

**BOR İÇEREN NANO HİDROKSİAPATİT KOMPOZİTLERİN
KEMİK HÜCRELERİNDEKİ MOLEKÜLER ETKİ
MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

**RESEARCHING OF THE MOLECULAR MECHANISM OF
NANO HYDROXYAPATITE COMPOSITES CONTAINING
BORON IN BONE CELLS**

MERVE GİZER

PROF. DR. PETEK KORKUSUZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin Biyomühendislik Anabilim Dalı
için Öngördüğü YÜKSEK LİSANS TEZİ Olarak Hazırlanmıştır.

2018

MERVE GİZER' in hazırladığı "**Bor İçeren Nano Hidroksiapatit Kompozitlerin Kemik Hücrelerindeki Moleküler Etki Mekanizmasının Araştırılması**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'**nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sema HAKKI

Başkan

Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

Danışman

Doç. Dr. Bora MAVİŞ

Üye

Doç. Dr. Aylin GÜRPINAR

Üye

Yrd. Doç. Dr. Sevil KÖSE

Üye

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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ Tezimin/Raporumun 02.12.2018 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- ☐ Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

06 / 07 / 2018

(İmza)

Öğrencinin Adı Soyadı

MERVE GİZER

ETİK

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

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

beyan ederim.


MERVE GİZER

12/06/2018

ÖZET

BOR İÇEREN NANO HİDROKSİAPATİT KOMPOZİTLERİN KEMİK HÜCRELERİNDE MOLEKÜLER ETKİ MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

Merve GİZER

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

Haziran 2018, 98 sayfa

Metabolik hastalıklar ve hasarlar ile kemiğin yapısı bozulur ve kendini yenileme kapasitesi zarar görür. Kemiğin içerdiği iz elementler ve hidroksiapatit kristalleri; ekstraselüler matriksinin yenilemesini destekleyecek biyomalzemelerin geliştirilmesinde önem taşımaktadır. Tez çalışması kapsamında, kemiğin içerdiği iz elementlerden biri olan borun, nanometre boyutundaki hidroksiapatite katılması ile, toksik etkisinin önlenmesi amacıyla kontrollü salınarak ekstraselüler matriks yapısını destekleyeceği varsayılmıştır. Bu varsayım doğrultusunda, nanometre boyutundaki hidroksiapatit biyoseramik ve bor elementi ile üretilen kompozitlerden bor salım kinetikleri indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometrisi yöntemi ile hesaplanmış; borun 1 saat içinde büyük oranda salındığı, salımın sabit düşük dozda devam ettiği saptanmıştır. Bor nanohidroksi apatit kompozitin SaOS-2 osteoblastlar ve insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonuna etkisi WST-1 yöntemi ile değerlendirilmiş; nanometre boyutundaki hidroksiapatit ve borik asitin etkileri ile karşılaştırıldığında osteoblastlarda proliferasyon oranını genellikle değiştirmedeği, mezenkimal kök hücrelerde yüksek dozda proliferasyonu arttırdığı gösterilmiştir. Bor içeren nanohidroksi apatit kompozitlerin mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını alkalın fosfataz aktivitesi üzerinden nanohidroksiapatit kompozit ve borik asite göre arttırdığı saptanmıştır. Etkili dozda bor içeren nanohidroksiapatitin osteoblastlardaki moleküler mekanizması transkriptom analizi ile değerlendirilmiş ve nanohidroksiapatit kompozit ve borik asit ile karşılaştırıldığında Wnt ve TGF- β sinyal

yolaklarında rol oynayan genleri etkilediği gösterilmiştir. Sonuç olarak bor içeren nanohidroksiapatit kompozitlerin kemik hasarlarının onarımında lokal olarak uygulanabilecek güvenli osteokondüktif doz penceresi ve etkili dozdaki moleküler etki profili belirlenmiştir. Rejeneratif terapötik etki penceresinin ileri çalışmalarla validasyonu gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Kemik, nanometre boyutunda hidroksiapatit, bor, osteoblast, mezenkimal kök hücre, Wnt sinyal yolağı, TGF- β sinyal yolağı.



ABSTRACT

RESEARCHING OF THE MOLECULAR MECHANISM OF NANO HYDROXYAPATITE COMPOSITES CONTAINING BORON IN BONE CELLS

Merve GİZER

Master, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

June 2018, 98 pages

The structure of the bone and the self-renewal capacity are damaged by metabolic diseases and damages. The trace elements and hydroxyapatite crystals in the bone are important in the development of biomaterials to support the renewal of the extracellular matrix. In this study, it was assumed the boron loaded nanometer sized hydroxyapatite was supposed to support the construction of extracellular matrix by controlled boron release in order to prevent toxic effect. In this context, boron release kinetics from nanometer sized hydroxyapatite were calculated by ICP-MS method and it was found that boron was released in large proportion within 1 hour and the release was continued at constant low dose. The effect of the boron containing nanometer sized hydroxyapatite composite on the proliferation of SaOS-2 osteoblasts and human bone marrow derived mesenchymal stem cells was evaluated by the WST-1 method and compared with the effects of nanohydroxyapatite and boric acid, it has been shown that do not alter the proliferation rate in osteoblasts and increase proliferation in mesenchymal stem cells at high doses. Boron containing nanohydroxyapatite composites have been shown to increase osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by increasing alkaline phosphatase activity, as compared to nanohydroxyapatite composite and boric acid. The molecular mechanism of effective dose of boron-containing hydroxyapatite has been assessed by transcriptomic analysis and shown to affect genes involved in Wnt, TGF- β and response to stress signaling pathways when compared to nano-hydroxyapatite composite and boric acid. Eventually, a safe osteoconductive dose range of boron-containing nano hydroxyapatite composites for local repair of bone injuries and the molecular effect profile in the effective

dose was determined has been determined. Further studies require the validation of the regenerative therapeutic effect window.

Keywords: Bone, nanohydroxyapatite, boron, osteoblast, mesenchymal stem cells, Wnt signalling pathway, TGF- β signalling pathway.



TEŞEKKÜR

Öncelikle bu süreçte bana bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, tüm desteğini sadece çalışma kapsamında değil hayatımın diğer alanlarında da hissettiren, çalışma disiplini hep örnek alacağım sayın hocam ve danışmanım Prof. Dr. Petek Korkusuz'a; bilgi birikimi ve bilim insanı kimliğiyle beni yönlendiren ve destekleyen sayın hocam Prof. Dr. Feza Korkusuz'a,

Çalışmamda kullandığım BnHAp kompozitlerin üretimini gerçekleştiren sayın hocam Prof. Dr. Muharrem Timuçin'e, çalışmamda kullandığım borik asit konusunda bilgilerini paylaşan ve bize ulaştıran sayın hocam Prof. Dr. Sema Hakkı'ya, transkriptom çalışmasında yardımını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ekim Taşkiran ve Beren Karaosmanoğlu'na, salım çalışmalarında bana destek olan değerli hocam Doç. Dr. Aysel Berkkan, sayın hocam Prof. Dr. Uğur Tamer ve değerli arkadaşım İzgen Canver'e;

Laboratuvar çalışmalarında her sorumu sabırla cevaplayan ve bana yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Sevil Köse'ye; destekleriyle yanımda olan Nilgün Yersal, Eda Çiftci Dede, Yrd. Doç. Dr. Elif Bilgiç, Şebnem Şahin, Özge Boyacıoğlu ve Selin Önen'e,

Hayatımın yarısını birlikte geçirdiğim iyi ve kötü kararlarımda yanımda olan, destekleri sonsuz değerli dostlarım Gülin Çavuş, Çiçek Endeşav ve Sidar Aydın'a;

Şimdi bile sayesinde istediğim yolda ilerlediğim, bana sonsuz güvenen ve inanan, sevgisini hiç bir zaman sakınmayan canım babama sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER.....	ix
TABLolar.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Kemik Dokusunun Hücreleri ve Ekstraselüler Matriksi.....	2
1.1.1. Kemik Dokusunun Hücreleri.....	2
1.1.2. Kemik Dokusunun Ekstraselüler Matriksi.....	4
1.1.3. Kemiğin Ekstraselüler Matriksinin Mineralizasyonu.....	5
1.2. Kemiğin Rejenerasyonu.....	6
1.3. Kemikteki Sinyal İleti Yolakları ve Transkripsiyon Faktörleri.....	7
1.4. Hidroksiapatit Biyoseramikler.....	11
1.5. Bor.....	13
1.5.1. Borun Hücre İçi Etki Mekanizması.....	14
1.5.2. Borun Kemik Dokusundaki Etkileri.....	21
1.3.Çalışmanın Gerekçesi, Hipotez ve Araştırma Soruları, Amacı, Kapsamı ve Yaygın Etkisi.....	22
2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	25

2.1. Bor İçeren Nanometre Boyutundaki Hidroksiapatit Kompozitlerden Borun Kontrollü Salım Profilinin Değerlendirilmesi.....	28
2.1.1. Bor İçeren Nanometre Boyutundaki Hidroksiapatit Kompozitlerin Raman Spektroskopi Yöntemi ile Karakterizasyonu.....	28
2.1.2. Bor İçeren Nanometre Boyutundaki Hidroksiapatit Kompozitten Salınan Bor Miktarının İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometri (ICP-MS) Yöntemi ile Saptanması.....	28
2.2. Borik Asit, Nanometre Boyutundaki Hidroksiapatit ve Bor İçeren Nanometre Boyutundaki Hidroksiapatit Kompozitlerin SaOS-2 İnsan Osteosarkom Hücre Hattı ve Kemik iliği Kaynaklı Primer Mezenkimal Kök Hücrelerin Proliferasyon Profillerine Doz Bağımlı Etkisinin Değerlendirilmesi.....	30
2.2.1. İnsan Osteosarkom SaOS-2 ve Kemik İliği Kaynaklı Primer Mezenkimal Kök Hücrelerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu.....	30
2.2.2. Hücre Proliferasyonunun <i>Water Soluble Tetrazolium-1</i> (WST-1) Tekniği ile Kantitatif Olarak Değerlendirilmesi.....	34
2.3. Borik Asit, Nanometre Boyutundaki Hidroksiapatit ve Bor İçeren Nanometre Boyutundaki Hidroksiapatit Kompozitlerin, İnsan Kemik İliği Kökenli Primer Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasına Etkisinin Alkalen Fosfataz Aktivitesi Üzerinden Değerlendirilmesi.....	36
2.4. Borik Asit, Nanometre Boyutundaki Hidroksiapatit ve Bor İçeren Nanometre Boyutundaki Hidroksiapatit Kompozitlerin SaOS-2 İnsan Osteosarkom Hücrelerinde Transkriptom Prolifine Etkisinin Değerlendirilmesi.....	38
2.5. İstatistiksel Değerlendirme.....	40
3. BULGULAR.....	41
3.1. Bor İçeren Nanometre Boyutundaki Hidroksiapatit Kompozitlerden Borun Kontrollü Salım Prolifinin Değerlendirilmesi.....	41
3.1.1. Bor İçeren Nanometre Boyutundaki Hidroksiapatit Kompozitlerin Raman Spektroskopi Yöntemi ile Karakterizasyonu.....	41

3.1.2. Bor İçeren Nanometre Boyutundaki Hidroksiapatit Kompozitten Salınan Bor Miktarının İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometrisi (ICP-MS) Yöntemi ile Saptanması.....	42
3.2. Borik Asit, Nanometre Boyutundaki Hidroksiapatit ve Bor İçeren Nanometre Boyutundaki Hidroksiapatit Kompozitlerin SaOS-2 İnsan Osteosarkom Hücre Hattı ve Kemik İliği Kaynaklı Primer Mezenkimal Kök Hücrelerin Proliferasyon Profillerine Doz Bağımlı Etkisinin Değerlendirilmesi.....	43
3.2.1. İnsan Osteosarkom SaOS-2 ve Kemik İliği Kaynaklı Primer Mezenkimal Kök Hücrelerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu.....	43
3.2.2. Hücre Proliferasyonunun <i>Water Soluble Tetrazolium-1</i> (WST-1) Tekniği ile Kantitatif Olarak Değerlendirilmesi.....	46
3.3. Borik Asit, Nanometre Boyutundaki Hidroksiapatit ve Bor İçeren Nanometre Boyutundaki Hidroksiapatit Kompozitlerin İnsan Kemik İliği Kökenli Primer Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasının Hücre İçi Alkalen Fosfataz Aktivitesinin Ölçümü Tekniği ile Değerlendirilmesi.....	52
3.4. Bor İçeren Nanometre Boyutundaki Hidroksiapatit Kompozitlerin Etkilediği Sinyal Yolaklarının Transkriptom Yöntemi ile Değerlendirilmesi.....	56
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	64
KAYNAKLAR.....	87
ÖZGEÇMİŞ.....	96

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1.1 Borun direkt ve indirekt etkileri özetlenmiştir.....	14
Şekil 2.1. Raman spektroskopi yöntemi ile karakterizasyonu yapılan 0,9 µg/ml, 9 µg/ml, 90 µg/ml ve 900 µg/ml dozlarda hazırlanan BnHAp kompozitler, hazırlandıkları tüplerde gösterilmektedir.	28
Şekil 3.1. BnHAp kompozitlerin 0,9 µg/ml, 9 µg/ml, 90 µg/ml ve 900 µg/ml dozlarının Raman spektroskopi yöntemi ile elde edilen HAp ve B pikleri gösterilmiştir.....	41
Şekil 3.2. Bor içeren nHAp kompozitlerin (A) 0,9 µg/ml, (B) 9 µg/ml, (C) 90 µg/ml ve (D) 900 µg/ml dozundan salınan B miktarının ICP-MS ile saptanan verilerinin kutu-çizgi grafiği gösterilmiştir.....	42
Şekil 3.3. SaOS-2 osteoblast hücreleri kültür plağına yapışık, oval biçimli olarak izlenmektedir x200.....	43
Şekil 3.4. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 5. pasajda kültür plağına tutundukları görülmektedir, (A) x100; (B) x200; (C) x400.....	44
Şekil 3.5. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 5. pasajda akım sitometrisinde bulundurduğu yüzey belirteçlerine ait histogramlar gösterilmektedir.....	46
Şekil 3.6. Osteosarkom SaOS-2 hücrelerinin 1. gün yapılan proliferasyon değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri gösterilmektedir.....	47
Şekil 3.7. Osteosarkom SaOS-2 hücrelerinin 3. gün yapılan proliferasyon değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri gösterilmektedir.....	48
Şekil 3.8. Osteosarkom SaOS-2 hücrelerinin 5. gün yapılan proliferasyon değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri gösterilmektedir.....	49
Şekil 3.9. Mezenkimal kök hücrelerin 1. gün gerçekleştirilen proliferasyon değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri gösterilmektedir.....	50

Şekil 3.10. Mezenkimal kök hücrelerin 3. gün gerçekleştirilen proliferasyon değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri gösterilmektedir.....	51
Şekil 3.11. Mezenkimal kök hücrelerin 5. gün gerçekleştirilen proliferasyon değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri gösterilmektedir.....	52
Şekil 3.12. Mezenkimal kök hücrelerin 7. günde ALP aktivitesi değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri verilmiştir gösterilmektedir.....	53
Şekil 3.13. Mezenkimal kök hücrelerin 14. günde ALP aktivitesi değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri verilmiştir gösterilmektedir.....	54
Şekil 3.14. Mezenkimal kök hücrelerin 21. günde ALP aktivitesi değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri verilmiştir gösterilmektedir.....	55
Şekil 3.15. Mezenkimal kök hücrelere uygulanan biyomalzemelerin ALP aktivitesinin zaman bağımlı etki grafikleri verilmiştir.....	56
Şekil 3.16. Bor içeren nHAp, nHAp kompozitin 0,9 µg/ml ve BA'in 0,006 µg/ml dozu uygulanan SaOS-2 hücrelerinde etkilenen genlerin sayıları ve etkili oldukları biyolojik süreçler gösterilmektedir.....	57
Şekil 3.17. Şekilde (A) Wnt sinyal yolağı, (B) TGF-β sinyal yolağın, (C) Ubikülin proteazom yolağı ile stres cevabında rol oynayan genlerin birbirleri ile ilişkileri şematize edilmiştir....	62
Şekil 3.18. Bor içeren nHAp kompozit uygulanan SaOS-2 hücrelerinin kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucunda değişim gözlenen sinyal yolları ile ilgili gen ekspresyon seviyelerinin ısı haritası (heatmap) gösterilmektedir.....	63

TABLÖLAR

Sayfa

Tablo.1.1. İnsan kemiğinin yapısında yer alan mineraller ve bunların kuru kemikteki bulunma yüzdeleri gösterilmektedir.....	5
Tablo.1.2. Bor içeren biyomalzemeler kullanılarak farklı hücre tiplerinde mineralizasyona etkisinin araştırıldığı çalışmalarda kullanılan bor türü ve taşıyıcısı, uygulanan doz listelenmiştir.	15
Tablo.1.3. Bor içeren biyomalzemeler kullanılarak proliferatif etki profilinin araştırıldığı çalışmalarda kullanılan bor türü ve taşıyıcısı, uygulanan doz listelenmiştir.....	17
Tablo.2.1. Deney ve kontrol gruplarıyla gerçekleştirilen iş paketlerindeki tekrar (n) sayıları, bağımlı ve bağımsız değişkenler ile gösterilmektedir.....	25
Tablo.2.2. Deneylerde (2.1, 2.2.2, 2.3 ve 2.4 numaralı iş paketleri) kullanılan biyomalzemeler, bunların moleküler formülleri, dozları ve içerdikleri B miktarları µg/ml olarak verilmiştir.....	27
Tablo.2.3. ICP-MS cihazının çalışma koşulları özetlenmiştir.....	29
Tablo.2.4. Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşma değerlendirilmesi kapsamında kullanılan belirteçleri ve primer dizilimleri gösterilmektedir.....	33
Tablo.2.5. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinde akım sitometrisi yöntemi ile değerlendirilen yüzey belirteçlerine ait antikorlar, florokromları, markaları ile beraber verilmiştir.....	34
Tablo.2.6. Hücre proliferasyon değerlendirmesinde kullanılan hücre türleri, uygulanan biyomalzeme dozları ve değerlendirme yapılan zaman dilimleri ile tekrar sayıları verilmiştir.....	35
Tablo.2.7. Osteojenik farklılaşma deneyinde uygulanan biyomalzeme dozları ve ALP aktivite değerlendirmesi yapılan zaman dilimleri, tekrar sayılarıyla verilmiştir.....	37
Tablo.2.8. Transkriptom yöntemi ile yapılan değerlendirilmede kullanılan hücre türü, biyomalzemeler, biyomalzemelerin dozları ve değerlendirmenin yapıldığı zaman ve tekrarları verilmiştir.....	38

Tablo.3.1. Mezenkimal kök hücrelerin 5. pasajda 21. gündeki osteojenik farklılaştırmasına ait tanımsal veriler görülmektedir.....	44
Tablo.3.2. Mezenkimal kök hücrelerin 5. pasajda 7. günde kondrojenik farklılaştırma gen ekspresyon seviyelerinin tanımsal verileri gösterilmiştir.....	45
Tablo.3.3. Bor içeren nHAp, nHAp kompozitin 0,9 µg/ml ve BA'in 0,006 µg/ml dozu uygulanan SaOS-2 hücrelerinde etkilenen gen ekspresyonlarının kat değişimleri ve bunların etkili olduğu biyolojik süreç ve yollar gösterilmektedir.....	59



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Ag	Gümüş
B	Bor
Ca	Kalsiyum
Mg	Magnezyum

Kısaltmalar

ALG-2	Alfa- 1,3/ 1,6- mannosiltransferaz
ALP	Alkalen fosfataz
ANKRD17	Ankyrin repeat domain 17
ATF4	<i>Activating transkription factor 4</i>
BA	Borik asit
BCP	Bifazik kalsiyum fosfat
BN	Bor nitrit
BnHAp	Bor içeren nanometre boyutunda hidroksiapatit
BLM	<i>Bloom syndrome RecQ like helicase</i>
BMP	Kemik morfogenetik protein
BMPR	Kemik morfogenetik protein reseptörü
B-MBG	B içeren mezaporlu biyoaktif camsı seramikler
BSP	Kemik siyaloproteini
bZIP	<i>Basic- region leucine zipper</i>
B-CS	Bor içeren CaSiO ₃ seramik

CCK-8	<i>Cell counting kit-8</i>
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
CCND2	<i>Cyclin D2</i>
CHOP	<i>CCAAT- enhancer binding protein homologous protein</i>
CEBPA	<i>CCAAT- enhancer binding protein alpha</i>
COL1	<i>Tip 1 kollagen</i>
CREB	<i>Cyclic adenosine monophosphate responsive element binding</i>
CSF-2	<i>Colony stimulating factor 2</i>
CSNK1A1L	<i>Casein kinase 1 alpha 1 like</i>
CSNK1D	<i>Casein kinase 1 delta</i>
CSNK2A1	<i>Casein kinase 2 alpha 1</i>
CSNK1G3	<i>Casein kinase 1 gamma 3</i>
DCLRE1B	<i>DNA cross-link repair 1B</i>
Dkk2	<i>Dickkopf Wnt signaling pathway inhibitor 2</i>
Dlx5	<i>Distal-less homeobox 5</i>
ELK3	<i>ETS transcription factor</i>
ESM	<i>Ekstraselüler Matriks</i>
ER	<i>Endoplazmik retikulum</i>
FAK	<i>Fokal adezyon kinaz</i>
FGFR2	<i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>
FIAT	<i>Factor inhibiting ATF4 mediated transcription</i>
FIGN	<i>Fidgetin, Microtubule severing factor</i>
FOXO1	<i>Forkhead transkripsiyon faktörü</i>
GPNMB	<i>Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B</i>

GRP78/BiP	<i>Glucose-regulated protein/ binding immunoglobulin protein</i>
GTF2H2C	<i>General transcription factor IIH subunit 2-like protein</i>
HIC1	<i>HIC ZBTB transcriptional repressor 1</i>
HMGA1	<i>High mobility group AT- hook 1</i>
HSFX2	<i>Heat shock transcription factor family, X- linked 2</i>
ICAM1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IGFR1	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
IL1RN	<i>Interleukin 1 receptor antagonist</i>
IP3Rs	<i>Inositol trifosfat reseptör</i>
IRE1	<i>Inositol- requiring protein 1</i>
ITPR3	<i>Inositol 1,4,5- trisphosphate receptor type 3</i>
JNK	<i>c- Jun N- terminal kinase</i>
JUND	<i>AP-1 transcription factor subunit</i>
MAPK	<i>Mitogen- activated protein kinase</i>
MAP1B	<i>Microtubule associated protein 1B</i>
M-CSF	<i>Makrofaj koloni-uyarıcı faktör</i>
MKH	<i>Mezenkimal kök hücre</i>
MMP	<i>Matriks metallopeptidaz</i>
mRNA	<i>Mesajcı RNA</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
MV	<i>Matriks vezikülü</i>
NaB	<i>Sodyum borat</i>
NFATc1	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NFKB1	<i>Nuclear factor Kappa B subunit 1</i>

NR1H3	<i>Nuclear receptor subfamily 1 group H member 3</i>
nHAp	Nanometre boyutunda hidroksiapatit
OCN	Osteokalsin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
OSE1	<i>Osteocalcin specific element 1</i>
OSE2	<i>Osteocalcin specific element 2</i>
Osx	Osterix
PBAT	poli(bütlen adipat-ko-terefalat)
PLGA	poli(laktik-ko-glikolik asit)
PRR9	Proline rich 9
PPP2R5A	Protein phosphatase 2 regulatory subunit B alpha
PSMC4	Proteasome 26S subunit ATPase 4
PSMC6	Proteasome 26S subunit ATPase 6
PSMD6	Proteasome 26S subunit non-ATPase 6
PTGIR	Prostaglandin I2 receptor
PVA	Polivinil alkol
PYGO1	Pygopus family PHD finger 1
RANK	Reseptör aktivatör nüklear faktör kappa B
RANKL	Reseptör aktivatör nüklear faktör kappa B ligandı
RET	RET reseptör tirozin kinaz
RFC5	<i>Replication factor C subunit 5</i>
ROS	Reaktif oksijen radikalleri
RT-PCR	<i>Real time- polymerase chain reaction</i>

Runx2	<i>Runt-related transkripsiyon faktör 2</i>
RSK2	Ribozomal S6 protein kinaz 2
SEMA6D	<i>Semaphorin 6D</i>
Setd7	<i>SET domain containing lysine methyltransferase 7</i>
Sirt1	Sirtuin 1
SLITRK1	<i>SLIT/ NTRK like family member 1</i>
SMAD7	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 7</i>
SOD1	<i>Superoxide dismutase 1</i>
SOX6	<i>Sex determining region Y- box 6</i>
STK35	<i>Serine/threonine kinase 35</i>
TCF7L2	<i>Transcription factor 7 like 2</i>
TCP	Trikalsiyum fosfat
TEM	Transmisyon elektron microscobu
TLE1	<i>Transducin like enhancer of split 1</i>
TRAP	Tatarat rezistan asitfosfataz
TGF-β	<i>Transforming growth factor- beta</i>
TGFβR	<i>Transforming growth factor beta receptor</i>
UBA6	<i>Ubiquitin like modifier activating enzyme 6</i>
UBE2B	<i>Ubiquitin conjugating enzyme E2 B</i>
uORFs	<i>Open reading frames</i>
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WST-1	<i>Water Soluble Tetrazolium-1</i>
WTIP	<i>Wilms tumor 1 interacting protein</i>
XRCC6	<i>X-Ray Repair Cross Complementing 6</i>

1.GİRİŞ

Kemik dokusu, hücreleri ve kalsifiye olmuş ekstrasellüler matriksi (ESM) ile kendi kendini yenileyebilen, özelleşmiş bir bağ dokusudur. Kemik, içerdiği iz elementler ve hidroksiapatit (HAp) kristallerinin kemik hücreleri ve organik matriksle bütünleşmesi sonucu yaşam boyu kendini yenileyebilir. Kemik dokusu, vücuda mekanik destek sağlamasının yanı sıra, kalsiyum dengesi ve kan yapımına katkıda bulunur [1]. Bu özelleşmiş işlevlerinden dolayı **kemik kayıpları** ve hasarları ile giden hastalıkların iyileştirilmesi organizmanın devamlılığı için büyük önem taşır. Toplumda yaygın olarak görülen ve kemik mineral yoğunluğu ve histolojik yapısının bozulduğu osteoporoz (kemik erimesi), travmatik ya da osteoporotik kemik kırıkları, tümörler ve metabolik hastalıklara bağlı kemik kayıplarında hücreler ve ESM'in yerine konarak tedavi edilmesi gerekir [2]. Osteoporozda (OP) kırık riskinin ileri derecede artması nedeniyle hastalarda yüksek morbidite ve mortalite görülür. Dünyada yaklaşık 49 milyon kişinin OP'lu olduğu [3, 4], Fracturk çalışmasına göre 2009 yılında ülkemizde 50 yaşın üzerinde OP'lu hastalarda 24.000 kırık olgusuna rastlandığı ve 2035'de bu sayının 64.000'e çıkmasının öngörüldüğü bildirilmiştir [5]. İleri yaştaki OP'lu hastaların özellikle omurga ve kalça kırıklarının cerrahi tedavisinde yaşa bağlı tedaviye direnç, implanta bağlı komplikasyonlar gibi pek çok sorunla karşılaşmaktadır. Bu nedenle OP'lu kemiğin histolojik yapısını güçlendirici ve kırıkta iyileşmeyi destekleyici biyoteknolojik yaklaşımlar gerekmektedir. Bu biyolojik yaklaşımlar kapsamında uygulanacak biyomateryalin, farklılaşmamış hücrelerin kemik hücrelerine farklılaşmasını sağlayacak osteoindüktif ve kemiğin gelişimini sağlayacak osteokondüktif özellikte olması gerekmektedir [6]. Kemiğin inorganik ESM'inin ana bileşeni olan HAp kristalleri nanometre boyutunda hazırlandıklarında biyoyumlulukları ve etkinlikleri artırılabilir. Kemiğin ESM'inde yer alan bir iz element olarak **bor**, kemikte iyileştirici etkilere sahiptir.

Bu çalışma, kemiğin, bor ve nanometre boyutundaki HAp kristalleri aracılığıyla iyileşme mekanizması üzerine odaklanacağından, aşağıda sırasıyla **kemik dokusunun hücreleri ve ESM'i**, kemik hücrelerinde işleyen **moleküler yolları**, nanometre boyutundaki **HAp** kristalleri ve **borun** etki profili ile ilgili bilgi verilecektir. Son bölümde ise çalışmanın **gerekçe ve araştırma soruları** sıralanacaktır.

1.1. Kemik Dokusunun Hücreleri ve Ekstraselüler Matriksi

1.1.1. Kemik Dokusunun Hücreleri

Kemik dokusu beş tip hücre türü bulundurur. Bunlar; kemiğin ESM'ini sentezleyerek salgılayan ve osteositlere olgunlaşan osteoblastlar, osteositler, endosteumu döşeyen örtücü hücreler ve kemiğin yıkımından sorumlu osteoklastlardır [1, 7].

Osteoprogenitör hücreler, mezenkimal kök hücrelerden köken alan ve kemik dokusu oluşurken osteoblastlara farklılaşan, öncül (progenitör) hücrelerdir. Kemiğin Havers kanallarının iç bölgesinde, endosteum ve periosteumda yerleşir. Yassı biçimli; oval çekirdekli bazofilik sitoplazmalıdır.

Osteoblastlar, kemik trabekülleri boyunca yer alan ve ESM bileşenlerini sentezleyip salgılayan kübik hücrelerdir. Aktif osteoblastların endoplazma retikulumları (ER) ve Golgi kompleksleri iyi gelişmiştir. Bazale yakın yerleşim gösteren büyük çekirdekleri vardır [7, 8]. Sitoplazmalarındaki salgı vezikülleri kemikleşmenin erken belirteci olarak da bilinen alkalen fosfataz (ALP) enzimi içermektedir [1, 8, 9]. Osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasında ve osteoblastların olgunlaşmasında transkripsiyon faktörleri *core binding factor alpha-1* (CBFA1), *Runt-related transkripsiyon faktörü 2* (Runx2), *distal-less homeobox 5* (Dlx5) ve *Osterix* (Osx) ile *bone morphogenetic proteinleri* (BMP) önemli rol oynamaktadır [1, 7, 10]. CBFA1, Runx2, Osx, Dlx5 ve *activating transcription factor 4* (ATF4) osteoblastların osteositlere farklılaşmasında ve ESM sentezinde görev almaktadır [1, 7, 10].

Kemiğin örtücü hücreleri (*bone-lining cells*), osteoblastlardan köken alan, kemiğin periosteal ve endosteal bölgelerinde yer alan yassı hücrelerdir. Düz yüzlü ER'a ve sayıca az ribozoma sahiptirler. Komşu örtücü hücreler arasında ve bu hücreler ile osteositler arasında oluklu bağlantılar (*gap junction*) bulunmaktadır ve bu bağlantılar aracılığıyla iletişim kurmaktadır [1, 8]. Bu hücrelerin, kemiğin farklı bölgelerindeki kalsiyum ve fosfat dengesinde ve hematopoietik hücreler için endosteal niş bileşeni olarak kan yapımında rol oynadığı bilinmektedir. Osteoklastların kemik matriksiyle direkt etkileşimini engellemektedirler ve OPG ile *receptor activator of nuclear factor kappa-beta* ligandı (RANKL) üretmektedirler [7].

Osteositler kalsifiye ESM'in lakuna isimli boşluklarında yerleşen, ESM'i sentezleyerek içinde hapis kalan osteoblastlardan farklılaşan, yassı, kemik hücreleridir. Osteositler,

organellerinin özelliklerine göre üç tipe ayrılır. Bunlar; granüllü endoplazmik retikulum (GER)'un bulunduğu, lizozomları aktif olarak yıkım yaptığı ve Golgi kompleksinin iyi geliştiği **rezorptif-yıkıcı osteositler**; GER'un ve Golgi kompleksi yoğunluğunun az olduğu **pasif osteositler** ve GER ve Golgi kompleksinin osteoblast benzeri özellik gösterdiği **osteositler** [1, 7].

Lakunalar, kanalikül ismi verilen dar tünellere sahiptir. Kanaliküller kemikte her yöne doğru uzanarak oluklu bağlantılar (*gap junction*) aracılığı ile komşu hücrelerin iletişimini sağlamaktadır. Bu iletişim sayesinde kemikte mekanik ve kimyasal uyarılara ortak bir yanıt oluşturulur; besin maddeleri, kalsiyum ve hormonların hücreler arasında dağılımı gerçekleşir [1, 10-13].

Osteositler, nitrik oksit, prostaglandin E2 ve sklerostin gibi sinyal ileti moleküllerini sentezleyerek osteoblastlar üzerinde etki göstermektedir [14]. Osteositler, sahip oldukları metalloproteinazlar (MMPs) ile kemik yıkımına (osteoliz) aracı olabilmektedir.

Osteoklastlar, mononükleer hemapoietik öncül hücreler olan granülosit- makrofaj progenitor hücrelerden (GMP, CFU-GM) köken alan; büyük, çok çekirdekli, kutuplaşmış hücrelerdir. Golgi kompleksleri, mitokondriyonları, lizozomlar ve ribozomlar açısından osteoklastlar lizozomlarında asit fosfatazlar, kollagenazlar, kathepsin K gibi proteazlar içermektedir.

Osteoblastlardan salgılanan *monocyte colony-stimulating factor* (M-CSF) ve *tumor necrosis factor* (TNF), osteoklast öncüllerinde bulunan cFMS reseptörüne bağlanarak osteoklast öncüllerinin çoğalmasını uyarır. Osteoblast ve osteositlerden salgılanan RANKL, osteoklast öncülüün yüzeyinde eksprese olan *receptor activator of nuclear factor kappa B* (RANK) reseptörüne bağlanarak bu hücrelerin farklılaşmasını sağlar [1, 10, 12]. Osteoklast oluşumunu sağlayan RANK-RANKL etkileşimi, farklılaşmayı sağlayan NFATc1, DC-STAMP ve c-Fos transkripsiyon faktörlerinin etkileşimini uyararak osteoklasta özgü TRAP ve kathepsin K gen ifadesini sağlar. Osteoblastlardan salgılanan OPG'nin RANKL'na bağlanarak RANK-RANKL etkileşimini inhibe etmesi ile osteoklast oluşumu durdurulur [7].

Osteoklastlar kemik matriksinin rezorpsiyonunu gerçekleştirmeye uygun şekilde kutuplaşmıştır. Buna göre osteoklastların fırçası kenar, şeffaf bölge ve bazolateral bölge olarak üç bölgesi bulunmaktadır [1, 8, 13].

Fırçamsı kenar; osteoklastların kemik yüzeyi ile doğrudan temasta olduğu bölgesidir. Bu bölgede, osteoklastın hücre zarının katlanmasıyla oluşan mikrovillusların yer aldığı Howship lakünası ismi verilen rezorpsiyon açıklığı bulunmaktadır. Mikrovillusların oluşması kemik ile hücrenin etkileşim bölgesinin alanının artmasını sağlamaktadır. Hücre yüzeyindeki adenozin trifosfat (ATP) bağımlı proton pompaları kemiğin yıkımını gerçekleştirmektedir. Yıkım ürünleri endositoz ile hücre içine alınmaktadır.

Şeffaf bölge; içerdiği ekstraselüler $\alpha_v\beta_3$ integrin reseptörleri, adezyon molekülleri ve aktin filamentleri ile hücrenin kemik yüzeyine sıkı bir şekilde bağlanmasını sağlamaktadır. Osteoklastların bu bölgesi hiçbir organel içermemektedir. Şeffaf bölge, fırçamsı kenar ile bazolateral bölgenin arasında yer alır.

Bazolateral bölge; endositoz ile alınan yıkım ürünlerinin veziküllerin içerdiği TRAP ile parçalanarak ekzositoz ile hücre dışına atıldığı alandır.

1.1.2. Kemik Dokusunun Ekstraselüler Matrisi

Kemik dokusunun ekstraselüler matrisi, osteoblastların sentezlediği; % 35'i organik ve % 65'i inorganik kısımlardan oluşan alandır.

Organik matris, fibrilli matris ve fibrilli olmayan matris olmak üzere iki bileşenden oluşur ve inorganik matris sentezlenmeden yapılır. **Fibrilli organik matrisin** ana bileşeni tip I kollagen ve daha az miktarda tip II, V, XI, XII, XIII kollagenidir. Kollagenin α ve β polipeptid zincirlerinin yapısına ve düzenlenişlerine bağlı olarak alt türleri oluşmaktadır. Kollagen fibril sentezi sırasıyla hücre içinde ve dışında olmak üzere iki basamakta gerçekleşmektedir. Kollagen öncelikle prepropeptid olarak sentezlenerek uzun bir polipeptid oluşturur. Oluşan polipeptid, üçlü α heliks yapısını GER'da kazanarak prokollagen halini alır ve Golgi kompleksinde paketlenerek hücre dışına ekzositoz ile salgılanır [1, 15]. Ekstraselüler bölgede kollagen fibril kesilerek son halini alır, uç bölgede bulunan peptid bölgeleri peptidaz enzimleri ile yapıdan ayrılarak iki farklı alt birimden oluşan tropokollagen yapısı oluşturulur. Tropokollagenin yapısındaki monomerler çapraz bağlanarak kollagen fibril yapısının stabilizasyonunu sağlamaktadır. Tropokollagen, üçlü sarmal yapısını kazandığında adı kollagen olur [1, 16]

Fibrilli olmayan organik matris, proteoglikanlar (Dekorin, Agrekan, sindekan), glikozaminoglikanlar (Hyaluronan, kondrotin sülfat, keratan sülfati dekorin), multi adeziv glikoproteinler (Fibronectin, laminin, osteopontin), bağlayıcı proteinler ve büyüme

faktörlerini (İnsulin-benzeri büyüme faktörü, TNF α , transforming büyüme faktörü β , kemik büyüme faktörleri ve interleokinler vb) içermektedir. Proteoglikanlar, hiyaluronan, kondroitin sülfat ve keratan sülfat, glikozaminoglikan yan zincirlerinin merkezi konumlu bir proteine kovalent olarak bağlanmasıyla üretilmektedir. Kemik sialoproteinleri I, II ve osteopontin kemik hücrelerinin yüzey maddesine tutunmasından sorumludur; osteonektinler ise HAp'ın kollagenin içerdiği bölgesel boşluklara tutunmasını sağlamaktadır. Osteokalsin, matriks kalsifikasyonunu başlatarak Ca^{2+} iyonlarının tutulmasından sorumlu bir matriks glikoproteinidir [1, 7, 17, 18]. Organik matriks, kalsiyum tuzlarının çökmesiyle kalsifiye olur.

İnorganik matrikste, kalsiyum fosfat, potasyum, magnezyum ve sodyum iyonları yer almaktadır. Bu minerallerin kemikte bulunma yüzdeleri Tablo 1.1'de verilmiştir [18]. Kalsiyum hidroksiapatit kristalleri kemikte üç boyutlu olarak $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ kimyasal formülü ile bulunur. Hidroksiapatit kristalleri sentetik olarak üretilmekte ve klinikte kemik rejenerasyonu için kullanılmaktadır (Bölüm 1.4.).

Tablo 1.1. İnsan kemiğinin yapısında yer alan mineraller ve bunların kuru kemikteki bulunma yüzdeleri gösterilmektedir.

Element	Ağırlıkça Yüzdesi (%)
Ca^{2+}	40
PO_4^{3-}	18
CO_3^{2-}	6-7
$\text{Mg}^{2+}/\text{Na}^+$	Az miktarda
$\text{Sr}^{2+}/\text{F}^-$	Çok az miktarda

1.1.3. Kemiğin Ekstraselüler Matriksinin Mineralizasyonu

Matriks proteinlerinin sentezi ve birikimi sürecini matriks mineralizasyonu izler. Osteoblastların ürettiği matriks vezikülleri (MV), zardan tomurcuklanarak ESM'e salınır. Salınan MV'leri; ALP, *fosfatase orophan 1* (PHOSPHO1), aneksin ve Na^{+2} bağlı *Pi simporter*'lar (PiT1/2) gibi mineralizasyon ile ilgili proteinler, fosfatase enzimleri ve taşıyıcı proteinler ile kanallar içermektedir. Aneksin II, V ve VI Ca^{+2} için bağlanma molekülleridir. Bunlar, MV'lerine Ca^{+2} alımını sağlar. Matriks veziküllerinde Ca^{+2} artışına bağlı olarak negatif yük artar; sülfat içeren proteoglikanların Ca^{+2} iyonlarınca hedeflenmesi sağlanır.

Osteoblastların proteoglikanları yıkan enzimleri salgılaması ile proteoglikanlara bağlı Ca^{+2} iyonları serbest kalır. Böylece Ca^{+2} MV'lerinde birikir. Osteoblastlarca salgılanan ALP ile MV'lerindeki fosfat bileşikler parçalanır ve mineralizasyona katılır [2, 7, 10, 19]. Matriks mineralizasyonunun ikinci basamağında, MV'inde biriken Ca^{+2} ve PO_4^{3-} , vezikül içindeki $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ kristalini oluşturur. Böylece inorganik matriksinin ana bileşeni olan HAp oluşumu gerçekleşir; oluşan HAp, MV'nin zarından ESM'e geçer [19, 20].

1.2. Kemiğin Rejenerasyonu

Kemik vücutta yaşam boyu kendini yenileyebilen tek dokudur. Yüksek rejeneratif kapasitesine rağmen, travmatik ya da metabolik nedenlerle ortaya çıkan kemik kayıpları ve hasarları hem kas iskelet sistemi, hem de iç organları ilgilendirmesi açısından büyük önem taşır. Kemik mineral yoğunluğu ve histolojik yapısının bozulduğu osteoporozda osteoporozla ilgili kemik kırıkları, travmalar, tümörler ve metabolik hastalıklara bağlı kemik kayıplarında kemiği yerine koymak amacıyla çeşitli tıbbi ve cerrahi girişimler yapılmaktadır. Kemik doku mühendisliği ürünleri kemiğin sistemik ya da lokal uygulamaya dayalı tıbbi ve cerrahi tedavisinde yoğun olarak çalışılmaktadır. Kemiğin hücresel ürünleri ve mineralize ESM bileşenleri sentetik olarak üretilmekte, biyouyumlulukları ve iyileştirici etkinlikleri araştırılmaktadır.

Tıbbi veya cerrahi yöntemlerle gerçekleştirilen tedavi sürecinde kemik dokusu primer ve sekonder olmak üzere iki şekilde kendini yenilemektedir.

Primer rejenerasyonda, osteoblastlar ve osteoklastlar görev alır. Osteoklastların oluşturduğu kesme konileri (*cutting cone*) ile kemikte rezorpsiyon kanalları oluşmaktadır. Osteoblastlar bu kanallara yerleşerek olgun kemiğin ESM'ini sentezler ve salgılar. Bu mekanizma hem yaşam boyu kemiğin yeniden şekillenmesinde hem de primer rejenerasyon ve cerrahi girişimle kırık kemik uçları karşılıklı sabitleştirildiğinde görülmektedir.

Sekonder iyileşme, kemik hücrelerinin etkinliğinin yumuşak doku ve periosteumdan gelen ek sinyaller ile düzenlenmesiyle gerçekleşmektedir. Düzenlenen hücre etkinliğini granülasyon dokusunun oluşması, kallusun oluşması ve kemikleşmesi süreçleri izler.

Granülasyon dokusunun oluşumu sürecinde, kemiği saran düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındaki periosteumdaki kan damarlarının ve çevredeki dokuların kırık sırasında zarar görmesi nedeniyle bölgede hematoma oluşmaktadır. Dokudaki hipoksik ortam nekroza neden

olabilir. Nekrotik bölgeye periosttaki MKH'ler, osteoprogenitör hücreler, fibroblastlar ve inflamatuvar makrofajlar ile lökositler göçeder [21, 22].

Yumuşak kallusun oluşumu sürecinde, MKH'ler ve osteojenik hücrelerin granülasyon dokusuna göç etmesiyle büyük defektlerde, düşük oksijen konsantrasyonu ya da stabil olmayan kırık uçlarının varlığında kondrojenik farklılaşma ve kıkırdağa ait ESM sentezi ortaya çıkar. İlerleyen süreçte oksijen saturasyonunun düzelmesi ve damarlanmanın artmasıyla kondrositler plakalarında hipertrofik özellik kazanır; osteojenik hücreler buralara ilerler ve matriks kalsifiye olur. Kan damarlarıyla bölgeye göç eden osteoblastlar ESM salgılar [21, 22]. Bölgede gerçekleşen damarlanma BMP/ TGF- β sinyal yolağı (BMP-2, BMP-5, BMP-7 ve TGF- β aracılığı ile), PDGF, IGF ve VEGF sinyal yollarına ait gen ekspresyonları ile uyarılmaktadır [23, 24]. Böylece kallus kemikleşmeye başlar.

Kallusun kemikleşmesi, sert kallusun oluşması sürecinde osteoblastlar osteoklastlarla etkileşir ve osteoklastlar sert kallusa şekil verir. Bu sürecin sonunda kemik orijinal yapı ve şekline yeniden kavuşmaktadır [21, 22].

1.3. Kemikteki Sinyal İleti Yolakları ve Transkripsiyon Faktörleri

Kemiğin hücreleri, bu hücrelerden salgılanan medyatörler ve ESM bileşenleri, çeşitli sinyal ileti mekanizmaları üzerinden kemiğin rejenerasyonunu düzenler. Aşağıda bu yollardan TGF- β ve Wnt sinyal yolakları özetlenecektir.

BMP/TGF- β Sinyal Yolağı; TGF- β süperailisi kemik hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması ve göçünde etkilidir. Bu grupta TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3, aktivin ve BMP ligand olarak yer alır. TGF- β ; serin ve tirozine zengin, tetra-heteromerik yapılı, hücre zarında yerleşik T β RI ve T β RII reseptörlerine bağlanarak etki gösterir. T β RI'nin 7 tipi bulunmaktadır ve bunlar, *activin receptor-like kinase type -1, -2, -3, -4, -5, -6 ve -7* (ALK-1,-2,-3,-4,-5,-6 ve -7) olarak adlandırılır. ALK-3 ve ALK-6 TGF- β dışında BMP aracılığı ile de uyarıldığı için, bu reseptörler sırasıyla *bone morphogenetic protein receptor type I A* (BMPRIA) ve *bone morphogenetic protein receptor type I B* (BMPRIB) olarak da adlandırılır. ALK-1, ALK-2, BMPRIA (ALK-3) ve BMPRIB (ALK-6) reseptörleri; *receptor-regulated smad*'lar (R-Smad) olan Smad1, Smad5 ve Smad8'i aktive ederek gen ekspresyonunu uyarır [25, 26]. Tip 1 reseptör T β RI'nin diğer üç tipi ALK-4, ALK-5 ve ALK-7 ise Smad2 ve Smad3'ün aktivasyonu aracılığı ile gen ekspresyonunda görev almaktadır. Tip 1 reseptörlerin tümü Smad bağımlı TGF- β sinyal yolağının uyarılmasında görev alır.

TGF- β sinyal yolağının tip II reseptörü T β RII'nin ActRII, ActRIIB, BMPRII, *anti-Müllerian hormone receptor type II* (AMHRII) ve kendisi T β RII olmak üzere 5 tipi bulunmaktadır. TGF- β , BMP, ya da aktivin, T β RII'ye bağlanarak reseptörü fosforile etmektedir, fosforile olan T β RII'nin uyarılması T β RI'yi fosforile ederek uyarır; fosforile T β RI, hücre içindeki R-Smadları fosforile eder. R-Smad, Smad4 ile bir kompleks oluşturur, bu kompleks çekirdeğe taşınarak *Smad-binding element*'e (SBE) bağlanır ve hedef genlerin ekspresyonunda kofaktörler ile birlikte rol oynar [25-28]. Smad aktivasyonunu gerçekleştiren TGF- β sinyal yolağı, kanonik sinyal yolağı olarak tanımlanır.

Smad molekülleri, hücre içindeki reseptör sonrası mekanizmalarda kanonik TGF- β sinyal yolağını inhibe edebilir. Smad7'nin T β RI'e bağlanması, R-Smadların fosforilasyonunu engeller [29]. Aktivasyonu engellenen R-Smadlar alt yolaklarıyla etkileşime geçemez ve aracı oldukları hedef gen ekspresyonları gerçekleşmez. Smad7'nin bağlandığı T β RI ise ubiquitin ligaz-E3 aracılığı ile yıkılır [27]. TGF- β sinyal yolağı Smad aktivasyonundan bağımsız olarak, kanonik olmayan sinyal yolakları üzerinden gen ekspresyonunu düzenleyebilir.

Wnt/ β -Katenin Sinyal Yolağı; Wnt sinyal yolağı β -katenine bağımlı kanonik sinyal yolağı ve β -kateninden bağımsız kanonik sinyal yolağı olmak üzere iki mekanizma izlemektedir.

Kanonik Wnt sinyal yolağında Wnt glikoproteinleri, gen ekspresyonlarını hücre içi sinyal yolaklarını uyararak β -kateninin etkisiyle düzenlemektedir. Wnt ligandı, hücre yüzey reseptörü *Frizzled*'in (FZD) sisteince zengin bölgesine ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörleri olan LRP5 ve LRP6'ya bağlanarak hücre yüzeyinde üçlü kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks, aksine bağlanarak β - kateninin serbest kalmasını sağlar ve yıkılmasını önleyerek sitoplazmada varlığını sürdürmesini ve çekirdeğe taşınmasını sağlar. β - katenin, Fam53b/Smp aracılığı ile çekirdeğe taşınır ve burada *T cell factor/lymphoid enhancer factor*'ü (TCF/LEF) uyarır; kemik oluşumunda rol oynayan Runx2 ve osterix'in transkripsiyonunu sağlar. Wnt ligandların yokluğunda β - katenin ve aksin, adenomatöz polipozis koli (APC) denen molekülle beraber sitoplazmada kompleks halde bulunur. β - kateninin kompleks halde bulunması çekirdeğe taşınmasını engeller ve sitozolde bulunan başka bir kompleks oluşturan glikojen sentez kinaz 3 β (GSK3 β) ve kazein kinaz 1 (Ck1), β - katenini fosforile ederek aksin ve APC'den ayrılmasına neden olur. Fosforile β - katenin ubiquitin proteozom sistemi aracılığıyla yıkılır [30-33].

Runx2 Transkripsiyon Faktörü;

İki bölge içeren Runx2, Runx1 ve Runx3'ü de içeren Runx ailesine aittir. Terminal bölgesi N *runt* domain olarak da bilinir ve DNA'ya bağlanan bölgeyi içermektedir [9, 34]. *Runt* bölgesi Runx1 ve Runx3'de de aynı yapıda bulunurken C uç bölgesi üçünde farklılık göstermektedir. Bu transkripsiyon faktörleri, farklı hücre tiplerinin farklılaşmasında önemlidir; Runx1 hematopoietik kök hücre farklılaşmasında, Run2x osteoblast farklılaşmasında ve Run3x gastrik epitel hücrelerinde, nörogenesiste ve kondrosit farklılaşmasında rol oynamaktadır [35, 36].

Osteoblast farklılaşmasında görev alan Runx2, OCN, tip 1 kollagen, OPN, BSP genlerinin transkripsiyonunu uyarır ve alt yolağı olan Osterix'in aktivasyonunu gerçekleştirir [37-39]. Osteoblast hücre döngüsünde siklin ve sitokinler ile etkileşime girerek, hücrenin G₀/G₁ fazında tutulmasına neden olur ve böylece proliferasyonu yavaşlatmasında rol oynar [40]. Kemik oluşumunda D₃ vitamininin hücresel düzeyde etkisi ile birlikte RANKL'in promotor bölgesine bağlanan Runx2'nin kemik oluşumunda farklı rolleri de olabileceği gösterilmiştir [41]. Runx2, dolaylı olarak osteoblast farklılaşmasının inhibisyonunda rol oynamaktadır [42].

Runx2, OCN, OPN, BSP, ALP ve tip 1 kollagenin transkripsiyonunu osteoblasta özgü genlerin promotor bölgesinde bulunan *osteoblast-specific cis-acting element*'e (OSE2) bağlanarak kontrol etmektedir [34, 38]. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda Runx2'nin ekspresyon seviyesinin kemik dokusunun ve kemik hücrelerinin normal yapısını etkilediği gösterilmiştir. Runx2 mutasyonu oluşturulan farelerde yapılan iki farklı çalışmada OCN ekspresyonunun ve kemik mineralizasyonunun gerçekleşmediği görülmüştür [43, 44]. Runx2'nin *runt* domaininin bir bölümünü de içeren *exon 4*'ün delesyonunda ise farelerde endokondral kemikleşme gerçekleşmemiştir [45], farelerde Runx2'nin *exon 8* bölgesinde delesyon oluşturulduğunda kemik yapısının zayıflayarak osteopeniye neden olduğu gösterilmiştir [46]. Trangenik farelerde yapılan bir başka çalışmada ise Runx2'nin overekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Bu hücrelerde osteoblastların olgunlaşmasının baskılanarak immature aşamada kaldığı ve osteositlerin hiç oluşmadığı gözlenmiştir [47]. Tavşan kemik iliği MKH'lerinde Runx2'in hipoksik koşullarda overekspresyonu gerçekleştirildiğinde hücrelerin osteojenik farklılaşma arttığı görülmüştür [48].

Osterix Transkripsiyon Faktörü;

Osterix, Runx2'nin alt yolaklarından biri olan ve osteoblastlarda eksprese edilen *zinc finger* transkripsiyon faktörüdür. Üç *zinc finger* yapısı içerir ve serin/prolin ailesi transkripsiyon faktörlerindendir. Bu yapıya dışında DNA bağlanma bölgesi ve prolin ile serin içeriği yüksek olan transaktivasyon bölge de içerir. Bu bölge kemik oluşumu için gerekli olan OCN ve tip I kollagen genlerini aktive etmektedir [9, 36, 49, 50].

Nakashima vd.'nin yaptığı çalışma, osterix'in osteoblast farklılaşmasında Runx2'den sonra ikincil önemli transkripsiyon faktörü olduğunu göstermiştir. Osterix^{-/-} farelerde yapılan çalışmada Runx2'nin ekspresyon seviyeleri normal gözlenirken, Runx2^{-/-} farelerde osterix ekspresyonu görülmemiştir ve MKH'in osteoblastlara farklılaşmadığı gözlenmiştir. Osteoblastlara farklılaşmak yerine kondrosit markerları olan Sox9 ve tip II kollagen'in eksprese olduğu tespit edilmiştir [51].

ATF4 Transkripsiyon Faktörü;

ATF4, *activating transcription factor (ATF)/ cyclic adenosine monophosphate responsive element-binding (CREB)* ailesinin üyesi olan bir *basic-region leucine zipper (bZIP)* transkripsiyon faktörüdür. Bu ailenin diğer üyeleri CREB/CREM, CREB314, CREB-H, ATF2, ATF3, ATFX, ATF6, ATF7 ve B-ATF'dir ve aminoasit benzerliklerine göre alt gruplara ayrılmaktadırlar. Sahip oldukları bZIP protein bölgesi DNA ile etkileşirken lōsin zipper bölgeleri ile homodimerize veya heterodimerize olarak transkripsiyonlarında görevli proteinlere özel etkileşimlerde bulunurlar [52, 53]. ATF4, üç adet *open reading frames* (uORFs) içermektedir, bunların yerleşimi ATF4'ün görevinde bulunduğu tepkiler için önemlidir [52]. ATF4 protein dengesinde, aminoasit taşınımında ve anabolizmasında, oksidatif strese ve ER stresinden korunma yolaklarında rol oynamaktadır. Bunlara ek olarak hücre siklusu tutulmasını, senesensi ve apoptozisi uyaran yolaklarda da görev almaktadır [54, 55].

Kemik biyolojisinde ATF4, transkripsiyon sonrası modifikasyonlar ve özel etkileşim partnerleri aracılığı ile farklı mekanizmalarda yer almaktadır [53]. Kemik hücrelerinde ATF4, ERK/Ribozomal S6 kinaz (RSK) ve Runx2 ile etkileşimiyle işlev görmektedir. Runx2'nin alt yolaklarından biridir, birlikte OCN ekspresyonunda rol oynamaktadırlar. ATF4 ve Runx2 osteokalsin gen promotorüne kendilerine özgü olan bölgelere bağlanarak OCN ekspresyonunu gerçekleştirirler. Xiao vd.'nin çalışmasında ATF4'ün Runx2'ye bağlı OCN ekspresyonunu kendisine özgü bölge olan OSE1'e bağlanarak Runx2'nin kendisine

özgü bölge olan OSE2'ye bağlanmasını arttırdığı gösterilmiştir [56]. Fibroblastlarda yapılan başka bir çalışmada ATF4'ün yıkımının önlenmesi ve birikiminin sağlanması, OCN ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır. Yapılan bu çalışma ile osteoblastik olmayan hücrelerde de ATF4'ün birikimi ile osteoblastik gen ekspresyonunun sağlandığı gösterilmiştir [57].

Osteoblast farklılaşmasının geç fazında ATF4, RSK2 ile etkileşimde bulunarak tip I kollagen sentezinde RSK2'nin substratı olarak görev aldığı ve RSK2 fosforilasyon bölgesinin etkileşimi ile tip I kollagen ekspresyonu gerçekleşmektedir. Yang vd.'nin ATF4 susturulmuş farelerde yaptıkları çalışmada, osteoblastlarda tip I kollagen ve BSP sentezinin önemli oranda azaldığı gösterilmiştir [58]. Fare osteoblastlarında stres ve ATF4'ün araştırıldığı çalışmada, *Forkhead box O1*'in (FOXO1) ATF4 ile etkileşime girerek proliferasyonu düzenlediği görülmüştür. Çekirdekte FOXO1, ATF4 ile etkileşime geçerek ATF4'ün aminoasit alımı ve protein sentezi için gereken transkripsiyonel aktivasyonunu uyarırdığı gösterilmiştir [59].

Osteoblastlarda ATF4'ün etkisinin incelendiği başka bir çalışmada fare osteoblastlarında ATF4'ü inhibe eden faktör olarak bilinen *factor inhibiting ATF4-mediated transcription*'ın (FIAT) inhibisyonu gerçekleştirildiğinde BSP ve OCN ekspresyonunda artış görülmüştür. Tip I kollagenin sentezi ise aminoasit yokluğunda artmıştır. Bu doğrultuda ATF4 iki farklı yolak aracılığı ile osteoblastlarda protein sentezini arttırdığı sonucuna varılmıştır [60].

1.4. Hidroksiapatit Biyoseramikler

Kemiğin ekstraselüler matriksinin (ESM) ana inorganik (mineral) bileşeni hidroksiapatit (HAp) biyoteknolojik yaklaşımlarla sentetik olarak üretilen biyoseramiktir. Biyoseramikler, kristal yapısında ya da amorf düzende bulunabilen, kalsiyum, sodyum, magnezyum, potasyumdan, silika ve fosfor iyon içeren inorganik katı malzemelerdir [61, 62]. Kristal yapısında veya şekilsiz olarak bulunmaları içerdikleri iyonik bağların düzenine bağlıdır [63]. Şekilleri, seramiklerin yıkım, yoğunluk ve sertlik gibi fiziksel özelliklerini etkilemektedir. İmplant olarak uygulanan metal malzemelerle karşılaştırıldığında seramikler daha sert yapıda olmaları nedeniyle yük altında metallere göre daha kırılğan; fizyolojik koşullarda yıkılmaya karşı metallere göre daha dayanıklıdır. Kemiğin doğal yapısıyla ortak özellikler taşıması nedeniyle seramikler, ortopedik ve dental implant uygulamalarında az yük binen bölgelerde kullanılmaktadır [63].

Doku mühendisliği yaklaşımlarında kullanılan birinci nesil biyomateryaller yalnızca zarar görmüş bölgenin yerine geçecek özellikteyken ikinci nesil biyomateryaller yerine geçtikleri dokunun tamirini de sağlamaktaydı. Üçüncü nesil biyomateryal sınıfına dahil olan biyoseramikler yüzey özellikleri ve taşıyıcı olarak kullanılabilmesi ile yerine geçtikleri dokunun yenilenmesi amacıyla kullanılmaktadır [63]. Bu kullanım amaçları doğrultusunda üç alt sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar inert, biyoaktif ve yarı inert ve biyolojik olarak eriyebilen ve inert olmayan malzemeler olarak isimlendirilmektedir [61, 64].

Hidroksiapatit, biyoaktif, biyouyumlu, cam benzeri biyoseramik alt sınıfına giren ve kemiğin ESM'inin ana mineral bileşeni olarak bulunan inorganik bir biyomalzemedir. Moleküler formülü $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ olan HAp, 3 nm – 2000 µm boyutları arasında ve dört farklı yöntem ile üretilmektedir. Sentez yöntemlerine göre HAp seramikler; biyolojik kaynaklar kullanılarak elde edilenler, yüksek sıcaklık reaksiyonları ile üretilenler, kuru kimyasal sentez ile ve ıslak kimyasal sentez ile üretilenler olarak sınıflandırılır. Islak kimyasal yöntem en etkili ve basit üretim yöntemi olması nedeniyle en çok tercih edilen HAp üretim yöntemidir [64-66].

Kemiğin yük taşımayan bölgelerde yerini tutması amacıyla, sentetik olarak uygulandığında düşük biyomekanik özellik ile yüksek osteokondüktif etkinlik gösteren HAp kontrollü ilaç salım sistemlerinde ve metal protezlerde yüzey kaplaması olarak klinikte kullanılmaktadır [67, 68]. Sentetik olarak çeşitli formülasyonlarda mikron boyutunda üretilen HAp kristallerinin *in vivo* koşullarda yaklaşık 12 haftada % 24 oranında degrade olduğu, kemikteki CaP taneciklerinin çözünerek tümüyle erimesinin yaklaşık 48 hafta sürdüğü bildirilmiştir [69]. Bu durum, zaten biyomekanik gücü sınırlı olan HAp'in, osteokondüktif etkisinin de sınırlı olmasına yol açmaktadır.

Hidroksiapatitin rejeneratif etkisini, üretim yöntemleri ve kimyasal özellikleri kadar boyutu da etkilemektedir. Nanometre boyutunda üretilen HAp seramikler, implante edilen dokudaki hücrelerce kolayca alınabilmektedir. Grubumuzca üretilip *in vitro* ve *in vivo* koşullarda test edilen nanometre boyutundaki HAp taneciklerinin (nHAp) biyoyumluluğu mikron boyutlarındakilere göre daha yüksek olarak saptanmıştır [70]. Islak kimyasal sentez yöntemi ile 800°C, 900°C ve 1000°C sıcaklıkta elde edilerek yapısal özellikleri *X-ray diffraction* (XRD) ve Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) değerlendirmeleri ile doğrulandıktan sonra nHAp'lerin L929 fare fibroblast hücre hattındaki sitotoksik etkilerinin 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromit (MTT) testi kullanılarak karşılaştırıldığı bir *in vitro* çalışmada ise fibroblastlarda her üç farklı sıcaklıkta elde edilmiş nHAp'lerin

sitotoksik bir etkisi görülmemiştir [71, 72]. Nanometre boyutunda HAp içeren poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)- kollagen yapıları biyoaktif doku iskelelerinin kullanıldığı diğer çalışmada bu doku iskelelerinin insan MKH'lerinde proliferasyon ve kemik yönünde farklılaşmaya etkileri incelenmiştir. Nanometre boyutunda HAp içeren doku iskelelerinde proliferasyon HAp içermeyen doku iskeleleri ile karşılaştırıldığında ALP aktivitesinde önemli derecede artış gözlenmiştir [72]. Dan vd.'nin, kemik doku mühendisliğinde kullanılması için geliştirilen kitosan- jelatin doku iskelelerine nHAp yüklenerek fizikokimyasal özelliklerinin değerlendirildiği çalışmada, nHAp yüklenen doku iskelesilerde şişme ve degradasyonun azaldığı gösterilmiştir. Aynı çalışmanın nHAp yüklü doku iskelesilerin biyolojik özellikleri kapsamında fare osteoblastik hücre hattı MC3T3-E1 hücrelerinde yapılan deneylerde, nHAp yüklü doku iskelelerinde hücre canlılık oranının daha yüksek olduğu saptanmış ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) değerlendirilmesinde nHAp yüklenen doku iskelesine hücrelerin tutunma oranının daha fazla olduğu gösterilmiştir [73].

Grubumuzca HAp seramiklere osteoindüktif özellik kazandırmak ve bunların biyouyumunu arttırmak için sırasıyla çeşitli biyoaktif moleküller (sitokinler, büyüme faktörleri, elementler) yapıya eklenmiş ve kemik hücreleriyle kolay integre olabilecek küçük boyutlu kristaller üretilmeye başlanmıştır [2, 74].

Nanometre boyutundaki seramik kompozitlere, kemikte rejeneratif etkili çeşitli elementler kolayca taşınarak hücrelere aktarımı sağlanabilir. **Bor** bunun için güçlü bir adaydır.

1.5. Bor

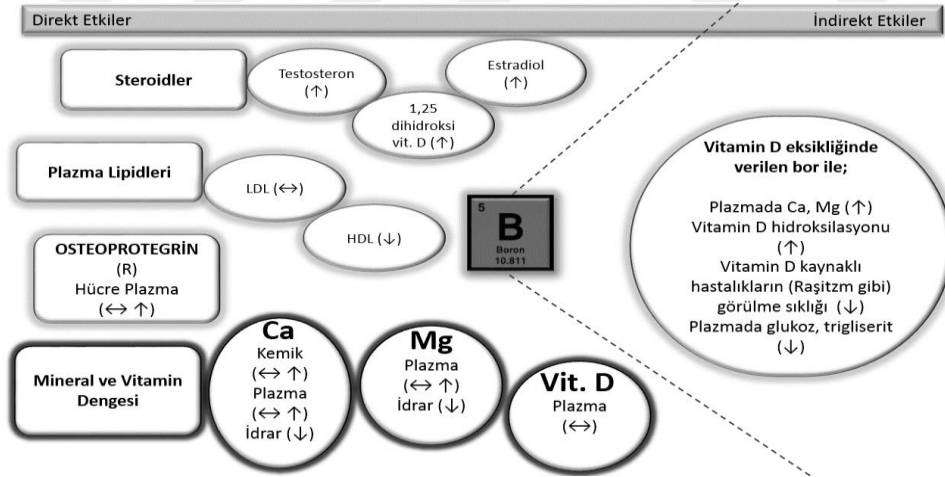
Bor (B), periyodik tabloda $1s^2 2s^2 2p^1$ elektron düzenine sahip, beşinci elementtir. Kahverengi toz halinde ve siyah kristaller halinde yeryüzünde bulunabilen borun doğal halinde stabil olan iki izotopu bulunmaktadır. Doğada bu izotoplardan B^{11} % 80.1 ve B^{10} % 19.9 oranında bulunmaktadır. Borun moleküler ağırlığı 10,81 g/mol'dür. Doğada genellikle borik asit veya borat formunda bulunan bor, oksijen atomlarına kovalent olarak bağlıdır. Bor, Lewis asidi gibi davranarak hidroksil iyonlarıyla bağlanır ve proton çıkışına neden olur. Organobor bileşikleri ise organik sentez uygulamaları ile sentetik olarak elde edilebilmektedir [75, 76].

Coğrafi bölgelere bağlı olarak toprakta 2 ile 100 ppm arasındaki konsantrasyonlarda ve suda ise 0.005 mg/L ile 43 mg/L konsantrasyonlarda bulunan bor, canlılar için de bir eser

elementtir [77]. Bor ülkemizde dünya rezervinin % 72,8'ni barındırması nedeniyle kullanımı ile ilgili çalışma ve uygulamalar devlet kurumlarınca desteklenmektedir [78].

Diyetle alınan B'un kemik sağlığına doğrudan ya da dolaylı olumlu etkileri bildirilmişse de [79-83], Amerika İlaç, Gıda ve Beslenme Dairesi verilerine göre ağız yoluyla 20 mg/gün ve Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 0.4 mg/kg'dan yüksek dozlarda alınan B'un bulantı, kusma, diyare, abdominal kramplar, ciltte ve mukozada eritemsi lezyonlar, dolaşım bozukluğu, taşikardi, siyanoz, deliryum, konvülsiyon ve koma gibi yan etkilere yol açabildiği rapor edilmiştir [84].

Borun fizyolojik etkileri; bor dolaylı olarak D vitamininin aktifleşmesinde önemli olan hidroksilasyon basamağını uyarıcı etki gösterir [85, 86], doğrudan D vitaminine etkisi sonucu plazmada tutulmasını sağlayarak, eksikliği ile oluşan raşitizm gibi hastalıkların sıklığını azalmaktadır [85-89]. Diyet ile oral yolla alınan B'un doğrudan etkileri Şekil 1.1'de özetlendiği gibi kemik ve plazmada Ca kalsiyumun tutulduğu ve arttığı, idrarda azaldığı [90], Mg'un plazmada tutulduğu ve arttığı, idrarda azaldığı [85, 91], testosteron ve estradiyolun arttığı [84] ve plazma lipidlerinden LDL düzeyinin değişmediği, HDL'nin azaldığı şeklinde bildirilmiştir [92].



Şekil 1.1. Borun direkt ve indirekt etkileri özetlenmiştir.

Borun, bu tez projesine gerekçe oluşturan, kemikteki etkileri aşağıda ayrıntılı olarak aşağıda borun hücre içi etki mekanizması başlığı altında tartışılacaktır.

1.5.1. Borun hücre içi etki mekanizması

Borun, hedef aldığı organ ve dokulardaki hücrelerde nasıl etki gösterdiği ile ilgili olarak yoğun araştırmalar yürütülmektedir. Borun hücre içi sinyal mekanizması birçok dokudaki

hücrelerde incelenmiştir. Bu araştırmalarda bor ve bileşikleri doğrudan veya polimer, seramik gibi taşıyıcılar aracılığı ile, sistemik ya da lokal olarak uygulanmıştır. Farklı uygulama yöntemleri ve yolları nedeniyle, etki profiline ait hücresel mekanizma da değişebilmektedir. Hücre türlerine göre farklılık göstermekle birlikte, borun genellikle hücrelerin çoğalmaları ya da farklılaşmalarında etkili olabildiği görülmektedir. Hücrelerin çoğalma ve farklılaşma davranışlarında bor ve bileşikleri genellikle dar bir güvenlik penceresi içinde olumlu etki gösterebilmektedir. Borun çeşitli çalışmalarda farklı biyomalzemeler ile uygulandığında hücre proliferasyonuna ve mineralizasyonuna etkisi sırasıyla Tablo 1.2 ve Tablo 1.3'te verilmiştir.

Tablo 1.2. Bor içeren biyomalzemeler kullanılarak farklı hücre tiplerinde mineralizasyona etkisinin araştırıldığı çalışmalarda kullanılan bor türü ve taşıyıcısı, uygulanan doz listelenmiştir. BN: Bor nitrit, P(VDF-TrFE): poli[(vinilidene-fluorit-ko-trifluoroetilen)], BNNT: Bor nitrit nanometre boyutunda tüp, TiO₂: Titanyum dioksit, GC: Glikol kitosan, BA: Borik asit, HOS: İnsan osteosarkom hattı, Kİ-MKH: İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre, SaOS-2: İnsan osteosarkom hücre hattı, sKİ-MKH: Sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre, MC3T3-E1: Fare kaynaklı osteoblastik hücre.

Biyomalzeme	İçerdiği B Miktarı (µg/ml)	Hücre Türü	Mineralizasyona Etkisi	Kaynak
BN/Jelatin	1050, 10500, 40200	HOS	8. günde ALP aktivitesi B dozuna doğru orantılı olarak artmıştır.	[93]
P(VDF-TrFE) + BNNT	4356	SaOS-2	7. günde kalsiyum birikimi B'un varlığında gerçekleşmiştir.	[94]
B-TiO ₂	432,44	SaOS-2	5. günde B'un varlığında ALP aktivitesi %57 oranında artmıştır.	[95]
BNNTs/GC	0,8712, 2,178,	sKİ-MKH	14. günde ALP aktivitesi 4,356 µg/ml	[96]

	4,356, 10,89,		B dozunda diğer dozlara göre daha fazladır.	
BA	0,000018, 0,000175, 0,001749, 0,017485, 1,7485	MC3T3 -E1	Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm B içeren gruplarda daha fazla mineralize nodüller görülmüştür. En yüksek mineralizasyon nodül varlığı 0,000175 µg/ml, 0,001749 µg/ml ve 0,017485 µg/ml dozlarında gözlenmiştir.	[97]

Osteosarkom hücre hattı HOS hücrelerine bor nitritin (BN) biyo-çözünür bir biyopolimer olan gelatin ile güçlendirilerek uygulandığı ve etkilerinin araştırıldığı *in vitro* çalışmada % 0.1, % 1 ve % 5 oranında BN toz içermek üzere üç farklı dozda malzeme uygulanmıştır. MTT ile yapılan hücre proliferasyon deneyinde hücre proliferasyonu bu üç konsantrasyondan etkilenmediği ve malzeme uygulanmayan hücrelerden daha az proliferasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Farklılaşma değerlendirmesi için ALP aktivite düzeyleri incelendiğinde ise kullanılan malzemenin içerdiği bor oranı ile doğru orantılı olarak ALP aktivitesinin arttığı görülmektedir [93]. Fare dermal fibroblastı 4T1, fare skuamöz hücre karsinoma SCCVII, hamster fibroblast V79 ve fare dermal fibroblast L929 hücre hatlarında Fenilboroksin asit (PBA) ile yapılan sitotoksik etki çalışmasında tüm hücre hatlarında kontrol grupları ile karşılaştırıldığında hücre canlılığında önemli derecede azalma görülmektedir. SCCVII hücre hattında ise hücre canlılığının azalması doz bağımlı olarak gerçekleşmiştir [98]. Polivinil alkol (PVA) hidrojellerinin hidroksilize edilmiş bor nitrit nano-sheetler (OH- BNNS) için taşıyıcı olarak kullanıldığı bir başka çalışmada HeLa hücrelerindeki sitotoksik etkisi MTS değerlendirmesi ile incelendiğinde ise sitotoksik bir etki görülmemiştir [99]. Liu vd.'leri 6 farklı doz BN ile HepG2 hücrelerinde CCK-8 sitotoksik ölçümlerinde kontrol grubu ile farklı dozlar arasında önemli bir fark gözlenmesi de en düşük canlılık en yüksek bor içeren grupta tespit edilmiştir [100]. MTT ölçümü ile

yapılan başka bir sitotoksik çalışmada bor kaynağı olarak bor- flüorit kompleks kullanılmıştır. Bu çalışma kapsamında insan endometriyum hücre hattı ECC-1 ve insan prostatik epitelyum hücre hattı PNT1-A olan iki farklı hücre hattına 7 farklı doz malzeme uygulanmıştır. ECC-1 hücre hattında 25 uM ve üzerinde hücre canlılığında azalma görülürken, PNT1-A hücre hattında 5 uM ve üzerinde azalma görülmektedir [101].

Tablo 1.3. Bor içeren biyomalzemeler kullanılarak proliferatif etki profilinin araştırıldığı çalışmalarda kullanılan bor türü ve taşıyıcısı, uygulanan doz listelenmiştir. BN: Bor nitrit, PBA: Fenilborik Asit, [L(BF₂)₂]: Binükleer bor-fluorit, BA: Borik asit, NaB: Sodyum borat, BNNT: Bor nitrit nanometre boyutunda tüp, GC: Glikol kitosan, HOS: İnsan osteosarkom hattı, SCCVII: Fare skuamöz hücre karsinoma hücre hattı, 4T1: Fare metastatik meme bezi, V79: Hamster fibroblast hücre hattı, L929: Fare dermal fibroblast hücre hattı, HepG2: İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı, ECC-1: İnsan endometriyum hücre hattı, PNT1-A: İnsan prostatik epitelyum hücre hattı, Kİ-MKH: İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre, U-118 MG: İnsan gliyoblastoma hücre hattı, SaOS-2: İnsan osteosarkom hücre hattı, HUVEC: İnsan umbilikal endotelyal hücre hattı, HaCaT: İnsan keratinosit hücre hattı, sKİ-MKH: Sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre, DGKH: İnsan diş germ kök hücresi, hOB: İnsan primer osteoblast hücresi, MC3T3-E1: Fare kaynaklı osteoblastik hücre.

Biyomalzeme	İçerdiği B Miktarı (ug)	Hücre Türü	Proliferasyona Etkisi	Kaynak
BN/Jelatin	1050, 10500, 40200	HOS	Dozlar arası fark görülmemiştir.	[93]
PBA	886,5, 88,65, 8,865	4T1, SCCVII, V79 ve L929	Tüm hücre tiplerinde canlılıkta azalma görülmüştür.	[98]
BN	0,2178, 2,178, 4,356, 8,712,	HepG2	Hücre canlılığında önemli bir fark görülmemiştir.	[100]

	10,89, 13,068			
[L(BF ₂) ₂]	4324,4, 2162,2, 1081,1, 540,55, 216,22, 108,11	ECC-1, PNT1-A	ECC-1’de 540,55 µg ve üzerinde; PNT1- A’da 108,11 µg ve üzerinde canlılık azalır.	[101]
¹⁰ B	648,66, 432,44x10 ³ , 216,22x10 ³ , 108,11x10 ³ , 54,055x10 ³ , 27,028x10 ³ , 13,514x10 ³ , 6,757x10 ³	U-118 MG	648,66 µg dozda zamana bağlı olmaksızın hücre canlılığında azalma görülmüştür.	[102]
BA	81532,5, 54355, 27177,5, 10871, 5435,5, 2702,75, 1081,1, 108,11	HS-2	1.günde 108,11 µg'da kontrol grubuna göre artış gözlenmiş. Diğer dozlarda B dozu arttıkça azalma görülmüştür.	[103]
Boraks	691,9x10 ⁶ , 345,96x10 ⁶ , 172,98x10 ⁶ , 86,488x10 ⁶ , 43,244x10 ⁶ ve 21,622x10 ⁶	HepG2	1, 2 ve 3. günlerde doz ve gün bağımlı olarak canlılıkta azalma görülmüştür.	[104]
NaB ve BA	10,102; 34,97	HF, HUVEC,	1 ve 2. günde; 10,102 ug/ml	[105]

	5,051; 17,485 1,01; 3,497 0,758; 2,623	L929 ve HaCaT	dozdaki bor proliferasyonu arttırmıştır. 3. günde; 1,01 ug/ml dozda canlılıkta azalma görülmüştür.	
BNNTs+GC	0,8712, 2,178, 4,356, 10,89	sKI- MKH	En yüksek proliferasyon 2,178 µg/ml dozda görülmüştür.	[96]
BA	0,0010491 ve 1,0491	sKI- MKH	0,0010491 µg/ml doz kontrol grubuyla aynı oranda etkilemiştir. 1,0491µg/ml toksik olarak bulunmuştur.	[105]
BA	0,054; 0,108; 0,54; 1,080; 2,161	V79	18. saatte yapılan ölçümde Hiç bir doz sitotoksik bulunmamıştır.	[106]
NaB	3, 497	DGKH	NaB hücre canlılığını desteklemiştir.	[107]
BNNT	0,8743, 1,7485, 2,6228	hOB	1, 2 ve 3. günde yapılan ölçüme göre her üç zaman diliminde	[108]

			de canlılık oranı en yüksek kontrol grubuna aittir. B içeren dozların hepsi canlılık oranını azaltmıştır.	
BA	0,1749, 1,7485, 17,485, 174,85	Kİ-MKH	0,1749, 1,7485, ve 17,485 µg/ml dozlarda istatistiksel olarak anlamlı olmayan çok az bir düşüş görülmüştür. 174,85 µg/ml ise proliferasyonda anlamlı bir düşüş göstermiştir.	[109]
NaB	35,357, 25,255, 20,204, 15,153, 12,6275, 10,102, 7,5765, 5,051, 3,788, 2,5255, 1,01, 0,5051, 0,2526	DGKH	24, 48 ve 72. saatlerde 0,5051 ve 1,01 µg/ml dozlar yüksek hücre canlılığı göstermiş daha yüksek dozlarda toksisite görülmüştür.	[110]

BA	0,000018, 0,000175, 0,001749, 0,017485, 0,17485, 0,3497, 0,6994, 1,3988, 1,7485	MC3T3- E1	1. günde; 24. saatte; kontrol grubu ile karşılaştırıldığı da 0,000018-0,017485 ug/ml dozlarında önemli bir fark yoktur. 0,17485 – 1,7485 ug/ml dozları arasında ise doz artışına bağımlı olarak canlılıkta azalma vardır. 3. günde; dozlar arasında önemli bir fark yoktur. Fakat en düşük canlılık 0,001749 ug/ml dozda görülmüştür.	[97]
----	---	--------------	---	------

1.5.2. Borun kemik dokusundaki etkileri:

Bor, kemiğin gelişimi ve yapısını steroid hormonların ve ESM proteinlerinin ve osteoblastik farklılaşmaya özgü transkripsiyon faktörlerinin üretimini uyararak desteklemektedir.

Günlük diyetlerinde bor içeren besinlerden yoksun kalan ve osteopeni, osteoporoz veya osteoartrit hastalıklarından birine sahip kişilerin günlük 3 mg bor kullanımı ile desteklenmesinin yararlı etkileri gösterilmiştir [111]. Oral yolla toksik olmayan doz penceresinde alınan B bileşiklerinin kemiğe etkili konsantrasyonda ulaşabilmesindeki zorluk, oral B ile olası bir tedavi yaklaşımını ciddi biçimde sınırlamaktadır. Buradan

hareketle B'un düşük konsantrasyonda doğrudan hedef doku olan kemiğe uygulanması gündeme gelmiştir. Amerika Birleşik Devletleri Tarım Departmanı (USDA) insan çalışmaları komitesi tarafından menapoz sonrası kadınlarda bordan fakir diyet uygulanarak borun etkileri incelenmiştir. Çalışma kapsamında 12 menapoz sonrası kadın 119 gün boyunca günlük 0,25 mg B içeren bir diyet uygulatılmıştır. Düşük bor diyeti sonrasında 28 gün boyunca günlük 3 mg bor diyeti uygulanmış ve iki deney grubuna ayırarak gruplardan birinde Mg alımını azaltacak bir diyet, diğer gruba da yeterli Mg alımı sağlanacak bir diyet uygulatılmış ve idrardaki atomik absorpsiyon yöntemi ile Ca seviyeleri saptanmıştır. Günlük 3 mg bor diyeti sonrasında kadınlardaki günlük idrarlarındaki Ca miktarının % 44 oranında düştüğü görülmüştür [112]. Beattie vd., bu çalışmayı destekler sonuçlar bulmuştur; 3 hafta süresince menapoz sonrası kadınlara günlük 0,33 mg B içeren düşük B diyeti uygulanmış, düşük B diyeti sonrasında da 3 hafta boyunca günlük 3 mg B içeren diyet uygulanmıştır. Günlük 3 mg B içeren diyet uygulanan menapoz sonrası kadınlarda günlük idrarlarında kalsiyum çıkışlarında azalma tespit edilmiştir [113]. Borun hücresel düzeyde kemik hücrelerinin çoğalması, mezenkimal kök hücrelerin kemiğe farklılaşması ve kemik mineralizasyonundaki olumlu etkileri grubumuz ve bir dizi araştırmacı tarafından bildirilmiştir [70, 97, 109, 114, 115].

Borun osteoblastlardaki etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Borun terapötik bir kimlikle kliniğe güvenli olarak aktarılabilmesi için hücre düzeyindeki etki mekanizması üzerinden dozunun optimize edilmesi gerekmektedir.

1.3. Çalışmanın Gerekçesi, Hipotez ve Araştırma Soruları, Amacı, Kapsamı ve Yaygın Etkisi

Kemik kayıpları ile giden osteoporoz, osteoartrit ve tümörler gibi hastalıkların iyileştirilmesi ve travmatik hasarların onarımı için kemik hücreleri ve ESM'in yerine konması gerekmektedir [116]. Cerrahi müdahaleye gerek olmadan ya da cerrahi uygulama sırasında iyileştirici etkisi yüksek doku mühendisliği ürünleri üzerinde yoğun olarak çalışılmaktadır. Kemiğin inorganik ESM'inin ana bileşeni olan HAp kristalleri nanometre boyutunda hazırlandıklarında biyouyumlulukları ve etkinlikleri arttırılabilmektedir [71-74, 116]. Coğrafyamız için öncelikli [78] bir iz element olarak bor, kemikte iyileştirici etkilere sahiptir [97, 117]. Doğrudan veya bir taşıyıcı aracılığı ile verilen B'un hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasındaki etkileri ve olası etki mekanizmalarına ait çalışmalar sınırlı sayıda olup, birbirine zıt bazı sonuçlar içermektedir [93-100, 102, 103, 105, 108]. Bor eklenerek biyoaktif özelliği güçlendirilmiş **nHAp (BnHAp)** kompozitlerin MKH'lerle etkileşimi, kemik

farklılaşması ve mineralizasyonundaki olumlu etkileri grubumuzca ve sınırlı sayıdaki araştırmacı tarafından bildirilmiştir [70, 117, 118]. Borun osteoblastlarda osteokalsin, tip 1 kollagen gen ekspresyonunu arttırdığı [97]; Wnt β -katenin sinyal yolağını uyararak mezenkimal kök hücrelerde adipojenik farklılaşmayı önlediği [119], aynı yolağı uyararak osteoblastlarda *SET domain containing lysine methyltransferase 7* (Setd7) geni üzerinden Runx2 ekspresyonunun arttırarak kemikleşmeyi uyardığı [120] sınırlı sayıda çalışmada bildirilmiştir. Borun, nHAp kristallerinden kontrollü salım profili görüntülenebilir ve osteoblastlardaki doz bağımlı moleküler etki mekanizması ortaya konulabilirse BnHAp kompozitlerin dozu optimize edilerek terapötik bir kimlikle kliniğe güvenli olarak aktarılmaları mümkün olabilir.

Bu hipotezi test etmek üzere aşağıdaki **araştırma soruları** yanıtlanmıştır:

1. Borun nHAp kompozitlerden kontrollü salım profili nasıl gerçekleşir?
2. Borik asit, nHAp ve BnHAp kompozitlerin SaOS-2 insan osteosarkom hücre hattı ve kemik iliği kaynaklı primer MKH'lerin proliferasyon profillerine doz bağımlı etkisi nedir?
3. Borik asit, nHAp ve BnHAp kompozitler insan kemik iliği kökenli primer MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını nasıl etkilemektedir?
4. Yukarıda etkili olduğu belirlenen dozlardaki borik asit, nHAp ve BnHAp kompozitler insan osteosarkom SaOS-2 hücrelerinde hangi moleküler mekanizmayı kullanmaktadır?

Sonuç olarak bu tez çalışmasının amacı, geliştirilen BnHAp kompozitlerden B'un salım kimliğinin belirlenmesi, insan kemik iliği kaynaklı MKH'lerin osteojenik farklılaşması, MKH'ler ve osteoblastların proliferasyonuna doz bağımlı etkinin değerlendirilmesi ve etkili dozda osteoblastlardaki transkriptom profilinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Çalışmanın kapsamı:

1. **Salınan B miktarının saptanması** amacıyla; BnHAp kompozit dozları fosfat çözeltisinde (PBS; pH= 7,4) hazırlanarak indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS) yöntemi ile ölçüm yapılmıştır.
2. **Salınan B miktarının hücrelerin (SaOS-2 ve MKH) proliferasyon profillerine etkisini** saptamak amacıyla; büyüme besiyerlerinde farklı dozlarda hazırlanan borik asit, nHAp ve BnHAp uygulanmış ve 1, 3 ve 5. günlerde hücre absorbans değerleri *Water Soluble Tetrazolium-1* (WST-1) yöntemi ile kantitatif olarak ölçülmüştür.
3. **Salınan B miktarının MKH'lerin osteojenik farklılaşmasına etkisinin** saptanması amacıyla; farklı dozlarda BnHAp kompozitleri osteojenik farklılaşma besiyerinde

hazırlanarak hücrelere uygulanmış ve 7, 14 ve 21. günlerde hücre içi ALP aktivitesi spektroskopik yöntemle kantitatif olarak ölçülmüştür.

4. Salınan B miktarının SaOS-2 hücrelerindeki moleküler etki mekanizmasını incelenmek amacıyla; etkili olduğu saptanan dozda büyüme besiyerinde hazırlanan borik asit ve BnHAp hücrelere uygulanara transkriptom profili değerlendirilmiştir.

Çalışmanın yaygın etkisi:

Kemiğin metabolik hastalıkları, kemik kütlesi ve mikro yapısının bozulması sonucu kırılabilirliği ve kırık olasılığını arttıran bir dizi metabolik bozukluğu kapsar. Kemiğin senil travmaları ile oluşan kırıklar da hastalarda yüksek mortalite ve morbiditeye yol açmaktadır. Tüm bu etmenler hastaların yaşam kalitesi ve yaşam süresini olumsuz yönde etkilenmekte ve toplumda yüksek oranda sağlık harcamalarını gerekli kılmaktadır. Bor içeren nHAp kompozit kemik metabolizmasının düzeltilerek kırılabilirliğinin azaltılmasında ya da iyileşmesini hızlandırmada olumlu etki gösterebilir. Bu kompozitin hücre içi doz bağımlı moleküler etki mekanizması ve güvenli doz penceresi anlaşılabilirse klinikteki tedavi süreçlerine katkıda bulunacak yeni bir yöntem olarak devreye girebilir. Bu kompozitin, nanoteknolojik koruyucu ve tedavi edici ilaç olma potansiyeli taşıması ve 2014 verilerine göre dünya bor üretiminin % 47,2'sinin gerçekleştiği ülkemiz açısından da bor katkılı bir nanomateryal kullanımı çalışmanın **yaygın etkisini** vurgulamaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Tasarımı; bu tez çalışmasında *in vitro* koşullarda, deney ve kontrol grupları içeren (BnHAp, HAp kompozit ve BA uygulanmış ve biyomalzeme uygulanmamış MKH'ler ve osteoblastlar) gözlemsel bir deney gerçekleştirilmiştir. Gruplara ait tekrar (n) sayıları Tablo 2.1'de verilmiştir. Çalışma disiplinlerarası, rastgele seçilmiş ve ileriye yönelik biçimde planlanmıştır. Bağımsız değişkenler BnHAp, HAp, BA uygulanmış gruplar ve kontrol grubu; bağımlı değişkenler hücrelerin proliferasyon, osteojenik farklılaşma ve gen ekspresyon düzeylerine ait verilerdir.

Tablo 2.1. Deney ve kontrol gruplarıyla gerçekleştirilen iş paketlerindeki tekrar (n) sayıları, bağımlı ve bağımsız değişkenler ile gösterilmektedir.

	Grup	Hücre Türü	Bağımlı Değişkenler		
			Proliferasyon Deneyi (n)	Osteojenik Farklılaşma Deneyi (n)	Transkriptom Deneyi (n)
Bağımsız Değişkenler	BnHAp	MKH	21	6	-
		Osteoblast	14	-	1
	HAp	MKH	21	6	-
		Osteoblast	14	-	1
	BA	MKH	21	6	-
		Osteoblast	14	-	1
	Kontrol (Hücre)	MKH	21	6	-
		Osteoblast	14	-	1

Bor içeren nanometre boyutundaki kalsiyum hidroksiapatit tozlarının hazırlanması ve karakterizasyonu:

Bu tez çalışmasında, daha önce grubumuz tarafından yüksek lisans tezi kapsamında [120] BnHAp kompozitlerin *in vitro* ortamda MKH ile etkileşimi ve *in vivo* olarak osteoporozlu tavşan uzun kemiklerine etkilerinin incelendiği çalışmada uygulanan ve elde edilen sonuçlar nedeniyle bu çalışmaya gerekçe oluşturan kompozitler kullanılmıştır. Bu çalışmada, BnHAp kompozitler kimyasal tuzlardan sentezleme yöntemi ile kalsiyum nitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), amonyum hidrojen fosfat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) ve borik asit (H_3BO_3) hammaddelerinden

oluşturulan sulu çözeltilerin asit- baz kimyasal reaksiyon sistemine göre yürüyen çöktürme süreci sonucu üretilmiştir. Reaktiflerin sulu çözeltileri, deiyonize su ile hazırlanmış olup çözelti derişimleri 0,1 M olarak uygulanmıştır. Kuvvetli karıştırma ve çöktürme yolu ile elde edilen nano boyutlu BHAp öncülü olan kütle ağız kapatılmış cam beher içinde bir gece dinlendirilmiş ve daha sonra santrifüjlenerek katı-sıvı ayırımı yapılmıştır. Bu işlem deiyonize su ile en az üç defa tekrarlanarak katı kısım çözeltiden taşınan yabancı katyonlardan arındırılmıştır.

BnHAp sentezleme süreci temizlenmiş öncülün 1000°C sıcaklığa kadar ısıtılması ile tamamlanmıştır. Üretilen BnHAp kompozitin karakterizasyonu XRD, SEM, TEM ve EDX yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir [69]. SEM ve TEM’de kompozit tozların ortalama $575,3 \pm 29,12$ nanometre boyutlu ve küresel biçimli oldukları saptanmıştır. Bor dağılımı ve yoğunluğu EDS element haritalaması ile belirlenmiştir. Mineralojik yapı XRD kırınım diyagramları çekilerek tanımlanmıştır. XRD diyagramı üretilen BnHAp tozunun tek fazlı bir yapıya sahip olduğunu, FTIR ve RAMAN spektral grafikleri ise bor elementinin yapı içinde genellikle $(\text{BO}_3)^{3-}$ grupları halinde $(\text{PO}_4)^{3-}$ grupları ile birlikte bulunduğunu göstermiştir. Bu veriler ışığında bor katkılı HAp tozunun yapısal formülü $\text{Ca}_{10}[(\text{PO}_4)_5.8(\text{BO}_3)_{0.2}](\text{OH})_2$ olarak tanımlanmıştır [121].

Deney düzeni ve BnHAp kompozitlerin doz aralıklarının belirlenmesi; literatür taraması ve grubumuzun önceki deneylerinden elde edilen verilere göre etkili ve yan etkiler açısından güvenli B doz penceresi araştırıldı. Buna gör etkili B miktarı 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} ve 1 µg olarak belirlendi [93, 97, 105, 109, 118]. Belirlenen B miktarlarının BnHAp kompozitlerden salınması için gereken zaman dilimleri ve BnHAp dozları yapılan salım çalışması ön deneyi ile hesaplandı. Boru 10^{-3} µg miktarında, 0,9 µg/ml dozunda BnHAp kompozitin yaklaşık 1. günde salacağı çıkarımına varıldı. Buna göre B içeren nHAp kompozitlerin dozları 0,9 µg/ml, 9 µg/ml, 90 µg/ml ve 900 ug/ml olarak hesaplandı. Bor içeren nHAp kompozitlerden salınan B miktarına karşılık gelen BA dozları sırasıyla 0,006 µg/ml, 0.06 µg/ml, 0.6 µg/ml ve 6 ug/ml olarak hesaplandı. BnHAp kompozitin toplam ağırlığı kadar HAp miktarı belirlendi. Çalışmada yapılan deneylerde kullanılan biyomalzemeler, moleküler formülleri, dozları ve içerdikleri B miktarları Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Deneylerde (2.1, 2.2.2, 2.3 ve 2.4 numaralı iş paketleri) kullanılan biyomalzemeler, bunların moleküler formülleri, dozları ve içerdikleri B miktarları µg/ml olarak verilmiştir.

Biyomalzeme	Moleküler Formül	Doz (µg/ml)	İçerdiği B Miktarı (µg/ml)
BnHAp	$\text{Ca}_{10} [(\text{PO}_4)_{5.8}(\text{BO}_3)_{0.2}](\text{OH})_2$	0,9	0,0167048
		9	0,167048
		90	1,67048
		900	16,7048
HAp	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	0,9	-
		9	-
		90	-
		90	-
BA	H_3BO_3	0,006	0,0010491
		0,06	0,010491
		0,6	0,10491
		6	1,0491

Tez çalışması, Biyomühendislik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı kapsamında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na ait laboratuvar alt yapısı ve teknik ekipman kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Salım çalışmaları için Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Abd. ve transkriptom deneyleri için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Abd.'dan destek alınmıştır.

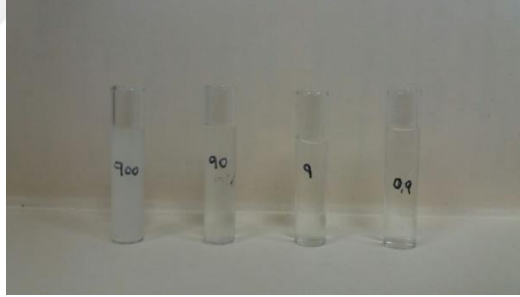
Giriş bölümünde sorulan araştırma sorularını yanıtlamak amacıyla aşağıdaki iş paketleri gerçekleştirilmiştir.

2.1. Bor içeren nHAp Kompozitlerden B'un Kontrollü Salım Profilinin Değerlendirilmesi

2.1.1. Bor içeren nHAp Kompozitlerin Raman Spektroskopi Yöntemi ile Karakterizasyonu

BnHAp kompozitlerin karakterizasyonu spektroskopik bir yöntem olan Raman mikroskobu ile 7 tekrarlı olarak yapılmıştır. Optimizasyon çalışmaları ve kalibrasyon grafiğinin oluşturulması için 785 nm lazer kaynağı, örnek için hareketli lamel haznesi ve CCD dedektörü ile sinyal ölçümü gerçekleştirilmiştir. Cihazın parametreleri 35 saniye veri toplama süresi, 10x ve 20x objektif, 30 µm lazer spot alanı ve 150 mW lazer gücü olacak şekilde ayarlanmıştır.

Bor içeren nanometre boyutlu HAp kompozitler 0,9 µg/ml, 9 µg/ml, 90 µg/ml ve 900 µg/ml dozlarına ulaşmak amacıyla 1800 mg kompozit tartılarak 2 ml PBS içinde disperse edilmiştir. 2 ml olarak hazırlanan 900 µg/ml dozunun 1 ml Raman mikroskobunda ölçüm için kullanılırken, geriye kalan 1 ml ile seri dilüsyonlar yapılarak sırasıyla 90 µg/ml, 9 µg/ml ve 0,9 µg/ml dozları elde edilmiş ve Raman tüplerine koyularak ölçüm yapılmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Raman spektroskopi yöntemi ile karakterizasyonu yapılan 0,9 µg/ml, 9 µg/ml, 90 µg/ml ve 900 µg/ml dozlarda hazırlanan BnHAp kompozitler, hazırlandıkları tüplerde gösterilmektedir.

2.1.2. Bor İçeren nHAp Kompozitten Salınan B Miktarının İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometre (ICP-MS) Yöntemi ile Saptanması

BnHAp kompozitler ve nHAp kompozitler 0,9 µg/ml, 9 µg/ml, 90 µg/ml ve 900 µg/ml dozlarında 5 tekrarlı olarak hazırlanarak kompozitlerden salınan B miktarları ICP-MS yöntemi ile nanogram düzeyinde ölçülmüştür. Bunun için BnHAp ve HAp kompozitler 0,9 µg/ml, 9 µg/ml, 90 µg/ml ve 900 µg/ml dozlarına ulaşmak amacı ile sırasıyla 0,027 mg, 0,27 mg, 2,7 mg ve 27 mg hassas tartıda tartılarak her biri 50 ml'lik falkon tüpte 30 ml PBS içinde

dağıtılmıştır. Örnekler oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde hedeflenen zaman noktaları olan 15 ve 60. dakika, 24. saat, 3 ve 5. güne kadar bekletilmiştir. Bekletilen örneklerden 2 ml çözelti 10 ml'lik enjektör ile çekilerek 0.22 µm gözenek boyutuna sahip filtre ile 15 ml'lik falkon tüplere süzölmüştür. Salım çalışması kapsamında 2 ml örnek alınan her gruba toplam hacmin korunması için 2 ml PBS eklenmiştir. Süzölen örnekler ICP-MS değerlendirilmesi yapılabildiği kadar +4°C'de bekletilmiştir.

Değerlendirme işlemi; 2,0 mL örnek çözeltisi 5,0 mL'ye % 2 (v/v) HNO₃ içerecek şekilde seyreltildikten sonra ICP-MS (Agilent Technologies 7800 ICP-MS, ABD) ile yapılmıştır. Internal standart olarak 6 Li çözeltisi (Mix24Lab, Almanya) kullanılmıştır. Yöntemin çalışma koşulları Tablo 2.3'te verilmiştir. Kalibrasyon standartları 100 mg L⁻¹ Bor standartının (Mix24Lab, Almanya) seyreltilmesiyle 2,5 µg L⁻¹ ile 250 µg L⁻¹ aralığında dokuz farklı derişimde hazırlanmış ve $y=7507,4x + 20498$, $R^2 = 0,9996$, (x ; µg L⁻¹) doğru denklemi elde edilmiştir. Örneklerin içeriğindeki bor derişimi kalibrasyon doğru denklemi üzerinden hesaplanmıştır.

Tablo 2.3. ICP-MS cihazının çalışma koşulları özetlenmiştir.

Plazma Koşulları	1550 W Rezonans Frekansı Gücü
Plazma Ar Akış Hızı	15 L/dk
Yardımcı Ar Akış Hızı	0,80 L/dk
Taşıyıcı Ar Akış Hızı	1,08 L/dk
Örnek Derinliği	8,0 mm
Cihazın Örnek Konisi	Nikel Uç, 1,0 mm Çapında Ağız
Skimmer Konisi	Nikel, 0,4 mm Çapında Ağız
İzotop Ölçümü	¹¹ B

2.2. Borik asit, nHAp ve BnHAp Kompozitlerin SaOS-2 İnsan Osteosarkom Hücre Hattı ve Kemik İliği Kaynaklı Primer MKH'lerin Proliferasyon Profillerine Doz Bağımlı Etkisinin Değerlendirilmesi

2.2.1. İnsan Osteosarkom SaOS-2 ve Kemik İliği Kaynaklı Primer Mezenkimal Kök Hücrelerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu

İnsan osteosarkom SaOS-2 hücreleri (#HTB-85, ATCC®, ABD) ATCC'den ve primer insan MKHleri (#A15652, StemPro, ABD) Thermo Fisher Scientific'ten ticari olarak elde edilmiştir. Bu hücreler, insan kökenli olmaları ve literatürde osteoblastların genotipik ve fenotipik profillerini en iyi yansıtan hücreler olmaları nedeniyle seçilmiştir [126]. Osteosarkom hücreleri ve MKH'ler sırasıyla 41 ve 4. pasajlarında açılarak kültür ortamında çoğaltılmıştır. Hücreler dondurma tüplerinde, 37°C'lik su banyosunda çözülerek üzerlerine büyüme besiyeri eklenmiş ve 1400 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Osteosarkom hücreleri için büyüme besiyeri % 15 fetal bovine serum (FBS), % 1 penisilin-streptomisin ve % 1 L-glutamin içeren McCoy's 5A Medium (Biological Industries, ABD)'dur. Mezenkimal kök hücreler için büyüme besiyeri olarak % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin ve % 1 L-glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium- Low Glucose (DMEM-LG) (Lonza, İsviçre) kullanılmıştır. Santrifüj sonrasında oluşan supernatan atılarak elde edilen hücre pelleti homojenize edilmiş ve sayım işlemi yapılmıştır. Hücre sayımı Bürker lamı kullanılarak, tripan mavisi boyası ile hücre süspansiyonu 1:1 oranında sulandırarak gerçekleştirilmiştir.

Osteosarkom SaOS-2 hücrelerinin üretimi, çözülüp ekilen hücrelerin büyüme besiyerleri atılarak 3 günde bir taze besiyeri eklenmiştir. Bir haftanın sonunda hücreler, % 70 oranında kültür kabını doldurmuştur. Hücreler PBS ile yıkanarak 3 ml % 0.25 tripsin-EDTA (Gibco, ABD) uygulanmıştır. Hücreler, inkübatörde 5 dk bekletilerek birbirlerinden ve adezyon gösterdikleri kültür kabından ayrılmalari sağlanmıştır. Tripsin-EDTA'nın aktivitesini durdurmak için üzerine % 15 fetal bovine serum (FBS), % 1 penisilin-streptomisin ve % 1 L-glutamin içeren McCoy's 5A Medium (Biological Industries, ABD) besiyeri eklenmiştir. Toplanan hücreler 5 dk 1200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet, supernatan uzaklaştırılarak homojenize edilmiş ve tripan mavisi ile 1:1 oranında sulandırılarak, hücreler sayılmıştır. Hücreler sayılarına göre kültür kaplarına ekilerek 37°C ve % 5 CO₂ içeren inkübatöre koyulmuştur. Artan hücreler 5:4:1 oranına (McCoy's 5A Medium: FBS: dimethyl sulfoxide (DMSO) sahip dondurma besiyeri ile dondurma tüplerine alınmıştır. Dondurma tüpleri dereceli dondurma için CoolCell'e (Sigma-Aldrich, Almanya) yerleştirilmiş ve yavaş

dondurma protokolüne uygun olacak şekilde dakikada 1°C soğutulmuş, 4 saat -80°C’de bekletildikten sonra -196°C sıvı azot tankına yerleştirilerek dondurulmuştur. Osteosarkom SaOS-2 hücreleri **2.2.2 ve 2.4 numaralı iş paketlerinde** kullanılmıştır.

Mezenkimal kök hücrelerin üretimi, çözülüp ekilen hücrelerin besiyerleri atılarak 2 günde bir taze besiyeri eklenmiştir. Hücreler % 70 oranında kültür kabını doldurduklarında, PBS ile yıkanarak 3 ml % 0.25 tripsin-EDTA (Gibco, ABD) eklenmiştir. İnkübatöre kaldırılarak 5 dk bekletilen hücrelerin birbirlerinden ve yapıştıkları kültür kabından ayrılmalari sağlanmıştır. Tripsin-EDTA’nın aktivitesini durdurmak için üzerine % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin ve % 1 L-glutamin içeren *Dulbecco's Modified Eagle Medium- Low Glucose* (DMEM-LG) (Lonza, İsviçre) besiyeri eklenmiştir. Toplanan hücreler 5 dk 1200 rpm’de santrifüj edilerek elde edilen pelletin supernatani atılmıştır. Pellet, homojenize edilmiş ve tripan mavisi boyası ile 1:1 oranında sulandırılarak sayılmıştır. Hücreler ekilerek 37°C ve % 5 CO₂ içeren inkübatöre koyulmuştur. Geriye kalan hücreler 5:4:1 oranına (DMEM-LG: FBS: DMSO) sahip dondurma besiyeri ile dondurma tüplerine alınmıştır. Dondurma tüpleri dereceli dondurma için *CoolCell*’e (Sigma-Aldrich, Almanya) yerleştirilmiş ve yavaş dondurma protokolüne uygun olacak şekilde dakikada 1°C soğutulmuş, 4 saat -80°C’de bekletildikten sonra -196°C sıvı azot tankına yerleştirilerek dondurulmuştur.

Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon çalışması, Uluslararası Hücresel Tedavi Topluluğu’nun Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi’nin (*The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of The International Society for Cellular Therapy*) ön gördüğü kriterler esas alınarak üç yöntemle gerçekleştirilmiştir [122]. Karakterizasyon çalışmalarının tümü, hücrelerin iş paketlerinde kullandıkları pasaj olan, 5. pasajda yapılmıştır.

Morfolojik değerlendirme, invert e ışık mikroskobu altında incelemesi yapılan MKH’lerin kültür kabına tutunmaları (adezyon özellikleri) ve morfolojik olarak iğ biçimli olmaları ile değerlendirilmiştir.

Farklılaştırma deneyleri, MKH’lerin osteojenik ve kondrojenik farklılaşmaları değerlendirilmiştir.

Osteojenik farklılaştırma; ELISA yöntemiyle hücrelerdeki alkalen fosfataz (ALP) enzim aktivitesi kantitatif olarak değerlendirilerek gerçekleştirilmiştir. Bunun için hücreler 24 kuyucuklu kültür kaplarına, kuyucuk başına 15x10³ hücre olacak şekilde 12 kuyucuğa ekilmiş ve % 80 yoğunluk oranına ulaşana kadar 2 günde bir, eski besiyerleri atılarak taze

besiyeri eklenmiştir. İstenen yoğunluğa ulaşan hücreler 0,5 ml PBS ile yıkanarak 6 kuyucuğuna % 10 FBS (Gibco, ABD), 100 nM deksametazon (Sigma-Aldrich, Almanya), 10 mM β -gliserofosfat (Sigma-Aldrich, Almanya) ve 0,2 mM L- askorbik asit (SantaCruz Biotechnology Inc., ABD) içeren osteojenik farklılaştırma besiyeri ve 6 kuyucuğuna % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin ve % 1 L-glutamin içeren DMEM-LG (Lonza, İsviçre) büyüme besiyeri eklenmiştir. Besiyerleri 3 günde 1 kere olacak şekilde taze besiyeri ile değiştirilmiştir ve 21. günün sonunda tüm kuyucuklardan besiyerleri uzaklaştırılarak 0,5 ml PBS ile yıkanmıştır. Osteojenik farklılaştırma değerlendirmesinde hücre içi ALP aktivitesinin ölçümü kantitatif olarak yapılmıştır; yıkanan kuyucuklara üreticinin talimatları doğrultusunda 0.5 ml *SIGMAFAST pNPP substrat* (Sigma- Aldrich, Almanya) çözeltisi eklenmiştir. Çözelti eklenen kültür kabı folyo ile kaplanarak karanlık bir ortam sağlanmıştır, 30 dk 37°C ve % 5 oranında CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiştir. Kültür kabı 30 dk. sonunda inkübatörden alınıp, her bir kuyucuktan 200 μ l çekilerek 96 kuyucuklu kültür kabına karanlık ortamda koyulmuştur. Kültür kabı ELISA okuyucuda 405 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Kondrojenik farklılaştırma; *quantitative real time- polymerase chain reaction* (qRT-PCR) yöntemiyle, 21. günde SOX-9 ve COMP kondrojenik belirteçlerin kantitatif olarak değerlendirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primer dizileri Tablo 2.4'te verilmiştir. Bunun için, kültürü gerçekleştirilen MKH'ler tripsin ile kaldırılmış ve sayımları yapılmıştır. Hücreler 5. pasajda, her bir falkon tüpünde 25x10⁴ hücre olacak şekilde toplam 2 adet 15 ml'lik falkon tüpe yıkama çözeltisi içinde eklenerek PBS ile sulandırılmıştır. *Falcon* tüpte bulunan hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılarak, pellet homojenize edilmiştir. Pellet üzerine 2 ml büyüme besiyeri eklenerek tekrar 1500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir ve santrifüjden alınan falkon tüpler inkübatöre yerleştirilmiştir. Falkon tüpünde 24 saat sonrasında oluşması beklenen küre biçimli pellet kontrol edilmiştir. Beklenen pellet şeklinin oluştuğu gözlenerek büyüme besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti PBS ile dağılmamasına dikkat edilerek bir defa yıkanmıştır. Kontrol grubu olarak değerlendirilecek olan falkon tüpe büyüme besiyeri ve kondrojenik farklılaşmanın değerlendirileceği falkon tüpe % 0,01 deksametazon, % 1 penisilin-streptomisin, % 1,25 L-askorbik asit(L-AA), % 1 Na-piruvat, % 1 μ l ITS+premix, % 1 μ l TGF- β 3, % 1 L-Glutamin ve DMEM-LG içeren kondrojenik farklılaşma besiyeri 2'şer ml olacak şekilde eklenmiştir. Her iki grubun da besiyerleri 3 günde 1 kere taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Değerlendirme yapılacak 21. günün sonunda besiyerleri ortamdaki

uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkanmıştır. Üzerine 1 ml trizol uygulanarak hücreler lizise uğratılmıştır. Hücre lizatları RNase içermeyen (*RNase free*) tüpe alınarak, RNA izolasyon işlemine kadar -80 °C 'de saklanmıştır. Değerlendirme günü örnekler -80°C 'den çıkarılarak buz üzerinde bekletilmiş ve 200 µl kloroform eklenmiştir. Örnekler, 15 dk 4°C' de 12000 rpm'de santrifüj edilmiş ve oluşan üst faz steril tüplere aktarılmıştır. Aktarılan örneğe, 750µl, %100'lük etil alkol eklenip karıştırılmıştır. Örnek, -20°C'de 30 dk inkübe edilmiştir ve 4°C' de 12000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek tekrar oluşan üst faz atılmıştır. Bu işlem 2 kere daha tekrar edilerek RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'ların miktarı ve saflığı, NanoDrop spektrometre ile (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, ABD) 260, 280 ve 230 nm dalga boylarında ölçülerek standart yöntemle hesaplanmıştır. cDNA sentezi için total RNA'dan 200 ng kadarı cDNA sentez kiti (ProtoScript® First Strand #E6300, New England BioLabs, USA) kullanılmıştır. Gerçek zamanlı kantitatif qRT-PCR işlemi için, PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (#A25741, Thermo, ABD) ve ViiATM 7 Real-Time PCR System (Thermo, ABD) kullanılmıştır. Rölatif mRNA ifade analizi delta Ct yöntemi ve ViiATM 7 yazılımının 1.2.4 sürümü ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.4. Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşma değerlendirmesi kapsamında kullanılan belirteçleri ve primer dizilimleri gösterilmektedir.

Gen	Forward Primer Dizilimi	Reverse Primer Dizilimi
COMP	AGGACGACTTTGATGCAGA	AAGCTGGAGCTGTCCTTCGA
SOX9	GGCAGCTGTGAACTGGCCA	GCACACGGGGAAGTTGTCC

Mezenkimal kök hücrelerin yüzey belirteçlerinin akım sitometrisi yöntemi ile değerlendirilmesi; üretimi gerçekleştirilen 5. pasaj MKH'lerin karakteristik hücre yüzey belirteçleri olan CD 73, CD 44, CD 90, CD 29 eksprese edip, CD 38, CD 45 ve HLA-DR'yi eksprese etmediklerinin doğrulanması için hücreler tripsinize edilerek birbirlerinden ve tutundukları yüzeyden ayrılmaları sağlanmıştır. İnkübatörden alınan hücrelere % 10 FBS içeren besiyeri eklenerek tripsin aktivitesi durdurulmuştur ve 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Pellet homojenize edilmiş ve tripan mavisi boyaması ile 1:1 oranında sulandırılarak sayımı yapılmıştır. Sayımı yapılan hücreler bir *Fluorescence Assisted Cell Sorting* (FACS) tüpünde 2×10^5 hücre (2×10^5 hücre/tüp) olacak şekilde 2 ml PBS ile koyulmuştur ve tüpler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet homojenize edilmiştir. Homojenize olan hücrelerin üzerine 100 µl PBS/BSA/Na Azide (PBN)

ve Tablo 2.5'te gösterilen antikorların her birinden 5 µl olacak şekilde eklenerek +4°C'de, karanlık ortamda 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübe edilen hücreler 20 dakika sonunda 2 kez olmak üzere PBN ile yıkanmıştır. Yıkamadan sonra tüplere 200 µl PBN eklenerek BD FACS Aria2 cihazında (*Becton Dickinson, New Jersey, ABD*) okutulmuştur. Antikorlar ile işaretlenen hücrelerin yüzey belirteçlerinin 15.000 olgu (*event*) ile okuması yapılarak FACS Diva yazılımı ile değerlendirmesi yapılmıştır.

Tablo 2.5. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinde akım sitometrisi yöntemi ile değerlendirilen yüzey belirteçlerine ait antikorlar, florokromları, markaları ile beraber verilmiştir.

Antikor	Florokrom Türü	Katalog Numarası	Marka ve Ülke
Fare anti insan CD73, IgG ₁	PE	550257	BD Biosciences, ABD
Fare anti insan CD44, IgG ₁	FITC	347943	BD Biosciences, ABD
Fare anti insan CD45, IgG ₁	FITC	555482	BD Biosciences, ABD
Fare anti insan CD90, IgG ₁	FITC	555595	BD Biosciences, ABD
Fare anti insan CD29, IgG ₁	APC	559883	BD Biosciences, ABD
Fare anti insan CD38, IgG ₁	APC	555462	BD Biosciences, ABD
Fare anti insan HLA-DR, IgG ₂	APC	347403	BD Biosciences, ABD

Mezenkimal kök hücreler, karakterizasyonları yapıldıktan sonra, **2.2.2 ve 2.3 numaralı iş paketlerinde** kullanılmıştır.

2.2.2. Hücre Proliferasyonunun *Water Soluble Tetrazolium-1* (WST-1) Tekniği ile Kantitatif Olarak Değerlendirilmesi

Kolorometrik bir ölçüm tekniği olan WST-1, hücrenin metabolik aktivitesinin ölçümünde kullanılmaktadır. Yöntemin esası, mitokondriyonda üretilen dehidrogenaz enzim aktivitesi sonucu oluşan tetrazolyum tuzlarının, 4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyo]-1,3-benzen disülfonad kimyasal formülüne sahip WST-1 ajanı ile kırmızı renkli formazan bileşiğine indirgenmesine dayanmaktadır. Kültürü yapılan hücreye uygulanan WST-1 ajanı, formazan bileşiği oluşumunu hücre sayısı ile doğru orantılı olarak artırır. Bu da proliferasyon profilinin ölçülmesini sağlar. Mezenkimal kök hücreler ve osteoblastik SaOS-

2 hücrelerinin çoğalma profilleri, biyomalzemeler uygulandıktan sonra 1, 3 ve 5. günlerde değerlendirilmiştir. Hücre proliferasyonu deney düzeneğindeki kontrol ve deney grupları ve tekrar sayıları Tablo 2.6’da verilmiştir.

Tablo 2.6. Hücre proliferasyon değerlendirmesinde kullanılan hücre türleri, uygulanan biyomalzeme dozları ve değerlendirme yapılan zaman dilimleri ile tekrar sayıları verilmiştir.

Hücre Türü	Malzeme	Doz (µg/ml)	Zaman	Tekrar Sayısı
MKH	BnHAp	0,9	1. gün, 3. gün ve 5. gün	21
		9		
		90		
		900		
	HAp	0,9		
		9		
		90		
		900		
	BA	0,006		
		0,06		
		0,6		
		6		
	-	-		
-	-	-		
SaOS-2	BnHAp	0,9	1. gün, 3. gün ve 5. gün	14
		9		
		90		
		900		
	HAp	0,9		
		9		
		90		
		900		
	BA	0,006		
		0,06		
		0,6		

		6		
	-	-		
-	-	-		

Deney için, bölüm 2.2.1’de anlatılan yöntemle üretimleri gerçekleştirilen 42. pasaj SaOS-2 hücreleri kuyucuk başına 9×10^3 hücre olacak şekilde ve 5. pasaj MKH’ler kuyucuk başına 5×10^3 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kabına ekilmiştir. Hücreler kendi besiyerlerinde kültür kabının yüzeyine adhezyon göstermeleri için 24 saat 37°C ’de % 5 CO_2 oranına sahip inkübatörde bekletilmiştir. Hedeflenen zaman dilimlerinde kurgulanan değerlendirme yönteme uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Bunun için 96 kuyucuklu kültür kabındaki tüm kuyucuklardan 200 μl besiyeri çekilerek atılmıştır. Besiyerleri uzaklaştırılan tüm kuyucuklar 200 μl PBS ile yıkanmıştır. Tüm kuyucuklara 100 μl besiyeri ve 10 μl WST-1 ajanı ışıktan korunarak koyulmuş, ajan eklenmiş kültür kapları folyo ile sarılarak karanlık bir ortam sağlanmıştır ve inkübatöre kaldırarak 2 saat bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda kültür kapları ELISA okuyucuda referans 620 nm dalga boyunda olmak üzere 460 nm dalga boyunda okutulmuştur.

2.3. Borik asit, nHAp ve BnHAp Kompozitlerin, İnsan Kemik İliği Kökenli Primer MKH’lerin Osteojenik Farklılaşmasına Etkisinin Alkalen Fosfataz Aktivitesi Üzerinden Değerlendirilmesi

Osteojenik farklılaşmanın erken belirteci ALP enzimi, hücre içinde fosfat bileşiklerini parçalayarak mineralizasyona katılmasını sağlamaktadır. Osteojenik farklılaşma ile ALP aktivitesi doğru orantılı olarak artmaktadır. Yöntem, substrat içeren *SIGMAFAST p-Nitrophenyl phosphate* (pNPP) tabletin (Sigma- Aldrich, Almanya) hücrelere uygulanması ve hücre içinde bulunan ALP’ın p-nitrofenil fosfatları, sarı renkli p-nitrofenol bileşiğine yıkmasına dayanmaktadır. Böylece sarı renkli olarak ölçülen p-nitrofenol miktarı, spektroskopik olarak ALP aktivitesini gösterir. Mezenkimal kök hücrelerin ALP aktiviteleri, biyomalzemeler uygulandıktan sonra 7, 14 ve 21. günlerde değerlendirilmiştir. Deney düzeneğindeki kontrol ve deney grupları ve tekrar sayıları Tablo 2.7’de verilmiştir.

Tablo 2.7. Osteojenik farklılaşma deneyinde uygulanan biyomalzeme dozları ve ALP aktivite değerlendirmesi yapılan zaman dilimleri, tekrar sayılarıyla verilmiştir.

Hücre Türü	Malzeme	Doz (µg/ml)	Zaman	Tekrar Sayısı
MKH	BnHAp	0,9	7. gün, 14. gün ve 21. gün	6
		9		
		90		
		900		
	HAp	0,9		
		9		
		90		
		900		
	BA	0,006		
		0,06		
		0,6		
		6		
	-	-		
	-	-		
-	-	-		

Deneyde, üreticinin talimatları doğrultusunda pNPP tabletler ölçüm yapılana kadar -20°C’de saklanmıştır. Deney öncesi, bir set deney için gerekli olan bir adet Tris tampon tableti ve bir adet pNPP tableti -20°C’den oda sıcaklığına getirilmiştir. Tabletler, 20 ml distile su içinde vortekslenerek çözülmüştür ve değerlendirmede doğrudan kullanılacak olan 1,0 mg/ml pNPP, 0,2 M Tris tamponu ve 5 mM magnezyum klorit içeren substrat çözeltisi elde edilmiştir. Bölüm 2.2.1’de anlatılan şekilde üretimleri gerçekleştirilen 5. pasajdaki MKH’ler kuyucuk başına 15×10^3 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür kabına ekilerek çoğalmaları sağlanmıştır. Kültür kaplarında hücreler % 80 oranında yoğunluğa ulaştığında deney seti kurulmuştur (Tablo 2.7). Pozitif kontrol grubunda MKH’ler osteojenik farklılaştırma; negatif kontrol grubunda büyüme besiyerinde izlenmiştir. Besiyerleri 3 günde bir taze besiyerleri ile değiştirilmiştir. Hedeflenen günlerin sonunda tüm kuyucuklardan besiyerleri uzaklaştırılarak 0,5 ml PBS ile yıkanmıştır. Yıkanan kuyucuklara 0,5 ml *SIGMAFAST* pNPP substrat çözeltisi eklenmiştir. Çözelti eklenen kültür kabı folyo ile

kaplanarak ışıktan korunmuş, 30 dk 37°C ve % 5 oranında CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiştir. Kültür kabı 30 dk sonunda inkübatörden alınmış, her kuyucuktan 200 µl çekilerek 96 kuyucuklu kültür kabına karanlık ortamda koyulmuştur. Kültür kabı ELISA okuyucuda 405 nm dalga boyunda okutulmuştur.

2.4. Borik Asit, nHAp ve BnHAp Kompozitlerin SaOS-2 İnsan Osteosarkom Hücrelerinde Transkriptom Prolifine Etkisinin Değerlendirilmesi

Transkriptom analizi, yeni nesil dizileme tekniği kullanılarak RNA üzerinden tüm transkriptom kütüphanesinin kantitatif olarak görüntülenmesine olanak veren bir tekniktir. Bunun için üretimi; bölüm 2.2.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen SaOS-2 hücreleri 49. pasajda 6 kuyucuklu kültür kabına kuyucuk başına 15×10^4 olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler, kültür kabına tutunmaları için 24 saat inkübatörde bekletildikten sonra deney düzeneği hazırlanmıştır. Osteoblastların transkriptom analizleri için, biyomalzemeler uygulandıktan sonra 1 ve 3. günlerde RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Deney düzeneğindeki kontrol ve deney grupları ve tekrar sayıları Tablo 2.8’de verilmiştir.

Tablo 2.8. Transkriptom yöntemi ile yapılan değerlendirilmede kullanılan hücre türü, biyomalzemeler, biyomalzemelerin dozları ve değerlendirmenin yapıldığı zaman ve tekrarları verilmiştir.

Hücre Türü	Malzeme	Doz (µg/ml)	Zaman	Tekrar Sayısı
SaOS-2	BnHAp	0,9	1. gün	1
	HAp	0,9		
	BA	0,006		
	-	-		

RNA izolasyonu için, kuyucuklardan besiyerleri atılmış; her kuyucuk 2 ml PBS ile yıkanarak besiyeri tamamen uzaklaştırılmıştır. Tüm kuyucuklara 1 ml trizol (Sigma- Aldrich, Almanya) eklenerek hücrelerin lizisi sağlanmış ve hücre lizatları RNase içermeyen (*RNase free*) tüplere toplanarak değerlendirme gününe kadar -80°C’de saklanmıştır. İzolasyon sonrası spektrofotometrik yöntem ile (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, ABD) RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. Örneklerden 260/280 ve 260/230’un oranları 1.50’in altında olanlar seçildi ve sodyum asetat/etanol karışımı kullanılarak manuel

olarak saflaştırıldı. Örneklerden 10'ar nanogram toplam RNA alınarak VILO Superscript cDNA sentez kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA'lar IonCode plağına yüklendi ve Ampliseq Transcriptome Human Gene Expression kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile Ion Chef cihazı (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak kütüphaneler oluşturuldu. Kütüphane üretimi sırasında IonCode plağı içerisindeki farklı kuyucuklara yerleştirilmiş barkod diziler sayesinde, tüm örneklerin aynı yeni nesil dizilenmesine olanak sağlandı. Birleştirilmiş kütüphanenin (4 örnek) kantitatif miktar tayini florometrik yöntem ile Qubit cihazı (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve PicoGreen kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak yapıldı. Qubit dsDNA High Sensitive Quantitation kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) içerisindeki standart değerler yardımı ile çift zincirli DNA moleküllerinin miktarı saptandı. 100 pM'lık kütüphane örneğinden 8 µl alınarak nükleaz içermeyen 92 µl su ile 100 µl'ye tamamlanarak klonal amplifikasyona geçildi. Kütüphanelerin klonal amplifikasyonu için Ion PI Hi-Q OT2 200 kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Yeni nesil dizileme reaksiyonu Ion PI Hi-Q Sequencing 200 Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak Ion Proton (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında gerçekleştirildi. Veri analizi için Torrent Server üzerinde bulunan analiz *plug-in* kodları kullanıldı. Yeni nesil dizileme sonrası elde edilen tüm okumalar “*read per millions*” yöntemiyle normalize edildi ve karşılaştırmalı olarak listelendi. Elde edilen verilerle oluşturulan kütüphane sonrası, kontrol grubuna göre 2 kat ve daha fazla ekspresyon değişikliği gösteren deney gruplarına ait veriler değerlendirmeye alınmıştır. Değerlendirmeye alınan gen ekspresyonu verileri *Entrez Gene ID* kimliklendirme birimi aracılığı ile *PANTHER* aracının 11. sürümü kullanılarak; yer aldıkları biyolojik süreçler ve sinyal yolları, moleküler işlevlerine göre sınıflandırılmıştır. Genlerin ait oldukları sinyal yollarına göre, ekspresyonlarına ait ısı haritası (*Heatmap*), *MORPHEUS* yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.5. İstatistiksel Değerlendirme

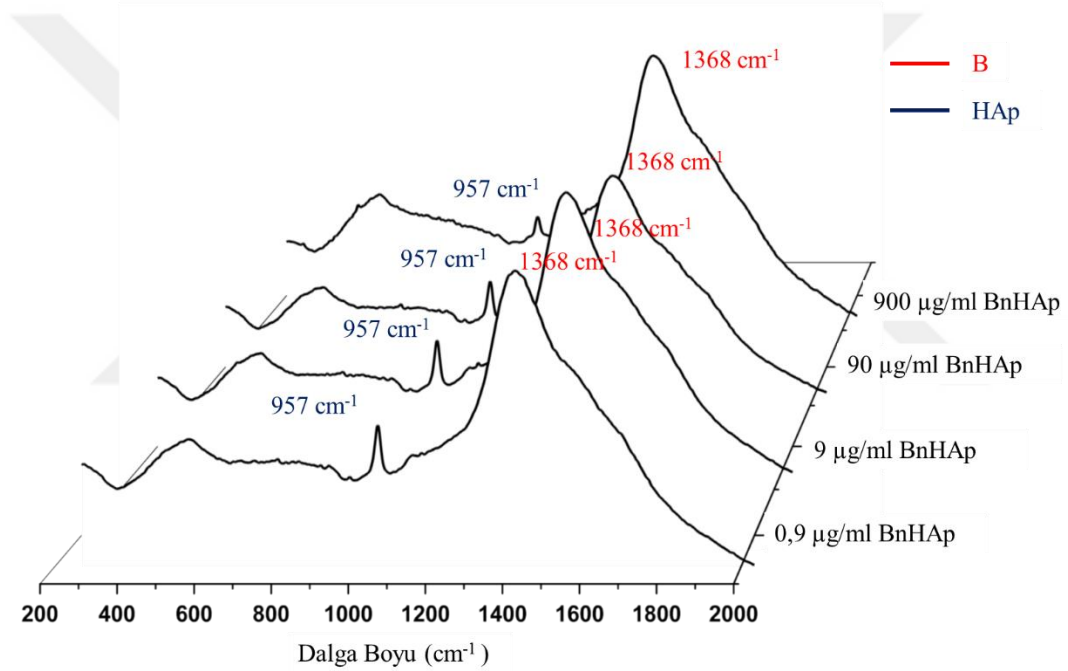
Tüm iş paketlerinden elde edilen verilerin normal dağılım gösterip göstermedikleri Shapiro Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Hücrelerin çoğalma ve farklılaşma profillerinin incelendiği 2.2 ve 2.3 numaralı iş paketlerine ait deney çıktılarının verileri parametrik test varsayımlarını sağlamaktadır. Bu nedenle üçten fazla bağımsız grubun karşılaştırılmasında üç yönlü varyans analizi, ikili grupların karşılaştırılması Bonferroni yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Borun salım profilinin incelendiği 2.1 iş paketine ait veriler normal dağılım göstermemeleri, parametrik test koşullarını sağlamaması ve değişkenlerin bağımlı olması nedeniyle çoklu karşılaştırma Friedman yöntemi ile ikili karşılaştırmalar Wilcoxon yöntemiyle değerlendirilmiştir. Transkriptom verileri *PANTHER* ve *MORPHEUS* araçlarının biyoinformatik eklentileri ile değerlendirilmiştir. Transkriptom analizleri dışındaki iş paketlerinden elde edilen verilerin değerlendirmesinde *IBM SPSS Statistics* programının 25. sürümü kullanılmıştır. Yüzde doksan beşlik güven aralığında çalışılmıştır. Tanımsal istatistikler parametrik veriler için ortalama ve standart sapma; parametrik olmayanlar için ortanca minimum ve maksimum değerleri ile gösterilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Bor İçeren nHAp Kompozitlerden B'un Kontrollü Salım Profilinin Değerlendirilmesi

3.1.1. Bor içeren nHAp Kompozitlerin Raman Spektroskopi Yöntemi ile Karakterizasyonu

Bor içeren nHAp kompozitlerin Raman mikroskobu ile karakterizasyonunda; B'a ait 1368 cm^{-1} ve nHAp'e ait 957 cm^{-1} dalga boyunda pikler elde edilmiştir. Raman mikroskobu ile elde edilen bulgular Şekil 3.1'de verilmektedir. Buna göre B içeren nHAp kompozitin $0,9 - 900\text{ }\mu\text{g/ml}$ doz aralığında B ve HAp pikleri elde edilmiştir.

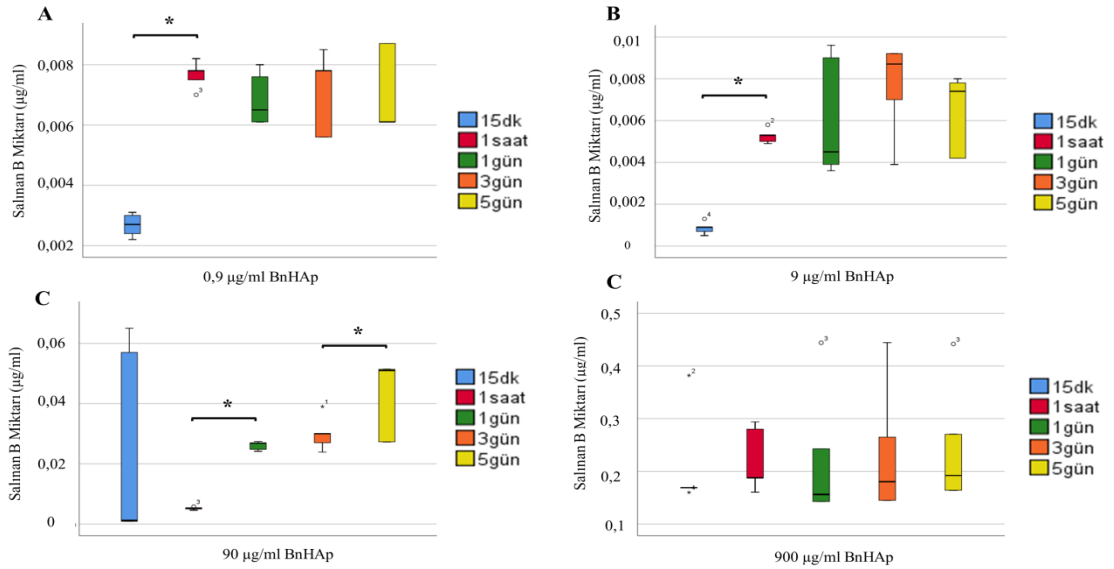


Şekil 3.1. BnHAp kompozitlerin $0,9\text{ }\mu\text{g/ml}$, $9\text{ }\mu\text{g/ml}$, $90\text{ }\mu\text{g/ml}$ ve $900\text{ }\mu\text{g/ml}$ dozlarının Raman spektroskopi yöntemi ile elde edilen HAp ve B pikleri gösterilmiştir.

3.1.2. Bor İçeren nHAp Kompozitten Salınan B Miktarının ICP-MS Yöntemi ile Saptanması

Farklı dozlarda B İçeren nHAp kompozitlerden salınan B miktarının ICP-MS Yöntemi ile zaman içinde değişen derecelerde artış gösterdiği izlenmiştir. Buna göre 0,9 µg/ml ve 9 µg/ml dozlardaki BnHAp kompozitten 1. saatte salınan B'un, 15. dakikaya göre anlamlı biçimde yüksek olduğu ($p=0,043$ ve $p=0,043$), 1. saatten itibaren 5. güne kadar salımın sabitlendiği saptanmıştır (Şekil 3.2 (A)-(B)). Diğer yandan 90 µg/ml dozda BnHAp kompozitten salınan B, 1. saatten itibaren 1. güne kadar ve 1 ile 5. günde anlamlı olarak artmaktadır ($p=0,042$ ve $p=0,043$; Şekil 3.2 (C)). 900 µg/ml dozda B içeren BnHAp kompozitten salım zaman içinde dereceli olarak artmakta ancak, bu artış istatistiksel olarak anlamlılık göstermemektedir (Şekil 3.2 (D)). Farklı dozlarda B içeren nHAp kompozitlerden salınan B miktarının zamana bağlı salımına ait tanımsal istatistikler Şekil 3.2'de verilmiştir. Buna göre B'un, nHAp kompozitlerin perferinden, ilk 15 dk ile 1 saat içinde yüksek miktarda salındığı, daha sonra nHAp'in çözünme hızına bağlı genellikle daha yavaş salım gösterdiği saptanmıştır.

Bundan sonraki deney paketlerinde Gereç ve Yöntem bölümünde detaylı olarak anlatıldığı gibi BnHAp kompozitlerden salınan B miktarına karşılık gelen BA dozları sırasıyla 0,006 µg/ml, 0,06 µg/ml, 0,6 µg/ml ve 6 µg/ml olarak hesaplanmış ve deney setlerine eklenmiştir.

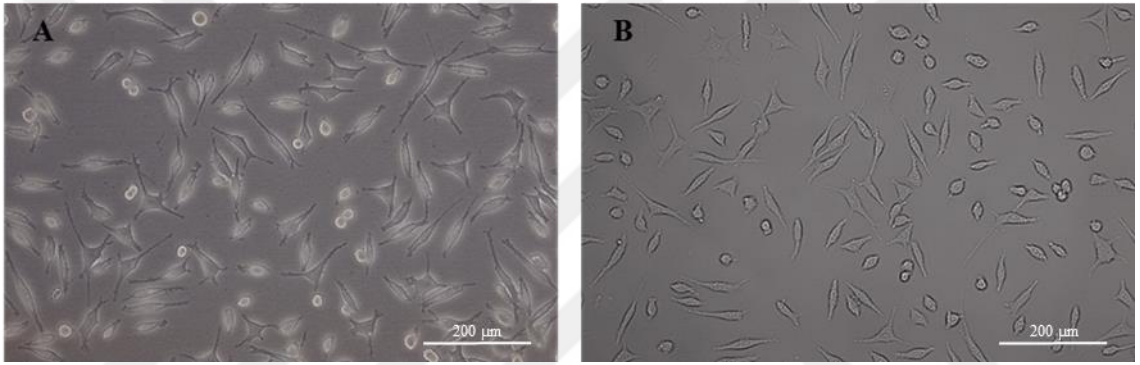


Şekil 3.2. Bor içeren nHAp kompozitlerin (A) 0,9 µg/ml, (B) 9 µg/ml, (C) 90 µg/ml ve (D) 900 µg/ml dozundan salınan B miktarının ICP-MS ile saptanan verilerinin kutu-çizgi grafiği gösterilmiştir. Tüm gruplar için n=5, (*) $p<0.05$.

3.2. Borik asit, nHAp ve BnHAp Kompozitlerin SaOS-2 İnsan Osteosarkom Hücre Hattı ve Kemik İliği Kaynaklı Primer MKH'lerin Proliferasyon Profillerine Doz Bağımlı Etkisinin Değerlendirilmesi

3.2.1. İnsan Osteosarkom SaOS-2 ve Kemik İliği Kaynaklı Primer Mezenkimal Kök Hücrelerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu

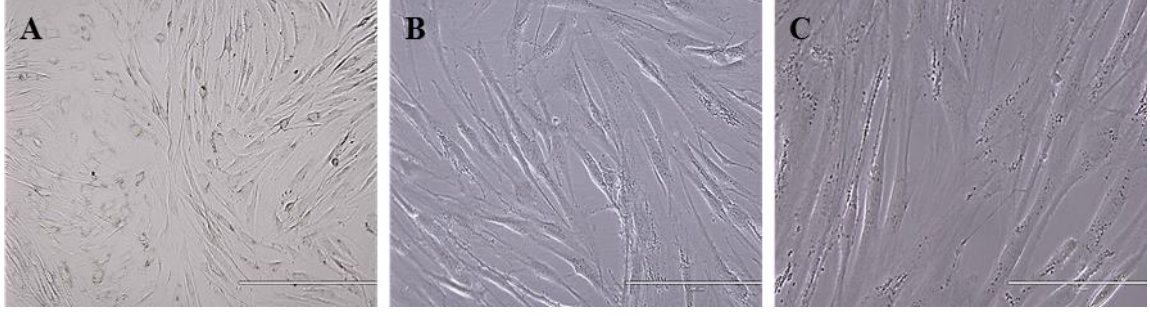
Osteosarkom SaOS-2 hücreleri; başarılı bir biçimde kültüre edilmiş, sayımı gerçekleştirilmiş ve amacı doğrultusunda gerekli iş paketlerinde kullanılmıştır. **Hücrelerin mikroskopik değerlendirmesinde** hücrelerin plastik kültür kaplarına adezyon gösterdikleri ve beklendiği üzere mekik biçimli morfolojiye sahip oldukları gözlenmiştir. Üretilen SaOS-2 hücrelerine ait faz kontrast mikroskop görüntüleri Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3. SaOS-2 osteoblast hücreleri kültür plağına yapışık, oval biçimli olarak izlenmektedir x200.

Mezenkimal kök hücreler; kültüre edilmiş, sayımı gerçekleştirilmiş ve amacı doğrultusunda gerekli deneylerde kullanılmıştır.

Mezenkimal kök hücreler; kültüre edilmiş, sayımları gerçekleştirilmiş ve amacı doğrultusunda gerekli iş paketlerinde kullanılmıştır. **Mezenkimal kök hücrelerin mikroskopik karakterizasyonunda;** beklendiği üzere plastik kültür kaplarına yapıştıkları ve ve iğsi görüntüye sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 5. pasajda kültür plağına tutundukları görülmektedir, (A) x100; (B) x200; (C) x400.

Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma değerlendirmeleri;

Osteojenik farklılaştırma; deneylerinde osteojenik farklılaştırma besiyeri uygulanan MKH'lerin osteojenik farklılaşmaları büyüme besiyeri uygulanan MKH'lerden anlamlı biçimde yüksek olarak saptanmıştır ($p=0,001$; Şekil 3.1).

Tablo 3.1. Mezenkimal kök hücrelerin 5. pasajda 21. gündeki osteojenik farklılaşmasına ait tanımsal veriler görülmektedir.

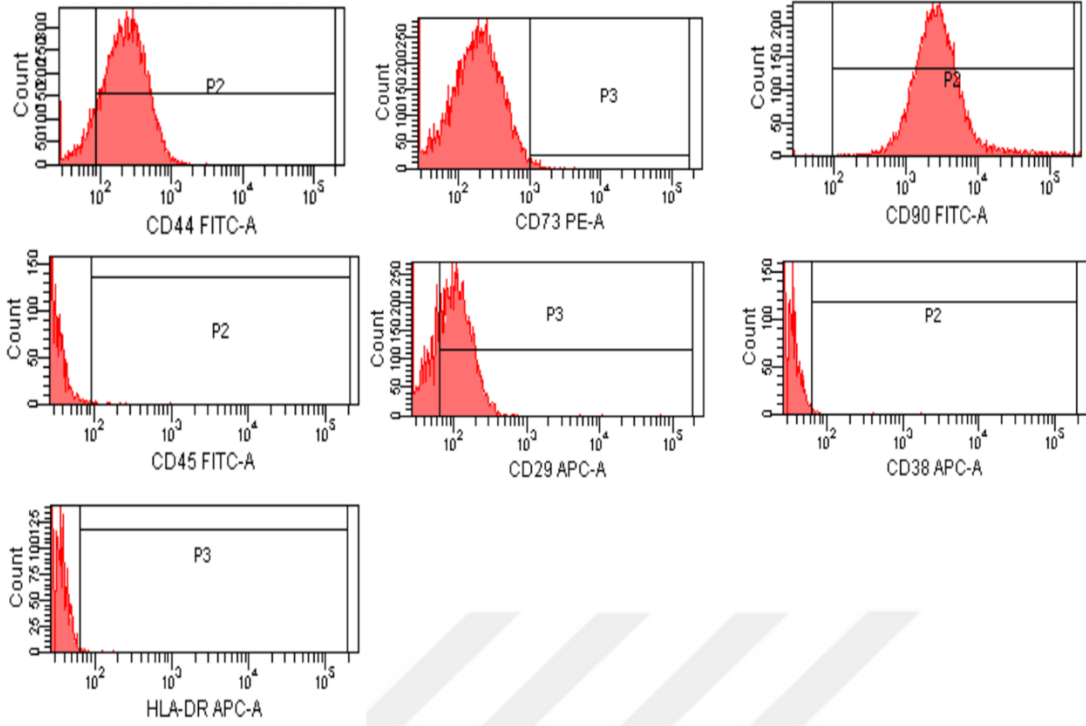
Deney Grupları	Ölçülen Optik Yoğunluk Değeri (Ortalama±Standart Sapma, O.D.)	Zaman	Tekrar Sayısı
Osteojenik farklılaşma besiyeri uygulanan MKH	3,3155±0,3581	21 gün	6
Büyüme besiyeri uygulanan MKH	1,5018±0,1346		

Kondrojenik farklılaştırma; deneylerinde kondrojenik farklılaştırma besiyeri uygulanan MKH'lerin SOX9 ve COMP gen ekspresyon seviyeleri büyüme besiyeri uygulanan MKH'lerden yüksek bulunmuştur fakat anlamlı fark saptanamamıştır (Sırasıyla $p=0,145$, $p=0,422$; Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Mezenkimal kök hücrelerin 5. pasajda 7. günde kondrojenik farklılaştırma gen ekspresyon seviyelerinin tanımsal verileri gösterilmiştir.

Kondrojenik Farklılaşma Belirteci	Deney Grupları	Ölçülen Ekspresyon Değeri (Ortalama±Standart Sapma)	Zaman	Tekrar Sayısı
SOX9	Kondrojenik farklılaşma besiyeri uygulanan MKH	1,45±0,08	7 gün	3
	Büyüme besiyeri uygulanan MKH	0,27±0,03		
COMP	Kondrojenik farklılaşma besiyeri uygulanan MKH	2,42±0,41		
	Büyüme besiyeri uygulanan MKH	0,27±0,03		

Mezenkimal kök hücrelerin yüzey belirteçlerinin akım sitometrisi yöntemi ile değerlendirmesi; işaretlenen 5. pasaj MKH'lerin CD38, HLA-DR, CD45 yüzey belirteçlerini çok düşük oranda bulundurduğu ve CD29, CD44, CD73 ve CD90 yüzey belirteçlerini çok yüksek oranda bulundurduğu ettiği saptanmıştır (Şekil 3.5). Bu yüzey profili, yukarıdaki diğer kriterlerle beraber MKH'lerin köklülük özelliğini teyid etmekte ve deneylerde güvenli olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

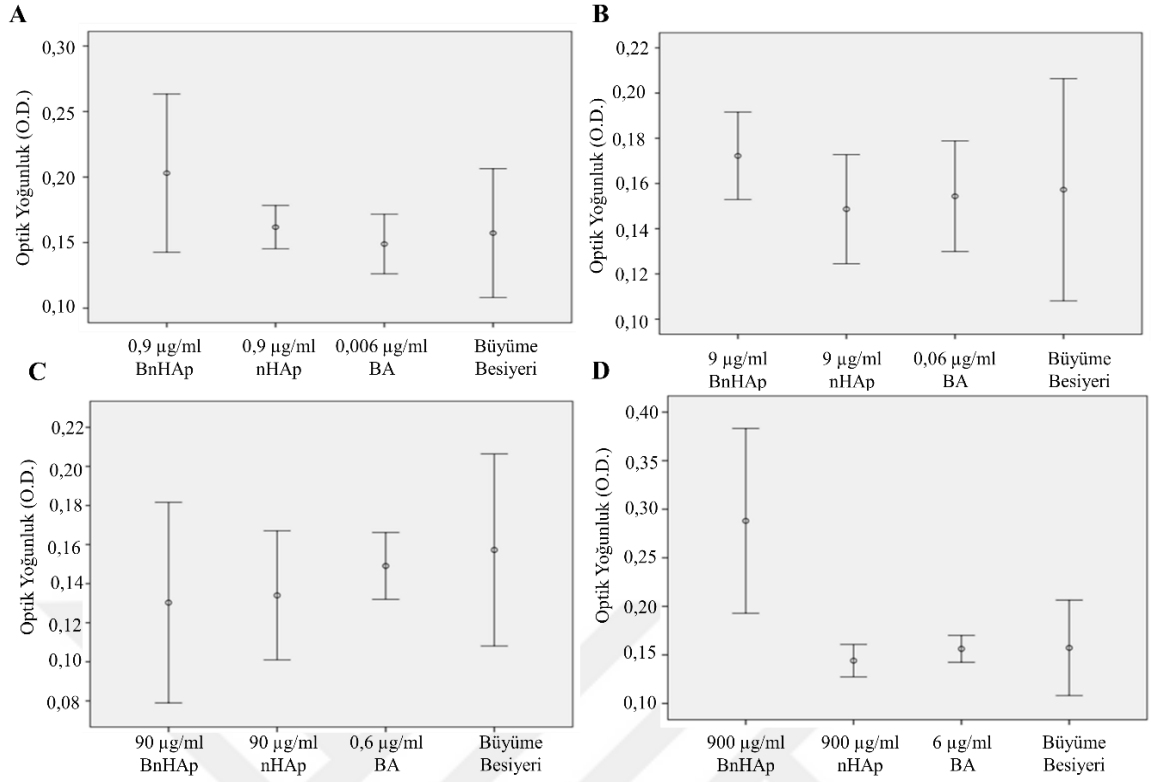


Şekil 3.5. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 5. pasajda akım sitometrisinde bulundurduğu yüzey belirteçlerine ait histogramlar gösterilmektedir.

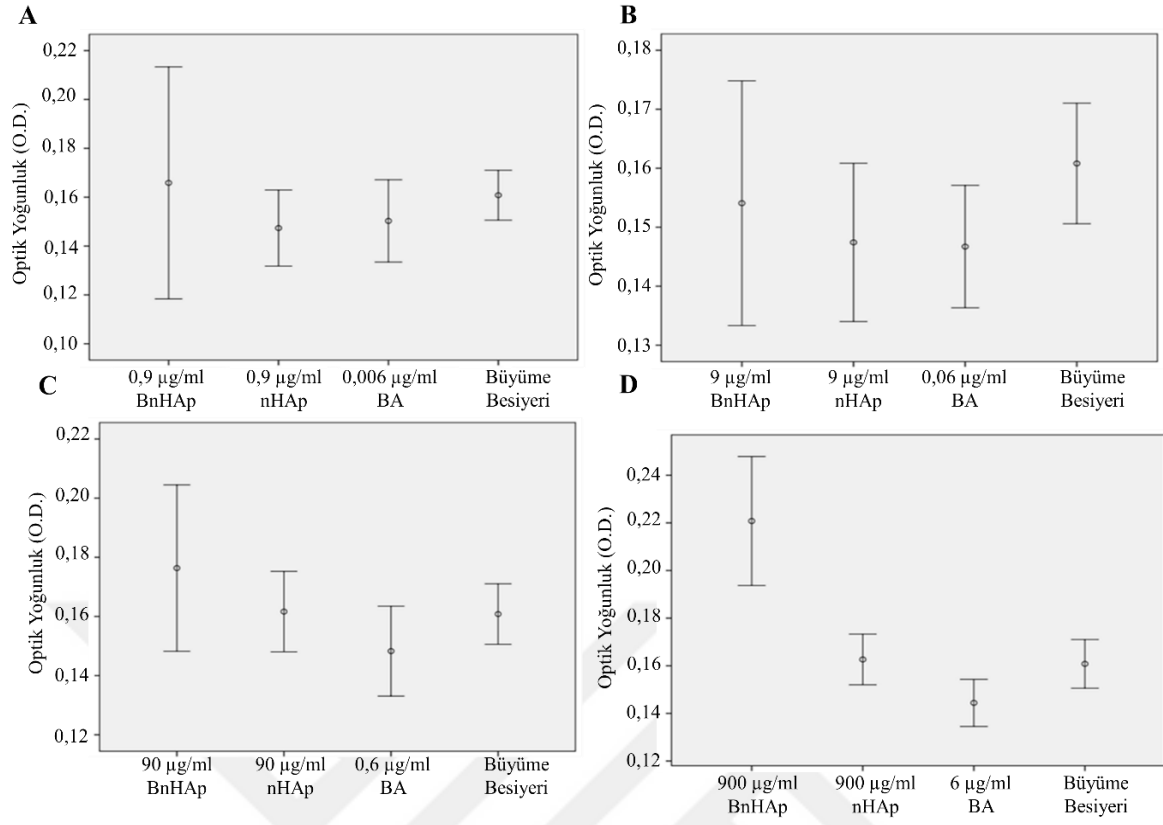
Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu kapsamında yapılan değerlendirmeler, üretimi gerçekleştirilen ve deneylerde kullanılan hücrelerin MKH'lerin karakteristik özelliklerini taşıdığını ve kök hücre olduğunu kanıtlamaktadır.

3.2.2. Hücre Proliferasyonunun *Water Soluble Tetrazolium-1* (WST-1) Tekniği ile Kantitatif Olarak Değerlendirilmesi

Osteosarkom SaOS-2 hücrelerinde 1 ve 3. günde; BnHAp, nHAp kompozit ve BA uygulanan gruplar ile biyomalzeme uygulanmamış kontrol grubunun proliferasyon oranları birbirine benzer şekilde izlenmiştir. Buna göre 0,006- 6 µg/ml doz aralığında uygulanan BA, ilaç uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, insan kökenli SaOS-2 osteoblastların proliferasyon oranlarını etkilememiştir (Şekil 3.6, Şekil 3.7). Bu zaman diliminde, farklı dozlarda uygulanan BnHAp kompozitler, diğer gruplara göre hafif bir proliferasyon artışına neden olsa da, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

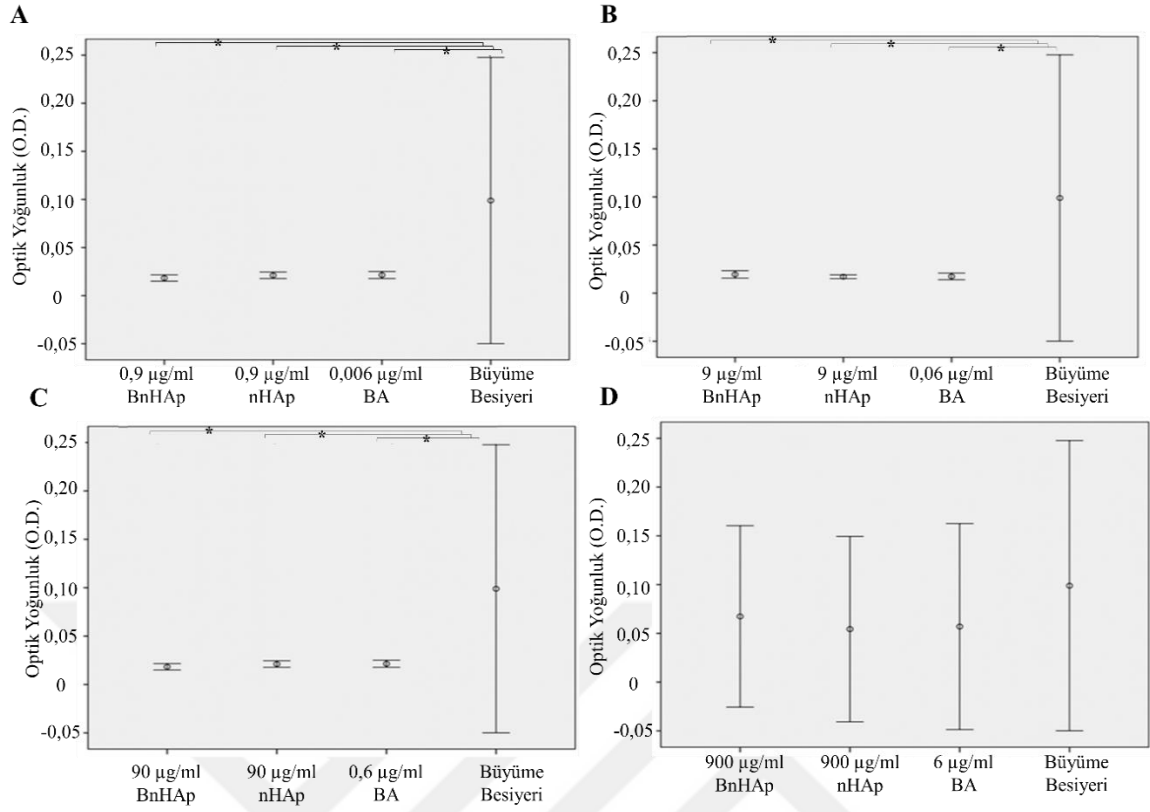


Şekil 3.6. Osteosarkom SaOS-2 hücrelerinin 1. gün yapılan proliferasyon değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri gösterilmektedir. BnHAp, nHAp kompozitler ve BA'ın sırasıyla **(A)** 0,9 µg/ml, 0,9 µg/ml ve 0,006 µg/ml dozu; **(B)** 9 µg/ml, 9 µg/ml ve 0,06 µg/ml dozu; **(C)** 90 µg/ml, 90 µg/ml ve 0,6 µg/ml dozu; **(D)** 900 µg/ml, 900 µg/ml ve 6 µg/ml dozu ile karşılaştırılmaktadır. Tüm deney grupları n=14, kontrol n=16.



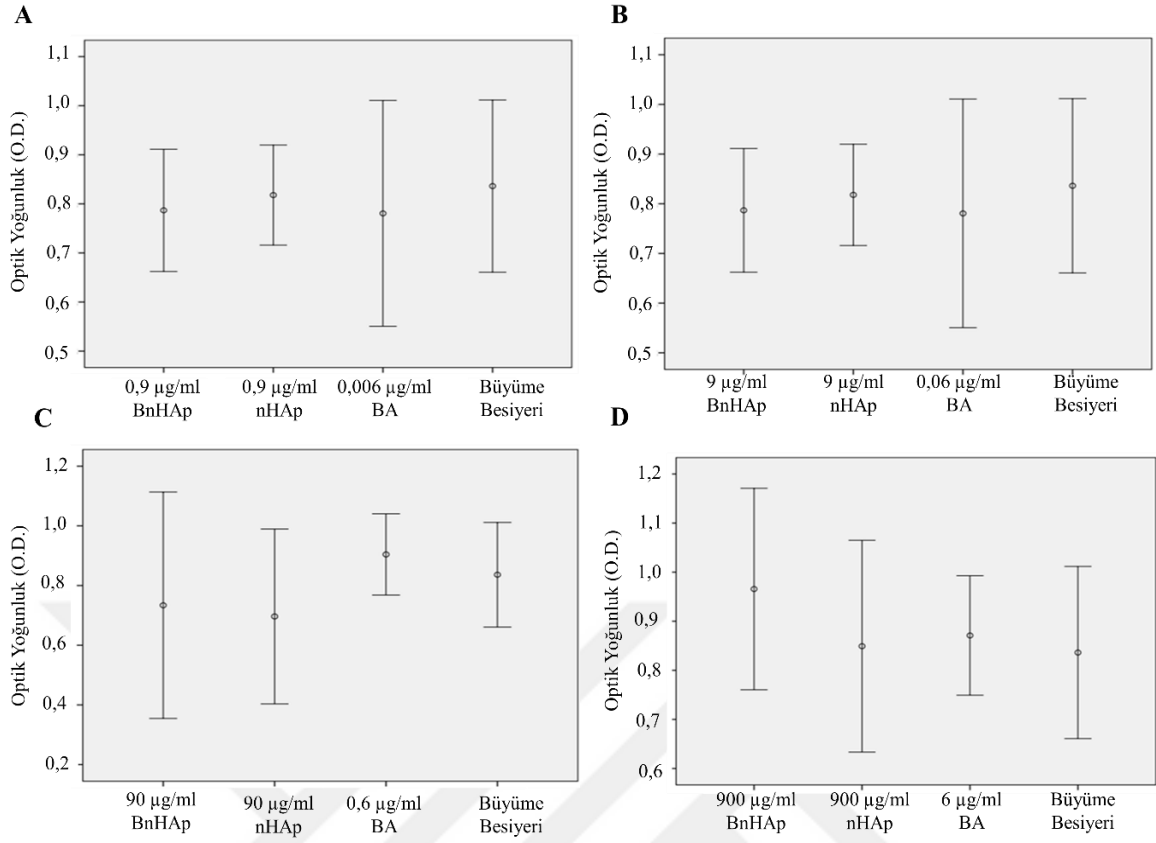
Şekil 3.7. Osteosarkom SaOS-2 hücrelerinin 3. gün yapılan proliferasyon değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri gösterilmektedir. BnHAp, nHAp kompozitler ve BA'nın sırasıyla **(A)** 0,9 µg/ml, 0,9 µg/ml ve 0,006 µg/ml dozu; **(B)** 9 µg/ml, 9 µg/ml ve 0,06 µg/ml dozu; **(C)** 90 µg/ml, 90 µg/ml ve 0,6 µg/ml dozu; **(D)** 900 µg/ml, 900 µg/ml ve 6 µg/ml dozu ile karşılaştırılmaktadır. Tüm deney grupları n=14, kontrol n=16.

Beşinci günde, 0,9 µg/ml ve 9 µg/ml dozunda BnHAp, nHAp kompozit ve 0,006 µg/ml ve 0,06 µg/ml dozunda uygulanan BA SaOS-2 hücrelerinin proliferasyonunu kontrole göre anlamlı biçimde azaltmaktadır (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,001$; Şekil 3.8 (A) –(B)). Buna karşın BnHAp, nHAp kompozitlerin 90 µg/ml ve 900 µg/ml dozlarıyla, doğrudan uygulanan 0,6 µg/ml, 6 µg/ml dozda BA SaOS-2 hücre proliferasyon profilini anlamlı şekilde değiştirmemektedir (sırasıyla Şekil 3.8 (C)–(D)).



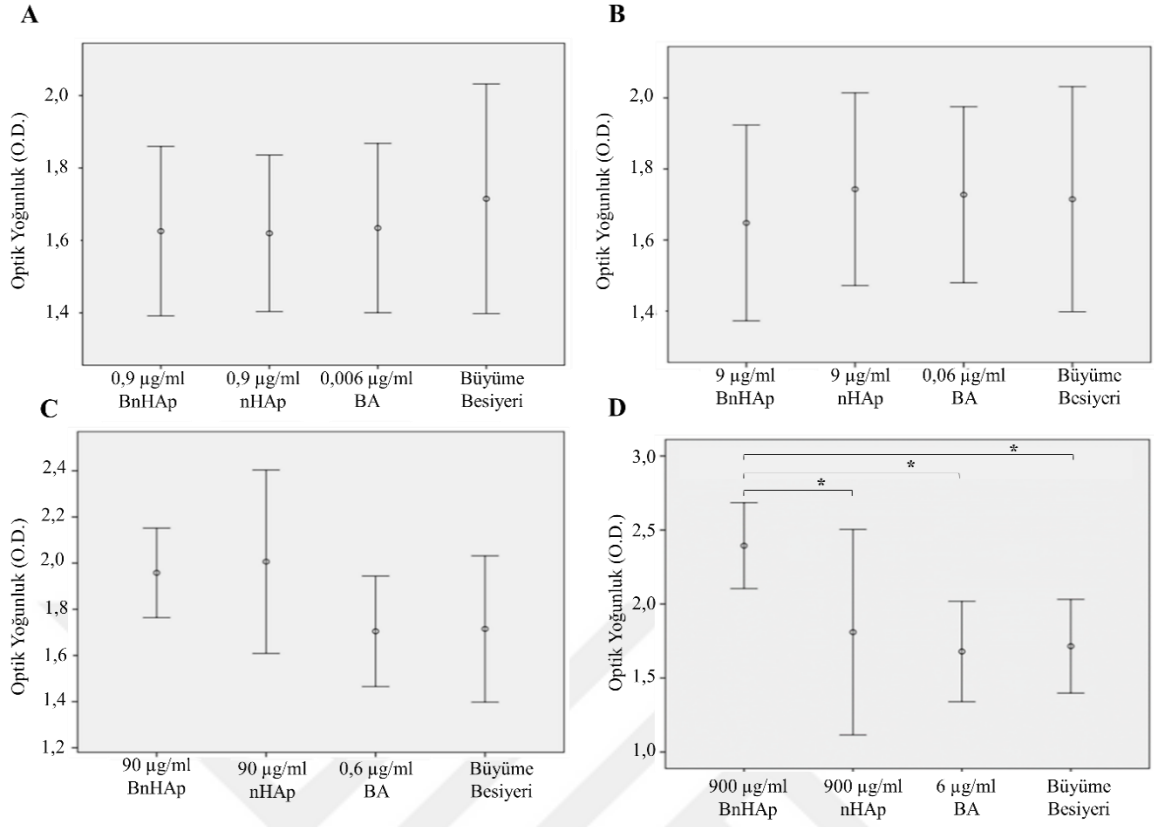
Şekil 3.8. Osteosarkom SaOS-2 hücrelerinin 5. gün yapılan proliferasyon değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri gösterilmektedir. BnHAp, nHAp kompozitler ve BA'ın sırasıyla **(A)** 0,9 µg/ml, 0,9 µg/ml ve 0,006 µg/ml dozu; **(B)** 9 µg/ml, 9 µg/ml ve 0,06 µg/ml dozu; **(C)** 90 µg/ml, 90 µg/ml ve 0,6 µg/ml dozu; **(D)** 900 µg/ml, 900 µg/ml ve 6 µg/ml dozu ile karşılaştırılmaktadır. Tüm deney grupları n=14, kontrol n=16.

Mezenkimal kök hücrelerin birinci günde, Şekil 3.9'da gösterildiği gibi deney grupları BnHAp, HAp kompozit ve BA uygulanan ile biyomalzeme uygulanmamış kontrol grubunun karşılaştırıldığında proliferasyon profilini etkilemediği gözlenmiştir.



Şekil 3.9. Mezenkimal kök hücrelerin 1. gün gerçekleştirilen proliferasyon değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri gösterilmektedir. BnHAp, nHAp kompozitler ve BA'nın sırasıyla **(A)** 0,9 µg/ml, 0,9 µg/ml ve 0,006 µg/ml dozu; **(B)** 9 µg/ml, 9 µg/ml ve 0,06 µg/ml dozu; **(C)** 90 µg/ml, 90 µg/ml ve 0,6 µg/ml dozu; **(D)** 900 µg/ml, 900 µg/ml ve 6 µg/ml dozu ile karşılaştırılmaktadır. Tüm deney grupları n=21, kontrol n=24.

Üçüncü günde, 900 µg/ml BnHAp, nHAp kompozit ile doğrudan uygulanan 0,006 µg/ml ve 6 µg/ml BA MKH'lerde kontrol grubuna göre proliferasyonu anlamlı şekilde arttırmıştır (sırasıyla p=0,001, p=0,001, p=0,0001; Şekil 3.10 (D)). Kompozitlerin 0,9 µg/ml, 9 µg/ml ve 90 µg/ml dozu ve BA'nın 0,006 µg/ml, 0,06 µg/ml ve 0,6 µg/ml dozu MKH'lerin proliferasyon profilini etkilememiştir (Şekil 3.10 (A)-(C)).

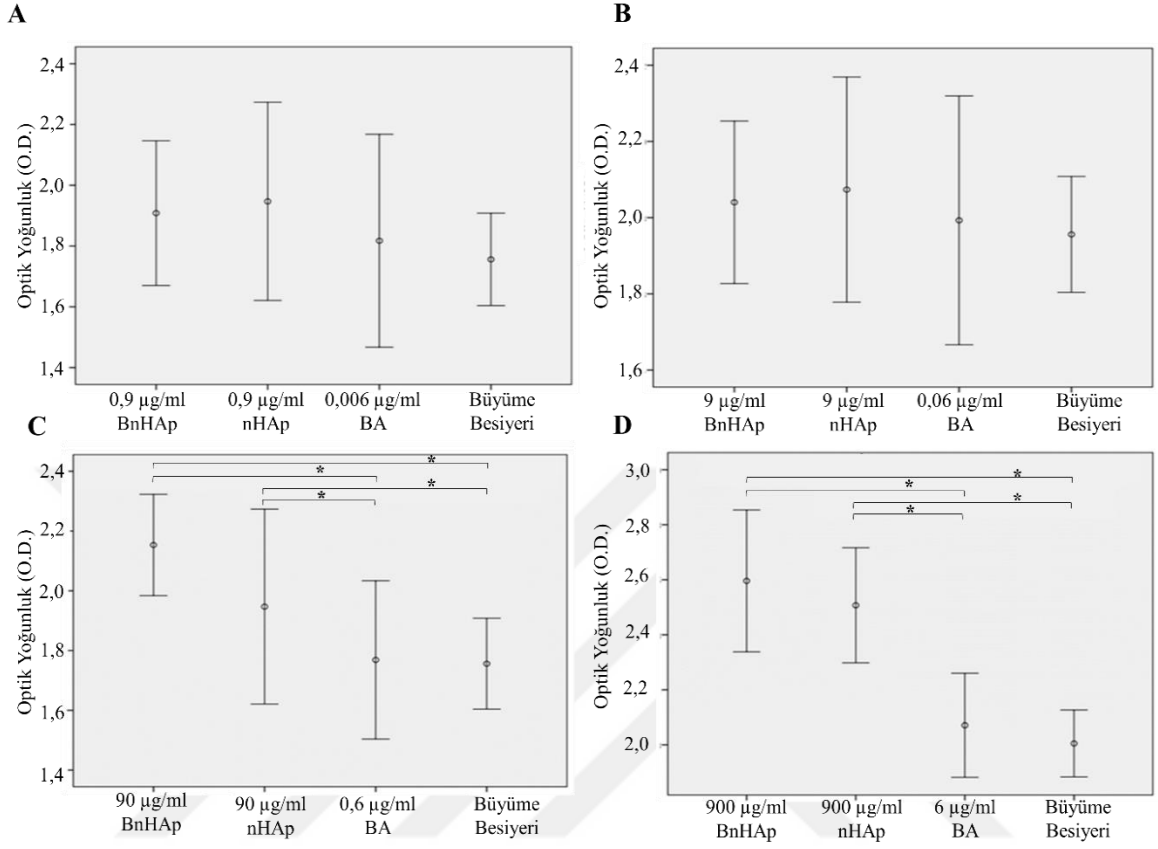


Şekil 3.10. Mezenkimal kök hücrelerin 3. gün gerçekleştirilen proliferasyon değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri gösterilmektedir. BnHAp, nHAp kompozitler ve BA'nın sırasıyla **(A)** 0,9 µg/ml, 0,9 µg/ml ve 0,006 µg/ml dozu; **(B)** 9 µg/ml, 9 µg/ml ve 0,06 µg/ml dozu; **(C)** 90 µg/ml, 90 µg/ml ve 0,6 µg/ml dozu; **(D)** 900 µg/ml, 900 µg/ml ve 6 µg/ml dozu ile karşılaştırılmaktadır. Tüm deney grupları n=21, kontrol n=24; (*) p<0.05.

Beşinci günde, 90 µg/ml dozda BnHAp kompozit uygulanan MKH'ler, 0,6 µg/ml BA uygulananlar ve kontrol grubuna göre daha fazla proliferasyon olmuştur (sırasıyla p=0,045 ve p=0,018; Şekil 3.11 (C)). Aynı dozda uygulanan nHAp kompozit ile karşılaştırıldığında 90 µg/ml dozda BnHAp kompozit uygulanan MKH proliferasyonunda anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 3.11 (C)).

Bor içeren nHAp kompozit 900 µg/ml dozda, 6 µg/ml dozda uygulanan BA ve ilaç uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında proliferasyon BnHAp kompozit uygulanan hücrelerde anlamlı olarak arttırmıştır. (sırasıyla p=0,001 ve p=0,001; Şekil 3.11 (D)). Hidroksiapatit kompozitlerin aynı dozu ile BnHAp arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 3.11 (D)). Beşinci günde, MKH'lere uygulanan 0,9 µg/ml, 9 µg/ml

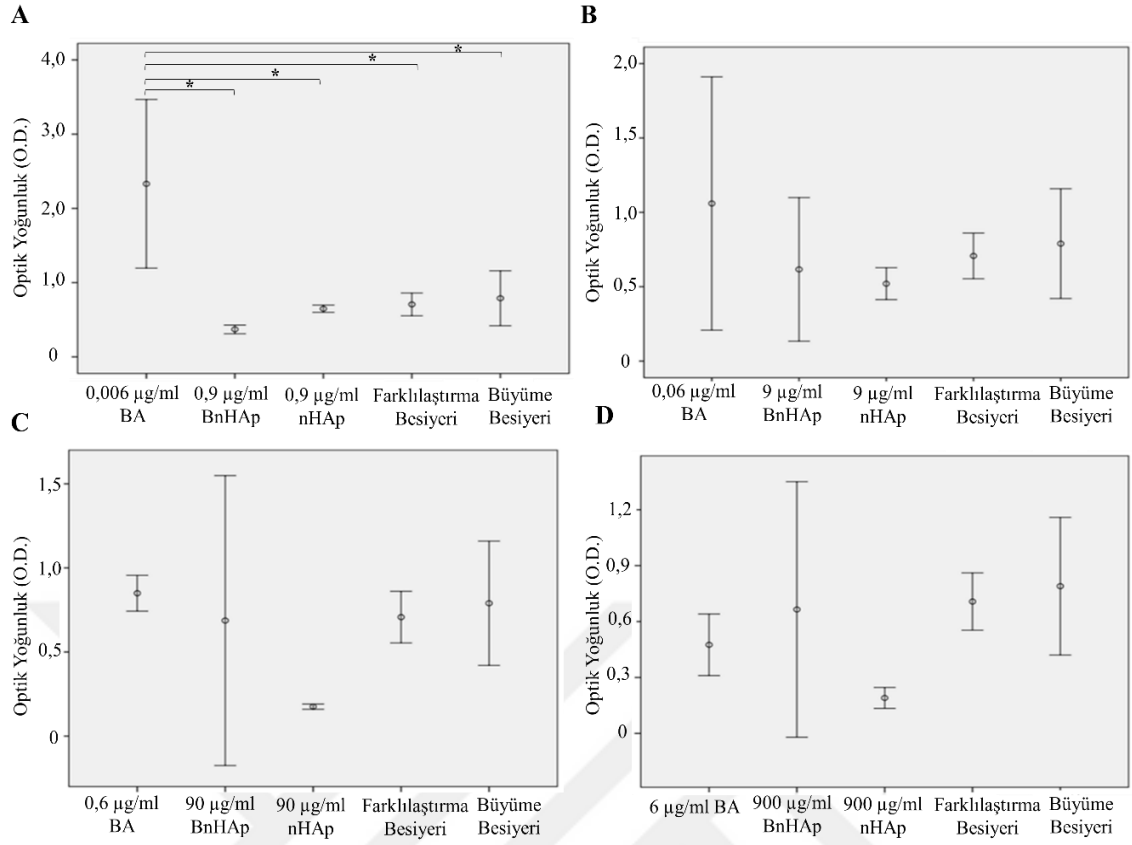
dozunda BnHAp ve HAp kompozit ve 0,006 µg/ml, 0,06 µg/ml, 0,6 µg/ml ve 6 µg/ml dozunda BA'ın hücrelerin proliferasyonunu etkilemediği gözlenmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Mezenkimal kök hücrelerin 5. gün gerçekleştirilen proliferasyon değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri gösterilmektedir. BnHAp, nHAp kompozitler ve BA'ın sırasıyla **(A)** 0,9 µg/ml, 0,9 µg/ml ve 0,006 µg/ml dozu; **(B)** 9 µg/ml, 9 µg/ml ve 0,06 µg/ml dozu; **(C)** 90 µg/ml, 90 µg/ml ve 0,6 µg/ml dozu; **(D)** 900 µg/ml, 900 µg/ml ve 6 µg/ml dozu ile karşılaştırılmaktadır. Tüm deney grupları n=21, kontrol n=24; (*) p<0.05.

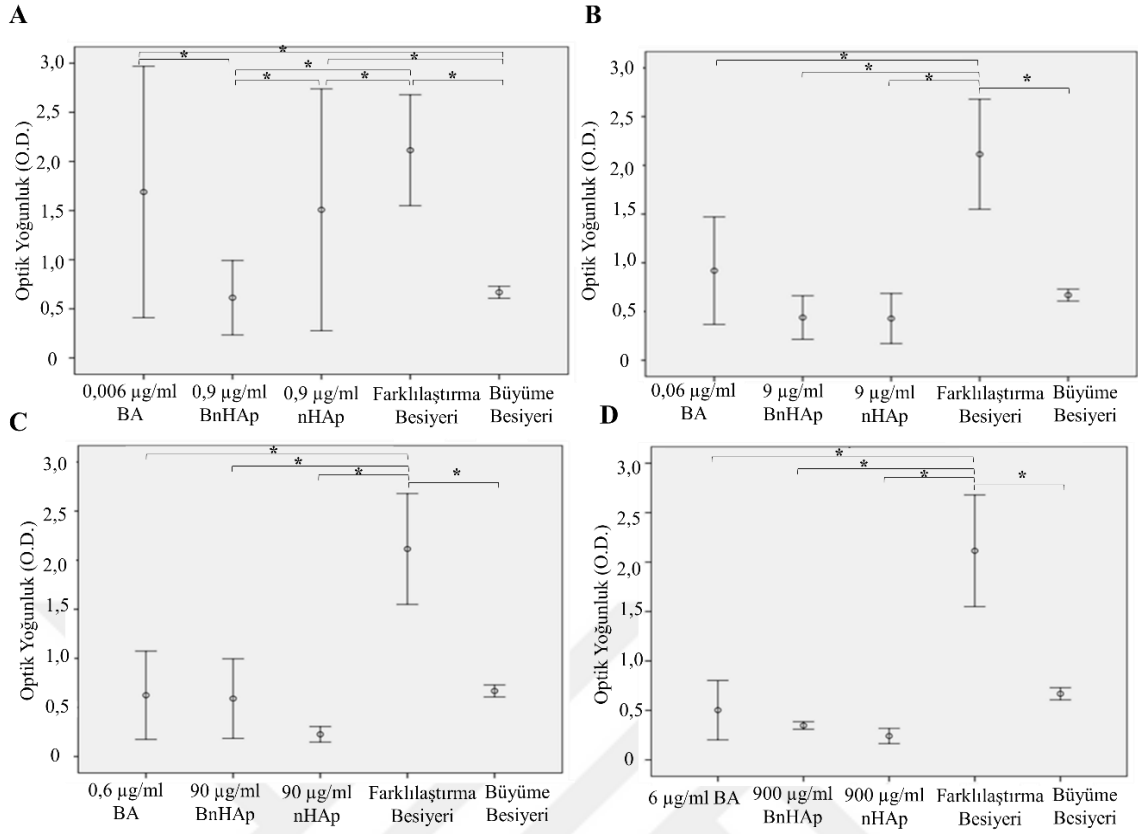
3.3. Borik asit, nHAp ve BnHAp Kompozitler İnsan Kemik İliği Kökenli Primer MKH'lerin Osteojenik Farklılaşmasının Hücre İçi Alkalen Fosfataz Aktivitesinin Ölçümü Tekniği ile Değerlendirilmesi

Yedinci günde; BnHAp ve nHAp kompozit uygulanan hücrelerde osteojenik farklılaşma benzer olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.12). Hücrelere doğrudan uygulanan 0,006 µg/ml BA, osteojenik farklılaşmayı diğer tüm deney grupları ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttırmıştır (p=0,001; Şekil 3.12 (A)).



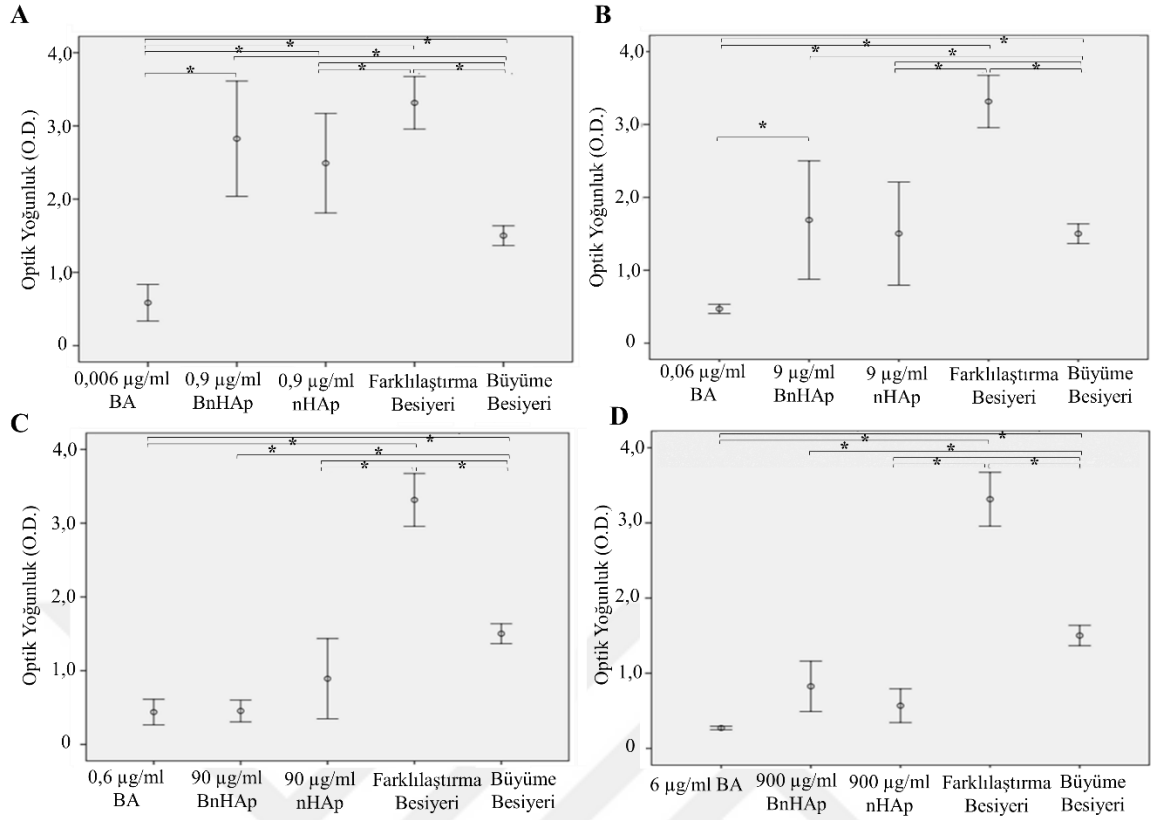
Şekil 3.12. Mezenkimal kök hücrelerin 7. günde ALP aktivitesi değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri verilmiştir gösterilmektedir. BnHAp, nHAp kompozitler ve BA'ın sırasıyla **(A)** 0,9 µg/ml, 0,9 µg/ml ve 0,006 µg/ml dozu; **(B)** 9 µg/ml, 9 µg/ml ve 0,06 µg/ml dozu; **(C)** 90 µg/ml, 90 µg/ml ve 0,6 µg/ml dozu; **(D)** 900 µg/ml, 900 µg/ml ve 6 µg/ml dozu ile karşılaştırılmaktadır. Tüm deney grupları n=6, kontrol n=6. (*) p<0.05.

On dördüncü günde; BnHAp ve HAp kompozitin 0,9 µg/ml, 9 µg/ml, 90 µg/ml ve 900 µg/ml dozu ve 0,006 µg/ml, 0,06 µg/ml, 0,6 µg/ml ve 6 µg/ml dozunda BA uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre osteojenik farklılaşmanın değişmediği gözlenmiştir (Şekil 3.13 (A)).



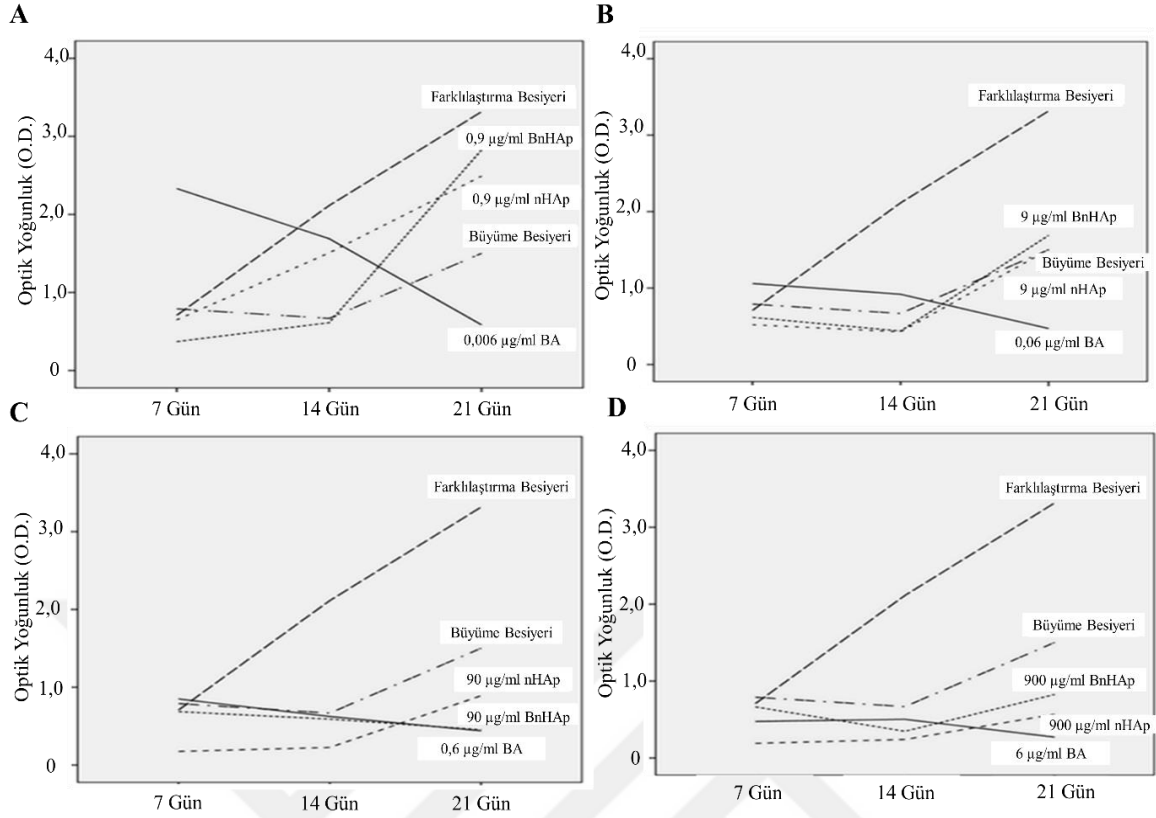
Şekil 3.13. Mezenkimal kök hücrelerin 14. günde ALP aktivitesi değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri verilmiştir gösterilmektedir. BnHAp, nHAp kompozitler ve BA'ın sırasıyla **(A)** 0,9 µg/ml, 0,9 µg/ml ve 0,006 µg/ml dozu; **(B)** 9 µg/ml, 9 µg/ml ve 0,06 µg/ml dozu; **(C)** 90 µg/ml, 90 µg/ml ve 0,6 µg/ml dozu; **(D)** 900 µg/ml, 900 µg/ml ve 6 µg/ml dozu ile karşılaştırılmaktadır. Tüm deney grupları n=6, kontrol n=6. (*) p<0.05.

Yirmi birinci günde, BnHAp kompozit 0,9 µg/ml dozda MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını, doğrudan uygulanan 0,006 µg/ml BA'e göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırmıştır (Sırasıyla p=0,001 ve p=0,001; Şekil 3.14 (A)). BnHAp kompozitler 9 µg/ml, 90µg/ml ve 900 µg/ml dozda MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını anlamlı olarak değiştirmemektedir (Şekil 3.14 (B)-(D)).



Şekil 3.14. Mezenkimal kök hücrelerin 21. günde ALP aktivitesi değerlendirmesine ait optik yoğunluk (O.D.) değerlerinin ortalama-standart sapma grafikleri verilmiştir gösterilmektedir. BnHAp, nHAp kompozitler ve BA'nın sırasıyla **(A)** 0,9 µg/ml, 0,9 µg/ml ve 0,006 µg/ml dozu; **(B)** 9 µg/ml, 9 µg/ml ve 0,06 µg/ml dozu; **(C)** 90 µg/ml, 90 µg/ml ve 0,6 µg/ml dozu; **(D)** 900 µg/ml, 900 µg/ml ve 6 µg/ml dozu ile karşılaştırılmaktadır. Tüm deney grupları n=6, kontrol n=6. (*) p<0.05.

BnHAp, nHAp kompozitlerin ve BA'nın MKH'lerin ALP aktivitesindeki etkileri zamana göre değerlendirildiğinde; 0,9 µg/ml BnHAp kompozitlerle ALP etkinliğinin zaman içinde giderek arttığı (7. ve 14. gün karşılaştırması için p=0,001, 14. ve 21. gün karşılaştırması için p=0,001; Şekil 15 (A)) saptanmıştır. Buna karşın 9 µg/ml BnHAp ile ALP'nin 14. güne kadar anlamlı artmadığı, artışın 21. günde anlamlı olduğu izlenmiştir (p=0,001; Şekil 3.15 (B)). BnHAp 90 ve 900 µg/ml dozları zaman içinde ALP etkinliğini etkilememiştir (Şekil 3.15 (C)- (D)).

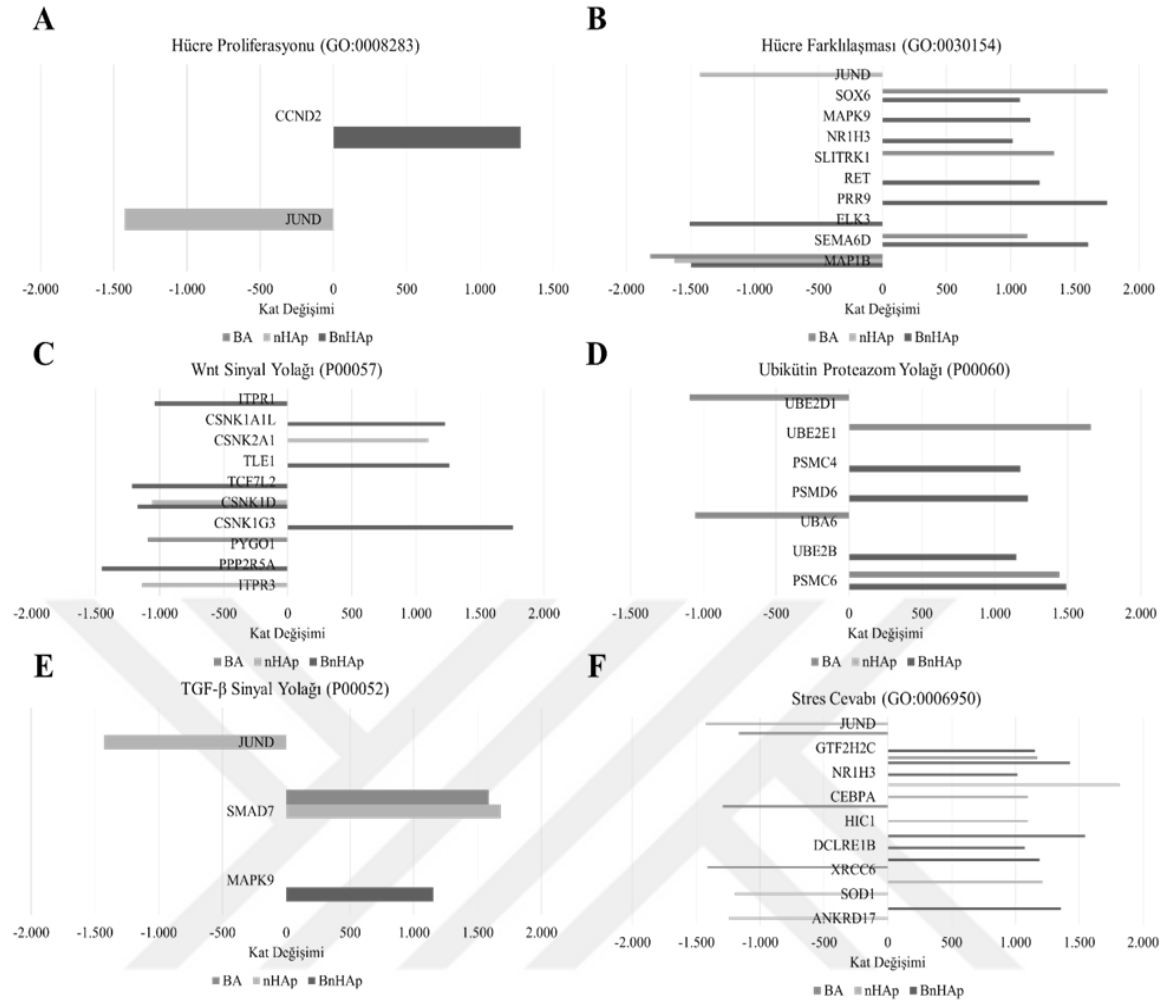


Şekil 3.15. Mezenkimal kök hücelere uygulanan biyomalzemelerin ALP aktivitesinin zaman bağımlı etki grafikleri verilmiştir. BnHAp, nHAp kompozitler ve BA'nın sırasıyla (A) 0,9 µg/ml, 0,9 µg/ml ve 0,006 µg/ml dozu; (B) 9 µg/ml, 9 µg/ml ve 0,06 µg/ml dozu; (C) 90 µg/ml, 90 µg/ml ve 0,6 µg/ml dozu; (D) 900 µg/ml, 900 µg/ml ve 6 µg/ml dozu ile karşılaştırılmaktadır. Tüm deney ve kontrol grupları n=6, (*) p<0.05.

3.4. Bor içeren nHAp Kompozitlerin Etkilediği Sinyal Yolaklarının Transkriptom Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Bor içeren nHAp, nHAp ve BA'nın SaOS-2 osteoblastik hücrelerin transkriptom profiline etkileri 1. günde incelenmiştir. Bor içeren nHAp, nHAp kompozit ve BA uygulanmış hücrelerin gen aktivasyonları biyomalzeme uygulanmamış hücreler ile karşılaştırılarak, anlamlı değişiklik gösteren gen ifadeleri ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Buna göre **1. günde 0,9 µg/ml BnHAp uygulanan grupta**, malzemesiz kontrol ile karşılaştırıldığında toplam 305 genin, **nHAp uygulanan** kontrol ile karşılaştırıldığında toplam 184 genin ve **BA uygulanan** kontrol ile karşılaştırıldığında toplam 213 genin ekspresyonlarında değişim gözlenmiştir. Değişim gözlenen gen ekspresyonları rol oynadıkları biyolojik süreçler ve görev aldıkları sinyal yollarına göre sınıflandırılmıştır (Şekil 3.16, 3.18, Tablo 3.4).



Şekil 3.16. Bor içeren nHAp, nHAp kompozitin 0,9 µg/ml ve BA'nın 0,006 µg/ml dozu uygulanan SaOS-2 hücrelerinde etkilenen genlerin sayıları ve etkili oldukları biyolojik süreçler gösterilmektedir. **(A)** Hücre proliferasyonu, **(B)** hücre farklılaşması, **(C)** Wnt sinyal yolağı, **(D)** ubikülin proteazom yolağında, **(E)** TGF-β sinyal yolağı, **(F)** stres cevabında etkili gen ekspresyonlarının kat değişimleri listelenmiştir.

Hücre proliferasyonunda rol oynayan genlerin ekspresyon seviyeleri *Gene Ontology* kütüphanesinde incelendiğinde, BnHAp kompozitin CCND2 gen ekspresyon seviyelerini arttırdığı, nHAp kompozitin JUND gen ekspresyon seviyesini azalttığı saptanmıştır. Borik asitin, uygulanan hücrelerde proliferasyonda etkili genlerin ekspresyon seviyelerini değiştirmedeği gözlenmiştir (Şekil 3.16. (A), 3.18, Tablo 3.4).

Hücre farklılaşmasında rol oynayan genlerin ekspresyon seviyeleri *Gene Ontology* kütüphanesinde incelendiğinde, BnHAp kompozitin SEMA6D, PRR9, RET, NR1H3, MAPK9 ve SOX6 gen ekspresyon seviyelerini arttırdığı, MAP1B ve ELK3 gen ekspresyon seviyelerini azalttığı, SLITRK1 ve JUND gen ekspresyon seviyelerini etkilemediği; nHAp

kompozitin MAP1B ve JUND gen ekspresyon seviyelerini azalttığı ve diğer gen ekspresyon seviyelerini etkilemediği; BA'ın SEMA6D, SLITRK1 ve SOX6 gen ekspresyon seviyelerini arttırdığı, MAP1B gen ekspresyon seviyesini azalttığı ve diğer gen ekspresyon seviyelerinde değişime neden olmadığı saptanmıştır (Şekil 3.16. (B), 3.18, Tablo 3.4).

Osteojenik farklılaşmada rol oynayan sinyal yolları *PANTHER* kütüphanesinde incelendiğinde **Wnt sinyal yolağına** ait gen ekspresyonlarını BnHAp kompozitin, HAp kompozitin 0,9 µg/ml ve 0,006 µg/ml dozda BA uygulanan hücrelerinkine göre arttırdığı saptanmıştır (Şekil 3.16, 3.18, Tablo 3.4). **BnHAp kompozit uygulanan** osteoblastlarda, biyomalzeme uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ITPR3, CSNK1G3, TLE1, CSNK1A1L genlerinin ekspresyonunda artma, PPP2R5A, CSNK1D, TCF7L2 ve ITPR1 genlerinin ekspresyonunda ise azalma saptanmış, CSNK2A1 ve PYGO1 gen ekspresyonunda değişim gözlenmemiştir. **Nanometre boyutunda HAp** kompozit uygulanan osteoblastlarda biyomalzeme uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CSNK2A1 gen ekspresyon seviyesinde artış; ITPR3 ve CSNK1D'de azalma saptanmış, CSNK1G3, TLE1, CSNK1A1L, PPP2R5A, , TCF7L2, ITPR1 ve PYGO1 gen ekspresyon seviyelerinde değişim gözlenmemiştir. **Borik asit** uygulanan osteoblastlarda biyomalzeme uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PYGO1 ekspresyon seviyesinde azalma saptanmış, diğer gen ekspresyon seviyelerinde değişim gözlenmemiştir (Şekil 3.16 (C), 3.18, Tablo 3.4). **TGF-β sinyal yolağına** ait genler incelendiğinde BnHAp kompozitin MAPK9 gen ekspresyonunu arttırdığı, SMAD7 ve JUND ekspresyon seviyelerini değiştirmedeği; nHAp kompozitin SMAD7 gen ekspresyon seviyesini arttırdığı, JUND ekspresyon seviyesini azalttığı ve MAPK9 ekspresyon seviyesini değiştirmedeği; BA'ın SMAD7 ekspresyon seviyesini arttırdığı, MAPK9 ve JUND ekspresyon seviyesini değiştirmedeği saptanmıştır (Şekil 3.16 (C), 3.18, Tablo 3.4).

Hücre stresinde rol oynayan sinyal yolları *PANTHER* ve *Gene Ontology* kütüphanesinde incelendiğinde ubiquitin proteazom yolağı ve stres cevabında rol oynayan gen ekspresyonlarında değişim gözlenmiştir. **Ubikütin proteazom yolağında** BnHAp kompozitin PSMC6, UBE2B, PSMD6 ve PSMC4 gen ekspresyonlarını arttırdığı, UBA6, UBE2E1 ve UBE2D1 gen ekspresyon seviyesini değiştirmedeği; nHAp kompozitin hiç bir genin ekspresyon seviyesini değiştirmedeği; BA'ın PSMC6 ve UBE2E1 gen ekspresyon seviyelerini arttırdığı, UBA6 ve UBE2D1 gen ekspresyon seviyelerini azalttığı, UBE2B, PSMD6 ve PSMC4 gen ekspresyon seviyelerinde değişime neden olmadığı saptanmıştır (Şekil 3.16 (D), 3.18, Tablo 3.4). **Strese karşı oluşan cevapta** BnHAp kompozit FIGN,

HSFX2, DCLRE1B, WTIP, NR1H3, STK35 ve GTF2H2C gen ekspresyon seviyelerini arttırdığı, diğer gen ekspresyon seviyelerini değiştirmedeği; nHAp kompozitin CCL7, HIC1, CEBPA ve PTGIR gen ekspresyon seviyelerini arttırdığı, ANKRD17, SOD1 ve JUND ekspresyon seviyelerini azalttığı, FIGN, XRCC6, HSFX2, DCLRE1B, WTIP, RFC5, NR1H3, STK35, GTF2H2C ve BLM’de değişime neden olmadığı; BA’in STK35’yi arttırdığı, XRCC6, RFC5 ve BLM’yi azalttığı, ANKRD17, FIGN, SOD1, CCL7, HSFX2, DCLRE1B, WTIP, HIC1, CEBPA, PTGIR, NR1H3, GTF2H2C ve JUND’de değişime neden olmadığı saptanmıştır (Şekil 3.16 (E)- (F), 3.18, Tablo 3.4).

Tablo 3.3. Bor içeren nHAp, nHAp kompozitin 0,9 µg/ml ve BA’in 0,006 µg/ml dozu uygulanan SaOS-2 hücrelerinde etkilenen gen ekspresyonlarının kat değişimleri ve bunların etkili olduğu biyolojik süreç ve yollar gösterilmektedir.

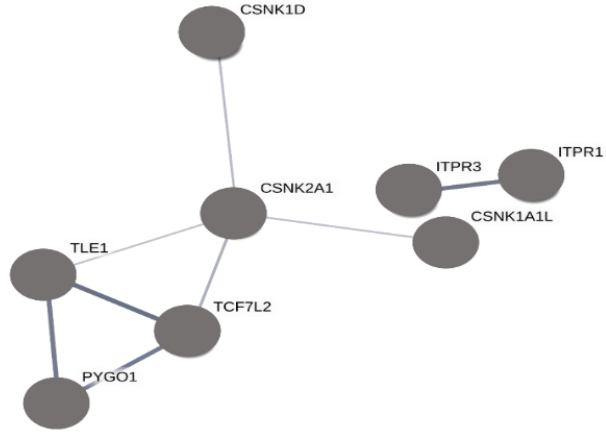
Biyolojik Süreç ve Sinyal Yolları	Gen	BnHAp Etkisinde Kat Değişimi	nHAp Etkisinde Kat Değişimi	BA Etkisinde Kat Değişimi
Hücre Proliferasyonu (GO:0008283)	JUND	-	-1.426	-
	CCND2	1.279	-	-
Hücre Farklılaşması (GO:0030154)	MAP1B	-1.496	-1.625	-1.814
	SEMA6D	1.605	-	1.131
	ELK3	-1.502	-	-
	PRR9	1.753	-	-
	RET	1.226	-	-
	SLITRK1	-	-	1.338
	NR1H3	1.015	-	-
	MAPK9	1.152	-	-
	SOX6	1.074	-	1.756
	JUND	-	-1.426	-

Wnt Sinyal Yolağı (P00057)	ITPR3	-	-1.137	-
	PPP2R5A	-1.452	-	-
	PYGO1	-	-	-1.092
	CSNK1G3	1.760	-	-
	CSNK1D	-1.172	-1.060	-
	TCF7L2	-1.214	-	-
	TLE1	1.262	-	-
	CSNK2A1	-	1.097	-
	CSNK1A1L	1.226	-	-
	ITPR1	-1.037	-	-
TGF- β Sinyal Yolağı (P00052)	MAPK9	1.152	-	-
	SMAD7	-	1.682	1.586
	JUND	-	-1.426	-
Ubiküitin Proteazom Yolağı (P00060)	PSMC6	1.489	-	1.444
	UBE2B	1.146	-	-
	UBA6	-	-	-1.055
	PSMD6	1.226	-	-
	PSMC4	1.174	-	-
	UBE2E1	-	-	1.658
	UBE2D1	-	-	-1.092
Stres Cevabı (GO:0006950)	ANKRD17	-	-1.245	-
	FIGN	1.356	-	-
	SOD1	-	-1.197	-
	CCL7	-	1.213	-
	XRCC6	-	-	-1.414
	HSFX2	1.191	-	-
	DCLRE1B	1.074	-	-
	WTIP	1.548	-	-
	HIC1	-	1.097	-
	RFC5	-	-	-1.293
	CEBPA	-	1.097	-
	PTGIR	-	1.820	-

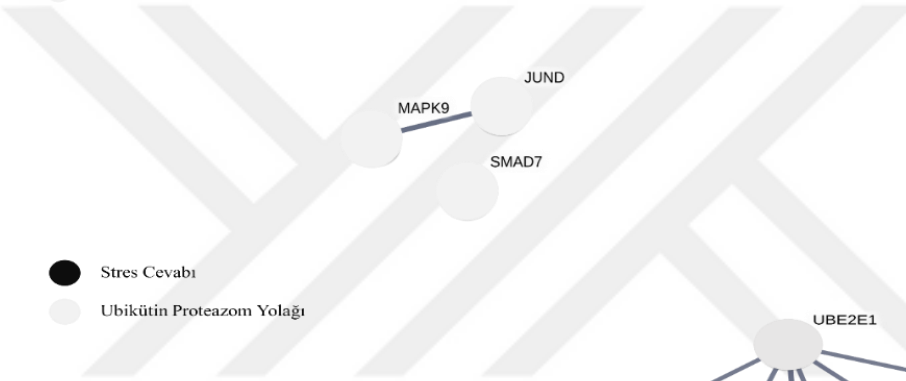
	NR1H3	1.015	-	-
	STK35	1.428	-	1.171
	GTF2H2C	1.152	-	-
	BLM	-	-	-1.166
	JUND	-	-1.426	-

Sinyal yolaklarında rol oynayan genlerin birbirleri ile ilişkileri *STRING* yazılımı ile incelendiğinde **Wnt sinyal yolağında** TLE1, TCF7L2 ve PYGO1 genleri arasındaki ilişkinin yolaktaki diğer genlere göre daha kuvvetli olduğu ve bu üç genin CSNK2A1 geni aracılığıyla CSNK1D ve CSNK1A1L genleri ile etkileştiği; ITPR3 ve ITPR1 genleri arasındaki ilişkinin kuvvetli olduğu ve diğer genler ile etkileşmediği gösterilmiştir. **TGF- β sinyal yolağında** rol oynayan MAPK9 ve JUND genlerinin etkileştiği, SMAD7'nin etkileşmediği gösterilmiştir. **Ubikülin proteazom yolağında** rol oynayan UBE2E1, UBE2D1, UBE2B, PSMD6, PSMC4, PSMC6 ve UBA6 genlerinin birbirleri ile ve **stres cevabında** rol oynayan RFC5, BLM, DCLRE1B, XRCC6 ile kuvvetli ilişkili olduğu saptanmıştır (Şekil 3.17).

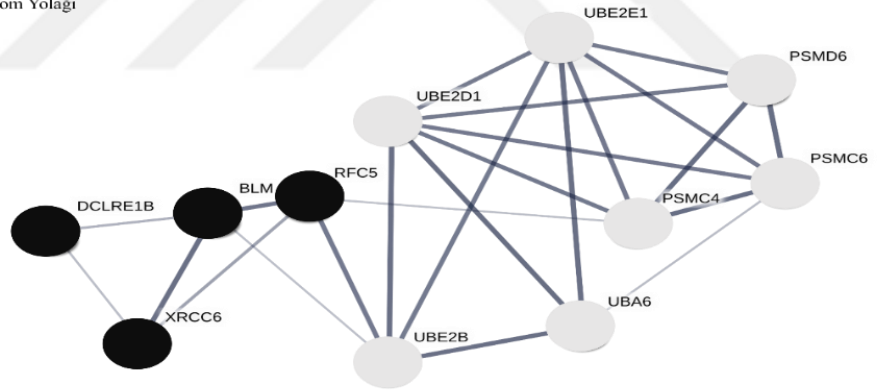
A ● Wnt Sinyal Yolağı



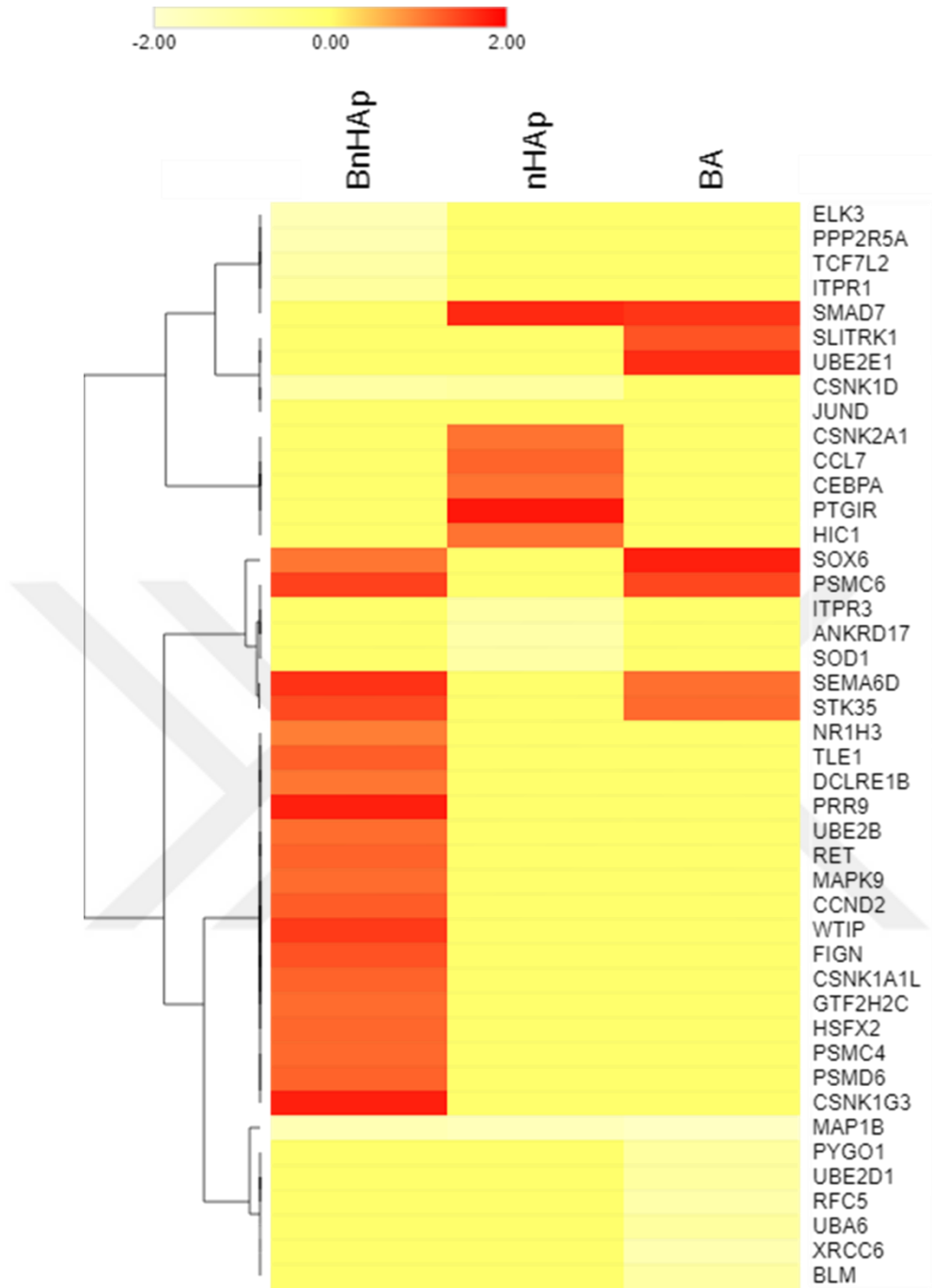
B ● TGF-β Sinyal Yolağı



C ● Stres Cevabı
● Ubikütin Proteazom Yolağı



Şekil 3.17. Şekilde **(A)** Wnt sinyal yolağı, **(B)** TGF-β sinyal yolağın, **(C)** Ubikütin proteazom yolağı ile stres cevabında rol oynayan genlerin birbirleri ile ilişkileri şematize edilmiştir. Genler arasındaki ilişkiyi ifade eden çizgiler ilişkinin kuvvetini göstermektedir. Koyu gri kuvvetli ve açık gri zayıf ilişkiyi temsil etmektedir.



Şekil 3.18. Bor içeren nHAp kompozit uygulanan SaOS-2 hücrelerinin kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucunda değişim gözlenen sinyal yolları ile ilgili gen ekspresyon seviyelerinin ısı haritası (*heatmap*) gösterilmektedir.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında, BnHAp kompozitin farklı dozlarından B'un zamana bağlı salımı değerlendirilerek, insan osteosarkom SaOS-2 osteoblast hücreleri ve insan kemik iliği kökenli MKH'lerdeki proliferasyon ve farklılaşma profillerine etkisi ile hücre içi mekanizması nHAp kompozitler ve BA ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Aşağıda, her araştırma sorusuna ait iş paketlerinden elde edilen veriler sırasıyla tartışılmıştır.

1. ARAŞTIRMA SORUSU: Borun BnHAp kompozitlerden salım profili nasıl gerçekleşir?

Raman ve ICP-MS yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre B, BnHAp kompozitlerden genellikle kontrollü olarak salınmaktadır. Borun, BnHAp kompozitlerden, kompozitin toplam dozu ile doğru orantılı olarak ve büyük oranda ilk 1 saat içinde salındığı saptanmıştır. **Raman yöntemi** ile elde edilen sonuçlara göre, 0,9- 900 µg/ml doz aralığındaki BnHAp kompozitlerde B için 1368 cm⁻¹ ve nHAp içinse 957 cm⁻¹ dalga boyunda sinyal elde edilmiştir. Bu bulgular, B'un kompozit içindeki varlığını kanıtlamaktadır. Bu tez çalışmasında elde edilen B ve HAp sinyal değerleri, moleküllerin kimyasal formüllerini destekleyip, literatürle uyumludur [115, 123, 124]. Bora ait sinyalin şiddeti, BnHAp kompozitlerin toplam dozu ile doğru orantılı olarak artmaktadır.

Atilla vd.'nin çalışmasında Raman yöntemi ile hekzagonal bor nitrit (hBN) kompozitler karakterize edildikten sonra sıçan femuruna implante edilmiş ve B'un serum seviyeleri incelenmiştir. Raman ile karakterizasyon sonucuna göre B sinyalinin şiddeti hBN kompozit dozu ile doğru orantılı olarak artarken, HAp sinyalininki azalmıştır. Atilla vd.'nin bu bulgularına ek olarak B ve HAp sinyalleri için elde ettikleri sayısal değerler (sırasıyla 1368 cm⁻¹ ve 957 cm⁻¹) bu tez çalışmasıyla uyumludur [125].

Nanometre boyutunda BN içeren nHAp kompozitin sinterleme koşullarının kompozite etkisinin incelendiği çalışmada, B için 1300 ile 1400 cm⁻¹ ve HAp için 900 ile 1000 cm⁻¹ dalga boyunda sinyaller elde edilmiştir [123]. Bu tez çalışmasında kullanılan nHAp seramikler 1000°C koşullarda sinterlendikleri için [70], elde edilen bulgular, aynı sinterleme koşullarını uygulayan Bakan vd.'nin çalışması ile paralellik göstermektedir [123].

Göncü vd., ticari titanyum tabakaların yüzeylerini, nanometre boyutunda hBN ve nHAp ile kaplayarak metal yüzeylerin biyoaktif özellik kazanmalarını hedeflemiştir. Bu doğrultuda, Raman spektroskopisi ile karakterizasyonda hBN ve nHAp'ın sinyal değerleri sırasıyla B

için 1300 ile 1400 cm^{-1} ve HAp için 900 ile 1000 cm^{-1} dalga boyunda olduğu bildirilmiştir [124]. Bu tez çalışmasında benzer dalga boylarında sinyaller elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, 90 $\mu\text{g/ml}$ dozdaki BnHAp kompozite ait B sinyal değeri, 9 $\mu\text{g/ml}$ BnHAp'e göre daha düşük olarak elde edilmiştir. Dozlar arasındaki bu farklılığın noktasal sinyalleri kaydeden Raman tekniğinin sınırlılığından kaynaklanabileceği düşünülmüş ve bu nedenle salım kinetikleri göreceli olarak duyarlılığı Raman'a göre daha yüksek olan ICP-MS tekniğiyle tekrar denetlenmiştir.

ICP-MS yöntemi ile elde edilen salım sonuçlarına göre 0,9 $\mu\text{g/ml}$, 9 $\mu\text{g/ml}$ ve 900 $\mu\text{g/ml}$ dozlarda BnHAp kompozitten B'un ilk 1 saat içinde ani olarak salındığı saptanmıştır. İlerleyen zaman dilimlerinde genellikle B salımı yavaş ve sabit bir hızda devam etmiştir. Doksan $\mu\text{g/ml}$ dozdaki BnHAp'ten salınan B miktarı, 1. saatten itibaren 5. güne kadar yukarıdaki diğer BnHAp dozlarındakine göre daha yüksek olarak saptanmıştır. Bor içeren biyomalzemelerden B'un salımının incelendiği çalışmalarda, bu elementin genellikle kompozitlerden düşük oranlarda ve kısa sürelerde salındığı bildirilmektedir [124-131]. Bu tez çalışmasından ICP-MS tekniği kullanılarak elde edilen salım verileri literatürle paralellik göstermektedir. Aşağıda bu literatür verileri ayrıntılı olarak tartışılacaktır.

Gümüşderelioğlu vd.'nin, BA'i kitosan nanopartiküller ve doku iskelelerine yükledikleri çalışmada, ICP-MS yöntemi ile benzerlik gösteren indüktif eşleşmiş plazma optik emisyon ölçüm (ICP-OES) tekniğini kullanarak B salımını 120 saate kadar değerlendirmiştir. Buna göre B'un büyük oranda ilk 5 saat içinde salımının gerçekleştiği görülmüştür. Beşinci saatten 120. saate kadar B salımının sabit olarak devam ettiği rapor edilmiştir [127]. Gümüşderelioğlu vd.'nin çalışmasındaki B salım kinetiği, bu tez çalışmasındaki gibi kümülatif olarak hesaplanmış ve her iki çalışmada paralel sonuçlar elde edilmiştir. Lu vd., titanyum partiküller üzerine B ile güçlendirilmiş CaSiO_3 seramikleri geliştirmiştir. Üretilen biyomalzemeler, ICP-OES yöntemi ile B salımı için 2 ile 10 gün süresince değerlendirilmiştir. Buna göre B salımının 2 gün içinde hızla arttığı, ikinci günden 10. güne kadar düşüş gösterdiği bildirilmiştir [132]. Lu vd.'nin çalışmasındaki B salım değerleri, kümülatif olarak değil, ayrı zaman noktalarındaki ölçümlerde farklı tüpler kullanılarak gerçekleştirildiğinden, salım miktarı sabit kalmak yerine düşmüş olarak saptanmış olabilir.

Bai vd., insan hepatoselüler karsinom HepG2 hücrelerine BA uygulayarak, ICP-MS tekniğine benzer bir yöntem olan indüktif eşleşmiş plazma-atomik emisyon (ICP-AES) yöntemi ile salınan B'un hücre içine alınma miktarını 250 dk.'ya kadar incelemiştir. Beşinci

dakikada hücre içine alınan B konsantrasyonunda hızlı bir artış saptanmış, sonrasında hücre içine alınan B konsantrasyonu sabit kalmıştır [128]. Camsı borat biyomalzemelerden B salım prolifinin farklı biyoreaktör koşullarında ICP-OES yöntemi ile incelendiği başka bir çalışmada, B'un ilk 20 saat içinde hızla salındığı bildirilmiştir [125]. Wu vd., B içeren mezaporlu biyoaktif camsı seramiklerden B salımını ICP-AES tekniği ile 1 gün ile 3 gün arasında değerlendirmiştir. Elde edilen verilere göre B, seramiklerden 1 gün içinde salınmıştır [129]. Bor içeren silikat biyoseramiklerden B salımının değerlendirildiği Liu vd. ile Balasubramanian vd.'nin çalışmalarında B'un ilk ölçüm yapılan zaman dilimi olan 24 saat içinde salındığı bildirilmiştir [130, 131].

Bu tez çalışmasında salım kinetiklerinin hesaplanması için kullanılan ICP-MS tekniğinde, ölçülecek elementin kütlesi esas alınmaktadır. ICP-OES ve ICP-AES yöntemleri sırasıyla elementin optik saçılımı ve uyarılan iyonun ölçümünü esas almaktadır. Tez çalışmasında ICP-MS yöntemi ile elde edilen veriler, literatürde buna yakın temelli olan diğer yöntemler ve B'un yüklendiği farklı polimer ve seramik kompozitlerle elde edilen verilerle paralellik göstermiştir. Buna göre B, BnHAp ve benzeri seramik kompozitlerden ani salım göstermekte, kümülatif ölçüm protokolleriyle ilerleyen zaman dilimlerinde salım düşük dozlarda devam etmekte ya da zaman içinde durmaktadır.

Hidroksiapatit kristallerinin *in vivo* koşullarda yaklaşık 12 haftada kısmen (%24) degrade olduğu, kemikteki CaP taneciklerinin çözünerek tümüyle erimesinin yaklaşık 48 hafta aldığı bildirilmiştir [69]. Bu nedenle BnHAp kompozitten salınan B'un ani salım ile öncelikle periferden salındığı ve kristal yapısının degrade olmasının uzun süre almasıyla salımın kısıtlandığı varsayılmıştır. Kompozitteki nHAp degrade olduğunda açığa çıkan Ca, yapıdaki B ile yer değiştirmekte ve fosfat, apatit tabakasında birikmektedir. Böylece kemiğin inorganik ESM'inin ana bileşeni olan ve osteoporotik kemikte yerine konması amaçlanan, CaP mineral içeriği desteklenebilmektedir [2]. Borun yüksek dozlarının hücre ve dokulardaki toksik etkileri bilinmektedir [111]. Bu gerekçeyle geliştirilen lokal salım sistemleri sistemik yan etkileri önleyerek, kemik hasarının olduğu bölgede sabit ve düşük dozlu B salımını hedeflemektedir [70]. Bu çerçevede düşünüldüğünde, kemiğin ekstraselüler matriksinin ana bileşeni olan hidroksiapatit temelli biyoaktif, biyouyumlu ve uzun sürede degrade olan nHAp seramikler 10^{-2} – 10 µg doz penceresinde B salımını başarıyla sağlamıştır. Literatüre göre güvenli olan bu doz penceresinin hücre düzeyindeki etkileri sonraki iş paketlerinde değerlendirilmiştir.

2. ARAŞTIRMA SORUSU: Borik asit, nHAp ve BnHAp kompozitlerin SaOS-2 insan osteoblast ve kemik iliği kaynaklı primer MKH'lerin proliferasyon profillerine doz bağımlı etkisi nedir?

Borik asit, nHAp ve BnHAp kompozitlerin SaOS-2 hücrelerinde ve MKH'lerde proliferasyon profiline etkisinin **WST-1 yöntemi** ile elde edilen sonuçlarına göre, SaOS-2 osteoblastlarda BA, nHAp ve BnHAp kompozitlerin proliferasyonu genellikle etkilemediği ve MKH'lerde BA, nHAp ve BnHAp'ın doz ve zaman bağımlı olarak proliferasyonu arttırdığı gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında Tablo 1.2 ve Tablo 1.3'te özetlenen literatür taramasından elde edilen doz penceresine göre [93, 94, 96-110] hesaplanan 0,006- 6 µg/ml doz aralığında uygulanan **BA**, biyomalzeme uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, **insan kökenli SaOS-2 osteoblastların** proliferasyon oranlarını etkilememiştir. Hakkı vd., BA'in MC3T3-E1 fare osteoblast hattında MTT yöntemiyle, 0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml, 2000 ng/ml, 4000 ng/ml, 8000 ng/ml ve 10000 ng/ml dozlarda 1. günde değerlendirdiğinde; 0.1-100 ng/ml doz aralığında hücre canlılığını etkilemediği, 1000 ng/ml ve daha yüksek dozlarda sitotoksik etki gösterdiğini bildirmiştir. Hücre canlılığını etkilemeyen 0,1-100 ng/ml doz aralığında BA uygulaması sonrası 2, 5 ve 14. günlerde tripan mavisi boyaması sonrası hemositometre ile yapılan hücre sayımıyla proliferative etki değerlendirilmiştir. Buna göre zaman içinde anlamlı olarak artan hücre proliferasyonunun 0.1- 100 ng/ml dozlarda uygulanan BA'ten etkilenmediği saptanmıştır [97]. Bu tez çalışmasında uygulanan 0,006- 6 µg/ml (6- 6000 ng/ml) doz aralığında BA 1 ve 3. günde, Hakkı vd.'nin çalışmasına benzer biçimde, zaman içinde artan osteoblast çoğalmasını etkilememiştir. Bu tez çalışmasında 0,06- 6 µg/ml doz aralığında uygulanan BA 5. günde SaOS-2 osteoblastların proliferasyonunu azaltmış; ancak 0,6 ve 6 µg/ml BA dozları için bu azalma istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir. Bu durumun, deney düzeneğinin 14 tekrarlı olarak planlanmasına rağmen, teknik aksaklıktan kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Bu tez çalışmasında, **nHAp kompozitler**, 1 ve 3. günde WST yöntemiyle yapılan değerlendirmede SaOS-2 osteoblastların proliferasyon oranlarını etkilememiştir. Buna karşın 5. günde 0,9- 9 µg/ml dozlarda nHAp kompozitler kontrol grubuna göre osteoblast çoğalmasını azaltmıştır. Hidroksiapatit seramiklerin osteokondüktif etkili oldukları ve ESM'e katkıda bulundukları bilinmektedir. Liv vd., nanometre boyutlu poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) fibrillerin biyoyumumluluğunu arttırmayı amaçlayarak fibril yapısına

jelatin ve 20 µg/ml dozunda ve 200 nm boyutundan nHAp yükleyerek MC3T3-E1 hücrelerinin proliferasyon özelliklerini MTT yöntemini kullanarak 1, 3 ve 5. günde incelemiştir. Buna göre nHAp kompozitin ve jelatinin yüklendiği PLGA fibrillerin, PLGA fibrillere oranla osteoblast proliferasyonunu her üç günde de arttırmıştır [48]. Liv d.'lerinin çalışmasında fiber yapının uygulanmadığı hücre kontrolünün ve sadece jelatin bulunan kontrol grubuna ait veri ve kıyaslamalar verilmemesi nedeniyle proliferasyon oranları ile ilgili tam bir yorum yapılamamaktadır. Başka bir çalışmada, Song vd.'leri polivinil alkol (PVA) nanometre boyutlu fibröz ağları tip I kollagen ve nHAp kompozit ile güçlendirerek MC3T3-E hücrelerinin proliferasyonuna etkisini 8. günde MTT yöntemi ile değerlendirmiştir. Üretilen ağda nHAp kompozit yapıda sabit miktarda tutulmuş ve PVA miktarı artırılarak farklı oranlarda içermektedir. Farklı oranlarda nHAp/PVA içeren meşin tip I kollagen varlığında proliferasyon etkisi incelenmiştir. Buna göre meş uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, nHAp içeren grupta hücre proliferasyonu artmaktadır. Fakat ağ içinde nHAp miktarı sabit tutulup, PVA oranı artırıldığında proliferasyonunda artış gözlenmiştir. Meş yapısına kollagen yüklendiğinde ise daha fazla proliferasyon sağlamıştır [133]. Bu çalışmada sadece PVA veya sadece tip I kollagen içeren kontrol gruplarının olmaması ve nHAp'in miktarının sabit tutulması, biyoseramik katkı etkisinin bu tez çalışması ile karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Zeng vd., nHAp kompozit içeren PVA zarların, ROS sıçan osteoblastlarının proliferasyonuna etkisini MTT yöntemi ile değerlendirmiştir. Buna göre, %20 ve %40 oranında nHAp içeren PVA zarlar, nHAp kompozit içermeyen PVA zarlarla karşılaştırıldığında; 2, 4 ve 6. günde yapıdaki nHAp, osteoblastların proliferasyon oranını etkilememiştir [134]. Bu tez çalışması kapsamında nHAp kompozitlerin 1, 3 ve 5. günde hücre proliferasyonunu etkilemediği gösterilmiştir. Bu bulgular, Zeng vd.'nin verilerini desteklemektedir.

Bu tez çalışmasında, **BnHAp kompozitler**, 1 ve 3. günde WST yöntemiyle SaOS-2 osteoblastların proliferasyon oranlarını etkilememiştir. Buna karşın 5. günde 0,9- 9 µg/ml dozlarda BnHAp kompozitler kontrol grubuna göre osteoblast çoğalmasını azaltmıştır. Bu dozlarda BnHAp'tan salınması beklenen BA (0,006 -0.06 µg/ml) doğrudan uygulandığında benzer biçimde antiproliferatif etkiye neden olmuştur. Diğer yandan B içermeyen 0,9- 9 µg/ml nHAp kompozitlerde 5. günde antiproliferatif etki göstermiştir. Deney grupları arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Bu nedenle osteoblastların azalmış proliferasyonundan BA ve/veya nHAp sorumlu olabilir. Tunçay vd.'nin çalışmasında, BnHAp kompozit ile kaplanarak oluşturulan kitosan doku iskelerinin MC3T3-E1 fare

osteoblastlarındaki proliferatif etkisini MTT yöntemiyle 21 gün süreyle izlenmiştir. Buna göre ve BnHAp kompozitin hücre proliferasyonu, 1, 3, 9, 14 ve 21. günde azalttığı, 5 ve 7. günde arttırdığı bildirilmiştir [117]. Sonuçları bu tez çalışmasıyla benzerlik gösterse de, bu çalışmada tek başına BA, kitosan ve nHAp deney grupları bulunmadığı için, etkiden hangi bileşenin sorumlu olabileceği açık değildir.

Bor nitrit, eşit miktarda B ve nitrojen atomlarını içeren ve oluşturduğu kristal yapısı nedeniyle biyomalzemelere eklenmesi tercih edilen bir B bileşiğidir [135]. Mikrometre boyutlu HAp seramiklere bor nitrit yüklendikten sonra insan U2OS osteosarkom hücrelerine sitotoksik etkisinin incelendiği çalışmada, doğrudan bor nitrit ile, toplam kompozit ağırlığının % 0.5'i oranında BN içeren HAp, % 1.5 oranında BN içeren HAp, ve tek başına HAp hücrelere uygulanmıştır. Uygulamadan 1 gün sonra canlılık oranı konfokal mikroskobunda Hoechst ve Calcein boyanması ile incelenmiştir. Buna göre doğrudan BN ve % 1.5 BN içeren HAp uygulamasının hücre canlılığını azalttığı, tek başına HAp ve % 0.5 BN içeren HAp'in etkilemediğini bildirmiştir [136]. Bu çalışma, HAp'in osteoblast canlılığını olumsuz etkilemediğini vurgulamaktadır. HOS insan osteosarkom hücre hattına 1050 µg, 10500 µg ve 40200 µg B içeren bor nitritin jelatin biyopolimer fibril ile uygulandığı Nagarajan vd.'nin çalışmasında MTT yöntemiyle hücre canlılığına etkisi 1, 4 ve 8. günde değerlendirilmiştir. Buna göre, her üç doz B içeren kompozitle 1 ve 4. günde sitotoksik etki görülmezken, 8. günde her üç dozda biyomalzeme içermeyen kontrol grubuna göre hücre canlılığında azalma görüldüğü bildirilmiştir [93]. Nagarajan vd.'nin çalışmasına ait bu bulgular, bu tez çalışması kapsamında elde edilen, BnHAp kompozitinin 0,9 µg/ml ve 9 µg/ml dozda 5. gündeki antiproliferatif etkisi ile paralellik göstermektedir.

Bor içeren TiO₂ biyofilm malzemenin SaOS-2 insan osteoblastlarındaki proliferatif etkisini, TCP ve TiO₂'e göre Cell Counting Kit-8 (CCK-8) yöntemiyle 1, 3 ve 5. günde inceleyen çalışmada 4,767 µg/ml B içeren TiO₂'nin 1. ve 3. günde hücre proliferasyonunu etkilemediği, 5. günde ise azalttığı saptanmıştır [95]. TiO₂ ve TCP'nin hücre proliferasyonunu arttırdığı gözlemlendiğinden, B-TiO₂'nin antiproliferatif etkisinin B aracılığıyla olduğu öne sürülmüştür. Diğer yandan bu çalışmada tek başına B'un etkisi araştırılmamıştır. Lu vd., BA yüklenmiş CaSiO₃ seramiklerle titanyum partiküllerin yüzeyini kaplamıştır. Hazırlanan biyomalzemedan B salımı ICP-OES yöntemiyle ile değerlendirilmiş ve 1. günde yaklaşık 0,6 µg/ml B'un salındığı, 4. ve 7. günde salınan B'un sırasıyla yaklaşık 1,25 µg/ml ve 0,4 µg/ml olduğu gösterilmiştir. Kompozitlerin hücrelere proliferatif etkisi, CCK-8 yöntemiyle 1, 4 ve 7. günde MC3T3-E1 fare osteoblastlarında incelenmiştir. Birinci

günde 0,6 µg/ml dozda B salan B-CS seramiğin, proliferasyonu etkilemediği, 4. günde 1,25 µg/ml ve 7. günde 0,4 µg/ml B salan B-CS seramiğin CS seramiğe göre osteoblastların proliferasyon oranını arttırdığı bildirilmiştir [131]. Lu vd.'nin yaptığı çalışmada kullanılan 0,6, 1,25 ve 0,4 µg/ml B dozları, bu tez çalışması kapsamında uygulanan BnHAp kompozitten salınan B miktarlarından ve uygulanan BA'in içerdiği B miktarından yüksektir. Bu tez çalışmasında içeriğinde en yüksek B miktarına sahip 6 µg/ml BA'in 1, 3 ve 5. günde proliferasyonu desteklemediği gösterilmiştir. Bor için kullanılan farklı biyomalzemelerden oluşturulan taşıyıcıların, B'un salımı ve hücrelerin proliferasyonuna farklı şekilde etki edebileceği varsayılabilir.

Bu tez çalışmasında 0,006- 6 µg/ml doz aralığında **mezenkimal kök hücrelere** uygulanan **BA**, ilaç uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hücrelerin proliferasyon oranlarını etkilememiştir. İnsan kemik iliği MKH'lerin BA varlığında proliferasyonlarının incelendiği Ying vd.'nin çalışması, CCK-8 yöntemi ile 1. günde BA'in 0,001 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml dozunda proliferasyonu azalttığı fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı; BA'in 1 µg/ml dozda anlamlı biçimde proliferasyonu azalttığını göstermiştir [109]. Najafabadi vd., sıçan kemik iliği MKH'lerde BA'in 0,006 ve 6 ug/ml dozda 5, 10, 15 ve 21. günde MTT yöntemi ile etkisini incelenmiştir. Hücrelere uygulanan 0,006 ug/ml BA'in değerlendirme yapılan günlerin hiçbirinde hücre proliferasyonunu etkilemediği gösterilmiştir. Diğer yandan 6 ug/ml dozda BA'in 5. günde hücrelerin proliferasyonunu etkilemediği, 10, 15 ve 21. günde ise azalttığı saptanmıştır [105]. Bu çalışmada 0,006 ug/ml ve 6 ug/ml dozdaki BA'in 5. güne kadarki verileri, tez çalışması kapsamındaki 0,006 ug/ml ve 6 ug/ml dozlardaki BA'in 1, 3 ve 5. gündeki MKH verileri ile örtüşmektedir.

Bu tez çalışmasında, **nHAp kompozitlerin** 0,9- 900 µg/ml doz aralığında 1. ve 3. günde, MKH proliferasyonunu etkilemediği gösterilmiştir. Beşinci günde nHAp kompozitler 90 µg/ml ve 900 µg/ml dozda MKH proliferasyonunu kontrole göre arttırmaktadır. Remya vd., nHAp kompozitlerin 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL dozda fare kemik iliği kaynaklı MKH'lerin canlılığını MTT yöntemi ile 1. günde kontrole göre azalttığını, ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmiştir. Kompozitin 1000 µg/mL dozu istatistiksel olarak anlamlı biçimde sitotoksik bulunmuştur [137]. Bu tez çalışması kapsamında 0,9- 900 µg/ml doz aralığında uygulanan nHAp kompozitin 1, 3 ve 5. günde MKH'lerde antiproliferatif etkisi saptanmamıştır. Elde edilen bu veri Remya vd.'nin çalışmasını destekleyici niteliktedir. Bir başka çalışmada nHAp ile kaplanan TiO₂'nin insan kemik iliği kaynaklı MKH'lerin proliferasyon oranına etkisi Alamar Blue yöntemi ile 1, 7

ve 14. günde değerlendirilmiştir. Bu çalışmada; hücrelere tek başına nHAp kompozit, tek başına TiO_2 ve TiO_2 ile nHAp kompozit birlikte uygulanmıştır. Buna göre 1, 7 ve 14. günde, nHAp kompozitin tek başına MKH'lere uygulanmasının proliferasyonu; tek başına uygulanan TiO_2 'e ve TiO_2 ile nHAp kompozitin birlikte uygulamasına göre arttırmadığı gösterilmiştir [138]. Dimitrievska vd.'nin çalışmasında biyomalzeme uygulanmamış kontrol hücre grubunun olmaması, değerlendirmenin geçerlilik ve güvenilirliğini kısıtlamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında 3. günde yapılan MKH proliferasyon değerlendirmesine göre, 900 $\mu g/ml$ doz BnHAp kompozit ile tek başına 900 $\mu g/ml$ doz nHAp kompozit verilen grup karşılaştırıldığında BnHAp kompozitin MKH proliferasyonunu daha fazla desteklediği gösterilmiştir. Buna göre nHAp kompozitlerin parçalanma süresinin de hücre proliferasyonuna etkisine katkıda bulunabileceği varsayılmıştır.

Bu tez çalışmasında, **BnHAp kompozitlerin** 0,9- 900 $\mu g/ml$ doz aralığında, 1. günde, MKH proliferasyonunu etkilemediği gösterilmiştir. Üçüncü günde, 0,9- 90 $\mu g/ml$ doz aralığının proliferasyonu etkilemediği, 900 $\mu g/ml$ dozda BnHAp kompozitinse proliferasyonu arttırdığı saptanmıştır. Beşinci gün yapılan proliferasyon değerlendirilmesinde 90 $\mu g/ml$ ve 900 $\mu g/ml$ doz BnHAp'in proliferasyonu arttırdığı ve 0,9 $\mu g/ml$ ve 9 $\mu g/ml$ dozda etkilemediği saptanmıştır. Bor içeren nHAp kompozitin MKH'lerde proliferasyona etkisiyle ilgili literatürde kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ciftci vd.'nin çalışmasında, BnHAp kompozitin insan kemik iliği kaynaklı MKH'lerde proliferasyona etkisi 9 gün süreyle gerçek zamanlı proliferasyon değerlendirilmesine olanak veren impedans temelli xCELLigence tekniği ile incelenmiş ve 10 $\mu g/ml$ BnHAp kompozitin MKH proliferasyonunu 9 gün süresince etkilemediği gösterilmiştir [70]. Bu tez çalışması kapsamında kullanılan 9 $\mu g/ml$ BnHAp, Ciftci vd.'nin kullandığı 10 $\mu g/ml$ BnHAp dozuna yakın kabul edilebilir ve 5. güne kadar proliferasyonu etkilemediği sonucu Ciftci vd.'nin sonucunu desteklemektedir.

Bor içeren farklı biyomalzemelerin MKH çoğalmasına etkisinin incelendiği çalışmalar B'un proliferasyonu desteklemediğini göstermiştir [96, 107, 139]. Boron nitritin insan yağ dokusu kökenli MKH'lerde CCK-8 yöntemi ile sitotoksitesi değerlendirildiğinde BN'in içerdiği B'un 0,44- 2,2 $\mu g/ml$ doz aralığında sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. İki ve 7. günde sitotoksik etki karşılaştırıldığında, günler arasında bir fark saptanmamıştır [139]. Suhito vd.'nin çalışmasında kullanılan B doz aralığı, bu tez çalışmasında kullanılan BnHAp kompozitin 90 $\mu g/ml$ dozunda içerdiği B miktarına (1,67048 $\mu g/ml$) karşılık gelmektedir. Tez çalışması kapsamında uygulanan 90 $\mu g/ml$ BnHAp kompozitin MKH proliferasyonunu 1 ve 3. günde etkilemediği, 5. günde ise kontrol grubuna göre arttırdığı gösterilmiştir. Bu tez

çalışmasında 1 ve 3. günde elde edilen bulgular Suhito vd.'ni desteklemektedir. Beşinci günde tez çalışması kapsamında elde edilen 90 µg/ml BnHAp kompozitin proliferasyonu arttırdığı bulgusu ise bu etkiye HAp'in katkısının olabileceğini işaret edebilir. Başka bir çalışmada bor nitrit nanotüplerin B içeriğinin 0,88, 2,2, 4,4 ve 11 µg/ml dozları CCK-8 ile yapılan proliferasyon değerlendirmesinde sıçan kemik iliği MKH'lerde 7 ve 14. günde MKH proliferasyonunu etkilemediği bildirilmiştir [96]. Li vd.'nin uyguladıkları B doz aralığı bu tez çalışmasında uygulanan BnHAp kompozitin 90 µg/ml (B içeriği 1,67048 µg/ml) ve 900 µg/ml (B içeriği 16,7048 µg/ml) dozu ile karşılaştırıldığında elde edilen olumlu sonuçların B'un taşıyıcısı olarak nHAp'e ait olabileceği varsayılmıştır. Demirci vd.'nin çalışmasında, insan diş germ kök hücrelerine uygulanan sodyum pentaborat pentahidrat'ın (NaB) kök hücre kriyoprezervasyonunda etkisi araştırılmıştır. Bunun için 5- 700 µg/ml doz aralığında NaB (B içeriği 0,916- 128,24 µg/ml) hücrelere uygulanmış ve 1, 2 ve 3. günde MTS ile sitotoksite testi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler NaB'ın 200 µg/ml dozda (B içeriği 36,6320 µg/ml) ve üstünde toksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Güvenli doz penceresi içinde bulunan 20 µg/ml NaB dozu (B içeriği 3,663 20 µg/ml) ile deneylere devam edilmiştir. Buna göre hücre dondurma-çözme süreçlerinde 20 µg/ml doz NaB'ın hücre canlılığını arttırdığı bildirilmiştir [107]. Sitotoksite değerlendirmesi sonucunda elde edilen 36,6320 µg/ml ve altı B içeren güvenli doz aralığını bu tez çalışmasında en yüksek B içeriğine sahip 900 µg/ml BnHAp kompozit (B içeriği 16,7048 µg/ml) karşılamaktadır.

Sonuç olarak B'un literatürdeki antiproliferatif etki profili, bu tez kapsamında kemik hücrelerinde benzer doz aralığında 0,9 – 900 µg/ml izlenmiştir. Tez kapsamında uygulanan BnHAp kompozitlerin kemik hücrelerinin proliferasyonunu genellikle etkilemediği saptanmıştır. Bu tez çalışmasında uygulanan BA ve BnHAp kompozitlerin MKH'lerde kemik hücrelerinden farklı bir etki profiline sahip olduğu dikkat çekmiştir. Buna göre BA ve BnHAp yüksek dozlarda ve zaman bağımlı şekilde proliferasyonu desteklemektedir. Bu etkinin olası mekanizması aşağıda tartışılmıştır.

3. ARAŞTIRMA SORUSU: Borik asit, nHAp ve BnHAp kompozitler insan kemik iliği kökenli primer MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını nasıl etkilemektedir?

Borik asit, nHAp ve BnHAp kompozitlerin MKH'lerde osteojenik farklılaşmaya etkisinin hücre içi **ALP aktivitesini spektroskopik olarak ölçümü** ile 7, 14 ve 21. günde yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, BnHAp kompozitlerin 900 µg/ml dozu, nHAp kompozit ve BA'in eş değer dozlarına göre 7. günde karşılaştırıldığında ve BnHAp

kompozitin 0,9 µg/ml, 9 µg/ml ve 900 µg/ml dozu, nHAp kompozit ve BA'in eş değer dozları ile 14. günde karşılaştırıldığında osteojenik farklılaştırmayı arttırdığı saptanmıştır.

Bu tez çalışmasında 0,006- 6 µg/ml doz aralığında **mezenkimal kök hücrelere** uygulanan BA'in 0,006 µg/ml dozu 7. günde ALP aktivitesini arttırmıştır. Borik asitin uygulandığı diğer günler ve dozlarda MKH'lerde ALP aktivitesinde artış görülmemiştir. Najafabadi vd., 0,006 ve 6 ug/ml dozda BA'in sıçan kemik iliği kaynaklı MKH'lerin osteojenik farklılaşmasında etkisini 5, 10, 15 ve 21. günde, hücre içinde biriken Ca^{+2} 'un ve hücre içi ALP aktivitesinin ölçümü ile Alizarin red boyaması yöntemleri ile incelemişlerdir. Borik asit, 0,006 ug/ml dozda, Alizarin red boyaması ve Ca^{+2} birikimini 5, 10 ve 21. günde arttırırken, 15. günde etkilememektedir. Borik asit, 0,006 ug/ml dozda, ölçüm yapılan dört zaman noktasında da ALP akitivitesini arttırmıştır. Borik asit, 6 ug/ml dozda 5 ve 10. günde her üç yöntemle de osteojenik farklılaşmayı arttırdığı, 15 ve 21. günde ise etkilemediği gösterilmiştir [105]. Bu tez çalışması kapsamında BA'in 0,006 ug/ml dozunun 7. günde osteojenik farklılaşmayı ALP aktivitesi üzerinden arttırdığı, 14 ve 21. günde ise etkilemediği saptanmıştır. Borik asitin 6 ug/ml dozunun ise osteojenik farklılaşmayı 7, 14 ve 21. günde etkilemediği gösterilmiştir. Buna göre 0,006 ug/ml dozda BA 7. günde Najafabadi vd.'nin çalışması ile paralellik göstermektedir. Diğer verilerin benzer olmamasının nedeni, yalnız ALP enzim etkinliğinin ölçülmüş olması ve tekrar sayısının sınırlılığı olarak varsayılabilir. Ying vd.'nin çalışmasında insan kemik iliği kaynaklı MKH'lerin BA'in 0,001 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml ve 1 µg/ml dozlarında osteojenik farklılaşmaları ALP aktivitesi ölçümü ile 7. günde; Von Kossa boyaması ile 21. günde; gerçek zamanlı PCR ile 4 ve 7. günde değerlendirilmiştir. Buna göre ALP aktivitesinin değerlendirildiği 7. günde BA'in 0,01 µg/ml ve 0,1 µg/ml dozlarda farklılaşmayı arttırdığı, 0,001 µg/ml ve 1 µg/ml dozlarda etkilemediği gösterilmiştir. Yirmi birinci günde yapılan Von Kossa boyamasında, BA'in 0,001 µg/ml ve 0,01 µg/ml dozda farklılaşmada artış, 0,1 µg/ml ve 1 µg/ml dozlarda ise BA uygulanmayan kontrol grubuna göre azalma görülmüştür. Dört ve 7. günde gerçek zamanlı PCR ile ALP, COL1, OCN ve BMP7 genlerindeki ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür. Bu ölçüme göre 0,001 µg/ml BA 4. günde ALP, COL1, OCN ve BMP7 ekspresyonunu etkilememekte, 7. günde COL1 gen ekspresyonunu arttırmaktadır. Borik asitin 0,01 µg/ml dozu 4. günde ALP ve OCN gen ekspresyonlarını arttırmış, COL1 ve BMP7 gen ekspresyonunu etkilememiş, 7. günde tüm gen ekspresyon seviyelerini arttırmıştır. Borik asitin 0,1 µg/ml dozu 4 ve 7. günde ALP, COL1, OCN ve BMP7 gen ekspresyonlarını arttırmıştır. Borik asitin 1 µg/ml dozu 4. günde ALP, COL1, OCN ve BMP7 gen

ekspresyonlarını etkilememiş, 7. günde sadece COL1 ekspresyonunu arttırmıştır [110]. Bu tez çalışmasında, BA'ın 7. günde 0,006 ug/ml dozunda ALP aktivitesini arttırdığı saptanmıştır. Başka bir çalışmada Hakki vd., BA'ın MC3T3-E1 osteoblastlarda mineralizasyon ve ESM sentezine etkisini değerlendirmek için von Kossa boyaması ile 30. günde mineralizasyonu ve gerçek zamanlı PCR ile 4 ve 8. günde COL1, OPN, BSP, OCN ve Runx2 ekspresyon düzeylerini 0,00001 µg/ml, 0,0001 µg/ml, 0,001 µg/ml, 0,1 µg/ml ve 1 µg/ml doz BA uygulayarak değerlendirmiştir. Mineralizasyon değerlendirmesi sonucunda 0,0001 µg/ml, 0,001 µg/ml ve 0,1 µg/ml BA dozunda artış olduğu saptanmıştır. Gen ekspresyon değerlendirmesi sonucunda COL1 ekspresyon seviyesi 3. günde sadece 0,1 µg/ml BA uygulamasında ve 8. günde tüm dozlarda artış göstermiştir. OPN ekspresyon seviyesi 3. günde 0,001 µg/ml, 0,1 µg/ml ve 1 µg/ml dozlarında artarken, 8. günde 0,00001 µg/ml, 0,1 µg/ml ve 1 µg/ml doz BA'da artmıştır. BSP ekspresyon seviyesi 3. günde tüm dozlarda artmış, 8. günde sadece 1 µg/ml doz BA uygulamasında artmıştır. OCN ekspresyonu 3 ve 8. günlerde 0,001 µg/ml, 0,1 µg/ml ve 1 µg/ml doz BA varlığında artmıştır. Runx2 ekspresyon seviyesi 3. günde 1 µg/ml dozunda artarken, 8. günde 0,00001 µg/ml, 0,0001 µg/ml, 0,001 µg/ml doz BA uygulamasında artış göstermiştir [97]. Ying vd. ile Hakki vd.'nin çalışmasında 0,001 ve 0,01 ug/ml doz aralığında bulunan ve tez çalışması kapsamında etkisi saptanan 0,006 ug/ml doz BA'ın ALP aktivitesinin artışı bulgusu Ying vd. ve Hakki vd.'nin çalışmasını desteklemektedir.

Bu tez çalışmasında **nHAp kompozitler**, 7. günde 0,9 – 900 µg/ml doz aralığında osteojenik farklılaşmayı etkilememiştir. On dördüncü günde, 0,9 – 900 µg/ml doz aralığında osteojenik farklılaşmayı biyomalzeme uygulanmayan kontrol grubuna göre negatif yönde etkilemiştir. Yirmi birinci günde, 0,9 µg/ml doz nHAp kompozit osteojenik farklılaşmayı biyomalzeme uygulanmayan kontrol grubuna göre osteojenik farklılaşmayı etkilemediği ve 9 µg/ml, 90 µg/ml ve 900 µg/ml dozlarda biyomalzeme uygulanmayan kontrol grubuna göre negatif yönde etkilediği saptanmıştır. Yirmi birinci günlerde 9- 900 µg/ml doz aralığındaki negatif etkisinin, nHAp kompozitlerin hücre üzerine çökmesine bağlı olarak ölüme neden olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Wang vd.'nin çalışmasında, PLGA doku iskeleleri nHAp kompozit ve kitosan ile güçlendirilerek insan umbikal kort MKH'lerinin osteojenik farklılaşmaları 21. günde ALP ve OCN gen ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı PCR ile ve mineralizasyon Alizarin red boyaması ile incelenmiştir. Bu incelemede nHAp/kitosan/PLGA, nHAp/PLGA, kitosan/PLGA ve PLGA doku iskeleri osteojenik farklılaşma belirteçlerinin değerlendirmesi için karşılaştırılmıştır. Buna göre 21. günde ALP

ve OCN gen ekspresyon seviyesinin, nHAp/ PLGA doku iskelesinde PLGA doku iskelesine göre arttığı; nHAp/ kitosan/ PLGA ve kitosan/ PLGA doku iskelesine göre azaldığı saptanmıştır. Mineralizasyon oranının gerçek zamanlı PCR değerlendirmesini destekleyecek şekilde nHAp/ PLGA doku iskelesinde PLGA doku iskelesine göre arttığı ve nHAp/ kitosan/ PLGA ve kitosan/ PLGA doku iskelesine göre azaldığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, insan kemik iliği kaynaklı MKH'lerine tek başına nHAp kompozit, tek başına TiO₂ ve TiO₂ ile nHAp kompozit birlikte uygulanarak 1, 7 ve 21. günde ALP aktivitesi spektroskopik yöntem kullanılarak, OCN ekspresyon seviyesi ELISA yöntemi kullanılarak ve 14. günde mineralizasyon Alizarin red ile değerlendirmiştir. Buna göre diğer iki gruba göre nHAp kompozit uygulanmış hücrelerde 1, 7 ve 21. günde ALP aktivitesi değişmemiştir. Osteokalsin seviyesi nHAp kompozit uygulanan gruplarda sadece 21. günde artmış, diğer iki grup ile karşılaştırıldığında ise daha az seviyede saptanmıştır. Mineralizasyon seviyesi tek başına nHAp uygulanan grupta, tek başına TiO₂ uygulanan gruba göre artmış, TiO₂ ile nHAp kompozit birlikte uygulanan gruba göre azalmıştır [138]. Bu tez çalışması kapsamında, nHAp kompozitlerin osteojenik farklılaşmaya katkısı sadece ALP aktivitesinin ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Bu durum, sonuçların geçerliliğini kısıtlamaktadır. Diğer yandan, geç degrade olarak, aylar içinde Ca ve P kemik dokusu için serbestleştiren nHAp ile ilgili olarak 21 günlük osteojenik protokolüne ait olumsuz bulgular, Dimitrievska vd ile bazı yönleriyle benzerlik göstermektedir.

Bu tez çalışmasında, hücre içi ALP aktivitesinin değerlendirmesi ile elde edilen verilere göre **BnHAp kompozitler** MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını etkilememiştir. Bor içeren nHAp kompozitlerin 10 µg/ml dozunda MKH'lerde osteojenik farklılaşmaya etkisinin Alizarin red boyaması ve Ca⁺² birikiminin ölçümü ile incelendiği Ciftci vd.'nin yaptığı çalışmada, 21. günde hücrelerde B varlığında Ca⁺² birikiminin arttığı saptanmıştır [70]. Arslan vd., BnHAp kompozit içeren poli(bütilen adipat-ko-terefalat) (PBAT), HAp içeren PBAT ve kompozit içermeyen PBAT doku iskelelerinin insan kemik iliği kaynaklı MKH'lerde osteojenik farklılaşmaya etkisini incelemiştir. Arslan vd.'nin çalışmasında BnHAp ve HAp kompozitler doku iskelelerinin ağırlıkça % 5'ini oluşturacak biçimde hazırlanmıştır. Bu doğrultuda ALP aktiviteleri 7, 14 ve 28. günde ve kollagen miktarı 1, 7, 14 ve 28. günde; Ca⁺² birikimi kolorimetrik ölçümler aracılığı ile 14 ve 28. günde ve ALP, COL1, OCN ve OPN gen ekspresyon seviyeleri gerçek zaman PCR ile 7, 14 ve 28. günde yapılmıştır. Buna göre BnHAp katkılı PBAT doku iskelesinin ALP aktivitesi 7, 14 ve 28. günde diğer iki gruba göre artmış; kollagen miktarı 7 ve 28. günde diğer iki gruba göre, 7 ve

14. günde ise sadece PBAT doku iskelesi grubuna göre artmış ve biriken Ca^{+2} miktarı 7. günde sadece PBAT grubuna göre, 28. günde ise her iki gruba göre artmıştır. Gerçek zamanlı PCR sonuçları değerlendirildiğinde, ALP ekspresyonu 7. günde BnHAp-PBAT grubunda PBAT ile karşılaştırıldığında artmış, HAp-PBAT grubu ile karşılaştırıldığında ise azalmıştır; 24. günde ALP ekspresyonunda bir fark saptanmamıştır; 28. günde ise BnHAp-PBAT grubunda ALP ekspresyon seviyesi her iki gruba göre artmıştır. COL1, OCN ve OPN gen ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde BnHAp-PBAT doku iskelesi grubunda yalnızca 28. günde artış gözlenmiştir [122]. Başka bir çalışmada B nitrit nanotüplerin 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 25 µg/ml dozlarının sıçan kemik iliği MKH'lerinin osteojenik farklılaşmasına etkisi ALP aktivitesini 7 ve 14. günde ve OCN protein konsantrasyonu 14. günde spektroskopik yöntem ile değerlendirilmiştir. Alkalen fosfataz aktivitesini 7. günde hiçbir dozun etkilemediği, 14. günde 1 µg/ml ve 2 µg/ml dozlarında ALP aktivitesini arttırdığı ve 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 25 µg/ml dozlarında doz arttıkça ALP aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada 10 µg/ml dozunda B nitrit nanotüplerin 14. günde OCN ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir [145]. Bu tez çalışması kapsamında 0,9– 900 µg/ml doz aralığında uygulanan BnHAp kompozitler, biyomalzeme uygulanmamış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında osteojenik farklılaşmayı uyarmamıştır. Bu tez çalışmasında, BnHAp kompozitin 21. günde, 0,9 µg/ml, 9 µg/ml ve 900 µg/ml dozu MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını aynı dozda uygulanan nHAp kompozite ve BA'e göre 21. günde arttırmıştır. Tunçay vd.'nin çalışmasında, BnHAp kompozit içeren kitosan doku iskelerinin, HAp kompozit içeren kitosan doku iskelelerinin ve kitosan doku iskelelerinin MC3T3-E1 hücrelerine etkisi incelenmiştir. Bu doğrultuda osteojenik farklılaşma belirteçleri olan Runx2, OCN, COL1 ve OPN gen ekspresyonları gerçek zamanlı PCR yöntemi ile 7, 14 ve 21. günde değerlendirilmiştir. Yedinci günde, BnHAp- kitosan doku iskelesi, kitosan iskelesi ile karşılaştırıldığında COL1, Runx2, OCN ve OPN ekspresyonlarını arttırmış, HAp- kitosan doku iskeleleri ile karşılaştırıldığında yalnızca OPN ekspresyon seviyesini arttırmıştır. On dördüncü günde BnHAp- kitosan doku iskelesi, kitosan iskelesi ile karşılaştırıldığında COL1, OCN ve OPN ekspresyonlarını arttırmış, HAp- kitosan doku iskeleleri ile karşılaştırıldığında sadece COL1 gen ekspresyon seviyesini arttırmıştır. Yirmi birinci günde, BnHAp-kitosan doku iskelesi, kitosan iskelesi ile karşılaştırıldığında COL1, OCN ve OPN ekspresyonlarını arttırmış, HAp- kitosan doku iskeleleri ile karşılaştırıldığında ise sadece COL1 gen ekspresyonunda artış gözlenmiştir [117]. Tunçay vd.'nin çalışmasında doku iskelesi uygulanmamış kontrol grubu verilmemiş yalnızca kullanılan doku iskelelerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Bu tez çalışmasında osteojenik farklılaşma için erken belirteç

olan ALP aktivitesinin seçilmesi, bu belirtecin spektroskopik bir yöntem aracılığı ile ölçülmesi ve tekrar sayısının yeterli olmaması BnHAp kompozitin literatürde verilen örneklerden farklı bir sonuç alınmasına neden olduğu düşünülmüştür.

Boru 4, 7 ve 10. günde 1,25 µg/ml, 0,5 µg/ml ve 0,25 µg/ml dozunda salan, B ile güçlendirilmiş CaSiO₃ seramiklerin titanyum partiküllerin yüzey kaplamasında kullanılarak uygulandığı MC3T3-E1 hücrelerinde 4, 7 ve 10. günde kollagen boyaması ile, 7 ve 14. günde ALP aktivitesinin ölçümü ile ve 4 ve 7. günde gerçek zamanlı PCR ile Runx2, BSP, OCN ve BMP7 ekspresyon seviyeleri ölçülerek osteojenik farklılaşmaya etkisi değerlendirilmiştir. Kollagen boyaması sonucunda 4 ve 10. günde B içeren seramiklerde kollagen miktarının arttığı ve B'ü yüksek oranda salmış olduğu 4. günde, 10. güne göre kollagen miktarının daha fazla olduğu saptanmıştır. Alkalen fosfataz aktivitesinin 7. günde B içeren grupta daha fazla olduğu gösterilmiştir. Gerçek zamanlı PCR ile gen ekspresyonlarının ölçümü sonucunda B katkılı seramiğin 1,25 µg/ml dozda B saldığı 4. günde, Runx2 ve BMP7'nin arttığı, BSP ve OCN'nin ekspresyon seviyelerinde değişim olmadığı saptanmıştır; B katkılı seramiğin 0,5 µg/ml dozda B saldığı 7. günde, Runx2, BSP, OCN ve BM7 gen ekspresyonlarının hepsinde artış tespit edilmiştir [132]. Osteojenik farklılaşmanın gen düzeyinde ifadesinin değerlendirilmesi daha hassas bir sonuç vermesi ve tekrar sayısını güçlendirmesi açısından daha anlamlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Bu tez çalışmasında BnHAp kompozitler uygulanan nHAp kompozit ve BA ile karşılaştırıldığında 7. günde 900 µg/ml doz BnHAp kompozit'in osteojenik farklılaştırmayı 900 µg/ml doz HAp ve 6 µg/ml doz BA'e göre arttırmış fakat istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Aynı karşılaştırma 21. günde yapıldığında 0,9 µg/ml, 9 µg/ml ve 900 µg/ml doz BnHAp kompozitin sırasıyla 0,9 µg/ml, 9 µg/ml ve 900 µg/ml doz nHAp kompozit ve 0,006 µg/ml, 0,06 µg/ml ve 6 µg/ml doz BA'ten daha yüksek oranda osteojenik farklılaşmayı arttırdığı saptanmış fakat anlamlı fark bulunamamıştır. Bu artışın anlamlı bulunamamasının nedeni tekrar sayısının azlığı olabilir.

Bor içeren nHAp kompozitin osteojenik farklılaşmayı desteklediği ve antiproliferatif etki göstermediği 0,9 µg/ml dozu, BnHAp kompozitin hücre içi etki mekanizmasının incelenmesi için seçilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SORUSU: Yukarıda etkili olduğu belirlenen dozlardaki BA, nHAp ve BnHAp kompozitler insan osteosarkom SaOS-2 osteoblastlarında hangi moleküler mekanizmayı kullanmaktadır?

Borik asit, nHAp ve BnHAp kompozitlerin **SaOS-2 osteoblastlarda**, hücre içi moleküler mekanizması **transkriptom analizi ile 1. günde** incelendiğinde, BnHAp kompozitin hücre içinde Smad7'nin inhibisyonu aracılığıyla Wnt sinyal yolağının aktivitesini gerçekleştirdiği saptanmıştır.

Hücre proliferasyonunda rol oynayan genlerin etkileri incelendiğinde, CCND2 ve JUND gen ekspresyon seviyelerinde değişim gözlenmiştir. Bor içeren nHAp kompozit CCND2 ekspresyon seviyesini arttırmış; nHAp kompozit JUND ekspresyon seviyesini azaltmış ve BA gen ekspresyon seviyelerini değiştirmemiştir. CCND2, hücre siklusunda G₁/S geçişinde görev alan ve proliferasyonu arttıran siklin D1 proteinini kodlamaktadır [140, 141]. JUND, siklin D1'in transkripsiyonunu inhibe ederek antiproliferatif etki göstermektedir [142, 143]. Bu bulgular, BnHAp kompozitin proliferatif etkisinin nHAp bileşeninden kaynaklandığını düşündürmektedir. 2.2.1. numaralı iş paketi kapsamında 0,9 µg/ml BnHAp kompozitin osteoblast proliferasyonunu nHAp, BA ve biyomalzeme uygulanmamış gruplara göre arttırdığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gösterilmiştir. Transkriptom verileri, proliferasyon sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde BnHAp kompozitin gösterdiği proliferatif etkinin nHAp kompozitten kaynaklandığı söylenebilir. Proliferasyon verileri, nHAp kompozitlerin proliferasyonu desteklediği bildirilen çalışmalar ile uyumludur [42, 134, 144]. Diğer yandan transkriptom verileri bu tez çalışması ile ilk kez ortaya konmuştur.

Hücre farklılaşmasında rol oynayan genlerin etkileri incelendiğinde, Ca bağlama proteini olan ALG-2'nin yerleşimi ve hücre içi Ca²⁺ seviyesini düzenleyen MAP1B'nin BnHAp, nHAp ve BA uygulaması ile azaldığı saptanmıştır. Buna göre BnHAp kompozitin bu etkisinden, hem nHAp hem de BA'nin sorumlu olduğu düşünülmüştür [145, 146]. SEMA6D'nin osteoklastlarda eksprese edilerek komşu osteoklastların farklılaşmasını uyardığı bilinmektedir Ancak SEMA6D'nin osteoblastlardaki etkisi üzerine literatürde bir bilgi yer almamaktadır. Bu tez çalışmasında SEMA6D'nin BnHAp kompozit ve BA uygulamasıyla arttığı gösterilmiştir. Bu nedenle BnHAp'ın bu etkisinin BA kaynaklı olduğu düşünülmüştür. BnHAp kompozit uygulaması sonucunda bir transkripsiyon faktörü olan ELK3'ün ekspresyon seviyesinin azaldığı, nHAp kompozit ve BA uygulamasıyla ekspresyon seviyesinin değişmediği saptanmıştır. Zhang vd., biyoinformatik yaklaşım ile

osteoporotik biyolojik belirteçlerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmada, osteoporotik hastaların MKH'lerinde ELK3'ün ekspresyon seviyelerinin arttığını göstermiştir[148]. Bu iki çalışma birlikte değerlendirildiğinde BnHAp kompozitin osteoporotik belirteç olarak gösterilen ELK3'ün ekspresyon seviyesini azalttığı ve bu nedenle osteoblastlar üzerinde osteojenik farklılaşma açısından olumlu etkileri olduğu çıkarımı yapılabilir. MAPK9 osteojenik farklılaşmada görev alan MAP kinaz ailesine ait protein kodlayan bir gendir [149, 150]. Bu tez çalışması kapsamında BnHAp kompozit uygulamasıyla MAPK9'un ekspresyon seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Nanometre boyutundaki HAp kompozit ve BA uygulaması ile MAPK9 ekspresyon seviyeleri değişmemiştir. ELK3 ve MAPK9 ekspresyon seviyelerinin nHAp kompozit ve BA ile değişmeyip BnHAp kompozit ile azalması, B'nin BnHAp kompozitten az miktarda salınması nedeniyle olabilir. SOX6, kondrositlerin proliferasyon aşamasında tip II kollagenin sentezi ve birikimini uyaran bir transkripsiyon faktörüdür. Zhang vd., SOX6'nın osteoblastların proliferasyonunu uyardığını göstermiştir [151]. Osteoporozun biyolojik belirteçlerinin araştırıldığı diğer çalışmalarda SOX6'nın duyarlı gen (*susceptibility gene*) olarak ifade edilerek osteoporozda rol oynayabileceği bildirilmiştir [152-154]. Bu tez çalışmasında SOX6 gen ekspresyon seviyesinin BnHAp kompozit ve BA uygulanan hücrelerde arttığı, nHAp kompozit uygulanan hücrelerde ise değişmediği saptanmıştır. Buna göre BnHAp kompozitin SOX6 üzerindeki etkisinin kaynağının BA olabileceği sonucuna varılmıştır.

Osteojenik farklılaşmada rol oynayan sinyal yolları incelendiğinde, Wnt ve TGF- β sinyal yollarında sırasıyla BnHAp kompozit 7 ve 1; nHAp kompozit 3 ve 2; BA her iki yolakta da 1 genin ekspresyonunu etkilemiştir. Hücre içinde Smad7, T β RI'e bağlanarak reseptörün yıkımına neden olur ve TGF- β sinyal yolağının aktivitesini durdurur [11, 26]. Bu tez çalışmasında, B içeren nHAp kompozitin, TGF- β sinyal yolağının inhibisyonuna neden olan Smad7 geninin ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Yano vd. çalışmasında, MC3T3-E1 hücrelerinde Smad7 gen ekspresyonu arttırılarak, bunun osteojenik farklılaşmaya etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda 2. günde spektroskopik yöntem ile hücre içi ALP aktivitesi, 14. günde Alizarin red ve von Kossa yöntemleri ile mineralizasyon, gerçek zamanlı PCR ile COL1 ve ALP gen seviyeleri değerlendirilmiştir. Buna göre Smad7 ekspresyonu arttırılmış hücrelerde ALP aktivitesi, mineralizasyon ve COL1 ve ALP gen ekspresyonunun kontrole göre azaldığı saptanmıştır [155]. Sonuç olarak Smad7'nin antiosteojen etkili olduğu bildirilmiştir. Vishal vd., insan kemik iliği kökenli MKH'lerin osteojenik farklılaşmasında Runx2'yi hedefleyen mirRNA'ların rolünü incelemiştir.

İncelenen hücrelerde, osteojenik farklılaşma sırasında miR-590-5p'nin ekspresyon seviyesi artmaktadır. Bu nedenle fare kemik iliği MKH'lerinde miR-590-5p'nin etkili olduğu yolak araştırılmıştır. Bunun için, fare kemik iliği MKH'leri miR-590-5p ile transfekte edilmiş ve transfeksiyon sonrası 3. günde Alizarin red yöntemi ile mineralizasyon oranları, gerçek zamanlı PCR yöntemi ile ALP ve COL1 gen seviyeleri incelenmiştir. Yolağın değerlendirilmesi için BMP2, Sirt1, Dkk2, TGFβI, BMP2R, Runx2 ve Smad7 'ye ait protein seviyeleri western blot yöntemi ile incelenmiştir. Buna göre miR-590-5p, Smad7 geninin ekspresyonunu azaltırken, BMP2, Sirt1, Dkk2, TGFβI, BMP2R ve Runx2'nin ekspresyonunu arttırmıştır [140]. Bu tez çalışması kapsamında 0,9 µg/ml BnHAp ile Smad7 gen ekspresyonu, nHAp kompozit ve BA kontrole göre azalmıştır. Aynı grupta TGF-β ve Wnt sinyal yolları da uyarılmıştır. Bu bulgular, Vishal vd. ve Yano vd.'nin bulguları ile uyumludur. Smad7 inhibisyonu sonucunda Wnt ve TGF-β sinyal yollarının uyarıldığı görülmektedir. Literatürde **BnHAp kompozitin hücre içi moleküler mekanizmasını** inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Grubumuzca, Ciftci vd. tarafından yapılan çalışmada BnHAp kompozitlerin MKH'ler tarafından hücre içine sitoplazmik uzantılar aracılığı ile alındığı gösterilmiş; ancak hücre içi etki mekanizması incelenmemiştir [69]. Bor içeren biyomalzemelerin hücre içi mekanizmasına ait literatürde sınırlı sayıda çalışma yer almaktadır [118, 119]. Yin vd.,'nin çalışmasında ovariyetomi yapılmış dişi Wistar sıçanlarında kritik boyutta femoral defekt oluşturulmuş ve B içeren mezaporlu biyoaktif camı seramikler (B-MBG) implante edilerek RNA- sekans yöntemi ile kemik rejenerasyonunda etkisi ve izlediği mekanizma *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) aracılığıyla 2. ayda değerlendirilmiştir. Buna göre elde ettikleri gen ekspresyonlarının Wnt/ β-katenin sinyal yolağına ait olduğunu ve bu yolda Setd7 geni aracılı olarak osteojenik farklılaşmanın arttığı bildirilmiştir Osteojenik farklılaşmaya etkisi 100 µg/ml dozda B-MBG ile uyarılmış Setd7 geninin, RT-PCR yöntemi ile insan kaynaklı MKH'lerde ALP, Runx2 ve OCN gen ekspresyon seviyesi 7. günde incelenmiştir. Buna göre Setd7 gen ekspresyon seviyesi ile birlikte ALP, Runx2 ve OCN gen ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiştir [119]. Bu tez çalışması kapsamında BnHAp kompozitin osteoblastlarda etkisi, uygulamadan sonra 1. günde değerlendirildiğinde transkriptom analizinde Setd7 gen ekspresyon seviyesinde bir farklılık görülmemiş; diğer yandan Yin vd.'nin çalışmasını destekleyecek şekilde Wnt sinyal yolağını uyardığı bu tez çalışmasında saptanmıştır. Çalışmanın farklı koşullarda yapılması (Yin vd.'de *in vivo*, çalışmamızda insan kökenli SaOS-2 osteoblast hücrelerinde *in vitro*), değerlendirme yönteminin farklılığı ve değerlendirilen zaman aralığı (Yin vd.'de 2. ay, çalışmamızda 1. gün), Setd7 geninin

ekspresyon seviyesinde değişim görülmemesinin nedeni olabilir. Doğan vd., 3T3-L1 fare kökenli adiposit öncülü hücre dizisinde BA ve NaB'nin 1000  g/ml dozunda 1 ve 2. günde transkriptom analizi ile B'un  -katenin ekspresyonunu arttırarak adipojenik farklılaşmayı inhibe ettiğini göstermiştir [118]. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen transkriptom verileri BnHAp kompozitin Wnt ile ilişkili yolaklarda BA ve nHAp kompozite göre daha fazla genin aktivitesini daha yüksek oranda uyardığı gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında BnHAp kompozitin Wnt sinyal yolağını uyardığı saptanmıştır. Buna göre, tez çalışmasında elde edilen bulgular Yin vd. ve Doğan vd.'nin verilerini destekler niteliktedir.

Bu tez çalışmasında **nHAp kompozitin**, Wnt sinyal yolağında rol oynayan CSNK2A1 gen ekspresyon seviyesini arttırdığı, ITPR3 ve CSNK1D'yı azalttığı, PPP2R5A, PYGO1, CSNK1G3, TCF7L2, TLE1, CSNK1A1L ve ITPR1 gen ekspresyon seviyelerini değiştirmediği; TGF-  sinyal yolağında rol oynayan Smad7'yi arttırdığı, MAPK9'u değiştirmediği saptanmıştır. Literatürde nHAp kompozitin yapısında yer alan kalsiyum fosfat bileşiklerini içeren biyomalzemelerin hücre içi etki mekanizmasına ait sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır [156-159]. Miron vd. MG-63 insan osteosarkom hücre hattında bifazik trikalsiyum fosfat (BCP) partiküllerin 1. günde kemik mineralizasyonunda, hücre büyümesinde ve farklılaşmasında etkilediği genler *microarray* yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bunun için 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına yüzey alanını kaplayacak biçimde 500 mg dozda BCP partikülü eklenmiş ve partiküllerin üzerine hücreler ekilmiştir. BCP uygulanan grupta, BCP uygulanmamış gruba göre biglikan, BMP-1, -2, -4, -6 ve -7, Col1a1, Col1a2, Col2a1 ve Col5a1, CSF-2, FGFR2, fibronektin, *GLI family zinc finger I*, ICAM1, IGFR1, integrin - 1,- 2 ve - 3, MMP2 ve MMP9, NFKB1, SOX9, TGF RII, VEGFA ve VEGFB'nin gen ekspresyon seviyelerinin 1,5- 2,5 kat arasında arttığı saptanmıştır [156]. Bu tez çalışması kapsamında nHAp partiküllerin kontrolle karşılaştırıldığında, SOX6 ekspresyonunu değiştirmediği gösterilmiştir. Bu veri daha önce rapor edilmemiştir. Huang vd., HAp yapısı içeren insan parçalı dentinini, kraniyal defekt oluşturdukları Yeni Zelanda beyaz tavşanlarına implante etmiş ve implantasyon sonrası 3, 5 ve 7. günde *microarray* yöntemi ile kemikteki gen ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Buna göre 3. günde, BMP-2, OPN, RANKL, IL1RN; 5. günde IL1RN ve CCL2; 7.günde IL1RN ve Col1a gen ekspresyonlarında 2 kat veya üstünde artış görülmüştür [158]. Bu tez çalışmasında nHAp kompozitin, Huang vd.'nin gen ekspresyon seviyesinde artış gördüğü CCL2'nin aynı sitokin ailesine ait olan CCL7 gen ekspresyon seviyesini arttırdığı saptanmıştır. Huang vd.'nin elde ettiği diğer bulgular, bu çalışma kapsamında transkriptom

analizinde saptanamamıştır. Groen vd., osteojenik etkileri bilinen 23 biyomalzemenin MG-63 osteosarkom hücre hattındaki osteoindüktif etkilerini *microarray* yöntemi ile değerlendirmiştir. Değerlendirme sonucunda gen ekspresyonlarının ait olduğu sinyal yolaklarının saptanması için KEGG kütüphanesi kullanılmıştır. Buna göre, kalsiyum fosfat yapısında bulunan biyomalzemelerin TGF- β ve Wnt sinyal yolağını aktive ettikleri ve hücre adezyon kinetiklerini FAK sinyal yolağı aracılı olarak gerçekleştirdikleri saptanmıştır [160]. Zhang vd., domuz kemiğinden elde ettikleri HAp'in 1, 2 ve 3. günde transkriptomik ve proteomik profilleri *microarray* yöntemi ile fare kemik iliği kaynaklı MKH'lerde değerlendirmiştir. Buna göre HAp'in MAPK ve JNK MAPK yolaklarını etkileyerek osteojenik farklılaşmayı uyardığı, MAPK yolaklarında miR-185, miR-222, miR-221'nin rol oynayabileceği saptanmıştır. MAPK yolağında ATF4, Fos, JUN, ATF2 transkripsiyon faktörlerinin ve ALP, SOX9, Col1 ve GPNMB, HMGA1 gen ekspresyonlarının osteojenik farklılaşmada rol oynadığı saptanmıştır [159]. Bu tez çalışmasında nHAp kompozitin, Wnt sinyal yolağında rol oynayan CSNK2A1 gen ekspresyon seviyesini arttırdığı, ITPR3 ve CSNK1D'yi azalttığı; TGF- β sinyal yolağında rol oynayan Smad7'yi arttırdığı, MAPK9'u değiştirmedeği saptanmıştır. Miron vd., Huang vd. ve Zhang vd.'nin çalışmalarında elde edilen bulgular bu tez çalışması kapsamında elde edilememiştir. Buna, değerlendirme yapılan zamanın farklılığı ve kullanılan kalsiyum fosfat birleşiklerin farklı yapısının neden olabileceği düşünülmüştür.

Hücre stresinde rol oynayan sinyal yolakları incelendiğinde bu tez çalışmasında ubikütin proteazom yolağında rol oynayan 7 gen ve strese karşı oluşan cevapta 17 genin ekspresyon seviyelerinde değişim gözlenmiştir. Uygulanan biyomalzemelerin, **ubikütin proteazom yolağında** rol oynayan genlere etkileri incelendiğinde BnHAp kompozit uygulamasının PSMC6, UBE2B, PSMD6, PSMC4 gen ekspresyon seviyelerini arttırdığı, UBA6, UBE2E1 ve UBE2D1'i değiştirmedeği; nHAp kompozit uygulamasının ubikütin proteazom yolağına ait gen ekspresyon seviyelerini değiştirmedeği; BA uygulamasının PSMC6 ve UBE2E1'i arttırdığı, UBA6 ve UBE2D1'i azalttığı, UBE2B, PSMD6 ve PSMC4'ü etkilemediği saptanmıştır. Buna göre BnHAp kompozitin ubikütin proteazom yolağıyla ilişkisini BA'in etkisiyle kurduğu söylenebilir. Ubikütin proteazom yolağı, hücre içinde zarar görmüş proteinlerin yıkımından sorumludur [161]. Tez çalışmasında BnHAp kompozit uygulamasının FIGN, HSF2, DCLRE1B, WTIP, NR1H3, STK35 ve GTF2H2C'yi arttırdığı; nHAp kompozitin CCL7, HIC1, CEBPA ve PTGIR'i arttırdığı, ANKRD17 ve SOD1'i azalttığı; BA uygulamasının STK35'i arttırdığı, XRCC6, RFC5 ve BLM'yi azalttığı

saptanmıştır. Buna göre BnHAp kompozitin stres cevabında görev alan gen ekspresyon seviyelerine etkisinin nHAp kompozitin etkisiyle gerçekleştiği söylenebilir.

Nanometre boyutunda HAp kompozitin hücre stresine etkisinin incelendiği çalışmalar literatürde sınırlı sayıda bulunmaktadır [162, 163]. Turkez vd., insan lenfositlerinde nHAp partiküllerin 300, 500 ve 1000 ppm dozlarda 3. günde oksidatif strese neden olduğunu bildirmiştir [162]. Xu vd., C6 sıçan glioma hücrelerinde 12 saatte 10, 100, 250 ve 500 µg/ml dozda nHAp'in reaktif oksijen türlerine etkisini *dichlorodihydrofluorescein diacetate* yöntemi ile değerlendirmiş ve nHAp'in reaktif oksijen türlerinin hücre içindeki oranını doz bağımlı olarak arttırarak oksidatif strese neden olduğunu saptamıştır [163]. Bu tez çalışmasında nHAp kompozitin hücre içinde strese neden olduğu bulgusu Turkez vd. ve Xu vd.'nin bulgularıyla uyumludur.

Borik asitin bu tez çalışmasında hücre stresine cevap oluşturan yolakta etkisi incelendiğinde STK35 gen ekspresyon seviyesini arttırdığı, XRCC6, RFC5 ve BLM'yi azalttığı ve ANKRD17, FIGN, SOD1, CCL7, HSFX2, DCLRE1B, WTIP, HIC1, CEBPA, PTGIR, NR1H3 ve GTF2H2C'yi etkilemediği saptanmıştır. Borik asitin hücre içi etki mekanizmasının araştırıldığı Henderson vd.'lerinin çalışmasında, DU-145 prostat kanseri hücre hattına 10 µM, 50 µM ve 250 µM dozda BA uygulaması sonrası 1. günde TEM ile hücrelerde endoplazma retikulumunun ince yapısı incelenmiştir. Borik asitin doz bağımlı olarak endoplazma retikulumu sisternalarını genişlettiği saptanmıştır. Bu bulgu, endoplazma retikulumu stresi lehine değerlendirilmiştir. Birinci günde akım sitometrisi yöntemi ile BA'in hücre siklusundaki etkileri incelendiğinde 50 µM dozda G₁, S ve G₂/M fazlarında etkisiz olduğu gözlenmiştir. Endoplazma retikulumu stresinin alt yolları RT-PCR yöntemi ile değerlendirildiğinde, 1. günde 10 µM BA'in eIF2α fosforilasyonunu zaman bağımlı biçimde uyarak ATF4 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [164]. Bu tez çalışması kapsamında BA'in, hücre siklusunda rol oynayan genlerin ve ATF4 gen ekspresyonunu etkilemediği saptanmıştır. Buna göre bu tez çalışmasında elde edilen BA'in hücre siklusunu etkilemediği bulguları Huang vd.'nin bulgularını desteklemekte; ATF4 gen ekspresyon seviyesine ait bulgular ise desteklememektedir. Başka bir çalışmada, 10 µM dozda BA'in DU-145 prostat kanseri hücre hattında endoplazma retikulumu stresi ile ilgili yollarla görev alan genlerin hedef proteinlerinin seviyeleri western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. Buna göre BA'in eIF2α fosforilasyonunu uyardığı, endoplazma retikulumunda Ca⁺² bağlayıcı protein olarak görev alan GRP78/BiP ve ATF4'ün transkripsiyon ve translasyonunu, ATF6'nın translasyonunu arttırdığı; IRE1'in translasyonunu değiştirmedeği saptanmıştır. Aynı

çalışmada BA'in apoptotik bir gen olan CHOP'un ekspresyonunu azalttığı gözlenmiştir. Bu bulgular doğrultusunda BA'in 10 µM dozda, DU-145 prostat kanseri hücrelerinde katlanmamış protein cevabına neden olduğu bildirilmiştir [165]. Bu tez çalışması kapsamında BA'in hücre içi etkileri değerlendirildiğinde endoplazma retikulumu stresine bağlı katlanmamış protein yanıtına yönelik herhangi bir transkriptom verisi elde edilmemiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, BnHAp kompozitten B'un ilk günde genel olarak 0,01 µg/ml dozda salındığı, bu dozun osteoblastlarda proliferasyonu etkilemediği izlenmiştir. Borik asit tek başına 0,006- 6 µg/ml doz aralığında osteoblastlarda 3. güne kadar proliferasyonu etkilememiş, 5. günde 0,006- 0,6 µg/ml doz aralığında antiproliferatif etki göstermiş; MKH'lerde proliferasyonu 5. güne kadar etkilememiştir. Nanometre boyutundaki HAp kompozit tek başına 0,9- 900 µg/ml doz aralığında osteoblastlarda 3. güne kadar proliferasyonu etkilememiş, 5. günde 0,9- 90 µg/ml doz aralığında antiproliferatif etki göstermiştir; MKH'lerde 3. güne kadar proliferasyonu etkilememiş, 5. günde 90- 900 µg/ml doz aralığında proliferasyonu arttırmıştır. Bor içeren nHAp kompozit 0,9- 900 µg/ml doz aralığında osteoblastlarda 3. güne kadar proliferasyonu etkilememiş, 5. günde 0,9- 90 µg/ml doz aralığında antiproliferatif etki göstermiş; MKH'lerde 1. günde proliferasyonu etkilememiş, 3. günde 900 µg/ml dozda ve 5. günde 90- 900 µg/ml doz aralığında proliferasyonu arttırmıştır. Borik asit 7. günde 0,006 µg/ml dozda uygulandığında MKH'lerde osteojenik farklılaşma belirteci olan ALP aktivitesini farklılaşma besiyeri uygulanan kontrol grubuna göre arttırmış; 14 ve 21. günde 0,006- 0,6 µg/ml doz aralığında ise azaltmıştır. Nanometre boyutundaki HAp kompozit tek başına MKH'lerde ALP aktivitesini farklılaşma besiyeri uygulanan kontrol grubuna göre 7. günde 0,9- 900 µg/ml doz aralığında etkilememiş, 14 ve 21. günde 0,9- 900 µg/ml doz aralığında azaltmıştır. Bor içeren nHAp kompozit MKH'lerde ALP aktivitesini farklılaşma besiyeri uygulanan kontrol grubuna göre 7. günde 0,9- 900 µg/ml doz aralığında etkilememiş, 14. günde 0,9- 900 µg/ml doz aralığında azaltmış, 21. günde 9- 900 µg/ml doz aralığında azaltmıştır. Bor içeren nHAp kompozit 0,9 µg/ml dozu osteoblastlarda 1. günde, nHAp kompozit ve BA'in eşdeğer dozuna göre Smad7 ekspresyon seviyesini azaltmış, TGF-β ve Wnt sinyal yollarını uyarmış ve hücrede strese yol açmıştır.

Yapılan çalışma *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiş olup, vücutta *in vivo* ortamdaki kemik fizyolojisi ve metabolizmasına ait parametreleri birebir yansıtmamaktadır. Bu sınırlama nedeniyle *in vitro* koşullar çerçevesinde B içeren nHAp'in metabolik ya da travmatik kemik

kayıplarındaki kullanımı ile ilgili olarak çıkarımlar yapılmıştır. Bu tez çalışması kapsamında belirlenen güvenli osteokondüktif doz penceresi *in vivo* koşullarda test edilerek, BnHAp kompozitlerin uzun dönemde etkilediği sinyal yolakları araştırılmalıdır.



SONUÇ:

1. Bu çalışmada 0,9- 900 µg/ml dozdaki BnHAp kompozitlerden 1 saat içinde ani olarak 0,01- 0,2 µg/ml doz aralığında salındığı, bundan sonra 1- 5 gün arasında salımın düşük dozda (yaklaşık 0,02- 0,5 µg/ml) sabit olarak devam ettiği saptanmıştır.
2. Borik asit, 3. güne kadar osteoblastların proliferasyon oranını değiştirmemiştir. Beşinci günde antiproliferatif etki göstermiştir.
3. Nanometre boyutundaki HAp kompozit, 3. güne kadar osteoblastların proliferasyon oranını etkilememiştir. Beşinci günde antiproliferatif etki göstermiştir.
4. Bor içeren nHAp kompozit 3. güne kadar osteoblastların proliferasyon oranını değiştirmemiştir. Beşinci günde nHAp kompozitin antiproliferatif etki gösterdiği saptanmıştır.
5. Borik asit, MKH'lerde proliferasyonu etkilememiştir.
6. Nanometre boyutundaki HAp kompozit, MKH'lerde 5. günde yüksek dozlarda (90- 900 µg/ml) proliferasyonu arttırmıştır.
7. Bor içeren nHAp kompozit MKH'lerde 5. günde yüksek dozlarda (90- 900 µg/ml) proliferasyonu arttırmıştır.
8. Bor içeren nHAp kompozitler 7. günde 900 µg/ml dozda, nHAp kompozit ve BA'in eşdeğer dozlarına göre ve 14. günde BnHAp kompozit 0,9 µg/ml, 9 µg/ml ve 900 µg/ml dozda, nHAp kompozit ve eş değer dozda BA'e göre osteojenik farklılaşmayı arttırmıştır.
9. Bor içeren nHAp kompozit 1. günde 0,9 µg/ml dozda, nHAp kompozit ve BA'in eş değer dozları ile karşılaştırıldığında hücre içinde Smad7'nin inhibisyonuna neden olarak TGF-β ve Wnt sinyal yolağı üzerinden osteojenik etki göstermekte ve hücrede strese neden olmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Michael H. Ross, W.P., *Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. 6th ed. **2011**: Lippincott Williams & Wilkins.
2. Berna Kankilic, S.K., Petek Korkusuz, Muharrem Timuçin, Feza Korkusuz, *Mesenchymal stem cells and nano-bioceramics for bone regeneration. Current stem cell research & therapy*. Current Stem Cell Research & Therapy, **2016**.
3. Wade, S.W., et al., *Estimating prevalence of osteoporosis: examples from industrialized countries*. Arch Osteoporos, **2014**. 9: p. 182.
4. WHO, *WHO Scientific Group on the Assessment of Osteoporosis at Primary Health Care Level*. **2007**.
5. Tuzun S, E.N., Akarirmak U, Saridogan M, Senocak M, Johansson H, Kanis JA, *Incidence of hip fracture and prevalence of osteoporosis in Turkey: The FRACTURK study*. Turkish Osteoporosis Society, **2011**.
6. Albrektsson, T. and C. Johansson, *Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration*. Eur Spine J, **2001**. 10 Suppl 2: p. S96-101.
7. Rinaldo Florencio-Silva, G.R.d.S.S., Estela Sasso-Cerri, Manuel Jesus Simões, and Paulo Sérgio Cerri, *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. BioMed Research International, **2015**.
8. Teresita Bellido, L.I.P., Angela Bruzzaniti, *Basic and Applied Bone Biology*. **2014**: Academic Press.
9. Huang, W., et al., *Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation*. Front Biosci, **2007**. 12: p. 3068-92.
10. Katsimbri, P., *The biology of normal bone remodelling*. Eur J Cancer Care (Engl), **2017**. 26(6).
11. Yan, X., Z. Liu, and Y. Chen, *Regulation of TGF-beta signaling by Smad7*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), **2009**. 41(4): p. 263-72.
12. Mescher, A., *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. 14th ed. **2016**: McGraw Hill Professional.
13. Katsimbri, P., *Osteoblast and osteocyte: games without frontiers*. Archives of biochemistry and biophysics, **2017**.
14. Rochefort, G.Y., S. Pallu, and C.L. Benhamou, *Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue*. Osteoporos Int, **2010**. 21(9): p. 1457-69.
15. William Ovalle, P.N., *Netter's Essential Histology E-Book*. **2013**: Elsevier Health Sciences.
16. Leslie P. Gartner, J.L.H., *Color Atlas and Text of Histology*. 6th ed. **2014**: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
17. Kierszenbaum A, T.L., *Histology and cell biology*. 3rd ed. **2012**: Philadelphia, PA: Elsevier Saunders.
18. Boivin, G., *The hydroxyapatite crystal: a closer look*. . Medicographia, **2007**.
19. Anderson, H.C., *Matrix vesicles and calcification*. Curr Rheumatol Rep, **2003**. 5(3): p. 222-6.
20. Bala, Y., D. Farlay, and G. Boivin, *Bone mineralization: from tissue to crystal in normal and pathological contexts*. Osteoporos Int, **2013**. 24(8): p. 2153-66.
21. Runyan, C.M. and K.S. Gabrick, *Biology of Bone Formation, Fracture Healing, and Distraction Osteogenesis*. J Craniofac Surg, **2017**. 28(5): p. 1380-1389.
22. Wang, M., N. Yang, and X. Wang, *A review of computational models of bone fracture healing*. Med Biol Eng Comput, **2017**. 55(11): p. 1895-1914.
23. Marsell, R. and T.A. Einhorn, *The biology of fracture healing*. Injury, **2011**. 42(6): p. 551-5.

24. Oryan, A., S. Monazzah, and A. Bigham-Sadegh, *Bone injury and fracture healing biology*. Biomed Environ Sci, **2015**. 28(1): p. 57-71.
25. Majidinia, M., A. Sadeghpour, and B. Yousefi, *The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration*. J Cell Physiol, **2018**. 233(4): p. 2937-2948.
26. MacFarlane, E.G., et al., *TGF-beta Family Signaling in Connective Tissue and Skeletal Diseases*. Cold Spring Harb Perspect Biol, **2017**. 9(11).
27. Lamora, A., et al., *TGF-beta Signaling in Bone Remodeling and Osteosarcoma Progression*. J Clin Med, **2016**. 5(11).
28. Wu, M., G. Chen, and Y.P. Li, *TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease*. Bone Res, **2016**. 4: p. 16009.
29. Massague, J., *TGFbeta signalling in context*. Nat Rev Mol Cell Biol, **2012**. 13(10): p. 616-30.
30. Maryam Majidinia, J.A., Rana Jahanban-Esfahlani, Bahman Yousefi, *The roles of Wnt/ β -catenin pathway in tissue development and regenerative medicine*. Journal of Cellular Physiology, **2017**.
31. Leucht, P., S. Lee, and N. Yim, *Wnt signaling and bone regeneration: Can't have one without the other*. Biomaterials, **2018**.
32. Rossini, M., Gatti, D., & Adami, S., *Involvement of WNT/ β -catenin Signaling in the Treatment of Osteoporosis*. Calcified tissue international, **2013**.
33. Canalis, E., *Wnt signalling in osteoporosis: mechanisms and novel therapeutic approaches*. Nat Rev Endocrinol, **2013**. 9(10): p. 575-83.
34. Liu, T.M. and E.H. Lee, *Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development*. Tissue Eng Part B Rev, **2013**. 19(3): p. 254-63.
35. James, A.W., *Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation*. Scientifica (Cairo), **2013**. 2013: p. 684736.
36. Komori, T., *Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors*. J Cell Biochem, **2006**. 99(5): p. 1233-9.
37. Bruderer, M., et al., *Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis*. Eur Cell Mater, **2014**. 28: p. 269-86.
38. Vimalraj, S., et al., *Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation*. Int J Biol Macromol, **2015**. 78: p. 202-8.
39. Komori, T., *Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors*. J Cell Biochem, **2005**. 95(3): p. 445-53.
40. Galindo, M., et al., *The bone-specific expression of Runx2 oscillates during the cell cycle to support a G1-related antiproliferative function in osteoblasts*. J Biol Chem, **2005**. 280(21): p. 20274-85.
41. Kitazawa, R., et al., *Modulation of mouse RANKL gene expression by Runx2 and vitamin D3*. J Cell Biochem, **2008**. 105(5): p. 1289-97.
42. Yan Chen, Z.H., Xiaoming Li, Songjian Li, Zhilai Zhou, Yichen Zhang, Qing ling Feng, and Bo Yu, *In Vitro Biocompatibility and Osteoblast Differentiation of an Injectable Chitosan/Nano-Hydroxyapatite/Collagen Scaffold*. Journal of Nanomaterials, **2012**.
43. Otto F, T.A., Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ., *Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development*. Cell, **1997**.
44. Komori, T., et al., *Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts*. Cell, **1997**. 89(5): p. 755-64.

45. Takarada, T., et al., *An analysis of skeletal development in osteoblast-specific and chondrocyte-specific runt-related transcription factor-2 (Runx2) knockout mice*. J Bone Miner Res, **2013**. 28(10): p. 2064-9.
46. Adhami, M.D., et al., *Loss of Runx2 in committed osteoblasts impairs postnatal skeletogenesis*. J Bone Miner Res, **2015**. 30(1): p. 71-82.
47. Komori, T., *Roles of Runx2 in Skeletal Development*. Adv Exp Med Biol, **2017**. 962: p. 83-93.
48. Li, D., et al., *Enhanced biocompatibility of PLGA nanofibers with gelatin/nano-hydroxyapatite bone biomimetics incorporation*. ACS Appl Mater Interfaces, **2014**. 6(12): p. 9402-10.
49. Rutkovskiy, A., Stensl kken, K. O., Vaage, I. J. , *Osteoblast Differentiation at a Glance*. Medical Science Monitor Basic Research, **2016**.
50. Jensen, E.D., R. Gopalakrishnan, and J.J. Westendorf, *Regulation of gene expression in osteoblasts*. Biofactors, **2010**. 36(1): p. 25-32.
51. Nakashima K1, Z.X., Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B., *The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation*. Cell, **2002**.
52. Ameri, K. and A.L. Harris, *Activating transcription factor 4*. Int J Biochem Cell Biol, **2008**. 40(1): p. 14-21.
53. St-Arnaud, R. and B. Hekmatnejad, *Combinatorial control of ATF4-dependent gene transcription in osteoblasts*. Ann N Y Acad Sci, **2011**. 1237: p. 11-8.
54. Wortel, I.M.N., et al., *Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells*. Trends Endocrinol Metab, **2017**. 28(11): p. 794-806.
55. Frank, C.L., et al., *Control of activating transcription factor 4 (ATF4) persistence by multisite phosphorylation impacts cell cycle progression and neurogenesis*. J Biol Chem, **2010**. 285(43): p. 33324-37.
56. Xiao G, J.D., Ge C, Zhao Z, Lai Y, Boules H, Phimphilai M, Yang X, Karsenty G, Franceschi RT., *Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression*. . Journal of Biological Chemistry, **2005**.
57. Yang, X., Karsenty, G. , *ATF4, the osteoblast accumulation of which is determined post-translationally, can induce osteoblast-specific gene expression in non-osteoblastic cells*. Journal of Biological Chemistry, , **2004**.
58. Yang, X., Matsuda, K., Bialek, P., Jacquot, S., Masuoka, H. C., Schinke, T., Hanauer, A. , *ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology: implication for Coffin-Lowry syndrome*. Cell, **2004**.
59. Rached, M.T., et al., *FoxO1 expression in osteoblasts regulates glucose homeostasis through regulation of osteocalcin in mice*. J Clin Invest, **2010**. 120(1): p. 357-68.
60. Yu, S., et al., *Critical role of activating transcription factor 4 in the anabolic actions of parathyroid hormone in bone*. PLoS One, **2009**. 4(10): p. e7583.
61. Khang, G., Kim, S. H., Kim, M. S., Lee, H. B. , *Hybrid, composite, and complex biomaterials for scaffolds*. In Principles of Regenerative Medicine **2008**.
62. L Hench, J.J., *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*. 1st ed. **2005**: Woodhead Publishing.
63. Johnna S. Temenoff, A.G.M., *Biomaterials: The Intersection of Biology and Materials Science*. 1st ed. **2008**.
64. Vallet-Regi, M., *Revisiting ceramics for medical applications*. Dalton Trans, **2006**(44): p. 5211-20.

65. Farokhi, M., et al., *Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering*. Biotechnol Adv, **2018**. 36(1): p. 68-91.
66. Mondal, S., S.V. Dorozhkin, and U. Pal, *Recent progress on fabrication and drug delivery applications of nanostructured hydroxyapatite*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, **2017**.
67. Sirin, H.T., et al., *Ti implants with nanostructured and HA-coated surfaces for improved osseointegration*. Artif Cells Nanomed Biotechnol, **2016**. 44(3): p. 1023-30.
68. Balcik, C., et al., *Early weight bearing of porous HA/TCP (60/40) ceramics in vivo: a longitudinal study in a segmental bone defect model of rabbit*. Acta Biomater, **2007**. 3(6): p. 985-96.
69. Zhong, Q., et al., *Degradation pattern of porous CaCO₃ and hydroxyapatite microspheres in vitro and in vivo for potential application in bone tissue engineering*. Colloids Surf B Biointerfaces, **2016**. 143: p. 56-63.
70. Ciftci, E., Köse, S., Korkusuz, P., Timuçin, M., & Korkusuz, F., *Boron Containing Nano Hydroxyapatites (Bn-HAp) Stimulate Mesenchymal Stem Cell Adhesion, Proliferation and Differentiation*. Key Engineering Materials, **2014**.
71. Szymonowicz, M., et al., *Cytotoxicity Evaluation of High-Temperature Annealed Nanohydroxyapatite in Contact with Fibroblast Cells*. Materials (Basel), **2017**. 10(6).
72. Bhuiyan, D.B., et al., *Bone regeneration from human mesenchymal stem cells on porous hydroxyapatite-PLGA-collagen bioactive polymer scaffolds*. Biomed Mater Eng, **2017**. 28(6): p. 671-685.
73. Dan, Y., et al., *Development of Novel Biocomposite Scaffold of Chitosan-Gelatin/Nanohydroxyapatite for Potential Bone Tissue Engineering Applications*. Nanoscale Res Lett, **2016**. 11(1): p. 487.
74. Korkusuz, P., S. Kose, and C.Z. Kopru, *Biomaterial and Stem Cell Interactions: Histological Biocompatibility*. Curr Stem Cell Res Ther, **2016**. 11(6): p. 475-486.
75. Martin, A.R., Vasseur, J. J., & Smietana, M. , *Boron and nucleic acid chemistries: merging the best of both worlds*. Chemical Society Reviews, **2013**.
76. Benderdour, M., et al., *In vivo and in vitro effects of boron and boronated compounds*. J Trace Elem Med Biol, **1998**. 12(1): p. 2-7.
77. Woods, W.G., *An introduction to boron: history, sources, uses, and chemistry*. Environ Health Perspect, **1994**. 102 Suppl 7: p. 5-11.
78. Müdörlüğü, E.M.İ.G., *Bor Sektör Raporu* **2013**.
79. Kurtoğlu, F., Kurtoğlu, V., Celik, I., Kececi, T., & Nizamlioğlu, M. , *Effects of dietary boron supplementation on some biochemical parameters, peripheral blood lymphocytes, splenic plasma cells and bone characteristics of broiler chicks given diets with adequate or inadequate cholecalciferol (vitamin D3) content*. . British poultry science, **2005**.
80. Hunt, C.D., *Dietary boron: progress in establishing essential roles in human physiology*. J Trace Elem Med Biol, **2012**. 26(2-3): p. 157-60.
81. Bozkurt, M., Küçükyılmaz, K., Çatlı, A. U., Çınar, M., Çabuk, M., & Bintaş, E., *Effects of boron supplementation to diets deficient in calcium and phosphorus on performance with some serum, bone and fecal characteristics of broiler chickens*. . Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, **2012**.
82. Ghanizadeh, G., et al., *The effect of supplementation of calcium, vitamin D, boron, and increased fluoride intake on bone mechanical properties and metabolic hormones in rat*. Toxicol Ind Health, **2014**. 30(3): p. 211-7.
83. Hulya Toker, H.O., Hatice Balci Yuce, Fahrettin Goze, *The effect of boron on alveolar bone loss in osteoporotic rats*. Journal of Dental Health, **2016**.

84. Nielsen, F.H., *Update on human health effects of boron*. J Trace Elem Med Biol, **2014**. 28(4): p. 383-7.
85. Naghii, M.R., G. Torkaman, and M. Mofid, *Effects of boron and calcium supplementation on mechanical properties of bone in rats*. Biofactors, **2006**. 28(3-4): p. 195-201.
86. Miljkovic, D., N. Miljkovic, and M.F. McCarty, *Up-regulatory impact of boron on vitamin D function -- does it reflect inhibition of 24-hydroxylase?* Med Hypotheses, **2004**. 63(6): p. 1054-6.
87. Elliot, M.A., Edwards, H.M. , *Studies to determine whether an interaction exists among boron, calcium, and cholecalciferol on the skeletal development of broiler chickens*. Poultry Science, **1992**.
88. Hunt, C.D., Herbel, J.L., Idso, J.P. , *Dietary boron modifies the effects of vitamin D3 nutriture on indices of energy substrate utilization and mineral metabolism in the chick*. Journal of Bone and Mineral Research, **1994**.
89. Nielsen, F.H., Mullen, L. M., Gallagher, S. K., *Effect of boron depletion and repletion on blood indicators of calcium status in humans fed a magnesium-low diet*. Journal of trace elements in experimental medicine, **1990**.
90. Sheng, M.H., et al., *Dietary boron supplementation enhances the effects of estrogen on bone mineral balance in ovariectomized rats*. Biol Trace Elem Res, **2001**. 81(1): p. 29-45.
91. Hall, I.H., et al., *The effects of boron hypolipidemic agents on LDL and HDL receptor binding and related enzyme activities of rat hepatocytes, aorta cells and human fibroblasts*. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, **1989**. 65(3): p. 297-317.
92. Nagarajan, S., et al., *Design of Boron Nitride/Gelatin Electrospun Nanofibers for Bone Tissue Engineering*. ACS Appl Mater Interfaces, **2017**. 9(39): p. 33695-33706.
93. Genchi, G.G., et al., *Ultrasound-activated piezoelectric P(VDF-TrFE)/boron nitride nanotube composite films promote differentiation of human SaOS-2 osteoblast-like cells*. Nanomedicine, **2017**.
94. Huang, Q., et al., *SaOS-2 cell response to macro-porous boron-incorporated TiO₂ coating prepared by micro-arc oxidation on titanium*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, **2016**. 67: p. 195-204.
95. Li, X., et al., *Boron nitride nanotube-enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, **2016**. 104(2): p. 323-9.
96. Hakki, S.S., B.S. Bozkurt, and E.E. Hakki, *Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1)*. J Trace Elem Med Biol, **2010**. 24(4): p. 243-50.
97. Marasovic, M., et al., *In vitro and in vivo antitumour effects of phenylboronic acid against mouse mammary adenocarcinoma 4T1 and squamous carcinoma SCCVII cells*. J Enzyme Inhib Med Chem, **2017**. 32(1): p. 1299-1304.
98. Jing, L., et al., *Biocompatible Hydroxylated Boron Nitride Nanosheets/Poly(vinyl alcohol) Interpenetrating Hydrogels with Enhanced Mechanical and Thermal Responses*. ACS Nano, **2017**. 11(4): p. 3742-3751.
99. Liu, Y.J., W.T. Su, and P.H. Chen, *Magnesium and zinc borate enhance osteoblastic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in vitro*. J Biomater Appl, **2018**. 32(6): p. 765-774.
100. Tuluçe, Y., et al., *The apoptotic, cytotoxic and genotoxic effect of novel binuclear boron-fluoride complex on endometrial cancer*. Biometals, **2017**. 30(6): p. 933-944.

101. Uram, L., et al., *N(4)-[B-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan)methyl]-2'-deoxycytidine as a potential boron delivery agent with respect to glioblastoma*. Biomed Pharmacother, **2017**. 95: p. 749-755.
102. Tepedelen, B.E., E. Soya, and M. Korkmaz, *Boric Acid Reduces the Formation of DNA Double Strand Breaks and Accelerates Wound Healing Process*. Biol Trace Elem Res, **2016**. 174(2): p. 309-318.
103. Wei, Y., et al., *Borax-induced apoptosis in HepG2 cells involves p53, Bcl-2, and Bax*. Genet Mol Res, **2016**. 15(2).
104. Movahedi Najafabadi, B.A. and M.H. Abnosi, *Boron Induces Early Matrix Mineralization via Calcium Deposition and Elevation of Alkaline Phosphatase Activity in Differentiated Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*. Cell J, **2016**. 18(1): p. 62-73.
105. Yilmaz, S., et al., *Protective Effect of Boric Acid on Oxidative DNA Damage In Chinese Hamster Lung Fibroblast V79 Cell Lines*. Cell J, **2016**. 17(4): p. 748-54.
106. Demirci, S., et al., *Boron increases the cell viability of mesenchymal stem cells after long-term cryopreservation*. Cryobiology, **2014**. 68(1): p. 139-46.
107. Danti, S., et al., *Boron nitride nanotubes and primary human osteoblasts: in vitro compatibility and biological interactions under low frequency ultrasound stimulation*. Nanotechnology, **2013**. 24(46): p. 465102.
108. Ying, X., et al., *Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells*. Biol Trace Elem Res, **2011**. 144(1-3): p. 306-15.
109. Tasli, P.N., et al., *Boron enhances odontogenic and osteogenic differentiation of human tooth germ stem cells (hTGSCs) in vitro*. Biol Trace Elem Res, **2013**. 153(1-3): p. 419-27.
110. Pizzorno, L., *Nothing Boring About Boron*. Integr Med (Encinitas), **2015**. 14(4): p. 35-48.
111. Nielsen, F.H., et al., *Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women*. FASEB J, **1987**. 1(5): p. 394-7.
112. Beattie, J.H. and H.S. Peace, *The influence of a low-boron diet and boron supplementation on bone, major mineral and sex steroid metabolism in postmenopausal women*. Br J Nutr, **1993**. 69(3): p. 871-84.
113. Erol, M.M., et al., *Copper-releasing, boron-containing bioactive glass-based scaffolds coated with alginate for bone tissue engineering*. Acta Biomater, **2012**. 8(2): p. 792-801.
114. Atila, A., et al., *Study of the boron levels in serum after implantation of different ratios nano-hexagonal boron nitride-hydroxy apatite in rat femurs*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, **2016**. 58: p. 1082-9.
115. Kankilic, B., et al., *Mesenchymal Stem Cells and Nano-Bioceramics for Bone Regeneration*. Curr Stem Cell Res Ther, **2016**. 11(6): p. 487-493.
116. Tuncay, E.O., T.T. Demirtas, and M. Gumusderelioglu, *Microwave-induced production of boron-doped HAp (B-HAp) and B-HAp coated composite scaffolds*. J Trace Elem Med Biol, **2017**. 40: p. 72-81.
117. Arslan, A., S. Cakmak, and M. Gumusderelioglu, *Enhanced osteogenic activity with boron-doped nanohydroxyapatite-loaded poly(butylene adipate-co-terephthalate) fibrous 3D matrix*. Artif Cells Nanomed Biotechnol, **2018**: p. 1-10.
118. Dogan, A., et al., *A new hope for obesity management: Boron inhibits adipogenesis in progenitor cells through the Wnt/beta-catenin pathway*. Metabolism, **2017**. 69: p. 130-142.
119. Yin, C., et al., *Setd7 and its contribution to Boron-induced bone regeneration in Boron-mesoporous bioactive glass scaffolds*. Acta Biomater, **2018**. 73: p. 522-530.

120. Guler, H., et al., *Solid state synthesis of calcium borohydroxyapatite*. Solid State Sciences, **2011**. 13(11): p. 1916-1920.
121. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, **2006**. 8(4): p. 315-7.
122. Bakan, F., et al., *Structural and Chemical Analysis of Hydroxyapatite (HA)-Boron Nitride (BN) Nanocomposites Sintered Under Different Atmospheric Conditions*. Microsc Microanal, **2017**. 23(5): p. 891-899.
123. Goncu, Y., et al., *Electrophoretic deposition of hydroxyapatite-hexagonal boron nitride composite coatings on Ti substrate*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, **2017**. 79: p. 343-353.
124. Chen, S., et al., *In vitro stimulation of vascular endothelial growth factor by borate-based glass fibers under dynamic flow conditions*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, **2017**. 73: p. 447-455.
125. Li, X., et al., *Hollow boron nitride nanospheres as boron reservoir for prostate cancer treatment*. Nat Commun, **2017**. 8: p. 13936.
126. Gumusderelioglu, M., et al., *Encapsulated boron as an osteoinductive agent for bone scaffolds*. J Trace Elem Med Biol, **2015**. 31: p. 120-8.
127. Bai, Y.C., et al., *Effect of Tumor Microenvironment on Selective Uptake of Boric Acid in HepG2 Human Hepatoma Cells*. Anticancer Res, **2017**. 37(11): p. 6347-6353.
128. Wu, C., et al., *Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds*. Biomaterials, **2011**. 32(29): p. 7068-78.
129. Liu, X., et al., *Conversion of borate-based glass scaffold to hydroxyapatite in a dilute phosphate solution*. Biomed Mater, **2010**. 5(1): p. 15005.
130. Balasubramanian, P., Grünewald, A., Detsch, R., Hupa, L., Jokic, B., Tallia, F., Boccaccini, A. R. , *Ion Release, Hydroxyapatite Conversion, and Cytotoxicity of Boron-Containing Bioactive Glass Scaffolds*. . International Journal of Applied Glass Science, **2016**.
131. Lu, X., et al., *Chemical stability and osteogenic activity of plasma-sprayed boron-modified calcium silicate-based coatings*. J Mater Sci Mater Med, **2016**. 27(11): p. 166.
132. Song, W., et al., *Electrospun polyvinyl alcohol-collagen-hydroxyapatite nanofibers: a biomimetic extracellular matrix for osteoblastic cells*. Nanotechnology, **2012**. 23(11): p. 115101.
133. Zeng, S., et al., *Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol) composite membranes for guided bone regeneration*. J Biomed Nanotechnol, **2011**. 7(4): p. 549-57.
134. Golberg, D., et al., *Boron nitride nanotubes and nanosheets*. ACS Nano, **2010**. 4(6): p. 2979-93.
135. 136.Unal, S., et al., *Synthesis, characterization, and biological properties of composites of hydroxyapatite and hexagonal boron nitride*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, **2017**.
136. Remya, N.S., et al., *An in vitro study on the interaction of hydroxyapatite nanoparticles and bone marrow mesenchymal stem cells for assessing the toxicological behaviour*. Colloids Surf B Biointerfaces, **2014**. 117: p. 389-97.
137. Dimitrievska, S., et al., *Titania-hydroxyapatite nanocomposite coatings support human mesenchymal stem cells osteogenic differentiation*. J Biomed Mater Res A, **2011**. 98(4): p. 576-88.

138. Suhito, I.R., et al., *Effects of two-dimensional materials on human mesenchymal stem cell behaviors*. Biochem Biophys Res Commun, **2017**. 493(1): p. 578-584.
139. Sales, K.U., et al., *Cyclin D1-induced proliferation is independent of beta-catenin in Head and Neck Cancer*. Oral Diseases, **2014**. 20(3): p. e42-e48.
140. Fu, M.F., et al., *Minireview: Cyclin D1: Normal and abnormal functions*. Endocrinology, **2004**. 145(12): p. 5439-5447.
141. Zou, T., et al., *JunD enhances miR-29b levels transcriptionally and posttranscriptionally to inhibit proliferation of intestinal epithelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, **2015**. 308(10): p. C813-24.
142. Meixner, A., et al., *Jun and JunD-dependent functions in cell proliferation and stress response*. Cell Death Differ, **2010**. 17(9): p. 1409-19.
143. Rutkovskiy, A., K.O. Stenslokken, and I.J. Vaage, *Osteoblast Differentiation at a Glance*. Med Sci Monit Basic Res, **2016**. 22: p. 95-106.
144. Takahara, T., et al., *The calcium-binding protein ALG-2 regulates protein secretion and trafficking via interactions with MISSL and MAP1B proteins*. J Biol Chem, **2017**. 292(41): p. 17057-17072.
145. Takahara, T., et al., *A microtubule-associated protein MAP1B binds to and regulates localization of a calcium-binding protein ALG-2*. Biochem Biophys Res Commun, **2018**. 497(2): p. 492-498.
146. Kang, S. and A. Kumanogoh, *Semaphorins in bone development, homeostasis, and disease*. Semin Cell Dev Biol, **2013**. 24(3): p. 163-71.
147. Zhang, Y., et al., *Expression profile analysis of new candidate genes for the therapy of primary osteoporosis*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, **2016**. 20(3): p. 433-40.
148. Zhang, J., et al., *MicroRNA expression analysis during FK506-induced osteogenic differentiation in rat bone marrow stromal cells*. Mol Med Rep, **2017**. 16(1): p. 581-590.
149. Wang, P., et al., *Molecular cloning and characterization of novel human JNK2 (MAPK9) transcript variants that show different stimulation activities on AP-1*. BMB Rep, **2010**. 43(11): p. 738-43.
150. Zhang, Y., et al., *Functional analyses reveal the essential role of SOX6 and RUNX2 in the communication of chondrocyte and osteoblast*. Osteoporos Int, **2015**. 26(2): p. 553-61.
151. Hsu, Y.H., et al., *An integration of genome-wide association study and gene expression profiling to prioritize the discovery of novel susceptibility Loci for osteoporosis-related traits*. PLoS Genet, **2010**. 6(6): p. e1000977.
152. Rivadeneira, F., et al., *Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies*. Nat Genet, **2009**. 41(11): p. 1199-206.
153. Yang, T.L., et al., *Genetic variants in the SOX6 gene are associated with bone mineral density in both Caucasian and Chinese populations*. Osteoporos Int, **2012**. 23(2): p. 781-7.
154. Yano, M., et al., *Smad7 inhibits differentiation and mineralization of mouse osteoblastic cells*. Endocr J, **2012**. 59(8): p. 653-62.
155. Miron, R.J., et al., *Osteogenic gene array of osteoblasts cultured on a novel osteoinductive biphasic calcium phosphate bone grafting material*. Clin Oral Investig, **2017**. 21(3): p. 801-808.
156. Groen, N., et al., *Exploring the Material-Induced Transcriptional Landscape of Osteoblasts on Bone Graft Materials*. Adv Healthc Mater, **2015**. 4(11): p. 1691-700.

157. Huang, Y.C., et al., *Histomorphometric and transcriptome evaluation of early healing bone treated with a novel human particulate dentin powder*. Biomedical Materials, **2017**. 12(1).
158. Zhang, Z.W., J.D. Wang, and X.Y. Lu, *An integrated study of natural hydroxyapatite-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells using transcriptomics, proteomics and microRNA analyses*. Biomedical Materials, **2014**. 9(4).
159. Groen, N., et al., *Exploring the Material-Induced Transcriptional Landscape of Osteoblasts on Bone Graft Materials*. Advanced Healthcare Materials, **2015**. 4(11): p. 1691-1700.
160. Shang, F. and A. Taylor, *Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress*. Free Radic Biol Med, **2011**. 51(1): p. 5-16.
161. Turkez, H., et al., *Evaluation of cytotoxic, oxidative stress and genotoxic responses of hydroxyapatite nanoparticles on human blood cells*. J Appl Toxicol, **2014**. 34(4): p. 373-9.
162. Xu, J., et al., *Oxidative stress and apoptosis induced by hydroxyapatite nanoparticles in C6 cells*. J Biomed Mater Res A, **2012**. 100(3): p. 738-45.
163. Henderson, K.A., et al., *Boric acid induces cytoplasmic stress granule formation, eIF2alpha phosphorylation, and ATF4 in prostate DU-145 cells*. Biometals, **2015**. 28(1): p. 133-41.
164. Kobylewski, S.E., et al., *Activation of the EIF2alpha/ATF4 and ATF6 Pathways in DU-145 Cells by Boric Acid at the Concentration Reported in Men at the US Mean Boron Intake*. Biol Trace Elem Res, **2017**. 176(2): p. 278-293.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Merve Gizer

Doğum Yeri : İstanbul

Medeni Hali : Bekar

E-posta : gizermerv@gmail.com

Adresi : Kavaklıdere mahallesi, Büklüm caddesi, No:14/6, Çankaya/ANKARA

Eğitim

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil Düzeyi

İngilizce – İleri Düzey

Almanca – Başlangıç Düzeyi

İş Deneyimi

-

Deneyim Alanları

Hücre kültürü, Mezenkimal kök hücre izolasyonu, Akım sitometrisi, Hücre proliferasyon deneyleri.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi tarafından TBB-2017-13-312 numaralı proje – 7.000 TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Ulusal Kongrede Sunulan Bildiriler - Merve Gizer, Eda Çiftci Dede, Aysel Berkkan, Feza Korkusuz, Muhammer Timuçin, Petek Korkusuz. Bor Katkılı Nano-Hidroksiapatit (B-nHAp) Kompozitlerin Mezenkimal Kök Hücrelerinin ve Kemik Hücrelerinin Proliferasyonuna Etkisinin Salımla İlişkili Araştırılması, THED 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Antalya, 10- 13 Mayıs 2018, Poster Sunumu.





HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih 02/02/2019

Tez Başlığı / Konusu: **BOR İÇEREN NANO HİDROKSİAPATİT KOMPOZİTLERİN KEMİK HÜCRELERİNDEKİ MOLEKÜLER ETKİ MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 82 sayfalık kısmına ilişkin, 02/02/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

02/02/2019
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: MERVE ATZEK
Öğrenci No: N16224023
Anabilim Dalı: BİYOMÜHENDİSLİK
Programı: YÜKSEK LİSANS
Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

PROF. DR. PETEK KORKUSUZ