

İŞIK-ETKİLİ KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

PHOTO-INDUCED BONE TISSUE ENGINEERING

NAZİFE ÜLKER

Prof. Dr. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2013

NAZİFE ÜLKER'in hazırladığı “Işık-Etkili Kemik Doku Mühendisliği” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

(Prof. Dr. Mehlika PULAT)

Danışman

(Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU)

Üye

(Prof. Dr. Zakir RZAYEV)

Üye

(Prof. Dr. Selma MUTLU)

Üye

(Yrd. Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

03/07/2013



Nazife ÜLKER

ÖZET

IŞIK-ETKİLİ KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Nazife ÜLKER

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Temmuz 2013, 103 sayfa

Sunulan tez çalışmasında, geniş (700-2500 nm, 650 W, 10^{-4} W/cm²) dalga boyu aralığında ışıma yapan plazma ark kaynağının biyomodülatif etkisinin 3-boyutlu hücre kültürlerinde araştırılması ve sonuçlarının kemik doku mühendisliği açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmasının ilk aşamasında, dondurarak-kurutma tekniği ile 3-boyutlu, gözenekli kitosan doku iskeleleri elde edilmiştir. Çalışmanın sonraki aşamasında, özel olarak tasarlanmış olan plazma ark kaynağının uygulama parametrelerinin belirlenmesine yönelik öncül çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Preosteoblastik MC3T3-E1 hücreleri ile yapılan analizler sonucunda, ışık kaynağının kullanılmasına bağlı olarak meydana gelen sıcaklık artışının hücrelere zarar vermeyecek boyutta olduğu belirlenmiştir. Işık kaynağının; hücrelere 10 cm mesafeden ve gün aşırı olarak, doku kültür kaplarındaki

(TCPS) hücre gruplarına 5 dk ve kitosan doku iskeleleri gruplarına ise 10 dk süre ile uygulanmasına karar verilmiştir.

Tez çalışmasının son aşamasında, belirlenen koşullarda plazma ark kaynağı kullanılarak durgun koşullarda yürütülen hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı ve üremesi MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür) analizi ile takip edilmiş, hücrelerin doku iskelesi içerisindeki morfolojileri ise SEM (taramalı elektron mikroskobu) analizi ile incelenmiştir. TCPS grubunda bulunan hücrelerin morfolojilerini incelemek için floresan boyama yapılmasının yanı sıra ışık mikroskobundan da fotoğraflar alınmıştır. Hücre farklılaşması ise alkalın fosfataz (ALP) aktivitesinin ölçümü ve Von Kossa boyama ile belirlenmiştir. RT-PCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) ile MC3T3-E1 hücrelerinin osteojenik farklılaşma belirteci olan ALP, kollajen tip I ve osteokalsin ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir.

Sonuçlar, literatürde hücre sel cevap açısından yararlı olduğu belirtilen dalga boylarını içeren plazma ark kaynağının, çalışma kapsamında kullanılan hücrelerin kemik dokusu oluşturmalarını pozitif yönde etkilediğini ve böylece kemik doku mühendisliğinde kullanımının uygun olacağını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kemik doku mühendisliği, kitosan, plazma ark kaynağı, fotobiyomodülasyon.

ABSTRACT

PHOTO-INDUCED BONE TISSUE ENGINEERING

Nazife ÜLKER

Master of Science, Bioengineering Division

Supervisor: Prof. Dr. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

July 2013, 103 pages

The purpose of this *in vitro* study is to investigate the biomodulatory effects of plasma arc welding (700-2500 nm, 650 W, 10^{-4} W/cm²) on three-dimensional (3D) cell cultures and to evaluate the results for bone tissue engineering applications.

In the first part of the study, porous chitosan scaffolds were prepared by freeze-drying technique. In the next part of the study, irradiation procedure was determined by several parameters i.e. irradiation time, frequency and distance. For the procedure of irradiation, primary studies were carried out using specially designed plasma arc welding. The results showed that, light-induced temperature rise did not affects cells when the distance between the lamp and the cells was 10 cm and the frequency of administration was daily. Moreover, light was applied for 5 min and 10 min to the cells in TCPS (tissue culture polystyrene dishes) and in chitosan scaffold groups, respectively.

In the last part of the study, cell-culture studies were performed under static conditions by using preosteoblastic MC3T3-E1 cell line and plasma arc welding. Cell viability and proliferation were analyzed by MTT (3-[4,5-dimethylthiazoyl-2-yl]-diphenyltetrazolium bromide) assay and morphological examination was done with SEM (scanning electron microscope). The photographs were taken under a light microscope and fluorescence staining was done to examine the morphology of the cells in the TCPS groups. Cell differentiation was quantified by determination of alkaline phosphatase (ALP) activities and Von Kossa staining. Osteogenic differentiation markers ALP, collagen type I and osteocalcin expression levels of MC3T3-E1 cells were determined using RT-PCR (real time polymerase chain reaction). According to the results, it was observed that photobiomodulation supported proliferation, osteogenic differentiation and matrix mineralization of MC3T3-E1 cells and inhibited apoptosis in both TCPS and chitosan scaffold groups.

The results indicate that plasma arc welding which involves a number of wavelengths useful for cellular responses mentioned in the literature, has positive effects on cells to bone tissue formation. In addition, photobiomodulation could be considered a promising application in bone tissue engineering.

Keywords: Bone tissue engineering, chitosan, plasma arc welding, photobiomodulation.

TEŞEKKÜR

Engin bilgi ve tecrübesiyle, tezimin yürütülmesi ve sonuçlandırılması için desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, disiplinli çalışması ve yol göstericiliğiyle her zaman örnek alacağım çok değerli hocam Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan, bana her zaman yardımcı olan, cesaret veren, dostluğu ve samimiyeti ile yanında huzur bulduğum, çok sevgili arkadaşım Anıl S. Çakmak'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımda çok emeği geçen, kıymetli zamanını bana ayıran Araş. Gör. Soner Çakmak'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans hayatım boyunca yanımda olan ve her zaman yanımda olacağını bildiğim, mutluluğu, neşeyi, hüznü paylaştığım ve birlikte olmaktan hep mutlu olduğum canım dostum Gülseren Irmak'a, tanıdığım günden itibaren iyi ki var dediğim, ruhunu çok sevdiğim can dostum Ezgi Odabaş'a sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca, sorduğu sorular ile bana yardımcı olan, bilgi ve tecrübeleri, dostluğu ile yanımda olan sevgili arkadaşım Tuğrul Tolga Demirtaş'a, içtenliği ve dostluğu ile yanımda olan güler yüzlü arkadaşım Araş. Gör. Işıl Gerçek Beşkardeş'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar arkadaşlarım Murat Şimşek'e, Araş. Gör. Damla Çetin Altındal'a, Müşra Zeren'e, Suna Sop'a Araş. Gör. Merve Çapkın Yurtsever'e, Gökçe Kaynak'a ve Ekin Ö. Tunçay'a teşekkür ederim.

Bana hep güvenen, maddi ve manevi destek olan, akademik yönü ile bana hep örnek olan, her yönü ile benzetmek istediğim, yol göstericim canım babam Mehmet Ülker'e, hayatımın olmazsa olmazı annem Tülay Ülker'e, varlığı yeten, ev arkadaşım, ablam Fatma Ülker'e, canım kardeşlerim Mustafa Ülker'e ve Mehtap Ülker'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
ETİK	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER	xi
ÇİZELGELER	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ ve ÇALIŞMANIN AMACI	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Doku Mühendisliği	3
2.2. Kemik Doku Mühendisliği	5
2.2.1. Kemik yapısı ve özellikleri	5
2.2.2. Kemik doku mühendisliği yaklaşımı	6
2.2.3. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan hücreler.....	7
2.2.4. Kemik doku mühendisliği için doku iskeleleri	8
2.2.4.1. Doku iskelelerinin temel özellikleri	8
2.2.4.2. Doku iskelesi üretiminde kullanılan biyomalzemeler	9
2.3. Fotobiyomodülasyon	10
2.3.1. Fotobiyomodülasyonda kullanılan ışık kaynakları	11
2.3.1.1. Lazer ışık kaynakları	11
2.3.1.2. LED ışık kaynakları	13
2.3.1.3. Plazma ark ışık kaynakları	13

2.3.2. Fotobiyomodülasyonun tarihçesi.....	14
2.3.3. Fotobiyomodülasyon parametreleri	14
2.3.4. Fotobiyomodülasyon-hücre etkileşimi	17
2.3.5. Fotobiyomodülasyonun moleküler mekanizması	18
2.3.5.1. Fotobiyomodülasyonda mitokondrinin önemi	20
2.3.5.2. Mitokondriyal sinyalizasyon	22
2.3.6. Fotobiyomodülasyonun kemik doku mühendisliği üzerine etkileri	26
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	31
3.1. Kullanılan Malzemeler	31
3.2. Kitosan Doku İskelesi Üretimi.....	32
3.3. Plazma Ark Kaynağı ve Yapılan Çalışmalar	32
3.3.1. Plazma ark kaynağı.....	32
3.3.2. Çalışma koşullarının belirlenmesine yönelik öncül çalışmalar.....	33
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	34
3.4.1. Hücre kültürü koşulları	34
3.4.2. Plazma ark sistemi ile ışık uygulaması.....	35
3.4.3. MTT analizi	37
3.4.4. Hücrelerin morfolojik olarak incelenmesi	37
3.4.4.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	37
3.4.4.2. Floresan boyama	38
3.4.5. Hücrelerin osteojenik farklılaşmasının belirlenmesi.....	38
3.4.5.1. ALP analizi	38
3.4.5.2. Von Kossa boyama.....	39
3.4.5.3. RT-PCR analizi	39
3.5. İstatistiksel Analiz	41
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	42
4.1. Kitosan-Bazlı Doku İskelelerinin Üretimi.....	42

4.1.1. Malzeme seçimi	42
4.1.2. Yöntem seçimi.....	43
4.1.3. Kitosan doku iskelelerinin üretimi	44
4.2. Işık Kaynağının Seçimi	45
4.2.1. Çalışma koşullarının belirlenmesine yönelik öncül çalışmalar.....	46
4.2.1.1. Sıcaklık artışının belirlenmesi	46
4.2.1.2. Mesafe ve uygulama sıklığı belirleme çalışması	48
4.2.1.3. Süre belirleme çalışması.....	52
4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	55
4.3.1. MTT analizi	56
4.3.2. Hücrelerin morfolojik olarak incelenmesi	59
4.3.2.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	59
4.3.2.2. Floresan boyama	69
4.3.3. Hücrelerin osteojenik farklılaşmasının belirlenmesi.....	77
4.3.3.1. ALP analizi	77
4.3.3.2. Von Kossa boyama.....	79
4.3.3.3 RT-PCR analizi	82
5. GENEL SONUÇLAR	92
KAYNAKLAR	95
EKLER.....	102
ÖZGEÇMİŞ	103

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Doku mühendisliği yaklaşımı	4
Şekil 2.2. Lazerin biyolojik alanlardaki kullanımı	11
Şekil 2.3. Elektromanyetik spektrum.....	12
Şekil 2.4. Fotobiyomodülasyonda kullanılan ışık kaynaklarının dalga boyu ve maksimum çıkış güçleri	15
Şekil 2.5. LLLT etkisi ile hücrede gerçekleşen primer reaksiyonlar	19
Şekil 2.6. LLLT etkisi ile gerçekleşen hücresel sinyal basamakları (ikincil reaksiyonlar).....	19
Şekil 2.7. Mitokondri solunum zincirinin yapısı	22
Şekil 2.8. Işığın absorpsiyonundan sonra hücrede meydana gelen olaylar	23
Şekil 3.1. Plazma ark ışık kaynağının fotoğrafları: (a) genel görüntüsü. (b) uygulama sırasında çekilmiş fotoğrafı	33
Şekil 3.2. Deneysel çalışmaların şematik gösterimi: (a) hücre kültür çalışmaları, (b)-(c) hücre kültür çalışmaları ile berabe plazma ark ışık kaynağının uygulama sırasındaki görüntüleri	36
Şekil 4.1. Kitosan doku iskelelerinin (a) SEM fotoğrafı (200 X), (b) optik fotoğrafı	44
Şekil 4.2. Farklı mesafelerde ve sıklıklarda gerçekleştirilen ışık uygulaması ile TCPS üzerinde çoğalan MC3T3 hücrelerine ait MTT grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu ışık uygulanmayan grup iken, * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001)	51
Şekil 4.3. Farklı sürelerde gerçekleştirilen ışık uygulaması ile TCPS üzerinde çoğalan MC3T3 hücrelerine ait MTT grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu; ışık uygulanmayan grup iken, * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001)	53
Şekil 4.4. Farklı sürelerde uygulanan ışık ile kitosan doku iskeleleri üzerinde çoğalan MC3T3 hücrelerine ait MTT grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu; ışık uygulanmayan grup iken, * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001 iken, ■ p<0.05, ■■ p<0.01).....	54
Şekil 4.5. TCPS (ışık uyg. yok), TCPS (1 kere ışık uyg.) ve TCPS (2 kere ışık uyg.) gruplarında bulunan MC3T3 hücrelerine ait MTT grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu TCPS (ışık uyg. yok) iken, * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001)	56

Şekil 4.6. Kitosan doku iskeleleri için oluşturulan MTT grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan (ışık uyg. yok) iken, * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001)	58
Şekil 4.7. Kitosan doku iskelelerinde 3. güne ait SEM fotoğrafları. (a, b) ışık uygulaması yok, (c, d) 1 kere ışık uygulaması, (e, f) 2 kere ışık uygulaması. Büyütmeler: (a) 841 X, (b) 1.99 K X, (c) 1.57 K X, (d) 2.75 K X (e) 1.21 K X, (f) 2.56 K X.....	60
Şekil 4.8. Kontrol grubunun (kitosan doku iskelesi, ışık uygulaması yok) 7. gün SEM görüntüleri: (a, b) doku iskelelerinin yüzey SEM görüntüleri, (c, d) boyuna kesitinden elde edilen SEM görüntüleri. Büyütmeler: (a) 1.80 K X, (b) 1.52 K X, (c) 886 X, (d) 850 X	61
Şekil 4.9. Bir kez ışık uygulaması yapılan kitosan doku iskelesi grubuna ait 7. gün SEM görüntüleri: (a, b, c) doku iskelelerinin yüzey SEM görüntüleri, (d) enine kesitinden elde edilen SEM fotoğrafları. Büyütmeler: (a) 963 X, (b) 963 X, (c) 963 X, (d) 873 X	62
Şekil 4.10. İki kez ışık uygulaması yapılan kitosan doku iskelesi grubuna ait 7. gün SEM görüntüleri: (a, b) doku iskelelerinin yüzey SEM görüntüleri, (c, d) enine kesitinden elde edilen SEM görüntüleri. Büyütmeler: (a) 1.09 K X, (b) 1.56 K X, (c) 1.11 K X, (d) 8.91 K X.....	63
Şekil 4.11. Kontrol grubunun (kitosan doku iskelesi, ışık uygulaması yok) 14. gününe ait SEM görüntüleri: (a, b, c) doku iskelelerinin enine SEM görüntüleri, (d) boyuna kesitinin SEM görüntüleri. Büyütmeler: (a) 963 X, (b) 963 X, (c) 2.26 K X, (d) 1.92 K X	64
Şekil 4.12. Bir kez ışık uygulaması yapılan kitosan doku iskelesi grubuna ait 14. gün SEM görüntüleri: (a, b) doku iskelelerinin yüzey SEM görüntüleri, (c, d) enine kesitinin SEM fotoğrafları. Büyütmeler: (a) 121 X, (b) 1.05 K X, (c) 102 X, (d) 652 X.....	65
Şekil 4.13. Ondördüncü gün SEM fotoğrafları. (a) 1 kez ışık uygulanan kitosan doku iskelelerinin enine, (b) boyuna kesite ait görüntüler. Büyütmeler: (a) 4.70 K X; 13.03 K X, (b) 989 X; 4.70 K X	66
Şekil 4.14. İki kez ışık uygulaması yapılan doku iskelesi grubuna ait 14. gün SEM görüntüleri: (a), (b), (c) ve (d) doku iskelelerinin yüzeyine ait SEM fotoğrafları. Büyütmeler: (a) 89 X, (b) 613 X, (c) 1.50 K X, (d) 2.22 K X	68
Şekil 4.15. Işık uygulanmayan TCPS (kontrol) grubunun 4. gün floresan boyama görüntüleri. Büyütmeler: (a) 4 X, (b) 10 X, (c) 20 X, (d) 40 X. Fotoğraflardaki kırmızı bölgeler hücre çekirdeklerini, yeşiller aktin filamentlerini, oklar mitoz safhasında olan hücreleri göstermektedir.....	70
Şekil 4.16. Bir kez ışık uygulaması yapılan TCPS grubuna ait 4. gün floresan boyama görüntüleri. Büyütmeler: (a) 4 X, (b) 10 X, (c) 20 X, (d) 40 X. Oklar mitoz safhasında olan hücreleri göstermektedir.....	71

Şekil 4.17. İki kez ışık uygulaması yapılan TCPS grubuna ait 4. gün floresan boyama görüntüleri. Büyütmeler: (a) 4 X, (b) 10 X, (c) 20 X, (d) 40 X. b'de yer alan oklar mitoz safhasında olan hücreleri, d'de bulunan olkar filamentleri göstermektedir.....	72
Şekil 4.18. Işık uygulaması yapılmayan TCPS grubunun 7. gün floresan boyama görüntüleri. Büyütmeler: (a) 4 X, (b) 10 X, (c) 20 X, (d) 40 X. Oklar mitoz safhasında olan hücreleri göstermektedir	73
Şekil 4.19. Bir kez ışık uygulaması yapılan TCPS grubuna ait 7. gün floresan boyama görüntüleri. Büyütmeler: (a) 4 X, (b) 10 X, (c) 20 X, (d) 40 X. Oklar mitoz safhasında olan hücreleri göstermektedir	74
Şekil 4.20. İki kez ışık uygulaması yapılan TCPS grubuna ait 7. gün floresan boyama görüntüleri. Büyütmeler: (a) 4 X, (b) 10 X, (c) 20 X, (d) 40 X. Oklar mitoz safhasında olan hücreleri göstermektedir	75
Şekil 4.21. TCPS hücre gruplarının 21. gün ışık mikroskobu görüntüleri: (a) TCPS (ışık uygulaması yok), (b) TCPS (1 kere ışık uygulaması) ve (c) TCPS (2 kere ışık uygulaması). Büyütmeler: (a) 10 X, (b) 10 X, (c) 10 X. Oklar ölen hücreleri göstermektedir	76
Şekil 4.22. TCPS (ışık uyg. yok), TCPS (1 kere ışık uygulanan) ve TCPS (2 kere ışık uygulanan) gruplarında bulunan MC3T3 hücrelerine ait ALP aktivitesi analiz sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu TCPS (ışık uyg. yok) iken, * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001)	78
Şekil 4.23. Kültürün 21. gününde Von Kossa ile boyanan TCPS grupları: (a) TCPS (ışık uygulaması yok), (b) TCPS (1 kere ışık uygulaması), (c) TCPS (2 kere ışık uygulaması) grubu. Büyütmeler: (a) 20 X, (b) 20 X, (c) 20 X	80
Şekil 4.24. Kitosan doku iskelesi gruplarının 21. gün Von Kossa boyama görüntüleri: (a) Kitosan (ışık uyg. yok), (b) Kitosan (1 kere ışık uyg.), (c) Kitosan (2 kere ışık uyg.)	81
Şekil 4.25. TCPS (ışık uygulaması yok), TCPS (1 kere ışık uygulaması) ve TCPS (2 kere ışık uygulaması) üzerinde kültüre edilmiş MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl ALP gen ekspresyonu sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu; ışık uygulanmayan grup iken, * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001 iken, ▫ p<0.05, ▫▫ p<0.01, ▫▫▫ p<0.001)	83
Şekil 4.26. TCPS (ışık uygulaması yok), TCPS (1 kere ışık uygulaması) ve TCPS (2 kere ışık uygulaması) üzerinde kültüre edilmiş MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl tip I kollajen gen ekspresyonu sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu; ışık uygulanmayan grup iken, * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001 iken, ▫ p<0.05, ▫▫ p<0.01, ▫▫▫ p<0.001)	84
Şekil 4.27. TCPS (ışık uygulaması yok), TCPS (1 kere ışık uygulaması) ve TCPS (2 kere ışık uygulaması) üzerinde kültüre edilmiş MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl osteokalsin gen ekspresyonu sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu; ışık uygulanmayan grup iken, * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001 iken, ▫ p<0.05, ▫▫ p<0.01, ▫▫▫ p<0.001)	86

Şekil 4.28. Kitosan doku iskelesi (ışık uygulaması yok), kitosan (1 kere ışık uygulaması) ve kitosan (2 kere ışık uygulaması) üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl ALP gen ekspresyonu sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu; ışık uygulanmayan grup iken, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$) 88

Şekil 4.29. Kitosan doku iskelesi (ışık uygulaması yok), kitosan (1 kere ışık uygulaması) ve kitosan (2 kere ışık uygulaması) üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl tip I kollajen gen ekspresyonu sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu; ışık uygulanmayan grup iken, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ iken, ▫ $p<0.05$, ▨ $p<0.01$, ▩ $p<0.001$) 89

Şekil 4.30. Kitosan doku iskelesi (ışık uygulaması yok), kitosan (1 kere ışık uygulaması) ve kitosan (2 kere ışık uygulaması) üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl osteokalsin gen ekspresyonu sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu; ışık uygulanmayan grup iken, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ iken, ▫ $p<0.05$, ▨ $p<0.01$, ▩ $p<0.001$) 90

Şekil 1. Işık kaynağına ait dalga boylarını içeren spektral ışınım grafiği..... 103

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Lazer tipi örnekleri	13
Çizelge 2.2. LLLT'nin farklı hücre hatları üzerindeki sonuçları.....	27
Çizelge 3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri	41
Çizelge 4.1. Kitosan doku iskelelerinin temel özellikleri	45

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

v/v	Hacim/Hacim Oranı
w/v	Ağırlık/Hacim Oranı
$\Delta\psi_m$	Mitokondriyal Membran Potansiyeli

Kısaltmalar

α -MEM	Minimum Essential Medium Alpha Modification
ADP	Adenozin Difosfat
ADSC	Adipoz Kökenli Kök Hücre
AgNO ₃	Gümüş Nitrat
ALP	Alkalen Fosfataz
ATP	Adenozin Trifosfat
BMSC	Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre
BSA	Sığır Serum Albümin
Col I	Kollajen I
DD	Deasetilasyon Derecesi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ECM	Hücre Dışı Matris
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ER	Endoplazmik Retikulum
ERK	Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
FBS	Fetal Sığır Serum
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
GaAlAs	Galyum-Alüminyum-Arsenit
GaAlInP	Galyum-Alüminyum-İndiyum-Fosfor

GaAs	Galyum-Arsenit
HCl	Hidroklorik Asit
hDPSC	İnsan Dental Pulpa Kök Hücreleri
He-Ne	Helyum-Neon
HGF	İnsan Gingival Fibroblast
InGaAlP	İndiyum-Galyum-Alüminyum-Fosfit
InGaAsP	İndiyum-Galyum-Arsenit-Fosfat
LED	Işık Yayan Diyot
LLLT	Düşük Seviyeli Lazer/Işık Terapisi
MSC	Mezenkimal Kök Hücre
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-Difeniltetrazolyum Bromür
mW	Miliwatt
Nd:YAG	Neodyum katkılı Yitrium- Alüminyum-Garnet
NF-KB	Nükleer Faktör kappa B
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
NO	Nitrik Oksit
OCN	Osteokalsin
PAC	Plazma Ark Kaynağı
PBM	Fotobiyomodülasyon
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PDGF	Platelet-Kaynaklı Büyüme Faktörü
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinaz
PLGA	Poli(Laktik-ko-glikolik asit)
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimerik Zincir Reaksiyonu
Runx2	Runt İlişkili Transkripsiyon Faktörü 2

SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TCPS	Polistiren Hücre Kültür Kapları
TGF	Transforme Büyüme Faktörü
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ ve ÇALIŞMANIN AMACI

Kemik, yaşam süresince metabolik faktörlerin ve hormonların etkisi altında değişebilme (yenilenme, büyüme ve küçülme gibi) yeteneğine sahip olan dinamik ve damarlı bir dokudur. Kemiğin esas görevi vücuda destek sağlamaktır. Ayrıca, hareketle sonuçlanan kas kasılmasını desteklemekle birlikte, kafatası ve göğüs kafesi ile yaşamsal organların ve kan yapıcı iliğin korunmasını da sağlamaktadır.

Doku mühendisliği ile kemik rejenerasyonunun sağlanabilmesinde üç temel bileşene gereksinim vardır. Bu bileşenler; osteoblastlar veya osteoblastlara farklılaşabilen hücreler, hücre büyümesini ve mineralize kemik doku oluşumunu destekleyen büyüme faktörleri ve doku iskeleleridir. Bu üç bileşenin tümü kullanılabildiği gibi, sadece hücreler ve doku iskelesinin kullanımı ile gerçekleştirilen kemik doku mühendisliği çalışmaları da mevcuttur.

Doku iskeleleri, hücre dışı matrisi taklit edecek biçimde tasarlanmış 3-boyutlu yapılardır. Doku iskelelerinin kullanımı, hasarlı bölgeye yapısal destek sağlamanın yanı sıra vücudun kendini yenileme potansiyelini de desteklemektedir. Ayrıca meydana gelen doku ile eski dokunun, fiziksel, mekanik ve fonksiyonel olarak aynı özellikleri taşımalarını sağlamaktadır [1].

Kitinin deasetillenmiş formu olan kitosan, kemiğin ekstraselüler matrisinin temel bileşeni olan glukozaminoglikan (GAG) ile benzer özellik göstermekte, kemik iyileşmesini, hücre yapışmasını ve çoğalmasını artırmaktadır. Ayrıca, osteokondüktif ve osteouyumlu olması nedeniyle kemik hücrelerinin farklılaşmasını ve kemik oluşumunu desteklemektedir. Kitosan, kemik doku oluşumunu destekleyen içsel bağlantılı gözeneklere sahip doku iskelelerinin olarak sağlamaktadır [2-3].

Fotobiyomodülasyon (PBM), hücre fonksiyonlarını normalleştirmek ve hücrelerden biyolojik cevaplar almak için ışık enerjisinin kullanımınıdır. Birçok parametrenin biraraya gelmesi ile PBM'den pozitif yönde sonuçlar alınmaktadır. Örneğin, PBM ile hücresel çoğalma, ATP, RNA, DNA ve kollajen sentezi gibi biyolojik olaylar artmaktadır. Ayrıca, PBM herhangi bir sitotoksik etki göstermemekte, apoptozu önlemekte, mitozu uyarmakta, hücresel göçü ve tutunmayı da artırmaktadır [4-5-6].

Fotobiyomodülasyon ile meydana gelen biyolojik olaylar mitokondri solunum zincirinin aktivasyonu ve hücresel sinyalin başlaması ile gerçekleşir ve birincil ve ikincil reaksiyonlar olmak üzere, iki basamaktan oluşan olaylar meydana gelir. Birincil reaksiyonlarda fotoalıcıların fonksiyonlarında değişim olur, bu değişimin ardından ikincil reaksiyonlar gerçekleşir. İkincil reaksiyonlarda ise hücre sinyalinde ve daha sonra buna bağlı olarak hücre fonksiyonlarında değişim olur [7].

Fotobiyomodülasyonda kullanılan ışık kaynakları; lazerler, LED'ler (Light-Emitting Diodes, ışık yayan diyotlar) ve plazma ark ışık kaynakları olmak üzere temelde üç çeşittir. Miliwatt düzeyinde çıkış gücüne sahip olan lazerler ve LED'lerden farklı olarak plazma ark ışık kaynağının enerji spektrumu geniştir ve ultraviyole (UV), görünür ve kızılötesi ışık içerirler. He-Ne, Ga-Al ve Ga-As gibi lazerin kullanıldığı LLLT, günümüzde yumuşak doku tedavilerinde ve yara iyileşmesini hızlandırmada kullanılmaktadır.

İlgili literatür incelendiğinde 632 nm, 647 nm, 780 nm ve 810 nm gibi farklı dalga boylarındaki lazerler ile çeşitli hücrelerin (fibroblast, osteoblast, endotelial hücre, kreatinosit ve kemik iliği ve adipoz kökenli kök hücreler) etkileştirildiği 2-boyutlu (2D) kültürlerde yürütülen çalışmaların olduğu görülmektedir [8-9]. Hücre canlılığı, çoğalması ve farklılaşması üzerinde lazer etkisinin incelendiği bu çalışmalarda, ışının dalga boyu, ışınlama sıklığı ve süresi, ışınlama yoğunluğu ve doz gibi ışık kaynağına yönelik parametrelerin hücresel cevabı pozitif ya da negatif yönde etkilediği belirlenmiştir. Genel olarak, 620 nm, 635 nm, 830 nm ve 1,064 nm gibi değişen dalga boylarındaki lazerlerin uygun sistem parametreleri oluşturacak şekilde kullanıldıklarında çoğalma ve farklılaşmayı olumlu etkiledikleri rapor edilmiştir. Bu bilgilerin ışığında, önerilen tez çalışmasında hücresel cevap açısından yararlı olduğu belirtilen dalga boylarını içeren özel olarak tasarlanmış bir plazma ark kaynağının kullanılması ve etkinliğinin kemik doku mühendisliği açısından değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu hedefe yönelik olarak üç-boyutlu (3D) kitosan doku iskeleleri ve preosteoblastik MC3T3-E1 hücre hattının kullanımına karar verilmiş ve 700-2500 nm dalga boyu aralığında ışınlar içeren plazma ark kaynağı ile durgun ortamda hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücre çoğalması ve farklılaşması ile ilgili *in vitro* bulgular değerlendirilerek, tez kapsamında kullanılan ışık kaynağının kemik doku mühendisliğinde uygulanabilirliği tartışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde yapılan tez çalışmasının temelini oluşturan konular ile ilgili literatür bilgisi 3 başlık altında toplanmıştır. İlk olarak doku mühendisliği hakkında kısa bir bilgi verilmiştir. İkinci bölümde, kemiğin yapısı ile birlikte kemik doku mühendisliği yaklaşımından bahsedilmiş, kullanılan hücreler ve doku iskeleleri ayrıntılı bir biçimde anlatılmıştır. Son bölümde ise fotobiyomodülasyon hakkında detaylı bilgi verilmiş ve tez kapsamında kullanılacak olan plazma ark ışık kaynağından söz edilmiştir.

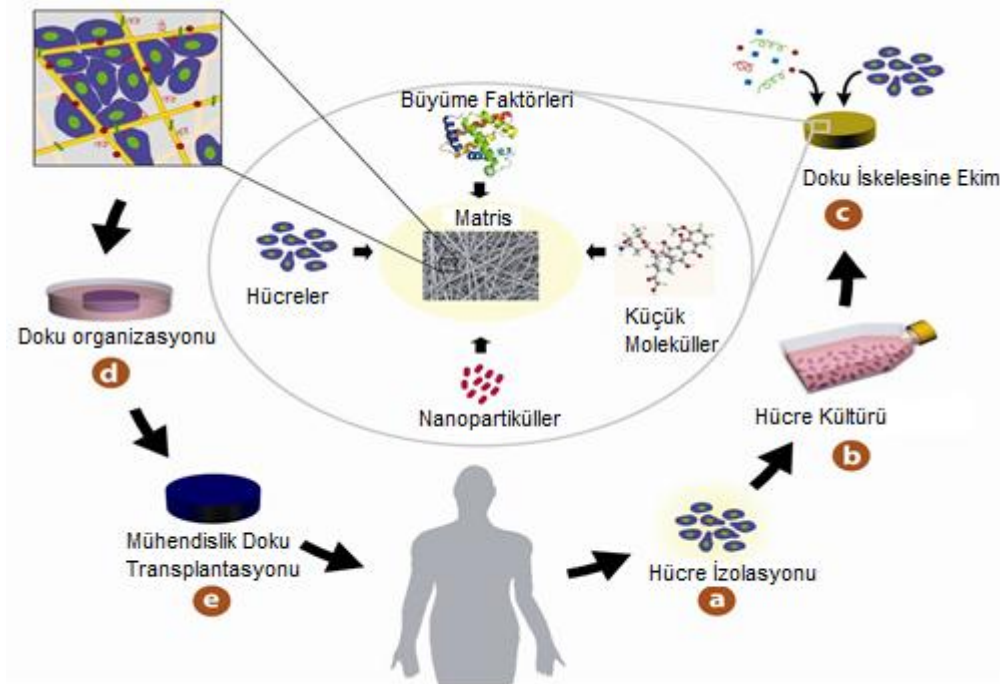
2.1. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, mühendislik prensipleri ile yaşam bilimlerinin sinerjik bir şekilde birleştirilmesi ile vücutta kaza, kanser ve travma sonucu meydana gelen işlevsel eksikliklerin giderilmesi ya da iyileştirilmesi için hücrelerin, mühendislik malzemelerinin ve gerekli biyosinyallerin bir araya getirilmesi olarak tanımlanmaktadır [10].

Vücutta, herhangi bir nedenden dolayı meydana gelen hasarların iyileştirilmesinde kullanılan tıbbi tekniklerde önemli ilerlemeler olmasına rağmen, organ veya doku nakli hala yaygın biçimde kabul gören bir yöntemdir. Hastalardan dokuların alınması ve hastanın hasarlı bölgesine nakledilmesi için uygulanan cerrahi müdahaleler çoğunlukla başarılıdır. Ancak, alınabilecek doku miktarı sınırlıdır ve ikinci bir ameliyat gerektirdiğinden hem hastaya acı vermekte hem de enfeksiyona neden olabilmektedir. Kullanılabilecek alternatif doku kaynakları, diğer insanlardan ya da bazı hayvanlardan alınan dokular ya da organlar olabilmektedir. Ancak, implantasyon sonrasında oluşabilecek immünolojik etkiler (bağışık sisteminin vereceği cevaplar) ve donör organ teminindeki zorluk, bu kaynakların kullanımında da problem yaratmaktadır [11]. Tüm bu nedenlerden dolayı, son yıllarda **doku mühendisliği yaklaşımı** ön plana çıkmıştır.

Doku mühendisliğinde tedaviler üç farklı yaklaşım ile yürütülebilir. İlk yaklaşım olarak; bir molekül, örneğin büyüme faktörü hasarlı doku veya organa enjekte edilir veya uygun biçimde (örneğin kontrollü salım sistemi şeklinde) yerleştirilir. Bu molekül, hastanın kendi hücrelerinin yaralı bölgeye hareketini sağlar ve onları istenilen tür hücreye dönüştürerek dokuyu rejenere eder. Bu yaklaşım, küçük doku hasarları durumunda geçerlidir. İkinci yaklaşımda, çeşitli kaynaklardan izole edilen hücrelerin

uygun polimerik taşıyıcılardaki kapsülleri (mikrokapsül veya makrokapsül) hazırlanarak vücuda verilir ve doku onarımının gerçekleşmesi sağlanır. Doku mühendisliğinin üçüncü ve en çarpıcı yaklaşımında ise, hastanın kendisinden veya uygun bir vericiden alınan sağlıklı hücreler uygun besi ortamında kültüre edilerek çoğaltılır. Çoğaltılan hücrelerin biyosinyal moleküllerle birlikte, gerçek doku mikroçevresini taklit eden üç boyutlu doku iskelesi üzerine ekimi yapılır. Son olarak elde edilen yapı, doku hasarının olduğu bölgeye implante edilir. Ayrıca, hücre üremesini ve işlevini gerçekleştirmek üzere gerçek doku mikroçevresindeki mekanik kuvvetlere benzer etkilerin sağlanabilmesi için çeşitli biyoreaktörler de kullanılabilmektedir [1]. Doku mühendisliği ile doku rejenerasyonunun amaçlandığı yaklaşım Şekil 2.1’de şematize edilmiştir.



Şekil 2.1. Doku mühendisliği yaklaşımı [12].

2.2. Kemik Doku Mühendisliği

2.2.1. Kemik yapısı ve özellikleri

Kemik, yaşam süresince metabolik faktörlerin ve hormonların etkisi altında değişebilme (yenilenme, büyüme ve küçülme gibi) yeteneğine sahip olan dinamik ve damarlı bir doku olup, vücudun genel destek görevini üstlenmiştir. Ayrıca kasların bağlanması ile harekette etkinliği, kafatası ve göğüs kafesi ile yaşamsal organların ve kan yapıcı iliğin korunmasını sağlar [13]. Basınç, çekilme, eğilme ve bükülmelere karşı yüksek derecede dayanıklı olan kemik, aynı zamanda oldukça hafif bir materyalden oluşmuştur. Kemik, kaba şeklinden mikroskobik yapısına kadar tüm organizasyon seviyelerinde minimum ağırlık ve maksimum ekonomik materyalle çok büyük bir dayanıklılığa sahiptir [14].

Kemik dokusu, **kortikal** (sıkı, kompakt) ve **trabeküler** (süngerimsi) kemik olmak üzere iki ana bölümden oluşmaktadır. Dikey iskeletin sert kemiği olan kompakt kemik, sıkı düzenlemiş, boşluk içermeyen bir doku olup, kayma gerilimine karşı dirençlidir. Mikroskobik olarak incelendiğinde, kompakt kemiğin; Havers kanalları etrafında 3-7 µm kalınlıktaki lamellerden, hücrelerden ve sert bir matristen oluştuğu görülmektedir. Trabeküler kemik dokusunun ise gevşek, çok boşluklu bir yapısı vardır ve bu boşluklarda kemik iliği bulunmaktadır [2].

Kemiğin dış ve iç yüzeyleri, kemiği oluşturan hücreler ve bağ dokusundan oluşan zarlar ile örtülüdür. Bu zarlardan, dıştaki zara **periosteum**, içteki zara da **endosteum** adı verilmektedir [15]. Periosteumda kan damarları, lenf damarları ve duyu sinirlerinden oluşan yoğun bir ağ bulunur. Endosteum, içinde kemik iliğini bulunduran kemik boşluklarının duvarlarını döşeyen yassı osteojenik hücrelerin oluşturduğu ince bir tabakadır [14].

Aktif olarak büyümekte olan kemiklerde dört çeşit kemik hücresi bulunur. Bunlar, **osteoprogenitor hücreler** (osteojenik hücreler), **osteoblastlar**, **osteositler** ve **osteoklastlardır**. Osteojenik hücreler kemik hücresi olma yönünde koşullanmış mezenşim hücrelerdir. Osteoblastlar kemik oluşumundan ve kemik matrisinin organik kısmının sentezinden sorumlu hücrelerdir. Osteositler, kalsiyum tuzlarının birikmesiyle kireçleşmiş kemik matrisi içinde hapsolan osteoblastlardır. Dolayısı ile osteositler, tamamen oluşmuş kemikteki esas hücrelerdir. Osteoklastlar ise kemiğin

yeniden biçimlenme süresinde çözünüp çevre dokularca emilmesinden sorumlu çok çekirdekli hücrelerdir.

Kemik matrisi organik ve inorganik bileşenlerden oluşan kompozit bir malzemedir. Kemiğin ağırlıkça % 65'ini inorganik bileşenler (kalsiyum, potasyum, sodyum, magnezyum, karbonat ve fosfat), %25'ini organik bileşenler ve % 10'unu da su oluşturmaktadır. Organik bileşenlerin büyük bir kısmı ise kollajenden oluşmaktadır. Kemik matrisinin zemin maddesi glikozaminoglikanlar (kondroitin sülfat, keratan sülfat ve hiyaluronik asit), osteokalsin, osteonektin ve osteopontin gibi küçük glikoproteinler ve birkaç sialoproteinden oluşur [14].

2.2.2. Kemik doku mühendisliği yaklaşımı

Kemik dokusu, etkin bir şekilde kendini yenileme özelliğine sahiptir. Özellikle genç bireylerde, kemiğin sahip olduğu yüksek iyileşme potansiyeli sayesinde önemli müdahaleler olmadan kemik hasarları iyileşebilmektedir. Fakat kemik iyileşmesinin zayıf olduğu durumlarda veya tümörlerin çıkarılmasıyla ve kırık uçların birleşmemesinden dolayı oluşan büyük kemik hasarlarında cerrahi müdahale olmadan iyileşme gerçekleşmemektedir [16]. Kemik hasarlarını tedavi etmek amacıyla kemik yamaları (greftler) ve kemik yerini tutabilecek malzemeler sıklıkla kullanılmaktadır. Seramikler (doğal ve sentetik), demineralize kemik matrisi, otolog kemik iliği ve kompozit greftler kemik yerine geçebilecek malzemeler arasında sayılabilir [17].

Geleneksel tedavi yöntemlerinde; **otogreft**, **allogreft** ve **zenogreft** kullanımı yer almaktadır. Allogreftler, kadavradan alınan kemik yamaları, zenogreftler ise hayvanlardan alınan kemik yamalarıdır. Allogreft ve zenogreft kullanımlarının her ikisinde de bazı kısıtlamalar bulunmaktadır. Bu kısıtlamalar arasında; hastalık bulaştırma riski taşımaları, hastada bağışıklık yanıtı oluşturmaları ve osteoindüksiyon kaybına neden olmaları yer almaktadır [18]. Bütün bu olumsuzluklardan dolayı, kemik hasarlarının tedavisi için en uygun yöntem otogreft kullanımı olarak görülmektedir. Bu işlem, hastanın kemik dokusunun yük taşımayan bölgesinden alınan bir kemik parçasının, hasarlı bölgeye transplantasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Bu şekilde elde edilen kemik yaması, kemik dokuyla iyi bir şekilde bütünleşme sağlar. Bağışıklık sistemi tepkileri oluşturmaması ve hastalık aktarım riski taşıması diğer üstünlükleridir. Fakat otolog yamaların kullanımında; kemik yamalarına şekil

vermedeki zorluklar, kemik parçası alınırken hastanın vücudunda yeni bir kemik hasarına yol açılması gibi sorunlarla karşılaşmaktadır [19].

Tüm bu olumsuzlukları aşmak için geliştirilen doku mühendisliği yaklaşımı ile kemik rejenerasyonunun sağlanabilmesinde üç temel bileşene gereksinim vardır. Bu bileşenler; hücre büyümesini ve mineralize kemik doku oluşumunu destekleyen büyüme faktörleri, doku iskelesi ve osteoblastlar veya osteoblastlara farklılaşabilen hücrelerdir. Bu üç bileşenin tümü kullanılabilirdiği gibi, sadece hücreler ve doku iskelesinin kullanımı ile gerçekleştirilen kemik doku mühendisliği çalışmaları da mevcuttur.

Sonuç olarak, kemik doku mühendisliği kemik onarımında gelecek vaat eden bir yaklaşımdır. Kemik doku mühendisliği, geleneksel olan otograft ve allograft yöntemleri ile karşılaştırıldığında, donör azlığı, patojen aktarım riski ve immün cevaba neden olma gibi problemleri ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle kemik doku mühendisliği alanındaki araştırmalar hızla artmaktadır [20].

2.2.3. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan hücreler

Kemik doku mühendisliğinin temel elemanlarından olan hücrelerin elde edilmesi için uygun bir hücre kaynağının bulunması gerekmektedir. Kullanılacak hücrelerin kolay elde edilebilmesi, *in vitro* olarak kolay çoğaltılabilmesi, immünolojik olmaması ve oluşturulması hedeflenen dokuya benzer protein ekspresyonuna sahip olması gerekmektedir.

Kemik dokunun elde edilebilmesi amacıyla osteoblastlar ve kök hücreler kullanılmaktadır. Osteoblastların, biyopsi ile kolay elde edilebilme ve immünojenik cevap oluşturmama gibi avantajları bulunmaktadır. Bunun yanı sıra, az sayıda osteoblast elde edilebilmesi ve hücrelerin çoğaltılmasının zorluğu gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Farklı kaynaklardan yeterli miktarda osteoblast temin edilebilir. Fakat bu durumda, immünojenik yanıt oluşturma ve hastalık taşıma gibi riskleri de oluşmaktadır [3].

Son yıllarda, doku mühendisliği alanında yapılan çalışmalarda, yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitesine sahip olan kök hücreler kullanılmaktadır. Kemik rejenerasyonunda bu hücreler osteoblastlara farklılaşmaktadır. Bu amaçla, kemik iliği, kordon kanı ve adipoz doku gibi farklı kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücreler (MKH) sıklıkla kullanılan hücreler arasındadır [21].

Bu hücre kaynaklarına ilaveten, MC3T3-E1 (fare preosteoblast hücre hattı), SAOS-2 (insan osteosarkoma hücre hattı) ve UMR-106 (sıçan osteosarkoma hücre hattı) gibi osteoblast benzeri hücre hatları da kullanılmaktadır [15].

2.2.4. Kemik doku mühendisliği için doku iskeleleri

Doku mühendisliğinin üç temel bileşeninden biri olan doku iskeleleri, hücre dışı matrisi taklit edecek biçimde tasarlanmış 3-boyutlu yapılardır ve yapay bir “hücre dışı matris” olarak düşünülebilirler. Doku iskelelerinin kullanımı, hasarlı bölgeye yapısal destek sağlamanın yanı sıra vücudun kendini yenileme potansiyelini de desteklemektedir. Ayrıca meydana gelen doku ile eski dokunun, fiziksel, mekanik ve fonksiyonel olarak aynı özellikleri taşımalarını sağlamaktadır [1].

2.2.4.1. Doku iskelelerinin temel özellikleri

Doku iskelesi üretiminde kullanılacak olan malzemenin seçimi çok önemlidir. Malzemeler vücut içerisine yerleştirildiğinde istenmeyen doku tepkilerine yol açmamalı, yani malzeme biyouyumlu olmalıdır. Yerleştirildiği bölgedeki doku ile iyi bir şekilde bütünleşmeli ve hücre yapışmasını, farklılaşmasını ve büyümesini destekleyecek uygun yüzey kimyasına sahip olmalıdır [1].

Kemik doku mühendisliğinde kullanılacak olan ideal malzemenin osteoindüktif ve osteokondüktif olması beklenmektedir. Osteoindüktif malzemeler, kök hücrelerin çevre dokularda osteoblastik fenotipe dönüşmelerini ve sonrasında kemik oluşturmalarını sağlayan malzemelerdir. Bu malzemeler, tedavi olmaksızın normal iyileşmenin gerçekleşmediği durumlarda kullanılarak hasarlı bölgenin iyileşmesini sağlar. Osteokondüktif malzemeler ise, kemik kapiller yapısının oluşumunu ve hücrelerin üremelerini destekleyerek, kemiğin üç boyutlu yapısının oluşmasını sağlayan malzemelerdir. Bu malzemeler, iyileşmenin gerçekleştiği bölgede onarımı yönlendirir [22-23].

Doku iskelelerinin sahip olması gereken özellikler arasında; içsel bağlantılı, kontrol edilebilir gözeneklilik de yer almaktadır. Gözeneklilik, hücrelerin doku iskelesine yapışıp, yayılması ve üremesi, besinlerin aktarımı ve atık maddelerin uzaklaştırılması, ayrıca vaskülarizasyonun gerçekleşmesi için çok önemlidir. Kemik rejenerasyonunun amaçlandığı doku iskeleleri için, en az % 90 gözeneklilik ve 100-400 µm’lik gözenek boyutları önerilen değerlerdir [24-25].

Özellikle kemik gibi yük taşıyan dokuların rejenerasyonunda kullanılan doku iskelelerinin mekanik dayanımlarının yüksek olması çok önemli bir özelliktir. Bir doku iskelesinin mekanik özelliği, yerine geçeceği kemiğin mekanik özelliklerine benzer olmalıdır. Bu nedenle doku iskelesi malzemesinin, güçlü interatomik ve intermoleküler bağlara ve ayrıca hidrolitik ataklara ve bozunmaya izin verecek fiziksel ve kimyasal bir yapıya sahip olması beklenmektedir. Literatürde kortikal ve kanselöz kemik için sıkıştırma dayanım aralığı, sırasıyla, 100-230 MPa ve 2-12 MPa olarak verilmiştir [26-27]. Oldukça yüksek olan bu dayanım değerlerine ancak yoğun ve gözeneklilik değerleri küçük olan doku iskelelerinin üretimi ile ulaşılabilir.

Hücreler kendi hücre dışı matrislerini oluşturabilecek kapasiteye ulaştıklarında doku iskelelerine ihtiyaçları kalmayacaktır. Bu yüzden doku iskelesi üretilirken; biyobozunur bir malzemedan üretilmesi ve vücut ortamında parçalanırken de biyoyumluluğunu kaybetmemesi ve aynı zamanda toksik etki göstermeyecek özellikte olması gerekmektedir [1]. Kemik doku mühendisliği için hazırlanan biyobozunur doku iskeleleri, 4 ay hücre kültürü ve 2 ay da vücut içi olmak üzere en az 6 ay fiziksel özelliklerini korumalıdır. Sonrasında, bu doku iskeleleri vücut içerisinde 12 ile 18 ay arasında mekanik özelliklerini kaybedip metabolize edilebilmelidirler [26].

2.2.4.2. Doku iskelesi üretiminde kullanılan biyomalzemeler

Günümüzde, kemik doku mühendisliği alanında çeşitli malzemeler kullanılmıştır. Bunlar; metaller, seramikler ve polimerler gibi doğal ve sentetik malzemelerdir. Metaller ve seramiklerin çoğu doku içinde yıkıma uğramadıklarından doku mühendisliği için uygun malzemeler değildir [28]. Buna karşılık, oldukça üstün tasarım etkinliğine sahip olan biyobozunur polimerlerin, ihtiyaca göre bileşimi ve yapıları ayarlanabildiğinden doku iskelesi üretimi için oldukça cazip malzemelerdir [29].

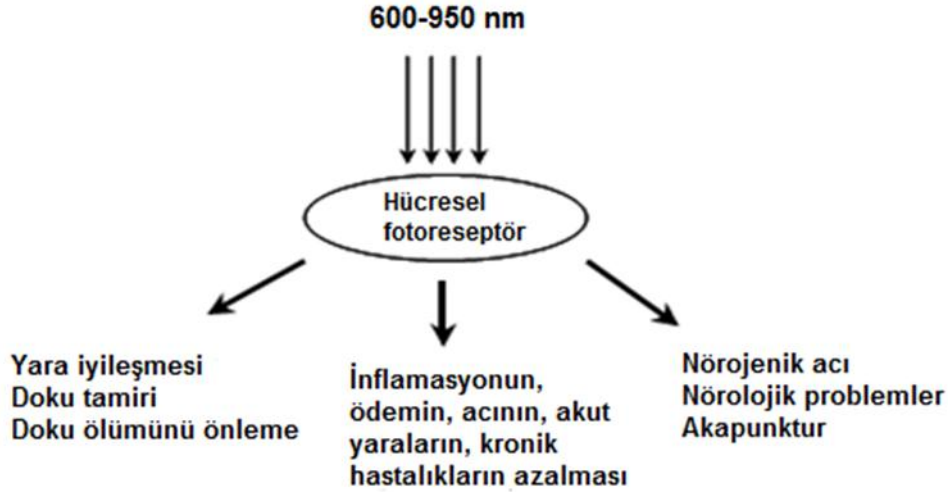
Doku iskelesi üretiminde kullanılacak olan malzemenin, yerine geçeceği dokuya benzerliği oldukça önemlidir. Örneğin, kemik gibi sert dokuyu oluşturacak olan doku iskeleleri seramik, polimer veya kompozitlerden oluşurken, yumuşak dokuyu (deri, tendon, ligament ve göz gibi) oluşturacak doku iskeleleri ise doğal veya sentetik polimerlerden oluşur [30].

Biyobozunur polimerler doğal ve sentetik polimerler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Doğal polimerler, polisakkaritleri (nişasta, aljinat, kitin/kitosan ve hiyaluronik asit türevleri) ya da proteinleri (kollajen, fibrin jeller ve ipek) ve yapıyı kuvvetlendirmek için kullanılan biyofiberleri içerirler. Sentetik polimerler kontrollü koşullar altında üretilmektedir. Genellikle üretilen polimerlerin, gerilme direnci, elastik modülü ve bozunma hızı gibi mekanik ve fiziksel özellikleri tekrarlanabilir niteliktedir [2]. Sentetik polimerler, toksik etki gösterme ve enfeksiyon taşıma gibi riskler içermemektedirler. Doğal polimerler, hücre dışı matrise benzerlik gösterip, yüksek derecede organize olmuş yapılardır. Doğal polimerler, biyouyumlu, biyobozunur ve biyokararlı olmalarından dolayı sentetik polimerlerden daha fazla ilgi uyandırmaktadırlar.

2.3. Fotobiyomodülasyon

Fotobiyomodülasyon (Photobiomodulation, PBM); **düşük seviyeli ışık/lazer terapisi** (Low Level Laser Therapy, LLLT), **fototerapi** veya **fotobiyostimülasyon** olarak da adlandırılıp hücre fonksiyonlarını normalleştirmek ve hücrelerden biyolojik cevaplar almak için ışık enerjisinin kullanımı olarak tanımlanmaktadır [7]. Fototerapi, yaklaşık 30 yıldır klinik olarak yumuşak doku tedavilerinde ve yara iyileşmesini hızlandırmada kullanılmaktadır [9]. Ayrıca ülser gibi çeşitli hastalıkların tedavilerinde de destekleyici bir terapi olarak rol oynamaktadır.

Yapılan birçok çalışmada, belirli dalga boylarında ve yeterli optik yoğunlukta uygulanan ışık etkisi ile biyolojik dokularda adenozin trifosfat (ATP) üretiminin arttığı ifade edilmiştir. Bunun sonucunda da acının dinmesi, inflamasyonun azalması ve hücre çoğalmasında artış gibi çeşitli biyolojik süreçler yaşanmaktadır [31]. Farklı ışık kaynakları ile yapılan tedaviler birçok alanda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Örneğin, fizyoterapi ve dişçilik alanında acıyı azaltmak, dermatolojide ödemi, egzamayı ve dermatiti tedavi etmek, cerrahide sürekli olan yaraları ve yanıkları tedavi etmek, romatolojide acıyı azaltmak ya da artrit ve artrozis gibi kronik hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır [7-32-33-34]. Şekil 2.2’de lazerin biyolojik alanlardaki kullanımı gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Lazerin biyolojik alanlardaki kullanımı [35].

Günümüzdeki uygulamalarda, çıkış güçleri 10-100 watt aralığında olan Yüksek Enerjili Lazerler (Hight Power Laser, Hot Laser) ve miliwatt düzeyindeki çıkış güçleri ile Düşük Enerjili Lazerler (Low Power Laser, Cold Laser) olmak üzere iki tip lazer kullanılmaktadır. Yüksek enerjili lazerler; dokuları kesmek, koagüle etmek ve yapıştırmak için kullanılırlar. Ancak bu lazerler, yerel sıcaklık artışlarına neden olmakta ve dokulara zarar verebilmektedirler. Düşük enerjili lazerler ise hücre fonksiyonlarının stimülasyonu için kullanılır. Düşük enerjili lazerler, dokularda termal değişikliğe neden olmamaktadır. Bu özelliğinden dolayı düşük enerjili lazerler, hücrel ve moleküler biyolojinin araştırılmasında kullanılmaya başlanmıştır [36-37].

2.3.1. Fotobiyomodülasyonda kullanılan ışık kaynakları

Fotobiyomodülasyonda kullanılan ışık kaynakları; lazerler, LED (Light-Emitting Diodes, ışık yayan diyotlar) ve plazma ark ışık kaynakları olmak üzere temelde üç çeşittir.

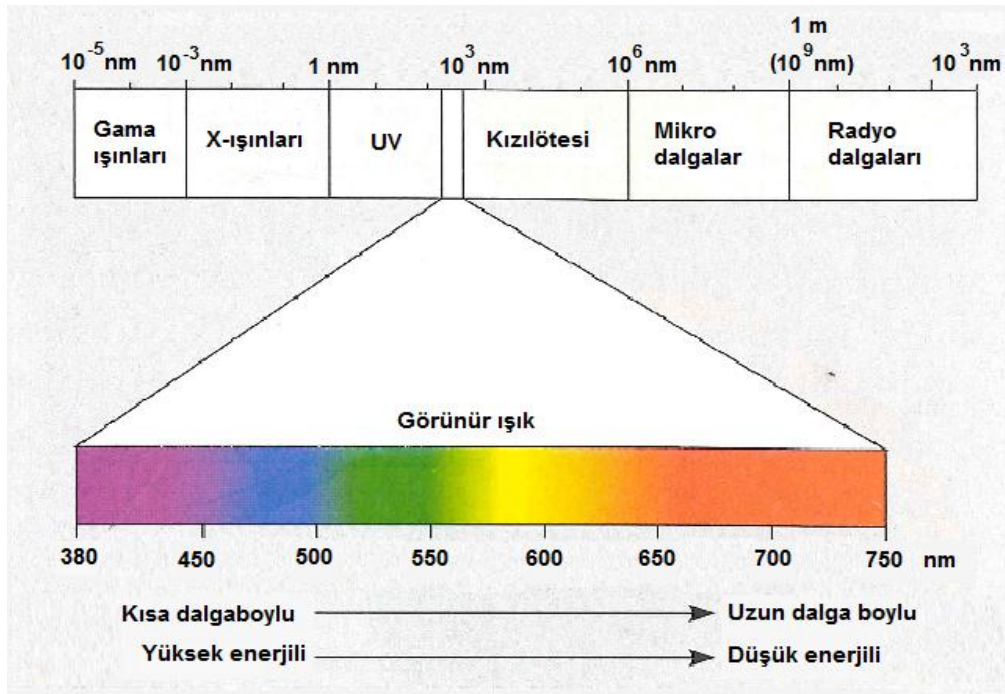
2.3.1.1. Lazer ışık kaynakları

‘Radyasyonun uyarılmış emisyonu ile ışığın güçlendirilmesi’ anlamına gelen ve İngilizce ‘light amplification by stimulated emission of radiation’ kelimelerinin baş harflerinden oluşan LASER (lazer) kavramının temeli olan ‘uyarılmış salım’ ilk olarak 1917’de Einstein tarafından ortaya atılmış, ‘Lazer’ sözcüğünü ise ilk olarak Gould kullanmıştır.

Normal şartlar altında evrende bulunmayan lazer ışını, teorik olarak atomik yapısına dışarıdan elektron eklenen bir atomun ortaya yaydığı tek dalga boyunda ve uniform hareket gösteren (**koherent**) foton parçacıklarından oluşan, saçılım göstermeyen (**kolime**) bir ışın demetidir. Evrende bulunan değişik ışık kaynaklarından oluşan fotonlar ise aynı ışın demeti içerisinde farklı dalga boylarında, birbirine paralel hareket etmeyen ve değişik yönlerde saçılan biçimlerdedir.

Işımanın dalga teorisine göre, atomların çeşitli biçimlerde ortama yaydıkları enerji ve bu enerjinin elektrik ve manyetik alanda oluşan bileşenler eşliğindeki yayılımına 'elektromanyetik radyasyon' denir. Işın demetleri bu elektromanyetik saçılımın parçasıdır. 'Radyasyon' adı verilen enerji salımı, değişik dalga boylarında olup bunların tümü elektromanyetik spektrumu oluşturur [38]. Şekil 2.3'de elektromanyetik spektrum gösterilmiştir.

Lazer ışık kaynakları tek bir dalga boyundan oluşur. Böylece, belli bir frekanstaki yoğun enerji miktarı küçük bir alana yönlendirilebilir. Işığın dalga boyu içerdiği elemente göre değişir. Lazer sistemleri, ışığın oluşmasında rol oynayan bu aktif elemente göre adlandırılırlar [39-40]. Çizelge 2.1'de farklı dalga boyuna sahip lazerler için örnekler verilmiştir.



Şekil 2.3. Elektromanyetik spektrum [41].

Çizelge 2.1. Lazer tipi örnekleri [42].

Lazer Tipi	Dalga boyu (nm)	Radyasyon
Ruby	694.3	kırmızı ışık
He-Ne	632.8	kırmızı ışık
	650	kırmızı ışık
	750	kırmızı ışık
	780	kırmızı ötesi
	810	kırmızı ötesi
	820	kırmızı ötesi
Galyum	850	kırmızı ötesi
Aluminyum	1300	kırmızı ötesi
Arsenid	860	kırmızı ötesi
Diyotlar	904	kırmızı ötesi
Karbondioksit	10000	kırmızı ötesi

2.3.1.2. LED ışık kaynakları

LED ışık kaynakları 1990'lı yılların ortalarında geliştirilerek kullanıma sunulmuştur. Kelime anlamı 'ışık yayan diyotlar' olan LED'lerin yapılarında birinden diğerine elektron geçişini sağlayan iki ayrı yarı iletken bulunur. Bu sistemde ortama elektrik verildiğinde, elektronlar bu iletkenlerden geçerek LED ışık kaynaklarından farklı dalga boylarında ışık yayılması sağlanmaktadır [43]. LED'ler koherent olmayan ışık kaynaklarıdır [44].

2.3.1.3. Plazma ark ışık kaynakları

Plazma ark ışık kaynaklarında, inert gaz dolu basınçlı bir hazne içerisinde birbirinden ayrı iki tungsten elektrot bulunur. Bu elektrotlar aralarındaki boşlukta yüksek elektrik potansiyeli oluştururlar. Elektrotlar arasında yüksek voltajlı elektrik oluştuğunda bir kıvılcım meydana gelir ve bu kıvılcım, çevresindeki Ksenon gazını iyonize ederek

plazmayı oluşturur. 'Plazma' kelimesi, yüksek sıcaklıkta, pozitif iyonlardan ve elektronlardan oluşmuş iyonize gazı ifade eder. Böylece çok yüksek seviyelerde enerji oluşturulur. Bu ışık kaynaklarının enerji spektrumu geniştir ve ultraviyole (UV), görünür ve kızılötesi ışık içerirler [40].

2.3.2. Fotobiyomodülasyonun tarihçesi

Tıp alanındaki ilk lazer çalışması, 1960'lı yılların sonunda Theodore H. Maiman tarafından tanıtılmıştır ve tanıtılan Ruby lazerin cerrahideki kullanımı tüm dünyada yaygınlaşmaya başlamıştır [45]. İki yıl sonra cerrahi lazer uygulamalarını Paul E. McGuff ve Leon Goldman gibi önemli isimler de kullanmaya başlamıştır. Aynı dönemde, Macar fizikçi Endre Mester da diğer bilim adamları gibi ruby lazerle çalışmaya başlamıştır. Mester, yüksek güçlü düşündüğü ruby lazeri, kötü huylu tümör hücrelerini yok etmek için kullanmayı düşünmüştür. Bunun için tümör hücrelerini, laboratuvar farelerinin cilt altlarına kesik açarak yerleştirmiş ve ardından lazer uygulamıştır. Çalışma sonunda, tümör hücrelerinin yok olmadığını ancak kontrol grubuna göre, lazer uyguladığı grupta, kesik bölgenin daha hızlı iyileştiğini gözlemlemiştir. Bu çalışmada Mester, ruby lazerin zayıf güçlü olduğu, doku onarımını artırdığı ve tümör hücreleri üzerinde etkisinin olmadığı sonucuna varmıştır. Tesadüfi gerçekleşen bu durum 'ışık tedavisi' alanını doğurmuştur.

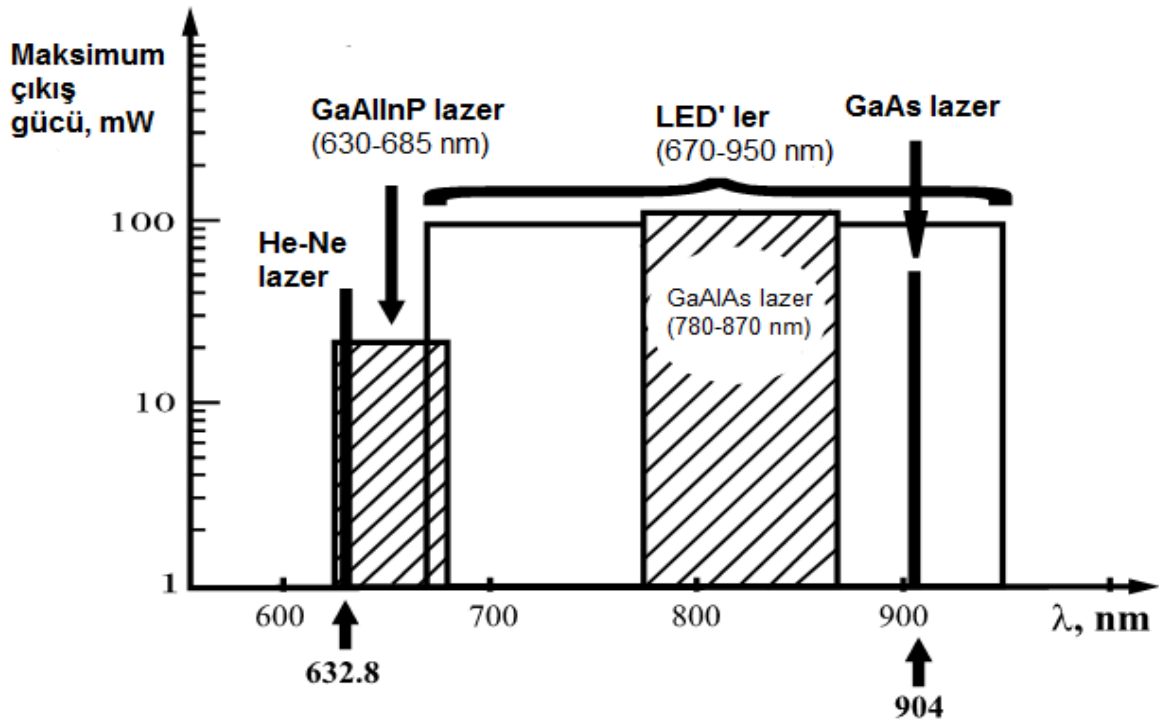
Lazerin etkisinin 'biyostimülasyon' şeklindeki ifadesini ilk kez Mester kullanmıştır ve Mester, fotobiyomodülasyonun babası olarak bilinmektedir. Mester, düşük seviyeli lazer terapi ile bir çok deneysel çalışma gerçekleştirmiş ve sonuç olarak; LLLT nin, kemik, kıkırdak, tendon, kas, sinir ve dental dokular gibi çeşitli dokularda iyileşmeyi ve doku tamirini hızlandırdığını, kıl büyümesini, fibroblast çoğalmasını, tip 1 ve 3 prokollajen mRNA sentezini ve dokularda yeniden damarlanmayı artırdığını gözlemlemiştir [45-46].

2.3.3. Fotobiyomodülasyon parametreleri

Fotobiyomodülasyon (PBM) çalışmalarında tanımlanmış birçok parametre bulunmaktadır. Bu parametrelerin bir araya gelmesi ile PBM'den hücresel seviyede pozitif veya negatif cevap elde edilmektedir. Fotobiyomodülasyon için tanımlanmış parametrelerin başında, 1-500 mW aralığında değişen güç yer almaktadır. Diğer önemli parametreler ise; dalga boyu (300-10,600 nm), 0-5,000 Hz aralığında olan atım oranı, atım süresi (1-500 milisaniye), atımlar arası geçen zaman (1-500

milisaniye), toplam ışınlama süresi (10-3,000 saniye), 10^{-2} - 10^0 W/cm² aralığında olan yoğunluk (güç/alan), ve 0.04-50 J/cm² aralığında bulunan dozdur (güç x ışınlama süresi /ışınlama yapılan alan) [4-6].

Fotobiyomodülasyonda, elektromanyetik spektrumun görünür (400-700 nm) ve kızılötesi ışınların (700-1000 nm) bulunduğu bölgedeki dalga boyları kullanılır [47]. En etkili ışınlama spektrumun kırmızı ve kızılötesi aralığında gerçekleştirilir. En yaygın kullanılan kaynaklar; Helyum-Neon lazer (He-Ne) (632.8 nm), Galyum-Alüminyum lazer (Ga-Al) (630-685 nm), Helyum-Neon-Arsenit lazer (He-Ne-As) (780-870 nm), Galyum-Arsenit lazer (Ga-As) (904 nm), 670-950nm spektrum aralığında ışık yayan diyotlar ve Ruby lazerlerdir (694 nm) [48]. PBM'de kullanılan lazerler ve LED ışık kaynaklarına ait dalga boyu ve maksimum çıkış güçleri Şekil 2.4'de verilmiştir. Karu, biyolojik süreçler için en etkin dalga boylarının 600-900 nm arasında olduğunu belirtmiştir [44].



Şekil 2.4. Fotobiyomodülasyonda kullanılan ışık kaynaklarının dalga boyu ve maksimum çıkış güçleri [7].

Çalışmalarda *in vitro* hücre çoğalması için farklı lazer türleri kullanılmıştır. Literatürde en çok sözü edilen lazer türleri; 632 nm dalga boyunda kırmızı ışık yayan helyum

neon (He-Ne) lazer ve 830 nm dalga boyunda olan galyum-alüminyum-arsenit (Ga-Al-As) lazerdir. Yapılan çalışmaların çoğunda ise He-Ne lazer kullanılmıştır [49].

Fotobiyomodülasyon, farklı parametreler ile birlikte farklı ışık kaynaklarının kullanımı ile karakterize edilmiştir. Bu ışık kaynakları lazerler ve ışık saçan diyotlar (LED) olmak üzere temelde iki tiptir. Lazerler koherent ışık kaynakları, LED'ler ise koherent olmayan ışık kaynaklarıdır [44]. Ayrıca, plazma ark ışık kaynaklarının kullanımı da gündemde olan bir konudur.

Fotokimyasal reaksiyon elde etmek için kullanılan ışığın koherent veya nonkoherent olması önemli değildir. Klinik olarak yapılan çalışmalarda her iki ışık tipi ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Karu [44] tarafından hücre kültürlerinde farklı dalga boyları ile yapılan çalışmalar ya uyarım ya da inhibisyon ile sonuçlanmıştır. Benzer dalga boyları ile yapılan çalışmalarda, fotobiyolojik cevaplarda son derece önemli olan elektron taşıma zinciri ya inhibe edilmiş ya da stimüle olmuştur. Örneğin Karu [50] yaptığı çalışmada, 404 nm'deki mavi ışık ile 890 nm'deki kızıl ötesi ışığın *Escherichia coli*'nin büyümesi üzerine etkisini araştırmış ve sonuç olarak her iki ışık arasında farklı bir etki gözlememiştir. Benzer şekilde mavi (404nm), yeşil (560nm) ve kırmızı (620, 700 ve 760 nm) ışıklarla yaptığı çalışmada, bu ışıkların hücre büyümesi üzerinde farklı etkilerinin olmadığını gözlemlemiştir. Karu elektromanyetik spektrumun kırmızı ve yeşil bölgelerinin DNA sentezi üzerindeki etkisini araştırmış ve maksimum etkinin 610 ile 630 nm dalga boyunda olduğu sonucuna varmıştır. 578 nm dalga boyunda olan ışığı kullanarak RNA sentezinin uyarıldığını, 633 nm dalga boyundaki ışıktaki ise hemen hemen RNA sentezinin hiç gerçekleşmediğini gözlemlemiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuç şöyle özetlenebilir: monokromatik görünür mavi ve kırmızı ışık ile kızıl ötesi bölgelerdeki ışıkla yapılan ışınlamada, hücrelerde metabolik süreç artırılabilir, uyarımın fotobiyolojik etkisi dalga boyuna, doza ve ışığın yoğunluğuna bağlıdır [50-51-52].

Fotobiyomodülasyon ile oluşacak biyolojik cevap, uygulanan enerjinin yoğunluğuna da (doza) bağlıdır. Düşük lazer dozlarında, hücrede metabolik aktivite artar. Yüksek dozlarda ise fotobiyomodülasyon, hücresel fonksiyonlarda negatif etki yaratmaktadır. 0.05-10 J/cm² aralığındaki dozlarda, lazer ile biyouyarım elde edilirken, enerji yoğunluğu 10 J/cm² ve yukarısında olan lazer uygulamalarında ise inhibisyon meydana gelmektedir [4].

Aynı dalga boyunda, düşük dozda dağıtılan lazer, yüksek dozda dağıtılan lazerden daha iyi sonuçlar verebilir. Bu kavram 'bifazik doz cevabı' ya da 'hormesis' olarak adlandırılmaktadır. Hormesis kavramı ilk kez 1982 yılında Stebbing tarafından kullanılmıştır. Bu kavrama göre, güçlü uyarı zayıf uyarıya oranla hücredeki önemli aktiviteleri daha fazla artırmaktadır. Fakat bu uyarı artıp zirveye ulaştığında önemli aktiviteler baskılanmakta ve sonuç olarak PBM'den negatif cevap elde edilmektedir [53-54-55].

Bifazik eğri dokuda, hücrede ya da klinik seviyede ışığın, belirlenen dozda cevap vermesi için kullanılabilir. Diğer bir deyişle bifazik eğri, uygulanan yeterli enerji seviyesinde maksimum biyoyarım almaya yardımcı olmaktadır. Eğer yeteri kadar enerji uygulanmazsa cevap oluşmaz çünkü minimum eşiğe rastlanmaz. Eğer çok daha fazla enerji uygulanırsa eşik ile karşılaşılır, fakat biyoyarım gözlenmez ve sonuç olarak; fotobiyoyarım biyoinhibisyon ile yer değiştirir [56-57].

Fotobiyomodülasyon parametrelerini belirlemek için kullanılan bazı formüller aşağıda verilmiştir:

- **Güç yoğunluğu (W/cm^2)** = lazer çıkış gücü (W) / ışık alanı (cm^2)
- **Işık alanı (cm^2)** = $\pi \times \text{yarıçap}^2$ (cm^2)
- **Enerji (J)** = lazer çıkış gücü (W) x süre (s)
- **Enerji yoğunluğu (J/cm^2)** = (lazer çıkış gücü [W] x süre [s]) / ışık alanı (cm^2)
ya da,
Enerji yoğunluğu (J/cm^2) = güç yoğunluğu (W/cm^2) x süre (s)
- **Işınlama süresi (s)** = Enerji yoğunluğu (J/cm^2) / güç yoğunluğu (W/cm^2) ya da,
Işınlama süresi (s) = enerji (J) / lazer çıkış gücü (W) [32].

2.3.4. Fotobiyomodülasyon-hücre etkileşimi

Düşük seviyeli lazer terapisi, fibroblast, lenfosit, endotelyal hücre, miyoblast, keratinosit ve osteoblast gibi çeşitli hücre tipleri ile çalışılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda LLLT'nin, kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler, adipoz kökenli kök hücreler ve insan dental pulpa kök hücreleri üzerindeki etkileri de incelenmiştir [58-59].

Fotobiyomodülasyon, hücre metabolizması üzerinde ışık enerjisinin etkilerine dayanmaktadır. Hücrelerin, görünür ve kızılötesi ışınlara biyolojik cevapları fiziksel

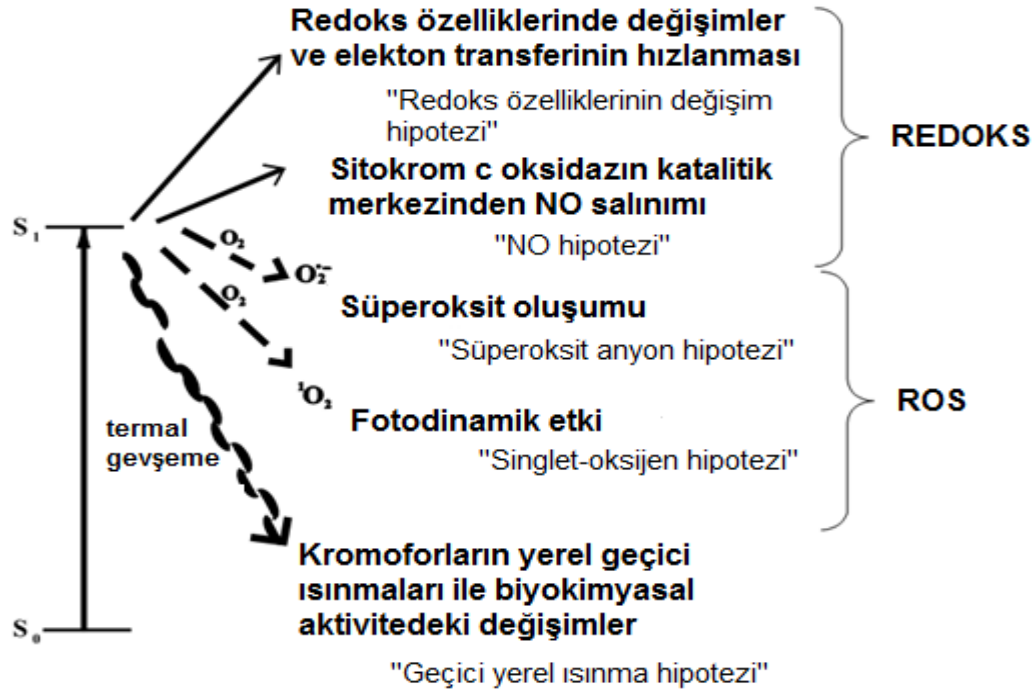
veya kimyasal değişimler ile gerçekleşir. Bu değişimler solunum zincirinin elemanlarında ve foto alıcı moleküllerde cereyan eder [4].

Fotobiyomodölasyon hücrede çeşitli sinyal yollarını aktive ederek, hücrelerin biyolojik fonksiyonlarını artırmaktadır. PBM, çeşitli hücre hatlarının çoğalma oranını artırmakta ve farklılaşmasını desteklemektedir. Soleimani ve ark. [60] LLLT'nin, mezenkimal kök hücrelerin; miyogenik, nörojenik ve osteojenik yönde farklılaşmasını etkilediğini belirtmişlerdir [60].

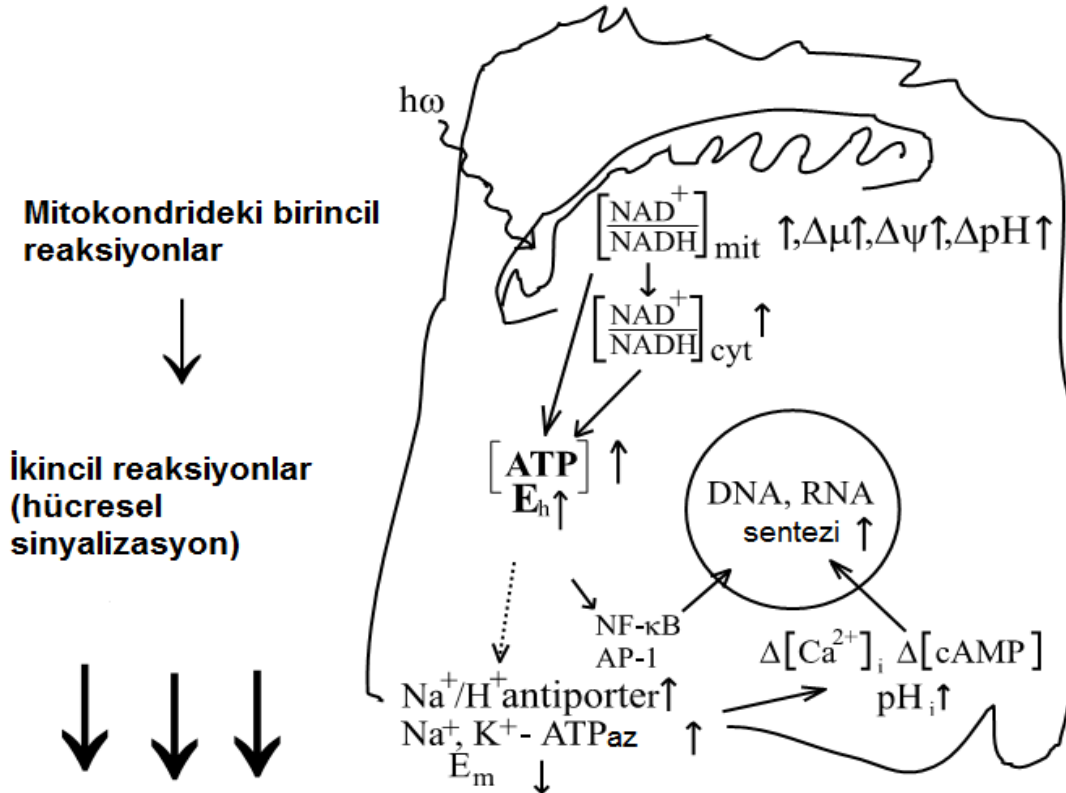
PBM ile ATP, RNA ve DNA ile kollajen ve prokollajen sentezinde artış sağlanmaktadır. Apoptoz önlenmekte, mitoz uyarılmakta, göç ve tutunma artmaktadır. Bunların yanı sıra, hücrede herhangi bir sitotoksik etki görülmemektedir. Makrofaj ve lenfositleri uyarması, anjiyogenezi artırması ve FGF (fibroblast büyüme faktörü), TGF (dönüştürücü büyüme faktörü), KGF (keratinosit büyüme faktörü) ve PDGF (platelet-kaynaklı büyüme faktörü) gibi çeşitli büyüme faktörlerinin üretimini artırması da PBM'nin sonuçlarındandır. Leonida ve ark. [5] 1,064 nm dalga boyuna sahip Nd:YAG (Neodymium:Yttrium-Aluminium-Garnet) lazer kullandıklarında, mezenkimal kök hücrelerden; PDGF, IGF-1 (insülin benzeri büyüme faktörü), NGF (sinir büyüme faktörü) ve FGF-2 gibi büyüme faktörlerinin salımında artış olduğunu ifade etmişlerdir [4-5].

2.3.5. Fotobiyomodölasyonun moleküler mekanizması

Klinik uygulamalarda ve hücre kültürü işlemlerinde fotobiyomodölasyonun önemli fizyolojik etkilerinden birisinin hücre çoğalması olduğu ifade edilmiştir. LLLT'nin birçok hücre tipinde çoğalmayı artırması; mitokondri solunum zincirinin aktivasyonu ve hücresel sinyalin başlaması ile gerçekleşir ve birincil ve ikincil reaksiyonlar olmak üzere, iki basamaktan oluşan olaylar meydana gelir. Birincil reaksiyonlarda, foto alıcıların fonksiyonlarında değişim olur. Bu değişimin ardından ikincil reaksiyonlar gerçekleşir. Bu aşamada, hücre sinyalinde ve daha sonra hücresel fonksiyonlarda değişim olur. Işığın absorpsiyonundan sonraki primer reaksiyonlar için öngörülen hipotezler şunlardır: singlet-oksijen hipotezi, redoks özelliklerinin değişimi hipotezi, nitrik oksit hipotezi, geçici bölgesel ısınma hipotezi ve süper oksit anyon hipotezi. Şekil 2.5'de hücrede gerçekleşen LLLT etkili primer reaksiyonlar gösterilmiştir. Işığın absorpsiyonundan sonraki ikincil reaksiyonlar ise hücresel sinyal yolları ve mitokondriyal sinyallerdir (Şekil 2.6) [7].



Şekil 2.5. LLLT etkisi ile hücrede gerçekleşen primer reaksiyonlar [7].



Şekil 2.6. LLLT etkisi ile gerçekleşen hücresel sinyal basamakları (ikincil reaksiyonlar) [7].

Fotobiyomodülasyonun etkisi hücrelerin başlangıç redoks özelliklerine bağlıdır. Eğer bir hücre zarar görmüşse ya da redoks özellikleri zayıfsa PBM'ye olan hücresel cevap güçlü olacaktır. Buna karşılık, optimum redoks özelliklerine sahip olan bir hücrenin ise PBM'ye olan hücresel cevabı ya hiç olmayacak ya da zayıf olacaktır. Dolayısı ile zarar görmüş bir hücre, sağlıklı ve normal fonksiyon gösteren bir hücreye göre PBM'ye daha iyi cevap verecektir [7].

Fotobiyoyarım ile hücresel metabolizma ve fonksiyon artar. Hücrelerde, LLLT'nin biyoyarımıcı etkileri olarak; mikrosirkülasyonda artış, ATP, RNA ve DNA sentezinde yüksek üretim gerçekleşir. Bu oluşumlara bağlı olarak, hücresel oksijenlenme, beslenme ve çoğalmada artış meydana gelir. Mitokondri ya da hücre membranında bulunan kromoforlar tarafından fotonlar absorbe edilir. Bu kromoforlar ışık demeti ile güçlü etkileşimde bulunurlar ve buna bağlı olarak hücre fonksiyonları ve hücresel çoğalma oranı artmaktadır [4]. Mitokondriler tarafından absorbe olan ışınlar, ATP ve sitoplazmik hidrojen iyonunun konsantrasyonunda artışa yol açan bir dizi reaksiyonu başlatır. Sonuçta hücre zarının iyonlara karşı geçirgenliği değişir [44].

Hücrede, ışığın etkisiyle ATP sentezinde meydana gelen artış sonucu Na^+/H^+ ve $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ antiportların aktivasyonu artar. Na^+/K^+ ATPaz ve Ca^{2+} pompaları gibi çeşitli iyon taşıyıcılar da aktif hale gelmektedir [35]. Bu değişimlerle birlikte, hücre membran geçirgenliği de değişir. Hücrenin aldığı glikoz, oksijen ve aminoasit miktarı artar. Hücre metabolizması hızlanır. Böylece hücre içi enzimlerin moleküler taşıma sistemleri hızlanır, hücre zarının aktif transport yapan enzimleri ışıktan aldıkları enerji ile daha aktif hale gelirler. Bunun sonucu olarak da kollajen gibi elemanların sentez hızında artış meydana gelir [61].

2.3.5.1. Fotobiyomodülasyonda mitokondrinin önemi

Işık uygulanmış hücrelerde, PBM'nin etkisi ile hücrenin mitokondrisinde bir takım sinyaller oluşur. Mitokondriyal sinyalizasyon ile çekirdeğe bilgi gönderilmekte ve ardından mitoz ve gen transkripsiyonu gibi metabolik aktiviteler artmaktadır. Dolayısı ile fotobiyomodülasyonda mitokondri önemli bir rol oynamaktadır. Mitokondrinin elektron taşıma sisteminde cereyan eden olaylar aşağıda özetlenmiştir.

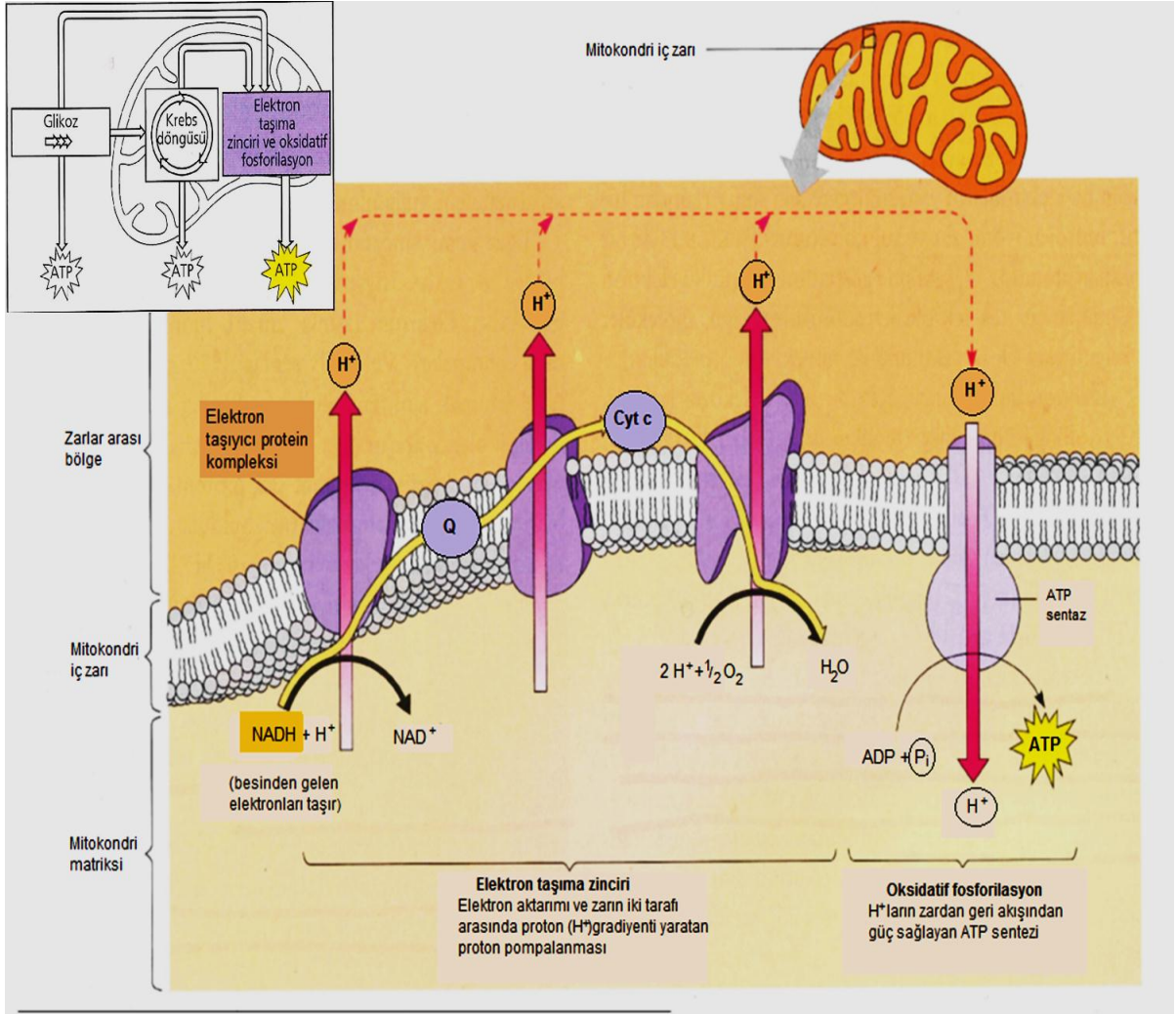
Hücresel solunumda, Glikoliz ve Krebs döngüsü sırasında besinden uzaklaştırılan elektronlar, NADH (Nikotinamid Adenin Dinükleotid) ve FADH_2 (Flavin Adenin Dinükleotid) tarafından elektron taşıma zincirindeki moleküllere aktarılır. Elektron

taşıma zinciri doğrudan ATP üretmez, bu zincirin işlevi elektronların besinden oksijene geçişini kolaylaştırmak ve serbest enerjideki büyük düşüşü bir seri küçük basamağa bölerek, kullanılabilir miktarda enerji açığa çıkmasını sağlamaktır.

Mitokondri iç zarında ATP sentaz adı verilen ve ADP ile inorganik fosfattan ATP yapan, karmaşık yapılı proteinin çok sayıda kopyası bulunur. ATP sentaz zıt yönde iş gören bir iyon pompası gibi çalışır. Normalde, iyon pompaları iyonları gradiyentlerin zıt yönünde aktarmak için enerji kaynağı olarak ATP kullanır. Bu sürecin zıt yönünde ise, ATP sentaz, iyon gradiyentinin enerjisini ATP sentezlemek için kullanır.

Oksidatif fosforilasyonu sürdüren iyon gradiyenti, proton (H^+ iyonu) gradiyentidir. Yani ATP sentazın güç kaynağı, mitokondri iç zarının iki yüzü arasındaki H^+ derişimi farkıdır. Elektron taşıma zinciri, matristen zarlar arası bölgeye H^+ pompalamak için kullanılan bir enerji dönüştürücüdür. H^+ , gradiyentin az olduğu tarafa doğru difüze olarak, zardan geri sızar. Ancak H^+ 'nın serbestçe geçebileceği zar kısımları sadece ATP sentazlardır. İyonlar ATP sentaz içindeki kanaldan geçer ve bu protein kompleksi ekzergonik e^- akışını ADP'nin oksidatif fosforilasyonunu sürdürmek için kullanır. Dolayısı ile zarın iki yüzü arasındaki H^+ gradiyenti, elektron taşıma zincirinin redoks tepkimelerini ATP sentezi ile eşleştirir. Şekil 2.7'de mitokondri solunum zincirinin yapısı gösterilmiştir.

Elektron taşıyıcıların zardaki yerleşimleri, H^+ 'ların mitokondri matrisinden alınıp, zarlar arası bölgede depolanmalarına olanak verecek şekilde düzenlenmiştir. Bu şekilde oluşturulan H^+ gradiyenti **proton-motif güç** olarak adlandırılır. Bu terim gradiyentin iş yapabilme kapasitesinde olduğunu ifade eder. Bu güç, H^+ 'ların ATP sentaz kompleksleri tarafından sağlanan özgül H^+ kanallarından geri dönüşlerinin devamlılığını sağlar [41].



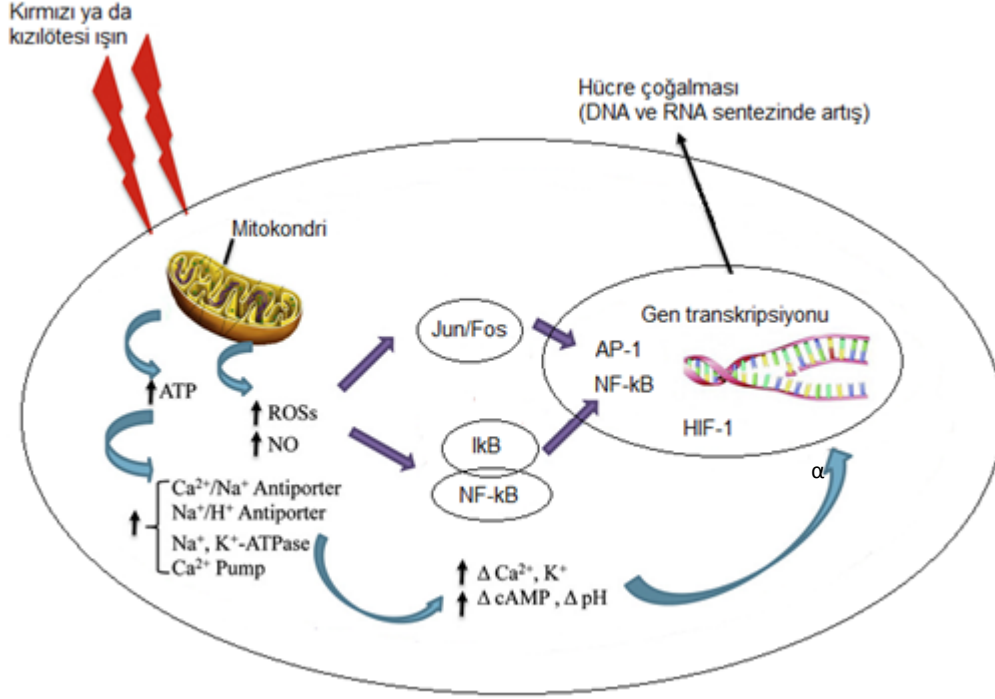
Şekil 2.7. Mitokondri solunum zincirinin yapısı [41].

2.3.5.2. Mitokondriyal sinyalizasyon

Mitokondriyal sinyalizasyon, uyarıya ve hücrel strese karşı oluşan cevaptır. Işınlamada, yoğunluk ve doz gibi fiziksel faktörler artırıldığı zaman mitokondrinin metabolik aktivitesinde değişimler meydana gelmektedir.

Fotobiyomodülasyon, hücrenin mitokondrisini etkiler ve mitokondride sinyal yolları aktif hale gelir. Mitokondriyal sinyal yolu, mitokondri solunum zinciri ile çekirdek arasındaki bilgi kanalıdır. Burada, mitokondrinin fonksiyonel durumu hakkında sinyal iletimi gerçekleşmektedir. Işınlama ile birlikte mitokondriyal sinyal yolunun elementlerinde (mitokondriyal membran potansiyeli [$\Delta\psi_m$], reaktif oksijen türleri [ROS], Ca²⁺, NO[•] (Nitrik oksit), pH ve mitokondrinin fizyon-füzyon homeostazı gibi) değişimler meydana gelir. Şekil 2.8'de ışığın absorpsiyonundan sonra hücrede meydana gelen olaylar gösterilmiştir. Mitokondri solunum zincirinin terminal enzimi

olan sitokrom c oksidaz, foto alıcı olarak görev yapar. Sitokrom c oksidazın görevi, ışınlama yapılmış hücrelerde sinyal üretmek ve sinyali dönüştürmektir [62]. Hücresel sinyal yolu; mitokondri → sitoplazma (plazma membranı → sitoplazma) → çekirdek şeklindedir [44-51].



Şekil 2.8. Işığın absorpsiyonundan sonra hücrede meydana gelen olaylar [63].

Işınlama ile birlikte mitokondriyal sinyal yolunun elementlerinde meydana gelen değişimler şunlardır:

LLLT ile moleküler olayların başlaması, ışığın fotoreseptörler tarafından absorblanması ile olur. Buna bağlı olarak mitokondri ile sitoplazma içerisinde değişimler meydana gelir. Mitokondri solunum zincirinin oluşturduğu enerji, **mitokondriyal membran potansiyeli** olarak da bilinen elektrokimyasal gradiyent olarak depolanır. Elektrokimyasal gradiyent ATP sentezini, proton gradiyentini (ΔpH) ve elektriksel transmembran potansiyelini içermektedir. Hücrede $\Delta \psi_m$ 'nin değişimi ile birlikte mitokondriyal sinyalizasyon başlamaktadır. Daha sonra, mitokondriyal ROS ve Ca^{2+} konsantrasyonları değişmektedir. Mitokondriyal sinyal elementlerinin pozitif ve negatif etkisi arasında hassas bir denge vardır. PBM etkisi ile birlikte mitokondrinin membran potansiyelinde, proton gradiyentinde ve ATP sentezinde artış meydana gelmektedir. Ayrıca sitokrom c oksidaz aracılığı ile O_2 alımı ve buna bağlı olarak

mitokondride oksijen tüketimi artmaktadır. Bunun yanı sıra bu enzimin proton pompasının aktivasyonu ve elektron transferi de artmaktadır [62].

Daha önceden de belirtildiği üzere mitokondri membran potansiyelinin değişimi, mitokondri içerisinde **ROS** konsantrasyonunu arttırmaktadır. Mitokondride üretilen ROS yapıya zarar vermez ve hücre çoğalmasında önemli bir rol oynamaktadır. Üretilen ROS süperoksit anyondur ($O_2^{\bullet-}$), bu anyon ya kendiliğinden dismutasyonla ya da enzim süperoksit dismutazla (SOD) H_2O_2 'ye dönüşmektedir. Mitokondride, $O_2^{\bullet-}$ 'nin ana kaynağı solunum zincirinin kompleks III Qo bölgesinde Q döngüsü boyunca oluşturulan ubisemikinon radikal kaynaktır ($QH^{\bullet}$). Bunun dışında kompleks I bölgesinde bulunan flavinmononükleotid grubu da $O_2^{\bullet-}$ için diğer bir kaynaktır [62].

ROS'un düşük ve kontrol edilebilir seviyedeki konsantrasyonu birçok hücre prosesinde önemli rol oynamaktadır. Örneğin; ROS fibroblastların çoğalmasını uyarır ve U937 hemapoiyetik hücre hattında DNA sentezini artırır. Ayrıca transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu, gen ifadesini, kas kasılmasını ve hücre büyümesi için sinyal üretim süreçlerini uyarır. Dolayısı ile ROS'lar hücrelere zarar verici ajan olarak görülmezler, ayrıca hem fizyolojik fonksiyonlarda, hem de ikincil mesajcı olarak görev almaktadırlar. Sonuç olarak Lubart ve ark. [64] ROS'un hücreler tarafından oluşum miktarına bağlı olarak, hücrelerin ışıktan zarar görebileceği ya da ışık ile uyarılabileceği sonucuna varmışlardır.

Mitokondri membran potansiyelinin değişiminden etkilenen diğer bir parametre ise Ca^{2+} konsantrasyonudur. Mitokondri, kalsiyum depolanmasında ve Ca^{2+} homeostazında önemli bir rol oynamaktadır. Endoplazmik retikulumdan (ER) mitokondri içine kalsiyum salımı gerçekleşir. Mitokondride meydana gelen bu artışa bağlı olarak plazma membranına doğru kalsiyum geçişi artar. ER'den ve mitokondriden salınan kalsiyumun lokal konsantrasyon artışına bağlı olarak hücrelerde farklı mekanizmalar aktif hale gelmektedir. Bu mekanizmalar arasında; mitokondriyal çoğalma ve ROS birikimine cevap olarak mitokondriyal sinyalizasyonda düzenlenme yer almaktadır. Oksidatif fosforilasyon sitozolik serbest Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) konsantrasyonunun ve birçok genin artışına neden olmaktadır [62].

Düşük lazer dozlarında, antiport prosesi ile fazla Ca^{2+} sitoplazma içerisine gönderilir. Bu yolla hücre çoğalması, mitozu ve DNA/RNA sentezi gibi çeşitli biyolojik işlemler uyarılır. Uygulanan yüksek dozlarda ise çok fazla Ca^{2+} salınması, Ca-ATPaz

pompası için hiperaktivite ile sonuçlanır ve hücrelerdeki ATP birikiminin azalmasına yol açar, dolayısı ile hücre metabolizması inhibe olur [4].

Mitokondrideki bir diğer önemli sinyal düzenleyici molekül olan **NO**, mitokondride ROS üretimini etkilemekte ve redoks sinyalini tetiklemektedir. Mitokondriyal membran potansiyelinin değişmesi ile birlikte NO üretimi gerçekleşmektedir. Serbest radikal olan nitrik oksit, mitokondri iç membranında lokalize olan nitrik oksit sentazlar (NOS) tarafından meydana getirilmektedir. NO, sitokrom c oksidazın katalitik bölgesine bağlı bir inhibitördür. Dolayısı ile NO, sadece oksijen tüketimini etkilemekle kalmaz aynı zamanda solunum zincirinin redoks özelliğini ve böylece $O_2^{\bullet-}$ oluşumunu da etkilemektedir. Fakat NO'nun düşük seviyedeki varlığı mitokondriyal ROS oluşumunu düzenlemektedir. Işınlama yapıldığı zaman NO'nun, sitokrom c oksidazın katalitik bölgesinden salımı gerçekleşir. Bu olay sonunda sitokrom c oksidazda anlık bir blok oluşur ve bu da sinyal sonuçlarını tersine çevirir [62].

Sitokrom c oksidazın aktivasyonu NO tarafından inhibe edilmektedir. Bu inhibisyon, NO ve O_2 arasındaki yarış ile açıklanabilmektedir. Lazer ışınlaması ile bu olay tersine çevrilmekte ve böylece solunum oranı artmaktadır (NO hipotezi) [35].

Mitokondri statik değildir, hücrelerle birlikte sabit bir hareketi vardır ve mitokondride çeşitli **fizyon-füzyon** olayları gerçekleşmektedir. Metabolik olarak aktif bir hücrede, mitokondri sitoplazmanın yaklaşık % 40'ını oluşturmaktadır. Hücrede oluşturulan yeni proteinler tarafından, mitokondri hücre çoğalması boyunca kendini eşler. Çeşitli hücre tipleri için mitokondriyal biyogenez programında, NO önemli bir mesajcıdır. Feedback sistemler tarafından sürdürülen hücresel metabolizmanın düzenlenmesinde, NO⁺-etkili mitokondriyal biyogenez önemli bir rol oynamaktadır [65]. He-Ne lazer uygulanarak maya hücrelerinde mitokondrinin mikroskobik yapısı incelenmiştir. Hücrelere uygulanan kısa dönem ışınlamanın ardından, hücrenin solunum aktivitesi uyarılmış ve bunun sonucu olarak da dev mitokondrinin yapısında değişimler olmuştur. Ayrıca lazer ile hücre çoğalması gerçekleşmiş ve yeni oluşan hücrelerin mitokondrisi ile endoplazmik retikulumu arasındaki ilişki de dikkat çekmiştir [66-67].

Tüm bu olaylar sonucunda mitokondrideki sinyalizasyonun uyarılmasına bağlı olarak çekirdekteki bazı sinyal yolları aktif hale geçer. Redoks-duyarlı transkripsiyon faktörü olan NF-KB (nükleer faktör-kappa B), oksidatif stres etkili hücre aktivasyonunda (mitokondriyal sinyalde) temel bir rol oynamaktadır. ROS, özellikle H_2O_2 , NF-KB'nin aktivasyonunda görev almaktadır, ayrıca ROS'un inhibitörü olan IKB'nin (NF-kappa-B

inhibitör) de degradasyonunu sağlar. İrrite edilmiş hücrelerde, NF-KB ve diğer transkripsiyon faktörü olan AP-1 (Aktivatör protein-1) hücrel sinyalizasyonda görev almaktadır [62].

Wilden ve ark. [68] ATP'nin, hücre çoğalması için gerekli olan (ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar) ERK1/ERK2 ve PI3K (fosfatidilinositol-3-kinaz) sinyal yollarının aktivasyonunu artırdığını belirtmişlerdir. Birçok hücrede, ERK'lar hücre çoğalmasında önemli bir rol oynamaktadır. ERK1/ERK2'nin ATP etkili aktivasyonu, çift-özgüllüklü kinaz mitojen aktiviteli protein kinaz (MAPK)/ERK kinaza bağımlı olup PI3K'dan bağımsızdır. PI3K hücrel çoğalmayı, göçü, canlılığı içeren çeşitli biyolojik fonksiyonları düzenleyen bir lipid kinazdır. PI3K metabolik yolu hücrelerin hayatta kalmasında ve hücre çoğalmasında önemli bir etmendir, fakat hücre çoğalmasının ana düzenleyicisi ERK sinyal yoludur [68-69-70].

2.3.6. Fotobiyomodülasyonun kemik doku mühendisliği üzerine etkileri

Günümüzde fotobiyomodülasyonun kemik doku oluşumu (osteogenez) üzerindeki etkileri araştırılmaktadır [71]. Fototerapi, hücre büyümesi üzerinde etkili olduğu için doku onarımını destekleyebilmektedir. PBM ile mineralizasyon nodüllerinin oluşumunda artış olmasının yanı sıra mineralizasyon sürecinde de hızlanma meydana gelmektedir. Işınlanma yapılmış osteoblastlarda, osteoblastik farklılaşmanın önemli düzenleyicilerinden olan alkalın fosfataz ve osteopontinin ifadelerinde de artış olmaktadır. Schwartz-Filho ve ark. [72] osteojenik hücrelere, 685 nm dalga boyunda ve farklı dozlarda lazer uygulamışlardır. Sonuç olarak, lazerin, hücre büyümesi ve hücre çoğalması üzerinde etkisi gözlenmemişken, ekstraselüler mineralizasyon oluşumunun lazer ile etkilendiği belirtilmiştir [72].

Fotobiyomodülasyon ve kemik doku oluşumu ile ilgili yapılan *in vivo* çalışmalarda, fototerapinin hayvan modellerinde kemik iyileşmesini uyardığı ve kemik rejenerasyonunu hızlandırdığı ifade edilmiştir. Khadra ve arkadaşlarının [73] yaptığı hayvan deneyi çalışmaları, LLLT'nin; kemiğe, titanyum implantların fonksiyonel tutunmasını ve kemik iyileşmesi ve mineralizasyonunu artırdığı ifade edilmiştir. PBM'nin, implant-doku etkileşimi üzerine yapılmış *in vitro* çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalarda LLLT'nin kemik iyileşmesini ve kemik mineralizasyonunu hızlandırdığı ifade edilmiştir [59]. Çizelge 2.2'de, çeşitli hücre tipleri için tanımlanmış farklı parametrelerin kullanımıyla birlikte gerçekleştirilen düşük seviyeli lazer terapinin yapılan çeşitli çalışmalardaki sonuçları verilmiştir.

Çizelge 2.2. LLLT'nin farklı hücre hatları üzerindeki sonuçları.

Hücre tipi	Dalga boyu (nm)	Güç (W)	Enerji Yoğunluğu (J/cm ²)	Uygulama Süresi	Uygulama Mesafesi (cm)	Sonuçlar	Referans
MSC	647	8.98-9.89 mW	-	10, 30 ve 90	3	LLLT ile hücrelerin çoğalma hızı artırmış, ALP aktivitesi yükselmiş, osteokalsin, osteopontin, Runx2'nin mRNA ifadelerinde artış gözlenmiştir	Kim et al., 2009
Osteoblast-benzeri hücreler	780	10 mW	3	12	-	Dekzametazon varlığından bağımsız olarak hücrelerin çoğalma oranı lazerin etkisi ile artmıştır. Lazer ile dekzametazon sinerjik etki göstererek kemik doku farklılaşmasını desteklemiştir.	Fujiyama et al., 2006
BMSC	620	1	1.5	10 dk	2	Lazer ile hücre çoğalmasında ve KOL1A1'in mRNA ifadesinde artış meydana gelmiştir.	Peng and Wu, 2010 [74]
MSC	1,064	1.5 ve 2.25	0.84 ve 1. 27	90	5 mm	Lazer hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarmıştır.	Leonida et al., 2012

Çizelge 2.2. (Devam)

Hücre tipi	Dalga boyu (nm)	Güç (W)	Enerji Yoğunluğu (J/cm ²)	Uygulama Süresi	Uygulama Mesafesi (cm)	Sonuçlar	Referans
BMSC	810	50 mW	2 ve 4 (osteoblast) ve 3 ve 6 (nöron)	12 ve 24 (osteoblast) ve 18 ve 36 (nöron)	-	Uygulanan her doz için, hücreler lazerin etkisi ile osteoblastlara ve nöronlara farklılaşmıştır. 6 j/cm ² enerji yoğunluğu dışındaki diğer dozlarda hücre çoğalması artmıştır.	Soleimani et al., 2011
MSC	632.8	10 mW	-	10 dk	20	Üç boyutlu biyomatris ve lazer sisteminin birlikte kullanımı hücrelerin çoğalmasını ve osteoblastlara farklılaşmasını uyarmış ayrıca <i>ex-vivo</i> kemikleşmeyi artırmıştır.	Abramovitch-Gottlib et al., 2005
ADSC	636	110 mW	5	53 s ve 6 dk	-	Lazer hücrelerin çoğalmasını ve canlılığını artırmıştır.	Mvula et al., 2010 [75]
BMSC	808	800 mW	4	91	9	Lazerin, hücrelerin osteoblast ve osteoklastlara farklılaşması üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır.	Bouvet-Gerbettaz et al., 2009 [76]

Çizelge 2.2. (Devam)

Hücre tipi	Dalga boyu (nm)	Güç (W)	Enerji Yoğunluğu (J/cm ²)	Uygulama Süresi	Uygulama Mesafesi (cm)	Sonuçlar	Referans
Osteoblast-benzeri hücreler	830	84 mW	1.5 ve 3	-	9	Titanyum implant materyal üzerinde kültüre edilen hücrelerde, lazer etkisi ile çoğalma, farklılaşma, yüzeye tutunma ve TGF- β_1 'nin üretimini artırmıştır. Hücre oluşumundaki artışa bağlı olarak implant materyal çevresinde doku oluşumu gerçekleşmiştir.	Khadra et al., 2005 [77]
hDPSC	660	28 mW	0.05, 0.30, 7 ve 42	10 ve 60	15 mm	Lazer, hücrelerin çoğalması ve osteojenik farklılaşması üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir.	Pereira et al., 2012 [78]
BMSC	635	60 mW	0.5, 1, 2 ve 5	75, 150, 300 ve 750	89 mm	Lazer, hücrelerin çoğalmasını uyarmış, NGF ve VEGF gibi büyüme faktörlerinin salgısını ve miyojenik farklılaşmayı artırmış	Hou et al., 2008 [79]

Çizelge 2.2. (Devam)

Hücre tipi	Dalga boyu (nm)	Güç (W)	Enerji Yoğunluğu (J/cm ²)	Uygulama Süresi	Uygulama Mesafesi (cm)	Sonuçlar	Referans
MC3T3-E1	830	500 mW	0.96, 1.91 ve 3.82	5, 10 ve 20 dk	-	Lazer uygulaması sonucu, Runx2 ve osteriks gibi transkripsiyon faktörlerinin ve kemik morfojenik proteinlerinin ifadelerindeki artışa bağlı olarak <i>in vitro</i> mineralizasyon uyarılmıştır.	Fujimoto et al., 2010 [80]
Osteojenik hücre	685	35 mW	25, 77 ve 130	7, 22 ve 37	2	Lazerin, hücrelerin büyümesi ve çoğalması üzerine bir etkisi gözlenmemişken ekstraselüler mineralizasyon sürecinde etkisi görülmüştür.	Schwartz-Filho et al., 2011

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez çalışması kapsamında öncelikle dondurarak-kurutma yöntemi ile kitosan doku iskeleleri üretilmiştir. Çalışmanın sonraki aşamasında, plazma ark sistemi ile yapılacak olan ışık uygulamasının öncül çalışmaları gerçekleştirilerek süre, mesafe ve uygulama sıklığı gibi işlem parametreleri belirlenmiştir. Ardından, belirlenen parametrelerin kullanıldığı plazma ark sistemi ile MC3T3-E1 preosteoblast hücrelerinin kültür çalışmaları yürütülmüştür. Sonuç olarak hücrelerin, *in vitro* kemik doku oluşturma potansiyellerinin belirlenmesine yönelik bulgular elde edilmiştir. Bu bölümde yukarıda belirtilen tüm deneysel çalışmalara yönelik açıklamalara yer verilmiştir.

3.1. Kullanılan Malzemeler

Doku iskelesi üretiminde kullanılan %80 deasetilasyon derecesine (DD) sahip kitosan Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Kitosanı çözmek için kullanılan asetik asit Riedel de Haen (A.B.D) firmasından satın alınmıştır.

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan MC3T3-E1 hücre hattı Riken hücre bankasından (Tsukuba, Japonya) satın alınmıştır. Minimum Essential Medium Alpha Modification (α -MEM) ve fetal sıgır serumu (FBS) Lonza (İsviçre) firmasından, Dulbecco fosfat tampon çözeltisi (DPBS) ve Tripsin/EDTA (%0.01 tripsin/10 mM EDTA) çözeltisi Hyclone (A.B.D) firmasından, penisilin-streptomisin Biological Industries (İsrail), β -gliserol fosfat ve askorbik asit ise Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Hücrelerin canlılık ve metabolik aktivitelerinin takibinde kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenilterazolyum bromür (MTT) Sigma-Aldrich (Almanya), izopropanol Aklar Kimya (Türkiye), HCl (%37) ise Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Hücre fiksasyonunda kullanılan gluteraldehit ve SEM analizi için örnek hazırlamada kullanılan hekzametildisilazan Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Alkalın fosfataz (ALP) aktivitesinin ölçümünde kullanılan Triton X-100 Sigma (Almanya), 2-amino 2-metil-1,3-propanol Aldrich (Almanya), magnezyum klorür hekzahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) ve sodyum hidroksit (NaOH) ise Merck (Almanya)

firmalarından satın alınmıştır. RNA izolasyonunda kullanılan Trizol maddesi ise Invitrogen (A.B.D) firmasından temin edilmiştir.

Floresan boyamada kullanılan Alexa Flour 488 Phalloidin Invitrogen (USA), propidyum iyodür ve Sığır serum albümini (BSA) ise Sigma (Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

3.2. Kitosan Doku İskelesi Üretimi

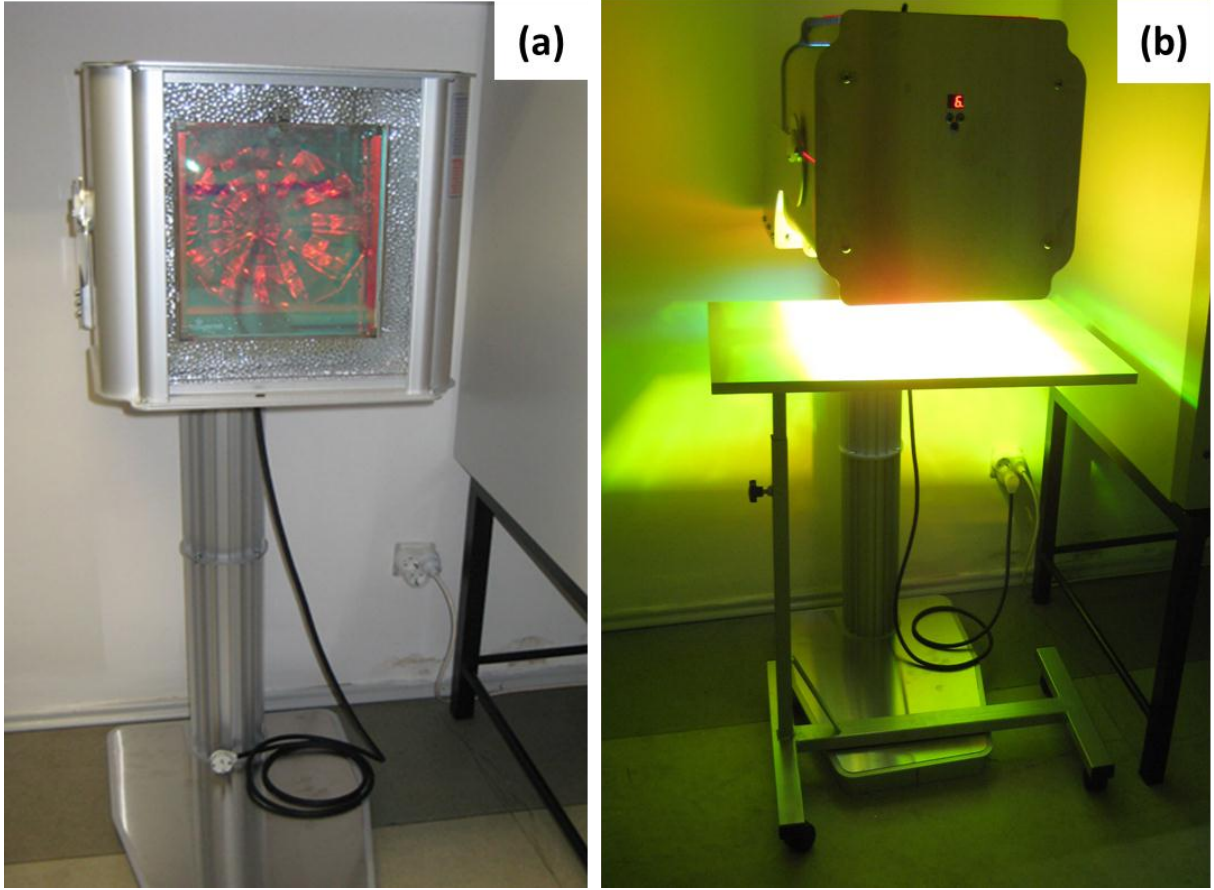
Kitosan (DD= %80) 0.2 M asetik asit çözeltisinde çözünene kadar karıştırılıp, % 1.1 (w/v) konsantrasyonuna sahip kitosan jel karışımı elde edilmiştir. Elde edilen kitosan jel karışımı, safsızlıkların giderilmesi amacıyla 0.45 µ'luk filtreden geçirilmiş ve 24 gözlü Petri kaplarına (Belçika) dökülerek -20°C'de dondurulmuştur. Bu işlemi takiben gözenekli kitosan doku iskeleleri 'dondurarak kurutma' (freeze-drying) yöntemi ile hazırlanmıştır. Bu metotla, -20°C'de donmuş kitosan çözeltisi -80°C'de 4 gün süreyle liyolifize edilmiş (Christ, Almanya), böylece gözenekli yapıda ve içsel bağlantıları olan 9 mm çapına ve 2 mm kalınlığa sahip kitosan doku iskeleleri elde edilmiştir. Elde edilen kitosan doku iskelelerinin stabilizasyonu için iskeleler % 96'lık (v/v) etanol çözeltisi içerisinde 1 gün, %70'lik (v/v) etanol çözeltisi içerisinde ise 1 saat bekletilmiştir.

Üretilen doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmaları, grubumuzda Dr. Seda Tıǧlı tarafından, doktora tezi çalışmaları kapsamında daha önceden yapılmıştır [81].

3.3. Plazma Ark Kaynağı ve Yapılan Çalışmalar

3.3.1. Plazma ark kaynağı

Tez kapsamında kullanılan plazma ark ışık kaynağı (Collagentex, Kanada) 700-2500 nm aralığındaki dalga boylarına ve 650 W çıkış gücüne sahiptir. Şekil 3.1'de plazma ark ışık kaynağının fotoğrafları gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Plazma ark ışık kaynağının fotoğrafları: (a) genel görüntüsü. (b) uygulama sırasında çekilmiş fotoğrafı.

3.3.2. Çalışma koşullarının belirlenmesine yönelik öncül çalışmalar

Çalışma koşullarını belirlemek için 3 öncül çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar: sıcaklık ölçme, mesafe ve uygulama sıklığı belirleme ve süre belirleme çalışmalarıdır.

İlk olarak plazma ark kaynağının kullanılmasıyla meydana gelen sıcaklık artışına bağlı olarak, hücrelerin bu durumdan zarar görüp görmeyeceği belirlenmeye çalışılmıştır. Işık kaynağı kullanılarak, 5, 10 ve 20 cm olmak üzere üç farklı mesafeden bir beher içindeki suyun sıcaklığındaki artış ölçülmüştür.

Plazma ark kaynağının hangi mesafeden ve hangi sıklıkla uygulanmasına karar verebilmek için, ışık kaynağı, 24-gözlü polistiren hücre kültür kaplarında (TCPS, Orange Scientific, Belçika) çoğaltılan hücre gruplarına 5cm, 10cm ve 20 cm mesafeden, 1 dk boyunca her gün ve gün aşırı olmak üzere uygulanmış ve MTT analizi yapılmıştır.

Son olarak yapılan uygulamada ise hücrelerin ışığa ne kadar süre maruz kalacağına karar verilmiştir. Bunun için TCPS'e ve kitosan doku iskelelerine ekilen hücrelere; 1 dk, 5 dk ve 10 dk olmak üzere üç farklı süre ile ışık uygulamasına karar verilmiştir. Işık uygulamaları ile beraber MTT analizi de gerçekleştirilmiştir.

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.4.1. Hücre kültürü koşulları

Durağan ortamda yürütülen hücre kültür çalışmalarında, preosteoblastik yapıda olup, osteoblastlara farklılaşabilen MC3T3-E1 hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücreler fare kafatasından elde edilmiş, yüzeye bağımlı üreyen hücrelerdir. Çalışmada 14. pasajdaki hücreler kullanılmış ve monolayer olarak çoğaltılmışlardır.

Hücrelerin subkültür işlemleri, %10 FBS ile zenginleştirilmiş α -modifiye MEM Eagle ortamı içeren flasklarda 37°C'lik inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Hücre üreme grafiği çalışmaları için çok gözlü polistiren kültür kapları ve Petri kapları (TPP, İsviçre) kullanılmıştır. Sayım testleri 6 gözlü, MTT testleri ise 24 gözlü kültür kaplarında gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin floresan boyama çalışmaları 3.5 cm'lik Petri kapları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm örnekler için, ortam, her üç günde bir veya pH'ın düşmesi durumunda gerekli görüldüğü taktirde yarı yarıya taze besi ortamı ile değiştirilmiştir [82].

Hücre kültürü çalışmaları, TCPS ve kitosan doku iskeleleri olmak üzere 2 farklı grup ile yapılmıştır. Kitosan doku iskeleleri kullanılarak yapılan hücre kültür çalışmaları, 24-gözlü polistiren hücre kültür kapları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 24-gözlü kültür kaplarının çapı 1.5 cm'dir. Hücrelerin TCPS tabanına yapışmalarını engellemek için her bir gözün tabanı 1.5 cm çapında kesilen Parafilm ile kaplanmıştır. Kaplamanın ardından, Parafilmelerin sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Öncelikli olarak, Parafilmeler %70'lik etanol içerisinde 30 dk bekletilmiş ve daha sonra doku iskeleleri (çap, 9mm; kalınlık, 2mm) 24-gözlü kültür kaplarının her bir gözüne yerleştirilmiştir. Bu işlemten önce doku iskeleleri, distile su ile hazırlanmış %70'lik etanolde çöktürülmüş ve daha sonra 24-gözlü Parafilm kaplı kültür kaplarına yerleştirilmiştir. Ardından 45 dk UV ile sterilizasyon işlemine devam edilmiştir. Böylece hem Parafilmelerin, hem de doku iskelelerinin sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Hücre ekiminden önce iskeleler ilk olarak Dulbecco PBS (pH:7.4) ile ardından α -MEM ile yıkanarak etanolün uzaklaşması sağlanmıştır. Daha sonra, sterilizasyonu

gerçekleştirilen doku iskelelerinin üzerine 0.5 mL; α -MEM, fetal sığır serumu (FBS) ve penisilin-streptomisin içeren ortam (kondisyonel ortam) eklenerek, 37°C sıcaklığa, %95 neme ve %5 CO₂'ye sahip inkübatörde (Heraus Instruments, Almanya) bir gece bekletilmiştir.

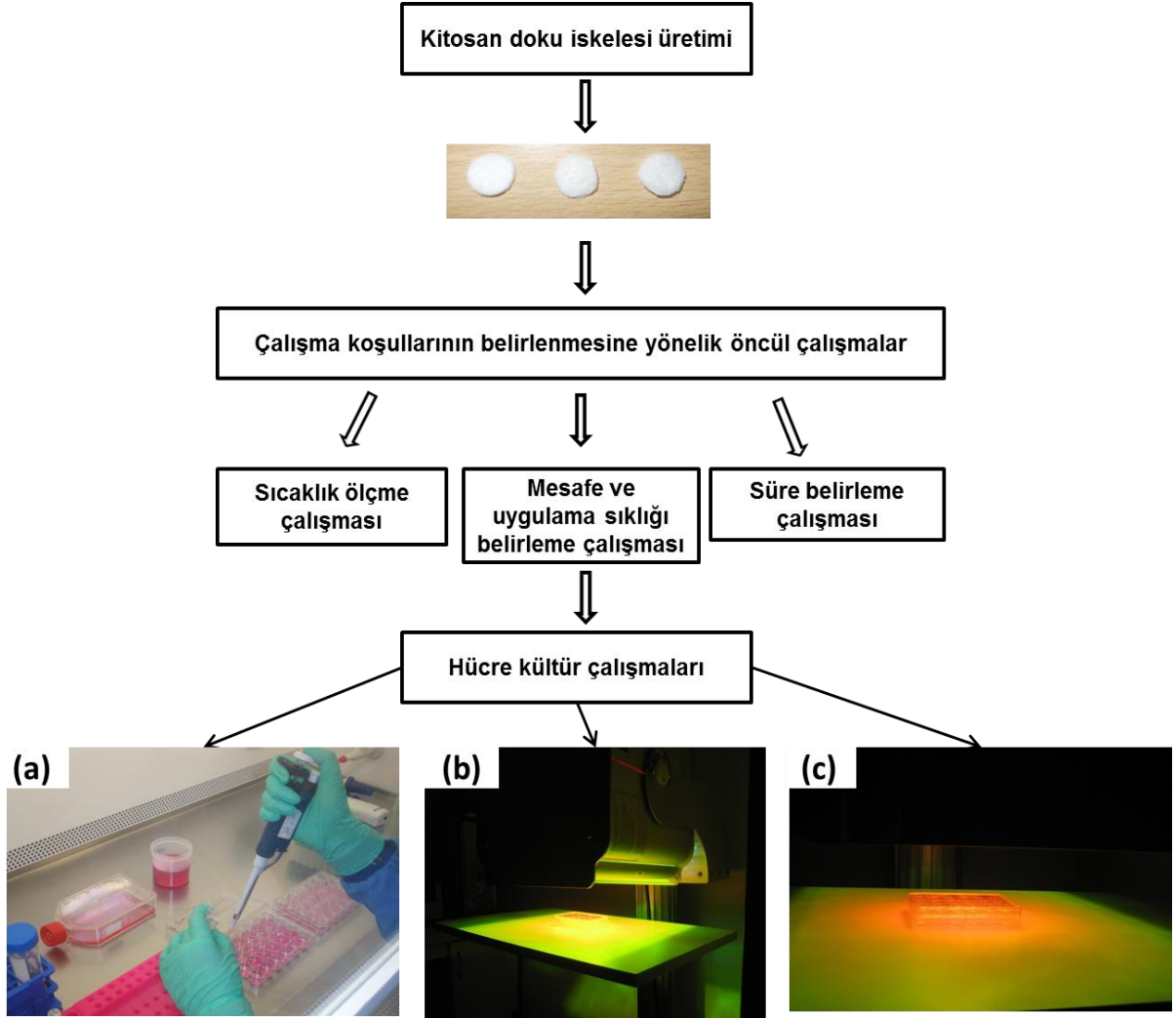
MC3T3-E1 hücreleri %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren α -MEM ile flasklarda kültüre edilmiştir (NuncTM, Almanya). Hücreler flasklarda doygunluğa ulaştıklarında (confluency), tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden kaldırılmışlardır. Bu işlem %0.25'lik tripsin enzimi ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra flasklara, α -MEM, FBS ve penisilin-streptomisinden oluşan ortam eklenerek, hücreler 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işleminin ardından, elde edilen süpernatant dökülmüş ve hücreler taze besi ortamı ile tekrar süspanse edilmiştir. Hemositometrik sayımın ardından, hücre yoğunluğu; TCPS grubu için 1×10^4 hücre/mL olacak şekilde belirlendikten sonra, hücre ekimi yapılmıştır. Doku iskelesi grubu için ise 8×10^4 hücre/doku iskelesi olacak şekilde, her bir doku iskelesine 50 μ L hücre süspansiyonu enjekte edilerek hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücre yapışması gerçekleştikten sonra (~2 sa sonra) her bir doku iskelesi üzerine 1 mL osteoblastik farklılaşma ortamı eklenmiştir. Farklılaşma ortamı, %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisinin yanı sıra α -MEM'e 10 mM β -gliserol fosfat ve 50 μ g/mL askorbik asit eklenerek hazırlanmıştır. Kültür ortamı, ilk 7 gün, üç günde bir $\frac{1}{2}$ oranında, son 14 günde ise iki günde bir $\frac{1}{2}$ oranında olmak üzere taze farklılaşma ortamı ile değiştirilmiştir. Böylece hücreler tarafından üretilen büyüme faktörleri ortamdan tamamen uzaklaştırılmamıştır. Steril ortam gerektiren tüm işlemler laminar akış kabini (Bioair, Type II Laminer Akış Kabini, İtalya) yürütülmüştür.

3.4.2. Plazma ark sistemi ile ışık uygulaması

Öncül ışık uygulamalarında belirlenen koşullarda TCPS ve doku iskeleleri ile oluşturulan gruplara ışık uygulaması gerçekleştirilmiştir. Her iki grup için 3 alt grup belirlenmiştir. Bu gruplar: 1) kontrol grubu olarak, ışık uygulaması yapılmayan grup, 2) gün aşırı olmak üzere günde 1 kere ışık uygulaması yapılan grup, 3) gün aşırı olmak üzere günde, 3 saat arayla 2 kez ışık uygulaması yapılan gruplardır.

TCPS grubu için 10 cm mesafeden ve 5 dk, doku iskeleleri ile oluşturulan gruba ise 10 cm mesafeden ve 10 dk olmak üzere ışık uygulaması yapılmıştır. Her iki grupta, ışık uygulaması yapılmadan önce hücrelerin üzerinde bulunan besi ortamı uzaklaştırılarak santrifüj tüplerine alınmıştır. Ortam yerine her bir göze 0.5 mL PBS

koyulup ışık uygulaması, laminar akışlı kabinin dışında gerçekleştirilmiştir. Uygulama tamamlandıktan sonra, ortamda bulunan PBS uzaklaştırılarak yerine, santrifüj tüplerine alınan ortam tekrar koyulmuş ve bir sonraki ışık uygulamasına kadar hücreler inkübatörde bekletilmiştir. Şekil 3.2’de tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Deneysel çalışmaların şematik gösterimi: (a) hücre kültür çalışmaları, (b)-(c) hücre kültür çalışmaları ile beraber plazma ark ışık kaynağının uygulama sırasındaki görüntüleri.

3.4.3. MTT analizi

MC3T3-E1 hücrelerinin iskele üzerindeki canlılığı ve mitokondriyal aktiviteleri kültür süresinde farklı zamanlarda (1, 3, 5, 7, 14 ve 21. günlerde) yapılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi ile belirlenmiştir. Canlı hücrelerin mitokondrisi, tetrazolyum bileşenini indirgeyerek formazan kristallerine dönüştürmektedir. Oluşan bu kristaller çözündüğünde ortaya çıkan mor renkli çözeltinin absorbans değeri belirlenir. Elde edilen bu absorbans değeri, üremesini devam ettiren canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır. MTT analizi için kültür ortamı, TCPS ve doku iskelelerinden uzaklaştırıldıktan sonra her bir göze 600 µL serumsuz besi ortamı ve 60 µL MTT çözeltisi (2.5 mg/mL PBS) eklenmiştir. Hücreler 37°C'de 3 sa boyunca inkübe edilmiş, daha sonra TCPS ve doku iskeleleri üzerindeki ortam uzaklaştırılmıştır. Her bir göze 400 µL 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Optik yoğunluk, elde edilen mor renkli çözeltiden 200 µL alınarak, 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de mikroparka okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

3.4.4. Hücrelerin morfolojik olarak incelenmesi

3.4.4.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

MC3T3-E1 hücrelerinin doku iskeleleri içerisindeki morfolojilerinin, yapışma ve yayılma eğilimlerinin görüntülenmesi için kültürün 3., 7. ve 14. günlerinde SEM (Zeiss Evo 50, Almanya) analizi yapılmıştır. Örneklerin hazırlanması için önce doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve daha sonra iskeleler iki kez PBS (pH=7.4) ile yıkanmıştır. Daha sonra 1 mL % 2.5'luk (v/v) gluteraldehit çözeltisi ile oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk boyunca fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler analize kadar PBS içinde 4°C'de bekletilmiştir. SEM analizinden önce, doku iskeleleri PBS ile yıkanmış ve iskeleler sırasıyla %30, %50, %70, %90 ve %100'lük (v/v) etanol çözeltilerinde 2'şer dk bekletilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İskeleler daha sonra hekzametildisilazan (HMDS) içerisinde 5 dk bekletilmiştir. Oda sıcaklığında kurutulan örnekler, altın-paladyum ile kaplanmış ve SEM görüntüleri alınmıştır.

3.4.4.2. Floresan boyama

Hücre kültür çalışmasının 4. ve 7. günlerinde TCPS gruplarındaki hücrelerin morfolojilerini incelemek için Alexa Flour 488 Phalloidin ve propidyum iyodür ile floresan boyama yapılmıştır. Öncelikli olarak hücreler üzerinde bulunan besi ortamı uzaklaştırılmış ve PBS tamponu ile yıkama yapılmıştır. Sonra, % 2.5 (v/v) gluteraldehit ile 10 dk fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler PBS tamponu ile tekrar yıkanmıştır. Ardından hücre membranlarının geçirgenliğini artırmak için, hücreler %0.1'lik Triton X-100 çözeltisinde 5 dk bekletilmiştir. Triton X-100 çözeltisi uzaklaştırılıp PBS ile yıkama yapıldıktan sonra 200 µL Alexa Flour 488 Phalloidin çözeltisi eklenmiş ve 20 dk karanlıkta inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda, Alexa Flour 488 Phalloidin çözeltisi uzaklaştırılmış ve %1 (w/v)'lik BSA çözeltisi ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra, 300 µL propidyum iyodür çözeltisi eklenmiş ve karanlıkta 5 dk inkübe edilmiştir. Son olarak, propidyum iyodür çözeltisi uzaklaştırılmış ve %1 (w/v)'lik BSA çözeltisi ile tekrar yıkama yapılmıştır. İşlemlerin sonunda floresan mikroskobu ile görüntüleme yapılmıştır.

Aynı zamanda TCPS'de bulunan hücre gruplarının morfolojik farklarını gözlemleme açısından 21. gün MTT'si alınmadan önce hücrelerin optik mikroskop altında fotoğrafları çekilmiştir.

3.4.5. Hücrelerin osteojenik farklılaşmasının belirlenmesi

3.4.5.1. ALP analizi

MC3T3-E1 preosteoblast hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını belirlemek için alkaline fosfatase (ALP) analizi yapılmıştır. Hücre kültür çalışmasının 7., 14. ve 21. günlerinde TCPS ve doku iskeleleri için örnekler hazırlanmıştır. TCPS grubu için örnek hazırlarken, hücrelerin üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra her bir göze 300 µL tripsin ekleyip inkübatörde 10 dk bekletilerek hücrelerin yüzeyden kalkması sağlanmıştır. Ardından, her bir göze 2 mL besi ortamı eklenerek 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatant atıldıktan sonra elde edilen hücre pelleti, analiz yapılincaya kadar -80°C'de bekletilmiştir. Doku iskeleleri için örnek hazırlarken, iskeleler üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve iskeleler başka bir kültür kabına aktararak test yapılincaya kadar -80°C'de bekletilmiştir.

-80°C'den alınan TCPS ve doku iskeleleri liyofilizatörde 2 gün süre ile kurutulmuştur. Ardından, doku iskeleleri küçük parçalara bölünerek Ependorf tüplerine alınmıştır. TCPS ve doku iskeleleri ile oluşturulan örnekler 250 µL Triton X-100 çözeltisi (%0.01'lik, v/v çözelti, PBS içinde) içerisinde, 4°C'de 30 dk inkübe edildikten sonra 4°C'de, 12,000 rpm hızda 10 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Bu şekilde elde edilen lizattan 50 µL alınarak 96-gözlü kültür kaplarına koyulmuş ve üzerlerine 125 µL ALP çözeltisi (56 mM 2-amino 2-metil-1,3-propanol ve 1 mM magnezyum klorür (MgCl₂) içeren 10 mL p-nitrofenil fosfat (pNPP)) eklenmiştir. Sonraki aşamada, 37°C'de 30 dk boyunca inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Gerçekleşen tepkime, her bir örneğe 50 µL 2.5 M sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi eklenerek durdurulmuştur. Mikroplaka okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) kullanılarak, 405 nm dalga boyunda p-nitrofenolün absorbansı ölçülmüştür.

3.4.5.2. Von Kossa boyama

Kültürün 21. gününde, besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra doku iskeleleri ve TCPS grubu PBS ile yıkanmış, soğuk saf etanol ile 20 dk oda sıcaklığında fiksasyon gerçekleştirilmiştir. Bu örnekler daha sonra deiyonize su ile yıkanmış ve %5'lik AgNO₃ (0.05g/mL distile su içerisinde) ile karanlıkta 30 dk inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası tekrar deiyonize su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve 2 dk UV ile muamele edilmiştir. Daha sonra TCPS grubu için optik mikroskop ile görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Kitosan doku iskelelerinde ise matris mineralizasyonunu görüntülemek için, doku iskelelerinin fotoğrafları çekilmiştir.

3.4.5.3. RT-PCR analizi

TCPS ve doku iskeleleri üzerinde üreyen ve farklılaşan hücrelerin β-aktin, kollajen I, osteokalsin, ALP ve bone sialo proteinlerinin ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) (Light Cycler® Nano, Roche, İsviçre) ile belirlenmiştir. Kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde TCPS ve doku iskeleleri grupları için örnekler hazırlanmıştır. Bu aşamada, TCPS gruplarında bulunan besi ortamı uzaklaştırılmış ve hücreleri liziz etmek için Trizol kullanılmıştır. Ependorflara alınan hücreler izolasyon yapılmaya kadar -80°C'de bekletilmiştir. Doku iskeleleri için örnek hazırlarken, iskeleler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve farklı bir kültür kabına aktararak izolasyon yapılmaya kadar -80°C'de bekletilmiştir.

RT-PCR analizinden önce TCPS ve doku iskeleleri gruplarının izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon basamakları şu şekilde yürütülmüştür: Doku iskeleleri, DNAase ve RNase içermeyen Ependorflara alınarak steril iğne ile parçalanırken, TCPS grubu ile oluşturulan örneklerde ise parçalama olmaksızın işlemlere devam edilmiştir. Her bir örneğin üzerine 1000 µL Trizol eklenerek 25-30 s vortekslenmiş ve örnekler 2 sa 4°C'de bekletilmiştir. Trizol yöntemine göre, hücrelerden RNA izole etmek amacıyla, örneklerin üzerlerine 200 µL kloroform eklenmiş, çalkalanmış ve oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında, örnekler 4°C'de 10 dk 12,000 g'de santrifüjlenmiş ve sıvı faz yeni bir RNase içermeyen Ependorf tüpe aktarılmıştır. Kloroform basamağı proteinden ve fenolden kaynaklanan kirliliği önlemek amacıyla 2 kez tekrarlanmıştır. Daha sonra sıvı faza 400 µL izopropanol eklenmiş ve hafifçe vortekslelendikten sonra 45 dk -20°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, örnekler 4°C'de 10 dk boyunca 12,000 g'de santrifüjlenmiş, süpernatant atılmış ve pellet 1 mL %75'lik etanol (otoklavlanmış ultra saf su ile hazırlanmış) ile yıkanmış ve hafifçe vortekslenmiştir. Örnekler tekrar 4°C'de 5 dk boyunca 7,500 g'de santrifüjlendikten sonra süpernatant atılmış ve pelletler kurutulmuştur. Her bir pelletin üzerine 35 µL (her bir geni incelemek için 5 µl örnek gereklidir) RNase free su eklenmiş ve 55-60°C su banyosunda 15 dk bekletilmiştir. Daha sonra örnekler analiz yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır.

RT-PCR analizi iki basamaklı olarak yürütülmüştür. Öncelikli olarak BM cDNA sentez kiti, daha sonra FastStart Essential DNA Green Master (Roche, İsviçre) kiti kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, RNAase içermeyen su ve BM cDNA sentez kiti kullanılarak DNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi reverse transkripsiyon ile 5 dk 65°C, 60 dk 50°C ve 5 dk 85°C'de gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada ise, FastStart Essential DNA Green Master (Roche) kiti kullanılarak forward- reverse primerler ve ilk aşamada elde edilen cDNA örneği kullanılarak RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Ardından, RT-PCR'in ilk aktivasyon basamağı 95°C 10 dk, 45 döngüde denatürasyon ile çoğalma basamağı 95°C' de 20 s, primerlerin ortamda bulunan hedef cDNA bileşeni ile birleşip ayrılma basamağı 60°C'de 20 s ve uzatma basamağı 72°C' de 20 s'de gerçekleştirilmiştir.

'Housekeeping gen' olarak kullanılan β-aktin, kollajen I, osteokalsin, ALP ve bone sialo protein genlerinin primer dizileri (Qiagen, BK, Türkiye). Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri.

β -aktin	Forward primer 5'-GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3' Reverse primer 5'-GATGCCACAGGATTCCATACCC-3'
ALP	Forward primer 5'-GAGCGACACGGACAAGAAG-3' Reverse primer 5'-TGGTAGTTGTTGTGACATAATC-3'
Kollajen I	Forward primer 5'-CAA GAT GTG CCA CTC TGA CT-3' Reverse primer 5'-TCT GAC CTG TCT CCA TGT TG-3'
Osteokalsin	Forward primer 5'-CTTTCTGCTCACTCTGCTG-3' Reverse primer 5'-TATTGCCCTCCTGCTTGG-3'

3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonuçları istatistiksel açıdan GraphPad Software Instant programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Veriler üç deney için ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile belirtilmiştir. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için Student's t-testi kullanılmış ve p-değerinin 0.05'den az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar sunulmuş ve elde edilen bulgular üzerinde tartışmalar yapılmıştır. İlk olarak, kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere üretilen kitosan-bazlı doku iskelelerinin hazırlama yöntemi ile ilgili sonuçları sunulmuştur. Ardından, çalışma koşullarının belirlenmesine yönelik, öncül ışık uygulamaları ile gerçekleştirilen; sıcaklık artışı, mesafe, uygulama sıklığı ve süre belirleme çalışmalarının sonuçlarına yer verilmiştir. Son aşamada ise MC3T3-E1 preosteoblastik hücre hattı ve plazma ark sisteminin birlikte kullanılması ile yürütülen hücre kültürü çalışmalarının sonuçları değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular üzerinde tartışmalar yapılmıştır.

4.1. Kitosan-Bazlı Doku İskelelerinin Üretimi

4.1.1. Malzeme seçimi

Kitin maddesinden elde edilen doğal bir polimer olan kitosan, doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılan bir biyomateryaldir. Kitin, doğada selülozdan sonra en çok bulunan protein olup, deniz kabuklularının ve çekirge, örümcek gibi bazı böceklerin kabuklarında yer alır. Kitosanın özelliğini etkileyen en önemli iki parametre; molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesidir. Kitosanın, ticari olarak %50 ve % 90 arasında değişen deasetilasyon derecelerine sahip formları bulunmaktadır. Kitosanın, kaynağına ve hazırlanış işlemlerine bağlı olarak moleküler ağırlığı 300 kD ile 1000 kD arasında değişmektedir. Moleküler ağırlığı ve deasetilasyon derecesi, kitosanın yüzey yük yoğunluğunu, kristalinitesini, çözünürlüğünü, enzimatik degradasyonunu ve hücre etkileşimlerini etkilemektedir. Deasetilasyon derecesinin yüksek olduğu yapılarda hücre yapışmasının daha fazla olduğu ve biyodegradasyon hızının yüksek olduğu belirlenmiştir [3-83].

Kitosan, biyobozunur, biyouyumlu, nonantijenik, nontoksik ve biyofonksiyonel özelliklere sahip olup, bu özellikleri sayesinde biyomedikal uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Kitosan, doku mühendisliği uygulamalarında, jel membranlar ve üç boyutlu iskele gibi değişik fiziksel şekillerde ve formlarda hazırlanabilmektedir. Kitosan, farklı gözenek yapılarına sahip olacak şekilde kolaylıkla şekillendirilebilir [15-82].

Ayrıca, kitosan, yapısında amin ve hidroksil gruplarını bulundurmaktadır. Bu grupların kimyasal olarak modifiye edilebilmesi sayesinde, doku mühendisliği alanında sıklıkla kullanılan bir polimerdir [3-84-85]. Doku iskelesi olarak sıklıkla tercih edilen kitosan, kemik çimentolarının enjekte edilebilme özelliklerini veya prostetik malzemelerin biyouyumluluklarını artırmak için de kullanılmaktadır [83].

Kitosanın, kemik doku mühendisliği araştırmalarında yaygın bir şekilde kullanılmasında birçok neden vardır. Bunlar arasında, kitosanın, kemiğin ekstraselüler matrisinin temel bileşeni olan glukozaminoglikan (GAG) ile benzer özellik göstermesi bulunmaktadır. Bu özellik sayesinde, kitosan ile oluşturulan üç boyutlu doku iskeleleri yara iyileşmesini ve doku stabilitesini desteklemektedir. Bunun dışında, kitosanın kemik iyileşmesini, hücre yapışmasını ve çoğalmasını artırması ayrıca, osteokondüktif ve osteouyumlu olması sebebiyle kemik hücrelerinin farklılaşmasını ve kemik oluşumunu desteklemesi gibi özellikleri de yaygın kullanımındaki diğer nedenler arasındadır [2-86].

Sunulan tez çalışması kapsamında, yukarıda bahsi geçen tüm özellikler dikkate alındığında; üç-boyutlu doku iskelesi üretimi için kitosan tercih edilmiştir.

4.1.2. Yöntem seçimi

Tez çalışması kapsamında, kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere üretilen doku iskelelerinin üretim yöntemi olarak dondurarak kurutma (Freeze-drying) yöntemi seçilmiştir. Literatürde, kitosan ile ince filmler, membran, kapsüller, sünger formu, fiberler ve jeller halinde doku iskeleleri üretilebildiği ifade edilmiştir. Bu yapıların eldesi için farklı üretim yöntemlerinin kullanıldığı ve bu üretim yöntemleri arasında; dökme-kalıplama, elektro-eğirme, dondurarak kurutma, gaz köpüklendirme ve hızlı prototipleme gibi yöntemler bulunduğu belirtilmiştir [15-82].

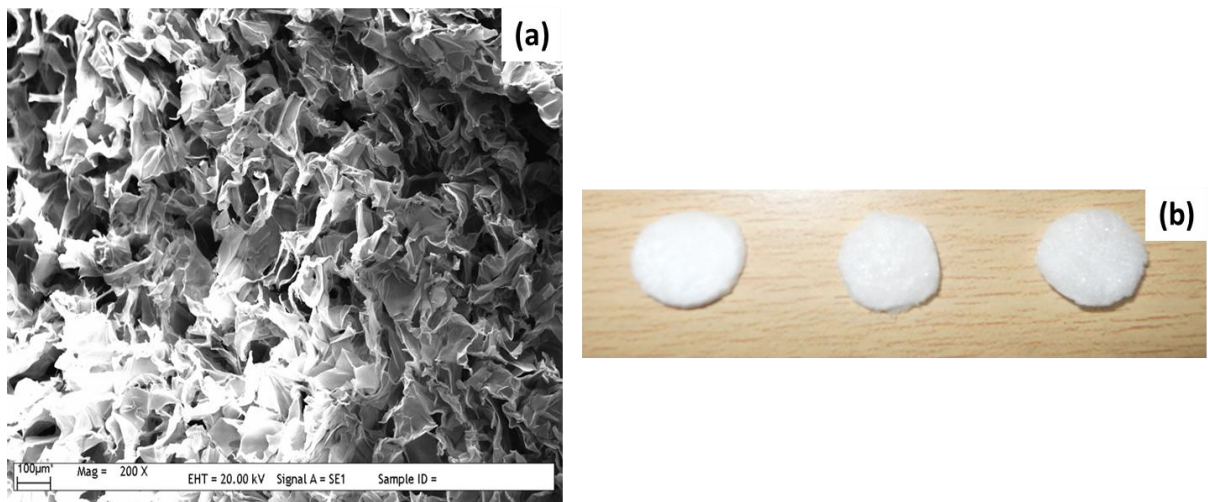
Doku mühendisliği alanında kullanılan doku iskelelerinin gözenekli ve bu gözeneklerin birbiriyle bağlantılı olması hücrelerin göçü; besin maddelerinin ve hücresel atıkların transferi açısından oldukça önemlidir. Dolayısı ile doku iskelesi üretiminde kullanılan tekniğin; gözeneklilik, gözenek dağılımı, gözenek boyutu ve gözeneklerin birbiriyle olan bağlantısı açısından uygun olması gereklidir [28]. Dondurarak kurutma yöntemi ile oluşturulan doku iskelelerinde bu özellikler sağlanabilmektedir. Literatürde, bu yöntem ile yapılmış farklı çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Seol ve ark. [87] 100-200 µm boyutunda gözeneklere sahip kitosan doku

iskelelerini, dondurarak kurutma yöntemi ile üretmişlerdir [87]. Zhang ve ark. [88] da bu yöntem ile 200 µm gözenek boyutuna ve içsel bağlantılı üç boyutlu yapıya sahip doku iskelelerini elde etmişlerdir [88].

Grubumuz tarafından yapılan çok sayıda kemik ve kırıldak doku mühendisliğine yönelik çalışmada, dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak, kitosan doku iskeleleri üretilmiş ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır [82-86-86].

4.1.3. Kitosan doku iskelelerinin üretimi

Doku iskelesi üretimi Bölüm 3.2’de belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kitosan, oldukça viskoz olup %80 deasetilasyon derecesine sahiptir. Kitosanın zayıf asitlerde çözündüğü bilinmektedir. Bu yüzden, asetik asit çözeltisinde çözünene kadar karıştırılmış ve kitosan jel karışım elde edilmiştir. Elde edilen kitosan jel karışımı 4 gün süre ile liyofilize edilmiştir. Düşük sıcaklıkta, vakum altında çalıştırılan liyofilizatör, donmuş olan çözücünün süblimleşmesini ve daha sonrasında cihazın iç duvarlarında kristallenmesini veya yoğunlaşmasını sağlamaktadır. Hızlı bir şekilde kurutmanın sağlandığı bu yöntem ile gözenekli yapıda ve içsel bağlantıları olan 9 mm çapına ve 2 mm kalınlığına sahip doku iskeleleri elde edilmiştir. Ardından, doku iskeleleri alkol serilerinde bekletilerek stabilizasyon gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1’de tez kapsamında üretilen kitosan doku iskelelerine ait görüntüler verilmiştir. Kitosan doku iskelelerinin temel özellikleri grubumuz tarafından daha önceden belirlenmiş olup, bu temel özellikler Çizelge 4.1’de verilmiştir [81].



Şekil 4.1. Kitosan doku iskelelerinin (a) SEM fotoğrafı (200 X), (b) optik fotoğrafı.

Çizelge 4.1. Kitosan doku iskelelerinin temel özellikleri.

Doku iskelesi	Gözeneklilik oranı	Elastik modülü (N/mm ²)	Şişme oranı*
Kitosan	%90	0.0572±0.0082	40.6±0.7*

*İskelenin şişme oranı örneğin yaş ağırlığı ile kuru ağırlığı arasındaki farkın yaş ağırlığa bölünmesi ile elde edilmiştir.

4.2. Işık Kaynağının Seçimi

Hücreseel seviyede fotobiyomodülasyondan cevap almak için bir çok parametre birlikte kullanılmaktadır. Kullanılan ışık kaynağının yanı sıra seçilen parametreler de oldukça önemlidir. Işık kaynağının gücü ile birlikte, ışığın uygulama süresi, mesafesi ve sıklığı da elde edilecek sonucu etkilemektedir. Literatürde, bu parametrelerin bir araya getirilmesi ile yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, hücreseel seviyede olumlu veya olumsuz cevaplar elde edilmiştir. PBM ile hücreseel seviyede elde edilen cevap bu parametrelerin dışında bazı faktörlere de bağlıdır. Bu faktörler arasında, kullanılan hücre tipi, hücrelerin başlangıç redoks özellikleri, hücrelerin stres durumu ve hücre kültür koşulları yer almaktadır. Renno ve ark. [89] farklı hücre tipleri üzerine aynı dalga boyunda lazer uygulayarak farklı sonuçlar elde etmişlerdir. MC3T3 osteoblast benzeri hücreler üzerine 830 nm dalga boyunda lazer uygulayarak hücre çoğalmasının arttığını gözlemlerken, 780 nm dalga boyunda ise hücre çoğalmasının azaldığını belirtmişlerdir. Diğer taraftan, MG63 insan osteosarkoma hücrelerine, 780 nm dalga boyunda uygulanan lazer ile hücre çoğalmasında artış, 830 nm dalga boyunda ise azalma olduğunu ifade etmişlerdir [89].

Kemik oluşumu ve rejenerasyonu biyosinyal moleküller tarafından kontrol edilmekte, yani biyosinyal moleküllerin kullanımı osteoblastik aktiviteyi artırmaktadır. Binyosinyal moleküller arasında büyüme faktörleri sıklıkla tercih edilmektedir. Tez çalışması kapsamında, osteoblastik aktivitenin artırılması için ilave biyosinyal moleküller yerine fotobiyomodülasyon tercih edilmiştir.

Fotobiyomodülasyonda, elektromanyetik spektrumun görünür ve kızıl ötesi ışınlarının bulunduğu aralıktaki dalga boyları kullanılmaktadır. Bu dalga boyları 400-10,600 nm arasında değişmektedir. Lazer sistemlerde ve LED’lerde tek bir dalga boyunda ışın söz konusu iken, plazma ark ışık (Plasma Arc, PAC) sisteminde ultraviyole (UV), görünür ve kızılötesi ışınların bir arada bulunduğu birçok dalga boyu kullanılmaktadır. Plazma ark ışık kaynağı; literatürde etkin olduğu belirtilen dalga boylarına sahip olduğu için tez çalışması kapsamında kullanılmasına karar verilmiştir.

Literatürde, LLLT ile farklı dalga boylarında, çeşitli hücre hatları ile yapılan çalışmalar mevcuttur. 2-boyutlu sistemlerde gerçekleştirilen bu çalışmalarda, lazerin hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklediği gözlenmiştir. Doku iskeleleri varlığında, fotobiyomodülasyonun etkisinin incelendiği çalışmalar ise çok daha az sayıdadır. Bu nedenle, fotobiyomodülasyonun etkisinin 3-boyutlu sistemlerde incelenmesine karar verilmiştir.

4.2.1. Çalışma koşullarının belirlenmesine yönelik öncül çalışmalar

Fotobiyomodülasyonun hücreler üzerindeki etkisi birçok parametreye bağlıdır. Bu parametreler arasında; kullanılan ışığın dalga boyu, gücü, ışığın hücreler üzerindeki uygulama süresi, uygulama mesafesi ve sıklığı bulunmaktadır.

Plazma ark kaynağının, kullanımı ile meydana gelen sıcaklık artışının hücreleri etkileyip etkilememesi, hangi mesafeden, hangi sıklıkla ve süreyle uygulanmasına karar vermek adına öncül ışık uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

4.2.1.1. Sıcaklık artışının belirlenmesi

Düşük seviyeli ışık terapileri termal etki göstermezler, çünkü lazer ışınlaması yapılmış dokularda önemli sıcaklık artışı gözlenmemektedir. Hrnjak ve ark. [90] gerçekleştirdiği deneysel çalışmaların sonucunda, lazere maruz kalan hedef dokuda sıcaklık artışının önemsenecek seviyede ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) olduğu ifade edilmiştir [90]. Birçok araştırmacı, lazer ışınlaması süresince fibroblast süspansiyonunda sıcaklığın değişmeden kaldığını belirtmiştir. Schneede ve ark. [91] monolayer hücre kültürüne, 40 mW/cm^2 dozda uygulanan lazerin, sıcaklığı 0.065°C ’den daha az artırdığını belirtmişlerdir [91]. CO_2 ve Nd:YAG gibi yüksek enerjili lazerlerde ise sıcaklık artışı meydana gelmektedir.

Yüksek güçlü plazma ark sistemlerinde, lazer sistemlere ve LED’lere göre sıcaklık artışı daha fazladır. Plazma ark sistemi ile dişçilik alanında yapılan çalışmalarda,

yüksek yoğunluktaki ışık kaynaklarının oluşturduğu ısının pulpa dokusuna zarar verip vermediği araştırılmıştır [92]. Bunun için halojen ışık kaynakları, LED ve plazma ark ışık kaynakları kullanılmıştır. Her üç kaynakta da pulpa dokusunda sıcaklık artışı gözlenmiş fakat bu artış, pulpa dokusunun sağlığı için kritik değer olan 5.5°C'yi geçmemiştir. Sonuç olarak, ışık kaynağına olan mesafe azaldıkça sıcaklık artışının daha fazla olduğu belirtilmiştir.

Gritsch ve ark. [93] HGF hücrelerine, mavi ışığa sahip plazma ark ve LED ışık kaynakları ile 9 mm mesafeden ışınlama yapmışlardır. Bu çalışmada hücre morfolojisi ve canlılığını belirlemek için gerçekleştirilen deneysel çalışmaların yanında sıcaklık artışı da incelenmiştir. Kullanılan her iki ışık kaynağı da 400-500 nm dalga boyuna sahip olup, plazma ark kaynağının yoğunluğu ($488 \pm 42 \text{ mW/cm}^2$) LED ışık kaynağının yoğunluğundan ($61 \pm 5 - 140 \pm 16 \text{ mW/cm}^2$) daha fazladır. Plazma ark kaynağının ışık yoğunluğu yüksek olduğu için ışınlama süresi (3 s) LED'lere göre (12 s) daha kısa tutulmuştur. Sonuç olarak, plazma ark kaynağı ile meydana gelen sıcaklık artışı 0.5°C, LED'lerde ise 3.5°C olarak ölçülmüştür. LED ışık kaynağında oluşan sıcaklık artışının daha fazla olması, ışık kaynağının kullanım süresi ile ilişkilendirilmiştir. Ardından, her iki ışık kaynağı ile aynı sürede (12 s) ışık uygulaması yapılmış ve sonuç olarak plazma ark kaynağı ile meydana gelen sıcaklık artışının, LED ışık kaynaklarından fazla olduğu görülmüştür [93].

Tez çalışması kapsamında kullanılan plazma ark ışık kaynağı, literatürde bahsi geçen plazma ark kaynaklarından daha yüksek enerji yoğunluğuna (10^4 W/cm^2) sahiptir. Dolayısı ile ışık sisteminin kullanılması ile oluşan sıcaklık artışının belirlenmesi için sıcaklık ölçüm deneyi yapılmıştır. Bu deney için; oda sıcaklığında (22°C), behere distile su koyulmuş ve 5, 10 ve 20 cm mesafeden 5 dk süre ile ışık uygulanmıştır. Deney sonunda, beherdeki sıcaklık artışının maksimum 3°C olduğu ve sıcaklığın 22-25°C arasında kaldığı görülmüştür. Ayrıca, ışığın uygulanacağı yüzey ile ışık kaynağı arasındaki mesafe arttıkça sıcaklık artışının azaldığı belirlenmiştir.

Hücreler çoğunlukla sıcaklık değişikliklerine karşı hızlı düzenlemeler yapabilirler. Örneğin, hücre kültürlerinde üretilen memeli hücrelerinin sıcaklıktaki belirli yükselmeler ve pH değişimi gibi güçlü stres durumlarında ısı şok proteinlerini oluşturduğu gözlenmiştir. Sıcaklığın 37°C'dan 43°C'a hızla yükselmesi ile şoka giren memeli kültür hücrelerinin dakikalar içinde ısı şok proteinlerini sentezlemeye başladıkları saptanmıştır. Bu proteinler, yüksek sıcaklığın etkisi ile denatüre olacak

diğer proteinlerin yapılarını korumaktadır. Dolayısı ile bu stres proteinleri, hücresel ortamdaki güçlü tehlikeler nedeniyle hücre ölümünü engellemektedir. Noda ve ark. [94] da ışığa maruz kalan hücrelerde, sıcaklığın; 1 sa boyunca 6°C artmasının ardından, ısı şok proteinlerinin aktif hale geldiğini belirtmişlerdir [41-94]. Yılmaz [95] sitoplazmadaki Ca^{++} iyonu miktarındaki hafif artışın ısı şok proteinlerini harekete geçirdiğini belirtmiştir. Fotobiyomodülasyona bağlı olarak hücrede Ca^{++} miktarındaki artış ile beraber ısı şok proteinleri aktif hale geçecektir.

Tez çalışması kapsamında plazma ark ışık kaynağının uygulanma aşaması laminar kabinin dışında, oda sıcaklığında (22°C) ve maksimum 25°C'de gerçekleşeceği için elde edilen deneysel sonuçlar ışığında meydana gelen sıcaklık artışından hücrelerin zarar görmeyeceğine karar verilmiştir.

4.2.1.2. Mesafe ve uygulama sıklığı belirleme çalışması

Işığın uygulama mesafesi fotobiyomodülasyonun önemli parametrelerinden biridir. Literatürde, 2-boyutlu sistemlerde yapılan hücre kültürü çalışmalarında, farklı mesafelerde ışık uygulaması gerçekleştirilmiştir. Örneğin, Kim ve ark. [9] 647 nm dalga boyuna sahip LED ışık kaynağını 3 cm mesafeden, Schwartz-Filho ve ark. [72] InGaAlP lazeri (685 nm), Peng ve Wu [74] da LED ışık kaynağını (620 nm) 2 cm mesafeden ve Khadra ve ark. [77] ise GaAlAs lazeri (830 nm) 9 cm mesafeden uygulamışlardır [9-72-74-77].

Literatürde, hücre kültürü çalışmalarında lazer ile yapılan çalışmaların çoğu genellikle 2-boyutlu sistemlerde gerçekleştirilmiştir. 3-boyutlu sistemlerde yapılan çalışmalar ise daha az sayıdadır. Işık uygulamasının 3-boyutlu sistemlerde gerçekleştirildiği çalışmalardan bir tanesi Abramovitch ve ark.'nın [71] yaptığı çalışma olup, mercan doku iskelelerini kullanarak, lazer ışınlarının hücrelerin farklılaşması üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bunun için He-Ne lazeri (632.8 nm) 20 cm mesafeden uygulamışlardır. Yapılan bir diğer çalışmada ise Leonida ve ark. [5] Nd:YAG lazeri, kollajen doku iskelelerine ekilmiş mezenkimal kök hücrelere 5 mm mesafeden uygulamıştır [5-71].

Literatürde, fotobiyomodülasyon için tanımlanmış bir mesafe aralığı bulunmamakla birlikte, 5mm ile 20 cm aralığında bulunan farklı mesafelerden ışık uygulaması gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında, ışık uygulama mesafesine karar vermek için üç farklı mesafe belirlenmiştir. Bu mesafeler Bölüm 3.3.2'de de belirtildiği

gibi 5 cm, 10 cm ve 20 cm'dir. Lazerler ve LED' ler kullanılarak yapılan çalışmalarda, hücreler üzerindeki sıcaklık artışı çok az olduğu için, ışık uygulaması yakın mesafelerden (2-3 cm gibi) gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, Gritsch ve ark. [93] yaptığı çalışmada, kullanılan yüksek güçlü plazma ark ışık kaynağının uygulama mesafesi 9 mm olarak belirlenmiştir. Tez kapsamında kullanılan plazma ark kaynağının yüksek ışık yoğunluğuna sahip olması ve kullanımı ile meydana gelen sıcaklık oluşumu gibi nedenler göz önüne alınarak mesafe, literatürde belirlenen mesafelere göre biraz daha fazla tutulmuş ve minimum ışık uygulama mesafesi 5 cm olarak belirlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında, 3-boyutlu kitosan doku iskeleleri kullanılarak ışık uygulaması gerçekleştirileceği için maksimum mesafe ise Abramovitch ve ark. [71] yaptığı çalışma göz önüne alınarak belirlenmiştir. Bu çalışmada 3-boyutlu sistemlere, ışık kaynağı 20 cm mesafeden uygulanarak PBM'den olumlu cevap elde ettikleri için maksimum mesafe 20 cm olarak belirlenmiştir. Üçüncü mesafe ise literatürdeki mesafelere de benzerlik gösterip 10 cm olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, öncül hücre kültür çalışmalarında plazma ark ışık kaynağı, hücrelere 5 cm, 10 cm ve 20 cm mesafeden 1 dk süre ile uygulanmıştır. Yapılan MTT analizi ile hücre-ışık kaynağı arasındaki kritik mesafe belirlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında belirlenen diğer bir parametre ise ışığın uygulama sıklığıdır. PBM ile metabolizmayı artırmak için hücreleri belirli aralıklarla uyarmak gerekmektedir. Tek bir dalga boyuna sahip düşük enerjili lazerlerle yapılan birçok çalışmada, ışık kaynağı sadece 1 kere veya belirli aralıklarla olmak üzere 3 kere, mercan doku iskeleleri ile yapılan çalışmada ise her gün uygulanmıştır. Gritsch ve ark. [93] HGF hücrelerine, plazma ark ışık kaynağını kullanarak 3 s süre ile toplam 4 kere olmak üzere ışık uygulamıştır. Sonuç olarak, farklı kaynaklarla (lazerler, LED'ler ve plazma ark sistemi) yapılan ışık uygulamaları ya her gün ya da belirli aralıklarla yapılmıştır.

Literatürde yapılan çalışmalar da göz önüne alınarak, MC3T3-E1 preosteoblast hücreler ile yürütülen öncül hücre kültür çalışmaları süresince, ışık kaynağı hücrelere her gün ve gün aşırı olmak üzere 2 farklı sıklıkla uygulanmıştır. MTT analiziyle plazma ark ışık kaynağının hücrelere uygulama sıklığı belirlenmiştir.

Öncül hücre kültür çalışması

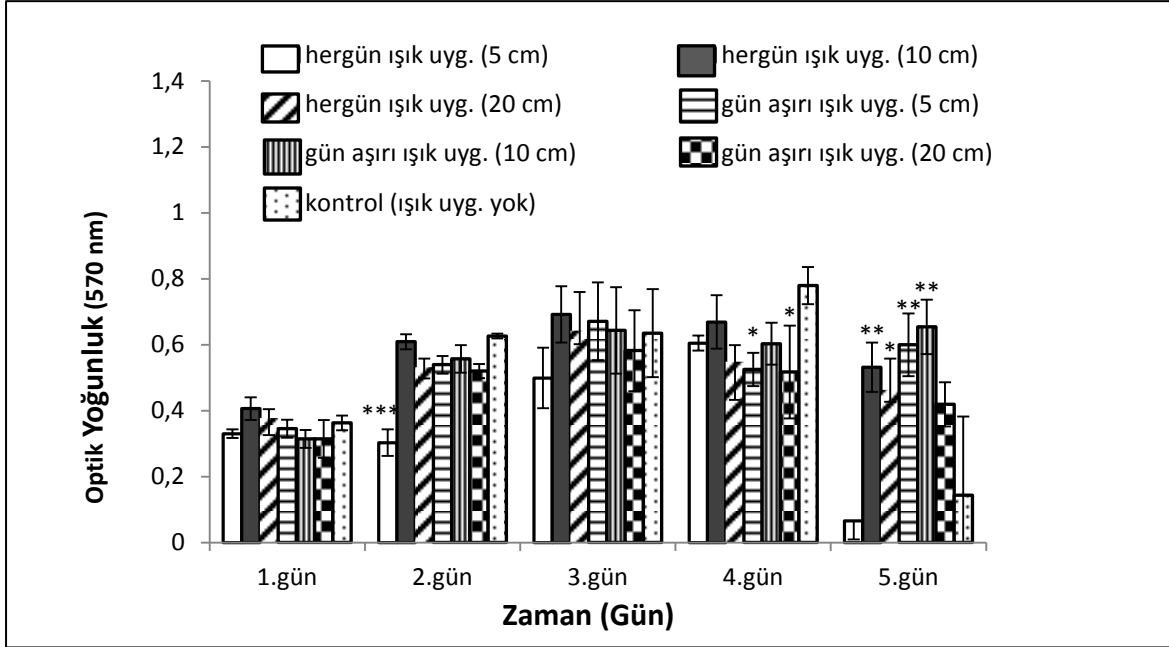
Al-Ghamdi ve ark. [4] fotobiyomodülasyondan maksimum verim almak için, ışınlama süresinde ortamın PBS ile değiştirilmesi gerektiğini aksi takdirde ışınlama süresince serumun reaksiyona müdahale edebileceğini belirtmişlerdir Ayrıca, PBM'ye dışarıdan farklı bir ışık kaynağının müdahalesi olmaması için, ışık uygulamasının karanlıkta gerçekleştirilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir [4]. Buna bağlı olarak, ileride yapılacak olan tüm hücre kültür çalışmaları karanlıkta gerçekleştirilmiş ve hücrelere ışık uygulaması yapılmadan önce, ortam PBS ile değiştirilmiştir. Işık uygulaması tamamlandıktan sonra ise, PBS uzaklaştırılmış, yerine hücrelerin önceden sahip oldukları kültür ortamı eklenerek inkübasyona devam edilmiştir.

Lazer ile yapılan birçok çalışmada, ışık kaynağı laminar kabinin içinde ve ışık, direkt hücre ile temas şeklinde bulunmaktadır. Schindl ve ark. [96] 670 nm diyot lazeri, kültür kaplarında bulunan endotel hücrelere uygularken steril şartlarda ve kültür kaplarının kapağı açık şekilde uygulamışlardır. 3.4.1'de gösterildiği gibi plazma ark kaynağı laminar kabinin dışında bulunmaktadır. Dolayısı ile ışınlama, 24-gözlü kaplara kabin dışında yapılmıştır. Bu esnada kültür kaplarının kapakları kapalı durumda bulunmaktadır (Şekil 3.3c). Yani ışığın hücrelere ulaşması için kültür kabinin kapağını geçmesi gerekmektedir. Silva ve ark. [97] hücre kültüründe yaygın olarak kullanılan materyallerdeki absorpsiyon katsayısı, penetrasyon derinliği ve geçiş etkinliğini belirlemişlerdir. Işığın, polistiren kültür kaplarından geçiş etkinliğinin %78 ve penetrasyon derinliğinin ise 0.76 cm olduğunu belirtmişlerdir [97]. Tez kapsamında kullanılan kültür kabinin kapağının kalınlığı 0.11 cm olup ışığın geçişi için uygun olduğu tespit edilmiştir.

Mesafe ve uygulama sıklığı için farklı seçenekler oluşturulduktan sonra öncül hücre kültür çalışması gerçekleştirilmiştir. Sadece TCPS hücre grubu ile yapılan çalışmalarda, 24-gözlü kültür kaplarının her bir gözüne 3×10^4 sayıda hücre ekilmiştir. Hücre ekiminden 1 gün sonra, inkübatörden alınan hücrelere, 5 cm, 10 cm ve 20 cm mesafeden her gün ve gün aşırı yapılacak olan ışık uygulamaları 5 gün süre ile gerçekleştirilmiştir.

MTT analizi

Hergün ve gün aşırı ışık uygulaması yapılan gruplar ile yürütülen hücre kültür süresi boyunca hücrelerin canlılıkları MTT analizi ile belirlenmiştir. Sonuçlar günlere karşı optik yoğunluk değeri olarak Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2. Farklı mesafelerde ve sıklıklarda gerçekleştirilen ışık uygulaması ile TCPS üzerinde çoğalan MC3T3 hücrelerine ait MTT grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu ışık uygulanmayan grup iken, * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001).

Hücre ekiminden sonra, TCPS yüzeyine hücreler tutunmuş ve çoğalmaya devam etmişlerdir. Kültürün 1. ve 3. günlerinde hücre canlılığı açısından gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Kültürün 2. gününde, 5 cm mesafeden her gün gerçekleştirilen ışık uygulaması ile hücrelerin üreme hızının diğer gruplara göre anlamlı derecede azaldığı görülmektedir ($p<0.001$). Kültürün 4. gününde, 5 cm ve 20 cm mesafeden gün aşırı gerçekleştirilen ışık uygulaması sonucunda, hücrelerin üreme hızı diğer gruplara göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). Kültürün 5. gününde ise kontrol grubu hücrelerinin üreme hızında düşüş yaşanmış ve bu düşüş 5 cm mesafeden her gün ışık uygulaması yapılan grup ile benzerlik göstermiştir. Diğer grupların mitokondriyal aktivitelerinin ise kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Yirmi cm mesafeden, her gün gerçekleştirilen ışık uygulamalarının yapıldığı hücrelerin üreme hızının, kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı görülmektedir ($p<0.05$). Aynı zamanda, 10 cm mesafeden her gün ve 5-10 cm

mesafeden gün aşırı gerçekleştirilen ışık uygulaması ile hücrelerin üreme hızlarının diğer gruplara göre anlamlı derecede arttığı görülmektedir ($p<0.01$). Beşinci gün sonuçları temel alınarak, gün aşırı ışık uygulanan grupların (5 ve 10 cm) MTT değerleri diğer gruplara göre daha yüksek olduğu için, ışık uygulama sıklığına 'gün aşırı' olarak karar verilmiştir. Gün aşırı ışık uygulanan gruplardaki MTT değerinin ise en fazla 10 cm mesafede olduğu görülmektedir ($p<0.01$). Tüm bu veriler doğrultusunda, ileride yapılacak çalışmalar için, uygulama mesafesi 10 cm ve uygulama sıklığı gün aşırı olarak belirlenmiştir.

4.2.1.3 Süre belirleme çalışması

Literatürde kullanılan ışık kaynaklarının, gücüne ve enerji yoğunluğuna bağlı olarak hesaplanan farklı süreler ile birlikte ışık uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Miliwatt (mW) düzeyinde olan düşük enerjili ışık kaynaklarında kullanılan enerji yoğunluğu J/cm^2 oranında olduğu için, bulunan süreler saniye ve dakika bazındadır. Bouvet-Gerbetaz et al. [76] $4J/cm^2$ enerji yoğunluğuna ve $44 mW/cm^2$ güce sahip ışık kaynağın uygulama süresini hesaplamak için, 2.3.3'de de açıklandığı gibi, $E(\text{enerji yoğunluğu}) = P(\text{güç yoğunluğu}) \times t(\text{süre})$ formülünü kullanmış ve bu süreyi 91 s olarak hesaplamışlardır [76].

Posten ve ark. [6] lazer ile gerçekleştirilen toplam ışınlama süresinin 10-3,000 saniye aralığında olduğunu belirtmişlerdir. Kim ve ark. [9] mezenkimal kök hücrelere 10, 30 ve 90 s süre ile 1 kez lazer uygulamasını gerçekleştirmişlerdir. Fujihara ve ark. [8] da GaAlAs lazeri (780 nm) kemik benzeri hücrelere 12 s boyunca uygulamışlardır. Hou ve ark. [79] ise kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelere ışık uygulamasını, InGaAsP lazeri (635 nm) kullanarak 75, 150, 300 ve 750 s süre ile gerçekleştirmişlerdir [6-8-9-79].

Tez kapsamında kullanılan plazma ark ışık kaynağının enerji yoğunluğu $10^4 W/cm^2$ olup, ışık kaynağının minimum uygulama süresi 1 dk, maksimum ışık uygulama süresi ise mercan doku iskeleleri ile yapılan çalışma göz önüne alınarak 10 dk olarak belirlenmiştir. Ara değer olarak da 5 dk alınmış ve böylece, tez kapsamında ışık uygulama süreleri 1 dk, 5 dk ve 10 dk olarak belirlenmiş ve öncül hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

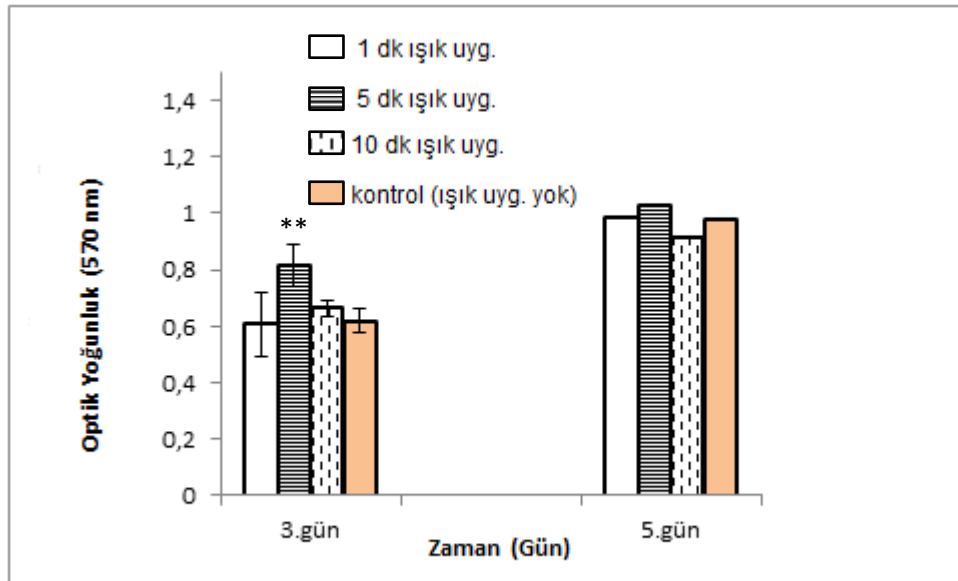
Öncül hücre kültür çalışmaları

TCPS ve doku iskeleleri olmak üzere 2 grup ile süre belirleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. TCPS hücre grubu için 24-gözlü kültür kaplarına 1.3×10^4 hücre/mL, kitosan doku iskelelerine ise 7.8×10^4 hücre/mL derişiminde hücre ekilmiştir. Hücre ekiminden 1 gün sonra, öncül ışık uygulamalarında belirlenen diğer iki parametre (10 cm mesafeden gün aşırı ışık uygulaması) ile birlikte, her iki gruba da 1dk, 5 dk ve 10 dk olmak üzere 5 gün süre ile ışık uygulanmıştır.

MTT analizi

Bu bölümde, TCPS ve doku iskeleleri ile oluşturulan grupların MTT analizleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

TCPS hücre grubu ile yürütölen hücre kültürü çalışması boyunca hücrelerin canlılıkları MTT analizi ile belirlenmiş olup, sonuçlar günlere karşı optik yoğunluk değeri olarak Şekil 4.3'de verilmiştir.

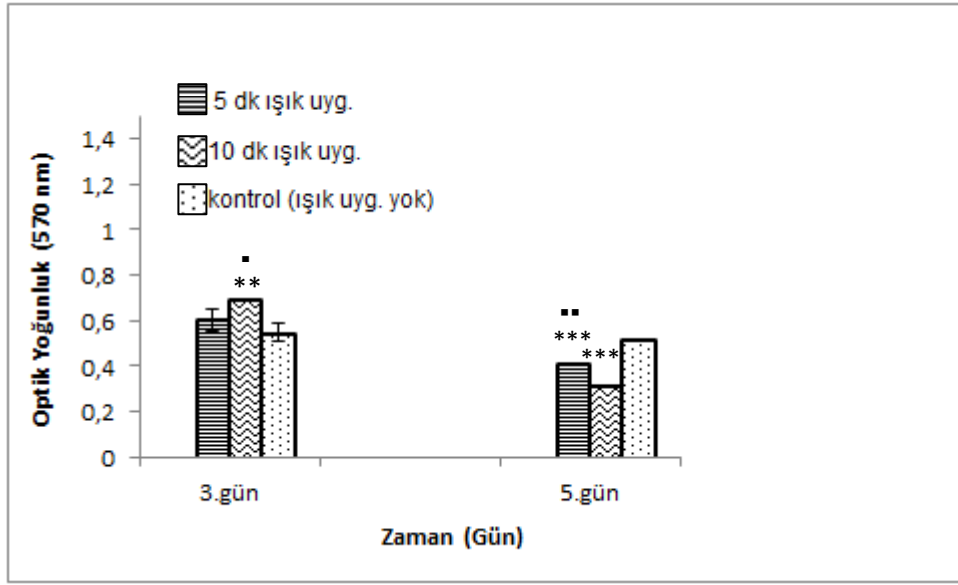


Şekil 4.3. Farklı sürelerde gerçekleştirilen ışık uygulaması ile TCPS üzerinde çoğalan MC3T3 hücrelerine ait MTT grafiğı (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu; ışık uygulanmayan grup iken, * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001).

MTT grafiğıne göre, 5 günlük hücre kültür süresi boyunca, ışık uygulanan bütün gruptaki hücrelerin MTT oranları artış göstermiştir. Kültürün 3.gününde, 5 dk süre ile ışık uygulaması gerçekleştirilen gruptaki hücrelerin üreme hızının, kontrol grubu ve

diğer gruplara göre anlamlı derecede arttığı görülmektedir ($p<0.01$). Kültürün 5. gününde ise, ışık uygulaması yapılan gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). Sonuç olarak, TCPS grubu ile yapılan hücre kültür çalışmalarında 3. gün baz alınarak, ışık kaynağının hücrelere uygulama süresi 5 dk olarak belirlenmiştir.

Kitosan doku iskeleleri ile yürütülen süre belirleme çalışmasında da, hücre kültürü boyunca hücrelerin canlılıkları MTT analizi ile belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Farklı sürelerde uygulanan ışık ile kitosan doku iskeleleri üzerinde çoğalan MC3T3 hücrelerine ait MTT grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, $n=3$, kontrol grubu; ışık uygulanmayan grup iken, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ iken, ▪ $p<0.05$, ■ $p<0.01$).

Hücre ekiminden sonra, doku iskelelerine hücreler tutunmuş ve çoğalmaya devam etmişlerdir. Kültürün 3. gününde 10 dk süreyle gerçekleştirilen ışık uygulamasında, hücrelerin üreme hızının, ışık uygulanan ve uygulanmayan diğer gruplara göre anlamlı derecede arttığı görülmektedir ($p<0.01$). Kültürün 5. gününde ise 5 dk ve 10 dk ışık uygulanan gruptaki hücrelerin MTT oranı kontrol grubundaki hücrelere göre daha azdır ($p<0.001$). Fakat ışık uygulanan her iki grup için de inhibisyon söz konusu değildir. Leonida ve ark. [5] yaptıkları çalışmada benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Bu çalışmada, mezenkimal kök hücrelere Nd:YAG lazer uygulanmış ve ışık uygulanmayan kontrol grubu ile sonuçlar değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular

ışığında, hücresel çoğalma sürecinin aynı zamanlı hücre farklılaşmasındaki artış ile birlikte azaldığını ifade etmişlerdir. Bu çalışmaya benzer şekilde, tez kapsamında gerçekleştirilen MTT analizinin 5. günde, hücrelerin kontrol grubuna göre çoğalmasındaki azalma farklılaşma ile ilişkilendirilebilirse de sürenin kısalığı dikkate alındığında diğer bir nedenin daha etkin olacağı düşünülmüştür. TCPS grubunda hücreler yüzeye tutunmuş halde bulunmaktadır. Doku iskeleleri ile oluşturulan grupta ise hücreler, kitosan doku iskelelerinin sahip olduğu gözeneklerde yer almaktadır. Dolayısıyla ışığın hücre ile etkileşimi için, 2 mm kalınlıkta olan doku iskelelerinin iç kısımlarına kadar ulaşması gerekmektedir. Bu nedenle TCPS grubunda, ışık uygulama süresi 5 dk yeterli olurken doku iskelelerinde bu sürenin 10 dk olması uygun olarak görülmüştür.

Öncül ışık uygulamaları ile gerçekleştirilen çalışmalarda şu sonuçlar elde edilmiştir:

- Belirlenen çalışma koşullarında plazma ark ışık kaynağı ile meydana gelen sıcaklık artışı hücrelere zarar vermeyecek ölçüdedir.
- TCPS ve doku iskeleleri için ışık uygulama mesafesi 10 cm, uygulama sıklığı ise gün aşırı olarak belirlenmiştir.
- TCPS grubu için ışık uygulama süresi 5 dk, doku iskeleleri ile oluşturulan grup için ise 10 dk olarak belirlenmiştir.

4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültür çalışmalarında preosteoblastik MC3T3-E1 hücre hattı kullanılmıştır. 24-gözlü kültür kaplarına ve kitosan doku iskelelerine ekilen hücrelere, önceden belirlenen parametrelerle birlikte plazma ark ışık kaynağı ile ışık uygulanmış ve kültür 21 gün boyunca devam ettirilmiştir.

Yapılan analizler ile preosteoblastik hücrelerin, TCPS yüzeyindeki ve doku iskeleleri üzerindeki canlılıkları, morfolojileri ve osteojenik farklılaşmaları incelenmiştir. Ayrıca ışık kaynağının incelenen özellikler üzerindeki etkileri gruplar arasında karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

TCPS ve doku iskeleleri için 3 farklı grup oluşturulmuştur. Bu gruplar şunlardır:

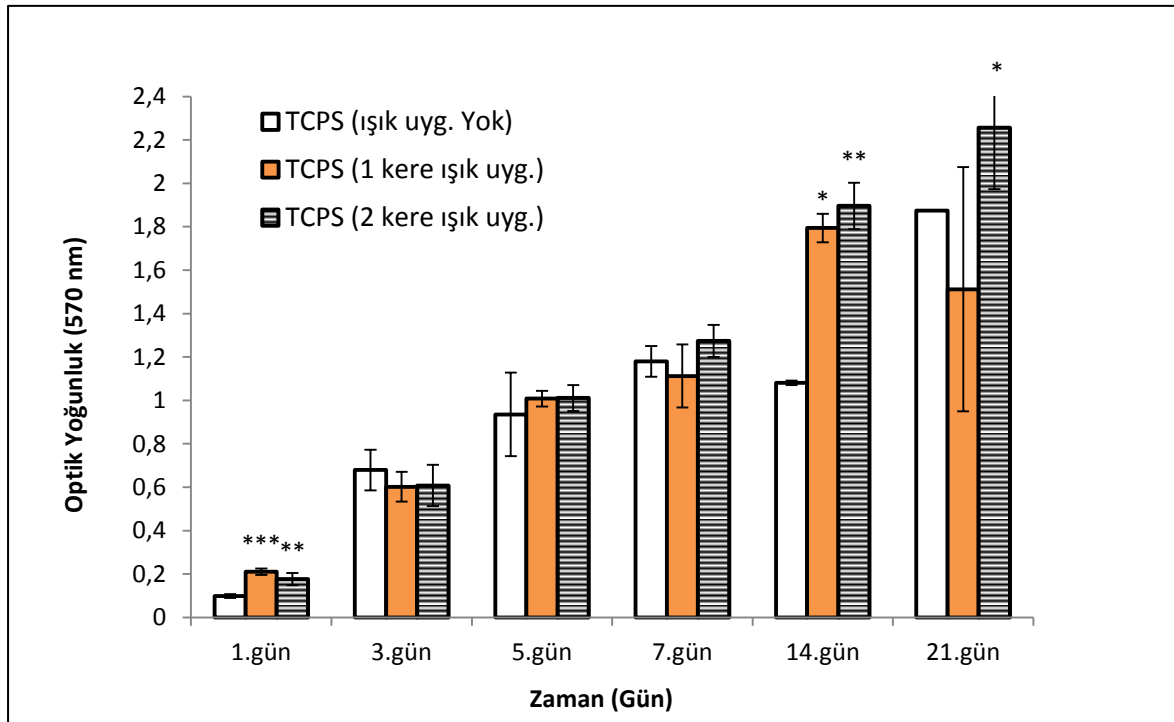
- Kontrol grubu olarak; ışık uygulanmayan gruplar: Kitosan (ışık uyg. yok) ve TCPS (ışık uyg. yok),

- Günde 1 kere ışık uygulanan gruplar: Kitosan (1 kere ışık uyg.) ve TCPS (1 kere ışık uyg.) ve
- 3 saat arayla, günde 2 kere ışık uygulanan gruplar: Kitosan (2 kere ışık uyg.) ve TCPS (2 kere ışık uyg.).

4.3.1. MTT analizi

TCPS ve kitosan doku iskeleleri ile oluşturulan gruplar için MTT analizi ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

3 farklı ışık uygulaması yapılan TCPS hücre grubu ile yürütülen hücre kültür çalışması boyunca hücrelerin canlılıkları MTT analizi ile belirlenmiştir. Sonuçlar günlere karşı optik yoğunluk değeri olarak Şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.5. TCPS (ışık uyg. yok), TCPS (1 kere ışık uyg.) ve TCPS (2 kere ışık uyg.) gruplarında bulunan MC3T3 hücrelerine ait MTT grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu TCPS (ışık uyg. yok) iken, * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001).

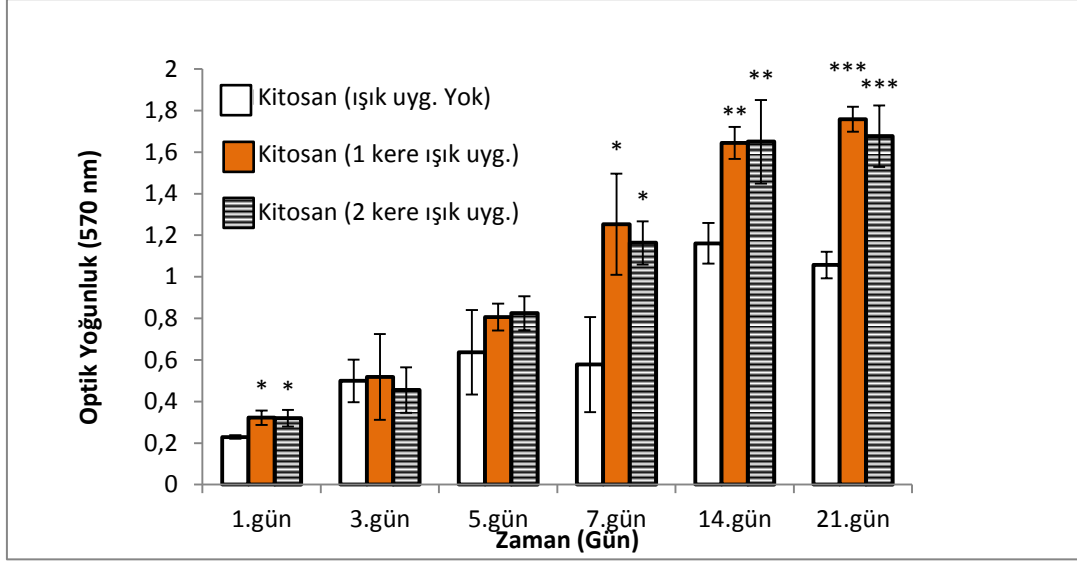
Kültürün ilk gününde, ışık uygulaması gerçekleştirilen her iki gruptaki hücrelerin üreme hızının, ışık uygulanmayan gruba göre anlamlı derecede arttığı görülmektedir (p<0.01 ve p<0.001). Kültürün 3., 5. ve 7. günlerinde hücre canlılığı açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiş (p>0.05) fakat her grup için, MTT değerleri

ilk güne göre artmaya devam etmiştir. Peng ve Wu [88] LED ışık kaynağını kullanarak mezenkimal kök hücrelerin hücre canlılıklarını MTT analizi ile belirlemiştir. Işık uygulaması yapılmayan kontrol grubu ile ışınlama yapılan grup olmak üzere 2 grup belirlenmiş ve 6 günlük kültürün sonunda, kontrol grubuna göre, ışınlama yapılan grubun MTT değeri artarak 6. gün sonuna kadar devam etmiştir [74]. Sunulan tez çalışmasında da kültürün ilk 7 gününde ışık uygulaması yapılan gruplarda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Kültürün 14. gününde ışık uygulanan grupların MTT değeri, ışık uygulanmayan grubun MTT oranının hemen hemen 2 katı kadardır. 2 kere ışık uygulaması yapılan gruptaki hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin diğer 2 gruba göre anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu görülmektedir ($p<0.01$). Aynı kültür gününde, 1 kere ışık uygulanan gruptaki hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri de kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde daha yüksektir ($p<0.05$). Kültürün 21. gününde ise 2 kere ışık uygulanan gruptaki hücrelerin çoğalma hızının, diğer iki gruptaki hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı görülmektedir ($p<0.01$). 21. günün sonunda mitokondriyal aktivitenin en fazla 2 kere ışık uygulanan grupta olduğu gözlenmiştir.

Gritsch ve ark. [93] epitel hücrelerine, iki farklı ışık kaynağı (PAC ve LED) ile 3 gün süreyle ışık uygulamıştır. Kültür sonunda, her iki ışık kaynağı için de hücrelerin çoğalma hızları kontrol grubuna göre (ışık uygulanmayan grup) artmış ve kültür süresi boyunca devam etmiştir [93]. Sunulan tez çalışması kapsamında, kullanılan plazma ark ışık kaynağı ile hücrelerin çoğalma hızının, kültür süresi boyunca devam etmesi bu çalışma ile benzerdir.

Sonuç olarak, plazma ark ışık kaynağının TCPS yüzeyinde bulunan MC3T3 hücreleri ile etkileşimi sonucu, hücrelerin çoğalma hızı artmış ve kültür süresi boyunca devam etmiştir. Işık ile müdahale sonucunda, mitokondri solunum zinciri ile çekirdek arasındaki bilgi kanalı olan mitokondriyal sinyal yolu aktif hale gelir. Çekirdeğe iletilen sinyal sonucunda gen transkripsiyon oranı artar ve hücrel çoğalma hızında artış meydana gelir. Yani fotobiyouyarım ile hücrel metabolizma ve fonksiyon artar. Sonuç olarak, belirlenen parametrelerle birlikte plazma ark ışık kaynağının kullanımı ile fotobiyomodülasyondan pozitif cevap elde edilmiştir.

Doku iskeleleri ile oluşturulan 3 farklı grup için de, hücrelerin canlılıkları MTT analizi ile belirlenmiş ve Şekil 4.6'da oluşturulan MTT grafiği verilmiştir.



Şekil 4.6. Kitosan doku iskeleleri için oluşturulan MTT grafiği. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan (ışık uyg. yok) iken, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$).

Kültürün ilk gününde ışık uygulaması yapılan her iki gruptaki hücrelerin üreme hızları ışık uygulanmayan kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Üçüncü ve 5. günlerde, hücrelerin üreme hızları artarak devam etmiş ve gruplar arasında bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). TCPS gruplarının, MTT grafiğinin 1. 3. ve 5. günlerinde de benzer sonuçlar görülmüştür. Kültürün 7. 14. ve 21. günlerinde, ışık uygulanan gruptaki hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri kontrol gruplarına göre anlamlı bir şekilde artarak devam etmiştir ve kültürün son günündeki farklılık diğer günlere göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$). Sonuç olarak, 21. günlük hücre kültürü süresince ışık uygulanan gruptaki hücrelerin çoğalma hızının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Fakat ışık uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemiş, yani hücrelere günde 1 veya 2 kere ışık uygulamak sonucu değiştirmemiştir. Bu çalışmanın sonunda, doku iskeleleri üzerinde çoğalma gösteren hücrelere, günde 1 veya 2 kere ışık uygulaması yapılarak, fotobiyomodülasyondan pozitif cevap alındığı görülmektedir.

Khadra ve ark. [77] titanyum implant üzerinde kültüre edilen osteoblast benzeri hücrelere GaAlAs diyot lazer uygulamış ve sonuç olarak, ışık uygulanan hücrelerin çoğalma oranının kontrol grubuna göre arttığını ve bu artışın kültür süresince devam ettiğini ifade etmişlerdir. Literatürde yapılan çalışmalara benzer şekilde

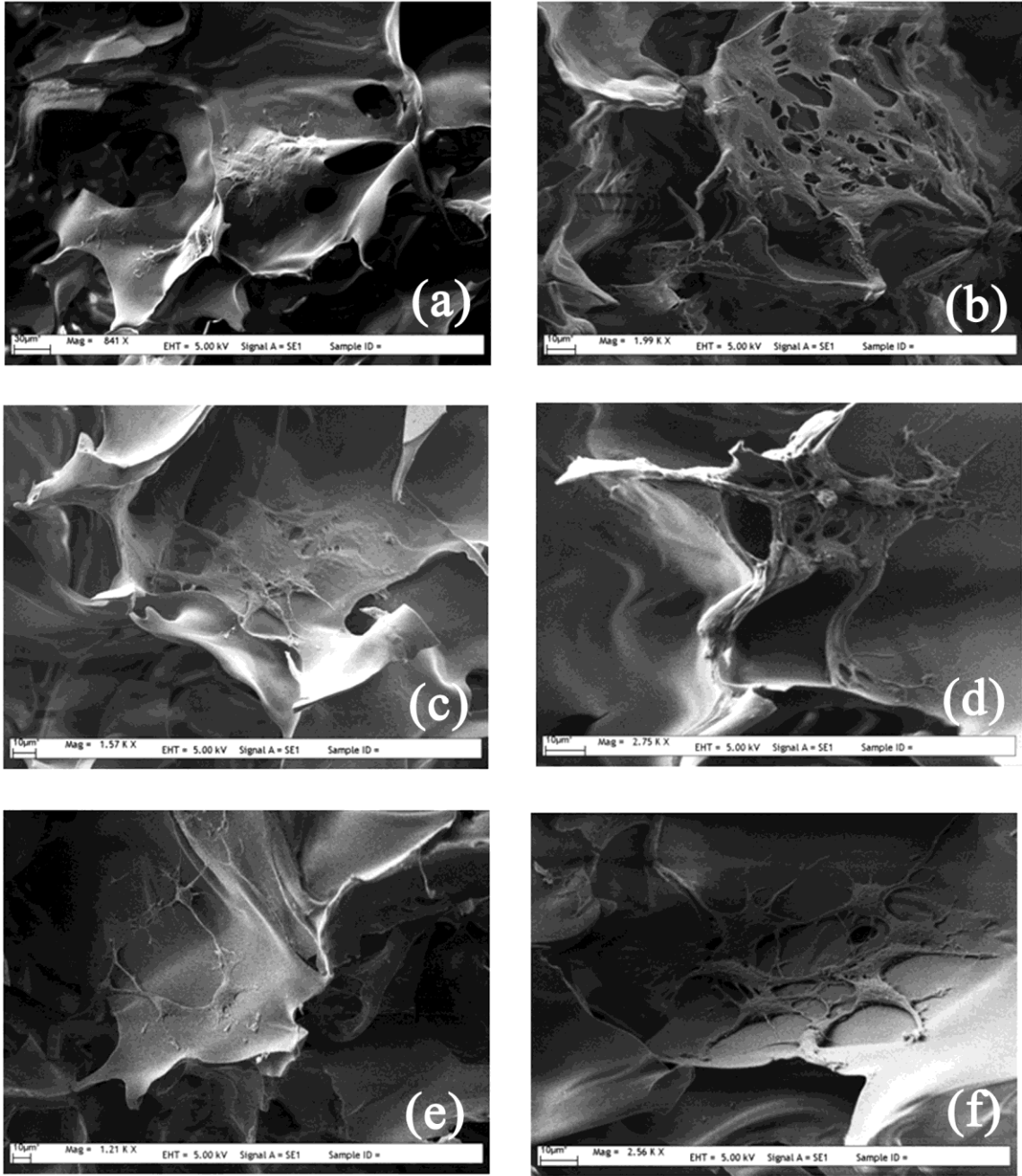
fotobiyomodölasyon hücresel çoğalmayı artırmış ve bu artış kültür süresince devam etmiştir.

4.3.2. Hücrelerin morfolojik olarak incelenmesi

Morfolojik incelemeler SEM analizi ve floresan mikroskop ile inceleme olmak üzere 2 şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.3.2.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

MC3T3-E1 hücrelerinin doku iskeleleri içerisindeki morfolojilerinin, yapışma ve yayılma eğilimlerinin görüntülenmesi için SEM analizi yapılmıştır. Bu analizler, kitosan doku iskeleleri ile oluşturulan 3 grup için, kültürün 3., 7. ve 14. günlerinde gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.7’de 3. güne ait SEM fotoğrafları verilmiştir.

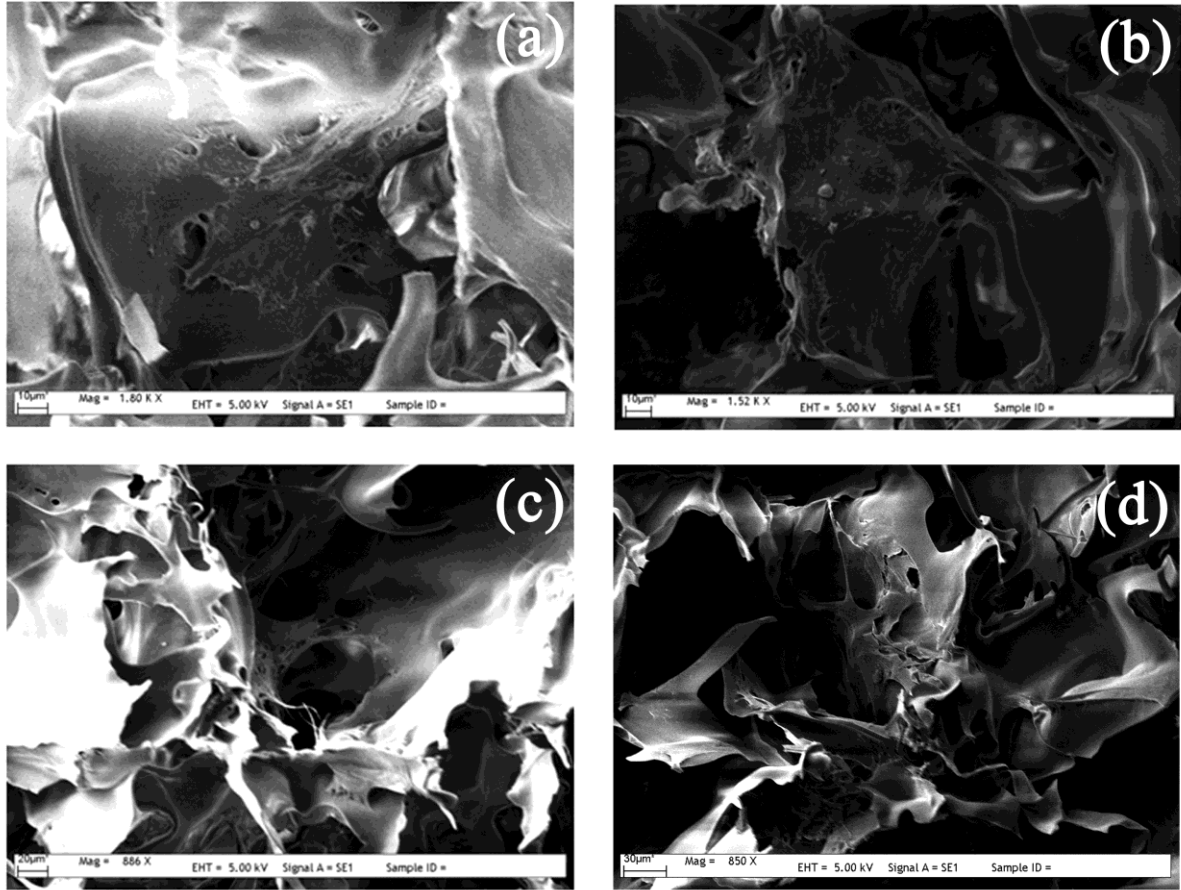


Şekil 4.7. Kitosan doku iskelelerinde 3. güne ait SEM fotoğrafları. (a, b) ışık uygulaması yok, (c, d) 1 kere ışık uygulaması, (e, f) 2 kere ışık uygulaması. Büyütmeler: (a) 841 X, (b) 1.99 K X, (c) 1.57 K X, (d) 2.75 K X (e) 1.21 K X, (f) 2.56 K X.

Kültürün 3. gününde, 3 grupta da hücreler gözeneklere girerek yayılma eğilimi göstermişlerdir. Ayrıca, hücreler arasındaki bağlantılar da dikkat çekmektedir. Işık uygulanan her iki grupta da hücreler yüzeye yayılırken ve birbirleri ile bağlantı kurarken, hücrelerin gövdelerinde çok sayıda uzantı oluşmaktadır. Fakat ışık

uygulamasý yapýlmayan gruptaki hücreler arasındaki baęlantýlar daha kısıdır. Bu duruma bağlı olarak, ışıık uygulanan gruptaki hücre kümeleri daha geniş bir alanda yayılma gösterirken, ışıık uygulanmayan grupta hücre kümeleri daha dar bir alanda bulunmaktadır.

şekil 4.8'de kontrol grubunun yani ışıık uygulanmayan doku iskelesi grubunun 7. gün SEM görüntüleri verilmiştir.

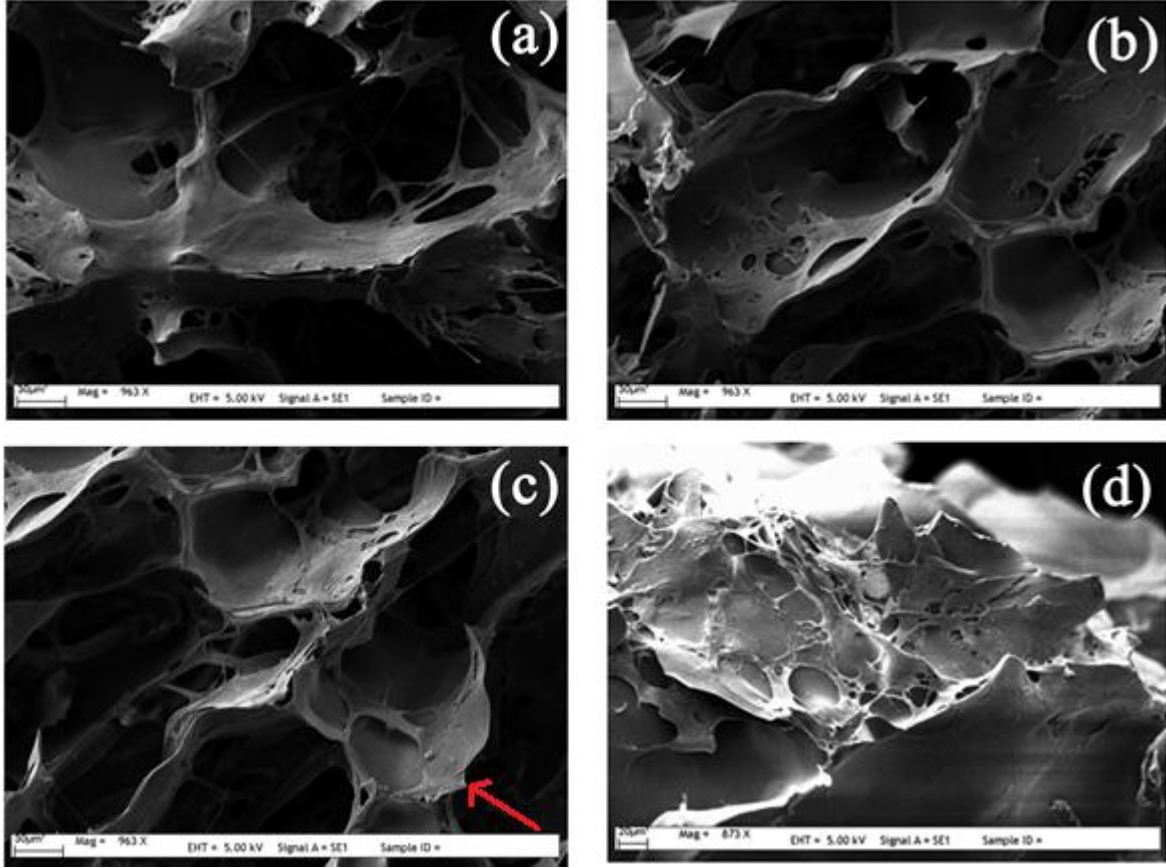


řekil 4.8. Kontrol grubunun (kitosan doku iskelesi, ışıık uygulamasý yok) 7. gün SEM görüntüleri: (a, b) doku iskelelerinin yüzey SEM görüntüleri, (c, d) boyuna kesitinden elde edilen SEM görüntüleri. Büyütmeler: (a) 1.80 K X, (b) 1.52 K X, (c) 886 X, (d) 850 X.

Enine kesitte hücreler gruplar halinde bulunmakta ve bu gruptaki hücrelerin yoğunluklarının 3. güne göre daha fazla olduğu görölmektedir. Doku iskelelerinin büyük boyutlarda ve içsel bağlantılı gözeneklere sahip olması nedeniyle hücreler doku iskelelerinin iç bölgelerine doğru yayılmaya devam etmişlerdir. Ayrıca, bu

hücrelerin üremeyi sürdürdükleri ve birbirleri ile bağlantı kurdukları da açıkça görülmektedir.

Şekil 4.9'da 1 kez ışık uygulanan kitosan doku iskelesi grubunun 7. gün SEM görüntüleri verilmiştir.

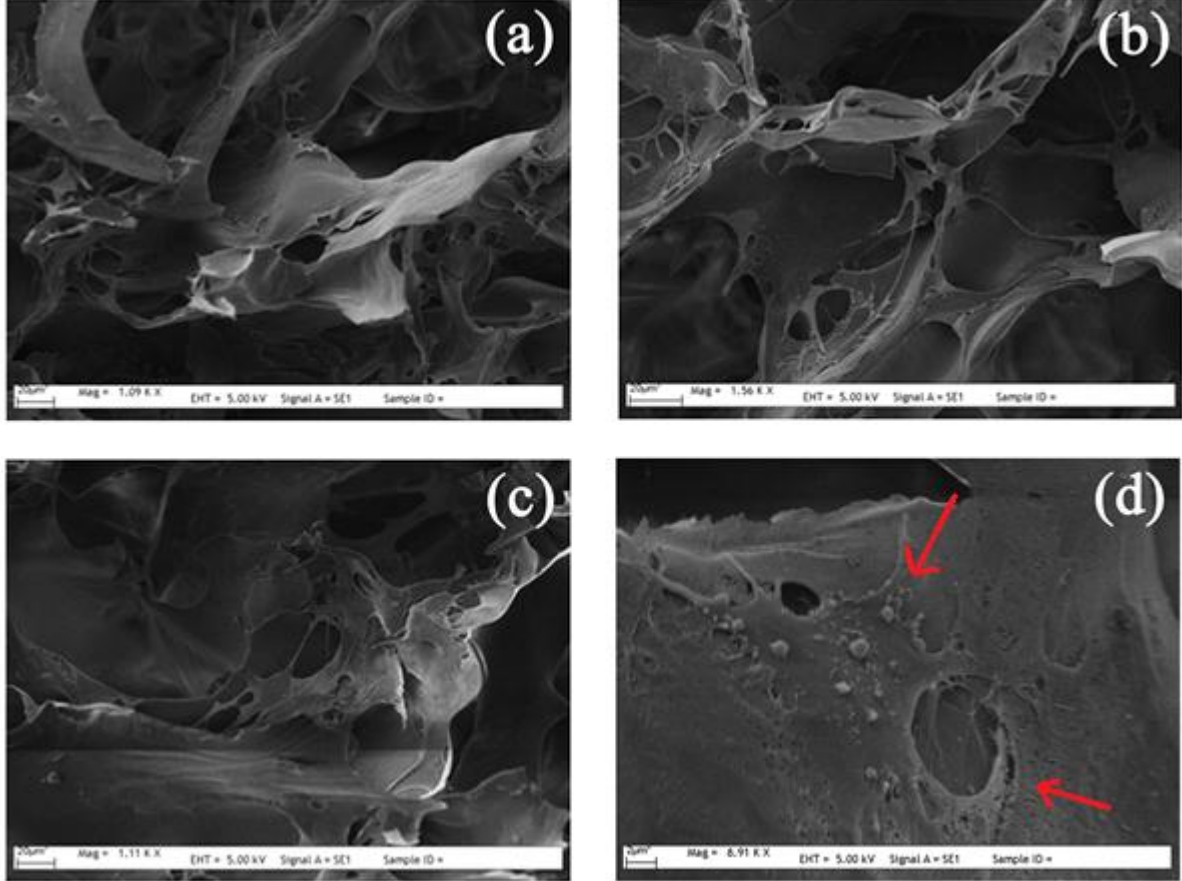


Şekil 4.9. Bir kez ışık uygulaması yapılan kitosan doku iskelesi grubuna ait 7. gün SEM görüntüleri: (a, b, c) doku iskelelerinin yüzey SEM görüntüleri, (d) enine kesitinden elde edilen SEM fotoğrafları. Büyütmeler: (a) 963 X, (b) 963 X, (c) 963 X, (d) 873 X.

Doku iskelelerinin yüzey fotoğraflarında (a, b, c), hücrelerin hem yüzeyde hem de iç kısımlarda yer aldıkları görülmektedir. Hücreler, uzun kollar oluşturarak birbirleri ile bağlantı kurmuş ve üç boyutlu şekilde çoğalmışlardır. Ayrıca, fotobiyomodülasyonun etkisi ile meydana gelen hücre çoğalmasındaki artış ile gözeneklerin kaplandığı görülmektedir. Enine kesitten elde edilen SEM görüntüsünde de, hücrelerin gruplar halinde ve nano boyutlardaki uzantıları ile birlikte yüzeye yayıldıkları görülmektedir. Şekil 4.8 ile karşılaştırıldığında, PBM'nin etkisi sonucu, hücre çoğalmasındaki artış ile beraber hücrelerin daha geniş alana yayıldıkları net bir şekilde fark edilmektedir.

Ayrıca, PBM'nin mineralizasyonu artırdığı da görüntülerden anlaşılmaktadır. Şekil 4.9c'de ok ile gösterilen bölgede, osteojenik farklılaşma işareti olarak, hücre membranlarında mineral birikimi gözlenmiştir.

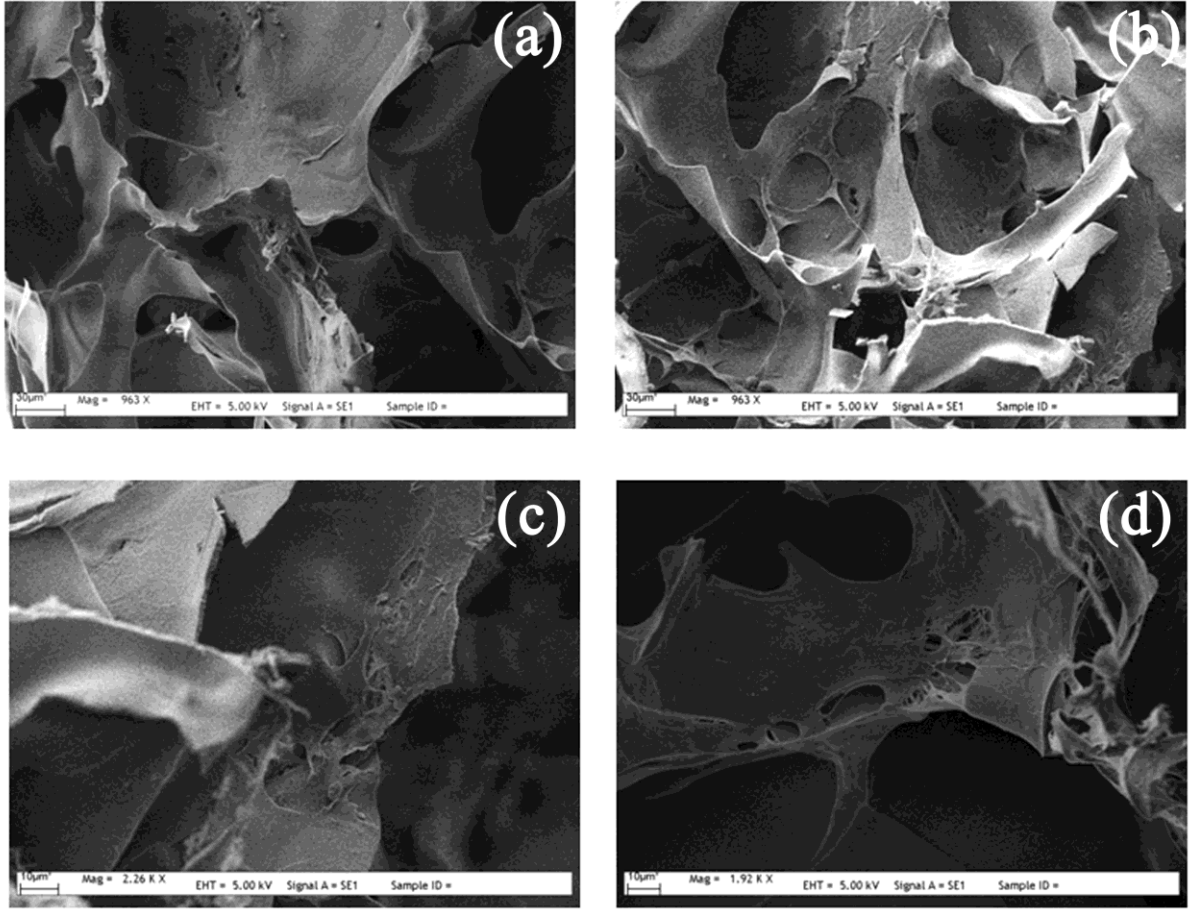
Şekil 4.10'da 2 kez ışık uygulanan kitosan doku iskelesi grubunun 7. gün SEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.10. İki kez ışık uygulaması yapılan kitosan doku iskelesi grubuna ait 7. gün SEM görüntüleri: (a, b) doku iskelelerinin yüzey SEM görüntüleri, (c, d) enine kesitinden elde edilen SEM görüntüleri. Büyütmeler: (a) 1.09 K X, (b) 1.56 K X, (c) 1.11 K X, (d) 8.91 K X.

Bu grubun SEM görüntüleri, 1 kez ışık uygulaması yapılan kitosan doku iskelesi grubunun 7. gün SEM görüntüleri ile benzerlik göstermektedir. Ok ile gösterilen bölgelerde, mineralizasyon ve kollajen fiberlerin oluşumu dikkat çekmektedir. Sonuç olarak, fotobiyomodülasyonun pozitif etkisi ile meydana gelen hücresel olaylar bu grupta da görülmektedir.

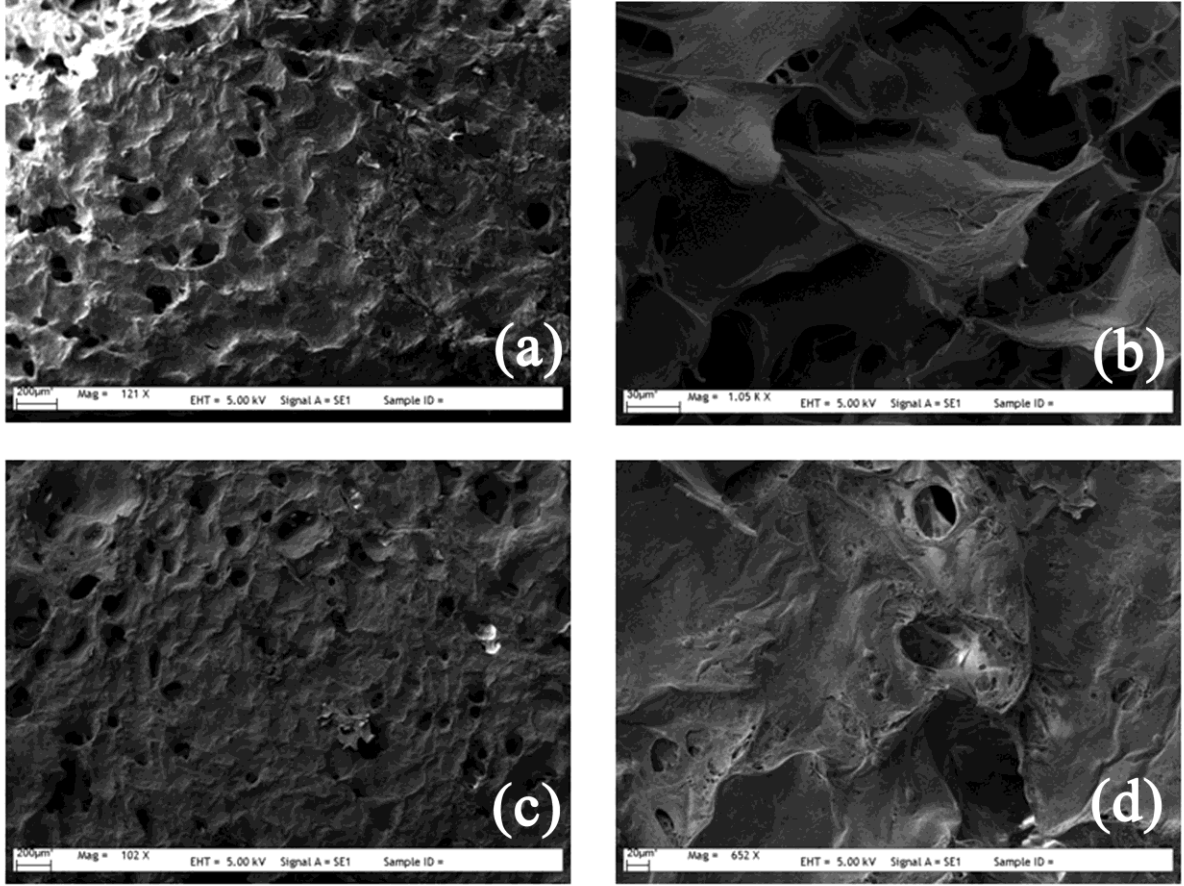
Şekil 4.11'de kontrol grubuna (kitosan, ışık uyg. yok) ait 14. gün SEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.11. Kontrol grubunun (kitosan doku iskelesi, ışık uygulaması yok) 14. gününe ait SEM görüntüleri: (a, b, c) doku iskelelerinin enine SEM görüntüleri, (d) boyuna kesitinin SEM görüntüleri. Büyütmeler: (a) 963 X, (b) 963 X, (c) 2.26 K X, (d) 1.92 K X.

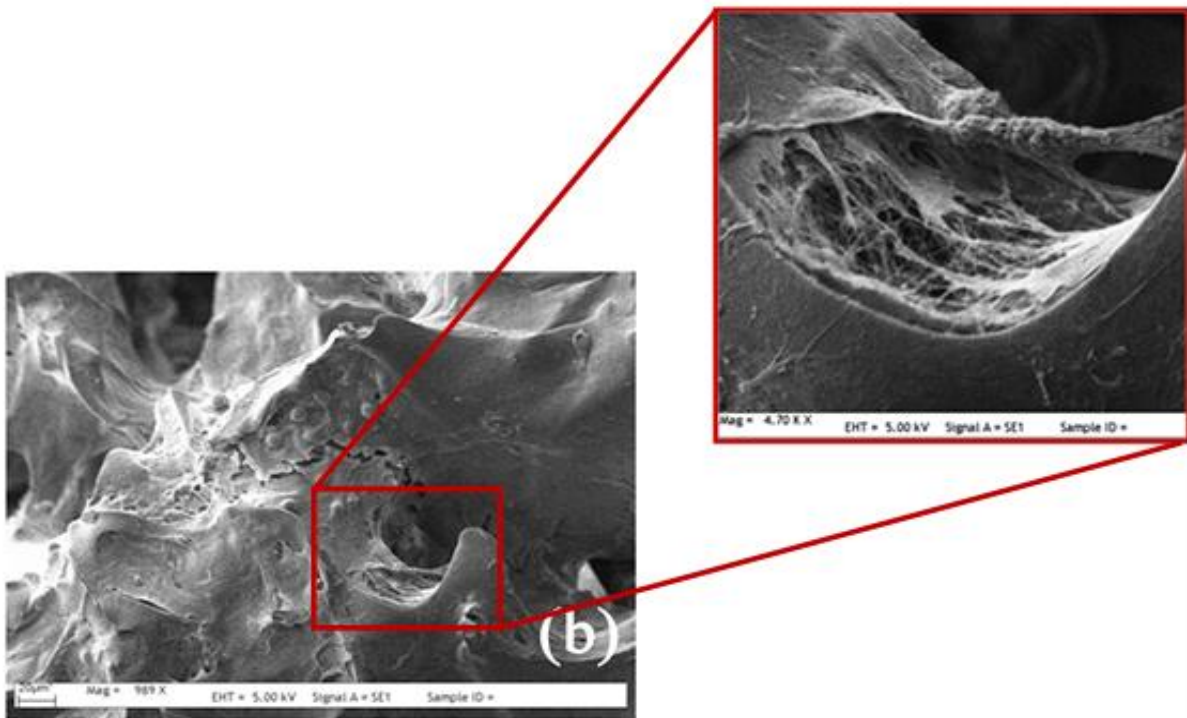
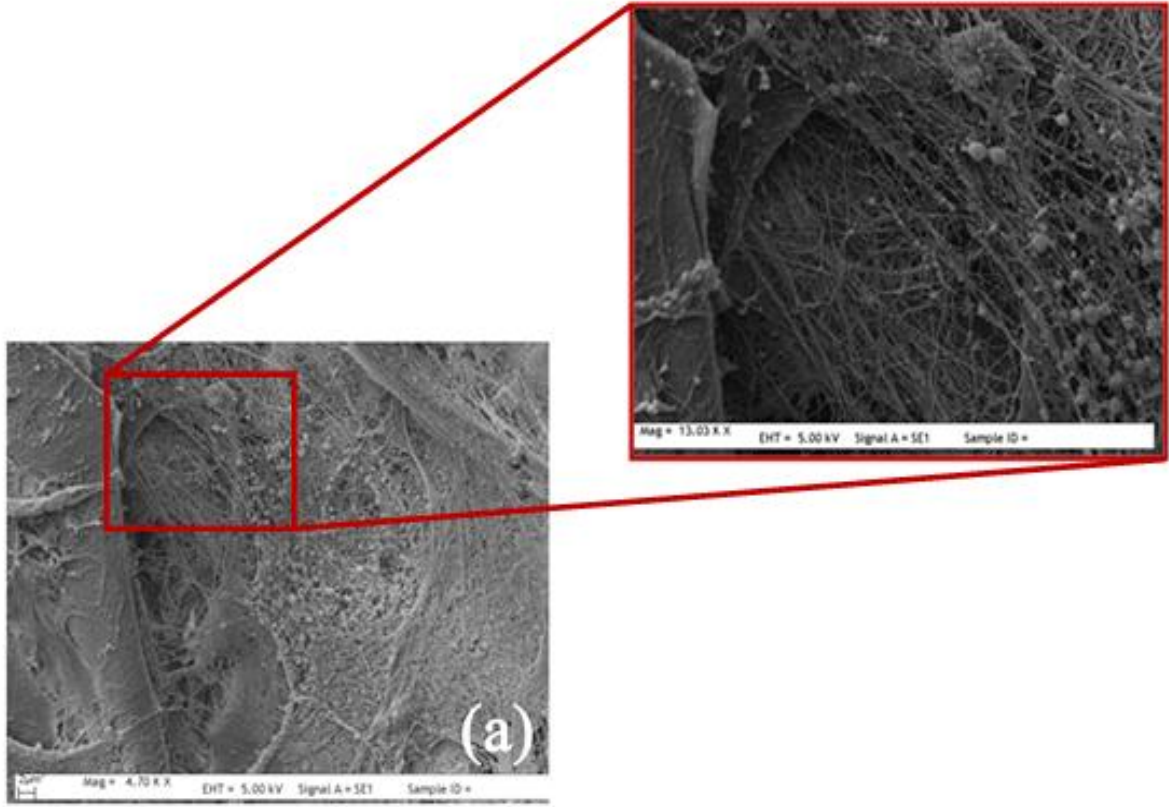
Fotoğraflarda, hücrelerin yüzeye tamamen yayıldıkları ve üç boyutlu şekilde çoğaldıkları görülmektedir. Hücreler doku iskelelerinin iç kısımlarına kadar girmiş ve hücresel fonksiyonlarına devam etmişlerdir. MTT sonuçları ile paralel bir şekilde kültürün 14. gününde hücre yoğunluğunun, 7. gününe oranla arttığı anlaşılmaktadır.

Şekil 4.12’de, 1 kez ışık uygulanan kitosan doku iskelesi grubunun 14. gününe ait SEM fotoğrafları verilmiştir.



Şekil 4.12. Bir kez ışık uygulaması yapılan kitosan doku iskelesi grubuna ait 14. gün SEM görüntüleri: (a, b) doku iskelelerinin yüzey SEM görüntüleri, (c, d) enine kesitinin SEM fotoğrafları. Büyütmeler: (a) 121 X, (b) 1.05 K X, (c) 102 X, (d) 652 X.

Fotobiyomodülasyonun etkisi sonucu hücrelerde gerçekleşen çoğalmadaki artışla birlikte, hücreler gözenekleri tamamen kaplamışlardır. Hücre artışının diğer günlere göre daha yoğun olduğu görülmekte ve MTT sonuçları da (Şekil 4.6) bu durumu desteklemektedir. Ayrıca kemik nodül oluşumları ve kollajen üretimindeki artış da açıkça görülmektedir. Şekil 4.13'de bu fotoğrafların yüksek büyütmedeki görüntülerinde, mineralizasyon ve kollajen fiberler daha net bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.13. Ondördüncü gün SEM fotoğrafları. (a) 1 kez ışık uygulanan kitosan doku iskelelerinin enine, (b) boyuna kesitine ait görüntüler. Büyütmeler: (a) 4.70 K X; 13.03 K X, (b) 989 X; 4.70 K X.

Diğer günlerin SEM görüntülerine göre, en fazla mineralizasyon ve kollajen üretimi 14. günde görülmektedir. Görüntülerden, kollajen fiberlerin 100 nm, mineralize yapıların ise 100-600 nm büyüklükte olduğu ölçülmüştür. Fratzl ve ark. [98] mineralize kollajen fiberlerin çaplarının yaklaşık 100 nm olduğunu ifade etmişlerdir. Wiesmann ve ark. [99] *in vitro* ortamda, osteoblast benzeri hücrelerin mineral oluşumunun elektrik uyarımından etkilenmesini incelemişlerdir. Bu çalışmada, hücre yüzeyinde bulunan nodül çaplarının 200 nm'den az ve mineral kürelerinin çapının ise 700 nm'den büyük olduğunu belirtmişlerdir [98-99]. Literatür bilgilerinde verilen kollajen ve mineralize yapıların çapları, SEM analizleri ile elde edilen sonuçları desteklemektedir.

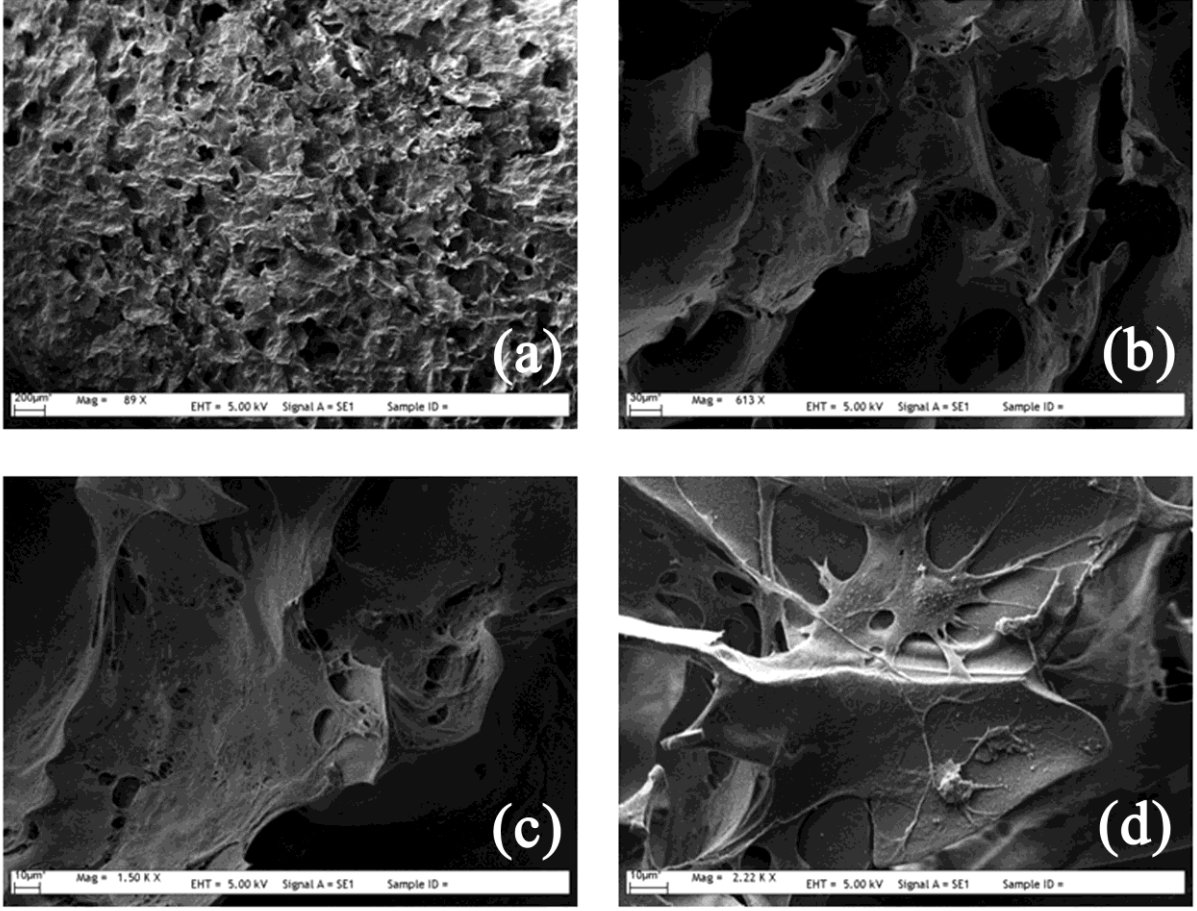
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman, fotobiyomodülasyonun hücreler üzerindeki pozitif etkisi sonucu meydana gelen oluşumlardaki farklılıklar bu fotoğraflar ile daha iyi anlaşılmaktadır.

Schwartz- Filho ve ark. [72] fotobiyomodülasyonun, mineralize nodül oluşumunu artırmasının yanında, mineralizasyon sürecini de hızlandırdığını belirtmişlerdir [72]. Bu çalışmaya benzer olarak, tez kapsamında yapılan çalışmada da, ışık uygulanan gruplarda mineralizasyon oluşumu görülmektedir. Işık uygulanmayan kontrol gruplarında kültürün 7. ve 14. gününde (Şekil 4.8 ve Şekil 4.11) mineralizasyon oluşumu görülmezken, ışık uygulanan gruplarda bu oluşum 7. günde görülmüştür. Sonuç olarak, ışık uygulaması yapılan gruplardaki mineralizasyon hızı ve nodül oluşumunun, ışık uygulanmayan gruplara göre daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Literatürde, ışık uygulaması sonucu kemik nodül oluşumlarının gerçekleştiği çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, Ueda ve ark. [100] lazer uyguladığı osteoblast benzeri hücrelerde, kemik nodül oluşumunun gerçekleştiğini ifade etmiştir [100]. Benzer şekilde, Ozawa ve ark. [101] 21 günlük hücre kültür süresi boyunca, ışık uygulaması ile kemik nodül oluşumunda artış olduğunu belirtmişlerdir [101].

Al-Ghamdi ve ark [4] fotobiyomodülasyonun farklılaşmayı artırdığını ifade etmiştir [4]. Tez çalışması kapsamında, PBM'nin bu etkisi SEM görüntüleri ile desteklenmiştir. PBM, preosteoblast hücrelerinin osteoblastlara farklılaşmasını artırmış ve sonuç olarak mineralizasyon oluşumları gerçekleşmiştir. Kontrol grubunda böyle bir durum söz konusu değilken, ışık uygulaması yapılan her iki grupta da mineralizasyon oluşumu görülmüştür.

Şekil 4.14'de 2 kez ışık uygulanan kitosan doku iskelesi grubuna ait 14. gün SEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.14. İki kez ışık uygulaması yapılan kitosan doku iskelesi grubuna ait 14. gün SEM görüntüleri: (a), (b), (c) ve (d) doku iskelelerinin yüzeyine ait SEM fotoğrafları. Büyütmeler: (a) 89 X, (b) 613 X, (c) 1.50 K X, (d) 2.22 K X.

Şekil 4.14'deki görüntüler, 1 kere ışık uygulanan doku iskelelerine ait 14. gün SEM fotoğrafları ile benzerlik göstermektedir. PBM'nin etkileri ile hücre çoğalması artmış ve buna bağlı olarak gözenekler kapanacak seviyeye ulaşmıştır. Ayrıca, kontrol grubundan farklı olarak kollajen üretimi ve nodül oluşumundaki artış ve hücrelerin uzantıları da dikkat çekmektedir.

Abramovitch-Gottlib ve ark. [71] mercan doku iskeleleri ile yaptıkları çalışmada, SEM analizi yaparak, ışınlama yapılan ve yapılmayan gruptaki hücrelerde doku oluşumunu incelemişlerdir. Her iki grupta da, osteoblastların çoğalmasının arttığını ve hücrelerin doku iskelelerinin gözeneklerini doldurduklarını belirtmişlerdir. SEM analizi sonuçlarına göre, doku oluşumunun ışık uygulaması yapılan grupta daha fazla

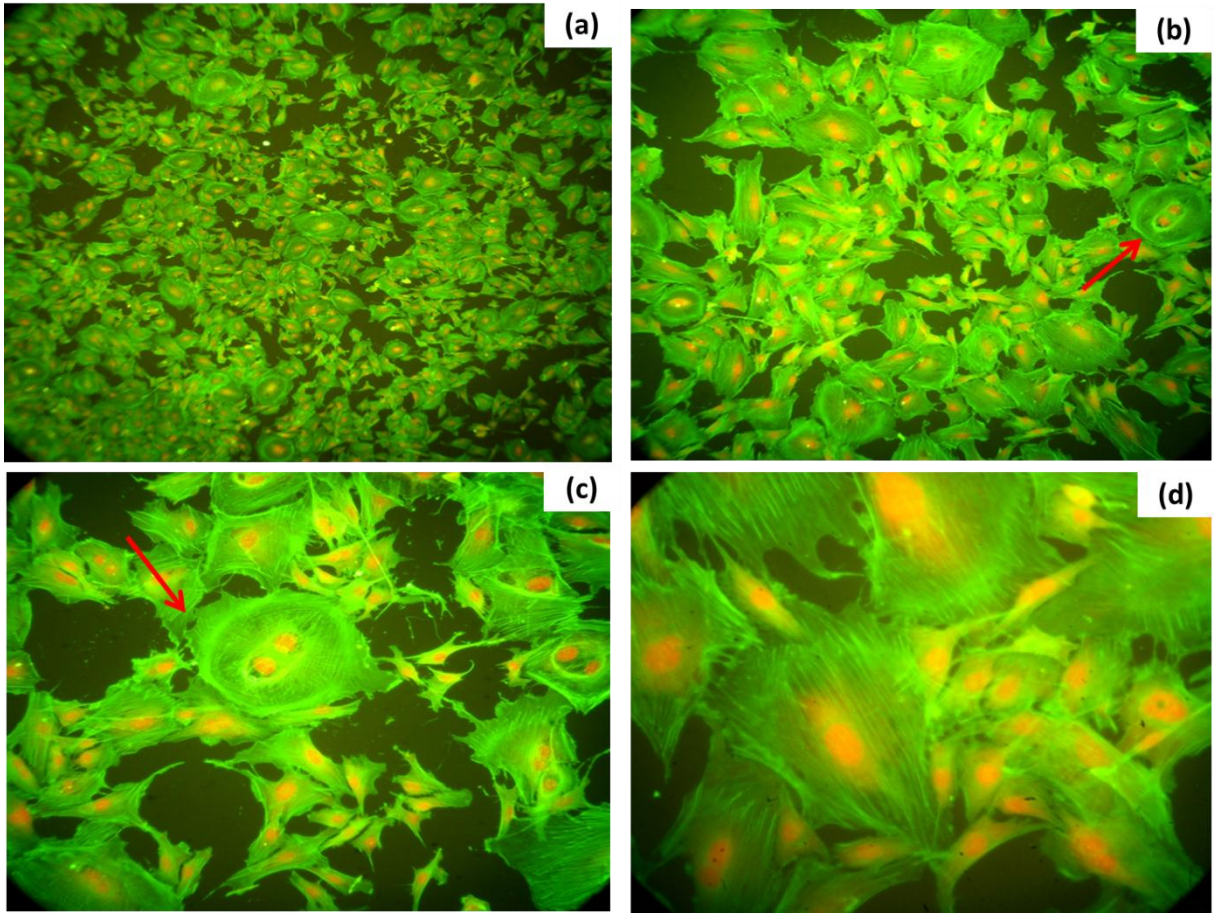
olduğu ifade edilmiştir [71]. Benzer sonuçlar, tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmada da görülmektedir.

SEM analizinin sonuçlarına göre, ışık uygulanan gruplarda fotobiyomodlasyonun etkisi ile gerçekleşen olaylar şöyle özetlenebilir:

- Hücre oalmasında artış ve buna bağlı olarak gözeneklerin kapanacak boyutlara ulaşması,
- Hücre göçündeki artış sonucu, hücrelerin doku iskelelerinin iç kısımlarına kadar ulaşması ve o bölgelerde hücresel olayların devamlılığı,
- Osteojenik farklılaşma sürecinin hızlanması ve
- Mineralize yapının oluşumu ile kollajen üretiminde ve kemik nodül oluşumlarında artışın gözlenmesi.

4.3.2.2. Floresan boyama

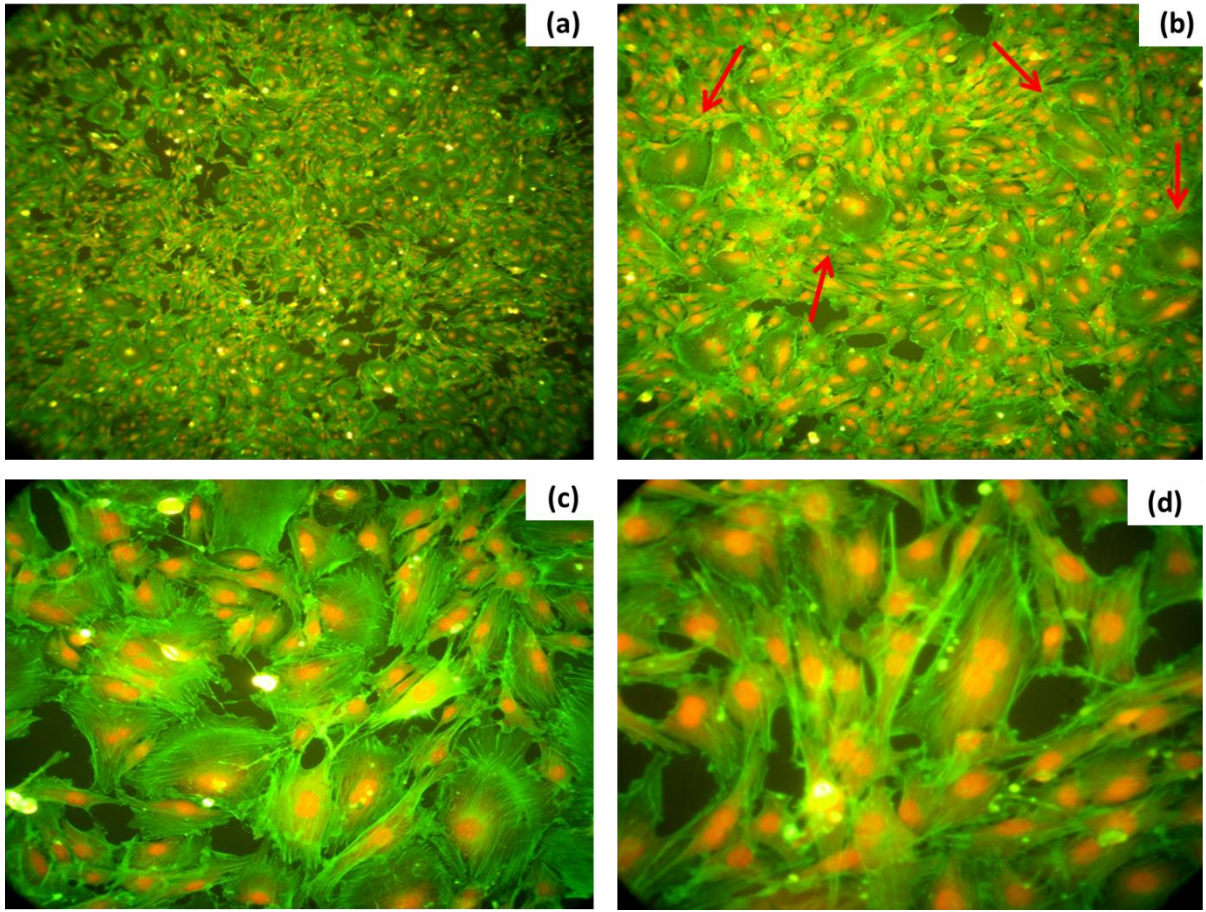
TCPS gruplarındaki hücrelerin morfolojilerini incelemek için kültürün 4. ve 7. günlerinde Alexa Flour 488 Phalloidin ve propidyum iyodür ile floresan boyama yapılmıştır. şekil 4.15'de TCPS (ışık uyg. yok) grubunun 4. gününe ait, farklı büyütmelerde çekilen floresan boyama görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.15. Işık uygulanmayan TCPS (kontrol) grubunun 4. gün floresan boyama görüntüleri. Büyütmeler: (a) 4 X, (b) 10 X, (c) 20 X, (d) 40 X. Fotoğraflardaki kırmızı bölgeler hücre çekirdeklerini, yeşiller aktin filamentlerini, oklar mitoz safhasında olan hücreleri göstermektedir.

Floresan boyama ile birlikte, farklı büyütmelerde hücre morfolojilerinin fibroblastik yapıda olduğu görülmektedir. Hücre morfolojisinin dışında, dikkat çeken bazı noktalar da bulunmaktadır. Örneğin, Şekil 4.15b-c'de ok ile gösterilen bölgelerde, hücrelerin mitoz safhasında oldukları, yani hücrelerin aktif olarak bölünmeye devam ettikleri ve Şekil 4.15d'deki görüntüde ise hücrelerin aktin filamentleri net bir şekilde görülmektedir. Aktin filamentlerin, hücre yüzey şeklinin oluşumunda görev alan hücre iskeleti yapıları olduğu bilinmektedir. Ayrıca, hücrelerin birbirleri ile iletişim halinde oldukları da şekillerden fark edilen diğer özellikler arasındadır.

Şekil 4.16'da 1 kez ışık uygulanan TCPS grubunun 4. gününe ait ve farklı büyütmelerde çekilen floresan boyama görüntüleri verilmiştir.

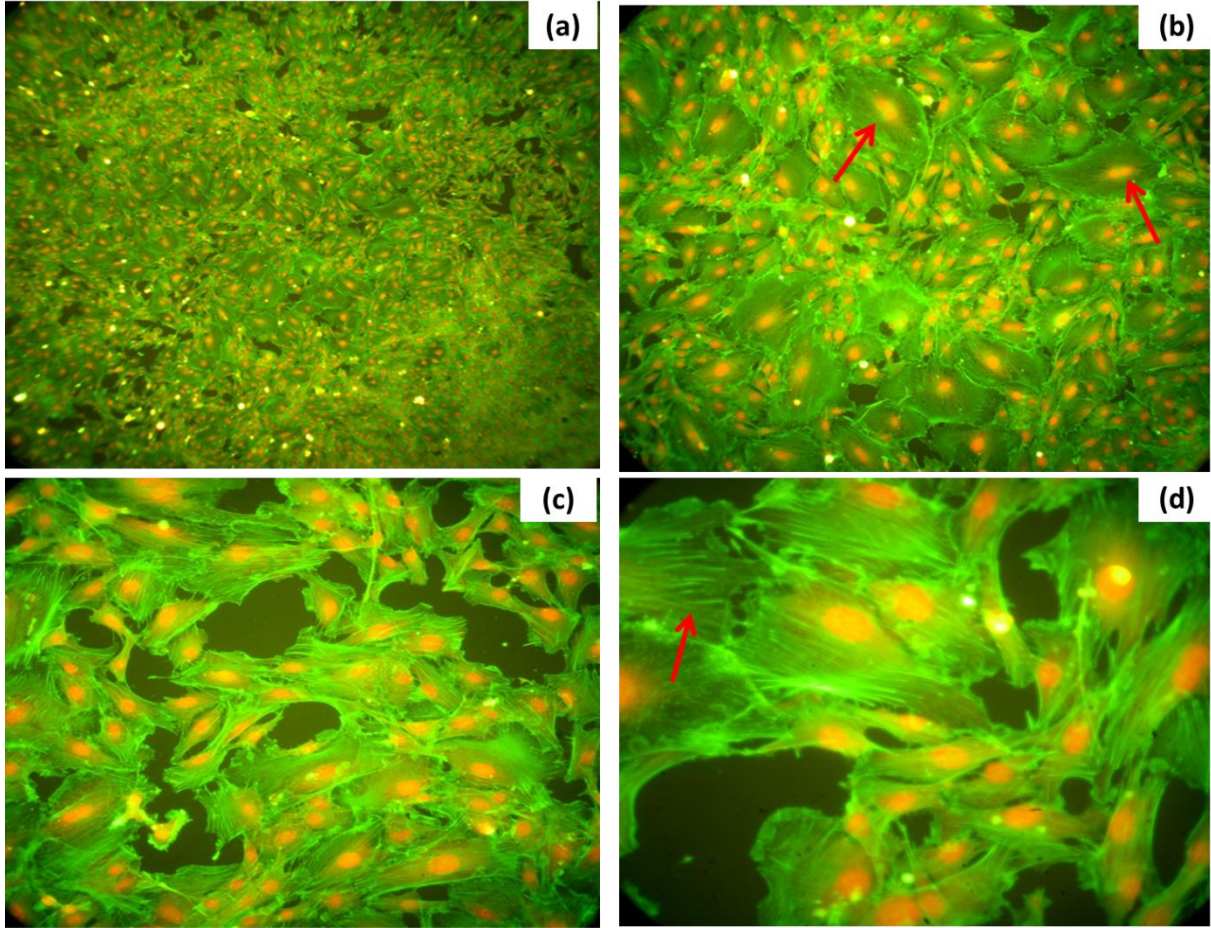


Şekil 4.16. Bir kez ışık uygulaması yapılan TCPS grubuna ait 4. gün floresan boyama görüntüleri. Büyütmeler: (a) 4 X, (b) 10 X, (c) 20 X, (d) 40 X. Oklar mitoz safhasında olan hücreleri göstermektedir.

Işık uygulaması sonucu hücrelerin morfolojilerinde değişim görülmekte ve bu değişim, hücre gövdelerinden çıkan uzantılar ile olmaktadır. Bu durum, kontrol grubunda görülmemekle birlikte 2 kere ışık uygulaması yapılan grupta da (Şekil 4.17) benzer şekilde görülmektedir. Ayrıca, ışık uygulaması yapılan bu gruptaki hücrelerin yoğunluğunun, ışık uygulanmayan gruptaki (Şekil 4.15) hücrelerin yoğunluğundan daha fazla olduğu açıkça görülmektedir. Fotobiyomodülasyonun önemli etkilerinden biri olan hücre çoğalmasındaki artış, bu görüntülerden anlaşılmaktadır. Ok ile gösterilen hücreler, ortamda bulunan diğer hücrelere göre daha büyük görünmektedir. Bu hücreler, mitoz aşamasında olan hücreler olup, bölünme için kendilerine yer açmaktadırlar. Şekil 4.16c-d'de görülen fotoğraflarda da, hücresel filamentler ile birlikte, hücrelerin birbirleri ile uzantılar oluşturarak bağlantı kurdukları dikkat çekmektedir. Işık uygulaması yapılan gruplarda hücreler yüzeye tutunurken,

gövdelerinden çıkan uzantılar SEM görüntülerinde (Şekil 4.7c-d-e-f, 4.9, 4.10b-c, 4.12b ve 4.14d) ve floresan boyama fotoğraflarında (Şekil 4.16c-d, 4.17c-d) dikkat çekmektedir. Fakat bu durum kontrol gruplarında (Şekil 4.7a-b, 4.8, 4.11, 4.15) gözlenmemektedir.

Şekil 4.17’de 2 kez ışık uygulanan TCPS grubuna ait 4. gün floresan boyama görüntüleri verilmiştir.

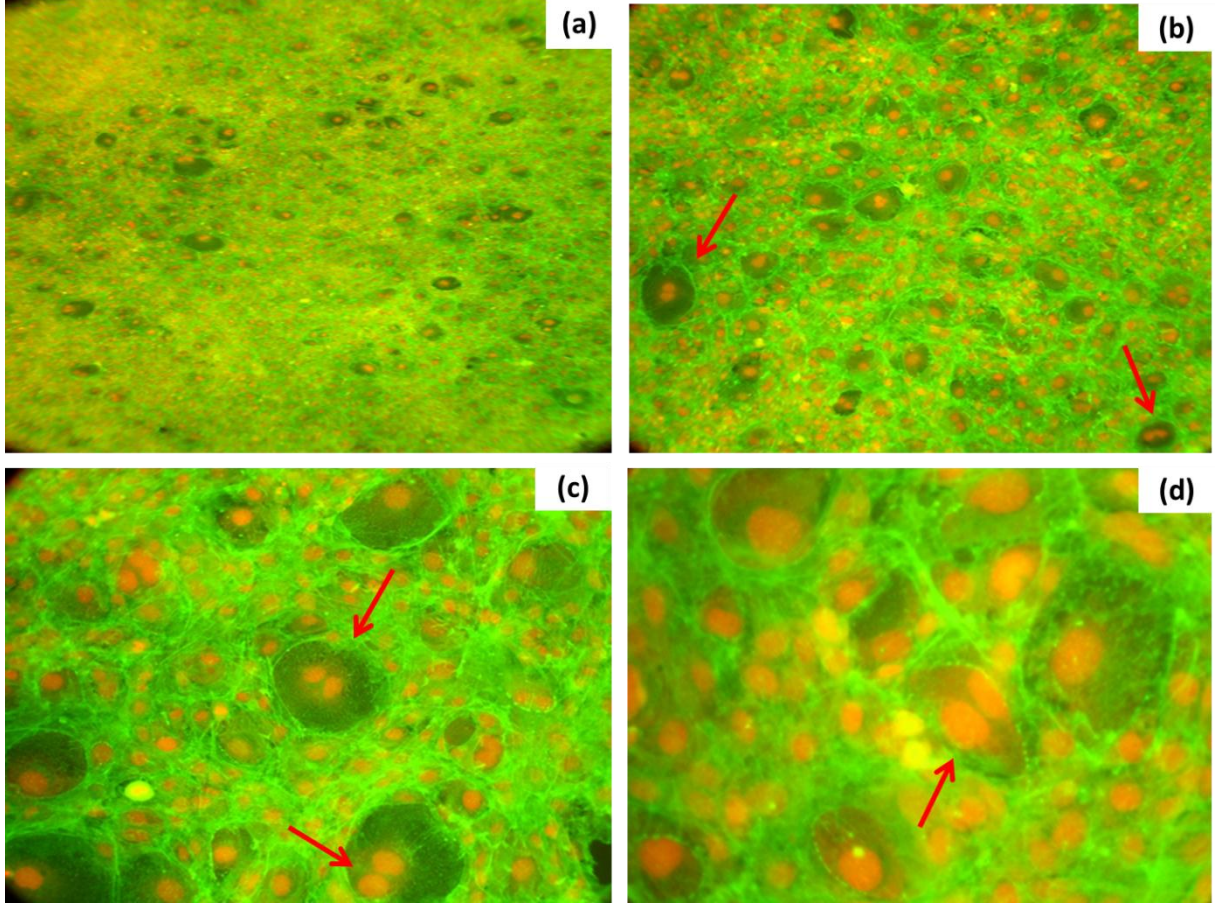


Şekil 4.17. İki kez ışık uygulaması yapılan TCPS grubuna ait 4. gün floresan boyama görüntüleri. Büyütmeler: (a) 4 X, (b) 10 X, (c) 20 X, (d) 40 X. b’de yer alan oklar mitoz safhasında olan hücreleri, d’de bulunan ok filamentleri göstermektedir.

Bu gruptaki hücrelerin morfolojileri ve yoğunlukları, 1 kez ışık uygulaması yapılan TCPS hücre grupları ile benzerlik göstermektedir. Işık uygulanan her iki grupta da PBM’nin etkisi ile hücre çoğalmasında artış görülmüştür. Hücreler metabolik olarak aktif durumdadır. Bir kez ışık uygulanan grupta bulunan hücrelerin çoğunda olduğu gibi, Şekil 4.17b’de okla gösterilen bölgelerde de hücrelerin çekirdek bölünmeleri

geçekleşmiştir. Şekil 4.17d'de ki görüntüde de hücrelerin filamenteleri ok ile gösterilmiştir.

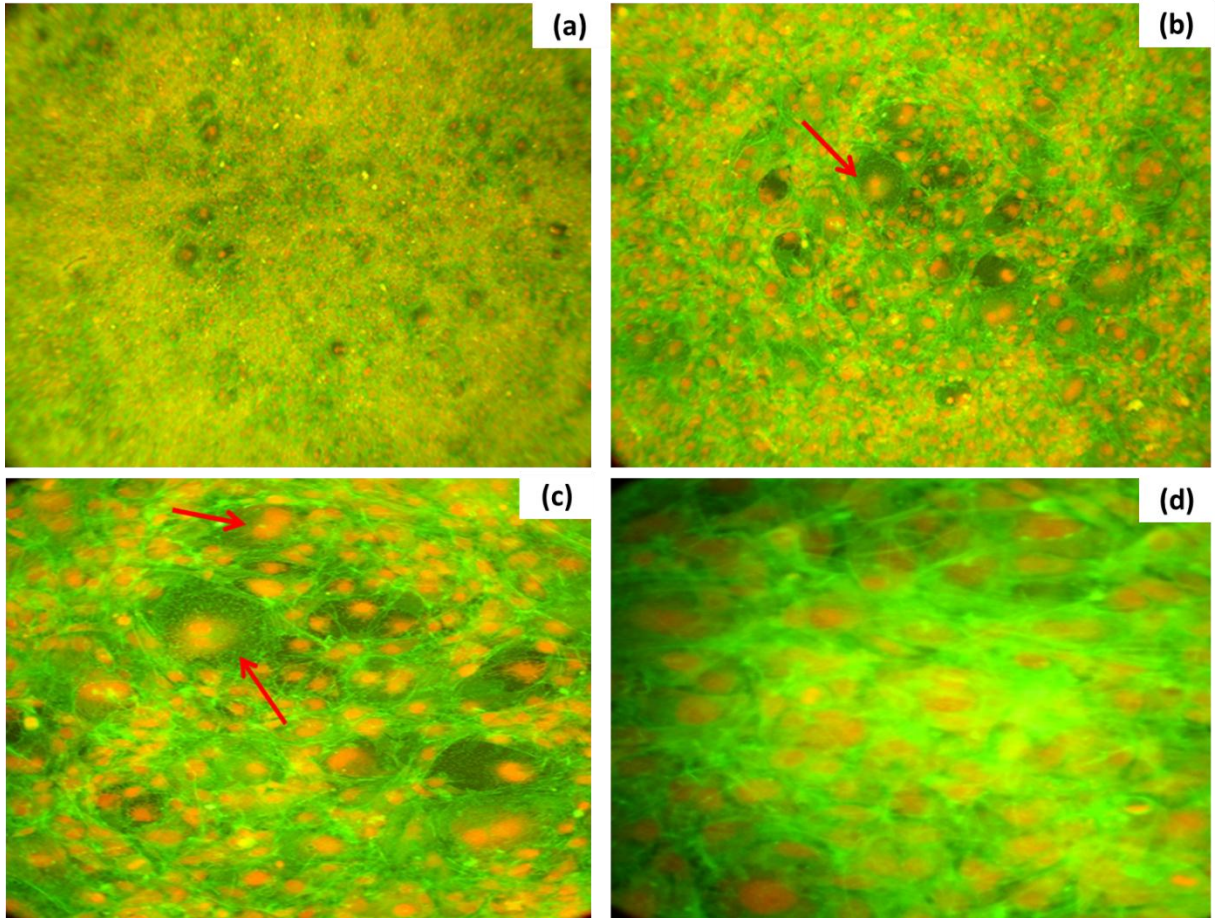
Şekil 4.18'de kontrol grubunun yani ışık uygulanmayan TCPS grubunun 7. gün floresan boyama görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.18. Işık uygulaması yapılmayan TCPS grubunun 7. gün floresan boyama görüntüleri. Büyütmeler: (a) 4 X, (b) 10 X, (c) 20 X, (d) 40 X. Oklar mitoz safhasında olan hücreleri göstermektedir.

Bu görüntülerde, hücrelerin sayıları artıp yoğun olarak bir arada bulundukları için hücrelerin morfolojileri tam olarak görülmemektedir. 4. gün kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Şekil 4.15b-c), bu görüntüde hücre yoğunluğunun arttığı görülmektedir. Hücrelerin canlılıkları devam etmekle birlikte mitoz bölünmenin de gerçekleştiği oklar ile gösterilmiştir (4.18b-c-d).

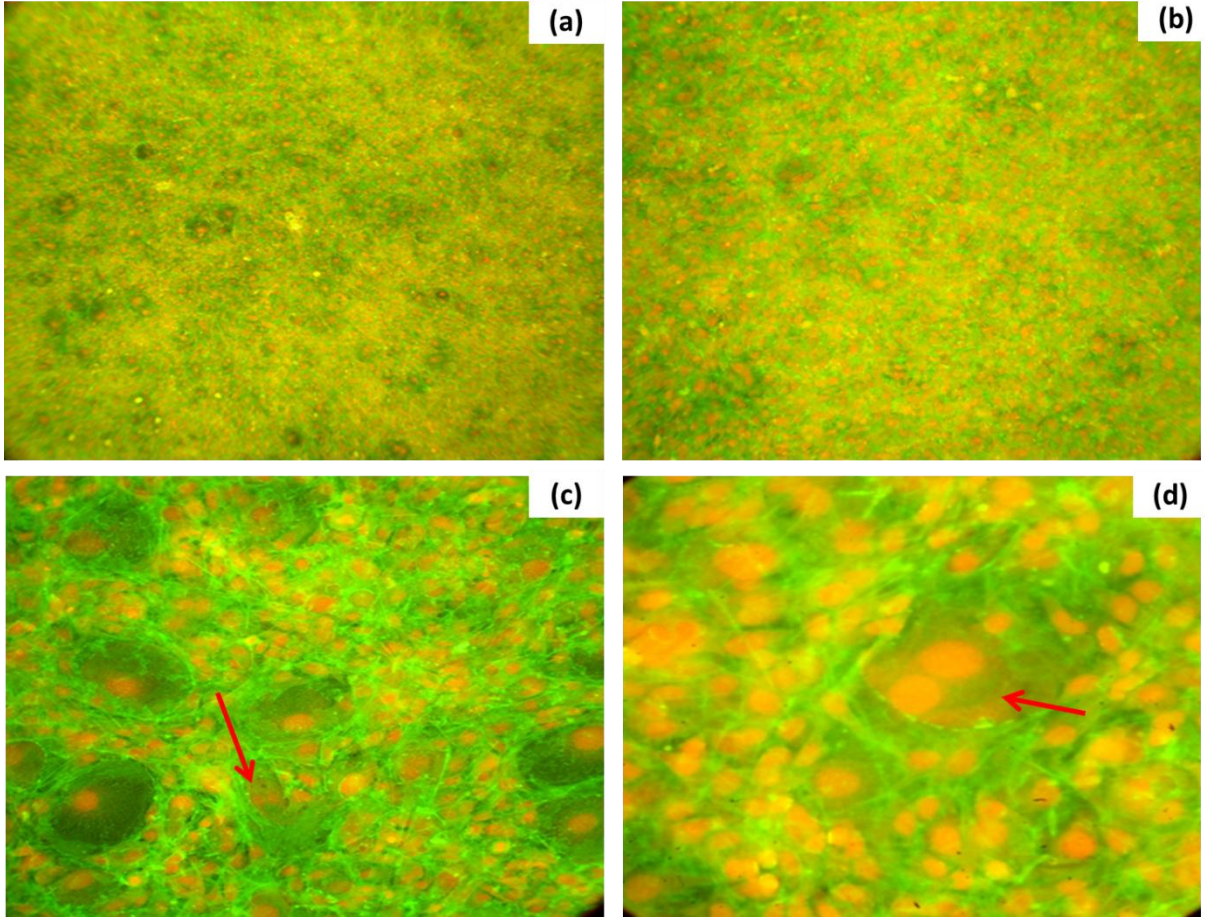
Şekil 4.19'da 1 kez ışık uygulanan TCPS grubunun 7. gün floresan boyama görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.19. Bir kez ışık uygulaması yapılan TCPS grubuna ait 7. gün floresan boyama görüntüleri. Büyütmeler: (a) 4 X, (b) 10 X, (c) 20 X, (d) 40 X. Oklar mitoz safhasında olan hücreleri göstermektedir.

Bu fotoğrafta da, hücre yoğunluğundan dolayı hücrelerin morfolojileri tam olarak seçilememektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Şekil 4.18), ışık uygulanan bu gruptaki hücre yoğunluğunun daha fazla olduğu görülmektedir. Ok ile gösterilen şekillerde, hücrelerin mitoz aşamasında olduklarından dolayı, diğer hücrelere nazaran daha geniş alanda bulundukları da fark edilen diğer bir durumdur.

Şekil 4.20’de 2 kez ışık uygulanan TCPS grubunun 7. gün floresan boyama görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.20. İki kez ışık uygulaması yapılan TCPS grubuna ait 7. gün floresan boyama görüntüleri. Büyütmeler: (a) 4 X, (b) 10 X, (c) 20 X, (d) 40 X. Oklar mitoz safhasında olan hücreleri göstermektedir.

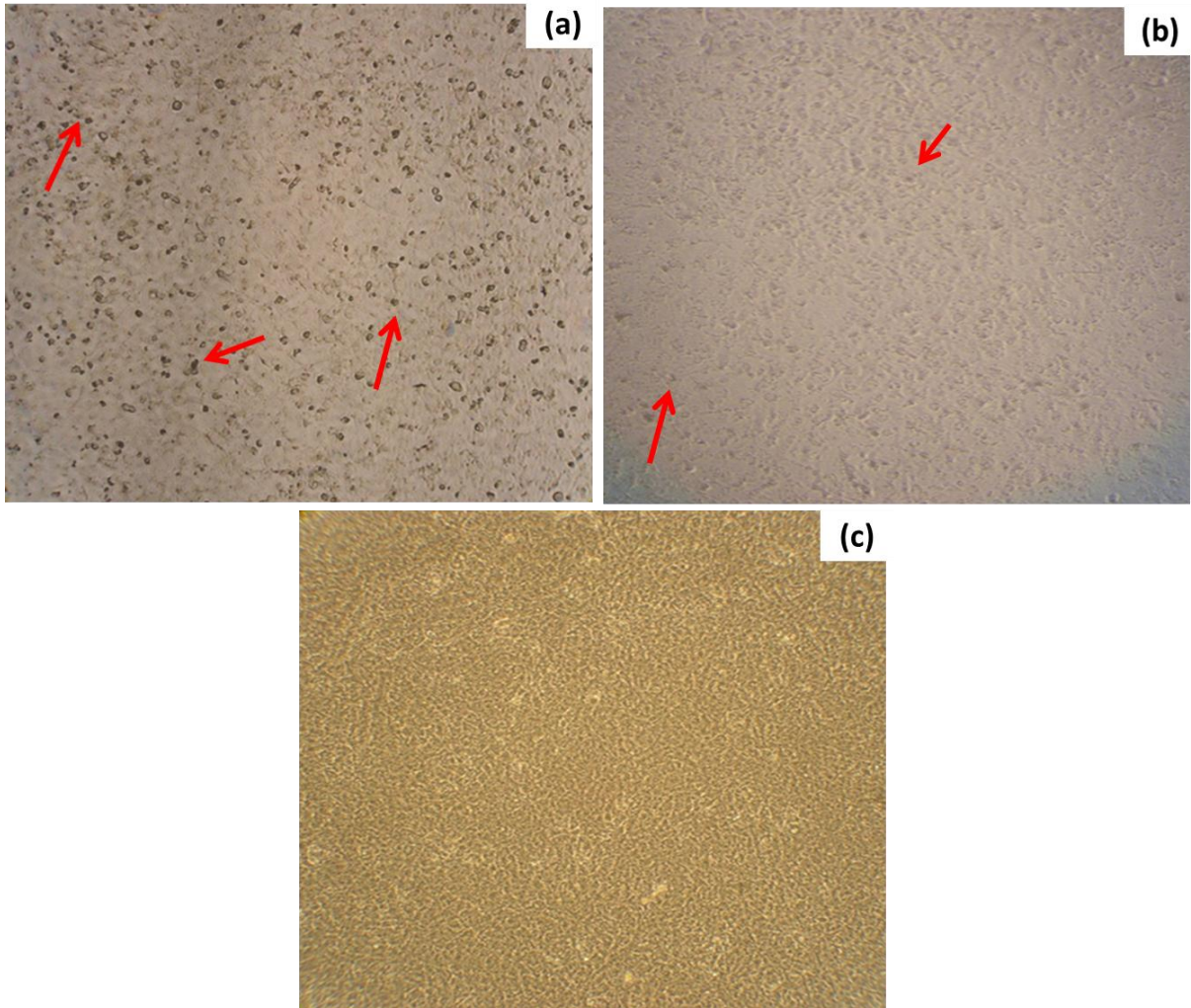
Bu grubun görüntüsü Şekil 4.19 ile benzerlik göstermektedir. Hücre morfolojileri tam olarak belli olmamakla birlikte, PBM'ye bağlı olarak hücre yoğunluğu, kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Kültürün 7. gününde de hücrelerin çoğalmaya devam ettikleri ve buna bağlı olarak gerçekleşmiş olan çekirdek bölünmeleri de oklar ile gösterilmektedir.

Sonuç olarak, TCPS gruplarının floresan boyama görüntülerinden şu sonuçlar elde edilmiştir:

- Işık uygulanmayan gruptaki hücreler fibroblastik morfolojiye sahiplerken, ışık uygulanan gruplarda, hücrelerin morfolojileri değişkenlik göstermektedir. Bu gruplarda bulunan hücrelerin gövdelerinden çıkan uzantılar dikkat çekmektedir.

- Işıık uygulanan her iki gruptaki hücre yoğunluğu, ışık uygulanmayan gruplara göre daha fazladır.
- Her 3 grupta da, hücre bağlantıları, hücresel bölünme ve hücrelerin filamantleri görölmektedir.

TCPS'de bulunan hücre gruplarının, morfolojik farklarını gözlemlene açısından 21. gün MTT'si alınmadan önce optik mikroskop altında fotoğrafları çekilmiştir. Şekil 4.21'de TCPS gruplarının 21. gün ışık mikroskobu görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.21. TCPS hücre gruplarının 21. gün ışık mikroskobu görüntüleri: (a) TCPS (ışık uygulaması yok), (b) TCPS (1 kere ışık uyg.) ve (c) TCPS (2 kere ışık uyg.). Büyütmeler: (a) 10 X, (b) 10 X, (c) 10 X. Oklar ölen hücreleri göstermektedir.

Kültürün 21. gününde, TCPS kontrol grubunda hücrelerin ölüm fazına geçtikleri görölmektedir. Şekil 4.21a'da gösterilen oklar ölen hücreleri göstermektedir. Hücrelerin ilerleyen kültür günlerinde, yüzeye yapışmaları ve canlılıklarını devam

ettirmeleri için yeterli alanın kalmaması ile birlikte, hücreleri uyarıcı herhangi bir etkinin bulunmaması hücrelerin ölümünü etkilemiştir. Bir kere ışık uygulanan grupta (Şekil 4.21b) hücre ölümü kontrol grubuna göre çok daha azdır. İki kere ışık uygulanan grupta ise hücre ölümü hemen hemen hiç görülmemektedir. Şekil 4.5’de verilen MTT grafiği de bu sonuçları desteklemektedir. Fotobiyomodülasyonun, 2 kere ışık uygulanan TCPS grubundaki hücreler üzerindeki etkisinin daha fazla olduğu görülmektedir. PBM’nin hücre çoğalmasını artırmasının yanı sıra apoptozu önlediği bilinmektedir. Leonida ve ark. [5] fotobiyomodülasyonun apoptozu inhibe ettiğini ifade etmişlerdir. Benzer durum, tez çalışması kapsamında verilen ışık mikroskobu görüntülerinde de mevcuttur.

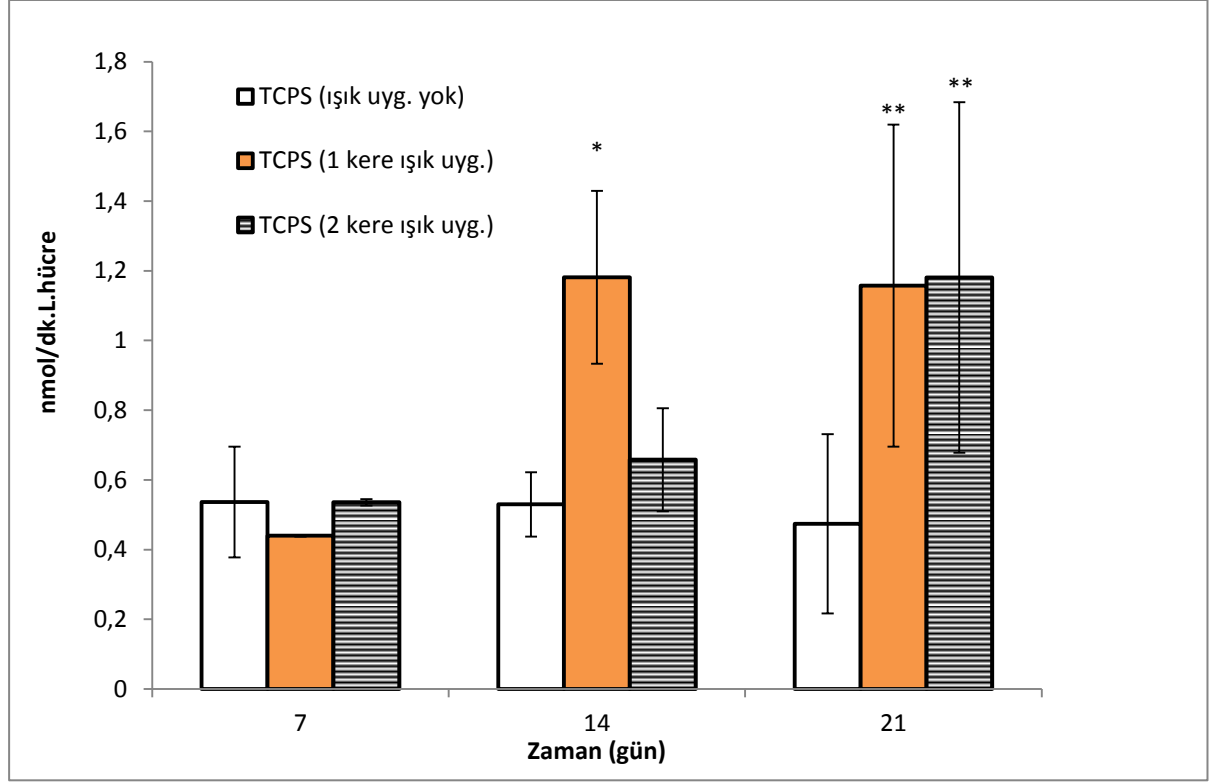
4.3.3. Hücrelerin osteojenik farklılaşmasının belirlenmesi

4.3.3.1. ALP analizi

Osteojenik aktivitenin en önemli fenotipik göstergelerinden birisi de hücre içindeki yüksek alkalın fosfataz aktivitesidir [102]. ALP erken osteoblastik farklılaşma aşamasının değerlendirilmesinde kullanılırken, in vitro mineralizasyon ve osteoklasın üretimi ise geç osteoblastik farklılaşmanın belirlenmesinde kullanılmaktadır. Yüksek pH’da monofosfat esterlerini hidroliz eden bir ektoenzim olan ALP, osteoblastların mineralize kemik matrise gömülerek osteosit haline gelmesiyle kaybolmaktadır [82]. ALP, osteoblast farklılaşmasının erken dönemi için bir belirteç olmasına rağmen, hem ekspresyonu hem aktivasyonu mineralizasyonun başlaması ile azalmış olur ki bu da osteoblast farklılaşmasının geç evresine rastlamaktadır [103].

Kim ve ark. [9] mezenkimal kök hücrelere LED ışığı uygulandıktan sonra osteojenik hücrelerin ALP aktivitesinin arttığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada, 10, 30 ve 90 saniye ışık uygulanan hücre gruplarının ALP aktiviteleri, ışık uygulanmayan kontrol grubuna göre sırası ile %109, %139 ve %99 oranında artış göstermiştir [9]. Ueda ve ark. [100] yaptıkları çalışmada, LLLT’nin, osteoblast benzeri hücrelerde; ALP aktivitesini ve ALP gen ekspresyonunu uyardığını ifade etmişlerdir. Abramovitch-Gottlib ve ark. [71] 28 günlük hücre kültür çalışmalarında birçok analiz ile birlikte ALP analizi de yapmışlardır. Bu analizde, kültürün 2. gününde ALP aktivitesi maksimum seviyeye ulaşmışken, sonraki günlerde ALP aktivitesinde azalma görülmüştür. Yirmisekiz gün boyunca, ışınlama yapılan ve yapılmayan gruplar arasında, ALP analizinde azalmalar ve yükselmeler olmuştur. LLLT’nin, kültürün erken dönemlerinde (2. gün) ALP

aktivitesini önemli derecede artırdığı ve kültürün sonraki dönemlerinde (21., 28. günlerde) ise ALP aktivitesini yine önemli oranda azalttığı görülmüştür. Bu sonuçlarla beraber, erken dönem lazer ışınlamasının, MSC'lerin osteoblastik fenotipe dönüşümlerini attırdığı yorumu yapılmıştır [71].



Şekil 4.22. TCPS (ışık uygulaması yok), TCPS (1 kere ışık uygulaması) ve TCPS (2 kere ışık uygulaması) gruplarında bulunan MC3T3 hücrelerine ait ALP aktivitesi analiz sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu TCPS (ışık uyg. yok) iken, * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001).

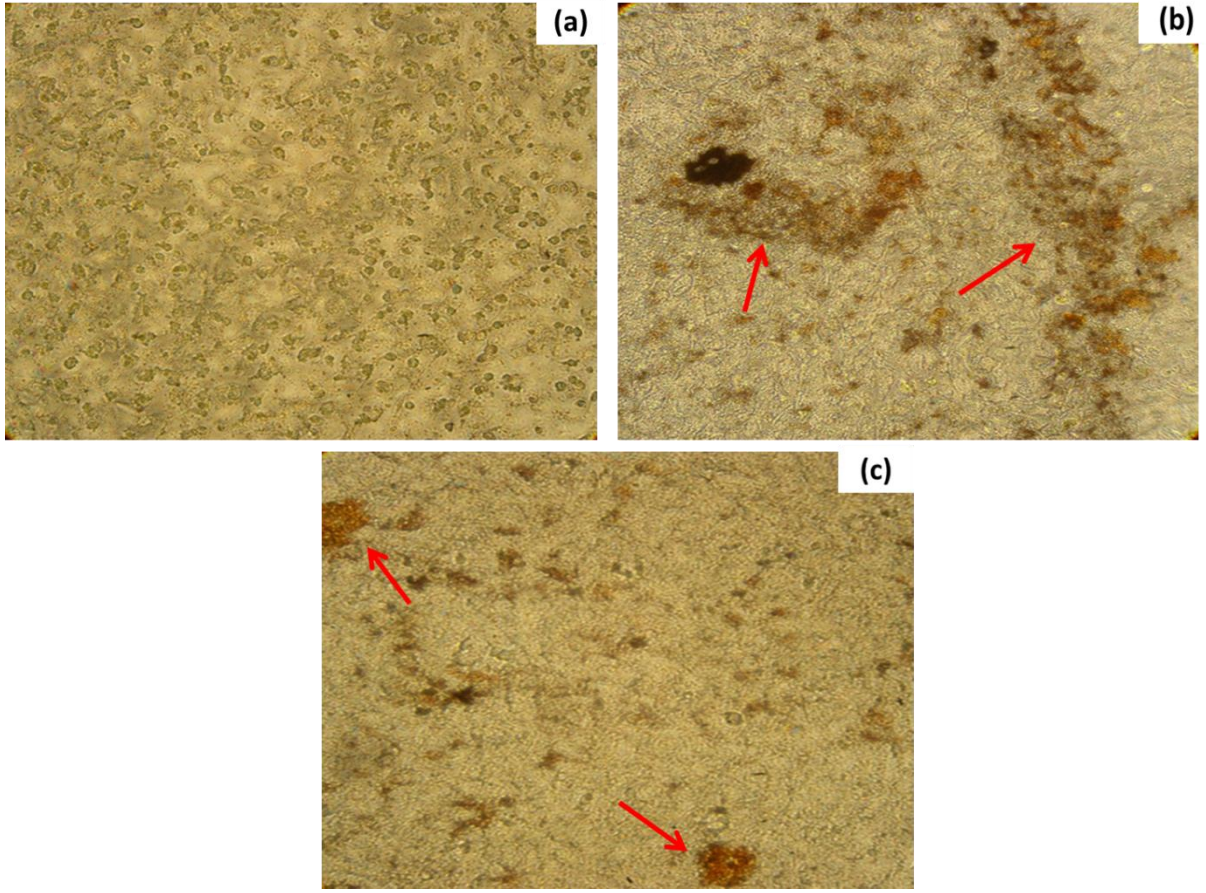
Tez kapsamında hücrelerin erken dönem osteoblastik farklılaşmalarını belirlemek için yapılan ALP analizi sonuçları hücre başına ALP aktivitesi değerine karşılık zaman grafiği olarak Şekil 4.22'de verilmiştir. Yapılan analizde 7. günde hücrelerin ALP aktivitesi açısından 3 grup arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kültürün 14. gününde ALP aktivitesi tüm TCPS grubundaki hücrelerde en yüksek değere ulaşmış, en fazla aktivite TCPS (1 kere ışık uyg.) grubunda gözlenmiştir. Kültürün son gününde, 2 kere ışık uygulaması yapılan TCPS grubunun ALP aktivitesinde artış gözlenmiş, 1 kere ışık uygulanan TCPS grubunun ALP aktivitesi ise hemen hemen aynı kalmıştır. Işık uygulanan her iki TCPS grubunun ALP aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p<0.01).

Manjubala ve ark. [104] kitosan/hidroksiapatitden oluşmuş doku iskeleleri üzerinde bulunan MC3T3 hücrelerinin ALP aktivitelerini farklı zamanlarda değerlendirmiştir. Dört haftalık hücre kültürü süresince ALP aktivitesinde sabit bir artış gözlenmiştir. Sonuç olarak, kompozit doku iskelelerinin, geç dönemde ECM oluşumunu artırdıklarını ifade etmişlerdir. Seol ve ark. [87] kitosan doku iskelelerinde bulunan osteoblast hücrelerinin ALP aktivitelerini 60. güne kadar değerlendirmişler ve ALP aktivitesinin 20. günden sonra istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde son güne kadar arttığını belirtmişlerdir. Jiang ve ark. [105] yaptıkları çalışmada, kitosan/PLGA'dan oluşmuş doku iskeleleri üzerinde bulunan MC3T3-E1 hücrelerin ALP aktiviteleri, 21. gün boyunca sürekli olarak artış göstermiştir [87-104-105]. Tez kapsamında yapılan ALP aktivitesi analiz sonuçlarının literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak, plazma ark ışık kaynağının MC3T3-E1 hücrelerinin osteoblastik farklılaşmasını desteklediği, TCPS (1 kere ışık uyg.) grubunun ALP değerinin 14. günde en yüksek değerde olduğu ve TCPS (2 kere ışık uyg.) grubunun ALP değerinin 21 günlük kültür süresince arttığı belirlenmiştir.

4.3.3.2 Von Kossa boyama

Hücrelerin osteoblastik farklılaşmasını ve kitosan doku iskelelerinin osteoindüktif potansiyelini belirlemek için uygulanan analizlerden biri de matris mineralizasyonunun görüntülenmesidir. Bu amaçla kullanılan boyalar, kalsiyum mineral kristallerine bağlanarak, matris dışında hücreler tarafından oluşturulan kalsiyum fosfat yapılarının varlığını gösterir. Von Kossa boyama, osteoblastların geç farklılaşma döneminde belirteç olarak kullanılır. Boyama sonrasında farklılaşan hücreler kahverengi ya da siyah renkte görülürler [15]. Tez çalışmasında, kültürün 21. gününde hem TCPS hem de doku iskeleleri ile oluşturulan gruplar için Von Kossa boyama yapılmıştır. TCPS hücre gruplarında, fotobiyomodülasyonun etkisi ile hücre içerisindeki kalsiyum fosfat depoları görüntülenmiştir. Şekil 4.23'de TCPS hücre gruplarının Von Kossa ile boyanmış görüntüleri verilmiştir.

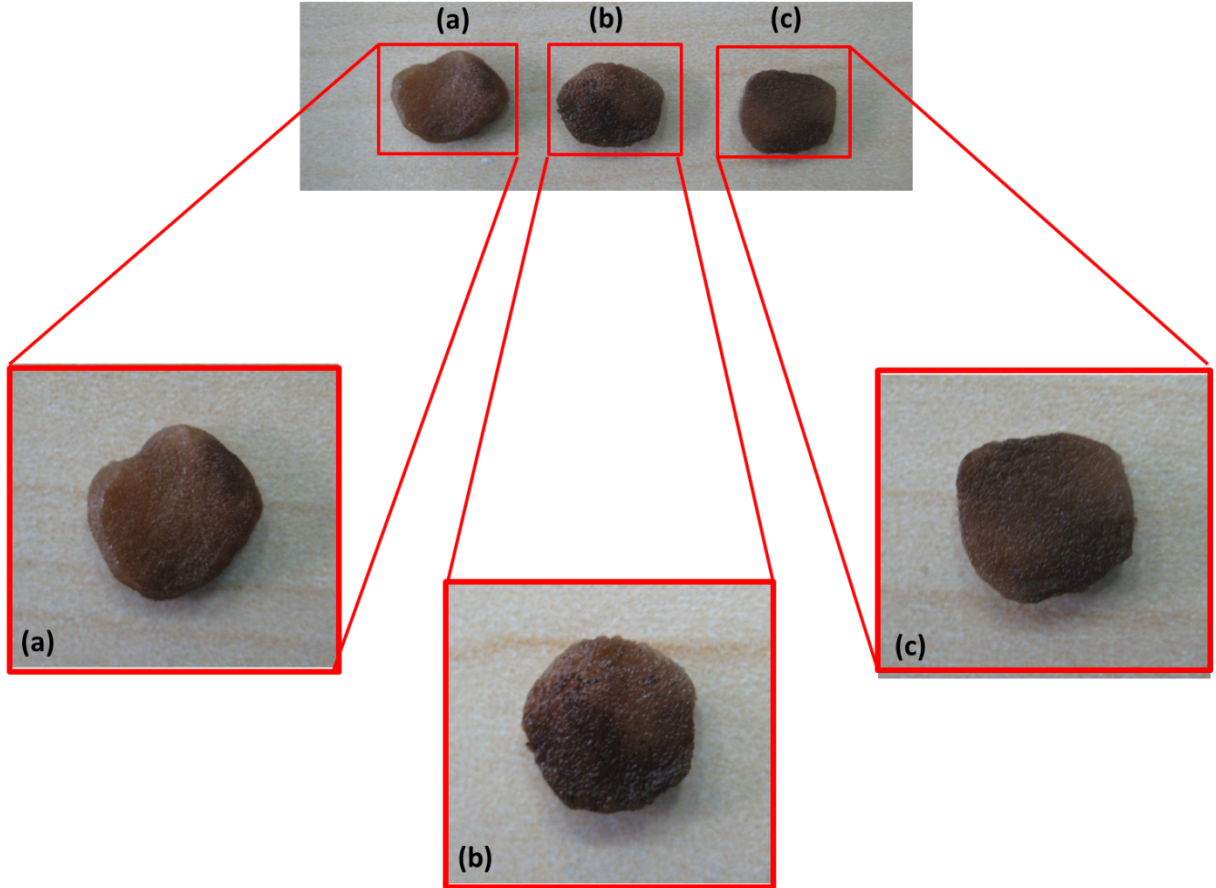


Şekil 4.23. Kültürün 21. gününde Von Kossa ile boyanan TCPS grupları: (a) TCPS (ışık uygulaması yok), (b) TCPS (1 kere ışık uygulaması), (c) TCPS (2 kere ışık uygulaması) grubu. Büyütmeler: (a) 20 X, (b) 20 X, (c) 20 X.

Işık uygulaması yapılmayan TCPS grubunda matris mineralizasyon oluşumu görülmemektedir. Işık uygulaması yapılan gruplarda ise mineralizasyon oluşumları koyu renkli olan bölgelerde görülmektedir. Özellikle, Şekil 4.23b-c'de okla gösterilen alanlarda yoğun mineralizasyon oluşumu görülmektedir. Literatürde, mineralizasyon oluşumunun incelendiği *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Khadra ve arkadaşlarının yaptığı hayvan deneyi çalışmasında, PBM'nin kemik iyileşmesi ve mineralizasyonunu artırdığı ifade edilmiştir [77]. Fujimoto ve ark. [80] MC3T3-E1 hücrelerinde, *in vitro* şartlarda BMP ifadesinin artması ile fotobiyomodülasyonun mineralizasyonu uyardığını ifade etmişlerdir [80]. Abramovitch-Gottlib ve ark. [71] ise mercan doku iskeleleri üzerinde bulunan mezenkimal kök hücrelere lazer uygulanması sonucu, ECM mineralizasyon oluşumunun gerçekleştiğini belirtmişlerdir [71]. Tez çalışması kapsamında yapılan Von Kossa boyama sonuçları ile gözlenen

mineralizasyon oluşumu, literatür çalışmaları ile benzerlik göstermektedir. Sonuç olarak ışık uygulaması yapılan TCPS hücre gruplarında, PBM'nin etkisi ile mineralizasyon oluşumları her iki grupta da benzer şekilde gözlenmektedir.

Şekil 4.24'de ise kitosan doku iskeleleri ile oluşturulmuş gruplara ait Von Kossa boyama görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.24. Kitosan doku iskelesi gruplarının 21. gün Von Kossa boyama görüntüleri: (a) (ışık uygulaması yok), (b) (1 kere ışık uygulaması), (c) (2 kere ışık uygulaması).

Şekil 4.24 incelendiğinde, doku iskelesi ile oluşturulmuş kontrol grubunda boyanmanın az, ışık uygulanan gruplarda ise daha fazla olduğu görülmektedir. Işık uygulaması yapılan her iki örnekte de boyanmanın yoğun, benzer ve yer yer olduğu görülmüştür. Boyanmada, ışık etkisi sonucu hücrelerin farklılaşmasıyla oluşturdukları mineralize matrisin etkisi bulunmaktadır. Farklılaşma için yapılan diğer analizler ile birlikte değerlendirildiğinde, hücrelerin farklılaşmasından kaynaklanan boyanmanın da diğer sonuçları destekler nitelikte olduğu söylenebilir.

4.3.3.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizleri

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, DNA'nın çoğalması ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Çift zincirli DNA'ya bağlandıkları zaman floresan veren Cyber green gibi boyalar kullanılarak amplifikasyona bağlı DNA artışı floresan miktarı ile ölçülmektedir. RNA molekülü ile gerçekleştirilen PCR çalışmalarında, öncelikle komplementer DNA (cDNA) sentezine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için ters transkriptaz (Revers Transcriptase) enzimi ile mRNA'nın kalıbı oluşturulmakta ve elde edilen cDNA doğrudan PCR işleminde kullanılmaktadır.

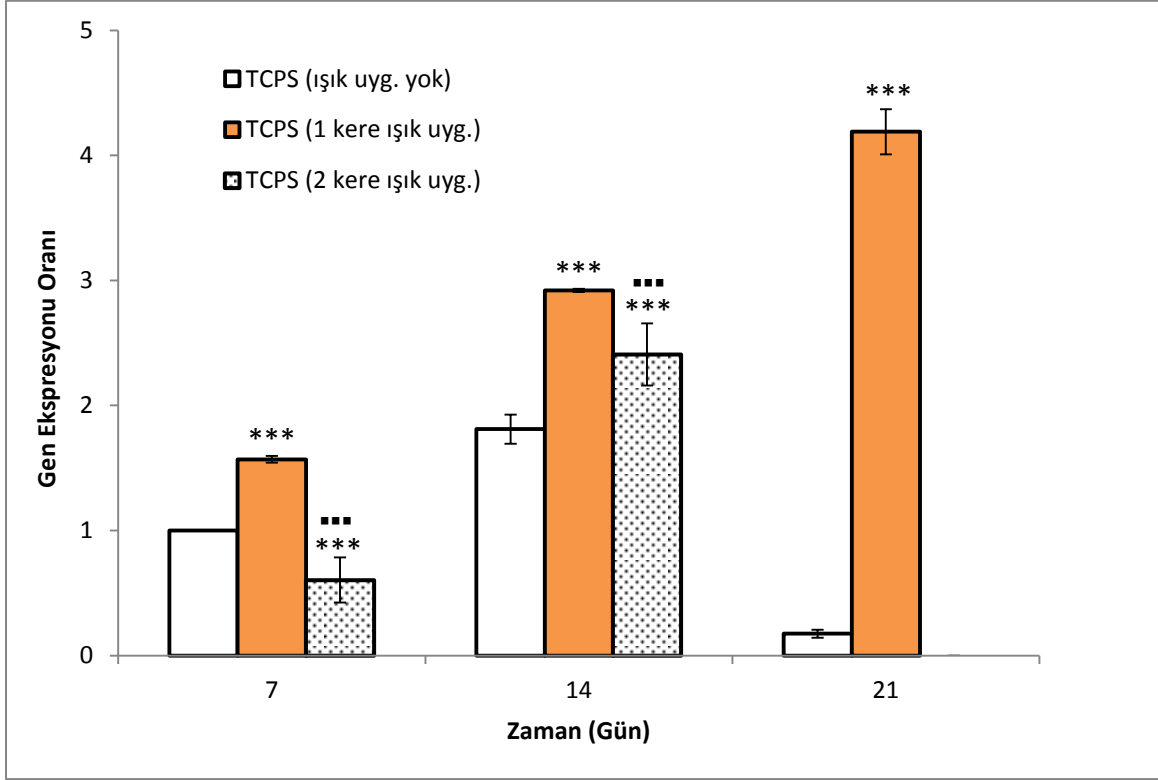
PCR'ın gerçekleşmesi için; çoğaltılacak olan kalıp DNA, çoğaltılacak bölgeye uygun şekilde tasarlanmış primer dizisi, deoksinükleotid trifosfatlar (dNTPs), yüksek sıcaklığa dayanıklı AVM polimeraz enzimi, polimerazın çalışması için uygun pH ve iyon derişimini sağlayacak olan tampon çözeltisi gerekmektedir.

PCR işlemi 3 temel basamakta gerçekleşir. İlk basamak, çoğaltılacak DNA'nın denatüre edilerek tek zincirli hale getirilmesi işlemi olarak tanımlanan denatürasyon basamağıdır. Bu aşamada, çift zincirli DNA'nın tek zincirli hale gelmesi 94-98°C sıcaklık aralığında yaklaşık 5 dk'da gerçekleşmektedir. Sonuç olarak DNA'nın iki ipliği birbirinden ayrılmakta ve kalıp olarak kullanılacak hale gelmektedir. Bir sonraki aşamada oligonükleotid primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlanırlar. Daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşen bu aşama genellikle 47-60°C aralığında yürütülür. Son aşama olan yeni DNA sentezinde, sıcaklık 72°C'ye kadar artırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır.

Yeni kemik oluşumu boyunca ilk olarak hücre çoğalması gerçekleşmekte ve osteoblastlar tip I kollajen salgılamaktadır. Ardından, tip I kollajen üretimi artmakta ve mineralizasyon için matris hazırlamakla görevli olan ALP gibi belirli proteinlerin ekspresyonu gerçekleşmektedir. Son olarak, hücreler OCN gibi geç osteoblastik farklılaşmanın belirteci olan proteinlerin ekspresyonu ile oluşan mineralize kemik dokuyu ve kalsiyumu üretmektedirler [2]. Yani, osteoblastik farklılaşma sırasında hücreler ALP, tip I kollajen, kemik siyaloproteini ve osteokalsin (OCN) gibi belirteçleri salgılamaktadırlar. Bu nedenle, hem 2-boyutlu hem de 3-boyutlu sistemlerde, fotobiyomodülasyonun MC3T3-E1 hücrelerinin osteoblastik farklılaşmaları üzerine

etkilerini incelemek amacıyla ALP, KOL I ve OCN'nin mRNA ekspresyonlarına bakılmıştır.

Şekil 4.25'de TCPS grupları için ALP'ye ait RT-PCR sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.25. TCPS (ışık uygulaması yok), TCPS (1 kere ışık uygulaması) ve TCPS (2 kere ışık uygulaması) üzerinde kültüre edilmiş MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl ALP gen ekspresyonu sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu; ışık uygulanmayan grup iken, * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001 iken, ▪ p<0.05, ▪▪ p<0.01, ▪▪▪ p<0.001).

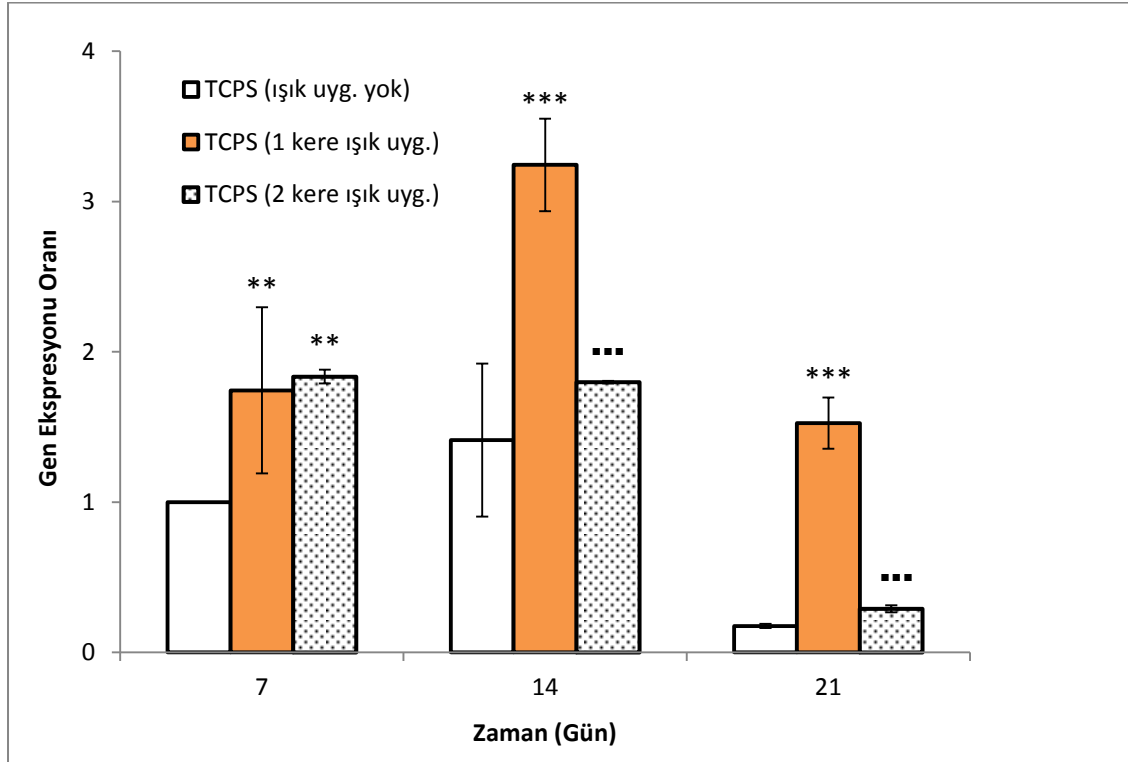
ALP osteojenik aktivitenin en önemli fenotipik göstergelerinden birisi olup, osteoblastların mineralize kemik matrise gömülerek osteosit haline gelmesiyle kaybolmaktadır. ALP, osteoblast farklılaşmasının erken dönemi için bir belirteç olmasına rağmen hem ekspresyonu hem aktivasyonu mineralizasyon başlaması ile azalır. Bu azalma osteoblast farklılaşmasının geç evresine rastlamaktadır.

Şekil 4.25'e göre, 21 günlük kültür süresi boyunca en yüksek ALP ekspresyonu TCPS (1 kere ışık uyg.) grubunda görülmüş ve ALP ekspresyonu kültür süresince artış göstermeye devam etmiştir. Yedinci günde, iki kere ışık uygulanan TCPS grubunun ALP ekspresyon seviyesinin hem ışık uygulanmayan kontrol hem de 1 kere ışık uygulanan TCPS grubuna göre daha düşük olduğu görülmektedir. Ondördüncü

günde ise 2 kere ışık uygulanan TCPS grubunun ALP aktivitesi, istatistiksel olarak ışık uygulanmayan kontrol grubuna göre artış göstermiştir (** $p < 0.001$). Kültürün son gününde kontrol grubunun ALP aktivitesinde azalma gözlenmiş, 2 kere ışık uygulanan TCPS grubunun ALP ekspresyonu ise oluşmamıştır. Sonuç olarak, fotobiyomodülasyon MC3T3-E1 hücrelerinin osteoblastik farklılaşmasını pozitif yönde etkilemiş ve bu sonucu Şekil 4.25 de desteklemiştir.

RT-PCR analizindeki ALP ekspresyon değerleri ile ALP aktivasyonunun belirlenmesi için yapılan ALP analizi sonuçları birbiri ile uyumlu bulunmuştur. Her iki analiz sonucunda da, 1 kere ışık uygulanan TCPS grubunun ALP aktivitesinin diğer gruplara göre en yüksek değere ulaştığı görülmüştür.

Şekil 4.26'da TCPS grupları için KOL I'e ait RT-PCR sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.26. TCPS (ışık uygulaması yok), TCPS (1 kere ışık uygulaması) ve TCPS (2 kere ışık uygulaması) üzerinde kültüre edilmiş MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl tip I kollajen gen ekspresyonu sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, $n=3$, kontrol grubu; ışık uygulanmayan grup iken, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ iken, ■ $p < 0.05$, ■■ $p < 0.01$, ■■■ $p < 0.001$).

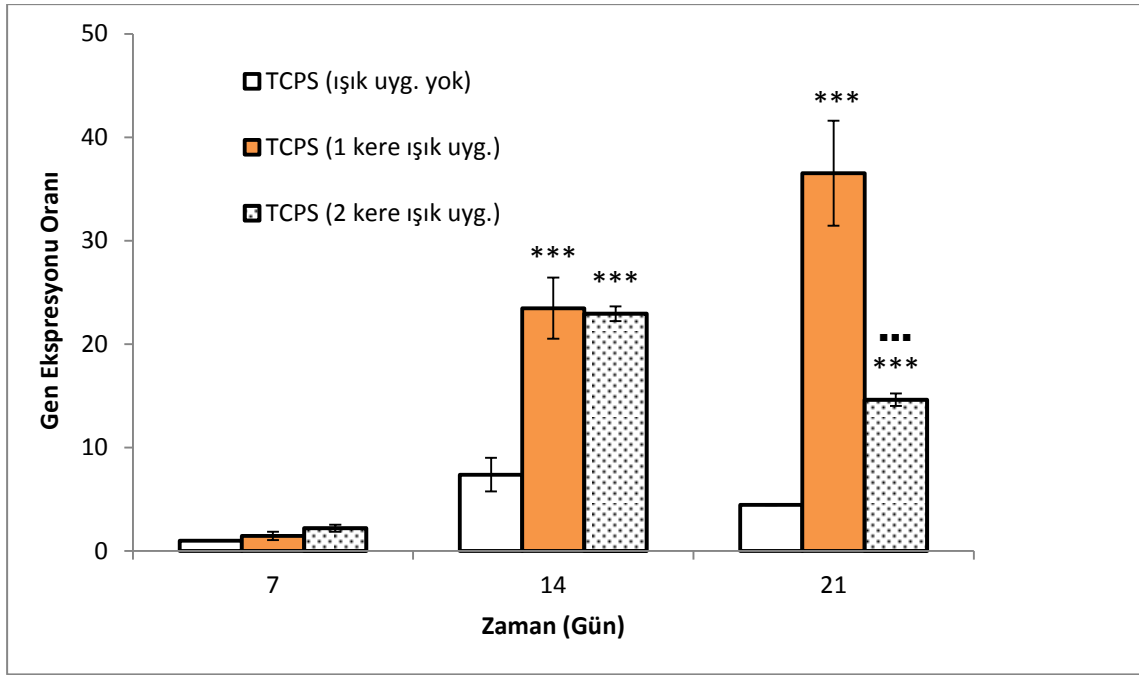
Kemiğin organik bileşenlerinin büyük bir kısmı osteoblastlar tarafından sentezlenen kollajenden oluşmaktadır. Kollajen kemiğin temel yapılarından biri olup mekanik

dayanımı sağlamaktadır. Kollajenin; tip I-III-V-XI gibi çeşitleri bulunmakta, organizmada en fazla bulunan çeşidi ise kollajen tip-I'dir.

Şekil 4.26'da göre, kültürün 7. gününde ışık uygulanan grupların kollajen tip I gen ekspresyonu ışık uygulanmayan kontrol grubuna göre fazla bulunmuştur (** $p < 0.01$). Kültürün 14. gününde, en yüksek kolajen sentezi 1 kere ışık uygulanan TCPS grubunda görülmüştür. İki kere ışık uygulanan TCPS grubunun kollajen sentezi ise 1 kere ışık uygulanan TCPS grubuna göre azalma göstermiş (*** $p < 0.001$) fakat kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır ($p > 0.05$). Kültürün son gününde, tüm gruplarda tip I kollajen sentezinde azalma görülmüştür. En yüksek kollajen sentezi 14. günde de olduğu gibi 1 kere ışık uygulanan TCPS grubunda görülmüştür.

Peng ve Wu'nun [74] yaptığı çalışmada, mezenkimal kök hücrelere 620 nm dalgaboyuna sahip kırmızı ışık uygulandığında; tip I kollajen sentezinin ışık uygulanmayan kontrol grubuna göre yüksek olduğu görülmüştür [74]. Kim ve ark. [9] mezenkimal kök hücrelere LED ışığını uyguladıktan sonra hücrelerde tip I kollajen sentezinin arttığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada, 10, 30 ve 90 saniye ışık uygulanan hücre gruplarının tip I kollajen sentezi, ışık uygulanmayan kontrol grubuna göre sırası ile %132, %158 ve %137 oranında artış göstermiştir [9]. Yapılan çalışmalardan anlaşıldığı gibi fotobiyomodülasyon kollajen sentezini artırmaktadır. Tez çalışması kapsamında yapılan bu analiz sonuçları da literatür bilgilerini destekler niteliktedir.

Şekil 4.27'de TCPS grupları için OCN'ye ait RT-PCR sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.27. TCPS (ışık uygulaması yok), TCPS (1 kere ışık uygulaması) ve TCPS (2 kere ışık uygulaması) üzerinde kültüre edilmiş MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl osteokalsin gen ekspresyonu sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu; ışık uygulanmayan grup iken, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ iken, • $p<0.05$, •• $p<0.01$, ••• $p<0.001$).

Osteokalsin osteoblastlar tarafından sentezlenen, kemikte en bol bulunan nonkollajenöz proteindir. Olgun osteoblast oluşumunun bir göstergesi olduğu için farklılaşmanın geç dönemlerinde ortaya çıkmaktadır.

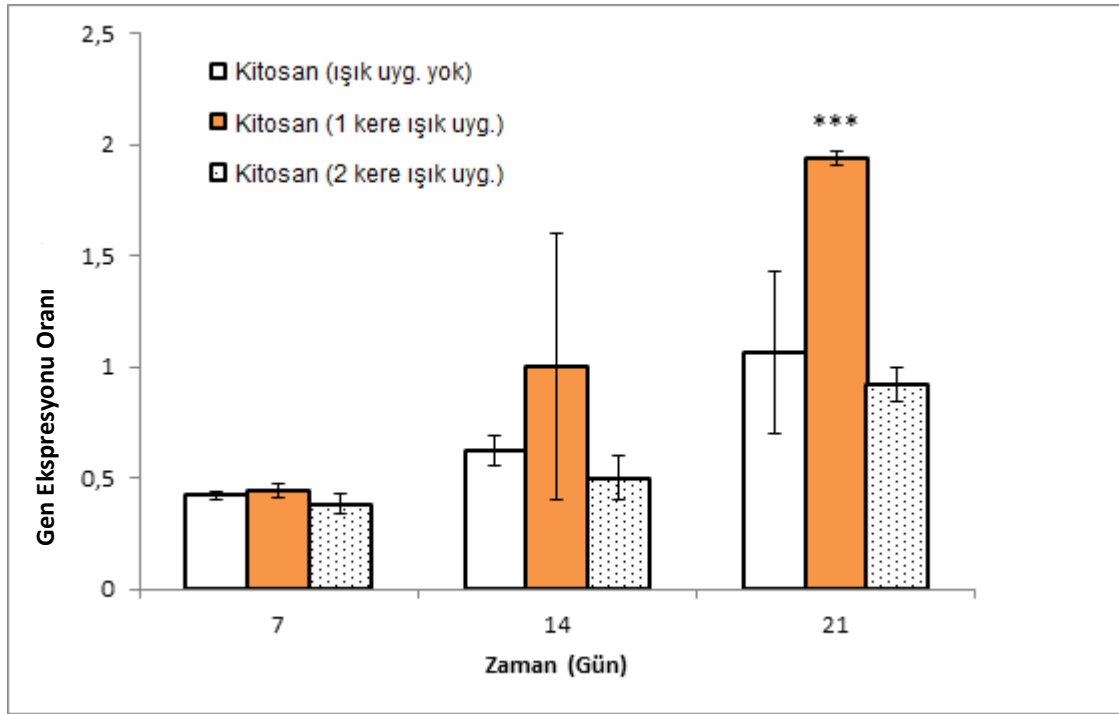
Kültürün 7. gününde gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). Ondördüncü günde, ışık uygulanan TCPS gruplarının OCN miktarının ışık uygulanmayan kontrol grubuna göre yüksek olduğu görülmektedir (*** $p<0.001$). Ayrıca, TCPS (1 kere ışık uyg.) grubunun ekspresyon değeri TCPS (2 kere ışık uyg.) grubuna göre biraz daha yüksektir. Kültürün son gününde ise ışık uygulanan her iki grupta da OCN miktarı kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Işık uygulanan gruplar arasındaki ekspresyon seviyesinin ise TCPS (1 kere ışık uyg.) grubunda daha yüksek olduğu görülmektedir (••• $p<0.001$). Kültür süresi boyunca 1 kere ışık uygulanan TCPS grubunda OCN ekspresyonu artmaya devam etmiş ve kültürün son gününde en fazla değere ulaşmıştır. Geç osteoblastik farklılaşma belirteci olan OCN ekspresyonunun kültürün ilk günlerinde düşük, son günlerinde yüksek olması literatür bilgilerine göre beklenen bir durum olup, bu durum Şekil 4.27 ile desteklemektedir.

Sonuç olarak fotobiyomodülasyon; osteoblastik farklılaşmaya bağlı olarak osteokalsin ekspresyonunu artırmıştır. Literatür bilgileri incelendiğinde benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür.

Kim ve ark. [9] LED ışığına maruz bıraktıkları mezenkimal kök hücrelerde ALP ve tip I kollajenin yanı sıra osteokalsinin mRNA ekspresyonunu da incelemişlerdir. Bu çalışmada, LED ışınlaması yapılan hücrelerin OCN ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu ifade edilmiştir [9]. Khadra ve ark. [77] osteoblast benzeri hücrelere 830 nm dalga boyunda olan GaAlAs diyot lazeri farklı dozlarda (1.5 ve 3 J/cm^2) uygulamışlardır. Çalışma sonunda, osteokalsin üretimi açısından; 1.5 J/cm^2 dozda uygulanan lazer grubu ile ışık uygulanmayan kontrol grubu arasında bir farklılık olmadığı, 3 J/cm^2 dozda uygulanan lazer grubunun osteokalsin üretiminde ise artış olduğu ve bu artışın diğer iki gruba göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği belirtilmiştir [77].

Khadra ve ark.'nın [77] yapmış olduğu bu çalışmada tek parametrenin farklı kullanılması sonucunda PBM'den cevap alınamamıştır. Enerji dozunun değiştirilmesi ile osteojenik farklılaşma gerçekleşmiş yani PBM'den pozitif cevap elde edilmiştir. Sonuç olarak bir çok parametrenin bir araya gelmesi ile fotobiyomodülasyondan cevap elde edilmektedir. Tez çalışması kapsamında TCPS gruplarında farklılık yaratan tek parametre ışığın günde 1 veya 2 kere uygulanmasıdır. Osteokalsin miktarından da anlaşıldığı gibi 1 kere ışık uygulamayla PBM'den daha iyi sonuç alınmıştır.

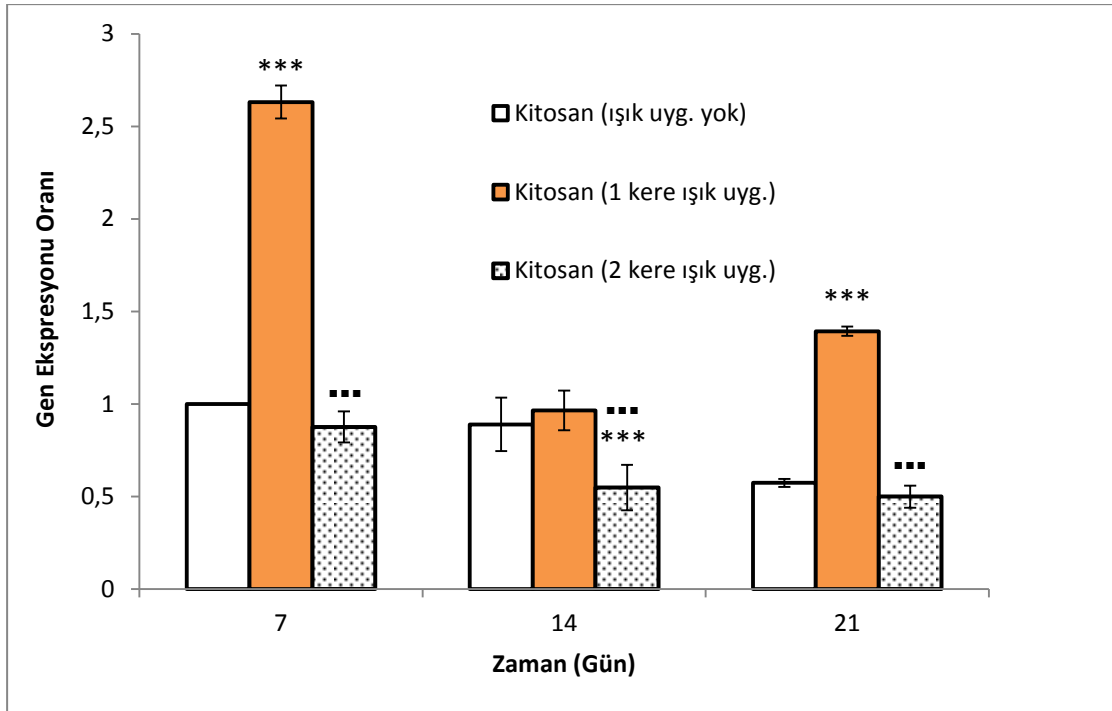
Şekil 4.28'de kitosan grupları için ALP'ye ait RT-PCR sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.28. Kitosan doku iskelesi (ışık uygulaması yok), kitosan (1 kere ışık uygulaması) ve kitosan (2 kere ışık uygulaması) üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl ALP gen ekspresyonu sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu; ışık uygulanmayan grup iken, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$).

Kültürün 7. ve 14. gününde ışık uygulanmayan kontrol grubu ile ışık uygulanan gruplar arasında bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). Yirmibir günlük kültür süresi boyunca ALP ekspresyon seviyesi artış göstermeye devam etmiş, kültürün son gününde ise en yüksek ALP değeri kitosan (1 kere ışık uyg.) grubunda bulunmuştur (** $p<0.001$). Kültür süresi boyunca ALP aktivitesinde meydana gelen artış Bölüm 4.4.3.1’de farklı örneklerle açıklanmış olup tez çalışması kapsamında elde edilen bu sonuçların literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Şekil 4.29’da kitosan grupları için KOL l’e ait RT-PCR sonuçları verilmiştir.

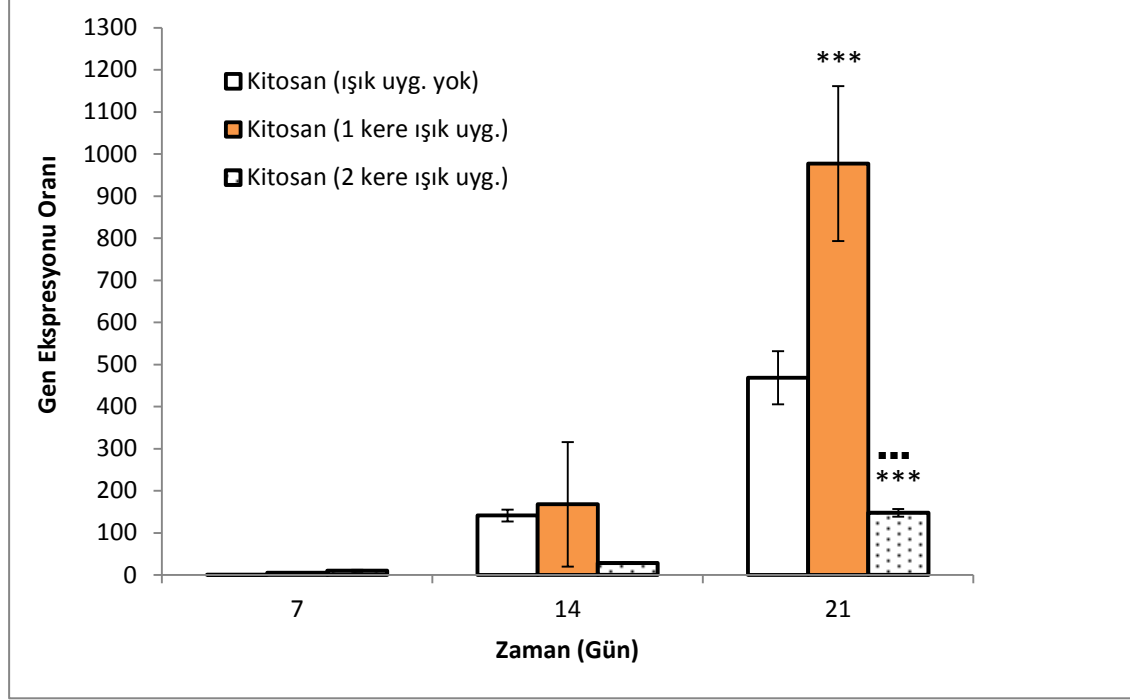


Şekil 4.29. Kitosan doku iskelesi (ışık uygulaması yok), kitosan (1 kere ışık uygulaması) ve kitosan (2 kere ışık uygulaması) üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl tip I kollajen gen ekspresyonu sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, $n=3$, kontrol grubu; ışık uygulanmayan grup iken, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ iken, ▫ $p<0.05$, ▨ $p<0.01$, ▩ $p<0.001$).

Şekil 4.29'a göre, kültürün 7. gününde 1 kere ışık uygulanan kitosan grubunun tip I kollajen sentezi ışık uygulanmayan kontrol grubu ve 2 kere ışık uygulanan kitosan grubuna göre yüksek bulunmuş (***) $p<0.001$ ve en yüksek değer bu günde gözlenmiştir. Kültürün 14. gününde, kitosan (1 kere ışık uyg.) grubun kollajen sentezi 7. güne göre düşüş göstermekle birlikte diğer gruplara göre daha yüksek değerde olduğu görülmektedir. Kültürün son gününde ise 1 kere ışık uygulanan kitosan grubunun kollajen sentezinin diğer 2 gruba göre anlamlı derecede arttığı görülmektedir (***) $p<0.001$). Kültür süresi boyunca kitosan (1 kere ışık uyg.) grubunun tip I kollajen ekspresyon seviyesinin, kitosan (2 kere ışık uyg.) grubundan yüksek olduğu net bir şekilde görülmektedir (***) $p<0.001$). Şekil 4.29'dan da anlaşılacağı gibi fotobiyomodülasyon osteojenik farklılaşma belirteci olan kollajen tip I üretimini arttırmaktadır. Hem TCPS hem de kitosan gruplarında en yüksek kollajen sentezi 1 kere ışık uygulanan gruplarda meydana gelmiştir.

Bir kere ışık uygulanan hücrelerdeki kollajen üretiminin, ışık uygulanmayan kontrol grubuna ve 2 kere ışık uygulanan kitosan grubuna göre daha yüksek olduğu Şekil 4.29 ile birlikte Şekil 4.13'de verilen SEM fotoğraflarında da görülmektedir.

Şekil 4.30'da kitosan grupları için OCN'ye ait RT-PCR sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.30. Kitosan doku iskelesi (ışık uygulaması yok), kitosan (1 kere ışık uygulaması) ve kitosan (2 kere ışık uygulaması) üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait bağıl osteokalsin gen ekspresyonu sonuçları. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu; ışık uygulanmayan grup iken, * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001 iken, ■ p<0.05, ■■ p<0.01, ■■■ p<0.001).

Geç osteoblastik farklılaşma belirteci olan OCN ekspresyonu kültürün 7. günde çok düşük değerdedir. Işık uygulanan gruplar ve ışık uygulanmayan kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (p>0.05). Ondördüncü günde gruplar arasında bir farklılık gözlenmezken en yüksek OCN miktarının kitosan (1 kere ışık uyg.) grubunda, en düşük değer ise kitosan (2 kere ışık uyg.) grubunda olduğu görülmektedir. Kültür boyunca OCN miktarında artış gözlenmiş ve bu artış 21. günde en yüksek değere ulaşmıştır. Bir kere ışık uygulanan kitosan grubunun OCN ekspresyon seviyesinin ışık uygulanmayan kontrol grubu ve 2 kere ışık uygulanan kitosan grubuna göre daha yüksek olduğu görülmektedir (*** p<0.001, ■■■ p<0.001). Elde edilen sonuçlar Şekil 4.12'de verilen SEM fotoğrafları ile uyumludur. Bu

görüntülerde de fotobiyomodülasyonun hücrelerin farklılaşmasını ve mineralizasyon oluşumunu artırdığı görülmektedir.

Jiang ve ark. [105] yaptıkları çalışmada, PLGA ve kitosan/PLGA'dan oluşmuş iki ayrı doku iskelesi üzerinde bulunan MC3T3-E1 hücrelerin OCN ekspresyon seviyelerinin 21. gün boyunca sürekli olarak artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu durum Şekil 4.30'da, kontrol grubunda (kitosan, ışık uyg. yok) da gözlenmiştir. Bouvet-Gerbetaz ve ark. [76] 808 nm dalgaboyunda olan lazeri mezenkimal kök hücrelere uygulamış ve sonuç olarak fotobiyomodülasyonun hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını etkilemediğini belirtmişlerdir. Hücre farklılaşmasına yönelik olarak yapılan RT-PCR analizinde osteokalsinin ekspresyon seviyesinin; kültürün 14. gününde ışık uygulanan grup ile ışık uygulanmayan kontrol grubu arasında benzer ve düşük seviyede olduğu, 21. günde ise kontrol grubunun OCN miktarının ışık uygulanan gruba göre yüksek ve 14. güne göre ise daha fazla olduğu belirtilmiştir. Benzer sonuçlar Şekil 4.30'da ışık uygulanmayan kontrol grubu ile kitosan (2 kere ışık uyg.) grup arasında görülmektedir. Khadra ve ark. [77] ve Kim ve ark. [9] yaptıkları çalışmada fotobiyomodülasyonun osteokalsin ekspresyonunu artırdığını belirtmişlerdir. Bir kere ışık uygulanan kitosan grubunun OCN miktarındaki artış bu çalışmalar ile benzerlik göstermektedir.

RT-PCR analizi sonuçlarına göre, PBM'de etkili olan parametrelerin doğru seçimi ile fotobiyomodülasyondan pozitif sonuçlar elde edildiği, osteojenik farklılaşmanın desteklendiği ve bu etkinin en iyi 1 kere ışık uygulanan gruplarda olduğu görülmektedir.

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında, kitosan bazlı doku iskeleleri dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmıştır. Plazma ark sistemi ile yapılacak olan ışık uygulamasının öncül çalışmaları gerçekleştirilerek süre, mesafe ve uygulama sıklığı gibi işlem parametreleri belirlenmiştir. Ardından, belirlenen parametrelerin kullanıldığı plazma ark sistemi ile MC3T3-E1 preosteoblast hücrelerinin kültür çalışmaları yürütülmüştür. Çalışmalar boyunca elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Deasetilasyon derecesi %80 olan kitosanın %1.1'lik (w/v) çözeltileri hazırlanarak dondurarak-kurutma yöntemi ile gözenekli yapıda ve içsel bağlantıları olan 9 mm çapına ve 2 mm kalınlığına sahip doku iskeleleri üretilmiştir. Liyofilize doku iskeleleri, %96'lık etanolle 1 gece, %70'lik etanolle 1 saat muamele sonucu stabilize edilmiştir.
- Yüksek çıkış gücüne sahip olan plazma ark kaynağının kullanımına bağlı olarak meydana gelen sıcaklık artışının hücrelere zarar vermeyecek boyutta olduğu belirlenmiştir.
- Işık kaynağının, uygulama mesafesine ve sıklığına karar vermek için hücre kültür çalışmaları 24-gözlü doku kültür kaplarında (TCPS) yürütülmüştür. Gerçekleştirilen MTT analizi sonuçlarına göre, ışınlamanın hücrelere 10 cm mesafeden ve gün aşırı olarak yapılmasına karar verilmiştir.
- TCPS yüzeyinde bulunan hücreler doğrudan ışık ile etkileşimde bulunurken, doku iskelelerinde bulunan hücreler, iskelenin iç kısımlarına kadar ilerledikleri için ışık ile doğrudan temas etmezler. Bu yüzden doku iskelelerinde bulunan hücrelerin ışığa maruz kalma sürelerinin, TCPS yüzeyinde bulunan hücrelerden daha fazla olması gerektiği düşünülmüştür. Buna bağlı olarak, ışık kaynağının süre belirleme çalışmaları yapılırken hem 2-boyutlu, hem de 3-boyutlu sistemlerde çalışmalar yürütülmüştür. Yapılan MTT analizi sonuçlarına göre, TCPS'de bulunan hücrelere 5 dk ve doku iskelelerinde bulunan hücrelere ise 10 dk ışınlama yapılmasına karar verilmiştir. Elde edilen sonuçlar yapılan yorumu desteklemiştir.

- 700-2500 nm aralığındaki dalga boylarına ve 650 Watt çıkış gücüne sahip olan plazma ark kaynağının belirlenen kritik parametreleri ile birlikte preosteoblast yapıda olan MC3T3-E1 hücrelerin kullanıldığı hücre kültür çalışmaları 21 gün süre ile yürütülmüştür.
- MTT analizi sonuçlarına göre, TCPS yüzeyinde bulunan hücreler yüzeye tutunmuş ve çoğalmaya devam etmişlerdir. En yüksek üreme hızı TCPS (2 kere ışık uyg.) grubunda görülmüştür. Kitosan doku iskeleleri ile oluşturulan gruplarda bulunan hücrelerin, iskele yüzeyine tutunup çoğaldığı belirlenmiştir. Işık uygulaması yapılan her iki grubun MTT değerlerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu, fakat ışık uygulanan gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, 2-boyutlu ve 3-boyutlu sistemlerde, fotobiyomodülasyonun hücrelerin çoğalma oranını artırdığı gözlenmiştir.
- SEM analizi sonuçlarına göre, fotobiyomodülasyon ile hücre çoğalmasında artış gözlenmiş ve buna bağlı olarak gözenekler kapanacak boyutlara ulaşmıştır. Hücre göçündeki artış sonucu, hücrelerin doku iskelelerinin iç kısımlarına kadar ulaştığı ve o bölgelerde hücreyel olayların devamlılığı görülmüştür. Ayrıca, mineralize yapının oluşumu ile kollajen üretiminde ve kemik nodül oluşumlarında artış ve osteojenik farklılaşma sürecinin hızlanması gözlenen diğer sonuçlar arasındadır.
- Floresan boyama görüntülerinde, fotobiyomodülasyon sonucunda, TCPS gruplarında bulunan hücrelerin çoğalmadaki artış ile birlikte hücre gövdelerinden çıkan uzantılar gözlenmiştir. Optik mikroskop altında çekilen fotoğraflarda ise PBM'nin apoptozu önlediğini söylemek mümkündür.
- Erken osteoblastik farklılaşma belirteci olarak kullanılan ALP analizinde, plazma ark ışık kaynağının MC3T3-E1 hücrelerinin osteoblastik farklılaşmasını desteklediği, TCPS (1 kere ışık uyg.) grubunun ALP değerinin 14. günde en yüksek değerde olduğu ve TCPS (2 kere ışık uyg.) grubun ALP değerinin kültür süresince arttığı belirlenmiştir.
- Hücre dışı mineralizasyonun belirlenmesi amacıyla yapılan Von Kossa boyamada; 2-boyutlu ve 3-boyutlu sistemlerde en yoğun rengin ışık uygulanan gruplarda olduğu belirlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, fotobiyomodülasyonun mineralizasyonu attırdığı gözlemlenmiştir.

- Fotobiyomodülasyonun MC3T3-E1 hücrelerinin osteoblastik farklılaşmasına olan etkisi RT-PCR yöntemi ile de incelenmiştir. Bu amaçla kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde β -aktin, kollajen I, osteokalsin ve ALP genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. TCPS grupları için değerlendirilen ALP gen ekspresyonu ALP aktivasyonu analizini destekleyecek şekilde olmuş ve ALP miktarı 1 kere ışık uygulanan grupta en yüksek değerde bulunmuştur. Kitosan grupları için yapılan RT-PCR analizi sonuçlarında da PBM'nin ALP seviyesini artırdığı belirlenmiştir. Hem TCPS hem de kitosan gruplarında, geç osteoblastik farklılaşma belirteci olan OCN ekspresyonu kültür süresince artış göstermiş, en yüksek değer kültürün 21. gününde ve 1 kere ışık uygulanan gruplarda bulunmuştur. Her iki grupta da tip I kolajen miktarı en fazla 1 kere ışık uygulanan gruplarda görülmüştür. Sonuç olarak, PBM'de etkili olan parametrelerin doğru seçimi ile fotobiyomodülasyondan pozitif sonuçlar elde edildiği, osteojenik farklılaşmanın desteklendiği ve bu etkinin en iyi 1 kere ışık uygulanan gruplarda olduğu belirlenmiştir.

Yukarıda belirtilen bulgular ışığında, plazma ark kaynağı için belirlenen parametreler ile PBM'den hücresel seviyede pozitif cevaplar elde edilmiştir. Fotobiyomodülasyonun; 2-boyutlu ve 3-boyutlu sistemlerde, hücre çoğalmasını ve göçünü artırdığı, hücre farklılaşmasını uyardığı, mineralizasyonu artırdığı ve apoptozu engellediği görülmüştür. 3-boyutlu kitosan doku iskeleleri ve ışığın sinerjik etkisi ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları sonucunda, preosteoblast yapıda olan MC3T3-E1 hücrelerinin çoğalmasının ve farklılaşmasının ışık uygulanmayan kontrol grubuna göre çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Tüm bulguların ışığında, çalışma kapsamında kullanılan 700-2500 nm dalga boyu aralığında ışınlarla sahip plazma ark ışık kaynağının hücrelerin kemik dokusu oluşturmasını indüklediği ve böylelikle kemik doku mühendisliğinde kullanımının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Gümüşderelioğlu M., 2007, Ekim, Doku mühendisliğinde nanoteknoloji, Bilim ve Teknik Özel Eki, Tübitak Yayınları, **2007**
- [2] Durukan M., 2012, Mikrodalga Destekli Kitosan/Hidroksiapatit Doku İskelesi Üretimi ve İn-Vitro Kemik Doku Mühendisliği, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 109 s., **2012**
- [3] Akman A.C., Tıǧlı R.S., Gümüşderelioğlu M., Nohutcu R.M., 2010, bFGF loaded HA-Chitosan: A promising scaffold for periodontal tissue engineering, J. Biomed. Mat. Res. Part A, 92A, 3, 953-962, **2010**
- [4] Al-Ghamdi K.M., Kumar A., Moussa N.A., 2012, Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells, Lasers Med Sci, 27, 237-249, **2012**
- [5] Leonida A., Paiusco A., Rossi G., Carini F., Baldoni M., Caccianiga G., 2012, Effects of low-level laser irradiation on proliferation and osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix: in vitro pilot study, Lasers Med Sci, DOI 10.1007/s10103-012-1067-6, **2012**
- [6] Posten W., Wrone D.A., Dover J.S., Arndt K.A., Silapunt S., Alam M., 2005, Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy, Dermatol Surg, 31, 334-340, **2005**
- [7] Karu Tl., 2003, Low-Power Therapy. Chapter 48 in: Vo-Dinh T, editor. Biomedical Photonics Handbook. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 48-1– 48-25, **2003**
- [8] Fujihara N.A., Hiraki K.R.N., Marques M.M., 2006, Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence, Lasers in Surgery and Medicine, 38, 332-336, **2006**
- [9] Kim H.K., Kim J.H., Abbas A.A., Kim D.O., Park S.J., Chung J.Y., Song E.K., Yoon T.R., 2009, Red light of 647 nm enhances osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells, Lasers Med Sci, 24, 214-222, **2009**
- [10] Langer R., Vacanti J. P., 1993, Tissue engineering, Science, 260, 920-927, **1993**
- [11] Shin H., Jo S., Mikos A.G., 2003, Biomimetic materials for tissue engineering, Biomaterials, 24, 4353-4364, **2003**
- [12] Dvir T., Timko B.P., Kohane D.S., Langer R., 2011, Nanotechnological strategies for engineering complex tissue, Nature Nanotechnology, 6, 13-22, **2011**
- [13] Demirsoy A., 2006, Yaşamın Temel Kuralları, Meteksan Yayınları, **2006**
- [14] Akay M.T., 2006, Genel Histoloji, Palme Yayıncılık, **2006**
- [15] Kaynak G., 2012, Mikrodalga Destekli Çapraz Bağlanma/Çökeltme Reaksiyonları ile Kitosan-HA Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanımının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 119 s., **2012**

- [16] Stevens M.M., 2008, Biomaterials for bone tissue engineering, Mater. Today, 11(5), 18-25, **2008**
- [17] Şimşek A., Çakmak G., Cila E., 2004, Kemik greftleri ve kemik greftlerinin yerini tutabilecek maddeler, TOTBİD Dergisi, Cilt: 3, Sayı: 3-4, **2004**
- [18] Wei G., Ma P.X., 2004, Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering, Biomaterials, 25, 4749-4757, **2004**
- [19] Corden T.J., Jones I.A., Rudd C.D., Christian P., Downes S., McDougal K.E., 2000, Physical and biocompatibility properties of poly-e-caprolactone produced using in situ polymerisation: a novel manufacturing technique for long-fibre composite materials, Biomaterials, 21, 713-724, **2000**
- [20] Gümüşderelioğlu M., 2011, Doku mühendisliği ders notları, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **2011**
- [21] Seong J.M., Kim B.C., Park J.H., Kwon K., Mantalaris A., Hwang Y.S., 2010, Stem cells in bone tissue engineering, Biomed. Mater., 5, 1-15, **2010**
- [22] Burg K.J.L., Porter S., Kellam J.F., 2000, Biomaterial developments for bone tissue engineering, Biomaterials, 21, 2347-2359, **2000**
- [23] Pilliar R.M., Filiaggi M.J., Wells J.D., Gryn timer M.D., Kandel R.A., 2001, Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications-in vitro characterization, Biomaterials, 22, 963-972, **2001**
- [24] Boyan B.D., Hummert T.W., Dean D.D., Schwartz Z., 1996, Role of materials surfaces in regulating bone and cartilage cell response, Biomaterials, 17, 137-146, **1996**
- [25] Rezwan K., Chen Q.Z., Blaker J.J., Boccaccini A.R., 2006, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, Biomaterials, 27(18): 3413-3431, **2006**
- [26] Hutmacher D.W., 2000, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, Biomaterials, 21, 2529-2543, **2000**
- [27] Lee S.H., Shin H., 2007, Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering, Advanced Drug Delivery Reviews, 59, 339-359, **2007**
- [28] Salgado A., Cauntinho O., Reis R., 2004, Bone tissue engineering, Macromolecular Bioscience, 4, 743-765, **2004**
- [29] Liu X., Ma P.X., 2004, Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, Ann. Biomed. Eng., 32(3), 477-486, **2004**
- [30] Vats A., Tolley N.S., Polak J.M., Gough J.E., 2002, Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications, Clinical Otolaryngology & Allied Sciences, 28(3), 165-172, **2002**
- [31] Barbosa C.J., Teles C., Moreira L.M., Damião Á.J., Lima C.J., 2012, A novel opto-mechanical system constituted by LEDs to employment in photobiostimulation: Clinical application in optical therapy, Spectroscopy, 27, 9-18, **2012**

- [32] Baxter G.D., 1994, Therapeutic lasers, Theory and Practice, Churchill Livingstone, London, **1994**
- [33] Simunovic Z., 2000, Lasers in Medicine and Dentistry, vol. I. Vitgraf, Rijeka (Croatia), **2000**
- [34] Tuner J., Hode L., 1999, Low level laser therapy, Clinical Practice and Scientific Background, Prima Books, Grangesbers (Sweden), **1999**
- [35] Hamblin M.R., Demidova N.T., 2006, Mechanisms of low level light therapy, Proc. of SPIE Vol. 6140, 12 s., **2006**
- [36] İlman A.A., 2005, Tavşanlarda Kırık İyileşmesinde Helyum-Neon (He-Ne) ve Galyum-Alüminyum-Arsenit (Ga-Al-As) Lazerin Kallus Formasyonu ve Mineral Yoğunluğu Üzerine Etkilerinin Deneysel Araştırılması, Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 84 s., **2005**
- [37] Keleş M., 2006, Düşük Enerji Seviyeli Lazerin Ratlarda Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Histolojik ve Deneysel İncelenmesi, Doktora Tezi, Gülhane Askeri Tıp akademisi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 90 s., **2006**
- [38] Baş K., 2012, Periodontolojide Lazerlerin Kullanımı, Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı, İzmir, 32 s., **2012**
- [39] Dederich D.N., Bushick R.D., 2004, Lasers in dentistry. J Am Dent Assoc, 135, 204-p212, **2004**
- [40] Rueggeberg F.A., 1999, Contemporary issue in photocuring, Compend Contin Educ Dent Suppl, 25, 4-15, **1999**
- [41] Reece J.B., Urry L.A., Cain M.L., Wasserman S.A., Minorsky P.V., Jackson R.B., 2011, Campbell Biology, Pearson, 9, 163-176, **2011**
- [42] Keskin RT., 2006, Kas İskelet Sistemi Hastalıklarında Düşük Enerjili Lazer Tedavisinin Etkinliği, Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Ana Dalı, Diyarbakır, 83 s., **2006**
- [43] Botsalı M.S., 2008, Rezin Esaslı Fissür Örtücülerin Farklı Işık Kaynaklarıyla Polimerizasyonu Sonrasında Açığa Çıkan Artık Monomer Miktarının, Yüzey Sertliğinin ve Bağlanma Dayanımının Araştırılması, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Pedodonti Anabilim Dalı, Konya, 142 s., **2008**
- [44] Karu T.I., 1988, Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation, Lasers in the Life Sciences, 2, 53-74, **1988**
- [45] Kneebone W.J., 2006, Practical applications of low level laser therapy, Practical PAIN MANAGEMENT, 34-40, **2006**
- [46] Gáspár L., 2009, Professor Endre Mester, The father of photobiomodulation, J Laser Dent, 17(3), 146-148, **2009**
- [47] Kneebone W.J., 2007, Phototherapy applications in sport medicine, Practical PAIN MANAGEMENT, 62-66, **2007**
- [48] Vladimirov Y.A., Osipov A.N., Klebanov G.I., 2004, Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation, Biochemistry, 69(1), 81-90, **2004**

- [49] Pogrel M.A., Chen J.W., Zhang K., 1997, Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes, *Laser Surg Med*, 20(4), 426–432, **1997**
- [50] Karu TI., 1989b, *Photobiology of low-power laser therapy*, London: Harwood Academic Publishers, **1989**
- [51] Karu TI., 1989a, Photobiology of low-power laser effects, *Health Physics*, 56, 691-704, **1989**
- [52] Laakso L., Richardson C., Cramond T., 1993, Quality of light - is laser necessary for effective photobiostimulation, *Australian Physiotherapy*, 39(2), 87-92, **1993**
- [53] Calabrese E.J., 2001, The future of hormesis: where do we go from here?, *Crit Rev Toxicol*, 31, 637–648, **2001**
- [54] Martius F., 1923, Das Amdt-Schulz Grandgesetz, *Munch Med Wschr*, 70, 1005–1006, **1923**
- [55] Stebbing A.R.D., 1982, Hormesis; the stimulation of growth by low-levels of inhibitors, *Sci Tot Environ*, 22, 213–234, **1982**
- [56] Huang Y.Y., Chen A.C.H., Carrol J.D., Hamblin M.R., 2009, Biphasic dose response in low level light therapy, *Dose-Response*, 7, 358-383, **2009**
- [57] Sommer A.P., Pinheiro A.L.B., Mester A.R., Franke R.P., Whelan H.T., 2001, Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system, *J Clin Laser Med Surg*, 19, 29–33, **2001**
- [58] Desmet K.D., et al., 2006, Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation, *Photomedicine and Laser Surgery*, 24(2), 121-128, **2006**
- [59] Obradović R.R., Kesić L.G., Peševska S., 2009, Influence of low-level laser therapy on biomaterial osseointegration: a mini-review, *Lasers Med Sci*, 24, 447-451, **2009**
- [60] Soleimani M., Abbasnia E., Fathi M., Sahraei H., Fathi Y., Kaka G., 2011, The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts- an in vitro study, *Lasers Med Sci*, DOI 10.1007/s10103-011-0930-1, **2011**
- [61] Sarı H., Tüzün Ş., Akgün K., 2002, *Fiziksel Tıp Yöntemleri*, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, **2002**
- [62] Karu TI., 2008, Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation, *Photochemistry and Photobiology*, 84, 1091–1099, **2008**
- [63] Gupta A., Avcı P., Sadasivam M., Chandran R., Parizotto N., Vecchio D., Melo W., Dai T., Chiang L.Y., Hamblin M.R., 2012, Shining light on nanotechnology to help repair and regeneration, *Biotechnology Advances*, Research review paper, 25 s., **2012**
- [64] Lubart R., Friedmann H., Lavie R., 2000, Photobiostimulation as a function of different wavelengths, *Laser Therapy*, 12, 38-41, **2000**

- [65] Nicoli E., Carruba M.O., 2006, Nitric oxide and mitochondrial biogenesis, *J. Cell Sci*, 119, 2855–2862, **2006**
- [66] Manteifel V.M., Bakeeva L.E., Karu T.I., 1999, He-Ne laser radiation causes changes in mitochondrial ultrastructure in successive generations of yeast cells, *Doklady Biophysics*, 364-366, 58–60 **1999**
- [67] Manteifel V.M., Karu T.I., 2005, Structure of mitochondria and activity of their respiratory chain in successive generations of yeast cells exposed to He-Ne laser light, *Biol. Bull*, 32, 556–566, **2005**
- [68] Wilden P., Agazie Y., Kaufman R., Halenda S., 1998, ATP-stimulated smooth muscle cell proliferation requires independent ERK and PI3K signaling pathways, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 275, 1209–1215, **1998**
- [69] Cantley L.C., 2002, The phosphoinositide 3-kinase pathway, *Science*, 296, 1655–1657, **2002**
- [70] Shefer G., Barash I., Oron U., Halevy O., 2003, Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts, *Biochim Biophys Acta*, 1593, 131–139, **2003**
- [71] Abramovitch-Gottlieb L., Gross T., Naveh D., Geresh S., Rosenwaks S., Bar I., Vago R., 2005, Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix, *Lasers in Medical Science*, 20, 138-146, **2005**
- [72] Schwartz-Filho H.O., Reimer A.C, Marcantonio C., Marcantonio E., Marcantonio R.A.C., 2011, Effects of low-level laser therapy (685 nm) at different doses in osteogenic cell cultures, *Lasers Med Sci*, 26, 539-543, **2011**
- [73] Khadra M., Ronold H.J., Lyngstadaas S.P., Ellingsen J.E., Haanes H.R., 2004, Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits, *Clin Oral Impl Res*, 15, 325-32, **2004**
- [74] Peng F., Wu H., 2010, 620nm red light promotes cellular viability and mRNA expression of Collagen type I in bone mesenchymal stem cells of rat, *SOPO*, DOI 10.1109/ 5504091, **2010**
- [75] Mvula B., Moore T.J., Abrahamse H., 2010, Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells, *Lasers Med Sci*, 25, 33-39, **2010**
- [76] Bouvet-Gerbettaz S., Merigo E., Rocca J.P., Carle G.F., Rochet N., 2009, Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts, *Lasers in Surgery and Medicine*, 41, 291-297, **2009**
- [77] Khadra M., Lyngstadaas S.P., Haanæs H.R., Mustafa K., 2005, Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material, *Biomaterials*, 26, 3503-3509, **2005**
- [78] Pereira L.O., Longo J.P.F., Azevedo R.B, 2012, Laser irradiation did not increase the proliferation or the differentiation of stem cells from normal and inflamed dental pulp, *Archives of Oral Biology*, 57, 1079-1085, **2012**

- [79] Hou JF., Zhang H., Yuan X., Li J., Wei YJ., Hu SS., 2008, 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*, 40, 726-733, **2008**
- [80] Fujimoto K., Kiyosaki T., Mitsui N., Mayahara K., Omasa S., Suzuki N., Shimizu N., 2010, Low-intensity laser irradiation stimulates mineralization via increased BMPs in MC3T3-E1 cells, *Lasers in Surgery and Medicine*, 42, 519-526, **2010**
- [81] Tıǧlı R.S., 2009, Kıkırdak Doku Rejenerasyonunda Kitosan Doku İskelesi Destekli Biyoreaktör Performansının İncelenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 184 s., **2009**
- [82] Aday S., Gümüşderelioǧlu M., 2010, Bonelike apatite coated chitosan scaffolds: Characterization and osteoblastic activity, *Polymer Composites*, 31, 8, 1418-1426, **2010**
- [83] Beşkardeş İ., Gümüşderelioǧlu M., 2009, Biomimetic apatite coated PCL scaffolds: Effect of surface topography on cellular functions, *Journal of Bioactive and Compatible Materials*, 24, 507-524, **2009**
- [84] Amaral I.F., Lamghari M., Sousa S.R., Sampaio P., Barbosa M.A., 2005, Rat bone marrow stromal cell osteogenic differentiation and fibronectin adsorption on chitosan membranes: The effect of the degree of acetylation, *J Biomed Mater Res*, 7, 387-397, **2005**
- [85] Tıǧlı R.S., Karakeçili A., Gümüşderelioǧlu M., 2007, In-vitro characterization of chitosan scaffolds: Influence of composition and deacetylation degree, *J. Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 1665-1674, **2007**
- [86] Akman A.C., Tıǧlı R.S., Gümüşderelioǧlu M., Nohutcu R.M., 2010, BMP-6 loaded chitosan scaffolds enhancing the osteoblastic characteristics of MC3T3-E1 cells, *Artificial Organs*, 34, 1, 65-74, **2010**
- [87] Seol Y.J., Lee J.Y., Park Y.J., Lee Y.M., Ku Y., Rhyu I.C., Lee S.J., Han S.B., Chung C.P., 2004, Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation, *Biotechnology Letters*, 26, 1037-1041, **2004**
- [88] Zhang Y., et al., 2006, Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor-beta1 DNA for periodontal tissue engineering, *Biochemical and Biophysical Research Community*, 344(1), 362-369, **2006**
- [89] Renno AC., McDonnell PA., Parizotto NA., Laakso EL., 2007, The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro, *Photomed Laser Surg*, 25, 275-280, **2007**
- [90] Hrñjak M., Kuljic-Kapulica N., Budisin A., Giser A., 1995, Stimulatory effect of low-power density He-Ne laser radiation on human fibroblasts in vitro, *Vojnosanit Pregl*, 52, 539-546, **1995**
- [91] Schneede P., Jelkmann W., Schramm U., Fricke H., Steinmetz M., Hofstetter A., 1988, Effects of the helium-neon laser on rat kidney epithelial cells in culture, *Lasers Med Sci*, 3, 249-257, **1988**
- [92] Güler F., 2008, Ortodontide Braket Yapıştırma Teknikleri, Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi Diřhekimliǧi Fakóltesi Ortodonti Ana Bilim Dalı, İzmir, 58 s., **2008**

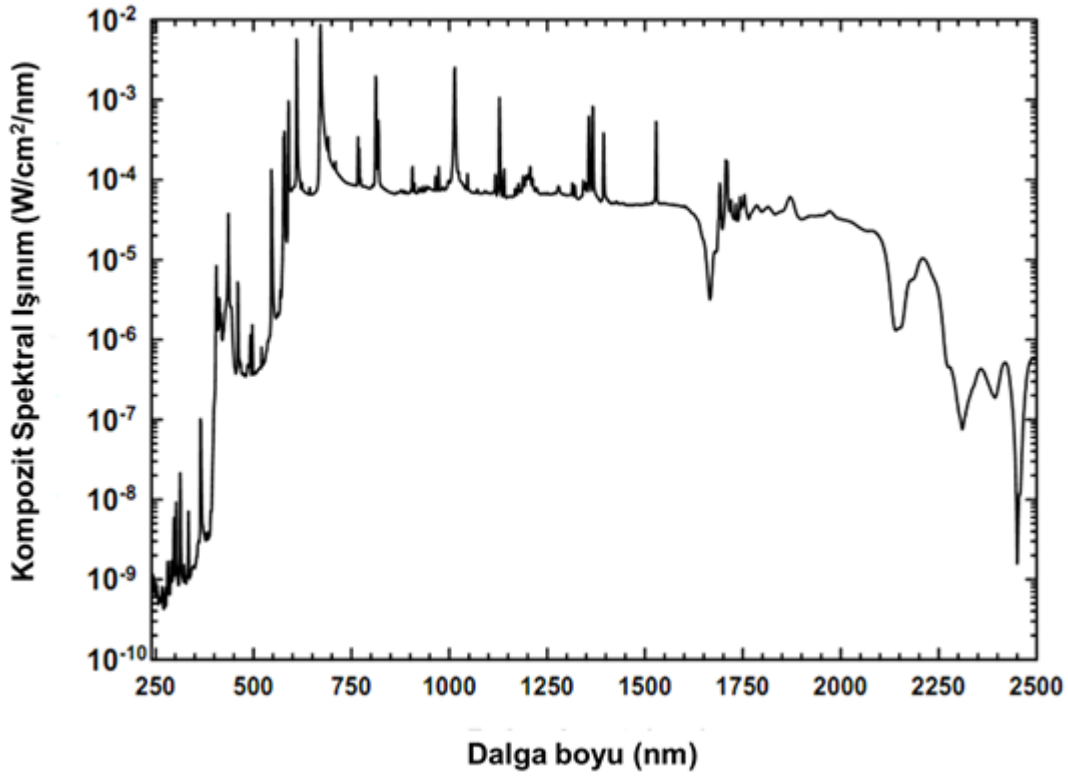
- [93] Gritsch K., Ponsonnet L., Schembri C., Farge P., Pourreyaon L., Grosogeat B., 2008, Biological behaviour of buccal cells exposed to blue light, *Materials Science and Engineering*, 28, 805–810, **2008**
- [94] Noda M., Wataha J.C., Kaga M., Lockwooh P.E., Volkmann K.R., Sano H., 2002, Component of dentinal adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed TPH-1 human monocytes at sublethal concentrations, *J Dent Res*, 81(4), 265-269, **2002**
- [95] Yılmaz İ., 2005, Erişkin Ratlarda Deneysel Varikozel Oluşturulması Sonrası Testislerde Germ Hücrelerinde Apoptozis Düzeylerinin Yükselmesi; ve Yükselmiş Olan Apoptozisin Varikoselektomi Sonrası Gerileme Düzeyi ve Düşresinin Tunel Yöntemi ile Değerlendirilmesi, Uzmanlık tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul, 69s., **2005**
- [96] Schindl A., Merwald H., Schindl L., Kaun C., Wojta J., 2003, Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation, *British Journal of Dermatology*, 148, 334-336, **2003**
- [97] Silva D.F.T., Mesquita-Ferrari R.A., Fernandes K.P.S., Raelle M.P., Wetter N.U., Deana A.M., 2012, Effective transmission of light for media culture, plates and tubes, *Photochemistry and Photobiology*, 88, 1211–1216, **2012**
- [98] Fratzl P., Gupta H.S., Paschalis E.P., Roschger P., 2004, Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone, *J. Mater. Chem.*, 14, 2115-2123, **2004**
- [99] Wiesmann HP., Hartig M., Stratmann U., Meyer U., Joos U., 2001, Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells in vitro, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1538, 28-37, **2001**
- [100] Ueda Y., Shimizu N., 2003, Effects of pulse frequency of low-level laser therapy (LLLT) on bone nodule formation in rat calvarial cells, *J Clin Laser Med Surg*, 21, 271–277, **2003**
- [101] Ozawa Y., Shimizu N., Kariya G., Abiko Y., 1998, Low-Energy Laser Irradiation Stimulates Bone Nodule Formation at Early Stages of Cell Culture in Rat Calvarial Cells, *Bone*, 22(4), 347-354, **1998**
- [102] Declercq H.A., Verbeeck R.M.H., De Ridder L., Schacht E.H., Cornelissen M.J., 2005, Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures, *Biomaterials*, 26, 4964–4974, **2005**
- [103] Xynos I.D., Hukkanen M.V., Batten J.J., Buttery L.D., Hench L.L., Polak J.M., 2000, Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro: implications and applications for bone tissue engineering, *Calcif Tissue Int.*, 67(4), 321–329, **2000**
- [104] Manjubala I., Woesz A., Pilz C., Rumpler M., Fratzl-Zelman N., Roschger P., Stampfl J., Fratzl P., 2005, Biomimetic mineral-organic composite scaffolds with controlled internal architecture, *Journal Of Materials Science: Materials In Medicine*, 16, 1111-1119, **2005**
- [105] Jiang T., Abdel-Fattah W., Laurencin C.T., 2006, In vitro evaluation of chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 27, 4894-4903, **2006**

EKLER

EK-1

PLAZMA ARK KAYNAĞINA AİT ENERJİ YOĞUNLUĞU GRAFIĞI

Tez kapsamında kullanılan plazma ark kaynağına ait dalga boyuna karşı verilen kompozit spektral ışınım grafiği Şekil 7.1’de verilmiştir.



Şekil 1. Işık kaynağına ait dalga boyu aralığını gösteren spektral ışınım grafiği.

Plazma ark ışık kaynağının dalga boyu aralığı 700-2500 nm’dir. Grafikten de anlaşıldığı gibi bu dalga boyları aralığına denk gelen enerji yoğunluğu 10^{-4} W/cm^2 ’dir.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Nazife ÜLKER
Doğum Yeri : ELAZIĞ
Medeni Hali : Bekar
E-posta : nazifeulker@gmail.com
Adresi : Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Lojmanları M/15, No:8
Merkez/Elazığ.

Eğitim

Lise : Özel Harput Koleji
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
Yabancı Dil : İngilizce

İş Deneyimi

2010 Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı
(Gönüllü Staj)

2013- Araştırma Görevlisi, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp
Bilimleri, Fizyoloji Anabilim Dalı, Elazığ.