



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KÖPEKLERDE YAĞ DOKU KÖKENLİ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
 β -TCP ve β -TCP/KOLLAJEN İÇERİKLİ
BİYOMATERYALLERDE KEMİĞE FARKLILAŞTIRILMASI**

Özge ÖZGENÇ

**HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman ÖZEN**

**ANKARA
2019**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÖPEKLERDE YAĞ DOKU KÖKENLİ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
 β -TCP ve β -TCP/KOLLAJEN İÇERİKLİ
BİYOMATERYALLERDE KEMİĞE FARKLILAŞTIRILMASI**

Özge ÖZGENÇ

**HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman ÖZEN**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
17L0239015 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2019**

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Köpeklerde yağ doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin β -TCP ve β -TCP/kollajen içerikli biyomateryallerde kemiğe farklılaştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Özge ÖZGENÇ

Tarih: 27.11.2019

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında
Özge ÖZGENÇ tarafından hazırlanan
“Köpeklerde yağ doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin β -TCP ve β -
TCP/kollajen içerikli biyomateryallerde kemiğe farklılaştırılması” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak Oy Birliği
ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19 / 12 / 2019

Prof. Dr. Asuman ÖZEN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Hikmet ALTUNAY
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Sevil ATALAY VURAL
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Hatice ERDOST
Uludağ Üniversitesi

Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Raportör

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1.GİRİŞ	1
1.1. Kök Hücre	1
1.1.1. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri	2
1.1.2. Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Kök Hücreler	4
1.1.2.1. Embriyonik Kök Hücreler	4
1.1.2.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler	5
1.1.2.2.1. Yetişkin Kök Hücreler	6
1.1.2.2.1.1. Hematopoetik Kök Hücreler	6
1.1.2.2.1.2. Mezenkimal Kök Hücre (MKH)	7
1.1.2.2.1.3. Diğer Yetişkin Kök Hücreleri	9
1.1.2.2.2. Fetal Kök Hücreler	10
1.1.2.2.3. Kadavra Kök Hücreleri	10
1.1.2.2.4. Göbek Kordonu ve Plasentadan Elde Edilen Kök Hücreler	10
1.2. Kemik Doku Mühendisliği ve Biyomateryaller	11
1.2.1. Doğal Biyomateryaller	12
1.2.2. Sentetik Biyomateryaller	15
1.2.2.1. Metalik Biyomateryaller	15
1.2.2.2. Seramikler	17
1.2.2.3. Polimerler	18
2.GEREÇ VE YÖNTEM	21
2.1.Yağ Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücre (Y-MKH) İzolasyonu	21
2.2.Y- MKH Karakterizasyonu	22
2.2.1. Üçlü Farklılaştırma	22
2.2.1.1. Osteojenik Farklılaştırma	22
2.2.1.2. Kondrojenik Farklılaştırma	23
2.2.1.3. Adipojenik Farklılaştırma	23
2.2.2. Akış Sitometrisi	24
2.3. Biyomateryale Ekim	24
2.4. MTT (Canlılık Testi)	25
2.5. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM)	26
2.6. Alkalen Fosfataz (ALP)	26
2.7. Von Kossa Boyaması	27
2.8. Real Time PCR (RT-PCR)	27
3.BULGULAR	29
3.1.Yağ Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücre (Y-MKH) İzolasyonu	29

3.2. Y- MKH Karakterizasyonu	30
3.2.1. Üçlü Farklılaştırma	30
3.2.2. Akış Sitometrisi	33
3.3. MTT (Canlılık Testi)	35
3.4. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM)	36
3.5. Alkalen Fosfataz (ALP)	38
3.6. Von Kossa Boyaması	39
3.7. Real Time PCR	40
4.TARTIŞMA	43
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	48
ÖZET	49
SUMMARY	50
KAYNAKLAR	51
EKLER	63
Ek-1. Etik Kurul Kararı	64
Ek-2. MTT Kalibrasyon Eğrisi	66
Ek-3.ALP Kalibrasyon Eğrisi	67
ÖZGEÇMİŞ	68

ÖNSÖZ

Veteriner Hekimliği alanında, köpeklerde kemik kırıkları ve hastalıklarının tedavisi için mezenkimal kök hücre ile birlikte biyomateriyal kullanımı ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Kemik doku ile uyumlu biyomateriyallerin türe özgü mezenkimal kök hücre ile birlikte kullanımı sonucunda köpeklerde ortopedik hastalıkların tedavisinin standartlaştırılabileceği ve tedavi başarısının arttırılabileceği düşünülmektedir. Bu amaç için kemik doku mühendisliğine uygun iki biyomateriyal üzerinde mezenkimal kök hücre üretilerek hücrelerin materyaller üzerinde kemiğe farklılaşma kapasiteleri karşılaştırılmıştır.

Doktora eğitimim boyunca kendimi geliştirmemde ve bu tez çalışmasını tamamlamamda büyük katkısı olan danışman hocam Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Asuman ÖZEN'e, tez çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU'na ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr. Ahmet CEYLAN'a, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalındaki ve tez izleme komitesindeki değerli hocalarıma, laboratuvar imkanlarını bana sunarak tezin hazırlanmasına hem maddi hem manevi katkı sağlayan hocam Ankara Üniversitesi Biomedikal Mühendisliği Bölümü Dr. Öğr. Üyesi Açelya YILMAZER AKTUNA'ya ve Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Biyoteknoloji doktora programı öğrencisi dostum Ezgi İrem BEKTAŞ TAŞ'a, Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Halil Murat AYDIN'a ve BMT Calsis firmasına teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince yanımda olduklarını ve bana olan güvenlerini hep hissettiren İbrahim Taha ÇINAR'a, Pınar ÇINAR'a, Halenur ŞAHİN MAHMUTOĞULLARI'na ve Emine BİRCAN'a, ne kadar teşekkür etsem az olacak

olan ablam Nurcihan KARABUDAK’a, bundan önce olduğu gibi bundan sonra da desteği ile yanımda olacağına emin olduğum annem Şefika ÖZGENÇ’e ve nasıl teşekkür edeceğimi bilemediğim babam Tefik Sinan ÖZGENÇ’e tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Projenin yürütölmesine mali destek sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğüne ve doktora eğitimim boyunca bana 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Bursu veren TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığına teşekkür ederim.



SİMGELER VE KISALTMALAR

Δ	Delta
%	Yüzde
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
μ	Mikro
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
ACTB	Aktin-beta
ALP	Alkalen fosfataz
β -TCP	β -trikalsiyum fosfat
β -TCP/kol	β -trikalsiyum fosfat/kollajen
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary Deoksiribo Nükleik Asit
CO_2	Karbondioksit
Ct	Eşik döngüsü (Threshold cycle)
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
FDA	Amerikan gıda ve ilaç dairesi
G	G kuvveti
g	Gram
HA	Hidroksiapatit kristalleri
HMDS	Hexamethyldisilazane
Kİ-MKH	Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücre
mg	Miligram
MKH	Mezenkimal kök hücre
mm	Milimetre
MR	Magnetik rezonans
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MTT	Canlılık testi
Nm	Nanometre
Oct4	Octomer-binding transcription factor 4

OPF	Oligo poli etilen glikol fumarat
p-NPP	p-nitrofenil fosfat
PBS	Phosphate buffered saline
PCL	Poli-kaprolakton
PCPP-SA	Poli karboksifenoksi propan-sebasik asit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDLA	Poli d-laktik asit
PGA	Poli glikolik asit
PI3K/Akt	Fosfatidilinositol 3-kinaz/serin treonin kinaz
PLA	Poli laktik asit
PLDLA	Poli 1, d-laktik asit
PLGA	Poli laktik-coglikolik asit
PLLA	Poli 1-laktik asit
PPF	Poli propilen fumarat
PPF ko-EG	Poli propilen fumarat-ko-etilen glikol
PUR	Poliüretan
RNA	Ribonükleik asit
Rnaz	Ribonükleaz
Rpm	Revolution per minute
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı elektron mikroskop
Sox2	Sry-box containing gene
SPARC	Secreted protein acidic and cysteine rich
UV	Ultraviolet
Y-MKH	Yağ dokudan elde edilen mezenkimal kök hücre

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Ovariohisterektomi operasyonu sırasında alınan yağ dokusu	22
Şekil 2.2. A. β -TCP içerikli biyomateryal B. β -TCP/kol içerikli biyomateryal C. Hücre ekili biyomateryaller	25
Şekil 3.1. 5. gün yağ doku etrafındaki Y-MKH'ler	29
Şekil 3.2. 3. hafta %80 konfluent mezenkimal kök hücreler	30
Şekil 3.3. 14. gün Von Kossa boyaması	31
Şekil 3.4. 21. gün Alcian Blue boyaması	32
Şekil 3.5. 21. Gün Oil Red O boyaması	33
Şekil 3.6. A. Kontrol, B. CD 29, C. CD 34, D. CD 271, E. CD 90, F. CD 81, G. CD 44, H. CD 73	34
Şekil 3.7. MTT hücre sayısı-zaman grafiği	35
Şekil 3.8. β -TCP kontrol	36
Şekil 3.9. β -TCP ve Y-MKH	37
Şekil 3.10. β -TCP/kol kontrol	37
Şekil 3.11. β -TCP/kol ve Y-MKH	38
Şekil 3.12. Alkalen fosfataz aktivitesi analizi	39
Şekil 3.13. A. β -TCP, 7. gün; β -TCP, 14. gün; C. β -TCP, 21. gün D. β -TCP/kol 7 gün; E. β -TCP/ kol 14. gün; F. β -TCP/ kol 21. gün	40
Şekil 3.14. RUNX2 göreceli gen ifadesi	41
Şekil 3.15. SPARC göreceli gen ifadesi	42

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan primerlere ait diziler

28



1. GİRİŞ

1.1. Kök Hücre

Canlı vücudunu oluşturan hücreler üç temel gruba ayrılır. Bunlar germ hücreleri, somatik hücreler ve kök hücrelerdir. Somatik hücreler, canlıyı oluşturan hücrelerin büyük kısmını oluşturan farklılaşmış durumdaki hücrelerdir. Germ hücreleri, bir organizmanın gamet oluşturmaya olanak veren sperm ve yumurta hücreleridir (Bongso ve Richards, 2004). Kök hücreler ise bir canlının vücudunda ya da laboratuvar ortamında farklılaşmadan bölünmeye devam ederek kendini yenileyebilen, gerektiğinde farklılaşarak başka hücre tiplerine dönüşebilen hücrelerdir (Bongso ve Lee, 2005).

Kök hücre terimi ilk kez Rus histolog Alexander Maximow tarafından 1908 yılında kullanılmıştır. Maximow, kök hücreleri kandaki hücrelerin atası olarak tanımlamıştır (Can, 2014). Kök hücre çalışmaları kemik iliği nakilleri ile başlamıştır. Becker ve ark. (1963), fare kemik iliği hücrelerinin nakil sonrası kendilerini yenileme kapasitelerinin olduğunu tanımlamışlardır. Evans ve Kaufman (1981), ayrıca onlardan bağımsız olarak Martin (1981), fare embriyosundan embriyonik kök hücre elde etmiştir. Bu çalışmaları takiben 1998 yılında Thomson ve çalışma arkadaşları ilk insan embriyo kök hücre serilerine ulaşmışlardır. Ülkemizde ilk kök hücre çalışmaları Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün tarafından 1950-1960 yılları arasında gerçekleştirilmiştir. Aygün kök hücrelerin amniyotik sıvıda, plasentada ve kordon kanında var olduğunu ve bu hücrelerin yardımıyla insan ömrünün uzatılabileceğini belirtmiştir (Şahin ve ark., 2005 ve Şimşek, 2012).

1.1.1. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri

Kök hücrelerin köklülük (potensi), farklılaşma (plastisite) ve kendini yenileyebilme (self-renewal) olmak üzere başlıca üç temel özelliği vardır (Tekeli ve ark., 2016).

Köklülük, kök hücreleri diğer hücre tiplerinden ayırt eden moleküler ve hücresel özellikleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Potensi, her üç germ yaprağına ve bunların türevlerine farklılaşma yeteneği olarak tanımlanır. Bu tanıma göre pluripotent özelliği gerçek anlamda taşıyan hücre grubu, embriyonik kök hücreler ve bu hücrelerin bazı türevleridir (Can, 2014; Cavaleri ve Schöler, 2009 ve Tekeli ve ark., 2016).

Kök hücrelerin pluripotensi özelliklerini etkileyen birtakım iç ve dış etkenler vardır. İç etkenler, dış etkenlerle uyarılan veya hücrede yapısal olarak bulunan Oct4 (octamer-binding transcription factor), Sox2 (Sry-box containing gene) ve Nanog transkripsiyon faktörleri ve bunlarla ilişkili proteinlerdir. Oct4, embriyoda gen aktivasyonundan sonra ifadesi artan ve blastokistin oluşmasıyla ifadesi azalan bir transkripsiyon faktörüdür. Oct4'ün embriyonik kök hücrelerin kendini yenilemesi ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (Niwa ve ark., 2000). Sox2 ise Oct4 gibi implantasyon öncesi ifade edilen ve embriyonik kök hücrelerin trofoektoderm yönünde farklılaşmasını sağlayan bir gendir (Masui ve ark., 2007). Nanog ise göçünü tamamlamış olan cinsiyet hücrelerinde görülen, implantasyon sırasında ifadesi artan ancak hemen sonrasında ifade düzeyi düşen bir transkripsiyon faktörüdür. Nanog'un ifadesi azaldığında embriyonik kök hücreler hipoblast hücrelerine farklılaşır (Chambers ve ark., 2007). Kök hücrelerin pluripotensi özelliklerini etkileyen dış etkenler ise embriyo fibroblastları ve sitokinler, büyüme faktörleri, aktivin/Nodal mekanizması, PI3K/Akt (fosfatidilinositol 3-kinaz/serin treonin kinaz) sinyal yolu gibi faktörler sayılabilir (Can, 2014).

Kök hücrelerin farklılaşma özelliği, özelleşmemiş hücrelerin özelleşmiş hücrelere dönüşürken geçirdikleri bir dizi değişim olarak tanımlanır. Kök hücreler tek bir hücreden birden fazla hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahiptir. Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent kök hücreler olarak ayrılırlar. Tek bir hücrenin, ekstraembriyonik membranlar da dâhil olmak üzere bir organizmadaki tüm farklı hücreleri oluşturma yeteneği totipotent olarak tanımlanmaktadır. Zigotun, aynı zamanda 2 ve 4 hücreli evreden izole blastomerlerin totipotent özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Hücre bölünmeleri devam ettikçe totipotent hücreler farklılaşmaya başlayarak blastokist denilen içi boş hücre grubunu oluştururlar. Blastokistin iç tabakasında bulunan ve yaklaşık 200 hücre çeşidine dönüşebilen bu hücrelere pluripotent hücreler denir. Bu hücreler aynı zamanda embriyonik kök hücreler olarak da adlandırılmaktadır. Erken gelişim dönemlerinde bulunan pluripotent hücreler farklılaşmalar geçirerek erişkin bireylerde bulunan özel hücre gruplarına dönüşürler. Bu hücre grubu tek bir doku veya hücreye farklılaşmak üzere programlanmıştır ve multipotent kök hücreler olarak isimlendirilir. Sadece tek bir hücre grubuna sahip kök hücrelere ise unipotent kök hücreler denir (Bongso ve Lee, 2005 ve Mitalipov ve Wolf, 2009).

Kök hücrelerin farklılaşma özelliği ile bağlantılı olarak, geriye farklılaşma (dediferansiyasyon) ve öteye farklılaşma (transdiferansiyasyon), farklılaşma teriminden türeyerek başka anlamlar kazanmış kavramlardır. Geriye farklılaşma (dediferansiyasyon), farklılaşma sürecini tamamlamış veya farklılaşmakta olan bir hücrenin erken gelişim evrelerindeki seviyesine geri dönmesidir. Öteye farklılaşma (transdiferansiyasyon) ise farklılaşmasını tamamlamış bir hücrenin başka bir olgun hücreye doğrudan farklılaşması olarak tanımlanır (Can, 2014).

Kök hücrelerin bir diğer özelliği olan kendini yenileme, kök hücrelerin yaşamları boyunca sayılarını korumak için henüz farklılaşmamışken çoğalmaları olarak tanımlanır. Kendini yenileyebilme aynı zamanda bölünmeden önceki hücrenin karakterini taşıyan en az bir hücre oluşturma yeteneği olarak da açıklanır. Kök hücreler ya simetrik bölünerek logaritmik olarak çoğalırlar ya da asimetric bölünürler. Asimetrik bölünme çevre asimetrisi ve bölünme asimetrisi olmak üzere iki şekilde

gerçekleşebilir. Çevre asimetrisiyle bölünme sonucu oluşacak iki yavru hücreden biri kök hücre olmayı sürdürür. Diğer yavru hücrenin farklılaşıp farklılaşmayacağı çevre faktörlerinin etkisiyle ya da rastgele belirlenir. Bölünme asimetrimesinde ise bölünme sonucu oluşacak iki hücreden biri daima ana hücrenin tüm özelliklerini taşıırken, diğeri determinasyon sürecine girerek kalıcı olarak farklılaşır (Can, 2014 ve Sell, 2004).

1.1.2. Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Kök Hücreler

Kök hücreler elde edildikleri kaynağa göre embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kök hücreler olmak üzere ikiye ayrılır. Embriyonik kök hücreler, embriyonun erken gelişim sürecinde blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen hücrelerdir. Embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler ise yetişkin kök hücreleri, fetal kök hücreleri, kadavra kök hücreleri, göbek kordonu ve plasentadan elde edilen kök hücreler olarak gruplandırılır (Can, 2014).

1.1.2.1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler, memelilerde implantasyon öncesi gelişim aşamalarından olan blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen özel pluripotent kök hücrelerdir (Smith, 2001). Bu hücreler farklılaşmaksızın bölünebilme ve uyarıldıklarında farklılaşarak üç embriyonik germ yaprağının türevlerini oluşturma özelliklerine sahiptir. Embriyonik kök hücrelerin özellikleri üç bölümde incelenebilir. Bunlar:

- İmplantasyondan önceki evre embriyosundan elde edilmeleri,
- Uzun süre inkübe edildiklerinde farklılaşmadan çoğalabilme özelliklerinin olması,
- Uzun süre inkübe edilseler bile her üç embriyonik germ yaprağının türevlerini oluşturma yeteneğini sürdürmeleridir (Thomson, 1998).

Embriyonik kök hücreler, sinir hücresi ve kalp kası gibi yaşamsal önemi fazla olan hücreleri oluşturma kapasitesine sahiptir. Ayrıca embriyonik kök hücrelerin tip 1 diyabet, santral sinir sistemi hastalıkları, Alzheimer, Parkinson, osteoartrit ve miyokard infarktüsü gibi hastalıklarda tedavi potansiyeli vardır. İnsan embriyonik kök hücrelerinin in vitro kemik, kırık, kas, bağırsak epiteli, nöron ve diğer hücre tiplerine farklılaştığı bilinmektedir. Hayvan modellerinde embriyonik kök hücrelerden elde edilmiş kardiyomiyositlerin, nöronların, mast hücrelerinin ve insulin salgılayan hücrelerin transplantının başarılı olduğu, bu hücrelerin nakledildikleri dokuda yaşadığı görülmüştür (Karaşahin, 2012 ve Sökmensüer, 2007).

Embriyonik kök hücrelerin tedavide kullanımlarını sınırlayan birtakım sorunlar mevcuttur. Hücrelerin farklılaşması sırasında teratom oluşturma etkisi henüz çözülememiştir (Hentze ve ark., 2007). Embriyonik kök hücrelerin laboratuvar ortamında farklı hücrelere farklılaşma potansiyeli bilinse de bu dönüşümde rol oynayan moleküler mekanizmalar açık değildir. Hücrelerin tedavi amaçlı kullanımlarından önce farklılaşma mekanizmalarının detaylı olarak araştırılması ve immun tolerans sorununun giderilmesi gereklidir (Türkşen, 2005).

1.1.2.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

Embriyonik kökenli olmayan kök hücreler yetişkin kök hücreleri, fetal kök hücreler, kadavradan elde edilen kök hücreler ve göbek kordonu ve plasentadan elde edilen kök hücreler olmak üzere sınıflandırılır (Bongso ve Lee, 2005).

1.1.2.2.1. Yetişkin Kök Hücreler

Bir doku ya da organda bulunan henüz farklılaşmamış, kendini yenileyebilen, içinde bulunduğu doku veya organın hücre tiplerine farklılaşabilen hücrelere yetişkin kök hücreler denir. Bu hücrelerin başlıca görevleri hasarlı dokuları tamir etmek ve sağlıklı dokuların devamlılığını sağlamaktır. Vücuttaki kök hücrelerin sayısı yaş ilerledikçe azalır. Bu nedenle vücudun kendini yenileme yeteneği yaş ilerledikçe yetişkin kök hücrelerin sayısı ile orantılı olarak azalır (Caplan, 2008).

Günümüzde üzerinde en çok araştırma yapılan yetişkin kök hücre türleri hematopoetik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler, endotel kök hücreleri, nöral kök hücreler ve bağırsak kök hücreleridir.

1.1.2.2.1.1. Hematopoetik Kök Hücreler

Hematopoez, kan kök hücrelerinin üretimi, çoğalması ve periferik kan hücrelerine farklılaşması olarak tanımlanır. Hematopoetik kök hücreler mezodermden köken alır ve embriyoda kemik iliği, karaciğer ve vitellus kesesi gibi hematopoetik bölgelerde bulunur. Erişkinde kemik iliğinden, periferik kandan ve kordon kanından izole edilebilir. Kemik iliği hematopoetik, endotelial ve mezenkimal kökenli kök hücreleri içerir. Hematopoetik kök hücrelerin kendilerini yenilemeleri, hücre siklusunun G0 evresinde kalmaları, üremeleri, farklılaşmaları ve dolaşıma girmeleri gibi olaylar kemik iliğindeki niş adı verilen özel mikroçevrelerde gerçekleşir. Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücreler pluripotent özelliktedir ve en az 10 farklı (eritrosit, eozinofil, nötrofil, monosit/makrofaj, bazofil, trombosit, mast hücreleri, dendritik hücreler, B ve T lenfositler) hücre tipini oluşturur (Bongso ve Lee, 2005; Pinho ve Frenette, 2019 ve Ural, 2006).

1.1.2.2.1.2. Mezenkimal Kök Hücre (MKH)

Mezenkimal kök hücreler, kültür kabının yüzeyine tutunan, uyarıldıklarında birçok farklı hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip, tek bir kök hücreden koloniler oluşturabilen multipotent kök hücrelerdir (Caplan, 1991). Fridenstein ve ark., (1966) tarafından fare kemik iliği stroması nakli yapılmış ve stromanın kemik, yağ, kıkırdak ve retikulum hücrelerine dönüşebildiği gösterilmiştir. Bu çalışma ile kemik iliğinde hematopoetik hücrelerden başka bir grup kök hücrenin varlığı ilk kez ortaya koyulmuştur. Daha sonra bu hücre grubunun fibroblastların öncüsü kök hücreler olduğu gösterilmiştir (Fridenstein ve ark., 1970). MKH'lerin in vitro ortamda tek bir koloni haline getirilerek osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaştırılması 1999 yılında gerçekleştirilmiştir (Pittenger ve ark., 1999).

MHK'lerin kemik iliğinden izolasyonundan sonra birçok dokudan ayrıştırılması gerçekleşmiştir. MKH'ler özellikle çok sayıda damar bulunduran bağ dokusuna sahip dokulardan izole edilmektedir. Günümüzde yetişkin MKH'ler, kemik (Bruder ve ark., 1997), periost (Nakahara ve ark., 1991), periferik kan (Fernandez ve ark., 1997), tendon (Young ve ark., 1998), iskelet kası (Williams ve ark., 1999), diş pulpası (Gronthos ve ark., 2000), dermis (Young ve ark., 2001), sinovial sıvı (De Bari ve ark., 2001), yağ dokusu (Zuk ve ark., 2001), göbek kordonu (Romanov ve ark., 2003), kıl folikülü (Jahoda ve ark., 2003), kıkırdak (Alsalameh ve ark., 2004), periyodondal ligament (Seo ve ark., 2004), akciğer (Sabatini ve ark., 2005), dalak (Krampera ve ark., 2007), endometriyum (Schwab ve Gargett, 2007), intervertebral disk (Risbud ve ark., 2007), menstrüal kan (Cui ve ark., 2007), pankreas (Gallo ve ark., 2007), timus (Krampera ve ark., 2007), göz (Polisetty ve ark., 2008), retina (Covas ve ark., 2008) ve fallop tüpü (Jazedje ve ark., 2009) gibi doku ve organlardan elde edilmiştir.

Yağ dokudan MKH'lerin elde edilebileceği gösterilmiştir (Zuk ve ark., 2001). Yağ doku kaynaklı kök hücreler direkt yağ dokusunun eksizyonu ve parçalanması sonrası (eksplant kültür metodu) veya lipoaspirat materyallerinin kollajenaz enzimi ile

parçalanması sonrası kültüre edilerek çoğaltılmasıyla elde edilir (Jurgens ve ark., 2008). Yağ dokudan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin (Y-MKH), izole edildikleri yağ kaynağına göre farklılaşma kapasiteleri farklılık göstermektedir. İnguinal bölgedeki yağ dokudan izole edilen mezenkimal kök hücreler; abdominal, perirenal ve omental bölgedeki yağ dokulardan izole edilen mezenkimal kök hücrelere göre daha yüksek farklılaşma kapasitesine sahiptir (Marx ve ark., 2015). Yağ dokudan elde edilen mezenkimal kök hücreler günümüzde bilimsel araştırmalarda en çok kullanılan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerle benzer morfoloji, fenotip ve diferansiyasyon yeteneğine sahiptir (Tognarini ve ark., 2008). Mezenkimal kök hücrelerin yağ dokudan kemik iliğine kıyasla 50 kat fazla izole edilebildiği bilinmektedir. Bir gram yağ dokudan yaklaşık 5.000 kök hücre izole edilebilirken, 1 ml kemik iliği aspiratından 100 ila 1.000 hücre izole edilebilmektedir (Via ve ark., 2012). Ayrıca Y-MKH'lerin kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerden (Kİ-MKH) daha fazla osteojenik farklılaşma potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Correia ve ark., 2012 ve Marx ve ark., 2015). Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ağırlı izolasyonunun aksine, Y-MKH izolasyonu hastaların konforu açısından daha avantajlıdır (Romagnoli ve ark., 2014). Y-MKH'lere deri altına yapılacak yağ aspirasyonu ile kolaylıkla erişilebilmektedir. Öte yandan, Y-MKH'ler hastanın kendi yağ dokusundan izole edildiği için embriyonik kök hücrelere kıyasla etik ve politik açıdan sorunu yoktur (Dai ve ark., 2016 ve Sándor, 2012). Tüm bu avantajları Y-MKH'leri günümüzde kemik iliğinden sonra çok tercih edilen mezenkimal kök hücre kaynaklarından biri yapmaktadır.

MHK'ler embriyolojik kökeni farklı birçok doku ve organdan elde edilebilir. Bu durum MKH'lerin karakterizasyonunda tutarsız sonuçlara yol açmıştır. Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği 2008 yılında Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi tarafından belirlenen MHK ölçütlerini yayımlamıştır. Buna göre MKH'ler;

- Standart kültür koşullarında plastiğe yapışarak üreme özelliğinde olmalı,
- Osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma özelliğine sahip olmalı,
- CD 73, CD 90 ve CD 105 yüzey antijenlerini ifade etmeli, CD 34, CD 45, CD 14 veya CD 11b, CD 19 veya CD 79 ve HLA class II açısından ise negatif olmalıdır

(Dominici ve ark., 2006).

Yayımlanan bu kriterler, MKH karakterizasyonu için altın standart olarak kabul edilse de günümüzde hücrelerin izole edildiği hayvan türüne ve izole edilen kaynağa göre değişmek üzere birçok pozitif ve negatif belirteç bulunmaktadır. Kİ-MKH için CD 44, CD 73, CD 90, CD 105, CD 106 pozitif; buna karşın CD 14, CD 34 ve CD 45 negatif olarak kabul edilmektedir. Y-MKH için ise CD 9, CD 13, CD 29, CD 44, CD 54, CD 73, CD 90, CD 105, CD 106, CD 117, CD 140b, CD 146, CD 166 ve HLA I belirteçleri pozitif iken CD 11b, CD 14, CD 19, CD 31, CD 34, CD 45, CD 79 alfa, CD 133 ve CD 144 ifadeleri negatif olarak kabul edilir (Morikawa ve ark., 2009; Romanov ve ark., 2005 ve Wilson ve ark., 2019).

Mezenkimal kök hücreler, kardiyovasküler hastalıklar, Crohn hastalığı, sistemik lupus akut miyeloblastik lösemi, romatoid artrit, oto-immun ensefalomyelitis, diyabet, multiple skleroz gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Lee ve ark., 2004). Ancak mezenkimal kök hücrelerin en yaygın olarak ortopedi ve travmatoloji alanında, özellikle kemik, kırık ve tendon hastalıklarının tedavileri için doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır (Caplan, 2008).

1.1.2.2.1.3. Diğer Yetişkin Kök Hücreleri

Hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerin yanında iskelet, dolaşım, sindirim, sinir ve üreme sistemindeki kök hücreler ve aynı zamanda kanser kök hücreleri de günümüzde üzerinde sıklıkla çalışılan yetişkin kök hücrelerdir.

1.1.2.2.2. Fetal Kök Hücreler

Fetüslerin organlarında bulunan primitif hücre tipleridir. Bu hücreler fetüsün kan, kemik iliği, karaciğer, pankreas, böbrek ve beyin gibi dokularından izole edilebilmektedir. Fetüs kanı zengin bir hematopoetik kök hücreden kaynağıdır ve buradaki kök hücreler kordon kanı ve erişkin kemik iliği kök hücrelerine göre daha hızlı çoğalmaktadır. Fetal kök hücreler sonsuz sayıda bölünme ve kendilerini yenileme özelliğine sahiptir. Fetüs kök hücreleri pluripotent yapıda olup gerekli koşullar sağlandığında kas, sinir, karaciğer hücresi gibi değişik hücre türlerine dönüşebilmektedir. Günümüzde birtakım kalıtsal hastalıklar fetal kaynaklı kök hücre nakilleri ile tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Ancak fetal kök hücre çalışmalarında da embriyonik kök hücre çalışmalarında olduğu gibi etik sorunlarla karşılaşılmaktadır (O'Donoghue ve Fisk, 2004).

1.1.2.2.3. Kadavra Kök Hücreleri

Kadavralar genellikle organ nakilleri için tercih edilirler ancak kadavralardan aynı zamanda hematopoetik, mezenkimal ve nöral kök hücrelerin izole edilebileceği bilinmektedir. Kadavra kökenli hücrelerden izole edilen kök hücrelerin çoğalma hızları, kadavraların yaşıyla ters orantılıdır (Valente ve ark., 2014).

1.1.2.2.4. Göbek Kordonu ve Plasentadan Elde Edilen Kök Hücreler

Prindull ve ark., (1978) tarafından insan göbek kordonu kanındaki kök hücrelerin varlığı ilk kez ortaya koyulmuşur. Göbek kordonu kanından hematopoietik kök hücreler 1982'de izole edilmiş ve ilk göbek kordon kanı transplantasyonu 1988 yılında yapılmıştır. Göbek kordonu stromasından elde edilen kök hücreler, Wharton jelinden, perivasküler alandan, subamniyotik membrandan izole edilebilmektedir (Lee ve ark., 2004; Nagamura-Inoue, 2014 ve Puranik ve ark., 2012).

Plasenta doğum sonrası atılacak bir doku olduğu için erişilebilirliği yüksek bir kök hücre kaynağıdır. Aynı zamanda plasentadan izole edilen kök hücreler için etik kaygılar azdır. Kemik iliğinden izole edilen kök hücreler ile plasentadan elde edilen kök hücreler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Bu özellikleri nedeniyle alternatif bir kök hücre kaynağı olabileceği düşünülmektedir (Barlow ve ark., 2008 ve Brooke ve ark., 2009).

1.2. Kemik Doku Mühendisliği ve Biyomateriyaller

Kemik doku mühendisliği, doğal kemiğin yapısını ve iyileşme sürecini taklit edebilecek yeni bir materyal tasarlamakla ilgilenen bilim dalıdır.

Biyomateriyaller ile ilgili çalışmalar günümüzden yaklaşık 2000 yıl önce Çinliler ve Romalıların dokuların tamirinde tunç ve bakır kullanmasıyla başlamıştır. Biyomateriyal kullanım denemeleri enfeksiyonla sonuçlandığı için 19. yüzyıla kadar biyomateriyal çalışmalarında kayda değer bir gelişme gerçekleşmemiştir. Aseptik cerrahi yöntemlerin keşfi ile birlikte doku tamirinde biyomateriyal kullanımı denemeleri artmıştır (Kümbüloğlu ve Oral, 2013). 1800'lü yıllarda gerçekleştirilen birçok başarısız biyomateriyal denemesinin ardından, Philip Wiles tarafından 1938 yılında paslanmaz çelikten oluşan ilk kalça protezi uygulaması başarıyla gerçekleştirilmiştir. Sonraki yıllarda titanyum implantlar bulunmuş ve bu materyal ilk kez Brånemark ve ark., (1969) tarafından uygulanmıştır.

Kemik, kendi kendine iyileşme ve skar dokusu oluşturmada rejenerasyon olabilmek için yeteneğine sahip bir doku olsa da bu rejenerasyon her zaman tam olarak gerçekleşmemektedir. Büyük defektler ve çok parçalı kırıklarda kemiğin rejenerasyon kapasitesi yetersiz kalmaktadır. Bunun gibi vakalarda kemik defektlerinin çeşitli biyomateriyaller ile doldurulması, kemiğin iyileşmesinin hızlandırılması ve iyileşme sürecine yapısal ve mekanik destek sağlanabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Huri ve ark., 2010). Üç boyutlu biyomateriyaller,

moleküler büyüme faktörleri ve hücre dışı matriksleri bir araya getirerek hücre çoğalması sağlar. Bunun yanında hücrelerin canlı kalma oranı ve farklılaşması için dokuların veya organların büyümesini düzenleyen mikro çevreyi meydana getirmektedir (Dai ve ark., 2016 ve Mravic ve ark., 2014).

İdeal kemik dolgu malzemesi, kemiğin hasarlı bölgeyi dolduracak şekilde büyümesine olanak sağlayacak osteokondüktif bir yapıda olmalı ve osteogenezisin gerçekleşmesi için canlı ostejenik hücreler içermelidir. Ayrıca kemik dolgu malzemesi, dokunun rejenerasyon hızına uygun, ayarlanabilen bir degradasyon hızına ve ekstrasellüler matriks oluşumu için yeterli alan sağlayacak gözenekli yapıya sahip olmalıdır (Arahira ve Todo, 2016 ve Kümbüloğlu ve Onur, 2013).

Biyomateriyaller doğal ve sentetik biyomateriyaller olmak üzere iki gruba ayrılır.

1.2.1. Doğal Biyomateriyaller

Son yıllarda doğal içerikli biyomateriyaller, biyobozunurluk ve biyouyumluluk özelliklerinin fazla olması ve bununla beraber düşük toksisiteye sahip olmaları nedeniyle bilim insanlarının dikkatini çekmektedir. Doğal biyomateriyallerin bu avantajlı özelliklerinin yanında hücre yapışmasını ve kemiğin yeniden şekillenmesini teşvik edici özellikleri de vardır. Doğal biyomateriyaller bu olumlu özelliklerinin yanında, mekanik olarak zayıf olmaları, düşük kimyasal stabiliteye sahip olmaları, enfeksiyon riskine sentetik biyomateriyallere göre daha açık olmaları gibi bazı dezavantajlara da sahiptir (Kim ve ark., 2011; Puppi ve ark., 2010 ve Sarkar ve ark., 2013).

Kemik dokusu mühendisliğinde en çok kullanılan doğal biyomateriyaller, kollajen, jelatin, aljinat, kitosan, ipek, fibrin ve hyaluronik asittir.

Kollajen, yapısı doğal kemik dokusuna benzediği için kemik doku

mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan doğal bir polisakkarittir. Bir ekstrasellüler matriks elemanı olan kollajen, dokulardaki tüm hücrelerle etkileşime girer. Kollajenin hücrelerle biyolojik olarak uyumlu olduğu ve vücut tarafından absorbe edilebildiği bilinmektedir. Ayrıca kollajen, farklı türler arasında kullanımında bile minimal düzeyde bağışıklık reaksiyonu vermektedir ve toksik değildir. Kollajen içerikli biyomalzemeler tabaka formunda, jel formda ya da gözenekli formda üretilirler. Bu avantajlarına rağmen kollajen zayıf mekanik özellikler gösterir. Kollajenin bozulma oranının kontrol edilmesi zordur, bu nedenle kemik doku mühendisliği uygulamaları için mekanik özelliklerinin yükseltilmesi ve kimyasal stabilitesinin artırılması gerekmektedir. Kollajen içeren bir biyomateryali daha güçlü hale getirmek için veya vücutta absorbe olma oranının değiştirmek için kollajen başka biyomateryallerle çapraz bağlanabilir. Günümüzde kollajen, protez implantlarında ve kemik de dâhil olmak üzere birçok organın doku mühendisliğinde kullanılmaktadır (Malafaya ve ark., 2007 ve Rodrigues ve ark., 2003).

Jelatin, kollajenin kısmi hidroliz ile denatürasyonu ile üretilen bir biyopolimerdir. Jelatin; lizin, arginin, glutamik ve aspartik asit, lösin, izolösin, metiyonin, valin, glisin, prolin ve hidroksiprolin aminoasitlerini içerir (Elzoghby, 2013). Bu amino asit dizileri, materyale hücre tanınabilirliği, çoğalması ve farklılaştırılmasında avantaj sağlar. Ayrıca jelatin, iyi derecede biyoyumluluğa, fizyolojik ortamlarda degradesi olabilmek ve suyu absorbe edebilme kapasitesine sahiptir. Bu özellikler jelatini farmasötik amaçlar için ve sert doku mühendisliği için kullanımına uygun hale getirir (Santoro ve ark., 2014 ve Sowmya ve ark., 2013).

Aljinat, kahverengi alglerden izole edilen ve *Laminaria hyperborea*, *Laminaria japonica*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum* ve *Macrocystis pyrifera*'yı içeren bir anyonik biyomateryaldir. Aljinat, biyoyumlu, dokuda immün reaksiyona yol açmayan ve toksisitesi düşük bir materyaldir (Lee ve Mooney, 2012 ve Yang ve ark., 2011).

Kitosan, alkalik çözeltisi veya kitin deasetilaz (hidrolitik bir enzim) varlığında kitinin N-asetilasyonu ile üretilen bir biyomateryaldir. Yüksek absorpsiyon

kapasitesine sahip olması, biyoyumlu, biyobozunur, esnek ve gözenekli olması, aynı zamanda toksik olmaması kitosanın avantajlarından. Ancak mekanik dengesizlik ve fiziksel zayıflık gibi bazı dezavantajları da vardır. Kitosanın hidroksiapatit kristalleri, biyoseramikler veya biyocam ile karıştırılması mekanik özelliklerini iyileştirir. Kitosan genellikle doku mühendisliği uygulamalarında ve farmasötik amaçlar için kullanılır (Anitha ve ark., 2014 ve Shi ve ark., 2006).

İpek, çeşitli böceklerden ve örümceklerden elde edilen doğal bir biyomateriyaldir. İpek biyomateriyallerinin yüksek esneklik kapasitesi, fazla yük taşıma yeteneği, yüksek gerilimlere karşı dayanımı, düzenlenebilir biyobozunma özellikleri ve termal stabilitesi bu materyalleri doku mühendisliği uygulamaları için uygun hale getirir. İpek böceği kozasının ipliği olan *Bombyxmori* ve örümcekte elde edilen *Nephila clavipes* doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan en yaygın biyomateriyallerdir (Hardy ve Scheibel, 2010 ve Wang ve ark., 2006).

Fibrin, kanın pıhtılaşma sürecinde yer alan lifli bir proteindir. Trombin, yaralanma sonucunda fibrin proteini oluşturmak için fibrinojenin polimerizasyonunu başlatır. Fibrin makrofajlara, nötrofillere fiziksel destek sağlayarak ve fibroblastların yaralanma bölgesinden geçmesine izin vererek doku yenilenmesi sırasında iskele görevi görür. Fibrin; integrinler, büyüme faktörleri ve aynı zamanda fibronektin, fibulin, trompospondin gibi ekstrasellüler matriks elementleri için bağlanma bölgelerine sahiptir. Bu yüzden kök hücrelerin farklılaşması, anjiyogenez stimülasyonu ve kök hücre iletimi için bir iskele olarak kullanılır. Fibrin kontrol edilemeyen bir şekilde bozunmaya yatkın olsa da biyoyumlu olmasıyla, manipülasyon kolaylığıyla ve hızlı polimerizasyon kapasitesiyle doku mühendisliği için umut verici bir biyomateriyaldir (Brown ve Barker, 2014 ve Zhou ve Xu, 2011).

Hyaluronik asit bir glikozaminoglikandır ve ekstrasellüler matrikste bulunan ana elementlerden biridir. Hidrofilik olması, biyoyumluluk ve biyobozunurluk özelliklerinin yüksek olması gibi avantajları ile doku mühendisliği alanında kullanılan bir doğal bir biyomateriyaldir (Lam ve ark., 2014).

1.2.2. Sentetik Biyomateryaller

Sentetik biyomateryaller; metalik biyomateryaller, seramikler ve polimerler olmak üzere üç ana başlıkta incelenir.

1.2.2.1. Metalik Biyomateryaller

Metalik biyomateryaller kemik kırıkları ve hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir biyomateryal türüdür. Kas ve iskelet sisteminin biyomekanik özelliklerine uyumlu, güçlü metalik bağlar içeren ve kristal yapıda olan biyomateryallerdir. Ancak bu biyomateryaller sert yapıda oldukları için dokuya uyumları yok denecek kadar azdır. Bunun yanında korozyona uğradıkları ve alerjik doku reaksiyonlarına neden olabilecek yapıya sahip oldukları için kemik kırıkları ve hastalıklarının tedavisinde kullanımları sınırlıdır (Özkurt ve Tabak, 2011).

Korozyon, metallerin vücutta istenmeyen kimyasal reaksiyonlara girerek oksijen, hidroksit ve diğer bileşikler oluşturacak şekilde bozunmasıdır. Metalik biyomateryaller korozyon sonucunda zayıflar ve korozyon ürünleri hücrelere ve dokulara toksik etki yapar. Bu yüzden doku mühendisliğinde kullanılacak metalik biyomateryallerin serum, tükürük ve tampon çözeltiler içinde denemelerin yapılması gerekmektedir (Alvarez ve Nakajima, 2009).

Metalik biyomateryaller kemik protezi ve kemik yenileme malzemesi olarak ortopedik alanda kullanılmasının yanında diş implantlarında ve kalp damar cerrahisinde de kullanılmaktadır. Paslanmaz çelikler, titanyum ve titanyum alaşımları, altın, nikel, tantal, magnezyum ve kobalt metalik biyomateryallerdendir.

Kemik kırıklarının tedavisinde kullanılmaya başlanan ilk metalik biyomateryal paslanmaz çelik özelliğinde olan vanadyum çeliğidir. Günümüzde kullanan paslanmaz çelik ASTM 316L çeliğidir. Paslanmaz çelik, günümüzde diğer metalik

biyomateryallere göre daha düşük maliyetli ve kolay elde edilebilir olması nedeniyle ortopedik cerrahide plaklarda, vidalarda, kalça çivilerinde daha sık kullanılmaktadır (Navarro ve ark., 2008).

Titanyumun biyomateryal olarak kullanımı 1930'lu yıllarda başlanmıştır. Titanyum elde edilmesi ve biyomateryal haline getirilmesi zor bir metaldir. Bu dezavantajına rağmen fiziksel ve kimyasal olarak birçok avantaja sahiptir. Diğer metalik biyomateryallerden hafif bir yapıya sahip olması ve yüksek biyouyumluluğa ve düşük korozyon riskine sahip olması bu avantajların en önemlileridir. Ayrıca titanyum manyetik bir materyal olmadığından MR (magnetik rezonans) uygulaması için uygundur. Kemik doku ile iyi derecede bağlanabilen titanyum kemik kırık ve hastalıklarının tedavisinde tercih edilmektedir (Alvarez ve Nakajima, 2009 ve Niimi, 1998).

Kobalt doku mühendisliğinde kobalt-krom-molibden alaşımı ve kobalt-nikelkrom-molibden alaşımı halinde kullanılır. Kobalt-krom-molibden alaşımı diş hekimliğinde ve yapay eklemlerin üretiminde kullanılmaktadır. Kobalt-nikelkrom-molibden alaşımı ise yeni bir malzeme olup yine eklem üretiminde kullanılmaktadır.

Altın ve altın alaşımları korozyon direnci yüksek materyallerdir ve uzun ömürlüdürler. Genellikle diş tedavilerinde kaplama malzemesi olarak kullanılırlar (Pasinli, 2004).

Tantal, diğer metalik biyomateryallerden üstün fiziksel ve mekanik özelliklere sahiptir. Yüksek gözeneklilik oranına ve fiziksel olarak yük taşıyabilecek dayanıklılığa sahiptir. Ayrıca hayvan modelleriyle yapılan çalışmalar sayesinde biyouyumlu olduğu bilinmektedir (Bobyne ve ark., 1999 ve Hacking ve ark., 2000). Gözenekli tantal, yeni bir materyal olmasına rağmen, ilk klinik veriler ve preklinik çalışmalar tantalın geleneksel ortopedik metalik biyomateryallere alternatif olarak kullanımını desteklemektedir (Adams ve ark., 2005 ve Meneghini ve ark., 2008).

1.2.2.2. Seramikler

Biyomateryal alanındaki önemli gelişmelerden biri, kemik yerine biyoseramiklerin kullanımı olmuştur. Seramikler, kalsiyum fosfat içerikli biyomateryaller ve biyoaktif camlar olarak sınıflandırılır. Kalsiyum fosfat seramikleri, 30 yılı aşkın bir süredir kemiklerin inorganik bileşimi ile benzerlik gösterdiği için sentetik kemik greftlerin yerine kullanılmaktadır. Kalsiyum fosfat içeren biyomateryallere örnek olarak hidroksiapatit kristalleri (HA), oktakalsiyum fosfat, kalsiyum fosfat, α -trikalsiyum fosfat (α -TCP) ve β -trikalsiyum fosfat (β -TCP) sayılabilmektedir (Takahashi ve ark., 2005).

Hidroksiapatit bir çeşit kalsiyum fosfat birleşenidir ve istenilen şekil ve kıvamda elde edilebilen bir biyomateryaldir. Osteokondüktif özelliğinin fazla olması ve kemik morfojenik proteinine bağlanma kapasitesinin yüksek olması HA'nın sahip olduğu avantajlardandır. Ancak bu biyomateryalin dokuda degrade olma süresi çok uzundur. Bu yüzden diğer seramik biyomateryallerle birlikte kullanımı daha yaygındır (Tomin ve ark., 2002).

Beta-trikalsiyum fosfat (β -TCP), kemik kırıklarının ve hastalıklarının tedavisinde kullanımının uygunluğu açısından en çok incelenen biyoseramiktir. Kalsiyum fosfat içerikli biyomalzemeler dökme, granül, toz veya kaplama formunda üretilebilir (Takahashi ve ark., 2005).

Çok sayıda in vivo ve in vitro değerlendirmede, β -TCP'nin mükemmel biyoyumluluğa ve osteokondüktiviteye sahip olduğu; aynı zamanda mezenkimal hücrelerin farklılaşmasını ve çoğalmasını desteklediği gösterilmiştir (Cao ve Kuboyama, 2010; Ebrahimi ve ark., 2017; Seo ve ark., 2012 ve Tebyanian ve ark., 2019). β -TCP, hızlı biyobozunma özelliğine ve büyüme faktörleri için yüksek afiniteye sahiptir. Bunlar da osteoindüktiviteyi etkileyen özelliklerdir. Ayrıca β -TCP, diğer materyallerle karşılaştırıldığında serum proteinleri için çok yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahiptir (Xiaoming ve ark., 2011). β -TCP içerikli materyaller gözenekli

yapıda ya da toz formunda hazırlanır. Kemiğe farklılaşan hücreler, seramik malzemenin gözenekleri içerisinde çoğaldığı için gözenekli implantlar kemik doku mühendisliği için yapı iskeleti olarak kullanılmaktadır (Bose ve ark., 2012).

Biyoaktif cam; silikon dioksit, disodyum oksit, kalsiyum dioksit ve pirofosfat bileşiklerinin değişen oranlarda bir araya getirilmesiyle oluşturulan bir materyaldir. Doku tarafından rezorbe olabilen ya da olamayan formları mevcuttur. Osteokondüktif ve osteoindüktif yapıda olan bu materyal daha çok dental tedavilerde kullanılmaktadır (Schepers ve ark., 1993 ve Turunen ve ark., 1997).

1.2.2.3. Polimerler

Polimerler elverişli özelliklerinden dolayı doku mühendisliği uygulamaları için yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğal biyomateryallerin aksine sentetik polimerler, doku iskelesinin istenen özelliklerine göre kimyasal veya mekanik olarak uyarlanabilir. Sentetik polimerlerin işlenebilir olması, polimerin degrade olma süresinin, fiziksel ve mekanik özelliklerinin kontrol edilebilir olmasına olanak sağlar. Ayrıca materyale fonksiyonel gruplar (karboksil, hidroksil, amino vb.) veya peptit dizileri (integrin / heparin bağlayıcı peptitler) eklenmesi materyalin üzerine hücre yapışmasını destekler. Kemik dokusu mühendisliğinde kullanılan sentetik polimerler poliestерleri, poliüretanları, polianhidritleri ve polifumaratları içerir (Wang ve ark., 2010).

Poli laktik asit (PLA) ve türevleri, poli glikolik asit (PGA), poli laktik-coglikolik asit (PLGA), poli-kaprolakton (PCL) yaygın olarak bilinen ve araştırılan sentetik poliestерlerdir.

PLA, şeker, patates ve mısır gibi yenilenebilir kaynakların monomerlerinden sentezlenen bir biyopolimerdir. PLA ayrıca poli l-laktik asit (PLLA), poli d-laktik asit (PDLA) ve poli l, d-laktik asit (PLDLA) gibi birçok farklı formda bulunur (Armentano ve ark., 2013) PLA çevre dostu ve biyoyumlu bir polimer olmasına

karşın, moleküler ağırlığı nedeniyle kırılgnalık, hidrofobiklik ve yavaş biyobozunma gibi bazı dezavantajlara sahiptir (Rasal ve ark., 2010). Bu fiziksel, termal ve mekanik yetersizliklerin üstesinden gelmek için PLLA genellikle PCL ile kemik doku mühendisliği ve potansiyel ortopedik uygulamalarda kullanılmak üzere birleştirilir. PLLA ve PCL in vivo kemik doku mühendisliği uygulamalarında herhangi bir zarara neden olmadan kullanılabilen Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı biyomateriyallerdir.

PCL, 1930'ların başında sentezlendiğinden beri birçok çalışma ve uygulamada kullanılmıştır (Woodruff ve ark., 2010). PCL hidrofobik, biyoyumlu ve yarı kristalize bir sentetik polimerdir. Bakteriler ve mantarlar PCL'yi bozabilirken, PCL insan veya hayvan vücudunda hızlı bir şekilde bozunamaz çünkü memeliler PCL yıkımı için uygun enzimlere sahip değildir. PCL'nin biyolojik bozulma oranının polimerin uzunluğuna, enzimlerin varlığına ve malzemenin başlangıç molekül ağırlığına bağlı olduğu kanıtlanmıştır (Dash ve ark., 2012 ve Woodruff ve ark., 2010).

Poliüretanlar (PUR), kemik dokusu mühendisliği için uygun olabilecek sert, biyoyumlu ve kararlı bir polimerdir (Anderson ve ark., 1998).

Polianhidritler, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve biyoyumluluğu nedeniyle geniş çapta incelenen bir biyopolimer sınıfıdır. Polianhidritler, yüzey aşındırma özelliklerinden dolayı ilaç verme uygulamaları için ideal polimerlerdir. Ancak mekanik olarak zayıf malzemeler oldukları için ortopedik uygulamalar için uygun bir polimer türü değildir. En kapsamlı incelenen polianhidrit, poli karboksifenoksi propan-sebasik asit (PCPP-SA)'tır. PCPP-SA, hızla çözünen, bozunma ürünleri toksik olmayan ve biyoyumlu olan kristal yapılu bir polimerdir. Bu polimer, kontrollü ve lokalize bir ilaç dağıtım aracı olarak kullanılır ve FDA onayına sahiptir (Gunatillake ve Adhikari, 2003 ve Nair ve Laurencin, 2007).

Poli propilen fumarat (PPF), poli propilen fumarat-ko-etilen glikol (PPF ko-EG) ve oligo poli etilen glikol fumarat (OPF) fumarat bazlı polimer örnekleridir. Bu malzemelerin her biri, çalışılacak dokuya göre özelleştirilebilen farklı fiziksel ve

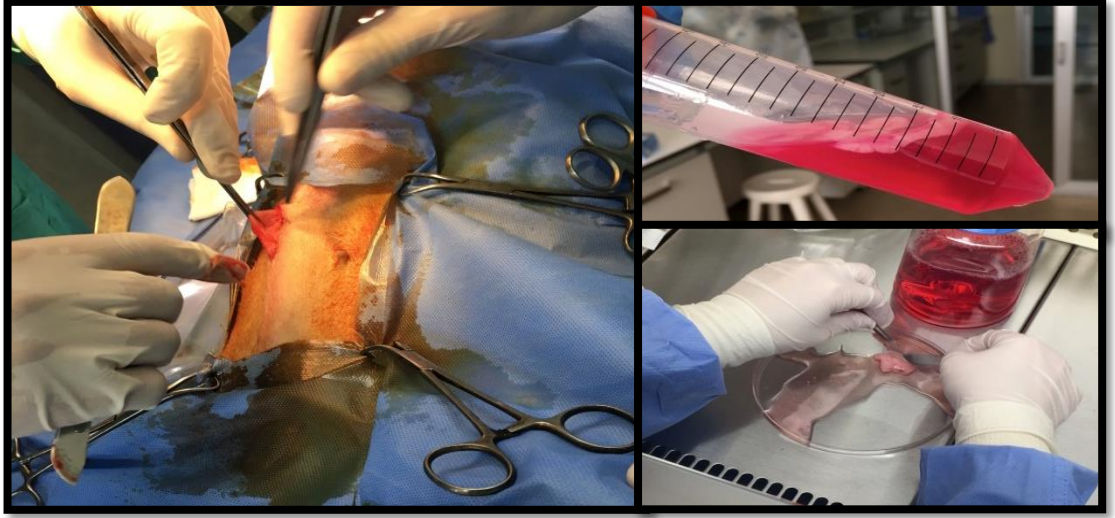
kimyasal özelliklere sahiptir. PPF, bu üç fumarat bazlı polimer içindeki en çok araştırılan biyopolimerdir (Sokolsky-Papkov ve ark., 2007).

Bu çalışmada β -TCP ve β -TCP/kollajen (β -TCP/kol) içeren biyomateryallerin üzerinde köpek Y-MKH'lerinin tutunması, çoğalması, uyumluluğu ve osteojenik farklılaştırması bakımından sahip oldukları özelliklerinin karşılaştırılması amaçlanmaktadır. β -TCP ve kollajen kombinasyonu şeklinde hazırlanan biyomateryalin bahsi geçen özellikler yönünden avantajlı olacağı düşünülmektedir. Çalışmada ayrıca köpeklerden elde edilen Y-MKH'lerin fenotipik belirteçlerinin ortaya konulması ve osteojenik gen ekspresyon belirteçlerinin analiz edilmesi amaçlanmaktadır. Türkiye'de veteriner hekimliği ortopedi alanına ait rejeneratif tedavide biyomateryal üzerinde türlere özgü mezenkimal kök hücre üretimi ve kullanımı ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Kök hücreler için uygun mikroçevreyi sağlayabilecek biyomateryallerin karşılaştırılması ileride yapılacak biyomateryallerle ilgili çalışmalara da veri sağlayacaktır. Gelecekte bu biyomateryaller kullanılarak köpeklerde kemik kırıkları ve hastalıklarında tedavi başarısının arttırılabileceği ve tedavi yöntemlerinin standartlaştırılabileceği düşünülmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Yağ Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücre (Y-MKH) İzolasyonu

Çalışma için etik raporu, “Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu” 2017-5-37 numaralı kararı ile alınmıştır. Çalışmada 5 adet dişi köpek kullanılmıştır. Mezenkimal kök hücre izolasyonu Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalına ovariohisterektomi isteğiyle getirilen köpeklerin inguinal yağ dokusu ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.1). Köpeklerden alınan 1 cm³ boyutundaki yağ doku steril tüp içerisinde Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarına nakledilmiştir. Mezenkimal kök hücre izolasyonu için eksplant kültür yöntemi tercih edilmiştir. Nakledilen yağ doku laminar flow altında Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Lonza) solüsyonuna alınarak steril petri kabı içinde küçük parçalara ayrılmıştır. T25 flasklara yerleştirilen yağ dokusu parçaları 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂'li inkübatörde 20 dakika bekletilerek sonrasında %20 Fetal bovine serum (Biowest), %2 L-Glutamine, %1 Penicilin, Streptomycin, Amphotericin (Lonza) ve %77 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Lonza) içeren besi yeri eklenmiştir. Üç günde bir besi yeri değişimi yapılmış ve hücrelerin gelişimi inverted mikroskop (Olympus Cx45) ile gözlemlenmiştir (Zuk ve ark., 2001).



Şekil 2.1. Ovariohisterektomi operasyonu sırasında alınan yağ dokusu.

2.2. Y- MKH Karakterizasyonu

Köpek Y-MKH'lerinin karakterizasyonu için üçlü farklılaştırma ve akış sitometrisi analizleri yapılmıştır.

2.2.1.Üçlü Farklılaştırma

Üçüncü pasajın sonunda hücreler tripsinize edilerek osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma için uyarılmıştır. Bu farklılaştırmalar için 6 kuyucuklu plaklara 0.7×10^6 hücre ekildikten sonra hücrelerin bir gün tutunmaları beklenmiştir.

2.2.1.1. Osteojenik Farklılaştırma

Osteojenik farklılaştırma için üçüncü pasajın sonunda hücreler Osteosit farklılaştırma besi yerinde (Sciencell) inkübe edilmiştir. 3 günde bir besi yeri değiştirilen hücreler 21 günün sonunda osteojenik farklılaştırmanın gösterilmesi

amacıyla Von Kossa (Merck) ile boyanmıştır. Bu amaç için, hücreler %10 Formol tespit solüsyonuyla 30 dakika boyunca tespit edilmiştir. Distile suyla yıkama aşamasının ardından 60 dakika Silver Nitrat boyasıyla UV ışığı altında bekletilmiştir. Hücreler tekrar yıkandıktan sonra %1 sodyum tiyosülfat eklenerek invert mikroskop (Olympus Cx45) ile osteojenik farklılaştırma gösterilmiştir (Csaki ve ark., 2007).

2.2.1.2. Kondrojenik Farklılaştırma

Kondrojenik farklılaştırma için hücreler kondrojenik farklılaştırma besi yeri (Sciencell) kullanılarak inkübe edilmiştir. 3 günde bir besi yeri değiştirelen hücreler 21 günün sonunda kondrojenik farklılaştırmanın gösterilmesi amacıyla Alcian Blue (Millipore) ile boyanmıştır. Bunun için, hücreler 30 dakika boyunca %10 Formol tespit solüsyonuyla tespit edilmiştir. Çeşme suyuyla yıkama aşamasının ardından Alcian Blue boyası ile 30 dakika boyanmışlardır. Tekrar çeşme suyu ile yıkanan hücreler %80, %96, %100 alkol olmak üzere dereceli alkollerden geçirilerek invert mikroskop (Olympus Cx45) ile incelenerek kondrojenik farklılaşma gösterilmiştir (Gimble ve Guilak, 2003 ve Vieira ve ark., 2010).

2.2.1.3. Adipojenik Farklılaştırma

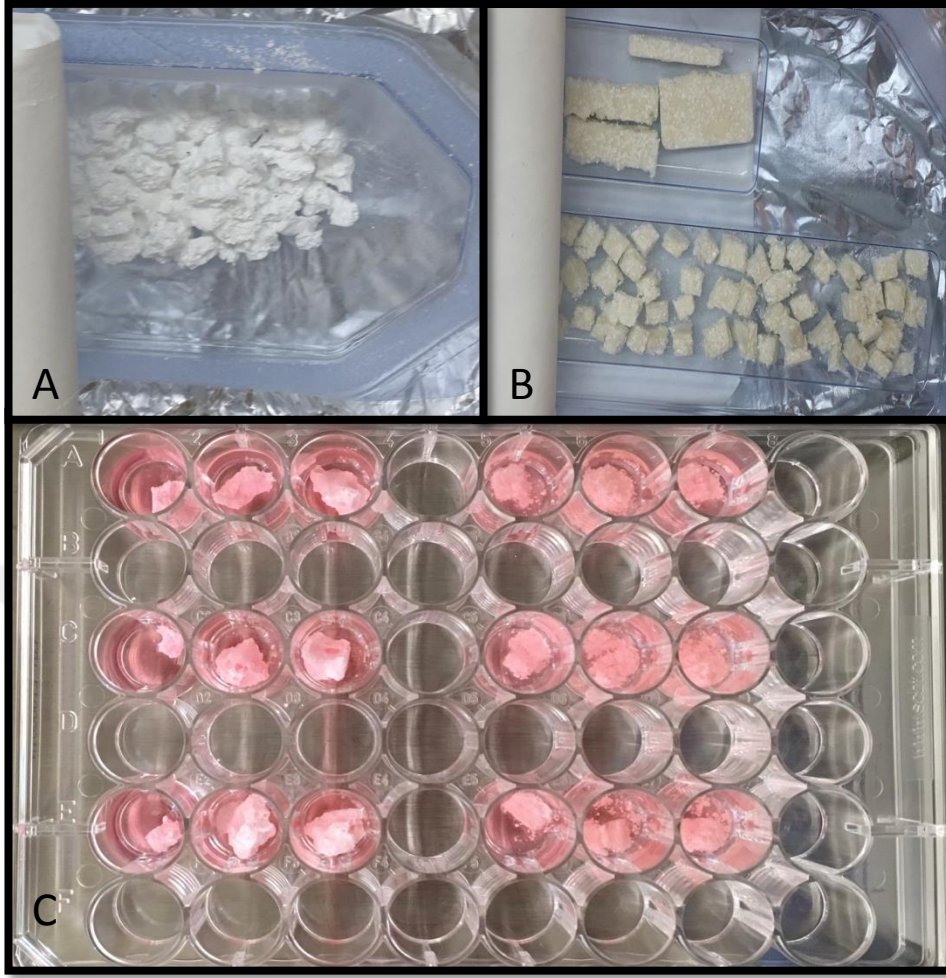
Adipojenik farklılaştırma için ise adipojenik farklılaştırma besi yeri (Sciencell) kullanılmıştır. Farklılaştırmanın gösterilmesi için Oil Red-O (Sigma Aldrich) boyaması kullanılmıştır. Bunun için hücreler önce %10 Formol ile tespit edilmiş ardından distile su ile yıkanmıştır. %50 alkol ile yıkama aşamasını takiben hücreler 20 dakika Oil Red O boyasında bekletilmiştir. Tekrar %50 alkol ile yıkanarak dekolore edilen hücreler son olarak distile su ile yıkanmış ve invert mikroskop (Olympus Cx45) ile incelenerek adipojenik farklılaştırma gösterilmiştir (Zuk ve ark., 2002).

2.2.2. Akış Sitometrisi

Üçüncü pasaja ulaşan Y-MKH'ler tripsin (Sigma) kullanarak kaldırılıp phosphate buffered saline (PBS) ile çözülerek hemositometre yardımıyla sayılmıştır. Akış sitometrisi tüplerine 1×10^6 hücre konulmuş ve bu hücreler 3'er kez %3 Bovine serum albumin/PBS (BSA/PBS) solüsyonunda yıkanmıştır. Hücre çökeltisinin %3 BSA/PBS solüsyonunda çözülmesini takiben kök hücreler 0.1-10 $\mu\text{g/ml}$ CD 29 (Chemicon), CD 34 (Novusbio), CD 44 (BD biosciences), CD 73 (Bioss), CD 81 (BD biosciences), CD 90 (BD biosciences) ve CD 271 (BD biosciences) primer antikorları ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. Hücreler %3 BSA/PBS (Sigma) solüsyonunda yine 3'er kez yıkandıktan sonra santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Bu aşamadan sonra unkonjuge primer antikorlar için hücreler sekonder antikor ile 30 dakika, $+4^\circ\text{C}$ de inkübe edilmiş ve 3 kez %3 BSA/PBS solüsyonunda yıkanmalarının ardından çöktürülmüştür. Hücre çökeltileri 1 ml %3 BSA/PBS solüsyonu içerisinde çözüldükten sonra hücre akış sitometrisi cihazında (BD Accuri Plus Flow Cytometer) analiz edilmiştir (Vieira ve ark., 2010).

2.3. Biyomateriyale Ekim

BMT calsis firmasından temin edilen β -TCP ve β -TCP/kol yapılı doku iskeleleri (Şekil 2.2-A; Şekil 2.2-B) 24 kuyucuklu tabaklara yerleştirilerek UV ışık altında sterilize edilmiştir. Sterilizasyonu takiben, 3. pasaja erişen köpek Y-MKH'leri tripsinize edilerek 1.800 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Hücreler hemositometre yardımıyla sayıldıktan sonra her bir doku iskelesine her analiz için farklı sayıda olmak üzere ekilmiştir. Her bir kuyucuğa 2 ml kültür ortamı eklenmeden önce hücrelerin materyale yayılmasını ve yapışmasını sağlamak için 37°C 'de 4 saat süreyle inkübe edilmiştir. 4 saatlik inkübasyon sırasında, materyallerin kurumasını önlemek için her bir hücre iskelesine her 30 dakikada bir 20 μl besi yeri eklenmiştir (Şekil 2.2-C). Hücre ekiminin ardından biyomateriyallerin üzerlerine besi yerleri eklenerek 37°C sıcaklıkta, 5% CO_2 içeren etüvde inkübe edilmiştir (Li ve ark., 2005).



Şekil 2.2. A. β -TCP içerikli biyomateryal B. β -TCP/kol içerikli biyomateryal C. Hücre ekili biyomateryaller.

2.4. MTT (Canlılık Testi)

Hücrelerin β -TCP ve β -TCP/kol yapılı doku iskeleleri üzerinde büyümesini ve çoğalmasını incelemek amacıyla 7., 14. ve 21. günlerde kolorimetrik MTT testi yapılmıştır. 20.000 hücre ekilmiş doku iskeleleri, hacim olarak 10:1 oranında karıştırılmış düşük glikozlu serumsuz besi yeri ve MTT reaktifi (Biovision) içeren solüsyon (5 mg/mL) içerisinde 4 saat boyunca 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ oranına sahip olan etüvde bekletilmiştir. Daha sonra, her bir doku iskelesi üzerine 100 μ l %1'lik SDS eklenerek 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ oranına sahip olan etüvde ve ışısız bir ortamda 24 saat bekletilmiştir. Çözeltiden 200 μ l alınarak 96 kuyucuklu tabağa

aktarılmıştır. Optik dansiteleri microplate okuyucuda (SpectraMax i3) 590 nm dalga boyunda okunmuştur (Brzoska ve ark., 2005 ve Özdal ve ark., 2016).

2.5. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM)

β -TCP ve β -TCP /kol yapılı doku iskeleleri üzerinde Y-MKH'lerin gösterilmesi amacıyla yapılan analiz için iki materyale de 250.000 hücre ekilmiştir. 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ içeren etüvde 2 gün inkübasyonun ardından biyomateryaller %5 gluteraldehit içinde 4°C de, 24 saat boyunca tespit edilmiştir. Distile su ile yıkama işleminin ardından %35, %50, %75, %95 ve absolu alkollerde ikişer kez 15 dakika tutularak dehidrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. β -TCP ve β -TCP/kol yapılı biyomateryaller 2 ml Hexamethyldisilazane (HMDS) içinde bekletildikten sonra desikatörde oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan biyomateryaller bakırla kaplanarak taramalı elektron mikroskopta (EVO50 Zeiss) incelenmiştir (Mygind ve ark., 2007).

2.6. Alkalen Fosfataz (ALP)

Osteojenik farklılaşma belirteçlerinden biri olan ALP'yi gözlemlemek amacıyla Alkaline Phosphatase Activity Colorimetric Assay Kiti (Biovision) kullanılmıştır. 200.000 hücre ekili biyomateryaller osteojenik besi yerinde inkübe edilerek ve 1., 7., 14. ve 21. günlerde PBS ile yıkanmalarının ardından %10 Formaldehit solüsyonu kullanılarak 5 dakika süreyle tespit edilmiştir. Biyomateryaller distile su ile yıkandıktan sonra 45 dakika boyunca ışık içermeyen 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ içeren etüvde p-nitrofenil fosfat (p-NPP) solüsyonu boyanmıştır. Stop solüsyonuyla reaksiyonun durdurulmasının ardından mikroplate okuyucuda 405 nm dalga boyunda okunmuştur (Martinello ve ark., 2011 ve Özdal ve ark., 2016).

2.7. Von Kossa Boyaması

Geç dönem osteojenik farklılaşmanın bir belirteci olan kalsiyum depozitlerini gözlemlemek amacıyla biyomateryallere ekilmiş Y-MKH'lere Von Kossa (Merck) boyaması yapılmıştır. Hücreler 21 gün boyunca osteojenik besi yerinde büyütülmüş ve 7., 14. ve 21. günlerin sonunda %4 paraformaldehit tespit solüsyonuyla 30 dakika boyunca tespit edilmiştir. Distile suyla yıkama aşamasının ardından 60 dakika silver nitrat boyasıyla UV ışığı altında bekletilmiştir. Hücre ekili materyaller tekrar yıkandıktan sonra %1 sodyum tiyosülfat eklenerek mineralizasyon gösterilmiştir (Özdal ve ark., 2016).

2.8. Real Time PCR (RT-PCR)

Osteojenik belirteç genlerin incelenmesi amacıyla 21 gün boyunca osteojenik farklılaşma besi yerinde bekletilmiş olan hücre ekili doku iskelelerine ters-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizi yapılmıştır.

Osteojenik besi yeri inkübasyonlarının 7., 14. ve 21. günlerinde RNA izolasyon kiti kullanılarak (Thermo GeneJet) total RNA izolasyonu uygulanmıştır. Kitin protokolüne göre hücre ekini biyomateryaller örnekleri önce PBS ile yıkanmıştır. Materyallerin üzerlerini kaplayacak şekilde (500 µl) Lysis Buffer eklenmiş ve 10 dakika beklenmiştir. Ardından 300 µl %96 alkol eklenmiştir. Karışım 1,5 ml'lik tüplere aktarılmış ve 1000 g'de 8 dakika santrifüj uygulanmıştır. Biyomateryal parçalarını içermeyen süpernatant spin kolona aktarılmıştır ve 12 000 G'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Yıkama ve kurutma adımlarının ardından 100 µl RNaz içermeyen su ile 12 000 G'de 1 dakika santrifüjlenerek RNA izolasyonu tamamlanmıştır.

İzolasyonu takiben RNA örnekleri cDNA'ya dönüştürülmüştür. Bu amaç için iScript cDNA sentez kiti (BioRad) kullanılmış ve protokole uygun olarak cDNA eldesi gerçekleştirilmiştir. Total hacim örnekler için 20 µl olarak belirlenmiştir. 4 µl 5x

iScript Reaction Mix, 1 µl iScript Reverse Transcriptase ve 14 µl nükleaz içermeyen su kullanılmış ve karışıma 1 µl izole edilmiş RNA örneği eklenerek 20 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan karışımlar C1000 ısı döngü cihazına (BioRad) konulmuş ve protokole uygun olarak sırasıyla 25°C'de 5 dakika, 46°C'de 20 dakika, 95°C'de 1 dakika bekletilerek cDNA eldesi gerçekleştirilmiştir.

Erime sıcaklıklarının optimizasyonu için cDNA'lar tasarlanan primerler (Çizelge 2.1) kullanılarak 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C ve 61°C'de PCR metoduyla çoğaltılmış ve agaroz jelde yürütülmüştür.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan primerlere ait diziler.

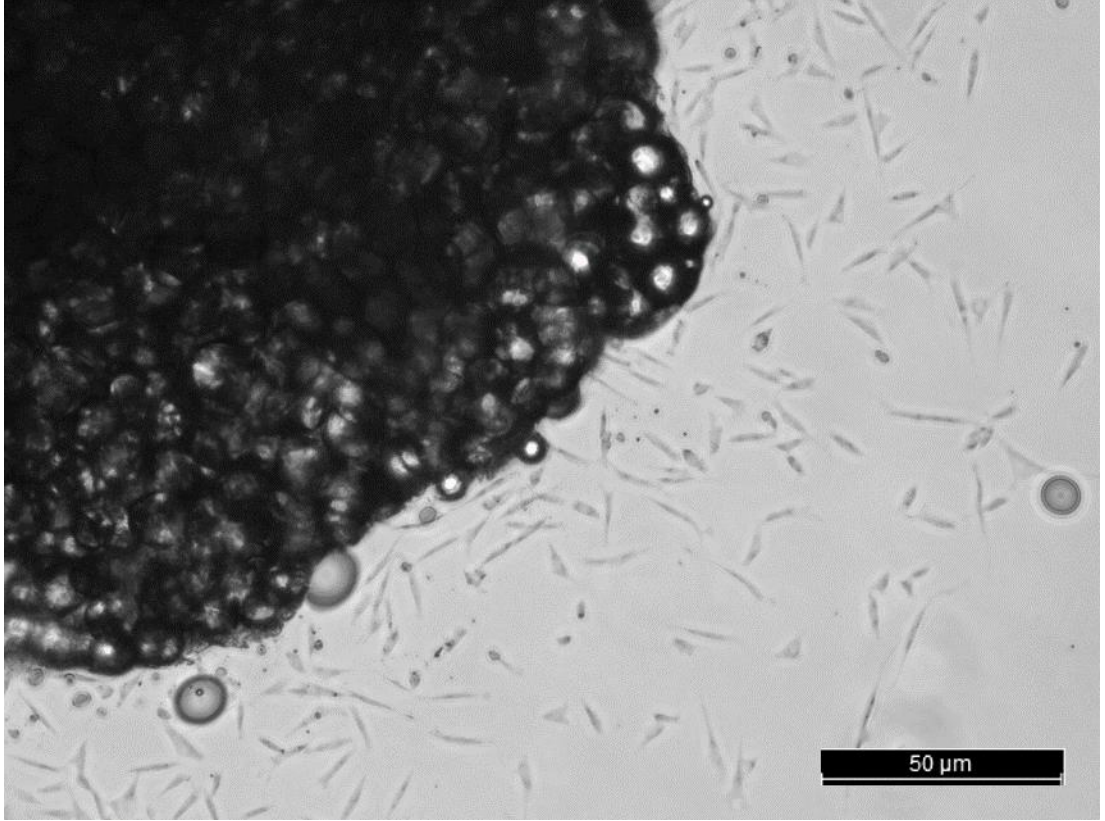
Gen	İleri Primer	Geri Primer
RUNX2	CCCAGAAGGCACAGACA GAA	CATCTGGCTCAGGTAGGACG
SPARC	TTCCTGTTGCCTGGCTCT AA	GGTTCTGGCAGGGGTTTCA
ACTB	TCCATGAACTACCTTCA ACTCC	AACGCAACTAAAGTAACAGTCC

Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) ve secreted protein acidic and cysteine rich (SPARC) osteojenik belirteç genlerine özel primerler dizayn edilmiş ve QPCR Green Master Mix (Biotechrabbit) kullanılarak ters-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle göreceli gen ifadeleri tayin edilmiştir. Bunun için Kit protokolü her örnek için 10 µl master mix, 7,2 µl nükleaz içermeyen su, 0,4 µl ileri primer, 0,4 µl geri primer ve 2 µl cDNA kullanılarak total hacim 20 µl'ye optimize edilmiş ve çalışılmıştır. Hazırlanan karışımlar RT-PCR cihazında sırasıyla 95°C'de 3 dk, 40 döngü tekrarlamak üzere 95°C'de 15 saniye, 60°C'de 30 saniye ile protokol tamamlanmıştır. Relatif gen ifadesi farklılıkları $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Değerlerin normalizasyonu için beta aktin (ACTB) geni kullanılmıştır (Martinello ve ark., 2011).

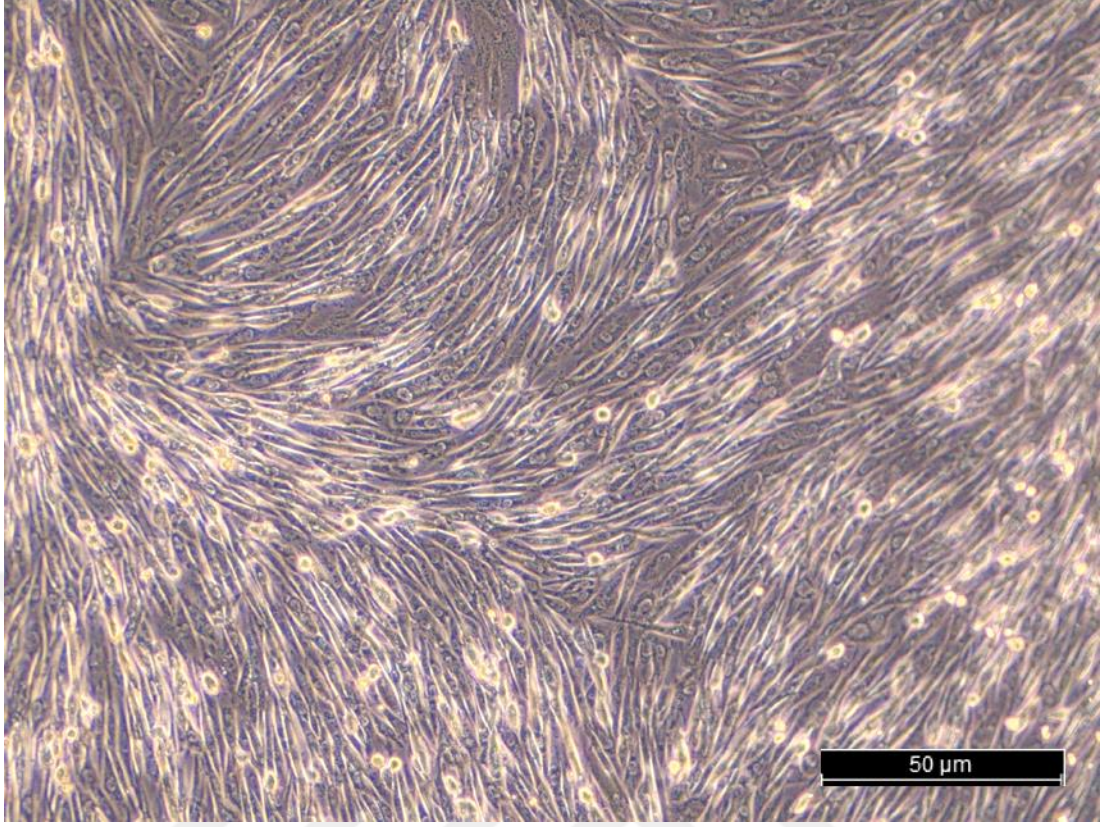
3. BULGULAR

3.1. Yağ Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücre (Y-MKH) İzolasyonu

Köpeklerin inguinal bölgesinden, ovariohisterektomi operasyonu sırasında alınan yağ dokularından eksplant kültür yöntemi ile mezenkimal kök hücre izolasyonları yapılmıştır. Flaskların yüzeyine yapıştırılan yağ dokuların etrafında 5. günde Y-MKH'ler gözlenmeye başlanmıştır (Şekil 3.1). Y-MKH'lerin %80-90 oranında konfluentliğe ulaşması 3 hafta sürmüştür (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. 5. gün yağ doku etrafındaki Y-MKH'ler.



Şekil 3.2. 3. hafta %80 konfluent mezenkimal kök hücreler.

3.2. Y- MKH Karakterizasyonu

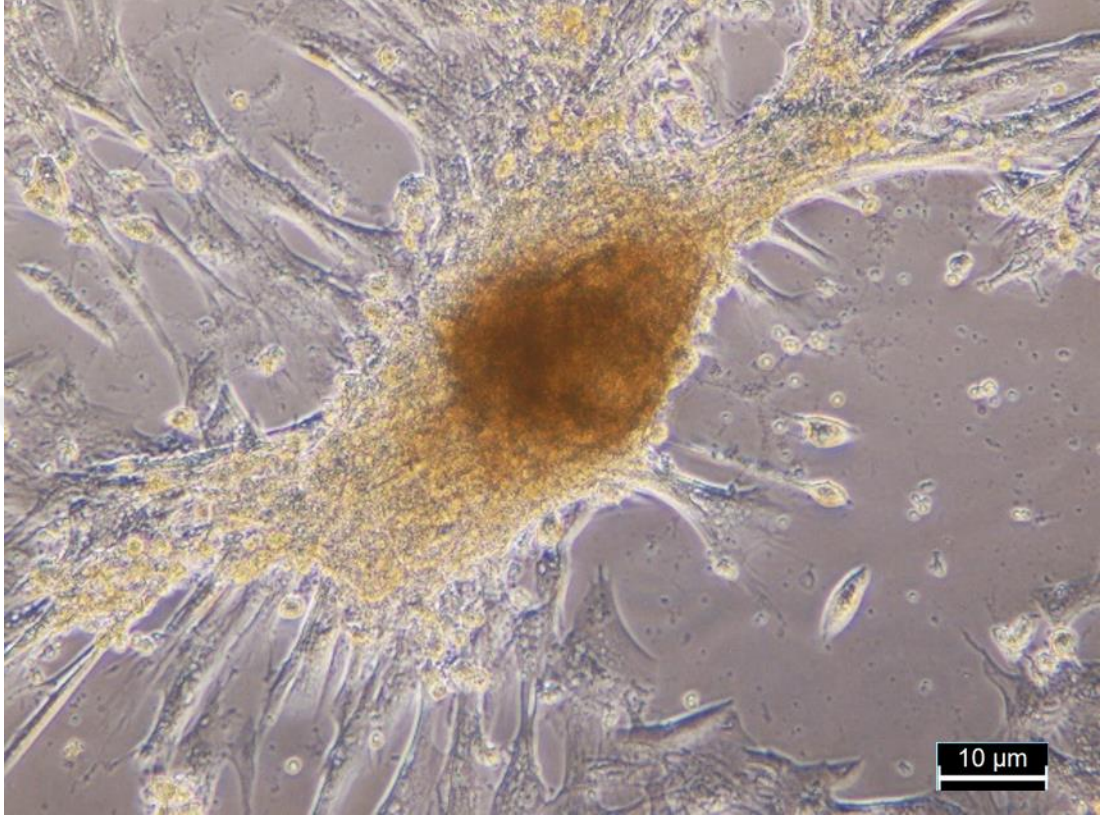
Köpek Y-MKH'lerinin karakterizasyonu için üçlü farklılaştırma ve akış sitometrisi analizleri yapılmıştır.

3.2.1. Üçlü Farklılaştırma

Mezenkimal kök hücre karakterizasyonu için hücreler kemik, kıkırdak ve yağ dokuya farklılaştırılmıştır.

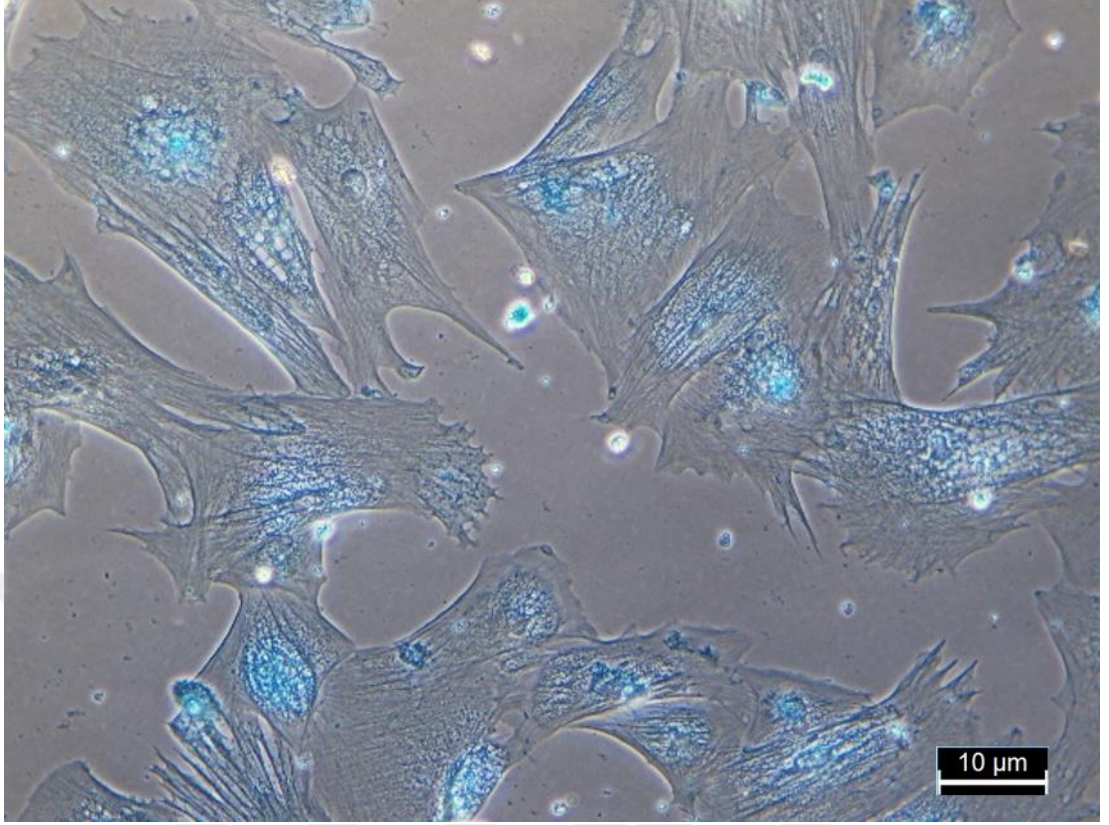
Osteojenik farklılaşma için uyarılan hücrelerde 9. günden itibaren hücre kolonileri gözlenmiştir. Bu kolonilerin sayısı ikinci haftanın sonunda en yüksek

seviyeye ulaşmıştır. 14. günde kemik farklılaşmasının gösterilmesi amacıyla Von Kossa boyaması yapılmış ve oluşan kalsiyum depozitleri gösterilmiştir (Şekil 3.3).



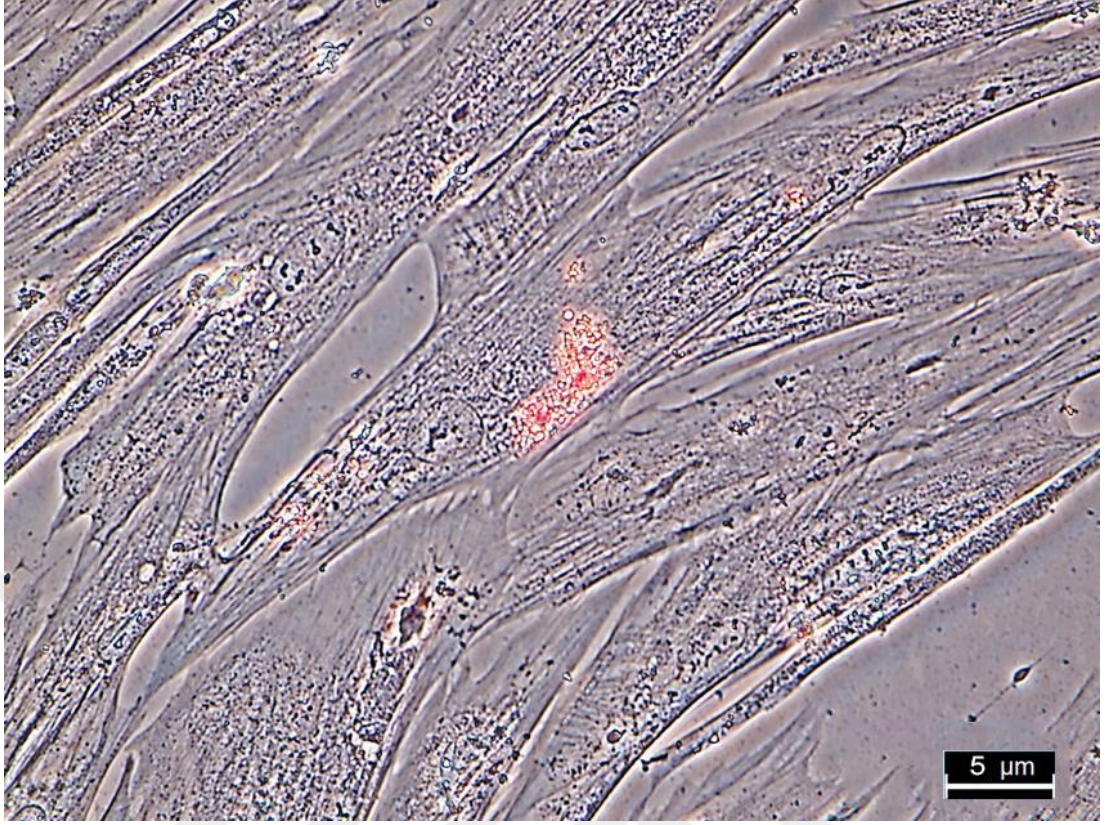
Şekil 3.3. 14. gün Von Kossa boyaması.

Kondrojenik farklılaşmada ise 2. haftada hücrelerin morfolojilerinde değişiklikler gözlenmeye başlamıştır. 19. günde kıkırdaklara özgü proteoglikan salgılayan odakların varlığı görülmüştür. Bu sebeple 21. günde kıkırdak farklılaşmasını gösterilmesi amacıyla Alcian Blue boyaması yapılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. 21. gün Alcian Blue boyaması.

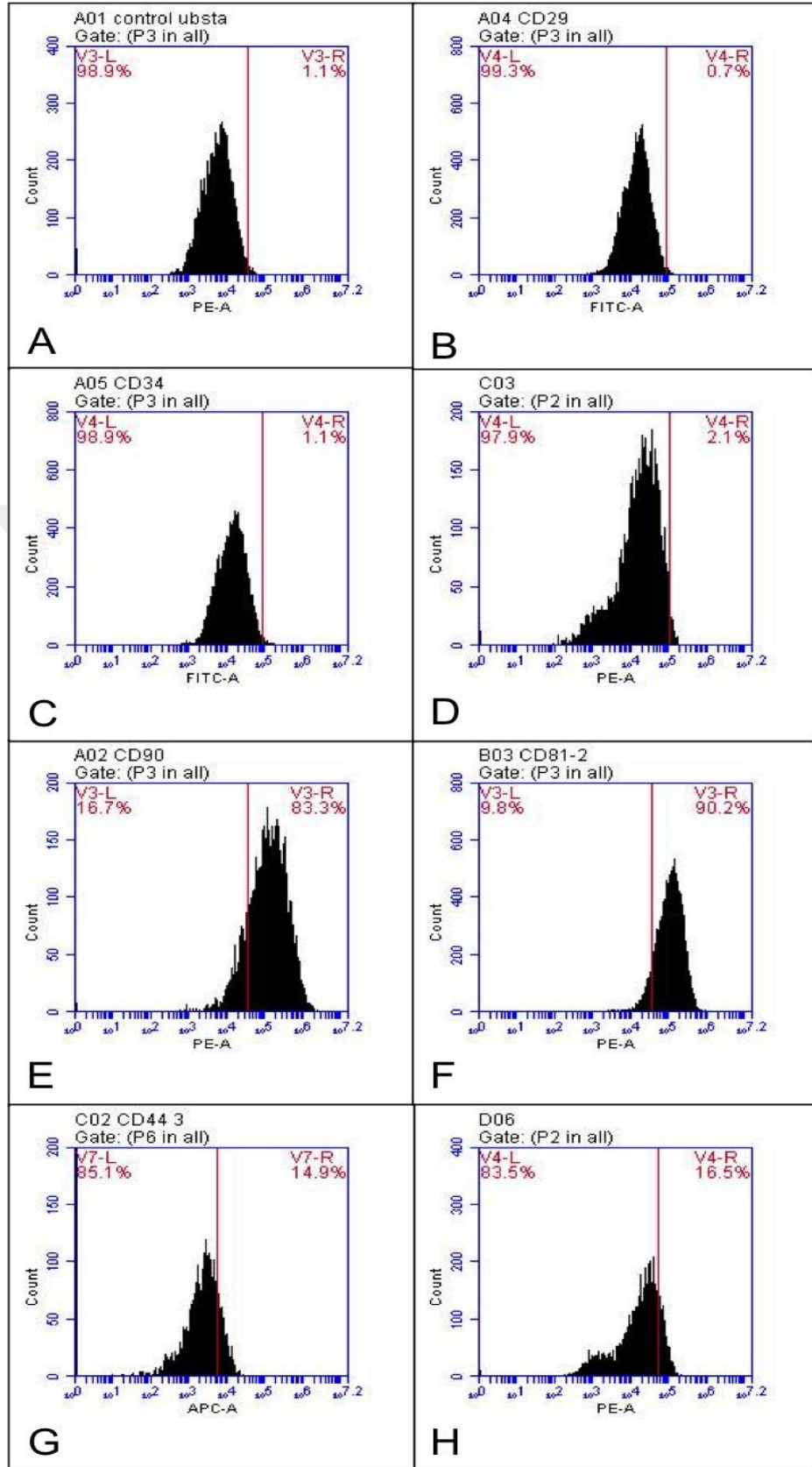
Adipojenik farklılaştırmada ise 14. günden itibaren yağ vakoulleri gözlenmeye başlanmıştır. 21. günün sonunda Oil red O boyası ile hücrelerin sitoplazmalarındaki yağ vakoulleri boyanarak adipojenik farklılaşırma gösterilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. 21. Gün Oil Red O Boyaması.

3.2.2. Akış Sitometrisi

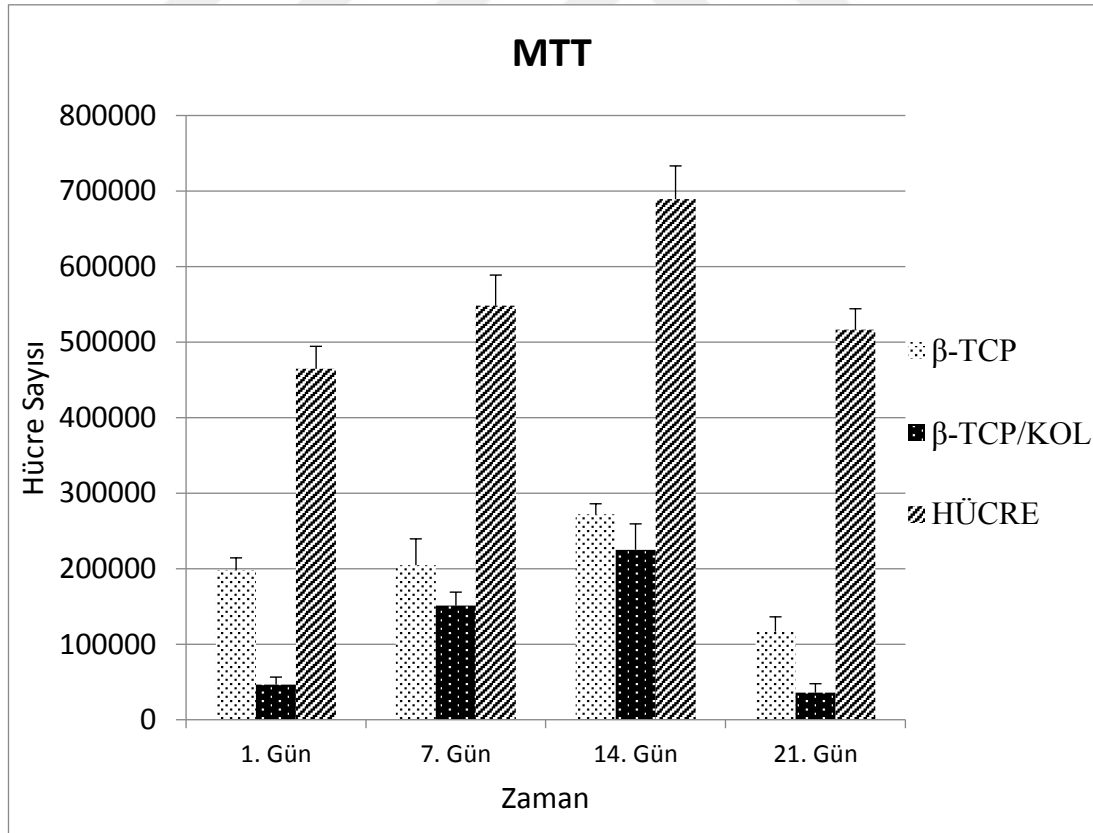
Mezenkimal kök hücre karakterizasyonu için izole edilen hücreler 7 farklı antikorla analiz edilmiştir. Bahsedilen yüzey antikorlarından CD 44, CD 73, CD 81 ve CD 90'ın eksprese olduğu; CD 29, CD 34 ve CD 271'in ise eksprese olmadığı akış sitometrisi analizi ile gösterilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. A. Kontrol, B. CD 29, C. CD 34, D. CD 271, E. CD 90, F. CD 81, G. CD 44, H. CD 73.

3.3. MTT (Canlılık Testi)

Hücrelerin β -TCP ve β -TCP/kol yapılı biyomateryallerin üzerinde büyümesini ve çoğalmasını incelemek amacıyla 1., 7., 14. ve 21. günlerde kolorimetrik MTT testi yapılmıştır. Absorbans değerlerini hücre sayılarına dönüştürmek için bir kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Kalibrasyon eğrisine göre, β -TCP ve β -TCP/kol içerikli biyomateryaller üzerinde ekili hücre sayıları hesaplanmış ve ikinci bir sütun grafiği (hücre sayısı-gün) çizilmiştir (Şekil 3.7). İki materyal üzerindeki hücrelerin sayısında 1. günden 14. güne doğru artış gözlenmiştir. Ancak 21 günde materyaller üzerindeki tutunan hücre sayıları azalmıştır. Tüm günlerde β -TCP içerikli materyaldeki hücre çoğalması β -TCP/kol kombinasyonlu materyale göre yüksektir. Kontrol amaçlı sadece hücre bulunan örneklerde yine hücre çoğalmaları 1. günden 14. güne doğru artmış ve 21 günde azalmıştır.



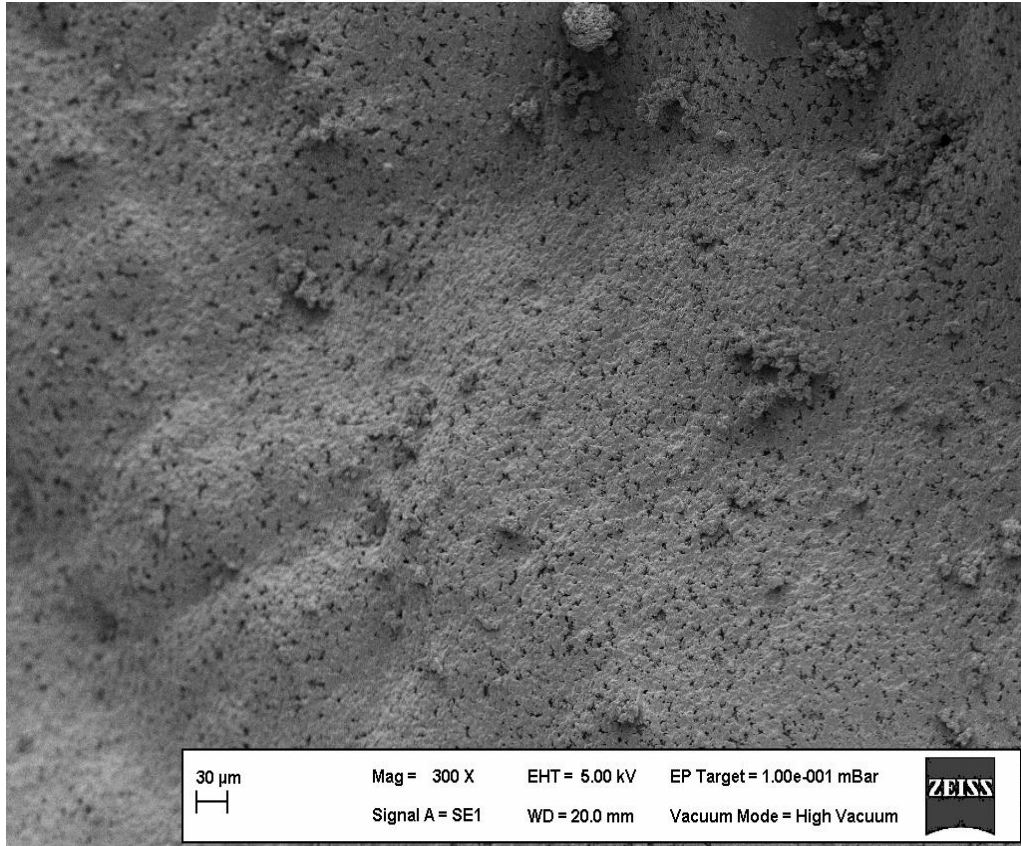
Şekil 3.7. MTT hücre sayısı-zaman grafiği.

3.4. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM)

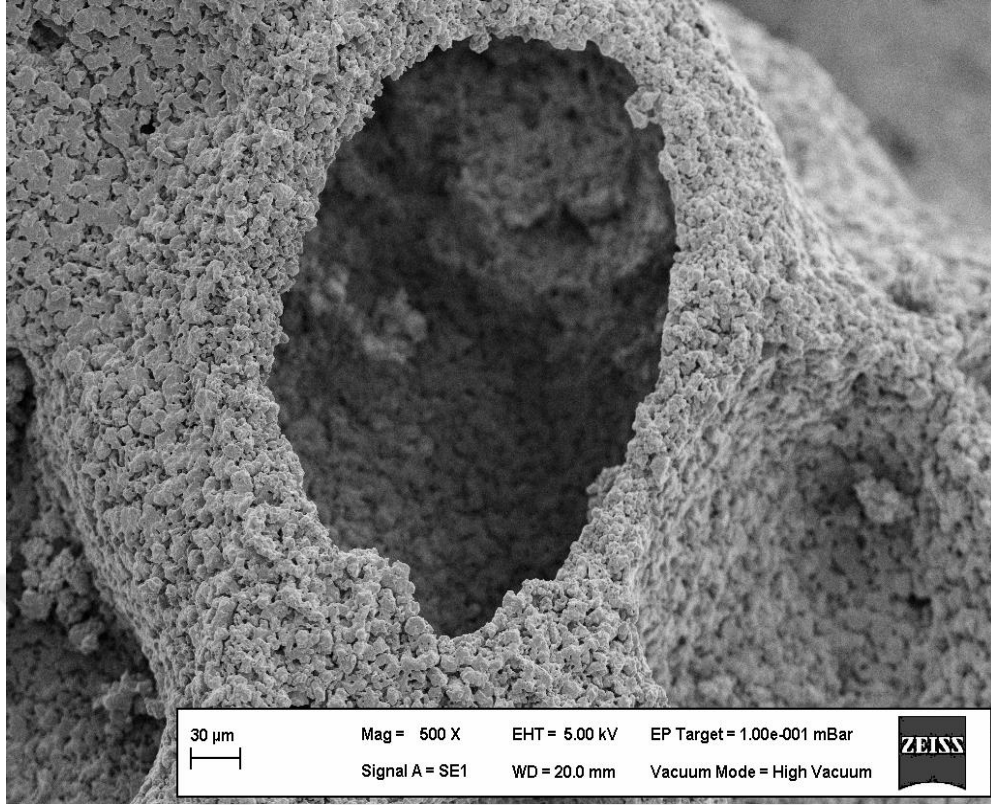
Hücre ekimi yapılmış ve yapılmamış β -TCP ve β -TCP/kol içerikli biyomateryaller ile yapılan taramalı elektron mikroskopisi sonucunda materyallerin genel yüzey karakteri fotoğraflanmıştır.

β -TCP kontrol örneğinde materyalin yüzey yapısı ve materyalin gözenekli yapısına tutunmuş Y-MKH'ler hücre ekili biyomateryalde gösterilmiştir (Şekil 3.8; Şekil 3.9).

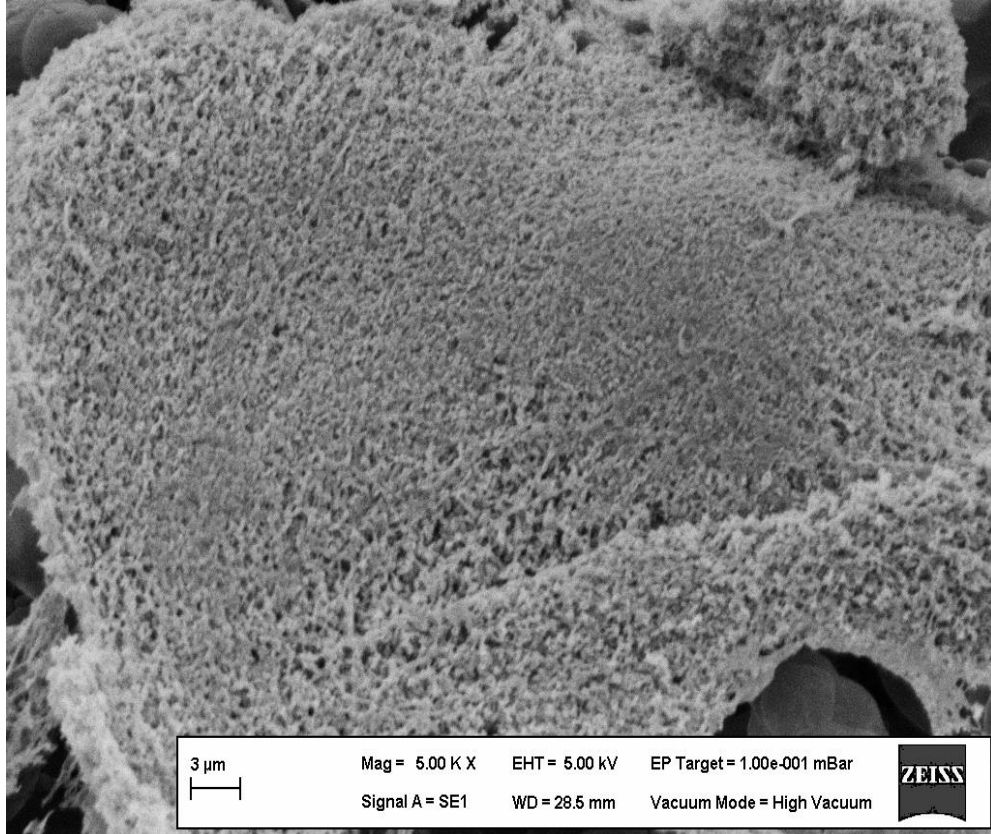
β -TCP/kollajen içerikli biyomateryalin β -TCP içerikli materyale göre daha az gözeneğe sahip olduğu taramalı elektron mikroskopla da gösterilmiştir. Hücre ekili β -TCP/kollajen içerikli biyomateryalde ise kollajen yapısı ve Y-MKH'lerin yerleşimi fotoğraflanmıştır (Şekil 3.10; Şekil 3.11).



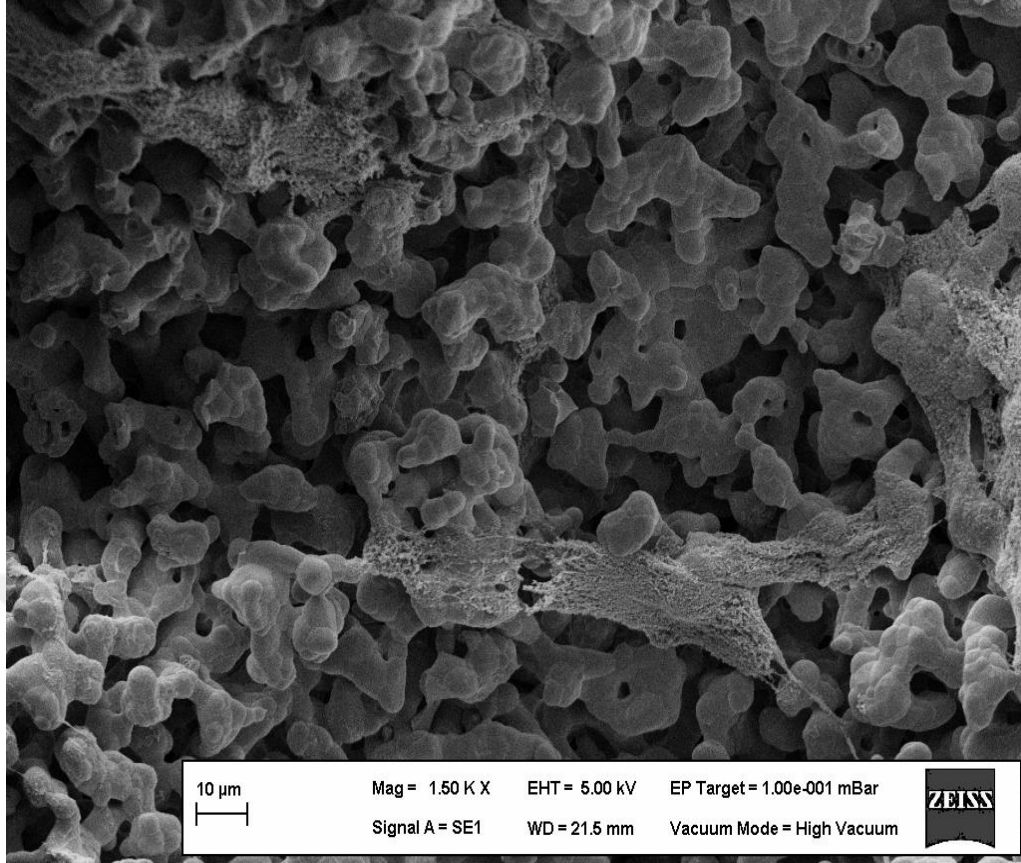
Şekil 3.8. β -TCP kontrol.



Şekil 3.9. β -TCP ve Y-MKH.



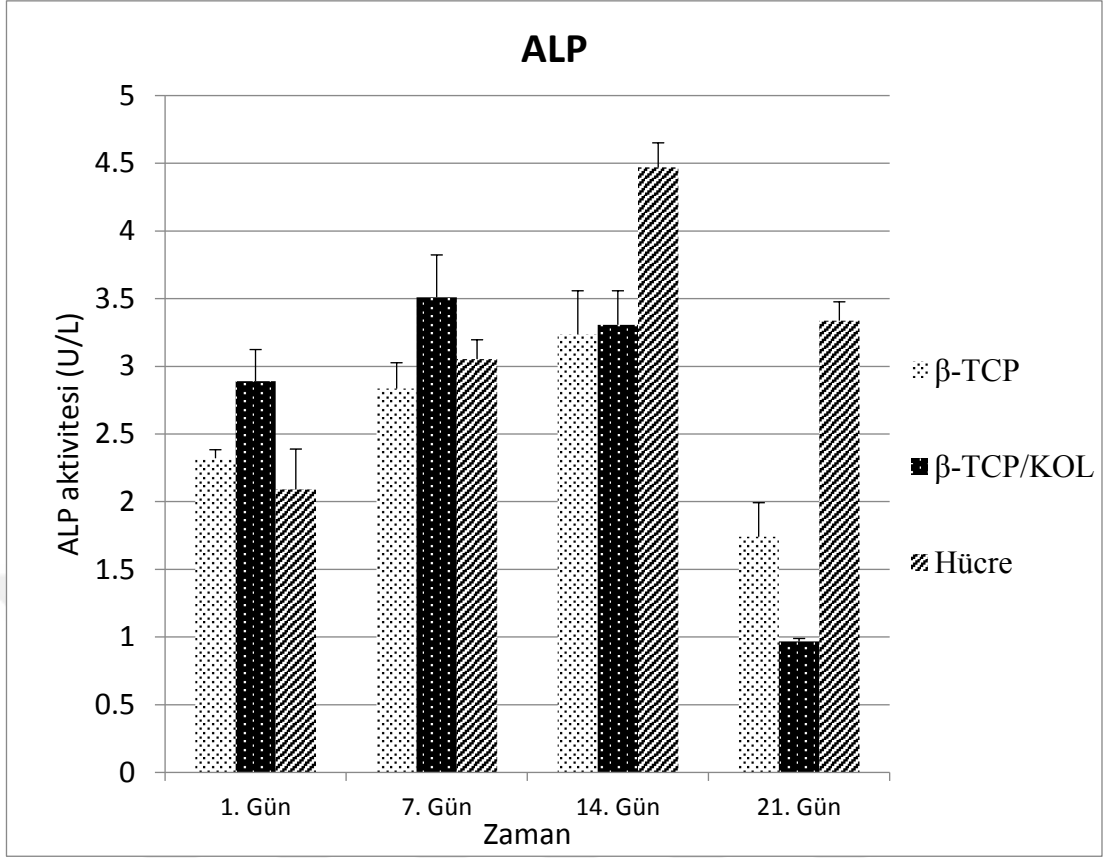
Şekil 3.10. β -TCP/kol kontrol.



Şekil 3.11. β -TCP/kol ve Y-MKH.

3.5. Alkalen Fosfataz (ALP)

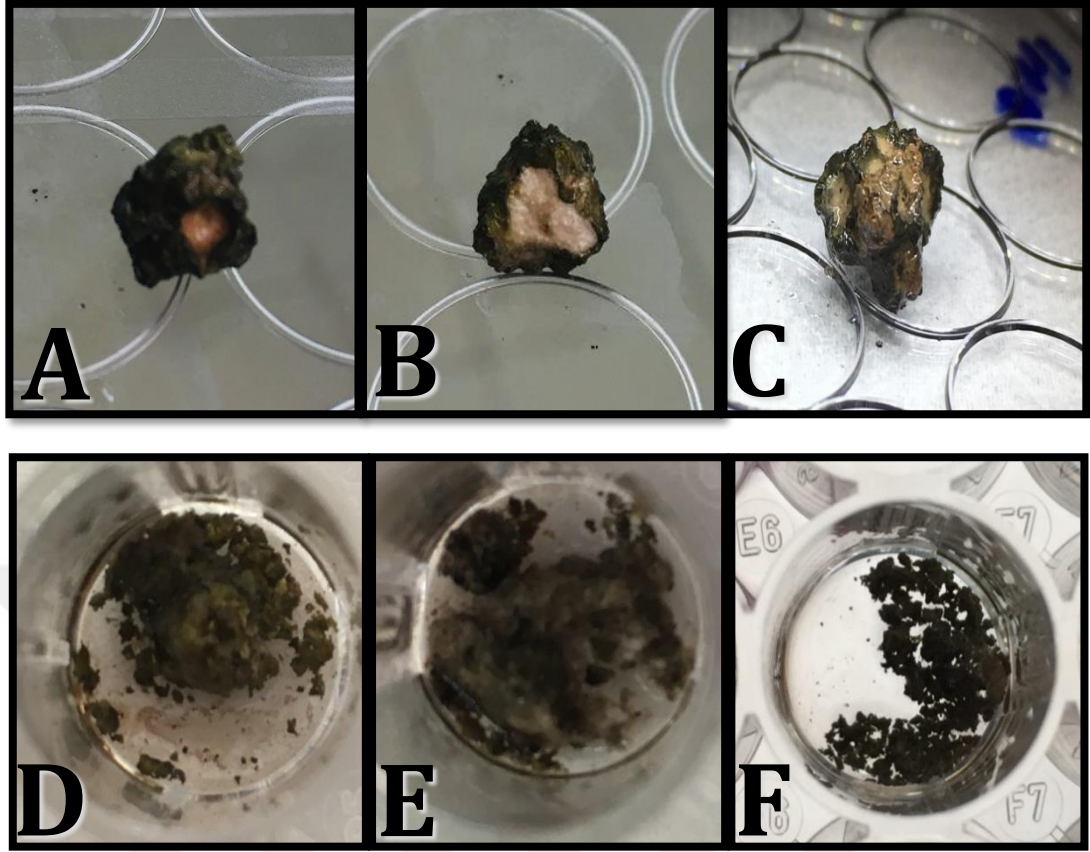
Osteojenik farklılaşmanın erken belirteçlerinden biri olan alkalen fosfataz aktivitesi analizi sonucunda β -TCP içerikli biyomateryalde ALP enzim aktivitesinin 1. günden 14 güne kadar arttığı ancak 21. günde ALP azaldığı görülmüştür. β -TCP/kol içerikli biyomateryalde ise aktivite 1. günden 7. güne kadar artmış daha sonra azalmaya başlamıştır. β -TCP/kol içerikli biyomateryal, β -TCP içerikli biyomateryale göre 1. ve 7. günde daha yüksek ALP aktivitesi gösterirken, 21. günde β TCP/kol içerikli biyomateryal β -TCP içerikli biyomateryale göre daha az ALP aktivitesi göstermiştir. 14. günde ise iki materyalin ALP enzim aktiviteleri aynıdır. Sadece hücre ekili kuyucuklardaki ALP aktivitesi ise yine 1. günden 14. güne kadar artış göstermiş, 21. günde azalmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Alkalen fosfataz aktivitesi analizi.

3.6. Von Kossa Boyaması

Von Kossa boyaması sonucu β -TCP içerikli biyomateryalde 7. günden 21. güne doğru kalsiyum depozitleri miktarı artmıştır. Bu artış, 60 dakika UV ışığa maruz bırakılma sonrasında materyal üzerinde kahverengi boyanan alanların artmasıyla gösterilmiştir (Şekil 3.13. A, B, C). Ancak, β -TCP/kol içerikli biyomateryalin biyodegradasyon özelliği yüksek olduğundan 7. günden sonra parçalanma başlamış ve kalsiyum depozitleri gösterilememiştir (Şekil 3.13 D, E, F).



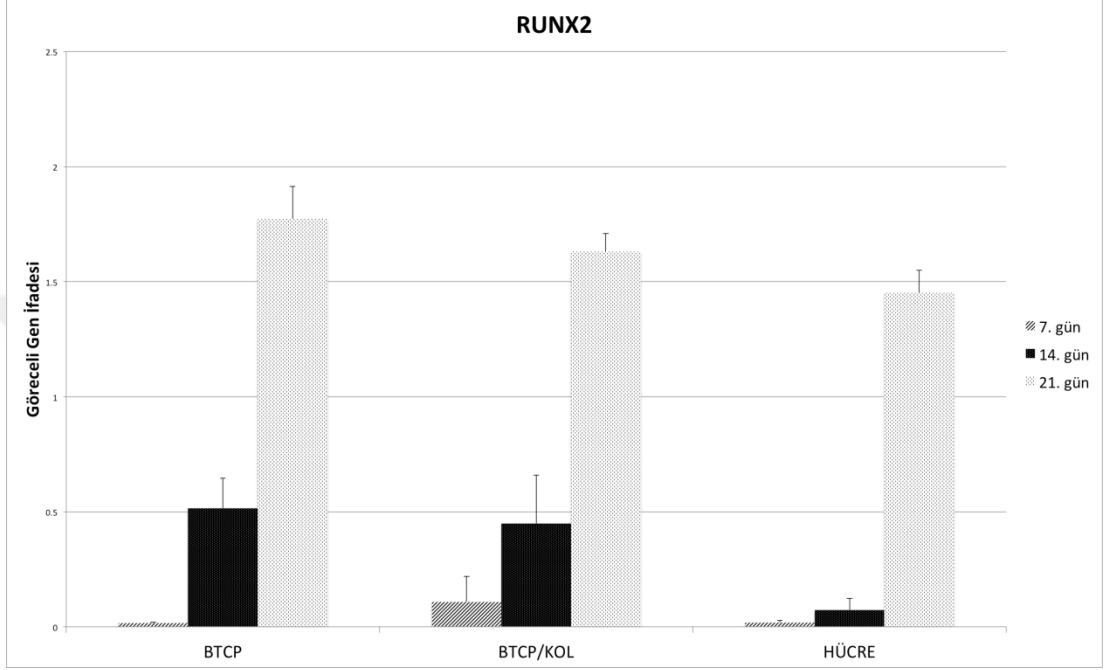
Şekil 3.13. A. β -TCP, 7. gün; β -TCP, 14. gün; C. β -TCP, 21. gün D. β -TCP/kol 7 gün; E. β -TCP/ kol 14. gün; F. β -TCP/ kol 21. gün.

3.7. Real Time PCR

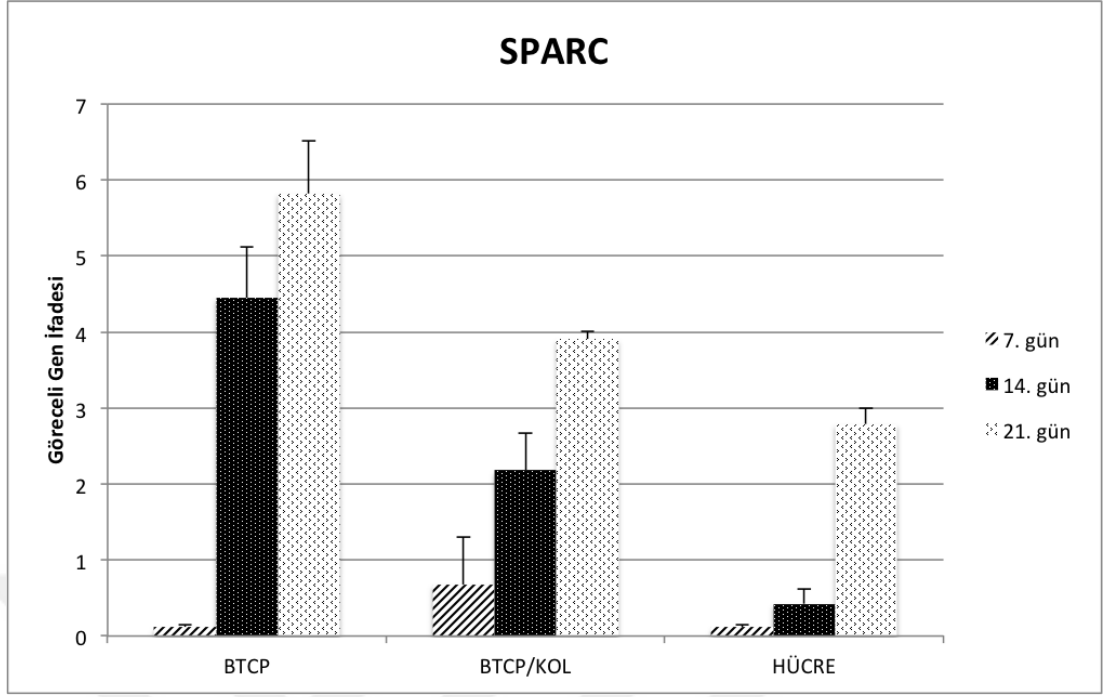
Erime sıcaklıklarının optimizasyonu için cDNA'lar, tasarlanan primerler kullanılarak çeşitli sıcaklıklarda PCR metoduyla çoğaltılmış ve agaroz jelde yürütülmüştür. Jel elektroforezi sonucunda RUNX2, SPARC ve ACTB genleri için tasarlanan primerlerin ortak optimum erime sıcaklıkları 58°C olarak belirlenmiştir.

RUNX2 ve SPARC osteojenik belirteç genleri için β -TCP ve β -TCP/kol içerikli materyallerin ve sadece hücre bulunan grubun göreceli gen ifadeleri incelenmiştir. Tüm gruplarda 7. günden 21. güne doğru RUNX2 ve SPARC gen ifadeleri artış göstermiştir. RUNX2 geninin ifadesi β -TCP/kol içerikli materyalde 7. günde β -TCP içerikli materyale göre yüksektir ancak diğer günlerde gen ifadelerinde fark görülmemiştir (Şekil 3.14). SPARC geninin ifadesi ise yine 7. günde β -TCP/kol

içerikli materyalde diğerine göre yüksektir. Ancak 14. ve 21. günlerde β -TCP içerikli biyomateryalde SPARC geninin ifadesi β -TCP/kol içerikli materyale göre yüksek bulunmuştur (Şekil 3.15).



Şekil 3.14. RUNX2 göreceli gen ifadesi.



Şekil 3.15. SPARC göreceli gen ifadesi.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada 5 sağlıklı köpekten alınan yağ dokulardan eksplant kültür yöntemiyle MKH izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Karaöz ve ark. (2017), tarafından yapılmış çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da ilk MKH'ler yağ doku parçalarının flasklara yerleştirilmesini takiben 5. günde gözlenmiş ve MKH'lerin %80-90 konfluentliğe ulaşması 2-3 hafta zaman almıştır. Çalışmalardaki MKH'lerin, izolasyonu takiben ilk gözlendiği zaman bu çalışmayla benzerlik göstermektedir. Ancak MKH'lerin izolasyonu takiben ilk haftanın sonunda %80-90 konfluentliğe sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Csaki ve ark., 2007; Nicpoń ve ark., 2014 ve Villatoro ve ark., 2015). Konfluentliğe erişme zamanındaki farklılığın yağ dokusu alınan hayvanın ırkına, yaşına ve yağ dokunun alındığı bölgeye göre değişkenlik göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

MKH izolasyonlarından sonra hücrelerin karakterizasyonları için üçlü farklılaştırma ve akış sitometrisi analizleri yapılmıştır. Yapılan üçlü farklılaştırma analizleri için hücreler kemik, kıkırdak ve yağ hücrelerine farklılaştırılmıştır. Kemiğe farklılaştırılan MKH'ler farklılaştırma besisi yerinin eklenmesinden 9 gün sonra koloniler oluşturmaya başlamış ve 14. günde bu koloniler en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Kıkırdağa farklılaştırılan hücrelerde 14. günden sonra hücre morfolojileri değişmiş ve 19. günde kıkırdak dokuya özgü proteoglikan sentezleyen odaklar gözlenmiştir. Yağ hücrelerine farklılaştırılan hücrelerde ise ikinci haftanın sonunda hücre sitoplazmalarının içinde yağ vakoulleri gözlenmeye başlamış ve 21. günde bu vakoullerin sayısı artmıştır. Kemiğe farklılaştırılmanın gösterilmesi için hücreler Von Kossa boyası ile, kıkırdağa farklılaştırılmanın gösterilmesi için Alcian Blue boyası ile ve yağa farklılaştırılmanın gösterilmesi için ise hücreler Oil Red O boyası ile boyanmıştır. İnsan ve köpeklerde yapılan çalışmalarda MKH'lerin, izolasyonunu takiben kemiğe, kıkırdağa ve yağa farklılaşma süreleri bu çalışmanın verileriyle benzerlik göstermektedir (Csaki ve ark., 2007; Park ve ark., 2009 ve Patrikoski ve ark., 2013).

Yapılan çalışmada Y-MKH'lerin karakterizasyonu için akış sitometrisi analizi yapılmış ve izole edilen hücreler CD 29, CD 34, CD 44, CD 73, CD 90, CD 81 ve CD 271 antikorları yönünden değerlendirilmiştir. Buna göre, CD 44, CD 73, CD 81 ve CD 90 yapılan diğer karakterizasyon çalışmalarıyla paralel olarak pozitif sonuç vermiştir. Çalışmamızda yapılan diğer çalışmalarla paralel şekilde CD 34 ve CD 271 negatif sonuç vermiştir (Marx ve ark., 2015; Schäffler ve Büchler, 2007; Screven ve ark., 2014; Song ve ark., 2019 ve Villatoro ve ark., 2014). İnsan, atlar ve kedilerde yapılan izolasyon ve karakterizasyon çalışmalarında CD 29 pozitif sonuçlar vermiştir (Gronthos ve ark., 2001; Marx ve ark., 2015; Morikawa ve ark., 2009; Pittenger ve ark., 1999; Romanov ve ark., 2005; Schäffler ve Büchler, 2007; Via ve ark., 2012 ve Wilson ve ark., 2019). Bu çalışmada CD 29 yüzey antijeni eksprese olmadığı dikkat çekmiştir. Marx ve ark. (2015) ve Screven ve ark. (2014) tarafından yapılan köpek yağ dokusundan MKH izolasyonu ve karakterizasyonu çalışmaları bu çalışmada elde edilen sonuçları desteklerken; Villatoro ve ark. (2014) ve Song ve ark. (2019) tarafından yine köpek yağ dokusundan MKH izolasyonu ve karakterizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar bu çalışmadaki sonuçlarla paralel değildir. Bu farklılığın hayvan türleri ve ırkları arasındaki farklılıktan meydana gelmiş olabileceği ve tür spesifik karakterizasyon çalışmalarının daha ayrıntılı çalışılması gerektiği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada β -TCP ve β -TCP/kol yapılı biyomateryallere ekilen Y-MKH'lerin tutunduklarını ve çoğaldıklarını göstermek amacıyla ekimden sonra 1., 7., 14. ve 21. günlerde MTT analizi yapılmıştır. Hücre ekili biyomateryallerde ve sadece hücre bulunan kuyucuklarda uygulanan testin sonucunda ilk 14 günde hücrelerin sayılarının arttığı ve 21. günde sayılarının azaldığı gösterilmiştir. Bu durum her iki biyomateryalin de hücrelerin bağlanması, yaşaması, çoğalması ve osteojenik farklılaşmasını desteklediğini göstermektedir. Westhauser ve ark. (2019), insan kemik iliği kökenli MKH'ler ve β -TCP içerikli bir biyomateryal ile yaptığı çalışmada, MKH'lerin yaşaması ve osteojenik farklılaşması için uygun bir ortam oluşturduğunu göstermiştir. İnsan MHK'leri ve poli-kaprolakton-trikalsium fosfat kombinasyonu şeklinde hazırlanan bir biyomateryalle yapılan çalışmadaki hücre canlılık testi sonuçları bu çalışmayla uyum göstermektedir (Rai ve ark., 2010). At kemik iliği

kökenli MKH'ler ve jelatin ile β -TCP içeren materyal ile çalışma yapan Seo ve ark. (2012), hücre ekili materyallere 1., 7. ve 14. günlerde canlılık testi uygulamış ve hücre sayısının artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Yapılan çalışmayla paralel sonuçlar gösteren başka bir çalışma ise Takahashi ve ark. (2005), tarafından β -TCP içerikli biyomateryal üzerinde rat kemik kökenli MKH'ler ile yapılmıştır. Çalışmadaki tüm gruplarda hücre ekimini takiben ikinci haftanın sonunda Y-MKH sayısındaki azalmanın hücrelerin doğru şekilde bağlanıp büyümesi için yer kalmadığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

ALP, yeni kemik oluşumu ve büyümesi için osteoblastlar aktivitesinde artışı ifade eder; bu nedenle osteojenik aktivite için erken bir belirteç olarak kullanılır. Alkalen fosfataz, p-nitrofenil fosfattan (pNPP) fosfatın çıkarılmasıyla p-nitrofenilat oluşumunu katalize eden bir enzimdir. Bu reaksiyonun sonucu olarak, p-nitrofenilat çözeltiye sarı renk verir ve rengin yoğunluğu mikropate okuyucuda 405 nm'de analiz edilmiştir. Yapılan çalışmada β -TCP ve β -TCP/kol yapılı biyomateryallere Y-MKH ekimi yapılmış ve ardından 1., 7., 14. ve 21. günlerde ALP aktivitesi ölçülmüştür. β -TCP içerikli biyomateryalde 1 günden 14. güne kadar enzim aktivitesi artarken 21. günde aktivite azalmıştır. β -TCP/kol yapılı biyomateryalde ise ALP aktivitesi ilk hafta artarken, ikinci haftadan itibaren azalmaya başlamıştır. İki materyal karşılaştırıldığında β -TCP/kol içerikli biyomateryalin 1. ve 7. günlerde, β -TCP içerikli biyomateryale göre daha yüksek ALP aktivitesi gösterdiği, 21. günde ise β -TCP/kol içerikli biyomateryalin β -TCP materyaline göre daha az ALP aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Kontrol amaçlı sadece hücre barındıran örneklerde ise aktivite ilk günden 14. güne kadar artarken 21. günde azalmıştır. Donzelli ve ark. (2007), sadece kollajen içeren materyalde rat kemik iliği kökenli MKH'leri kemiğe farklılaştırmışlar ve ardından 1., 7., 14., 21. ve 28. günlerde ALP aktivitesini ölçmüşlerdir. Çalışmada ilk 3 hafta enzim aktivitesinin sürekli artarak pik noktasına ulaştığı ve 28 günde aktivitenin azaldığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada β -TCP gibi seramik biyomateryal olan hidroksiapatit, insan MKH'leri ile birlikte kullanılmış ve kemiğe farklılaşmanın gösterilmesi için 1., 7., 14. ve 21. günlerde ALP aktivitesi değerleri ölçülmüştür. Çalışmanın sonucunda ilk günden 14. güne kadar aktivitenin arttığı ancak 21. günde aktivitenin azaldığı gösterilmiştir (Mygind ve ark., 2007). Karadzic ve ark.

(2015), tarafından yapılan çalışmada ise hidroksiapatit temelli 5 farklı biyomateriyal üzerinde MKH'ler kemiğe farklılaştırılmış, 6. ve 14. günde alınan okumalarla ALP aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. İnsan ve ratlarda yapılan ALP analizi verilerinin çalışmamızdaki veriler ile benzer olduğu görülmüştür.

Von Kossa boyaması, biyomateriyaller üzerindeki kalsiyum birikintilerini göstermek için uygulanmıştır. Bu yöntemde, gümüş nitrat çözeltisi, materyal içindeki kalsiyum bileşikleri ile reaksiyona girerek gümüş tuzlarını oluşturur. Gümüş tuzları UV ışık altında indirgenir ve kalsiyum birikintileri görülür hale gelir. İndirgenmemiş gümüş sodyum tiyosülfat kullanılarak uzaklaştırılır. Yapılan çalışmada iki biyomateriyale de 7., 14. ve 21. günlerde Von Kossa boyaması uygulanmış ve β -TCP içerikli biyomateriyalde kalsiyum birikintilerinin 7 günden 21. güne artış gösterdiği tespit edilmiştir. Zhou ve ark. (2012), poli laktik-koglikolik asit (PLGA) ve β -TCP kombinasyonu şeklinde hazırladıkları biyomateriyalin üzerinde rat fibroblast hücrelerini kemiğe farklılaştırmışlardır. Materyale 14. günde Von Kossa boyaması yapmışlar ve kalsiyum depositlerini göstermişlerdir. Ancak β -TCP/kol içeren biyomateriyalin degradasyon yeteneği yüksek olduğundan 7. günden sonra materyal çözünmüş ve bahsedilen kalsiyum birikintileri materyal üzerinde gösterilememiştir. Bu materyalin degradasyon kabiliyetinin yüksek olması içerdiği doğal bir biyomateriyal olan kollajenden kaynaklanmaktadır. Materyalin degradasyon özelliğinin bu kadar yüksek olması kemik doku mühendisliği için bir dezavantajdır. Donzelli ve ark. (2007), rat kemik iliği kaynaklı MKH ve kollajen materyalini kullanarak in vitro degradasyon çalışması yapmışlardır. Kollajenin in vivo çalışmalarda kemik doku iyileşmesinden önce çözünebileceğini öngörmüşlerdir. Bu çalışmada kollajenin bu dezavantajını aşmak için kollajen, β -TCP ile kombinasyon halinde kullanılmıştır. Ancak bu kombinasyonun materyalin degradasyon özelliğini yeterince azaltamadığı görülmüştür ve degradasyon çalışmalarına devam edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), canlılarda RUNX2 geni tarafından kodlanan ve Core-binding factor subunit alpha-1 (CBF-alpha-1) olarak da bilinen bir proteindir. RUNX2 osteoblast farklılaşması için temel bir transkripsiyon

faktörüdür (Komori, 2005). SPARC (Secreted protein acidic and cysteine rich) aynı zamanda osteonektin veya bazal membran proteini 40 (BM-40) olarak da adlandırılır. Kollajen tip I gibi fibril kollajenlerin ifadesi ile yakından ilişkili olan SPARC'ın osteoblast farklılaşması sırasında gen ifadesi artmaktadır (Rosset, 2016). Çalışmada β -TCP ve β -TCP/kol içerikli materyallerin ve aynı zamanda sadece hücre bulunan kontrol grubun RUNX2 ve SPARC osteojenik belirteçleri için 7., 14. ve 21. günlerde real time PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Her iki biyomateryalde ve kontrol grubunda bahsedilen günlerde genlerin ifadeleri artmıştır. RUNX2 ve SPARC genlerinin ifadeleri bahsedilen günlerin hepsinde kontrol grubundan yüksektir. Bu durum materyallerin osteoindüktif kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir. Westhauser ve ark. (2019), insan Kİ-MKH'ler ve β -TCP içerikli biyomateryal ile çalışma yapmışlar ve RUNX2 gen ifadesinin 7. günde pik yaptığı ve 14. günde azalıp 42. güne kadar yeniden arttığını göstermişlerdir. Bu sonucu osteogenezin geç evrelerinde henüz farklılaşmamış olan osteoblastların aktivitelerine bağlamışlardır. Assaf ve ark. (2019), insan kök hücreleri ile birlikte sadece kollajen ve sadece jelatin içeren iki biyomateryal ve β -TCP, HA ve fibrin kombinasyonu şeklinde hazırlanan başka bir biyomateryalin kemiğe farklılaşma kapasitelerinin karşılaştırılması amacıyla RUNX2 ve SPARC gen ekspresyon düzeylerini ölçmüşlerdir. Her üç biyomateryalde de bahsi geçen gen ifadelerinin 7. günden 14. güne arttığını ve sadece jelatin içeren materyalin diğerlerine göre daha yüksek gen ifadelerine sahip olduğunu göstermişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise ilk günlerde β -TCP/kol içerikli biyomateryalin RUNX2 ve SPARC gen ifadelerinin β -TCP içerikli materyale göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç β -TCP/kol içerikli materyalin diğerine göre ilk haftada osteoindüktif kapasitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada köpek yağ dokusundan izole edilen mezenkimal kök hücreler, β -TCP ve β -TCP/kol içerikli biyomateryallerde üretilmiş ve kemiğe farklılaştırılmıştır. Materyallerin yüzey özellikleri taramalı elektron mikroskopunda incelenmiştir. β -TCP ve β -TCP/kol içerikli biyomateryaller üzerinde hücre tutunmasını, çoğalmasını ve kemiğe farklılaşma kapasitelerini test etmek için MTT, Alkalen fosfataz, Von Kossa ve RT-PCR analizleri yapılmıştır. Köpeklerde Y-MKH'lerin çoğalma, osteojenik farklılaşma, canlı kalma kapasiteleri iki farklı biyomateryalde karşılaştırılmıştır.

Köpeklerden elde edilen Y-MKH'lerin fenotipik belirteçleri ortaya konulmuş ve bu hücrelerin osteojenik gen ekspresyon belirteçlerinin analizi yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda köpeklerde mezenkimal kök hücrelerle birlikte çalışılan β -TCP/kol kombinasyonun, β -TCP'e göre, köpek Y-MKH tutunma, çoğalma, uyumluluk ve osteojenik farklılaştırma yeteneklerinin daha fazla olduğuna dair olan hipotez reddedilmiştir. β -TCP/kol içerikli materyalin ALP aktivitesinin diğer materyale göre daha yüksek olmasına ve bununla birlikte ilk günlerde osteojenik belirteç genleri olan RUNX2 ve SPARC gen ifadeleri yönünden β -TCP materyaline göre daha avantajlı olmasına rağmen degradasyon kapasitesinin istenen düzeyden yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. β -TCP/kol kombinasyonunun biyodegradasyon özelliğinin çok yüksek olmasının kemik doku mühendisliğinden çok kıkırdak doku mühendisliği alanında çalışılmasına olanak sağladığı düşünülmektedir. Avantajlarına rağmen kollajenin zayıf mekanik özellikler gösterdiği ve bozulma oranının kontrol edilmesi zor olduğu bilinmektedir. Bu nedenle kemik doku mühendisliği uygulamaları için kollajen ile kombinasyon halinde hazırlanan materyalin mekanik özelliklerinin ve kimyasal stabilitesinin artırılması için veya absorbe olma oranını değiştirmek için β -TCP içeren materyalle kombinasyonundaki oranlarının iyileştirilmesi gerektiği ve degradasyon çalışmalarının yapılması gerektiği düşünülmektedir.

ÖZET

Köpeklerde Yağ Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin β -TCP ve β -TCP /Kollajen İçerikli Biyomateryallerde Kemiğe Farklılaştırılması

Yetişkin kök hücrelerden olan mezenkimal kök hücrelerin, kemik, kıkırdak, kas ve yağ dokusu gibi özellikle destek dokulara farklılaşabildiği bilinmektedir. İnsanlarda ortopedi ve travmatoloji alanında da mezenkimal kök hücreler özellikle kemik kırıkları ve hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Günümüzde kemik kırıklarının iyileştirilmesi amacıyla mezenkimal kök hücrelerin biyomateryal kombinasyonları ile birlikte kullanımı hakkında yapılan araştırmaların sayısı her geçen gün artmaktadır. Ancak Türkiye’de Veteriner hekimliğin ortopedi alanına ait rejeneratif tedavi çalışmalarında biyomateryal üzerinde türlere özgü mezenkimal kök hücre kullanımıyla ilgili yeterli araştırma bulunmamaktadır.

Yapılan bu çalışmada köpeklerin yağ dokusundan eksplant kültür yöntemiyle izole edilen mezenkimal kök hücrelerin Beta-trikalsiyum fosfat (β -TCP) ve β -TCP/kollajen (β -TCP/kol) içerikli biyomateryallerde üretilip kemiğe farklılaştırılması amaçlanmıştır. Üç boyutlu kemik dokunun ekstrasellüler matriksini taklit etmek amacıyla kullanılan β -TCP ve β -TCP/kol içerikli biyomateryaller üzerinde hücre tutunmasını ve çoğalmasını tespit etmek için canlılık testi (MTT) analizi yapılmıştır. Biyomalzemelerin genel yüzey özelliklerini göstermek için taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır. Alkalen fosfataz (ALP), Von Kossa ve RT-PCR analizleri kullanılarak β -TCP ve β -TCP/kollajen içerikli biyomateryallerin osteoindüktif kapasitesi test edilmiştir. Köpeklerde yağ dokusu kökenli mezenkimal kök hücrelerin (Y-MKH) çoğalma, osteojenik farklılaşma, canlı kalma kapasiteleri iki farklı biyomateryalde karşılaştırılmıştır.

Bu çalışmanın sonucunda β -TCP/kol içerikli biyomateryalin alkalen fosfataz aktivitesi ve osteojenik gen ekspresyonları yönünden β -TCP materyaline göre avantajlı olmasına rağmen degradasyon özelliği çok yüksek olmasından dolayı kemik doku mühendisliğinde kullanımı için geliştirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyomateryal, Köpek, Mezenkimal Kök Hücre, Osteojenik Farklılaşma, Yağ Doku.

SUMMARY

Osteogenic Differentiation of Canine Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells on β -TCP and β -TCP /Collagen Biomaterials

Mesenchymal stem cells are adult stem cells that have ability to differentiate into osteogenic, chondrogenic, adipogenic and myogenic lineages. In the field of orthopedics and traumatology, mesenchymal stem cells are used especially for the treatment of bone fractures and diseases in humans. Today, the number of studies regarding the use of mesenchymal stem cells in combination with biomaterials to treat bone fractures is increasing day by day. However, there are not enough studies on the use of species specific mesenchymal stem cells on biomaterials in the research of orthopedic regenerative therapies in Veterinary Medicine in Turkey.

The purpose of this study is to promote growth, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells that were isolated from the adipose tissue of canines on β -TCP ve β -TCP /collagen biomaterials. MTT analysis was performed to test the cell adhesion and proliferation on β -TCP and β -TCP /collagen biomaterials which were used to mimic the extracellular matrix of three-dimensional bone tissue. Scanning electron microscope analysis was performed to show general surface characters of β -TCP and β -TCP /collagen biomaterials. The osteoinductive capacity of the β -TCP and β -TCP /collagen biomaterials were determined by alkaline phosphatase and Von Kossa stainings, and RT-PCR analysis. Beside these studies, the capacity of growth, proliferation and osteogenic differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells on two different biomaterials were compared.

As a result of this research, it is thought that although it is advantageous in terms of alkaline phosphatase activity and osteogenic gene expression compared to β -TCP material, β -TCP /collagen biomaterial should be developed because of its high degradation properties for use in bone tissue engineering.

Keywords: Adipose Tissue, Biomaterial, Canine, Mesenchymal Stem Cell, Osteogenic Differentiation.

KAYNAKLAR

- ADAMS JE, ZOBITZ ME, REACH JS, AN KN, LEWALLEN DG, STEINMANN SP (2005). Canine carpal joint fusion: A model for four-corner arthrodesis using a porous tantalum implant. *J. Hand Surg.* **30A**: 1128-1135.
- ALSALAMEH S, AMIN R, GEMBA T, LOTZ M (2004). Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis and Rheumatism.* **50**: 1522-1532.
- ALVAREZ K, NAKAJIMA H (2009). Metallic scaffolds for bone regeneration. *Materials.* **2(3)**: 790-832.
- ANDERSON JM, HILTNER A, WIGGINS MJ, SCHUBERT MA, COLLIER TO, KAO WJ, MATHUR AB (1998). Recent Advances in Biomedical Polyurethane Biostability and Biodegradation. *Polymer International.* **46**: 163-171.
- ANITHA A, SOWMYA S, KUMAR PTS, DEEPTHI S, CHENNAZHI KP, EHRLICH H, TSURKAN M, JAYAKUMAR R (2014). Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Progress in Polymer Science.* **39(9)**: 1644-1667.
- ARAHIRA T, TODO M (2016). Variation of mechanical behavior of β -TCP/collagen two phase composite scaffold with mesenchymal stem cell in vitro. *Journal of The Mechanical Behavior of Biomedical Materials.* **61**: 464-474.
- ARMENTANO I, BITINIS N, FORTUNATI E, MATTIOLI S, RESCIGNANO N, VERDEJO R, LOPEZ-MANCHADO MA, KENNY JM (2013). Multifunctional nanostructured PLA materials for packaging and tissue engineering. *Progress in Polymer Science.* **38**: 1720-1747.
- ASSAF RB, FAYYAD-KAZAN M, AL-NEMER F, MAKKI R, FAYYAD-KAZAN H, BADRAN B, BERBÉRI A (2019). Evaluation of the osteogenic potential of different scaffolds embedded with human stem cells originated from schneiderian membrane: An in vitro study. *Biomed Research International.* **2019**: 1-10.
- BARLOW S, BROOKE G, CHATTERJEE K, PRICE G, PELEKANOS R, ROSSETTI T, DOODY M, VENTER D, PAIN S, GILSHENAN K, ATKINSON K (2008). Comparison of human placenta-and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development.* **17(6)**: 1095-1108.
- BECKER AJ, MCCULLOCH EA, TILL JE (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* **197(4866)**: 452-454.

- BOBYN JD, TOH KK, HACKING SA, TANZER M, KRYGIER JJ (1999). The tissue response to porous tantalum acetabular cups: A canine model. *J. Arthroplast.* **14**: 347-354.
- BONGSO A, LEE EH (2005). Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources, Stem Cells from Bench to Bedside. *World Scientific Publishing Co.* Chapter 1.
- BONGSO A, RICHARDS M (2004). History and perspective of stem cell research. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **18(6)**: 827-842.
- BOSE S, ROY M, BANDYOPADHYAY A (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology.* **30(10)**: 546-554.
- BRÅNEMARK PI, BREINE U, ADELL R, HANSSON BO, LINDSTRÖM J, OHLSSON Å (1969). Intra-osseus anchorage of dental prosthesis. *Scand. J. Plas. Reconstr. Surg.* **3**: 81-100.
- BROOKE G, ROSSETTI T, PELEKANOS R, ILIC N, MURRAY P, HANCOCK S, ANTONENAS V, HUANG G, GOTTLIEB D, BRADSTOCK K, ATKINSON K (2009). Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials. *British Journal of Haematology.* **144(4)**: 571-579.
- BROWN AC, BARKER TH (2014). Fibrin-based biomaterials: Modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. *Acta Biomaterialia.* **10**: 1502-1514.
- BRUDER SP, JAISWAL N, HAYNESWORTH SE (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. Biochem.* **64**: 278-294.
- BRZOSKA M, GEIGER H, GAUER S, BAER P (2005). Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330(1)**: 142-150.
- CAN A (2014). Kök Hücre, Biyolojisi türleri ve tedavide kullanımları. *Akademisyen Kitabevi.* s.: 327-426.
- CAO H, KUBOYAMA N (2010). A biodegradable porous composite scaffold of PGA/ β -TCP for bone tissue engineering. *Bone.* **46**: 386-395.
- CAPLAN AI (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **9**: 641-650.
- CAPLAN AI (2008). Why are MSCs therapeutic? New data: New insight. *Journal of Pathology.* **217(2)**: 318-324.

- CAVALERI F, SCHÖLER H (2009) Molecular Basis of Pluripotency. *Essential of Stem Cell Biology*. LANZA R. Academic Press. p.: 39-60.
- CHAMBERS I, SILVA J, COLBY D, NICHOLS J, NIJMEIJER B, ROBERTSON M, VRANA J, JONES K, GROTEWOLD L, SIMTH A (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*. **450**: 1230-1234.
- CORREIA C, BHUMIRATANA S, YAN LP, OLIVEIRA AL, GIMBLE JM, ROCKWOOD D, KAPLAN D, SOUSA RA, REIS RL, VUNJAK-NOVAKOVIC G (2012). Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells. *Acta Biomaterialia*. **8**: 2483-2492.
- COVAS DT, PANEPUCCI RA, FONTES AM, SILVA JR WA, ORELLANA MD, FREITAS MC, NEDER L, SANTOS ARD, PERES LC, JAMUR MC, ZAGO MA (2008). Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental Hematology*. **36**: 642-654.
- CSAKI C, MATIS U, MOBASHERI A, YE H, SHAKIBAEI M (2007). Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochemistry and Cell Biology*. **128(6)**: 507-520.
- CUI CH, UYAMA T, MIYADO K, TERA I M, KYO S, KIYONO T, UMEZAWA A (2007). Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. *Molecular Biology of the Cell*. **18**: 1586-1594.
- DAI R, WANG Z, SAMANIPOUR R, KOO K I, KIM K (2016). Adipose-derived stem cells for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Stem Cells International*. **2016**: 1-19.
- DASH TK, KONKIMALLA VB (2012). Poly-ε-Caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A Review. *Official Journal of the Controlled Release Society*. **158**: 15-33.
- DE BARI C, DELL'ACCIO F, TYLZANOWSKI P, LUYTEN FP (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and Rheumatism*. **44**: 1928-1942.
- DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC, KRAUSE DS, DEANS RJ, KEATING A, PROCKOP DJ, HORWITZ EM (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. **8**: 315-317.
- DONZELLI, E, A. SALVADE, P. MIMO, M. VIGANÒ, M. MORRONE, R. PAPAGNA, F. CARINI et al. (2007). Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. *Archives of Oral Biology*. **52(1)**: 64-73.

- EBRAHIMI M, BOTELHO MG, DOROZHKIN, S V (2017). Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Materials Science and Engineering*, **71**: 1293-1312.
- ELZOGHBY AO (2013). Gelatin-Based Nanoparticles as Drug and Gene Delivery Systems: Reviewing Three Decades of Research. *Journal of the Controlled Release Society*. **172**: 1075-1091.
- EVANS MJ, KAUFMAN MH (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. **292(5819)**: 154.
- FERNANDEZ M, SIMON V, HERRERA G, CAO C, DEL FAVERO H, MINGUELL JJ (1997). Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplantation*. **20**: 265-271.
- FRIEDENSTEIN AJ, CHAILAKHJAN RK, LALYKINA KS (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. **3**: 393-403.
- FRIEDENSTEIN AJ, PIATETZKY SII, PETRAKOVA KV (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol*. **16**: 381-390.
- GALLO R, GAMBELLI F, GAVA B, SASDELLI F, TELLONE V, MASINI M, MARCHETT P, DOTTA F, SORRENTINO V (2007). Generation and expansion of multipotent mesenchymal progenitor cells from cultured human pancreatic islets. *Cell Death and Differentiation*. **14**: 1860-1871.
- GIMBLE JM, GUILAK F (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*. **5(5)**: 362-369.
- GRONTHOS S, FRANKLIN DM, LEDDY HA, ROBEY PG, STORMS RW, GIMBLE JM (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue derived stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*, **189(1)**: 54-63.
- GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J, ROBEY PG, SHI S (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **97**: 13625-13630.
- GUNATILLAKE PA, ADHIKARI R (2003). Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials*. **5**: 1-16.
- HACKING SA, BOBYN JD, TOH K, TANZER M, KRYGIER JJ (2000). Fibrous tissue ingrowth and attachment to porous tantalum. *J. Biomed. Mater. Res*. **52**: 631-638.
- HARDY JG, SCHEIBEL TR (2010). Composite materials based on silk proteins. *Progress in Polymer Science*. **35**: 1093-1115.

- HENTZE H, GRAICHEN R, COLMAN A (2007). Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts. *Trends in Biotechnology*. **25(1)**: 24-32.
- HURİ P Y, HASIRCI N, HASIRCI, V (2010). Kemik doku mühendisliği. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. **19**: 206-219.
- JAHODA CA, WHITEHOUSE CJ, REYNOLDS AJ, HOLE N (2003). Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Experimental Dermatology*. **12**: 849-859.
- JAZEDJE T, PERIN PM, CZERESNIA CE, MALUF M, HALPERN S, SECCO M, BUENO DF, VIEIRA NM, EDER ZUCCONI E, ZATZ M (2009). Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures. *Journal of Translational Medicine*. **7(1)**: 46-48.
- JURGENS WJ, OEDAYRAJSINGH-VARMA MJ, HELDER MN, ZANDIEHDOULABI B, SCHOUTEN TE, KUIK DJ, RITT MJPF, VAN MILLIGEN FJ (2008). Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell and Tissue Research*. **332(3)**: 415-426.
- KARADZIC I, VUCIC V, JOKANOVIC V, DEBELJAK MARTACIC J, MARKOVIC D, PETROVIC S, GLIBETIC M (2015). Effects of novel hydroxyapatite based 3D biomaterials on proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. **103(1)**: 350-357.
- KARAÖZ E, DEMİRCAN PÇ, ERMAN G, GÜNGÖRÜRLER E, SARIBOYACI AE (2017). Comparative analyses of immunosuppressive characteristics of bone-marrow, Wharton's jelly, and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells. *Turkish Journal of Hematology*. **34(3)**: 213-216.
- KARAŞAHİN T (2012). Embriyonik kök hücreler. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **9(1)**: 65-71.
- KIM BS, PARK IK, HOSHIBA T, JIANG HL, CHOI YJ, AKAIKE T, CHO CS (2011). Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*. **36**: 238-268.
- KOMORI T (2005). Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J. Cell Biochem*. **95**: 445-453.
- KRAMPERA, M., SARTORIS, S., LIOTTA, F., PASINI, A., ANGELI, R., COSMI, L., ANDREINI A, MOSNA F, BONETTI B, REBELLATO E, TESTI MG, FROSALI F, PIZZOLO G, TRIDENTE G, MAGGI E, ROMAGNANI S, ANNUNZIATO F (2007). Immune regulation by mesenchymal stem cells derived from adult spleen and thymus. *Stem Cells and Development*. **16**: 797-810.
- KÜMBÜLOĞLU Ö, ONUR O (2013). Biyomateryaller. *Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*. **34(1)**: 27-33.

- LAM J, TRUONG NF, SEGURA T (2014). Design of cell-matrix interactions in hyaluronic acid hydrogel scaffolds. *Acta Biomaterialia*. **10**: 1571-80.
- LEE KY, MOONEY DJ (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. **37**: 106-126.
- LEE OK, KUO TK, CHEN WM, LEE KD, HSIEH SL, CHEN TH (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. **103(5)**: 1669-1675.
- LI WJ, TULI R, HUANG X, LAQUERRIERE P, TUAN RS (2005). Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials*. **26(25)**: 5158-5166.
- MALAFAYA PB, SILVA GA, REIS RL (2007). Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **59**: 207-233.
- MARTIN, GR (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **78**: 7634-7638.
- MARTINELLO T, BRONZINI I, MACCATROZZO L, MOLLO A, SAMPAOLESI M, MASCARELLO F, DECAMINADA M, PATRUNO M (2011). Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Research in Veterinary Science*. **91(1)**: 18-24.
- MARX C, SILVEIRA MD, BEYER NARDI N (2015). Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. *Stem Cells and Development*. **24(7)**: 803-813.
- MASUI S, NAKATAKE Y, TOYOOKA Y, SHIMOSATO D, YAGI R, TAKAHASHI K, OKOCHI H, OKUDA A, MATOBA R, SHAROV AA, KO MS, NIWA H (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biol*. **9**: 625-635.
- MENEGHINI RM, LEWALLEN DG, HANSEN AD (2008). Use of porous tantalum metaphyseal cones for severe tibial bone loss during revision total knee replacement. *J. Bone Joint Surg. Am*. **90**: 78-84.
- MITALIPOV S, WOLF D (2009). Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. In *Engineering of Stem Cells*. MARTIN U. Springer. p.: 185-199.
- MORIKAWA S, YO M, YOSHIKI K, YASUO N, KUNIMICHI N, EMI H, SADAFUMI MIYAUCHI-HARA C, NAGOSHI N, SUNABORI T, SHIMMURA S, MIYAWAKI A, NAKAGAWA T, SUDA T, OKANO H, MATSUZAKI Y (2009). Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *Journal of Experimental Medicine*. **206(11)**: 2483-2496.

- MRAVIC M, PÉAULT B, JAMES A W (2014). Current trends in bone tissue engineering. *BioMed Research International*. **2014**: 1-5.
- MYGIND T, STIEHLER M, BAATRUP A, LI H, ZOU X, FLYVBJERG A, MOUSTAPHA K, BÜNGER, C (2007). Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*. **28(6)**: 1036-1047.
- NAGAMURA-INOUE T, HAIPING H (2014). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World J. Stem Cell*. **6(2)**: 195-202.
- NAIR LS, LAURENCIN CT (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. **32**: 762-798.
- NAKAHARA H, GOLDBERG VM, CAPLA AI (1991). Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J. Orthop. Res*. **9**: 465-476.
- NAVARRO M, MICHIARDI A, CASTAÑO O, PLANELL JA (2008). Biomaterials in orthopaedics. *J. R. Soc. Interface*. **5**: 1137-58.
- NICPOŃ J, MARYCZ K, GRZESIAK J, ŚMIESZEK A, TOKER ZY (2014). The advantages of autologous adipose derived mesenchymal stem cells (AdMSCs) over the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) application for degenerative elbow joint disease treatment in dogs-Twelve cases. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **20(3)**: 345-350.
- NIINOMI, M (1998). Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Materials Sci. and Engineering*. 231-236.
- NIWA H, MIYAZAKI J, SIMTH AG (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet*. **24**: 372-376.
- O'DONOGHUE K, FISK NM (2004). Fetal stem cells: Best practice and research. *Clin. Obstet. Gynecol*. **18(8)**: 53-75.
- ÖZDAL KURT F, TUĞLU I, VATANSEVER HS, TONG S, ŞEN BH, DELİLOĞLU GÜRHAN SI (2016) The effect of different implant biomaterials on the behavior of canine bone marrow stromal cells during their differentiation into osteoblasts. *Biotechnic and Histochemistry*. **91(6)**: 412-422.
- ÖZKURT B, TABAK AY (2011). Metalik biyomateryaller ve metallozis. *Totbid Dergisi*, **10(2)**: 83-86.
- PARK IS, HAN M, RHIE JW, KIM SH, JUNG Y, KIM IH, KIM SH (2009). The correlation between human adipose-derived stem cells differentiation and cell adhesion mechanism. *Biomaterials*. **30(36)**: 6835-6843.

- PASINLI A (2004). Biyomedikal uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler. *Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi*. **(4)**: 25-34.
- PATRIKOSKI M, JUNTUNEN M, BOUCHER S, CAMPBELL A, VEMURI MC, MANNERSTRÖM B, MIETTINEN S (2013). Development of fully defined xeno-free culture system for the preparation and propagation of cell therapy-compliant human adipose stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*. **4(2)**: 27.
- PINHO S, FRENETTE PS (2019). Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **20**: 303-320.
- PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. **284**: 143-147.
- POLISETTY N, FATIMA A, MADHIRA SL, SANGWAN VS, VEMUGANTI GK (2008). Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye. *Molecular Vision*. **14**: 431-442.
- PRINDULL G, PRINDULL B, MEULEN N (1978). Haematopoietic stem cells (CFUc) in human cord blood. *Acta Paediatr Scand*. **67**: 413-6.
- PUPPI D, CHIELLINI F, PIRAS AM, CHIELLINI E (2010). Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*. **35**: 403-440.
- PURANIK SB, NAGESH A, GUTTEDAR RS (2012). Isolation of mesenchymal-like cells from Wharton's jelly of umbilical cord. *Ijpcbs*. **2(3)**: 218-224.
- RAI B, LIN JL, LIM ZX, GULDBERG RE, HUTMACHER DW, COOL SM (2010). Differences between in vitro viability and differentiation and in vivo bone-forming efficacy of human mesenchymal stem cells cultured on PCL-TCP scaffolds. *Biomaterials*. **31(31)**: 7960-7970.
- RASAL RM, JANORKAR AV, HIRT DE (2010). Poly (lactic acid) modifications. *Progress in Polymer Science*. **35**: 338-356.
- RISBUD MV, GUTTAPALLI A, TSAI TT, LEE JY, DANIELSON KG, VACCARO AR, ALBERT T, GAZIT Z, GAZIT D, SHAPIRO IM (2007). Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc. *Spine*. **32**: 2537-2544.
- ROMAGNOLI C, BRANDI ML (2014). Adipose mesenchymal stem cells in the field of bone tissue engineering. *World J Stem Cells*. **6**: 144-152.
- ROMANOV YA, SVINTSITSKAYA VA, SMIRNOV VN (2003). Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*. **21**: 105-110.

- ROMANOV YA, DAREVSKAYA AN, MERZLIKINA NV, BURAVKOVA LB (2005). Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. **140(1)**: 138-143.
- RODRIGUES CVM, SERRICELLA P, LINHARES ABR, GUERDES RM, BOROJEVIC R, ROSSI MA, DUARTE MEL, FARINA M (2003). Characterization of a bovine collagen–hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*. **24(27)**: 4987-4997.
- ROSSET EM, BRADSHAW AD (2016). SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biology*. **52**: 78-87.
- SABATINI F, PETECCHIA L, TAVIAN M, DE VILLEROCHÉ VJ, ROSSI GA, BROUTY-BOYÉ D (2005). Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Laboratory Investigation*. **85**: 962-971.
- SÁNDOR GK (2012). Tissue engineering of bone: Clinical observations with adipose-derived stem cells, resorbable scaffolds, and growth factors. *Annals of Maxillofacial Surgery*. **2**: 8-11.
- SANTORO M, TATARA AM, MIKOS AG (2014). Gelatin Carriers for Drug and Cell Delivery in Tissue Engineering. *Official Journal of the Controlled Release Society*, **190**: 210-218.
- SARKAR D, ZHAO W, SCHAEFER S, ANKRUM JA, TEO GSL, PEREIRA MN, FERREIRA L, KARP JM (2013). Overview of tissue engineering concepts and applications. *Biomaterials Science*. 1122-1137.
- SCHÄFFLER A, BÜCHLER C (2007). Concise review: adipose tissue derived stromal cells basic and clinical implications for novel cell based therapies. *Stem cells*. **25(4)**: 818-827.
- SCHEPERS EJG, DUCHEYNE P, BARBIER L, SCHEPERS S (1993). Bioactive glass particles of narrow size range: A new material for the repair of bone defects. *Implant Dent*. **2**: 151-156.
- SCHWAB KE, GARGETT CE (2007). Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Human Reproduction*. **22**: 2903-2911.
- SCREVEN R, KENYON E, MYERS MJ, YANCY HF, SKASKO M, BOXER L, BIGLEY III, EC, BORJESSON DL, ZHU M (2014). Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **161(1-2)**: 21-31.

- SELL, S (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **51(1)**: 1-28.
- SEO BM, MIURA M, GRONTHOS S, BARTOLD PM, BATOULI S, BRAHIM J, MARIAN YOUNG M, ROBEY PG, WANG CY, SHI S (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet.* **364(9429)**: 149-155.
- SEO JP, TSUZUKI N, HANEDA S, YAMADA K, FURUOKA H, TABATA Y, SASAKI N (2012). Proliferation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in gelatin/ β -tricalcium phosphate sponges. *Research in Veterinary Science.* **93(3)**: 1481-1486.
- SHI C, ZHU Y, RAN X, WANG M, SU Y, CHENG T (2006). Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *The Journal of Surgical Research.* **133**: 185-192.
- SMITH AG (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* **17(1)**: 435-462.
- SÖKMENSÜER LK (2007). Embriyonik kök hücreler ve tedavi amaçlı kullanımları. *Hacettepe Tıp Dergisi.* **38**: 9-15.
- SOKOLSKY-PAPKOV M, AGASHI K, OLAYE A, SHAKESHEFF K, DOMB AJ (2007). Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **59**: 187-206.
- SONG WJ, LI Q, RYU MO, NAM A, AN JH, JUNG YC, AHN JO, YOUN HY (2019). Canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells pre-treated with TNF-alpha enhance immunomodulatory effects in inflammatory bowel disease in mice. *Research in Veterinary Science.* **125**: 176-184.
- SOWMYA S, BUMGARDENER JD, CHENNAZHI KP, NAIR SV, JAYAKUMAR R (2013). Role of nanostructured biopolymers and bioceramics in enamel, dentin and periodontal tissue regeneration. *Progress in Polymer Science.* **38**: 1748-1772.
- ŞAHİN F, SAYDAM G, OMA Y SB (2005). Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi.* **1(15)**: 48-56.
- ŞİMŞEK Ö (2012). Yetişkin kök hücrelerin dünü ve bugünü. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi.* **7(3)**: 231-236.
- TAKAHASHI Y, YAMAMOTO M, TABATA Y (2005). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and β -tricalcium phosphate. *Biomaterials.* **26(17)**: 3587-3596.

- TEBYANIAN H, NORAHAN MH, EYNI H, MOVAHEDIN M, MORTAZAVI SJ, KARAMI A, NOURANI MR, BAHEIRAEI N (2019). Effects of collagen/ β -tricalcium phosphate bone graft to regenerate bone in critically sized rabbit calvarial defects. *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials*. **17(1)**: 1-7.
- TEKELİ S, NAGHAVI EA, GÖKÇE B, SIR G, YİĞİTTÜRK G, ÇAVUŞOĞLU T, UYANIKGİL Y (2016). Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplantasyon Dergisi*. **1(2)**: 72-83.
- THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS, JONES JM (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. **282(5391)**: 1145-1147.
- TOGNARINI I, SORACE S, ZONEFRATI R, GALLI G, GOZZINI A, SALA SC, THYRION GDZ, CAROSSINO AM, TANINI A, MAVILIA C, AZZARI C, SBAIZ F, FACCHINI A, CAPANNA R, BRANDI ML (2008). In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells on Ti6Al4V surfaces. *Biomaterials*. **29**: 809-824.
- TOMIN E, BEKSAÇ B, LANE JM (2002). Amerika birleşik devletlerinde ortopedik girişimlerde otogreftlerin yerine kullanılan materyallere toplu bakış. *Artroplastik Artroskopik Cerrahi*. **13(2)**: 114-129.
- TURUNEN T, PELTOLA J, HELENIUS H, YLI-URPO A, HAPPONEN RP (1997). Bioactive glass and calcium carbonate granules as filler material around titanium and bioactive glass implants in the medullar space of the rabbit tibia. *Clin. Oral Impl. Res.* **8**: 96-102.
- TÜRKŞEN K, RAO M (2005). Issues in human embryonic stem cell biology. *Stem Cell Reviews*. **1(2)**: 79-81.
- URAL AU (2006). Kök hücreler. *TOTBİD Dergisi*. **5(3-4)**: 140-145.
- VALENTE S, ALVIANO F, CIAVARELLA C, BUZZI M, RICCI F, TAZZARI PL, PASQUALEPAOLO P, PASQUINELLI G (2014). Human cadaver multipotent stromal/stem cells isolated from arteries stored in liquid nitrogen for 5 years. *Stem Cell Research and Therapy*. **5(1)**: 8.
- VIA AG, FRIZZIERO A, OLIVA F (2012). Biological properties of mesenchymal stem cells from different sources. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*. **2(3)**: 154.
- VIEIRA NM, BRANDALISE V, ZUCCONI E, SECCO M, STRAUSS BE, ZATZ M (2010). Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplantation*. **19(3)**: 279-289.

- VILLATORO AJ, FERNÁNDEZ V, CLAROS S, RICO-LLANOS GA, BECERRA J, ANDRADES JA (2015). Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. *Biomed Research International*. **2015**: 2-4.
- WANG X, NYMAN JS, DONG X, LENG H, REYES M (2010). Fundamental biomechanics in bone tissue engineering. *Synthesis Lectures on Tissue Engineering*. **2(1)**: 125-145.
- WANG Y, KIM HJ, VUNJAK-NOVAKOVIC G, KAPLAN DL (2006). Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials*. **27**: 6064-6082.
- WESTHAUSER F, KARADJIAN M, ESSERS C, SENGHER AS, HAGMANN S, SCHMIDMAIER G, MOGHADDAM A (2019). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is enhanced in a 45S5-supplemented β -TCP composite scaffold: an in-vitro comparison of Vitoss and Vitoss BA. *PloS one*. **14(2)**: 1-18.
- WILLIAMS JT, SOUTHERLAND SS, SOUZA J, CALCUTT AF, CARTLEDGE RG (1999). Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am. Surg.* **65**: 22-26.
- WILSON A, CHEE M, BUTLER P, BOYD AS (2019). Isolation and characterisation of human adipose-derived stem cells. *In Immunological Tolerance*. **2019**: 3-13.
- WOODRUFF MA, HUTMACHER DW (2010). The return of a forgotten polymer-polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*. **35**: 1217-1256.
- XIAOMING L, HAIFENG L, NIU X, FAN Y, FENG Q, CUI F, WATARI F (2011). Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells induced by osteoinductive calcium phosphate ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. **1(2011)**: 10-19.
- YANG JS, XIE YJ, HE W (2011). Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate Polymers*. **84**: 33-39.
- YOUNG HE, STEELE TA, BRAY RA, HUDSON J, FLOYD JA, HAWKINS K, THOMAS K, AUSTIN T, EDWARDS C, CUZZOURT J, DUENZL M (2001). Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. **264**: 51-62.
- YOUNG RG, BUTLER DL, WEBER W, CAPLAN AI, GORDON SL, FINK DJ (1998). Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair. *Journal of Orthopaedic Research*. **16**: 406-413.
- ZHOU H, XU HHK (2011). The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. **32**: 7503-7513.

- ZHOU Z, YI Q, LIU L, ZHAO Y, ZENG W, OU B, LIU Q, LIU, X (2012). Morphological and functional expression of fibroblast on poly (lactide-co-glycolide)/ β -tricalcium phosphate/nature bone. *International Journal of Polymeric Materials*. **61(8)**: 643-653.
- ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, HUANG J, FUTRELL J W, KATZ AJ, BENHAIM P, LORENZ H P, HEDRICK M H (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*.**7**: 211-228.
- ZUK PA, ZHU M, ASHJIAN P, DE UGARTE DA, HUANG JI, MIZUNO H, ALFONSO ZC, FRASER JK, BENHAIM P, HEDRICK MH (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*. **13(12)**: 4279-4295.



EKLER

Ek-1. Etik Kurul Kararı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 01/03/2017
TOPLANTI NO : 2017-5
DOSYA NO : 2017-21
KARAR NO : 2017-5-37

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Asuman Özen'in yaptığı; araştırmacı olarak Arş.Gör.Dr.Ahmet Ceylan ve Arş.Gör.Özge Özgenç'in katıldığı "Köpek Yağ Dokusu Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerinin β -TCP ve β -TCP/kollagen İçerikli Biyomateryallerde Kemige Farklılaştırılması" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"nin 7 (h) maddesi gereği, çalışmanın Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu iznine tabi olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

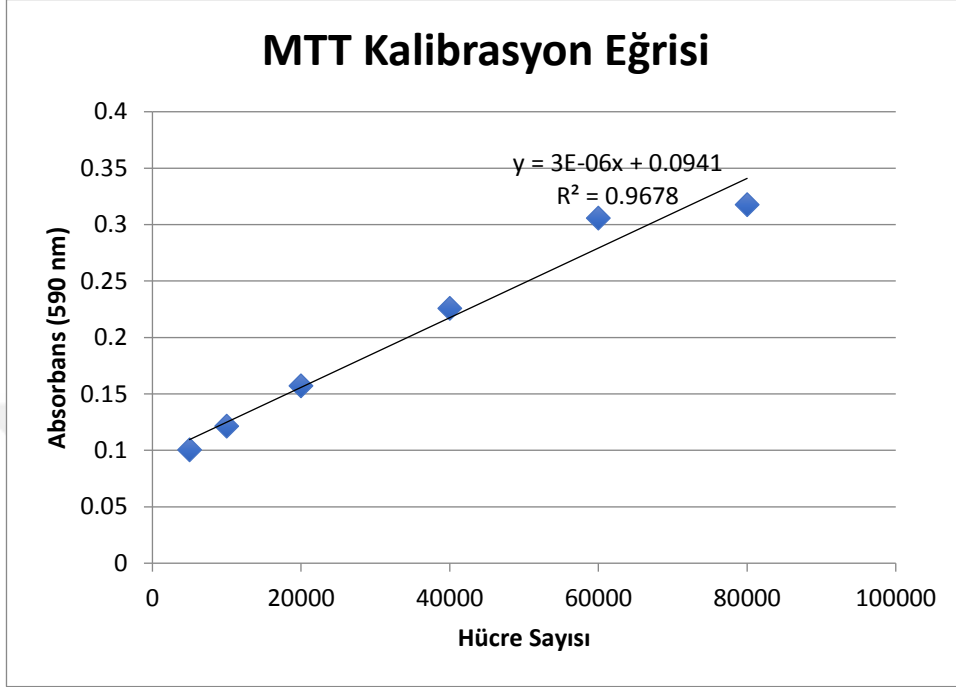
ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan/ANKARA Telefon : 0 (312) 212 60 40 / 2101 Faks : 0 (312) 212 60 49

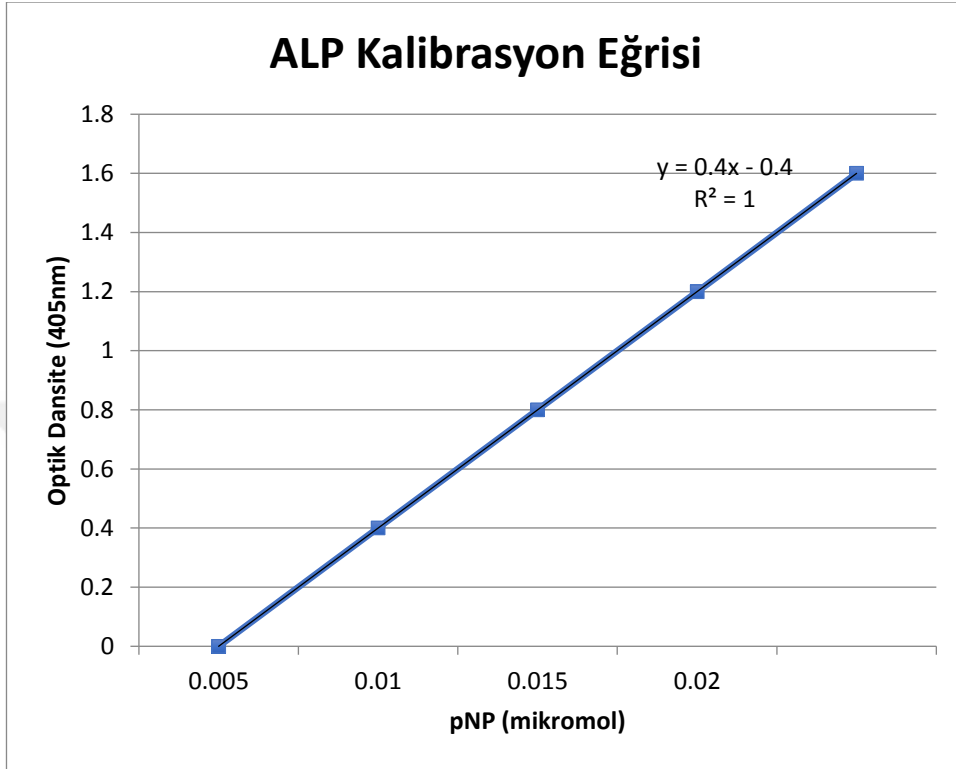
Ek-1. Devam

Yrd.Doç.Dr.Gölnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Uzm.Vet.Hek.Attıla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Dr. Vet.Hek.Gülbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E	
Uzm. Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	

Ek-2. MTT Kalibrasyon Eğrisi



Ek-3. ALP Kalibrasyon Eğrisi



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Özge ÖZGENÇ

Doğum Yeri ve Tarihi: SAMSUN/19.03.1990

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Bekâr

İletişim Adresi ve Telefonu: Baraj Mah. Selçuklu Cad. 17/3 Altındağ/ANKARA

+90 530 925 90 55

II- Eğitimi

2014-2019, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Histoloji-Embriyoloji (Doktora – Ankara)

2008-2014, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi (Lisans – Bursa)

2004-2008, Tülay Başaran Anadolu Lisesi (Lise – Samsun)

Yabancı Dili: İngilizce

III- Ünvanları

Veteriner Hekim 2014 - Halen devam etmekte

Araştırma Görevlisi 2014 - Halen devam etmekte

IV- Mesleki Deneyimi

Erasmus öğrenim hareketliliği kapsamında Slovenya, Nova Gorica Üniversitesi (17.12.2018-28.06.2019)

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı
Araştırma Görevlisi (2014 – Halen)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Histoloji-Embriyoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar

1. ÖZEN A, SANCAK İG, CEYLAN A, **ÖZGENÇ Ö** (2016). Isolation of adipose tissue-derived stem cells. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. **40(2)**: 137-141.
2. CEYLAN A, **ÖZGENÇ Ö**, ALTUNBAŞ K, KORKUSUZ P, ÖZEN A (2017). Ultrastructure of rat umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. **41(4)**: 464-470.
3. ÖZBEK M, ERGÜN E, BEYAZ F, ERGÜN L, **ÖZGENÇ Ö**, ERHAN F (2018). Prenatal development and histochemical characteristics of gastrointestinal mucins in sheep fetuses. *Microscopy research and technique*. **81(6)**: 630-648.
4. ÖZBEK M, HİTİT M, YILDIRIM N, **ÖZGENÇ Ö**, ERGÜN E, ERGÜN L, BEYAZ F, KURTDEDE N, ALTUNAY H (2018). Expression pattern of galectin-1 and galectin-3 in rat testes and epididymis during postnatal development. *Acta histochemica*. **120(8)**: 814-827.

Bildiriler

1. **ÖZGENÇ Ö**, CEYLAN A, BAYRAKTAROĞLU AG, ÖZEN A (2016). Göbek Kordonu Stromasından elde edilen mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu. Uluslararası Katılımlı XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 30 Nisan – 3 Mayıs 2016, İzmir – Türkiye. (Poster).
2. ÖZBEK M., ERGÜN E., CEYLAN A., BEYAZ F, ERGÜN L, YILDIRIM N, ERHAN F, **ÖZGENÇ Ö**. (2016). Postnatal Dönemdeki Sıçan Testis ve Epididimislerinde Hücre Proliferasyonu. Uluslararası Katılımlı XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 30 Nisan – 3 Mayıs 2016, İzmir – Türkiye. (Poster).
3. ÖZBEK M, ERGÜN E, BEYAZ F, CEYLAN A, ERGÜN L, YILDIRIM N, ERHAN F, **ÖZGENÇ Ö** (2016). The cell Proliferation in the terminal ileum of sheep fetuses during prenatal period. 1st International Congress on Advances in Veterinary Sciences & Technics Congress (ICAVST) (Poster).

4. CEYLAN A, **ÖZGENÇ Ö**, ALTUNBA, K, KORKUSUZ P, ÖZEN A (2017). An observation of fine structure of umbilical cord stroma derived mesenchymal stem cell. 2nd International Congress on Advances in Veterinary Sciences & Technics (ICAVST), Ekim 2017, Skopje. (Sözlü sunum).
5. CEYLAN A, **ÖZGENÇ Ö**, ERHAN F, SEVİN S, YARSAN E (2017). Histochemical Observations of Nosemosis in Honey Bee Midgut. 45th Apimondia International Congress. September 29th- October 4th, 2017, İstanbul (Poster).
6. ERHAN F, ÖZBEK M, CEYLAN A, ERGÜN E, BEYAZ F, ERGÜN L, YILDIRIM N, **ÖZGENÇ Ö** (2017): Apoptosis and cell proliferation during postnatal development of the testis in the rat. 2nd International Congress on Advances in Veterinary Sciences & Technics (ICAVST), Ekim 2017, Skopje. (Sözlü sunum).
7. ERGÜN E, ÖZBEK M, BEYAZ F, ERGÜN L, ALTUNAY H, KURTDEDE N, YILDIRIM N, **ÖZGENÇ Ö** (2017). Differences in Immunohistochemical Localization and Distribution of Galectin 1 and-3 in Rat Testes and Epididymis During Postnatal Development. International Congress of Histochemistry and Cytochemistry 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. (Sözlü Sunum).
8. ÖZBEK M, ERGÜN E, BEYAZ F, ERGÜN L, ERHAN F, YILDIRIM N, **ÖZGENÇ Ö** (2017). Expression of Toll like Receptors in rat testicular and epididymal tissues. 2nd International Congress on Advances in Veterinary Sciences Technics (ICAVST) (Sözlü Sunum).
9. ÖZBEK M, ERGÜN E, BEYAZ F, ERGÜN L, YILDIRIM N, **ÖZGENÇ Ö**, ERHAN F (2017). Expression of TLR2 in Sheep Ileum during Prenatal Development. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (Poster).
10. ÖZBEK M, ERGÜN E, BEYAZ F, ERGÜN L, YILDIRIM N, **ÖZGENÇ Ö**, ERHAN F (2017). Immunohistochemical investigation of TLR4 in rat testis and epididymis during postnatal development. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (Poster).
11. ÖZBEK M, ERGÜN E, BEYAZ F, ERGÜN L, YILDIRIM N, **ÖZGENÇ Ö**,

ERHAN F (2017). Exploration of protein expression by immunohistochemistry of Toll like receptor 2 (TLR 2) in rat testis and epididymis during postnatal development. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (Poster).

12. **ÖZGENÇ Ö**, CEYLAN A, ÖZEN A (2018). Osteogenic Differentiation of Canine Mesenchymal Stem Cells On β -TCP. 3rd International Congress on Advances in Veterinary Science and Technics (ICAVST), September 5-9, 2018 Belgrade, Serbia. (sözlü sunum).

13. **ÖZGENÇ Ö**, CEYLAN A, ERHAN F, BAYRAKTAROGLU AG (2018). Histochemical Characteristics of The Lacrimal Glands In Cattle. 3rd International Conference on Advances in Veterinary Sciences Technicsis (Sözlü Sunum).

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeler

1. Özen A., **Özgenç Ö**. Köpeklerde yağ doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin β -TCP ve β -TCP/kollajen içerikli biyomateryallerde kemiğe farklılaştırılması. Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, 05.07.2017- 26.09.2019.
2. Ergün, E., Ergün, L., Kurtdede, N., Beyaz, F., Özbek, M., Yıldırım, N., **Özgenç, Ö**. Postnatal Gelişim Dönemlerindeki Sıçanların Testis ve Epididimislerinde Galektin 1 ve -3'ün İmmunohistokimyasal Lokalizasyonları ve Dağılımındaki Farklılıklar, Ankara Üniversitesi BAP projesi, Araştırmacı, 01/06/2015- 23/12/2016.
3. Ergün, E., Özbek M., Beyaz F., Ergün L., Yıldırım N., **Özgenç Ö**. Erhan F. Toll Benzeri Reseptör 4'ün (TLR 4) postnatal gelişim dönemlerindeki sıçanların testis ve epididimisinde protein ekspresyonunun araştırılması. Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi, Araştırmacı, 01/09/2016- 07/11/2017.

Burslar

TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Programları- 2211-A Yurt İçi Doktora Burs Programı

Seminerler

Pineal Bez ve Melatonin – 2015.

