazmik organellerinin çoğunu kaybetmişler ve osteoblastlara göre kromatini daha koyu gözlenir (Franz-Odendaal ve ark. 2006, Noble 2008). Osteositler lamellea denilen kovuklarda bulunur ve sahip oldukları uzantılar aracılığıyla diğer hücreler ile iletişim kurarlar, molekül alışverişi yaparlar. Ayrıca kan damarları arasındaki molekül alışverişi osteositlerin uzantıları ile kemik matriksi arasında bulunan az miktardaki hücre dışı madde üzerinden de gerçekleştirilir. Bu alışveriş yaklaşık 15 hücreden oluşan bir zinciri besler (Junqueira ve Carneiro 2009).

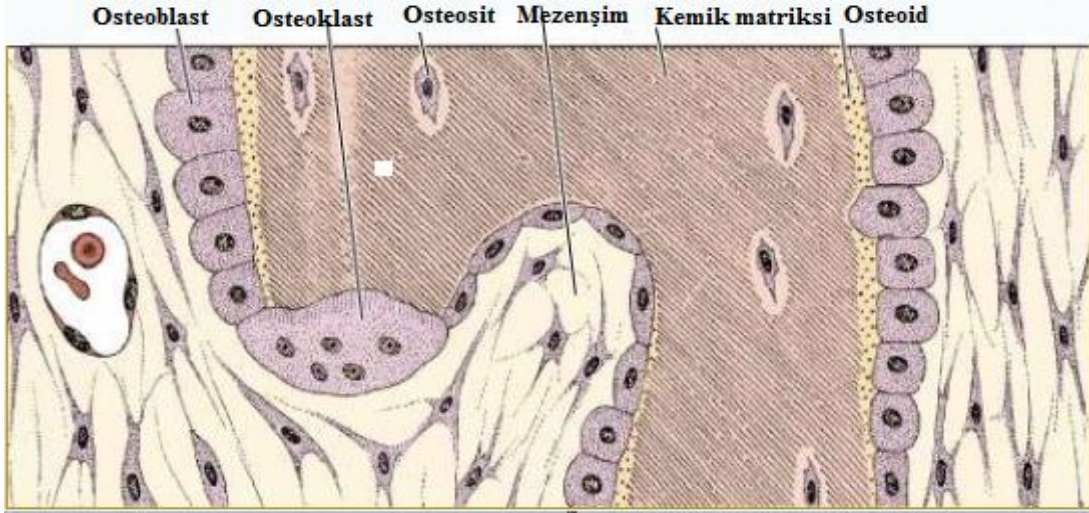
Osteositler yetişkin iskeletinde bulunan tüm kemik hücrelerinin %90-95'ini oluştururlar. Osteositlerin ara bağlantılara sahip olmaları ve kemik matriksinde yaygın şekilde bulunmalarından dolayı mekanik gerilimin rezorpsiyon veya formasyon sinyaline

dönüştürülmesinden sorumludurlar. Osteositlerin primer fonksiyonu kemik yapısının devamlılığının sürdürülmesi ve belirlenmesidir. Osteositler mekaniksel uyarıyı biyolojik bir sinyale dönüştürme yeteneğine sahip mekano-sensörlerdir. Ayrıca gerilme sinyalinin yoğunluğunu ve tüm kemiğin içine dağılımını düzenleme yeteneğine sahiptirler (Cowin ve ark. 1991, Lanyon 1993). Kemik matriksindeki mikro hasar kemik remodelingi başlatmaktadır. Osteositler ise artmış remodeling ile korele olan apoptozis bölgelerinin çok yakınında lokalizedirler (Tatsumi ve ark. 2007). Kemik remodeling sürecinde osteoklastogenezi aktive eden major faktör olan RANKL'nin (receptor activator of nf-kappa- β ligand) ana kaynaklarından biri osteositlerdir (Nakashima ve ark. 2011, O'Brien ve ark. 2013). Osteositlerin ortalama yaşam ömürleri 25 yıldır ve osteositlerin ölümü yaş senesensi ile artmaktadır (O'Brien ve ark. 2013).

2.2.3. Osteoklastlar

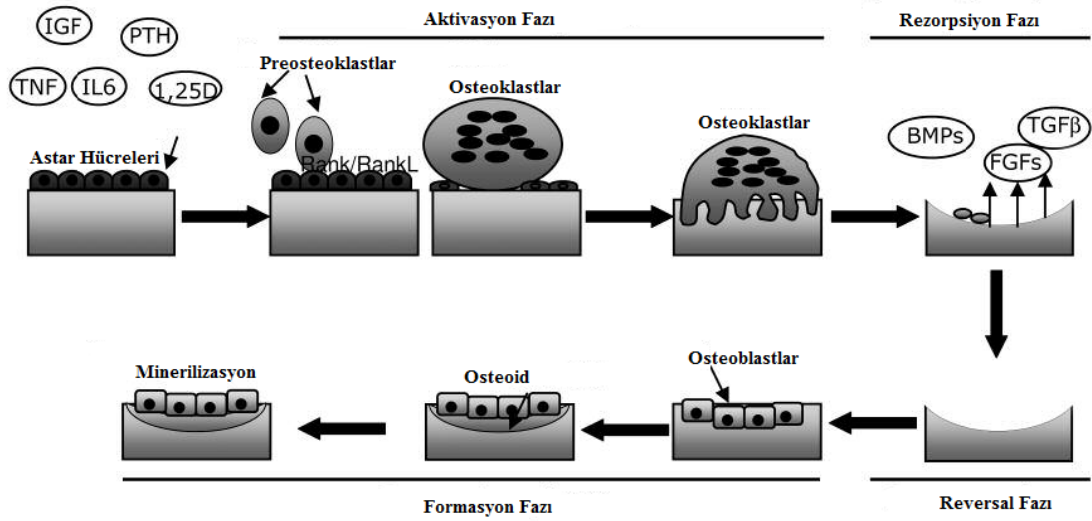
Osteoklastlar osteoklastogenez olarak adlandırılan işlemle monosit/makrofaj ailesinin mononükleer progenitörlerinin füzyonuyla oluşan multinükleuslu dev hücrelerdir ve kemik rezorpsiyonundan sorumlu tek hücrelerdir (Teitelbaum 2000). Osteoklastlar havers sisteminde bulunan endosteal yüzeyde ve periost altındaki periosteal yüzeyde bulunurlar. Osteoklastlar morfolojik ve fenotipik karakteristik özelliklere sahiptirler. Örneğin genişlemiş hücre gövdelerinde 50 veya daha fazla çekirdeğe sahiptirler ve soy hattına spesifik marker olan TRAP (tartarate-resistant acid phosphatase) ile kalsitonin reseptörü eksprese etmeleri en önemli fenotipik karakterleridirler (Roodman 1999). Osteoklastların farklılaşması osteoblast soy hatlarının M-CSF (macrophage colony stimulating factor) ve RANK (receptor activator of nuclear factor κ B)'ın ligandı olan RANKL eksprese etmeleriyle teşvik edilir. (Yasuda ve ark. 1998). Osteoklastlar hareket edebilen hücrelerdir ve kemik iliğinden rezorpsiyon bölgelerine göç ettikleri dönemlerde morfolojik değişikliklere uğrarlar (Li ve ark. 2006). Hareket eden osteoklastlar düzleşmişlerdir, non-polarizedirler ve karakteristik olarak membran uzantılarına sahiptirler. Rezorpsiyon bölgelerine ulaştıklarında polarize hale geçerek sızdırmazlık bölgesi, fonksiyonel sekresyon alanı ve taban membranı oluşumunu gerçekleştirirler. Sızdırmazlık bölgesi osteoklasta özgü bir yapıdır ve hücreyi asidik bölgeden ayırır

osteoblastları, kemik matriksinde bulunan osteositleri, kılcal kan damarlarını ve kemik yüzeyini örten kemik astar hücrelerini içermektedir. Tüm BMU'lar farklı evrelerdedir ve her bir BMU'nun ömrü BMU'yu oluşturan her hücrenin ömründen daha uzundur (Smit ve Burger 2000, Hauge ve ark. 2001, Kular ve ark. 2012).



Şekil 2.2. Kemik oluşumu (Junqueira ve Carneiro 2009).

Kemik remodeling süreci çok sıkı denetim altında olan beş ardışık fazdan oluşur. Bu süreçte kemik üzerinde çeşitli nedenlerle meydana gelen mekanik stres osteositler tarafından algılanır. Osteositler bu sinyali astar hücrelerine aktararak yeni kemik oluşumunu sağlayacak olan BMU oluşum sinyalini oluştururlar (Şekil 2.3) (Rucci 2008). Bu sürecin 2-8 ay olduğu tahmin edilmektedir (Bonewald 2011). Bu fazlar şunlardır;



Şekil 2.3. Kemik remodeling (Rucci 2008).

Aktivasyon Fazı: Kemik remodelingin ilk evresidir ve remodelingin başlatıcı sinyalinin algılandığı evredir. Bu sinyal çeşitli formlarda alınabilir. Örneğin; doğrudan kemik üzerindeki mekanik yük yapısal bozukluklara neden olur ya da hormonların [östrojen ve paratiroid hormon (PTH) gibi] kemik hücrelerindeki aktivasyonu homeostazide daha fazla sistemik değişimlere neden olur. Böylece aktivasyon BMU'ların kenarlarında meydana gelir (Raggatt ve Partridge 2010). Aktivasyon fazı boyunca çok çekirdekli hücelere farklılaşacak olan ve resorbe edici osteoklastları aktive edecek olan osteoklastik prekürsörler kemik iliği mononükleer monosit/makrofajlardan ve dolaşımdan elde edilir (Roodman 1999). Osteoklast aktivasyonu osteoblastlardan salgılanan RANKL, OPN, kemik sialoprotein gibi ECM proteinleri ile osteoklastların etkileşmesine bağlıdır (Ross ve ark. 1993). Osteosit apoptozu ve osteotropik büyüme faktörleri ile sitokinlerin salınımı kan damarları için teşvik edici olur, bu durum osteogenezis, kırık iyileşmesi ve kortikal kemik remodeling için ön koşul olan rezorptif kemik remodeling kompartman formasyonunu başlatır. (Smit ve Burger 2000, Eriksen 2010, Bonewald 2011).

Rezorpsiyon Fazı: Bu fazda osteoklast aktivasyonu ve formasyonu osteoblast soy hücrelerinin kontrolü altındadır. Osteoblast soy hücreleri osteoklastları remodeling bölgesine toplar ve osteoklastogenezis için gerekli olan CSF-1 (colony-stimulating factor 1) RANKL ve OPG (osteoprotegrin) sitokinlerinin ekspresyonunun yanı sıra PTH

hormonuna karşı cevabın oluşmasından sorumludurlar (Tang ve ark. 2009, Raggatt ve Partridge 2010, Teti 2011). Remodeling osteoklastik rezorpsiyonla başlar. Osteoklastlar osteoklastik rezorpsiyon lakunasını aşındırırlar ve kemik yüzeyine tutunarak rezorpsiyon bölgesinden sızıntı olmasını engellerler. Osteoklastlar kemik erimesini kolaylaştırmak için rezorpsiyon lakunasının içerisine H^+ iyonu salgılayarak asiditeyi artırırılar. Böylece organik matriks proteolitik enzimlere maruz kalarak kemik matriksinin ve minerallerinin sindirimi gerçekleşir. Bu süreçte oluşan bazı fragmentler tüm kemik rezorpsiyonu için biyokimyasal marker olarak kullanılabilir (Martin ve Sims 2005). Kortikal kemikte BMU'lar osteonal tüneller oluşturur, bu sırada osteoklastlar kanalı oyarlar osteoblastlar ise tekrar doldurur. Bu şekilde oluşturulan havers sistemleri 100-200 mikron genişliğinde ve 10 mm uzunluğunda olabilmektedir (Smit ve Burger 2000).

Reversal Fazı: Rezorpsiyon fazında maksimum boyutta rezorpsiyon çukurları (lakunası) oluşuktan sonra reversal fazı başlar ve yaklaşık 9 gün sürer. Reversal fazında osteoklastlar apoptoza uğrarken, osteoblastlar toplanır ve farklılaşırlar, bundan dolayı reversal fazı osteoblast ve osteoklast aktivitesi arasındaki geçiş fazıdır (Matsuo ve Irie 2008, Kular ve ark. 2012). Rezorpsiyon çukurundan osteoklastların çekilmesinden sonra, kemik-astar hücreleri boşluklara girer ve kemik matriks artıklarını temizlerler. Bu temizleme rezorpsiyon çukurlarında kollajen gibi proteinlerin birikmesi ve osteoblastların da tutunmaları için glikoprotein gibi moleküllerden kement hattı oluşması için gereklidir (Everts ve ark. 2002, Gallagher ve Sai 2010).

Formasyon Fazı: Reversal fazının hemen ardından formasyon fazı başlar. Osteoblastlar tarafından gerçekleştirilen kemik formasyonu remodeling sürecinin en uzun süren aşamasıdır ve rezorpsiyondan daha yavaş gerçekleşir (Tang ve ark. 2009, Raggatt ve Partridge 2010). Mezenşimal kök hücreler veya osteoblast projenitör hücreler rezorpsiyon lakunasına (oyuklarına) toplandıktan hemen sonra farklılaşırlar ve formasyon gerçekleşir (Everts ve ark. 2002, Eriksen 2010). ECM formasyonu ile çeşitli genler ilişkilidir. Tip I kollajen, fibronektin, TGF- β (transforming growth factor beta) ekstra selüler matriksin (ECM) formasyon sürecinde aktif olarak eksprese olurlar ve daha sonra osteoblastların farklılaşma aşamalarında bazal seviyede tutulmaları için aşamalı olarak miktarları düşer. Kollajen I kemiğin organik kısmının temel molekülüdür ve birikimi hücre büyümesinin kısmen durmasına katkıda bulunur. Proliferasyon durduğunda kemik hücrelerinin

fenotipiyle ilişkili proteinler olan alkalın fosfataz (ALP), OCN üretimi ve birikimi başlar (Lian ve Stein 1995, Clarke 2008). Kemığın son formunun elde edilebilmesi için hidroksiapatit yeni oluşan tortulaşmış osteoidin içinde toplanır (Lian ve Stein 1995, Confavreux 2011). ECM kompozisyonunda ve organizasyonunda bir dizi modifikasyon meydana gelir. Bu modifikasyonlar osteoid oluştuktan yaklaşık 15 gün sonra minerilizasyonun başlayabilmesine olanak sunar. Bu sürece non-kollajen proteinler de katılarak kemik hücrelerinin fonksiyonel aktivitelerinin düzenlenmesine yardımcı olurlar. Minerilizasyonun başlamasıyla kemik sialoprotein, OPN, OCN genleri eksprese olur (Lian ve Stein 1995, Raggatt ve Partridge 2010). Rezorbe edilen kemik miktarı kadar yerine konulduğunda remodeling döngüsü sona erer.

Sonlanma Fazı: Sonlanma sinyalinin nasıl oluştuğu tam olarak bilinmemektedir ancak bu sinyalin oluşumunda osteoblastların son farklılaşmasının ve osteositlerin rolü vardır. Osteoblastların üretim yeteneği azaldığında aşamalı olarak yassılaşırlar ve sonunda hareketsiz astar hücreleri halini alırlar. Osteoblastların bazıları da osteositlere farklılaşırlar ve matrikse gömülürler (Bonewald 2011). Osteositler rezorbe edilen oyukları tamamen doldurulmaya yakın bir zamanda kemik formasyonunu yavaşlatacak inhibitör faktörler salgılayabilirler. Kemik remodeling osteoklast ve osteoblast hücrelerinin aktivitesinin dengesiyle kontrol edilmektedir. Hem kemik formasyonunun azalması hem de kemik rezorpsiyonunun artması kemik kaybıyla sonuçlanır. Bu durum kemik formasyonunun uyarılması kemik kaybının tedavi edilmesi ve önlenmesi için önemli bir faktör olduğunu gösterir.

2.3.1. Kemik Remodelingte RANK/RANKL/OPG Sistemi

Kemik remodelingin aktivasyonu ve düzenlenmesi osteoblastlar ve osteoklastlar arasındaki etkileşime bağlıdır. Kemik remodeling sürecinde mezenşimal soy hatlarından köken alan osteoblast hücreleri oluştuğunda osteoklastlar myeloid hematopoetik soy hatlarından oluşur. Yeni osteoklastlar, kemik stromasında bulunan osteoblastlar ile osteoklast öncülleri arasındaki karşılıklı etkileşim aracılığıyla oluşur (Roodman 1999). Remodeling sürecinde osteoklastlar kemikte yıkım yapacağı bölgeyi kapatır ve lakuna içerisine sindirici asitler salgılayarak kemik rezorpsiyonunu gerçekleştirir, bu işlemde

sonra osteoblastlar yeni kemik sentezlemeye başlayarak oluşan boşlukları doldurur (Roodman 1999). Osteoblast ve osteoklast arasındaki bu ilişki RANK/RANKL/OPG etkileşimine bağlıdır (Simonet ve ark. 1997, Yasuda ve ark. 1998, Anderson 2003). RANK, TNFR (tumor necrosis factor receptor) üst ailesine ait olan tip I homotrimerik transmembran proteindir ve iskeletin yanı sıra çeşitli dokularda da eksprese edilir (Boyce ve Xing 2007, Boyce ve Xing 2008, Tat ve ark. 2009). RANK geni 18q22.1 kromozomal bölgede lokalize olmuştur. RANK 616 amino asitlik polipeptittir ve; 28 aminoasitlik sinyal peptidi, 184 amino asitlik N-terminal ekstrasellüler domaini, 21 amino asitlik kısa transmembran domaini ve 383 amino asitlik büyük sitoplazmik C-terminal domaini bulunur. RANK'ın ekstrasellüler domaini sistein açısından zengin dört domain ve iki N-bağlantılı glikozilasyon bölgesi içerir (Rosa-Ranal ve ark. 2001). RANKL, TNF (tumor necrosis factor) üst ailesine ait olan 317 amino asitlik polipeptittir, sitoplazmik N terminal domain (1-48 rezidüleri), transmembran domain (49-69 rezidüleri) ve ekstrasellüler C-terminal domaini (70-317 rezidüleri) vardır. RANKL geni 13q14 kromozomal bölgede lokalize olmuştur (Rosa-Ranal ve ark. 2001, Tat. 2009). Başta kemik olmak üzere çeşitli dokularda eksprese olan RANKL -1, -2 ve -3 şeklinde adlandırılan üç izoforma sahiptir. Bu üç izoform tip II homotrimerik transmembran protein olup hem çözünür hem de membrana bağlı formları vardır ve osteoklastogenezi farklı şekillerde düzenlerler. Çözünür form osteoklast oluşturmak için düşük afiniteye sahiptir (Nakashima ve ark. 2000). Osteoblastlarda ve aktive edilmiş T hücrelerde membrana bağlı formda eksprese edilir ve matriks metallo proteinazlar (MMP) veya disintegrin ve metalloproteinazlar tarafından proteolitik yıkıma uğradıktan sonra salınır (Boyce ve Xing 2008, Geusens 2009, Tat ve ark. 2009). RANKL immatür osteoklast salınmasını uyarmaktadır (Caetano-Lopes ve ark. 2007) ve M-CSF'in yokluğunda bile olgun osteoklast farklılaşmasını tamamlama yeteneğine sahiptir (Khosla 2001). OPG, TNFRS üst ailesine ait olup, RANKL'nin biyolojik etkilerini önleyebilen bir reseptördür. Yetişkin osteoblastlar dışında çeşitli dokularda eksprese edilir (Boyce ve Xing 2007, Caetano-Lopes ve ark. 2007, Boyce ve Xing 2008, Tat ve ark. 2009). OPG, osteoblastlarda propeptit formda sentezlenir ve 380 aminoasitlik olgun peptit oluşturmak üzere 22 amino asitlik sinyal peptidi uzaklaştırılır. OPG transmembran domaine veya sitoplazmik domaine sahip değildir, salgılanmış çözünebilir proteindir. TNF ailesinin diğer üyeleri gibi sistein bakımından zengin 4 domain içerir ayrıca iki ölüm domaini ve yüksek net pozitif yüke sahip bir domaine sahiptir

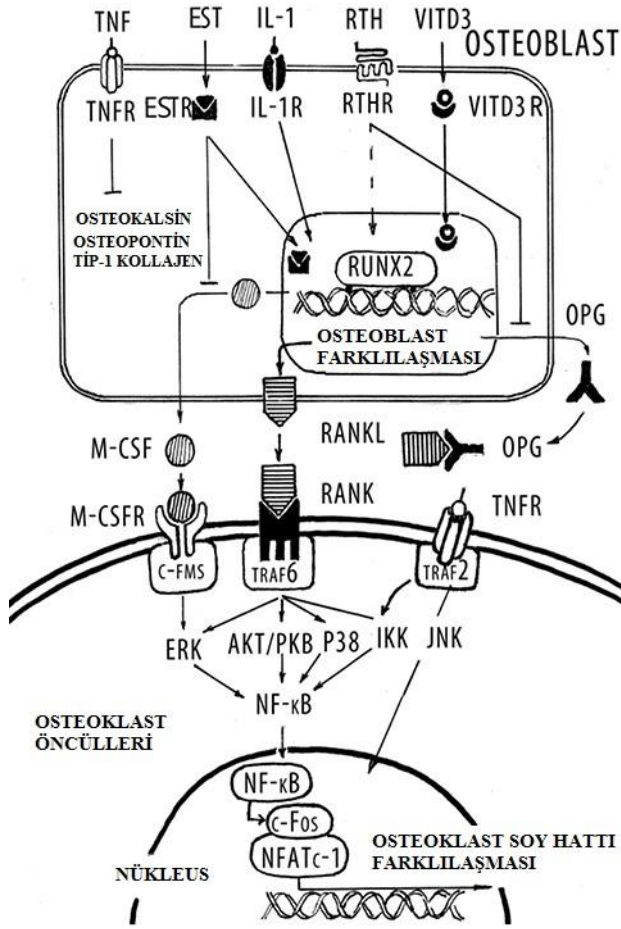
(Wittrant ve ark. 2004). OPG disülfit bağlarının oluşmasına göre monomer veya dimer formda bulunur ancak serumda baskın olarak monomerik formda bulunduğu gösterilmiştir (Rosa-Ranal ve ark. 2001).

Osteoblastlarda sentezlenen ve işlenen RANKL osteoklast membranında bulunan RANK reseptörüne bağlanır ve osteoklastogenezin başlamasını sağlayacak NFATc1 (nuclear factor of activated T-cells 1) transkripsiyon faktörünü uyarır böylece osteoklastogenez için hedef genlerin ekspresyonu uyarılır. RANKL'nin tuzak reseptörü olan ve osteoblastlardan sentezlenerek ekstrasellüler alana salınan OPG ekstrasellüler alanda RANKL'ye bağlanarak osteoklastogenezin ilerlemesini yavaşlatır. RANKL'nin RANK yerine OPG'ye bağlanması osteoklastogenezin ilerlemesini yavaşlatarak kemik yıkım hızının azalmasını sağlar (Boyce ve Xing 2007, Caetano-Lopes ve ark. 2007, Boyce ve Xing 2008, Tat ve ark. 2009).

RANK/RANKL/OPG sistemi çeşitli faktörler aracılığıyla düzenlenir (Şekil 2.4)

(Sagalovsky ve Schönert 2014):

- IL (interleukin)-1, IL-6 ve TNF- α ; RANKL, M-CSF ve GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) sentezini artırarak osteoklast öncüllerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarır ve apoptozu inhibe eder.
- IL-1, TNF, PTH ve 1,25 dihidroksi-vitamin D₃ osteopontinin ve osteoblastlar ile osteoklastlar arasındaki iletişimi sağlayacak olan integrinlerin sentezini uyararak osteoklastogenezini stimüle edecek olan sitokinlerin artmasını sağlar. PTH ayrıca TNF ile sinerjik olarak IL-6 sentezini uyarır.
- IFN- α (interferon alpha), IFN- γ (interferon gamma), IL-4, IL-10, IL-18 ve TGF- β osteoklastogenez üzerinde inhibitör etkiye sahip olan sitokinlerdir.
- IL-6 ayrıca östrojenlerdeki bir eksiklik sonucu gelişen kemik kaybında önemli olmasına rağmen, RANKL/OPG sistemine belirgin bir etkisi yoktur (Grimaud ve ark. 2003, Lerner 2004, Boyce ve Xing 2007, Boyce ve Xing 2008).



Şekil 2.4. RANK/RANKL/OPG sistemi ve osteoblastlar tarafından osteoklast öncüllerinin düzenlenmesi (Sagalovsky ve Schönert 2014).

2.4.1. Osteoartrit

Osteoartrit (OA) eklem kıkırdağının dejenerasyonu, osteofit formasyonu ve bunların sonucunda da eklem boşluğunda daralma ile karakterize olan dejeneratif eklem hastalığıdır (Castaneda ve ark. 2012). Osteoartritte kıkırdak, kemik ve sinoviyal dokuda çeşitli travmatik, biyomekanik, gelişimsel, metabolik ve genetik faktörlerin etkisiyle meydana gelen kıkırdak yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıkan, biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler meydana gelir (Sharma ve ark. 2006).

2.4.1. Osteoartrit Epidemiyolojisi

OA herhangi bir eklemden meydana gelebilmesine rağmen özellikle diz, kalça, eller, faset eklemleri ve ayaklarda görülme sıklığı çok daha yüksektir. Diz, kalça ve el OA'nın insidansı yaş ile artmaktadır ve kadınlarda görülme sıklığı özellikle 50 yaşından sonra erkeklerde görülme sıklığından daha yüksektir (van Saase ve ark. 1989, Lawrence ve ark. 2008). Birleşik Devletlerde yapılan çalışmalara göre 2005 yılında 26 milyon kişinin üstünde OA'lı insan bulunmaktaydı, 25-34 yaş aralığındaki populasyonun %1'i şiddetli radyografik değişimlerden etkilenmişlerdir, 75 yaş ve üstü populasyonda ise yaklaşık %50'sinde OA'lı birey bulunmaktadır (Bijlsma ve Knahr 2007, Jordan, Helmick ve ark. 2007). Ülkemizde ise hastalık yükü çalışmalarında OA ön sıralarda (yedinci sırada ve toplam hastalık yükü içinde %2,9) yer almaktadır (Ünüvar ve ark. 2007). Kas iskelet sistemi yakınmaları ile polikliniğe başvuran 65 yaş üstü hastaların tanınan dağılımını değerlendirmede retrospektif bir çalışmada dejeneratif hastalıklar en sık rastlanan tanı olarak izlenmiştir (Seçkin ve ark. 1999). Ülkemizde yapılan bir çalışmada, Antalya şehri popülasyonunda 50 yaş üstünde 655 kişide, semptomatik diz OA prevalansı %14,8 (kadınlarda %22,5 ve erkeklerde %8) distal interfalangal eklem OA prevalansı ise %10,5 (kadınlarda %17,6 ve erkeklerde %4,3) olarak bildirilmiştir (Kaçar ve ark. 2005). Bir diğer çalışmada ise üroloji arşivinden alınan 25-97 yaş grubundaki 682 hastanın İVP (intravenous pyelography) görüntüleri Kellgren-Lawrence yöntemiyle retrospektif olarak incelenmiş ve radyolojik kalça osteoartriti sıklığı %8,8 olduğu (kadınlarda %9,7; erkeklerde %12,7; 25-39 yaş grubunda %1,9; 40-54 yaş grubunda %16,1; 55 yaş üzerinde %21,6) bulunmuştur (Göker 2001).

2.4.2. Osteoartrit Etyopatogenezi

OA sinoviya ile kaplı eklemlerde kıkırdak yapısında kayıp ile karakterize olan kronik bir hastalık olmasına rağmen aynı zamanda subkondral kemik, ligamanları, kapsül, sinoviyum ve çevre kas dokusunu da etkilemektedir. OA'da kıkırdak ve subkondral kemikteki yıkım ve yapım arasındaki dengeyi sağlamaya yönelik dinamik bir süreç vardır. Etyopatogeneze hastalığın, kıkırdak doku ya da subkondral kemikten başladığı konusunda tartışmalı görüşler bulunmaktadır. OA'da yapısal olarak radyografilerde subkondral

kemikte skleroz artışı görülürken doku içeriğinde artmış remodellingten dolayı minerilizasyonda ve elastik modüllerde azalma vardır (Li ve ark. 1997). Şiddetli OA'da subkondral kemikte osteoblastik aktivite artışını gösteren OCN miktarı artmaktadır, OPN protein birikimi olmaktadır, idrar CTX-II (cross linked c-telopeptide of type II collagen) ve glikozil-galaktozil-bridolin (Glc-Gal-Pyd) düzeyleri artmaktadır (Pullig ve ark. 2000, Bruyere ve ark. 2006). OA'da IGF-1 (insulin-like growth factor-I), IL-1 β , TNF- α , IL-6, TGF- β , MMP-1 (matriks metallo proteinaz 1) düzeylerinde artma ve RANKL, OPG, VEGF, OCN, OPN seviyelerinde değişiklikler olmaktadır (Bay-Jensen ve ark. 2016). Ayrıca OA'da eklem kıkırdağında yapısal değişiklikler meydana gelmekle birlikte ana kollajen tipi normal eklem kıkırdağındaki gibi tip II kollajendir. Ancak osteofit adı verilen eklem kenarlarında ve kıkırdak tabakasında meydana gelen kemik proliferasyonlarının üzerine örten kıkırdakta tip I kollajen miktarı artmaktadır. Osteoartritlik kıkırdakta kollajen liflerinin boyu normalden kısadır, lif çapı azalmıştır ve liflerin sıkı yapısı gevşemiştir (Cremer ve ark. 1998). En önemli değişiklik proteoglikanlarda meydana gelir. OA eklem kıkırdağında su içeriği belirgin şekilde azalmaktadır ve bu durum sonucunda agrekan moleküllerinin yarattığı osmotik yük basıncına karşı gevşemiş kollajen ağının direnç gösterme yeteneği kaybolur. OA'da kollajen ağı proteoliz ile değişikliğe uğrar ve dokuda şişme meydana gelir. Hidrofilik proteoglikanlar normalden daha fazla şişer. Hastalık ilerledikçe proteoglikan seviyesi azalır ve glikozaminglikan zincirlerinin boyu kısalmır. Keratan sülfat konsantrasyonu azalırken kondroitin 4 sülfat/kondroitin 6 sülfat oranı artar. Proteoglikan kaybı eşik değere ulaştığında ise su miktarı daha da azalır. ECM'de bulunan agrekan tükenmeye başlar ve kıkırdak fibrilasyonu ve laserasyonu bunu takip eder ve sonuç olarak da kollajen yıkımı gerçekleşir (Pullig ve ark. 2002). OA'da COMP (cartilage oligomeric matrix protein), fibronektin, asporin, CILP (cartilage intermediate layer protein), matrilin-3, fibromodulin düzeylerinde artma, PRELP (proline-arginine-rich end leucine-rich repeat protein) seviyesinde azalma görülür (Clark ve ark. 1999, Heinegard ve ark. 2001) . OA'da MMP-1 ve yıkımdan asıl sorumlu olan kolajenaz-3'ün (MMP-13) sentez ve sekresyonu artmıştır. Agrekanazlar ve bazı MMP'ler tarafından agrekan kaybı görülür (Mitchell ve ark. 1996). Osteoartritlik sinoviyumda kemik ve kıkırdak metabolizmasında yer alan büyüme faktörleri ve inflamatuvar sitokinler bulunur. Bu faktörler sinoviyal hücrelerde ve kondrositlerde hasar sonrasında düzenleyici görev yaparlar. TNF- α kollajen ve agrekan sentezini baskılayarak doku yıkımına neden olur, IL-1

uyarımı sonucunda NO miktarında miktarı artar, sinoviyada bulunan iNOS (nitric oxide synthase, inducible) enzimi kollajen ve proteoglikanların sentezini inhibe eder, MMP aktivasyonunu arttırarak kıkırdak yıkımının ilerlemesine neden olur. Tüm bu faktörlerin etkisi sonucunda sinoviyal inflamasyon ilerleyerek OA şiddeti artar (Evcik ve Babaoğlu 2007).

2.4.3. Osteoartritte Risk faktörleri

OA gelişiminde risk hem sistemik hem de lokal faktörler tarafından belirlenir. Sistemik faktörler yaralanmada eklem duyarlılığını arttırarak, eklem dokularına direkt hasar vererek veya hasarlı eklem dokusunda onarım sürecini bozarak etki etmektedirler.

1. Obezite: OA için obezite eklemlere aşırı yük binmesine neden olduğundan dolayı en güçlü risk faktörlerindendir. Diz, kalça ve el OA prevalansı aşırı kilolu insanlarda artmaktadır (Carman ve ark. 1994, Gelber ve ark. 1999, Karlson ve ark. 2003). Yapılan bir çalışmada kadınlarda kilonun yaklaşık 5 kg azalması semptomatik diz OA gelişiminin yaklaşık %50 azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (Felson ve ark. 1992). Ayrıca aşırı kilo el gibi yük taşımayan eklemler içinde risk teşkil etmektedir bu durum obezitenin OA patogenezinde sistemik olarak da etki ettiğini göstermektedir (Carman ve ark. 1994, Hu ve ark. 2011).

2. Yaş: Semptomatik ve radyografik OA'in insidansı ve prevalansı yaş ile artmaktadır. Oksidatif hasarın artması, kıkırdak incilmesi, kas zayıflaması ve proprioseptif bir azalma gibi çok sayıda bireysel faktörlerin yaş ile birlikte artması yaş ile OA riski arasındaki ilişkinin multi faktöriyel olmasına neden olmaktadır. Ayrıca yaş ile doku bütünlüğünün devamlılığını sağlayan homeostasite bozulmalar artmaktadır. Homeostasisin bozulması strese veya eklem yaralanmasına karşı yetersiz cevap oluşmasına neden olmaktadır bunun sonucunda eklem doku azalması ve kaybı ilerlemektedir (Felson ve ark. 1987, Felson ve ark. 1995).

3. Cinsiyet: Diz, kalça ve el OA insidansı kadınlarda erkeklerden daha yüksektir, kadınlarda menopoza yakın zamanlarda veya menopozda OA insidansı dramatik bir şekilde artmaktadır (Srikanth ve ark. 2005).

4.Yaşam Tarzı: Eklem tekrarlayıcı şekilde kullanımı OA riskini arttırmaktadır. Framingham çalışmasında taşıma, diz çökme, çömelme gerektiren işlerde çalışan erkeklerde, bu aktiviteleri yapmayanlara göre diz OA'sının iki kat fazla geliştiği, boş zamanlarında yürüyüş ve bahçe işleri yapanlarda sedanter yaşayanlara göre radyografik diz OA riskinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Buna karşın akut yaralanma olmaması durumunda rekreasyonel olarak yapılan uzun mesafe yürüyüş ve koşu gibi aktivitelerin diz OA riskini artırmadığı görülmüştür (Zhang ve Jordan 2008).

5. Etnik ve ırk: OA prevalansı ve eklem tutulması farklı etnik ve gruplarda çeşitlilik göstermektedir. El ve kalça OA'nin her ikisi de Framingham çalışmasına kıyasla Pekin osteoartrit çalışmasında Çinlilerde daha az görülmektedir ama ilginç bir şekilde Çinli kadınlarda radyografik diz OA prevalansı çok daha yüksektir (Muraki ve ark. 2009). Johnson ilçesi (Kansas, Birleşik Devletler) OA projesi radyografik kalça OA'inin Afrikalı kadınlar ile beyaz kadınlarda benzer olduğunu ama erkeklerdeki prevalansının ise Afrikalı Amerikan erkeklere göre beyaz erkeklerde daha düşük olduğunu göstermiştir (Nelson ve ark. 2010).

2.4.4.Osteoartritin Ekonomiye Etkisi

Kas iskelet sistemi hastalıklarına bağlı harcamalar giderek artma eğilimindedir. 1997'de 5 endüstri ülkesinde (Avustralya, Kanada, Fransa, Birleşik Krallık ve ABD) milli gelirinin %1-2,5'i OA tedavisine harcanmıştır. 1997'de artritler ve diğer romatizmal hastalıklara bağlı tıbbi harcamalar 233,5 milyar dolar iken, 2003'de 321,8 milyar dolara yükselmiştir. Bu harcamaların önemli bir bölümü OA'ya aittir. Bir tahmine göre OA'nın yıllık maliyeti 89,1 milyar dolardır. Yeni bir çalışmada, ABD'de 5 milyon sigortalıdan oluşan bir veri tabanının analizinde OA'nın dolaylı maliyeti kişi başı yıllık 4603 dolar olarak bildirilmiştir. Ayrıca OA'lılarda komorbid durumların tedavi maliyeti, aritri olmayanların 1,5-2,6 katıdır. Direkt maliyeti ilaç tedavisi, ambulatuvar bakım, hastane bakımı oluşturur. OA'lılarda direk maliyet OA'sı olmayanların kabaca iki katıdır. Bir çalışmada kişi başı yıllık maliyet 543 dolar olarak bildirilmiştir. Bu maliyetin yaklaşık yarısı hastahane bakımına, üçte biri ilaçlara aittir. Hastane bakımı maliyetinin önemli bir kısmını kalça ve diz replasmanı oluştururken, bu kaynak OA'lı hastaların yalnızca %5'i

tarafından kullanılmaktadır. OA'nın evresi ilerledikçe tedavi maliyeti de artmakta ve ileri evre OA'lılarda yaklaşık ikiye katlanmaktadır. 2009 yılında İspanyada yapılan bir çalışmada Kellgren/Lawrence evre 4 hastaların direkt yıllık maliyeti evre 1'den yaklaşık %45 daha yüksekti. 2003-2004 yıllarında özel bir sigorta veritabanı incelemesinde yıllık ilaç maliyetinin %15'ini ağrıya ilişkin ilaçların oluşturduğu bulunmuştur. İntra artiküler tedavilere ilişkin veri azdır. Bir çalışmada 6 aylık maliyetin (2006'da, enjeksiyon, artrosentez ve ofis viziti dahil) 852 ila 1840 dolar arasında değiştiği tahmin edilmiştir. Ayrıca, eklem replasman (yenileme) tedavileri giderek artmaktadır. Kalça artroplastisinin 2005'den 2030'a %174, diz artroplastisinin %673 artacağı tahmin edilmektedir. Sağlık harcamaları ile ilgili bir projede 2007 yılında diz ve kalça artroplastilerinin toplam maliyeti yaklaşık 15,6 milyar dolar olarak tahmin edilmektedir (Bitton 2009).

2.4.5. Osteoartritte Korunma ve Tedavi

OA tedavisinde asıl amaç semptomları gidermek, hareketin devamlılığını sağlamak ve oluşabilecek hasarları minimuma indirmektir. Bunun için de non-farmakolojik ve farmakolojik tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Uygulanacak tedavi ve koruma yöntemi OA'nın meydana geldiği bölgeye göre seçilmelidir. Örneğin; patello femoral OA'da özellikle çömelme, diz üstüne oturmak, merdiven çıkmak şiddetli ağrılara neden olur. Bu olgularda medial patellar destek ağrıda belirgin azalmalara neden olur. Bu durumda dizlik uygulaması yapılabilir ve dizlik desteği quadriceps kasının vastus medialis obliquus parçasının izometrik egzersizle desteklenmesi ağrının giderilmesinde yararlıdır. Ayrıca ayakkabı içi destekler/ortezler, ısı uygulamaları, egzersiz non-farmakolojik tedavi uygulamaları olup OA'da meydana gelen ağrının azaltılması ve hareketin devamlılığının artırılması sağlanabilir. OA tedavisinde farmakolojik tedavi yöntemleri bulunmasına rağmen var olan yöntemler palyatif olup patolojik değişiklikleri önleyecek ya da koruyacak bir ilaç henüz yoktur. OA tedavisinde kullanılan ilaçlar ağrı ve eklem hareketinde sıklıkla düzelme sağlasa da düzelme miktarı orta düzeyde olup ağrı giderilmesinde %30, fonksiyonel düzelmede %15 düzeyindedir. Günümüzde OA tedavisinde en sık kullanılan ilaçlar ise asetaminofen, n-asetil-p-aseto aminofenol, APAP ve NSAİD (non-steroidal anti-inflammatory drugs) ilaçlardır. Eklem içi glukokortikoid ve hyaluron anenjeksiyonu haftalar ya da aylar süren önemli semptomatik yararlar sağlamaktadır. Farmakolojik ve

nonfarmakolojik tedavilere rağmen ağrının kontrol altına alınamadığı eklem hareket yeteneğinin geri dönüşümsüz bozulduğu hastalarda eklem replasmanı yapılabilir (Kennth 2007). Hastalığın şiddeti arttıkça eklem ve bileşenleri geri dönüşümsüz bozulmaktadır ve yapılan tıbbi müdahaleler yetersiz kalmaktadır. Cerrahi işlemlerde günümüzde yaygın olarak implantlar kullanılmaktadır ve bu implantlar vasıtasıyla hastalığın etkisi ciddi oranda azaltılmaktadır. Kullanılan bu implantların biyobozunur ve biyouyumlu olması tercih edilmektedir. Böylece vücut içerisinde uzun süre kalacak olan bu implantların dokuya herhangi olumsuz etkide bulunmaksızın ve tekrar çıkartılması için bir operasyon gerektirmeden vücutta bozunmaları gerçekleşmektedir.

2.5. Biyobozunur Malzemeler

Biyomalzemeler, insan vücudundaki dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik malzemelerdir. Sürekli olarak veya belli aralıklarla vücut sıvılarıyla (örneğin sinoviyal sıvı) etkileşim halindedirler. Biyomalzemeler damar, kemik, diş protezi olarak kullanılmasının yanı sıra ameliyat ipliği ve ekstrakorporeal cihazlarda da (vücut dışına yerleştirilen ancak vücut sıvılarıyla etkileşim halinde olan cihazlar) kullanılması sağlıkta çok önemli yere sahip olmalarını sağlamıştır. Biyomalzemeler, total eklem artroplastisinde, tendon, ligament rekonstrüksiyonu prosedürlerinin ve kemik kırıklarının stabilizasyonunun sağlanması amacıyla ortopedik cerrahide kullanılmaktadır. Yumuşak ve sert doku yaralanmalarının iyileştirilmesinde biyoaktif molekül olarak kullanılmasının yanı sıra hastanın kendi dokusu yerine de kullanımları gittikçe artmaktadır. Biyomalzemeler yapılacak uygulamanın özelliğine göre seçilir. Bunun için malzemelerin mekaniksel özellikleri, porozite yapısı, bozulma profilleri, biyouyumlulukları, dokuya yapışması ve dokuyla birleşme güçleri gibi spesifik özellikleri dikkate alınır (Butler ve ark. 2000).

Tarihsel olarak paslanmaz çelik ve alüminyum alaşımları gibi parçalanmayan metaller güçlü mekanik kuvvete, korozyon dirençliliğe sahip olmaları ve biyouyumlu olmalarından dolayı çok yaygın olarak kullanılmaktaydı (Geetha ve ark. 2009). Ortopedik uygulamalarda kullanılan implantlarda metalik biyomalzemeler önemli rollere sahiptir. Sahip oldukları yüksek mekanik dirençlilikleri ve kırılmaya karşı dayanıklılıklarından

dolayı metalik biyomalzemeler seramik, polimer ve polimer/seramik kompozitlerinden daha üstün olmalarını sağlamıştır. Geçmişten günümüze başta paslanmaz çelik olmak üzere (Tonino ve ark. 1976, Tengvall ve ark. 2004), Co-Cr tabanlı alaşımlar (Matkovic' T ve ark. 2004, Webster ve Ejiöfor 2004), titanyum tabanlı alaşımlar (Li ve ark. 1997, Webster ve Ejiöfor 2004, Geetha ve ark. 2009), zirkonyum tabanlı alaşımlar (Gomez Sanchez ve ark. 2013) ve tantalyum tabanlı alaşımlar (Leng ve ark. 2013) biyomedikal implantlarda yaygın olarak kullanılan metalik materyallerdi. Bu biyomedikal metallerin hiçbiri *in vivo* ortamda bozunmadıklarından dolayı implantların gerekli bölgeye (diz, kalça vb.) uygulanmasından sonra implantlar insan vücudunda sürekli olarak bulunmaktadır. Bu implantların uzun süre vücutta bulunmaları toksik elementlerin salınmalarına veya korozyonun neden olduğu lokal inflamasyon riskinin artmasına neden olabilmektedir (Vermes ve ark. 2001, Coen ve ark. 2003, Okazaki Y ve Gotoh E 2008). Bu tehlikeden dolayı doku iyileşmesinden sonra implantın alınması için tekrar bir cerrahi operasyon yapılması gerekmektedir. Ayrıca uzun yıllar boyunca kullanılan paslanmaz çelik 316L'deki Ni gibi toksik elementler vücut içerisinde metal alerjisine ve bazı deri hastalıklarına da sebep olduğu bilinmektedir (Gimenez-Arnau ve ark. 2000, Dou ve ark. 2003). İmplant üretiminde kullanılacak materyallerin toksik iyon salınımını engellemek ve yüzey stabilitesinin korunmasını sağlamak için yüzey modifikasyonu veya alaşımlama yoluyla korozyon dirençliliği iyileştirilebilmektedir (Grogan ve ark. 2011). Biyobozunur olmayan metallerin mekaniksel özellikleri doğal dokular ile tam olarak uyumlu olmadıklarından dolayı bazı olumsuz etkilere neden olurlar. Kemik ile bu metalik implantlar arasındaki mekaniksel uyumsuzluk stres shielding olarak bilinen klinik fenomene neden olur. Stres shielding implantların kemiğin üzerindeki tipik stresi kaldırmasının üzerine kemik yoğunluğunun azalması anlamına gelmektedir (Ridzwan ve ark. 2007). Wolff yasasına göre sağlıklı insanlarda veya hayvanlarda kemiğin üzerindeki yük remodelingi uyacaktır. Ancak kemik üzerindeki yük azalırsa kemik kütlelerini korumak için gerekli olan remodeling için hiçbir uyarıcı olmadığından kemik yoğunluğu azalacaktır ve kemik daha zayıf hale gelecektir. Eğer kemik üzerindeki yük veya stres artarsa remodeling zamanla artacaktır (Frost 1994). Bu nedenle stres shielding genellikle kemik doku etrafında aşırı stresi azaltmaya çabalarırken kemik rezorpsiyonuna yol açar (Nagels ve ark. 2003).

Biyomalzeme olarak polimerler de çok fazla özelliklere sahip olabilmeleri nedeniyle ortopedide doku yenilenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Lu ve Thomopoulos 2013). Polimerler, seramikler veya biyo-aktif camlar gibi biyobozunur non-metalik materyaller *in vivo* da aşamalı olarak bozunduklarından ve bozunma sonucunda toksik olmayan ürünleri emildiklerinden veya çevre dokular aracılığıyla atıldıktan dolayı metalik alaşımlardan daha kullanışlıdır (Amass ve ark. 1998, Tsigkou ve ark. 2009, Wu ve ark. 2012). Ancak bu materyallerin de ortak bazı dezavantajları vardır. Örneğin; kemik implant malzemesi olarak kullanılan PLLA (Poli L-laktik asit) ve PLGA (Poli laktik-koglikolik asit) gibi biyobozunur polimerler düşük mekanik özellikleri nedeniyle biyomedikal uygulamaları sınırlıdır (Zhang ve ark. 2009). Polimer materyaller aşırı kırılabilir yapıya sahip olduklarından implantın uygulanması aşamasında kırılabilmektedirler, bozulma hızı oranları hastadan hastaya değişmektedir ve bozulma hızları uzun sürmektedir (Smith ve ark. 2003, Johnston ve ark. 2011). Ayrıca bozulmalarından sonra yerlerinin dolmadığı ve kemik kistlerinin oluştuğu da gözlenmiştir (Walton ve Cotton 2007). Polimer kullanımının yanı sıra yetersiz osteointegrasyon için kompozit materyaller de tasarlanmıştır. Ancak yapılan çalışmalardan bazıları osteointegrasyonun ilerlemediği bazı çalışmalarda ise zayıf integrasyon olduğu rapor edilmiştir (Tecklenburg ve ark. 2006, Johnston ve ark. 2011). Bu nedenle polimer materyaller bazı ortopedik uygulamalar için uygun bir seçim olmayabilir.

İnsan vücudunda eser elementler olarak var olan magnezyum, demir ve çinko tabanlı materyaller bu gelişmeler sonunda ilgi çekmiştir. Bu biyobozunur materyaller arasında magnezyum ve magnezyum alaşımlarının biyomedikal kullanılabilirliği için çok geniş bir şekilde araştırılmıştır (Hermawan ve ark. 2010, Vojtech ve ark. 2011, Poinern ve ark. 2013).

2.5.1. Magnezyum Alaşımları

Magnezyum $1,74 \text{ g/cm}^3$ yoğunluğa sahip hafif bir metal olup, kemiğin yoğunluğundan ($1,8-2,1 \text{ g/cm}^3$) daha az bir yoğunluğa sahiptir. Saf magnezyumun elastik katsayısı 45 GPa iken insan kemiğinin elastik katsayısı ise 40-57 GPa'dır. Bu benzer elastik katsayısından dolayı doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan magnezyum

olası stres shielding fenomenini büyük oranda azaltarak kemik rezorpsiyonunu engelleyebilmektedir. Magnezyum alaşımları uygun mekanik mukavemete sahip olmalarının yanı sıra biyolojik uyumlulukları ve *in vivo* ortamdaki güvenilirliği implant üretimi için aday olmalarını sağlamıştır. İnsan vücudunda en bol bulunan magnezyumun yaklaşık yarısı kemik dokuda depolanmaktadır. Ayrıca magnezyum metabolik açıdan elzem olan bir elementtir (Okuma 2001). Magnezyum birçok enzim için kofaktör olmasının yanı sıra DNA ve RNA'nın yapı stabilizatörüdür (Hartwig 2001). Magnezyum bivalent iyon olarak kemik matriksinde apatit formasyonunda rol alır (Zreiqat ve ark. 2005). ECM'deki magnezyum konsantrasyonu 0,7-1,05 mmol/l olup Mg homeostazisi böbrek ve bağırsak aracılığıyla devam ettirilir. Bu nedenle fazla Mg idrar yoluyla etkili bir şekilde uzaklaştırılmasının yanı sıra (Saris ve ark. 2000), magnezyum tabanlı alaşımların bozunması serum magnezyum miktarında artışlara neden olmadığı bilinmektedir (Wong ve ark. 2010). Mg-tabanlı materyallerin en önemli avantajı istenildiği zaman içerisinde bozunmaları ilk mekaniksel özelliklerinde herhangi bir değişime neden olmaksızın düzenlenebilmesidir (Zberg ve ark. 2009). Ayrıca bu materyaller uygulandıktan sonra MRI (magnetic resonance imaging) görüntüleme diğer metalik materyaller gibi görüntüyü engelleyip araya girmemektedirler. En önemli özellikleri ise Mg-tabanlı materyaller biyouyumludurlar (Witte ve ark. 2005, Zhang ve ark. 2009) ve polimerler ile karşılaştırıldığında bozunmalarından sonra kemik oluşumunu teşvik edebilmektedirler. Ancak polimerlerin bozunmaları dokunun kendini yenilemesine engel olabilmektedirler. Mg-tabanlı materyallerin bu özellikleri polimerlerin sahip olduğu dezavantajların üstesinden gelmesini sağlamaktadır.

Fizyolojik çevrede magnezyum ve magnezyum alaşımları indirgenmeleri korozyon süreçleri aracılığıyla gerçekleşir. Korozyon süreci sonunda korozyon tabakası oluşur. Bu tabaka $Mg(OH)_2$ üretimine ve H_2 gazı salınımına neden olur. Kemik doku damarlanma açısından zayıf olduğundan salınan H_2 gazının uzaklaştırılmasında başarılı değildir. Bu durum potansiyel tehdit olan H_2 gazı keselerinin oluşmasına neden olur (Persaud-Sharma ve McGoron 2012). Tüm korozyon süreci elektrokimyasal reaksiyona dayalı olarak gerçekleşir. $Mg(OH)_2$ tabakası korozyon süreci boyunca magnezyum substratının altında toplanır ve takip eden korozyon sürecinde magnezyumu koruyucu tabaka olarak rol alabilmektedir. Ancak klorid konsantrasyonu 30 mmol/l'nin üzerine çıktığında $Mg(OH)_2$, suda çözünebilen $Mg(Cl)_2$ 'ye dönüşmeye eğilimlidir. Bu yüzden kendiliğinden oluşan

Mg(OH)₂ tabakası magnezyumu tamamen koruyamamaktadır. Yaklaşık 150 mmol/l klorid konsantrasyonunun olduğu *in vivo* ortamda aşırı korozyon ve hızlı degradasyon magnezyum tabanlı implantlar için kaçınılmazdır (Kokubo ve Takadama 2006, Witte ve ark. 2008). Magnezyum tabanlı alaşımların korozyona uğramalarını ve H₂ gazı salınımlarını en aza indirmek için en iyi yol magnezyumun nadir toprak elementleri ile katkılanması ve yüzey modifikasyonunun yapılmasıdır.

Magnezyum tabanlı materyallerin kendi mekanik özelliklerini koruyarak hızlı bozunmalarının kontrol edebilmek için magnezyuma çeşitli elementler eklenerek magnezyum alaşımları üretilmiştir (Li ve ark. 2008, Berglund ve ark. 2012). Magnezyumun yüksek negatif potansiyele (-2.4V) ve zayıf pasivasyon eğilime sahip olmasına rağmen, üretilen yeni alaşımlar ticari magnezyum ile karşılaştırıldığında daha iyi mekanik özelliklere, korozyon direncine ve biyolojik performansa sahiptirler. Dokunun implanta cevabı, implant yüzeyinin özelliklerine, korozyon direçliliğine, doku ile bütünleşmesindeki biyo-uyumluluğuna bağlıdır. Bu nedenle magnezyumun ve alaşımlarının yüksek derecede biyouyumlu anti-korozyon tabaka ile yüzeyinin modifikasyonu yapılmaktadır. Yüzey modifikasyonundan sonra magnezyumun bulk substrat özelliklerini sıklıkla sürdürebilmektedir. Yüzey modifikasyonu ile magnezyumun daha iyi biyomedikal performansı için multi fonksiyonel yüzey yapımı mümkündür (Zhang ve ark. 2009). Metal implantlardan iyonların çözülmesi (ayrılması) alerjiyi indüklemesinden endişe edilir. Ancak ISO (international organization for standardization) standartlarına uygun olarak yapılan epikutan test çalışmasında AZ31, AZ91, WE43 ve LAE442 (%4 Li; %3.6 Al; %2.4 RE, Mg'a göre yüzde ağırlık) gibi magnezyum alaşımlarının alerjik reaksiyonlara yol açmadığı gösterilmiştir (Witte ve ark. 2008). Ayrıca korozyonun ana ürünü olan Mg(OH)₂ molekülünün kemik formasyonun artırılması ile yakından ilişkili olduğu, kemik yıkımını geçici olarak azalttığı gösterilmiştir (Witte ve ark. 2008).

Mg materyalleri hazırlanırken Mg metalinin daha da uygun bir yapıya sahip olması için alaşım kaplama, yüzey işlenmesi ve prosesing gibi yöntemler geliştirilmiştir. Bu işlemlerle magnezyuma nadir toprak elementi katkılanarak magnezyumun sahip olduğu özellikler güçlendirilmektedir. Bu yöntemlerle magnezyuma nadir toprak (Rare Earth; RE) elementleri katkılanarak magnezyum güçlendirilir. Nadir toprak elementleri aslında

magnezyum tabanlı alaşımların korozyon ve sürtünme direncini iyileştirmek, mekanik özelliklerini arttırmak amacıyla kullanılmıştır (He SM, Zeng XQ et al. 2006, Mert F, Blawert C et al. 2012). RE elementleri 17 elementten oluşmaktadır ve magnezyumdaki çözünürlüklerine göre iki gruba ayrılabilir:

- i) Yüksek katı çözünürlüklü (Y, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu);
- ii) Sınırlı çözünürlüklü (Nd, La, Ce, Pr, Sm, Eu) (Feyerabend, Fischer ve ark. 2010).

Ayrıca RE elementleri; hafif RE elementleri (La, Ce, Pr, Nd, Pm) ve ağır RE elementleri (Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu) olmak üzere iki gruba ayrılır (Gerold B 2013). Çoğu RE elementi anti-karsinojenik karakter sergilemektedir (Ji, Xiao et al. 2000). Magnezyuma eklenen nadir toprak elementlerinin magnezyumun gerilebilirliğini arttırdığı ve korozyon özelliklerine katkı sağladığı gösterilmiştir (Leng ve ark. 2012, Leng ve ark. 2013). Örneğin Mg-Y alaşımı saf Mg metaline göre gerilme direnci yaklaşık iki kat daha fazladır ve bozunma hızı da korunmaktadır (Gu ve ark. 2009, Chou ve ark. 2013). Mg'nin bu özelliklerinden dolayı Mg alaşımlarının çeşitli dokulara benzer olarak tasarlanmalarını olanaklı hale getirmektedir. Örneğin; Mg materyalinin mikro-yapısı süngerimsi kemiğin mekanik özelliklerine benzer olarak yani gözenekli olarak tasarlanabilmektedir. Bu durum Mg-tabanlı materyallerin kemiğin yapısına entegre olmaları için ideal hale getirmektedir (Wei ve ark. 2010). Ancak RE elementlerinin kombinasyonu ile vücuda alınan günlük miktar 4,2 mg/gün 'den fazla olmamalıdır (Kirkland ve ark. 2011).

Magnezyum alaşımlarının korozyon direnci ve mekanik özellikleri üzerinde oldukça etkili olan nadir toprak elementlerinin katkılanmasıyla daha kullanışlı Mg-tabanlı alaşımlar yapılmaktadır. Mg-Y-RE alaşımları kullanılan nadir toprak elementlerine ve ağırlıkça yüzdelerine göre WE43, WE54, Mg-Y-Gd, Mg-Y-Nd vb. olarak adlandırılmaktadır. WE43 magnezyum alaşımında "W" ağırlıkça %4 oranında kullanılan yitriyumu; "E" harfi ise ağırlıkça %3 oranında ki nadir toprak elementlerini ifade eder. Ağırlıkça %3 oranında eklenen nadir toprak elementleri "E"; 17 farklı nadir toprak elementlerinden bazılarının değişik oranlarda bir araya getirilmesiyle oluşmaktadır. Mg-Y-RE alaşımındaki nadir toprak elementleri; farklı nadir toprak elementlerinin bir araya getirilmesiyle katkılanıldığı gibi, nadir toprak elementlerinin tekli katkılanmasıyla da üretilmektedir. Nadir toprak elementlerinin tekli katkılanmasıyla, magnezyum

alaşımının mekanik ve korozyon özelliklerine etkilerinin gözlemlenebileceği literatürde de açıkça ifade edilmektedir (Reifenrath ve ark. 2010).

Mg-tabanlı materyallerin bozunmaları ve hücre canlılığına olan etkisini belirlemek için çok fazla çalışma yapılmıştır. Sitotoksite testi alaşımların biyoyumluluğunu belirlemede en hızlı yöntemdir. Teorik olarak, hiçbir metalin insan vücuduna sınırsız alımı yoktur. Alaşımlarda kullanılan çoğu element tolerans sınırının ötesinde toksik reaksiyonlara neden olabilir. Geliştirilen alaşımların biyoyumluluğu salınan elementler tarafından etkilenmektedir. Salınan elementler alaşımın korozyon oranı ile ilişkilidir. Magnezyumun insan vücudunda biyoyumlu olduğu bilinmektedir. Ancak ekstrasellüler sıvılarda 1,05 mmol/l'den fazla magnezyum kas felci, hipotansiyon, solunum zorluğuna neden olduğu, serumdaki 6-7 mmol/l magnezyum seviyesinin kalp durmasına neden olduğu bilinmektedir (Staiger ve ark. 2006). Alaşımlardan salınan elementlerin sitotoksitesi ve tolerans limiti implantın lokalizasyonu, lokalize olduğu dokudaki yolaklar veya mekanizmalar ve bunların korozyon ürünleri ile ilişkilidir. Örneğin stentlerden salınan korozyon ürünleri doğrudan kan damarlarını etkilerken ortopedik implantlardan salınan ürünler ise ekstrasellüler sıvıyı etkiler. Yapılan bir çalışmaya göre alaşımlardan korozyondan dolayı salınan ürünlerin etkisi hücreden hücreye değişiklik sergilemektedir (Feyerabend ve ark. 2010). Ayrıca Mg, Y, Gd, Ce ve Nd ile yapılan bir çalışmada bu elementlerin metabolik aktiviteleri değiştirmedikleri görülmüştür (Drynda ve ark. 2009). Yapılan bir çalışmada Mg-tabanlı alaşımların stromal hücreleri desteklediği ve osteoblast benzeri fenotiplere farklılaşmasını teşvik ettiği gösterilmiştir (Pietak ve ark. 2008). Ayrıca U-2OS hücreleri (osteoblast hücre hattı) Mg ile kültüre edildiğinde hücre canlılığının veya hücre proliferasyonunun, mineralizasyonunun değişmediği gösterilmiştir (Yun ve ark. 2009). Yapılan çeşitli çalışmalarda magnezyum alaşımlarının yeni kemik yapımını teşvik edici özellik sergilediği gösterilmiştir (Yamasaki ve ark. 2002, Zreiqat ve ark. 2002, Yamasaki ve ark. 2003, Revell ve ark. 2004).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. hFOB1.19 Hücre Kültürü

hFOB1.19 hücre dizileri (ATCC, LGC Promochem, Teddington, UK; ATCC Numarası: CRL-11372) kemik gelişimi ile ilgili olarak *in vitro* çalışmalarda yaygın olarak kullanılan insan kemik osteoblastlarının SV40 T-antijenin ısıya duyarlı bir mutanı (tsA58) ile ölümsüzleştirilmesiyle elde edilen hücre dizileridir (Harris ve ark. 1995). hFOB1.19 hücreleri complete medium [CM; %10 buzağı serumu (fetal calf serum; FCS; Gibco, Invitrogen) ve %3 G418 (Sigma, Türkiye) içeren Dulbecco Modifiye Edilmiş/F12 (DMEM/F-12; Gibco, Invitrogen)] vasatta 75cm²'lik kültür flasklarında ve 24 kuyucuk (well) içeren kültür kaplarında (plate) (Thermo, Türkiye) %95 nem, %5 CO₂ ve 34 °C sağlayan inkübatörde üretildi. Kültür vasatı haftada iki kez değiştirildi ve hücreler kültür kaplarının yüzeyini %70-80 oranında kapladıktan sonra deneylerde kullanıldı.

3.2. Partikül Süspansiyonunun Hazırlanması

Çalışmada kullanılan Mg-Y-RE-12, Mg-Y-RE -13 ve Mg-Y-RE -24 nolu alaşımlar, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Mikro/Nano Mekanik Karakterizasyon Laboratuvarında TÜBİTAK tarafından öncelikli alanlar başlığında desteklenen 213M699 nolu proje kapsamında Doç. Dr. Osman ŞAHİN ve ekibi tarafından üretilmiştir. Partiküller 0-1000 µg/ml dozlarda serumsuz vasat [FCS içermeyen serum free medium; DMEM/F12 ve %3 G418 içeren vasat; SF] içinde hazırlanarak deneylerde kullanıldı.

3.3. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Hücrelerin canlılığı tetrazolium tuzu 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide'in (MTT) bir çözünmez formazan boyasına metabolik aktivitenin bir göstergesi olan mitokondriyal enzimler tarafından indirgenmesi esasına

dayanan ve bu şekilde canlı hücre sayısını yansıtan yöntem ile değerlendirildi (Bayram ve ark. 2013). hFOB1,19 hücre dizileri 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına (Thermo, Türkiye) her bir kuyuya 0,5 ml (5000 hücre/ml) olacak şekilde CM vasat içerisinde ekimi yapıldı. Hücreler kuyucukların tabanını %70-80 oranında kapladıktan sonra SF vasat içinde 24 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra, aynı vasat içinde hazırlanmış 0-1000 µg/ml Mg-Y-RE-12, -13 ve -24 numaralı alaşımlara 24, 48 ve 72 saat süreliğine maruz bırakıldı. Süre sonunda hücrelerin üzerindeki kültür vasatı toplanarak ELISA yöntemiyle protein analizi çalışmalarında kullanılmak üzere -80⁰C'de saklandı. 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarının tabanına yapışık olarak kalan hücreler 0,5 ml 1 mg/ml MTT (Sigma, Türkiye) ile 1 saat inkübe edildi. Daha sonra MTT solüsyonu döküldü ve hücrelerin üzerine 0,5 ml dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma, Türkiye) konuldu. Renkteki değişim kolorometrik bir okuyucu olan spektrofotometre (Thermo, Multiskan GO) ile 550 nm'de okutuldu.

3.4. Protein seviyesinin belirlenmesi

hFOB1.19 hücrelerinin canlılığının değerlendirilmesi çalışmalarında 0, 400 ve 1000 µg/ml'lik dozları 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde alaşımlara maruz bırakılan hücrelerden elde edilen süpernatantlar -80⁰C'de saklanıp, daha sonra ELISA yöntemiyle protein seviyesinin belirlenmesinde kullanıldı. Hücre süpernatantlarından RANKL, OPG, MMP-1, TNF- α , IL-1 β , TGF- β , BMP (bone morpho genetic protein; kemik morfogenetik protein), 2, BMP-7 proteinlerin seviyeleri üretici firmanın (R&D systems; Albio, Türkiye) direktifleri doğrultusunda belirlendi.

3.5. Kantitatif Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT- PCR)

Gen ekspresyon analizleri için hücre canlılığı değerlendirilmesinde belirlenen optimum doz ve maruziyet süreleri kullanıldı. Tasarımı yapılan bu implantlar canlı sistem içerisinde uzun süre kalacağından dolayı gen ekspresyon analizinde 72. saat optimum maruziyet süresi olarak belirlendi. Mg-Y-RE alaşımlarının 1000 µg/ml konsantrasyonu

etkili en yüksek doz olarak ve 400 µg/ml konsantrasyonu hücre canlılığını etkilemeyen en yüksek doz olarak belirlendi. Bu nedenle gen ekspresyon analizi çalışmalarında 0, 400 ve 1000 µg/ml doz ve 72 saatlik maruziyet süreleri kullanıldı.

hFOB1.19 hücreleri 5000 hücre/ml olacak şekilde CM vasat içerisinde 75 cm²'lik hücre kültür kabına (Thermo, Türkiye) ekimi yapıldı. %95 nem, %5 CO₂ ve 34 °C sağlayan inkübatörde üretildi. Hücre kültür kaplarının yüzeyinin %70-80'ini kaplayınca (ortalama 72 saat) kültür kaplarının içindeki vasat uzaklaştırılıp, SF ile 24 saat inkübe edildi. SF içinde 24 saat inkübe edildikten sonra SF vasat içinde 0, 400 ve 1000 µg/ml dozlarda hazırlanmış Mg-Y-RE-12, -13, -24 alaşımlarına 72 saat süreyle maruz bırakıldı. İnkübasyonun sonunda Mg-Y-RE alaşımlı vasat uzaklaştırılıp kabın dibine yapışık halde bulunan hücreler HBSS (hank's balanced salt solution; hank's balanced tuz çözelti; Gibco, Türkiye) ile iki defa yıkandıktan sonra tripsin (Sigma, Türkiye) ile kaldırıldı ve elde edilen hücrelerden ticari kitler (miRNeasy Mini Kit, Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firmanın direktifleri doğrultusunda total RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen total RNA reverse transkripsiyon kiti (RT²HT First Strand Kit, Qiagen, Amerika) kullanılarak üretici firmanın direktifleri doğrultusunda cDNA'ya dönüştürüldü. Araştırılan gen ekspresyon düzeyleri 'real time' PCR yöntemiyle Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya) cihazı kullanılarak kuantifiye edildi. MMP1, NFκB1, BMP2, BMP7, SPP1 (secreted phospho protein 1; salgılanmış fosfoprotein 1), RANKL, OPG (osteoprotegrin), BGLAP (bone gamma-carboxy glutamate (gla) protein; kemik gama-karboksil glutamat (gla) protein), UCMA (upper zone of growth plate and cartilage matrix associated), MGP (matrix gla protein), UTS2 (urotensin 2) genlerinin ekspresyon düzeyleri belirlendi. Gen ekspresyonunun normalizasyonu için GAPDH ve ACTB 'ev' ('house keeping') genleri kullanıldı.

3.6. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasında verilerinin değerlendirilmesinde GraphPed Prism 5 (GraphPed Software Inc. USA) programı kullanıldı. Verilerin normal dağılımlı olup olmadıkları değerlendirilmesinde "D'Agostino & Pearson omnibus normality test" kullanıldı. Sonuca göre; hücre canlılığı verilerinin analizinde GraphPed Prism 5 (GraphPed Software Inc.

USA) programı kullanılarak tek yönlü varyans analizinin (One-way analysis of variance, ANOVA) Dunnett's çoklu karşılaştırma testi (Dunnett's Multiple Comparison Test) yapıldı. Gen ekspresyon miktarlarının analizi fold regulation ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) yöntemine göre hesaplandı. Böylelikle ilgili genlerin ekspresyon miktarlarının kaç kat arttığı/azaldığı belirlendi. Gen ekspresyonunda istatistiki değerlendirme deney ve kontrol gruplarının $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin Student t-test ile kıyaslanması ile yapıldı. 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

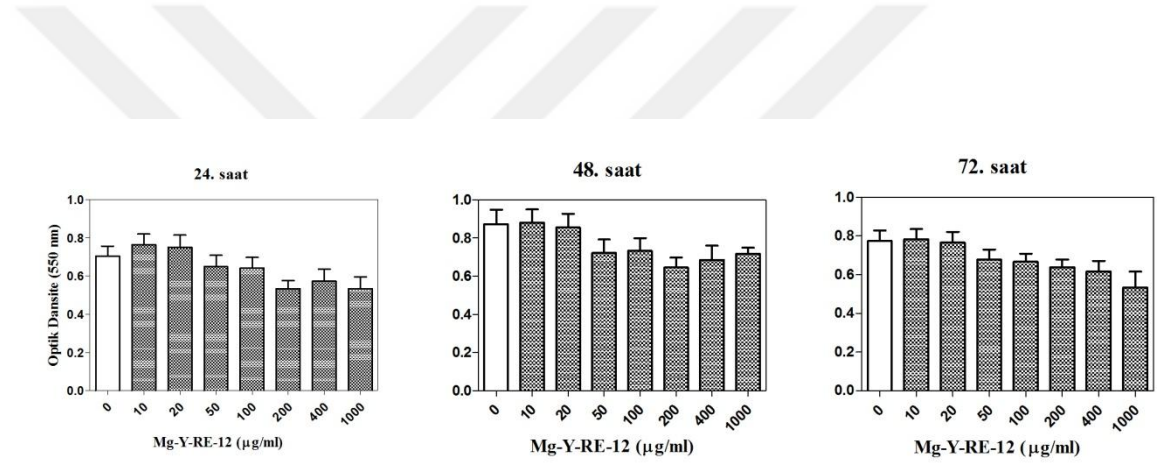


4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

4.1.1. Mg-Y-RE-12 Alaşımının hFOB1.19 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

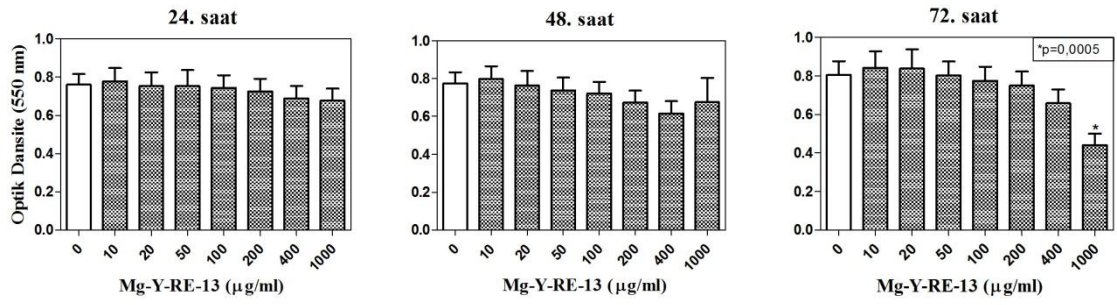
hFOB1.19 hücreleri Mg-Y-RE-12 alaşımının 0-1000 µg/ml konsantrasyonları ile 24-72 saat süre inkübe edilmesi sonucunda Mg-Y-RE-12 alaşımının hFOB1.19 hücrelerinin canlılığı üzerine anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı bulundu (Şekil 4.1 ve çizelge 4.1).



Şekil 4.1. Mg-Y-RE-12 alaşımının hFOB1.19 hücre canlılığı üzerine olan etkisi.

4.1.2. Mg-Y-RE-13 Alaşımının hFOB1.19 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

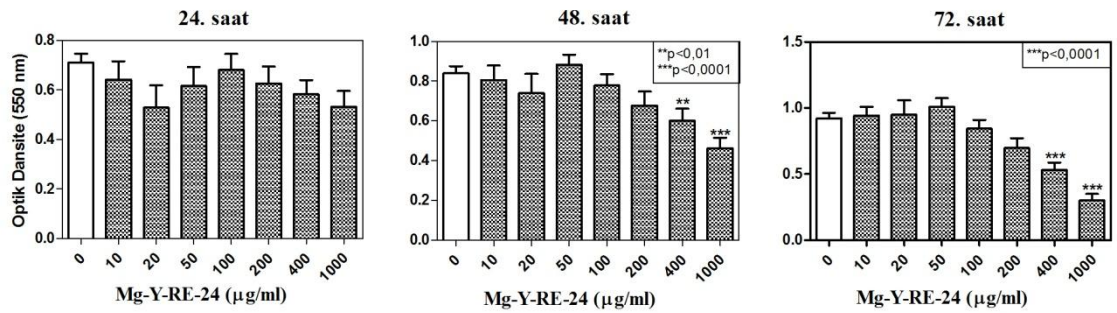
Mg-Y-RE-13 alaşımı 72. saatte 1000 µg/ml konsantrasyonda kontrol grubu (0 µg/ml Mg-Y-RE-13) ile kıyaslandığında hFOB1.19 hücre canlılığını baskıladığı ($p=0,0005$), diğer konsantrasyonlarda ve inkübasyon sürelerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı bulundu (Şekil 4.2 ve çizelge 4.1).



Şekil 4.2. Mg-Y-RE-13 alaşımının hFOB1.19 hücre canlılığı üzerine olan etkisi.

4.1.3. Mg-Y-RE-24 Alaşımının hFOB1.19 Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

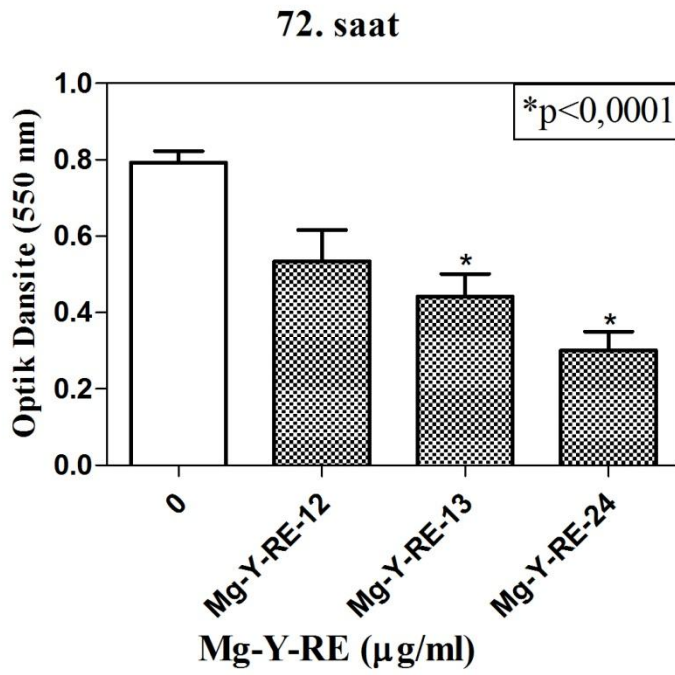
Mg-Y-RE-24 alaşımı 24. saatte hiçbir dozda hücre canlılığında anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı; 48. saatte 400 µg/ml ($p < 0,01$) ve 1000 µg/ml ($p < 0,0001$) konsantrasyonda; 72. saatte 400 ve 1000 µg/ml ($p < 0,0001$) konsantrasyonda kontrol grubu ile kıyaslandığında (0 µg/ml Mg-Y-RE-24) hFOB1.19 hücre canlılığını baskıladığı, diğer konsantrasyonlarda ise hücre canlılığında anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı gözlemlendi (Şekil 4.3 ve çizelge 4.1).



Şekil 4.3. Mg-Y-RE-24 alaşımının hFOB1.19 hücre canlılığı üzerine olan etkisi.

4.1.4. Mg-Y-RE Alaşımlarının 1000 µg/ml Konsantrasyonunun hFOB1.19 H¼cre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

Mg-Y-RE-13 ve Mg-Y-RE-24 alaşımlarının 72. saatte 1000 µg/ml ($p<0,0001$) konsantrasyonları hFOB1.19 h¼cre canlılığını baskıladığı; Mg-Y-RE-12 alaşımının ise hi¼bir dozda h¼cre canlılığı üzerinde anlamlı bir değişikliğe yol a¼madıęı gözlemlendi (şekil 4.4 ve ¼izelge 4.1).



şekil 4.4. Mg-Y-RE alaşımlarının 1000 µg/ml konsantrasyonlarının 72. saatte hFOB1.19 h¼cre canlılığı üzerine olan etkisi.

Çizelge 4.1. Mg-Y-RE alaşımlarının hFOB1.19 hücre canlılığı üzerine olan etkisi. Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

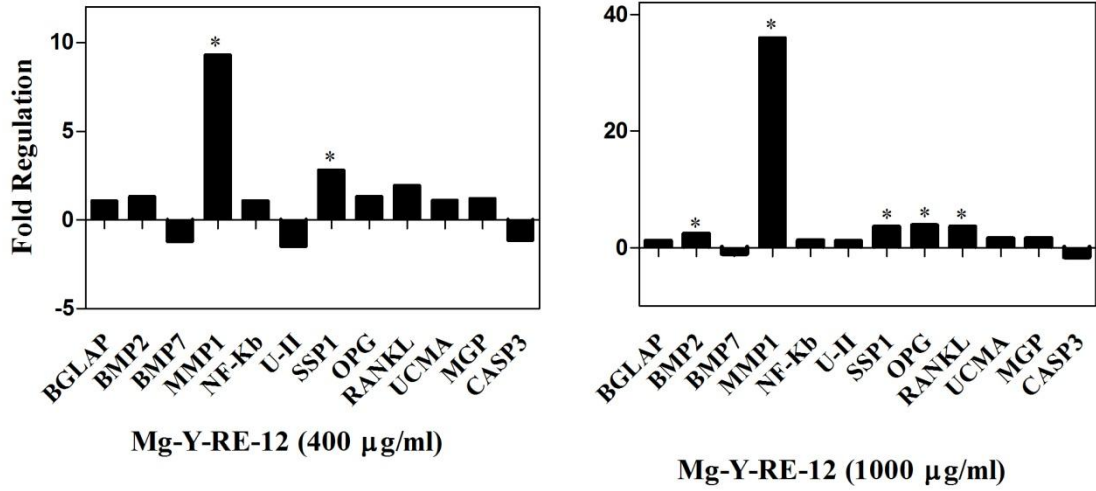
| Alaşım | µg/ml | 24.saat | 48.saat | 72.saat |
|-------------------|-------------------|-------------|------------|------------|
| Mg-Y-RE-12 | 0 | 0,70±0,052 | 0,87±0,075 | 0,77±0,055 |
| | 10 | 0,76±0,056 | 0,88±0,069 | 0,78±0,053 |
| | 20 | 0,75±0,063 | 0,85±0,071 | 0,76±0,056 |
| | 50 | 0,65±0,06 | 0,72±0,069 | 0,67±0,052 |
| | 100 | 0,64±0,057 | 0,73±0,066 | 0,66±0,042 |
| | 200 | 0,53±0,045 | 0,64±0,053 | 0,64±0,039 |
| | 400 | 0,57±0,063 | 0,68±0,074 | 0,61±0,053 |
| | 1000 | 0,53±0,062 | 0,72±0,031 | 0,53±0,081 |
| | Mg-Y-RE-13 | 0 | 0,76±0,055 | 0,77±0,056 |
| 10 | | 0,78±0,068 | 0,79±0,067 | 0,84±0,08 |
| 20 | | 0,758±0,073 | 0,76±0,078 | 0,83±0,1 |
| 50 | | 0,758±0,085 | 0,74±0,068 | 0,80±0,07 |
| 100 | | 0,74±0,065 | 0,72±0,060 | 0,77±0,072 |
| 200 | | 0,72±0,066 | 0,67±0,061 | 0,75±0,073 |
| 400 | | 0,69±0,067 | 0,61±0,066 | 0,66±0,073 |
| 1000 | | 0,67±0,065 | 0,67±0,13 | 0,44±0,06 |
| Mg-Y-RE-24 | | 0 | 0,71±0,035 | 0,84±0,036 |
| | 10 | 0,64±0,074 | 0,80±0,075 | 0,94±0,066 |
| | 20 | 0,53±0,09 | 0,74±0,098 | 0,95±0,11 |
| | 50 | 0,61±0,076 | 0,88±0,05 | 1,01±0,06 |
| | 100 | 0,68±0,064 | 0,78±0,055 | 0,84±0,06 |
| | 200 | 0,62±0,068 | 0,67±0,071 | 0,69±0,073 |
| | 400 | 0,58±0,058 | 0,60±0,059 | 0,53±0,057 |
| | 1000 | 0,53±0,064 | 0,46±0,053 | 0,301±0,05 |

4.2. Osteoblastik Aktivitede Rol Alan Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

4.2.1. Mg-Y-RE-12 Alaşımının Osteoblastik Aktivitede Rol Alan Genlere Etkisi

hFOB1.19 hücreleri Mg-Y-RE-12 alaşımı ile 0, 400, 1000 µg/ml dozlar ile 72 saat süre inkübe edildiğinde Mg-Y-RE-12 alaşımının 72. saatte 400 µg/ml'lik dozu kontrol grubuna (0 µg/ml) göre MMP1 geninin ekspresyonu 9,3 kat ve SSP1 geninin ekspresyonu 2,8 kat arttırdığı bulundu.

Mg-Y-RE-12 alaşımının 1000 µg/ml'lik dozu kontrol grubu (0 µg/ml) ile karşılaştırıldığında ise BMP2 geninin ekspresyonu 2,3 kat, MMP1 geninin ekspresyonununun 36 kat, SSP1 geninin ekspresyonununun 3,6 kat, OPG geninin ekspresyonu 3,8 kat, RANKL geninin ekspresyonu 3,6 kat arttığı bulundu (şekil 4.5 ve çizelge 4.2).



şekil 4.5. Mg-Y-RE-12 alaşımının osteoblastik aktivite rol alan genlere etkisi (*2 kat ve üzerindeki değişimi simgelemektedir).

Çizelge 4.2. Mg-Y-RE-12 alışıının osteoblastik aktivite rol alan genlere etkisi.

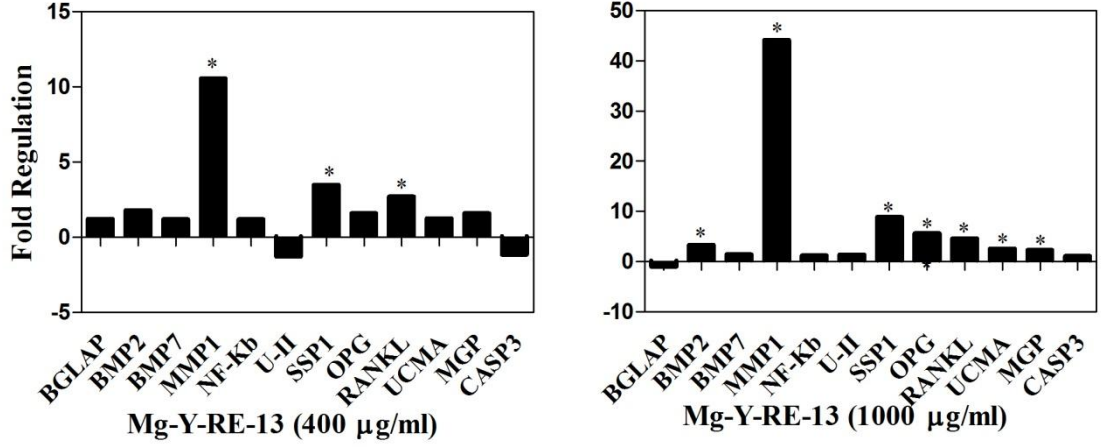
| Genler | Mg-Y-RE-12 ($\mu\text{g/ml}$) | | | | |
|--------------|---------------------------------|--------------------------|----------|---------------------------|----------|
| | 0 | 400 ($\mu\text{g/ml}$) | | 1000 ($\mu\text{g/ml}$) | |
| | $2^{-\Delta\text{Ct}}$ | $2^{-\Delta\text{Ct}}$ | p değeri | $2^{-\Delta\text{Ct}}$ | p değeri |
| BGLAP | 0,12 | 0,127 | | 0,14 | |
| BMP2 | 0,000033 | 0,000044 | | 0,0001 | 0,033 |
| BMP7 | 0,0005 | 0,00044 | | 0,0005 | |
| MMP1 | 0,04 | 0,4 | 0,0001 | 1,5 | 0,0001 |
| NF-b | 0,3 | 0,32 | | 0,4 | |
| U-II | 0,005 | 0,0033 | | 0,006 | |
| SSP1 | 0,5 | 1,33 | 0,0053 | 1,7 | 0,0002 |
| OPG | 0,23 | 0,3 | | 0,87 | 0,0001 |
| RANKL | 0,001 | 0,0017 | | 0,0032 | 0,0001 |
| UCMA | 0,0017 | 0,002 | | 0,003 | 0,024 |
| MGP | 0,004 | 0,006 | | 0,0073 | 0,0033 |
| CASP3 | 1,01 | 0,87 | | 0,62 | |

Her bir gen için verilen p değeri; Mg-Y-RE-12 alışıının 0, 400 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ dozlardaki ilgili genin ekspresyon seviyeleri, ACTB ve GAPDH house keeping genlerinin aritmetik ortalamaları kullanılıp $2^{-\Delta\text{Ct}}$ değerleri hesaplandı. 400 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ dozlar için hesaplanan $2^{-\Delta\text{Ct}}$ değerleri kontrol grubu (0 $\mu\text{g/ml}$) ile Student t testi kullanılarak kıyaslandı.

4.2.2. Mg-Y-RE-13 Alışıının Osteoblastik Aktivitede Rol Alan Genlere Etkisi

hFOB1.19 hücreleri Mg-Y-RE-13 alışıını ile 72 saat inkübe edildiğinde Mg-Y-RE-13 alışıının 400 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozu kontrol grubuna (0 $\mu\text{g/ml}$) göre MMP1 geninin ekspresyonu 10,6 kat ve SSP1 geninin ekspresyonu 3,5 kat, RANKL geninin ekspresyonunun 2,7 kat arttırdığı bulundu.

Mg-Y-RE-13 alışıının 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozu kontrol grubuna (0 $\mu\text{g/ml}$) göre BMP2 geninin ekspresyonunun 3,3 kat, MMP1 geninin ekspresyonunun 44,2 kat, SSP1 geninin ekspresyonunun 8,9 kat, OPG geninin ekspresyonunun 5,6 kat, RANKL geninin ekspresyonunun 4,6 kat, UCMA geninin ekspresyonunun 2,6 kat, MGP geninin ekspresyonunun 2,3 kat arttığı bulundu (Şekil 4.6 ve çizelge 4.3).



Şekil 4.6. Mg-Y-RE-13 alışıının osteoblastik aktivite rol alan genlere etkisi (*istatistiki olarak 2 kat ve üzerindeki değişimi simgelemektedir.)

Çizelge 4.3. Mg-Y-RE-13 alışıının osteoblastik aktivite rol alan genlere etkisi

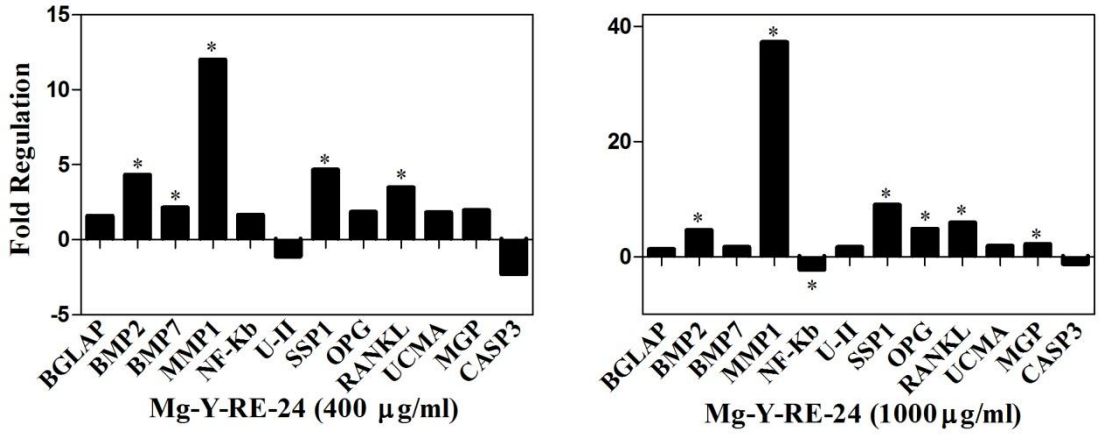
| Gen | Mg-Y-RE-13 (µg/ml) | | | | |
|--------------|--------------------|-------------------|----------|-------------------|----------|
| | 0 | 400 | | 1000 | |
| | 2 ^{-ΔCt} | 2 ^{-ΔCt} | p değeri | 2 ^{-ΔCt} | p değeri |
| BGLAP | 0,12 | 0,14 | 0,022 | 0,115 | |
| BMP2 | 0,000033 | 0,00006 | | 0,00011 | 0,02 |
| BMP7 | 0,0005 | 0,0006 | | 0,0008 | |
| MMP1 | 0,04 | 0,45 | 0,0057 | 1,87 | 0,0001 |
| NF-Kb | 0,3 | 0,36 | | 0,35 | |
| U-II | 0,005 | 0,004 | | 0,01 | |
| SSP1 | 0,5 | 1,65 | | 4,2 | 0,001 |
| OPG | 0,23 | 0,36 | | 1,28 | 0,0001 |
| RANKL | 0,001 | 0,0024 | 0,0073 | 0,0041 | 0,0001 |
| UCMA | 0,0017 | 0,0021 | | 0,0044 | 0,002 |
| MGP | 0,004 | 0,0072 | 0,01 | 0,01 | 0,0024 |
| CASP3 | 1,01 | 0,87 | | 1,11 | |

Her bir gen için verilen p değeri; Mg-Y-RE-13 alışıının 0, 400 ve 1000 µg/ml dozlardaki ilgili genin ekspresyon seviyeleri, ACTB, GAPDH house keeping genler birlikte kullanılıp, normalizasyonu yapılarak 2^{-ΔCt} değerleri hesaplandı. 400 ve 1000 µg/ml dozlar için hesaplanan 2^{-ΔCt} değerleri kontrol grubu (0 µg/ml) ile Student t testi kullanılarak kıyaslandı

4.2.3. Mg-Y-RE-24 Alaşımının Osteoblastik Aktivitede Rol Alan Genlere Etkisi

hFOB1.19 hücreleri Mg-Y-RE-24 alaşımı ile 72 saat boyunca 0, 400, 1000 µg/ml dozlar ile inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda Mg-Y-RE-24 alaşımının 400 µg/ml'lik dozu kontrol grubu (0 µg/ml) ile karşılaştırıldığında BMP2 geninin ekspresyonu 4,3 kat; BMP7 geninin ekspresyonu 2,2 kat; MMP1 geninin ekspresyonu 12,1 kat; SSP1 geninin ekspresyonu 4,7 kat; RANKL geninin ekspresyonu 3,5 kat arttığı; CASP3 geninin ekspresyonu ise 2,3 kat azaldığı bulundu.

Mg-Y-RE-24 alaşımının 1000 µg/ml'lik dozu kontrol grubu (0 µg/ml) ile karşılaştırıldığında BMP2 geninin ekspresyonu 4,7 kat, MMP1 geninin ekspresyonu 37,2 kat, SSP1 geninin ekspresyonu 9 kat, OPG geninin ekspresyonu 4,8 kat, RANKL geninin ekspresyonu 6 kat, MGP geninin ekspresyonu 2,3 kat arttığı; NF-κB geninin ekspresyonu 2,2 kat azaldığı bulundu (Şekil 4.7 ve çizelge 4.4).



Şekil 4.7. Mg-Y-RE-24 alaşımının osteoblastik aktivite rol alan genlere etkisi. (*istatistik olarak 2 kat ve üzerindeki değişimi simgelemektedir.)

Çizelge 4.4. Mg-Y-RE-24 alışıının osteoblastik aktivite rol alan genlere etkisi

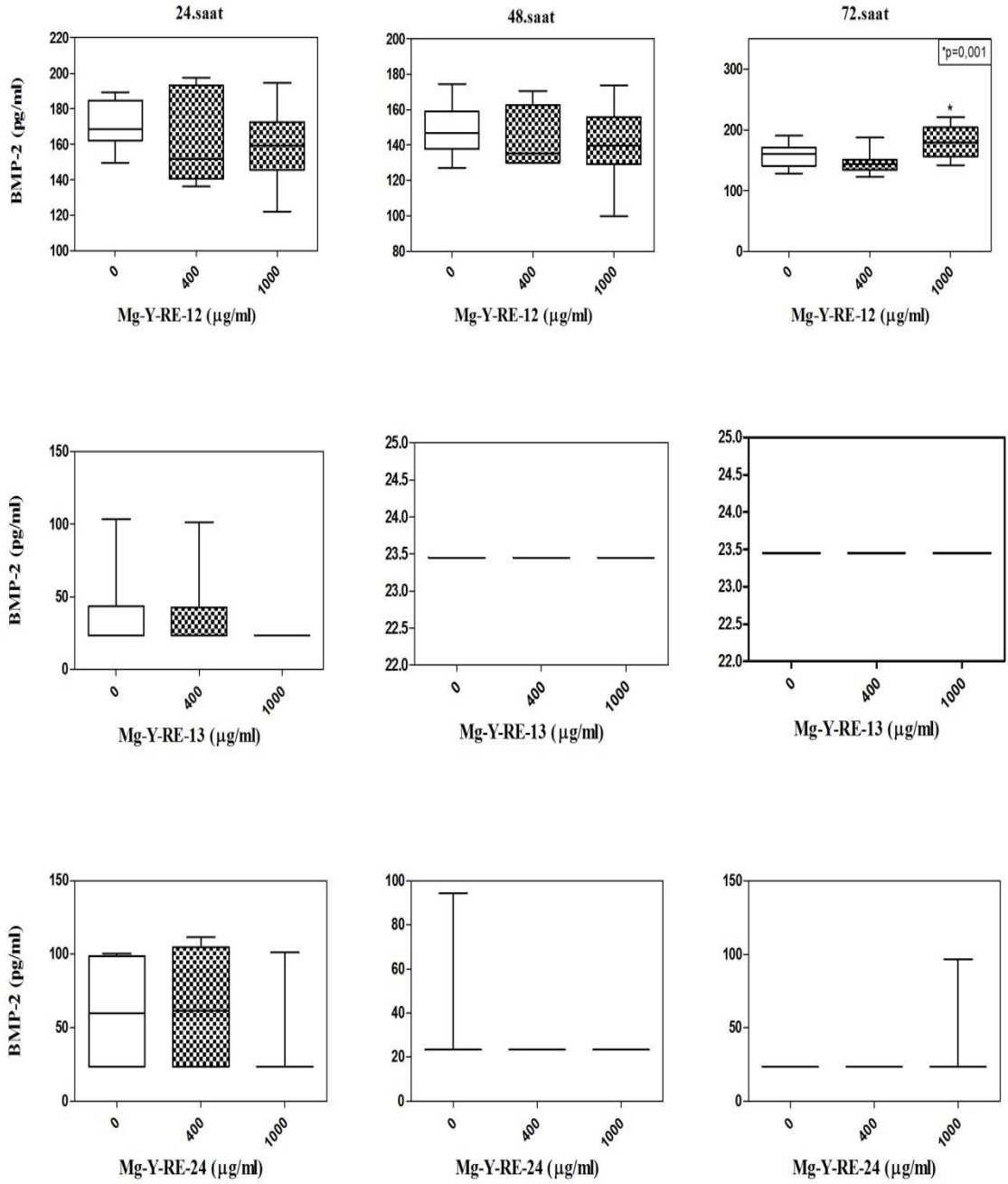
| Gen | Mg-Y-RE-24 ($\mu\text{g/ml}$) | | | | |
|--------------|---------------------------------|------------------------|----------|------------------------|----------|
| | 0 | 400 | 1000 | | |
| | $2^{-\Delta\text{Ct}}$ | $2^{-\Delta\text{Ct}}$ | p değeri | $2^{-\Delta\text{Ct}}$ | p değeri |
| BGLAP | 0,12 | 0,19 | 0,032 | 0,161 | 0,01 |
| BMP2 | 0,000033 | 0,0001 | 0,0003 | 0,0001 | 0,0001 |
| BMP7 | 0,0005 | 0,001 | 0,03 | 0,001 | |
| MMP1 | 0,04 | 0,507 | 0,015 | 1,6 | 0,0002 |
| NF-Kb | 0,3 | 0,5 | 0,03 | 0,134 | |
| U-II | 0,005 | 0,004 | | 0,01 | 0,01 |
| SSP1 | 0,5 | 2,21 | | 4,26 | 0,00024 |
| OPG | 0,23 | 0,42 | 0,014 | 1,11 | 0,0001 |
| RANKL | 0,001 | 0,0031 | 0,0017 | 0,0053 | 0,0001 |
| UCMA | 0,0017 | 0,0031 | 0,012 | 0,0032 | 0,014 |
| MGP | 0,004 | 0,009 | 0,02 | 0,01 | 0,00013 |
| CASP3 | 1,01 | 0,44 | | 0,83 | |

Her bir gen için verilen p değeri; Mg-Y-RE-24 alışıının 0, 400 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ dozlardaki ilgili genin ekspresyon seviyeleri, ACTB, GAPDH house keeping genler birlikte kullanılıp, normalizasyonu yapılarak $2^{-\Delta\text{Ct}}$ değerleri hesaplandı. 400 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ dozlar için hesaplanan $2^{-\Delta\text{Ct}}$ değerleri kontrol grubu (0 $\mu\text{g/ml}$) ile Student t testi kullanılarak kıyaslandı.

4.3. Osteoblastik Aktivitede Rol Alan Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

4.3.1. Mg-Y-RE Alışıının BMP-2 Protein Düzeyine Etkileri

Mg-Y-RE alışıının BMP-2 salınımı üzerindeki etkilerine bakıldı. Mg-Y-RE-12 alışıının 24. ve 48. saatlerde 400 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ dozları kontrol grubu (0 $\mu\text{g/ml}$) ile karşılaştırıldığında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı, ancak 72. saatte 1000 $\mu\text{g/ml}$ dozunun BMP-2 protein seviyesini anlamlı derecede ($p=0,001$) arttırdığı bulundu. Mg-Y-RE-13 ve Mg-Y-RE-24 alışııları 24-72. saatlerde 400 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ dozlar kontrol grubu (0 $\mu\text{g/ml}$) ile karşılaştırıldığında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı bulundu (Şekil 4.8 ve çizelge 4.5).



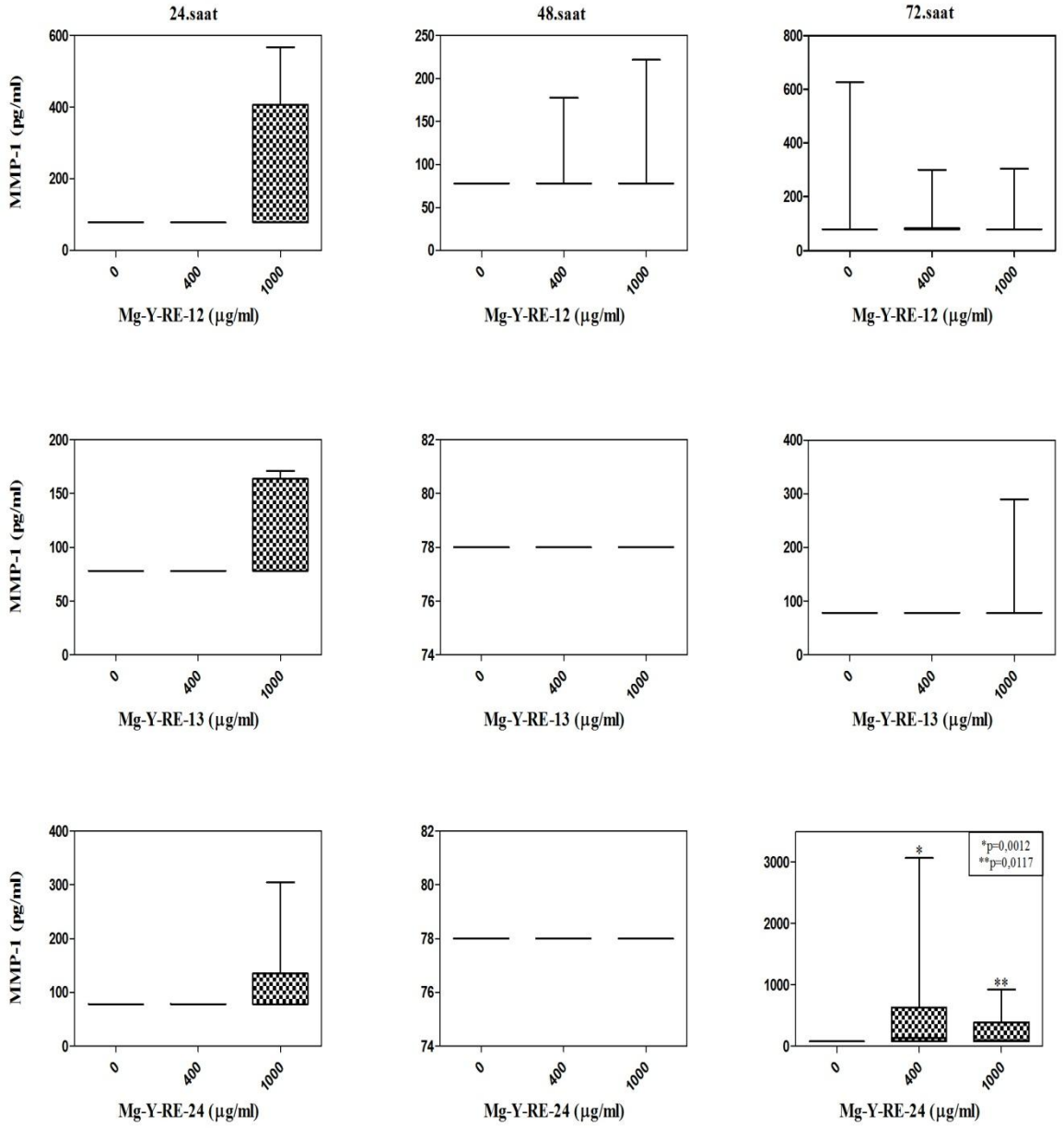
Şekil 4.8. Mg-Y-RE alaşımlarının BMP-2 protein düzeyine etkileri

Çizelge 4.5. Mg-Y-RE alaşımlarının BMP-2 protein düzeyine etkileri Veriler ortalama±standart hata, olarak verilmiştir. * Analiz edilemeyecek kadar düşük BMP-2 seviyesi.

| | µg/ml | 24. saat | 48. saat | 72. saat |
|-------------------|-------------|--------------|------------|------------|
| Mg-Y-RE-12 | 0 | 170,9±5,73 | 148,1±5,22 | 156,9±5,44 |
| | 400 | 161,9±10,68 | 143,5±7,13 | 145,6±4,67 |
| | 1000 | 159±5,801 | 140,2±5,71 | 182±6,03 |
| Mg-Y-RE-13 | 0 | 36,82±13,37 | * | * |
| | 400 | 36,44±13 | * | * |
| | 1000 | * | * | * |
| Mg-Y-RE-24 | 0 | 60,92±16,77* | 29,9±6,45* | * |
| | 400 | 64,07±18,23 | * | * |
| | 1000 | 29,92±6,47 | * | 29,57±6,12 |

4.3.2. Mg-Y-RE Alaşımlarının MMP-1 Protein Düzeyine Etkileri

Mg-Y-RE alaşımlarının MMP-1 protein düzeyine etkilerine bakıldığında 24. saatte her üç alaşımlarının hiçbir dozda MMP-1 protein düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı, 48-72. saatlerde. Mg-Y-RE-12 ve Mg-Y-RE-13 alaşımlarının 0-1000 µg/ml dozlarında MMP-1 proteinin ölçülemeyecek kadar düşük miktarda olduğu görüldü. Mg-Y-RE-24 alaşımlarının sadece 72. saatte 400 ve 1000 µg/ml dozları kontrol grubu (0 µg/ml) ile karşılaştırıldığında 400 µg/ml (p=0,0012) ve 1000 µg/ml (p=0,0117) dozlarının MMP-1 protein düzeyini anlamlı derecede arttırdığı bulundu (Şekil 4.9 ve çizelge 4.6).



Şekil 4.9. Mg-Y-RE alaşımlarının MMP-1 protein düzeyine etkileri

Çizelge 4.6. Mg-Y-RE alaşımlarının MMP-1 protein düzeyine etkileri. Veriler ortalama±standart hata, olarak verilmiştir. * Analiz edilemeyecek kadar düşük MMP-1 seviyesi.

| | $\mu\text{g/ml}$ | 24.saat | 48.saat | 72.saat |
|-------------------|------------------|-------------|-------------|--------------|
| Mg-Y-RE-12 | 0 | * | * | 123,7±45,68* |
| | 400 | * | 90,42±12,42 | 95,07±13,81 |
| | 1000 | 205,4±85,18 | 89,98±11,98 | 108,5±16,94 |
| Mg-Y-RE-13 | 0 | * | * | * |
| | 400 | * | * | * |
| | 1000 | 107,4±18,63 | * | 94,21±11,54 |
| Mg-Y-RE-24 | 0 | * | * | * |
| | 400 | * | * | 660,7±309,6 |
| | 1000 | 115,8±37,84 | * | 258,8±48,54 |

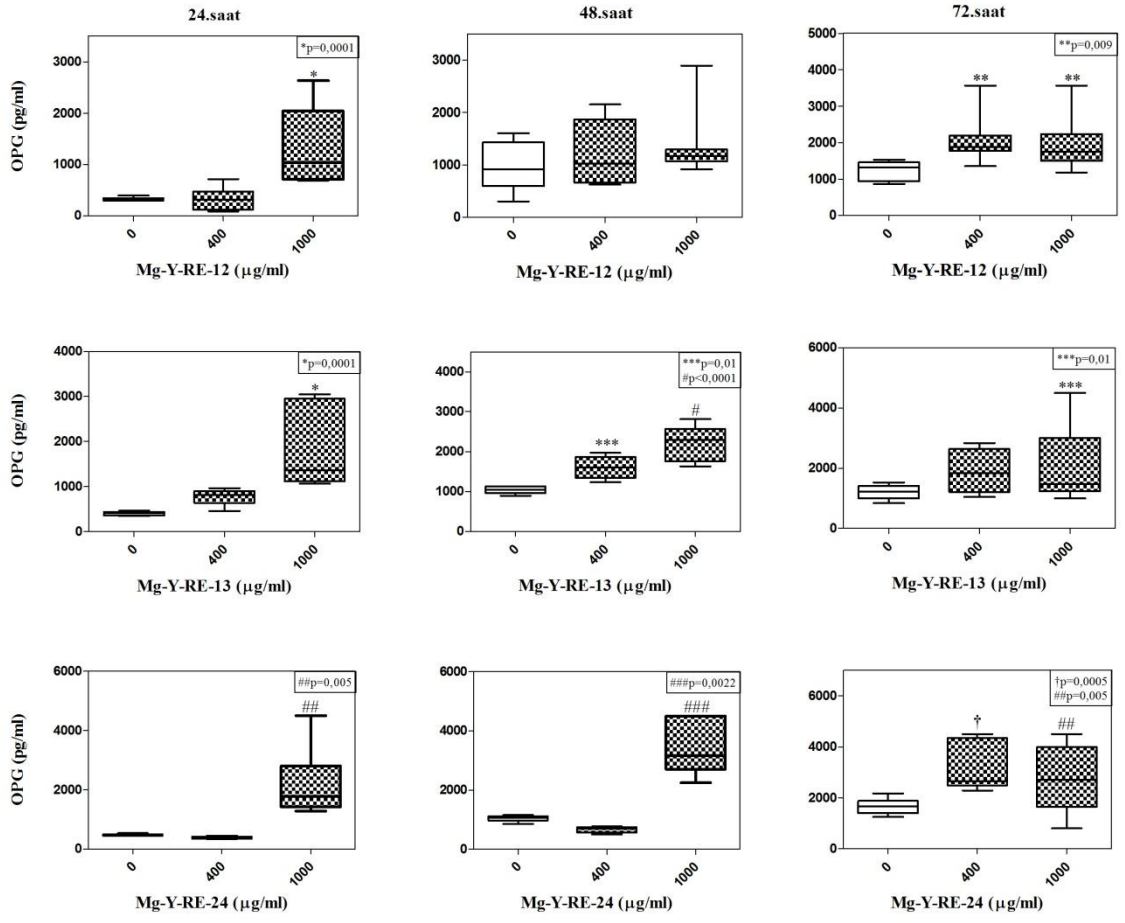
4.3.3. Mg-Y-RE Alaşımlarının OPG Protein Düzeyine Etkileri

Mg-Y-RE alaşımlarının 400 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ dozları kontrol grubu (0 $\mu\text{g/ml}$) ile karşılaştırılarak OPG protein seviyelerine etkilerine bakıldı.

Mg-Y-RE-12 alaşımının 24. saatte 1000 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,0001$) dozu OPG protein seviyesinin anlamlı derecede arttığı, 48. saatte anlamlı bir değişikliğe sebep olmazken 72. saatte 400 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,009$) dozların OPG protein seviyesini anlamlı derecede arttırdığı bulundu.

Mg-Y-RE-13 alaşımının 24. saatte 1000 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,0001$) dozu, 48. saatte 400 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,01$) ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ ($p<0,0001$) dozları; 72. saatte 1000 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,01$) dozu OPG protein seviyesini anlamlı derecede attırdığı bulundu.

Mg-Y-RE-24 alaşımının 24. ve 48. saatlerde 1000 $\mu\text{g/ml}$ dozu (sırasıyla $p=0,005$ ve $p=0,0022$), 72. saatte 400 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,0005$) ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik ($p=0,005$) dozu OPG protein seviyesini anlamlı derecede attırdığı bulundu (Şekil 4.10 ve çizelge 4.7).



Şekil 4.10. Mg-Y-RE alaşımlarının OPG protein düzeyine etkileri

Çizelge 4.7. Mg-Y-RE alaşımlarının OPG protein düzeyine etkileri. Veriler ortalama±standart hata, olarak verilmiştir.

| | µg/ml | 24. saat | 48. saat | 72. saat |
|-------------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 0 | 322,4±15,27* | 983,0±133,4* | 1224±77,68* |
| Mg-Y-RE-12 | 400 | 316,4±59,58 | 1179±218,0 | 2040 ±155,6 |
| | 1000 | 1325±314,6 | 1352±165,8 | 1959±197,1 |
| | 0 | 410,1±17,75 | 1036±38,63 | 1213±70,41 |
| Mg-Y-RE-13 | 400 | 771,6±71,80 | 1607±116,7 | 1902±199,0 |
| | 1000 | 1814±374,3 | 2223±180,8 | 2004±233,9 |
| | 0 | 469,8±15,07 | 1039±42,98 | 1661±73,26 |
| Mg-Y-RE-24 | 400 | 381,0±16,5 | 656,8±45,74 | 3232±269,2 |
| | 1000 | 2175±483,7 | 3403±372,6 | 2804±227,3 |

4.3.4. Mg-Y-RE Alaşımlarının BMP-7, RANKL, IL-1 β , TNF- α ve TGF- β Protein Düzeylerine Etkileri

hFOB1.19 hücreleri Mg-Y-RE alaşımlarının 0, 400 ve 1000 µg/ml dozlarına maruz bırakılarak BMP-7, RANKL, IL-1 β , TNF- α ve TGF- β protein seviyelerine etkilerine bakıldı. BMP-7, RANKL, IL-1 β , TNF- α ve TGF- β protein seviyelerinin analiz edilemeyecek kadar düşük seviyede olduğu gözlemlendi.

5. TARTIŞMA

Osteodejeneratif hastalıklar hem bireylerin sağlık kalitesi açısından hem de tedavisinin sağlık harcamalarına bindirdiği yük göz önüne alındığında önemli bir sağlık problemidir. Bu hastalıkların tedavisinde implant uygulamaları sıklıkla kullanılır. Kullanılan bu implantlar açısından ülkemiz büyük ölçüde dışa bağımlıdır ve bu durum sağlık harcamalarına ciddi yük bindirmektedir. Ayrıca obezite, hareketsiz yaşam tarzı gibi günümüzün önemli problemlerindeki artış göz önüne alındığında OA sıklığının artması kaçınılmaz bir durum olarak ortaya çıkmaktadır. Bu tez çalışması yukarıdaki sakıncaları gidermek için osteodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanan biyobozunur implant materyallerinin *in vitro* ortamda biyoyumluluğunu test etmeyi amaçlamaktadır. Çalışmamızda implantın *in vivo* etkileri hakkında fikir sahibi olmak için *in vitro* ortamda kemik dokusunun yapımından sorumlu olan ve salgıladığı bazı moleküller vasıtasıyla kemik yıkımına katkıda bulunan osteoblast hücre dizisi hFOB1.19 hücrelerini kullandık. Bu tez çalışması kapsamında osteodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanan Mg-Y-RE alaşımları Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Mikro/Nano Mekanik Karakterizasyon Laboratuvarından temin edilmiştir. Bu alaşımlardan Mg-Y-RE-12, Mg-Y-RE-13 ve Mg-Y-RE-24 alaşımlarının (i) hFOB1.19 hücre canlılığı üzerine olan etkileri, (ii) kemik yapım/yıkımında görev alan moleküller ve bu yolakları düzenleyen moleküllerin seviyelerine olan etkileri araştırıldı. Böylelikle tasarlanan alaşımların kemik dokuya olan biyoyumunun test edilmesi hedeflendi.

Mg-Y-RE-12 alaşımı hiçbir dozda ve maruziyet süresinde hFOB1.19 hücre canlılığını etkilemezken, Mg-Y-RE-13 alaşımı yalnızca 72. saatte 1000 µg/ml'lik dozda hücre canlılığını baskıladığını bulduk. Mg-Y-RE-24 alaşımı ise 24. saatte hiçbir dozda hücre canlılığında anlamlı bir değişikliğe neden olmazken, 48. ve 72. saatte 400 ve 1000 µg/ml dozlarda hücre canlılığını baskıladığını bulduk. Yapılan çeşitli *in vitro* ve *in vivo* (fare modeli) çalışmalarda magnezyum alaşımlarının yeni kemik yapımını teşvik edici özellik sergilediği gösterilmiştir (Yamasaki ve ark. 2002, Zreiqat ve ark. 2002, Yamasaki ve ark. 2003, Revell ve ark. 2004). Ancak magnezyuma katkılanan nadir toprak elementleri

magnezyumun özelliklerini güçlendirmesinin yanı sıra magnezyuma katkılanan bazı nadir toprak elementlerinin çeşidine ve konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığını baskılayabildiği gösterilmiştir (Li ve ark. 2008, Yun ve ark. 2009, Zhang ve ark. 2009, Berglund ve ark. 2012). Magnezyum alaşımlarıyla (Zn-3Mg) yapılan bir sitotoksite çalışmasında hücre canlılığının yaklaşık %50 oranında apoptoz yoluyla azaldığı rapor edilmiştir (Murni ve ark. 2015). Bir başka çalışmada magnezyum tabanlı alaşımların mutajenik ya da genotoksik olmadığı rapor edilmiştir (Pichler ve ark. 2014, Kubasek ve ark. 2016). Diğer yandan her üç alaşımın düşük dozları hücre canlılığını etkilemediği, ancak yüksek dozların (1000 µg/ml) alaşımın çeşidine bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkili olduğunu bulduk. Bu tez çalışmasında doz aşımını test etmek için 1000 µg/ml'lik dozu kullandık. Bu durum (1000 µg/ml'lik doz) yaşamla bağdaşmayan, *in vitro* ortamda doz aşımını test etmek için kullanılan ancak *in vivo* ortamda uygulanması güç olan bir durumdur. Bu nedenle Mg-Y-RE-13 ve Mg-Y-RE-24 alaşımlarının 1000 µg/ml'lik dozu hücre canlılığını baskılamasının nedeni bu alaşımların ilgili dozda toksik olduğu şeklinde yorumlanamayabilir. Çünkü kullanılan alaşım miktarında doz aşımına gidildiği için ilgili alaşımın toksik özelliklerinin yanı sıra dozun yüksek olmasından kaynaklanan ve hücrelerin ilgili alaşımlarla fiziki temasının arttığı bir durum ortaya çıkmaktadır. Bu fiziki temas hücre üzerinde nekrotik etki yaparak hücre canlılığını baskılamış olabileceğini düşünmekteyiz. Nitekim bu alaşımların hFOB1.19 hücre apoptozisi üzerine olan etkilerini değerlendirdiğimizde ilgili alaşımların apoptotik yolağı uyarmadığını bulduk.

Hücre canlılığı çalışmasında etkisiz en yüksek dozun 400 µg/ml, etkili en yüksek dozun 1000 µg/ml olduğu (doz aşımını test etmek için), en etkili maruziyet süresinin 72 saat olduğu görüldü. Bu nedenle Mg-Y-RE alaşımlarının osteoblastik aktivite üzerindeki etkileri araştırılırken 400 ve 1000 µg/ml dozları, 72 saat optimum maruziyet süresi olarak belirlendi. Gen ekspresyon çalışmalarında bu dozlar ve optimum maruziyet süresi kullanılmıştır. Osteoblastik aktivitede rol alan proteinlerin analizleri yapılırken ise 24-72 saat maruziyet süreleri ile 400 ve 1000 µg/ml dozlar kullanıldı.

Tasarlanan implant materyali osteodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılması hedeflenmektedir. Bu hedefe uygun olarak implantlar diz eklemine kemik içerisine, bir ucu sinoviyumda kalacak şekilde yerleştirilmesi (implante edilmesi) tasarlanmaktadır. Bu nedenle aday implant materyali kemik doku ile sıkı bir ilişki içerisinde olacaktır. Bu

durumda implant materyalinin kemik yapım/yıkımında ve bu sürecin idamesinde görev alan MMP1, NFκB1, BMP2, BMP7, SPP1, RANKL, OPG, BGLAP, TNF-α, IL-1β ve TGF-β gibi moleküller gen ekspresyon ve/veya protein seviyeleri belirlenerek bu alışımların kemik metabolizması üzerine olan/olması muhtemel etkilerin belirlenmesi hedeflendi.

Osteoblast ECM' sinin büyük kısmını oluşturan tip I kollajenin yıkımından sorumlu olan MMP1 enzimi kemik yıkımının bir belirteci olarak kullanılmaktadır ve artışı ECM yıkımının olacağına belirtisidir (Goldberg ve ark. 1986, Bay-Jensen ve ark. 2016). Çalışmamızda hFOB1.19 hücrelerini Mg-Y-RE alışımlarına maruz bıraktığımızda her üç alışımların da bu hücrelerde MMP1 gen ekspresyon seviyesini arttırdığını bulduk. Buna karşılık aynı örneklerdeki protein seviyelerini belirlediğimizde yalnızca Mg-Y-RE-24'ün MMP1 protein seviyesini arttırdığını gözledik. Bununla beraber her üç alışımda 24. saatte MMP1 protein seviyesini arttırmasına rağmen, bu durumun 48. saatte ortadan kalktığı görülmektedir. Mg ve türevleri maddeler hızlı oksitlenme özelliğine sahiptir. Bu alışımlar hücre kültürü ortamına ilk tatbik edildiklerinde okside olurlar ve Mg(OH)₂ oluşur ve hidrojen gazı salınır (Persaud-Sharma ve McGoron 2012). Bizim hipotezimize göre hücrelerin bu alışımlarla ilk teması sonucunda ortaya çıkan bu duruma yanıt olarak sebebini bilemediğimiz bir şekilde MMP1 seviyesinin artışına neden olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda Mg-Y-RE alışımlarının TGF-β ailesinin bir üyesi olan BMP2 gen ve protein seviyeleri üzerine etkileri araştırıldı. BMP2 osteoindüktif özelliklere sahiptir ve MSC'lerin kemik, kıkırdak ve adipoz dokuya farklılaşmasının düzenlenmesinde görev alır (Wozney ve ark. 1988, Sampath ve ark. 1990). Bu tez çalışmasına konu olan her üç alışımların da BMP2 gen ekspresyon seviyesini arttırdığını gözledik. Bizim bulgularımıza göre yalnızca Mg-Y-RE-12 alışımda protein seviyesinin bu duruma eşlik ettiğini bulduk. Bilindiği üzere BMP2 seviyesinin artması osteokalsin seviyesini arttırmaktadır (Huang ve ark. 2010). Osteokalsin sahip olduğu 3 Gla rezidüsü sayesinde hidroksiapatit kristalleri ile etkileşime girerek mineralizasyonun ilerlemesini sağlamaktadır (Hauschka ve Carr 1982, Dowd ve ark. 2003, Hoang ve ark. 2003). Ayrıca BMP2 kemik MSC'lerde ve insan osteosarkoma hücrelerinde Runx2, Osteriks, ALP, tip I kollajen ve OPN ekspresyonunu uyarmaktadır (Lysdahl ve ark. 2014, Sun ve ark. 2015). Bu etkileri ile artmış BMP2 gen ekspresyonu ve protein seviyesi osteoblastik aktivitenin arttırmasının yanı sıra ECM

minerilizasyonunu da teşvik ederek kemik yapımının ilerlemesini sağlar. Bunlara göre her üç alaşım BMP2 gen seviyesini arttırmışken sadece Mg-Y-RE-12 alaşımı BMP2 protein seviyesinin artmasına neden olmuştur. Bu tez kapsamında yürütülen çalışmalarda aday implant olmaya en yakın alaşımın Mg-Y-RE-12 olduğu düşüncesi hasıl olmuştur. Bu çerçevede de düşünenecek olursak Mg-Y-RE-12 alaşımının hFOB1.19 hücrelerinde hem gen ekspresyon seviyesi hem de protein seviyesini arttırması, bu alaşımın toksik etkiden çok kemik yapımını teşvik edebileceği düşüncesini akla getirmiştir. Nitekim benzer sonuçlar SSP1 için de geçerlidir. SPP1, SIBLING (small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein) ailesi üyesidir, kemikte bulunan major non-kollajen matriks proteini olup kemik minerilizasyonunda görev alır (Ogbureke ve Fisher 2007). Çalışmamızda hFOB1.19 hücrelerini Mg-Y-RE alaşımına maruz bıraktığımızda her üç alaşımın da SSP1 gen ekspresyonunu arttırdığını bulduk. Yaptığımız çalışmalarda Mg-Y-RE-24 alaşımının SSP1 gen ekspresyonunu diğer alaşımlara göre yaklaşık 2 kat daha fazla arttırdığını bulduk. SSP1 ekspresyonunun artması SSP1 proteinin membranda bulunan integrin reseptörleri ile etkileşmesine ve MMP ekspresyonunun uyarılmasına neden olur (Reinholt ve ark. 1990, Kruger ve ark. 2014). Bu durumun çalışmamızdaki Mg-Y-RE-24 alaşımının MMP1 ekspresyonundaki dramatik artışın nedeni olabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışma kapsamında kullanılan alaşımların kemik yıkımı üzerindeki etkilerini değerlendirmek için RANKL ve OPG moleküllerinin seviyelerindeki değişim belirlendi. RANKL ve OPG osteoblastlarda sentezlenir. RANKL, osteoklast membranında bulunan reseptörü RANK'a bağlanarak osteoklastogenezin aktivasyonunu sağlar böylece kemik rezorpsiyonu teşvik edilmiş olur (Boyce ve Xing 2007, Caetano-Lopes ve ark. 2007, Boyce ve Xing 2008, Tat ve ark. 2009). OPG ise osteoblastlarda sentezlenip ECM'de RANKL' ye bağlanır ve RANKL'nin osteoklast aktivitesini uyarmasını engeller. Çalışmamızda RANKL gen ekspresyonu 72. saatte 1000 µg/ml Mg-Y-RE-12 dozunda her üç alaşım tarafından da arttırılmışken sadece Mg-Y-RE-12 alaşımı 400 µg/ml dozda RANKL artışına neden olmamıştır. Ayrıca her üç alaşım da OPG' nin hem gen ekspresyonunun hem de protein seviyesinin artmasına neden olmuştur. Yapılan çeşitli çalışmalarda Mg tabanlı alaşımların RANKL ekspresyonunu ve protein sentezini baskıladığı gösterilmiştir. Bir çalışmada osteoklastogenezini uyarabilen monosit hücrelerinin RANKL ile uyarıldıktan sonra hücrelere uygulanan nadir toprak elementi ile katkılanmış magnezyumun saf magnezyuma göre RANKL aracılı osteoklast farklılaşmasını daha fazla baskıladığı

görülmüştür (Saha ve ark. 2015). RANKL'nin sadece ekspresyonunun artması ve OPG'nin ise hem ekspresyonunun hem de protein seviyesinin artması kemik rezorpsiyonunun teşvik edilemeyeceğini gösterir. Mg-Y-RE alaşımlarından elde edilecek implantlar doğrudan kemik dokuya uygulanacaktır ve Mg-Y-RE-12 alaşımının etkisiz dozu RANKL gen ve protein seviyesinin değiştirmemesinin yanı sıra OPG gen ve protein seviyesini anlamlı derecede arttırması Mg-Y-RE-12 alaşımının kemik yıkımını teşvik edici özelliği olmadığını en büyük destekçisidir. Her üç alaşım OPG ekspresyonunu ve protein seviyesini RANKL ile kıyaslandığında daha fazla arttırmış olması osteoklastogenezin aktivasyonunun teşvik edilemeyeceğini de gösterir.

Osteoblastik aktivitede rol aldığı düşünülen UCMA'nın gen ekspresyonu Mg-Y-RE-13 ve Mg-Y-RE-24 alaşımları tarafından arttırıldığını gördük. UCMA patofizyolojik kalsifikasyondan etkilenmiş bölgelerde bulunur (Osman ve ark. 2013). Yapılan bir çalışmada kalsiyum metabolizmasına dahil vasküler ve valvular kalsifikasyonun inhibitörü olan UCMA'nın kalsiyum kaynaklı sinyal yollarını engelleyerek ve doğrudan kristal oluşumu/olgunlaşmasını inhibe ederek mineral bağlanmasını engelliyor olabileceği gösterilmiştir (Viegas ve ark. 2015). UCMA primer osteoblastların, mezenşimal kök hücrelerin ve MC3T3-E1 preosteoblastların farklılaşmasına dahil olduğu ve osteojenik farklılaşmayı negatif olarak kontrol ettiği gösterilmiştir (Surmann-Schmitt ve ark. 2008). Non-kollajen matriks proteini olan MGP ise vasküler kalsifikasyon gelişiminde major inhibitördür (Zanduetta ve ark. 2016). Çalışmamızda Mg-Y-RE-24 alaşımının MGP gen ekspresyonunu arttırdığını gördük. Yapılan bir çalışmada RANKL'nin BMP2 ve MGP'yi düzenleyerek kalsifikasyona katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Shimizu ve ark. 2014). ECM'nin aşırı minerilizasyonu feed back mekanizması aracılığıyla MGP ekspresyonunun up-regülasyonuna neden olur. Çalışmamızda Mg-Y-RE-13 alaşımının UCMA gen ekspresyonunun artmış olması öte yandan MGP ekspresyonunun artması bu alaşımın osteojenik farklılaşma üzerinde bu genler aracılığıyla hem olumlu hem de olumsuz etkilere neden olduğunu gösterir. Diğer yandan UCMA'nın MGP ile birlikte gen ekspresyonunun artması MMP1 ekspresyonunun artmasına neden olduğu gösterilmiştir. (Goldberg ve ark. 1986, Bay-Jensen ve ark. 2016). Çalışmamızda Mg-Y-RE-13 alaşımının MMP1 gen ekspresyon ve protein sentezinin artmasına neden olan bir başka nedenin artmış UCMA ve MGP ekspresyonu olabileceğini düşündürmüştür.

Diğer alışımlardan farklı olarak Mg-Y-RE-24 72. saatte 400 µg/ml dozda BMP7 gen ekspresyonunu arttırmıştır. BMP7 de TGF-β ailesinin bir üyesidir, ALP aktivitesini uyarak osteoblastik farklılaşmayı, kalsiyum minerilizasyonunu hızlandırmaktadır (Gu ve ark. 2004, Shen ve ark. 2010). BMP-2 ve BMP-7 mezenşimal kök progenitör hücrelerden osteoblast farklılaşmasını ilerleten transkripsiyonel faktörler olan Runx2 ve Osx'in ekspresyonunu uyardırmaktadırlar (Lee ve ark. 2003, Lee ve ark. 2003). Bu etkileri ile BMP7 osteogenezi ve minerilizasyonu teşvik edeceğini düşündürmüştür. Ayrıca Mg-Y-RE-24 alışımlı diğer alışımlardan farklı olarak NFκB gen ekspresyonunu da arttırmıştır. NFκB tüm hücre tiplerinde bulunan ve hücre yaşamı, sitokin salınımı başta olmak üzere metabolik süreçlerde görev alan bir transkripsiyon faktörüdür (Brasier 2006, Gilmore 2006). NFκB aktivasyonunun artması RUNX ve Osx aktivasyonuna dolayısıyla OCN ve ALP ekspresyonunun artmasına, osteoblastların minerilizasyonunu arttırarak osteoblastların farklılaşmasına neden olur (Osta ve ark. 2014).

Her üç alışımda da IL-1β, TNF-α, protein seviyeleri ise ölçülemeyecek kadar düşük miktarlarda olması bu alışımların inflamasyona neden olmayacağını düşündürmüştür. Multi potent stromal hücrelerde yapılan bir çalışmada BMP2'nin IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α mRNA sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (Gorskaya ve ark. 2013). Bu durumun çalışmamızda IL-1β, TNF-α protein seviyesinin değişmemesinin nedeni olabileceğini düşündürmüştür.

Bu bulgular ışığında Mg-Y-RE-12, Mg-Y-RE-13 ve Mg-Y-RE-24 alışımlarını birbirleriyle kıyaslayacak olursak sadece Mg-Y-RE-12 hücre canlılığını baskılamamıştır. Ancak her üç alışım MMP1, SSP1, OPG, RANKL, BMP2 gen ekspresyonu; OPG protein seviyesini arttırmışken sadece Mg-Y-RE-12 BMP2 protein seviyesini ve yalnızca Mg-Y-RE-24 MMP1 protein seviyesini arttırmıştır. Sadece bu molekülleri değerlendirecek olursak her üç alışım MMP1 den dolayı ECM yıkımına neden olacağı görülmektedir. Ancak Mg-Y-RE-24 alışımlı MMP1 gen ekspresyonunda ve protein seviyesinde daha dramatik değişikliklere neden olmuştur. Çeşitli çalışmalarda SSP1'in MMP sentezini uyardığı da gösterilmiştir (Reinholt ve ark. 1990, Kruger ve ark. 2014). Bu durumun elde ettiğimiz artmış MMP1 gen ekspresyonunun nedeni olabileceğini düşündürmüştür. Nitekim çalışmamızda kullandığımız alışımların SSP1 ve BMP2 gen ekspresyon seviyesini arttırdığını bulduk. Her üç alışımlın CASP3 geninde değişikliğe neden olmaması bu alışımların apoptotik yolağı uyardırmadığını düşündürmüştür. Ayrıca IL-1β, TNF-α

protein miktarında değişikliklere neden olmaması bu alaşımların inflamasyonu tetiklemediği fikrini akla getirmiştir. Her üç alaşım da aynı genlere aynı etkide bulunmasına rağmen etki oranları farklılık sergilemiştir. Bu farklılığa magnezyuma katkılanan nadir toprak elementlerinin oranlarının neden olabileceğini dūřünmekteyiz. Hücre canlılığı üzerinde anlamlı değişikliklere neden olmayan Mg-Y-RE-12 alaşımını diğer iki alaşıma göre hFOB1.19 hücre dizilerinin metabolik aktivitelerini de en az değiştiren alaşımdır. Uygulanacak implant hasarlı dokuyu destelemek amacıyla kullanılacaktır. Bu nedenle dokunun balansından uzaklaşması istenmemektedir. Bu nedenle osteoblastik metabolizmayı en az düzeyde etkileyecek alaşım implant üretiminde kullanılması planlanmıştır. Bu açıdan bakıldığında Mg-Y-RE-12 hücre canlılığını baskılamaması, apoptotik yolağı uyarmaması, osteoblastik aktivitede rol alan genler ve proteinler üzerinde en az değişime neden olması hFOB1.19 hücresinin homeostazisini değiştirmediğini gösterir. Bu bulgular ışığında ölkemizde üretilecek ilk yerli biyobozunur implantlarda Mg-Y-RE-12 alaşımının osteodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılmaya en uygun alaşım olacağını dūřündürmüřtür.



6. SONUÇ

1. Osteodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılan implantlar bakımından Türkiye'nin dışa bağımlı olması nedeniyle Mg-Y-RE alaşımlarından biyobozunur ortopedik implantlar üretilecektir. Bu implantların vücutta uygulanacağı kemik dokusu üzerindeki etkisi *in vitro* ortamda hFOB1.19 hücreleri kullanılarak araştırılmış oldu.
2. Çalışmamızda Mg-Y-RE-12 hFOB1.19 hücre canlılığını etkilemediği, Mg-Y-RE-13 alaşımının 72. saatte yüksek dozda (1000 µg/ml) hücre canlılığını baskıladı. Mg-Y-RE-24 alaşımı 48. ve 72. saatte 400 ve 1000 µg/ml dozlarda hücre canlılığını baskıladığı bulundu.
3. Her üç alaşımda MMP1, SSP1, OPG, RANKL, BMP2 gen ekspresyonu; OPG protein seviyesini arttırdığı sadece Mg-Y-RE-12 BMP2 protein seviyesini ve yalnızca Mg-Y-RE-24 MMP1 protein seviyesini arttırdığı bulundu.
4. Her üç alaşımda IL-1 ve TNF-α seviyesinin değıştirmedığı bulundu.

Bu veriler eşliğinde gelecekte şu çalışmaların yapılması uygun olur:

- a. Mg-Y-RE alaşımlarının muhtemel sebep olacağı Mg(OH)₂, H₂ ve magnezyum elementinin miktarının belirlenmesi implantın korozyon miktarının belirlenmesi için yararlı olacaktır.
- b. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerinin hayvan modelleri oluşturularak *in vivo* ortamda da test edilmesi verilerimizin geçerliliği açısından yararlı olur.

7. KAYNAKLAR

1. **Amass W, Amass A ve Tighe B.** A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. *Polym Int*, **1998**, s.47: 89-144.
2. **Ambrosetti D, Holmes G, Mansukhani A ve Basilico C.** Fibroblast growth factor signaling uses multiple mechanisms to inhibit Wnt-induced transcription in osteoblasts. *Mol Cell Biol*, **2008** s.28 (15): 4759-4771.
3. **Anderson HC.** Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Repts*, **2003**, s.5 (3): 222-226.
4. **Aubin JE ve Bonewald LF.** *Principles of bone biology*. Academic Press, San Diego, **1996**.
5. **Banerjee C, McCabe LR, Choi JY, Hiebert SW, Stein JL ve ark.** Runt homology domain proteins in osteoblast differentiation: AML3/CBFA1 is a major component of a bone specific complex. *J Cell Biochem*, **1997**, s.66: 1-8.
6. **Bay-Jensen AC, Reker D, Kjelgaard-Petersen CF, Mobasheri A, Karsdal MA ve ark.** Osteoarthritis year in review 2015: soluble biomarkers and the BIPED criteria. *Osteoarthritis Cartilage*, **2016**, s.24 (1): 9-20.
7. **Bayram, H, Fakili F, Gogebakan B, Bayraktar R, Oztuzcu S ve ark.** Effect of serum on diesel exhaust particles (DEP)-induced apoptosis of airway epithelial cells in vitro. *Toxicol Lett*, **2013**, s.218 (3): 215-223.
8. **Berglund, IS, Brar HS, Dolgova N, Acharya AP, Keselowsky BG ve ark.** Synthesis and characterization of Mg-Ca-Sr alloys for biodegradable orthopedic implant applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, **2012**, s.100 (6): 1524-1534.
9. **Bijlsma, JW ve Knahr K.** Strategies for the prevention and management of osteoarthritis of the hip and knee. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, **2007**, s.21 (1): 59-76.
10. **Bitton R.** The economic burden of osteoarthritis. *Am J Manag Care*, **2009**, s.15 (8 Suppl): S230-235.
11. **Bonewald LF.** The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*, **2011**, s.26 (2): 229-238.
12. **Boyce BF ve Xing L.** Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*, **2007**, s.9.
13. **Boyce BF ve Xing L.** Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*, **2008**, s.473 (2): 139-146.
14. **Brasier AR.** The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc Toxicol*, **2006**, s.6 (2): 111-130.
15. **Bruyere OJ, Collette M, Kothari S, Zaim D, White H ve ark.** Osteoarthritis, magnetic resonance imaging, and biochemical markers: a one year prospective study. *Ann Rheum Dis*, **2006**, s.65 (8): 1050-1054.
16. **Butler DL, Goldstein SA ve Guilak F.** Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *J Biomech Eng*, **2000**, s.122 (6): 570-575.
17. **Caetano-Lopes J, Canhao H ve Fonseca JE.** Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port*, **2007**, s.32 (2): 103-110.
18. **Caplan AI.** Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, **1991**, s.9 (5): 641-650.
19. **Carman WJ, Sowers M, Hawthorne VM ve Weissfeld LA.** Obesity as a risk factor for osteoarthritis of the hand and wrist: a prospective study. *Am J Epidemiol*, **1994**, s.139 (2): 119-129.
20. **Castaneda S, Roman-Blas JA, Largo R ve Herrero-Beaumont G.** Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment. *Biochem Pharmacol*, **2012**, s.83 (3): 315-323.
21. **Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM ve McCarthy TL.** Transforming growth factor-beta gene family members and bone. *Endocr Rev*, **1994**, s.15 (1): 27-39.
22. **Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS ve Schumacker PT.** Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol*, **2000**, s.165 (2): 1013-1021.
23. **Chapurlat RD ve Confavreux CB.** Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. *Rheumatology (Oxford)*, **2016**.
24. **Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF ve Avioli LV.** Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*, **1994**, s. 134 (1): 277-286.
25. **Chou DT, Hong D, Saha P, Ferrero J, Lee B ve ark.** In vitro and in vivo corrosion, cytocompatibility and mechanical properties of biodegradable Mg-Y-Ca-Zr alloys as implant materials. *Acta Biomater*, **2013**, s.9 (10): 8518-8533.

26. **Clark AG, Jordan JM, Vilim V, Renner JB, Dragomir AD ve ark.** Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheum*, **1999**, s.42 (11): 2356-2364.
27. **Clarke B.** Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, **2008**, s.3: 131-139.
28. **Coen N, Kadhim MA, Wright EG, Case CP ve Mothersill CE.** Particulate debris from a titanium metal prosthesis induces genomic instability in primary human fibroblast cells. *Br J Cancer*, **2003**, s.88 (4): 548-552.
29. **Confavreux CB.** Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism. *Kidney Int*, **2011**, Suppl(121): S14-19.
30. **Cowin SC, Moss-Salentijn L ve Moss ML.** Candidates for the mechanosensory system in bone. *J Biomech Eng*, **1991**, s.113 (2): 191-197.
31. **Cremer MA, Rosloniec EF ve Kang AH.** The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med (Berl)*, **1998**, s.76 (3-4): 275-288.
32. **Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP ve Varanasi SS.** The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*, **2008**, s.61: 577-587.
33. **Dou X, Liu LL ve Zhu XJ.** Nickel-elicited systemic contact dermatitis - A report of 20 cases and a review of the literature. *Contact Dermatitis*, **2003**, s.48 (3): 126-129.
34. **Dowd TL, Rosen JF, Li L ve Gundberg CM.** The three-dimensional structure of bovine calcium ion-bound osteocalcin using 1H NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **2003**, s.42 (25): 7769-7779.
35. **Drynda A, Deinet N, Braun N ve Peuster M.** Rare earth metals used in biodegradable magnesium-based stents do not interfere with proliferation of smooth muscle cells but do induce the upregulation of inflammatory genes. *J Biomed Mater Res*, **2009**, s.A91 (2): 360-369.
36. **Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL ve Karsenty G.** Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, **1997**, s.89 (5): 747-754.
37. **Eddy Jai Poinern G, Brundavanam S ve Fawcett D.** Biomedical magnesium alloys: a review of material properties, surface modifications and potential as a biodegradable orthopaedic implant. *Am J Biomed Eng*, **2013**, s.2: 218-240.
38. **Eriksen EF.** Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*, **2010**, s.11 (4): 219-227.
39. **Evcik D ve Babaoğlu ÜS.** *Osteoartrit Etiyopatogenezi*, Nobel Tıp Kitapevi, 2007.
40. **Everts V, Delaisse JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W ve ark.** The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res*, **2002**, s.17 (1): 77-90.
41. **Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W ve ark.** The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum*, **1987**, s.30 (8): 914-918.
42. **Felson DT, Zhang Y, Anthony JM, Naimark A ve Anderson JJ.** Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study. *Ann Intern Med*, **1992**, s.116 (7): 535-539.
43. **Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weissman BN ve ark.** The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum*, **1995**, s.38 (10): 1500-1505.
44. **Feyerabend F, Fischer J, Holtz J, Witte F, Willumeit R ve ark.** Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines. *Acta Biomater*, **2010** s.6 (5): 1834-1842.
45. **Franz-Odendaal TA, Hall BK ve Witten PE.** Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*, **2006**, s.235 (1): 176-190.
46. **Franze'n A ve Heinegard D.** Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochemistry*, **1985**, s.232: 715-724.
47. **Frost HM.** Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians. *Angle Orthod*, **1994**, s.64 (3): 175-188.
48. **Gallagher, JC ve Sai AJ.** Molecular biology of bone remodeling: implications for new therapeutic targets for osteoporosis. *Maturitas*, **2010**, s.65(4): 301-307.
49. **Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK.** Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants-a review. *Prog Mater Sci*, **2009**, s.54: 397-425.
50. **Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM ve ark.** Body mass index in young men and the risk of subsequent knee and hip osteoarthritis. *Am J Med*, **1999**, s.107 (6): 542-548.

51. **Gerold B**, Implant made of a biodegradable magnesium alloy. C. United States: *BIOTRONIK VI Patent AG, Baar*, 2013.
52. **Geusens P**. Emerging treatments for postmenopausal osteoporosis - focus on denosumab. *Clin Interv Aging*, 2009, s.4: 241-250.
53. **Gilmore TD**. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 2006, s.25(51): 6680-6684.
54. **Gimenez-Arnau A, Rimbau V, Serra-Baldrich E ve Camarasa JG**. Metal-induced generalized pruriginous dermatitis and endovascular surgery. *Contact Dermatitis*, 2000, s.43 (1): 35-40.
55. **Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A, Bauer EA, Grant GA ve ark**. Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J Biol Chem*, 1986, s.61 (14): 6600-6605.
56. **Gomez Sanchez A, Ballarre J, Orellano JC, Duffo G ve Cere S**. Surface modification of zirconium by anodisation as material for permanent implants: in vitro and in vivo study. *J Mater Sci Mater Med*, 2013, s.24 (1): 161-169.
57. **Gorskaya YF, Danilova TA, Mezentseva MV, Shapoval IM, Grunina TM ve ark**. Effect of BMP-2 protein on the count and osteogenic properties of multipotent stromal cells and expression of cytokine genes in primary cultures of bone marrow and spleen cells from CBA mice immunized with bacterial antigens. *Bull Exp Biol Med*, 2013, s.155 (5): 650-654.
58. **Göker B**. Radiographic hip osteoarthritis of the hip joint in Turkey. *Rheumatol Int*, 2001, s.21 (94): 6.
59. **Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A ve ark**. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol*, 2003, s.163 (5): 2021-2031.
60. **Grogan JA, O'Brien BJ, Leen SB ve McHugh PE**. A corrosion model for bioabsorbable metallic stents. *Acta Biomater*, 2011, s.7 (9): 3523-3533.
61. **Gu K, Zhang L, Jin T ve Rutherford RB**. Identification of potential modifiers of Runx2/Cbfa1 activity in C2C12 cells in response to bone morphogenetic protein-7. *Cells Tissues Organs*, 2004, s.176 (1-3): 28-40.
62. **Gu X, Zheng Y, Cheng Y, Zhong S ve Xi T**. In vitro corrosion and biocompatibility of binary magnesium alloys. *Biomaterials*, 2009, s.30 (4): 484-498.
63. **Harris SA, Enger RJ, Riggs BL ve Spelsberg TC**. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res*, 1995, s.10 (2): 178-186.
64. **Hartwig A**. Role of magnesium in genomic stability. *Mutat Res*, 2001, s.475 (1-2): 113-121.
65. **Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L ve Melsen F**. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res*, 2001, s.16 (9): 1575-1582.
66. **Hauschka PV ve Carr SA**. Calcium-dependent alpha-helical structure in osteocalcin. *Biochemistry*, 1982, s.21(10): 2538-2547.
67. **Hayami T, Kapila YL ve Kapila S**. Divergent upstream osteogenic events contribute to the differential modulation of MG63 cell osteoblast differentiation by MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3). *Matrix Biol*, 2011, s.30 (4): 281-289.
68. **He SM, Zeng XQ, Peng LM, Gao X, Nie JF ve ark**. Precipitation in a Mg- 10Gd-3Y-0.4Zr (wt.%) alloy during isothermal ageing at 250 degrees C. *J Alloy Compd*, 2006, s.421(309-13).
69. **Heinegard D, Lorenzo P ve Saxne T**. *Kelley's textbook of rheumatology*. 6th, Philadelphia, WB Saunders, 2001, s.41-54.
70. **Hermawan H, Purnama A, Dube D, Couet J ve Mantovani D**. Fe-Mn alloys for metallic biodegradable stents: degradation and cell viability studies. *Acta Biomater*, 2010, s.6 (5): 1852-1860.
71. **Hernandez CJ, Hazelwood SJ ve Martin RB**. The relationship between basic multicellular unit activation and origination in cancellous bone. *Bone*, 1999, s.25 (5): 585-587.
72. **Hoang QQ, Sicheri F, Howard AJ ve Yang DS**. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature*, 2003, s.425 (6961): 977-980.
73. **Hort N, Huang Y, Fechner D, Stormer M, Blawert C ve ark**. Magnesium alloys as implant materials--principles of property design for Mg-RE alloys. *Acta Biomater*, 2010, s.6(5): 1714-1725.
74. **Hu PF, Bao JP ve Wu LD**. The emerging role of adipokines in osteoarthritis: a narrative review. *Mol Biol Rep*, 2011, s.38 (2): 873-878.

75. **Huang Z, PG Ren, T Ma, RL Smith ve SB Goodman.** Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability. *Cytokine*, **2010**, 51(3): 305-310.
76. **Ji YJ, Xiao B, Wang ZH, Cui MZ ve Lu YY.** The suppression effect of light rare earth elements on proliferation of two cancer cell lines. *Biomed Environ Sci*, **2000**, s.13 (4): 287-292.
77. **Johnston M, Morse A, Arrington J, Pliner M ve Gasser S.** Resorption and remodeling of hydroxyapatite-poly-L-lactic acid composite anterior cruciate ligament interference screws. *Arthroscopy*, **2011**, s.27 (12): 1671-1678.
78. **Jordan JM, CG Helmick, JB Renner, G Luta, AD Dragomir ve ark.** Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J Rheumatol*, **2007**, s.34 (1): 172-180.
79. **Junqueira LC ve Carneiro J.** *Temel Histoloji text & atlas*, Nobel Tıp Kitabevleri, **2009**.
80. **Kaçar C, Gilgil E ve Urhan S.** The prevalence of symptomatic knee and distal interphalangeal joint osteoarthritis in the urban population of Antalya, Turkey. *Rheumatol Int*, **2005**, s. 25 (201): 4.
81. **Karlson EW, Mandl LA, Aweh GN, Sangha O, Liang MH ve ark.** Total hip replacement due to osteoarthritis: the importance of age, obesity, and other modifiable risk factors. *Am J Med*, **2003**, s.114 (2): 93-98.
82. **Kennth DB.** *Osteoartrit. Harrison Romatoloji*. M. Soy, Nobel Tıp Kitabevi, 2007, s 241-258.
83. **Khosla S.** Mini review: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, **2001**, s.142 (12): 5050-5055.
84. **Kirkland NT, Staiger MP, Nisbet D, Davies CHJ ve Birbilis N.** Performance-driven design of biocompatible Mg alloys. *JOM-US*, **2011**, s.63: 28-34.
85. **Kokubo T ve Takadama H.** How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, **2006**, s.27 (15): 2907-2915.
86. **Komori T.** Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development. *J Bone Miner Metab*, **2003**, s.21 (193-197).
87. **Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K ve ark.** Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell Biol Int*, **1997**, s.89: 755-764.
88. **Kruger TE, Miller AH, Godwin AK ve Wang J.** Bone sialoprotein and osteopontin in bone metastasis of osteotropic cancers. *Crit Rev Oncol Hematol*, **2014**, s.89 (2): 330-341.
89. **Kubasek J, Vojtech D, Jablonska E, Pospisilova I, Lipov J ve ark.** Structure, mechanical characteristics and in vitro degradation, cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of novel biodegradable Zn-Mg alloys. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, **2016**, s.58: 24-35.
90. **Kular J, Tickner J, Chim SM ve Xu J.** An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem*, **2012**, s.45 (12): 863-873.
91. **Lanyon LE.** Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int*, **1993**, s.53:102-106.
92. **Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H ve ark.** Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum*, **2008**, s.58 (1): 26-35.
93. **Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, Park HD, Kang AR ve ark.** BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J Biol Chem*, **2003**, s.278 (36): 34387-34394.
94. **Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM ve Ryoo HM.** BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun*, **2003**, s.309 (3): 689-694.
95. **Leng Z, Zhang JH, Zhang ML, Liu XH, Zhan HB ve ark.** Microstructure and high mechanical properties of Mg-9RY-4Zn (RY: Y-rich misch metal) alloy with long period stacking ordered phase. *Mater Sci Eng A: Struct*, **2012**, s.540: 38-45.
96. **Leng Z, Zhang J, Yin T, Zhang L, Guo X ve ark.** Influence of biocorrosion on microstructure and mechanical properties of deformed Mg-Y-Er-Zn biomaterial containing 18R-LPSO phase. *J Mech Behav Biomed Mater*, **2013**, s.28: 332-339.
97. **Lerner UH.** New Molecules in the Tumor Necrosis Factor Ligand and Receptor Superfamilies with Importance for Physiological and Pathological Bone Resorption. *Crit Rev Oral Biol Med*, **2004**, s.15 (2): 64-81.
98. **Li J, Liao H, Fartash B, Hermansson L ve Johnsson T.** Surface-dimpled commercially pure titanium implant and bone ingrowth. *Biomaterials*, **1997**, s.18 (9): 691-696.

99. **Li Z, Gu X, Lou S ve Zheng Y.** The development of binary Mg-Ca alloys for use as biodegradable materials within bone. *Biomaterials*, **2008**, s.29 (10): 1329-1344.
100. **Li Z, Kong K ve Qi W.** Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. *Biochem Biophys Res Commun*, **2006**, s.343 (2): 345-350.
101. **Lian JB ve Stein GS.** Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *Iowa Orthop J*, **1995**, s.15: 118-140.
102. **Lu HH ve Thomopoulos S.** Functional attachment of soft tissues to bone: development, healing, and tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng*, **2013**, s.15: 201-226.
103. **Lysdahl H, Baatrup A, Foldager CB ve Bunger C.** Preconditioning Human Mesenchymal Stem Cells with a Low Concentration of BMP2 Stimulates Proliferation and Osteogenic Differentiation In Vitro. *Biores Open Access*, **2014**, s.3 (6): 278-285.
104. **Manolagas SC.** Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, **2000**, s.21 (2): 115-137.
105. **Martin TJ ve Sims NA.** Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med*, **2005**, s.11 (2): 76-81.
106. **Matkovic' T, Matkovic' P ve Malina J.** Effects of Ni and Mo on the microstructure and some other properties of Co-Cr dental alloys. *J Alloys Compounds*, **2004**, s. 366: 293-297.
107. **Matsuo K ve Irie N.** Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys*, **2008**, s.473 (2): 201-209.
108. **Mert F, Blawert C, Kainer KU ve Hort N.** Influence of cerium additions on the corrosion behaviour of high pressure die cast AM50 alloy. *Corros Sci*, **2012**, s.65: 145-151.
109. **Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA ve ark.** Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*, **1996**, s.97 (3): 761-768.
110. **Muraki S, Akune T, Oka H, Mabuchi A, En-Yo Y ve ark.** Association of occupational activity with radiographic knee osteoarthritis and lumbar spondylosis in elderly patients of population-based cohorts: a large-scale population-based study. *Arthritis Rheum*, **2009**, s.61 (6): 779-786.
111. **Murni NS, Dambatta MS, Yeap SK, Froemming GR ve Hermawan H.** Cytotoxicity evaluation of biodegradable Zn-3Mg alloy toward normal human osteoblast cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, **2015**, s.49: 560-566.
112. **Nagels J, Stokdijk M ve Rozing PM.** Stress shielding and bone resorption in shoulder arthroplasty. *J Shoulder Elbow Surg*, **2003**, s.12 (1): 35-39.
113. **Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M ve ark.** Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*, **2011**, s.17 (10): 1231-1234.
114. **Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K ve ark.** Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, **2000**, s.275 (3): 768-775.
115. **Nelson AE, Braga L, Renner JB, Atashili J, Woodard J ve ark.** Characterization of individual radiographic features of hip osteoarthritis in African American and White women and men: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, **2010**, s.62 (2): 190-197.
116. **Noble BS.** The osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys*, **2008**, s.473 (2): 106-111.
117. **O'Brien CA, Nakashima T ve Takayanagi H.** Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone*, **2013**, s.54 (2): 258-263.
118. **Ogawa E, Inuzuka M, Maruyama M, Satake M, Naito-Fujimoto M ve ark.** Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel Drosophila runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha. *Virology*, **1993**, s.194 (314-331).
119. **Ogbureke KU ve Fisher LW.** SIBLING expression patterns in duct epithelia reflect the degree of metabolic activity. *J Histochem Cytochem*, **2007**, s.55 (4): 403-409.
120. **Okazaki Y ve Gotoh E.** Metal release from stainless steel, Co-Cr-Mo-Ni-Fe and Ni-Ti alloys in vascular implants. *Corrosion Sci*, **2008**, s.50: 3429-3438.
121. **Okuma T.** Magnesium and bone strength. *Nutrition*, **2001**, s.17 (7-8): 679-680.
122. **Osman A, Uhlin F, Franlund E, Fernstrom A ve Magnusson P.** Exon resequencing of the gene encoding UCma/GRP reveals a common carboxy-terminal 138Thr > Ser polymorphism. *Clin Lab*, **2013**, s.59 (11-12): 1397-1401.
123. **Osta B, Benedetti G ve Miossec P.** Classical and Paradoxical Effects of TNF-alpha on Bone Homeostasis. *Front Immunol*, **2014**, s.5: 48.
124. **Owen M.** Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl*, **1988**, s.10: 63-76.

125. **Park KD, Lee BA, Piao XH, Lee KK, Park SW ve ark.** Effect of magnesium and calcium phosphate coatings on osteoblastic responses to the titanium surface. *J Adv Prosthodont*, **2013**, s.5 (4): 402-408.
126. **Persaud-Sharma D ve McGoron A.** Biodegradable Magnesium Alloys: A Review of Material Development and Applications. *J Biomim Biomater Tissue Eng*, **2012**, s.12: 25-39.
127. **Pichler K, Kraus T, Martinelli E, Sadoghi P, Musumeci G ve ark.** Cellular reactions to biodegradable magnesium alloys on human growth plate chondrocytes and osteoblasts. *Int Orthop*, **2014**, s.38 (4): 881-889.
128. **Pietak A, Mahoney P, Dias GJ ve Staiger MP.** Bone-like matrix formation on magnesium and magnesium alloys. *J Mater Sci Mater Med*, **2008**, s.19 (1): 407-415.
129. **Pullig O, Weseloh G, Gauer S ve Swoboda B.** Osteopontin is expressed by adult human osteoarthritic chondrocytes: protein and mRNA analysis of normal and osteoarthritic cartilage. *Matrix Biol*, **2000**, s.19 (3): 245-255.
130. **Pullig O, Weseloh G, Klatt AR, Wagener R ve Swoboda B.** Matrilin-3 in human articular cartilage: increased expression in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, **2002**, s.10 (4): 253-263.
131. **Pullig O, Weseloh G, Ronneberger D, Kakonen S ve Swoboda B.** Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone. *Calcif Tissue Int*, **2000**, s.67 (3): 230-240.
132. **Rafael MS, Cavaco S, Viegas CS, Santos S, Ramos A ve ark.** Insights into the association of Gla-rich protein and osteoarthritis, novel splice variants and gamma-carboxylation status. *Mol Nutr Food Res*, **2014**, s.58 (8): 1636-1646.
133. **Raggatt LJ ve Partridge NC.** Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*, **2010**, s.285 (33): 25103-25108.
134. **Reifenrath J, Krause A, Bormann D, von Rechenberg B, Windhagen H ve ark.** Profound differences in the in-vivo-degradation and biocompatibility of two very similar rare-earth containing Mg-alloys in a rabbit model. *Material wissenschaft Und Werkstofftechnik*, **2010**, s.41 (12): 1054-1061.
135. **Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A ve Heinegard D.** Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1990**, s.87 (12): 4473-4475.
136. **Renard P, Zachary MD, Bougelet C, Mirault ME, Haegeman G ve ark.** Effects of antioxidant enzyme modulations on interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation. *Biochem Pharmacol*, **1997**, s.53 (2): 149-160.
137. **Revell PA, Damien E, Zhang XS, Evans P ve Howlett CR.** The effect of magnesium ions on bone bonding to hydroxyapatite. *Key Eng Mater*, **2004**, s.254-256: 447-450.
138. **Ridzwan MIZ, Shuib S, Hassan AY, Shokri AA ve Mohamad Ibrahim MI.** Problem of Stress Shielding and Improvement to the Hip Implant Designs: A Review. *Journal of Medical Sciences (Faisalabad)*, **2007**, s.7 (3): 460-467.
139. **Roodman GD.** Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol*, **1999**, s.27 (8): 1229-1241.
140. **Rosa-Ranal M, de la Cruz DA, Lorena-Rubio Y ve Larrea F.** [New paradigms in the regulation of bone metabolism]. *Rev Invest Clin*, **2001**, s.53 (4): 362-369.
141. **Ross F, Chappel J, Alvarez J, Sander D, Butler W ve ark.** Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin $\alpha\beta 3$ potentiate bone resorption. *J Biol Chem*, **1993**, s. 268 (9901-9907).
142. **Rucci N.** Molecular biology of bone remodelling. *Clin Cases Miner Bone Metab*, **2008**, s.5 (1): 49-56.
143. **Sagalovsky S ve Schönert M.** Osteoporosis and role rankl-rank-opg system and notch signaling pathway in bone development and remodeling. *Український ревматологічний журнал*, **2014**, s. 57 (3) (29-37).
144. **Saha P, Roy M, Datta MK, Lee B ve Kumta PN.** Effects of grain refinement on the biocorrosion and in vitro bioactivity of magnesium. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, **2015**, 57: 294-303.
145. **Sampath TK, Coughlin JE, Whetstone RM, Banach D, Corbett C ve ark.** Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A, two members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem*, **1990**, s.265 (22): 13198-13205.
146. **Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA ve Lewenstam A.** Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin Chim Acta*, **2000**, s.294 (1-2): 1-26.
147. **Seçkin Ü, Borman P ve Bodur H.** Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon polikliniğine başvuran yaşlıların tanısal dağılımı. *Turkish Journal of Geriatrics*, **1999**, s. 2(57): 57-60

148. **Sharma L, Kapoor D ve Issa S.** Epidemiology of osteoarthritis: an update. *Curr Opin Rheumatol*, **2006**, s.18 (2): 147-156.
149. **Shen B, Wei A, Whittaker S, Williams LA, Tao H ve ark.** The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *J Cell Biochem*, **2010**, s.109 (2): 406-416.
150. **Shimizu H, Nakagami H ve Morishita R.** Bone metabolism and cardiovascular function update. Cross link of hypertension, bone loss and vascular calcification - common back grounds in renin angiotensin system with anti-aging aspect. *Clin Calcium*, **2004**, s.24 (7): 53-62.
151. **Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS ve ark.** Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, **1997**, s.89 (2): 309-319.
152. **Smit TH ve EH Burger.** Is BMU-coupling a strain-regulated phenomenon? A finite element analysis. *J Bone Miner Res*, **2000**, s.15 (2): 301-307.
153. **Smith CA, Tennent TD, Pearson SE ve Beach WR.** Fracture of Bilok interference screws on insertion during anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy*, **2003**, s.19 (9): E115-117.
154. **Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D ve ark.** A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, **2005**, s.13 (9): 769-781.
155. **Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J ve Dias G.** Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. *Biomaterials*, **2006**, s.27 (9): 17 28-1734.
156. **Sun J, Li J, Li C ve Yu Y.** Role of bone morphogenetic protein-2 in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep*, **2015**, s.12 (3): 4230-4237.
157. **Surmann-Schmitt C, Dietz U, Kireva T, Adam N, Park J ve ark.** Ucma, a novel secreted cartilage-specific protein with implications in osteogenesis. *J Biol Chem*, **2008**, s.283 (11): 7082-7093.
158. **Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C ve ark.** TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med*, **2009**, s.15 (7): 757-765.
159. **Tat SK, Pelletier JP, Velasco CR, Padrines M ve Martel-Pelletier J.** New perspective in osteoarthritis: the OPG and RANKL system as a potential therapeutic target? *Keio J Med*, **2009**, s.58 (1): 29-40.
160. **Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T ve ark.** Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab*, **2007**, s.5 (6): 464-475.
161. **Tecklenburg K, Burkart P, Hoser C, Rieger M ve Fink C.** Prospective evaluation of patellar tendon graft fixation in anterior cruciate ligament reconstruction comparing composite bioabsorbable and allograft interference screws. *Arthroscopy*, **2006**, s.22 (9): 993-999.
162. **Teitelbaum SL.** Bone resorption by osteoclasts. *Science*, **2000**, s.289 (5484): 1504-1508.
163. **Tengvall P, Skoglund B, Askendal A ve Aspenberg P.** Surface immobilized bisphosphonate improves stainless-steel screw fixation in rats. *Biomaterials*, **2004**, 25 (11): 2133-2138.
164. **Teti A.** Bone development: overview of bone cells and signaling. *Curr Osteoporos Rep*, **2011**, s.9 (4): 264-273.
165. **Tonino AJ, Davidson CL, Klopper PJ ve Linclau LA.** Protection from stress in bone and its effects. Experiments with stainless steel and plastic plates in dogs. *J Bone Joint Surg Br*, **1976**, s.58 (1): 107-113.
166. **Tsigkou O, Jones JR, Polak J ve Stevens MM.** Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. *Biomaterials*, **2009**, s.30: 3542-3550.
167. **Ünüvar N, Mollahaliloğlu S ve Yardım N.** *Türkiye Hastalık Yüğü Çalışması 2004*. Ankara, **2007**, s. 1-71.
168. **Vaananen HK ve Horton M.** The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci*, **1995**, s.108:2729-2732.
169. **van Saase JL, van Romunde LK, Cats A, Vandenbroucke JP ve Valkenburg HA.** Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann Rheum Dis*, **1989**, s.48 (4): 271-280.
170. **Vermes C, Glant TT, Nadim JH, Fritz EA, Roebuck KA ve ark.** The potential role of the osteoblast in the development of periprosthetic osteolysis: review of in vitro osteoblast responses to wear debris, corrosion products, and cytokines and growth factors. *J Arthroplasty*, **2001**, s.16: 95-100.

171. **Viegas CS, Rafael MS, Enriquez JL, Teixeira A, Vitorino R ve ark.** Gla-rich protein acts as a calcification inhibitor in the human cardiovascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2015**, s.35 (2): 399-408.
172. **Vojtech D, Kubasek J, Serak J ve Novak P.** Mechanical and corrosion properties of newly developed biodegradable Zn-based alloys for bone fixation. *Acta Biomater*, **2011**, s.7 (9): 3515-3522.
173. **Walton M ve Cotton NJ.** Long-term in vivo degradation of poly-L-lactide (PLLA) in bone. *J Biomater Appl*, **2007**, s.21(4): 395-411.
174. **Webster TJ. ve Ejiófor JU.** Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials*, **2004**, s.25 (19): 4731-4739.
175. **Wei J, Jia J, Wu F, Wei S, Zhou H ve ark.** Hierarchically microporous/macroporous scaffold of magnesium-calcium phosphate for bone tissue regeneration. *Biomaterials*, **2010**, s.31 (6): 1260-1269.
176. **Witte F, Hort N, Vogt C, Cohen S, Kainer KU ve ark.** Degradable biomaterials based on magnesium corrosion. *Curr Opin Solid State Mater*, **2008**, s.12: 63-72.
177. **Witte F, Abeln I, Switzer E, Kaese V, Meyer-Lindenberg A ve ark.** Evaluation of the skin sensitizing potential of biodegradable magnesium alloys. *J Biomed Mater Res A*, **2008**, s.86 (4): 1041-1047.
178. **Witte F, Kaese V, Haferkamp H, Switzer E, Meyer-Lindenberg A ve ark.** In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials*, **2005**, s.26 (17): 3557-3563.
179. **Wittrant Y, Theoleyre S, Couillaud S, Dunstan C, Heymann D ve ark.** Relevance of an in vitro osteoclastogenesis system to study receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin biological activities. *Exp Cell Res*, **2004**, s.293 (2): 292-301.
180. **Wong HM, Yeung KW, Lam KO, Tam V, Chu PK ve ark.** A biodegradable polymer-based coating to control the performance of magnesium alloy orthopaedic implants. *Biomaterials*, **2010**, s.31(8): 2084-2096.
181. **Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ ve ark.** Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, **1988**, s.242 (4885): 1528-1534.
182. **Wu C, Fan W ve Zhou Y, Luo Y, Gelinsky M ve ark.** 3D-printing of highly uniform CaSiO₃ ceramic scaffolds: preparation, characterization and in vivo osteogenesis. *J Mater Chem*, **2012**, s.22: 12288.
183. **Yamamoto N, Sakai F, Kon S, Morimoto J, Kimura C ve ark.** Essential role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, **2003**, s.112 (2): 181-188.
184. **Yamasaki Y, Yoshida Y, Okazaki M, Shimazu A, Kubo ark.** Action of FGMgCO₃Ap-collagen composite in promoting bone formation. *Biomaterials*, **2003**, s.24 (27): 4913-4920.
185. **Yamasaki Y, Yoshida Y, Okazaki M, Shimazu A, Uchida T ve ark.** Synthesis of functionally graded MgCO₃ apatite accelerating osteoblast adhesion. *J Biomed Mater Res*, **2002**, s.62 (1): 99-105.
186. **Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M ve ark.** Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, s.95 (7): 3597-3602.
187. **Yun Y, Dong ZY, Yang DE, Schulz MJ, Shanov VN ve ark.** Biodegradable Mg corrosion and osteoblast cell culture studies. *Mater. Sci. Eng. C—Mater*, **2009**, s.29: 1814-1821.
188. **Zanduetta C, Ormazabal C, Perurena N, Martinez-Canarias S, Zalacain M ve ark.** Matrix-Gla protein promotes osteosarcoma lung metastasis and associates with poor prognosis. *J Pathol*, **2016**.
189. **Zberg B, Uggowitzer PJ ve Löffler JF.** MgZnCa glasses without clinically observable hydrogen evolution for biodegradable implants. *Nat Mater*, **2009**, s.8 (11): 887-891.
190. **Zhang E, Yin D, Xu L, Yang L, Yang K ve ark.** Microstructure, mechanical and corrosion properties and biocompatibility of Mg-Zn-Mn alloys for biomedical application. *Mater Sci Eng C*, **2009**, s.29: 987-993.
191. **Zhang E, Xu L, Yu G, Pan F ve Yang K.** In vivo evaluation of biodegradable magnesium alloy bone implant in the first 6 months implantation. *J Biomed Mater Res A*, **2009**, s.90 (3): 882-893.
192. **Zhang Y ve Jordan JM.** Epidemiology of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, **2008**, s.34 (3): 515-529.
193. **Zreiqat H, Howlett CR, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G ve ark.** Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *J Biomed Mater Res*, **2002**, s.62 (2): 175-184.

194. **Zreiqat H, Valenzuela SM, Nissan BB, Roest R, Knabe C ve ark.** The effect of surface chemistry modification of titanium alloy on signalling pathways in human osteoblasts. *Biomaterials*, **2005**, s.26 (36): 7579-7586.



ÖZGEÇMİŞ

Leyla ATAÇ; İlk, orta ve lise eğitimini Hatay'da tamamladı. Lisans eğitimini 2014 yılında Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde tamamladı.

