

**FARKLI HÜCRE TİPLERİNİN
FOTOBİYOMODÜLASYON VE ASKORBİK ASİT
VARLIĞINDA HÜCRE TABAKASI OLUŞTURMA
POTANSİYELLERİNİN İNCELENMESİ**

**EXAMINATION OF THE POTENTIAL OF DIFFERENT
CELL TYPES TO FORM CELL SHEET IN THE
PRESENCE OF ASCORBIC ACID AND
PHOTOBİOMODULATION**

HATİCE DEMİR

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

FARKLI HÜCRE TİPLERİNİN FOTOBİYOMODÜLASYON ve ASKORBİK ASİT VARLIĞINDA HÜCRE TABAKASI OLUŞTURMA POTANSİYELLERİNİN İNCELENMESİ

Hatice DEMİR

Yüksek lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Aralık 2021, 93 sayfa

Bu çalışma “Farklı hücre tiplerinin fotobiyomodülasyon ve askorbik asit varlığında hücre tabakası oluşturma potansiyellerinin incelenmesi” başlıklı Lisansüstü Tez Projesi (FYL-2020-18707) kapsamında Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında farklı morfolojik yapıları sahip hücrelerle polikromatik ışık kaynağı (600-1200 nm dalga boyunda) ve askorbik asit (vitamin C, VC) varlığında hücre tabakası elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla üç tür hücre seçilmiştir. Bu hücreler; insan göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücreleri (GK-MKH), insan dermal fibroblast hücreleri (BJ) ve insan keratinosit epitel hücreleri (HS2) dir. Çalışmanın ilk kısmında GK-MKH’lerin karakterizasyon çalışmaları tamamlanmış ve bu hücrelerden hücre tabakası elde edebilmek için kültür ortamına 20 µg/mL VC eklemesi yapılmıştır. Daha sonra bu hücreler için uygun olan fotobiyomodülasyon (PBMT) parametreleri belirlenerek (20 cm mesafe, 2 dk ve gün aşırı uygulama) hücre tabakaları üretilmiştir. Sonuçta VC grubunda 5-7. günler arası, PBMT ve PBMT+VC gruplarında 6-7. günler

arasında hücre tabakaları elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen bu hücre tabakalarına ait karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarında hücre tabakalarının hücre dışı matriks (ECM) yapısı, hücre morfolojisi, çekirdek yapısı ve farklı gen ifade düzeyleri incelenmiştir. Bu kapsamda yapılan immüno Floresan ve Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama sonuçları en yoğun çekirdek yapısının PBMT+VC grubuna ait olduğunu göstermektedir. Makroskobik ve mikroskobik gözlemler de en kalın ve opak hücre tabaka yapısının, PBMT+VC grubuna ait olduğunu göstermiştir. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analiz sonuçlarına göre VC ve PBMT varlığı ECM yapısını arttırmış, kök hücre gen ifadelerini anlamlı düzeyde etkilememiş, fakat PBMT osteojenik gen ifade düzeylerini (OCN, RUNX2) arttırmıştır. BJ fibroblast ve HS2 hücre hattı için de karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. BJ fibroblast hücre hattı ile hücre tabakası elde edebilmek için kültür ortamına 60 µg/mL vitamin C eklemesi yapılmış ve bu hücreler için uygun olan PBMT parametreleri belirlenerek (20 cm mesafe, 5 dk ve gün aşırı uygulama) hücre tabakaları üretilmiştir. Bu hücre hattı için PBMT grubunda hücre tabakası elde edilemezken, VC ve PBMT+VC grubunda 6-7. günlerde elde edilen hücre tabakaları arasında özellikler açısından anlamlı farklılıklar gözlemlenmemiştir. HS2 hücre hattı ile hücre tabakası elde edebilmek için kültür ortamına 20 µg/mL vitamin C eklemesi yapılmış ve bu hücreler için uygun olan PBMT parametreleri belirlenerek (20 cm mesafe, 5 dk ve gün aşırı uygulama) hücre tabakaları üretilmiştir. Bu hücre hattı için VC grubunda 8.gün ve PBMT+VC grubunda 8-9.gün günlerde hücre tabakası elde edilmiştir. Elde edilen hücre tabakaları arasında makroskobik ve mikroskobik incelemeler sonucu anlamlı farklılıklar gözlemlenmemiştir.

Sonuç olarak çalışılan 3 farklı hücre tipinde de vitamin C varlığında etkin bir şekilde hücre tabakaları elde edilebilmiştir. Polikromatik ışıkla yapılan fotobiyomodülasyon uygulamasının çalışılan koşullarda hücre proliferasyonunu artırıcı etkiye sahip olduğu, GK-MKH'ler ile HS2 hücrelerinde ise tek başına tabaka oluşumunu sağlayabildiği, ayrıca GK-MKH'lerde osteojenik farklılaşmada etkili olduğu görülmüştür. Elde edilen veriler klinik uygulamalar için umut vaat etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hücre Tabakaları, Dermal Fibroblast, Epitel Hücre, Mezenkimal Kök Hücreleri, Fotobiyomodülasyon, Askorbik Asit

ABSTRACT

EXAMINATION OF THE POTENTIAL OF DIFFERENT CELL TYPES TO FORM CELL SHEET IN THE PRESENCE OF ASCORBIC ACID and PHOTOBİOMODULATION

Hatice DEMİR

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

December 2021, 93 pages

This study was funded by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (BAP) graduate project entitled "Examination of the potential of different cell types to form cell sheet in the presence of ascorbic acid and photobiomodulation" (FYL-2020 18707).

In this study, it is aimed to investigate the formation of cell sheets in the presence of ascorbic acid and polychromatic light (600-1200 nm) with cells in different morphologies. For this purpose, three types of cells have been selected, human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (HUC-MSCs), human dermal fibroblast cells (BJ) and human keratinocyte epithelial cells (HS2). In the first part of the study, characterization studies of HUC-MSCs were performed. Then, in order to obtain a cell sheets from these cells, 20 µg/mL vitamin C (VC) was added to the culture medium, the

appropriate photobiomodulation (PBMT) parameters were determined and cell sheets were obtained at 5-7 days in VC group and 6-7 days in PBMT and PBMT+VC groups. In characterization studies, the extracellular matrix (ECM) structure, cell morphology, nucleus structure and different gene expression levels of cell sheets were examined. In this context, immunofluorescence and Hematoxylin-Eosin (H&E) staining results and macroscopic/microscopic observations showed that the thickest and opaque cell sheet was obtained in the PBMT+VC group. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) results showed that while VC and PBMT are causing to increase of ECM, they did not significantly affect stem cell gene expressions. However, PBMT upregulates osteogenic genes (OCN, RUNX2) expression levels. Hydroxyproline assays results were also regulated upwards in the presence of VC and PBMT. The similar studies were also carried out for BJ fibroblasts and HS2 cells. While no cell sheets were obtained in the PBMT group for the BJ fibroblast cell line, no significant differences were observed between the cell sheets obtained in the VC and PBMT+VC group on the 6th-7th days. RT-PCR and hydroxyproline assay results also supported that ECM increased in the presence of VC and PBMT. In the VC and PBMT+VC group for the HS2 cell line, the cell sheets were obtained in the 8th-9th days.

In conclusion, cell sheets could be obtained effectively in the presence of vitamin C for different cell types. Photobiomodulation with polychromatic light was found to have an increasing effect on cell proliferation at the studied conditions. Photobiomodulation provided sheet formation in HUC-MSCs and HS2 cells, and it was also effective in osteogenic differentiation in HUC-MSCs. The results are promising for clinical applications.

Keywords: Cell Sheets, Dermal Fibroblast, Epithelial Cell, Mesenchymal Stem Cells, Photobiomodulation, Ascorbic Acid

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesi sırasında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, başarı yolunda filizlenecek tohumları ekmemde büyük katkısı olan, engin bilgi ve tecrübesiyle yoluma hep ışık tutan sadece bilim insanlığı kişiliği ile değil aynı zamanda insani ve vicdani değerleriyle de her zaman örnek alacağım değerli hocam Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmama 119S133 no'lu proje kapsamında maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından FYL-2020-18707 numaralı projeye sağlanan maddi destekten dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve destek olan Araş. Gör. Ülkü Bozoğlu başta olmak üzere, Dr. Öğr. Üyesi Işıl Gerçek Beşkardeş'e, Öğr. Görevlisi Anıl Sera Çakmak'a, Ayfer Koyuncu'ya, Özge Ekin Akdere'ye, Araş. Gör. Elvan Konuk Tokat'a, Araş. Gör. Tülay Selin Ertekin'e, Araş. Gör. Demet Çakır'a, Sitem Merve Şahin 'e ve tüm hücre ve doku mühendisliği araştırma grubu üyesi arkadaşlarıma çok teşekkür eder, akademik hayatlarında başarılar dilerim.

Deneysel çalışmalarım için laboratuvar imkanlarını kullandığım değerli hocam Prof. Dr. Nurhayat Barlas'a ve ekibinde bulunan Dr. Arş. Gör. Seçil Karahisar ve Eda Nur İnkaya'ya yardımları ve desteklerinden ötürü yol gösterici ve içten davranışları için çok teşekkür ederim.

Son olarak tüm hayatım boyunca benim yanımda olan, aldığım kararları her zaman destekleyen, emeklerinin karşılığını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım annem Remziye Demir'e sadece bu çalışma sürecinde değil tüm hayatım boyunca beni cesaretlendiren ve moral veren canım babam Hanifi Demir'e, beni her zaman yapabileceklerimden daha fazlasına inandıran abim Hakan Demir'e ve biricik kızkardeşim, iyikim Rabia Demir'e tüm kalbi duygularıyla çok teşekkür ediyorum. İyi ki varsınız.

Hatice DEMİR

Aralık 2021, Ankara



İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Hücre Tabaka Mühendisliği	3
2.2 Hücre Tabakalarının Elde Edilmesinde Kullanılan Alternatif Yöntemler.....	5
2.3 Hücre Tabaka Teknolojisinin Doku Mühendisliğindeki Uygulamaları	7
2.3.1 Hücre tabaka tekniklerinin farklı hücrelerle uygulamaları.....	8
2.3.2 Hücre tabaka tekniklerinin mezenkimal kök hücrelerle uygulamaları.....	11
2.3.3 Doku onarımı için diğer kök hücre tabakaları ve uyarılmış pluripotent kök hücre tabakaları.....	12
2.4 Hücre Tabaka Teknolojisinde Avantajlar ve Sınırlamalar	14
2.5 Fotobiyomodülasyon Tedavisi	15
2.6 Fotobiyomodülasyon Mekanizmaları.....	15
2.7 Farklı Hücre Türleri Üzerinde Fotobiyomodülasyonun Etkisi	19
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	23
3.1 Tez Çalışması Kapsamında Kullanılan Deneysel Malzemeler	23
3.2 GK-MKH'lerin Karakterizasyon Çalışmaları	26
3.3 Fotobiyomodülasyonda Kullanılan Işık Kaynağının Özelliği ve Uygulama Yöntemi	27
3.3.1 GK-MKH'ler ile Fotobiyomodülasyon Çalışma Koşullarının Belirlenmesine Yönelik Ön Çalışmalar.....	29
3.4 GK-MKH'lere Ait Hücre Tabakalarının Üretimi ve Karakterizasyon Çalışmaları	31
3.4.1 Hücre Tabakalarının Elde Edilmesi	31

3.4.2	Hücre Tabakalarının Karakterizasyon Çalışmaları.....	31
3.4.2.1	İmmünofloresan Boyama	31
3.4.2.2	İmmünohistokimya.....	32
3.4.2.3	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi	32
3.4.2.4	Hidroksiprolin Analizi.....	35
3.4.2.5	Osteojenik Farklılaşmanın Belirlenmesi	35
3.4.2.6	Hemotoksilen&Eozin (H&E) Boyama.....	36
3.5	BJ Fibroblast Hücre Hattının Karakterizasyon Çalışmaları	37
3.6	BJ Fibroblast Hücre Hattı ile Hücre Tabakası Üretimi	38
3.7	BJ Fibroblast Hücre Tabakalarının Karakterizasyon Çalışmaları	38
3.8	HS2 Keratinosit Hücre Hattının Karakterizasyon Çalışmaları.....	39
3.9	HS2 Hücre Hattı ile Hücre Tabakası Üretimi.....	39
3.10	HS2 Hücre Tabakalarının Karakterizasyon Çalışmaları.....	39
3.11	İstatistiksel Analiz	40
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	41
4.1	GK-MKH'lerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	41
4.2	Fotobiyomodülasyon Parametrelerinin Optimizasyon Çalışmaları.....	45
4.3	GK-MKH Tabakalarının Üretimi	47
4.4	GK-MKH Tabakalarının Karakterizasyonu	50
4.4.1	İmmünofloresan Boyama	50
4.4.2	İmmünohistokimyasal İnceleme	51
4.4.3	Hematoksilen/Eozin Boyama	52
4.4.4	RT-PCR Analizi	53
4.4.5	Hidroksiprolin Analizi	55
4.4.6	Osteojenik Farklılaşma.....	57
4.5	BJ Dermal Fibroblast Hücrelerin Karakterizasyon Çalışmaları	59
4.6	BJ Fibroblast Hücre Hattı ile Hücre Tabakalarının Üretimi.....	61
4.7	BJ Fibroblast Hücre Tabakalarının Karakterizasyonu.....	63
4.7.1	İmmünofloresan Boyama	63
4.7.2	İmmünohistokimya	64
4.7.3	Hematoksilen/Eozin Boyama	66
4.7.4	RT-PCR Analizi	66
4.7.5	Hidroksiprolin Analizi	67

4.8	HS2 İnsan Keratinosit Hücrelerinin Karakterizasyon Çalışması	68
4.9	HS2 Hücre Hattı ile Hücre Tabakalarının Üretimi.....	70
4.10	HS2 Keratinosit Hücre Tabakalarının Karakterizasyonu.....	71
4.10.1	İmmünofloresan Boyama	71
4.10.2	İmmünohistokimya	72
4.10.3	RT-PCR Analizi.....	74
4.10.4	Hidroksiprolin Analizi	75
5.	GENEL SONUÇLAR	77
6.	KAYNAKLAR.....	81
	EKLER.....	91
	EK 1- Tez Çalışması Orjinallik Raporu	91
	ÖZGEÇMİŞ	92

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Sıcaklık duyarlı polimerik kültür kaplarının elde edilmesi.	4
Şekil 2.2	Sıcaklık-duyarlı hücre tabaka tekniği (A) ile klasik hücre yüzeyden kaldırma yönteminin (B) karşılaştırması	5
Şekil 2.3	Farklı hücre tabaka türlerinin doku mühendisliği uygulamaları	7
Şekil 2.4	Düşük seviyeli ışık tedavisinin (LLTT) hücre içi etki mekanizmaları.	19
Şekil 3.1	Tez kapsamında kullanılan ışık kaynağının görüntüleri: (a) genel görüntüsü. (b) uygulama sırasında çekilmiş fotoğrafı.	28
Şekil 3.2	Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşma kapasitesinin belirlenebilmesi için yapılan deneysel çalışmanın şematik gösterimi.	36
Şekil 4.1	GK-MKH'lere ait flow sitometri analiz sonuçları	42
Şekil 4.2	Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin invert mikroskop [a (1.gün) ve b (7.gün), 20x], kristal viyole boyama [c (3.gün) ve d (7.gün) ,20x], F aktin (yeşil), DAPI (mavi) boyama görüntüleri [e (1.gün) ve f (7.gün), 20x].	43
Şekil 4.3	Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelere ait (3. pasaj) a) Hücre sayısı-zaman grafiği, b) ln(x)-zaman grafiği, c) MTT-zaman grafiği, d) SDS'li kristal viyole-zaman grafiği.....	44
Şekil 4.4	Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin kontrol, VC ve ışık uygulamasının üç farklı koşulda (15 cm 3 dk, 20 cm 1 dk ve 20 cm 3 dk) uygulandığı gruplara ait MTT-zaman grafiği sonuçları.....	46
Şekil 4.5	Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin, kontrol, vitamin C ve ışık uygulanan (20 cm,2 dk) gruplarına ait 1.ve 5. günkü morfolojik görüntüleri (10x).....	47
Şekil 4.6	Vitamin C, PBMT ve PBMT+VC gruplarına ait hücrelerin kaldırma öncesi (10x, bar 200 µm) ve kaldırma sonrası (4x, bar 500 µm) invert mikroskop ve makroskobik görüntüleri.	49
Şekil 4.7	Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelere ait immünofloresan boyama görüntüleri (10x, bar 200µm).	50
Şekil 4.8	Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelere ait immünohistokimya boyamaları (20x). Kollajen ve integrin boyama için sekonder	

	antikor Alexa Fluor® 555 (kırmızı) ve fibronectin boyama için Alexa Fluor® 488 Konjugate (yeşil) kullanılmıştır.	52
Şekil 4.9	Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin yatay kesitlerine ait H&E boyamaları: 40x, bar 50µm (Siyah oklar hücrelere ait çekirdek yapılarını göstermektedir.)	53
Şekil 4.10	Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin çalışılan tüm genlerine ait RT-PCR sonuçları. İstatistiksel olarak önemli farklılıklar sembollerle gösterilmiştir; n = 5,.....	55
Şekil 4.11	Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin hidroksiprolin analizlerinin sonuçları. İstatistiksel olarak önemli farklılıklar sembollerle gösterilir; n = 3; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$	56
Şekil 4.12	a) Hücre tabakalarından izole edilen GK-MKH'lerin Alizarin kırmızısı analizinin faz kontrast mikroskop görüntüleri (20x, bar 100µm). b) Tüm gruplardan alınan boyanın ortalama absorbansının grafik gösterimi. Kontrol grubu proliferasyon ortamı (Kontrol PM); Kontrol grubu osteojenik ortam (kontrol OM); VC grubu proliferasyon ortamı (VC, PM); VC grubu osteojenik ortam (VC, OM), PBMT grubu proliferasyon ortamı (PBMT, PO) ve PBMT grubu osteojenik ortam (PBMT, OM).	58
Şekil 4.13	BJ dermal fibroblast hücre hattına ait invert mikroskop [a (3.gün) ve b (10.gün), 20x], Kristal viyole boyama görüntüleri [c (3.gün) ve d (10.gün) ,20x], F aktin (yeşil), DAPI (mavi) boyama görüntüleri [e (1.gün) ve f (10.gün) ,20x].	60
Şekil 4.14	BJ dermal fibroblast hücrelerin 14. pasajdaki a) hemositometrik sayım sonucu grafiği, b) hücrelerin ikilenme süresinin belirlenmesine yönelik lnx-zaman grafiği, c) MTT analizi sonucu elde edilen hücre üreme grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, aynı günde farklı gruplar için * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).....	61
Şekil 4.15	BJ dermal fibroblast hücre hattı ile elde edilen hücre tabakalarının kaldırma öncesine (a, c), kaldırma sonrasına (b, d) ait invert mikroskop ve makroskobik (e, f) görüntüleri. (20x, bar 100 µm ve 4x, bar 500 µm).	62

Şekil 4.16	BJ dermal fibroblast hücre hattına ait immüno Floresan görüntüler (bar 100 µm, 20x).....	63
Şekil 4.17	BJ insan dermal fibroblast hücrelerine ait immünohistokimya boyamaları (bar 100µm, 20x). Kollajen boyama için sekonder antikor Alexa Fluor® 555 (kırmızı) ve fibronektin boyama için Alexa Fluor® 488 Konjugate (yeşil) kullanılmıştır.	65
Şekil 4.18	BJ fibroblast hücrelerine ait H&E boyamaları: VC grubu dikey (a) ve yatay (b) kesitleri, PBMT+VC grubu yatay (c) kesitleri göstermektedir. 40x, bar 50 µm (Siyah oklar hücrelere ait çekirdek yapılarını göstermektedir).	66
Şekil 4.19	BJ dermal fibroblast hücreleri ile çalışılan tüm genlerine ait RT-PCR sonuçları. İstatistiksel olarak önemli farklılıklar sembollerle gösterilmiştir; n = 5; *p < 0.05, **p < 0.01 ve ***p < 0.001. VC, PBMT ve PBMT+VC grupları kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.	67
Şekil 4.20	BJ fibroblast hücrelerine ait hidroksiprolin analizi sonuçları. İstatistiksel olarak önemli farklılıklar sembollerle gösterilir; n = 3; *p < 0.05, **p < 0.01 ve ***p < 0.001.	68
Şekil 4.21	HS2 insan keratinosit hücre hattına ait invert mikroskop [a (3.gün) ve b (8.gün), 20x], F aktin (yeşil), DAPI (mavi) boyama görüntüleri [c (3.gün) ve d (8.gün) ,20x], Kristal viyole boyama görüntüleri [e (3.gün) ve f (8.gün) ,20x].	69
Şekil 4.22	HS2 insan keratinosit hücre hattına ait (24.pasaj) a) hemositometrik sayım sonucu elde edilen hücre sayısı zaman grafiği, b) lnx-zaman grafiği c) MTT analizi sonucu elde edilen hücre üreme grafiği.	70
Şekil 4.23	HS2 keratinosit hücre hattı ile elde edilen hücre tabakalarının kaldırma öncesine (a, c), kaldırma sonrasına (b, d) ait invert mikroskop ve makroskopik (e, f) görüntüleri. (4x, bar 500 µm).	71
Şekil 4.24	HS2 keratinosit hücre hattına ait immüno Floresan görüntüler (bar 100 µm, 20x).	72
Şekil 4.25	HS2 hücrelerine ait immünohistokimya boyamaları (bar 100µm, 20x). İntegrin boyama için sekonder antikor Alexa Fluor® 555	

(kırmızı) ve fibronektin boyama için Alexa Fluor® 488 Konjugate (yeşil) kullanılmıştır.....	73
Şekil 4.26 HS2 hücreleri ile çalışılan tüm genlerine ait RT-PCR sonuçları. İstatistiksel olarak önemli farklılıklar sembollerle gösterilmiştir; n = 5. *p < 0.05, **p < 0.01 ve ***p < 0.001. VC, PBMT ve PBMT+VC grupları kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.	74
Şekil 4.27 HS2 hücrelerine ait hidroksiprolin analizi sonuçları. İstatistiksel olarak önemli farklılıklar sembollerle gösterilir; n = 3. *p < 0.05, **p < 0.01 ve ***p < 0.001.....	75



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Deneysel çalışmalar sırasında gerçekleştirilen çalışmaların özetini	25
Çizelge 3.2 Fotobiyomodülasyon Koşullarının Belirlenmesine Yönelik Ön Çalışmalar.....	30
Çizelge 3.3 PBS Sıcaklığı Arttırıldıktan Sonraki Elde Edilen Veriler	30
Çizelge 3.4 RT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri.....	34
Çizelge 5.1 Elde edilen hücre tabakalarına ait veriler	78



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Ca ⁺²	Kalsiyum
HCl	Hidroklorik Asit
v/v	Hacim/Hacim Oranı
w/v	Kütle/Hacim Oranı
μ	Özgöl Üreme Hızı
t	Zaman
W	Watt
J	Joule

Kısaltmalar

AA	Askorbik Asit
ALP	Alkalın fosfataz
ATP	Adenozin Trifosfat
COL1A1	Kollajen Tip I Alfa I
COL3A1	Kollajen Tip 3 Alfa I
CX43	Konneksin 43
cDNA	Komplementer DNA
Cq	Kantifikasyon Döngüsü
DAPI	Diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

ECM	Ekstraselüler Matris
FBS	Fetal sığır serumu
GK-MKH	Göbek kordonu mezenkimal kök hücre
H&E	Hematoksilen & Eozin
HS2	İnsan keratinosit hücre hattı
LED	Işık Yayan Diyot
LLLT	Düşük Seviyeli Lazer Terapisi
mRNA	Haberci Ribonükleik Asit
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolyum bromür
OCN	Osteokalsin
OCT-4	Oktamer Bağlanan Protein 4
OPN	Osteopontin
PAC	Plazma Ark
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PBMT	Fotobiyomodülasyon uygulaması
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
SOX2	Cinsiyet Belirleyici Bölge 2
VC	Vitamin C

1. GİRİŞ

Rejeneratif tıbbın temel amacı, insan vücudunun çeşitli doku ve organlarının nasıl onarılacağını, iyileştirileceğini veya yenilenebileceğini belirlemektir. Başarılı doku rejenerasyonunu tetiklemek için doğal veya sentetik malzemelerden yararlanılır, ancak doğal malzemeler için olası konak inflamatuvar reaksiyonları, sentetik malzemeler için ise sınırlı biyoaktivite ve biyouyumluluk gibi dezavantajlar söz konusudur. Ayrıca yetersiz hücre göçü ve uzun bozunma süreçleri, son yirmi yılda araştırmacıları bu yöntemlere alternatif olarak geliştirilen ve "Hücre tabaka mühendisliği" adı verilen, iskelesiz doku mühendisliği yaklaşımına yöneltmiştir. 1990'lı yılların başlarında ilk defa Okano ve grubu tarafından geliştirilen hücre tabaka teknolojisi, doku mühendisliğinin "bottom-up" yaklaşımlarından biridir. Bu yaklaşımda hücre kültür kapları sıcaklık duyarlı bir polimer olan poli N-izopropilakrilamid (PIPAAm) ve kopolimerleri ile kaplanmaktadır. Bu polimer ve kopolimerleri düşük kritik çözelti sıcaklığının (lower critical solution temperature-LCST) üstündeki sıcaklıklarda hidrofobik özellik göstermektedir ve hücreler 37°C sıcaklıkta kültür kabının yüzeyine tutunabilmektedirler. Bu sıcaklığın altındaki sıcaklıklarda ise polimerik yüzey hidrofilik özellik kazanmakta ve polimer zincirlerinin şişmesi sonucu oluşan mekanik etkiyle hücreler tabaka halinde yüzeyden kalkmaktadır. Sıcaklık duyarlı yüzeylerin kullanıldığı bu yöntemde, proteolitik enzimlerin kullanımına gerek kalmaksızın hücreler yüzeyden kaldırılabilir. Ayrıca yüzeyden kalkan bu tabakaların hücre-hücre bağlantıları, ECM yapısı ve hücre-ECM bağlantıları korunmaktadır. Hücrenin bazal bölgesinde korunan yoğun ECM yapısı tabakanın yeni bir kültür kabı yüzeyine, başka bir hücre tabakası üzerine, biyomalzeme yüzeylerine ya da doğrudan canlı doku üzerine etkili bir şekilde yapışmasını sağlamaktadır. Hücre tabaka mühendisliği kornea, karaciğer, periodonsiyum, kalp ve akciğer gibi farklı doku ve organların rejenerasyonunun sağlanmasında kullanılmaktadır [1]. Hücre tabakalarının elde edilmesinde sıcaklık duyarlı kapların kullanımının dışında alternatif yöntemler de geliştirilmiştir. Bunlar: manyetik katyonik lipozomlar (magnetite cationic liposomes-MCLs) ve polielektrolitlerin kullanımı, kültür kaplarının sıcaklık duyarlı hidrojeller ve laminin-5 ile kaplanması olarak sıralanabilir. Sıcaklık duyarlı kaplar ve yukarıda bahsi geçen metotlar uygulanması zor olan, zaman ve malzeme tüketimi açısından da verimli olmayan yöntemlerdir. Bu nedenle hücre tabakalarının elde edilmesi için literatürde basit, kolay uygulanabilir ve maliyeti çok yüksek olmayan yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında hücre ortamlarına deksametazon ve L-askorbik asit (Vitamin C)

eklenmesi, yüksek hücre ekim yoğunluğu ve hücre kültür ortamlarının yüksek serum içermesi örnek olarak verilebilir [2-4]. Suda çözünebilen bir vitamin türü olan vitamin C insan sağlığı için önemli bir bileşendir. Vitamin C, kollajen ve diğer ECM bileşenlerinin biyosentezinde önemli rol almaktadır ve insan vücudundaki birçok biyolojik reaksiyonda kofaktör olarak görev yapmaktadır. Kimyasal adı Askorbik asit olan vitamin C antioksidan olarak görev yapmakta, böylelikle hücre dışı reaktif oksidanları nötralize etmekte ve serbest radikal hasarlarına karşı hücre membranını korumaktadır. Ayrıca hücre çoğalmasını ve DNA sentezini artırıcı rol oynamaktadır. Birçok çalışmada askorbik asitin ECM üretimi, hücre çoğalması ve farklılaşması üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Vitamin C uyarımıyla hücre tabakası eldesi sırasında COL1, integrin β 1 ve fibronektin gibi ECM elemanlarının üretildiği ve bu süreç boyunca korunduğu gösterilmiştir [4-6]. Yukarıda sıralanan tüm özellikler kültür ortamlarına vitamin C'nin eklenmesinin hücre tabakalarının elde edilmesinde etkili ve diğer yöntemlere kıyasla daha kolay bir yöntem olduğunu ortaya koymaktadır [7].

Fotobiyomodülasyon tedavisinin hücre canlılığı, çoğalması, göçü ve farklılaşmasını sağlayarak doku rejenerasyonu üzerinde önemli etkinliğinin olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Ayrıca bu uygulamanın ECM elemanlarının sentezinin artmasında da önemli etkiye sahip olabileceği belirtilmiştir [8,9]. Hücre tabakalarının elde edilmesinde ECM elemanlarının sentezinin artması önemlidir. Kültür kaplarındaki hücrelerin artan ECM miktarları ile korunan hücre-hücre bağlantıları hücrelerin yüzeyden kalkmasına etki eden önemli bir faktördür.

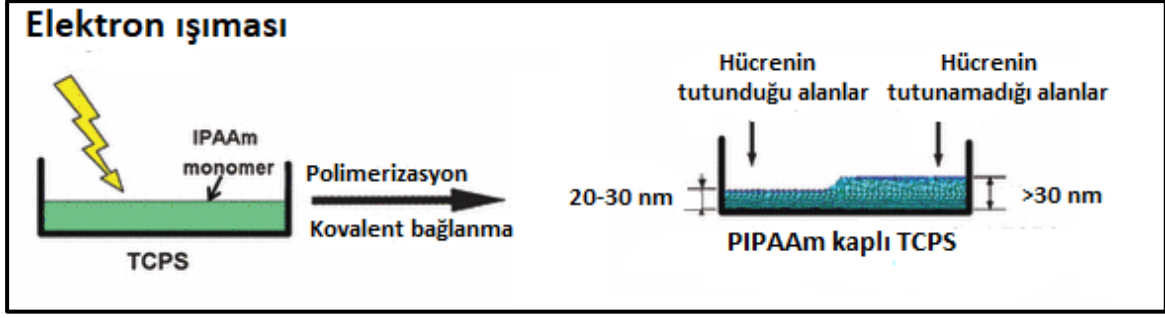
Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında 3 farklı hücrenin (göbek kordonu mezenkimal kök hücresi, GKM-KH, insan dermal fibroblast hücre hattı, BJ ve epitel morfolojiye sahip insan keratinosit hücre hattı, HS2) vitamin C ve ışığın (600-1200 nm dalga boyu aralığında polikromatik ışık) ayrı ayrı ve birlikte kullanıldığı koşullarda hücre tabakası oluşturma potansiyelleri araştırılmıştır. Bu amaçla ilk olarak tüm hücrelerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ardından hücrelerin fotobiyomodülasyon ve vitamin C varlığında hücre tabakası oluşturma koşulları belirlenmiştir. Elde edilen hücre tabakaları görünüm, fiziksel yapı, ECM proteinleri ve hidroksiprolin miktarı açısından değerlendirilerek hücre özelliklerinin ve yapılan uygulamaların (Vitamin C ve ışık uygulaması) hücre tabakalarının oluşumuna etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, gerçekleştirilen tez çalışmasının konusu hakkında genel bir literatür bilgisine yer verilmiştir. Literatür bilgisi genel olarak iki kısımda ele alınmıştır. İlk kısımda hücre tabaka mühendisliği hakkında bilgi verilmiştir. Daha sonra hücre tabakalarının elde edilmesinde kullanılan alternatif metotlardan, doku mühendisliğindeki uygulamalarından ve bu uygulamaların avantaj ve dezavantajlarından bahsedilmiştir. İkinci kısımda ise fotobiyomodülasyon tedavisinden, kullanılan ışık kaynağının özelliklerinden ve uygulama yönteminden bahsedilerek farklı hücreler üzerindeki etkileri ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

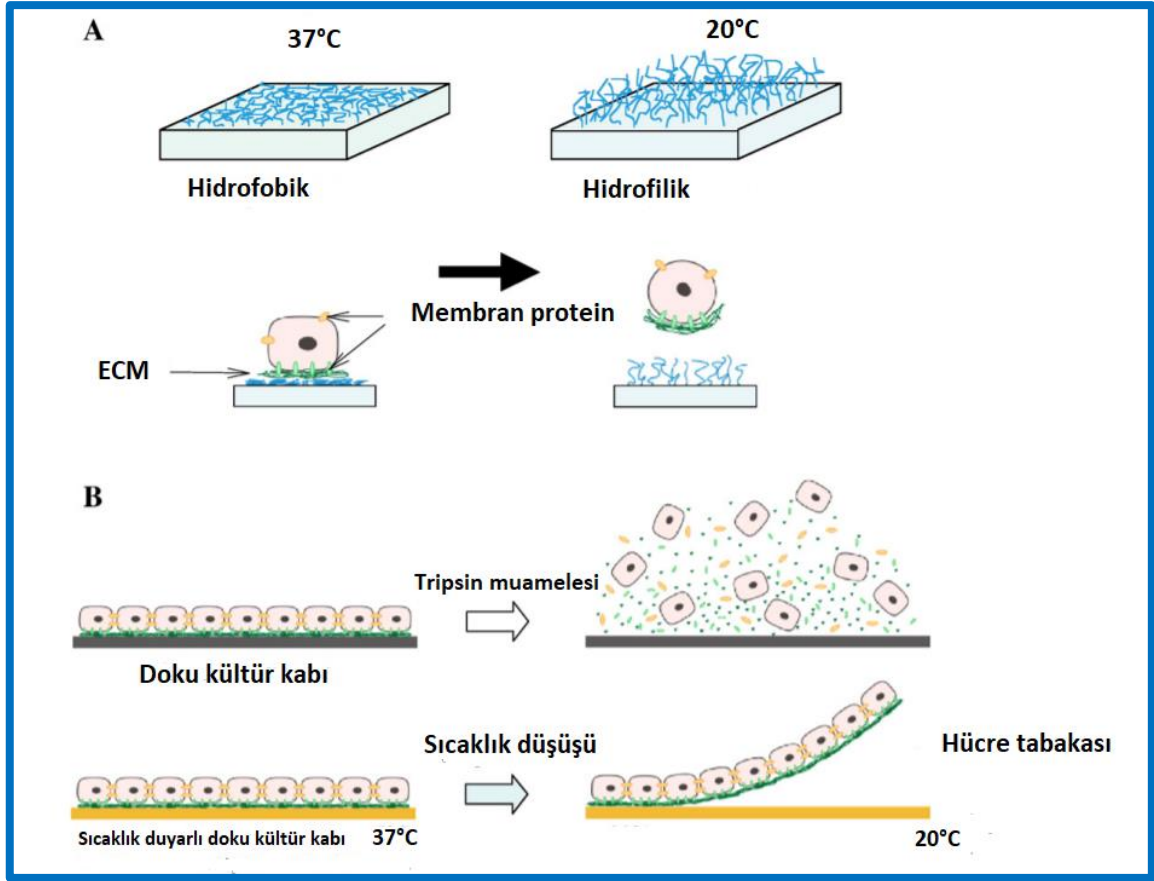
2.1 Hücre Tabaka Mühendisliği

1990'lı yılların başlarında ilk defa Okano ve grubu tarafından geliştirilen hücre tabaka teknolojisi, hasarlı doku hücrelerinin yenilenmesine yönelik iskelesiz bir yaklaşımdır [10]. Bu teknoloji ile çeşitli doku mühendisliği uygulamaları yaygın bir şekilde araştırılmaktadır. Hücre tabakalarının eldesinde sıcaklık duyarlı kültür kapları kullanılmaktadır. Hücreler, yüzeyi poli (N-izopropilakrilamid) (PIPAAm) ile kaplı bu kültür kaplarında tripsin, kollajenaz ve dispaz gibi proteolitik enzimlerin kullanımına gerek kalmadan hücre-hücre bağlantıları ve ekstraselüler matriks (ECM) yapısı korunarak tabaka halinde yüzeyden ayrılmaktadır. PIPAAm, hücre kültürü yüzeylerine entegre edildiğinde değişen sıcaklıkla şişme/büzüşme davranışı gösterir ve sıcaklığa duyarlı tersinir özellikleri nedeniyle hücrelerin işlevlerinin korunmasına olanak sağlar [10]. Sıcaklığa duyarlı kültür kapları birkaç farklı şekilde hazırlanabilir, ancak en yaygın olanı N-izopropilakrilamid (IPAAm) monomerinin bir kültür kabına eklenmesi ve elektron ışını (EB) ile polimerleştirilmesidir [11,12]. PIPAAm kaplamanın 20-30 nm kalınlığında olması istenir, 30 nm'den büyük değerler hücre yapışmasını engeller (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Sıcaklık duyarlı polimerik kültür kaplarının elde edilmesi [13].

PIPAAm'ın farklı sıcaklıklara maruz kaldığında hidrofobik ve hidrofilik nitelikleri, bu polimeri bir kültür yüzeyine kaplamak için uygun kılmaktadır. PIPAAm düşük kritik çözelti sıcaklığı olan 32°C üzerindeki sıcaklıklarda hidrofobiktir ve hücrelerin yüzeye tutunabilmeleri için uygundur, ancak düşük kritik çözelti sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda hidrofiliktir [10]. Hücreler 37°C 'de kolayca yüzeye tutunabilme ve çoğalabilme yeteneğine sahip olduklarından bu sıcaklıkta kültür kabına ekilir ve kültürlenirler [11]. Hücreler çoğalıp kültür kabının yüzeyini tamamen kapladığında sıcaklık 20°C 'ye düşürülerek PIPAAm kaplamanın hidrofilik hale geçmesi ve polimer zincirlerinin aralarına su moleküllerini alarak genişlemiş bir polimer tabakası oluştururlar [13]. Genişleme sırasında oluşan mekanik etkiyle hücrelerin tabaka halinde kültür kabının yüzeyinden zarar görmeden ayrılmasını sağlar [10]. Sonuçta tripsin, kollajenaz ve dispaz gibi proteolitik enzimlerin kullanımına gerek kalmadan hücre-hücre bağlantıları ve ECM yapısı korunarak hücre tabakaları elde edilir. Ayrıca hücrelere ait büyüme faktörleri, iyon kanalları ve reseptörleri de korunarak yüzeyden bir bütün halinde kaldırılmış olur. Şekil 2.2 sıcaklık duyarlı hücre kültür kapları ile geleneksel yöntem arasındaki farkı göstermektedir.



Şekil 2.1 Sıcaklık-duyarlı hücre tabaka tekniği (A) ile klasik hücre yüzeyden kaldırma yönteminin (B) karşılaştırması [14].

2.2 Hücre Tabakalarının Elde Edilmesinde Kullanılan Alternatif Yöntemler

Hücre tabakalarının elde edilmesinde pek çok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları; yüzey altın kaplama, fibrin matriks kaplama, manyetik nanopartiküller ve kültür ortamına vitamin C eklemesidir. Altın kaplı yüzeylerde altın-tiolat bağlarının oluşumu, hücre tabaka elde edilmesinde etken olarak rapor edilmiştir [15,16]. Arg-Gly-Asp peptitlerinin alkanetiyol moleküllerine kovalent bağlanmasıyla elektro-duyarlı bir hücre tabaka ayırma sistemi geliştirilmiş ve bu hücre tabakasının ayrılmasında, elektrik stimülasyonu kullanılarak altın yüzeyinden peptitlerin salımı gerçekleştirilmiştir. Bu yüzey modifikasyonu ile fibroblast hücre tabakalarının yüzeye 10 dakikalık -1.0 V elektrik potansiyeli uygulanma sonucunda hızlı bir şekilde yüzeyden kalktığı görülmüştür [17]. Itabashi ve arkadaşları [18], trombin ile karıştırılmış fibrinojen monomerleri ile hazırlanan polimerize fibrin kaplı kültür kapları üzerinde sıçan kardiyomiyositlerini kültürlemişlerdir. Fibrin, intrinsik proteaz tarafından sindirildiği için, hücre tabakası, polimerize fibrin tabakasından kolayca ayrılabilir. Bu şekilde kültürlenmiş kardiyomiyositler ile 4 gün içinde bir miyokardiyal hücre tabakası oluşturulmuştur.

Manyetik olarak etiketlenmiş hücrelerin mıknatıslarla toplanabildiği ve biyouyumluluk gösterdiği bilinmektedir. Hücre tabakalarının elde edilmesinde, manyetik olarak etiketlenmiş hücreler, ultra düşük tutunma sağlayacak yüzeylere ekilir ve yüzeyin altına bir mıknatıs yerleştirilir. Hücrelerin belirli bir süre kültürlenmesinden sonra, mıknatıs çıkarılarak hücre tabakasının yüzeyden ayrılması sağlanır. Bu dış kuvvet sayesinde kültür yüzeyinde oluşan hücre tabakasının kalınlığı, ekilmiş hücre sayısı değiştirilerek istenilen değerlere ayarlanabilir. Hücre tabakalarının elde edilmesi 3B dokuların üretilmesi açısından önemlidir, bu nedenle, oluşturulan hücre tabakalarının kalınlığını kontrol etme yeteneği, bu yöntemin avantajı olarak gösterilmektedir.

Sunulan tez çalışmasında kullanılan yöntem olması nedeniyle aşağıda vitamin C ile hücre tabaka elde edilmesine ayrıntılı yer verilmiştir.

Vitamin C uygulaması

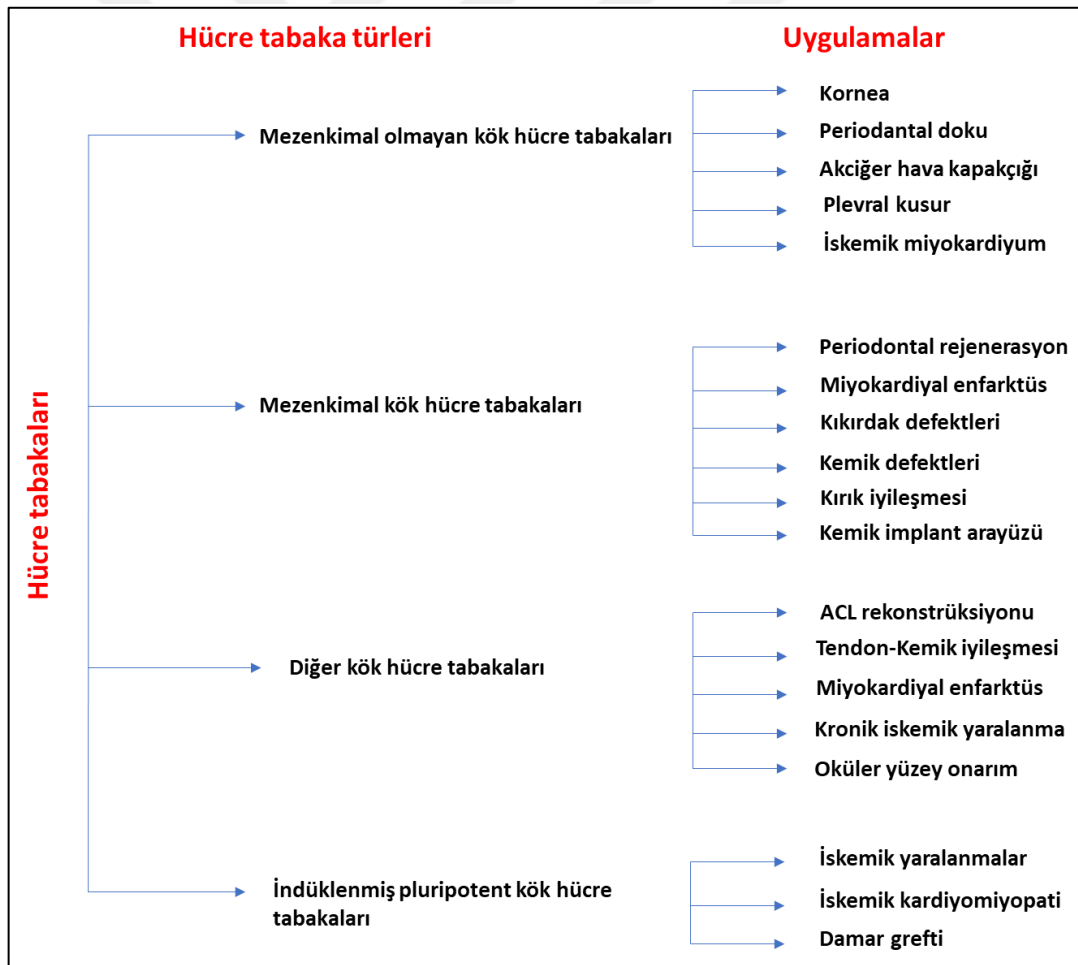
Kimyasal adı askorbik asit olan vitamin C insan vücudunun üretemediği suda çözünebilir temel antioksidanlardan biridir. Vitamin C nin kapsamlı bir şekilde incelenmesinin ana sebeplerinden biri insan vücudunda en bol protein olan ve hücre dışı matrisin bileşimi, yapısı ve biyomekanik özellikleri üzerinde güçlü bir etkiye sahip olan kollajen proteinlerinin uygun şekilde katlanması ve birikmesi için önemli bir rol oynamasından kaynaklanmaktadır. Askorbik asitin diğer bir önemli görevi ise, prokollajen içindeki lizin ve prolin aminoasitlerinin hidroksilasyonunu sağlamasıdır. Bu kimyasal reaksiyon gerçekleşmezse, prokollajen çapraz-bağlar yaparak normal kollajen fibrilini oluşturamaz. Bu nedenle, askorbik asit bağ dokusu oluşumu ve yaraların iyileşmesinde önemli bir rol oynar. Bu özellikleri sayesinde hücre tabaka mühendisliğinde kullanılmaktadır. Bu anlamda gerçekleştirilen ilk çalışma L'Heureux ve ark., insan fibroblast ve düz kas hücrelerini kullanarak vitamin C eklenen kültür ortamından hücre tabakası elde edilmesiyle gerçekleşmiştir [19]. Kültür ortamına vitamin C eklenmesinin bu hücrelerin hücre dışı matriks yapısını arttırdığı ve böylelikle hücrelerin yüzeyden bir bütün olarak kaldırılabilirdiği rapor edilmiştir. Naughton ve ark., [20] tarafından yapılan çalışmada 3B fibroblast kültürü oluştururken kültür ortamına ekledikleri vitamin C' nin lizin ve prolin amino asidinin hidroksilasyonunu sağlayarak mRNA ve kollajen sentezini arttırdığını belirtmişlerdir. Wei ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada [21] ise, çeşitli konsantrasyonlarda vitamin C ile periodontal ligament kök hücreleri kültür edilmiştir. Vitamin C, hücre matriksi üretimini artırabildiğinden, hücrelerin vitamin C'nin 20 ug/mL'den büyük olduğu konsantrasyonlarda hücre tabakası yapılarını oluşturduğu rapor

edilmiştir. Ancak, daha düşük konsantrasyonlarda (0.0, 5.0 veya 10.0 µg/ml) tabaka oluşumunun olmadığı bildirilmiştir.

2.3 Hücre Tabaka Teknolojisinin Doku Mühendisliğindeki Uygulamaları

Doku ve organ rekonstrüksiyonu için hücre tabakası hazırlama yöntemleri, tek hücre tabakası implantasyonunu, iskele implantasyonu ile birleştirilmiş hücre tabakalarını ve çok katmanlı hücre tabakası implantasyonunu içerir. Tek hücreli tabaka implantasyonu kornea epiteli [23-25], periodontal bağ [26,27] ve deri [29] dokusunu onarmak için kullanılmıştır. İskelelerle birleştirilmiş hücre tabakaları, kemik ve kırıkta oluşturmak için kullanılmıştır. Çok katmanlı hücre tabakası implantasyonu esas olarak miyokard, düz kas, karaciğer ve diğer 3B dokular için kullanılmıştır.

Şekil 2.3'te hücre tabakalarının türleri ve kullanıldıkları doku mühendisliği uygulamaları şematize edilmiştir.



Şekil 2.2 Farklı hücre tabaka türlerinin doku mühendisliği uygulamaları

2.3.1 Hücre tabaka tekniklerinin farklı hücrelerle uygulamaları

Kornea onarımı

Kornea nakli klinik kornea onarımı için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, transplantasyon reddinin komplikasyonları ve donör sınırlamaları, daha geniş uygulamasını kısıtlamaktadır. Doku mühendisliği yöntemleri bu tür problemlerin üstesinden gelebilir [22]. Yang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada [23] ilk olarak, bir proteolitik enzim kullanılarak otolog kornea epitel hücreleri elde edilmiştir. Ardından, fibrin jel, kollajen jel veya amniyon ile birleştirilmiş kornea epitel hücreleri kornea stromasına nakledilerek dikişlerle tutturulmuştur. Bununla birlikte, implantasyon bölgesinde inflamatuvar reaksiyonların komplikasyonları, düşük kornea şeffaflığı ve kornea opasitesi gibi istenmeyen durumlarla karşılaşmıştır. Bu kaygılarla ilgili olarak, oküler uygulamalar için taşıyıcı kullanmamanın daha iyi bir yaklaşım olacağı düşünüldükçe hücre tabakaları geliştirilmiştir. Nishida ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada [24], kornea epitel hücre tabakalarının oluşturulması için, otolog limbal epitel hücreleri izole edilerek 37°C'de sıcaklığa duyarlı kültür yüzeylerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra, sıcaklığın 30 dk boyunca 20°C'ye düşürülmesiyle, biriken ECM ile epitel hücre tabakaları kolaylıkla manipüle edilebilmiş ve konakçı kornea stromasına nakledilebilmiştir. Beş dk sonra, nakledilen hücre tabakasının, dikiş gerektirmeden tüm korneayı kaplayabildiği ve pürüzsüz bir yüzey oluşturabildiği rapor edilmiştir. Tsai ve arkadaşları [25], amniyotik membran üzerinde kültürlenmiş otolog epitel hücre tabakalarını, 6 hastada hasarlı bir gözün soyulmuş kornea yüzeyine implante etmiştir. Ardından, 2-4 gün sonra, 6 gözün tümünde kornea yüzeyinin tamamen yeniden epitelizasyonunun gerçekleştiği görülmüştür. Oküler yüzey kornea epiteli ile kaplandığında implantasyondan 1 ay sonra korneanın netliğinin düzeldiği rapor edilmiştir. Nishida ve arkadaşları [27] tarafından yapılan bir diğer çalışmada, otolog oral mukozal epitel hücreleri sıcaklığa duyarlı hücre kültürü kapları üzerinde kültürlenmiş ve oluşturulan hücre tabakaları soyulmuş kornea yüzeylerine (her hasta için 1 göz) sütür kullanılmadan implante edilmiştir. Tedavi edilen 4 gözün tümünde kornea yüzeyleri 1 hafta içinde tamamen yeniden epitelize olmuştur. Kornea şeffaflığı restore edilerek ameliyat sonrası görme keskinliğinin 4 gözde de belirgin bir şekilde arttığı bildirilmiştir. Ortalama 14 aylık takip süresi boyunca tüm kornea yüzeylerinin şeffaf kaldığı ve herhangi bir komplikasyonun gelişmediği rapor edilmiştir.

Periodontal membran onarımı

Geleneksel hücreler, yapı iskeleleri ve büyüme faktörleri, periodontal doku kusurlarının onarımındaki gelişmelere önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. Bununla birlikte, periodontal doku rejenerasyonunun karmaşıklığı ve kusurların özgüllüğü nedeniyle, doku mühendisliğinin periodontal doku onarımına uygulanması şimdiye kadar sınırlı kalmıştır. Hücre tabaka teknikleri bu alanda büyük potansiyele sahiptir. Flores ve arkadaşları [28], sıcaklık duyarlı kültür kapları kullanarak osteojenik ortamda kültürlenmiş çok katmanlı insan periodontal bağ (PDL) hücre tabakalarını elde ederek, bu tabakaları immün yetersizliği olan farelerin deri altına implante etmiştir. İmplant edilen hücre tabakalarının büyük bir kısmı, 6 hafta sonra yeni olgunlaşmamış sement benzeri doku oluşumu göstermiştir. Iwata ve arkadaşları [29] tarafından yapılan çalışmada, köpeklerde üç duvarlı periodontal defektlere sahip diş kök yüzeylerine poliglaktik asit ile desteklenen üç katmanlı PDL hücre tabakaları implante edilmiştir. Kemik defektleri gözenekli β -trikalsiyum fosfat (β -TCP) ile doldurulmuştur. Hücre tabakasının transplantasyonu, iyi yönlendirilmiş kollajen lifleri ile bağlanan yeni kemik ve sement rejenerasyon ederken, kontrol grubunda sadece sınırlı kemik rejenerasyonunun gözlemlendiği bildirilmiştir.

Akciğer hava kapaklığı

Pulmoner hava kaçağı genellikle kardiyotorasik ameliyatlarda meydana gelir ve bu da hastaların yaşam kalitesini düşürür. Mevcut yöntemler, intraoperatif hava kaçaklarının kapatılmasında etkisiz olan çeşitli biyolojik ve sentetik dolgu malzemelerin kullanımını içermektedir. Buna karşılık, pulmoner hava kaçağı kalıcı olarak kapatılamaz ve dolgu malzemeleri akciğer hareketinin kısıtlanmasına neden olabilmektedir [30]. Biyomühendislik tabanlı hücre tabaka teknikleri hava sızıntılarını dinamik bir şekilde anında ve kalıcı olarak kapatabilir ve fibrin yapıştırıcı gibi önceki malzemelerle karşılaştırıldığında postoperatif nüks olmaksızın solunumla ilgili kapsamlı doku kasılması ve genişlemesine izin verir. Kanzaki ve arkadaşlarının çalışması [30], bir domuz modelinde plevral defektlerin kapatılmasında otolog dermal fibroblast tabakalarının etkilerini incelemiştir. Dermal fibroblast tabakasının transplantasyondan 4 hafta sonra plevral yüzeyde kalıcı kapanma sağladığı bildirilmiştir. Dermal fibroblast tabakasının, mekanik ventilasyon nedeniyle akciğer hacmindeki değişikliklere de duyarlı olduğu rapor edilmiştir. Takip süresi boyunca hava kaçağının tekrarı

gözlenmediği ve bu nedenle, fibroblast hücre tabakalarının pulmoner hava kaçağının onarımında gelecekteki klinik uygulamalar için uygun olabileceği rapor edilmiştir.

Yapay damar çalışmaları

Katmanlı hücre tabakalarını kullanarak bir vasküler ağı yeniden yapılandırmak, 3B doku mühendisliği yaklaşımında sıkça yapılan bir işidir. Dokudaki endotel hücrelerin birlikte kültürlemesinin, *in vitro* vasküler ağ oluşumuna sebebiyet verdiği ve transplantasyonun ardından *in vivo* neovaskülarizasyonun desteklendiği gösterilmiştir. Asakawa ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, insan göbek damarı endotel hücreleri (HUVEC'ler), normal insan dermal fibroblastları ile ko-kültür yapılarak, sıcaklık duyarlı kültür kaplarında çoğaltılmıştır [31]. Konfokal mikroskop ile yapılan gözlemler, damar öncesi ağların, doğal bir mikro damar sistemine benzer tüp yapıları oluşturduğunu göstermiştir.

Miyokardiyal doku mühendisliği

Miyokardiyal doku mühendisliği, ciddi kalp yetmezliği olan hastalar için en umut verici tedavilerden biridir. Bununla birlikte, tek hücreli süspansiyon enjeksiyonları ile yetersiz hücre göçü, hücre kaybı ve konvansiyonel doku mühendisliği ile yapı iskelesinin bozunmasına bağlı inflamatuvar reaksiyonlar nedeniyle sınırlamalar söz konusudur. Yapay iskele olmadan 3B fonksiyonel dokular oluşturmak için katmanlı miyokardiyal hücre tabakalarının kullanılması miyokardiyal doku mühendisliğinde umut verici bir yaklaşımdır Shimizu ve arkadaşları [32] katmanlı kardiyomiyosit tabakaları arasında elektriksel iletişimin kurulabileceğini ve aynı zamanda bu hücre tabakalarının 3B olarak üretilen miyokardiyal dokulardan daha üstün olabileceği bildirmiştir. Bununla birlikte, *in vivo olarak* katmanlı kardiyomiyosit tabakaları uzun bir hayatta kalma, makroskopik pulsasyon ve doğal kalp dokusunun karakteristik yapılarını göstermiştir. Shimizu ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada [33] üç katmanlı yenidoğan sıçan kardiyomiyosit tabakaları toplanmış ve bunlar tekrar tekrar 1, 2 veya 3 günlük aralıklarla sıçanların deri altı dokusuna implante edilmiştir. Üst üste binen iki greft tamamen senkronize olmuş ve tüm doku 1 ve 2 günlük aralıklarla nekroz olmadan hayatta kalabilmeyi başarmıştır. Çok adımlı transplantasyon ve iyi organize edilmiş bir mikrovasküler ağ ile ~1 mm kalınlığında bir miyokard oluşturmuştur. Ayrıca, cerrahi olarak bağlanabilen bir arter ve ven üzerinde fonksiyonel çok katmanlı greftin üretilmesinin ardından damarlar yoluyla greft perfüzyonu sağlanmıştır.

2.3.2 Hücre Tabaka Tekniklerinin Mezenkimal Kök Hücrelerle Uygulamaları

Mezenkimal kök hücreler (MKH) doku mühendisliği alanında yaygın olarak kullanılmaktadır ve umut verici bir hücre kaynağı olarak gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücreler, çok sayıda hücre ve hücre dışı matriks ile hücre tabakalarının oluşumuna katkı sağlayabilir ve çeşitli alanlarda doku onarımı ve yenilenmesi için faydalı olabilir.

Periodontal rejenerasyon

Tsumanuma ve arkadaşları [34] bir köpek ciddi hasar (tek duvarlı kemik içi hasar) modelinde hücre kaynakları arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için üç tip mezenkimal dokudan türetilmiş hücre (periodontal bağ, alveolar periosteum ve kemik iliği) kullanarak hücre tabaka nakli gerçekleştirmiştir. Poliglikolik asit ile desteklenen her hücre kaynağından üç katmanlı hücre tabakaları, otolog olarak nakledilmiştir. Tek duvarlı kemik içi defektler bir β -TCP ve kollajen karışımı ile doldurulmuştur. Transplantasyondan 8 hafta sonra tüm gruplarda yeni oluşan sement ve iyi yönlendirilmiş PDL lifleri ile periodontal rejenerasyon ve alveolar kemik rejenerasyonu tespit edilmiştir. En yüksek kemik ve periodontal rejenerasyon miktarı PDL tabaka grubunda ortaya çıkmıştır.

Kardiyak doku rejenerasyonu

Mezenkimal kök hücreler, hayvan modellerinde kardiyak doku onarımı için ve klinik olarak hücre süspansiyon sistemlerini uygulamak için yaygın olarak kullanılmıştır. Miyahara ve arkadaşları [35] sıcaklık duyarlı kültür kapları kullanarak yağ dokusundan türetilen MKH tabakalarını elde etmiş ve bunları sıçanlarda hasarlı miyokardiyuma implante etmiştir. İmplant edilen tabakalar yavaş yavaş büyüyerek yeni oluşmuş damarlar, farklılaşmamış hücreler ve birkaç kardiyomiyosit içeren kalın bir tabaka oluşturmuştur. MKH tabakasının skar bölgesindeki duvar incelmelerini tersine çevirerek miyokard enfarktüsli sıçanlarda kalp fonksiyonunu iyileştirdiği rapor edilmiştir.

Kıkırdak entegrasyonu ve onarımı için MKH tabakaları

Yaralanan kıkırdak, kendi kendine sınırlı iyileşme kapasitesi nedeniyle, genellikle tedavi edilmediğinde daha fazla dejenerasyona yol açan, kendini otomatik olarak zor onarabilen bir dokudur. Kıkırdağın kalıcı iyileşmesini ve biyomekanik yeterliliğini sağlamak için kıkırdak entegrasyonu önemlidir. Mezenkimal kök hücre tabakaları, implant ve konak kıkırdağı arasında devamlılığı sağlayabilen çok sayıda hücre ve hücre dışı matriks sağlayabilir, böylece bütünleştirici kıkırdak onarımını geliştirebilir. Qi ve arkadaşları [36]

tavşan modelinde kırıkta kusurlarının entegrasyonunu ve onarımını geliştirmek için MKH yüklü iki katmanlı poli- (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) yapı iskelelerine MKH tabakasını dahil ederek etkilerini araştırmıştır. İmplantasyondan 6 ve 12 hafta sonra, MKH tabaka içeren PLGA/MKH grubu, diğer gruplara kıyasla önemli ölçüde daha fazla hiyalin kırıkta ve daha yüksek histolojik skorlar göstermiştir. Ek olarak, MKH tabakasıyla desteklenmiş PLGA/MKH grubu, onarılan kırıkta ile çevreleyen normal kırıkta ve subkondral kemik arasında en iyi entegrasyonu sağlamıştır.

Kemik rejenerasyonu için MKH tabakaları

MKH'ler, kemik rejenerasyonunda olumlu rolleri olan hücrelerdir. Geleneksel doku mühendisliği yaklaşımında kullanılan çeşitli iskeleler üzerine süspanse halde ekilen MKH'lerin yüzeye tutunma oranları istenilen seviyelerde değildir. Daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada, çeşitli malzemelerle birleştirilen süspanse haldeki MKH'lerin kemik kusurlarının tedavisinde yeterli olmadığı ve kusurların tekrar oluştuğu bildirilmiştir [37]. Hücre tabaka tekniği yüksek verimli hücre iletimi sağlayabilir ve hücre yüzeyindeki adezyon molekülleri ve hücre-hücre etkileşimleri bozulmadan kalır. Ayrıca, mineralize katmanlı hücre tabakasına bağlı osteoblastlar, kemik matrisinin *in vivo* birikimini taklit edebilir.

Gao ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, tavşanlarda uzun kemik rejenerasyonu (5 mm çap ve 1.5 mm duvar kalınlığı) için çok katmanlı kemik iliği stromal hücre tabakaları tübüler mercan yapı iskeleleriyle birleştirilmiştir. Böylelikle, doğal kemiğe benzer şekil ve yapıya sahip kortikal kemik oluşturulmuştur. Yeni oluşan kemikler endokondral kemikleşmeye benzer bir şekildeydi.

2.3.3 Doku onarımı için diğer kök hücre tabakaları ve uyarılmış pluripotent kök hücre tabakaları

Diğer kök hücre türleri yetişkin dokulardan elde edilebilir ve hücre tabakaları oluşturabilir. Miyokard enfarktüsü için kardiyak kök hücre tabakaları ve kas kök hücre tabakaları umut vericidir. Sekiya ve arkadaşları [38], kronik miyokard enfarktüsünün fare modelinde kastan türetilen kök hücre (MDSC) tabakasını nakletmişlerdir. MDSC tabaka implante edilmiş fareler, diğer gruplara kıyasla sol ventrikül (LV) genişlemesinde bir azalma ve sürekli LV kontraksiyonu sergilemiştir. MDSC tabakası hizalı miyotüpler oluşturmuş ve önemli aritmik olaylar olmaksızın kronik enfarktüslü miyokardın daha iyi işlevsel iyileşmesini sağlamıştır. Kök hücre tabakalarının transplantasyonu da iskemik

kardiyomiyopati için umut verici bir terapötik stratejidir. Bununla birlikte, nakledilen bölgedeki potansiyel iskemi bir problem olmaya devam etmektedir. Endotelyal progenitör hücreler (EPC'ler), enjekte edilen alanda anjiyogenezi indükleyebilir. Bu nedenle, Kamata ve arkadaşlarının [39] çalışmasında, intramiyokardiyal EPC enjeksiyonu ile kardiyak kök hücre tabakası, 4 hafta boyunca sol koroner arter etrafına bir ameroid konstriktör yerleştirilerek oluşturulan kronik iskemik yaralanma modelinde değerlendirilmiştir. Progenitör hücre enjeksiyonu ile kardiyak hücre tabaka implantasyonu, artan kılcal damar sayısı ve iskemik epikardium veya endokardiyumda azalmış kardiyak fibrozis ile iskemik epikardiumda önemli fonksiyonel iyileşme sağlamıştır. Embriyonik kök hücreler (ESC'ler), erişkin kök hücreler için donör bölgesi morbiditesi sınırlaması olmaksızın tüm doku mühendisliği rejenerasyonu ve indüklenmiş farklılaşma için en iyi potansiyel aday hücreleri olarak kabul edilmektedir. Matsuura ve arkadaşları [40], 3B süspansiyon ve kardiyak fibroblastlarla ortak kültürün ardından fare embriyonik sapı (ES) hücrelerinden türevlendirilmiş kardiyomiyosit tabakaları oluşturmuştur. Hücre tabakalarındaki kardiyomiyositler kendiliğinden ve senkron olarak atım yapmıştır. Bu tür ES türevli kardiyak hücre tabakaları biyomühendislik miyokard gelişimi için umut verici bir araç olabilir. Zhang ve arkadaşları [41], santrifüjleme yöntemini kullanarak limbal kök hücre eksikliği olan tavşanlarda oküler yüzey rekonstrüksiyonu için ESC tabakalarını kullanmıştır. Hücre tabakası naklinin, tedavi edilen hayvanların %75'inde oküler yüzeyin yeniden inşasını kolaylaştırdığı bildirilmiştir. ES hücreleri stroma ile doğrudan temas halindeyken kornea epitel hücrelerine farklılaşmaya gitmiş ve böylece kornea doku mühendisliği için hücre kaynağı görevi görebilmiştir. Bununla birlikte, etik sorunlar, immünolojik ret ve teratom oluşumu riski [39] gibi ESC'ler ile ilişkili olan ve daha kapsamlı uygulamalarından önce çözülmesi gereken birkaç kilit sorun vardır.

Kardiyak kök hücre tabakaları, kas kök hücre tabakaları ve ESC'lerle karşılaştırıldığında, iPS hücrelerinin başarılı bir şekilde uyarılması ve izolasyonu yeni bir umut sağlar. iPS hücreleri, bir hastanın kendi somatik hücrelerinden oluşturulabilir ve aynı zamanda, kişiselleştirilmiş bir terapiye yol açan birden fazla türe farklılaşma potansiyeline sahiptir. İndüksiyonu takiben farklılaşmış iPS hücre tabakaları, doku rejenerasyonunda geniş çapta araştırılmıştır. Kito ve arkadaşları çıplak fare modelinde iskemik arka uzuvları onarmak için fare iPS hücresinden türetilmiş Flk-1(+) hücre tabakalarını kullanmıştır. İmplantasyonu takiben, Doppler kan akışı ve kılcal yoğunluk analizleri, iskemik arka

uzuvların revaskülarizasyonunun hızlandığını ve Flk-1(+) hücre tabakasının iskemik dokuda VEGF ve bFGF ekspresyonunu da arttırdığını göstermiştir [42]. Farklılaştırılmış iPS hücre tabakalarında da doku mühendisliği vasküler greftlerin yapımı için incelenmiştir. Şiddetli kombine immün yetmezlik/bej dişi farelerin alt vena kavasına 0.8 mm çapında poliglikolik asit-poli-l-laktid ve poli (l-laktid-ko-epsilon-kaprolakton) içeren bir iskeleye sarılmış iPS hücre türevi damar hücre tabakaları interpozisyon greftleri olarak yerleştirilmiştir. Onuncu haftada histolojik değerlendirme ile endotelizasyon ve düz kas aktin ve kalponin pozitif hücreler içeren bir iç tabaka gözlenmiştir [43].

2.4 Hücre Tabaka Teknolojisinde Avantajlar ve Sınırlamalar

Hücre tabaka teknikleri biyolojik olarak parçalanabilen yapı iskeleleri kullanmadan elde edilebilmesi nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında yeni yaklaşımlar sağlamakla birlikte birçok avantaj ve dezavantajı da beraberinde getirebilmektedir [44-46]. Geleneksel doku mühendisliği yönteminde kullanılan hücre süspansiyonları, yapı iskeleleri ve büyüme faktörlerindeki kısıtlamalar belirli alanlardaki uygulamaları sınırlandırmaktadır. Hücre tabakası tekniği, bu tür dezavantajların üstesinden gelebilmektedir. Bu teknikte kültüre edilmiş hücreler, hücre hasarına ve farklılaşmış fenotiplerin kaybına neden olabilen tripsin veya dispaz gibi proteolitik enzimler kullanılmadan bozulmamış tabakalar halinde yüzeyden kaldırılabilir [47-48]. Aynı zamanda hücre dışı matriks, iyon kanalı, büyüme faktörü reseptörleri, neksin ve diğer önemli hücre yüzeyi proteinleri bozulmadan tek bir tabaka halinde elde edildiği için de bir avantaj sağlamaktadır. Hücre dışı matriks hücre tabakalarının bazal yüzeyinde mevcut olduğu için, doğrudan uygun dokuya nakledilebilir veya üst üste konularak üç boyutlu doku benzeri yapılar oluşturulabilir [49]. Tek hücreli süspansiyon enjeksiyonları kullanılırken hedef bölgede yalnızca küçük bir hücre yüzdesi ile önemli bir hücre kaybı vardır. Bununla birlikte dokular hasar gördüğünde, enjekte edilen hücreler, konakçı mimarisinin yok edildiği yerlere bağlanamayabilir. Buna karşılık, biriken ECM'leri ile hücre tabakaları, minimum hücre kaybıyla yüzeyi kaplayarak konak dokulara ve hatta yara bölgelerine tutunabilir.

Ancak, hücre tabaka teknikleri ile ilgili bazı sorunlar halen devam etmektedir. Tek hücre tabakası incedir ve bu nedenle, daha kalın hücre tabakaları oluşturmak için genellikle katman katman üst üste bindirilmesi gerekebilir. Bununla birlikte, yetersiz beslenme veya hipoksi nedeniyle çok katmanlı hücre tabakalarının ortasında nekrotik bölgeler oluşabilmektedir. Ek olarak, *in vivo* potansiyel iskemi, hücre tabakasının hayatta

kalmasını sınırlayabilir. Bir çalışmada, hipoksi ön tedavisinin implante edilen MKH'lerin hayatta kalma oranını artırabileceğini ve *in vivo* olarak anjiyogenezi destekleyebileceğini göstermiştir [50]. Bu nedenle, hipoksi ile ön işleme tabi tutulmuş hücre tabakaları, *in vivo* olarak daha iyi hayatta kalma oranlarına ve iyileştirilmiş terapötik etkinliğe sahip olabilir. Ayrıca doku mühendisliği uygulamalarında önemli bir yeri olan uyarılmış pluripotent kök (iPS) hücre ve türevlerinden elde edilen hücre tabakalarının incelenmesi için daha geniş araştırma ve uygulamalara ihtiyaç vardır [45].

2.5 Fotobiyomodülasyon Tedavisi

Fotobiyomodülasyon tedavisi, lazerler, ışık yayan diyotlar (LED'ler) ve görünürden kızılötesi spektruma kadar geniş bantlı plazma ark gibi iyonlaştırıcı olmayan ışık kaynaklarını kromoforlarla etkileşime girmek ve farklı dokularda fotokimyasal ve fotofiziksel reaksiyonları tetiklemek için kullanan termal olmayan bir terapidir [51]. Bu işlem, ağrının hafifletilmesi, immünomodülasyon, yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonunun desteklenmesi gibi pek çok faydalı terapötik sonuçları beraberinde getirmektedir. Fotobiyomodülasyon (PBMT) terimi araştırmacılar ve uygulayıcılar tarafından düşük seviyeli lazer tedavisi (LLLT) olarak da adlandırılmaktadır [52]. Işık, Sitokrom C oksidaz tarafından emildiğinden, mitokondri içinde adenosin trifosfat (ATP) üretimini artırmak için elektron taşıma zincirini uyarır. Doku hasar gördüğünde hücrede ATP üretimi bozulur ve bu da koruyucu bir mekanizma olarak hücrenin metabolizmasını yavaşlatır. PBMT, normal hücresel fonksiyonun geri kazanılmasına yardımcı olan oksidatif süreci geri yüklemeye yardımcı olur. ATP'ye ek olarak, lazer uyarımı ayrıca serbest nitrik oksit (NO) üretir ve reaktif oksijen türlerini (ROS) modüle eder. NO, güçlü bir vazodilatör ve birçok fizyolojik süreçte yer alan önemli bir hücresel sinyal molekülüdür. ROS'un, inflamatuvar yanıt dahil olmak üzere birçok önemli fizyolojik sinyal yolunu etkilediği gösterilmiştir. Artan NO ve geliştirilmiş ROS seviyeleri birlikte, daha hızlı sinyalleşme için bir ortam sağlayarak inflamasyonun azalmasına neden olur.

2.6 Fotobiyomodülasyon Mekanizmaları

Birçok hücresel molekülün, ışığın çeşitli dalga boylarını absorbe edebildiği gösterilmiştir. Görünür kırmızı ışık ve yakın kızılötesi radyasyon ile fotobiyomodülasyonda, kanıtlar birincil hücresel fotoalıcıların, mitokondriyal elektron taşıma zincirinde işlev gören karmaşık bir protein olan sitokrom c oksidazın merkezleri olduğunu göstermektedir [53,54]. Sitokrom c oksidaz, mitokondriyal elektron taşıma zincirinde birim IV'tür. Bir

elektronu (dört sitokrom c molekülünün her birinden) tek bir oksijen molekülüne aktararak iki molekül su üretir. Aynı zamanda, gerekli olan dört proton, mitokondriyal membran boyunca yer değiştirir ve ATP sentaz enziminin ATP'yi sentezlemesi için ihtiyaç duyduğu bir proton gradyanı üretir. Sitokrom c oksidazın iki hem merkezi (a ve a₃) ve iki bakır merkezi (Cu_A ve Cu_B) vardır. Bu metal merkezlerin her biri oksitlenmiş veya indirgenmiş halde bulunabilmekle beraber farklı absorpsiyon spektrumlarına sahiptirler, böylelikle sitokrom c oksidaz ışığı NIR (near infrared) bölgesinde (950 nm'ye kadar) iyi emebilir [55]. Sitokrom c oksidazın PBMT üzerine ana hedefi kırmızı/NIR dalga boylarının yaygın kullanımını ile açıklanabilir, çünkü daha uzun dalga boyuna sahip kırmızı/NIR ışık kaynağı hemoglobin tarafından daha iyi emilen mavi veya yeşil ışıktan çok daha iyi bir doku penetrasyonuna sahiptir. Sitokrom c oksidaz tarafından sağlanan foton absorpsiyonunun enzim aktivitesinin, oksijen tüketiminin ve ATP üretiminin artmasına neden olduğunu tam olarak açıklayan en popüler teori, inhibitör olarak etki gösteren nitrik oksit (NO) foto-ayrışmasına dayanmaktadır [56]. NO, hem ve Cu merkezlerine kovalent olmayan bir şekilde bağlı olduğundan ve oksijeni 1:10 oranında rekabetçi bir şekilde bloke ettiğinden, nispeten düşük enerjili bir foton NO'yu dışarı atabilir ve daha fazla hücresel solunumun gerçekleşmesine izin verebilir [58].

Fotobiyomodülasyon terapisinin mekanik etkileri birincil (ışık maruziyeti sırasında) ve ikincil (ışığa maruz kaldıktan sonra) olmak üzere ikiye ayrılabilir.

Birincil Etkiler

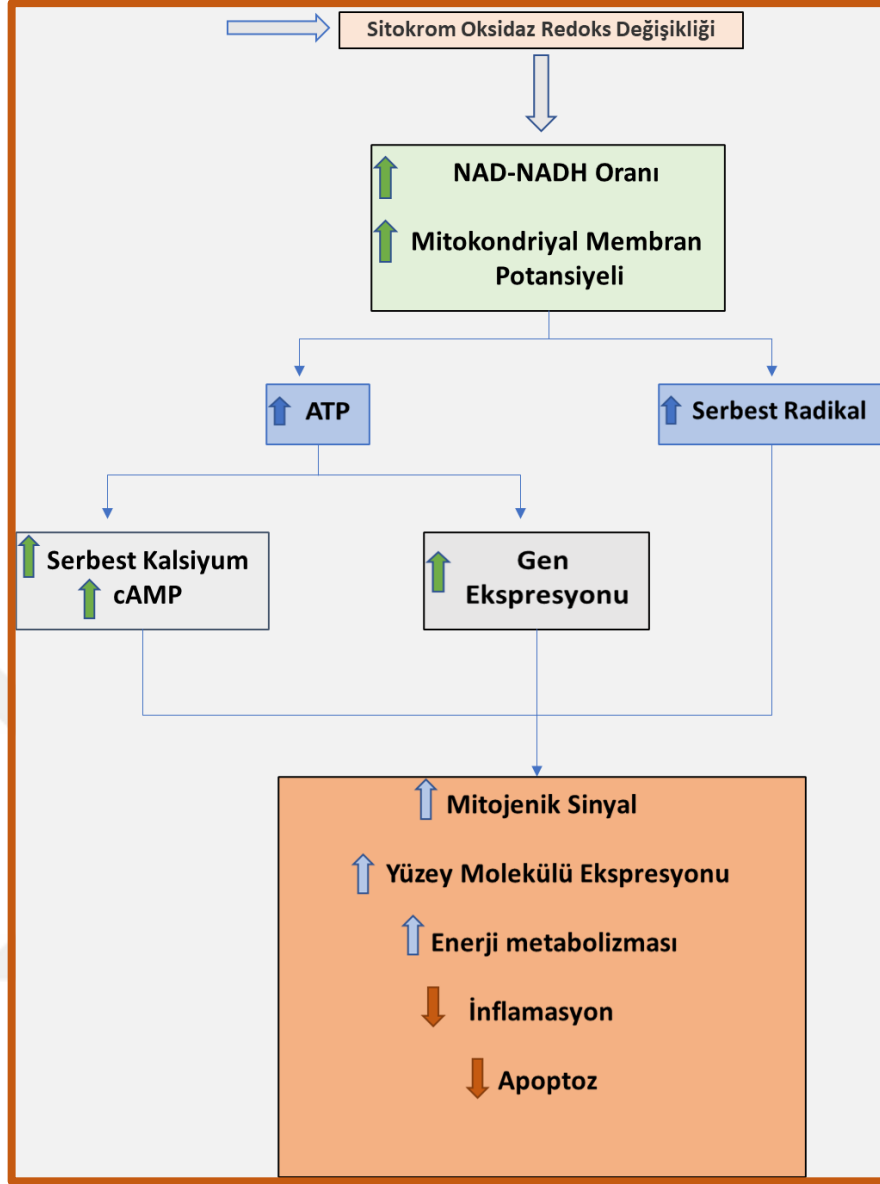
Birincil etkiler, ışıkla uyarma üzerine foto alıcıda meydana gelen doğrudan fotokimyasal değişimi ifade eder. Birincil etkiler ışığa bağımlıdır ve yalnızca hedef doku ışığa maruz kaldığında ortaya çıkar. En az üç farklı birincil etkiyi destekleyen mevcut kanıtlar bulunmaktadır. İlk ve en önemli birincil etki, solunum zinciri bileşenlerinin redoks değişikliğidir. LLLT, sitokrom oksidazın indirgenmesini veya oksidasyonunu indükleyebilir. Redoks durumundaki bu değişiklikler, hücresel cevaplar için doz yanıtı ile ilişkilidir [58]. Sitokrom oksidazın redoks durumundaki değişiklikler, elektron akışındaki değişiklikleri içerir. LLLT, sitokrom oksidaz varlığında sitokrom c oksidasyonunu artırır, oksijen tüketiminde ve mitokondriyal membran potansiyelinde artışa neden olur ve mitokondriyal geçirgenliği aktive eder [53]. Tüm bu olaylar, mitokondriyal elektron taşıma zincirindeki hızlandırılmış elektron akışı ile ilişkilendirilmiştir. İkinci olası birincil etki, doğrudan fotodinamik etki yoluyla tek (single) oksijen ve bir elektron oto-oksidasyonu yoluyla süperoksit iyonu dahil olmak

üzere serbest radikallerin üretilmesidir. Bu etkinin önemi, reaktif oksijen türlerinin sadece solunumun yan ürünlerine zarar vermeleri değil, aynı zamanda hücrel sinyalleşmede önemli bir role sahip olmalarıdır. LLLT'nin üçüncü birincil etkisi ise elektrik veya hafif salınımlara dayalı olarak soğurucu kromoforun lokalize geçici ısıtmasıdır [53]. Bu etki daha az karakterize edilmiştir ve önerilen diğer iki birincil etkiyi tamamladığına inanılmaktadır. Bu tür salınımların etkisinin daha genel olduğu ve su dahil hedef dokudaki tüm molekülleri etkilediği görülmektedir. LLLT, hidrojen bağlarını güçlendirebilir ve rezonans moleküller arası enerji aktarımı nedeniyle hızlı enerji aktarımlarına izin veren büyük boyutlu hidrojen bağı ağlarını indükleyebilir. Bu nedenle, LLLT, ısı transferi olmadan elektron pompalamasını destekleyen mekanizmaları indükleyen dengesiz elektrik dalgalanmalarına neden olabilir [59].

İkincil Etkiler

LLLT'nin ikincil etkileri, birincil etkilerin bir sonucu olarak ortaya çıkar ve hücrel homeostazı değiştiren bir dizi biyokimyasal reaksiyonu içerir [60,61]. İkincil etkiler, ikinci habercilerin aktivasyonunu, ardından enzim fonksiyonu ve gen ekspresyonunun modülasyonunu içerir. İkincil etkiler, ışığa maruz kaldıktan saatler ve hatta günler sonra meydana gelebildikleri ve güçlendirilmiş makro etkilerle sonuçlanan sinyal yollarının aktivasyonunu içerdiği için ayırt edicidir. Kademeli reaksiyonların bir parçası olarak meydana geldikleri için ikincil etkiler pleiotropik olma eğilimindedir. LLLT, mitokondriden çekirdeğe giden, geriye doğru nörotransmisyon (retrograd sinyal) yolunu aktive eder. Bu sinyal yolu, foto-alıcıları içeren mitokondriden çekirdeğe bilgi göndererek strese karşı adaptif tepkileri indükler ve daha sonra gen ekspresyon seviyelerini değiştirerek yanıt verebilir. Bu yolun ilk aşamasının, NAD/NADH oranında ve mitokondriyal zarlar arası potansiyelde bir artış, nitrik oksidin sitokrom oksidazdaki bağlanma bölgesinden ayrılması ve ATP havuzunun modifikasyonu olduğu öne sürülmüştür. ATP'deki küçük değişiklikler bile hücrel metabolizmayı değiştirir. ATP, intraselüler alana doğru kalsiyum akımlarını ve hücre içi depolardan kalsiyum salınımını indüklemek için P2 reseptörlerini (P2X ve P2Y) aktive eder. ATP'deki değişiklikler ayrıca kinazların aktivasyonu ile siklik adenosin monofosfat seviyelerini de değiştirir. Bu ikincil etkilerin sonuçları, mitojenik sinyalleşmeyi, yüzey molekülü ekspresyonunu, inflamatuvar redoks durumları ve apoptozu düzenleyen proteinlerin ekspresyonunu etkileyen gen ekspresyonundaki değişiklikleri içerir [61].

Yukarıda bahsedilen bilgilerin özeti olarak; fotobiyomodülasyon tedavisi, hücre içi pleiotropik etkilerin bir dizisi ile sonuçlanır. Işık, sitokrom oksidazdaki kromoforlar tarafından emilir ve redoks durumunda değişikliklere neden olur. Enzimlerin mitokondriyal iç zardaki redoks reaksiyonu, hızlandırılmış elektron akışını, NADH tüketimini azaltır ve mitokondriyal zar potansiyelinde artışa neden olur. Bu değişiklikler, ATP sentezini kolaylaştırır ve serbest radikallerin oluşumunu artırır. Artan ATP, kalsiyum salınımını ve siklik adenosin monofosfat (cAMP) oluşumunu indükleyen kinazların aktivasyonuna izin verir. Kalsiyum, cAMP ve serbest radikaller ikincil haberciler olarak hareket ederler ve nükleer düzeyde farklı metabolik yolları aktive edebilirler. Hücre ortamına bağlı olarak, bu hücresel değişiklikler uyarlanabilir ve klinik iyileşmeyi teşvik edebilir. Fotobiyomodülasyon tedavisinin hücre içi etki mekanizmaları Şekil 2.4'te belirtilmiştir.



Şekil 2.3 Düşük seviyeli ışık tedavisinin (LLTT) hücre içi etki mekanizmaları.

2.7 Farklı Hücre Türleri Üzerinde Fotobiyomodülasyonun Etkisi

Fotobiyomodülasyon tedavisinin (PBMT'nin) çeşitli hücre hatlarının proliferasyonu ve protein üretimi üzerindeki etkilerine dair birçok çalışma vardır [62]. Bu çalışmalar, bu etkilerin hem ışınlama parametrelerine hem de hücre tipine bağlı olduğunu göstermektedir. Örneğin, enerji yoğunluğu, kültürlenmiş hücrelerin hücre büyümesini etkileyen önemli bir faktör olarak belirtilmiştir. Diğer tüm ışınlama parametreleri sabitlenerek güç yoğunluğunun, insan dişeti fibroblastlarının büyümesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuçta güç yoğunluğunun hücre büyümesini ters orantılı bir şekilde etkilediği sonucuna varılmıştır [63]. Aynı hücre tipini kullanan Damante ve arkadaşları

[64], farklı dalga boylarının protein üretimi üzerindeki etkisini göstermiştir. Araştırmacılar iki farklı dalga boyunu (660 ve 780 nm) test ederek kızılötesi lazerle tedavi edilen gruplarda bFGF (temel fibroblast büyüme faktörü) üretiminin önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Önemli olan diğer PBMT parametresi, ışınlama sayısı ile ilgilidir. Meneguzzo ve arkadaşları [65], birden fazla ışınlamada ve bir kerede hücre kültürlerine uygulanan aynı toplam enerjinin etkisini karşılaştırmıştır. Çoklu ışınlama uygulanan gruplar, tek ışınlama uygulanan gruplardan önemli ölçüde daha yüksek hücre büyümesi ile sonuçlanmıştır. Ayrıca, besin eksikliği altında büyütülen çok sayıda ışınlanmış hücrenin hücre büyümesi, hücrelerin ideal beslenme koşulları altında büyütüldüğü pozitif kontrol grubuna benzerlik göstermiştir. Araştırmacılar, çoklu ışınlamalı PBMT'nin hücresel büyüme üzerinde daha etkili olduğu sonucuna varmışlardır. Eduardo ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada hücre tipi ve lazer ışınlama parametrelerinin önemli bir PBMT faktörü olduğu gösterilmiştir [66]. PBMT'nin farklı dalga boyları ve güçleri ile beslenme açısından yetersiz koşullar altında kültürlen epitel hücrelerinin büyüme üzerindeki etkisi incelenmiştir. Araştırmacılar, gözlemlenen hücre büyümesi iyileşmesinin ışınlama sayısı ile doğru orantılı olduğu sonucuna varmışlardır. Aynı zamanda, bu çalışmada uygulanan aynı ışınlama parametrelerinin, NIH-3T3 fibroblastları [67] ve sıçan kalvaria osteoblast benzeri hücreler [68] gibi diğer hücre tiplerinde de düzenli hücre büyüme iyileşmesi sağladığı bildirilmiştir. Kültürlen hücrelerin PBMT'ye tepkisinin analizinde önemli olan diğer bir husus, bazı deneysel koşullarla ilgilidir. PBMT, patolojik süreçlerin varlığında veya yara iyileşmesi sırasında stresli durumlara maruz kalan hücrelerin ideal metabolik koşullarını eski haline getirebilir. Bu nedenle, ideal yetiştirme koşulları altında büyütülen ve muhafaza edilen hücrelerin ışınlanması, metabolizmalarında, çoğalma hızında veya örneğin protein üretme kabiliyetinde dikkate değer değişikliklere yol açmamıştır. PBMT'nin kültürdeki hücreler üzerindeki etkilerini daha iyi gözlemlemek için, bazı araştırmacılar kültür ortamındaki fetal sıgır serumu miktarını azaltarak stresli bir durumun indüklenmesi olan bir yöntem benimsemişlerdir [67,69,70]. Hücrelerin çeşitli sitotoksik maddelerle ve hatta virüsle teması, hücre stresine neden olabilir ve hücre proliferasyon hızında önemli bir azalmaya yol açabilir. Araştırmalara göre, deksametazon [71] gibi kortikosteroidlerin ve endodontik dolgu macunları [72] veya diş beyazlatma ajanları [67] gibi diş materyalleri tarafından salınan maddelerin kullanımı birçok farklı hücre tipinde strese neden olabilmektedir. Tüm bu çalışmalarda, ideal beslenme koşulları

altında yetiştirilen aynı hücrelerin büyüme hızı özelliklerinin tamamını veya bir kısmını geri kazanabilen PBMT parametrelerini belirlemek mümkün olmuştur.

Hou ve arkadaşları [73], 635 nm dalga boyuna sahip bir diyot lazer kullanarak kemik iliğinden türetilen mezenkimal kök hücrelerin çoğalma hızını iyileştirmek için PBMT uygulaması yapmıştır. Işınlanmayan gruplarla karşılaştırıldığında, ışınlanmış grupta önemli ölçüde daha yüksek hücre proliferasyon oranı bulmuşlardır. Fekrazad ve arkadaşları [74], PBMT'nin MKH'ler üzerindeki etkisi üzerine bir inceleme yayınlayarak PBMT'nin olumlu etkilerini doğrulamıştır. Ayrıca araştırmacılar, hücre proliferasyonunu artırmak için en uygun dozları ($0.7\text{--}4 \text{ J cm}^{-2}$) ve dalga boylarını (600 ila 700 nm) belirlemişlerdir.





3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu kısımda tez çalışması sırasında kullanılan malzemeler ve gerçekleştirilen deneysel çalışmalar detaylı bir şekilde açıklanmıştır. Deneysel çalışmalar üç bölüme ayrılarak incelenmiştir. İlk bölümde göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin (GK-MKH) karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Karakterizasyon çalışması tamamlanan hücrelerden hücre tabakaları elde edebilmek için öncelikle deneysel gruplar belirlenmiştir. Hücreler ışık ve vitamin C uygulaması olmayan grup (kontrol), sadece vitamin C uygulaması olan grup (VC), sadece ışık uygulamasının yapıldığı grup (PBMT) ve hem ışık hem de vitamin C uygulamasının olduğu grup (PBMT+VC) olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Daha sonra bu gruplar için en uygun fotobiyomodülasyon koşulları ve vitamin C konsantrasyonu belirlenerek hücre tabakaları elde edilmiştir. Sonrasında ise bu hücre tabakalarına ait karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Tez çalışmasının ikinci bölümünde BJ insan dermal fibroblast hücre hattına ait karakterizasyon çalışmaları tamamlanmış ve bu hücreler için fotobiyomodülasyon koşulları, grubumuzda yapılan daha önceki çalışmalar temel alınarak belirlenmiştir. Daha sonra bu hücreler için uygun vitamin C konsantrasyonu ve hücre ekim yoğunluğu belirlenerek hücre tabakaları elde edilmiş ve karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Son bölümde ise HS2 insan keratinosit hücre hattına ait karakterizasyon çalışmalarına yer verilerek hücre tabaka eldesi ve karakterizasyonu için yapılan çalışmalar açıklanmıştır.

3.1 Tez Çalışması Kapsamında Kullanılan Deneysel Malzemeler

Hücre kültürü çalışmaları sırasında kullanılan göbek kordonu mezenkimal kök hücreler, Ankara Doku Biyoteknoloji Kök Hücre, Biyobanka ve Doku Mühendisliği Laboratuvarından, BJ dermal fibroblast hücre hattı Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Prof. Dr. Mehtap Kılıç'ın laboratuvarından ve HS2 insan keratinosit hücre hattı Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Prof. Dr. İsmet Deliloğlu Gürhan'ın laboratuvarından temin edilmiştir.

Deneysel çalışmalar sırasında kullanılan DMEM ve F12 nin 1:1 karışımı olan DMEM/F12 ve Dulbecco modifikasyonu yüksek glikoz (DMEM-High glucose) besi ortamları ile fetal sığır serumu (FBS), Dulbecco fosfat tampon çözeltisi (DPBS), penisilin-streptomisin ve Capricorn Scientific (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Tripsin/EDTA (%0.01 Tripsin/10 mM EDTA) çözeltisi Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir. Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin büyüme ortamı

içerisine eklenmesi gereken Nutristem MSC XF Supplement Mix, Dr. Zeydanlı Hayat Bilimleri Tic. Ltd. Şti (Ankara) firmasından satın alınmıştır. Hücrelerin canlılık analizlerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen analizlerde kullanılan MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür) tuzu AppliChem (İspanya) tedarik edilmiştir. Dimetil sülfoksit (DMSO) ve izopropanol Sigma-Aldrich (ABD) firmasından, hidroklorik asit (%37, v/v) Merck (Almanya), firmasından temin edilmiştir. Kullanılan 25, 75, 175 cm²'lik flasklar ve 96, 24, 12, 6 gözlü hücre kültür kapları (TCPS) Greiner (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücreleri fikse etmek için kullanılan paraformaldehit, Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücreleri morfolojik olarak inceleyebilmek için temin edilen Tripton X-100 Merck (Almanya) firmasından, Sığır serum albümini (BSA) Sigma-Aldrich (ABD), Alexa fluor 488 phalloidin Life Technologies (ABD) firmasından, 4'-6- diamidino-2-fenilindol (DAPI) ve gluteraldehit Sigma Aldrich (ABD) firmasından satın alınmıştır. Alizarin red çözeltisi Thermo Fischer Scientific (ABD) şirketinden temin edilmiştir. GK-MKH'lerin kemik hücrelerine farklılaştırılmasında kullanılan, deksametazon ve β -gliserol fosfat Sigma (Almanya) şirketinden satın alınmıştır. Hücreleri morfolojik incelenmesinde kullanılan kristal viyole BDH (ABD), aseton ve metanol ise Sigma-Aldrich (ABD) şirketinden satın alınmıştır. Hücre tabakalarının üretiminde kullanılan L-askorbik asit-2 fosfat Cayman Chemical (ABD) şirketinden satın alınmıştır. RNA izolasyonu için kullanılan Trizol® ve RNAeasy kit Qiagen (ABD) şirketinden temin edilmiştir. cDNA sentezi için, cDNA reverse transkripsiyon kit Applied Biosystems (ABD) şirketinden satın alınmıştır. RT-PCR deneylerinde kullanılan, 5X Hot FIREPol EvaGreen qPCR mix plus Solis Biodyne (Estonya) firmasından satın alınmıştır. Hematoksilen&eosin boyaları ve ksilen Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hücre tabakalarının karakterizasyonunda kullanılan COL1A1, integrin beta 1 ve fibronektin Cell Signaling Technology (ABD) firmasından temin edilmiştir.

Yukarıda bahsedilen malzemelerle gerçekleştirilen tüm deneysel çalışmaların özeti Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Deneysel çalışmalar sırasında gerçekleştirilen çalışmaların özeti.

Gerçekleştirilen Çalışmalar	Yapılan Analizler
1. Hücre Karakterizasyonu	• MTT Analizi
• Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücre • BJ Fibroblast Hücre Hattı • HS2 Hücre Hattı	• Hemositometrik Sayım • Kristal Viyole Boyama • F-aktin/DAPI Boyama
2. Ön Hücre Kültürü Çalışmaları	• cm^2'ye ekilecek hücre sayısının belirlenmesi • İdeal VC konsantrasyonunun belirlenmesi • Fotobiyomodülasyon parametrelerinin optimize edilmesi • MTT Analizi • Hücre kaldırma denemesi
• Kontrol Grubu • Vitamin C Grubu (VC) • Fotobiyomodülasyon Grubu (PBMT) • Fotobiyomodülasyon+VC Grubu (PBMT+VC)	
3. Hücre Tabaka Çalışmaları	• MTT analizi
3.1 Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücre	• Hücre tabakası kaldırma çalışması
• Ekim yoğunluğu: 5×10^4 hücre/cm^2 • Vitamin C konsantrasyonu: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ • Fotobiyomodülasyon parametresi: 20 cm 2 dk	• Kültür süresi: VC grubu: 5-7 gün • PBMT grubu: 7 gün • PBMT+VC grubu: 7 gün
3.2 BJ Fibroblast Hücre Hattı	• MTT analizi
• Ekim yoğunluğu: 1×10^5 hücre/cm^2 • Vitamin C konsantrasyonu: 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ • Fotobiyomodülasyon parametresi: 20 cm 5 dk	• Hücre tabakası kaldırma çalışması • Kültür süresi: VC grubu: 6-7 gün • PBMT+VC grubu: 7 gün
3.3 HS2 Hücre Hattı	• MTT analizi
• Ekim yoğunluğu: 5×10^4 hücre/cm^2 • Vitamin C konsantrasyonu: 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ • Fotobiyomodülasyon parametresi: 20 cm 5 dk	• Hücre tabakası kaldırma çalışması • Kültür süresi: VC grubu: 8-9 gün • PBMT grubu 10-11 gün • PBMT+VC grubu 8-9 gün
4. Hücre Tabakalarının Karakterizasyonu	• F-aktin/DAPI Boyama
• Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücre • BJ Fibroblast Hücre Hattı • HS2 Hücre Hattı	• RT-PCR • Hidroksiprolin Analizi • Alizerin Red • Hematoksilen Eozin boyama • İmmünohistokimya boyama

3.2 GK-MKH'lerin Karakterizasyon Çalışmaları

Göbek kordonundan izole edilen hücreler %88 DMEMF12, %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) L-glutamin %1 (v/v) P/S ve %0.1 Nutristem MSC XF Supplement Mix içeren besi ortamı içerisinde 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücrelerin dondurularak saklanması işleminde ise dondurma ortamı olarak %10 (v/v) DMSO ve %90 (v/v) serumlu ortam kullanılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarında üçüncü pasaj hücreleri kullanılmıştır. Hücrelerin morfolojilerini gözlemek ve canlılık analizlerini belirlemek için cm²'ye ekilecek hücre sayısı 5000 olarak belirlenmiştir. Altı gözlü hücre kültür kaplarına ekilen hücreler on gün boyunca kültürlenmiştir. Bu süre boyunca ortam değişimi yapılmamıştır. Tez kapsamında steril ortam gerektiren tüm deneyler laminar akışlı kabin (Bioair, Type II Laminar Akış Kabini, İtalya) içerisinde gerçekleştirilmiştir.

MTT analizi ve hemositometrik hücre sayımı hücrelerin canlılık analizini belirlemek için kullanılmıştır. Bu analizlere göre hücrelerin özgül üreme hızı ve ikilenme süresi logaritmik üreme fazında Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$dx/dt = \mu x \quad (3.1)$$

Eşitlikte x hücre sayısını, μ özgül üreme hızını, t ise zamanı göstermektedir.

MTT analizi için belirlenen hücre grupları üzerindeki büyüme ortamı uzaklaştırılmış, her bir örneğe 600 μ L serumsuz kültür ortamı ve 60 μ L MTT çözeltisi (2.5 mg/mL, PBS içerisinde) ilave edilmiştir. MTT çözeltisi ışık ile etkileşime girdiği için işlemler karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. İlavenin ardından hücreler 3 sa boyunca 37°C'deki inkübatörde kültüre edilmiştir. İnkübasyonun ardından MTT solüsyonu hücreler üzerinden uzaklaştırılmış ve her bir göze 0.04 M HCl içeren 400 μ L izopropanol çözeltisi eklenmiştir. Canlı hücrelerin mitokondrisi varlığında MTT çözeltisi suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüşmektedir. Bu kristaller izopropil alkol/HCl karışımı ile çözülerek elde edilen mor renkli çözeltinin absorbans değeri belirlenir. Çözeltinin absorbans değeri hücre canlılığıyla doğrudan ilgilidir. Doksanaltı gözlü kültür kaplarına her bir gözden 200 μ L alınarak 570 nm dalga boyunda 690 nm referans değeriyle mikroparka okuyucuda (Asys UVM 340, Avusturya) absorbans değeri belirlenmiştir. MTT testi sonucu absorbans değerlerine karşılık zaman grafiği çizilerek büyüme eğrisi oluşturulmuştur. Hemositometrik hücre sayımı için belirlenen hücre grupları üzerinden büyüme ortamı atılmış ve hücrelerin üzerine %0.25'lik (v/v) tripsin/EDTA eklenerek 5 dk inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonucunda enzim

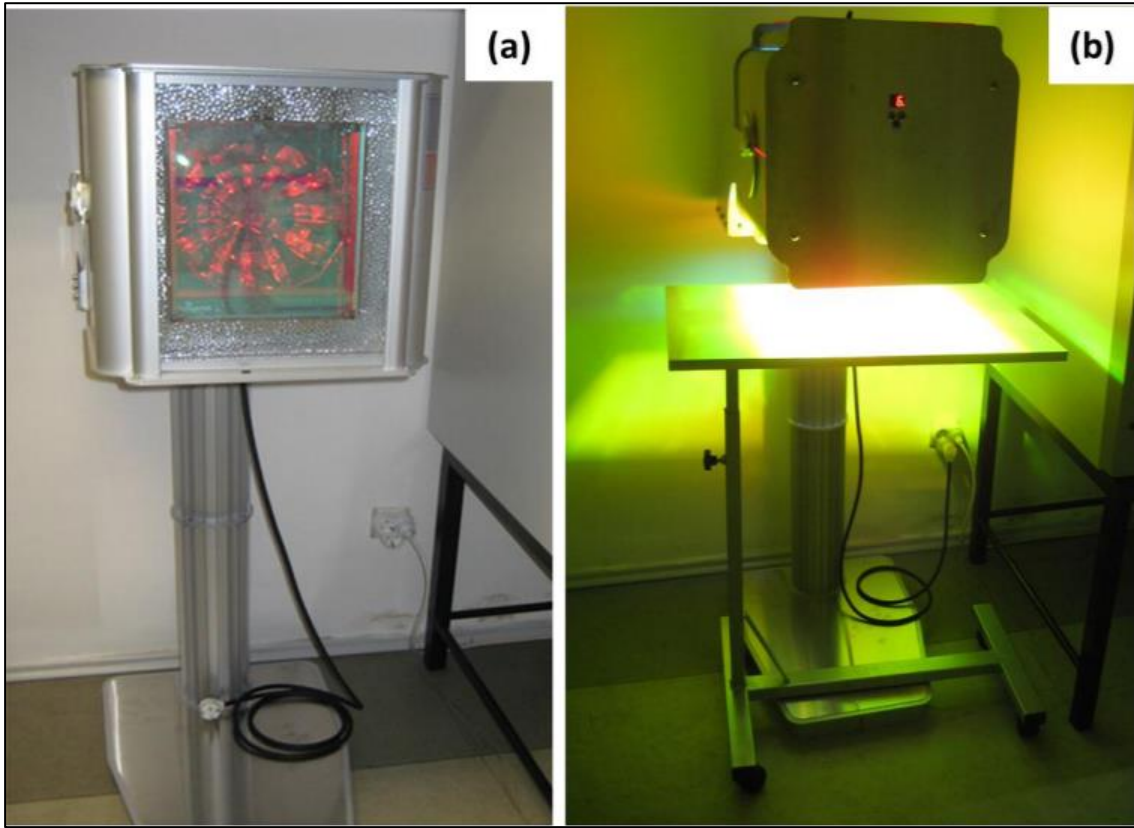
aktivasyonu sağlanmış ve hücreler yüzeyden kaldırılmıştır. Yüzeyden kaldırılan hücrelerin Canlılıklarını belirleyebilmek için için tripan mavisi ile boyama yapılmıştır. Neubauer lamı kullanılarak gerçekleştirilen sayım sonucu ölü hücreler boyayı hücre içine aldıkları için mavi renkte gözlemlenirken, canlı hücreler parlak ve sarı renkte gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında hücre sayısına karşılık zaman grafiği elde edilmiş ve tüm veriler değerlendirilerek göbek kordonu mezenkimal kök hücreler için özgül üreme hızı ve ikilenme süresi hesaplanmıştır.

Hücrelerin morfolojik yapıları incelemek amacıyla kristal viyole ve immünofloresan boyama yapılmıştır. Bu analizlerin yapılacağı günlerde hücreler fikse edilmiştir. Fiksasyon işlemi için hücreler üzerindeki büyüme ortamı atılmış ve DPBS ile iki kez yıkama yapılmıştır. Fiksasyon işlemi için hücreler 4°C’ de 20 dk boyunca 1:1 (v/v) aseton-metanol çözeltisine tabi tutulmuştur. Daha sonra hücrelerin üzerine %0.5’lik (w/v) kristal viyole çözeltisi ilave edilmiş ve 30 dk boyunca oda koşullarında bekletilmiştir. Bu işlemin ardından musluk suyu ile hücrelere zarar vermeden yıkama yapılmıştır. Yıkama sonunda hücreler invert mikroskop (Olympus IX71, A.B.D) altında incelenmiştir. İmmünofloresan boyama yönteminde hücre çekirdeğın görüntülenmesi için DAPI ve hücre sitoplazmasındaki aktin filamentlerinin görüntülenmesi için Alexa Fluor 488 Phalloidin konjuge anti-F-aktin antikoru kullanılmıştır. Bu analizin yapılacağı günlerde hücreler üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılarak PBS ile 2 kez yıkama yapılmıştır. Daha sonra hücreler oda sıcaklığında %4 (v/v) paraformaldehit ile 20 dk muamele edilerek fiksasyon yapılmıştır. Fiksasyonun ardından 3 kez PBS ile yıkama yapılmış ve hücre zar geçirgenliğinin artırılması için %0.1 (v/v) Triton X-100 (PBS içerisinde) ile 10 dk muamele edilmiştir. Bu işlemin ardından %1 (w/v) BSA çözeltisi (PBS içinde) ile 3 kez yıkama yapılmış, %1 (v/v) Alexa Fluor 488 Phalloidin konjuge anti-F-aktin antikoru BSA çözeltisi ile karanlıkta 20 dk ve %0.1 (v/v) DAPI içeren BSA çözeltisi ile karanlıkta 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süre sonunda antikor çözeltisi uzaklaştırılarak BSA çözeltisi ile 3 kez yıkanmıştır. Ardından floresan mikroskop (Olympus IX71, A.B.D) ile görüntüleme yapılmıştır.

3.3 Fotobiyomodülasyonda Kullanılan Işık Kaynağının Özelliği ve Uygulama Yöntemi

Fotobiyomodülasyon uygulamasının hücre aktivitesi ve fonksiyonları üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla led ve lazer ışınlarının kullanımı yaygındır. Sunulan tez çalışmasında bu kaynaklardan daha farklı olarak yakın kızılötesi dalga boyunda ışım

yapan polikromatik bir ışık kaynağı kullanılmıştır (COLLAGENTEX, Tanses Technologies, Kanada). Bu ışık kaynağında, farklı elementlerle katkılandırılmış kuartz plazma ark lambası 600 nm ile 1200 nm dalga boyları arasındaki ışınların geçişine izin veren filtre ile işlevselleştirilmiştir. Işık kaynağı 650 W çıkış gücüne ve lambanın dış yüzeyinden 1 cm uzaklıkta ortalama 130 mW/cm² çıkış yoğunluğuna sahiptir. FDA'dan insan uygulamaları için onay almış bu cihaz ile grubumuzda çok sayıda *in-vitro* ve *in-vivo* çalışma gerçekleştirilmiştir [8,9,75]. Plazma ark ışık kaynağının fotoğrafı Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 1 Tez kapsamında kullanılan ışık kaynağının görüntüleri: (a) genel görüntüsü. (b) uygulama sırasında çekilmiş fotoğrafı.

Fotobiyomodülasyon uygulaması öncesinde, ışık kaynağının tüm yüzeyleri %70 etanol ile temizlenmiş ve masa yüksekliği ayar düğmesi ile istenilen seviyeye getirilmiştir. Hücreler fotobiyomodülasyon uygulamasına hazır hale geldikten sonra zaman değeri, uygulama süresinden 3 dk daha fazla olacak şekilde seçilerek cihaz çalıştırılmıştır. Kültür ortamı içerisinde bulunan fenolik bileşikler, serum ve protein yapıları ışık ile etkileşime girerek yapıları bozulacağından dolayı uygulama sırasında hücreler üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve yerine uygun sıcaklığa ısıtılmış PBS konulmuştur. Uygulama

sonrası hücreler üzerinden PBS uzaklaştırılmış ve %50 taze ortam olacak şekilde kültür ortamı tekrar eklenerek inkübatörde kültüre edilmiştir.

3.3.1 GK-MKH'ler ile Fotobiyomodülasyon Çalışma Koşullarının Belirlenmesine Yönelik Ön Çalışmalar

Plazma ark ışık kaynağı hem elektromanyetik spektrumun görünür dalga boyunu hem de kızıl ve kızılötesi ışınları içerdiği için yüksek seviyelerde enerji oluşturabilmektedir. Bu duruma paralel olarak uygulama sonucu sıcaklık artışı gözlemlenmektedir. Çalışma koşullarının ilk hedefi ışık kaynağının kullanılmasıyla meydana gelen sıcaklık artışının minimum seviyeye indirilmesidir. Çünkü hücreler üzerindeki yüksek sıcaklık farklılıkları hücrelerin metabolik aktivitelerini değiştirebilmekle beraber istenilmeyen sonuçları da doğurabilmektedir. Bu nedenle göbek kordonu mezenkimal kök hücreler için çeşitli mesafe ve sürelerden uygulama öncesi ve sonrasında PBS ortamının sıcaklıkları belirlenmiştir. Çizelge 3.2'de çeşitli mesafe ve sürelerde belirlenen sıcaklık artışları verilmiştir. Çizelge 3.2'de görüldüğü üzere uygulama öncesi PBS sıcaklığı ile uygulama sonrası PBS sıcaklığı arasındaki fark 20 cm mesafe ve 1 dk süre koşullarında en az seviyededir. Bununla birlikte sadece sıcaklık farkı temel alınarak gerçekleştirilen bir çalışma tam anlamıyla doğru sonuçlar vermeyecektir. Uygulanan ışık süresinin bu hücreler üzerinde yeterli olup olmadığını anlamak ve hücrelerin bu duruma vereceği cevapları değerlendirmek adına iki tane ara değer koşulu belirlenmiştir. Bu koşullar, hücreleri düşük seviye de strese sokarak ikincil sinyal yollarını aktive etmeye yönelik olarak belirlenmiştir. Böylelikle hücrelerin mitokondriyal sinyalizasyonu ve proliferasyonu arttırması beklenmiştir. Sıcaklık farkındaki 5-6°C'lik değişikliklerin hücreleri düşük seviyede strese sokabileceği öngörülerek 15 cm mesafe ve 3 dk uygulama süresi ile 20 cm mesafe ve 3 dk uygulama süresi, ara değer koşulları olarak belirlenmiştir. Daha sonra belirlenen bu üç koşulda PBS sıcaklıklarının da artırılması gerektiği düşünülmüş ve uygulama öncesi PBS sıcaklığı arttırılarak yeniden ölçüm yapılmıştır. Bu ölçümlere ait sonuçlar Çizelge 3.3'te belirtilmiştir.

Sonuçta 12-gözlü polistiren hücre kültür kaplarında çoğaltılan hücre gruplarına 15 cm mesafeden 3 dk, 20 cm mesafeden 3 dk ve 20 cm mesafeden 1 dk boyunca gün aşırı ışık uygulaması yapılmış ve hücrelerin bu koşullara vereceği cevabı değerlendirebilmek için MTT analizinden yararlanılmıştır.

Çizelge 3.1 Fotobiyomodülasyon Koşullarının Belirlenmesine Yönelik Ön Çalışmalar

Mesafe (cm)	Süre (dk)	Oda sıcaklığı (°C)	PBS sıcaklığı (°C)	Uygulama sonrası PBS sıcaklığı (°C)
10	5	25	27	36
10	3	25	27	36,5
15	7	25,5	27,5	40,5
15	3	25	27	34
15	2,5	25	27	34
20	5	24	27	37
20	3	25	27	33
20	2,5	25	27	33
20	2	26	27	31
20	1	25	27	29

Çizelge 3.3 PBS Sıcaklığı Arttırıldıktan Sonraki Elde Edilen Veriler

Mesafe (cm)	Süre (dk)	Oda sıcaklığı (°C)	PBS sıcaklığı (°C)	Uygulama sonrası PBS sıcaklığı (°C)
15	3	25	32	36,5
20	3	25	32	36
20	2	25	35	37
20	1	25	35	36,5

3.4 GK-MKH'lere Ait Hücre Tabakalarının Üretimi ve Karakterizasyon Çalışmaları

3.4.1 Hücre Tabakalarının Elde Edilmesi

Üç farklı hücre tipinde de hücre tabakalarının üretilmesi için askorbik asit (AA), yani vitamin C uygulaması (VC) ile ışık uygulamasının (PBMT) ayrı ayrı ve bir arada kullanılmasına karar verilmiştir. Hücre tabakalarının üretilmesi aşamasında üçüncü ve dördüncü pasajlarda göbek kordonu mezenkimal kök hücreleri kullanılmıştır. Hücreler; kontrol (vitamin C ve ışık uygulanmayan), sadece vitamin C uygulanan (VC), sadece ışık uygulanan (PBMT) ve her iki etkinin bir arada olduğu (PBMT+VC) dört gruba ayrılmıştır. Hücre tabakalarının elde edilmesinde gerçekleştirilen çalışmalar şu şekilde özetlenebilir: doyumluğa erişen hücreler 75 cm²'lik hücre kültür kaplarından tripsin/EDTA kullanılarak kaldırılmış ve hücre sayımı yapılmıştır. Hücreler 5x10⁴ hücre/cm² yoğunlukta 12 gözlü kültür kaplarına ekilmiştir. Ekimden 1 gün sonra VC'li ve PBMT+VC'li grupların kültür ortamı 20 µg/mL vitamin C konsantrasyonu içeren ortam ile değiştirilmiş, kontrol ve PBMT'li grubun kültür ortamına vitamin C eklemesi yapılmamıştır. Tüm gruplarda gün aşırı ortam değişimi yapılarak DPBS uygulaması ile hücre tabakaları yüzeyden kaldırılmaya çalışılmıştır. VC'li grupta 5-7. günde, PBMT'li ve PBMT+VC'li grupta 7. günde hücre tabakaları yüzeyden bütün halinde kaldırılmıştır.

3.4.2. Hücre Tabakalarının Karakterizasyon Çalışmaları

3.4.2.1 İmmünofloresan Boyama

Yüzeyden kaldırılan hücre tabakalarının yeni bir kültür kabına aktarıldıktan sonraki morfolojilerini inceleyebilmek için immünofloresan boyama yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen hücre tabakalarına ait çekirdek yapıları DAPI, hücre iskeletindeki aktin filamentleri ise Alexa Fluor 488 Phalloidin konjuge anti-F-aktin antikoru ile boyanmıştır. Bu yöntemde hücre tabakaları üç defa PBS ile yıkanmış ve oda sıcaklığında %4 paraformaldehitte 20 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda fiksasyon çözeltisi uzaklaştırılmış ve üç defa PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücre tabakalarına ait zar geçirgenliğini arttırmak amacıyla %0.2 (v/v) PBS içinde çözünen Triton X-100 10 dk boyunca hücre tabakaları ile muamele edilmiştir. Bu işlemin ardından %1 (w/v) BSA çözeltisi (PBS içinde) ile 3 kez yıkama yapılmış, %1 (v/v) Alexa Fluor 488 Phalloidin konjuge anti-F-aktin antikoru BSA çözeltisi ile karanlıkta 20 dk ve %0.1 (v/v) DAPI içeren BSA çözeltisi ile karanlıkta 5 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır.

İnkübasyonun ardından antikor çözeltisi uzaklaştırılarak BSA çözeltisi ile 3 kez yıkanmıştır. Ardından karanlık ortamda floresan mikroskop (Olympus IX71, A.B.D) ile görüntüleme yapılmıştır.

3.4.2.2. İmmünohistokimya

Yüzeyden kaldırılan hücre tabakalarının hücre dışı matriks değişimlerinin gözlemlenebilmesi ve reseptör bileşenlerinin analiz edilmesi için immünohistokimya boyamaları yapılmıştır. Bu yöntemde hücre tabakaları yüzeyden kaldırıldıktan sonra yeni bir kültür kabına aktararak üç kez PBS ile yıkanmış ve oda sıcaklığında %4 paraformaldehitte 20 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda fiksasyon çözeltisi uzaklaştırılarak üç kez PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücre tabakalarının zar geçirgenliğini arttırmak amacıyla PBS içerisinde çözünen %0.2 (v/v) Triton X-100 ile 10 dk muamele edilmiştir. Hücre tabakalarını bloklama için %10 (v/v) keçi serumu kullanılmış ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süre sonunda keçi serumu uzaklaştırılarak %1 BSA'lı çözeltide (PBS içinde) 5 dk ara ile 3 defa yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra %1 BSA çözeltisi içerisinde seyreltilen primer antikorlar (monoklonal tavşan anti-insan tip I kollajen 1:200, monoklonal tavşan anti-insan fibronectin 1:800 ve monoklonal tavşan anti-insan integrin, 1:200) eklenmiştir. Örnekler 1 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra %1 BSA'lı çözeltide 5 dk ara ile 3 defa yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra BSA'lı çözeltide hazırlanan sekonder antikorlar (1/500 oranında, Alexa Fluor 555 ve Alexa Fluor 488) ile karanlıkta ve oda koşullarında 1 saat inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonucu sekonder antikorlar uzaklaştırılarak BSA'lı çözelti ile 3 defa yıkama yapılmış ve %0.1 (v/v) oranında DAPI eklenerek oda sıcaklığında 5 dk inkübasyon yapılmıştır. Sonrasında BSA'lı çözelti ile üç kez yıkama yapılarak floresan mikroskop altında inceleme yapılmıştır.

3.4.2.3 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi

Hücrelerin hücre dışı matriks elemanlarını, kök hücre ve osteojenik farklılaşma belirteçlerini gen ekspresyonu düzeyinde belirlemek için RT-PCR analizi yapılmıştır. Kültürün 7.gününde hücre tabakaları analiz gününe kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. Kullanılan primerler Çizelge 3.4 de verilmiştir.

RNA İzolasyonu

Kültürün 7. gününde toplanan örneklerden Qiagen RNeasy® Mini Kit ile RNA izolasyonu yapılmıştır. Uygulanan basamaklar şu şekilde özetlenebilir:

- ❖ Analiz günü -80°C 'den çıkarılan örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra her birini üzerine 500 μL TRIzol® eklenmiş 10 dk bekletilmiştir.
- ❖ Süre sonunda örneklerin üzerine faz ayrımının gerçekleşmesi için 100 μL kloroform eklenmiş ve örnekler dikkatli bir şekilde 20 defa alt üst edilmiş ve oda sıcaklığında 3 dk beklenmiştir.
- ❖ Daha sonra örnekler 4°C 'de 10 dk boyunca 13,000 rpm'de santrifüjlenme yapılmış ve üst kısımda bulunan faz yeni bir Eppendorf tüpe aktarılmıştır.
- ❖ Eppendorf tüpüne aktarılan sıvı faz ile aynı miktardaki %70'lik (v/v) etanol RNeasy spin kolona aktarılmış ve 13,000 rpm'de 15 s santrifüj edilerek eppendorf tüpün alt kısmında biriken sıvı dökülmüştür.
- ❖ Kolon üzerine 350 μL RW1 çözeltisi eklenmiş ve 13,000 rpm'de 15 s santrifüj edildikten sonra tüpün altında kalan sıvı kısım dökülmüştür.
- ❖ Daha sonra tekrar 350 μL RW1 çözeltisi spin kolona eklenmiş ve 13,000 rpm'de 15 s santrifüj edilmiştir.
- ❖ Eppendorf tüpün altında kalan sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra spin kolona 500 μL RPE (RPE çözeltisi kit içerisinde konsantre bir şekilde gelmektedir ve 4 hacim %100 etanol eklenerek çalışma çözeltisi hazırlanmıştır) çözeltisi eklenerek 13,000 rpm'de 15 s santrifüjle işlemi gerçekleştirilmiştir.
- ❖ Tüpün altında toplanan sıvı atılmıştır ve spin kolona tekrar 500 μL RPE çözeltisi eklenerek 13,000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmıştır.
- ❖ Son kısımda ise spin kolonda yıkama çözelti kalmaması için toplama tüpü atılarak spin kolon yeni bir santrifüj tüpüne yerleştirilmiştir ve 13,000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- ❖ İşlem sonrası spin kolon yeni bir Eppendorf tüp içerisine yerleştirilerek membran üzerine 30 μL RNase-DNase içermeyen steril su eklenmiş ve 13,000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Bu sayede spin kolon membranında tutunan RNA, su ile membrandan yıkanarak santrifüj tüpünde toplanmıştır.
- ❖ RNA'nın konsantrasyonu ve saflaştırılma oranı Nanodrop (Thermoscientific 2000c, A.B.D) ile belirlenmiştir. İzole edilen RNA'lar analiz gününe kadar 80°C bekletilmiştir.

cDNA Sentezi

Applied Biosystem, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti kullanılarak gerçekleştirilen cDNA sentezinde, reaksiyonların gerçekleşmesi için Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific, ABD) cihazı kullanılmıştır. cDNA sentezi için gerekli olan reaksiyonlar, 25°C’de 10 dk, 37°C’de 120 dk ve 85°C’de 5 dk koşullarında gerçekleştirilmiştir.

RT-PCR Analizi

5xHot Fire Pol[®] Eva Green[®] qPCRMix Plus ya da 5xHot Fire Pol[®] Eva Green[®] qPCR supermix (SolisBioDyne, Estonya) kiti kullanılarak gerçekleştirilen analizde, LightCycler[®] Nano Instrument (Roche, İsviçre) cihazı kullanılmıştır. Bu analize ait koşullar, aktivasyon basamağı 95°C’de 600 sn, denatürasyon basamağı 95°C’de 15 s, primerlerin yapışma sıcaklığı 57 ve 60°C’de 30s ve uzama basamağı 72°C’de 20 s olacak şekilde 45 döngü olarak uygulanmıştır. Referans gen (Housekeeping gene) olarak β -Aktin kullanılmıştır. Yapılan analizin sonuçları bağıl gen ifadesi olarak verilmiştir. Tüm veriler $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre hesaplanmış, sonuçlar kontrol grubunun katları şeklinde verilmiştir.

Çizelge 3.4 RT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri.

Genler	Forward Primer	Reverse Primer
β -AKTİN	5'-GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3'	5'-GATGCCACAGGATTCCATACCC-3'
COL1A1	5'-TCCTGCCGATGTCGC-3'	5'-CAAGTTCCGGTGTGACTCGTG-3'
COL3A1	5'-CTTCTCTCCAGCCGAGCTTC-3'	5'-CCAGTGTTTCGTGCAACC-3'
CX43	5'-TCAAAGTGCCCGAGACTGAC-3'	5'-CCGTGCTCTCAATCCCGTA-3'
ALP	5'-GGAGATGGTATGGGCGTCTC-3'	5'-GGACCTGAGCGTTGGTGTTA-3'
OPN	5'-CACTTTCACTCCAATCGTCCCTAC-3'	5'-ACTCCTTAGACTACCGCTCTTC-3'
OCN	5'-CTTTCTGCTCACTCTGCTG-3'	5'-TATTGCCCTCCTGCTTGG-3'
RUNX2	5'-GCATGGCCAAGAAGACATCC-3'	5'-CCTCGGGTTTCCACGTCTC -3'
OCT4	5'-TGGAGAAGAGAAGCTGG-3'	5'-TCGGCCTGTGTATATCCC-3'
SOX2	5'-TGCAGTACAACCTCATGAC-3'	5'-GGGAGGAAGAGGTAACCA-3'
NANOG	5'-TGTCTTCTGCTGAGATGGC-3'	5'-GGAAGTGGGTTGTTGCCT-3'

3.4.2.4 Hidroksiprolin Analizi

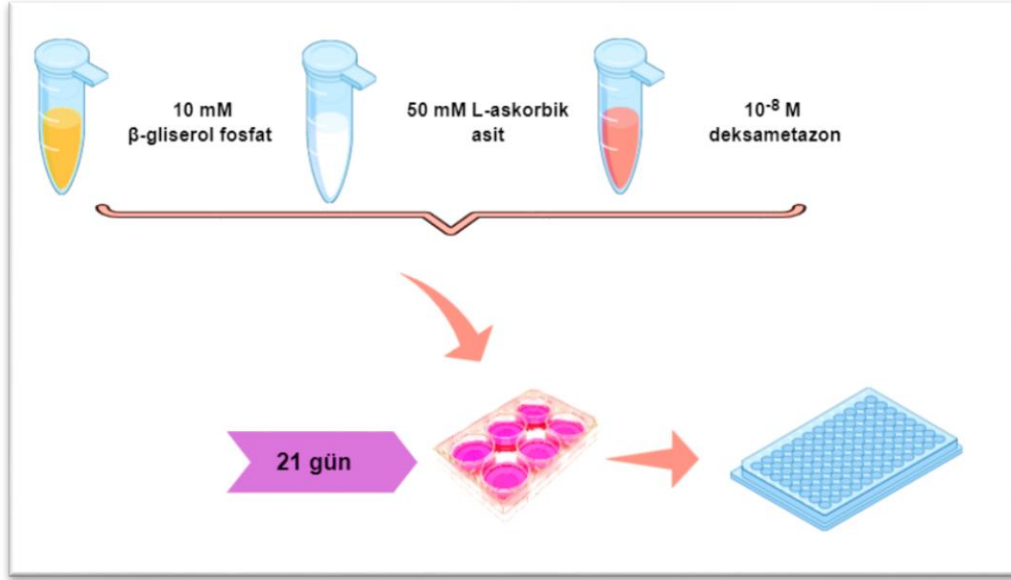
Vitamin C ve fotobiyomodülasyon uygulamasının, hücre tabakalarından sentezlenen kollajen miktarında bir farklılığa sebebiyet verip vermediğini anlamak için hidroksiprolin analizinden yararlanılmıştır. Prolin aminoasidin hidroksilasyonu sonucu oluşan hidroksiprolin, kollajen çapraz bağ yapısına katılan önemli bir aminoasittir. Bu analiz, dokunun alkali hidrolizi ile yapısındaki hidroksiprolinin ölçülmesine baz alır. Örnekler analiz gününe kadar -80°C 'de bekletilmiştir. Hidroksiprolin kiti ile gerçekleştirilen analiz kültürün 7.gününde yapılmıştır. Analiz aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

- ❖ Konsantrasyon farkına sebebiyet vermemek için -80°C 'den çıkarılan örneklerden fazla PBS pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır.
- ❖ Soğuk buz blokları üzerinde olan örnekler 100 μL distile su eklenmiş ve 1 dk sonikatörde parçalanmıştır.
- ❖ Daha sonra örnekler üzerine 100 μL 6N HCl asit eklemesi yapılmıştır. Örneklerin ağzı sıkıca kapatılarak 3 saat boyunca 120°C 'de inkübe edilmiştir.
- ❖ İnkübasyon sonucunda örnekler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10,000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir.
- ❖ Hidroksiprolin standardı kitte belirtilen oranlara göre konulduktan sonra her bir örnekten 10 μL alınarak 96'lı kültür kabına konulmuştur.
- ❖ Örnekler 1.5 saat boyunca 60°C 'de vakumlandıktan sonra örnek başına 6 μL kloramin T konsantrat ve 94 μL oksidasyon tamponu konulmuştur.
- ❖ Bu işlem sonrasında her bir örneğe 50 μL DMAB konsantresi ve 50 μL perklorik asit isopropanol eklenerek 60°C 'de 90 dk bekletilmiştir. (DMAB konsantresi ışıktan etkilendiği için örnekler alüminyum folyo ile kapatılmıştır.)
- ❖ Örneklerin 560 nm dalga boyunda mikropłaka okuyucuda (Asys UVM 340, Avusturya) optik yoğunluğu belirlenmiştir.

3.4.2.5. Osteojenik Farklılaşmanın Belirlenmesi

Göbek kordonu mezenkimal kök hücreler ile elde edilen hücre tabakalarının matriks mineralizasyonunun belirlenmesi için Alizarin red boyaması yapılmıştır. Kültürün 7.gününde kaldırılan hücre tabakaları tripsinize edilerek ekim yapılmış ve hücreler L-askorbik asit, deksametazon ve β -gliserofosfat içereкли osteojenik ortamda 21 gün boyunca kültüre edilmiştir. 21. günde hücreler fikse edilerek Alizarin red boyaması

yapılmıştır. Fiksasyon işleminin ardından hücelere Alizarin red çözeltisi (%2'lik, w/v) eklenmiş, karıştırıcıda ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından çözelti uzaklaştırılmış ve distile su ile 3 kez yıkama yapılmıştır. Elde edilen görüntüler ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Osteojenik farklılaşma deneyinin şematik gösterimi Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşma kapasitesinin belirlenebilmesi için yapılan deneysel çalışmanın şematik gösterimi.

3.4.2.6. Hemotoksilen&Eozin (H&E) Boyama

Hücre tabakalarının histolojik açıdan incelenmesi amacıyla Hematoksilen&Eozin (H&E) boyama yapılmıştır. Hücre tabakaları çok hassas yapıda olmalarından dolayı literatürde yer alan genel boyama protokolü kullanılmamıştır. Hücre tabakaları yüzeyden kaldırıldıktan sonra fikse edilmeden Tissue-Tek® boyama çözeltisine gömülmüş ve sıvı azotta dondurularak 1 gece -80°C'de bekletilmiştir. Daha sonra örneklerden mikrotom ile 5 µm'lik kesitler alınmıştır.

H&E Boyama

Kesit alınan lamellere uygulanan işlemler aşağıda özetlenmiştir.

- ❖ Alınan kesitler 1 dk süre boyunca 2 defa mutlak etanole bırakılmıştır.

- ❖ 30 s boyunca %95'lik (v/v) etanole bırakılan kesitler, %70'lik (v/v) lik etanole alınarak yine 30 sn bekletilmiştir.
- ❖ 1dk süre ile Deiyonize suda bırakılmıştır.
- ❖ Hematoksilen boya çözeltisinde 10 dk bekletilmiştir. (%0.4 lük asetik asit eklemesi yapılmıştır.)
- ❖ 1 dk musluk suyunda bırakılmıştır.
- ❖ 30 s boyunca asit alkole muamele edilen kesitlerden asit musluk suyu ile uzaklaştırılmıştır.
- ❖ Lameller, bir litre distile su içerisinde 2 g sodyum hidrojen karbonat ile 20 g magnezyum sülfat içereğine sahip Scott's tamponuna 10 defa hızlı bir şekilde batırılıp çıkarılmıştır (Kesitlerin rengi mor-mavi renge dönüşür).
- ❖ Kesitler hızlı bir şekilde musluk suyuna tabi tutulmuştur.
- ❖ 1 dk süre ile Eozin çözeltisine bırakılmıştır.
- ❖ 1 dk süre ile mutlak etanole bırakılmıştır.
- ❖ 1 dk süre ile %95'lik (v/v) etanole bırakılmıştır.
- ❖ 1 dk süre ile %95'lik (v/v) etanole bırakılmıştır.
- ❖ 1 dk süre ile mutlak etanole bırakılmıştır.
- ❖ 1 dk süre ile mutlak etanole bırakılmıştır.
- ❖ Ksilene hızlıca batırılıp çıkartılmıştır. (Kapatma çözeltisinin çözünmesi için)

İşlemlerin ardından kesitlerin üzerine kapatma çözeltisi damlatılarak üzeri lamel ile kapatılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kesitler kuruduktan sonra mikroskop altında incelenmiştir.

3.5 BJ Fibroblast Hücre Hattının Karakterizasyon Çalışmaları

BJ insan dermal fibroblast hücre hatlarına ait büyüme ortamı %88 DMEM (yüksek glikoz), %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) L-glutamin, %1 (v/v) P/S'dir. Hücreler bu büyüme ortamında 37°C'de sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmişlerdir. BJ insan dermal fibroblast hücre hattının dondurularak saklanması için gerekli ortam %10 (v/v) DMSO ve %90 (v/v) serum şeklindedir. Karakterizasyon çalışmalarında on dördüncü pasaj hücreleri kullanılmıştır. Hücreleri morfolojik olarak incelemek için faz kontrast görüntüleme, kristal viyole ve immüno Floresan boyama yöntemi kullanılmıştır.

Bu analizler için 24 gözlü kültür kaplarına hücreler 8000 hücre/cm² olacak şekilde ekilmiş ve 14 gün boyunca kültüre devam edilmiştir. Hücrelerin canlılık analizlerini belirlemek amacıyla MTT analizi ve hemositometrik hücre sayımı yönteminden yararlanılmıştır. Bu analizlere ait protokoller “3.2 GK-MKH’lerin Karakterizasyon Çalışmaları” başlığı altında ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

3.6 BJ Fibroblast Hücre Hattı ile Hücre Tabakası Üretimi

Hücre tabakalarının elde edilmesinde kullanılan BJ dermal fibroblast hücre hattı 14. pasajda kullanılmıştır. Hücreler; kontrol, VC’li, PBMT ve PBMT+VC’li olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Hücre tabakalarının elde edilmesinde gerçekleştirilen çalışmalar şu şekilde özetlenebilir: doyumluğa erişen hücreler 75 cm²’lik hücre kültür kaplarından tripsin/EDTA kullanılarak kaldırılmış ve hücre sayımı yapılmıştır. Hücreler 1x10⁵ hücre/cm² yoğunlukta 12 gözlü kültür kaplarına ekim işlemi gerçekleştirilmiş ve ertesi gün VC’li ve PBMT+VC’li grupların kültür ortamı 60 µg/mL vitamin C konsantrasyonu içeren ortam ile değiştirilmiş, kontrol ve PBMT’li gruba vitamin C eklemesi yapılmamıştır. Işık uygulaması 20 cm mesafeden 5 dk ve gün aşırı olarak yapılmıştır. Işık uygulamasının yapıldığı günler yarı yarıya taze besi ortamı ile ortam değişimi yapılmıştır. Daha sonra DPBS uygulaması ile hücre tabakaları yüzeyden kaldırılmaya çalışılmıştır. VC’li ve PBMT+VC’li grupta 7. günde hücre tabakaları yüzeyden bütün halinde kaldırılmıştır. Bu hücre hattında kontrol ve PBMT’li grupta bir kalkış gözlemlenmemiştir.

3.7 BJ Fibroblast Hücre Tabakalarının Karakterizasyon Çalışmaları

VC ve PBMT+VC ile elde edilen hücre tabakaların yüzeyden kaldırılıp başka bir yüzeye aktarıldıktan sonraki morfolojik incelemeleri için immüno Floresan ve Hematoksilen&Eozin boyama yapılmıştır. Hücre dışı matriks genlerinin ekspresyonu RT-PCR analizi ile belirlenmiştir. Elde edilen hücre tabakalarının kollajen içerikleri hidroksiprolin analizi ile belirlenmiştir. Bu analizlerin protokolleri ‘3.4.2 Hücre Tabakalarının Karakterizasyon Çalışmaları’ başlığı altında ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

3.8 HS2 Keratinosit Hücre Hattının Karakterizasyon Çalışmaları

İnsan keratinosit hücre hattı HS2'lerin kültür ortamı % 94 DMEM: F12, %5 (v/v) FBS, %1 (v/v) P/S şeklindedir. Bu büyüme ortamı içerisinde 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilen hücrelerin dondurularak saklanması için gerekli koşullar ise %5 (v/v) DMSO, %95 (v/v) serumlu ortam şeklindedir.

Bu hücrelere ait karakterizasyon çalışmalarında yirmi dördüncü pasaj hücreleri kullanılmıştır. Hücreleri morfolojik olarak inceleyebilmek için kristal viyole ve immünofloresan boyama yönteminden yararlanılmıştır. Bu işlem için gerçekleştirilecek analizlerde hücreler 5000 hücre/cm² olacak şekilde ekilmiş ve 11 gün boyunca kültüre edilmiştir. Hücrelerin canlılık analizlerini belirleyebilmek için MTT analizi ve hemositometrik hücre sayımı yönteminden yararlanılmıştır. Bu analizlere ait protokoller "3.2 GK-MKH'lerin Karakterizasyon Çalışmaları" başlığı altında ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

3.9 HS2 Hücre Hattı ile Hücre Tabakası Üretimi

Hücre tabakalarının üretilmesi için HS2 hücreleri yirmi dördüncü pasajda kullanılmıştır. Hücreler; kontrol, VC, PBMT ve PBMT+VC'li olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Hücreler 5x10⁴ hücre/cm² yoğunlukta 12 gözlü kültür kaplarına ekilmiştir. Ertesi gün VC'li ve PBMT+VC'li grupların kültür ortamı 20 µg/mL vitamin C konsantrasyonu içeren ortam ile değiştirilmiş, kontrol ve PBMT'li gruba vitamin C eklemesi yapılmamıştır. Tüm gruplarda gün aşırı taze besi ortamı ile yarı yarıya değişim yapılmıştır. Daha sonra DPBS uygulaması ile hücre tabakaları yüzeyden kaldırılmaya çalışılmıştır. Fotobiyomodülasyon uygulaması 20 cm mesafeden 5 dk olarak yapılmıştır. VC'li ve PBMT+VC'li grubunda ise 8-9.gün hücre tabakaları yüzeyden bütün halinde kaldırılmıştır.

3.10 HS2 Hücre Tabakalarının Karakterizasyon Çalışmaları

VC ve PBMT+VC ile elde edilen hücre tabakalarının başka bir kültür kanına aktarıldıktan sonraki morfolojik incelemeleri için immünofloresan boyama yapılmıştır. Hücre dışı matriks genlerinin ekspresyonu RT-PCR analizi ile belirlenmiştir. Elde edilen hücre tabakalarının kollajen içerikleri hidroksiprolin analizi ile belirlenmiştir. Bu analizlerin protokolleri '3.4.2 Hücre Tabakalarının Karakterizasyon Çalışmaları' başlığı altında ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

3.11 İstatistiksel Analiz

Gerçekleştirilen çalışmanın sonuçları istatistiksel açıdan GraphPad Prism programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Veriler 3-5 paralel örnek için için ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile belirtilmiştir. Farklı ve ikiden fazla grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanılmış ve *p*-değerinin 0.05 den az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde gerçekleştirilen deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar üç bölümde detaylı bir şekilde açıklanmış ve tartışılmıştır.

İlk bölümde göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin çalışmalarına ait sonuçlar yer almaktadır. Öncelikle bu hücrelere ait karakterizasyon ve optimum fotobiyomodülasyon parametrelerinin belirlenmesine yönelik çalışmalara yer verilmiştir. Ardından vitamin C ve fotobiyomodülasyon varlığında hücre tabaka çalışmalarının elde edilmesi ve elde edilen hücre tabakalarının karakterizasyonları ile ilgili bulgular değerlendirilmiştir.

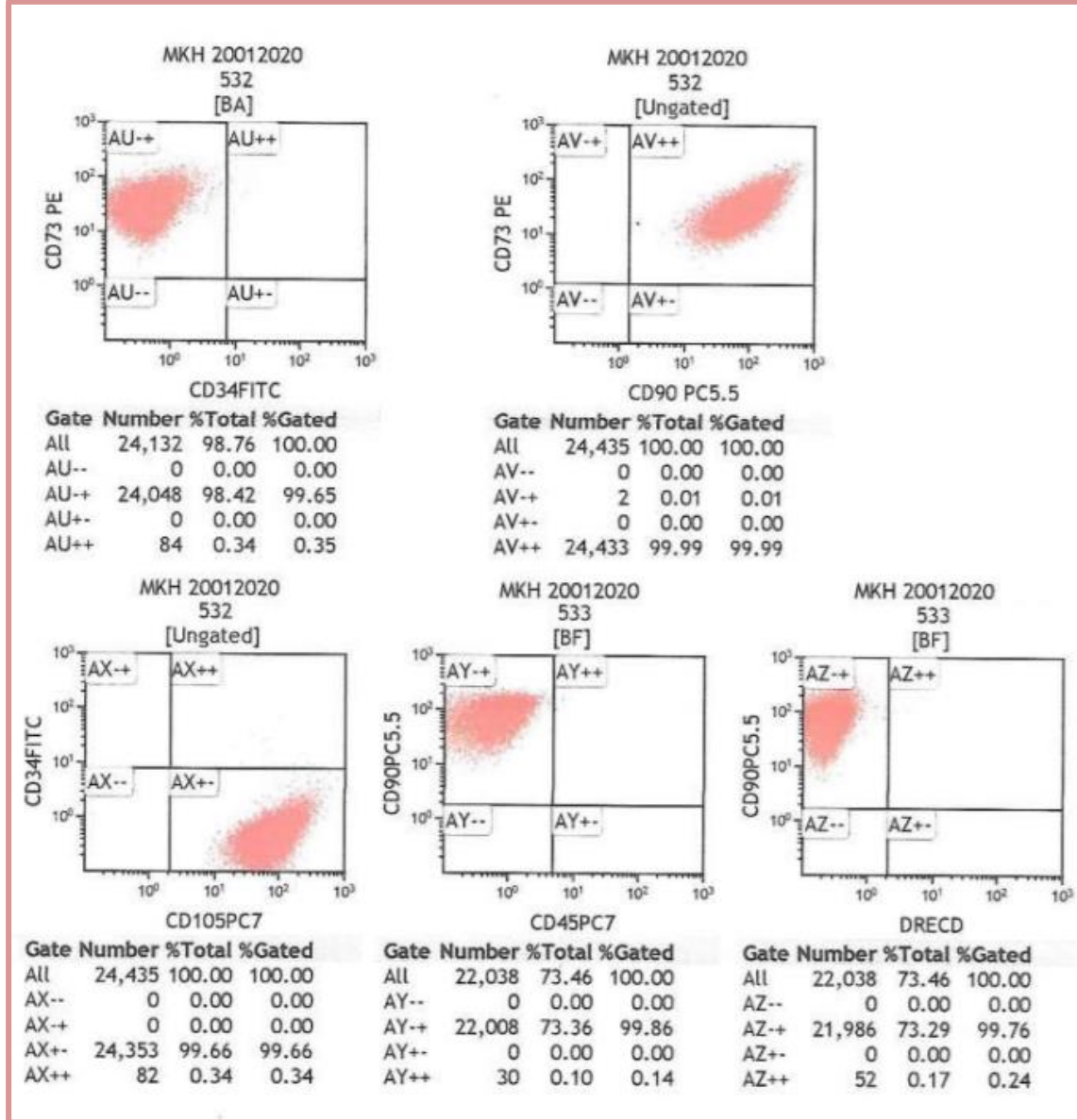
İkinci bölümde BJ insan dermal fibroblast hücre hattı ile yapılan çalışmaların sonuçlarına yer verilmiştir. Öncelikle hücre karakterizasyonu, ardından da hücre tabakalarının eldesi ve karakterizasyonu konusunda elde edilen bulgular sunulmuş ve tartışılmıştır.

Üçüncü bölümde ise benzer çalışmalar HS2 insan keratinosit hücreleri ile yapılmış ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak tartışılmıştır.

4.1 GK-MKH'lerin Karakterizasyon Çalışmaları

Göbek kordonu mezenkimal kök hücreler; göbek kordonun etrafında bulunan Wharton's Jelly'nin (WJ) subkortikal endotelinde bulunur [76]. Buradan izole edilen hücrelerin karakterizasyon çalışmaları için yapılan flow sitometri analizleri, Doku biyoteknoloji kök hücre, biyobanka ve doku mühendisliği laboratuvarı (Ankara) tarafından gerçekleştirilmiş ve sonuçlar tarafımıza paylaşılmıştır. Bu çalışmaya ait sonuçlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçları incelendiğinde; CD73'ün pozitif olduğu, CD34'ün negatif olduğu hücre popülasyonuna bakıldığında çok yüksek oranda CD73'ün pozitif eksprese edildiği, CD34'ün ise neredeyse hiç eksprese edilmediği görülmektedir. Bunun yanı sıra CD73'ün ve CD90'nın pozitif olduğu hücre popülasyonuna bakıldığında her iki yüzey belirtecinin de çok yüksek oranda eksprese edildiği görülmektedir. CD34'ün negatif, CD105'in pozitif olduğu hücre popülasyonunda ise çok yüksek oranda CD105'in pozitif eksprese edildiği görülmektedir. CD90'nın pozitif olduğu, CD 45'in negatif olduğu hücre popülasyonu incelendiğinde yüksek oranda CD90'nın pozitif eksprese edildiği görülmüştür. Uluslararası Hücre Tedavileri Topluluğu (ISCT), mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması için üç önemli özellik belirlemiştir. Bu özellikler; kültür ortamında plastiğe yapışabilir olmalı, *in vitro* şartlarda yağ, kemik, kıkırdak hücrelerine farklılaşabilmeli ve karakteristik hücre yüzey belirteçlerine (CD105+, CD73+, CD90+;

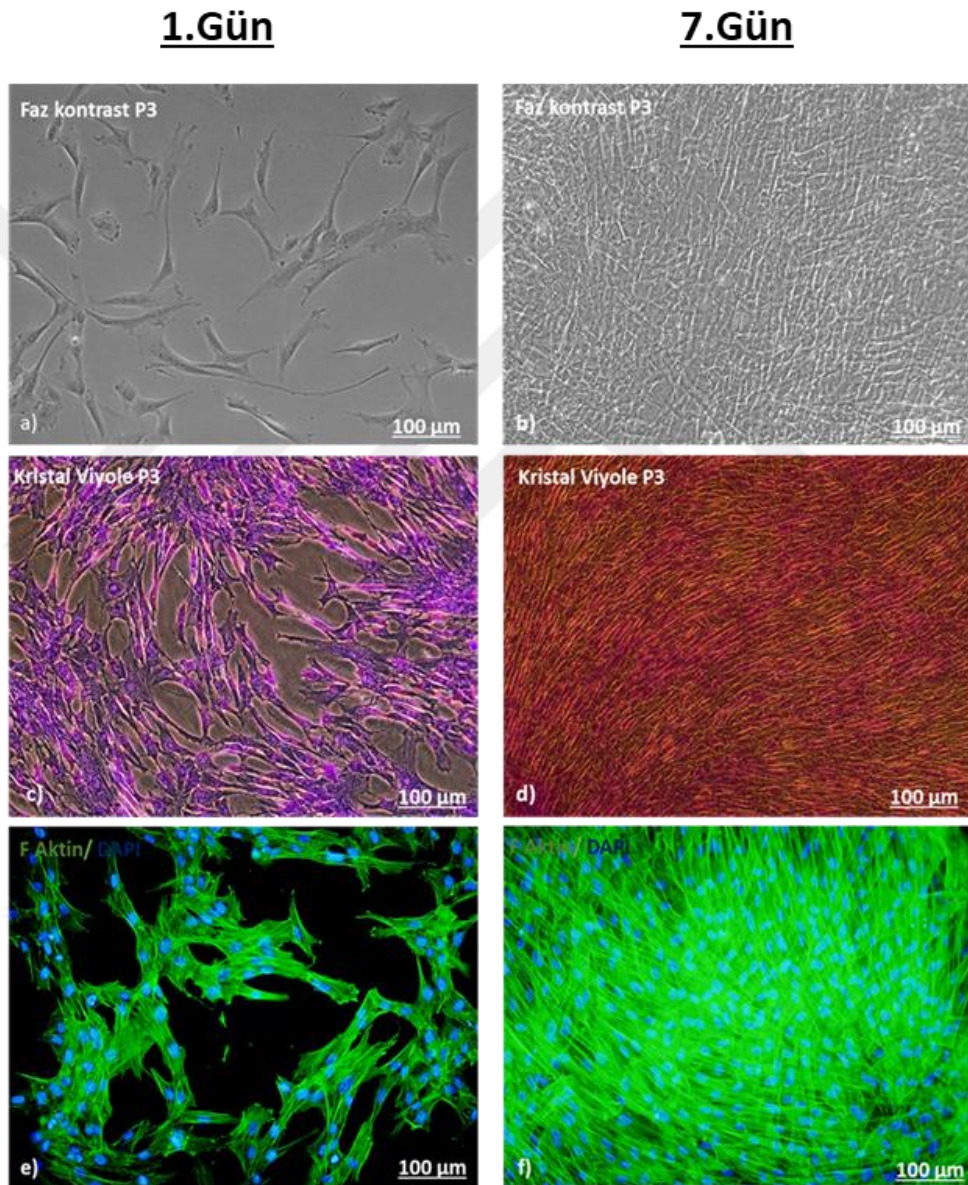
CD45-, CD34-) sahip olmalı şeklinde sıralanabilmektedir [77]. Bu bilgiler ışığında elde edilen verilerle literatürdeki bilgilerin uyumlu olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1 GK-MKH'lere ait flow sitometri analiz sonuçları

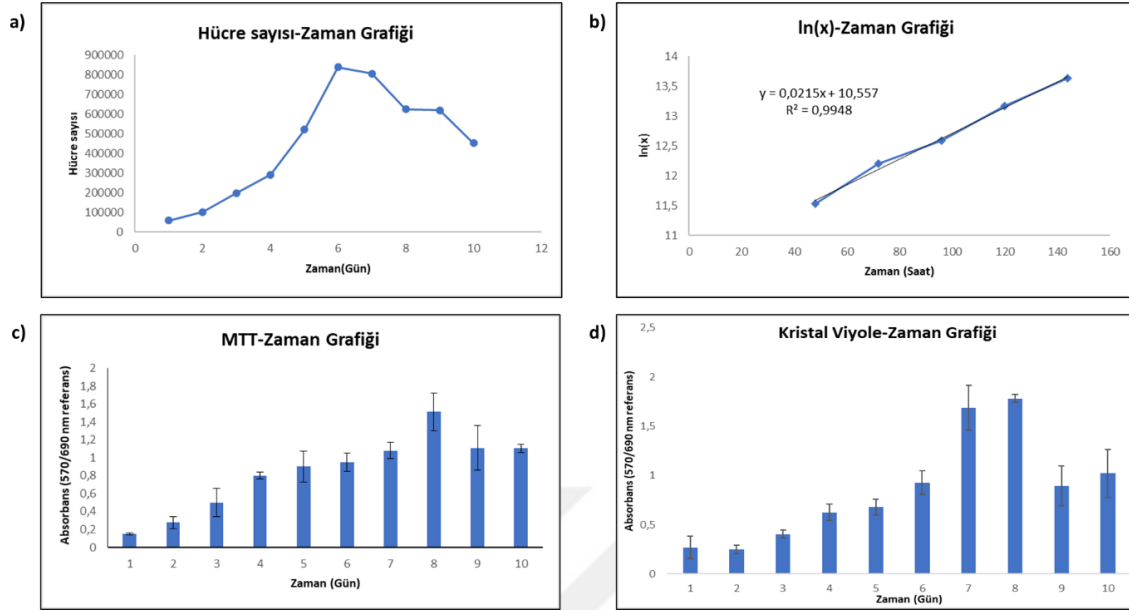
Bununla birlikte tez kapsamında gerçekleştirilen GK-MKH'lerin karakterizasyon çalışmasında hücrelerin morfolojileri ve üreme kinetikleri incelenmiştir. Üçüncü-dördüncü pasajlardaki hücrelerle gerçekleştirilen çalışmada hücre morfolojilerinin incelenmesi amacıyla faz kontrast görüntüleme, kristal viyole ve immüno Floresan antikorlar ile boyama yapılmıştır.

GK-MKH'ler yüzeye bağımlı olarak üreyen ve sitoplazmik uzantıları fibroblast benzeri olan hücrelerdir. Hücrelerde çekirdek ve mikrofilament yapılarını gözlemlemek için immüno Floresan boyama yapılmış ve çekirdekler mavi, F-aktin filamentler yeşil olarak gözlemlenmiştir. Kültürün 7. gününde aktin filamentleri yoğun oranda gözlemlenmiş, hücrelerin sitoplazmik uzantıları ise aynı yönde ve çift kutuplu olarak görülmüştür. Bu çalışmaya ait sonuçlar Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin invert mikroskop [a (1.gün) ve b (7.gün), 20x], kristal viyole boyama [c (3.gün) ve d (7.gün) ,20x], F aktin (yeşil), DAPI (mavi) boyama görüntüleri [e (1.gün) ve f (7.gün), 20x].

GK-MKH'lerin üreme kinetiklerinin incelenmesi için hemositometrik sayım ve MTT analizi yapılmıştır. Bu analizlere ait grafikler Şekil 4.3'te belirtilmiştir.

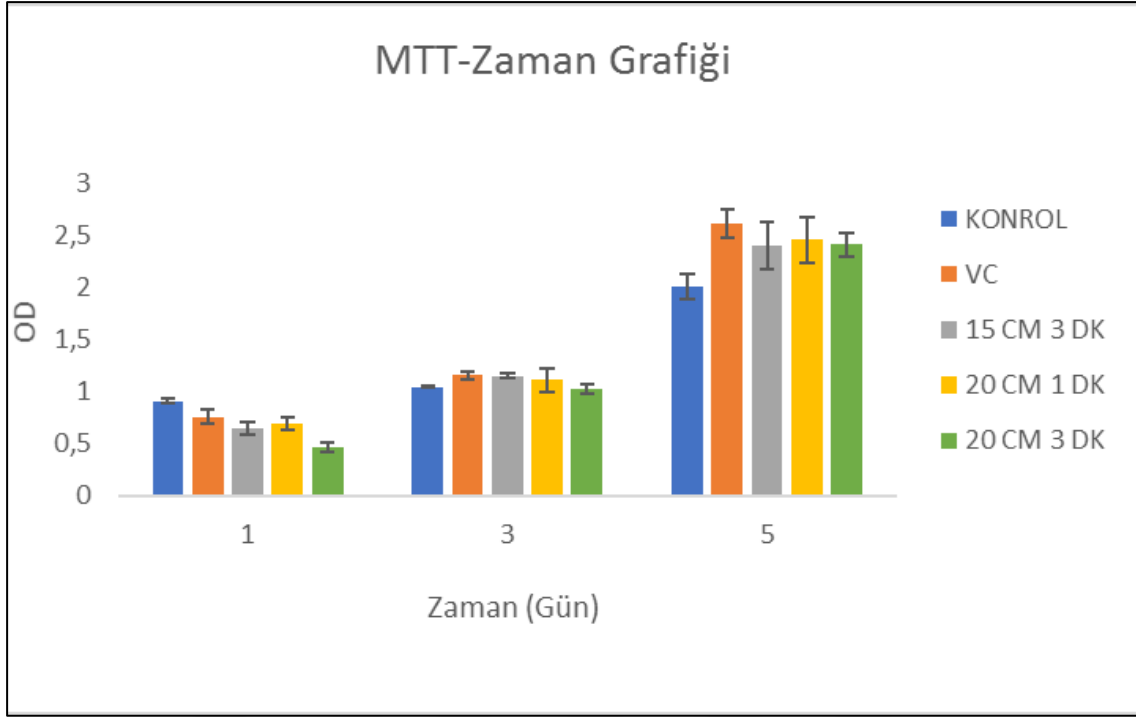


Şekil 4.3 Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelere ait (3. pasaj) a) Hücre sayısı-zaman grafiği, b) ln(x)-zaman grafiği, c) MTT-zaman grafiği, d) SDS'li kristal viyole-zaman grafiği.

Hücrelerin üreme grafiklerinde görüldüğü gibi 0-1. gün arası hücreler “lag” fazında (adaptasyon fazı), 2-6. gün arası logaritmik fazda, 7-8. günde durağan fazda ve 8.günden 10 güne kadar “latel” (ölüm) fazındadır. Hücrelerin özgül üreme hızı (μ), logaritmik faz temel alınarak hesaplanmıştır. Grafiğin eğimi özgül üreme hızını vermektedir. Bu veriler ışığında GK-MKH'lerin özgül üreme hızı 0.023 sa^{-1} , ikilenme süresi ise yaklaşık 32 sa olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar literatürle uyumludur. Literatürde yer alan çalışmalarda göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin ikilenme süresinin yaklaşık 30-35 sa aralığında olduğu rapor edilmiştir [78,79]. MTT-zaman grafiği incelendiğinde hücrelerin 8. güne kadar absorbans değerlerinin arttığı, yani proliferasyonunun arttığı, fakat 8. günden sonra absorbans değerlerinin azaldığı gözlemlenmiştir. SDS'li kristal viyole-zaman grafiğinde de MTT analiz sonuçlarıyla benzer şekilde 8. güne kadar absorbans değerlerinde bir artış gözlemlenirken 8. günden itibaren değerler azalış göstermiştir.

4.2 Fotobiyomodülasyon Parametrelerinin Optimizasyon Çalışmaları

Klinikte fotobiyomodülasyon uygulaması yara iyileşmesinin hızlandırılması için, *in vitro* uygulamalarda ise hücre proliferasyonunun ve farklılaşmasının desteklenmesi amacıyla kullanılmaktadır [80,81]. Sunulan tez çalışması kapsamındaki amaçlardan biri, plazma ark ışık kaynağının hücre tabaka oluşumunu nasıl etkilediğini incelemektir. Bu nedenle GK-MKH'lerin kullanılan ışık kaynağının uygulama koşullarında nasıl etkilendiği incelenmiştir. Hücreler ışık ve vitamin C uygulamasının olmadığı (kontrol), sadece vitamin C uygulamasının olduğu (VC) ve ışık uygulamasının üç farklı koşulda (15 cm 3 dk, 20 cm 1 dk ve 20 cm 3 dk) uygulandığı gruplara ayrılmıştır. Hücrelerin üreme davranışı 5 gün boyunca MTT analizi ile incelenmiştir. MTT analizinin sonuçları Şekil 4.4'te gösterilmiştir. İnceleme sonucunda bazı günlerde anlamlı farklılıklar olsa da hücre üremesini engelleyen ya da apoptoza gitmesine neden olan belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. Işık uygulamasının yapılacağı mesafe, süre ve sıcaklık koşullarının belirlenmesine temel olacak değerler Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te belirtilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde vitamin C ve ışık uygulanan grupların kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılıkta olmamakla beraber daha fazla absorbans değerlerine ulaştığı görülmektedir. Bununla birlikte ışık uygulanan gruplar kendi arasında kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlenmemiştir. Fakat en yüksek absorbans değeri 20 cm mesafe 1 dk süre koşulunda gözlemlenmiştir. Bu sonuca en yakın grup ise 20 cm mesafe ve 3 dk süre koşulundaki gruptur. Bu nedenle iki grup arasında bir ara değer belirlenmiş ve ışık uygulamasının 20 cm mesafe ve 2 dk uygulama koşulu ile 35°C'deki PBS ortamında yapılmasına karar verilmiştir.

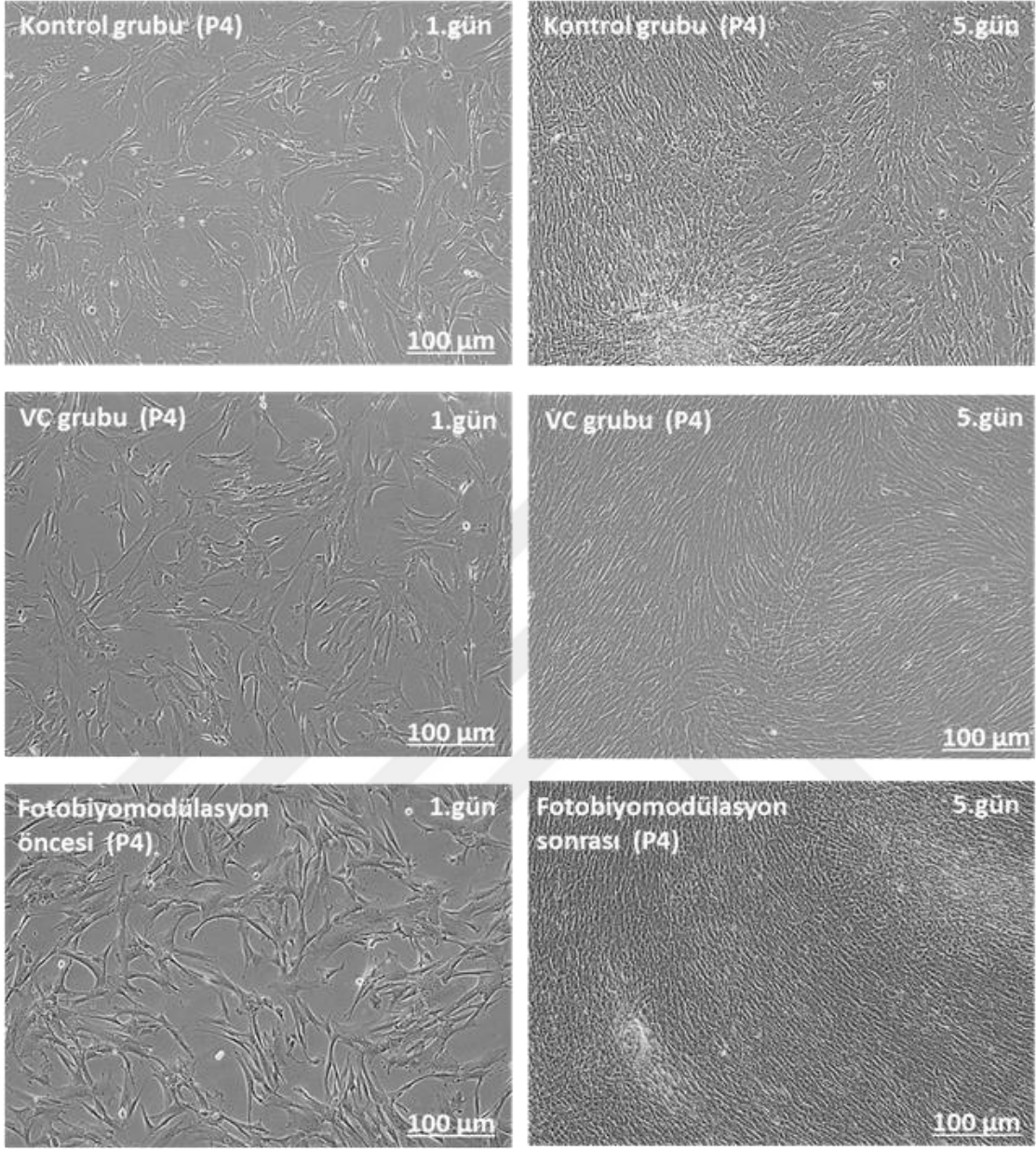


Şekil 4.4 Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin kontrol, VC ve ışık uygulamasının üç farklı koşulda (15 cm 3 dk, 20 cm 1 dk ve 20 cm 3 dk) uygulandığı gruplara ait MTT-zaman grafiği sonuçları.

Işık uygulaması için 20 cm mesafe ve 2 dk süre ile gün aşırı uygulama yapılmasına karar verildikten sonra hücreleri morfolojik olarak incelemek için faz kontrast mikroskop görüntülerinden yararlanılmıştır. Bu çalışmaya ait görseller Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Beşinci gün sonuçları incelendiğinde kontrol grubunda hücrelerin tam olarak yüzeyi kaplamadıkları ancak VC ve PBMT grubunda yüzeyi tamamen kapladıkları görülmüştür. Bu sonuçlar hem vitamin C konsantrasyonunun hem de uygulanan ışığın uygun koşullar olduğu göstermektedir. Sonuçlar MTT analizi sonuçları ile de paralellik göstermiştir.

1.Gün

5.Gün



Şekil 4.5 Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin, kontrol, vitamin C ve ışık uygulanan (20 cm,2 dk) gruplarına ait 1.ve 5. günlük morfolojik görüntüleri (10x).

4.3 GK-MKH Tabakalarının Üretimi

GK-MKH'lerden hücre tabakası elde etmek için ışık uygulaması ve vitamin C takviyesi ayrı ayrı ve birlikte kullanılmıştır. Çalışmalar, Bölüm 3.4'te 'GK-MKH 'lere Ait Hücre Tabakalarının Üretimi ve Karakterizasyon Çalışmaları' başlığı altında da belirtildiği gibi 4 grup ile karşılaştırmalı olarak yürütülmüştür.

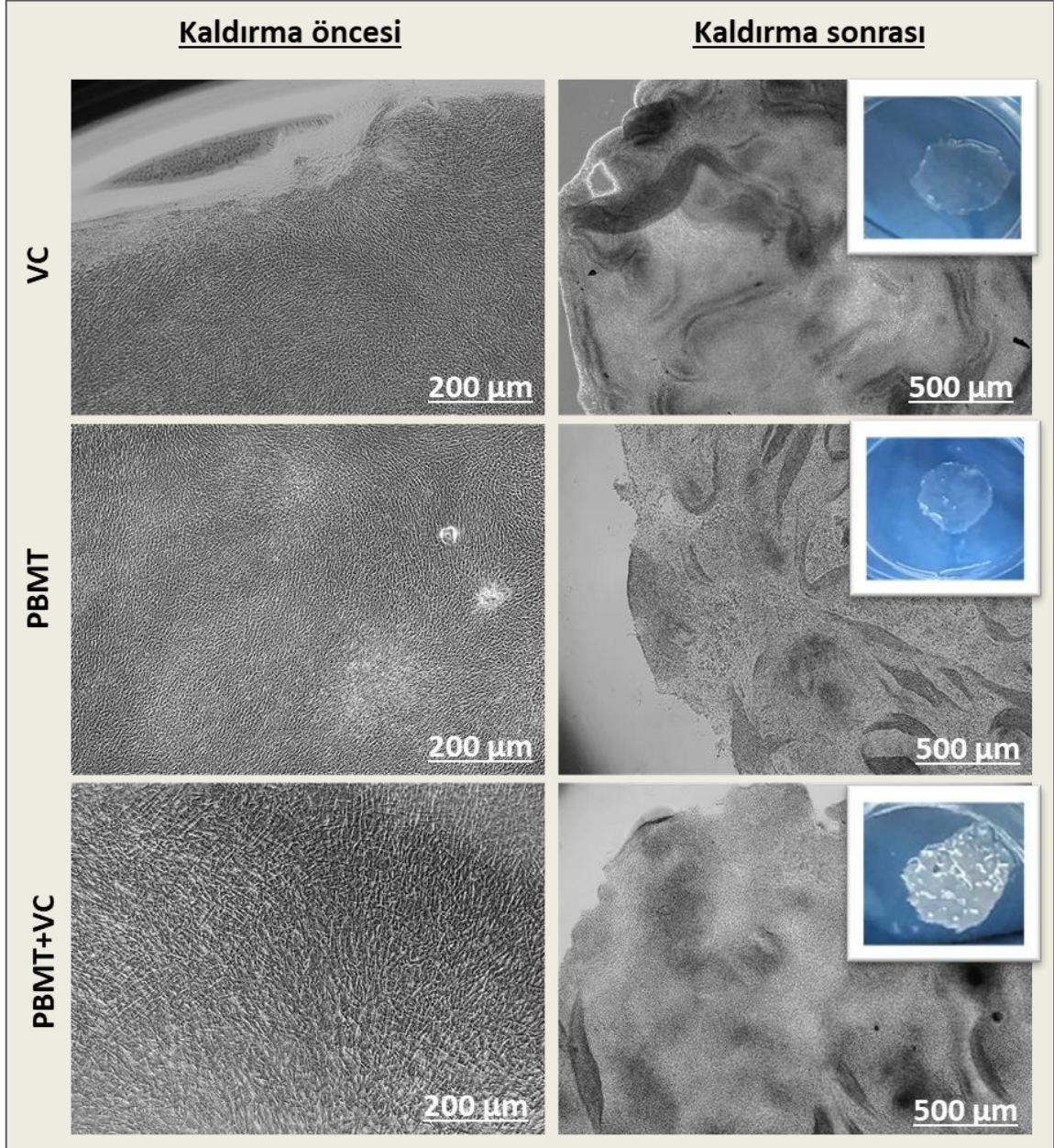
Bunlar; ışık ve vitamin C uygulaması olmayan grup (kontrol), sadece vitamin C uygulaması olan grup (VC), sadece ışık uygulamasının yapıldığı grup (PBMT) ve hem ışık hem de vitamin C uygulamasının olduğu grup (PBMT+VC) olarak belirlenmiştir.

Literatürde vitamin C ile hücre tabaka eldesinin farklı hücre türleri için araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Kültür ortamına vitamin C ilave edilmesi hücrelerin hücre dışı matriks (ECM) sentezini artırır. ECM sentezi, hücre tabakasının bütünlüğü ve hücrelere mekanik desteğin sağlanması açısından önemlidir [82]. Bununla birlikte ECM çözünür faktörler ile hücreler arası etkileşimi düzenlenmesi açısından da doku rejenerasyonunda önemli bir rol almaktadır. Kültür ortamına vitamin C eklenmesi ile elde edilen başka bir hücre tabaka çalışmasında, dental pulpa, göbek kordonu ve kemik iliğinden izole edilen kök hücreler kullanılmış ve elde edilen hücre tabakalarında sadece hücre dışı matriks ve hücreler arası etkileşimin değil aynı zamanda plazma membranı yakınındaki mikrofilyament ve ekzositoz vezikül bölgelerinin de korunduğu ve böylelikle yüksek hücresel aktivitenin sağlandığı rapor edilmiştir [4].

Fotobiyomodülasyon, diğer bir deyişle ışık uygulaması yapılarak hücre tabaka elde edilmesine yönelik literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Pedroni ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada insan dental pulpa kök hücreleri kullanılarak 660 nm dalga boyuna sahip galyum alüminyum arsenit diyot lazeri ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir [83]. Çalışmanın sonuçları incelendiğinde lazer ışığının hücre tabaka oluşumuna müdahale etmediği ancak insan dental pulpa kök hücrelerinin osteojenik farklılaşmasında etkili olduğu görülmüştür.

Sunulan tez çalışmasında, yakın kızılötesi bölgede (600-1200 nm) polikromatik ışık veren ışık kaynağı ile farklı morfolojilere ve kaynaklara sahip hücrelerin tabaka oluşturma potansiyelleri incelenmiştir. Vitamin C ve fotobiyomodülasyon uygulamaları ile elde edilen hücre tabakalarının kültür kabının yüzeyinden kaldırma öncesi ve kaldırma sonrası görüntüleri Şekil 4.6' da gösterilmiştir. Vitamin C grubuna ait hücrelerden 5-7. günlerde, PBMT ve PBMT+VC gruplarına ait hücrelerden ise 6-7. günlerde hücre tabakası elde edilmiştir. Makroskobik ve mikroskobik incelemelerde en kalın ve opak hücre tabakalarının PBMT+VC grubunda olduğu gözlemlenmiştir. Literatürde hem ışık hem de vitamin C uygulamasının hücre proliferasyonu üzerinde etkili olduğu bilinmektedir [84,85]. Bu hücreler için hem ışık hem de vitamin C uygulamasının proliferasyonu arttırdığı ve hücreler arası bağlantıları daha güçlü kıldığı sonucu çıkarılabilmektedir. Bu

hücre grubu için VC ve PBMT grupları arasında mikroskobik ve makroskobik incelemeler sonucu anlamlı farklılıklar gözlemlenmemiştir.

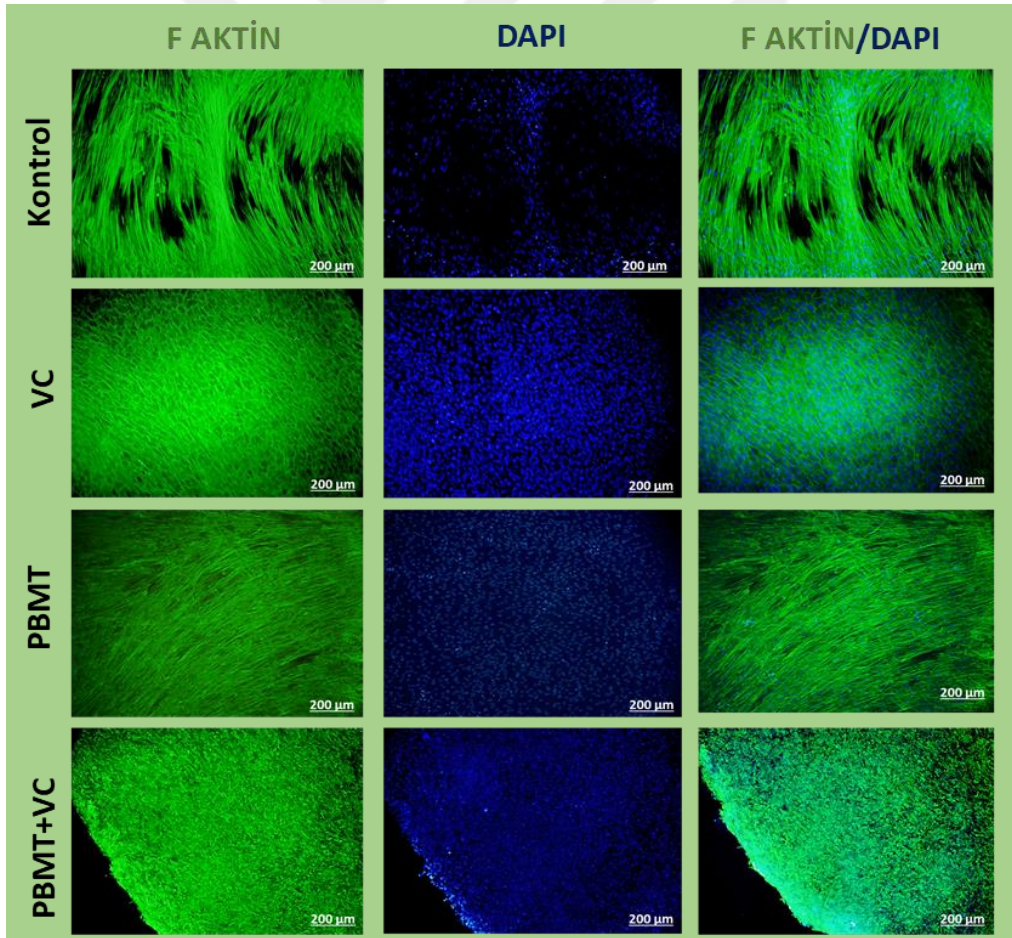


Şekil 4.6 Vitamin C, PBMT ve PBMT+VC gruplarına ait hücrelerin kaldırma öncesi (10x, bar 200 µm) ve kaldırma sonrası (4x, bar 500 µm) invert mikroskop ve makroskobik görüntüleri.

4.4 GK-MKH Tabakalarının Karakterizasyonu

4.4.1 İmmüno Floresan Boyama

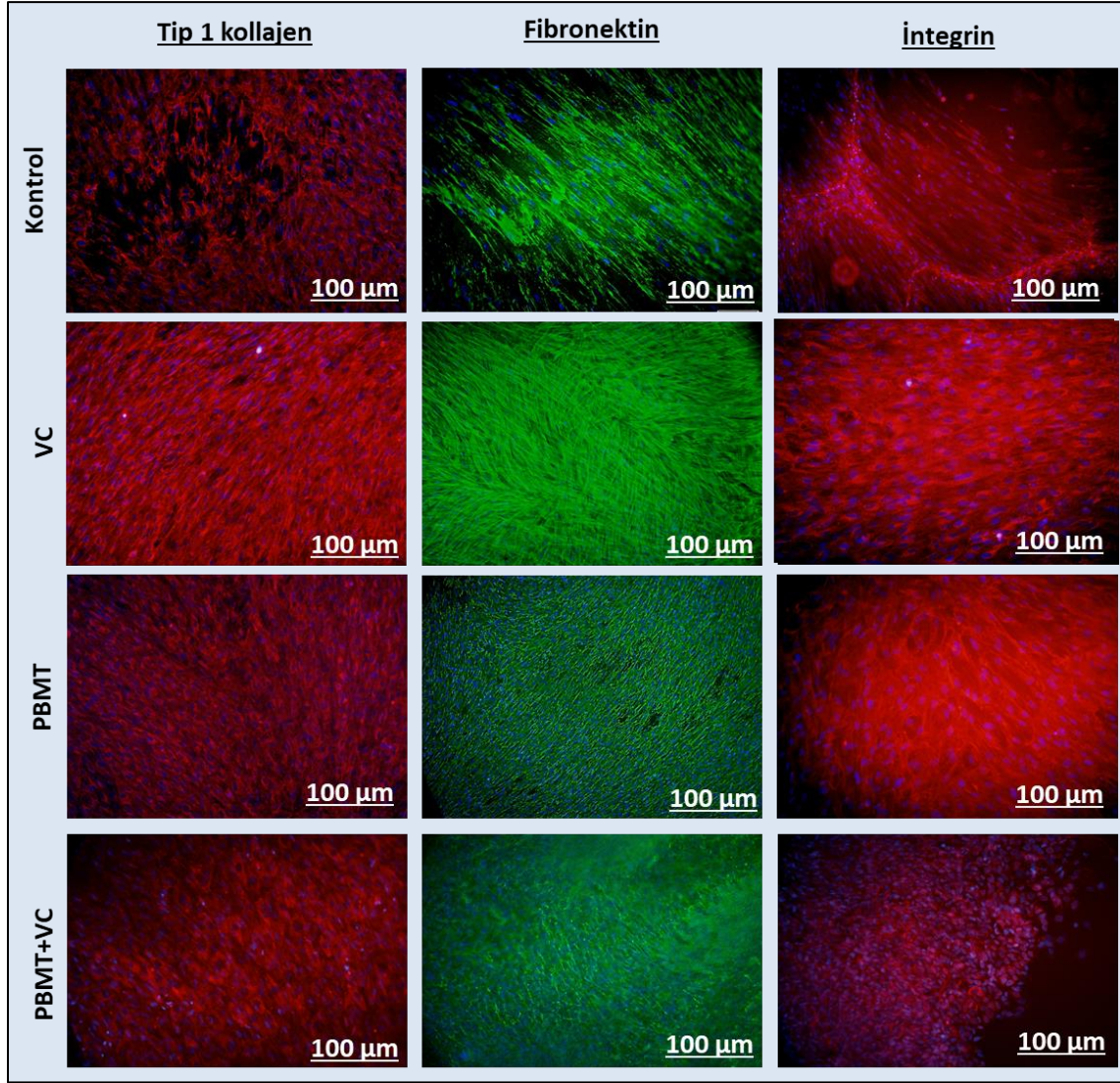
Yüzeyden kaldırılan hücre tabakalarının morfolojilerini daha ayrıntılı gözlemleyebilmek için F aktin/DAPI boyaması yapılmıştır. Hücrelerin F aktin filamentleri yeşile, çekirdekleri ise mavi renge boyanmıştır. Kontrol grubu diğer üç gruba kıyaslandığında hem F aktin filamentlerinin hem de çekirdek sayısının daha az olduğu net bir şekilde görülmektedir. Özellikle PBMT+VC grubuna ait hücre tabakalarında F aktin filamentlerinin daha ince, uzun ve iğsi morfolojide olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte bu gruba ait çekirdek sayısı da diğer gruplara kıyasla daha yoğun gözlemlenmiştir. Ayrıca kültür ortamına vitamin C eklenmesinin kollajen sentezini tetiklediği ve hücre proliferasyonunu arttırdığı için vitamin C grubu ve PBMT+VC grubundaki hücre tabakalarının PBMT grubuna göre daha sıkışık ve kalın oldukları gözlemlenmiştir.



Şekil 4.7 Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelere ait immüno floresan boyama görüntüleri (10x, bar 200µm).

4.4.2 İmmünohistokimyasal İnceleme

Kaldırılıp başka bir kültür kabına aktarılan hücre tabakalarının protein yapılarını, ECM bileşenlerini ve reseptörlerini analiz etmek için immünohistokimyasal inceleme yapılmıştır. Bu analizde tip 1 kollajen, fibronektin ve integrin proteinleri incelenmiştir. Bu proteinlerin incelenmesinin başlıca sebebi hücre dışı matriks yapısının temel bileşenlerinin yapısını oluşturmaktan kaynaklanmaktadır. Özellikle tip 1 kollajen ECM 'de en bol bulunan proteindir ve hücre yüzeyleri, diğer hücre dışı matris molekülleri ve büyüme ve farklılaşma faktörleri ile etkileşime girerek dokunun bütünlüğünü korumaya yardımcı olur [86]. Fibronektin, hücreleri ECM'deki kollajen lifleriyle birleştiren ve hücrelerin ECM'den geçmesine izin veren glikoproteinlerdir. Fibronektinler, kollajen ve integrinleri bağlayarak hücre iskeletini düzenlenmeye yardımcı olur [87]. İntegrinler ise hücreleri fibronektin ve laminin gibi ECM yapılarına ve diğer hücrelerin yüzeyindeki integrin proteinlerine bağlayan spesifik hücre yüzey yapışma proteinleridir [88]. Şekil 4.8 hücre tabakalarının immünohistokimyasal analizinin sonuçlarını göstermektedir. Her üç grupta da (VC, PBMT ve PBMT+VC) çalışılan tüm proteinler (Tip 1 kollajen, fibronektin ve integrin) için pozitif reaksiyonlar gözlemlenmiştir. Bu proteinler hücrelerde olduğu kadar hücre dışı matrikste de gözlemlenmiştir. Kontrol grubu her üç grupla karşılaştırıldığında proteinlerin dağılımı ve boyama miktarları arasında anlamlı bir farklılık görülmektedir. Bununla birlikte VC grubunun tip 1 kollajen miktarı PBMT ve PBMT+VC gruplarına göre bir miktar daha yoğun gözlemlenmiştir. Fakat fibronektin ve integrin proteinleri için PBMT +VC grubunun VC ve PBMT gruplarına göre bir miktar daha yoğun olduğu gözlemlenmiştir. Fibronektin ve integrin proteininin dağılımı ve boyanma miktarı açısından VC ve PBMT grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlar literatürle uyumludur. Literatürde vitamin C'nin hücredeki kollajen sentezinde etkili olduğu bildirilmiştir [89]. Ayrıca pedroni ve ark; yaptığı bir çalışmada lazer ışık kaynağının insan dental pulpa kök hücreleri üzerinde fibronektin ve integrin sentezini arttırdığı rapor edilmiştir [90].

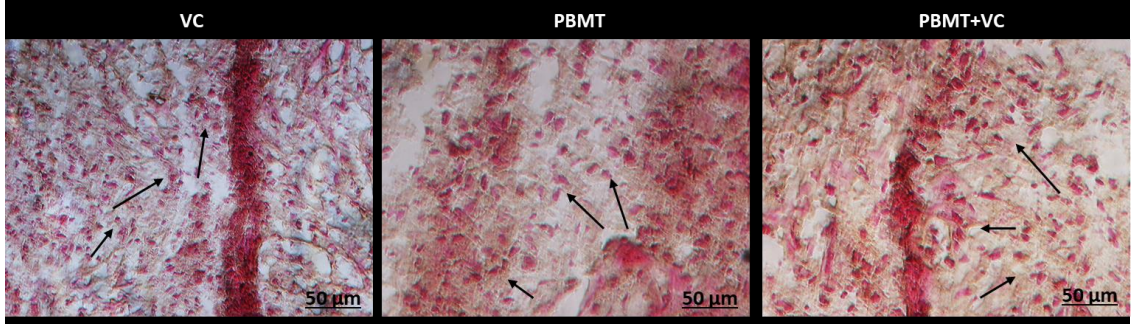


Şekil 4.8 Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelere ait immünohistokimya boyamaları (20x). Kollajen ve integrin boyama için sekonder antikor Alexa Fluor® 555 (kırmızı) ve fibronektin boyama için Alexa Fluor® 488 Konjugate (yeşil) kullanılmıştır.

4.4.3 Hematoksilen/Eozin Boyama

Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin 5 µm'lik yatay kesitler alınarak elde edilen Hematoksilen&Eozin boyama fotoğrafları Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Hematoksilen bazik bir boyadır ve bu nedenle hücrenin asidik kısımlarını oksijenle tepkimeye girerek mavi-mor renge boyar. Eozin ise asidik bir boyadır ve hücrenin bazik kısımlarını (sitoplazma ve protein birikimi olan kısmı) pembe-kırmızı renge boyamaktadır. Bu veriler ışığında VC, PBMT ve PBMT+VC gruplarına ait sonuçlar kıyaslandığında VC grubunun çekirdek yoğunluğu diğer iki gruba göre anlamlı olmamakla birlikte daha

yoğun gözlemlenirken, PBMT+VC grubunun sitoplazma yoğunluğu diğer iki gruba göre bir miktar daha yoğun gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar daha önce gerçekleştirilen immüno Floresan ve immünohistokimya boyama sonuçlarıyla da benzerlik göstermektedir.



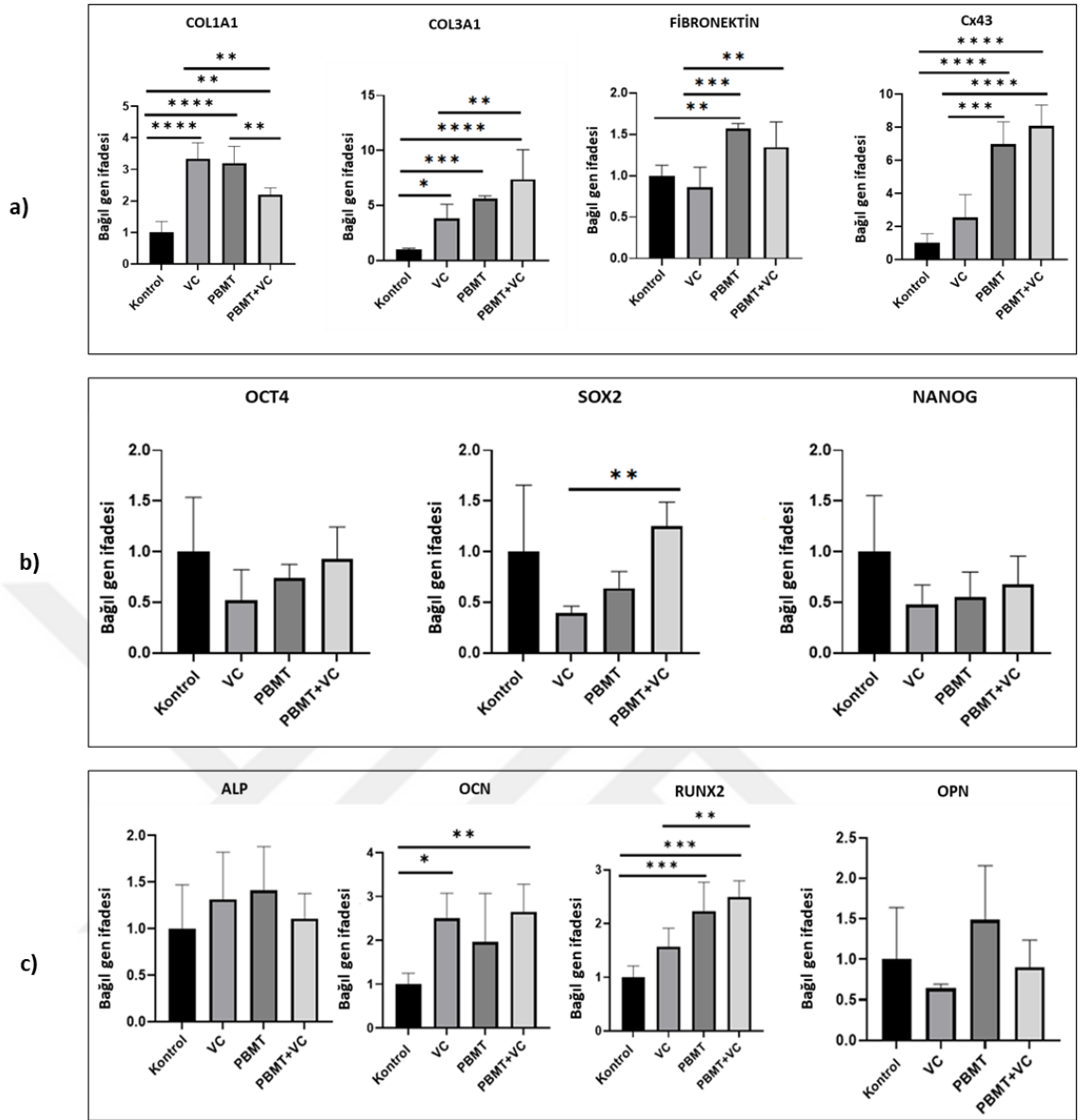
Şekil 4.9 Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin yatay kesitlerine ait H&E boyamaları: 40x, bar 50µm (Siyah oklar hücrelere ait çekirdek yapılarını göstermektedir.)

4.4.4 RT-PCR Analizi

Kültürün 7.gününde ECM, kök hücre ve osteojenik belirteçlerin gen ekspresyon düzeyini belirlemek amacıyla RT-PCR analizi yapılmıştır. ECM belirteçleri olarak; tip 1 ve tip 3 kollajen (COL1A1, COL3A), fibronektin ve gap junction (Cx43) genlerinin, kök hücre belirteçleri olarak; OCT4, SOX2 ve NANOG genlerinin, osteojenik belirteç olarak ise ALP, OPN, OCN ve RUNX2 genlerinin bağıl ifade düzeyleri incelenmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde tüm ECM elemanlarının bağıl gen ifadesinin kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır. RT-PCR analiz sonuçları Şekil 4.10’da gösterilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde özellikle COL1A1 geninde VC grubu, tüm gruplara göre daha yüksek gen ifade düzeyine ulaşmıştır. Tip 1 kollajen sentezinde vitamin C’nin önemli bir rol aldığı literatürde yer almaktadır [91]. Dolayısıyla bu sonuç literatürle uyum içerisindedir. COL3A1 ve fibronektin geninin ekspresyonu incelendiğinde ışık uygulanan grupların (PBMT ve PBMT+VC), VC grubuna göre daha yüksek oranda eksprese edildiği gözlemlenmiştir. Cx43 geni hücreler arası bağlantıda görev almakta olup, en yüksek gen ifade düzeyi PBMT+VC grubunda gözlemlenmiştir. Bu sonuç makroskobik olarak daha kalın ve opak gözlemlenen PBMT+VC grubuna ait hücre tabakalarının moleküler düzeyde de benzer sonuçlar verdiğinin kanıtıdır.

Kök hücre belirteçlerinin bağıl gen ifadesi OCT4 ve NANOG'da kontrol grubuna göre azalmalarına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. SOX2 geninde ise kontrol grubu ile PBMT+VC grupları arasında anlamlı farklılık varken VC ve PBMT gruplarının kontrol grubuna kıyasla bağıl gen ifade düzeyi daha düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır.

Osteojenik belirteçlere bakıldığında ALP geninde kontrol grubuna göre VC, PBMT ve PBMT+VC grubunda bağıl gen ifade düzeyinde bir artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. OCN ve RUNX2 genlerinin bağıl gen ifade düzeyleri incelendiğinde ise VC ve PBMT+VC gruplarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir artış bulunmuştur. OPN geninin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte VC ve PBMT+VC gruplarında azalış, PBMT grubunda ise artış gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar literatürdeki sonuçlarla karşılaştırıldığında bazı farklılıklar gözlemlenmiştir. Örneğin Wei ve ark., [21] yaptığı çalışmada vitamin C konsantrasyonunun farklı kök hücreler üzerinde tabaka oluşturma potansiyeli incelenirken, vitamin C'nin hem OCT4, SOX2, NANOG gibi kök hücre gen ekspresyonlarını, hem de RUNX2, ALP, OCN gibi osteojenik markerların gen ifade düzeylerini arttırdığı rapor edilmiştir. Pedroni ve ark., [83] yaptığı başka bir çalışmada lazer ışık kaynağı ve vitamin C'nin OCT4 ve Mitofilin üzerindeki gen ifade düzeylerini arttırdığı rapor edilmiştir. Bununla birlikte, Zhilong Li ve ark., [92] tarafından yapılan bir çalışmada mezenkimal kök hücrelerin art arda pasajlanmasıyla morfolojik değişikliklere uğradığı rapor edilmiştir. ALP boyaması ve çeşitli analizlerle mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara spontan olarak farklılaştığı ve bu farklılaşmanın sonucu olarak kolajen tip I, ALP, kemik sialoproteini (BSP), osteokalsin (OCN) ve osteopontin (OPN) gibi osteogenez ile ilişkili genlerin ekspresyonunun kademeli olarak arttığı, buna karşın kök hücre pluripotensi ve proliferasyonu ile ilişkili genlerin ekspresyonunun (Oct4, Sox2, Nanog, REX1, CD133 ve TERT) belirgin şekilde azaldığı bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Zhilong Li ve ark., [93] tarafından yapılan sonuçlarla benzerlik göstermektedir.



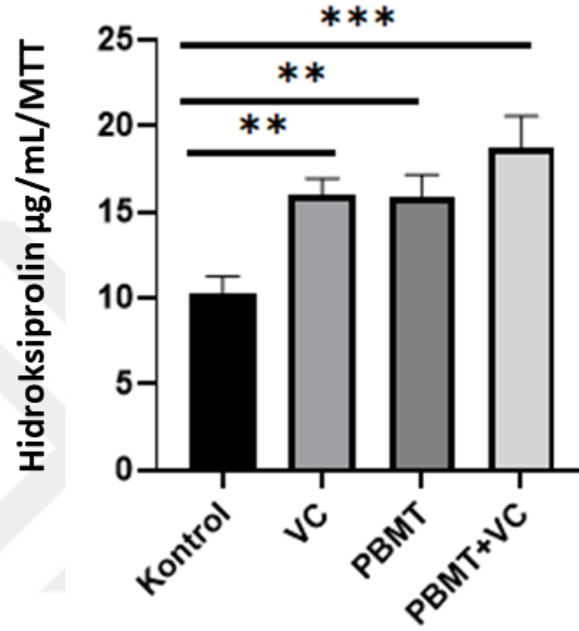
Şekil 4.10 Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin çalışılan tüm genlerine ait RT-PCR sonuçları. İstatistiksel olarak önemli farklılıklar sembollerle gösterilmiştir; $n = 5$,

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$. VC, PBMT ve PBMT+VC grupları kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

4.4.5 Hidroksiprolin Analizi

Elde edilen hücre tabakalarından sentezlenen kollajen miktarı hidroksiprolin analizi üzerinden belirlenmiştir. Kültürün 7.gününde fiks edilen hücrelerden yapılan analizde hidroksiprolin kiti kullanılmıştır. Bu analizin sonuçları Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde, Vitamin C (VC) ve ışık uygulamasının (PBMT)

yapıldığı gruplarda, ışık ve vitamin C uygulamasının olmadığı gruba göre (kontrol) istatistiksel anlamlılık gözlemlenmiştir. Bununla birlikte hücre tabakalarından elde edilen en yüksek kollajen içeriğine sahip olan grubun PBMT+VC grubuna ait olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.11 Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin hidroksiprolin analizlerinin sonuçları. İstatistiksel olarak önemli farklılıklar sembollerle gösterilir; $n = 3$; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ ve $***p < 0.001$.

Sonuçlar literatürle uyumludur. Wei ve ark., yaptığı bir çalışmada [4] periodontal ligament kök hücreler ile muamele edilen vitamin C'nin; hücre dışı matriks, tip I kollajen, fibronektin ve integrin $\beta 1$ gibi hücre belirteçlerinin yüksek oranda eksprese edildiği bildirilmiştir. Otterço ve ark.,'nın [72] yaptığı bir çalışmada ise 670 nm dalga boyundaki galyum arsenit diyot lazer kullanılarak *in vivo* bir deney düzeneği hazırlanmıştır. Sıçanlar üzerinde yapılan deneyler sonucu tip 1 kollajen miktarının lazer uygulanan grupta daha yüksek olduğu bildirilmiştir [93]. Pedroni ve ark., tarafından yapılan çalışmada ise 660 nm dalga boyunda galyum arsenit diyot lazer kullanılarak insan dental pulpa kök hücreleri üzerinde lazer ışınının etkisi araştırılmış ve sonuçta tip 1 kollajen ekspresyonunun lazer ışınli grupta kontrol grubuna göre artışın olduğu rapor edilmiştir [83].

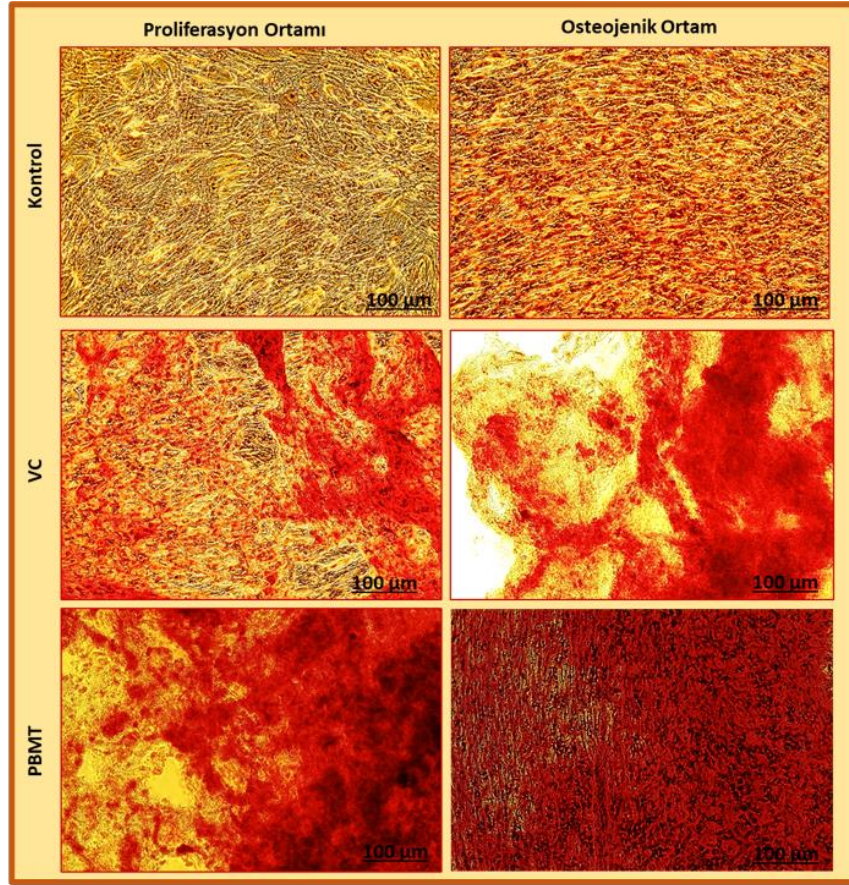
4.4.6 Osteojenik Farklılaşma

Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşma kapasitelerinin ve matriks mineralizasyonunun belirlenebilmesi için alizerin red boyaması yapılmıştır. Bu çalışma için kültür ortamına β -gliserol fosfat, L-askorbik asit ve deksametazon eklenmiş ve 21 gün boyunca hücreler kültüre edilmiştir. Deneysel gruplar aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

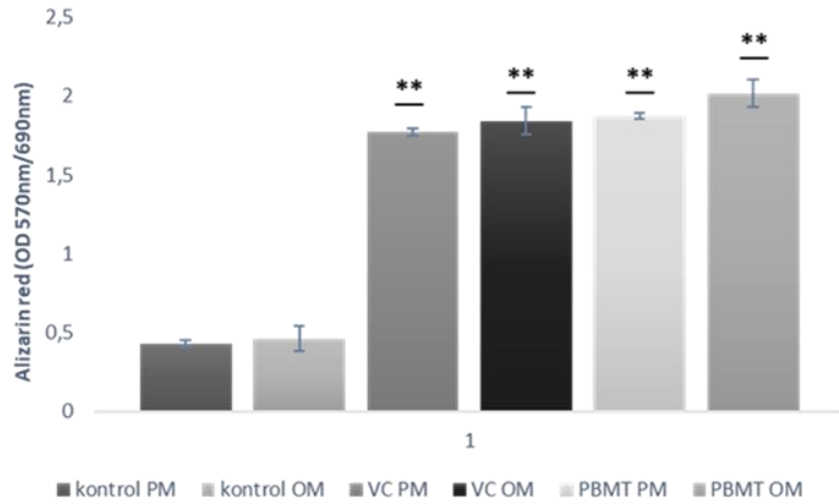
- ❖ Proliferasyon ortamında kültüre edilen hücreler ile oluşturulan kontrol grubu
- ❖ Osteojenik ortamda kültüre edilen hücreler ile oluşturulan kontrol grubu
- ❖ Proliferasyon ortamında kültüre edilen hücreler ile oluşturulan VC grubu
- ❖ Osteojenik ortamda kültüre edilen hücreler ile oluşturulan VC grubu
- ❖ Proliferasyon ortamında kültüre edilen hücreler ile oluşturulan PBMT grubu
- ❖ Osteojenik ortamda kültüre edilen hücreler ile oluşturulan PBMT grubu

Çalışma sonuçları incelendiğinde proliferasyon ortamında kültüre edilen hücreler ile oluşturulan kontrol grubu en az farklılaşma gösterirken, osteojenik ortamda kültüre edilen hücreler ile oluşturulan PBMT grubu en fazla farklılaşma göstermiştir. Çalışmaya ait sonuçlar Şekil 4.12 de gösterilmiştir. Pedroni ve ark., [83] tarafından gerçekleştirilen çalışmada 660 nm dalga boyuna sahip galyum alüminyum arsenit diyot lazeri kaynağı kullanılarak fotobiyomodülasyon uygulaması yapılmış ve sonuçta lazer ışık kaynağı ile muamele edilen grubun diğer gruplara kıyasla osteojenik farklılaşmasının daha yüksek seviyede olduğu bildirilmiştir. Elde edilen veriler literatürdeki bu bilgiyle uygunluk göstermektedir.

a)



b)



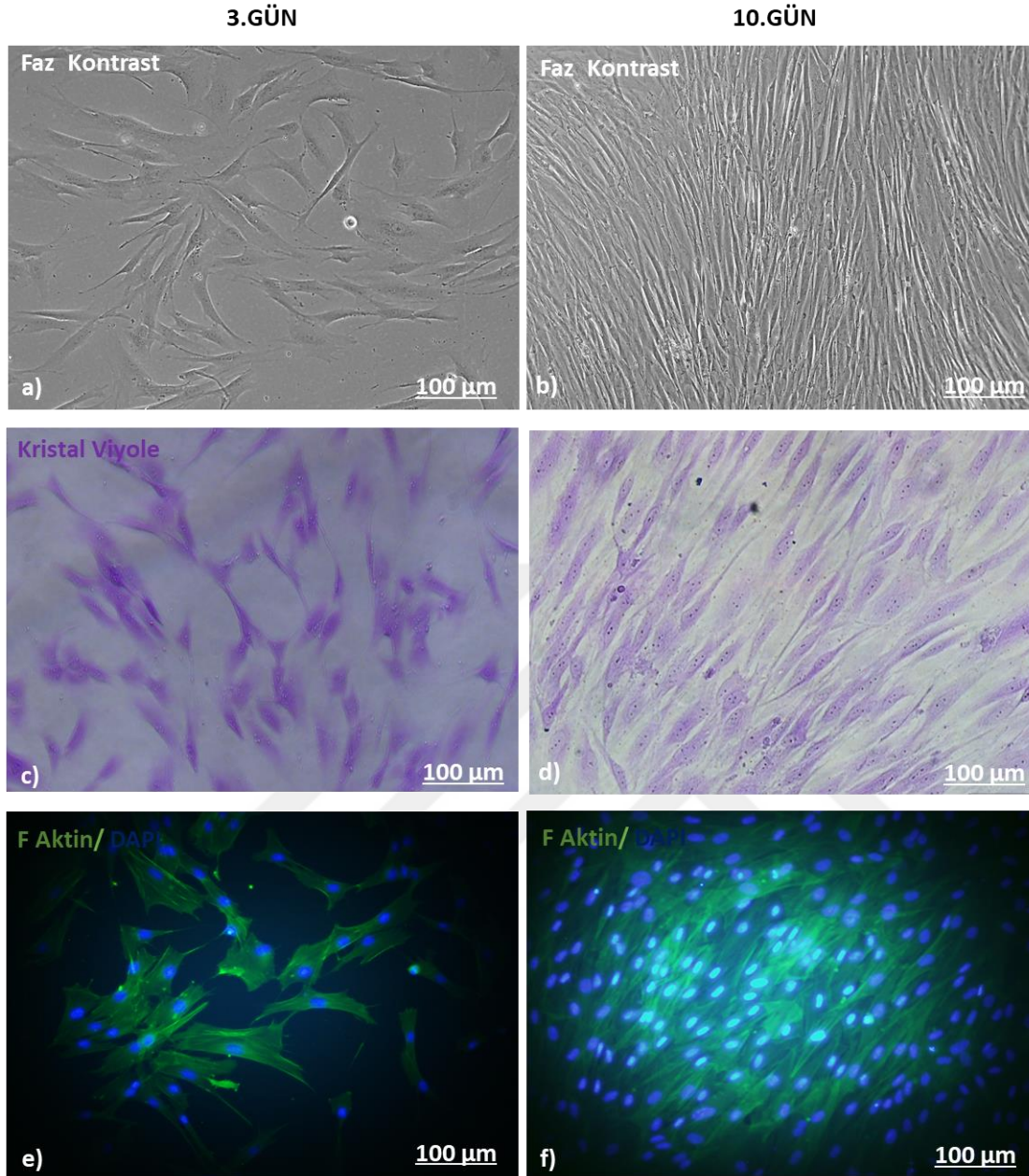
Şekil 4.1 a) Hücre tabakalarından izole edilen GK-MKH'lerin Alizarin kırmızısı analizinin faz kontrast mikroskop görüntüleri (20x, bar 100µm). b) Tüm gruplardan alınan boyanın ortalama absorbansının grafik gösterimi. Kontrol grubu proliferasyon ortamı (Kontrol PM); Kontrol grubu osteojenik ortam (kontrol OM); VC grubu proliferasyon ortamı (VC, PM); VC grubu osteojenik ortam (VC, OM), PBMT grubu proliferasyon ortamı (PBMT, PO) ve PBMT grubu osteojenik ortam (PBMT, OM).

4.5 BJ Dermal Fibroblast Hücrelerin Karakterizasyon Çalışmaları

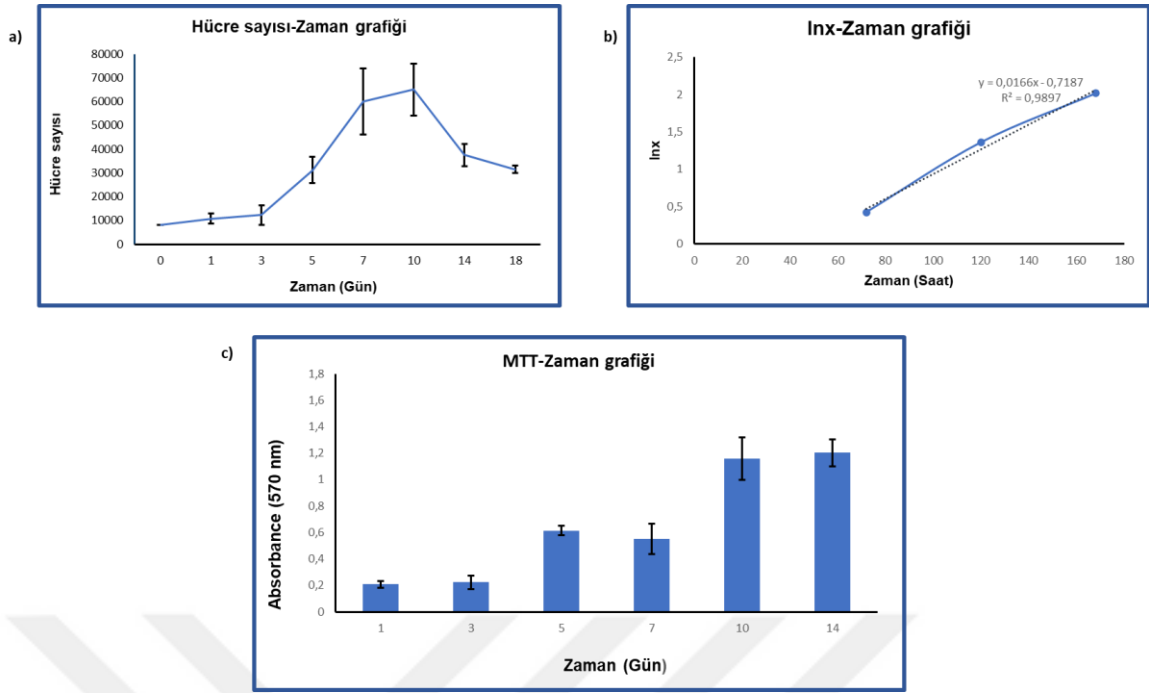
BJ insan dermal fibroblast hücrelerinin karakterizasyon çalışmasında hücrelerin morfolojileri ve üreme kinetikleri incelenmiştir. On dördüncü pasajda gerçekleştirilen çalışmada hücrelerin morfolojilerinin incelenmesi amacıyla faz kontrast görüntüleme, kristal viyole ve immüno Floresan antikorlar ile boyama yapılmıştır. Çalışmalar boyunca hücre kültürü besiyeri içeriği; %87 DMEM High Glikoz, FBS (%10), Pen/Strep. (%1), Sodyum Piruvat (%1), L-Glutamin (%1) olarak belirlenmiştir. BJ dermal fibroblast hücreleri yüzeye bağımlı olarak üreyen ve sitoplazmik uzantıları fibroblast morfolojide olan hücrelerdir. Hücrelerde çekirdek ve mikrofament yapılarının gözlemlemek için yapılan immüno Floresan boyamada çekirdekler mavi, F-aktin filamentler yeşil olarak gözlemlenmiştir. Şekil 4.13 BJ dermal fibroblast hücrelerinin kültürün 3.ve 10. gününe ait morfolojik görüntülerini göstermektedir. BJ dermal fibroblast hücreleri 8000/cm² olacak şekilde 18 gün boyunca kültür ortamı değiştirilmeden inkübe edilmiştir. Hücreler 10.günde doygunluğa tamamen ulaşmıştır ve bugünden itibaren latel fazına (ölüm fazına) girmiştir.

Hücrelerin üreme kinetiklerinin incelenmesi için hemositometrik sayım ve MTT analizi yapılmıştır. Bu analizlere ait grafikler Şekil 4.14' de gösterilmiştir.

Hücrelerin üreme grafiklerinde görüldüğü gibi 0-3.gün arası hücreler lag fazında (adaptasyon fazı), 3-10. gün arası logaritmik fazda, 10.günden 18. güne kadar latel (ölüm) fazındadır. Hücrelerin özgül üreme hızı (μ), logaritmik faz baz alınarak hesaplanmıştır. Bu veriler ışığında BJ fibroblast hücrelerin özgül üreme hızı 0.0166 sa⁻¹ ve ikilenme süresi yaklaşık olarak 42 sa hesaplanmıştır. İnsan sünnet derisi BJ fibroblast hücreler ile yapılan bir çalışmada [94], hücrelerin ikilenme süresi yaklaşık olarak 48 sa bulunmuştur. Dolayısıyla elde edilen sonuçlar literatürle uyumludur.



Şekil 4.2 BJ dermal fibroblast hücre hattına ait invert mikroskop [a (3.gün) ve b (10.gün), 20x], Kristal viyole boyama görüntüleri [c (3.gün) ve d (10.gün) ,20x], F aktin (yeşil), DAPI (mavi) boyama görüntüleri [e (1.gün) ve f (10.gün) ,20x].

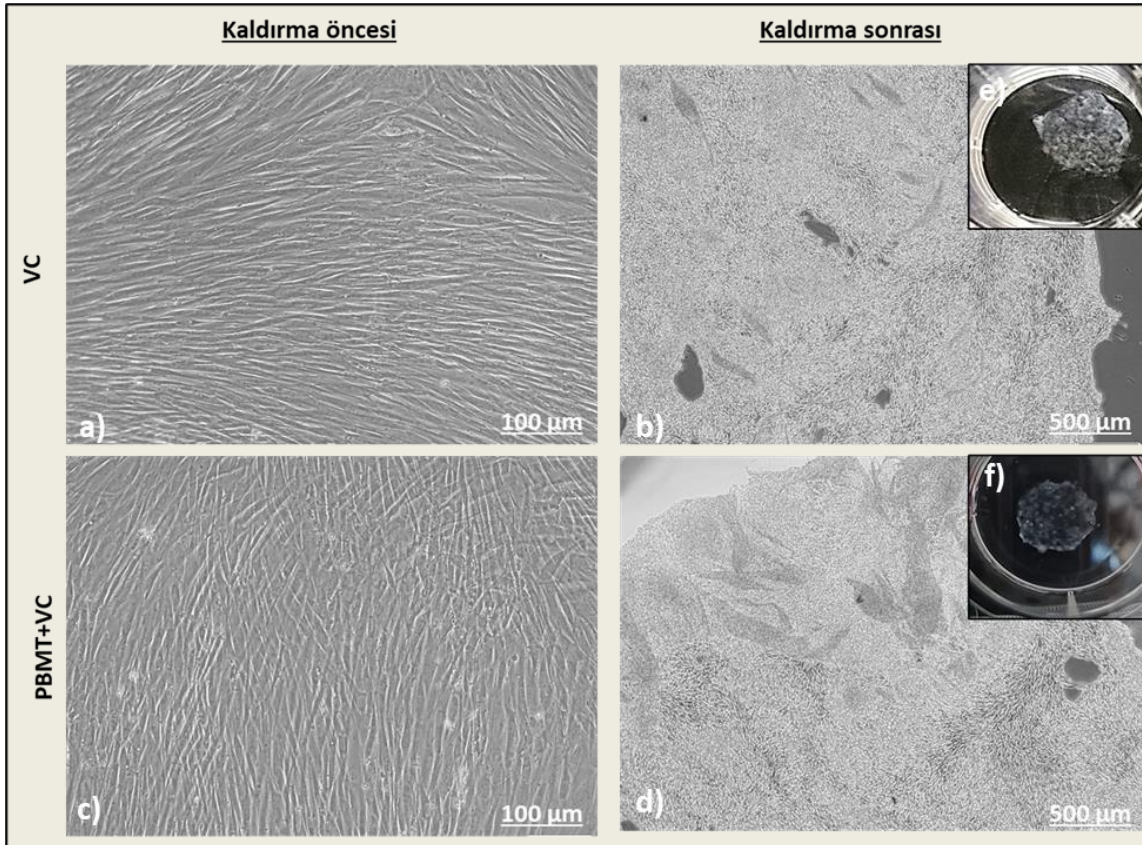


Şekil 4.3 BJ dermal fibroblast hücrelerin 14. pasajdaki a) hemositometrik sayım sonucu grafiği, b) hücrelerin ikilenme süresinin belirlenmesine yönelik ln x-zaman grafiği, c) MTT analizi sonucu elde edilen hücre üreme grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, aynı günde farklı gruplar için * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

4.6 BJ Fibroblast Hücre Hattı ile Hücre Tabakalarının Üretimi

BJ dermal fibroblast hücrelerinden tabaka elde etmek için ışık uygulaması ve vitamin C takviyesi kullanılmıştır. Bu hücre grubu ile ilgili hücre tabakası elde etmek için cm^2 'ye ekilecek hücre sayısı ve vitamin C konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik bir ön çalışma planlanmıştır. İlk etapta cm^2 'ye 5×10^4 hücre ekilerek 20 $\mu\text{g/mL}$ vitamin C konsantrasyonu ile hücre tabakası elde edilmeye çalışılmıştır. Fakat en erken 17. günde VC'li grupta hücre tabakaları elde edilebilmiştir. Bu süre bir hücre tabakası eldesi için uzun bir süreçtir. Bu hücrelerin ikilenme süresi de göbek kordonu mezenkimal kök hücrelere göre daha uzundur. Aynı zaman da bu süreçte bu hücrelerin kollajen sentezinin daha düşük seviyede olduğu kanısına varılmıştır. Bu nedenle deney grupları; 10^5 hücre/ cm^2 ve 40 $\mu\text{g/mL}$ vitamin C konsantrasyonu, 10^5 hücre/ cm^2 ve 60 $\mu\text{g/mL}$ vitamin C konsantrasyonu, 1.5×10^5 hücre/ cm^2 ve 60 $\mu\text{g/mL}$ vitamin C konsantrasyonu, 1.5×10^5 hücre/ cm^2 ve 80 $\mu\text{g/mL}$ vitamin C konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Tüm gruplarda 6-7.günlerde hücre tabakası elde edilebilmiştir. Makroskobik ve mikroskobik gözlemlere de dayanarak 10^5 hücre/ cm^2 ve 60 $\mu\text{g/mL}$ vitamin C konsantrasyonu ideal parametreler olarak belirlenmiştir. Tüm

çalışmalar 12 gözlü kültür kabına ile gerçekleştirilmiş ve fotobiyomodülasyon parametreleri için ön çalışmaya yapılmamıştır. Fotobiyomodülasyon çalışma koşullarının verileri laboratuvar grubumuzda daha önce gerçekleştirilen deneysel sonuçlar baz alınarak değerlendirilmiştir [8,9,75]. 20 cm mesafe 5 dk ve gün aşırı uygulama süresi (1.3.5.günler) ile elde edilen vitamin C ve PBMT+VC grubuna ait hücrelerden 6-7. günde hücre tabakası üretilmiştir. Her iki gruptan elde edilen hücre tabakalarında büyüklük ve kalınlık açısından makroskobik ve mikroskobik incelemeler sonucu anlamlı farklılıklar gözlemlenmemiştir. Şekil 4.15 bu hücre tabakalarına ait mikroskobik ve makroskobik incelemeleri göstermektedir.

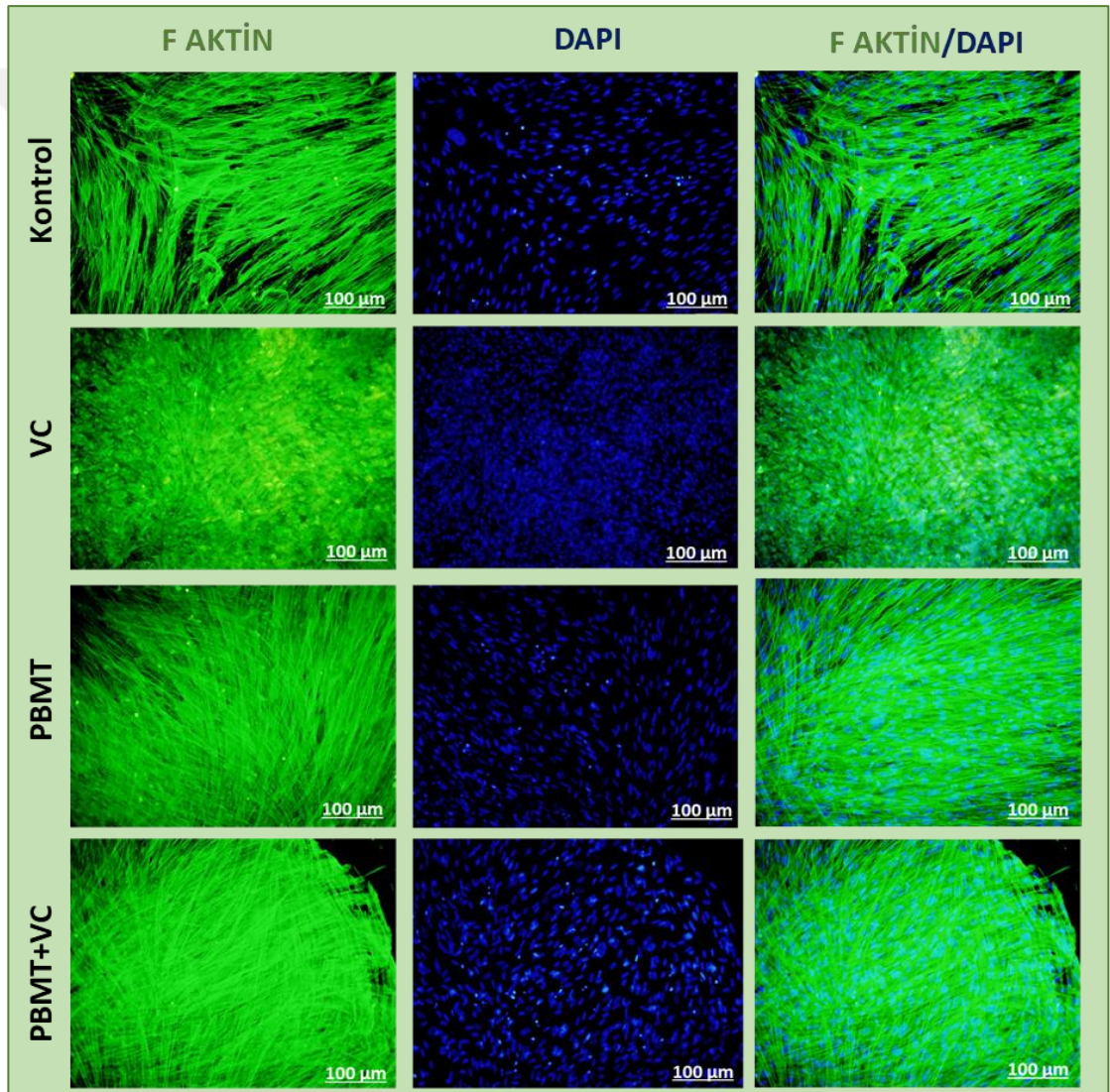


Şekil 4.4 BJ dermal fibroblast hücre hattı ile elde edilen hücre tabakalarının kaldırma öncesine (a, c), kaldırma sonrasına (b, d) ait invert mikroskop ve makroskobik (e, f) görüntüleri. (20x, bar 100 µm ve 4x, bar 500 µm).

4.7 BJ Fibroblast Hücre Tabakalarının Karakterizasyonu

4.7.1 İmmüno Floresan Boyama

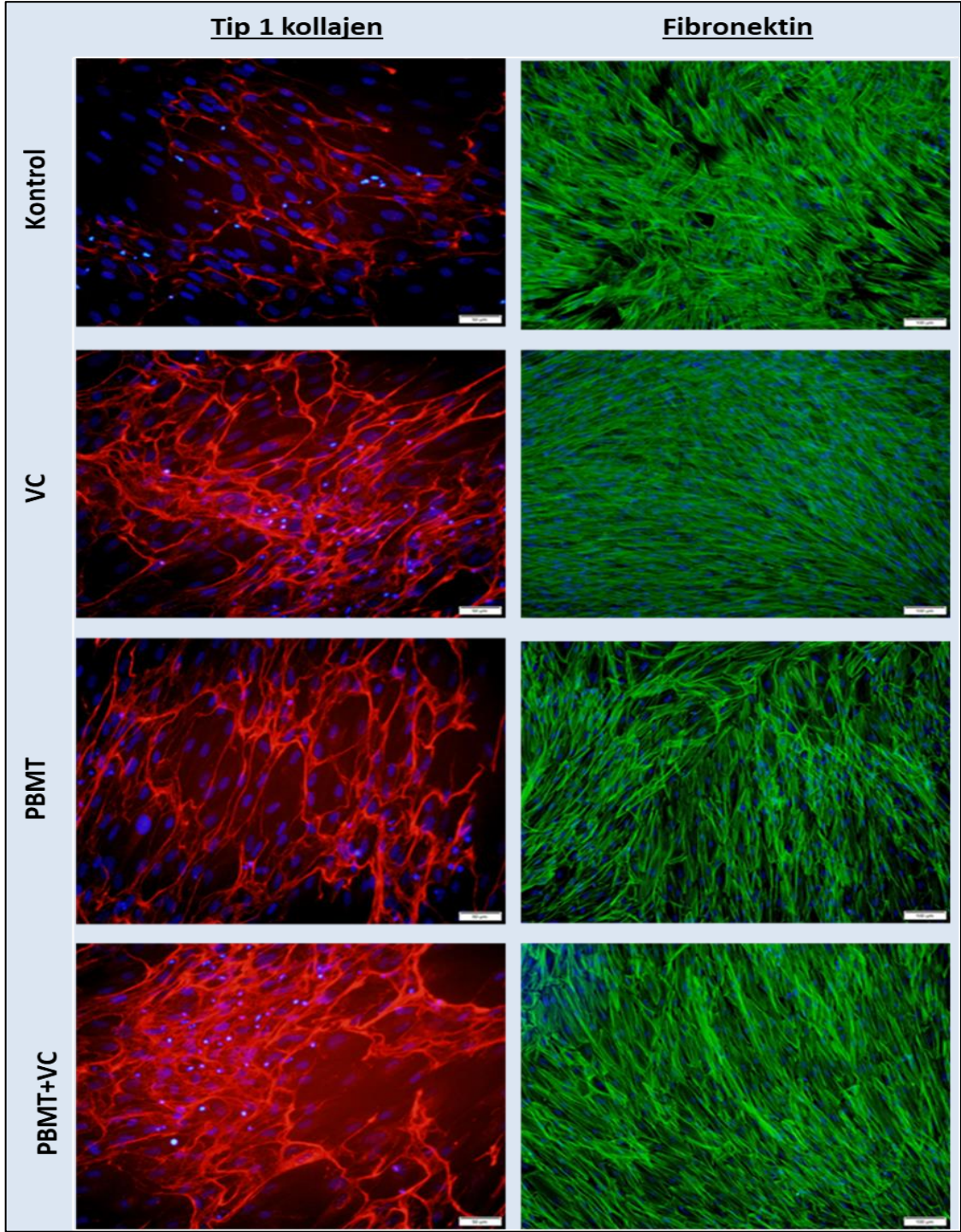
Yüzeyden kaldırılan hücre tabakalarının morfolojilerini daha ayrıntılı gözlemleyebilmek için F aktin/DAPI boyaması yapılmıştır. Hücrelerin F aktin filamentleri yeşile, çekirdekleri ise mavi renge boyanmıştır. Şekil 4.16 immüno floresan boyamaya ait sonuçları göstermektedir. Analiz sonuçları incelendiğinde hem F aktin hem de DAPI görüntülerinde VC ve PBMT+VC gruplarında kontrol grubuna göre belirgin bir yoğunluk gözlemlenmiştir. PBMT grubu hücre tabakası oluşturmamasına rağmen kontrol grubuna göre F aktin ve DAPI yapıları daha yoğun gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5 BJ dermal fibroblast hücre hattına ait immüno floresan görüntüler (bar 100 µm, 20x).

4.7.2 İmmünohistokimya

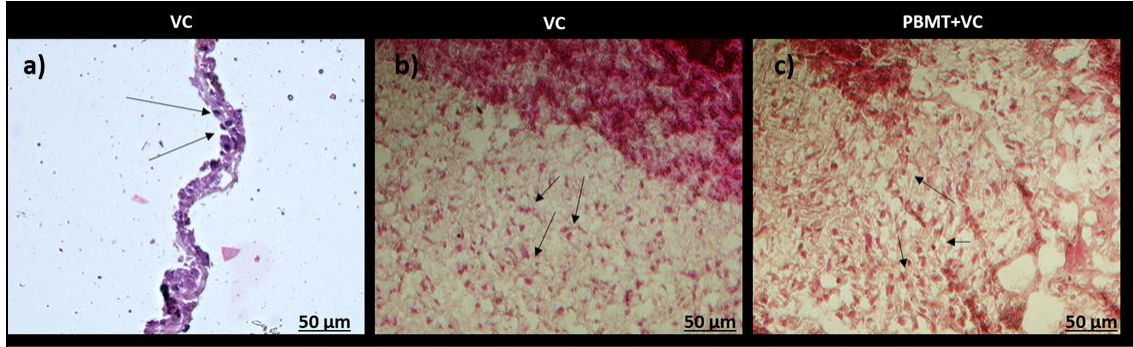
BJ insan dermal fibroblast hücre hattı ile üretilen hücre tabakalarının başka bir yüzeye aktarıldıktan sonraki protein yapılarını, ECM bileşenlerini ve reseptörlerini analiz etmek için immünohistokimya boyaması yapılmıştır. Tüm gruplarda çalışılan tip 1 kollajen ve fibronektin için pozitif reaksiyonlar gözlemlenmiştir. Kollajen dağılımı incelendiğinde VC, PBMT ve PBMT+VC gruplarının kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılıklar görülmektedir. VC grubunun, PBMT grubuna göre daha fazla kollajen sentezlendiği görülmüştür. Bunun yanı sıra, PBMT+VC grubunun tip 1 kollajen sentezi tüm gruplara göre daha yoğun gözlemlenmiştir. Fibronektin sentezinde kontrol grubu ile PBMT grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bunun yanı sıra tüm gruplar içerisinde en yoğun fibronektin sentezi VC grubunda gözlemlenmiştir. Bu çalışmaya ait sonuçlar Şekil 4.17’de gösterilmiştir. Gruplar kendi arasında kıyaslandığında vitamin C muamelesinin kollajen ve fibronektin sentezini arttırması beklenen bir durumdur. Bu hücreler üzerinde ışık uygulaması kollajen ve fibronektin sentezini bir miktar arttırsa da vitamin C kadar etkili olamamıştır.



Şekil 4. 6 BJ insan dermal fibroblast hücrelerine ait immünohistokimya boyamaları (bar 100µm, 20x). Kollajen boyama için sekonder antikor Alexa Fluor® 555 (kırmızı) ve fibronektin boyama için Alexa Fluor® 488 Konjugate (yeşil) kullanılmıştır.

4.7.3 Hematoksilen/Eozin Boyama

BJ dermal fibroblast hücrelerin 5 µm'lik yatay kesitler alınarak elde edilen Hematoksilen-Eozin boyama fotoğrafları Şekil 4.18'de gösterilmiştir. Boyama sonuçları incelendiğinde VC ve PBMT+VC grubunda çekirdek yapıları ve sayısı açısından anlamlı fark gözlemlenememiş ancak PBMT+VC grubunda sitoplazmik kısımların daha yoğun boyandığı görülmüştür.

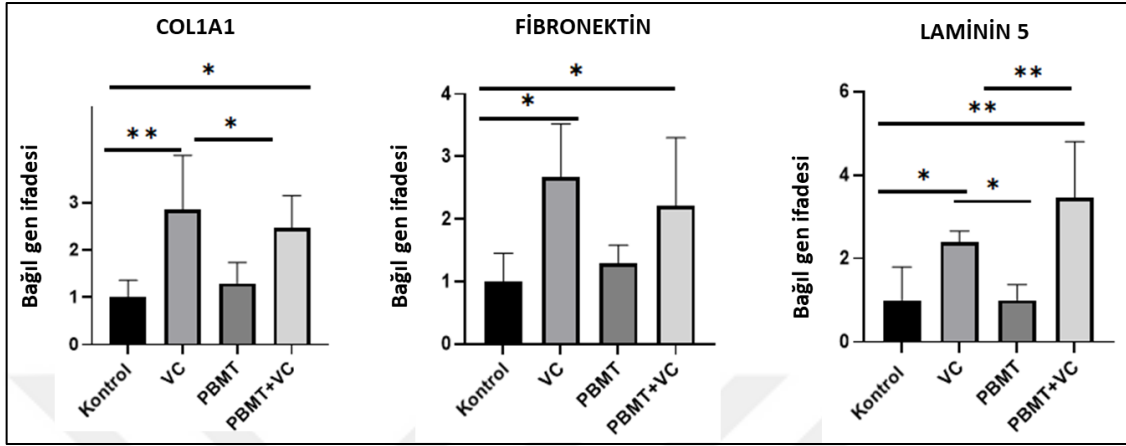


Şekil 4.7 BJ fibroblast hücrelerine ait H&E boyamaları: VC grubu dikey (a) ve yatay (b) kesitleri, PBMT+VC grubu yatay (c) kesitleri göstermektedir. 40x, bar 50 µm (Siyah oklar hücelere ait çekirdek yapılarını göstermektedir).

4.7.4 RT-PCR Analizi

Kültürün 7.gününde ECM belirteçlerin gen ekspresyon düzeyini belirlemek amacıyla RT-PCR analizi yapılmıştır. Bu amaçla hücrelerin tip 1 kollajen (COL1A1), Fibronektin ve Laminin 5 gibi hücre dışı matriks elemanları incelenmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde tüm ECM elemanlarının bağıl gen ifadesi kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir. COL1A1 genine bakıldığında en yüksek ekspresyonun VC grubuna ait olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra kontrol grubu ve PBMT grubu arasında anlamlılık bulunamamıştır. PBMT+VC grubunun ise kontrol grubu ile arasında istatistiksel anlamlılık bulunmuştur. Fibronektin geni incelendiğinde VC ve PBMT+VC grubunun kontrol grubuna göre anlamlılığı aynıdır. Fakat PBMT grubu ile diğer gruplar arası anlamlı farklılıklar yoktur. Laminin 5 geninde ise PBMT+VC grubunun ekspresyonu diğer gruplara göre en yüksek seviyededir. Bununla birlikte bu gruba ait istatistiksel anlamlılık, kontrol ve PBMT grupları arasındadır ve VC grubu ile arasında istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır. VC grubunun da kontrol ve PBMT gruplarıyla arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Bu

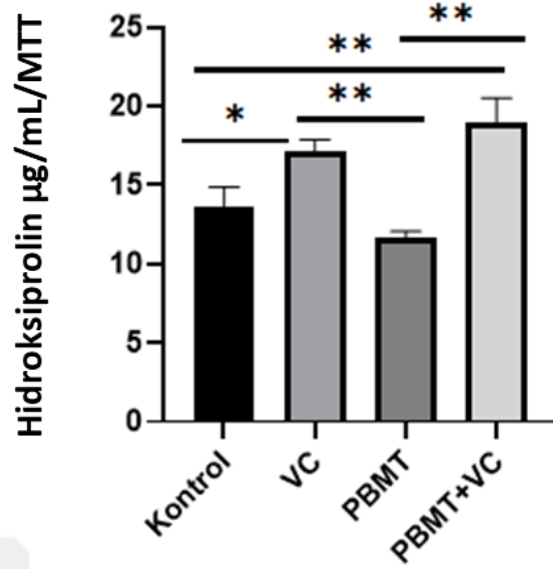
çalışmaya ait sonuçlar Şekil 4.19’da gösterilmiştir. Bu hücre hattı ile elde edilen RT-PCR sonuçları vitamin C’nin hücre dışı matriks elemanlarının sentezini arttırdığını göstermektedir. Ayrıca tek başına ışık uygulanan gruplarda bu etki görülmezken, vitamin C ve ışık uygulanan gruplarda bu etki gözlemlenmiştir.



Şekil 4.8 BJ dermal fibroblast hücreleri ile çalışılan tüm genlerine ait RT-PCR sonuçları. İstatistiksel olarak önemli farklılıklar sembollerle gösterilmiştir; n=5; *p<0.05, **p<0.01 ve ***p<0.001. VC, PBMT ve PBMT+VC grupları kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

4.7.5 Hidroksiprolin Analizi

Elde edilen hücre tabakalarından sentezlenen kollajen miktarı hidroksiprolin analizi üzerinden belirlenmiştir. Kültürün 7.gününde fiks edilen hücrelerden yapılan analizde hidroksiprolin kiti kullanılmıştır. Bu analizin sonuçları Şekil 4.20’de gösterilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde istatistiksel olarak en yüksek kollajen içeriğine sahip olan gruplar VC ve PBMT+VC grubuna aittir ve bu iki grup kendi arasında istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ayrıca bu iki grubun istatistiksel olarak en yüksek anlamlılıkları PBMT grubu iledir. PBMT ve kontrol grupları arasında ise anlamlı farklılıklar bulunamamıştır. Bu sonuçlar, RT-PCR analizi ve immünohistokimya sonuçlarıyla da karşılaştırıldığında benzer verilerin elde edildiği gözlemlenmiştir.

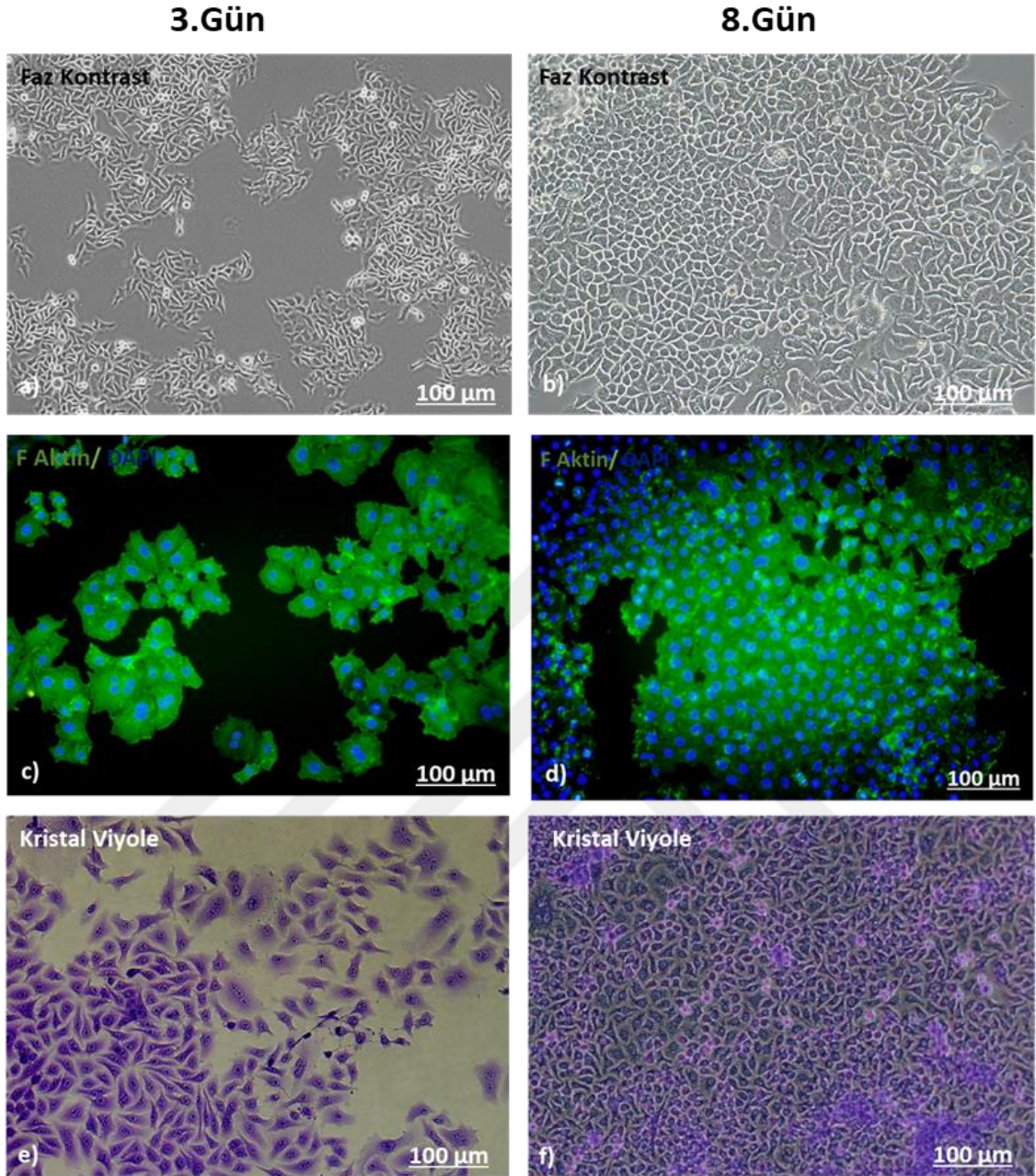


Şekil 4.9 BJ fibroblast hücrelerine ait hidroksiprolin analizi sonuçları. İstatistiksel olarak önemli farklılıklar sembollerle gösterilir; $n = 3$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$.

4.8 HS2 İnsan Keratinosit Hücrelerinin Karakterizasyon Çalışması

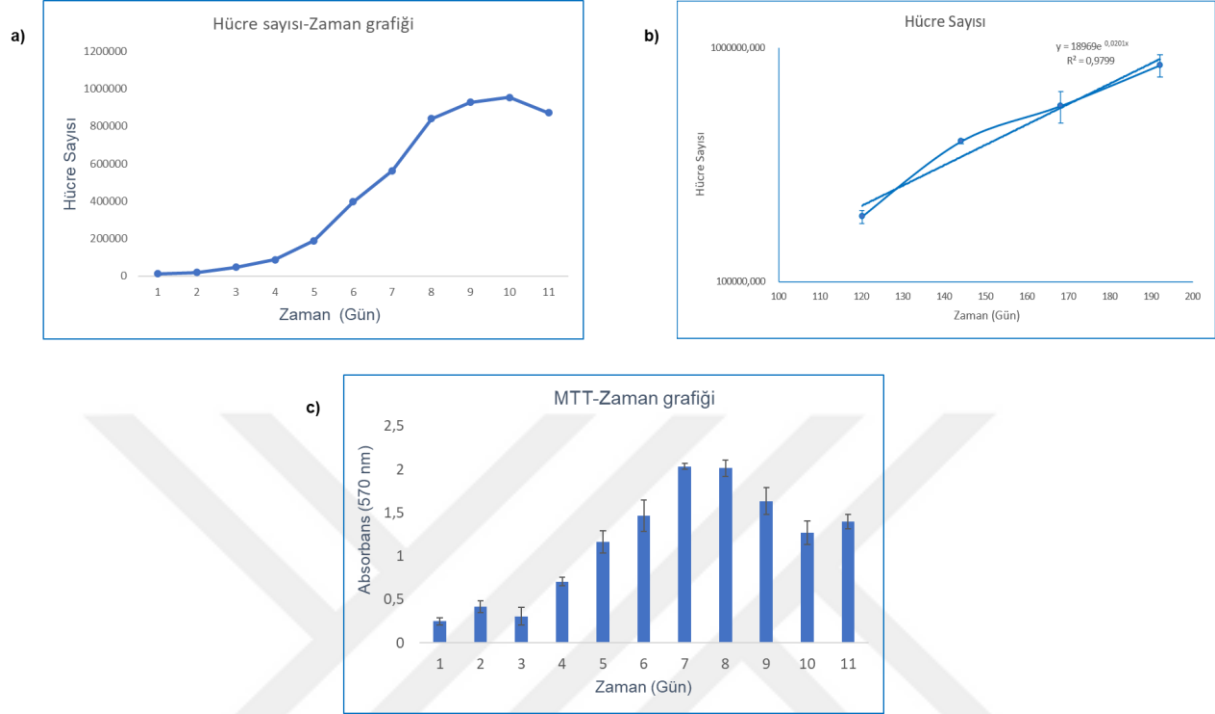
HS2 insan keratinosit hücrelerinin karakterizasyon çalışmasında hücrelerin morfolojileri ve üreme kinetikleri incelenmiştir. Yirmi dördüncü pasajda gerçekleştirilen çalışmada hücrelerin morfolojilerinin incelenmesi amacıyla faz kontrast görüntüleme, kristal viyole ve immüno Floresan antikolar ile boyama yapılmıştır. Çalışmalar boyunca hücre kültürü besiyeri içeriği; DMEM F12, FBS (%5), Pen/Strep. (%1) olarak belirlenmiştir. HS2 hücreleri yüzeye bağımlı olarak üreyen ve sitoplazmik uzantıları epitel morfolojide olan hücrelerdir. Hücrelerde çekirdek ve mikrofilament yapılarının gözlemlemek için yapılan immüno Floresan boyamada çekirdekler mavi, F-aktin filamentler yeşil olarak gözlemlenmiştir. Şekil 4.21 HS2 keratinosit hücrelerinin kültürün 3. ve 8. gününe ait morfolojik görüntülerini göstermektedir. HS2 hücreleri $5000/\text{cm}^2$ olacak şekilde 11 gün boyunca kültür ortamı değiştirilmeden inkübe edilmiştir.

Hücrelerin üreme grafiklerinde görüldüğü gibi 0-3.gün arası hücreler lag fazında (adaptasyon fazı), 4-9. gün arası logaritmik fazda ve 10-11.günde latel (ölüm) fazındadır. Bu veriler ışığında HS2 keratinosit hücrelerin özgül üreme hızı 0.0201 sa^{-1} ve ikilenme süresi yaklaşık olarak 34.4 sa hesaplanmıştır. Bu sonuçlar literatürle uyumludur [79].



Şekil 4.10 HS2 insan keratinosit hücre hattına ait invert mikroskop [a (3.gün) ve b (8.gün), 20x], F aktin (yeşil), DAPI (mavi) boyama görüntüleri [c (3.gün) ve d (8.gün) ,20x], Kristal viyole boyama görüntüleri [e (3.gün) ve f (8.gün) ,20x].

Hücrelerin üreme kinetiklerinin incelenmesi için hemositometrik sayım ve MTT analizi yapılmıştır. Bu analizlere ait grafikler Şekil 4.22’ de gösterilmiştir.

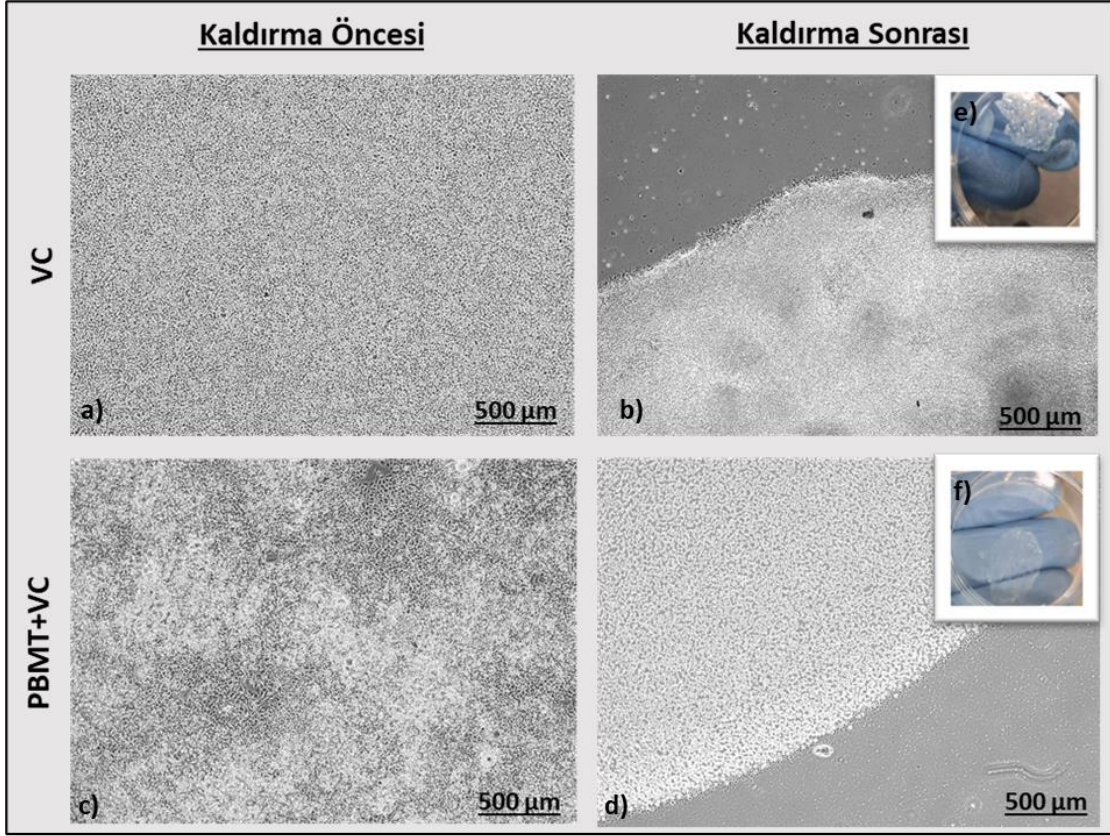


Şekil 4.11 HS2 insan keratinosit hücre hattına ait (24.pasaj) a) hemositometrik sayım sonucu elde edilen hücre sayısı zaman grafiği, b) $\ln x$ -zaman grafiği c) MTT analizi sonucu elde edilen hücre üreme grafiği.

4.9 HS2 Hücre Hattı ile Hücre Tabakalarının Üretimi

HS2 insan keratinosit hücrelerinden hücre tabakası elde etmek için ışık uygulaması ve vitamin C takviyesi kullanılmıştır. 12 gözlü kültür kabına 5×10^4 hücre/cm² olarak ekilen hücreler de kullanılan vitamin C konsantrasyonu 20 µg/mL olarak belirlenmiştir. Fotobiyomodülasyon parametreleri için ön çalışma gerçekleştirilmemiştir. Fotobiyomodülasyon çalışma koşullarının verileri laboratuvar grubumuzda daha önce gerçekleştirilen deneysel sonuçlar baz alınarak değerlendirilmiştir [8,9,75]. 20 cm mesafe, 5 dk ve gün aşırı uygulama süresi (1.3.5.günler) ile elde edilen vitamin C ve PBMT+VC grubuna ait hücrelerden 8-9 günde hücre tabakası üretilmiştir. Her iki gruptan da elde edilen hücre tabakalarında büyüklük ve kalınlık açısından makroskobik ve mikroskobik incelemeler sonucu anlamlı farklılıklar gözlemlenmemiştir. Bu çalışmaya ait görseller Şekil 4.23’te gösterilmiştir. Bu hücre grubundan elde edilen hücre tabakaları

göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerinden ve BJ insan dermal fibroblast hücrelerinden elde edilen tabakalara göre daha ince olduğu gözlemlenmiştir.

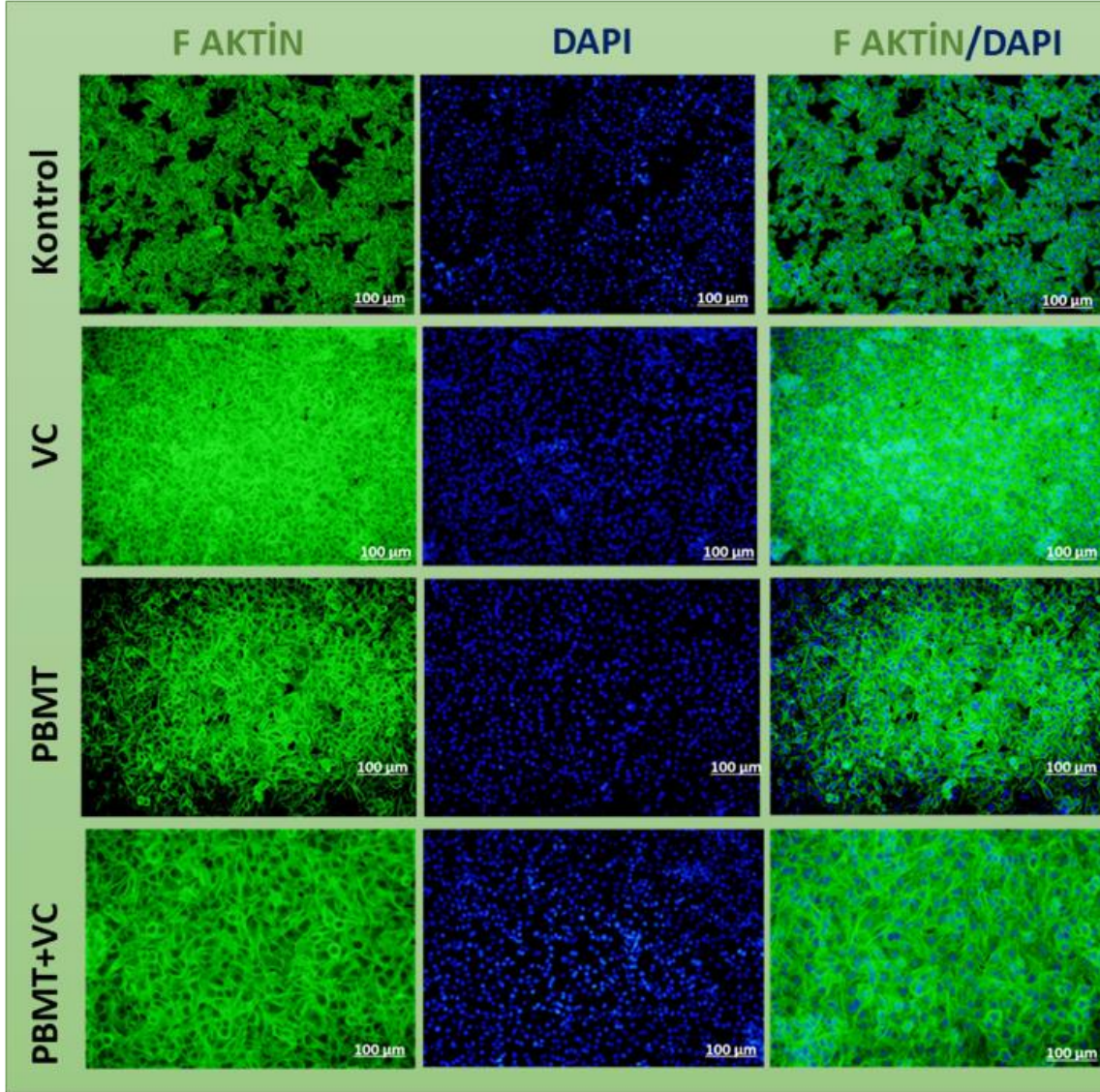


Şekil 4.12 HS2 keratinosit hücre hattı ile elde edilen hücre tabakalarının kaldırma öncesine (a, c), kaldırma sonrasına (b, d) ait invert mikroskop ve makroskobik (e, f) görüntüleri. (4x, bar 500 µm).

4.10 HS2 Keratinosit Hücre Tabakalarının Karakterizasyonu

4.10.1 immünofloresan Boyama

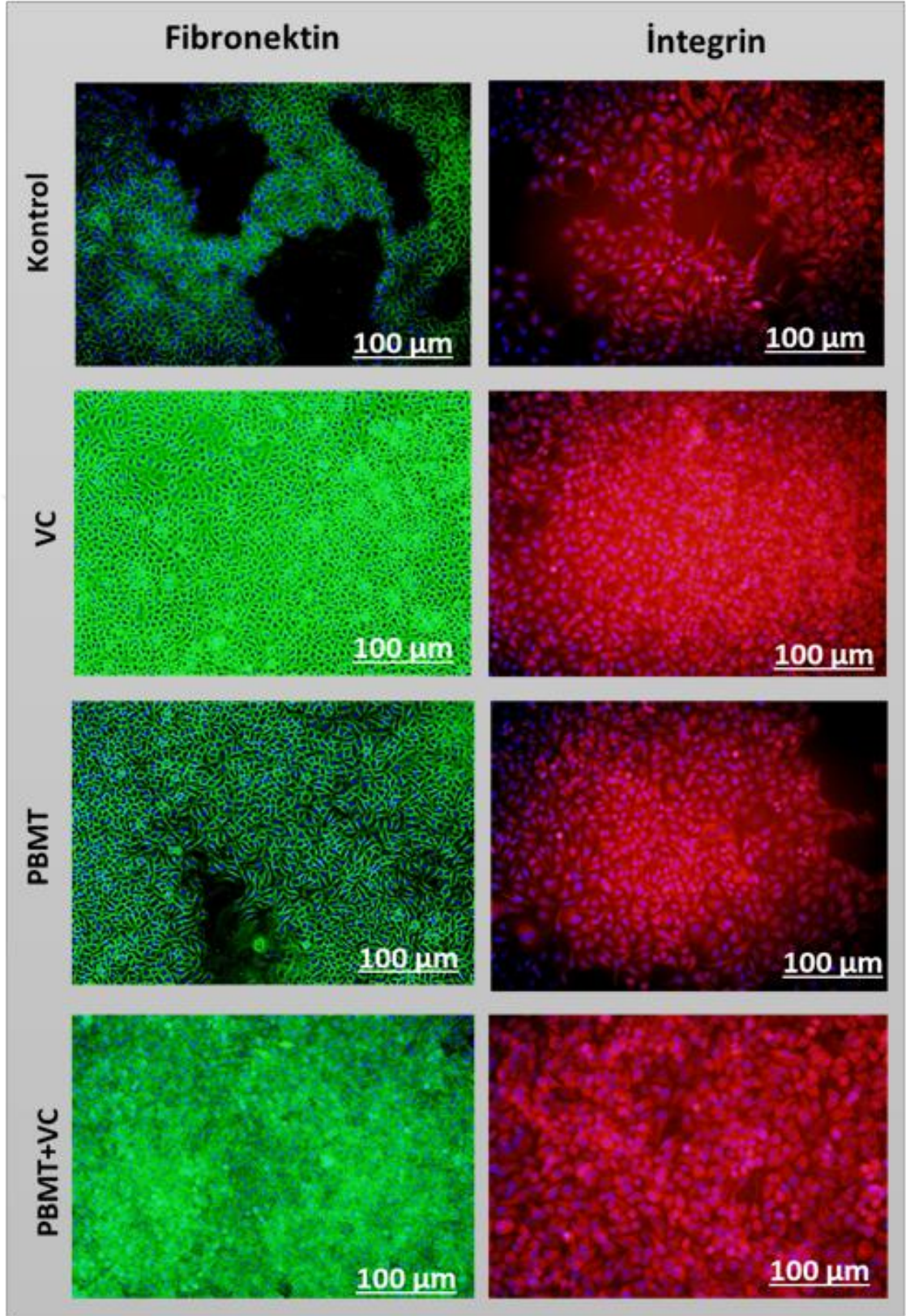
Yüzeyden kaldırılan hücre tabakalarının morfolojilerini daha ayrıntılı gözlemleyebilmek için F aktin/DAPI boyaması yapılmıştır. Özellikle VC ve PBMT+VC grubuna ait hücre tabakalarında F Aktin filamentler ve çekirdekler daha yoğun gözlemlenmiştir. Ayrıca kültür ortamına vitamin C eklenmesi kollajen sentezini tetiklediği ve hücre proliferasyonunu arttırdığı için vitamin C grubu ve PBMT+VC grubundaki hücre tabakalarının PBMT ve kontrol grubuna göre daha sıkışık ve kalın tabakalar olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.13 HS2 keratinosit hücre hattına ait immünofloresan görüntüler (bar 100 µm, 20x).

4.10.2 İmmünohistokimya

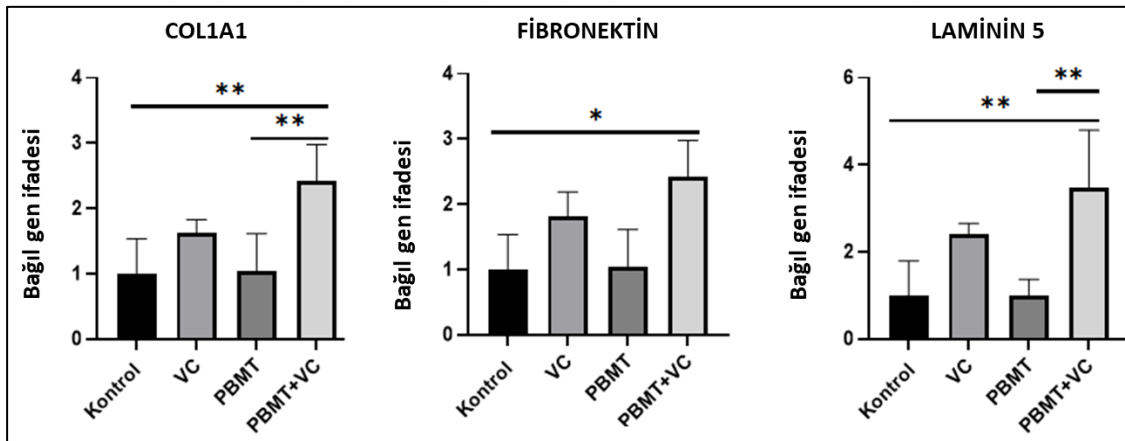
Kaldırılıp başka bir kültür kabına aktarılan hücre tabakalarının protein yapılarını, ECM bileşenlerini ve reseptörlerini analiz etmek için immünohistokimya boyaması yapılmıştır. Şekil 4.25 hücre tabakalarının immünohistokimyasal analizinin sonuçlarını göstermektedir. Tüm gruplarda çalışılan proteinler (fibronektin ve integrin) için pozitif reaksiyonlar gözlemlenmiştir. Bu proteinler hücrelerde olduğu kadar hücre dışı matrikste de gözlemlenmiştir. Kontrol grubu her üç grupla karşılaştırıldığında proteinlerin dağılımı ve boyama miktarları arasında anlamlı bir farklılık görülmektedir. Bununla birlikte VC ve PBMT+VC grupları arasında protein dağılımı ve boyama miktarı açısından anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.14 HS2 hücrelerine ait immünohistokimya boyamaları (bar 100µm, 20x). İntegrin boyama için sekonder antikör Alexa Fluor® 555 (kırmızı) ve fibronektin boyama için Alexa Fluor® 488 Konjugate (yeşil) kullanılmıştır.

4.10.3 RT-PCR Analizi

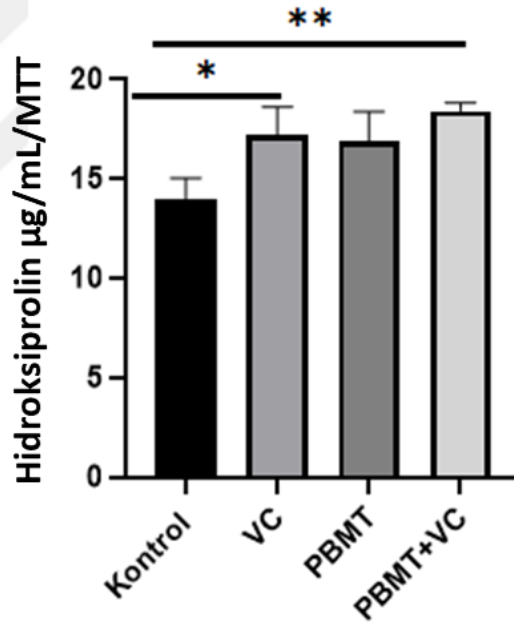
Kültürün 9.gününde ECM belirteçlerin gen ekspresyon düzeyini belirlemek amacıyla RT-PCR analizi yapılmıştır. Bu amaçla hücrelerin tip 1 kollajen (COL1A1), Fibronektin ve Laminin 5 gibi hücre dışı matriks elemanları incelenmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde COL1A1 geninde kontrol grubu ile PBMT+VC grubu karşılaştırıldığında anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir. Aynı anlamlılık derecesi PBMT grubuyla PBMT+VC grubu arasında da gözlemlenmiştir. Bu gende en yüksek bağıl gen ifadesi PBMT+VC grubuna aittir. Fibronektin geni incelendiğinde sadece PBMT+VC grubu ile kontrol grubu arasında anlamlılık gözlemlenmiştir. VC grubunun bağıl gen ifade düzeyi kontrol ve PBMT gruplarına göre daha yüksek çıkmasına rağmen aralarında istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır. Laminin 5 geninde ise en yüksek bağıl gen ifadesi PBMT+VC grubuna aittir. PBMT+VC grubunun hem kontrol hem de PBMT grubuyla arasında istatistiksel farklılıklar vardır ve bu farklılıklar aynı düzeydedir. VC grubunun bağıl gen ifade düzeyi incelendiğinde kontrol ve PBMT grubuna göre daha yüksek oranda eksprese edilmesine rağmen aralarında istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır. Bu analize ait sonuçlar Şekil 4.26’da gösterilmiştir.



Şekil 4.15 HS2 hücreleri ile çalışılan tüm genlerine ait RT-PCR sonuçları. İstatistiksel olarak önemli farklılıklar sembollerle gösterilmiştir; n = 5. *p < 0.05, **p < 0.01 ve ***p < 0.001. VC, PBMT ve PBMT+VC grupları kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

4.10.4 Hidroksiprolin Analizi

Elde edilen hücre tabakalarından sentezlenen kollajen miktarı hidroksiprolin analizi üzerinden belirlenmiştir. Kültürün 9.gününde fikse edilen hücrelerden yapılan analizde hidroksiprolin kiti kullanılmıştır. Bu analizin sonuçları Şekil 4.27 de gösterilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde kontrol grubunun VC ve PBMT+VC grupları ile istatistiksel anlamlılıkta olduğu görülmüştür. Bu analiz sonucu elde edilen hücre tabakalarından en yüksek kollajen içeriğine sahip olan grubun PBMT+VC grubu olduğuna karar verilmiştir. Bununla birlikte VC grubunun da kontrol grubu ile arasında istatistiksel fark bulunmuştur fakat PBMT ve PBMT+VC grupları arasında bulunamamıştır. Bu sonuçlar RT-PCR analizinin sonuçlarıyla da benzerdir. RT-PCR analiz sonucunda da COL1A1 geninde en yüksek ekspresyon PBMT+VC grubuna aittir. Elde edilen veriler birçok analizlerle desteklenmiş ve pek çok zaman benzer sonuçlarla karşılaşılmıştır. Bu durum gerçekleştirilen tez çalışmasının güvenilirliği açısından da önemlidir.



Şekil 4.16 HS2 hücrelerine ait hidroksiprolin analizi sonuçları. İstatistiksel olarak önemli farklılıklar sembollerle gösterilir; n = 3. *p < 0.05, **p < 0.01 ve ***p < 0.001.



5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışmasında üç farklı morfolojiye sahip hücreler ile vitamin C ve ışığın (600-1200 nm dalga boyu aralığında polikromatik ışık) ayrı ayrı ve birlikte kullanıldığı koşullarda hücre tabakası oluşturma potansiyelleri incelenmiştir. Bu amaçla ilk olarak tüm hücrelerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ardından hücrelerin fotobiyomodülasyon ve vitamin C varlığında hücre tabakası oluşturma koşulları belirlenmiştir. Hücreler; Kontrol, VC, PBMT ve PBMT+VC olmak üzere dört grupta incelenmiştir.

- GK-MKH'ler için ekim yoğunluğu 5×10^4 hücre/cm² ve kültür ortamına eklenecek vitamin C konsatrasyonu 20 µg/mL olarak belirlenmiştir. Işık parametreleri optimize edilerek bu hücreler için ideal koşulların 20 cm mesafe ve 2 dk ve gün aşırı uygulama süresi olduğuna karar verilmiştir. Sonuçta vitamin C varlığında 5-7 günde elde edilen hücre tabakaları PBMT ve PBMT+VC varlığında 6-7 günde elde edilmiştir. Elde edilen hücre tabakalarından en kalın ve opak görünüm PBMT+VC grubuna aittir. Ayrıca bu hücreler için ışık uygulamasının osteojenik farklılaşmada önemli bir rol aldığı alizerin red boyaması ve RT-PCR sonuçlarıyla desteklenmiştir. Ancak buradan elde edilen sonuçlar ışık uygulamasının hücre tabakalarının oluşum süresine etki etmediği yönündedir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir; birçok çalışma [80-82] vitamin C'nin hücre metabolizması üzerinde antioksidatif bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte hücredeki metabolik faaliyetler sırasında üretilen serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerini (ROS) temizlediği bilinmektedir [83]. Fotobiyomodülasyon tedavisi ise moleküler düzeyde enerji akışını hızlandırarak hücresel süreçleri biyolojik olarak modüle edebilir. Bu biyolojik süreçler, hücrelerde ve dokularda serbest radikallerinin üretilmesiyle sağlanır [84]. Bu sonuçlardan yola çıkarak hem vitamin C uygulamasının hem de fotobiyomodülasyon tedavisinde kullanılan ışık kaynaklarının hücre metabolizması üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Ancak hücre metabolizması üzerinde zıt mekanizmalarla bu etkilere sahiptirler. Dolayısıyla beraber kullanıldıklarında etkilerinin azalabileceği ya da elimine olabileceği düşünülmektedir.

- İnsan dermal fibroblast hücre hattı, BJ hücrelerin kollajen sentezinin bir miktar daha düşük olduğuna karar verilerek ekilen hücre sayısı ve buna paralel olarak vitamin C konsantrasyonu arttırılmıştır. Hücrelerin ekim yoğunluğu 1×10^5 hücre/cm² ve vitamin C konsantrasyonu 60 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu hücrelerde kontrol ve PBMT grubunda hücre tabakası elde edilemezken VC ve PBMT+VC grubunda 6-7 günde hücre tabakası elde edilmiştir ve tabakaların makroskopik ve mikroskopik görüntüleri arasında anlamlı farklılıklar gözlemlenmemiştir.
- Epitel morfolojiye sahip insan keratinosit hücre hattı, HS2 hücrelerin ekim yoğunluğu 5×10^4 hücre/cm² ve vitamin C konsantrasyonu 20 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu hücreler ile PBMT grubunda 10. günde, VC grubunda 8.gün ve PBMT+VC grubunda 8-9.günlerde hücre tabakası elde edilmiştir ve hücre tabakaların makroskopik görüntüsü arasında anlamlı farklılıklar gözlemlenmemiştir. Fakat bu hücre hattından elde edilen hücre tabakaları BJ ve GK-MHK'lere kıyasla en ince olan gruptur.

Çizelge 5.1 Elde edilen hücre tabakalarına ait veriler

Özellikler	GK-MKH	BJ	HS2
Ekim yoğunluğu	5×10^4 hücre/cm ²	1×10^5 hücre/cm ²	5×10^4 hücre/cm ²
VC konsantrasyonu	20 µg/mL	60 µg/mL	20 µg/mL
PAC ışık uygulama koşulları	20 cm 2 dk,gün aşırı	20 cm 5 dk,gün aşırı	20 cm 5 dk,gün aşırı
Hücre tabakası elde edilen grup	VC,PBMT,PBMT+VC	VC, PBMT+VC	VC, PBMT PBMT+VC
Hücre tabakası oluşma süresi	VC grubu:5-7 gün PBMT grubu:6-7 gün PBMT+VC grubu: 6-7 gün	VC grubu:6-7 gün PBMT+VC grubu: 7 gün	VC grubu:8 gün PBMT grubu 10 gün PBMT+VC grubu 8-9 gün
Hücre tabakanın fiziksel yapısı	Kalın	İnce	Çok ince
Hücre tabakalarının manipülasyonu	Kolay	Orta	Zor

Tüm deneysel çalışmaların sonucu elde edilen veriler ışığında üç farklı morfolojiye sahip hücreler ile vitamin C varlığında etkin bir şekilde hücre tabakaları elde edilebilmiştir. Polikromatik ışık uygulaması hücre proliferasyonunu arttırıcı etkiye sahiptir ve GK-MKH'ler ile tek başına tabaka oluşumunu sağlayabilmiştir. Bununla birlikte doku ve organlarımız pek çok farklı hücre ile hücreler arası maddenin bir araya gelmesiyle oluşur. Hücre tabaka teknolojisinde de farklı hücreleri bir arada kültürlenmek ve daha kalın tabakalar elde edebilmek klinik yaklaşımlar için önem arz etmektedir. Fakat vasküler ağlar olmadan kalınlık sınırlamaları (~40-80 μm) söz konusudur [31]. Literatürde vaskülarize ağların geliştirilmesi için ortak kültür hücre tabakası yaklaşımları önerilmiştir [85,86]. Örneğin, insan miyoblast tabakaları ile kültürlenmiş insan göbek veni endotel hücrelerinin kılcal benzeri yapılar oluşturduğu ve çıplak sıçanların deri altı dokularına transplantasyondan sonra neovaskülarizasyonu ve greft sağkalımını arttırdığını rapor edilmiştir [87]. Bununla birlikte, kalın 3B hücre tabakalarının uzun vadeli kültürünü desteklemek için fonksiyonel olgun kan damarlarının oluşumu gereklidir. Bu amaçla, kültür ortamının sürekli olarak akıtıldığı perfüzyon biyoreaktör sistemleri, fonksiyonel bir damar ağının oluşumuna ve 12 katmanlı hücre tabakalarının hayatta kalmasına izin veren sistemler olarak rapor edilmiştir [88,89].

Tez çalışması kapsamında elde edilen verilerin yukarıda bahsedilen yaklaşımlarla desteklenmesi, çalışmanın daha ileri bir noktaya götürülmesi ve klinik denemeler için umud vaad etmesi açısından önemlidir.



6. KAYNAKLAR

1. Takahashi H, Okano T. Thermally-triggered fabrication of cell sheets for tissue engineering and regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews*. 2019;138:276-92.
2. Guo P, Zeng Jj, Zhou N. A novel experimental study on the fabrication and biological characteristics of canine bone marrow mesenchymal stem cells sheet using vitamin C. *Scanning*. 2015;37(1):42-8.
3. Yeh T-S, Fang Y-HD, Lu C-H, Chiu S-C, Yeh C-L, Yen T-C, et al. Baculovirus-transduced, VEGF-expressing adipose-derived stem cell sheet for the treatment of myocardium infarction. *Biomaterials*. 2014;35(1):174-84.
4. Wei FL, Qu CY, Song TL, Ding G, Fan ZP, Liu DY, et al. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity. *J Cell Physiol*. 2012;227(9):3216-24.
5. Murad S, Grove D, Lindberg K, Reynolds G, Sivarajah A, Pinnell S. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981;78(5):2879-82.
6. Harris JR. *Subcellular Biochemistry: Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology*: Springer Science & Business Media; 2013.
7. Bayrak GK, Gümüşderelioğlu M. Construction of cardiomyoblast sheets for cardiac tissue repair: comparison of three different approaches. *Cytotechnology*. 2019;71(4):819-33.
8. Çakmak AS, Çakmak S, Vatansever HS, Gümüşderelioğlu M. Photostimulation of osteogenic differentiation on silk scaffolds by plasma arc light source. *Lasers in medical science*. 2018;33(4):785-94.
9. Yurtsever MÇ, Kiremitci A, Gümüşderelioğlu M. Dopaminergic induction of human dental pulp stem cells by photobiomodulation: comparison of 660nm laser light and polychromatic light in the nir. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2020;204:111742.
10. Yamada N, Okano T, Sakai H, Karikusa F, Sawasaki Y, Sakurai Y. Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications*. 1990;11(11):571-6.
11. Haraguchi Y, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Scaffold-free tissue engineering using cell sheet technology. *RSC advances*. 2012;2(6):2184-90.

12. Elloumi- Hannachi I, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering: a unique nanotechnology for scaffold- free tissue reconstruction with clinical applications in regenerative medicine. *Journal of internal medicine*. 2010;267(1):54-70.
13. Yang J, Yamato M, Shimizu T, Sekine H, Ohashi K, Kanzaki M, et al. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. *Biomaterials*. 2007;28(34):5033-43.
14. Masuda S, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering for heart tissue repair. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(2):277-85.
15. Inaba R, Khademhosseini A, Suzuki H, Fukuda J. Electrochemical desorption of self-assembled monolayers for engineering cellular tissues. *Biomaterials*. 2009;30(21):3573-9.
16. Enomoto J, Kageyama T, Myasnikova D, Onishi K, Kobayashi Y, Taruno Y, et al. Gold cleaning methods for preparation of cell culture surfaces for self-assembled monolayers of zwitterionic oligopeptides. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2018;125(5):606-12.
17. Enomoto J, Mochizuki N, Ebisawa K, Osaki T, Kageyama T, Myasnikova D, et al. Engineering thick cell sheets by electrochemical desorption of oligopeptides on membrane substrates. *Regenerative Therapy*. 2016;3:24-31.
18. Itabashi Y, Miyoshi S, Kawaguchi H, Yuasa S, Tanimoto K, Furuta A, et al. A New Method for Manufacturing Cardiac Cell Sheets Using Fibrin-Coated Dishes and Its Electrophysiological Studies by Optical Mapping. *Artificial Organs*. 2005;29(2):95-103.
19. L'Heureux N, Pâquet S, Labbé R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *Faseb j*. 1998;12(1):47-56.
20. Naughton G. A physiologic skin model for in vivo toxicity studies. *In vitro toxicity new directions*. 1989:183-92.
21. Wei F, Qu C, Song T, Ding G, Fan Z, Liu D, et al. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity. *J Cell Physiol*. 2012;227(9):3216-24.
22. Nishida K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea*. 2003;22(7):S28-S34.
23. Yang J, Yamato M, Nishida K, Ohki T, Kanzaki M, Sekine H, et al. Cell delivery in regenerative medicine: the cell sheet engineering approach. *Journal of Controlled Release*. 2006;116(2):193-203.

24. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, et al. Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation*. 2004;77(3):379-85.
25. Tsai RJ-F, Li L-M, Chen J-K. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *New England Journal of Medicine*. 2000;343(2):86-93.
26. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *New England Journal of Medicine*. 2004;351(12):1187-96.
27. Flores MG, Hasegawa M, Yamato M, Takagi R, Okano T, Ishikawa I. Cementum–periodontal ligament complex regeneration using the cell sheet technique. *Journal of periodontal research*. 2008;43(3):364-71.
28. Iwata T, Yamato M, Tsuchioka H, Takagi R, Mukobata S, Washio K, et al. Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. *Biomaterials*. 2009;30(14):2716-23.
29. Fabian T, Federico JA, Ponn RB. Fibrin glue in pulmonary resection: a prospective, randomized, blinded study. *The Annals of thoracic surgery*. 2003;75(5):1587-92.
30. Kanzaki M, Yamato M, Yang J, Sekine H, Kohno C, Takagi R, et al. Dynamic sealing of lung air leaks by the transplantation of tissue engineered cell sheets. *Biomaterials*. 2007;28(29):4294-302.
31. Asakawa N, Shimizu T, Tsuda Y, Sekiya S, Sasagawa T, Yamato M, et al. Pre-vascularization of in vitro three-dimensional tissues created by cell sheet engineering. *Biomaterials*. 2010;31(14):3903-9.
32. Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials*. 2003;24(13):2309-16.
33. Shimizu T, Sekine H, Yang J, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, et al. Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *The FASEB journal*. 2006;20(6):708-10.
34. Tsumanuma Y, Iwata T, Washio K, Yoshida T, Yamada A, Takagi R, et al. Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model. *Biomaterials*. 2011;32(25):5819-25.

35. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nature medicine*. 2006;12(4):459-65.
36. Qi Y, Du Y, Li W, Dai X, Zhao T, Yan W. Cartilage repair using mesenchymal stem cell (MSC) sheet and MSCs-loaded bilayer PLGA scaffold in a rabbit model. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2014;22(6):1424-33.
37. Dumas A, Moreau MF, Ghérardi RK, Baslé MF, Chappard D. Bone grafts cultured with bone marrow stromal cells for the repair of critical bone defects: an experimental study in mice. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2009;90(4):1218-29.
38. Sekiya N, Tobita K, Beckman S, Okada M, Gharaibeh B, Sawa Y, et al. Muscle-derived stem cell sheets support pump function and prevent cardiac arrhythmias in a model of chronic myocardial infarction. *Molecular Therapy*. 2013;21(3):662-9.
39. Kamata S, Miyagawa S, Fukushima S, Nakatani S, Kawamoto A, Saito A, et al. Improvement of cardiac stem cell sheet therapy for chronic ischemic injury by adding endothelial progenitor cell transplantation: analysis of layer-specific regional cardiac function. *Cell transplantation*. 2014;23(10):1305-19.
40. Matsuura K, Masuda S, Haraguchi Y, Yasuda N, Shimizu T, Hagiwara N, et al. Creation of mouse embryonic stem cell-derived cardiac cell sheets. *Biomaterials*. 2011;32(30):7355-62.
41. Zhang W, Yang W, Liu X, Zhang L, Huang W, Zhang Y. Rapidly constructed scaffold-free embryonic stem cell sheets for ocular surface reconstruction. *Scanning: The Journal of Scanning Microscopies*. 2014;36(3):286-92.
42. Kito T, Shibata R, Ishii M, Suzuki H, Himeno T, Kataoka Y, et al. iPS cell sheets created by a novel magnetite tissue engineering method for reparative angiogenesis. *Sci Rep*. 2013;3:1418.
43. Hibino N, Duncan DR, Nalbandian A, Yi T, Qyang Y, Shinoka T, et al. Evaluation of the use of an induced pluripotent stem cell sheet for the construction of tissue-engineered vascular grafts. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2012;143(3):696-703.
44. Matsuda N, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Tissue Engineering Based on Cell Sheet Technology. *Advanced Materials*. 2007;19(20):3089-99.

45. Chen G, Qi Y, Niu L, Di T, Zhong J, Fang T, et al. Application of the cell sheet technique in tissue engineering. *Biomed Rep.* 2015;3(6):749-57.
46. Owaki T, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering for regenerative medicine: current challenges and strategies. *Biotechnology journal.* 2014;9(7):904-14.
47. Kushida A, Yamato M, Isoi Y, Kikuchi A, Okano T. A noninvasive transfer system for polarized renal tubule epithelial cell sheets using temperature-responsive culture dishes. *Eur Cell Mater.* 2005;10:23-30; discussion 23-30.
48. Kushida A, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets: the noninvasive harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces. *J Biomed Mater Res.* 2001;54(1):37-46.
49. Kushida A, Yamato M, Konno C, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T. Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature- responsive culture surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials.* 1999;45(4):355-62.
50. Tamama K, Kawasaki H, Kerpedjieva SS, Guan J, Ganju RK, Sen CK. Differential roles of hypoxia inducible factor subunits in multipotential stromal cells under hypoxic condition. *Journal of cellular biochemistry.* 2011;112(3):804-17.
51. Leal-Junior ECP, Lopes-Martins RÁB, Bjordal JM. Clinical and scientific recommendations for the use of photobiomodulation therapy in exercise performance enhancement and post-exercise recovery: current evidence and future directions. *Brazilian journal of physical therapy.* 2019;23(1):71-5.
52. Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg.* 2015;33(4):183-4.
53. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B.* 1999;49(1):1-17.
54. Karu TI, Pyatibrat LV, Kolyakov SF, Afanasyeva NI. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *J Photochem Photobiol B.* 2005;81(2):98-106.

55. Mason MG, Nicholls P, Cooper CE. Re-evaluation of the near infrared spectra of mitochondrial cytochrome c oxidase: Implications for non invasive in vivo monitoring of tissues. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1837(11):1882-91.
56. Lane N. Cell biology: power games. *Nature*. 2006;443(7114):901-3.
57. Pannala VR, Camara AK, Dash RK. Modeling the detailed kinetics of mitochondrial cytochrome c oxidase: Catalytic mechanism and nitric oxide inhibition. *J Appl Physiol* (1985). 2016;121(5):1196-207.
58. Karu TI. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem Photobiol*. 2008;84(5):1091-9.
59. Santana-Blank L, Rodríguez-Santana E, Santana-Rodríguez K. Theoretic, experimental, clinical bases of the water oscillator hypothesis in near-infrared photobiomodulation. *Photomed Laser Surg*. 2010;28 Suppl 1:S41-52.
60. Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response*. 2009;7(4):358-83.
61. Karu T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(2):159-60.
62. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers in medical science*. 2012;27(1):237-49.
63. Azevedo LH, de Paula Eduardo F, Moreira MS, de Paula Eduardo C, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth. *Lasers in medical science*. 2006;21(2):86-9.
64. Damante CA, De Micheli G, Miyagi SPH, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers in medical science*. 2009;24(6):885-91.
65. Meneguzzo D, Eduardo C, Ribeiro M, Marques M, editors. Influence of the fractioned irradiation energy in the phototherapy with low intensity laser on the growth of human dental pulp fibroblasts. *Mechanisms for Low-Light Therapy III*; 2008: International Society for Optics and Photonics.
66. Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP, et al. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*. 2007;39(4):365-72.

67. Pereira AN, Eduardo CdP, Matson E, Marques MM. Effect of low- power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*. 2002;31(4):263-7.
68. Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*. 2006;38(4):332-6.
69. Volpato LER, de Oliveira RC, Machado MAAM, Espinosa MM, Bagnato VS. Viability of fibroblasts cultured under nutritional stress irradiated with red laser, infrared laser, and red light-emitting diode. *Journal of Biomedical Optics*. 2011;16(7):075004.
70. Basso F, Turrioni A, Almeida L, Soares D, Oliveira C, Hebling J, et al. Nutritional deprivation and LPS exposure as feasible methods for induction of cellular—A methodology to validate for vitro photobiomodulation studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2016;159:205-10.
71. Sousa LR, Cavalcanti BN, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of TNF- α and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages. *Photomedicine and laser surgery*. 2009;27(1):37-42.
72. Dantas CMG, Vivan CL, Ferreira LS, Freitas PMd, Marques MM. In vitro effect of low intensity laser on the cytotoxicity produced by substances released by bleaching gel. *Brazilian oral research*. 2010;24:460-6.
73. Hou Jf, Zhang H, Yuan X, Li J, Wei Yj, Hu Ss. In vitro effects of low- level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: Proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*. 2008;40(10):726-33.
74. Fekrazad R, Asefi S, Allahdadi M, Kalhori KA. Effect of photobiomodulation on mesenchymal stem cells. *Photomedicine and laser surgery*. 2016;34(11):533-42.
75. Ülker N. Işık-Etkili Kemik Doku Mühendisliği: Hacettepe üniversitesi; 2013.
76. Watson N, Divers R, Kedar R, Mehindru A, Mehindru A, Borlongan MC, et al. Discarded Wharton jelly of the human umbilical cord: a viable source for mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2015;17(1):18-24.

77. Pelagiadis I, Dimitriou H, Kalmanti M. Biologic Characteristics of Mesenchymal Stromal Cells and Their Clinical Applications in Pediatric Patients. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 2008;30(4):301-9.
78. Zhan XS, El-Ashram S, Luo DZ, Luo HN, Wang BY, Chen SF, et al. A Comparative Study of Biological Characteristics and Transcriptome Profiles of Mesenchymal Stem Cells from Different Canine Tissues. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(6).
79. Smith JR, Pfeifer K, Petry F, Powell N, Delzeit J, Weiss ML. Standardizing Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells for Translation to Clinical Use: Selection of GMP-Compliant Medium and a Simplified Isolation Method. *Stem Cells International*. 2016;2016.
80. Bathini M, Raghushaker CR, Mahato KK. The molecular mechanisms of action of photobiomodulation against neurodegenerative diseases: a systematic review. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2020:1-17.
81. Chen H, Wang H, Li Y, Liu W, Wang C, Chen Z. Biological effects of low-level laser irradiation on umbilical cord mesenchymal stem cells. *AIP Advances*. 2016;6(4):045018.
82. Zhang H, Yu N, Zhou Y, Ma H, Wang J, Ma X, et al. Construction and characterization of osteogenic and vascular endothelial cell sheets from rat adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue and Cell*. 2016;48(5):488-95.
83. Pedroni ACF, Diniz IMA, Abe GL, Moreira MS, Sipert CR, Marques MM. Photobiomodulation therapy and vitamin C on longevity of cell sheets of human dental pulp stem cells. *J Cell Physiol*. 2018;233(10):7026-35.
84. Irmak G, Gümüşderelioğlu M. Photo-activated platelet-rich plasma (PRP)-based patient-specific bio-ink for cartilage tissue engineering. *Biomed Mater*. 2020;15(6):065010.
85. Zhang P, Li J, Qi Y, Zou Y, Liu L, Tang X, et al. Vitamin C promotes the proliferation of human adipose-derived stem cells via p53-p21 pathway. *Organogenesis*. 2016;12(3):143-51.
86. Di Lullo GA, Sweeney SM, Körkkö J, Ala-Kokko L, San Antonio JD. Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen *. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(6):4223-31.

87. To WS, Midwood KS. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2011;4(1):21.
88. Mezu-Ndubuisi OJ, Maheshwari A. The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatric Research*. 2021;89(7):1619-26.
89. Walingo K. Role of vitamin C (ascorbic acid) on human health-a review. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*. 2005;5(1).
90. Garrido P, Pedroni A, Cury D, Moreira M, Rosin F, Sarra G, et al. Effects of photobiomodulation therapy on the extracellular matrix of human dental pulp cell sheets. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2019;194:149-57.
91. Carr AC, Maggini S. Vitamin C and immune function. *Nutrients*. 2017;9(11):1211.
92. Li Z, Liu C, Xie Z, Song P, Zhao RC, Guo L, et al. Epigenetic dysregulation in mesenchymal stem cell aging and spontaneous differentiation. *PloS one*. 2011;6(6):e20526.
93. Vitor LLR, Prado MTO, Neto NL, de Oliveira RC, Santos CF, Machado MAAM, et al. Photobiomodulation changes type 1 collagen gene expression by pulp fibroblasts. *Laser Physics*. 2018;28(6):065603.
94. Zhao Y, Hoshiyama H, Shay JW, Wright WE. Quantitative telomeric overhang determination using a double-strand specific nuclease. *Nucleic Acids Research*. 2007;36(3):e14-e.

