

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DÜŞÜK FREKANSLI DARBELİ ELEKTROMANYETİK ALANIN  
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KÜLTÜRLERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Alın TOPRAKKALE**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2022**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### DÜŞÜK FREKANSLI DARBELİ ELEKTROMANYETİK ALANIN MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KÜLTÜRLERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Alım TOPRAKKALE

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Bu çalışmada düşük frekanslı darbeli elektromanyetik alana tâbi tutulan farklı biyokimyasal bileşimlere sahip nano-ölçekte modifiye edilmiş yüzeylerde kültürü yapılan mezenkimal kök hücrelerin matriks metalloproteinaz aktivitesine olan etkileri incelenmiştir. Çoğaltılan mezenkimal kök hücrelerin, içine belirli oranlarda hidroksiapatit katılan deselülerize kemik temelli hidrojellerin üzerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen hidrojellerin ve mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu bağlamda hidrojellerin SEM ve FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin ise üçlü soy, CFU ve akım sitometri analizleri gerçekleştirilmiştir. Hidrojel temelli özel kültür yüzeyleri üzerine mezenkimal kök hücre ekimi yapılmıştır. Özel kültür yüzeylerindeki hücreler, standart şartlar altında ve düşük frekanslı darbeli elektromanyetik alan etkisinde olmak üzere iki ayrı grupta incelenmiştir. Deney gruplarının iki ortamda da ALP,  $Ca^{+2}$  ve eş zamanlı-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda deselülerize kemik matriksi ve özellikle hidroksiapatit içeren bileşiminde ALP ve  $Ca^{+2}$  aktivitesinde zamana bağlı bir artış belirlenmiştir. Eş-zamanlı PCR çalışmalarında ise yine hidroksiapatit katkılı hidrojel substrat gruplarında diğerlerine oranla MMP-2 ifade seviyesinde yüksek bir artış gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada, oluşturulan deselülerize kemik temelli hidrojelin ve düşük frekanslı darbeli elektromanyetik alanın mezenkimal kök hücreleri osteojenik soya farklılaşmayı desteklediği sonucuna ulaşılmıştır.

**Haziran 2022, 86 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Mezenkimal kök hücreler, düşük frekanslı darbeli elektromanyetik alan, deselülerize kemik matriksi, matriks metalloproteinaz

## ABSTRACT

Master Thesis

### THE EFFECT OF LOW FREQUENCY PULSED ELECTROMAGNETIC FIELD EXPOSURE ON MESENCHYMAL STEM CELL CULTURES

Alim TOPRAKKALE

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

In this study, the effects of cell attachment substrate with different biochemical compositions and low frequency pulsed electromagnetic field on the matrix metalloproteinase activity of cultured mesenchymal stem cells were investigated. The proliferated mesenchymal stem cells were seeded on decellularized bone-based hydrogels in which hydroxyapatite was added at certain rates. Characterization studies of the developed hydrogels and mesenchymal stem cells were carried out. In this context, SEM and FTIR analyzes of the hydrogels were performed. Triple lineage, CFU and flow cytometry analyzes of mesenchymal stem cells were performed. Mesenchymal stem cells were seeded on created hydrogel culture surfaces. These culture surfaces were evaluated as two separate working groups, i.e. under standard, and low frequency pulsed electromagnetic field conditions. ALP,  $Ca^{+2}$  and real time-PCR analyzes were performed for both of the experimental groups. As a result of the analysis, a time-dependent increase in ALP and  $Ca^{+2}$  activity of cells was observed on the decellularized bone matrix, and especially in groups containing hydroxyapatite. In real time-PCR studies, a higher level of MMP-2 expression was observed in the hydroxyapatite-incorporated groups compared to those of others. Findings support the notion that, the formed decellularized bone-based hydrogel cell substrate, and low-frequency pulsed electromagnetic field supports the differentiation of mesenchymal stem cells into the osteogenic lineage.

**June 2022, 86 Pages**

**Key Words:** Mesenchymal stem cells, low frequency pulsed electromagnetic field, decellularized bone matrix, matrix metalloproteinase

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım süresince araştırmalarımın her aşamasında engin bilgisi, fikirleri ve tecrübesi ile bana yol gösteren, beni destekleyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e,

Çalışmalarım kapsamında benden yardım ve desteklerini esirgemeyen, deneylerimin her aşamasına değerli katkılarda bulunan hocam Sayın Prof. Dr. A. Eser ELÇİN'e,

Laboratuvarıda çalışmalarım boyunca bana destek ve yardımlarını esirgemeyen Dr. M. Taner VURAT'a,

Yüksek lisansım boyunca yanımda olan çalışma arkadaşlarıma,

Ve hayatım boyunca her konuda yanımda olan, benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım annem Handan TOPRAKKALE ve canım babam Uğur TOPRAKKALE'ye,

Teşekkürlerimi sunarım.

Alım TOPRAKKALE  
Ankara, Haziran 2022

## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Kök Hücreler.....	3
2.2 Mezenkimal Kök Hücreler.....	4
2.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşması ve Karakterizasyonu.....	6
2.4 Kök Hücrelerin Yenileyici Tıpta Kullanım Alanları.....	6
2.4.1 Embriyonik kök hücrelerin yenileyici tıpta kullanımı.....	7
2.4.2 Dokuya özgü progenitör kök hücrelerin yenileyici tıpta kullanımı.....	8
2.4.3 Mezenkimal kök hücrelerin yenileyici tıpta kullanımı.....	9
2.4.4 Göbek kordonu kök hücrelerin yenileyici tıpta kullanımı.....	10
2.4.5 Kemik iliği kök hücrelerinin yenileyici tıpta kullanımı.....	11
2.4.6 İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerin yenileyici tıpta kullanımı.....	12
2.5 Hücrelerin Yüzey Substratlarına Göre Hareketleri.....	13
2.5.1 Mezenkimal kök hücrelerin yüzey substratlarına göre hareketleri.....	14
2.6 Mekanotransdüksiyon.....	15
2.7 Deselülerizasyon.....	15
2.8 Matriks Metalloproteinaz.....	16
2.8.1 Kolajenazlar.....	17
2.8.2 Jelatinazlar.....	18
2.8.3 Stromelisinler.....	18
2.8.4 Matrilisinler.....	18
2.8.5 Membran-tipi matriks metalloproteinazlar.....	19
2.8.6 Diğer matriks metalloproteinazlar.....	19
2.9 Matriks Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri.....	20
2.10 Kemik Doku Gelişimi ve Yeniden Şekillenmesinde Matriks Metalloproteinazlar.....	20

2.11 Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşması Sırasında Matriks Metalloproteinazlar ve İnhibitörlerinin Rolü .....	25
2.12 Elektromanyetik Alan .....	25
2.12.1 Düşük frekanslı darbeli elektromanyetik alan .....	26
2.12.2 Kök hücreler ve kemik dokuda düşük frekanslı darbeli elektromanyetik alan etkisi.....	27
2.13 Kaynak Özetleri. ....	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	33
3.1 Materyal .....	33
3.2 Yöntem .....	36
3.2.1 Sığır kaynaklı kemik dokusunun deselülerizasyonu.....	36
3.2.2 Deselülerize kemik temelli hidrojel oluşturulması.....	37
3.2.3 Deselülerize kemik temelli hidrojellerin karakterizasyonları.....	37
3.2.3.1 SEM analizi.....	37
3.2.3.2 FTIR analizi.....	38
3.2.4 İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kültürü.....	38
3.2.5 İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu. ....	39
3.2.5.1 İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin farklılaştırma çalışmaları .....	39
3.2.5.1.1 Farklılaştırma çalışmalarının histokimyasal analizi .....	40
3.2.5.1.1.1 Alizarin kırmızısı boyaması.....	40
3.2.5.1.1.2 Von kossa boyaması .....	40
3.2.5.1.1.3 Sudan siyahı boyaması.....	40
3.2.5.1.1.4 Hematoksilen-eozin boyaması.....	41
3.2.5.2 CFU analizi. ....	41
3.2.5.3 Akım sitometri analizi.....	41
3.2.6 Özel kültür yüzeylerinin geliştirilmesi .....	42
3.2.6.1 Özel kültür yüzeylerinin analizleri.. ....	43
3.2.6.1.1 SEM analizi.....	43
3.2.7 İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ve özel kültür yüzeylerinin elektromanyetik alan ve standart inkübatörde analizleri.....	43
3.2.7.1 Metabolik analizler .....	43
3.2.7.1.1 Kalsiyum analizi.....	43
3.2.7.1.2 Alkalen fosfataz analizi.....	44
3.2.7.2 Gen ifadesi analizleri. ....	44
3.2.7.2.1 mRNA izolasyonu.....	44

3.2.7.2.2 mRNA miktarı ve saflığının belirlenmesi.....	45
3.2.7.2.3 Agaroz jel elektroforezi.....	45
3.2.7.2.4 cDNA sentezi .....	46
3.2.7.2.5 Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizi .....	47
3.3 İstatistiksel Analizler .....	49
4. BULGULAR .....	50
4.1 Deselülerize Kemik Temelli Hidrojellerin Karakterizasyon Bulguları.....	50
4.1.1 SEM analizi bulguları.....	50
4.1.2 FTIR analizi bulguları.....	53
4.2 İnsan Adipoz Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyon Bulguları.....	55
4.2.1 İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin üçlü soya farklılaştırılması bulguları.....	56
4.2.1.1 Üçlü soy farklılaşmasının histokimyasal bulguları .....	56
4.2.2 İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analizi bulguları.....	58
4.2.3 İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin CFU analizi bulguları .....	59
4.3 Özel Kültür Yüzeyi Analizlerinin Bulguları .....	60
4.3.1 SEM analizi bulguları.....	60
4.4 İnsan Adipoz Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Özel Kültür Yüzeylerinin Elektromanyetik Alan ve Standart İnkübatörde Analiz Bulguları.....	64
4.4.1 Metabolik analiz bulguları .....	67
4.4.1.1 Kalsiyum analizi bulguları .....	67
4.4.1.2 Alkalen fosfataz analizi bulguları .....	67
4.4.2 Gen ifadesi analizi bulguları .....	68
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	71
KAYNAKLAR.....	76
ÖZGEÇMİŞ.....	86

## SİMGELER DİZİNİ

Ca <sup>+2</sup>	Kalsiyum iyonu
Zn <sup>+2</sup>	Çinko iyonu
°C	Santigrat Derece
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit

### Kısaltmalar

ALP	Alkalen Fosfataz
BSA	Sığır Serum Albumini
CCK-8	Hücre Sayma Kiti-8
DFD-EMA	Düşük Frekanslı Darbeli Elektromanyetik Alan
DF-EMA	Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alan
DMEM	Dulbecco Modifiye Eagle Besiyeri
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DÖPKH	Dokuya Özgü Progenitör Kök Hücre
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EKH	Embriyonik Kök Hücre
EMA	Elektromanyetik Alan
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
G	Gauss
GKKH	Göbek Kordonu Kök Hücre
HA	Hidroksiapatit
HCV	Hepatit C Virüsü
HDM	Hücre Dışı Matriks
HKH	Hematopoietik Kök Hücre
ISCT	Uluslararası Hücre Tedavi Derneği
iADMKH	İnsan Adipoz Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
İBYV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
iKİMKH	İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre

iPKH	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
Kİ	Kemik İliği
KMP	Kemik Morfogenetik Proteini
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MMP	Matriks Metalloproteinaz
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MT-MMP	Membran Tipi Matriks Metalloproteinaz
MTT	3-4,5-Dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
P/S	Penisilin/Streptomisin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi
T	Tesla
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF- $\beta$ 1	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta 1
TIMP	Matriks Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri
TNF- $\alpha$	pro-Tümör Nekroz Faktörü
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Kök hücrelerin sınıflandırılması .....	4
Şekil 2.2 MKH'lerin çoklu potansiyeli .....	5
Şekil 2.3 MKH'lerin hücre soylarına farklılaşması .....	6
Şekil 2.4 Yenileyici tıpta embriyonik kök hücreler .....	8
Şekil 2.5 Yenileyici tıpta dokuya özgü progenitör kök hücreler .....	9
Şekil 2.6 Yenileyici tıpta mezenkimal kök hücreler .....	10
Şekil 2.7 Yenileyici tıpta göbek kordonu kök hücreleri .....	11
Şekil 2.8 Yenileyici tıpta kemik iliği kök hücreleri .....	12
Şekil 2.9 Yenileyici tıpta indüklenmiş pluripotent kök hücreler .....	13
Şekil 2.10 MMP alt gruplarının alan kompozisyonu ve yapısal özellikleri .....	17
Şekil 2.11 İntramembranöz kemikleşmenin şematik gösterimi .....	22
Şekil 2.12 Endokondral kemikleşmenin şematik gösterimi .....	23
Şekil 2.13 Kemik iyileşmesi adımlarının şematik gösterimi .....	25
Şekil 2.14 Karakteristik frekansları, dalga boyları ve elektromanyetik enerjisi ile elektromanyetik spektrum .....	27
Şekil 2.15 iADMKH büyümesinin 1., 4., 7., 10. ve 13. günden sonra CCK-8 ile ölçümü .....	30
Şekil 3.1 Düşük frekanslı darbeli elektromanyetik alan sistemi .....	35
Şekil 4.1 100X büyütmede deselülerize kemik temelli B, BH50 ve BH100 gruplarının SEM görüntüleri .....	50
Şekil 4.2 500X büyütmede deselülerize kemik temelli B, BH50 ve BH100 gruplarının SEM görüntüleri .....	52
Şekil 4.3 Deselülerize kemik temelli B, BH50 ve BH100 gruplarının FTIR spektrumları .....	54
Şekil 4.4 Kültürü yapılan ve çoğaltılan iADMKH'lerin invert mikroskop görüntüsü .....	55
Şekil 4.5 iADMKH'lerin sırasıyla adipojenik, osteojenik ve kardiyojenik farklılaştırılmasının invert mikroskop görüntüleri .....	56
Şekil 4.6 İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 21 günlük kültürde CFU görüntüleri .....	60
Şekil 4.7 100 X büyütmede üzerine iADMKH ekimi yapılan deselülerize kemik temelli B, BH50 ve BH100 gruplarının SEM görüntüleri .....	61
Şekil 4.8 500 X büyütmede üzerine iADMKH ekimi yapılan deselülerize kemik temelli B, BH50 ve BH100 gruplarının SEM görüntüleri .....	62
Şekil 4.9 Standart inkübatördeki iADMKH ve özel kültür yüzeylerinin belirlenen günlerde çekilen invert mikroskop büyütmesi .....	65

Şekil 4.10 DFD-EMA'daki iADMKH ve özel kültür yüzeylerinin belirlenen günlerde çekilen invert mikroskop büyütmesi .....	66
Şekil 4.11 Standart ve DFD-EMA grubu in vitro örneklerinin Ca <sup>2+</sup> değerleri .....	67
Şekil 4.12 Standart ve DFD-EMA grubu in vitro örneklerinin ALP değerleri .....	68
Şekil 4.13 Deney gruplarının 1. ve 3. günde standart (STD) inkübatör etkisinde MMP-2 ifadesi.....	69
Şekil 4.14 Deney gruplarının 1. ve 3. günde standart (STD) inkübatör etkisinde TIMP-1 ifadesi .....	69
Şekil 4.15 Deney gruplarının 3. günde DFD-EMA etkisinde MMP-2 ifadesi.....	70
Şekil 4.16 Deney gruplarının 3. günde DFD-EMA etkisinde TIMP-1 ifadesi. ....	70



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Akım sitometride kullanılan antikorlar ve floresan boyalar .....	42
Çizelge 3.2 cDNA sentezinde kalıp-primer karışımı .....	46
Çizelge 3.3 Master mix reaktifleri ve miktarları .....	47
Çizelge 3.4 Eş-zamanlı PCR karışımına eklenen bileşenler ve miktarları.....	48
Çizelge 3.5 Eş-zamanlı PCR’da kullanılan döngü koşulları.....	49
Çizelge 4.1 iADMKH akım sitometri sonuçları .....	59



## 1. GİRİŞ

İnsan vücudundaki hücreler ve dokular, çeşitli fiziksel güçlere ve kimyasal uyarılara maruz kalırlar. Mekanik kuvvetleri biyokimyasal faaliyetlere ve gen ifadesine dönüştürme süreci, mekanokimyasal transdüksiyon veya mekanotransdüksiyon olarak adlandırılmaktadır. Bununla birlikte canlı bir hücrenin gen ekspresyonunu düzenlemek, fizyolojik koşullar ve hastalıklarda canlı dokularda tutarlı biyolojik yanıtlar oluşturmak için mekanik sinyallerin kimyasal sinyallerle nasıl bütünleştiğini açıklığa kavuşturmada halen büyük zorluklar mevcuttur (Wang, 2017).

Elektromanyetik alan (EMA) insan vücudu üzerinde oldukça büyük bir etkiye sahiptir. Kemik bozuklukları, osteoartrit tedavisi, kırıldak yenilenmesi veya ağrının azaltılmasında fizyoterapide başarıyla kullanılmıştır. Son zamanlarda hücre / kök hücre kültürleri üzerinde *in vitro* deneylerde EMA'ların da uygulamaları görülmüştür. Kök hücreler, vücudumuzda çeşitli potansiyeller sergiledikleri yerler olarak hemen hemen bütün dokularda bulunurlar ve homeostazı, yenilenmeyi ve iyileşmeyi kontrol ettikleri için çok önemlidirler. İnsan vücudundaki dokuların tümü olmasa da çoğunun, yaralanma sonrası doku yenilenmesi ve onarımından sorumlu yetişkin kök hücreler içerdiği düşünülmektedir.

Buldukları nişin beraberinde yetişkin kök hücreler, biyokimyasal ve biyofiziksel uyarılara bağlı olarak istenen dokulara da farklılaşabilirler. Hücre göçü ve proliferasyonu, büyüme faktörlerinin ifadesi, sitokin modülasyonu ve daha fazlası, EMA'dan etkilenen süreçler arasında yer almaktadır. Bu etkilerin gözlemlenmesi sürecinde, düşük (30-300 kHz) ve aşırı düşük (3-30 Hz) frekanslarda bir EMA kullanılmıştır (Maziarsz vd. 2016).

Çoklu hücrel ve moleküler süreçleri etkilediği bilinen son derece düşük frekans darbeleri EMA 100 Hz'den daha az tanımlanmış bir frekansa sahip geniş bir salınımlı elektromanyetik alan yelpazesinden oluşmaktadırlar. Düşük frekanslı darbeleri EMA'lar, 50 veya 60 Hz'de elektrik gücünün yaygın olarak uygulanmasından dolayı çoğu toplulukta halk sağlığı için kritik kabul edilmektedirler (Oladnabi vd. 2019).

Mezenkimal kök hücreler (MKH), diğer dokuları ve organları çevreleyen bağ dokusunda bulunurlar ve osteoblast, adiposit, kondrositle beraber potansiyel olarak kas hücreleri, miyositler, nöronlar ve glial hücreler dâhil olmak üzere birçok hücre tipine farklılaşma yeteneği sergilerler. Yaralanma veya lezyon bölgesine göç ederek MKH'ler, doku onarımının önemli bir parçasını oluştururlar (Zhang vd. 2018). Mezenkimal kök hücreler ayrıca, kültür ortamındaki farklılaşmaya neden olan kimyasal faktörlerle beraber, aynı zamanda hücreleri çevreleyen ortamın sertliği ve nano / mikro yapı gibi fiziksel özelliklere yanıt olarak da farklılaşma yönlerini değiştirme yeteneğine sahiptirler (Yamazaki vd. 2020).

Çeşitli fizyolojik süreçleri düzenleyebilen matrisin ailesine ait endopeptidazlar olan matris metalloproteinazlar (MMP), hücre dışı matris (HDM) proteinini proteoliz yoluyla düzenler veya aktive eder ve biyolojik olarak işlevsel hale getirir. Matris metalloproteinazlar ve onların doku inhibitörleri (TIMP), insan yetişkin MKH öncülerinin olgun fenotiplere farklılaşmalarının son aşamalarında işlev gösterirler (Mannello vd. 2006).

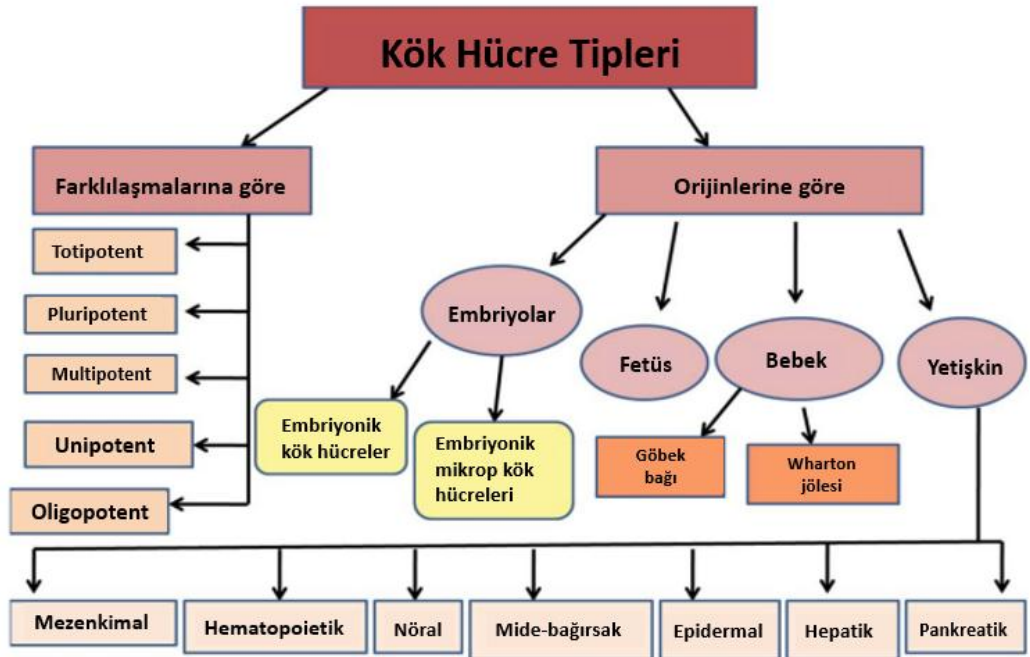
Bu tez çalışmasında, farklı biyokimyasal bileşimlere sahip nano-ölçekte modifiye edilmiş yüzeylerde kültürü yapılan ve düşük frekanslı darbeli elektromanyetik alana tabi tutulan mezenkimal kök hücrelerin matris metalloproteinaz enzimi aktivitesine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Kök Hücreler

1868 gibi erken bir tarihte kök hücre terimi, ünlü Alman biyolog Ernst Haeckel'in çalışmalarında bilimsel literatürde yer almaktadır (Haeckel, 1868). Darwin'in evrim teorisinin en büyük destekçilerinden biri olan Haeckel, ortak atalardan gelen canlıların evrimini temsil etmek amacıyla bir dizi filogenetik ağaç çizip bu ağaçlara "gövde ağaçları" adını vermiştir. Kök hücre terimi bu bağlamda Haeckel tarafından tüm çok hücreli organizmaların evrimleştiğini varsaydığı tek hücreli ata organizmayı tanımlamak için kullanılmıştır (Haeckel 1868, Haeckel 1874).

İnsan vücudundaki uzmanlaşmamış hücreler kök hücreler olarak adlandırılır. Hem embriyolarda hem de yetişkin hücrelerde bulunabilen bu hücreler bir organizmanın herhangi bir hücresine farklılaşabilme ve kendini yenileme yeteneğine sahiptirler (Zakrzewski vd. 2019). Kök hücreler üç temel kriter ile tanımlanır: Birincisi, bir kök hücre kendi kendine yenilenmesini sağlayan hücre bölünmelerine uğrar, yani en az bir adet aynı yavru hücreyi oluşturabilir bu da kök hücre havuzunu korumak için gereken bir özelliktir. İkincisi bir kök hücre soy farklılaşmasına uğrar ve böylece farklılaşmış progenitörler, öncü hücreler ve nihayetinde terminal olarak farklılaşmış hücreler haline gelir. Üçüncüsü, kök hücreler canlı dokuda sağlam bir şekilde yeniden çoğalırlar, bu sayede o dokunun hücre tiplerine farklılaşmak için belirli ipuçlarına yanıt verirler. Böylece bu hücre tipleri o dokunun işlevini üstlenebilir (Verfaillie, 2004). Kök hücreler embriyolardan, fetüsten, bebeklerden ve yetişkinden olmak üzere kökenlerine göre dört geniş türe ayrılabilir bununla beraber potenslerine göre sınıflandırılabilirler (Barky vd. 2017). Kök hücreler kökenlerine göre embriyonik, fetüs, infant ve yetişkin olmak üzere dörde ayrılır. Farklılaşmalarına göre ise totipotent, pluripotent, multipotent, unipotent ve oligopotent olmak üzere beşe ayrılır (Şekil 2.1).



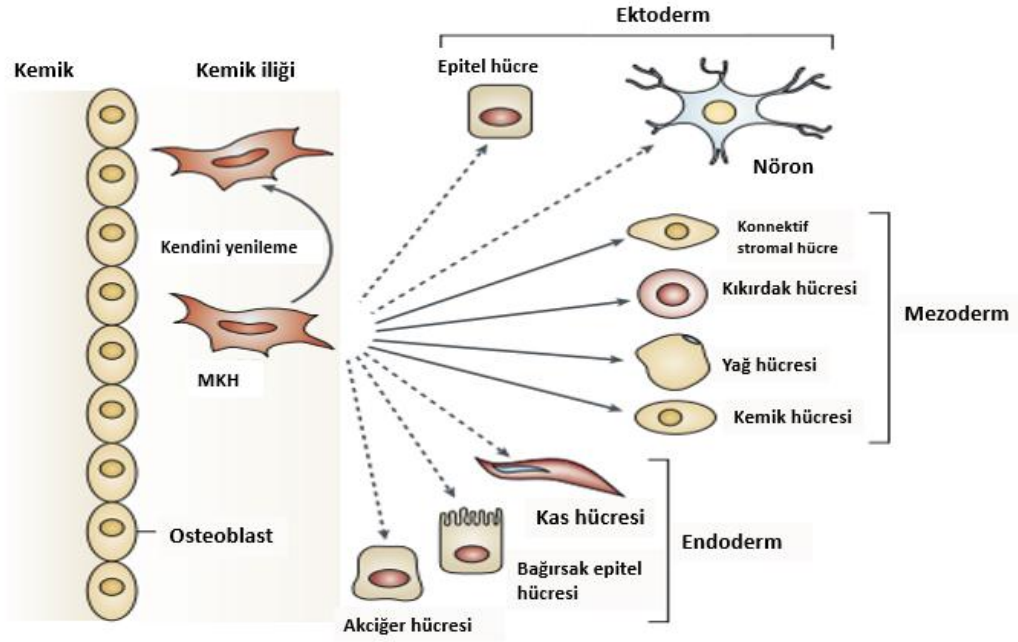
Şekil 2.1 Kök hücrelerin sınıflandırılması (Barky vd. 2017)

Bir kök hücre, birtakım uyarılardan sonra nişinden çıkıp kanda dolaşabilme potansiyeline sahiptir. Belirli mikro-çevresel koşullar altında farklılaşma programına girebilmek üzere hücre, daha sonra başka bir bölgeye çekilmelidir. Bu bağlamda, çeşitli somatik soylara farklılaşma potansiyeline sahip farklı bir hücre popülasyonu olan mezenkimal kök hücrelerin, yenilenme sürecini desteklemek üzere yerel olarak yaralı bölgelere göç ettikleri tanımlanmıştır (Barky vd. 2017).

## 2.2 Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler, kendi kendini yenileme ve çok potansiyelli farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir (Miana ve González, 2018). Bu iş şeklindeki hücreler, kemik iliğinin (Kİ) stromal bölgesinde bulunur ve 1966'da Friedenstein ve Petrakova tarafından yapılan bir çalışmada tanımlanmışlardır (Wang vd. 2020, Friedenstein vd. 1966). 1991'de bu tür Kİ'den izole edilmiş hücreler resmi olarak "mezenkimal kök hücreler" olarak adlandırılmıştır (Caplan, 1991). Birçok yetişkin dokudan izole edilebilen mezenkimal kök hücreler, heterojen bir stromal kök hücre alt kümesidir. Alternatif olarak multipotent mezenkimal stromal hücreler olarak da tanımlanabilen bu hücreler *in vitro* olarak plastiğe yapışık hücreler olarak çoğalan, fibroblast (iğsi) benzeri

morfolojik yapıya sahip, *in vitro* koloniler oluşturan ve kemik, kıkırdak ve yağ hücrelerine farklılaşabilen heterojen bir hücre popülasyonudur (Şekil 2.2).

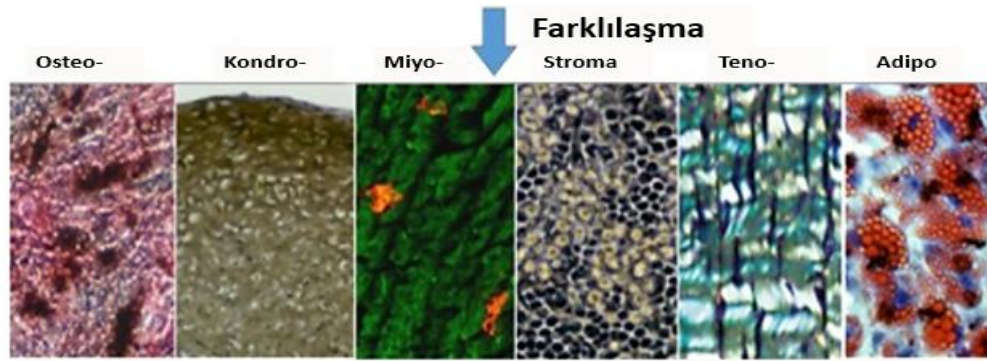


Şekil 2.2 Mezenkimal kök hücrelerin çoklu potansiyeli (Uccelli vd. 2008).

Yağ dokusu, plasenta, amniyotik sıvı ve göbek kordonu kanı gibi diğer dokulardan da izole edilebilen MKH'ler, en yaygın yöntem olarak kemik iliğinden izole edilirler. MKH'ler ulaşılabilirlikleri ve uygun genişleme protokolleri nedeniyle hücresel tedavi için umut verici adaylar olarak kabul edilmişlerdir ve bununla beraber, MKH'lere artan ilgi farklı kaynaklardan izole edilmiş ve çeşitli protokollerden genişletilmiş MKH'lerin eşdeğerliğinin sorgulanmasına sebebiyet vermiştir. Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği'nin (ISCT) Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi bu sorunu çözmek için insan MKH'lerini evrensel olarak tanımlamak üzere minimum kriterleri geliştirmiştir. Mezenkimal kök hücreler plastiğe yapışıp çoğalma, spesifik yüzey antijen ekspresyonunu gösterme (CD73 CD90 CD105 CD34- CD45- CD11b- CD14- CD19- CD79a- HLA-DR-) ve ayrıca standart *in vitro* koşullar altında multipotent farklılaşma potansiyeli taşırlar (Kim ve Cho, 2013).

### 2.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşması ve Karakterizasyonu

MKH'lerin karakterizasyonunda, kökene özgü düzenleyicilerden oluşan kültür koşulları altında çoklu farklılaşma potansiyelleri gözlemlenmektedir (Hwang vd. 2009). Transkriptom, proteom, immünofenotip ve immünomodülatör aktiviteleri MKH tiplerine göre farklılık göstermektedir ve MKH'ye özgü kritik bir özellik olarak farklılaşma potansiyelleri hücre kaderini etkilemektedir (Han vd 2019). Ayrı spesifik *in vitro* koşullar altında kültürle genişletilmiş MKH'ler, osteoblastlar, kondrositler ve adipositler gibi çok sayıda hücre soyuna farklılaşabilir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Mezenkimal kök hücrelerin hücre soylarına farklılaşması (Pittenger vd. 2019).

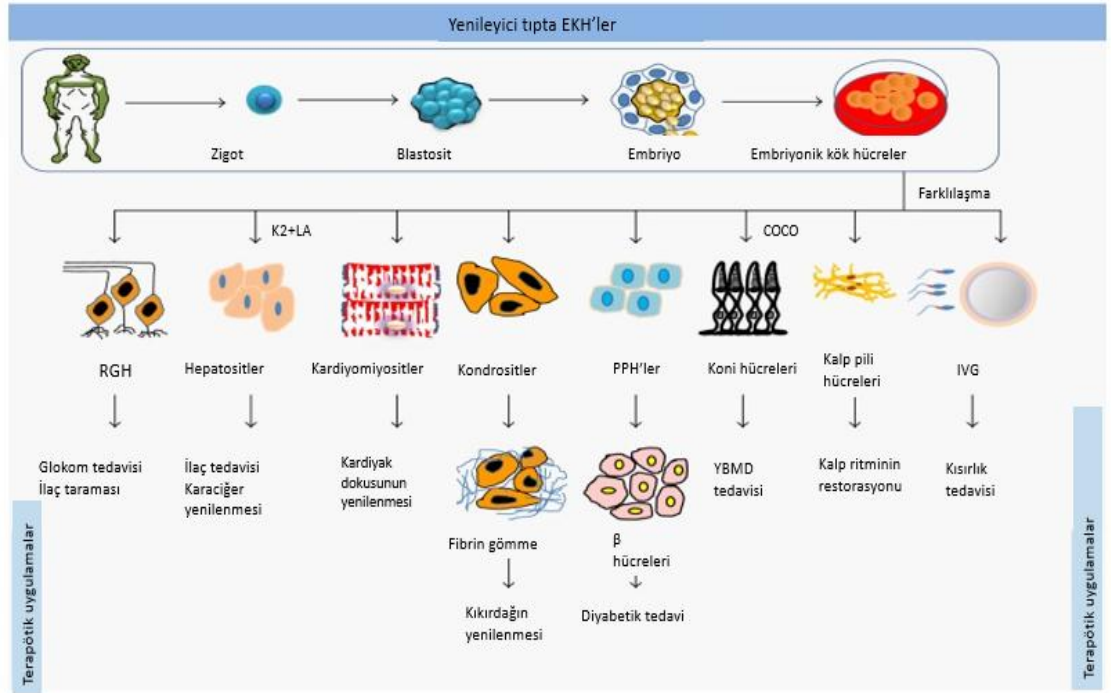
### 2.4 Kök Hücrelerin Yenileyici Tıpta Kullanım Alanları

Kök hücreler, sonsuz hücreye bölünme potansiyeline sahip olmanın yanı sıra, diğer hücre türlerine farklılaşabilme özelliğine de sahip hücrelerdir ve son zamanlarda doğuştan kusurlar, hastalıklar ve yaşla ilişkili etkiler nedeniyle ortaya çıkan doku ve organ anomalilerinin düzeltilmesi için ön safta yenileyici tıp kaynağı olarak ortaya çıkmışlardır (Mahla, 2016). Yenileyici uygulamalar temelinde kök hücreler, embriyonik kök hücreler (EKH'ler), dokuya özgü progenitör kök hücreler (DÖPKH'ler), MKH'ler, göbek kordonu kök hücreleri (GKKH'ler), insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreleri (iKİMKH'ler) ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH'ler) olmak üzere altı sınıfta kategorize edilebilirler. Kök hücre yenileyici tıp yaklaşımları ve organoid

gelişimi için hücre nakli, malzeme bilimi ve mikro mühendislik ilkelerini birleştiren doku mühendisliği, yenileyici tıp ile birlikte hasarlı doku ve organların fizyolojik onarımında işlev gören bir bilim dalıdır. Biyolojik olarak parçalanabilen 3 boyutlu iskeleler üzerinde yeni oluşan doku üretilirken, doku mühendisliği teknolojilerinden yararlanır (Leferink vd. 2015, Gubareva vd. 2016). İdeal yapı iskeleleri, hücre yapışmasına ve büyümelerine yardım ederek, hedef dokunun mekaniğini taklit eder böylece uygun doku perfüzyonu için anjiyogenez ve neovaskülarizasyonu destekler ve konakçı için immünojenik olmadıkları için sistemik immün baskılayıcı gerektirmezler (Garzón vd. 2012). Doku naklinde kök hücre sayısı yenileyici sonucu etkilediği için bu durumda, transplantasyonu yapılabilecek kök hücrelerin önceden ex vivo genişlemesi gereklidir (Thompson vd. 2016, Nathamgari vd. 2015). Başarılı yenileyici sonuçlar elde etmek için nakli yapılan kök hücreler, bölgeye özel bir şekilde hayatta kalmalı, çoğalmalı ve farklılaşmalı ve konakçı dolaşım sistemine entegre olmalıdırlar (Mahla, 2016).

#### **2.4.1 Embriyonik kök hücrelerin yenileyici tıpta kullanımı**

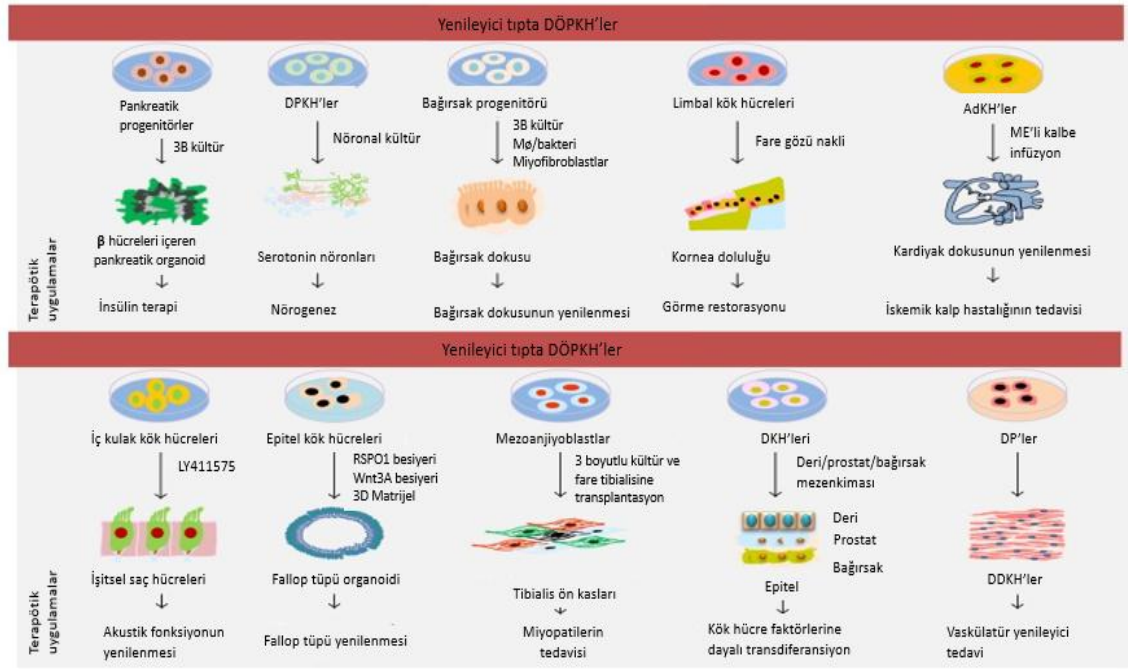
Thomson, 1998 yılında ilk kez insan embriyonik kök hücrelerini izole etmiştir. Gastrulanın iç hücre kütesinden kaynaklanan ve yapıları gereği pluripotent olan EKH'ler, 200'den fazla hücre türüne farklılaşabilir ve her türlü hastalığın tedavisi için vaatler verebilir (Thomson vd. 1998) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Yenileyici tıpta embriyonik kök hücreler (Mahla, 2016).

#### 2.4.2 Dokuya özgü progenitör kök hücrelerin yenileyici tıpta kullanımı

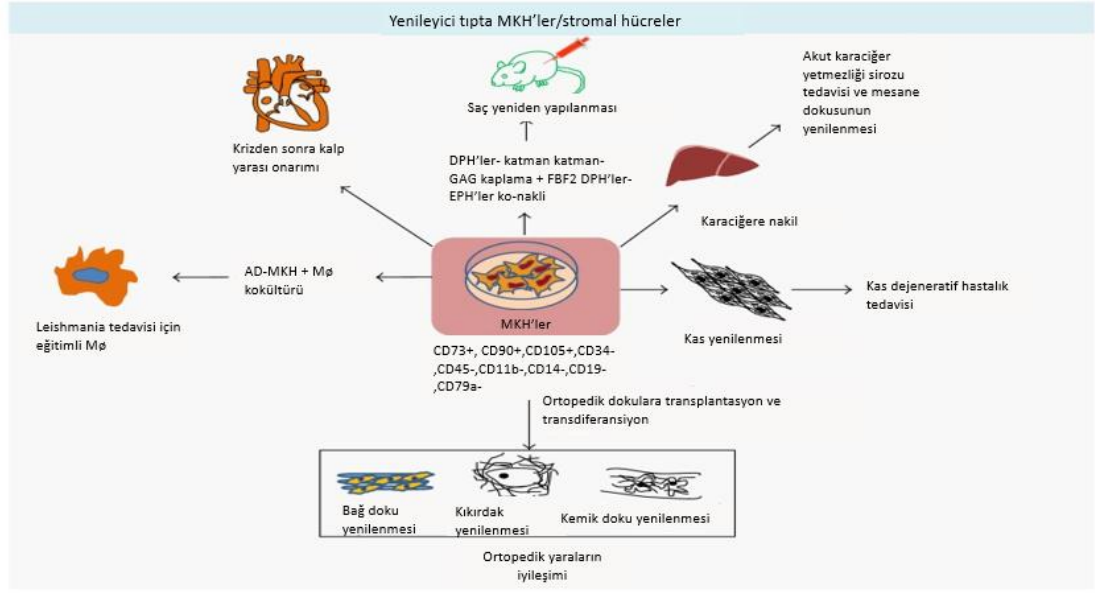
Dokuya özgü progenitör kök hücreler, dokunun diğer hücrelerine farklılaşma potansiyeline sahiplerdir ve devamlı hücre bölünmesi yoluyla doku homeostazını sürdürürler, ancak EKH'lerden farklı olarak, DÖPKH'ler kök hücrelerin plastisitesini ve dokuya özgü farklılaşmayı koruyarak birkaç hücre türüne yol açar. Toplam hücre popülasyonuna göre DÖPKH popülasyonu sayısı çok düşüktür bu durumda, bu hücrelerin hasat edilmesi ve *in vitro* manipülasyonu, onları terapötik ölçekte araştırmak açısından gerçekten zordur (Greggio vd. 2013), ancak insan vücudunun çeşitli DÖPKH türlerinden temeli vardır (Mahla, 2016). Karmaşık biyomalzemedeki DÖPKH'lerin üç boyutlu kültürü, pankreas progenitöründen gelen pankreas organoidleri, bağırsak progenitör hücrelerinden bağırsak doku organoidleri ve fallop tüpü epitel hücrelerinden fallop tüpü organoidleri gibi doku organoidlerine yol açmaktadır. Hücreler, DÖPKH'ler tarafından salgılanan hücre büyümesi ve transformasyon faktörleri tarafından değişerek diğer hücre türleri haline gelebilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Yenileyici tıpta dokuya özgü progenitör kök hücreler (Mahla, 2016).

### 2.4.3 Mezenkimal kök hücrelerin yenileyici tıpta kullanımı

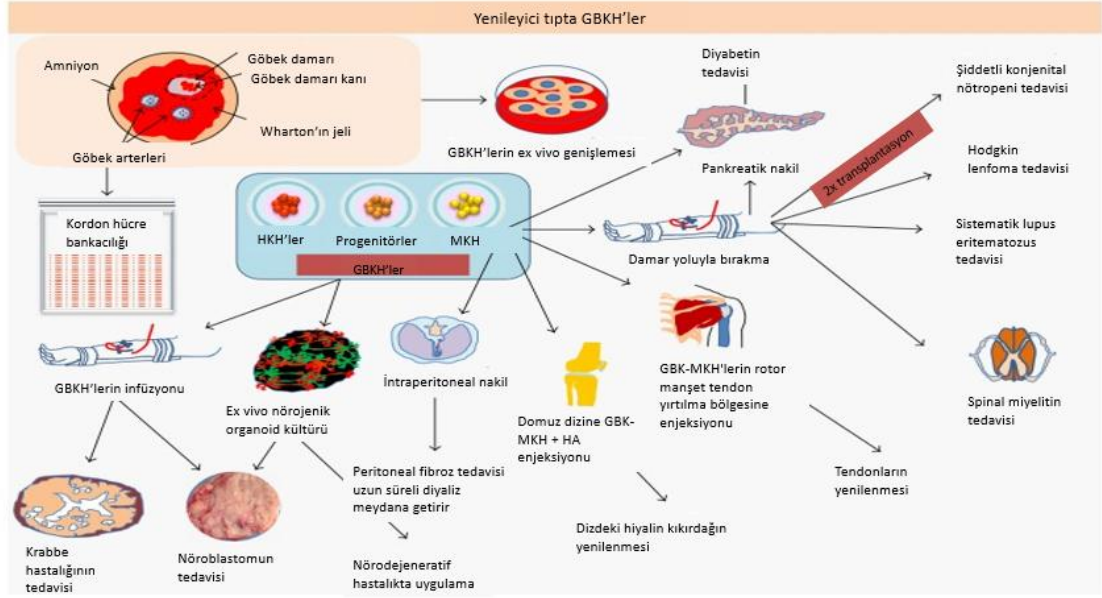
Çok soylu kök hücreler olan mezenkimal kök hücreler, yalnızca tendonları, kemiği, kıkırdağı, bağları, kasları ve nöronları içeren mezodermal kaynaklı dokularda farklılaşırlar. MKH'ler, belirteç olarak yüksek düzeyde CD73+, CD90+, CD105+ ve yüksek düzeyde CD11b-, CD14-, CD19-, CD34-, CD45-, CD79a-, HLA-DR ifade eden hücrelerdir (Dominici vd. 2006). Mezenkimal kök hücrelerin yenileyici tıpta uygulanması, devam eden klinik çalışmalardan, farklı tamamlama durumlarına göre aşamalandırılarak geliştirilebilir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Yenileyici tıpta mezenkimal kök hücreler (Mahla, 2016).

#### 2.4.4 Göbek kordonu kök hücrelerin yenileyici tıpta kullanımı

Göbek kordonu genellikle doğum sırasında atılır ve EKH'lere göre daha az etik kısıtlamalara sahip, noninvaziv bir şekilde elde edilen kök hücreler için bilinen en iyi kaynaktır. Hematopoyetik kök hücreler (HKH'ler) ve mezenkimal kök hücreler, göbek kordonundan elde edilebilirler ve oldukça büyük bir yenilenme potansiyeline sahiptirler (Shahrokhi vd. 2012). Kordon kanının HKH'leri kan hücrelerinin ve koruyucu bağışıklık hücrelerinin devamlı olarak yenilenmesinde görev alır (Mahla, 2016). Kişiselleştirilmiş terapi ve yenileyici tıp için kordon kanı kök hücre bankacılığı, oldukça iyi ve uzun süreli bir kök hücre kaynağıdır (Şekil 2.7).

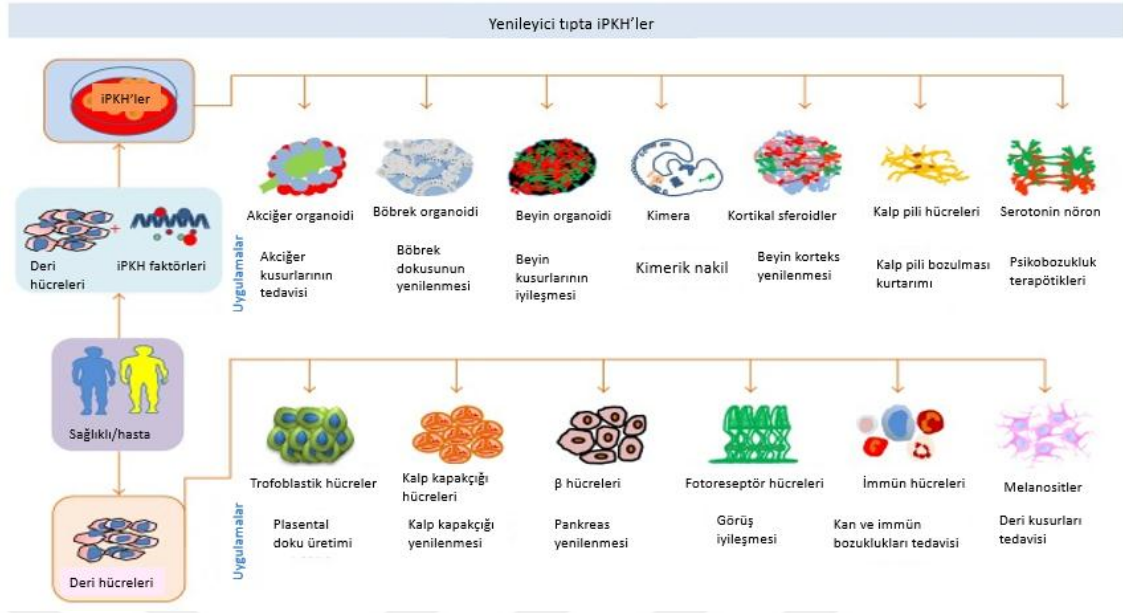


Şekil 2.7 Yenileyici tıpta göbek kordonu kök hücreleri (Mahla, 2016).

#### 2.4.5 Kemik iliği kök hücrelerinin yenileyici tıpta kullanımı

Kan hücreleri üreten hematopoietik kök hücreler ile yağ, kıkırdak ve kemik üreten stromal hücreleri içeren, yumuşak sünger bir kemik dokusu olan kemik iliği, stromal, hematopoietik, mezenkimal ve progenitör kök hücrelerden oluşur tüm periferik kanın oluşumundan sorumludur (Mahla, 2016). Kemik iliğinin kırmızı ilik ve sarı ilikten meydana gelir (Travlos, 2006). İlik kompozisyonundaki bir dengesizlik durumu hastalıklı duruma neden olabilmektedir. Kemik iliği nakli 1980 yılından beri kanser tedavisi için geniş çapta kabul görmektedir (Gschweng vd. 2014). Bu multipotent kök hücreler, konağı kanserden ve insan bağışıklık eksikliği/ yetmezliği virüsü (İBYV) ve hepatit C (HCV) enfeksiyonundan iyileştirebilmekle beraber, beyin dokusunu, diyafram dokusunu ve karaciğer dokusunu yenileyebilir (Şekil 2.8).





Şekil 2.9 Yenileyici tıpta indüklenmiş pluripotent kök hücreler (Mahla, 2016).

## 2.5 Hücrelerin yüzey substratlarına göre hareketleri

Biyomalzemelerin daha iyi şekilde tasarlanmalarında ve implantların dokularla entegrasyonunda hücre-substrat etkileşimleri çok önemli bir rol oynamaktadır. Hücre zarının yüzey molekülleri ile hücrelerin alt tabakaya bağlanma süreci yapışma olarak adlandırılmaktadır. Birçok faktör hücre yapışmasını etkileyebilir ve bunlar arasında substrat yüzey kimyası, topografya ve sertlik örnek olarak gösterilebilir. Bu faktörler fiziksel ve kimyasal olarak hücrenin yapışma kuvvetini, yayılmasını, şeklini, kaderini yönlendirip etkilemektedir. Fotolitografi, elektron ışını litografisi, mikro temas baskısı ve mikroakışkanlar, biyomalzemeler üzerinde istenen hücresel tepkileri ortaya çıkarmak için en yaygın kullanılan yüzey mühendisliği yöntemlerindedir. Bu yöntemler sayesinde hücreler üzerinde yapışma, göç, farklılaşma gibi farklı etkileri kontrol edebilen substratların üretilmesi oldukça kolay hale gelmektedir. Üretilen substrat, hücrenin birçok özelliğini kontrol edebilme özelliğine sahiptir (Ermiş vd. 2018). Çeşitli fiziksel ve kimyasal sinyaller ile substrat, yapışma, göç, çoğalma ve morfoloji ile birlikte hücreye aynı zamanda destek verir (Hasırcı ve Kenar 2006, Hasırcı ve Pepe-Mooney, 2012). Hücrenin fonksiyonları, kullanılan substrat içeriğinin kimyasal özelliklerine bağlı olarak değişebilmekle beraber, yine hücre tipi, desen boyutu,

geometrisi ve substrat katılığı da hücre fonksiyonunu etkileyebilen özellikler arasındadır (Bettinger vd. 2009).

Hücrelerin davranışlarının düzenlenmesinde, hücre dışı matriks ve komşu hücreler ile olan iletişimleri oldukça önemlidir (Geiger vd. 2001). Hücreler, hücre iskelet mimarisi ve gen ifadesinde uyumla sonuçlanan sinyaller ile mekanik ipuçlarına tepki verirken, fiziksel ortamlarını da doku, organ, organizma düzeyinde algılar ve yanıt verirler (Üzer vd. 2016). HDM'ye yapışma, her tür yapışık hücre tarafından sağlanmaktadır. Hücreler, integrinler adı verilen spesifik hücre yüzeyi proteinleri ile HDM'ye yapışma özelliği gösterir ve bu proteinler hücre iskeletinin düzenlenmesine katkıda bulunurlar (Mitra vd. 2005, Isermann ve Lammerding 2013, Tsimbouri 2015). Elektrostatik ve van der Waals kuvvetleri gibi etkileşimler yoluyla hücre-yüzey etkileşimindeki ilk olay meydana gelir. Fibronektin, hücre yüzeyindeki olan integrinlere bağlanır ve bu yapı, talin ve vinculin proteinleri ile bağlanarak sitoplazmadaki aktin filamanlarına bağlanır. Aktin hücre iskeleti ile hızla birleşen bağlı reseptörler fokal adezyonlar oluşturmak için birlikte kümelenir (Hasırcı ve Pepe-Mooney, 2012).

### **2.5.1 Mezenkimal kök hücrelerin yüzey substratlarına göre hareketleri**

MKH şeklinin kontrolünün, substrat sertliğinin veya mevcut temas yüzey alanının *in vitro* kontrolü yoluyla stabil bir farklılaşma yolunu belirleyebileceği gösterilmiştir (Engler vd. 2004, 2006, Pittenger vd. 1999, McBeath vd. 2004, Kurpinski vd. 2006). Nispeten sert sentetik substratlar ve / veya geniş bağlanma yüzey alanına sahip substratlar üzerine kaplanan MKH'lerin morfolojisi yönlendirici kimyasal ipuçlarının yokluğunda düzleşmiş görünür ve bu, farklılaşmış osteoblastların tipik bir fenotipini temsil eder (McBeath vd. 2004, Engler vd. 2006). Kimyasal olarak büyümeyi destekleyen (inert) ortamın varlığında yumuşak substratlar üzerine plakalandıklarında ise MKH'ler, farklılaşmış nöronal hücrelerle orantılı, daha iç benzeri bir uzun fenotip varsayarlar (Engler vd. 2006). Bu nedenle ortaya çıkan yol gösterici bir ilke, *in vitro* substrat ipuçları aracılığıyla farklılaşmanın ancak dikkatli bir kuvvet dengeleme ile indüklenebileceğidir bunun yanı sıra, artan her gelişim basamağında giderek artan substrat sertliği gereklidir (Chowdhury vd. 2010). MKH'nin farklılaşması HDM

substratının topografyası ve mekanik iletim yolu aracılığıyla indüklenebilir (Ebrahimi, 2019).

## **2.6 Mekanotransdüksiyon**

Hücrelerin mekanik uyarıları biyokimyasal sinyallere dönüştürdüğü süreç, mekanotransdüksiyon olarak adlandırılır (Wang vd. 2009). Hücrelerin fiziksel ortamlarını algılamalarını ve yapılarını ve işlevlerini ayarlayarak tepki vermelerini sağlamakla birlikte mekanotransdüksiyon, kan basıncının düzenlenmesinde, kemiğin yeniden şekillenmesinde, kasın korunmasında ve dokunma ve sesin algılanmasında rol almaktadır. Çoğu hücre tipinde hücre büyümesi, göçü ve gen ekspresyonu, mekanotransdüksiyondan etkilenir (Dalby, 2005). Uygulanan kuvvetleri ve substrat sertliğini algılamak için hücreler, çeşitli mekanosensitif elemanlardan yararlanırlar (McGregor vd. 2016).

## **2.7 Deselülerizasyon**

İlk kez 1973'te planlanan dokuyu korumak amacıyla bir yöntem olarak doku hücresizleştirilmesi, yanık hastaları için koruyucu bir bariyer olarak bildirilmiştir (Elliott ve Hoehn, 1973). Yapısal ve işlevsel moleküllerin bir karışımını içeren bozulmamış bir HDM'yi geride bırakırken aynı zamanda bir bağışıklık tepkisini başlatacak bir dokudan allojenik veya zenojenik hücrel antijenlerin uzaklaştırılması işlemi hücresizleştirme olarak adlandırılır (Srokowski ve Woodhouse, 2011). Deselülerizasyon işlemi, doğal HDM dokusunun bileşimini, organizasyonunu, biyolojik aktivitesini ve mekanik bütünlüğünü koruyarak, bütün hücrel materyalleri ortadan kaldıran fiziksel, kimyasal ve enzimatik muameleden meydana gelir. Hücre dışı matriksin her doku tipi için karakteristik olan biyokimyasal bileşimi ve üç boyutlu organizasyonu, doku yapısının yanı sıra dokuda yerleşik hücreler tarafından salgılanan fonksiyonel molekülleri de içerir (Mattioli-Belmonte vd. 2019). Hücre mikro ortamının karmaşıklığını özetleyen sentetik yapı iskelelerinin hazırlanmasıyla ilişkili zorluklar, doğal olarak türetilmiş hücre dışı matriksin kendisinin kullanımına olan ilgiyi arttırmıştır (Gilpin ve Yang, 2017). Hücresizleştirmenin asıl amacı, HDM'nin yapısal, biyokimyasal ve biyomekanik

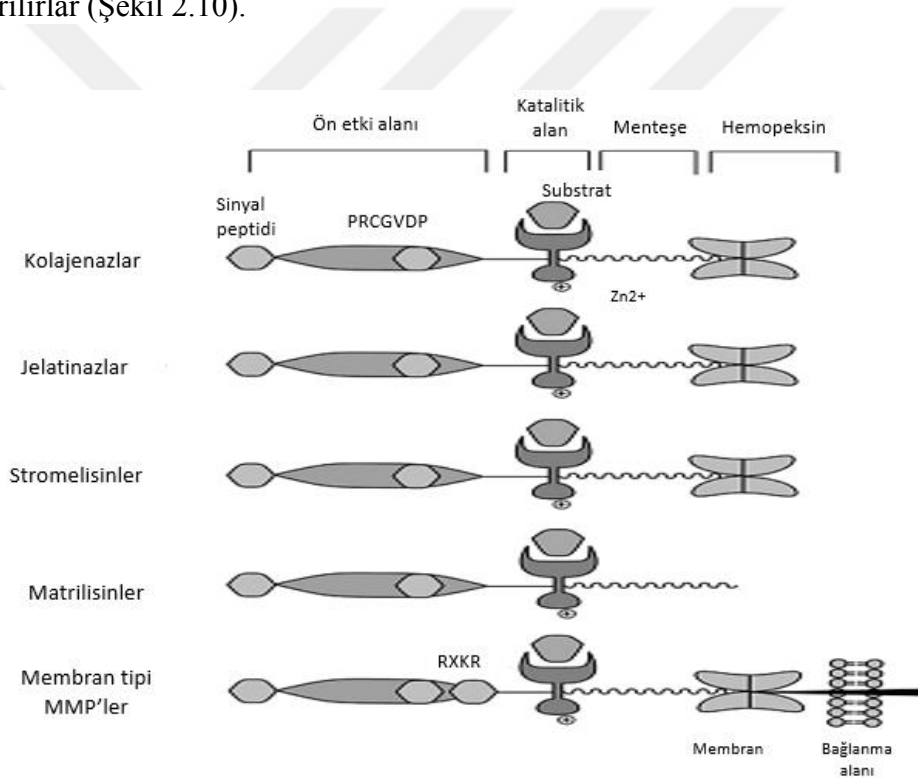
ipuçlarını korurken, doğal hücrelerden ve deoksiribonükleik asit (DNA) gibi genetik materyallerden uzaklaştırmaktır ve bunun için kimyasal ve enzimatik, fiziksel veya birleşik yöntemler kullanılır. Hücrelerin çıkarılması, genetik materyalin ortadan kaldırılması, protein içeriğinin korunması ve mekanik özelliklerin korunmasını özelliklerinin llmesiyle hcresizleştirilmiş HDM'nin kalitesi değerlendirilmektedir. Kan damarı, kalp kapakçığı, kornea, trakea, yemek borusu, idrar kesesi, böbrek, karaciğer, akciğer ve kalp dâhil olmak üzere hcresizleştirilmiş HDM çeşitli doku ve organ türlerini yeniden oluşturmak için başarıyla kullanılmıştır (Gilpin ve Yang, 2017).

Kemik dokusu yenilenmesi ise, düşük seviyelerde kemik morfojenetik proteinlerini (KMP'ler) de kapsayan, osteokondüktif yapıda kemik grefti ile temsil edilmektedir. Kemik hcresizleştirmesi ve demineralizasyonu hücreler için bir matriks olarak kullanılabilmele beraber osteokondüktif özellikleri koruyan, süngerimsi ve deforme olabilen bir yapı iskelesi ile sonuçlanır ve bu nedenle iskele olarak hcresizleştirilmiş kemik matriksinin kullanımı, yerleşik veya tohumlanmış hücrelerin davranışını etkileyen dokuya özgü HDM ipuçlarını verebilir (Mattioli-Belmonte vd. 2019).

## **2.8 Matriks Metalloproteinaz**

Matriks metalloproteinazlar, kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) ve çinkoya ( $Zn^{2+}$ ) bağlı olup insan organizmasındaki fizyolojik ve patolojik süreçlerde yer alan proteolitik bir enzim ailesidir ve metzincin süper familyası olarak adlandırılan geniş proteinaz ailesinin de bir üyesidir (Djuric ve Zivkovic, 2017). İnsanlarda MMP'leri çoğaltılan MMP-23 geni de dâhil olmak üzere kodlayan 24 adet gen vardır bu da insanlarda 23 farklı MMP olduğu anlamına gelir (Murphy ve Nagase, 2008). Bu enzim ailesi Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği tarafından MMP olarak adlandırılmıştır ve enzim ailesinin her bir üyesine bir numara (MMP-1, -2, -3 vb.) verilmiştir (Iyer vd. 2012). Katalitik bölgelerinde inko ( $Zn^{2+}$ ) bağlanma motifine sahip olma, aktif olmayan enzim formunda salgılanma, kararlılık için kalsiyuma ( $Ca^{2+}$ ) ihtiyaç duyma, nötral pH'da işlev sahibi olma ve TIMP'ler tarafından inhibe edilme bütün MMP'lerin sahip olduğu ortak özelliklerdir (Djuric ve Zivkovic, 2017).

MMP'lerin proteini en az üç homolog alan içerir, bu alanlar protein sekresyonundan sorumlu sinyal peptidi, enzimin aktivasyonu için gerekli olan ve bir konsensüs sistein-anahtar dizisi içeren propeptid alanı ve proteolitik aktiviteden sorumlu olan çinko bağlayıcı bir konsensüs sekansı içeren bir katalitik alandır (Djuric ve Zivkovic, 2017). Farklı şekillere sahip olan ve bu şekillere göre sınıflandırılabilen MMP'lerde en yaygın sınıflandırma biçimi alt tabaka özgüllüklerine ve temel alan yapısına dayanır (Djuric ve Zivkovic, 2017). MMP'ler bu kriterlere göre kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilisinler ve membran tipi-matriks metalloproteinazlar (MT-MMP'ler) ve “diğerleri” olmak üzere altı sınıfa ayrılır (Djuric ve Zivkovic, 2017). “Diğerleri” sınıftaki MMP'ler bu beş gruptan hiçbirine üye değildir bu nedenle “diğerleri” olarak adlandırılırlar (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Matriks metalloproteinaz alt gruplarının alan kompozisyonu ve yapısal özellikleri (Djuric ve Zivkovic, 2017).

### 2.8.1 Kollajenazlar

MMP-1, MMP-8, MMP-13 ve MMP-18 (Xenopus) kollajenaz grubunun üyesidirler (Visse ve Nagase, 2003). Bu enzimlerin temel özelliği, interstisyel kollajen I, II ve III'ü N terminalinden üçte üçü belirli bir bölgede yarma kabiliyetleridir. Kollajenazlar ayrıca

bir dizi başka HDM ve HDM olmayan molekülü de sindirebilme özelliğine sahiplerdir (Visse ve Nagase, 2003).

### **2.8.2 Jelatinazlar**

MMP-2 ve MMP-9 jelatinazları oluştururlar (Visse ve Nagase, 2003). Bu iki enzim denatüre kollajenleri ve jelatinleri kolayca sindirebilme özelliğine sahiptirler (Visse ve Nagase 2003, Allan vd. 1995). MMP-2 tip I, II ve III kollajenleri sindirir ancak MMP-9'un böyle bir özelliği yoktur (Aimes ve Quigley 1995, Patterson vd. 2001). MMP-2'ye sahip olmayan fareler belirgin bir anormallik olmadan gelişmesine rağmen insanlarda MMP-2'deki aktif enzimin yokluğuyla sonuçlanan mutasyonlar, etkilenen kemiklerin tahrip olmasına ve emilmesine neden olan nadir görülen bir genetik bozukluk olan otozomal resesif multisentrik osteoliz formu ile bağlantılıdır (Itoh vd. 1997, Martignetti vd. 2001). Bu durum insanlarda MMP-2'nin kemik oluşumu için büyük önem taşıdığını gösterir (Martignetti vd. 2001).

### **2.8.3 Stromelisinler**

MMP-3 ve MMP-10 stromelisinleri oluşturur ve MMP-3'ün MMP-10'a göre daha yüksek bir proteolitik verimi vardır (Visse ve Nagase, 2003). MMP-3 bir dizi proMMP'yi aktive etmekle beraber HDM bileşenlerini de sindirme özelliğine sahiptir (Suzuki vd. 1990).

### **2.8.4 Matrilisinler**

Matrilisinler, hemopeksin domaininin olmaması ile karakterizelerdir. Matrilisin 1 (MMP-7) ve matrilisin 2 (MMP-26) bu gruptadır ve endometaz olarak da adlandırılırlar (Uria ve López-Otín 2000, Park vd. 2000). HDM bileşenlerinin yanında MMP-7 pro- $\alpha$ -defensin, Fas-ligand, pro-tümör nekroz faktörü (TNF)- $\alpha$  ve E-kaderin gibi hücre yüzeyi moleküllerini işler. Matrilisin 2'nin (MMP-26) ayrıca bir dizi HDM bileşenini sindirme işlevi vardır (Visse ve Nagase, 2003).

### **2.8.5 Membran-tipi matriks metalloproteinazlar**

Dördü tip I transmembran proteinler (MMP-14, MMP-15, MMP-16 ve MMP-24) ve ikisi glikosilfosfatidilinositol bağlantılı proteinler (MMP-17 ve MMP-25) olmak üzere altı adet membran-tipi MMP vardır (Visse ve Nagase, 2003). MT1-MMP ise tip I, II ve III kollajenler üzerinde kollajenolitik aktiviteye sahip olan membran-tipi MMP'dir (Ohuchi vd. 1997). Bu özelliğe sahip MT1-MMP'den yoksun fareler, doğum sonrası gelişim sırasında iskelet anormallikleri sergilerler (Holmbeck vd. 1999). MT1-MMP kollajenler üzerindeki aktivitesinin yanı sıra anjiyogenezde de önemli bir rol alır (Pepper 2001). Temel olarak serebellumda ifade edilen ve beyni özgü olan enzim ise MT5-MMP'dir (Sekine-Aizawa vd. 2001). Menenjiyomlarda ifade edilmeyen MT6-MMP (MMP-25) ise neredeyse sadece periferik kan lökositlerinde, anaplastik astrositomlarda ve glioblastomlarda ifade edilir (Velasco vd. 2000, Pei 1999).

### **2.8.6 Diğer matriks metalloproteinazlar**

Yedi adet MMP yukarıdaki sınıflardan herhangi birinin üyesi değildir (Visse ve Nagase, 2003). Metalloelastaz olarak adlandırılan MMP-12 esas olarak makrofajlarda eksprese edilen ve makrofaj göçü için gerekli olan bir enzimdir (Shapiro vd. 1993, Shipley vd. 1996). Bu enzim elastin haricinde bir dizi başka proteini de parçalar (Visse ve Nagase, 2003). MMP-19, "diğerleri" grubunun bir başka üyesidir (Péndas vd. 1997, Kolb vd. 1997). Amelogenin sindiren enamelizin (MMP-20) öncelikli olarak yeni oluşan diş minesinde bulunur (Li vd. 2001). MMP-21 bazal ve skuamöz hücreli karsinomlarda bulunmuştur ve insan dokularında ifade edilir (Ahokas vd. 2003). Esas olarak üreme dokularında ifade edilen MMP-23 sistein açısından zengin bir alana sahiptir ve bunu immünoglobulin benzeri bir alan takip eder (Velasco vd. 1999). Memelilerde işlevi henüz bilinmemekte olan MMP-27, B lenfositlerinde eksprese edilir (Bar-Or vd. 2003). MMP-28 temel olarak keratinositlerde ifade edilir (Marchenko ve Strongin 2001, Lohi vd. 2001). MMP-28'in yaralanmış ciltte ekspresyon paternleri göstermesi bu enzimin doku hemostazında ve yara onarımında işlev görebileceğini düşündürmektedir (Marchenko ve Strongin 2001, Lohi vd. 2001, Saarialho-Kere vd. 2002).

## **2.9 Matriks Metalloproteinazların Doku İnhibitörleri**

Metalloproteinazların doku inhibitörleri, matriks metalloproteinaz alt ailesinin ana hücrel inhibitörleridir ve ailenin farklı üyelerine karşı değişen etkinlik ve farklı doku ekspresyon paternleri ve düzenleme modları gösterirler (Baker vd. 2002). Dört memeli MMP doku inhibitörü ortaya çıkarılmıştır, karakterize edilmiştir ve bunlar TIMP-1, -2, -3 ve -4 olarak adlandırılmaktadır (Djuric ve Zivkovic, 2017). Hücre dışı matrisin, hücre adezyon moleküllerinin, birçok sitokin, kemokin ve büyüme faktörünün hücre fenotipi üzerindeki etkisinin belirlenmesinde TIMP'ler oldukça önemli bir role sahiptir (Murphy, 2011). Alt ökaryotlarda tek bir temsilcisi ve memelilerde dört üyesi olan TIMP ailesi eski bir ailedir. Matriks metalloproteinazların kendiliğinden meydana gelen TIMP aktiviteleri, başlangıçta birkaç on yıl boyunca gerçekleştirilen birçok hücre ve doku kültürü çalışmasında tanımlanmıştır ve bununla birlikte 1985 ve 1996 arasında, TIMP'lerin dört üyesi, memelilerde gen seviyesinde kesin olarak tanımlanmıştır (Murphy, 2011). Bu proteinler bazı durumlarda metzincin süper ailesinin diğer metalloendopeptidazlarının, yani disintegrin metalloproteinazların ve trombospondin motifli disintegrin metalloproteinazların ve MMP'lerin önemli düzenleyicileri olarak işlev görürler (Murphy, 2011). MMP'ler inhibitörleriyle kovalent bağlar oluşturmazlar, onları parçalamazlar, ancak sub-nanomolar aralıkta inhibisyon sabitleri olan inhibitörleriyle sıkı 1: 1 kompleksler oluştururlar (Murphy, 2011).

## **2.10 Kemik Doku Gelişimi ve Yeniden Şekillenmesinde Matriks Metalloproteinazlar**

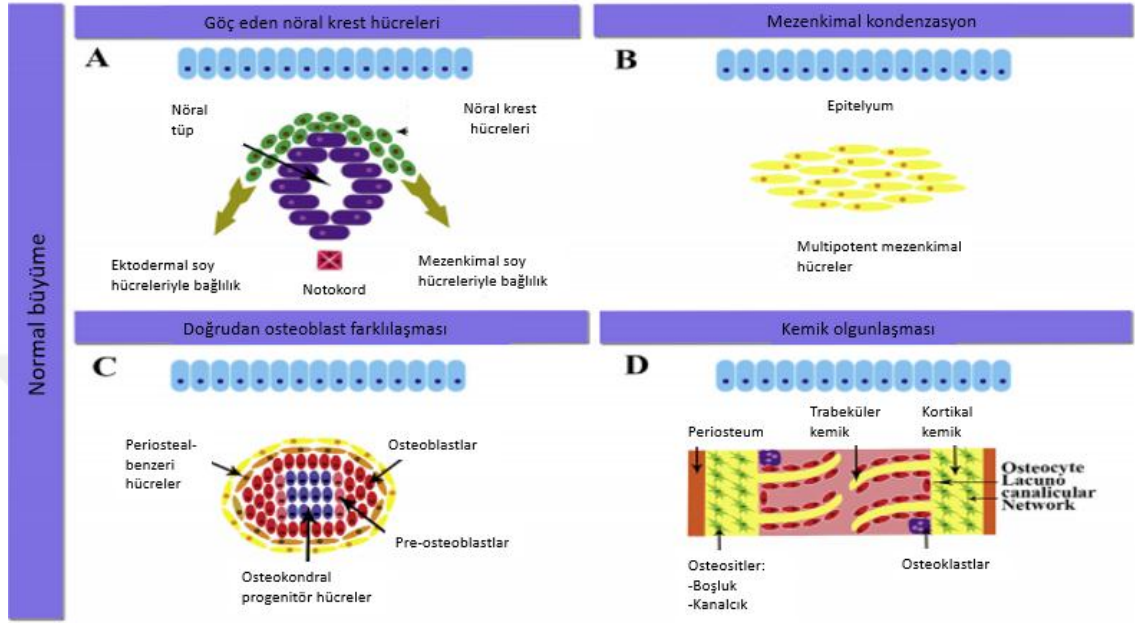
Kemik, sürekli yeniden modelleme, eski kemiğin değiştirildiği ve lokal kemik kusurlarının zaman içinde iskeleti yenilemek ve böylece iskelet sağlığını korumak için onarıldığı, enerji maliyetli bir sürece sahip dinamik bir organdır (Hardy ve Fernandez-Patron, 2020). İntramembranöz kemikleşme ve endokondral kemikleşme ile kemik gelişimi meydana gelir (Rauner vd. 2012). Kemik yeniden şekillenmesi ise kemik dokusunun ardışık olarak emilmesini ve aynı bölgede yeni kemiğin birikmesini içeren karmaşık bir süreçtir (Kersch-Schindl ve Ebenbichler, 2016). Kemik hücrelerinde kollajenazın keşfinden bu yana, MMP üyelerinin yarısından fazlası hem fizyolojik hem de patolojik koşullar altında kemik dokularında tespit edilmiştir (Paiva ve Granjeiro,

2014). Kondrosit proliferasyonu ve farklılaşması, osteoklast işe alım ve fonksiyonu, kemik modelleme, kemik yeniden modellenmesi, osteoblast alımı ve hayatta kalma, anjiyogenez, osteosit canlılığı ve fonksiyonu gibi MMP'lerin gelişim ve kemik yenilenmesi sırasındaki önemli fonksiyonları, kemik kalitesini değiştirebilir. Kemik yeniden şekillenmesi, sırasıyla osteoklastlar ve osteoblastlar tarafından koordine edilen kemik emilimi ve kemik oluşumu adı verilen iki bağlı mekanizma yoluyla gerçekleşir ve aynı zamanda bu işlem kemik lezyonu veya yaralanmasından sonra, kemik iyileşmesini sağlayan kemik yenilenmesine yol açar. Yeni doku oluşturmak ve işlevselliğini yitirmiş kemik dokusuna fonksiyonunu yeniden kazandırmak için HDM yeniden modellenmesini de içeren kemik yenilenmesi veya onarımı, birbiriyle uyumlu süreçlere bağlıdır ve bununla birlikte her aşamada doğru bir şekilde HDM yeniden modellenmesi ve MMP'lere ihtiyaç duyulmaktadır. MMP'lerin yarısından fazlasının, sıçan kemik hücrelerinde kollajenolitik aktivitenin bulunmasıyla birlikte bazı memeli türlerinde normal kemik gelişiminde kıkırdak ve kemik oluşumu esnasında aktif olduğu keşfedilmiştir. Nakavt fare modelleri ve insan genetik hastalıkları özellikle MMP -2, 9, -13, 14 ve -16'nın iskelet gelişimi için önemini ortaya çıkarmıştır (Paiva ve Granjeiro, 2014).

Çok merkezli mezenkimal hücrelerin osteoblastlara doğrudan farklılaşmasını gösteren intramembranöz kemikleşme, osteogenezin gerçekleşmesini sağlayan iki ana mekanizmadan biridir (Şekil 2.11). Bu kemikleşme türünün ilk iki aşamasında göç eden nöral krest hücreleri gelecekteki kemik bölgesinde mezenkimal yoğunlaşma geçirir (Paiva ve Granjeiro, 2014). Üçüncü aşamada hücreler, pre-osteoblastlar ve son olarak osteoblastlar haline gelen osteokondral progenitör hücrelere farklılaşır, son aşamada ise osteoblastlar mineralize olmayan kemik matriksi salgılar böylece mineralizasyon gerçekleşir, bu hücreler matrikse gömülür daha sonra nihai osteoblast olgunlaşması meydana gelir.

İntramembranöz kemikleşmede MMP-2 nakavt farelerde kafa yüz anormallikleri, osteoblast ve osteoklast proliferasyonunda azalma ve artmış boş osteosit çukurları gibi anormallikler görülür. MMP-14 nakavt farelerde kısa burun, hipertelorizm, intramembranöz kemikleşme başlamadan önce yanlış geçici hiyalin kıkırdak yeniden şekillenmesi görülür. MMP-14 / MMP-16 nakavt farelerde ise kemik dokularında çok

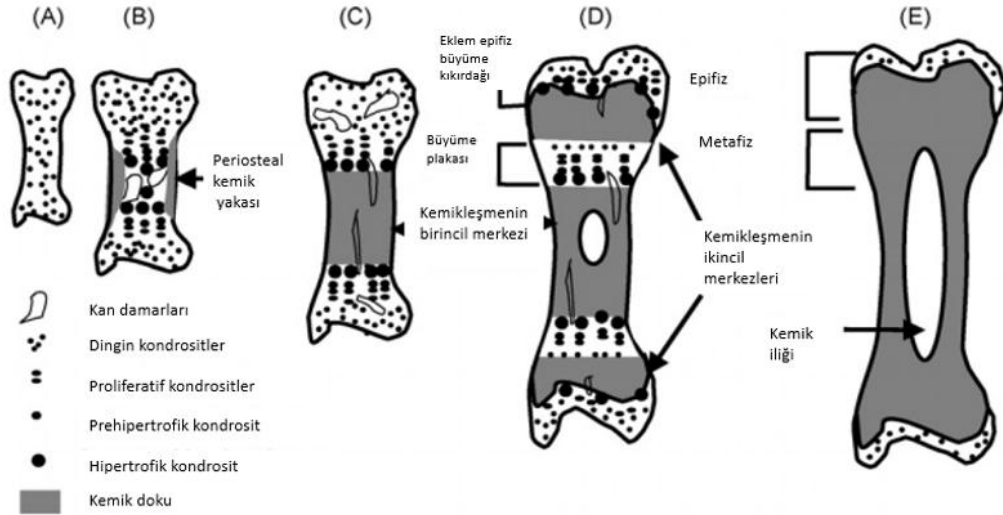
potansiyelli mezenkimal hücrelerin canlılığı azalır ve iki MMP çeşidinin birden tükenmesiyle beraber daha ciddi kafa-yüz anomalileri görülür (Paiva ve Granjeiro, 2014).



Şekil 2.11 İntramembranöz kemikleşmenin şematik gösterimi (Paiva ve Granjeiro, 2014)

Endokondral kemikleşme ise çok merkezli mezenkimal hücrelerin kondrosite farklılaşmasını gösteren, osteogenez gerçekleşmesini sağlayan diğer mekanizmadır (Paiva ve Granjeiro, 2014). Endokondral kemikleşme çoğu kemiğin, ilk aşaması bir kıkırdak modelinin oluşturulmasıyla bilinen bir süreçtir (Şekil 2.12). Bu model fetal gelişim ve doğum sonrası büyüme sırasında kademeli olarak kemik ile değiştirilir. İlk olarak mezenkimal hücrelerin yoğunlaşması, daha sonra bunların kondrositlere farklılaşması ve tipik kıkırdak hücre dışı matris bileşenlerinin salgılanması ile kıkırdak modelleri oluşturulur. Oluşturulduktan sonra kıkırdak modeli, ilk önce merkezinde ve daha sonra her iki ucunda sırasıyla birincil ve ikincil kemikleşme merkezlerini oluşturan bir hücre karışımı tarafından işgal edilir. Kalan kıkırdağı kademeli olarak etkileyen bu kemikleşme merkezleri, nihayetinde iskelet olgunluğuna ulaşıldığında eklem yüzeyleri hariç onu tamamen değiştirir (Mackie vd. 2008).

Endokondral kemikleşmede MMP-2 nakavt farelerde kısalmış uzun kemikler, osteoblast ve osteoklast sayısında ve çoğalma oranında azalma, daha az osteosit görülür (Paiva ve Granjeiro, 2014). MMP-9 nakavt farelerde daha kısa uzun kemikler, bozulmuş vasküler ve hücrel işe alım, bozulmuş kırıldak yeniden şekillenmesi görülür. MMP-13 nakavt farelerde gecikmiş terminal hipertrofik kondrositlerin ölümü gerçekleşir. MMP-9 / MMP-13 nakavt farelerde ise kısaltılmış iskelet elemanları, iki MMP çeşidinin birden tükenmesiyle beraber tek-tükenmiş MMP'lere kıyasla şiddetlendirilmiş fenotipler görülür. MMP-14 nakavt farelerde diğer MMP'lerden yoksun farelere kıyasla en şiddetli iskelet fenotipi, düzensiz büyüme plakası, ankiloz, cücelik ve periosteumda fibroz görülür. MMP-14 / MMP-16 nakavt farelerde ise kısalmış uzun kemikler, kemik iliğinin ortasındaki kondrositlerin çoğalması ve bozulmuş birincil kemikleşme merkezleri görülür. Her iki kemikleşme de kapsamlı HDM yeniden şekillenmesine bağlıdır (Paiva ve Granjeiro, 2014).



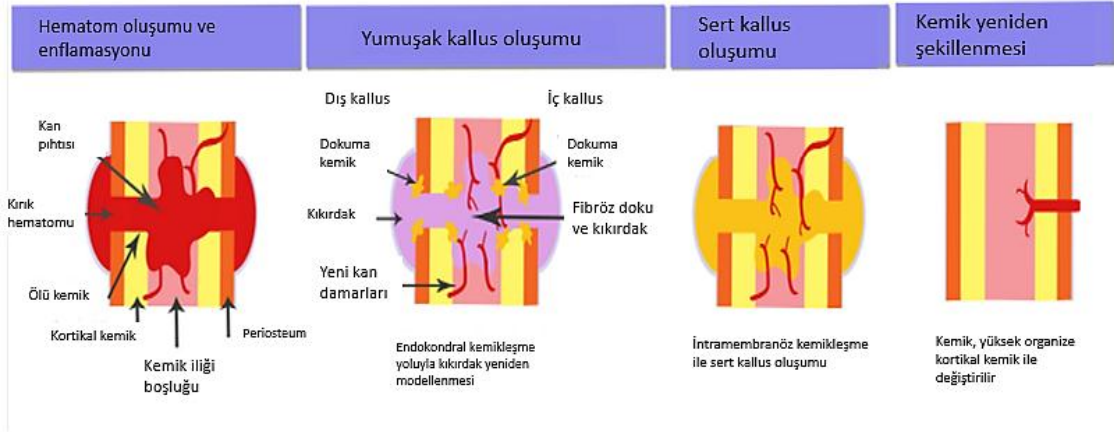
Şekil 2.12 Endokondral kemikleşmenin şematik gösterimi (Mackie vd. 2008).

Modelleme ve yeniden modelleme, kemik hücreleri tarafından koordine edilen iki farklı mekanizmadır ve kemikleşmeyle iskelet büyümesi sırasında kemik dokusunu korur (Paiva ve Granjeiro, 2014). Kemik modellemesi, normal ve tutarlı büyümeyi sağlamak için kemiklerin şeklinin ve boyutunun üretilmesi ve korunması ve ayrıca mekanik strese dayanmak için gereklidir ve bu olay, farklı kemik bölgelerinde ve farklı zamanlarda,

işbirlikçi olmayan bir şekilde hem osteoblastların hem de osteoklastın etkisiyle gerçekleştirilir. (Paiva ve Granjeiro, 2014).

Lokal invaziv patolojiler nedeniyle travma, fasiyal veya cerrahi olarak çıkarılan kemik dokusunun restorasyonu için kemik yenilenmesi gereklidir ve kemik onarımı, yaralanma bölgesinde yeni kemik üretmek için intramembranöz veya endokondral kemikleşme gibi, kemik gelişimine benzeyen bir mekanizmadır (Paiva ve Granjeiro, 2014). Dört farklı ve ardışık aşama ile karakterize edilmektedir, ilk olarak kırık ve hemen ardından bağışıklık sisteminin indüklenmesi, mezenkimal kök hücrelerin işe alınması ve anjiyogenezden sonra hematoma oluştuğu iltihaplanma ve granülasyon dokusu oluşumu gerçekleşir, burada hematomdan dönüştürücü büyüme faktörü beta 1 (TGF- $\beta$ 1) salınımı kırık bölgesinde hücre alımını kontrol eder. İkinci ve üçüncü aşamalarda kallus oluşumu meydana gelir, burada kırıkta endokondral kemikleşme ile yeniden modellenir ve intramembranöz kemikleşme ile direkt kemik oluşumu meydana gelir (Paiva ve Granjeiro, 2014). Son olarak, bu iki temel mekanizmanın oluşturduğu trabeküler kemik, kırıktan 14 gün sonra birkaç ay boyunca ikincil kemiğe yeniden şekillenir (Gerstenfeld vd. 2003, Mavčič ve Antolič 2012, Rozen vd. 2007, Shapiro 2008).

MMP'ler ayrıca kemik kırıkları ve kritik boyutlu kemik kusurlarının iyileşmesi sırasında da farklı aşamalarda yer alır ve kemik onarımının düzgün bir şekilde gerçekleşmesi için gereklidirler (Şekil 2.13). Kemik yeniden şekillenmesi esnasında MMP-2 nakavt farelerde bozulmuş kemik matriksi yeniden modellenmesi görülür, MMP-9 nakavt farelerde kırık bölgesinde kalıcı kırıkta ile kaynamama ve gecikmiş birleşmeler görülür, MMP-13 nakavt farelerde ise gecikmiş kondroklast alımları nedeniyle bozulmuş kırıkta matriksi yeniden modellenmesi görülür (Paiva ve Granjeiro, 2014).



Şekil 2.13 Kemik iyileşmesi adımlarının şematik gösterimi (Paiva ve Granjeiro, 2014)

## 2.11 Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşması Sırasında Matriks Metalloproteinazlar ve İnhibitörlerinin Rolü

Karmaşık bir süreç olan osteoblast progenitörlerinin farklılaşması ve çoğalması, çok sayıda hormon, otokrin ve parakrin süreçleri ve sistemik büyüme faktörlerinin etkileşiminin yanı sıra sürekli HDM yeniden modellenmesi de gerektirir (Mannello vd. 2006). Osteositler, osteojenik mezenkimal progenitörlerin son farklılaşma aşamasının bir sonucu olarak meydana gelirler. Tip I kollajen, osteositlerin HDM ortamlarıyla ve özellikle osteosit ortamında en bol proteindir ve osteositler bu protein ile aktif olarak etkileşime girebilmektedir. MKH'lerin osteositlere farklılaşmasıyla bağlantılı olmakla birlikte MMP'ler, osteoblast çoğalması ve hücre ölümünün düzenlenmesinde de rol alırlar. MKH farklılaşmasının hem MMP aktivitesine hem de MMP doku inhibitörlerini inhibe edici fonksiyonlara bağlı olduğu, *in vitro* çalışmalarda ileri sürülmüştür (Mannello vd. 2006).

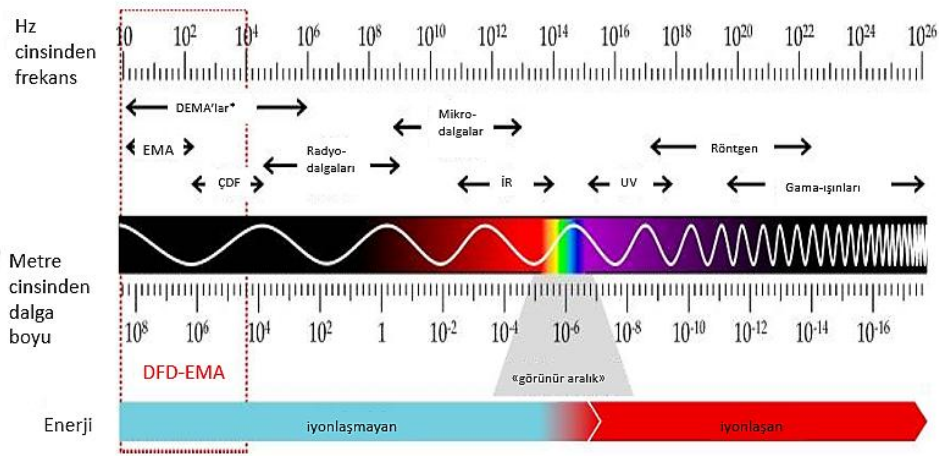
## 2.12 Elektromanyetik Alan

Aşırı düşük statik manyetik alanlardan aşırı yüksek gama ışınlarına kadar değişebilen elektromanyetik alanlar, fiziksel elektromanyetik spektrumun bir parçasıdır (Salvatore, 2014). 0 Hz – 300 GHz frekansları, iyonlaşmayan olarak kabul edilen spektrumun bir parçasıdır ve elektromanyetik alanlar bu frekanslara odaklanır. Elektrik enerjisi üretimi ve iletimi, radyo frekansları ve mikrodalgalar, bu spektrumun parçası olan frekansların

örnekleridir. EMA, elektrik alanı ve manyetik alan olarak adlandırılan ve zamanla değişen iki bileşene sahiptir ve bunlar uzayda birlikte hareket ederler. Bu iki miktar vektördür ayrıca büyüklük ve yöne sahiptir. Elektrik alanı, bir elektrik yükünün varlığı ile üretilir. Manyetik alan ise elektrik yükü akışı yani bir elektrik akımı olduğunda üretilir. Frekansı ve dalga boyu ile karakterize edilen elektromanyetik alan matematiksel olarak  $F \times DB = \text{Işık Hızı}$  ile ilişkilendirilir. Elektrik alanı metre başına volt olarak ölçülürken, manyetik alan metre başına amper cinsinden ölçülmektedir. Manyetik akı yoğunluğu ise Tesla veya Gauss ( $1 \text{ T} = 10\,000 \text{ G}$ ) cinsinden ifade edilir ve manyetik alanların diğer bir ölçüsüdür (Salvatore, 2014).

### **2.12.1 Düşük frekanslı darbeleri elektromanyetik alan**

Manyetoterapi makineleri, Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) tarayıcıları gibi birçok elektrikli cihazın ve tıbbî ekipmanın sık kullanımı, geniş bir elektrik ve manyetik alan yelpazesi sağlamaktadır bundan dolayı insanlar son derece düşük frekanslı darbeleri elektromanyetik alanları (DFD-EMA) da içeren, elektrik ve manyetik alanları üreten bu tür kaynaklara maruz kalırlar (Akbarnejad vd. 2017). Elektromanyetik alanların bir alt sınıfını temsil eden ve birkaç yüz Hz'e kadar frekanslar veya tekrarlama oranlarıyla DFD-EMA'lar, elektromanyetik spektrumun alt ucunda yer alırlar (Şekil 2.14). DFD-EMA'lar da iyonlaşmayan radyasyon sınıfına girerler ve elektrik enerjisini biyolojik doku üzerinden bir dizi manyetik darbeyi yönlendirmek için kullanırlar. Önemli termal etkilere sebebiyet vermeden doku onarımını uyardığı düşünülen küçük miktardaki elektrik sinyali, açıkta kalan dokudaki manyetik darbelerin her biri tarafından indüklenir (Ehnert vd. 2019).



Şekil 2.14 Karakteristik frekansları, dalga boyları ve elektromanyetik enerjisi ile elektromanyetik spektrum (Ehnert vd. 2019).

İstenen hücresel tepkileri düzenlemek adına DFD-EMA'lar, invaziv olmayacak şekilde uygulanabilen potansiyel bir teknoloji platformu sunar ve bununla birlikte, belirli genliklere, frekanslara ve dalga formlarına sahip elektromanyetik sinyaller de DFD-EMA üreten cihazlarda üretilebilir. Elektrik ve manyetik alanların bölgesel olarak indüklenmesiyle sinyaller, hedefe yönelik yaralanma bölgelerine uygulanan bobinler ile yumuşak dokuya dönüştürülebilir (Poh vd. 2018).

### 2.12.2 Kök hücreler ve kemik dokuda düşük frekanslı darbeli elektromanyetik alan etkisi

Osteoblast çoğalmasını, farklılaşmasını ve kalsiyum içeren hücre dışı matriksin üretimini destekleyen gelişmiş kemik yenileyici yetenekler, DFD-EMA sinyallerine maruz kalmanın bir sonucu olarak bazı çalışmalarda önerilmektedir (Poh vd. 2018). 30 yılı aşkın süredir klinik olarak araştırılan DFD-EMA tedavileri, kırık onarımına yardımcı olmayı amaçlamaktadır. DFD-EMA'nın kemik yenilenmesi üzerindeki etkisiyle birlikte, farklı kaynaklardan (örneğin insan alveolar kemik türevi MKH, iKMKH ve iADMKH'den) toplanan MKH üzerindeki uyarılmasının temel mekanizmasını anlamaya yönelik olarak birçok çaba harcanmıştır (Poh vd. 2018).

Literatürde bulunan elektromanyetik alana maruz kalma süreleri, fikir birliği olmaksızın, optimal tedavi süresi konusunda günde 5 dakika ila 14 saat arasında değişmektedir ancak bununla birlikte, organların ve dokuların DFD-EMA'ya uzun süreli maruz kalması şu anda hala oldukça tartışmalıdır. DFD-EMA'ya uzun süreli maruz kalmanın, sperm hareketliliğinin azalması (1 mT, 50 Hz EMA, 85 gün boyunca 24 saat) ve karaciğer dokusunda artmış oksidatif stres (1 mT, 50 Hz EMA, 45 gün boyunca günde 4 saat) gibi olumsuz yan etkilere neden olabileceği *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. Öte yandan potansiyel tedavilerden beklenenler doğrultusunda ümit verici faydalar ise kısa süreli maruziyetlerde görülmüştür (Poh vd. 2018).

MKH'lerin diğer ana kaynaklarının da kemik iliğine ek olarak insan vücudundan türetilbildiği DFD-EMA çalışmalarında görülmüştür (Yin vd. 2018). iKİMKH'lerle benzer immünomodülatör özellikleri paylaşan iADMKH'ler, kolayca bulunma ve bol olma özelliklerinin yanısıra diğer kök hücre türleriyle karşılaştırıldığında, birçok önemli avantaja sahiptirler (Yin vd. 2018).

İlk olarak liposuction olarak bilinen deri altı yağ alımı yöntemiyle kolayca iADMKH eldesi gerçekleştirilebilir (Yin vd. 2018). İkinci olarak, iADMKH'ler otolog yağdan türetilbilirler bu nedenle embriyonik kök hücrelere kıyasla etik veya politik sorunları yoktur. Üçüncü olarak ise vasküler ağ tarafından sağlanan (örneğin implant cerrahisi prosedürleri gibi) oksijenin sınırlı olabileceği hücre tedavileri için uygun haldedirler çünkü iADMKH'ler hipoksik yani düşük oksijenli ortamlarda hayatta kalabilme yeteneğine sahiptirler. iADMKH'ler ayrıca kemik oluşumu için gerekli olan uygun anjiyogenezi de uyarabilirler. iADMKH'lerin sahip olduğu bu özellikler, doku ve organ nakli için onları yenileyici tıpta ve klinik araştırmalarda daha kabul edilebilir bir hücre türü haline getirmektedir (Yin vd. 2018).

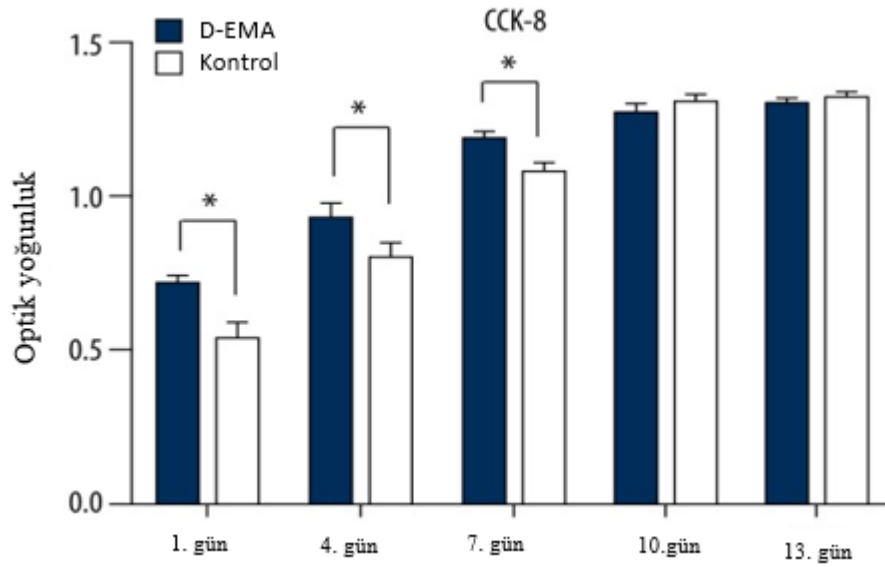
### **2.13 Kaynak Özetleri**

Düşük frekanslı ve/veya darbeli elektromanyetik alanın çeşitli kök hücre tiplerine olan etkisinin incelenmesine yönelik olarak yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Razavi vd. (2014) yaptıkları çalışmada son derece düşük frekanslı elektromanyetik alanın, insan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin hayatta kalma ve çoğalması üzerindeki etkisini gözlemlemişlerdir. Çalışmada iADMKH'ler  $10^3$  hücre / kuyucuk yoğunluktaki 96 kuyucuklu plakaya kültürlendikten sonra bir gece boyunca inkübe edilmiştir ve daha sonra 7 gün boyunca günde 20 ve 40 dakika süre ile 0.5 ve 1 mT ve 50 Hz yoğunluklu DF-EMA'ya tâbi tutulmuştur. Grup 1: günde 40 dakika için 1 mT, grup 2: günde 20 dakika için 1 mT, grup 3: günde 40 dakika için 0.5 mT ve grup 4: günde 20 dakika için 0.5 mT şeklinde olmak üzere hücelere, farklı dozlarda DF-EMA uygulaması yapılmıştır. Çalışmada iADMKH'lere MTT Testi de uygulanmıştır. 7 günün sonunda tüm maruz kalma gruplarında hayatta kalma ve çoğalma oranının Grup 1 hariç (günde 40 dakika için 1 mT), kontrol gruplarına oranla önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur. Mevcut çalışmanın sonucunda DF-EMA'nın kısa süreli maruziyetinin iADMKH'lerin sağkalımını ve çoğalma etkisini önemli ölçüde artırabileceği gösterilmiştir.

Yin vd. (2018) yaptıkları çalışmada son derece düşük frekanslı darbeli elektromanyetik alanın, insan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonu ve osteojenik farklılaşması üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Deney grubundaki hücreler sırasıyla 7 gün, 14 gün ve 21 gün süreyle, günde iki saat olmak üzere bir inkübatörde yoğunluğu 1 mT, frekansı 50 Hz olan DFD-EMA'ya maruz bırakılmışlardır. Kontrol grubundaki hücreler ise DFD-EMA'ya maruz bırakılmadan standart inkübatör koşulunda kültürlenmiştir. DFD-EMA'nın hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini araştırmak için, iADMKH'lerde CCK-8 tahlilleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.15). DFD-EMA'nın, deney grubundaki iADMKH'lerin proliferasyonunu 1., 4., ve 7. günden sonra kontrol grubuna kıyasla desteklediği görülmüştür. Deney grubundaki iADMKH'lerdeki osteojenik farklılaşma değerinin, DFD-EMA'ya maruz kaldıktan sonra 1. gün, 3. gün, 5. gün ve 7. günde önemli ölçüde daha yüksek olduğu ancak yine deney grubundaki iADMKH'lerin osteojenik farklılaşma değerinin bir haftadan daha fazla süreyle DFD-EMA maruziyetinden sonra kontrol grubuna kıyasla artık daha yüksek olmadığı ve hatta altında olduğu gözlemlenmiştir. DFD-EMA'nın osteojenik farklılaşmayı teşvik etme üzerindeki etkisi de çeşitli yönlerden incelenmiştir. Deney ve kontrol gruplarında 7 günlük DFD-EMA maruziyetinden sonra alkalen fosfataz (ALP) boyaması yapılmıştır

ve deney grubundaki pozitif boyamanın, kontrol grubundakinden daha belirgin olduğu görülmüştür. Çalışmanın sonucunda DFD-EMA'nın, kırıkları ve büyük kemik kusurlarını tedavi etme amacına ulaşmak için insan yağ dokusundan türetilmiş kök hücrelerin proliferasyonunu ve osteojenik farklılaşmasını önemli ölçüde destekleyebileceği, iADMKH'lerin ayrıca iKİMKH'ler ile aynı osteojenik farklılaşma potansiyeline sahip olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 2.15 iADMKH'lerin büyümesinin 1., 4., 7., 10., ve 13. günden sonra CCK-8 ile ölçümü (Yin vd. 2018)

Ehnert vd. (2018) yaptıkları çalışmada iADMKH'lerin proliferasyon ve osteojenik farklılaşma potansiyelinin, tek tek mono-kültürlerle karşılaştırıldığında insan osteoblastları ile ortak kültürlerle artırılıp artırılamayacağını incelemişlerdir. Hücreler, farklı oranlarda mono- veya ortak kültür olarak kaplanmışlardır. Tam yapışmadan sonra (3. gün) büyüme ortamı, osteojenik farklılaşma ortamı ile değiştirilmiştir. Tüm farklılaşma süresi boyunca hücreler birbirini takip eden 5 gün içerisinde, günde 7 dakika süreyle, yoğunluğu spesifik olarak 6–282  $\mu$ T, frekansı ise 16 veya 26 Hz olan DFD-EMA'ya günlük olarak maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonrası 16 Hz'in osteoblast mono-kültürleri için en etkili DFD-EMA temel frekansı olduğu, 26 Hz'in ise iADMKH mono-kültürleri için en etkili DFD-EMA frekansı olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmada ayrıca 0., 7. ve 14. günlerde toplanan hücrelerin toplam protein içeriği (sülforodamin B boyaması), mitokondriyal aktivite (resazurin dönüşümü), ALP

aktivitesi ve matriks mineralizasyonu (Alizarin Kırmızısı ve Von Kossa boyaması ile) değerlendirilmiştir.

Kang vd. (2013) yaptıkları çalışmada frekans ve manyetik akı yoğunluğundan oluşan spesifik elektromanyetik alan koşullarının *in vitro* olarak adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını önemli ölçüde düzenlediğini incelemişlerdir. İlk olarak ALP mRNA ekspresyonu ölçülerek pozitif (30/45 Hz, 1 mT) ve negatif (7.5 Hz, 1 mT) osteojenik farklılaşma koşulları seçilmiştir ve hücreler günde 8 saat boyunca elektromanyetik alana tabi tutulmuştur. Çalışmada bağıl ALP ekspresyonu, eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak değerlendirilmiştir. Manyetik akı yoğunluğunun 0,1 ila 3 mT arasında, frekansın ise 7,5 ila 75 Hz arasında değiştiği elektromanyetik alanda ALP ekspresyonunun, 30 ila 50 Hz frekans aralığında ve 0.8 ila 2.4 mT'lik bir manyetik akı yoğunluğunda arttığı gözlemlenmiştir. Elektromanyetik alanın ayrıca, osteojenik farklılaşma üzerindeki olumlu ve olumsuz etkilerini değerlendirmek için ALP aktivitesi ölçülmüştür ve osteojenik ortamın, elektromanyetik alandan bağımsız olarak normal ortam gruplarına kıyasla ALP aktivitesini artırdığı bulunmuştur. Ayrıca aynı ortam ile kültürlenmiş kontrol grubuna kıyasla iADMKH'lerin hem normal ortam hem de osteojenik ortam ile tedavi edildiğinde 30/45 Hz gruplarında ALP aktivitesinin 7.5 Hz grubuna kıyasla daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Bir kalsiyum içeriği deneyi kullanılarak farklılaştırılmış osteoblastların matris üretimi değerlendirilmiştir. ALP aktivitesine benzer şekilde, iADMKH'ler kontrol grubuna kıyasla 30/45 Hz frekanstaki elektromanyetik alanlara maruz bırakıldığında artan miktarda mineralize nodül tespit edilmiştir. 7.5 Hz frekansa sahip elektromanyetik alanın kalsiyum seviyeleri ise kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda 30/45 Hz frekanstaki elektromanyetik alanların iADMKH osteojenik farklılaşmasını indüklediği, ancak 7.5 Hz frekanstaki elektromanyetik alanın iADMKH osteojenik farklılaşmasını engellediği sonucuna varılmıştır.

Bloise vd. (2018) yaptıkları çalışmada günlük DFD-EMA maruziyetinin, nanoyapılı TiO<sub>2</sub> üzerine ekilen iKIMKH'lerin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışmada TiO<sub>2</sub> üzerine tohumlanmış olan hücreler, manyetik alan yoğunluğu 2 mT ve frekansı 75 Hz olan DFD-EMA sistemi içine yerleştirilmiştir.

DFD-EMA'nın etkisini incelemek için ALP aktivitesi ve protein birikimi ölçülmüştür. Çalışmada kontrol grubuna kıyasla DFD-EMA ile muamele edilmiş TiO<sub>2</sub> yüzeyinde tohumlanan hücreler için seçilmiş osteojenik hücre dışı matriks protein birikiminde hafif bir artış tespit edilmiştir. Ek olarak, ALP aktivite değerlendirmesi sonucunda ise DFD-EMA ile uyarılan grupta kontrol grubuna göre daha yüksek bir ALP aktivitesi gözlemlenmiştir. Çalışmada ek olarak deney gruplarının hücre içi kalsiyum ölçümü, eş-zamanlı PCR aktivitesi ve 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) aktivitesi değerlendirilmiştir.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

Deneyde kullanılan sığır femur kemiğinin Ankara Et ve Balık Kurumu Genel Müdürlüğü bünyesindeki hayvan kesim tesisinden, veteriner kontrolü altında kesimi yapılan sağlıklı sığırlardan eldesi gerçekleştirildi.

Deselülerize kemik temelli hidrojel oluşturma işlemi için hidroklorik asit (Sigma, ABD), sığır kaynaklı kemik dokusunun demineralizasyonu için kullanıldı. Distile su süngerimsi kemik parçalarını yıkamak için kullanıldı. Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) süngerimsi kemik parçalarını yıkamak için kullanıldı. Kloroform (Merck, ABD), Metanol (Riedel- de Haën), kemik dokusunda doğal olarak bulunan yağ doku kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla kullanıldı. Tripsin, (Sigma, ABD) / Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma, ABD) sığır kaynaklı kemik dokusunun deselülerizasyon işlemi için kullanıldı. Penisilin-Streptomisin (Biological Industries, İsrail), sığır kaynaklı kemik dokusunun deselülerizasyon işlemi için kullanıldı. Pepsin (Sigma, ABD), deselülerize kemik parçalarını jel haline getirmek için kullanıldı. Sodyum hidroksit (Sigma, ABD), jel formuna dönüşen çözeltiyi nötral hale getirmek için kullanıldı. Hidroksiapatit (HA) (Sigma, ABD), jel formuna dönüşen çözeltinin içine belirli oranlarda katıldı.

Hücre kültürü çalışmalarında, ticari olarak temin edilip çoğaltılan ve fazlası dondurulmuş olan mezenkimal kök hücrelerin ekildiği steril hücre kültür kapları (Corning, NY, ABD), pasajlanması amacıyla falkon tüp (Corning, ABD), besiyeri olarak DMEM F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12; Lonza, ABD), besiyeri katkısı olarak L-glutamin (Sigma, ABD), penisilin-streptomisin (P/S, Sigma, ABD) ve fetal sığır serumu (FBS) (Sigma, St. Louis, MO, ABD), hücrelerin pasajlanması işleminde ise tripsin/EDTA çözeltisi (Sigma) kullanıldı. Hücreleri yıkamak amacıyla fosfat tamponlu tuz çözeltisi kullanıldı. DMEM-HG (Lonza, ABD) iADMKH'lerin adipojenik soya farklılaştırılmasında besiyeri olarak kullanıldı. IBMX, insan insülini ve indometazin iADMKH'lerin adipojenik soya

farklılaştırılmasında besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı. DMEM-LG (Lonza, ABD) iADMKH'lerin osteojenik ve kardiyojenik soya farklılaştırılmasında besiyeri olarak kullanıldı. L-askorbik asit 2-fosfat iADMKH'lerin osteojenik soya farklılaştırılmasında besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı. Azasitidin iADMKH'lerin kardiyojenik soya farklılaştırılmasında besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı. Dekzametazon iADMKH'lerin osteojenik ve adipojenik soya farklılaştırılmasında besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı. 8'li kuyucuklar (Sigma, ABD) iADMKH'lerin üçlü soya farklılaştırılması amacıyla kullanıldı.

Alizarin Kırmızısı Boyası (AR-S; Sigma, ABD), osteojenik soya farklılaşan hücrelerin histolojik çalışmaları için kullanıldı. Von Kossa Boyası, osteojenik soya farklılaşan hücrelerin histolojik çalışmaları için kullanıldı. Sudan Siyahı Boyası, adipojenik soya farklılaşan hücrelerin histolojik çalışmaları için kullanıldı. Hematoksilen-Eozin Boyası, kardiyojenik soya farklılaşan hücrelerin histolojik çalışmaları için kullanıldı.

iADMKH'lerin CFU analizi için tripsin/EDTA (Sigma), 6'lı kuyucuklar ve %0.5'lik kristal viyole boyası kullanıldı.

Çalışmalar laminer akışlı steril kabinde (Labconco, Fisher Scientific, ABD) yapıldı ve hücre kültürleri 37°C, %5 CO<sub>2</sub>, %95 nem ortamını sağlayan bir karbondioksitli inkübatörde (Heracell 150i®, ABD) gerçekleştirildi.

iADMKH'lerin akım sitometri analizi için FACSCanto II cihazı (BD Biosciences, San Jose, CA, ABD), %0,1 Sodyum azid, %0,5 BSA, FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, ABD) analiz programı ve floresan boyalara bağlı yüzey antikoları (CD29-FITC, CD105-PC7, CD34-APC, CD31-PB, CD133-PE, CD90-PC5, LIN-A750, CD73-PE, HLA-DR-ECD) kullanıldı.

Düşük frekanslı darbeleri elektromanyetik alan sistemini kurmak için Lake Shore 475 DSP model gaussmetre (Lake Shore Cryotronics, Westerville, OH), Rigol DG1022 model puls üretici (Rigol, Beaverton, OR), Accel TS250 model amplifikatör (Accel

Instruments Corp., Irvine, CA) ve iki özdeş helmholtz bobini (Lake Shore MH-12) kullanıldı.



Şekil 3.1 Düşük frekanslı darbeli elektromanyetik alan sistemi

Alkalen fosfataz tayini için QuantiChrom Alkaline Phosphatase Assay Kit (DALP-250, Belçika) kullanıldı. Kalsiyum tayini için ise QuantiChrom™ Calcium Assay Kit kullanıldı. Spektrofotometrik ölçümlerde ise her iki tayinde de SpectraMax M5 model (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) mikro-plaka ölçer kullanıldı.

mRNA izolasyonu için Trizol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ABD), 2 ml'lik ependorf, Kloroform (Sigma, ABD), İzopropanol (Isolab, Almanya) ve Etanol (Isolab, Almanya) kullanıldı.

Agaroz jel elektroforezi için agaroz (%2), Tris-Borat-EDTA tamponu (TBE, 5X), Tris-Borat-EDTA tamponu (TBE, 1X), Etidyum bromür, Jel tankı (Bio-Rad, ABD) ve güç kaynağı (Bio-Rad, ABD) kullanıldı.

Komplementer DNA (cDNA) sentezi için Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche, ABD, Katalog Numarası 04 897 030 001), 200 µl PCR tüpleri, termal döngü cihazı (Bio-Rad Thermal Cycler T100, ABD) ve santrifüj cihazı kullanıldı.

Kantitatif eş-zamanlı polimeraz zincir Reaksiyonu için LightCycler® 96 Real-Time PCR Sistem Cihazı (Roche, ABD), LightCycler® 480 Çok Kuyulu Plaka (Roche, ABD) ve LightCycler® 480 Probes Master (Roche, ABD) kullanıldı.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1 Sığır kaynaklı kemik dokusunun deselülerizasyonu**

Sığır femur kemiği, Ankara Et ve Balık Kurumu Genel Müdürlüğü bünyesindeki hayvan kesim tesisinden veteriner kontrolü altında kesimi yapılan sağlıklı sığırlardan temin edildi. Temini gerçekleştirilen sığır femur kemiği boylamasına iki parçaya kesildi. Kemiğin uç kısımlarının orta kısmında bulunan süngerimsi kemik kısmı küçük parçalar halinde çıkarılarak PBS içerisinde toplandı. İlk önce demineralizasyon daha sonra da deselülerizasyon işlemleri için toplanan kemik dokudan, kemik hücre dışı matriksi elde edildi.

Demineralizasyon işlemi için süngerimsi kemik dokuları mekanik karıştırıcı kullanılarak 0.5 N HCl çözeltisi içinde 24 saat boyunca muamele edildi. (24 saatlik süre boyunca HCl çözeltisi gerektikçe yenilendi) 24 saatlik süre sonunda süngerimsi kemik dokuları süzüldü ve distile su ile yıkamaları ile asit kalıntılarından uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi sonrası kemik dokusunda doğal olarak bulunan yağ doku kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla süngerimsi kemik dokuları kloroform:metanol (1:1, v:v) çözeltisi ile mekanik karıştırıcı kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat süre boyunca muamele edildi. Çözelti 1 saat içerisinde yenilenerek, çözeltinin etkinliğinin artması sağlandı. 1 saatin sonunda dokuya önce metanol ile tek bir yıkama, ardından distile su ile seri yıkama yapıldı. Yıkamaların sonunda mineral ve yağdan arındırılan kemik doku, deselülerizasyon aşaması için liyofilize edilmek üzere bir gün boyunca -86°C'de donduruldu. Dondurulan doku daha sonra, 24 saat boyunca liyofilize edildi.

Liyofilizatörde kurutulup demineralizasyon işlemini tamamlamış olan süngerimsi kemik dokuları deselülerizasyon işlemi için öncelikle distile su ile yıkandı. Daha sonra kemik, manyetik karıştırıcı eşliğinde ve 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarını sağlayan inkübatörde PBS içerisinde hazırlanan %0,05 Tripsin ve %0,02 EDTA içeren çözelti içerisinde 24 saat süre ile muamele edildi. Süre sonunda süzülerek toplanan doku distile sudan geçirilerek %1 Penisilin-Streptomisin içeren PBS solüsyonunda +4°C'de 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile çalkalandı. Son aşamada çözeltilen süzülerek uzaklaştırılan doku -80°C'de bir gün boyunca dondurularak daha sonra 24 saat süre ile liyofilizasyon işlemine tabi tutuldu.

### **3.2.2 Deselülerize kemik temelli hidrojel oluşturulması**

Deselülerizasyon işlemi tamamlanmış olan kemik parçaları cerrahi makas yardımı ile daha küçük parçalar halinde kesildi. Jel formuna getirmek amacıyla deselülerize kemik parçaları 0.1 N HCl içerisinde hazırlanan ve 1mg/ml pepsin enzimi ihtiva eden çözeltiliye ilave edildi. Bu aşamada 10mg doku /mL çözelti oranı kullanıldı. Yaklaşık 72 saat boyunca manyetik karıştırıcı yardımı ile oda sıcaklığında kemik parçaları tamamen çözününceye dek karıştırıldı. Jel formuna dönüşen çözelti 0,1 M NaOH çözeltisi ile 0-10°C sıcaklık arasında nötralizasyon işlemine tâbi tutuldu. Ayrıca tuz konsantrasyonunu ayarlamak amacı ile 10X PBS kullanıldı. Nötralizasyon işlemi sonrası içine farklı oranlarda HA eklenen jel, +4°C'de manyetik karıştırıcıyla bir gece karışmaya bırakıldı. En son aşamada ise UV ile sterilize edilip inkübatörde 37°C'de katı hale getirildi.

### **3.2.3 Deselülerize kemik temelli hidrojellerin karakterizasyonları**

#### **3.2.3.1 SEM analizi**

Deselülerize kemik temelli hidrojel örneklerinin yüzeylerinin mikroskopik incelenmesi, Zeiss EVO 40 (Almanya) model SEM cihazı ile 100X ve 500X büyütmelemlerde ve 20 kV değerinde incelenip görüntülendi.

### 3.2.3.2 FTIR analizi

Deselülerize kemik temelli hidrojel örneklerinin kimyasal yapısının incelenmesi için FTIR analizi (Shimadzu, IRAffinity, Japonya) 600-4000 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında yayıflatılmış toplam yansıma ünitesi ile gerçekleştirildi.

### 3.2.4 İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kültürü

Ankara Üniversitesi Doku Mühendisliği, Biyomalzemeler ve Nanobiyoteknoloji Laboratuvarı'nda ticari olarak temin edilen insan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler uygun koşullarda çözüldü. Standart hücre çözme yöntemi uygulanan dondurulmuş hücreler, -80 °C' den çıkarılıp sıcaklığı önceden 37°C'ye ayarlanan suya konularak çözüldü ve 45 ml DMEM-F12'nin içine %10 FBS, %1L-Glutamin, %1 P/S konulmasıyla hazırlanan tam vasatın içinde kültüre edildi. Çözünen hücreler daha sonra içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik tüplere konuldu ve DMSO uzaklaştırılması için 1500 rpm'de 7-11 dk. süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün tam vasat ve DMSO içeren süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Uzaklaştırma işleminden sonra hücreler %10 FBS ile %1'lik L-Glutamin ve %1'lik P/S içeren DMEM F-12 besiyeri içerisinde yeniden süspanse edilerek T-25/T-75'e ekildi ve daha sonra 37°C, %5 CO<sub>2</sub>, %90 nem içeren ortam şartlarında inkübe edildi. Daha sonraki günlerde ise haftada üç sefer olmak üzere besiyeri değişimi yapıldı. Üç günlük hücre kültürü (besiyeri değişimi) sonrası yüzeye yapışmayan hücreler uzaklaştırıldı. Kültürü yapılmaya devam eden insan adipoz mezenkimal kök hücreleri, %80 bolluğa ulaştığında tripsin işlemine tabi tutuldu. Bu aşamada kültür kaplarındaki serum içeren vasat uzaklaştırıldıktan sonra, tripsin enziminin serum tarafından aktivitesinin durdurulmasını engellemek için kültür kabı 5 mL steril PBS ile yıkandı. Daha sonra her bir T75 kültür kabına 3 mL %0,05 Tripsin-0,53 mM EDTA ve 12 mL tripsin inhibitörü eklendi ve 5-10 dakika boyunca inkübatörde bekletildi.

Hücrelerin kültür kabının yanlarına hafifçe vurularak kabın yüzeyinden uzaklaşmaları sağlandı. Daha sonra yüzeyden uzaklaşan hücreler kültür kabından alınarak içerisinde 1 mL serum bulunan tüpe aktarıldı ve sonrasında tripsinin

inhibisyonu sağlanarak 1500 rpm'de 5-7 dakika süre ile santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve pellet üzerine bir miktar tam vasat eklenerek pipetleme yöntemiyle homojen bir hücre süspansiyonu elde edildi. Daha sonra üzerine 7 mL tam vasat konulan hücre kültür kaplarına elde edilen hücre süspansiyonundan 1 mL eklenerek hücre kültürü gerçekleştirildi. Bir sonraki aşamada kültür kapları yeniden 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem oranına ayarlı CO<sub>2</sub> inkübatörüne konuldu ve hücrelerin %80 bolluğa ulaşıncaya dek kültürüne devam edildi. İşlem, çalışma için yeterli sayıda hücre elde edilinceye kadar sürdürüldü.

### **3.2.5 İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu**

Karakterizasyon çalışmaları bağlamında ilk olarak invert mikroskobu ile hücrelerin morfolojik şekli incelendi. Daha sonra ise insan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin üçlü soya farklılaştırma, akım sitometri ve CFU analizleri gerçekleştirildi.

#### **3.2.5.1 İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin farklılaştırma çalışmaları**

Uygun farklılaştırma ortamlarında adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kemik, yağ ve kalp hücresine farklılaşabildiğini göstermek için tohumlanan kök hücrelerin 8'li kuyucuklara ekimi yapıp, istenilen hücre yoğunluğuna gelmeleri sağlandı. Hücreler istenilen yoğunluğa ulaştıktan sonra osteojenik farklılaşma için besiyeri / vasat olarak düşük seviyede glikoz içeren DMEM, besiyeri katkısı olarak ise 50 µg/mL askorbik asit, 10 mM β-gliserofosfat ve 10<sup>-8</sup> M deksametazon kullanıldı. Adipojenik farklılaşma için besiyeri olarak yüksek seviyede glikoz içeren DMEM, besiyeri katkısı olarak ise 0,45 mM IBMX, 10<sup>-7</sup> mM deksametazon, 0,1 U/mL insülin kullanıldı. Kardiyojenik farklılaşma için besiyeri olarak düşük seviyede glikoz içeren DMEM, besiyeri katkısı olarak ise 50 µL azasitidin kullanıldı.

### **3.2.5.1.1 Farklılaştırma çalışmalarının histokimyasal analizi**

İnsan adipoz dokusu kökenli MKH'lerin farklılaştırılması ile elde edilen adipojenik, osteojenik ve kardiyojenik hücreler indüksiyonun belirli günlerinde toplandı ve %2,5'luk glutraldehit çözeltisinde tespit edildi. Tespit edilen hücre örneklerinin her biri adipojenik, osteojenik ve kardiyojenik indüksiyon için sırasıyla Sudan Siyahı, Alizarin Kırmızısı, Von Kossa ve Hematoksilen-Eozin boya ile boyanarak ışık mikroskobu altında görüntülendi.

#### **3.2.5.1.1.1 Alizarin kırmızısı boyaması**

Osteojenik farklılaşmanın doğrulanması ve hücrelerde kalsiyum oluşumunun gözlemlenmesi için 8 hazneli kültür kaplarında çoğaltılan hücreler, Alizarin Kırmızısı ile boyandı. Hücrelerin, Alizarin kırmızısı çözeltisi ile boyandı ve 15 dakika sonra, distile su uygulamasıyla fazla miktardaki boya uzaklaştırıldı. İki defa tekrar edilen bu işlem sonrası hücreler ışık mikroskobu ile görüntülendi.

#### **3.2.5.1.1.2 Von kossa boyaması**

Çoğaltılan hücreler, hücre dışı matrislerinde biriken kalsiyumun belirlenmesi amacıyla Von Kossa ile boyandı. Öncelikli olarak parafin kesitleri parafinden arındırılarak birkaç kez damıtılmış su ile durulandı. Preparatlar, %1 gümüş nitrat solüsyonuyla 20 dakika boyunca inkübe edildi. Sonrasında, preparatlar birkaç kez damıtılmış su ile durulandı. Gümüş nitrat solüsyonu %5'lik sodyum tiyosülfat ile 5 dakika boyunca uzaklaştırıldı ve sonrasında distile su ile yıkandı. Nükleer fast kırmızısı ile 5 dakika boyunca zıt boyama yapılarak son aşamada distile suda durulanan hücreler ışık mikroskobu ile görüntülendi.

#### **3.2.5.1.1.3 Sudan siyahı boyaması**

Adipojenik farklılaşmanın doğrulanması için 8 hazneli kültür kaplarında çoğaltılan hücreler, bazik bir boya olan Sudan Siyahı ile boyandı. Boya öncesi solüsyonu ile muamele edilen hücrelere Sudan siyahı boyası eklenerek 8-10 dakika boyunca 60°C'de

bekletildi. Farklılaşma solüsyonu ile muamele sonrası distile su ile yıkaması gerçekleştirildi. Nükleer fast solüsyonu ile 5 dakikalık boyama sonrası 2 dakika boyunca akan musluk suyunda yıkandı ve ardından distile su ile tekrar yıkama gerçekleştirildi. Hücreler boyama sonrası ışık mikroskobu ile görüntüledi.

#### **3.2.5.1.1.4 Hematoksilen-eozin boyaması**

1 g kristal hematoksilen tartılarak 10 ml %95'lik etil alkol içinde çözdürüldü. Sonrasında potasyum alum, kaynatılmış olan 200 ml'lik distile suyun içine eklendi. Karışımlar mor renge ulaşana dek yavaşça karıştırılıp kaynatıldı. Bir sonraki basamakta 0.5 g merkürük oksit karışıma eklendi ve karışımın bulunduğu kap soğumaya bırakılarak üzerine birkaç damla asetik asit ilavesi yapıldı. Eozin boyası içinse 20 ml distile suyun içinde 1 g eozin-y eritildi ve hazırlanan karışıma 5ml asetik asit ile 595'lik etil alkol ilavesi yapıldı. H-E ile boyanan hücreler sonrasında ışık mikroskobu ile görüntüledi.

#### **3.2.5.2 CFU analizi**

İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin belirleyici özelliklerinden olan koloni oluşturma potansiyellerini incelemek amacıyla CFU analizi yapıldı. Hücre kültürünün 14.ncü gününde olan ve %70-80 bolluğa ulaşan hücrelerin tripsin kullanılarak yüzeyden kalkması sağlandı. Yüzeyden kalkan hücrelerin 100 ve 10000 adet olacak şekilde 6'lık kültür kuyucuklarına ekimi gerçekleştirildi. Tutunan hücreler daha sonra %0,5'lik kristal viyole ile 10 dakika boyandı.

#### **3.2.5.3 Akım sitometri analizi**

İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin immünojenotipik özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla yapılan akım sitometri analizinde akan hücre ölçer tekniği kullanıldı. Bu analiz için karma pasajdaki hücrelerin tripsin ile kalkması sağlandı. Hücreler tripsinlendikten sonra farklı floresan boyalara bağlı CD29, CD105, CD34, CD31, CD133, CD90, LIN, CD73 ve HLA-DR yüzey antikorları ile 15 dakika boyunca inkübe edildi (Çizelge 3.1). Boyama işleminin bitiminde hücreler FACSanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, ABD) cihazının

%2'lik serum barındıran yıkama solüsyonu ile yıkandı sonrasında ise santrifüj işlemine tabi tutuldu ve süpernatantın uzaklaşması sağlandı. Hücreler tüpün içindeki son hacim 200 µl olarak şekilde %0,1 Sodyum azid ve %0,5 BSA içeren akım tamponu kullanılarak heterojen şekilde karıştırıldı ve sabitlendi. Son aşamada ise FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, ABD) analiz programı ile heterojen şekilde karıştırılan hücrelerin taraması gerçekleştirildi.

Çizelge 3.1 Akım sitometride kullanılan antikolar ve floresan boyalar

<b>Antikolar</b>	<b>İşaretlendiği Floresan Boyalar</b>
CD29	FITC
CD105	PC7
CD34	APC
CD31	PB
CD133	PE
CD90	PC5
LIN	A750
CD73	PE
HLA-DR	ECD

### 3.2.6 Özel kültür yüzeylerinin geliştirilmesi

Karakterizasyon çalışmaları tamamlanan deselüerize kemik temelli hidrojeller (B, BH50 ve BH100) kültür kaplarının yüzeyine kaplanmadan önce sterilizasyon işlemine tabi tutuldu ve ardından her bir kültür kabı (Corning T75 Flask) içerisine 5 mL hacimde hidrojeller eklenip yüzeyde homojen olarak yayılması sağlandı. Yüzeyleri B, BH50 ve BH100 ile kaplanan kültür kapları, hidrojellerin jelleştirilmesi amacı ile yaklaşık 30 dakika süre ile 37°C deki inkübatöre yerleştirildi. Kültür kabı yüzeyinde jelleşmesi tamamlanan malzemelerin üzerine hücre ekimi işlemine geçildi. İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler (kontrol grubu) ve üzerine iADMKH ekimi yapılan hidrojel grupları (özel kültür yüzeyleri) ile toplamda 4 adet deney grubu elde edildi.

### **3.2.6.1 Özel kültür yüzeylerinin analizleri**

#### **3.2.6.1.1 SEM analizi**

Özel kültür yüzeylerinin mikroskopik incelenmesi, Zeiss EVO 40 (Almanya) model SEM cihazı ile 100X ve 500X büyütmelemlerde ve 20 kV değeriinde incelenip görüntüledi.

### **3.2.7 İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ve özel kültür yüzeylerinin elektromanyetik alan ve standart inkübatörde analizleri**

Kontrol grubu (iADMKH) ve özel kültür yüzeyi gruplarından oluşan 4 adet deney grubu bir hafta boyunca günde 24 saat süreyle yoğunluğu 1.3 mT ve frekansı 15 Hz olan elektromanyetik alana tabi tutuldu. Elektromanyetik alana tabi tutulan deney grupları belirlenen günlerde (3. ve 7. günlerde) invert mikroskop ile görüntüledi. Belirlenen günlerde gruplardan ayrıca ALP, Ca<sup>+2</sup> ve eş-zamanlı PCR analizi için örnekler alındı.

Bir hafta sonra kontrol grubu ve özel kültür yüzeyi grupları standart inkübatöre yerleştirildi. Belirlenen günlerde (1., 3. ve 7. günlerde) örnekler invert mikroskop ile görüntüledi. Belirlenen günlerde gruplardan ayrıca ALP, Ca<sup>+2</sup> ve eş-zamanlı PCR analizi için örnekler alındı.

#### **3.2.7.1 Metabolik analizler**

##### **3.2.7.1.1 Kalsiyum analizi**

Standart grubundaki ve DFD-EMA grubundaki besiyerlerinden belirlenen zaman noktalarında (1., 3., ve 7. günlerde; 3. ve 7. günlerde) alınan örneklerin kalsiyum katyonu miktarını belirlemek için, QuantiChrom™ Calcium Assay Kiti (DICA-500, Belçika) aaalp nitkullanılarak 612 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler yapıldı. Spektrofotometrik ölçümlerde SpectraMax M5 model (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) mikro-plaka ölçer kullanıldı.

### 3.2.7.1.2 Alkalen fosfataz analizi

Standart grubundaki ve DFD-EMA grubundaki besiyerlerinden belirlenen zaman noktalarında (1., 3. ve 7. günlerde; 3. ve 7. günlerde) alınan örneklerin alkalen fosfataz aktivitesini belirlemek için QuantiChrom Alkaline Phosphatase Assay Kit (DALP-250, Belçika) kullanılarak 405 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler yapıldı. Yöntemde, p-nitrofenil fosfat kullanılarak ALP tarafından sarı renkli bir ürüne hidrolize edildi. Enzim aktivitesi ve reaksiyon hızı arasında doğru orantı bulunmaktadır. Spektrofotometrik ölçümler için SpectraMax M5 model (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) mikro-plaka ölçer kullanıldı.



### 3.2.7.2 Gen ifadesi analizleri

Düşük frekanslı darbeli elektromanyetik alan ve standart inkübatör içerisinde kontrol grubu (iADMKH) ve özel kültür yüzeylerinden oluşan deney gruplarından belirlenen günlerin sonunda toplanan örneklerin üzerine RNA yapısının ve bütünlüğünün korunmasını sağlayan RNAlater® solüsyonundan 100 µl eklendi ve hücre pelletinin nazik bir şekilde pipetlenerek çözülmesi sağlandı. Üzerine RNAlater® solüsyonu eklenen örnekler +4°C’de 12-16 saat bekletildikten sonra -80°C’ye yerleştirildi.

#### 3.2.7.2.1 mRNA İzolasyonu

mRNA izolasyonu Trizol solüsyonu kullanılarak gerçekleştirildi. Dondurulan örnekler -80’den çıkarıldı. Örnekler 2 ml’lik tüplere aktarılarak üzerlerine Trizol solüsyonu (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ABD) eklendi.

Bir sonraki aşamada her bir tüpe Trizol miktarının 1/5’i kadar Kloroform (Sigma, ABD) eklenerek tüpler sert bir şekilde karıştırıldı ve birkaç dakika boyunca

beklendi. Tüpler, 15.000 rpm'de +4°C'de 15 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutuldu.

Santrifüj sonunda oluşan berrak faz yeni bir ependorfa aktarıldı ve üzerine başlangıçta eklenen Trizol miktarının yarısı kadar İzopropanol (Isolab, Almanya) eklenip, pipetaj yapıldı. Sonrasında oda sıcaklığında 10 dakika boyunca beklendi.

Bir sonraki aşamada tüpler 15.000 rpm'de +4°C'de 15 dakika boyunca santrifüje tabi tutuldu. Santrifüj bitiminde ependorfun dibindeki pellete dikkat edilerek üst kısımdaki sıvı faz uzaklaştırıldı ve örnekler kuruma işlemine bırakıldı.

Kuruyan örneklerin üzerine başlangıçta eklenen Trizol miktarı kadar %70'lik Etanol (Isolab, Almanya) eklendi ve 10.000 rpm'de +4°C'de 5 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirildi.

Sonraki aşamada pelletin üzerinde bulunan sıvı fazın steril pipet ile uzaklaşması sağlandı. Örnekler kurumaları için ağzı açık halde bırakıldı ve etanolü uzaklaşan örneklerin üzerine 20 µl PCR suyu eklenerek pelletin pipetaj yapılarak çözülmesi sağlandı.

#### **3.2.7.2.2 mRNA miktarı ve saflığının belirlenmesi**

mRNA örneklerinin miktarı ve saflığı Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (ABD) ile ölçülerek kontrol edildi. mRNA örneklerinin A260/A280 oranınının 1.8-2.2 aralığında olması, örneklerin saf olduğunu göstermektedir.

#### **3.2.7.2.3 Agaroz jel elektroforezi**

İzolasyonu gerçekleştirilen mRNA örneklerinin yapısal bütünlüğü ve kalitesi, %2'lik yoğunluğa sahip olan agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

İlk olarak 1X 100 ml TBE solüsyonuna 2 gram agaroz eklenerek çözüldü. Daha sonra 5 µl etidyum bromür eklendi ve iyice karışması sağlandı. Örnek-boya karışımı için mRNA örneklerinden 1 µl, yükleme boyasından 5 µl alındı ve %2'lik agaroz jele yüklenerek 70 Voltta 2 saat boyunca yürütüldükten sonra görüntülendi.

#### 3.2.7.2.4 cDNA sentezi

Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti kullanılarak mRNA örneklerinden cDNA sentezi gerçekleştirildi. Sentez için uygulanan protokol aşağıda detaylı bir biçimde açıklanmıştır.

Donmuş reaktiflerin her biri cDNA sentezine başlamadan önce çözülür. Çözülmüş olan reaktifler kısa bir süre boyunca santrifüj edilir. Reaksiyonları hazırlama esnasında bütün reaktifler buzda tutulur.

Kalıp-primer karışımı nükleaz içermeyen, steril ve ince duvarlı bir PCR tüpüne hazırlanır. PCR tüpü karışımı hazırlama esnasında buza konulur.

Toplamda 20 µl'lik bir cDNA reaksiyonu için eklenen reaktifler ve miktarları çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 cDNA Sentezinde Kalıp-Primer Karışımı (1 reaksiyon için)

Reaktif	Hacim	Final Konsantrasyonu
Total RNA veya poli (A)+ mRNA	Değişken	1 µg total RNA veya 10 ng poli (A)+mRNA
Anchored-oligo(dT)18 Primer, 50 pmol/µl	1 µL	2.5 µM
Veya Random Hexamer Primer, 600 pmol/µl	2 µL	60 µM
veya sequence-specific Primer	Değişken	0.5-2.5 µM
Su	Değişken	Toplam hacme bağlı
Total Hacim	13 µL	

Kalıp-primer karışımının 65°C’de 10 dakika boyunca kapak ısıtılmış bir halde termal döngü cihazında (BioRad Thermal Cycler T100, ABD) denatürasyon işlemi gerçekleştirilir. Bu sayede RNA ikincil yapıları denatüre hale getirilir. 10 dakikanın bitiminde reaksiyon tüpü buza konular ve reaksiyon durdurulur.

Kalıp-primer karışımına diğer reaktifler eklenir ve master mix hazırlanır. Master mix’e eklenen reaktifler Çizelge 3.3’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Master Mix Reaktifleri ve Miktarları

Reaktif	Hacim	Final Konsantrasyonu
Transkriptör Ters Transkriptaz Reaksiyon Tamponu, 5x kons.	4 µL	1x (8 mM MgCl <sub>2</sub> )
Koruyucu RNaz İnhibitörü, 40 U/µl	0,5 µL	20 U
Deoksinükleotit Karışımı, 10 mM	2 µL	1 mM
Transkriptör Ters Transkriptaz, 20 U/µl	0,5 µL	10 U
Son Hacim	20 µL	

Tüpteki reaktifler dikkatli bir şekilde karıştırılır ve yeniden termal döngü cihazına yerleştirilir. Reaktiflerin 10 ila 30 dakika boyunca, 45-55°C’de inkübasyonu sağlanır.

Bir sonraki aşamada Transkriptör Ters Transkriptaz enzimi 85°C’de, 5 dakika boyunca ısıtılarak inaktif hale getirilir. Tüp buza konular ve reaksiyon durdurulur.

Elde edilen cDNA örnekleri daha sonra eş-zamanlı PCR analizi için kullanıldı. Son reaksiyon hacmi 20-50 µl olan eş-zamanlı PCR reaksiyonu için 1-5 µl cDNA örneği kullanıldı.

### 3.2.7.2.5 Kantitatif eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizi

cDNA örneklerinden kantitatif eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu LightCycler® 480 Probes Master protokolüne göre uygulandı.

Solüsyonlar kullanılmadan önce mikrosantrifüjde kısa bir süre boyunca karıştırılır. Karıştırılan solüsyonlar buzun üzerinde yavaşça pipetlenir. Bir sonraki aşamada PCR primerlerini ve hidroliz probunu içeren 10X konsantrasyonlu bir solüsyon hazırlanır.

20 µl'lik bir eş-zamanlı PCR reaksiyonu için PCR karışımına eklenen bileşenler ve miktarları Çizelge 3.4'te gösterildi. PCR karışımı, buzun üzerinde hazırlanır.

Çizelge 3.4 PCR Karışımına Eklenen Bileşenler ve Miktarları

<b>Bileşen</b>	<b>Hacmi</b>
dH <sub>2</sub> O	3 µL
Primer-prob karışımı, 10X kons.	2 µL
LightCycler® 480 Probes Master, 2X kons.	10 µL
Son Hacim	15 µL

Hazırlanan PCR karışımı kontrollü bir şekilde pipetlenirken, bu aşamada PCR karışımının vortekslenmemesine özen gösterilmelidir.

Karışım hazırlandıktan sonra LightCycler® 480 Çok Kuyulu Plakanın her bir kuyusuna toplamda 15 µL olacak şekilde PCR karışımı eklendi. Daha sonra her bir kuyuya 5 µl cDNA örneği eklendi. En son aşamada optik yapışkan film ile plakanın üstü kapatıldı.

Çok Kuyulu Plaka LightCycler® 96 Real-Time PCR System (Roche, ABD) cihazına yerleştirildi ve uygun koşullarda reaksiyon başlatıldı. Eş-zamanlı PCR reaksiyonu için kullanılan döngü koşulları Çizelge 3.5.'te gösterildi. Reaksiyondaki döngü koşulları modifiye edilerek kullanıldı.

Çizelge 3.5 Eş-zamanlı PCR’da Kullanılan Döngü Koşulları

Program Adı	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Zaman
İnkübasyon öncesi	1	95°C	10 dakika
Amplifikasyon	45	95°C 60°C 72°C	10 saniye 30 saniye 1 saniye
Soğutma	1	40°C	30 saniye

Eş-zamanlı PCR reaksiyonu sonlandıktan sonra elde edilen sonuçların, “LightCycler® 96 RealTime PCR System” cihazında bulunan yazılım programları ile analizi gerçekleştirildi.

### 3.3 İstatistiksel Analizler

Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve deneylerin sonucunda elde edilen değerlerin ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanıp bulgular kısmında gösterildi. Sonuçların anlamlılığı için  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ , ve  $****p < 0.0001$  değerleri kabul edildi.

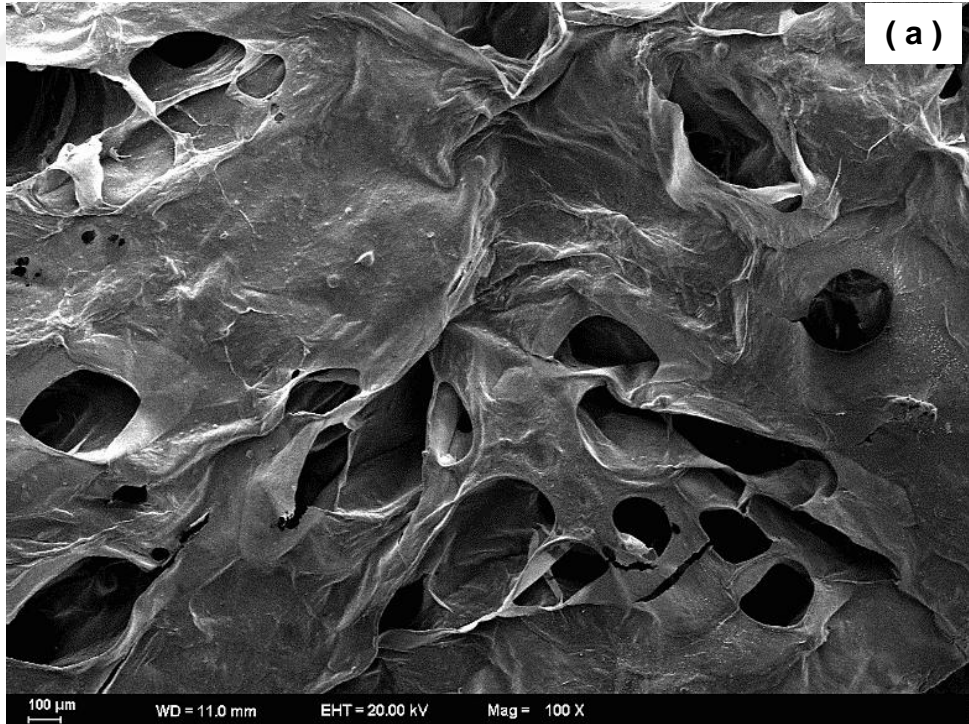
## 4. BULGULAR

### 4.1 Deselülerize Kemik Temelli Hidrojellerin Karakterizasyon Bulguları

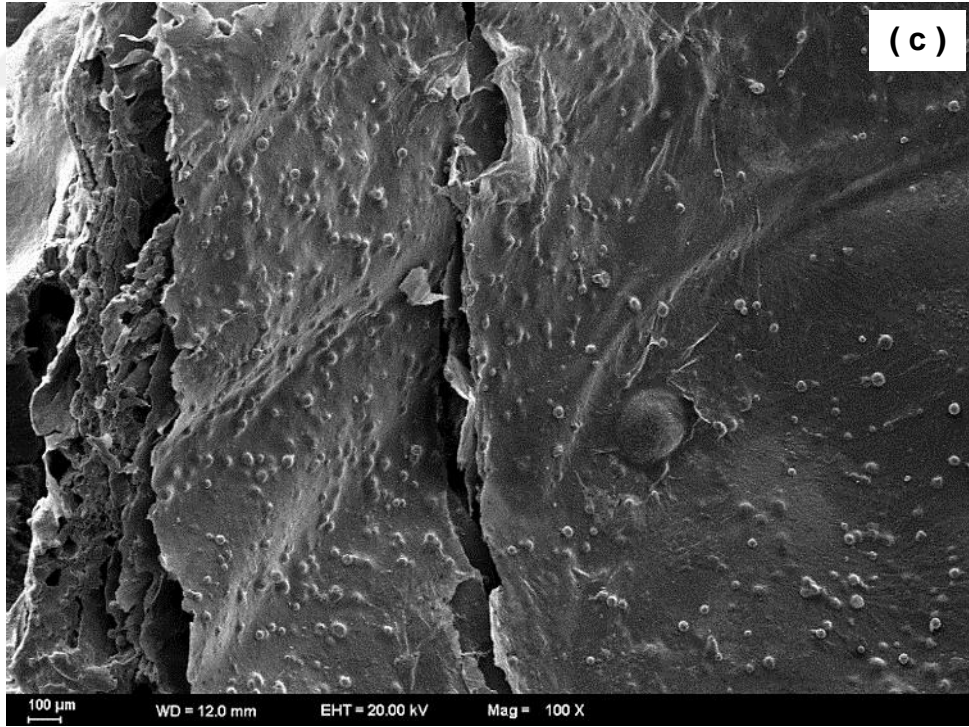
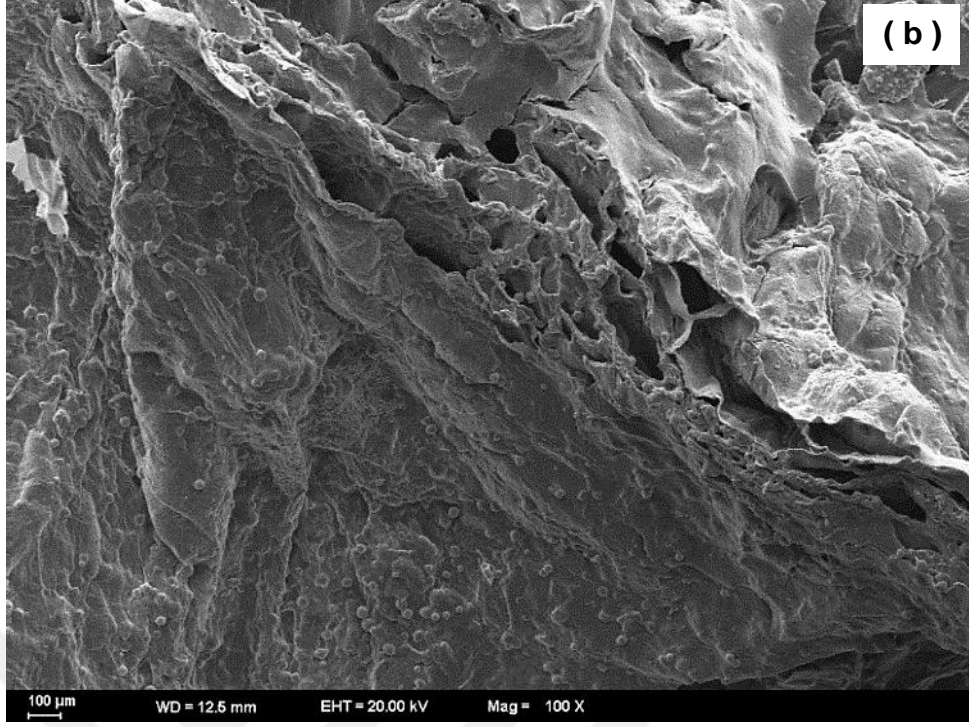
#### 4.1.1 SEM analizi bulguları

Deselülerize kemik temelli ve içerisine belirli oranlarda hidroksiapatit katılmış deselülerize kemik temelli B, BH50 ve BH100 hidrojel gruplarının morfolojilerinin incelenmesi için yaklaşık olarak 5 nm altın tabakasıyla kaplama yapıp SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen SEM görüntüleri Şekil 4.1 ve 4.2’de sunulmuştur.

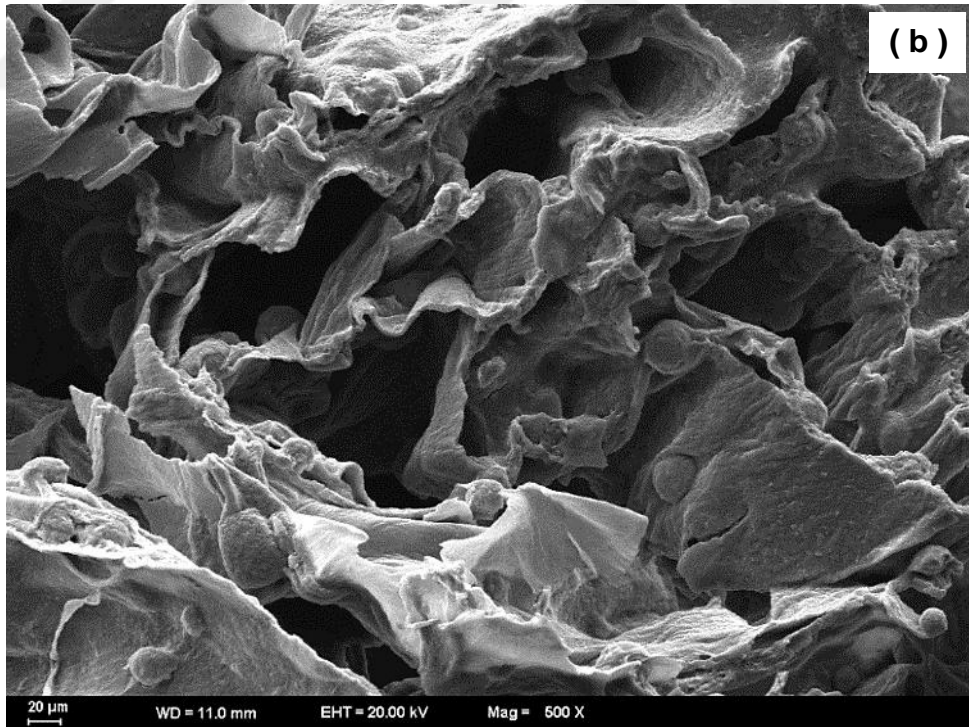
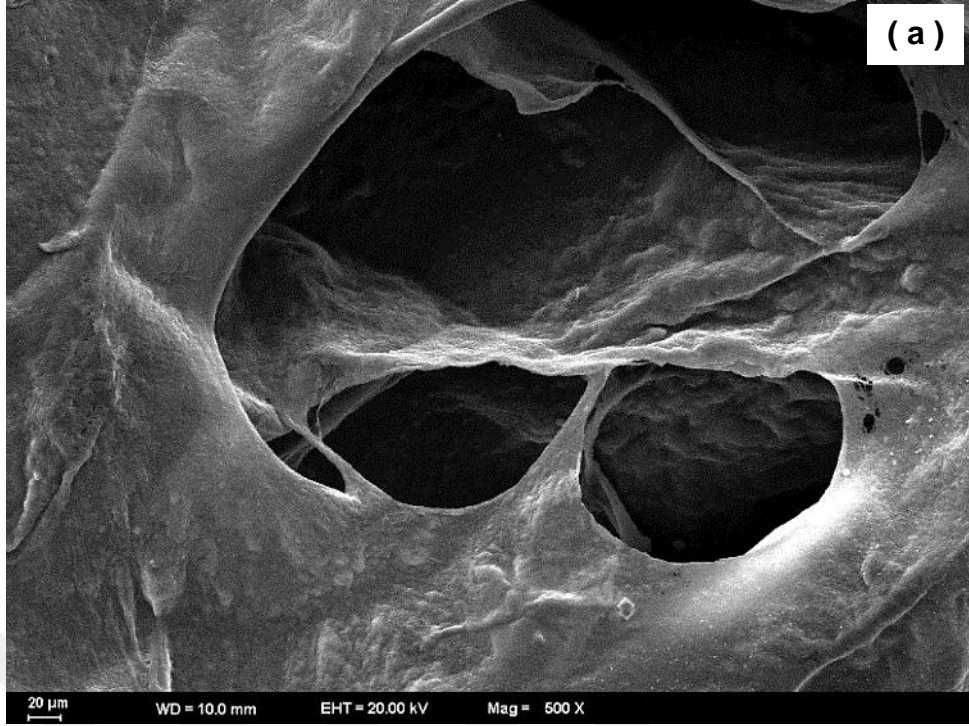
Elde edilen SEM görüntülerinde hidroksiapatit içermeyen grupta gözenekli bir substrat yüzeyi gözlenirken, içine belirli oranlarda hidroksiapatit eklenen gruplarda pürüzlü ve daha az gözenekli bir substrat yüzeyi gözlemlenmiştir. Hidroksiapatit partiküllerinin küre şeklinde bir yapıya sahip olduğu ve kümeler halinde dağıldığı gözlemlenmiştir.



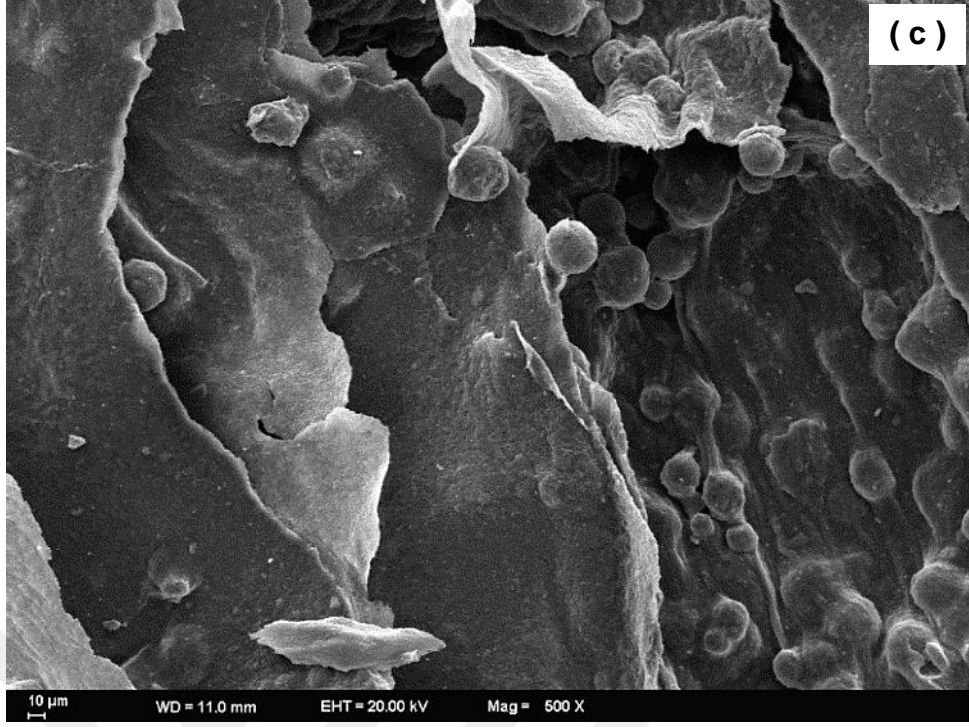
Şekil 4.1 100X büyütmede deselülerize kemik temelli (a) B, (b) BH50 ve (c) BH100 gruplarının SEM görüntüleri



Şekil 4.1 100X büyütmede desludgerize kemik temelli (a) B, (b) BH50 ve (c) BH100 gruplarının SEM görüntüleri (devam)



Şekil 4.2 500X büyütmede deselülerize kemik temelli (a) B, (b) BH50 ve (c) BH100 gruplarının SEM görüntüleri

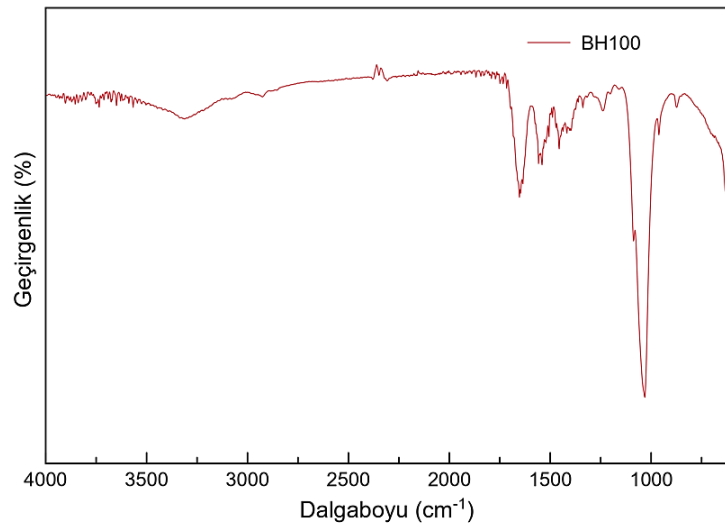
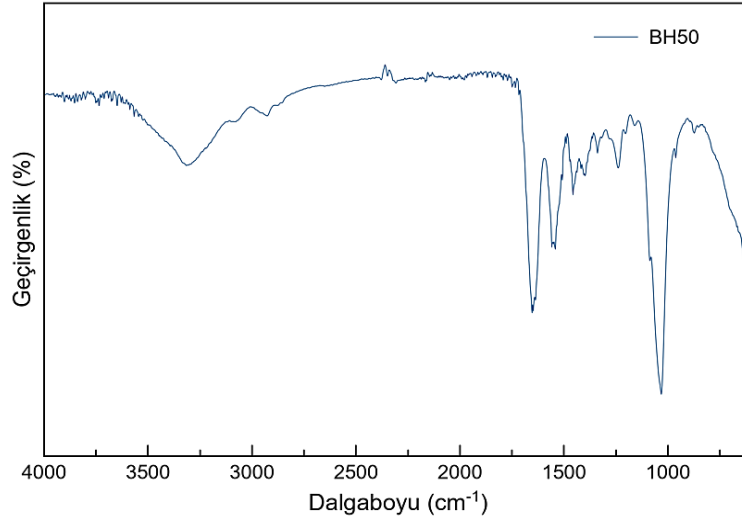
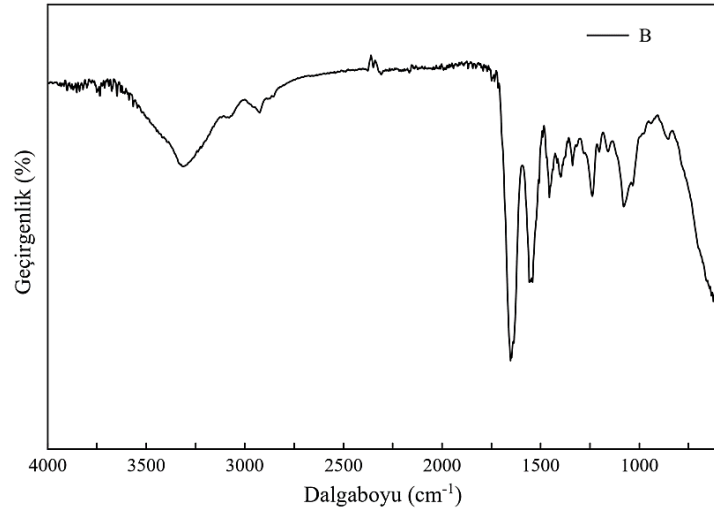


Şekil 4.2 500X büyütmede deselülerize kemik temelli (a) B, (b) BH50 ve (c) BH100 gruplarının SEM görüntüleri (devam)

#### 4.1.2 FTIR analizi bulguları

Deselülerize kemik temelli hidrojellerin yapısındaki fonksiyonel grupların incelenmesi için FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapıdaki bileşenlerin dalga boyuna karşılık yüzde (%) geçirgenlik pikleri incelenerek teyit edilmiştir ve literatür ile karşılaştırılması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.3'te gösterilmiştir.

Deselülerize kemik matriksinin FTIR analizinde  $1238\text{ cm}^{-1}$  bandında Amid III gerilmesi,  $1545\text{ cm}^{-1}$  bandında Amid II ve  $1660\text{ cm}^{-1}$  bandında Amid I gerilmesi tespit edilmiştir (Parmaksız vd. 2021).  $2930\text{ cm}^{-1}$  bandında ise  $\text{CH}_2$  asimetrik gerilmesi gözlemlenmiştir. Hidroksiapatit katkılı hidrojel gruplarında ise  $604$ ,  $963$ ,  $1051$  ve  $1111\text{ cm}^{-1}$  bantlarında  $\text{PO}_4^{3-}$  pikleri algılanmıştır (Cengiz vd. 2008).

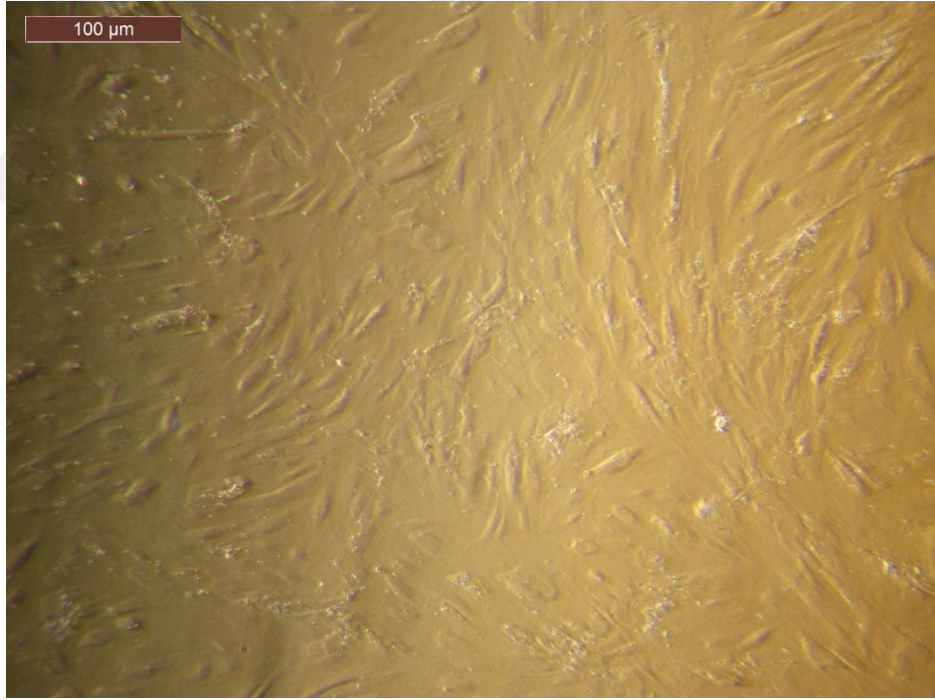


Şekil 4.3 Deselülerize kemik temelli B, BH50 ve BH100 gruplarının FTIR spektrumları

#### 4.2 İnsan Adipoz Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyon Bulguları

Ticari olarak temin edilen insan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin temel mezenkimal kök hücre özelliklerini taşıdıklarının belirlenebilmesi amacıyla üçlü soya farklılaşma, akım sitometri ve CFU analizleri yapıldı.

Standart hücre kültürü koşullarında kültürü yapılan insan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin morfolojisi invert mikroskobu ile incelendi. Kültürü yapılan hücrelerin kültür kabının tabanına yapıştıkları, fibroblastik hücre morfolojisine sahip oldukları ve 7 ila 10 gün içerisinde çoğalmaya başladıkları görüldü (Şekil 4.4).



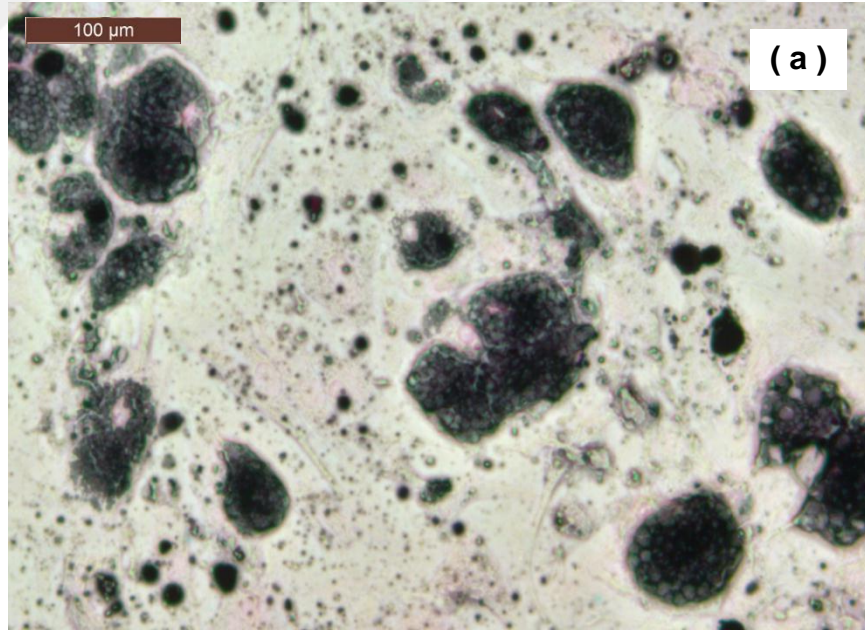
Şekil 4.4 Kültürü yapılan ve çoğaltılan insan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin invert mikroskop görüntüsü

#### 4.2.1 İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin üçlü soya farklılaştırılması bulguları

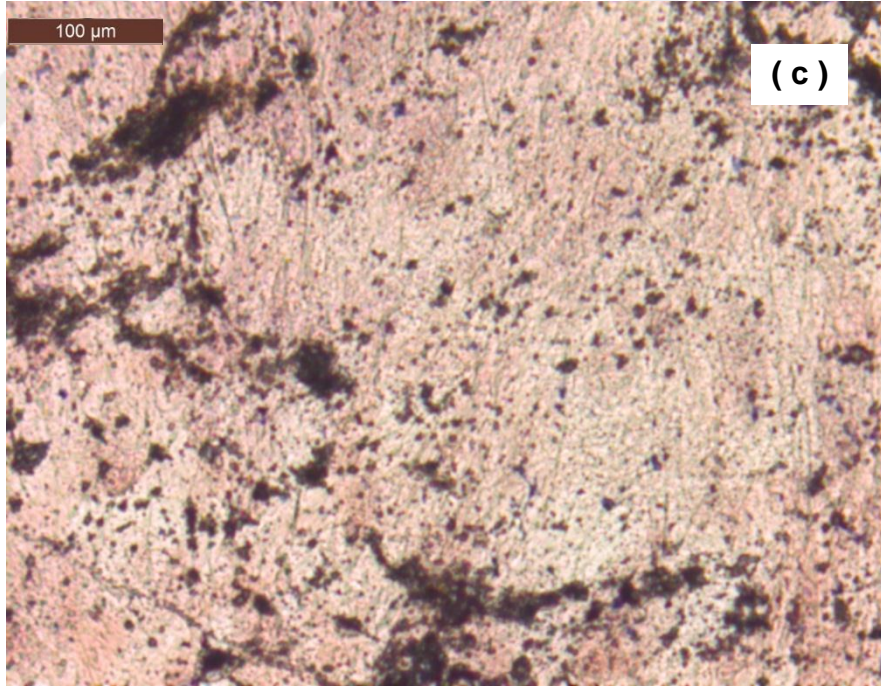
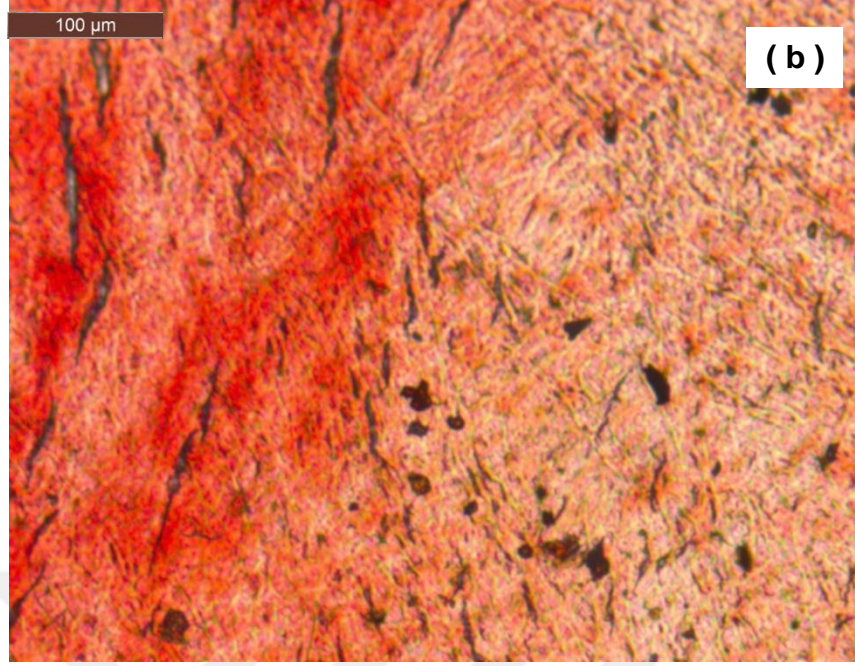
Kültürü yapılan insan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin adipojenik, osteojenik ve kardiyojenik farklılaşma potansiyelleri *in vitro* koşullarda incelendi. Hücrelerin 7-31 günlük farklılaşma ortamında kültüre edilmeleri sonrasında adipojenik, osteojenik ve kardiyojenik hücelere farklılaştıkları görüldü.

##### 4.2.1.1 Üçlü soy farklılaşmasının histokimyasal bulguları

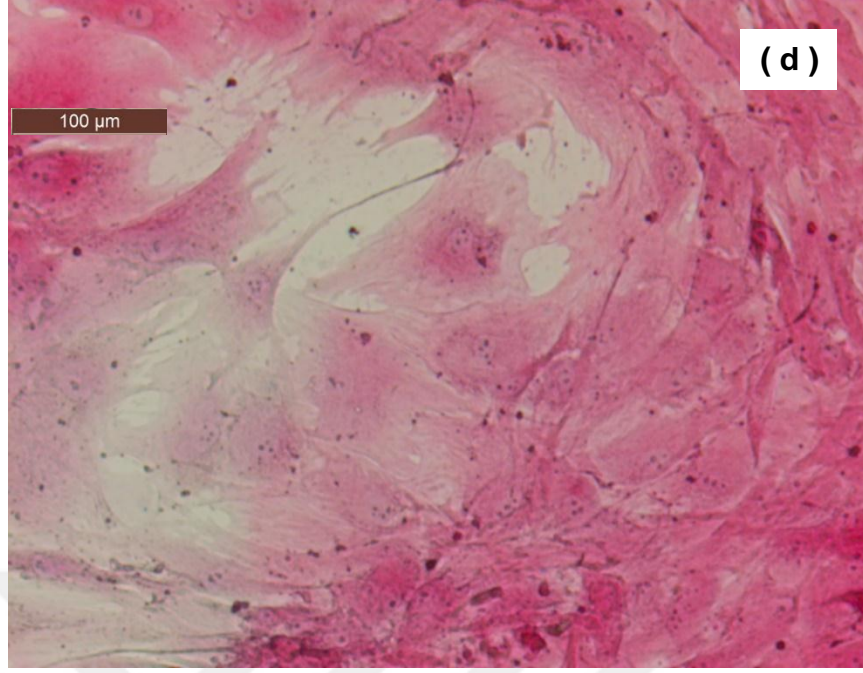
Üçlü soya farklılaştırılan insan ADMKH'leri indüksiyonların belirli günlerinde toplandı. Toplanan hücre örneklerinin *in vitro* koşullarda adipojenik, osteojenik ve kardiyojenik farklılaşma potansiyellerini incelemek için Sudan Siyahı, Alizarin Kırmızısı, Von Kossa ve Hematoksilen-Eozin boyamaları yapıldı ve ışık mikroskopunda görüntülendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin sırasıyla (a) adipojenik, (b,c) osteojenik ve (d) kardiyojenik farklılaştırılmasının invert mikroskop görüntüleri



Şekil 4.5 İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin sırasıyla (a) adipojenik, (b,c) osteojenik ve (d) kardiyojenik farklılaştırılmasının invert mikroskop görüntüleri (devam)



Şekil 4.5 İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin sırasıyla (a) adipojenik, (b,c) osteojenik ve (d) kardiyojenik farklılaştırılmasının invert mikroskop görüntüleri (devam)

#### 4.2.2 İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analizi bulguları

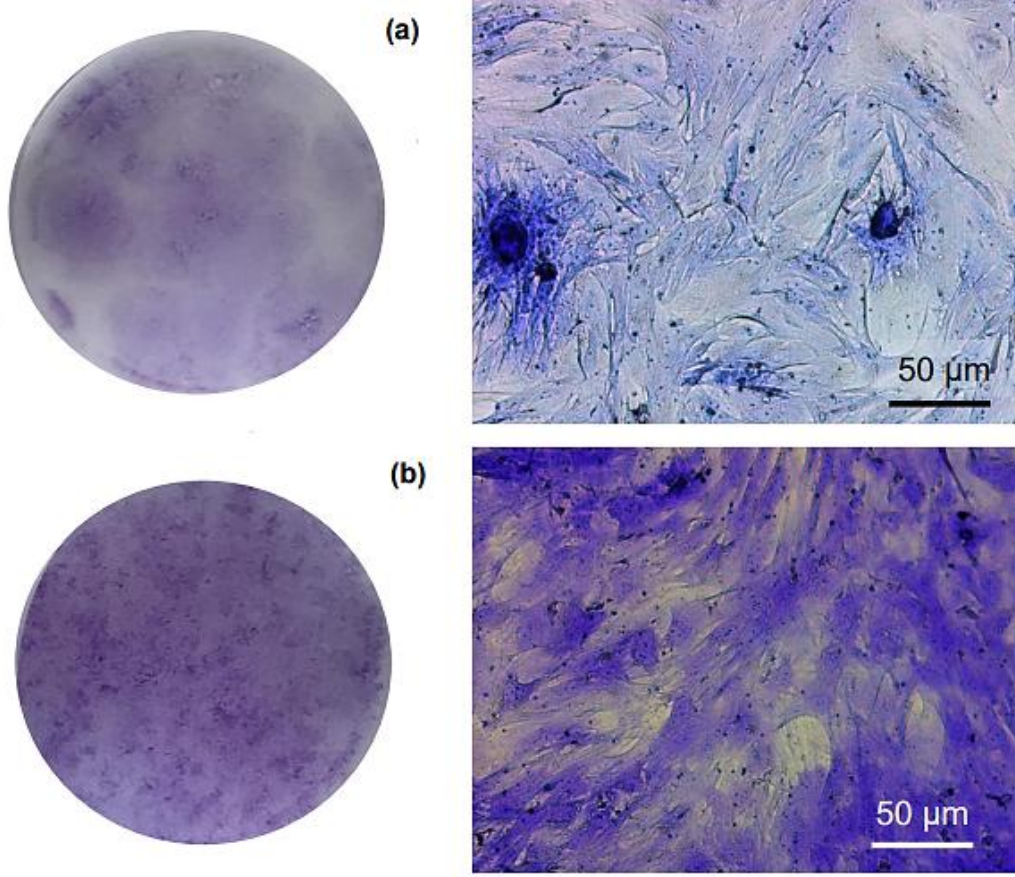
Karma pasajdaki insan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analizi sonucunda, hücrelerin adipoz kaynaklı kök hücre olma kriterlerinde belirtilen yüzey molekül belirteçlerinden olan CD29, CD105, CD133, CD90 ve CD73 yüzey antijenlerini pozitif yönde eksprese ettiği; CD34, CD31, LIN ve HLA-DR yüzey antijenlerini ise negatif yönde eksprese ettiği belirlendi. Bu hücrelerin akım sitometri analiz bulguları çizelge 4.1’de gösterildi.

Çizelge 4.1 İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri sonuçları

YÜZEY BELİRTEÇLERİ	%ORAN	POZİTİF/NEGATİF
CD29	%98,38	POZİTİF
CD105	%98,31	POZİTİF
CD133	%94,51	POZİTİF
CD90	%98,38	POZİTİF
CD73	%98,38	POZİTİF
CD34	%0,04	NEGATİF
CD31	%0,00	NEGATİF
LIN	%0,08	NEGATİF
HLA-DR	%0,00	NEGATİF

#### 4.2.3 İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin CFU analizi bulguları

İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri CFU analizi ile incelendi. Kültür kabına 100 ve 10000 hücre olacak şekilde ekimi yapılan iADMKH'lerin, 21 gün sonra CFU analizi sonucunda koloni oluşturma yeteneğine sahip oldukları görüldü (Şekil 4.6).



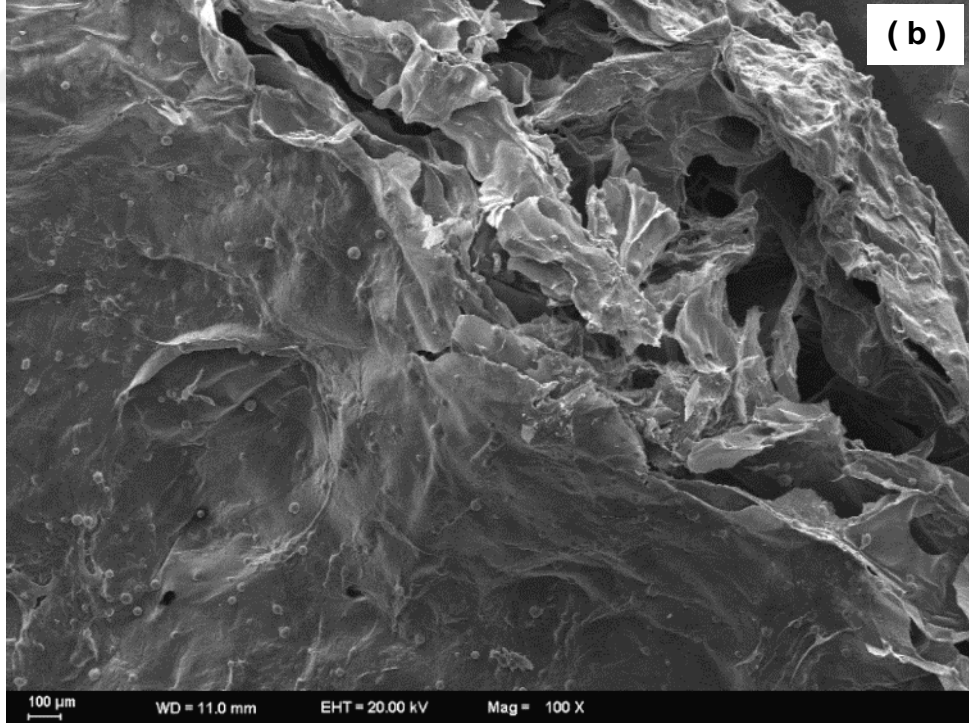
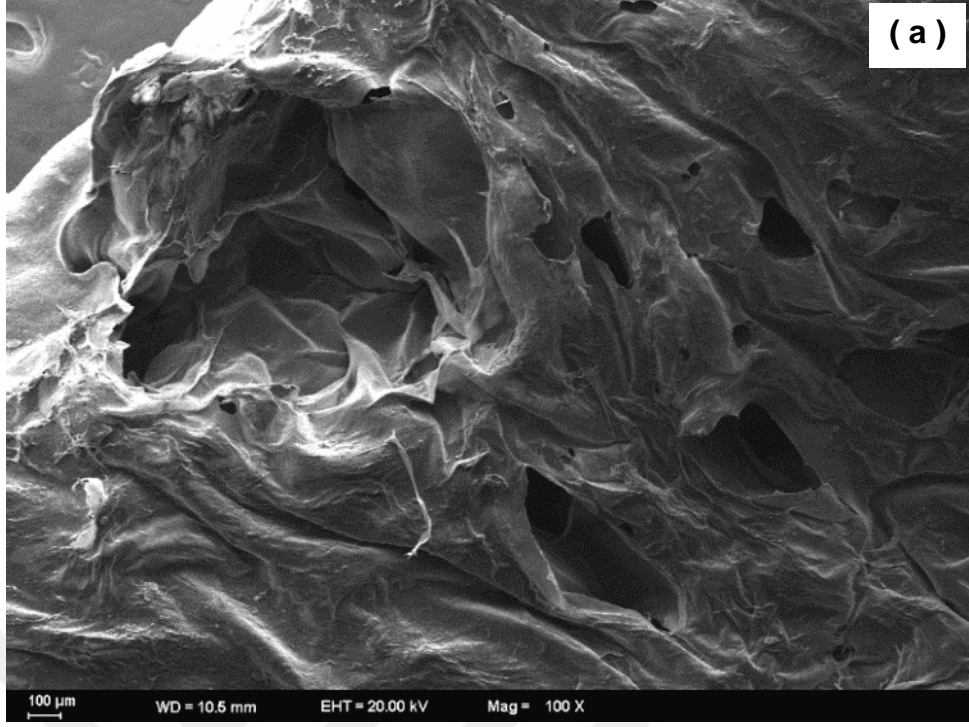
Şekil 4.6 İnsan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 21 günlük kültürde CFU görüntüleri. (a) 100 hücre/cm<sup>2</sup> ve (b) 10000 hücre/cm<sup>2</sup> ekim yoğunluğu

### 4.3 Özel Kültür Yüzeyi Analizlerinin Bulguları

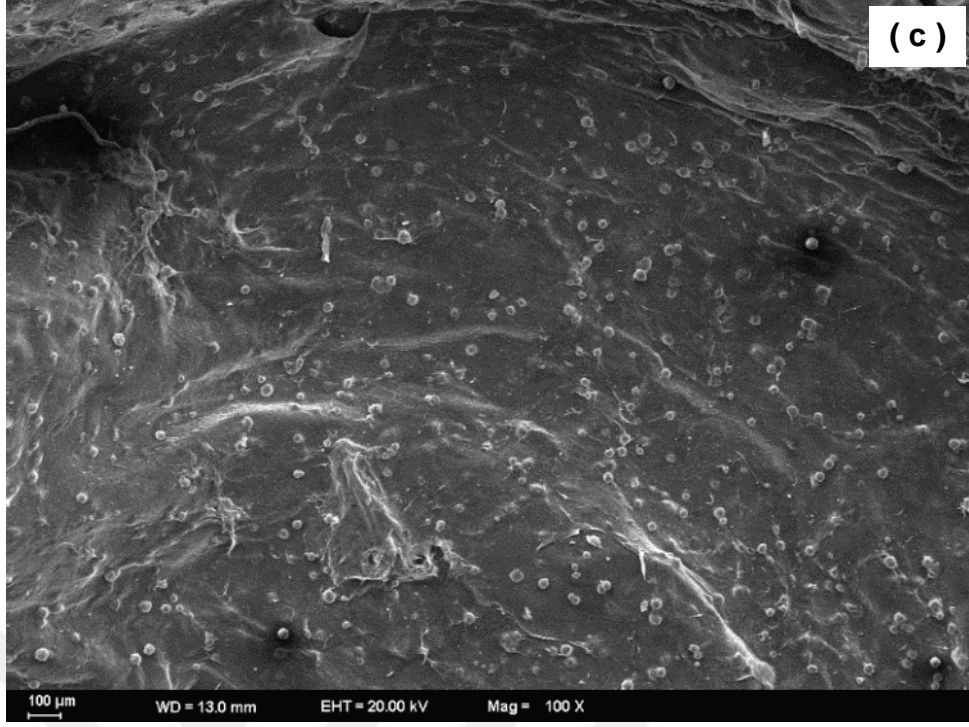
#### 4.3.1 SEM analizi bulguları

Üzerine iADMKH ekimi yapılan özel kültür yüzeyi gruplarının morfolojilerinin incelenmesi için SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen SEM görüntüleri şekil 4.7 ve 4.8’de sunulmuştur.

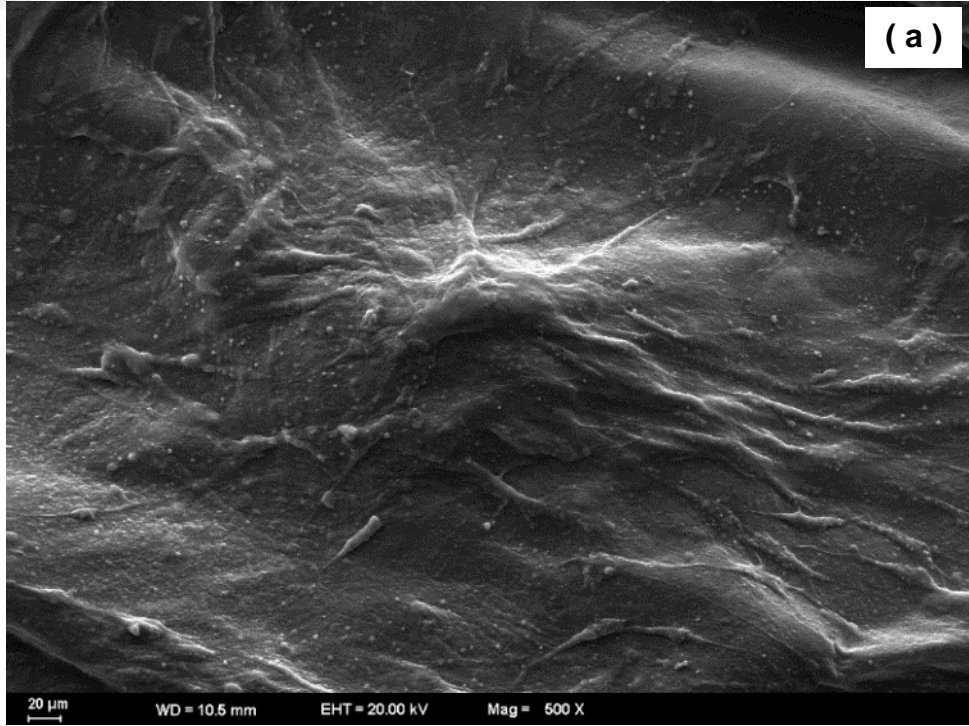
Elde edilen SEM görüntülerinde, gruplardaki hücrelerin fibroblastik bir yapı oluşturarak yüzeye tutunduğu ve hidrojeldaki gözenekli kısmı doldurduğu gözlemlenmiştir.



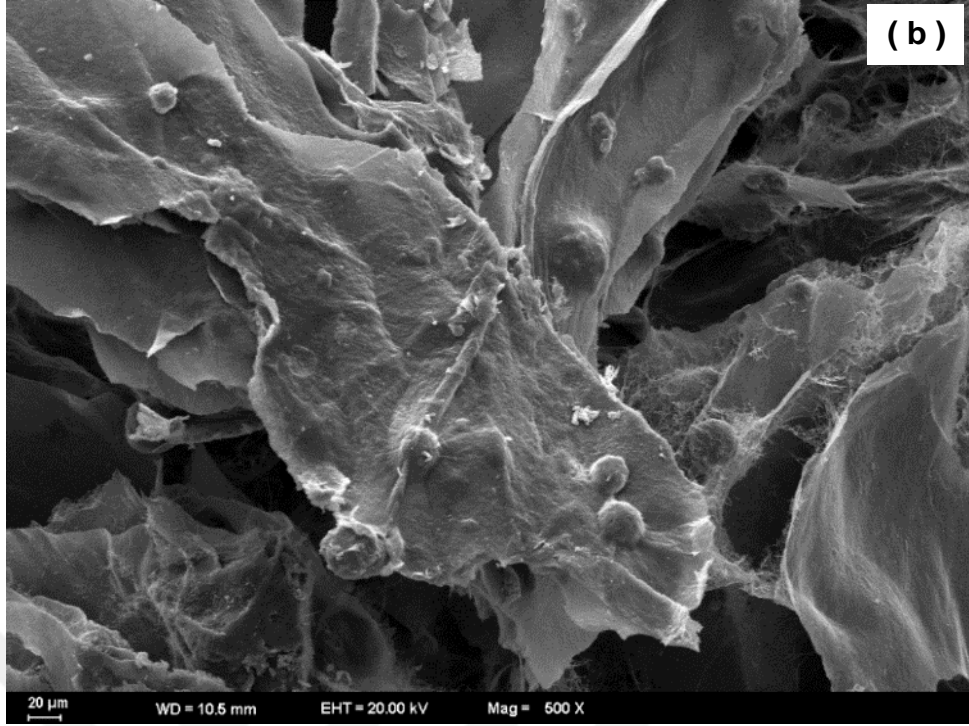
Şekil 4.7 100X büyütmede üzerine insan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre ekimi yapılan deselülerize kemik temelli (a) B, (b) BH50 ve (c) BH100 gruplarının SEM görüntüleri



Şekil 4.7 100X büyütmede üzerine insan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre ekimi yapılan deselülerize kemik temelli (a) B, (b) BH50 ve (c) BH100 gruplarının SEM görüntüleri (devam)




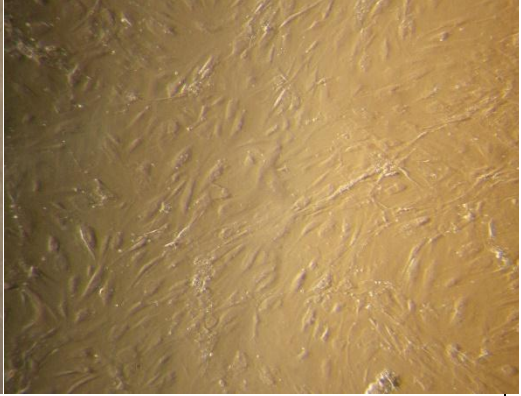
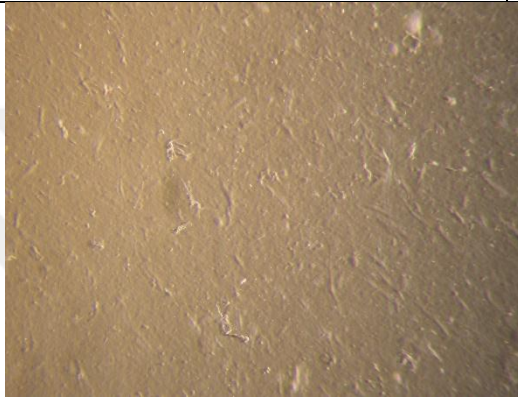

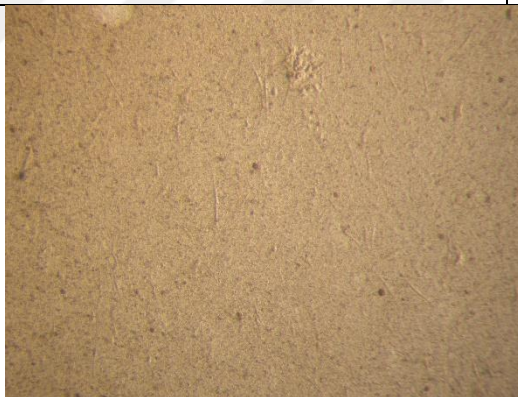
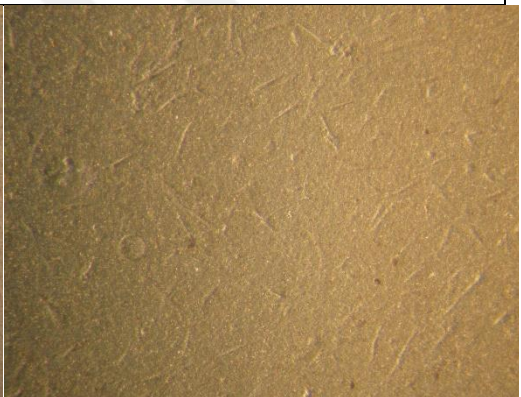

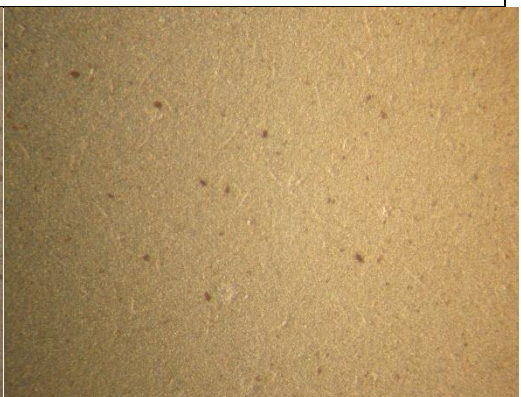
Şekil 4.8 500X büyütmede üzerine insan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre ekimi yapılan deselülerize kemik temelli (a) B, (b) BH50 ve (c) BH100 gruplarının SEM görüntüleri



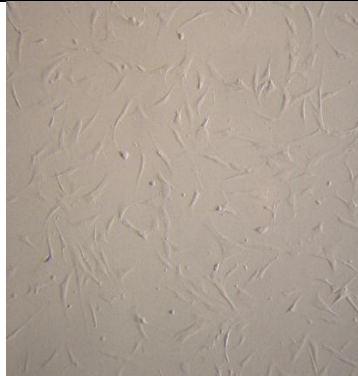
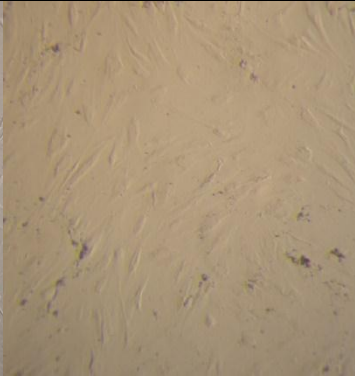
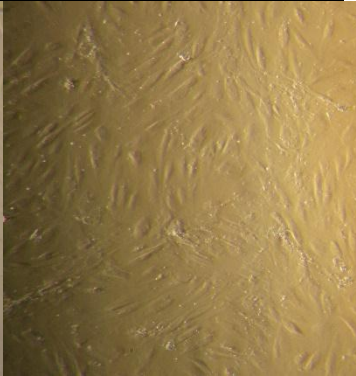


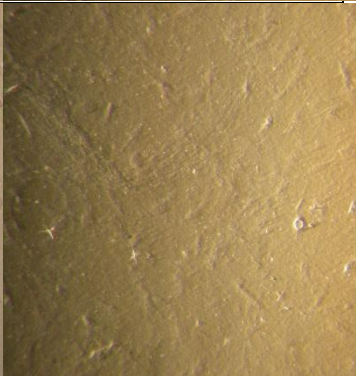
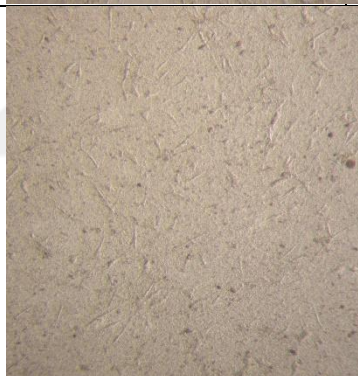

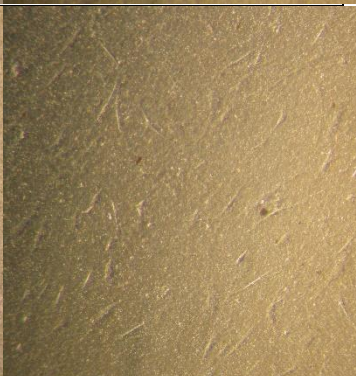


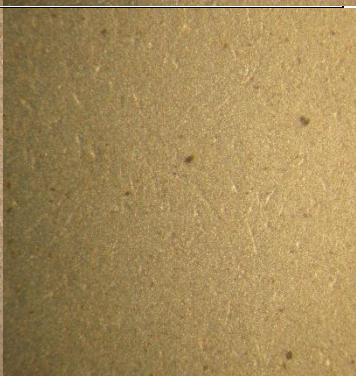
Şekil 4.8 500X büyütmede üzerine insan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre ekimi yapılan deselüerize kemik temelli (a) B, (b) BH50 ve (c) BH100 gruplarının SEM görüntüleri (devam)

#### **4.4 İnsan Adipoz Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök hücrelerin ve Özel Kültür Yüzeylerinin Elektromanyetik Alan ve Standart İnkübatörde Analiz Bulguları**

Bir hafta boyunca elektromanyetik alanda ve standart inkübatörde bekletilen iADMKH'ler (kontrol grubu) ve özel kültür yüzeyi gruplarından belirli günlerde toplanan örnekler invert mikroskobu ile görüntülenmiştir. Elde edilen görüntüler şekil 4.9 ve şekil 4.10'da sunulmuştur.

	3. gün	7. gün
K		
B+K		
BH50+K		
BH100+ K		

Şekil 4.9 Standart inkübatördeki iADMKH ve özel kültür yüzeylerinin belirlenen günlerde çekilen invert mikroskop büyötmeleri

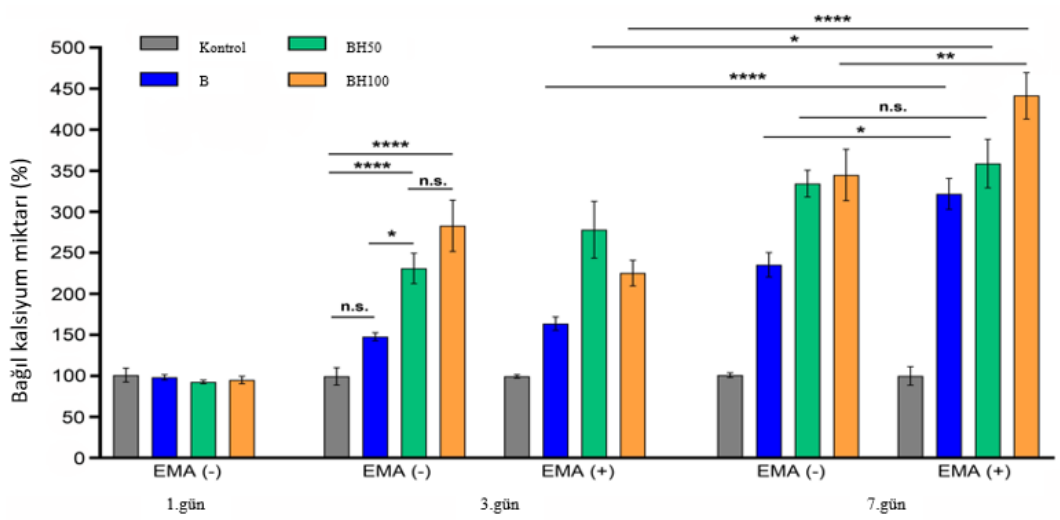
	1.gün	3. gün	7. gün
K			
B+K			
BH50 +K			
BH10 0+K			

Şekil 4.10 DFD-EMA'daki iADMKH ve özel kültür yüzeylerinin belirlenen günlerde çekilen invert mikroskop büyütmelemleri

#### 4.4.1 Metabolik analiz bulguları

##### 4.4.1.1 Kalsiyum analizi bulguları

Deney kitinin içeriğinde bulunan kalsiyum standardı ve çalışma çözeltileri kullanılarak 612 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler yapıldı ve bir kalibrasyon eğrisi elde edildi. Ölçümlerin sonucunda elde edilen kalsiyum değerleri Şekil 4.11’de verilmiştir.

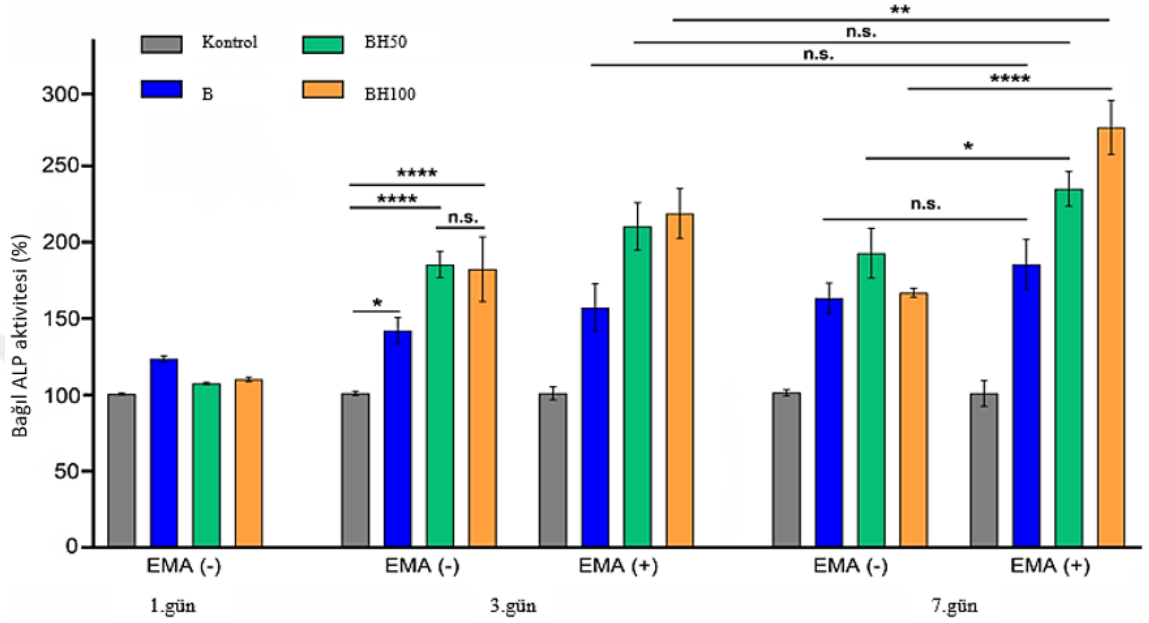


Şekil 4.11 Standart ve DFD-EMA grubu *in vitro* örneklerinin  $Ca^{2+}$  değerleri (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , ns: anlamlı fark yok)

##### 4.4.1.2 Alkalen fosfataz analizi bulguları

Alkalen fosfataz analizinde tartrazin standardı kullanılarak kültürün 1., 3. ve 7. günlerinde alınan örneklerin 0. ve 4. dakikalarda 405 nm’de ölçümleri alındı ( $OD_{ÖRNEK0}$  ve  $OD_{ÖRNEK4}$ ). Aktivitenin ölçümünde aşağıda verilen hesaplama formülü kullanıldı. Elde edilen alkalen fosfataz analiz sonuçları Şekil 4.12’de verilmiştir.

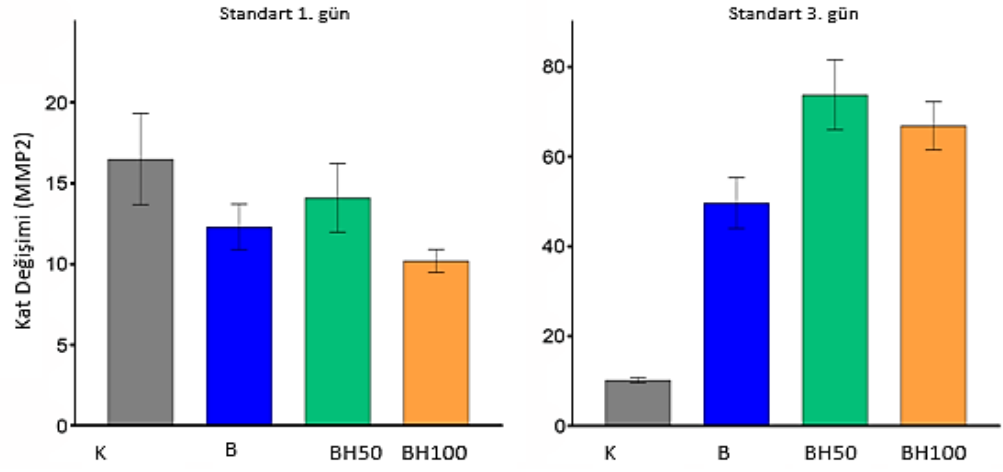
$$\text{ALP aktivitesi} = \frac{\text{OD örnek}(t_4) - \text{OD örnek}(t_0) \times \text{Reaksiyon hacmi}}{\text{OD kalibratör} - \text{OD su} \times \text{örnek hacmi} \times t_4} \times 35,3$$



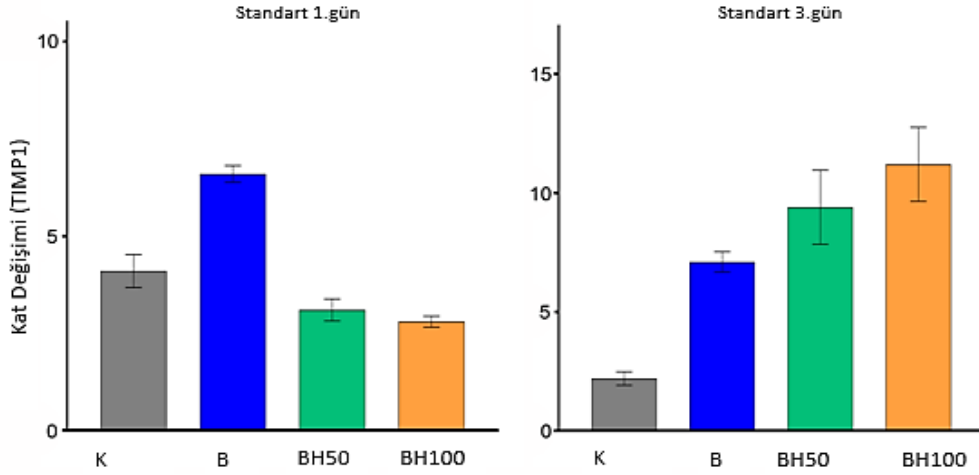
Şekil 4.12 Standart ve DFD-EMA grubu *in vitro* örneklerinin ALP değerleri (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$ , ns: anlamlı fark yok)

#### 4.4.2 Gen ifadesi analizi bulguları

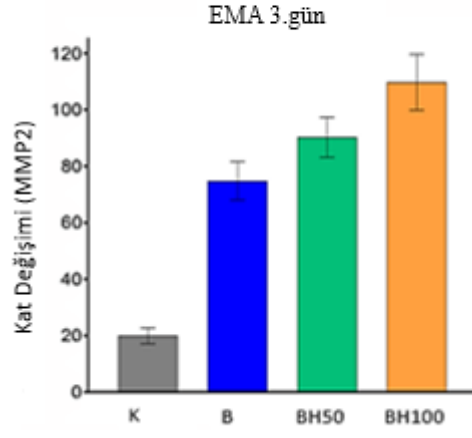
Standart inkübatör ve DFD-EMA grubundaki deney gruplarından izole edilen mRNA örneklerinin “Transcriptor First Strand” kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Eldesi gerçekleştirilen cDNA’lar eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanıldı. Bir sonraki aşamada 96 kuyulu plakada ve Roche Light Cycler 480 cihazında profillendirilen matriks metalloproteinaz genlerinin ifade seviyesi belirlendi. Standart inkübatör ve düşük frekanslı darbeli elektromanyetik alana tabi tutulan grupların belirli zaman noktalarındaki RT-PCR sonuçları şekil 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16’da gösterildi.



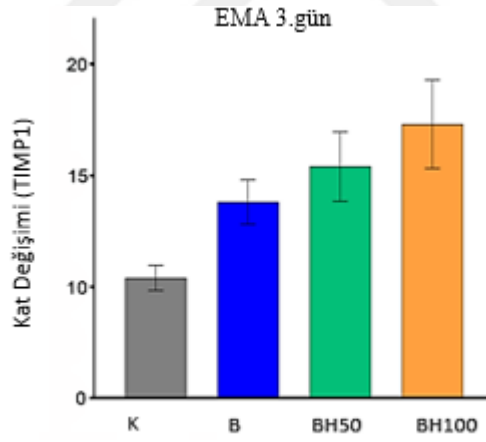
Şekil 4.13 Deney gruplarının 1. ve 3. günde standart (STD) inkübatör etkisinde MMP-2 ifadesi



Şekil 4.14 Deney gruplarının 1. ve 3. günde standart (STD) inkübatör etkisinde TIMP-1 ifadesi



Şekil 4.15 Deney gruplarının 3. günde DFD-EMA etkisinde MMP-2 ifadesi



Şekil 4.16 Deney gruplarının 3.günde DFD-EMA etkisinde TIMP-1 ifadesi

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma kapsamında içine belirli oranlarda hidroksiapatit katılan deselülerize kemik temelli bir hidrojel oluşturulup, elde edilen hidrojin üzerine insan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre ekimi yapılarak özel kültür yüzeyleri elde edilmiştir. Elde edilen özel kültür yüzeylerinin, matriks metalloproteinaz enzimi aktivitesine olan etkisinin incelenmesine yönelik olarak eş-zamanlı PCR'da gen ifadesi analizleri gerçekleştirilmiştir.

Oluşturulan deselülerize kemik temelli hidrojinlerin SEM analizi gerçekleştirilerek karakterizasyonu yapılmıştır. SEM analizinin bulgularında içinde HA olmayan hidrojel grubunda substrat yüzeyi gözenekli bir yapıda gözlenirken, gruplara belirli oranlarda HA eklenmesiyle substrat yüzeyinin daha az gözenekli bir hale geldiği, HA partiküllerinin ise kümeler halinde yayılıp, küre biçimli bir yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Deselülerize kemik temelli hidrojel ve içine belirli oranlarda HA eklenen hidrojel grubunun karakterizasyonu için FTIR analizi de gerçekleştirilmiştir. HA içermeyen gruptan farklı olarak, HA'lı hidrojinlerde HA'ya spesifik olan  $PO_4^{3-}$  bantları gözlemlenmiştir.

Deselülerize kemik temelli hidrojel oluşturulmasından sonra, ticari olarak temin edilen ve çoğaltılan insan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler standart yöntemlerle çözülüp kültüre alınmıştır. Hücreler, %80 yoğunluğa ulaştığı zaman tripsin işlemine tâbi tutulmuştur. Tripsin işlemi sonrası kültür kaplarına yeniden ekilen hücrelerin üçlü soya farklılaşma, CFU oluşumu ve akım sitometri analizi olmak üzere karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Bu aşamalardan sonra, bir adet insan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre grubu (kontrol grubu) ve üzerine mezenkimal kök hücre ekimi gerçekleştirilen üç adet deselülerize kemik temelli hidrojel grubu (özel kültür yüzeyleri) ile dört adet deney grubu elde edilmiştir.

Özel kültür yüzeylerinin karakterizasyon çalışmaları bağlamında, SEM analizi gerçekleştirilmiştir. SEM analizi görüntülerinde içinde hidroksiapatit bulundurmayan hücreli grupta, içinde hidroksiapatit bulunduran hücreli gruba göre daha fazla boşluğa sahip bir substrat yüzeyi gözlenmiştir. Hücreli grupta ayrıca hücrenin yüzeye tutunarak ağ şeklinde bir yapı oluşturduğu gözlemlenmiştir. Hidroksiapatit eklenen hücreli gruplarda ise hidroksiapatit partiküllerinin kümeler halinde dağılıp, küre şeklinde bir yapıya sahip olduğu görülmüştür.

Kontrol grubu ve özel kültür yüzeyleri bir hafta boyunca günde 24 saat süre ile 1.3 mT yoğunluğa ve 15 Hz frekansa sahip bir düşük frekanslı darbeli elektromanyetik alan sistemi içine yerleştirilmiştir. Bir hafta sonra aynı deney grupları standart inkübatör içerisine yerleştirilmiştir. Belirli günlerde çekilen invert mikroskop görüntülerinde DFD-EMA'ya tabi tutulan deney gruplarındaki hücrelerin, standart inkübatördeki gruplara oranla proliferasyon seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir. Literatürde kemik oluşumunu (osteogenez) indüklemek için kullanılan DFD-EMA sinyalinin genlik ve frekansının sırasıyla 0.1 ila 3 mT ve 7.5 ila 75 Hz arasında değişmekte olduğu ve bunun aynı zamanda DFD-EMA konfigürasyonlarına, cihazlarına, yöntemine, uygulama ve maruz kalma süresine bağlı olarak değişen sonuçlara sahip olduğu gösterilmektedir (Poh vd. 2018). Elde ettiğimiz sonuçlarda özel kültür yüzeyi gruplarındaki hücrelerin DFD-EMA'da yüzeye iyice tutunup gömüldüğü görülmüştür.

Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması hücre çoğalması, matriks olgunlaşması ve matriks mineralizasyonu olmak üzere üç kısımdan oluşur (Huang vd. 2007). Alkalen fosfataz ise kemik oluşumu ve farklılaşmasının başlamasını belirlemek için kullanılan bir enzimdir ve kemik mineralizasyonunun ana düzenleyicisidir (Luo vd. 2012, Szulc vd 2021). Osteoblast farklılaşmasının erken bir belirteci olarak kabul edilen ALP osteoblast aktivitesinin bir yan ürünü olduğundan, enzimin artan seviyesi aktif kemik oluşumunu ifade eder (Lee vd. 2017). Elde ettiğimiz sonuçlarda standart inkübatör ortamında 1. günden itibaren B, BH50 ve BH100 gruplarında bir artış gözlemlenmiştir. Elektromanyetik alan etkisi altındaki deney gruplarında ise 3. günden itibaren erken farklılaşma sonrası özellikle hidroksiapatit katkılı gruplarda (BH50,

BH100) bir artış gözlemlenmiştir. Prakash ve Behari (2009) yaptıkları çalışmada darbeli elektromanyetik alan etkisi altında ve HA içeren grubun kontrol grubuna kıyasla yüksek ALP aktivitesi gösterdiğini bulmuşlardır. Esposito vd. (2012) yaptıkları çalışmada darbeli elektromanyetik alan etkisindeki KİMKH'lerin kontrol grubuna kıyasla ilk 48 saatte ALP aktivitesinin yükseldiğini gözlemlemişlerdir.

Temel bir sinyal habercisi olan kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ), hücre büyümesinden farklılaşmaya ve hücre ölümüne kadar çeşitli hücre fonksiyonları modüle eder (Viti vd. 2016). Normal büyüme, gelişme ve kemik gücü için gerekli olan kalsiyum iskelet mineralizasyonunda önemli bir rol oynamakla birlikte kemiği, iskeletin sağlamlığını ve yapısını koruyarak hücre içi ve hücre dışı kalsiyum havuzunun dengesini sağlamak adına metabolik bir depo haline getirir. Kanda, hücre dışı sıvılarda, kaslarda ve diğer dokularda da bulunan kalsiyum, kemikteki işlevleriyle beraber hücre içi ve hücre dışı sinyalleşme, kas kasılması, damar kasılması, gevşemesi ve sinir uyarı iletimine aracılık etmekten de sorumludur (Vannucci vd. 2018). Elde ettiğimiz sonuçlarda standart inkübatör ortamındaki  $Ca^{2+}$  aktivitesinde deselülerize kemik matriksi ve hidroksiapatit eklenen gruplarda (B, BH50 ve BH100) özellikle 3.günden itibaren farklılaşma gerçekleşmesinden sonra kalsiyum aktivitesinde artışla birlikte kalsiyum depolanmaya başlandığı gözlemlenmiştir. EMA ortamında ise elektromanyetik alanın etkisiyle 3.günden itibaren özellikle hidroksiapatit katkılı gruplarda (BH50, BH100) kalsiyum aktivitesinde artış ve kalsiyum depolanmaya başlandığı gözlemlenmiştir. Lin ve Lu (2010) yaptıkları çalışmada DFD-EMA sistemi, osteoblast hücreleri ve kitosan iskeleleri kullanarak yaptıkları çalışmada DFD-EMA'ya tabi tutulan ve iskele üzerine tohumlanan grubun kontrol grubuna göre kalsiyum miktarında %74'lük bir artış gözlemlemişlerdir. Arjmand vd. (2017) yaptıkları çalışmada kemik doku mühendisliğinde kullanılan bir biyomalzeme olan polikaprolakton yüzeyine tohumlanmış ve DFD-EMA'ya tabi tutulmuş ADMKH'lerin kalsiyum aktivitesinin zamana bağlı olarak (7. gün, 14.gün ve 21. gün) arttığını göstermişlerdir.

Adipoz ve kemik dokuda görev alan matriks metalloproteinazlarla ilgili yapılan gen ifadesi çalışmaları çeşitli literatürlerde ele alınmıştır. MMP-1, 2, 3, 13, 14, TIMP-1 ve

TIMP-3 adipoz dokuda ifade gösteren genlerdir (Berg vd. 2019, Chavey vd. 2003). Bununla birlikte yine birçok literatür çalışmasında çeşitli MMP'lerin iskelet sisteminde kemik doku gelişiminde, kemik doku yeniden şekillenmesinde görev aldığı bilinmektedir. MMP-2, kemiğin mineral yoğunluğunu ve gücünü koruyan bir enzimdir. Nakavt fare modellerinde MMP-2 eksikliğinin tibia ve femur uzunluğunu kısalttığı gözlemlenmiştir ve MMP-2 yokluğu, osteoblast azalmasına da sebebiyet verir (HPH, 2016). Elde ettiğimiz sonuçlarda 1.günde standart inkübatör ortamında, adipoz ve kemik dokuda ifade edildiği bilinen MMP-2'nin K, B, BH50 ve BH100 gruplarında ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir. MMP-2'yi inhibe etme özelliği olan TIMP-1 ise MMP-2 ifadesine göre daha düşük seviyelerde ifade göstermiştir. Standart inkübatör ortamında 3. günde ise özellikle B, BH50 ve BH100 gruplarında MMP-2 ifadesinde bir artış, TIMP-1 grubunda ise yine artan ancak MMP-2'ye göre daha düşük ifade seviyeleri gözlenmiştir.

Kemik dokuda bulunan matriks metalloproteinazların gen ifadesi elektromanyetik alan uygulaması gibi mekanik uyarılarla artabilmektedir. Jansen vd. (2010) yaptıkları çalışmada düşük frekanslı-darbeleri elektromanyetik alanın, kemik dokuda ifadesi gözlenen matriks metalloproteinazların gen ifadelerinin yukarı yönde regüle edildiğini göstermişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlarda, normal iskelet gelişimi sırasında kemik hücrelerinde en bol miktarda ifade edilen enzim olan MMP-2'nin DFD-EMA uygulaması sonucu bütün gruplarda özellikle de hidroksiapatit katkılı BH50 ve BH100 gruplarında ifadesinin arttığı görülmüştür. TIMP-1 grubunda ise yine artan ancak MMP-2'ye göre daha düşük ifade seviyeleri gözlenmiştir. Matriks metalloproteinazların inhibitörü olmanın yanı sıra TIMP'ler, normal kemik gelişimi esnasında da ifade edilirler (HPH, 2016). Sollazzo vd. (2010) yaptıkları bir çalışmada DF-EMA'nın MG-63 (osteoblast-benzeri) hücrelerinde TIMP-1 ifadesini arttırdığını gözlemlemişlerdir. TIMP-1'in normal gelişen kemikte yaygın ifadesi, onun MMP aktivitesini kontrol etmede bir rol oynar ve dolayısıyla gelişen insan kemiğinde kemik modelleme ve yeniden şekillenmenin düzenlenmesine katkıda bulunur (Bord vd. 1999).

Kemik oluşumu mezenkimal kök hücrelerden progenitör hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını ve osteoblastlar tarafından kemik matriksinin salgılanmasını ve mineralizasyonunu içeren, birkaç aşamalı bir süreçtir (Poh vd. 2018). Yapılan çalışmalarda kemik dokuda ve iskelet gelişiminde yer alan matriks metalloproteinazların ve düşük frekanslı darbeli elektromanyetik alanın kemik oluşumu, kemik yeniden şekillenmesi ve onarımı üzerinde majör boyutta etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Mekanik uyarılar, büyüme faktörleri, kemik oluşumunda görev alan proteinler ve enzimler, kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyoaktif, biyoçözünür ve biyouyumlu doğal ve yapay yapı iskeleleri, iskelet oluşumunda ve kemik yeniden şekillenmesinde görev alan matriks metalloproteinazlar ve/veya bu etmenlerin kombinasyonu, mezenkimal kök hücreleri osteojenik soya doğru farklılaşmaya itmeye beraber, onları kemik doku mühendisliği ve yenileyici tıp için oldukça büyük bir aday haline getirmektedir.

## KAYNAKLAR

- Ahokas, K., Lohi, J., Illman, S. A., Llano, E., Elomaa, O., Impola, U., ... & Saarialho-Kere, U. (2003). Matrix metalloproteinase-21 is expressed epithelially during development and in cancer and is up-regulated by transforming growth factor- $\beta$ 1 in keratinocytes. *Laboratory investigation*, 83(12), 1887-1899.
- Aimes, R. T., & Quigley, J. P. (1995). Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific  $\frac{3}{4}$ - and  $\frac{1}{4}$ -length fragments. *Journal of Biological Chemistry*, 270(11), 5872-5876.
- Akbarnejad, Z., Eskandary, H., Vergallo, C., Nematollahi-Mahani, S. N., Dini, L., Darvishzadeh-Mahani, F., & Ahmadi, M. (2017). Effects of extremely low-frequency pulsed electromagnetic fields (ELF-PEMFs) on glioblastoma cells (U87). *Electromagnetic biology and medicine*, 36(3), 238-247.
- Allan, J. A., Docherty, A. J. P., Barker, P. J., Huskisson, N. S., Reynolds, J. J., & Murphy, G. (1995). Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochemical Journal*, 309(1), 299-306.
- Arjmand, M., Ardeshtyrlajimi, A., Maghsoudi, H., & Azadian, E. (2018). Osteogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells cultured on nanofibrous scaffold improved in the presence of pulsed electromagnetic field. *Journal of Cellular Physiology*, 233(2), 1061-1070.
- Baker, A. H., Edwards, D. R., & Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of cell science*, 115(19), 3719-3727.
- Barky, A. R. E., Ali, E. M. M., & Mohamed, T. M. (2017). Stem Cells, Classifications and their Clinical Applications.
- Bar-Or, A., Nuttall, R. K., Duddy, M., Alter, A., Kim, H. J., Ifergan, I., ... & Yong, V. W. (2003). Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain*, 126(12), 2738-2749.
- Berg, G., Barchuk, M., & Miksztoewicz, V. (2019). Behavior of metalloproteinases in adipose tissue, liver and arterial wall: an update of extracellular matrix remodeling. *Cells*, 8(2), 158.
- Bettinger, C. J., Langer, R., & Borenstein, J. T. (2009). Engineering substrate topography at the micro- and nanoscale to control cell function. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(30), 5406-5415.
- Bloise, N., Petecchia, L., Ceccarelli, G., Fassina, L., Usai, C., Bertoglio, F., ... & Visai, L. (2018). The effect of pulsed electromagnetic field exposure on osteoinduction of human mesenchymal stem cells cultured on nano-TiO<sub>2</sub> surfaces. *Plos one*, 13(6), e0199046.

- Bord, S., Horner, A., Beeton, C. A., Hembry, R. M., & Compston, J. E. (1999). Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) distribution in normal and pathological human bone. *Bone*, 24(3), 229-235.
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, 9(5), 641-650.
- Cengiz, B., Gokce, Y., Yildiz, N., Aktas, Z., & Calimli, A. (2008). Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 322(1-3), 29-33.
- Chavey, C., Mari, B., Monthouel, M. N., Bonnafous, S., Anglard, P., Van Obberghen, E., & Tartare-Deckert, S. (2003). Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 11888-11896.
- Chowdhury, F., Na, S., Li, D., Poh, Y. C., Tanaka, T. S., Wang, F., & Wang, N. (2010). Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells. *Nature materials*, 9(1), 82-88.
- Dalby, M. J. (2005). Topographically induced direct cell mechanotransduction. *Medical engineering & physics*, 27(9), 730-742.
- Djuric, T., & Zivkovic, M. (2017). Overview of MMP biology and gene associations in human diseases. *Role Matrix Met. Hum. Body Pathol*, 1, 3-33.
- Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- Ebrahimi, M. (2019). Extracellular matrix: The ideal natural fibrous nanocomposite products. In *Applications of Nanocomposite Materials in Orthopedics* (pp. 263-286). Woodhead Publishing.
- Ehnert, S., Schröter, S., Aspera-Werz, R. H., Eisler, W., Falldorf, K., Ronniger, M., & Nussler, A. K. (2019). Translational insights into extremely low frequency pulsed electromagnetic fields (ELF-PEMFs) for bone regeneration after trauma and orthopedic surgery. *Journal of clinical medicine*, 8(12), 2028.
- Ehnert, S., Van Griensven, M., Unger, M., Scheffler, H., Falldorf, K., Fentz, A. K., ... & Balmayor, E. R. (2018). Co-culture with human osteoblasts and exposure to extremely low frequency pulsed electromagnetic fields improve osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 994.
- Elliot Jr, R. A., & Hoehn, J. G. (1973). Use of commercial porcine skin for wound dressings. *Plastic and reconstructive surgery*, 52(4), 401-405.
- Engler, A. J., Griffin, M. A., Sen, S., Bönnemann, C. G., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2004). Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness pathological implications for soft or stiff microenvironments. *Journal of Cell Biology*, 166(6), 877-887.

- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4), 677-689.
- Ermis, M., Antmen, E., & Hasirci, V. (2018). Micro and Nanofabrication methods to control cell-substrate interactions and cell behavior: A review from the tissue engineering perspective. *Bioactive materials*, 3(3), 355-369.
- Esposito, M., Lucariello, A., Riccio, I., Riccio, V., Esposito, V., & Riccardi, G. (2012). Differentiation of human osteoprogenitor cells increases after treatment with pulsed electromagnetic fields. *In vivo*, 26(2), 299-304.
- Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., & Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Development*, 16(3), 381-390.
- Garzón, I., Pérez-Köhler, B., Garrido-Gómez, J., Carriel, V., Nieto-Aguilar, R., Martín-Piedra, M. A., ... & Alaminos, M. (2012). Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 18(6), 408-419.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., & Yamada, K. M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(11), 793-805.
- Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T., & Einhorn, T. A. (2003). Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of cellular biochemistry*, 88(5), 873-884.
- Gilpin, A., & Yang, Y. (2017). Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. *BioMed research international*, 2017.
- Greggio, C., De Franceschi, F., Figueiredo-Larsen, M., Gobaa, S., Ranga, A., Semb, H., ... & Grapin-Botton, A. (2013). Artificial three-dimensional niches deconstruct pancreas development in vitro. *Development*, 140(21), 4452-4462.
- Gschweng, E., De Oliveira, S., & Kohn, D. B. (2014). Hematopoietic stem cells for cancer immunotherapy. *Immunological reviews*, 257(1), 237-249.
- Gubareva, E. A., Sjöqvist, S., Gilevich, I. V., Sotnichenko, A. S., Kuevda, E. V., Lim, M. L., ... & Macchiarini, P. (2016). Orthotopic transplantation of a tissue engineered diaphragm in rats. *Biomaterials*, 77, 320-335.
- Haeckel, E. (1868). *Natürliche Schöpfungsgeschichte. Gemeinverständliche wissenschaftliche Vorträge über die Entwicklungslehre im Allgemeinen und diejenige von Darwin, Goethe und Lamarck im Besonderen... Mit Tafeln, Holzschnitten, etc.*
- Haeckel, E. (1874). *Anthropogenie oder entwicklungsgeschichte des menschen*. W. Engelmann.
- Han, Y., Li, X., Zhang, Y., Han, Y., Chang, F., & Ding, J. (2019). Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Cells*, 8(8), 886.

- Hardy, E., & Fernandez-Patron, C. (2020). Destroy to Rebuild: The Connection Between Bone Tissue Remodeling and Matrix Metalloproteinases. *Frontiers in Physiology*, *11*, 47.
- Hasirci, V., & Kenar, H. (2006). Novel surface patterning approaches for tissue engineering and their effect on cell behavior.
- Hasirci, V., & Pepe-Mooney, B. J. (2012). Understanding the cell behavior on nano-/micro-patterned surfaces. *Nanomedicine*, *7*(9), 1375-1389.
- Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S. A., ... & Ward, J. M. (1999). MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*, *99*(1), 81-92.
- Huang, Z., Nelson, E. R., Smith, R. L., & Goodman, S. B. (2007). The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors to osteoblasts in vitro. *Tissue engineering*, *13*(9), 2311-2320.
- Hwang, N. S., Zhang, C., Hwang, Y. S., & Varghese, S. (2009). Mesenchymal stem cell differentiation and roles in regenerative medicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, *1*(1), 97-106.
- Isermann, P., & Lammerding, J. (2013). Nuclear mechanics and mechanotransduction in health and disease. *Current Biology*, *23*(24), R1113-R1121.
- Itoh, T., Ikeda, T., Gomi, H., Nakao, S., Suzuki, T., & Itohara, S. (1997). Unaltered secretion of  $\beta$ -amyloid precursor protein in gelatinase A (matrix metalloproteinase 2)-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(36), 22389-22392.
- Iyer, R. P., Patterson, N. L., Fields, G. B., & Lindsey, M. L. (2012). The history of matrix metalloproteinases: milestones, myths, and misperceptions. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *303*(8), H919-H930.
- Jansen, J. H., van der Jagt, O. P., Punt, B. J., Verhaar, J. A., van Leeuwen, J. P., Weinans, H., & Jahr, H. (2010). Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: an in vitro study. *BMC musculoskeletal disorders*, *11*(1), 1-11.
- Kang, K. S., Hong, J. M., Kang, J. A., Rhie, J. W., Jeong, Y. H., & Cho, D. W. (2013). Regulation of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by controlling electromagnetic field conditions. *Experimental & molecular medicine*, *45*(1), e6-e6.
- Kersch-Schindl, K., & Ebenbichler, G. (2016). Osteoimmunological Aspects of Biomechanics. In *Principles of Osteoimmunology* (pp. 109-124). Springer, Cham.
- Kim, N., & Cho, S. G. (2013). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *The Korean journal of internal medicine*, *28*(4), 387.

- Kolb, C., Mauch, S., Peter, H. H., Krawinkel, U., & Sedlacek, R. (1997). The matrix metalloproteinase RASI-1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid arthritis patient. *Immunology letters*, 57(1-3), 83-88.
- Kurpinski, K., Chu, J., Hashi, C., & Li, S. (2006). Anisotropic mechanosensing by mesenchymal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44), 16095-16100.
- Lee, J. M., Kim, M. G., Byun, J. H., Kim, G. C., Ro, J. H., Hwang, D. S., ... & Kim, U. K. (2017). The effect of biomechanical stimulation on osteoblast differentiation of human jaw periosteum-derived stem cells. *Maxillofacial plastic and reconstructive surgery*, 39(1), 1-9.
- Leferink, A. M., Chng, Y. C., van Blitterswijk, C. A., & Moroni, L. (2015). Distribution and viability of fetal and adult human bone marrow stromal cells in a biaxial rotating vessel bioreactor after seeding on polymeric 3D additive manufactured scaffolds. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 169.
- Li, W., Gibson, C. W., Abrams, W. R., Andrews, D. W., & DenBesten, P. K. (2001). Reduced hydrolysis of amelogenin may result in X-linked amelogenesis imperfecta. *Matrix Biology*, 19(8), 755-760.
- Liang, H. P. H., Xu, J., Xue, M., & Jackson, C. J. (2016). Matrix metalloproteinases in bone development and pathology: current knowledge and potential clinical utility. *Metalloproteinases In Medicine*, 3, 93-102.
- Lin, H. Y., & Lu, K. H. (2010). Repairing large bone fractures with low frequency electromagnetic fields. *Journal of Orthopaedic Research*, 28(2), 265-270.
- Lohi, J., Wilson, C. L., Roby, J. D., & Parks, W. C. (2001). Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *Journal of Biological Chemistry*, 276(13), 10134-10144.
- Luo, F., Hou, T., Zhang, Z., Xie, Z., Wu, X., & Xu, J. (2012). Effects of pulsed electromagnetic field frequencies on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Orthopedics*, 35(4), e526-e531.
- Mackie, E., Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Chen, K. S., & Mirams, M. (2008). Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(1), 46-62.
- Mahla, R. S. (2016). Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *International journal of cell biology*, 2016.
- Mannello, F., Tonti, G. A., Bagnara, G. P., & Papa, S. (2006). Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24(3), 475-481.
- Marchenko, G. N., & Strongin, A. Y. (2001). MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene*, 265(1-2), 87-93.

- Martignetti, J. A., Al Aqeel, A., Al Sewairi, W., Boumah, C. E., Kambouris, M., Al Mayouf, S., ... & Glucksman, M. J. (2001). Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nature genetics*, 28(3), 261-265.
- Mattioli-Belmonte, M., Montemurro, F., Licini, C., Iezzi, I., Dicarolo, M., Cerqueni, G., ... & Vozzi, G. (2019). Cell-free demineralized bone matrix for mesenchymal stem cells survival and colonization. *Materials*, 12(9), 1360.
- Mavčič, B., & Antolič, V. (2012). Optimal mechanical environment of the healing bone fracture/osteotomy. *International orthopaedics*, 36(4), 689-695.
- Maziarz, A., Kocan, B., Bester, M., Budzik, S., Cholewa, M., Ochiya, T., & Banas, A. (2016). How electromagnetic fields can influence adult stem cells: positive and negative impacts. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 54.
- McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K., & Chen, C. S. (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Developmental cell*, 6(4), 483-495.
- McGregor, A. L., Hsia, C. R., & Lammerding, J. (2016). Squish and squeeze—the nucleus as a physical barrier during migration in confined environments. *Current opinion in cell biology*, 40, 32-40.
- Miana, V. V., & González, E. A. P. (2018). Adipose tissue stem cells in regenerative medicine. *Ecancermedicalscience*, 12.
- Mitra, S. K., Hanson, D. A., & Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(1), 56-68.
- Murphy, G. (2011). Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome biology*, 12(11), 233.
- Murphy, G., & Nagase, H. (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular aspects of medicine*, 29(5), 290-308.
- Nathamgari, S. S. P., Dong, B., Zhou, F., Kang, W., Giraldo-Vela, J. P., McGuire, T., ... & Espinosa, H. D. (2015). Isolating single cells in a neurosphere assay using inertial microfluidics. *Lab on a Chip*, 15(24), 4591-4597.
- Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M., & Okada, Y. (1997). Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *Journal of Biological Chemistry*, 272(4), 2446-2451.
- Oladnabi, M., Bagheri, A., Kanavi, M. R., Azadmehr, A., & Kianmehr, A. (2019). Extremely low frequency-pulsed electromagnetic fields affect proangiogenic-related gene expression in retinal pigment epithelial cells. *Iranian journal of basic medical sciences*, 22(2), 128.
- Paiva, K. B. S., & Granjeiro, J. M. (2014). Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions. *Archives of biochemistry and biophysics*, 561, 74-87.

- Park, H. I., Ni, J., Gerkema, F. E., Liu, D., Belozerov, V. E., & Sang, Q. X. A. (2000). Identification and characterization of human endometase (matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20540-20544.
- Parmaksiz, M., Lalegül-Ülker, Ö., Vurat, M. T., Elçin, A. E., & Elçin, Y. M. (2021). Magneto-sensitive decellularized bone matrix with or without low frequency-pulsed electromagnetic field exposure for the healing of a critical-size bone defect. *Materials Science and Engineering: C*, 124, 112065.
- Patterson, M. L., Atkinson, S. J., Knäuper, V., & Murphy, G. (2001). Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP- 2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin- like domain. *FEBS letters*, 503(2-3), 158-162.
- Pei, D. (1999). Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage. *Cell research*, 9(4), 291-303.
- Pendás, A. M., Knäuper, V., Puente, X. S., Llano, E., Mattei, M. G., Apte, S., ... & López-Otín, C. (1997). Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. *Journal of Biological Chemistry*, 272(7), 4281-4286.
- Pepper, M. S. (2001). Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thrombosis and haemostasis*, 86(07), 346-355.
- Pittenger, M. F., Discher, D. E., Péault, B. M., Phinney, D. G., Hare, J. M., & Caplan, A. I. (2019). Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regenerative medicine*, 4(1), 1-15.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., ... & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*, 284(5411), 143-147.
- Poh, P. S., Seeliger, C., Unger, M., Falldorf, K., Balmayor, E. R., & van Griensven, M. (2018). Osteogenic effect and cell signaling activation of extremely low-frequency pulsed electromagnetic fields in adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Stem cells international*, 2018.
- Prakash, D., & Behari, J. (2008, November). Synergistic role of Hydroxyapatite Nanoparticles and pulsed electromagnetic field therapy to prevent bone loss in rats following exposed to simulated microgravity. In *2008 International Conference on Recent Advances in Microwave Theory and Applications* (pp. 572-573). IEEE.
- Rauner, M., Stein, N., & Hofbauer, L. C. (2012). Basics of bone biology. In *Principles of Osteoimmunology* (pp. 1-26). Springer, Vienna.
- Razavi, S., Salimi, M., Shahbazi-Gahrouei, D., Karbasi, S., & Kermani, S. (2014). Extremely low-frequency electromagnetic field influences the survival and proliferation effect of human adipose derived stem cells. *Advanced biomedical research*, 3.

- Rozen, N., Lewinson, D., Bick, T., Meretyk, S., & Soudry, M. (2007). Role of bone regeneration and turnover modulators in control of fracture. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 17(3).
- Saarialho-Kere, U., Kerkelä, E., Suomela, S., Jahkola, T., Keski-Oja, J., & Lohi, J. (2002). Epilysin (MMP-28) expression is associated with cell proliferation during epithelial repair. *Journal of investigative dermatology*, 119(1), 14-21.
- Salvatore, J. R. (2014). Electromagnetic Fields.
- Sekine- Aizawa, Y., Hama, E., Watanabe, K., Tsubuki, S., Kanai- Azuma, M., Kanai, Y., ... & Saïdo, T. C. (2001). Matrix metalloproteinase (MMP) system in brain: identification and characterization of brain- specific MMP highly expressed in cerebellum. *European Journal of Neuroscience*, 13(5), 935-948.
- Shahrokhi, S., Mena, F., Alimoghaddam, K., McGuckin, C., & Ebtekar, M. (2012). Insights and hopes in umbilical cord blood stem cell transplantations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
- Shapiro, F. (2008). Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater*, 15(53), e76.
- Shapiro, S. D., Kobayashi, D. K., & Ley, T. J. (1993). Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 268(32), 23824-23829.
- Shiple, J. M., Wesselschmidt, R. L., Kobayashi, D. K., Ley, T. J., & Shapiro, S. D. (1996). Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(9), 3942-3946.
- Sollazzo, V., Palmieri, A., Pezzetti, F., Massari, L., & Carinci, F. (2010). Effects of pulsed electromagnetic fields on human osteoblastlike cells (MG-63): a pilot study. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 468(8), 2260-2277.
- Srokowski, E. M., & Woodhouse, K. A. (2011). Decellularized scaffolds.
- Suzuki, K. O., Enghild, J. J., Morodomi, T., Salvesen, G., & Nagase, H. (1990). Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry*, 29(44), 10261-10270.
- Szulc, P., Bauer, D. C., & Eastell, R. (2021). Biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. In *Marcus and Feldman's Osteoporosis* (pp. 1545-1588). Academic Press.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*, 126(4), 663-676.
- Thompson, P. A., Perera, T., Marin, D., Oran, B., Popat, U., Qazilbash, M., ... & Hosing, C. M. (2016). Double umbilical cord blood transplant is effective therapy for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Leukemia & lymphoma*, 57(7), 1607-1615.

- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *science*, 282(5391), 1145-1147.
- Travlos, G. S. (2006). Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicologic pathology*, 34(5), 548-565.
- Tsimbouri, P. M. (2015). Adult stem cell responses to nanostimuli. *Journal of functional biomaterials*, 6(3), 598-622.
- Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews immunology*, 8(9), 726-736.
- Uría, J. A., & López-Otín, C. (2000). Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. *Cancer research*, 60(17), 4745-4751.
- Uzer, G., Rubin, C. T., & Rubin, J. (2016). Cell mechanosensitivity is enabled by the LINC nuclear complex. *Current molecular biology reports*, 2(1), 36-47.
- Vannucci, L., Fossi, C., Quattrini, S., Guasti, L., Pampaloni, B., Gronchi, G., ... & Brandi, M. L. (2018). Calcium intake in bone health: a focus on calcium-rich mineral waters. *Nutrients*, 10(12), 1930.
- Velasco, G., Cal, S., Merlos-Suárez, A., Ferrando, A. A., Alvarez, S., Nakano, A., ... & López-Otín, C. (2000). Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Research*, 60(4), 877-882.
- Velasco, G., Pendás, A. M., Fueyo, A., Knäuper, V., Murphy, G., & López-Otín, C. (1999). Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *Journal of Biological Chemistry*, 274(8), 4570-4576.
- Verfaillie, C. M. (2004). Adult stem cells: tissue specific or not. *Handbook of Stem Cells*, 2, 13-20.
- Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*, 92(8), 827-839.
- Viti, F., Landini, M., Mezzelani, A., Petecchia, L., Milanese, L., & Scaglione, S. (2016). Osteogenic differentiation of MSC through calcium signaling activation: transcriptomics and functional analysis. *PloS one*, 11(2), e0148173.
- Wang, J., Chen, Z., Sun, M., Xu, H., Gao, Y., Liu, J., & Li, M. (2020). Characterization and therapeutic applications of mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Tissue and Cell*, 64, 101330.
- Wang, N. (2017). Review of cellular mechanotransduction. *Journal of physics D: Applied physics*, 50(23), 233002.

- Wang, N., Tytell, J. D., & Ingber, D. E. (2009). Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(1), 75-82. Y
- Yamazaki, M., Kojima, H., & Miyoshi, H. (2020). Morphology and differentiation of human mesenchymal stem cells cultured on a nanoscale structured substrate. *Electronics and Communications in Japan*, 103(9), 23-28.
- Yin, Y., Chen, P., Yu, Q., Peng, Y., Zhu, Z., & Tian, J. (2018). The effects of a pulsed electromagnetic field on the proliferation and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 3274.
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 1-22.
- Zhang, Y., Yan, J., Xu, H., Yang, Y., Li, W., Wu, H., & Liu, C. (2018). Extremely low frequency electromagnetic fields promote mesenchymal stem cell migration by increasing intracellular  $Ca^{2+}$  and activating the fak/rho gtpases signaling pathways in vitro. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 1-10.