

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANILMAK ÜZERE METALİK VE BİYOJENİK
NANOPARTİKÜLLERİN SOMATİK VE KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

SERAP YEŞİLKIR BAYDAR

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. MELAHAT BAĞIROVA**

İSTANBUL, 2016

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANILMAK ÜZERE METALİK VE BİYOJENİK
NANOPARTİKÜLLERİN SOMATİK VE KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Serap YEŞİLKIR BAYDAR tarafından hazırlanan tez çalışması 15.11.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Mehalat BAĞIROVA
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Mehalat BAĞIROVA
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Tülay İREZ
Biruni Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Melike ERSÖZ
İstanbul Bilim Üniversitesi

Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE
Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2011-07-04 KAP06 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca akademik bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen, bilimsel çalışma prensipleri ile öğrencilerini özenle yetiştiren çok sevdiğim değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA'ya, çalışmalarım boyunca aynı bilgiyi, desteği ve özeni gösteren, çok sevgili değerli hocam Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e;

Tezin gerçekleşmesindeki katkılarından dolayı Biyomühendislik Bölüm Başkanlığı'na, Kimya Metalurji Fakültesi Dekanlığı'na, Yıldız Teknik Üniversitesi Rektörlüğü'ne, bu çalışmayı 2011-07-04 KAP06 numaralı proje ile destekleyen Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğü'ne, Biyomühendislik Bölümümüzün kurucusu ve eski bölüm başkanı değerli bilim adamı rahmetli Prof. Dr. M.Mustafa AKDESTE ile yine eski bölüm başkanımız ve değerli hocamız rahmetli Prof. Dr. Huriye KUZU'ya;

Tez çalışmalarım sırasında bana her zaman yardımcı olan, bilimsel desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen çok değerli arkadaşım Arş. Gör. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a, metalik nanopartiküllerin elde edilmesi için destek veren Malzeme Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Cengiz KAYA, Prof. Dr. Figen KAYA ve Arş. Gör. Cansu NOBERİ'ye, biyojenik nanopartiküllerin elde edilmesi için destek veren Pakistan Quaid-i-Azam Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü araştırmacısı M.Sc. İkrım ULLAH'a, Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı Müdürlüğü'ne ve Uzm. Dr. Ali Can ZAMAN'a, Protein Analiz Laboratuvarı doktora öğrencisi Tayfun ACAR'a;

Yüksek lisans ve doktora eğitimlerimiz süresince her zaman birbirimize destek olduğumuz çok değerli arkadaşlarım Dr. Olga Nehir ÖZTEL'e, Yrd. Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ'a, Yrd. Doç. Dr. Serhat ELÇİÇEK'e, Yrd. Doç. Dr. Sezen CANIM ATEŞ'e, Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği grubumuza, özellikle de Ayşe Özlem ÖZYILMAZ, Aslı Pınar ZORBA, Hilal TOPTAŞ, Gizem COŞAR, Günel BAYRAMOVA, Hilal ŞENTÜRK, Mehmet AYDOĞDU ve diğer araştırmacı arkadaşlarıma,

Biyomühendislik Bölümünün Değerli Öğretim Üyelerine ve Asistanlarına;

Hayattaki en büyük desteğim değerli eşim Hüseyin BAYDAR'a, canım oğlum Ömer'e ve hayatımın her anında destekleri, sevgileri ve emekleri ile beni asla yalnız bırakmayan değerli YEŞİLKIR ve BAYDAR Aileleri'ne sonsuz teşekkürler.

Kasım, 2016

Serap YEŞİLKIR BAYDAR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	x
KISALTMA LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÇİZELGE LİSTESİ	xv
ÖZET	xvi
ABSTRACT.....	xix
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	6
1.3 Hipotez	6
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	8
2.1 Nanoteknolojinin Tarihçesi	8
2.2 Nanoteknoloji	9
2.2.1 Nanoteknolojinin Sanayide Kullanımı	10
2.2.2 Nanobiyoteknoloji	11
2.2.3 Nanotıp.....	12
2.2.4 Kök Hücre Nanoteknolojisi	13
2.3 Nanopartiküller	13
2.3.1 Nanopartiküllerin Nanotıpta Kullanımı	16
2.3.2 Nanotoksikoloji.....	17
2.3.2.1 Nanopartiküllere Maruziyet Yolları.....	18
2.3.2.2 Hücre İçi Nanopartikül Alım Mekanizmaları ve Etki Eden Faktörler.....	20
2.3.2.3 Nanopartiküllerin Hücre İçi Lokalizasyonu	21
2.3.2.4 Nanopartiküllerin Hücre İçi Görüntülenmeleri	22
2.4 Nanopartikül Sentezi.....	24
2.4.1 Kimyasal Sentez Yöntemleri	25
2.4.1.1 Sol-jel Yöntemi:	25
2.4.2 Fiziksel Sentez Yöntemleri	26

2.4.3	Biyojenik (Yeşil) Sentez Yöntemleri	27
2.4.3.1	Bitki Bazlı Nanopartikül Sentezi.....	28
2.5	Hücre Biyolojisi	29
2.5.1	Somatik Hücreler	30
2.5.2	Öncü Hücreler.....	30
2.5.3	Kanser Hücreleri ve Kanser Kök Hücreleri	31
2.5.4	Kök Hücreler	32
2.5.4.1	Kendini Yenileme	33
2.5.4.2	Klonlaşma	33
2.5.4.3	Farklılaşma.....	34
2.5.5	Embriyonik Kök Hücreler	37
2.5.6	Erişkin Kök Hücreler.....	37
2.5.6.1	Hematopoetik Kök Hücreler	39
2.5.6.2	Mezenkimal Kök Hücreler	40
2.5.7	Kök Hücre Kaynakları.....	46
2.5.7.1	Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücreleri	48
2.6	Doku Mühendisliği	51
2.6.1	Hücre Yüzey Etkileşimleri	54
2.6.2	Doku Mühendisliğinde Kullanılan Doku İskeleleri	54
2.6.3	Hücre Kültürü ve Tarihçesi	55
2.6.4	Hücre Kültürlerinin Uygulama Alanları.....	56
2.6.5	İki Boyutlu Hücre Kültürü	56
2.6.6	Üç Boyutlu Hücre Kültürü	56

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD	58
3.1 Materyal.....	58
3.1.1 Ekipman	58
3.1.2 Kimyasallar	59
3.1.3 Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	60
3.1.3.1 PBS Solüsyonunun (1X) Hazırlanması	60
3.1.3.2 Kriyoprotektan (Dondurma Solüsyonu) Hazırlanması.....	61
3.1.3.3 Tripsin EDTA Hazırlanması.....	61
3.1.3.4 Besiyerlerinin Hazırlanması	61
3.1.3.5 Boyama Solüsyonlarının Hazırlanması	64
3.1.3.6 Gümüşnitrat Stok Solüsyonun Hazırlanması	65
3.1.3.7 Ekstrakt Hazırlanması.....	65
3.2 Metod	66
3.2.1 Nanopartiküllerin Sentezlenmesi	66
3.2.1.1 Kimyasal Yöntemler ile Nanopartikül Sentezlenmesi.....	66
3.2.1.2 Biyojenik Yöntem ile Nanopartikül Sentezlenmesi	67
3.2.2 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	67
3.2.2.1 Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Ölçümleri	67
3.2.2.2 Taramalı Elektron Mikroskopisi.....	68
3.2.3 Hücre Kültürü	68
3.2.3.1 Hücre Çözdürme.....	68

3.2.3.2	L929 Hücre Hattı Kültürü	69
3.2.3.3	J774 Hücre Hattı Kültürü	69
3.2.3.4	Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	69
3.2.3.5	Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	70
3.2.4	Nanopartikül Hücre Toksisite Çalışmaları.....	71
3.2.4.1	Hücrelerin Ekimi	71
3.2.4.2	Hücrelere Nanopartikül Eklenmesi.....	71
3.2.4.3	Nanopartiküllerin Hücre Kültürleri Üzerinde Canlılıklarına Etkisi	72
3.2.5	Nanopartiküllerin Mezenkimal Kök Hücre Kültürleri Üzerinde Farklılaşmaya Etkisi	74
3.2.5.1	Nanopartiküllerin Mezenkimal Kök Hücre Kültürleri Üzerinde Adipojenik Farklılaşmaya Etkisi	74
3.2.5.2	Nanopartiküllerin Mezenkimal Kök Hücre Kültürleri Üzerinde Osteojenik Farklılaşmaya Etkisi	74
3.3	İstatistiksel Analiz.....	75
BÖLÜM 4		
DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA		76
4.1	Hücre Kültürü Deneysel Çalışmaları	76
4.1.1	Hücre Çözdürme.....	76
4.1.2	Devamlı Hücre Kültürü Çalışmaları.....	77
4.1.2.1	L929 Hücre Hattının Devamlı Kültürü.....	77
4.1.2.2	J774 Hücre Hattının Devamlı Kültürü	78
4.1.2.3	Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü	78
4.1.2.4	Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu	79
4.1.2.5	Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kriyoprezervasyonu	84
4.2	Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	84
4.2.1	Kimyasal TiO ₂ Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu.....	84
4.2.1.1	Kimyasal TiO ₂ Nanopartiküllerinin Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Ölçümleri.....	84
4.2.1.2	Kimyasal TiO ₂ Nanopartiküllerinin SEM Analizi	85
4.2.2	Kimyasal Ag Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	86
4.2.2.1	Kimyasal Ag Nanopartiküllerinin Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Ölçümleri.....	86
4.2.2.2	Kimyasal Ag Nanopartiküllerinin SEM Analizi	87
4.2.3	Kimyasal TiO ₂ @Ag Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu.....	88
4.2.3.1	Kimyasal TiO ₂ @Ag Nanopartiküllerinin Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Ölçümleri	88
4.2.3.2	Kimyasal TiO ₂ @Ag Nanopartiküllerinin SEM Analizi	89
4.2.4	Biyojenik TiO ₂ Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	90
4.2.4.1	Biyojenik TiO ₂ Nanopartiküllerin Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Ölçümleri.....	90
4.2.4.2	Biyojenik TiO ₂ Nanopartiküllerinin SEM Analizi	91
4.2.5	Biyojenik Ag Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu.....	92

4.2.5.1	Biyojenik Ag Nanopartiküllerinin Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Ölçümleri.....	92
4.2.5.2	Biyojenik Ag Nanopartiküllerinin SEM Analizi	93
4.2.6	Biyojenik TiO ₂ Ag Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	94
4.2.6.1	Biyojenik TiO ₂ @Ag Nanopartiküllerinin Zeta Sizer Sonuçları	94
4.2.6.2	Biyojenik TiO ₂ @Ag Nanopartiküllerinin SEM Analizi	95
4.3	Nanopartiküllerin Hücre Kültürü Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi	96
4.3.1	TiO ₂ Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	96
4.3.1.1	Kimyasal TiO ₂ Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	97
4.3.1.2	Biyojenik TiO ₂ Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	97
4.3.2	TiO ₂ Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	98
4.3.2.1	Kimyasal TiO ₂ Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	98
4.3.2.2	Biyojenik TiO ₂ Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	99
4.3.3	TiO ₂ Nanopartiküllerinin ADMKH Proliferasyonuna Etkisi	100
4.3.3.1	Kimyasal TiO ₂ Nanopartiküllerinin ADMKH Proliferasyonuna Etkisi	100
4.3.3.2	Biyojenik TiO ₂ Nanopartiküllerinin ADMKH Proliferasyonuna Etkisi	101
4.3.4	Ag Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	102
4.3.4.1	Kimyasal Ag Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	102
4.3.4.2	Biyojenik Ag Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	103
4.3.5	Ag Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	104
4.3.5.1	Kimyasal Ag Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	104
4.3.5.2	Biyojenik Ag Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	105
4.3.6	Ag Nanopartiküllerinin ADMK Hücre Proliferasyonuna Etkisi.....	106
4.3.6.1	Kimyasal Ag Nanopartiküllerinin ADMK Hücre Proliferasyonuna Etkisi	106
4.3.6.2	Biyojenik Ag Nanopartiküllerinin ADMK Hücre Proliferasyonuna Etkisi	107
4.3.7	... TiO ₂ @Ag Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	108
4.3.7.1	Kimyasal TiO ₂ @Ag Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	108

4.3.7.2	Biyojenik TiO ₂ @Ag Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	109
4.3.8....	TiO ₂ @Ag Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	110
4.3.8.1	Kimyasal TiO ₂ @Ag Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	110
4.3.8.2	Biyojenik TiO ₂ @Ag Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi	111
4.3.9	TiO ₂ @Ag Nanopartiküllerinin ADMK Hücre Proliferasyonuna Etkisi	113
4.3.9.1	Kimyasal TiO ₂ @Ag Nanopartiküllerinin ADMK Hücre Proliferasyonuna Etkisi	113
4.3.9.2	Biyojenik TiO ₂ @Ag Nanopartiküllerinin ADMKH Proliferasyonuna Etkisi	113
4.3.10	DAPI Boyama ile Apoptotik ADMKH Tayini	114
4.3.11	EtBr/AO ile ADMKH Apoptotik Tayin	116
4.4	Nanopartiküllerin ADMKH Kültürü Farklılaşmasına Etkisi	117
4.4.1	TiO ₂ Nanopartiküllerinin ADMKH Farklılaşmasına Etkisi.....	117
4.4.1.1	Kimyasal TiO ₂ Nanopartiküllerinin ADMKH Farklılaşmasına Etkisi	117
4.4.1.2	Biyojenik TiO ₂ Nanopartiküllerinin Kök Hücre Farklılaşmasına Etkisi	117
4.4.2	Ag Nanopartiküllerinin ADMKH Farklılaşmasına Etkisi	118
4.4.2.1	Kimyasal Ag Nanopartiküllerinin ADMKH Farklılaşmasına Etkisi	118
4.4.2.2	. Biyojenik Ag Nanopartiküllerinin Kök Hücre Farklılaşmasına Etkisi	119
4.4.3	TiO ₂ @Ag Nanopartiküllerinin ADMKH Farklılaşmasına Etkisi	120
4.4.3.1	Kimyasal TiO ₂ @Ag Nanopartiküllerinin ADMKH Farklılaşmasına Etkisi	120
4.4.3.2	Biyojenik TiO ₂ @Ag Nanopartiküllerinin ADMKH Farklılaşmasına Etkisi	121
4.5	Tartışma	122
BÖLÜM 5		
SONUÇ VE ÖNERİLER		136
5.1	Sonuç Değerlendirmesi	136
5.2	Öneriler	136
KAYNAKLAR		138
ÖZGEÇMİŞ		154

SİMGE LİSTESİ

Ag	Gümüş Elementi
Ti	Titanyum Elementi
TiO ₂ @Ag	Titanyumdioksit-Gümüş Kompoziti
Zn	Zirkonyum / Çinko
ZnO-Cu	Çinkoksit-Bakır Bileşği

KISALTMA LİSTESİ

CO ₂	Karbondioksit
ADMKH	Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücre
CD	CD hücre yüzey antijeni bulunduran hücre
dH ₂ O	Distile Su
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSO	Dünya Sağlık Örgütü
EC50	Etkili Konsantrasyonun %50'si
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EKH	Embriyonik Kök Hücre
FBS	Fetal Sığır Serum [Fetal Bovine Serum]
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
HE	Hematoksilen Eozin boyası
HKH	Hematopoetik Kök Hücre
ISCT	International Society of Cellular Therapy
J774	Fare Makrofaj Hücre Hattı
KH	Kök Hücre
L929	Fare Fibroblast Hücre Hattı
mRNA	Mesajcı Ribonukleik Asit
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NP	Nanopartikül
PBS	Fosfat Tampon Solusyonu [Phosphate buffered saline]
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu [Polymerase Chain Reaction]
pH	Potansiyel hidrojen
rpm	Revolutions per minutes
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
SB	Sağlık Bakanlığı
TNFT α	Tumor nekroz faktör alfa

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1 XVIII. yy'dan itibaren sanayi devrimleri [6].....	9
Şekil 2. 2 Nanopartiküllerin boyutunu kıyaslamalı olarak gösterilmesi [37]	14
Şekil 2. 3 Nanopartiküllerin hücresel boyutta kullanımı.....	15
Şekil 2. 4 Nanopartiküllerin kullanım alanları	16
Şekil 2. 5 Nanopartiküllerin insan vücuduna giriş yollarının gösterilmesi	19
Şekil 2. 6 Üç esas endositoz mekanizması	21
Şekil 2. 7 Nanopartikülün hücre içine giriş ve lokalizasyonunun gösterilmesi	22
Şekil 2. 8 Nanopartikül üretiminde kullanılan yaklaşımlar	24
Şekil 2. 9 Biyolojik sentez yönteminin vurgulandığı genel nanopartikül üretim yöntemlerinin şematik gösterimi [83]	25
Şekil 2. 10 Ökaryotik hücre yapısı	29
Şekil 2. 11 Yumurta ve spermin fertilizasyonu ile meydana gelen zigot [92]	30
Şekil 2. 12 Öncü hücreler ve kök hücrelerin bulundukları dokulardaki farklılaşma özellikleri	31
Şekil 2. 13 Kanser kök hücrelerinin çoğalmasını gösteren şema	32
Şekil 2. 14 Kök hücrelerin genel özelliklerini gösteren şema.....	33
Şekil 2. 15 Zigot embriyo ve blastosist evreleri	35
Şekil 2. 16 Multipotent hücrelerin farklılaşmalarını gösteren şema	35
Şekil 2. 17 Blastosit ve iç hücre kitlesi [113]	37
Şekil 2. 18 Embriyonik kök hücrenin somatik hücreye indüklenmesini gösteren şema. 38	
Şekil 2. 19 Hematopoetik kök hücrelerin farklılaşmalarını gösteren şema	40
Şekil 2. 20 Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyelini gösteren şema	43
Şekil 2. 21 Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasında rol oynayan genler.....	45
Şekil 2. 22 Beyaz ve kahverengi yağ dokusunun histolojik görüntüsü	49
Şekil 2. 23 Yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerin farklılaşma potansiyelini gösteren şema	51
Şekil 2. 24 Bir doku iskelesi örneği [165]	52
Şekil 2. 25 Doku mühendisliği uygulama basamaklarının şematik gösterimi [166]	53
Şekil 2. 26 Doku iskelesi temelli doku mühendisliği yaklaşımının şematik gösterimi [170]	55
Şekil 3. 1 Tripan mavisi molekül yapısı ($C_{34}H_{23}N_6O_{14}S_4Na_4$) [1]	64
Şekil 4. 1 Çözdürme sonrası ve kültüre adapte L929 hücre hattı mikroskopik görüntüsü (A ve B 10X, C 40X)	77

Şekil 4. 2	Çözdürme sonrası ve kültüre adapte J774 hücre hattı mikroskopik görüntüsü (A, B ve C 10X).....	78
Şekil 4. 3	İnsan adipoz doku mezenkimal kök hücrelerin kültür ortamına adaptasyon sürecinde mikroskopik görünüm (A ve B 10X, C 20X)	80
Şekil 4. 4	Mezenkimal kök hücrelerin flow sitometrik olarak CD90 analizi	81
Şekil 4. 5	Mezenkimal kök hücrelerin flow sitometrik olarak CD34 analizi	81
Şekil 4. 6	Yağ dokusu mezenkimal kök hücrelerinin hücre döngüsü analizi.....	82
Şekil 4. 7	Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin adipojenik farklılaşması ve Oil Red O boyama	83
Şekil 4. 8	Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması ve Alizarin Red S boyama.....	83
Şekil 4. 9	Kimyasal TiO ₂ nanopartikülünün zeta verilerine göre partikül yükü ve boyutu	85
Şekil 4. 10	Kimyasal TiO ₂ nanopartikülünün SEM Görüntüleri (A) 10.000X, (B) 60.000X, (C) 100.000X.....	86
Şekil 4. 11	Kimyasal TiO ₂ nanopartikülünün zeta verilerine göre partikül yükü ve boyutu	87
Şekil 4. 12	Kimyasal Ag nanopartikülünün SEM Görüntüleri (A) 10.000X, (B) 60.000X, (C) 100.000X.....	88
Şekil 4. 13	Kimyasal TiO ₂ @Ag nanopartikülünün zeta verilerine göre partikül yükü ve boyutu	89
Şekil 4. 14	Kimyasal TiO ₂ -Ag nanopartikülünün SEM Görüntüleri (A) 10.000X, (B) 60.000X, (C) 100.000X.....	90
Şekil 4. 15	Biyojenik TiO ₂ nanopartikülünün zeta verilerine göre partikül yükü ve boyutu	91
Şekil 4. 16	Biyojenik TiO ₂ nanopartikülünün SEM Görüntüleri (A) 10.000X, (B) 60.000X, (C) 100.000X.....	92
Şekil 4. 17	Biyojenik Ag nanopartikülünün zeta verilerine göre partikül yükü ve boyutu	93
Şekil 4. 18	Biyojenik Ag nanopartikülünün SEM Görüntüleri (A) 10.000X, (B) 60.000X, (C) 100.000X.....	94
Şekil 4. 19	Biyojenik TiO ₂ @Ag nanopartikülünün zeta verilerine göre partikül yükü ve boyutu	95
Şekil 4. 20	Biyojenik TiO ₂ @Ag nanopartikülünün SEM Görüntüleri (A) 100.000X, (B) 150.000X	96
Şekil 4. 21	Kimyasal TiO ₂ nanopartikülünün L929 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi	97
Şekil 4. 22	Biyojenik TiO ₂ nanopartikülünün L929 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi	98
Şekil 4. 23	Kimyasal TiO ₂ nanopartikülünün J774 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi	99
Şekil 4. 24	Biyojenik TiO ₂ nanopartikülünün J774 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi	100
Şekil 4. 25	Kimyasal TiO ₂ nanopartikülünün ADMKH üzerindeki proliferasyonuna etkisi	101

Şekil 4. 26 Biyojenik TiO ₂ nanopartikülünün ADMKH üzerindeki proliferasyonuna etkisi	101
Şekil 4. 27 Kimyasal Ag nanopartikülünün L929 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi	103
Şekil 4. 28 Biyojenik Ag nanopartikülünün L929 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi	104
Şekil 4. 29 Kimyasal Ag nanopartikülünün J774 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi	105
Şekil 4. 30 Biyojenik Ag nanopartikülünün J774 üzerindeki proliferasyonuna etkisi ...	106
Şekil 4. 31 Kimyasal Ag nanopartikülünün ADMKH üzerindeki proliferasyonuna etkisi	107
Şekil 4. 32 Biyojenik Ag nanopartikülünün ADMKH üzerindeki proliferasyonuna etkisi	108
Şekil 4. 33 Kimyasal TiO ₂ @Ag nanopartikülünün L929 üzerindeki proliferasyonuna etkisi	109
Şekil 4. 34 Biyojenik TiO ₂ @Ag nanopartikülünün L929 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi	110
Şekil 4. 35 Kimyasal TiO ₂ @Ag nanopartikülünün J774 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi	111
Şekil 4. 36 Biyojenik TiO ₂ @Ag nanopartikülünün J774 üzerindeki proliferasyonuna etkisi	112
Şekil 4. 37 Kimyasal TiO ₂ @Ag nanopartikülünün ADMKH üzerindeki proliferasyonuna etkisi	113
Şekil 4. 38 Biyojenik TiO ₂ @Ag nanopartikülünün ADMKH üzerindeki proliferasyonuna etkisi	114
Şekil 4. 39 Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin DAPI boyamalarından elde edilen bazı görüntüler	115
Şekil 4. 40 Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin EtBr/AO boyama boyamalarından elde edilen bazı görüntüler	116
Şekil 4. 41 Kimyasal TiO ₂ nanopartikülü ile inkübe edilen kök hücrelerin adipojenik farklılaşmaları (Oil Red O Boyama, 20 µg/mL)	117
Şekil 4. 42 TiO ₂ nanopartikülünün kök hücre farklılaşmasına etkisinin korelasyonu (K: kimyasal, TiO ₂ : titanyumdioksit, Y: yeşil, Adip: adipojenik, Ost: osteojenik)	118
Şekil 4. 43 Kimyasal Ag nanopartikülü ile inkübe edilen kök hücrelerin adipojenik farklılaşmaları (Oil Red O Boyama, 50 µg/mL)	119
Şekil 4. 44 Ag nanopartikülünün kök hücre farklılaşmasına etkisinin korelasyonu (K: kimyasal, Ag: gümüş, Y: yeşil, Adip: adipojenik, Ost: osteojenik)	120
Şekil 4. 45 Kimyasal TiO ₂ @Ag nanopartikülü ile inkübe edilen ADMKH adipojenik farklılaşmaları (Oil Red O Boyama, 10 µg/mL ve 50 µg/mL)	120
Şekil 4. 46 TiO ₂ @Ag nanopartikülünün kök hücre farklılaşmasına etkisinin korelasyonu (K: kimyasal, TiO ₂ @Ag: titanyumgümüş, Y: yeşil, Adip: adipojenik, Ost: osteojenik)	122

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1 Parçacık boyutlarının dağılımı.....	14
Çizelge 2. 2 Biyojenik nanopartikül sentezi ile ilgili çalışmalara örnekler [83]	28
Çizelge 2. 3 Kök hücre tipleri.....	36
Çizelge 2. 4 Mezenkimal kök hücre kaynakları	47
Çizelge 4. 1 Mezenkimal kök hücrelerin apoptotik yüzde oranları (DAPI boyama)	115
Çizelge 4. 2 Mezenkimal kök hücrelerin apoptotik yüzde oranları (EtBr/AO boyama)	116

**DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANILMAK ÜZERE METALİK VE BİYOJENİK
NANOPARTİKÜLLERİN SOMATİK VE KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Serap YEŞİLKIR BAYDAR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA

Kök hücreler ve nanoteknoloji son yılların en önemli çalışma alanları arasında yer almaktadır. İntradisipliner faaliyetler gerektiren ve böylece hızla gelişen bu bilim dalları birleşerek kök hücre nanoteknolojisi adı altında yeni bir çalışma alanı doğurmuştur. Bulundukları doku ve organların devamlılığını sağlayan kök hücreler rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinde son derece önemli role sahipken, nano boyutta yapılar da çeşitli endüstriyel ve medikal alanlara ek olarak özellikle son yıllarda doku mühendisliğinde de giderek daha çok önem kazanmaktadır. Kök hücre nanoteknolojisinde gelişmeler yaşanırken yapılan çalışmalar da nanopartiküllerin yaygın kullanımı çeşitli tartışmalara neden olmaktadır. Nanopartiküllerin solunum, sindirim, intravenöz ve subkütanöz yollar ve dermal kontakt vasıtası ile insan vücuduna girişi endişelere neden olmaktadır. Bu nedenle normal hücre hatları ve özellikle kök hücrelerin nanopartiküller ile etkileşimin incelenmesi oldukça önemlidir. Diğer taraftan günümüzde büyük oranda kimyasal yöntemler ile sentezlenen nanopartiküllerin güvenli sentez yöntemleri ile elde edilmesi amacı ile biyogenik yöntemler de geliştirilmeye başlanmıştır. Biyogenik yöntemler ile sentezlenen nanopartiküllerin normal hücre hatları ve kök hücreler üzerindeki etkileri belirsizdir. Buna göre de bu çalışmanın amacı ilk kez olarak çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip kimyasal ve biyogenik nanopartiküllerin (TiO₂, Ag, TiO₂@Ag) normal hücre hatları (L929 ve J774) ve insan adipoz dokusundan elde edilmiş mezenkimal kök hücreler (ADMKH) üzerindeki etkisinin kıyaslamalı olarak incelenmesi,

incelenen nanopartiküllerin kök hücrelerin farklılaşmasına etkisinin belirlenmesi ve elde edilen sonuçların doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanılmak üzere önerilmesi olmuştur. Bu amaçla tez kapsamında kültür çalışmaları Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarımızda gerçekleştirilmiştir. Hücre kültür çalışmalarında somatik hücre (L929 ve J774) ve adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücreler (ADMKH) kullanılmıştır. Hücreler laboratuvarımızda bulunan kriyobanktan çıkarılmış, kültür ortamına adaptasyonu sağlanmış, devamlı kültürü elde edilmiş ve kriyoprezervasyonu gerçekleştirilmiştir. Deneylerde aynı zamanda metalik ve biyojenik nanopartiküller kullanıldı. Metalik nanopartiküller (TiO_2 , Ag ve $\text{TiO}_2@\text{Ag}$) YTÜ Malzeme Mühendisliği Bölümü'nde sentezlenerek temin edilmiştir. İlk kez olarak *Teucrium stocsianum* Bioss bitkisi ekstraktı ile TiO_2 , Ag ve $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ NP'leri ise laboratuvarımızda bitki bazlı olarak sentezlendi. Her iki gruptaki nanopartiküllerin karakterizasyonları YTÜ Merkez Laboratuvarı ve Biyomühendislik Bölümü'müzün Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin somatik ve adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücreler üzerindeki sitotoksikite çalışmaları hücrelerin mitokondriyal etkinliklerinin belirlenmesi amacı ile MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) yöntemi ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Diğer taraftan metalik ve biyojenik nanopartiküllerin adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşmalarına etkileri incelendi. Deneyler en az üç kere tekrar edilmiş ve GraphPad Prism 5 programı ile istatistiksel analizler yapılmıştır. Varyansların homojenitesi ANOVA one-way varyansı ile belirlenmiş, $p < 0.005$ değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Deneyler hem somatik ve hem de mezenkimal kök hücreler üzerinde gerçekleştirildi. Her iki gruptan olan nanopartiküllerin beş farklı konsantrasyonunun bu hücre hatları üzerindeki morfolojik, proliferasyon ve farklılaşmalarına etkileri incelendi.

Elde edilen sonuçlara göre, kimyasal TiO_2 NP J774 için toksik etki gösterirken L929 ve ADMKH için tüm konsantrasyonlarda non-toksiktir. Kimyasal Ag NP hücreler üzerinde genel olarak non-toksiktir. Kimyasal $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ NP L929 ve ADMKH hatları için hücre canlılığı da artış göstermektedir.

Biyojenik TiO_2 NP ise J774, L929 ve ADMKH için kullanılan konsantrasyonlarda non-toksiktir. Biyojenik Ag NP L929 hücre hattı proliferasyonunu artırmakta, ADMKH proliferasyonunu ise azaltmaktadır. Biyojenik $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ NP ise J774 hücre hattı üzerinde farklı konsantrasyonlarda farklı etkiler sergilemektedir. Biyojenik TiO_2 , Ag ve $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ NP'lerinin adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasına etkileri incelenmiştir. Kimyasal Ag ve kimyasal TiO_2 nanopartiküllerinin MKH'lerin adipojenik farklılaşmasını artıran nanopartiküller olduğu ancak MKH'lerin osteojenik farklılaşması üzerinde ise pozitif bir etkilerinin olmadığı tespit edilmiştir.

Son yıllarda endüstriyel ve medikal alanlarda kimyasal ve biyojenik yöntemler ile sentezlenen nanopartiküllerin sayısında oldukça büyük bir artış yaşanmaktadır. Bu durum da insan vücudunun çeşitli nanopartiküllere maruz kalmasına neden olmaktadır. İnsanoğlunun nanopartiküllere maruziyeti çeşitli endişelere sebebiyet vermektedir. Böylece elde edilen sonuçlar nanopartiküllerin çeşitli yollar ile vücuda girmesinin ardından somatik ve özellikle doku ve organların devamlılığını sağlayan kök hücreler üzerindeki etkilerinin araştırılmasının son derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Elde edilen sonuçların ilerde biyomedikal ürünlerin tasarlanmasında ve uygulanmasında pratik açıdan oldukça önemli olduğunu göstermektedir.

Buna göre de çalışmamızda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda amacımıza uygun olarak özellikle doku mühendisliği çalışmalarında tasarlanacak olan ürünler ile ilgili tasarlanan üründen beklenen özellik, bu özelliği karşılayacak nanopartikül ve hücre hattı seçimi, nanopartikül sentez biçimi ve ayrıca uygulanacak olan nanopartikülün konsantrasyonu ile ilgili olarak elde ettiğimiz verilerin göz önüne alınması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nanopartikül, hücre kültürü, kök hücre, doku mühendisliği

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF METALLIC AND BIOGENIC NANOPARTICLES ON SOMATIC AND STEM CELLS FOR THE PURPOSE OF USING FOR BIOENGINEERING APPLICATIONS

Serap YESILKIR BAYDAR

Department of Bioengineering

Ph.D. Thesis

Adviser: Ass. Prof. Melahat BAGIROVA

Stem cells and nanotechnology are one of the most important research topics of the late years. These research fields require interdisciplinary cooperation, therefore have developed quickly to generate a new research field called stem cell nanotechnology. Stem cells have secured an important place in regenerative medicine and tissue engineering as they provide persistence to the tissues and organs from which they originate, whereas nanoscale structures have recently become prominent in tissue engineering, as well as various industrial and medical areas. While developments are made in stem cell nanotechnology, studies on extensive use of nanoparticles cause controversy. Internalization of the nanoparticles into human body through respiration, digestion, intra- and subcutaneous injection or dermal contact raise concern. Therefore, investigation of nanoparticle interaction between normal cell lines, especially stem cells, is extremely important. On the other hand, safe biogenic techniques to produce nanoparticles, instead of commonly used chemical synthesis techniques are being developed. The influence of nanoparticles produced by these biogenic techniques on normal cell lines and stem cells are unclear. Hereunder, the purpose of this study is to investigate and compare the effects of chemically produced and biogenic nanoparticles with different physical and chemical properties (TiO_2 , Ag, $\text{TiO}_2\text{@Ag}$) on normal cell lines (L929 and J774) and human adipose-derived

mesenchymal stem cells (hADMSC), to investigate the effect of these nanoparticles on the differentiation of stem cells and to refer to these information to guide their use in tissue engineering and regenerative medicine. For this purpose, L929 and J774 cell lines were obtained from the cryobank in Yıldız Technical University Department of Bioengineering, Tissue Engineering and Cell Culture laboratory and the sustained culture of the cells were provided. Mesenchymal stem cells were obtained from cryobank and thawed, cell culture adaptation, continuous culture and cryopreservation of the cells were done. Additionally, chemically produced TiO_2 , Ag ve $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ nanoparticles were obtained from YTU Department of Material Engineering. For the first time in this study, biogenic nanoparticles were synthesized via *Teucrium stocsianum* Bioss plant extract. Both types of the nanoparticles were analyzed with characterization studies in YTU Central Laboratory and YTU Department of Bioengineering Laboratory. Cytotoxicity studies of nanoparticles on somatic cell lines (L929 and J774) and adipose tissue derived stem cells were measured spectrophotometrically by using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium bromide). Additionally, adipogenic and osteogenic differentiation of stem cells were provided at concentrations affecting proliferation. Differentiation potential of stem cells were microscopically tracked, suitable incubation periods were determined and at the end of these periods differentiation rate and morphologies of the cells under culture were analyzed. The experiments were repeated at least three times and statistical analyses were done using GraphPad Prism 5 software. Homogeneity of the variants were determined with ANOVA one-way variant and a p-value less than 0.005 ($p > 0.005$) is taken as statistically significant. Experiments were performed using both somatic and mesenchymal stem cells. The effects of five different concentrations of nanoparticles from two groups were investigated on morphology, proliferation and differentiation of these cell lines. According to our results, chemical TiO_2 NP showed toxic effects on J774, while it was non-toxic for L929 and ADMSCs at all concentrations investigated. Chemical $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ NP showed increased cell viability of L929 and ADMSC. Green TiO_2 NP was shown to be non-toxic for J774, L929 and ADMSCs at all concentrations investigated. Green Ag NP increased cell proliferation of L929 cell line, but decreased proliferation of ADMSCs. Green $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ NP showed different effects on J774 at different concentrations. Effects of biogenic TiO_2 , Ag and $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ NP on differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells were investigated. Chemical Ag and chemical TiO_2 nanoparticles were shown to increase adipogenic differentiation of MSCs, whereas they were shown to have no effect on osteogenic differentiation of MSCs. Recently, the number of chemically and biogenically synthesized nanoparticles have increased in the use of industrial and medical areas. This causes exposure of human body to various nanoparticles and this exposure to nanoparticles raises different concerns. Therefore, the investigation of the effects of nanoparticle exposure on somatic and especially stem cells that provide maintenance of tissue and organs is extremely important. The results of such research will be useful in design and application of biomedical products in the future. According to this, it is suggested that the results of this study should be considered while designing products for tissue engineering to determine the expected properties of the designed product, the nanoparticles and cell lines that would fulfil

these expectations, the technique for nanoparticle synthesis and the concentration of the nanoparticle to be applied.

Keywords: Nanoparticle, cell culture, stem cell, tissue engineering

1.1 Literatür Özeti

Kök hücreler ve nanoteknoloji son yılların büyüyen en önemli iki alanıdır. Bu bilim dalları interdisipliner faaliyetler gerektiren çalışmalar sonucunda hızla gelişmiştir. Bu iki bilim dalı birleşerek kök hücre nanoteknolojisi adı altında yeni bir çalışma alanı doğurmuştur [1, 2]. Bulundukları doku ve organların devamlılığını sağlayan kök hücreler rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinde son derece önemli rol alırken [3-9], nano boyutta yapılar da çeşitli endüstriyel [10-12] ve medikal alanlara [13] ek olarak özellikle son yıllarda doku mühendisliğinde de giderek daha çok önem kazanmaktadır [14, 15]. Bunun nedeni nanopartiküllerin ultra küçük boyutta olmaları, geniş yüzey alanına sahip olmaları ve bu sayede hücresel boyutta etkileşimlere girebilmeleridir [16-23]. Kök hücre nanoteknolojisinde gelişmeler yaşanırken yapılan çalışmaların tartışmalara neden olduğu da bildirilmektedir [24-29].

Son yıllara kadar doku mühendisliği ve hücresel tedavi çalışmalarında somatik hücrelerden faydalanılıyordu. Ancak kök hücreler farklılaşmamış ve kendilerini yenileyebilme özellikleri nedeni ile somatik hücrelerden farklı olup büyük ilgi çekmektedir. Günümüzde kök hücreler rejeneratif tıp çalışmalarında hasar görmüş ya da işlevini yitirmiş çeşitli doku ve organların yenilenmesinde [30-35], antiinflamatuar etkileri sayesinde immünoterapilerde [36-38], hedeflendirilmiş sistemlerde [39] ve hücresel tedavilerde [40, 41] başarı ile kullanılmaktadır.

Nanopartiküller kozmetik, tekstil, gıda ve boya gibi sanayi kollarında, ilaç salınım sistemleri, mikrobiyoloji, rejeneratif tıp gibi çeşitli medikal alanlarda kullanılmaktadır

[42, 43]; ancak nanopartiküllerin bu kadar geniş bir alanda kullanılmaya başlanması ile birlikte toksik etkileri ile ilgili bilgilerin yetersizliği çeşitli endişelere neden olmaktadır [44]. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda insanların solunum, ağız yolu, dermal kontakt, intravenöz uygulamalar ve subkütanöz uygulamalar ile nanopartiküllere maruz kaldıkları kesin olarak belirlenmiştir [45]. İnsan vücudunun nanopartiküllere maruz kalmasının meydana getirdiği endişeler nedeni ile nanopartiküllerin etkilerinin detaylı şekilde incelenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Nanoteknoloji alanında olduğu gibi kök hücre alanında da her geçen gün gelişmeler hız kazanmaktadır. Kök hücrelerin rejeneratif tıp çalışmalarında kullanımı son derece önemli ve gereklidir. Bu çalışmalarda kök hücrenin bulunduğu bir niş ortamı ile etkileşim içerisinde olduğu bilinmektedir. Hücre-hücre etkileşimi, ortamda bulunan sekresyon faktörleri, ekstrasellüler matriks ve mekaniksel şartlar doku mühendisliğinde kök hücre kullanımı için gerekli mikroçevrenin componentleridir. Bu mikroçevrenin uygun proliferatif ve farklılaştırma etkenleri ile zenginleştirilmesinde nanopartiküllerden de faydalanılması mümkündür. Doku mühendisliği çalışmalarında kök hücre nanoteknolojisi ile travma sonrası doku, organ kayıpları ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için fayda sağlanacağı beklenmektedir; ancak bu amaç için nanopartiküllerin etki mekanizmaları ile ilgili soru işaretlerinin kaldırılmasına yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Kök hücre nanoteknolojisindeki çalışmalar; in vivo şartlarda işaretlenmiş kök hücreleri takip etme ve görüntüleme, genetik çalışmalar, üç boyutlu (3D) nanostrüktürel doku mühendisliği çalışmaları ve kök hücre terapileri yönünde başlatılmıştır [2]. Her ne kadar bu alanda çalışmalar bulunsun da yapılan araştırmalarda çeşitli zorluklar ve sınırlamalar ile karşılaşmaktadır. Bu sorunların en önemlilerinden bir tanesi de kök hücrelerin ve nanomalzemelerin birbirleri ile olan etkileşimlerinin henüz açıklık kazanmamış olmasıdır. Son yıllarda nanopartiküller hakkındaki mevcut bilgiler ışığında yeni ve işlevsel nanomalzemeler üretilmekte olup virüs bazlı gen taşıma sistemleri yerine nanopartikül esaslı sistemlerin kullanıldığı çalışmalar, kanser tedavileri, aşı geliştirmelerine yönelik araştırmalar bildirilmektedir; ancak hücre içine giren nanopartikül veya nanomalzemelerin hücre içi lokalizasyonu, bu durumun ilerde kök hücre üzerinde ne gibi bir etkiye neden olacağı ve hücrenin bu partikülü ne şekilde metabolize edeceği bilinmemektedir [2]. Günümüzde endüstriyel

alanlarda ve sanayide bakır, çinko, palladyum, altın gibi çeşitli nanopartiküllerin kullanıldığı bilinmektedir. Bu nanopartiküllerin yanında geniş kullanım alanı bulan nanopartiküller arasında Ag ve TiO₂ nanopartikülleri de çok önemli bir yer kaplamaktadır.

Gümüş nanopartikülü antimikrobiyal etki mekanizması sayesinde medikal, cerrahi ve diş hekimliği ürünlerinde, su arıtma sistemlerinde [44], tekstil ürünlerinde, gıda sanayinde, optik saçılım özelliği sayesinde biyosensör şeklinde, görüntüleme sistemlerinde ve özellikle dolaşım sistemine katılarak hedeflenmiş hücre ve organlara ilaç taşıma amacı ile ilaç salınım sistemlerinde [46] kullanılabilmektedir.

Titanyumdioksit nanopartikülü ise kişisel bakım ürünleri [47], deterjanlar, elektronik cihazlarda kullanım alanı bulmuştur ve bu ürünler gün geçtikçe artmaktadır.

Gümüş ve titanyumdioksit nanopartiküllerinin kullanım alanları ve insanoğlunun bunlara maruziyeti ile meydana gelen endişeler sonucunda sitotoksikolojik çalışmalar önem kazanmaktadır. Gümüş nanopartiküllerinin antibakteriyel özellikleri için kozmetik ve tekstil ürünlerinde kullanıldığı ancak terleme ile dermal kontaminasyona neden olduğu bildirilmiştir [48]. Paddle-Ledinek ve ark. (2006) yaptıkları çalışmalarında yara iyileştirmesinde kullanılan deri örtüsünden keratinositlere nanopartikül geçişi olduğunu rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada da Ag nanopartiküllerinin hem keratinositler hem de fibroblastlar için toksik olduğu gösterilmiştir [49]. Gümüş nanopartikülünün insan hepatoma hücrelerindeki (HepG2) non-toksik konsantrasyonlarının ($\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$) bu hücreler üzerinde oksidatif strese neden olduğu ve aynı zamanda bu konsantrasyonların mezenkimal kök hücreler üzerinde ise toksik etkileri olduğu bildirilmiştir. Buna göre de gümüş nanopartikülünün non-toksik konsantrasyonlarının da hücreler üzerinde kullanımının güvenli olmadığı anlaşılmaktadır [50, 51].

Gıda, eczacılık ve kozmetikte de kullanılan TiO₂ nanopartikülleri ile yapılan sitotoksikite çalışmalarına baktığımızda ultra küçük boyutları sayesinde çeşitli yolları (inhalasyon, dermal vb) kullanarak canlı bünyesine girdiklerinde [52] inflamasyon, fibrozis ve DNA hasarlarına neden oldukları gösterilmiştir [53]. Jin ve ark. (2008) fibroblast hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmalarında ise hücreler üzerindeki etkilerin doz ve zamana bağlı

olarak değişiklikler gösterdiklerini belirlemişlerdir [54]. Ayrıca TiO_2 nanopartiküllerinin endotel hücrelerinde inflamasyona [53], lenfoblastoid hücrelerde DNA hasarına [55] ve hamster embriyo fibroblastlarında ise apoptoza [56] neden olduğu rapor edilmiştir. Doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmak üzere üretilen TiO_2 nanopartiküllerinin farklı doz, boyut ve şartlarda mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşması üzerinde negatif etkileri olduğu gösterilmiştir [57].

Varolan nanopartiküllerin yanı sıra gelişen nanoteknoloji ile birlikte her geçen gün yeni nanopartiküller ve kombinasyonları da üretilmektedir. Bu kombinasyonlar tek nanopartiküllerden farklı fizikokimyasal özellikler göstermekte ve etki mekanizmaları da değişmektedir [58]. Ag ve TiO_2 nanopartiküllerinin bir kombinasyonu olan $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ nanopartikülünün son derece güçlü bir antimikrobiyal etkiye sahip olduğu yapılan son çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle çeşitli antibakteriyel yüzey kaplamaları ve antibiyotiklere alternatif olarak kullanım alanları sayesinde insanların yeni nanopartiküllere maruziyeti de söz konusu olmaktadır [59, 60].

Nanopartiküllere; solunum, deri, ağız, intravenöz ve subkütanöz enjeksiyonlar, sindirim gibi çeşitli yollar ile maruz kalınması ve günlük hayatta nanopartiküllerin yoğun kullanımı çeşitli endişelere yol açmaktadır. Kimyasal yollar ile üretilen nanopartiküllerin toksik maddeler açığa çıkartması, maliyetli, uzun sürede olması gibi nedenlerden ötürü güvenli üretim yolları aranmaktadır. Buna göre de son yıllarda oldukça önem kazanan yeşil kimya (biyojenik) yöntemlerinden nanopartikül üretiminde de faydalanılmaktadır. Böylece kimyasal yöntemler ile üretilen nanopartiküllere kıyasla daha ucuz, daha kısa sürede ve toksik kalıntılar oluşturmeyan bitki bazlı sentezler geliştirilmiştir.

Nanopartiküller ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar; kullanılan sentez yöntemleri, elde edilen nanopartiküllerin farklı boyut, doz ve özelliklerde olması, incelenen hücre hatlarının birbirinden farklı olması, hücrelerin nanopartiküllere maruziyet şartlarının, doz ve zamanlarının farklı olması ve laboratuvarında kullanılan teknikler nedeni ile çok fazla değişiklik göstermektedir. Güvenli nanopartikül üretim yöntemleri geliştirilmesine rağmen hem kimyasal hem de biyojenik nanopartiküllerin hücreler üzerindeki etkilerine dair çalışmalar yetersizdir ve biyojenik nanopartiküllerin de hücreler ile etkileşimleri bilinmemektedir. Literatürde çeşitli bitkisel bazlı biyojenik

yöntemler kullanılarak Ag nanopartikülünün sentezlendiği bildirilmesine rağmen TiO_2 ve $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ nanopartiküllerinin bitkisel bazlı biyogenik yöntem ile uygulamalarına dair çalışmalar son derece azdır. Kimyasal yöntemler ve biyogenik yöntemler ile üretilen nanopartiküllerin belirli hücre hatları ve kök hücreler üzerindeki toksikolojik etkileri, kök hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmaları üzerindeki etkilerinin incelenmesi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu nedenle bu çalışmada ilk kez olarak, kimyasal ve bitki bazlı biyogenik yöntemler ile üretilmiş nanopartiküllerin normal hücre hatları ve kök hücreler üzerindeki etkisi incelendi.

Buna göre de çalışmamızda kimyasal ve biyogenik yöntem ile sentezlenmiş TiO_2 , Ag ve $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ nanopartikül kompozitleri kullanıldı. Nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları; elektroforetik ışık saçılması tekniği ile zeta potansiyeli ölçümü ve taramalı elektron mikroskopisi ile boyut ve dağılım analizi şeklinde gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarına göre kimyasal sentezlenmiş TiO_2 , Ag ve $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ nanopartiküllerinin boyut aralığı sırası ile 40-86 nm, 76-200 nm ve 35-65 nm, bitki bazlı biyogenik yöntem ile sentezlenen nanopartiküllerinin boyutları ise TiO_2 için 52-78 nm, Ag nanopartikülü için 35-50nm ve $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ için 55-100nm olarak belirlendi. Tüm nanopartiküllerin yüzey yükleri negatif olarak (-16,2 mV ila -34,2 mV aralığında) analiz edildi. Bu nanopartiküllerin farklı konsantrasyonları (1-100 $\mu\text{g/mL}$) hazırlandı. Her bir hücre hattı için her nanopartikülün proliferasyon etkisi incelendi. Nanopartiküllerin kök hücreler üzerindeki en uygun konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından, kök hücreler üzerindeki farklılaşmalarına olan etkileri incelendi.

Buna göre de elde edilen sonuçlar doğrultusunda farklı nanopartiküllerin, farklı sentez yöntemine bağlı olarak farklı doz, boyut ve şartlar altında normal ve mezenkimal kök hücreleri üzerinde birbirinden farklı tepki verdikleri şeklinde olup literatürde karşımıza çıkan sonuçlar ile birbirini destekler nitelikte olarak belirlendi.

Tez çalışması 2011-07-04 KAP06 numaralı projesi ile Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklendi. TÜBİTAK tarafından yayınlanan 2003-2023 Teknoloji Öngörü Çalışmasında vurgulanan Türkiye’de yapılması gereken bilimsel çalışmalar için kök hücre teknolojilerinin geliştirilmesi ve özellikle

rejeneratif tıp ve nanoteknoloji uygulamalarında kullanılabilir hale gelmesi hedefine de uygun olarak ulaşılabilir adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kullanımı ile ülkemizde ilk kez olarak devamlı kültürü, karakterizasyonu, kriyoprezervasyonu ve nanopartikül etkileşimleri gerçekleştirildi. Nanoteknoloji uygulamalarında kullanılmak üzere L929, J774 ve ADMKH kültür modelleri üzerinde çalışılarak güvenli nanopartikül kullanımı için öneriler sunuldu.

1.2 Tezin Amacı

Bu tezin amacı çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip kimyasal ve biyojenik yöntemler ile sentezlenmiş nanopartiküllerin somatik hücre hatları ve adipoz dokudan elde edilmiş mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkisinin incelenmesi, incelenen nanopartiküllerin kök hücrelerin farklılaşmasına etkisinin belirlenmesi ve elde edilen sonuçların doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanılmak üzere önerilmesidir.

1.3 Hipotez

Çalışmanın hipotezini doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanılan somatik hücreler ve özellikle son yıllarda kullanımı artan mezenkimal kök hücreler ile birlikte son yıllarda ultra küçük boyutlardaki farklı özellikleri nedeni ile geniş kullanılm alanına sahip nanopartiküllerin etkilerinin incelenmesi oluşturur.

Hedefe ulaşmak için aşağıdaki basamaklar gerçekleştirildi;

- Kriyobanktan somatik hücre hatları ve adipoz dokudan elde edilmiş mezenkimal kök hücrelerin çözdürülerek çıkarılması ve devamlı kültürünün yapılarak laboratuvar şartlarına adaptasyonu ve kriyoprezervasyonu,
- Laboratuvara adapte edilen insan adipoz dokusundan elde edilmiş mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu,
- Kimyasal ve biyojenik yöntemler kullanılarak elde edilen ve literatürde geniş yer tutan TiO_2 ile Ag nanopartiküllerinin sentezi ve TiO_2 ile Ag nanopartiküllerinden farklı etkilere ve özelliklere sahip nanopartikül kombinasyonu olan $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ nanopartikülünün elde edilmesi/temin edilmesi,
- Elde edilen/temin edilen nanopartiküllerin karakterizasyonları,

- Nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak tüm hücre hatlarının proliferasyonlarına etkilerinin belirlenmesi,
- Aynı konsantrasyonların mezenkimal kök hücrelerin farklılaştırılmasına etkilerinin incelenmesi ve
- Elde edilen sonuçların mikroskopik, histolojik ve istatistiksel olarak değerlendirilmesidir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

Son yıllarda gelişen nanoteknoloji sayesinde günlük hayatta kullandığımız pek çok üründe ve biyomühendisliğin önemli çalışma alanlarından biri olan doku mühendisliği ve rejeneratif tıp gibi hücre/kök hücre temelli çalışmalarda nanopartiküller geniş bir kullanım alanına sahip olmaktadır. Nanopartiküller ile etkileşimde olan kök hücrelerin arasındaki ilişkiyi inceleyen kök hücre nanoteknolojisi günümüzün en hızlı ilerleme gösteren çalışma alanlarından bir tanesidir ve bu nedenle bu bilim dalının daha geniş bir şekilde anlaşılabilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.1 Nanoteknolojinin Tarihçesi

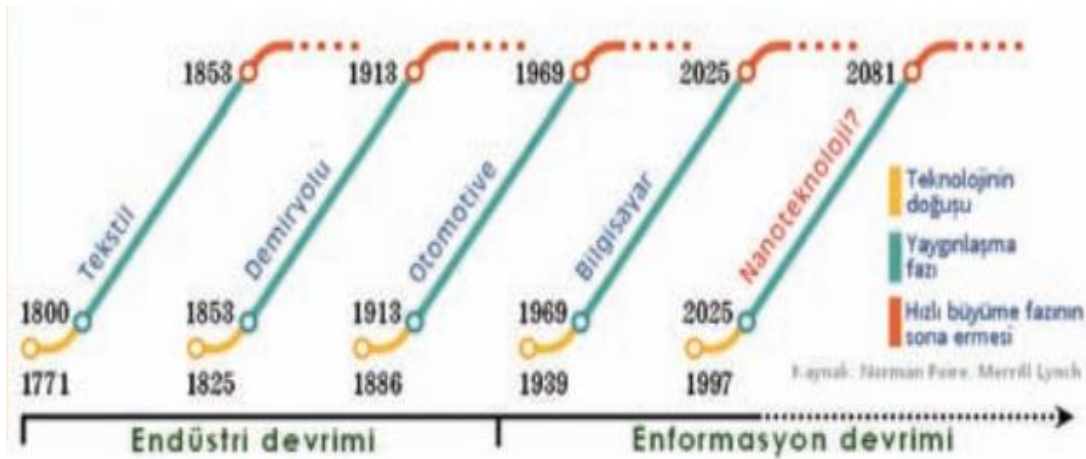
Nanoteknolojinin temelleri bilim dünyasında 20. yüzyılın ilk yarısından sonra atılmıştır. İlk olarak 29 Aralık 1959'da Amerikan Fizik Cemiyeti'nde gerçekleştirdiği "There is Plenty of Room at the Bottom" (Aşağıda Daha Çok Yer Var) başlıklı bir konuşması ile Richard Feynman nanoteknoloji teriminin fikir babası olarak kabul edilmektedir. Feynman konuşmasında nanoteknoloji kelimesini kullanmamışsa da bahsettiği konuların yıllar sonra nanoteknolojiyi anlattığı anlaşılmıştır [2]. Yazılı literatürde ise 1974'de yayınlanan makalesi ile Dünya'da ilk kez nanoteknoloji kelimesini kullanan kişi Norio Taniguchi olmuştur [3].

Sonraki yıllarda (1986) Eric Drexler ilk nanoteknoloji derecesini alan, ilk nanoteknoloji kitabını yazan ve nanoteknoloji dersini ilk veren kişi olarak tarihe geçmektedir. Drexler'in nanoteknoloji üzerine yazdığı kitaplar "Yaratma Makineleri: Nanoteknolojinin Yaklaşan Devri" ve "Nanosistemler: Moleküler Mekanizmalar, Üretim

ve Hesaplama" olup buralarda istenilen maddeyi atom atom dizerek oluşturan nanorobotların varolabileceğini ispat etmeye ve bu teknolojinin etkilerini ortaya çıkarmaya çalışmıştır. Ayrıca "Moleküler Üretim" adlı bir teknolojiyi tanıtmış ve ileride istediğimiz malzemeyi moleküler düzeydeki nanorobotlarla yapabilme ihtimalimizin olduğunu ispatlamak istemiştir [4].

İlerleyen yıllardaki nanoteknolojik gelişmeler sırası ile 1981'de Gerd Binnig ve Gerhard Rohrer tarafından Taramalı Tünelleme Mikroskobu (STM)'nin üretilmesi, 1986'da Binnig, Quate ve Gerber'in Atomik Kuvvet Mikroskobunu (AFM) bulması, 1991'de Sumio Iijima'nın karbon nanotüpü bulması şeklinde devam etmiştir [5].

Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi'nin (National Aeronautics and Space Administration/NASA) 1996 yılında nanoteknoloji üzerinde çalışmaya başlaması ve gelişmiş devletlerin nanoteknolojiye finansal destek vermeye başlamaları ile nanoteknolojik üretimler hız kazanmıştır.



Şekil 2. 1 XVIII. yy'dan itibaren sanayi devrimleri [6]

2.2 Nanoteknoloji

Son yıllarda nanoboyutlu malzemeler üzerine gerçekleştirilen çalışmalar büyük bir gelişme göstermektedir. Bu nedenle nanoteknoloji çok hızlı gelişen araştırma alanlarının başında gelmektedir [7]. Daha büyük boyutlarına göre oldukça farklı elektriksel, mekanik, optik ve manyetik özellikler gösteren atomik ve moleküler boyutlardaki (1-100 nm) fonksiyonel materyallerin, aletlerin, sistemlerin üretilmesini konu alan bilim dalına nanoteknoloji denir [8]. Nanoteknoloji nano boyuttaki yeni

fiziksel özelliklerin varlığı, atomik ve moleküler boyutlardaki analizler, maddelerin atomik boyutlarda kontrolü ve niteliksel olarak yeni özelliklere sahip olan fonksiyonel kompleks sistemlerin üretilmesi gibi temel fiziksel ve kimyasal konuları kapsar [7]. Özetle bu bilim dalı temel olarak nanoyapıdaki malzemelerin sentez, karakterizasyon, araştırma ve faydalanımları ile uğraşır [9].

Mevcut teknolojilerin küçültülerek daha ileri düzeyde duyarlı sistemlerin oluşmasına imkân veren nanoteknolojik çalışmalar sayesinde iyi dizayn edilmiş, daha uzun süre dayanan, daha temiz, güvenli ve akıllı ürünleri evde, iletişimde, ulaşımda, tarımda, tıpta, kimyada, fizikte, biyoteknolojide ve endüstrinin her alanında kullanmaya olanak sağlayacaktır [10].

Nanoteknolojinin gelecek yıllarda ne tür özellikler taşıyacağı ile ilgili Li ve ark. (2005) 2000 ila 2020 yılları arasında 4 nesillik bir tahminde bulunmuştur [11], [12]. Buna göre de nanoteknolojinin ilk nesili nanotüpler, nano yüzeyler ve nanokaplamalar gibi basit olanlarıdır. 2005 yılı sonrasında keşfedilecek olan ikinci nesil; aktif yapılı, morfolojik, biyolojik ve manyetik özellikleri gibi çeşitli özelliklerini değiştirebilen nanoteknolojik ürünlere kucak açacaktı. Örneğin hedeflenmiş ilaç ya da kimyasallar, enerji depolama cihazları, transistörler ve benzeri gibi... Üçüncü nesil nanoyapılar (2010 ve sonrası) nanosistemler, moleküllerin kendiliğinden bir araya gelip bağ oluşturabildiği ya da kendi kendini organize edebilen yapılar olabilirler. Yapay dokular ve elektronik cihazlar bunlar arasında yer alabilecekti. 2015-2020 yıllarındaki 4. nesil de moleküler boyutlardaki nanosistemleri içerecekti ve bu nanosistemde yer alan her bir molekül de spesifik bir yapıya sahip olacak ve farklı bir rol üstlenecektir [12].

Son yıllarda bu bilim dalının gelişmesi ve uygulamaların artması ile nanotıp, nanobiyoteknoloji, nanopartikül ve nanotoksikoloji gibi terimler ortaya çıkmıştır [7]. Bu nedenle de bu tez çalışmasında bu terimler üzerinde durulmaktadır.

2.2.1 Nanoteknolojinin Sanayide Kullanımı

Nanopartiküller bulk formundan farklı fizikokimyasal etkileri sayesinde sanayi alanında büyük oranda kullanım alanı bulmuştur. Günlük kullanılan pek çok ürün içerisinde nanopartikül ya da nanomalzeme teknolojisini içermektedir. Gıda, tekstil, kozmetik,

boya, askeri ve elektronik alanlarda nanopartiküller büyük oranda kullanılmaktadır. Kırışmayan ya da leke tutmayan kıyafetlerin geliştirilmesi, boya malzemelerinin solmayan, leke tutmayan ve kolay uygulanabilirliğinin sağlanması, daha hafif teknolojik ürünlerin (telefon, bilgisayar gibi) elde edilmesi, güneş ışığından korunma amacı ile ışınları yansıtıcı özellikte kremlerin üretimi, su ve hava filtrasyonunda nanopartikül bazlı filtrelerin üretimi, gıdaların bozunmaması ve antimikrobiyal özelliğinden faydalanılmak amacı ile ambalaj üretimi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Bu kullanım oranı da her geçen gün yeni nanopartiküllerin üretimi ile artış göstermektedir [13]. Sanayide nanopartikül kullanımı ile birlikte günlük kullanılan ürünlerin hayatı kolaylaştırıcı, daha etkili, daha iyi faydalanımlar sağlayan pratik ürünlerin de artması beklenmektedir.

2.2.2 Nanobiyoteknoloji

Nanobiyoteknoloji biyolojik sistemler üzerinde nano boyutta yapılan tüm araştırmaları kapsamaktadır [14]. Nanoteknoloji ve biyoteknolojinin ortak bir noktada birleşmesi sonucu ortaya çıkan bir bilim dalı olan nanobiyoteknoloji, nano boyuttaki materyallerin ya da ürünlerin yapımında biyolojik moleküllerden yararlanır. Oluşan bu nano materyaller ise biyolojik sistemleri etkilerler. Nanobiyoteknolojinin katılımıyla birlikte gelecekte biyolojik sistemlerde özelleşmiş bölgeleri hedefleyebilen, bulunduğu bölgeden farklı olarak çevresindeki yapıları denetleyebilen, çeşitli kimyasalların salınımında görev alabilen, dokuların veya hücrelerin verdikleri yanıtları algılayabilen ve çevresinde bulunan dokuları yeniden oluşturabilen çeşitli nanopartiküllerin veya başka yapıların geliştirilmesi hedeflenmektedir. Nano boyuttaki materyaller insan vücudunda bulunan hücrelerden daha küçüktür. Hücre içerisinde bulunan makro moleküllerle hemen hemen aynı boyutta oldukları bilinmektedir. Yapılan araştırmalar DNA'nın eninin yaklaşık olarak 2,5 nm olduğunu ve protein moleküllerinin eninin ise 1–20 nm arasında değiştiğini ortaya koymuştur [14]. Canlı hücrelerin fonksiyonel bileşenlerinin bu doğal nano boyutları, nanoteknolojinin biyoteknoloji içerisinde uygulanmasını kaçınılmaz hale getirmektedir [15]. Sonuç olarak nanobiyoteknolojideki gelişmeler gelecek yıllarda özel olarak dizayn edilmiş nano yapıların iletişimi sağlayan bir operatör vasıtasıyla kontrol edilerek canlı bir organizma (örneğin bir hastada) içerisinde idare

edilebileceğini ve verilen sinyallerle istenen noktalara yönlendirilebileceğini göstermektedir [16], [17].

2.2.3 Nanotıp

Günümüzde bilimsel ve endüstriyel pek çok alanda nanoteknolojiden faydalanılmaktadır [18], [19]. Nanotıp terimi de nanoteknolojinin tıp alanında uygulanması anlamına gelmektedir. Nanotıp fikri ilk kez olarak Nobel ödüllü Profesör Richard Feynman (Şekil 2.1) tarafından dile getirilmiştir. Feynman ince robotların ve nano boyuttaki aletlerin tanı ve tedavide daha güvenilir, kesin, ucuz ve hızlı yaklaşımların sağlanmasında kullanılabileceğini söylemiştir [2]. Ulusal Sağlık Örgütü (National Institute of Health-NIH), nanotıp terimini zarar görmüş dokuların (kemik, kas ya da sinir) iyileştirilmesi için moleküler boyutlarda spesifik buluşlar geliştiren nanoteknolojinin bir yan dalı olarak tanımlamaktadır [20]. Avrupa Bilim Vakfı (The European Science Foundation-ESF) da tanıya, tedaviye ve hastalanmayı ve travmatik yaralanmaları engellemeye, ağrıları dindirmeye ve insan sağlığını korumaya yönelik moleküler araçlar ve moleküler bilginin kullanıldığı bilim ve teknoloji olarak nanotıbbı tanımlamıştır [21].

Nanotıbbın çalışma alanları ilaçların taşınması, biyomateryallerin oluşturulması, *in vivo* görüntüleme, *in vitro* tanı, aktif implantların oluşturulması ve hastalıkların tedavisi olmak üzere çeşitli başlıklar altında toplanabilir. Temel yaklaşımı hasta hücrelerin sağlıklı hücrelere oranla daha çabuk bir biçimde ortadan kaldırılması olan ameliyat, kemoterapi ve radyasyon ile muamele gibi konvansiyonel tedavilerin aksine, nanotıp spesifik hücrelerin belirlenmesi, öldürülmesi veya tedavi edilebilmesi için çok yönlü uygulamaları kullanmayı amaçlamaktadır. Bu nedenle nanotıp yalnızca nanoteknolojik kavramların kabul edilmesine ve uygulanmasına değil, aynı zamanda gerekli bilgilerin nanoteknolojiye aktarılmasına da ihtiyaç duymaktadır. Bu yüzden bu iki çalışma alanı birbirleri ile koordineli şekilde gelişmektedir [22].

Son yıllarda bilimin her alanında olduğu gibi tıp alanında da nanoteknolojiye olan ilginin artmasının esas nedeni ileride çeşitli hastalıkların tanısında ve tedavisinde nanopartiküllerin ve nano boyuttaki cihazların kullanılmasının beklenmesidir [23], [24], [25]. Nanotıbbın hedeflerinin bir diğeri de tıp alanında uygulanması amaçlanan ve yeni

fonksiyonel ve dinamik özelliklere sahip çok yüzeyli moleküler agregatların tasarlanmasıdır. Bu amaç doğrultusunda boyuta ve bölgeye spesifik nano boyuttaki sistemler üretilmeye çalışılmaktadır. Bu yaklaşım aynı zamanda kişiselleştirilmiş tıbbın geliştirilmesi doğrultusunda yeni olasılıklar önermektedir. Kişiselleştirilmiş tıp gelecekte genomik ve proteomik teknolojileri kullanarak her hasta için en uygun farmakoterapinin geliştirilmesini hedeflemektedir [26].

Diğer taraftan nanoteknolojik çalışmalardan doku mühendisliğinde de faydalanılabilecektir. Özellikle kök hücre biyolojisi ve kök hücre çoğalması, farklılaşması ve transplantasyonlarında (hücre/doku nakilleri) oldukça önem kazanmaktadır [18], [19]. Bu da yeni bir çalışma alanı olan kök hücre nanoteknolojisini doğurmaktadır.

2.2.4 Kök Hücre Nanoteknolojisi

Rejeneratif tıp ve doku mühendisliği çalışmalarında önemli yer alan kök hücrelerin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda nanopartiküller kullanılarak migrasyonu ve bulunduğu yerdeki hücresel davranışlarının (çoğalma, farklılaşma gibi) belirlenmesi amacı ile faydalanılabilmektedir. Çeşitli şekillerdeki (karbon nanotüp, quantum dot, partikül) nanomalzemelerin kök hücrelerin çoğalma, kendini yenileme, farklılaşmalarına etkilerinin öğrenilmesi ile amacına uygun kullanımı sağlanabilecektir [27].

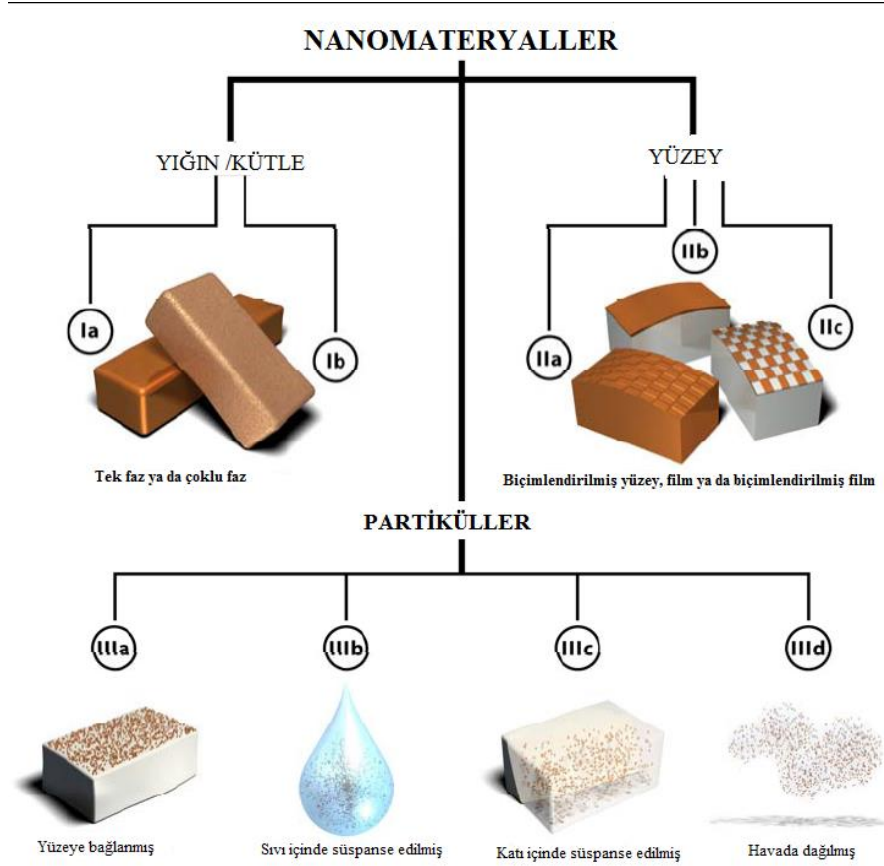
2.3 Nanopartiküller

“Nano” terimi bir fiziksel büyüklüğün milyarda biri anlamına gelmektedir. Bir nanometre ise, metrenin milyarda birine eşit uzunluk birimidir [16], [28], [29], [30]. International Organisation of Standardization (ISO) tanımına göre bir geometrik, aerodinamik, hareket ya da benzeri bir özelliğinin çapının 100 nm’den küçük olan parçacıklar nanopartikül olarak adlandırılır [31]. Çizelge 2.1’de parçacık boyutlarının (Particulate Matter-PM) dağılımına bakıldığında 0,1 μm ’den küçük parçacıklar *ultra ince parçacık* yani *nanopartiküller* olarak adlandırılırken 0,1-2,5 μm aralığındakiler *ince*, 0,2- ≤ 10 μm aralığındaki parçacıklar ise *iri taneli parçacıklar* şeklinde adlandırılmakta olduğunu görmekteyiz [32].

Çizelge 2. 1 Parçacık boyutlarının dağılımı

	UZUNLUK BİRİMİ	SINIFLANDIRMA
PM₁₀	≤10 µm	İri taneli parçacık
PM_{2,5}	≤2.5 µm	İnce parçacık
PM_{0,1}	≤0.1 µm	Ultraince parçacık/Nanopartikül

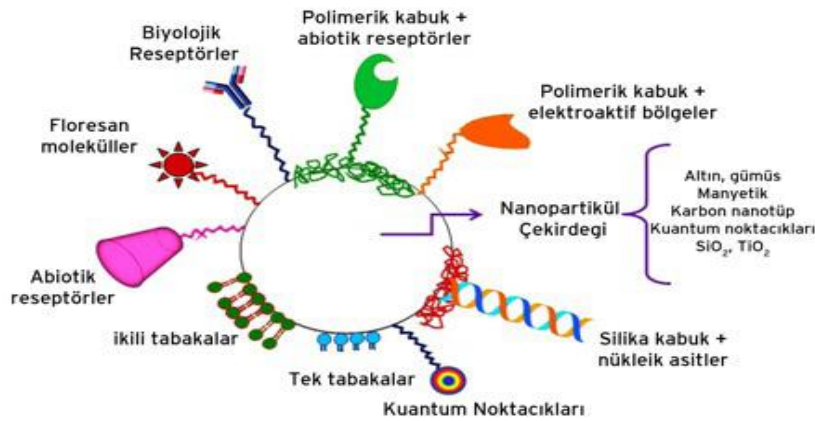
Nano ölçekteki malzemeler, malzemenin moleküler haldeki özelliklerinden çok farklı olan yeni özelliklere sahiptirler [33]. Nanomalzemeler olarak da adlandırılan nanopartiküller kütsel halde bulunan malzemelerle kıyaslandığında toplam hacimlerine göre çok daha büyük oranda yüzey alanına sahiptir. Geniş yüzey alanı elementlerin ve nanoparçacıkların birbirleriyle olan etkileşimini etkiler. Nanopartiküller 100 nm'den daha küçük boyutlarına kıyasla oldukça geniş yüzey alanlarına sahip çözünmeyen partiküllerdir [34], [35], [36].



Şekil 2. 2 Nanopartiküllerin boyutunu kıyaslamalı olarak gösterilmesi [37]

Kütlesel halde bulunan materyaller genellikle sabit fiziksel özelliklere sahiptirler. Nanopartiküllerin ise kütlesel materyallerin aksine oldukça değişken elektriksel, manyetik ve optik özellikleri bulunmaktadır. Tüm bu farklı özellikleri nanopartiküllerin hastalıkların tanısı ve tedavisi konusunda ilgi odağı haline gelmelerini sağlamaktadır [38].

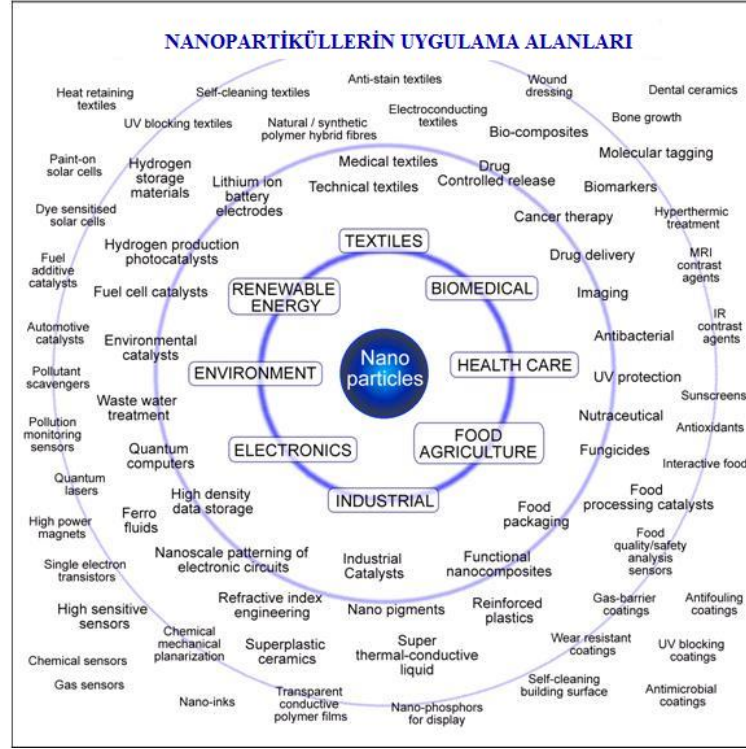
Nanopartiküller kanser teşhis ve tedavisinde, hedeflenmiş ilaç salımında, biyosensörler gibi tıp ve biyoteknoloji alanlarında kullanılmaktadırlar. Nanopartiküller boyut olarak insan hücrelerinden daha küçük olmakla birlikte enzimler ve reseptörler gibi biyolojik makro moleküllerle aynı boydadırlar. Bu nedenle nanopartiküller aynı boyda oldukları peptidler, antikorlar veya nükleik asitlerle konjuge edilerek problemler şeklinde kullanılabilirler. Böylece hücresel boyutlarda moleküler değişiklikler gözlemlenebilir [16], [39], [40].



Şekil 2. 3 Nanopartiküllerin hücresel boyutta kullanımı

Nano taşıyıcılar kimyasallar, manyetik alan, ısı ve pH gibi uyaranlar tarafından aktive edilecek şekilde düzenlenebilirler [19]. Nano taşıyıcılar benzer şekilde ilaçların kan-beyin bariyeri gibi anatomik bariyerlerden, akciğerler ve deriden penetre olması için de kullanılırlar. Son zamanlarda nano taşıyıcılar hedefleme, ilaç taşıma cihazı ve biyolojik sensör olarak çok fonksiyonlu şekilde tasarlanmaktadır [16].

Yukarıda bahsedilen özellikleri nedeni ile son yıllarda nanopartiküllerden mikrobiyoloji, rejeneratif tıp, kozmetik, boya sanayi, ilaç salınım sistemleri, tekstil ve gıda alanında da yararlanılmaktadır [41]. Şekil 2.4'te nanopartiküllerden fayda sağlayan endüstriyel ve teknolojik alanlar gösterilmektedir.



Şekil 2. 4 Nanopartiküllerin kullanım alanları

Nanopartiküllerin çeşitli özelliklerinden faydalanan pek çok branşın içerisinde biyomühendisliğin önemli alanlarından biri olan rejeneratif tıp da bulunmaktadır. Hücre temelli çalışmalarda ve günlük hayatta kullandığımız pek çok üründe nanopartiküller ile etkileşimde olan hücrelerin arasındaki ilişki nanobiyoteknolojinin hızla ilerleyen çalışma alanlarından bir tanesidir ve bu kavramların daha geniş bir şekilde anlaşılabilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.3.1 Nanopartiküllerin Nanotıpta Kullanımı

Gen tedavisi: Son yıllarda yapılan çalışmalar uzun ekspresyon süreleri ve yüksek transfeksiyon etkinliği ile alakalı olarak nanopartiküller ile gerçekleştirilebilmektedir. Nanopartikül sistemleri gen taşıyarak kanserli hücreleri hedeflemekte ve böylece oküler tedavi sağlanmaktadır [42].

Kanser tedavisi: Multidisipliner bir çalışma gerektirmektedir. Moleküler görüntüleme ile kanserli doku ya da kanser hücresinin tespiti, moleküler tanı ile kanserli bölgenin belirlenmesi ve hedeflendirilmiş ilaç tedavisiyle nanopartikül bazlı ilaç taşıma sistemleri ile kanser tedavisi mümkün olabilmektedir. Moleküler görüntülemede yarı iletken

quantum dotlar, altın nanopartikülleri ve demir oksit nanopartikülleri gibi partiküller, diğer moleküllerde mevcut olmayan optik, manyetik ve yapısal özellikleri ile kanserli doku/kanser hücrelerini tespit etmek için kullanılmaktadır. Monoklonal antikorlar, peptidler ve küçük moleküller gibi tümöre hedeflendirilmiş ligandlara bağlanan nanopartiküller de tümör antijenlerine veya tümör damarlarına yüksek afinite ve spesifikle hedeflendirilmede kullanılabilir. Nanopartiküller, multiple teşhis (optik, radyoizotopik veya manyetik) ve terapötik (antikanser) maddelerin bağlanması için geniş yüzey alanına ve fonksiyonel gruplara sahiptirler. Son yıllarda, moleküler ve hücresel görüntüleme için biyoafinite gösteren nanopartiküller, kanser tedavisi için ilaç taşıyan hedeflendirilmiş nanopartiküller ve erken kanser tanısı/görüntülenmesi için nanocihazlar ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Nanopartiküller, her bir hastanın moleküler profiline bağlı olarak kanserin teşhis ve tedavisinde kullanılan genetik ve protein biyoışaretliyecileri kapsayan kişisel onkolojiye imkân sağlamaktadır [42].

Oral tedavi için nanopartikül kullanımı: Ağız yolu ile vücuda verilen peptid ve protein bazlı ilaçlarda parçalanmadan koruması, absorpsiyonu artırması, hedefleme ve ilaçların kontrollü salınımı gibi avantajlar sağlanmaktadır [42].

2.3.2 Nanotoksikoloji

Toksikoloji yaşayan organizmalar üzerinde zararlı etkilerin incelenmesidir. Buradan anlaşılacağı üzere nanotoksikoloji nanopartiküllerin zararlı etkilerini ifade eder [43]. ‘Nanotoksikoloji’ terimi ise toksikolojinin bir alt kategorisi olarak nanopartiküllerin sebep olabileceği özel problemleri ortaya koyan bir dal [43] ve yaşayan organizmalar üzerindeki etkilerinin bertaraf edilmesi ile ilgili nanomateriyallerin geliştirilmesi şeklinde ifade edilmektedir [44]. Nanotoksikoloji nanopartiküllerin canlılar üzerinde etkileri ile uğraşan bilim dalı olarak da tanımlanabilmektedir [44].

Nanoteknoloji, nanotıp ve nanotoksikoloji insan yaşamını daha iyi bir hale getirmeyi amaçlayan tamamlayıcı disiplinlerdir [21].

Nanoteknolojik medikal ve endüstriyel uygulamaların güvenilir şekilde üretimi ve geliştirilebilirliği ve yeni materyallerin üretiminin pek çok fayda sağlayacağı hiç şüphesiz oldukça önemlidir [7], [21], [44]. Bulk formundan farklı özellikler gösteren düşük moleküler ağırlık ve yüksek yüzey alanına sahip nanopartiküllerin toksikolojik

araştırmaları için büyük bir çalışma alanı doğmuştur. Bu üretimler yapılırken her ne kadar bu alandaki çalışmalar için ayrılan btler oldukça az olsa da eř zamanlı olarak nanopartiküllerin negatif yanları da araştırılmalıdır [44]. Nanopartiküllerin olası toksik etkilerinin esas nedenleri şu özellikleridir [45], [46], [47], [48], [49]:

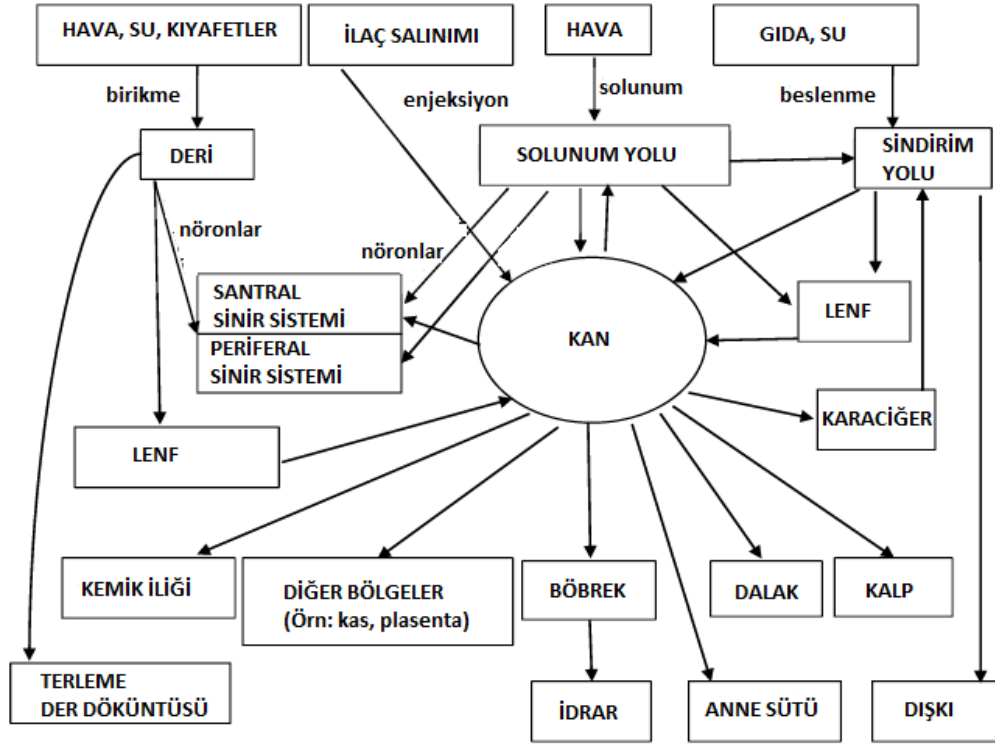
- Boyut
- şekil
- Kimyasal Kompozisyon
- Yüzey Alanı
- Yüzey Reaktivasyonu
- Yüzey Yükü ve
- znebilirliği

Bu nedenle de Avrupa Birliği ve Avrupa Bilim Vakfı nanopartiküllere (NP) dayalı teknoloji ile ilgili olarak risk-fayda haritaları oluşturdular. Elde edilen çalışmalarda ise nanoteknolojiden kaynaklı çevresel zararların mevcut olduğu ile ilgili veriler de karşımıza çıkmaya başlamıştır [43].

Günümüzde ticari olarak yüzlerce çeşit nanoteknolojik ürün ilaç sanayi, kozmetik, tekstil, boya sanayi, gıda endüstrisi ve rejeneratif tıp gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır [29], [50]. Böylece nanotoksikoloji NP'lerin söz konusu organizmalar üzerindeki etkilerinin doz, boyut, şekil, reaktivasyon, materyal kompozisyonu gibi özelliklerini incelemeye odaklanmıştır [51].

2.3.2.1 Nanopartiküllere Maruziyet Yolları

Gelişmekte olan nanoteknolojinin en önemli merak konularından bir tanesi şüphesiz ki insanların nanopartiküllere maruziyeti ile ilgilidir [44]. Nanopartiküllere maruziyet esas olarak solunum, sindirim ve deri yolu ile olmaktadır, daha detaylı giriş yolları ise şekil 2. 5'te gösterilmektedir [52], [53].



Şekil 2. 5 Nanopartiküllerin insan vücuduna giriş yollarının gösterilmesi

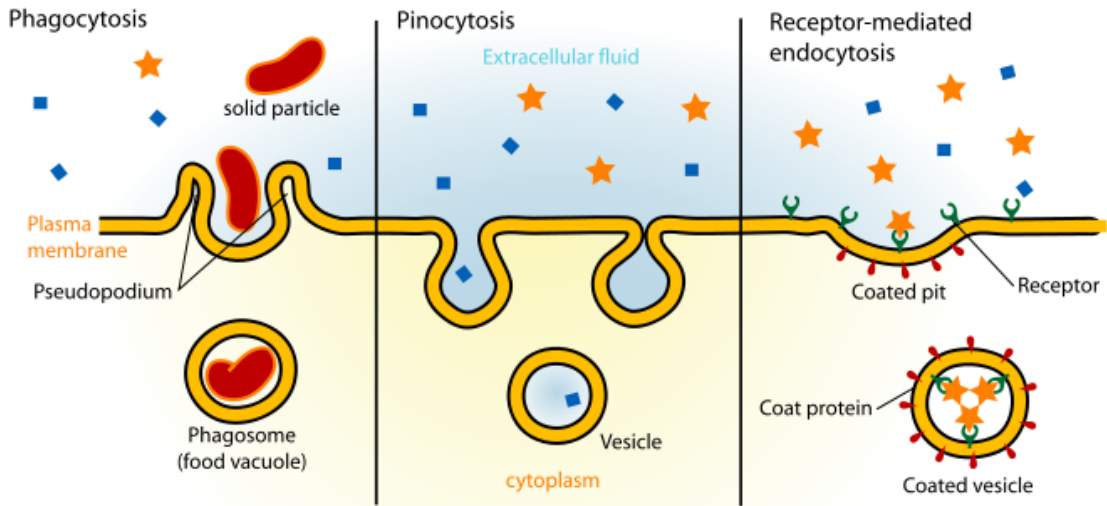
Her ne kadar nanopartiküllerin sahip oldukları özellikleri (mekanik, elektriksel ve kimyasal) mühendislik açısından arzu edilen niteliklerde olsa da bu özellikleri biyolojik ve ekolojik olarak son derece istenmeyen toksikolojik etkilere neden olabilmektedir [21]. NP'ler büyük boyuttaki partiküllere nazaran tüm organizma içerisinde yayılabilirler. Vücut içerisine alınan bir NP çok küçük kapiler damarlara dahi penetre olabilir ve NP'ün yapısına bağlı olarak belirli dokularda birikebilirler [54]. NP'lerin hücre zarından geçebilmeleri ve hücre fizyolojisini etkileyebilmeleri [54] nedeni ile NP'lerin vücut sıvıları, hücreler ve dokular ile etkileşimleri ve organizmaya giriş ve organlara olan olası etki mekanizmaları incelenmelidir [43]. NP'lerin çeşitli hücre hatları üzerindeki toksik etkilerine dair çalışmalar bulunmasına rağmen yetişkin kök hücreler ile NP etkileşimine dair veriler oldukça sınırlıdır [54]. Tüm bu araştırmaların yanı sıra NP'lerin kök hücrelere giriş mekanizmaları ve kök hücre proliferasyon ve farklılaşmaları üzerindeki etkilerinin incelenmesi de önem kazanmaktadır.

2.3.2.2 Hücre İçi Nanopartikül Alım Mekanizmaları ve Etki Eden Faktörler

Yukarıda da belirtildiği gibi nanopartiküllere maruziyetler solunum, sindirim, tedavi amaçlı subkütanöz ve intravenöz enjeksiyonlar ya da dermal kontakt ile meydana gelmektedir [52], [53]. Nanopartiküller insan hücreleri tarafından alınırsa bu durum nanopartiküllerin hücre altı komponentler ve organeller ile etkileşime girebilmesi ve hücre içi çeşitli organellere taşınması ile sonuçlanır. Bu nedenle NP'lerin hücreler arası biyolojik özelliklerinin araştırılması ihtiyacı doğmaktadır [55].

Nanopartiküllerin hücre içine girişine etki eden faktörler partikülün boyutu, yüzey yükü ve yüzey özellikleridir [55]. Endositoz NP'lerin hücre içine alımındaki temel yoldur ve bu proses üç farklı şekilde meydana gelebilir 1) fagositoz, 2) pinositoz (sıvı-faz endositoz) ve 3) reseptör-bağlı endositoz (Şekil 2.6) [56]. Endositoz her hücrede meydana gelir [55] ve hücre yüzeyinde bulunan 'yabancı' maddeleri uzaklaştırmak amacı ile kullanılan konvensiyonel bir mekanizmadır [57]. Kök hücreler de NP'lerin alımı için çeşitli endositotik mekanizmalardan faydalanırlar [58]. Endositozun tüm çeşitleri zar invajinasyonunu içerir ve proses NP'lerin hücre içi vakuollerde sindirimi ile devam eder [57]. Ek olarak pinositoz ve reseptör-bağlı endositoz da, ayrıca, hücre zarında klatrin- ya da kaveolin- kaplı kesecik oluşumu ile yabancı maddeleri hücre içine alırlar. Bu kesecikler (veziküller) GTPaz dinamin aracılığı ile oluşan vezikülün nihayetinde sitosol içerisinde endozomlarda sonlanmasını sağlar [59]. Endositoz çok etkili bir prostestir ancak terapötik uygulamalarda istenmeyen neticelere de yol açabilir.

NP'lerin hücre içine alımında NP boyutu ve yüzey özelliklerinin etkileri ile ilgili pek çok çalışma rapor edilmiştir [60]. Verma ve Stellacci (2010) NP'lerin hücre içine girişinde en uygun boyutun 50 nm olduğunu belirtmişlerdir [61].

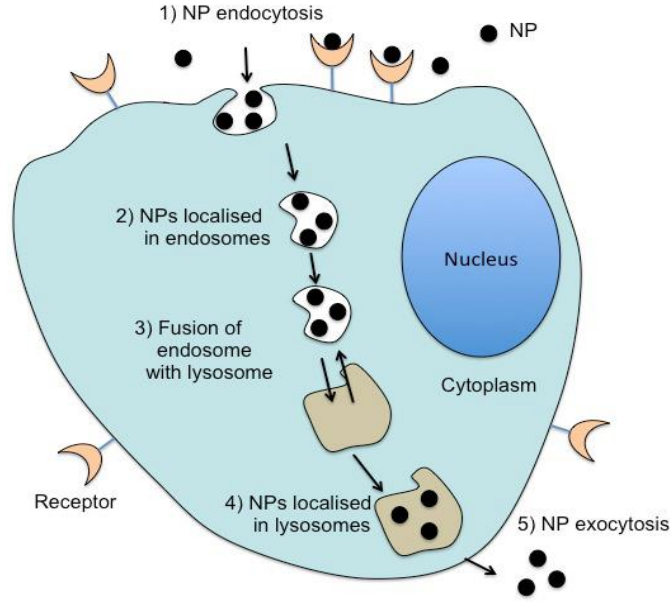


Şekil 2. 6 Üç esas endositoz mekanizması

Ayrıca küre şeklindeki partiküllerin aynı boyuttaki çubuk şeklindeki NP'lerden %500 daha fazla hücre içine alındığı görülmüştür. Cho ve ark. (2009) pozitif yüklü NP'lerin negatif ve nötral yüklü NP'ler ile kıyaslandığında endositotik alımının daha yüksek seviyelerde olduğunu bulmuşlardır [62]. Hücre yüzey özelliklerinin NP-hücre etkileşimine olan etkileri ile ilgili olarak yapılan bir seri çalışmada da altın nanopartiküllerinin tiyopronin ile yüklenmesinde etilenamid ile yüklenmesine kıyas ile fonksiyonlarının düştüğü, ayrıca PEG ile yüklenmesi ile de hücre yüzeyine tutunmasının arttığı gösterilmiştir [57].

2.3.2.3 Nanopartiküllerin Hücre İçi Lokalizasyonu

Nanopartiküllerin kök hücre sitoplazması içerisindeki dağılımı ile ilgili birkaç *in vitro* çalışma yer almaktadır. Verilere göre NP'ler hücre içine alındıktan sonra sitoplazma içinde veziküllerde lokalize olurlar [58], [63] (Şekil 2.7). NP'ler ayrıca nükleus çevresinde bulunur ve etrafında bir halka oluştururlar ancak içerisine girmezler [64]. Bazı nanopartiküllerin kök hücre sitoplazması içerisine alımından sonra lizozomlara transfer oldukları da rapor edilmiştir [65]. Quantum dotlar ile yapılan çalışmalarda da Chang ve ark. tarafından (2008) bu partiküllerin hücre içine alımının ilk zamanlarında lizozomlardaki parçalanma işleminden kaçtıkları gösterilmiştir. Quantum dotların 21. güne kadar hücre veziküllerinde görüldükleri de belirtilmiştir [66].



Şekil 2. 7 Nanopartikülün hücre içine giriş ve lokalizasyonunun gösterilmesi

2.3.2.4 Nanopartiküllerin Hücre İçi Görüntülenmeleri

Hücre içine alınan NP'lerin hücre/doku içerisinde lokalizasyonu ve herhangi bir patolojiye neden olup olmadığının belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu belirlemede kullanılabilecek en önemli araç görüntüleme sistemleridir [67]. Günümüzde bu amaç ile kullanılabilecek görüntüleme sistemleri geleneksel olarak kullanılan sistemler ve yeni geliştirilen görüntüleme sistemleri olarak şu şekilde sıralanabilir; ışık, floresan, transmisyon elektron ve taramalı elektron mikroskopileri ile Raman mikrospektroskopisi, X-ray mikroskopisi, süperçözünürlüklü illüminasyon, spectral görüntüleme vb [67]. Her ne kadar pek çok görüntüleme sistemi bulunsun da önemli olan kullanılacak bu sistemlerin araştırmacı tarafından ulaşılabilir, kullanılabilir, zaman tasarrufu sağlayabilmesi ve ekonomik olmasıdır. Sıraladığımız özellikleri sağlayan bazı görüntüleme sistemleri aşağıda kısaca belirtilmiştir.

Işık mikroskopisi: Hücre ve doku görüntülemelerinde kullanılan altın standart bir yöntemdir. Hücre ve doku kesitlerinin iki boyutlu gözlenmesi için çeşitli boyama yöntemleri (Giemsa, Dapi, Hematoksilin ve Eozin vb) de kullanılması ile araştırmacılara görüntülemelerde kolaylık sağlanabilmektedir [68], [69]. Işık mikroskopisi toksikolojik çalışmalarda da uzun yıllardan beridir kullanılan etkili, hassas ve ekonomik bir yöntemdir [68]. Hücre ve doku kesitlerinde nanopartikül varlığının tespit edilmesi

yöntemlerinden bir tanesi olarak kullanılan ışık mikroskopisinde özellikle 100 nm'den küçük yapıların incelenmesi için uygun objektif kullanımı gerekmektedir [70]. Tek bir NP görüntülemek kolay olmayabilir, agregat şeklindeki NP'ler ya da 200 nm'den büyük boyuttaki NP'lerin uygun boyama yöntemleri sayesinde doğrudan görüntülenmesi mümkündür; örneğin karbon nanotüpler kesitlerde gri renklerde [67], [71], demiroksit nanopartikülleri kahverengi [72], titanyum dioksit sarı-kahverengi [73] olarak kendini belli etmektedir.

Florasan mikroskopisi: Konvansiyonel floresan mikroskopisi hücre içi görüntülemelerde ve biyomedikal uygulamalarda kullanılabilecek faydalı bir yöntemdir [74]. Nanopartiküllerin hücre içi dağılımlarını görüntülemek için yaygın olarak kullanılmaktadır [67]. Floresan mikroskopisinde ise çeşitli florasan boyalar (örn: florasan izotiyosiyen (FITC) ve indokarbosiyanin) ile görüntülemeler elde edilmektedir [75]. Boyama işlemleri yapılırken dikkate alınması gereken bazı konular vardır. Boyanın reaktivasyonu [74] ve boyamalarda elde edilen ışımanın zaman ile kaybolması [76] bu yöntemin dezavantajı olarak gösterilebilir.

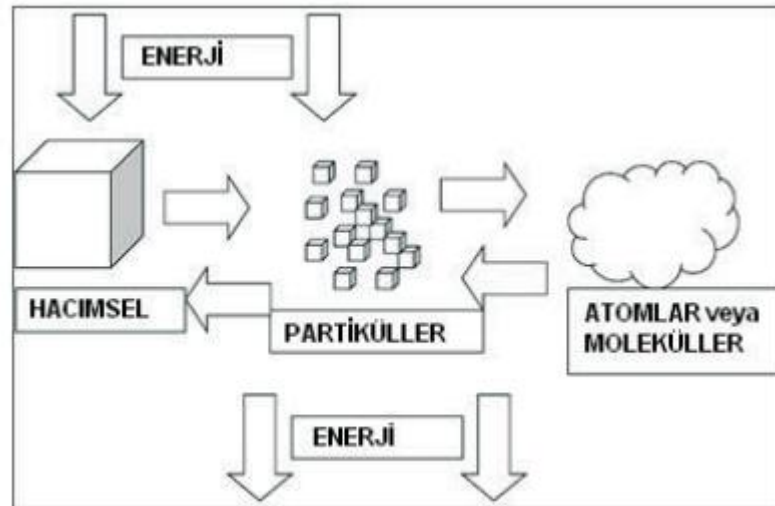
Taramalı elektron mikroskopisi (TEM): Örnek yüzeyi üzerinde mikroskobik bir prop ile tarama yaparak ve örnek yüzeyi ile prop arasındaki belirli karşılıklı etkileşimleri dedekte ederek yüksek oranda büyütme sağlayan ve incelemeler yapan bir yöntemdir. İki boyutlu görüntüleme sistemlerinden farklı olarak 3 boyutlu mikroskopi sağlar yani numunenin yanlamasına x ve y eksenlerine ait yüzey incelemesini yapmakla kalmaz aynı zamanda yüzeye dik z eksenini boyunca da inceleme yaparlar. Taramalı Elektron mikroskobu ile birleştirilerek de kullanımı söz konusudur [77]. Görüntülemelerde altın veya gümüş ile kaplamalar da uygulanmaktadır. Yüksek çözünürlükte 1,3 nm'ye [78] kadar tüm yapıların üç boyutlu görüntülenmesini sağlayabilir [70]. NP ile muamele edilmiş hücre yapılarındaki değişikliklerin de belirlenebilmesi mümkündür [79].

Transmisyon emülsiyon mikroskopisi: Çok küçük ölçeklerde dahi (0,1 nm) görüntüleme sağlayabilen yüksek çözünürlüklü bir yöntemdir [67]. Hücre içi tüm yapıların görüntülenmesini sağlayarak özellikle toksikolojik analizlerde hücresel yapıların bozunup bozunmadığına dair gözlem yapabilmeye olanak sağlar, ancak diğer ışık mikroskopilerinden farklı olarak Transmisyon Emülsiyon Mikroskopisi

görüntülemeleri için preparat hazırlıkları oldukça fazla olup çalışan hatasına açıktır [80]. Zaman ile bozunmaya uğrayabilecek dokuların çalışılmasında da kısıtlamalara neden olan bu yöntem Taramalı Elektron Mikroskopisi ile bertaraf edilebilmektedir [81].

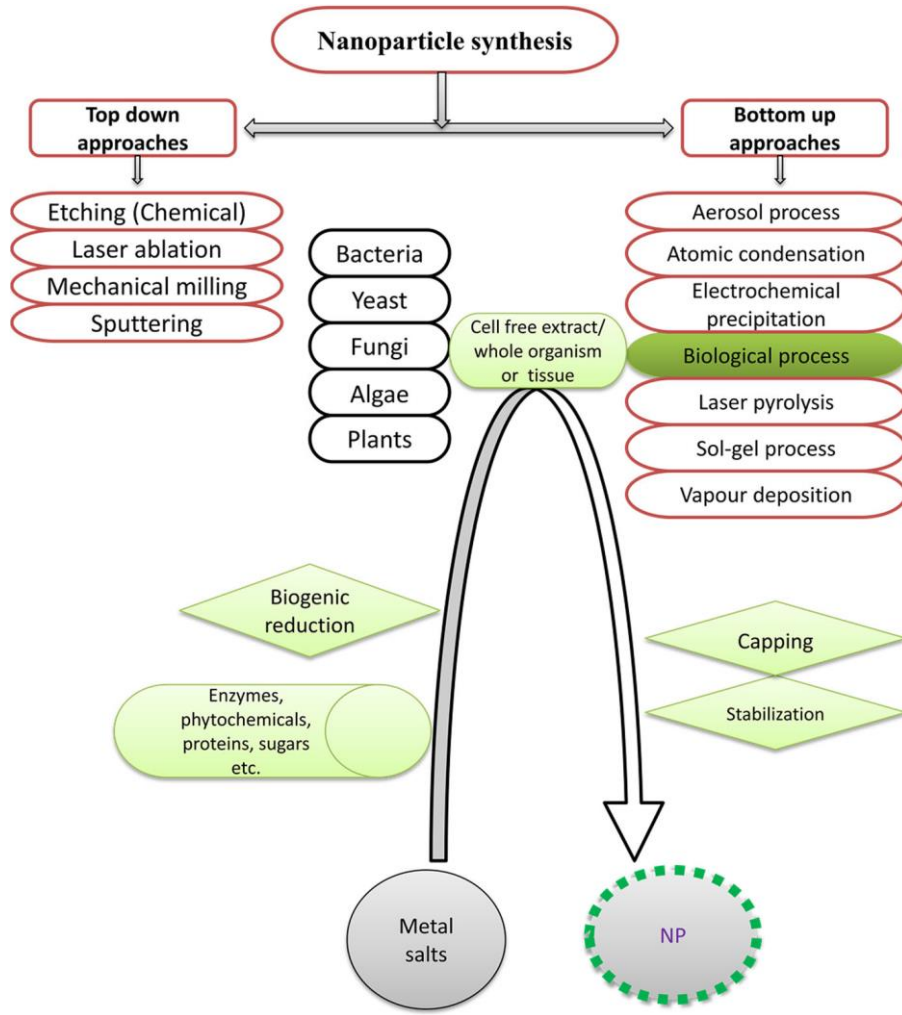
2.4 Nanopartikül Sentezi

Nanopartiküllerin üretimi aşağıdan yukarı (Bottom Up) ve yukarıdan aşağı (Top Down) olmak üzere iki farklı yaklaşım esas alınarak gerçekleştirilmektedir. Yukarıdan aşağıya yaklaşımında uygulanan yöntemlerde kullanılacak malzemeye dışarıdan mekaniksel ve/veya kimyasal işlemler ile enerji verilir ve böylece malzemenin küçültülerek nano boyuta kadar parçalanarak ayrılması esas alınır. Yukarıdan aşağıya yaklaşımında mekanik öğütme ve aşındırma gibi teknikler örnek verilebilir. Bu işlemlerde çok daha fazla enerji tüketimi ile malzemeler nanopartiküllerine parçalanır. Aşağıdan yukarıya yaklaşımında ise atomik veya moleküler boyuttaki yapılar kimyasal reaksiyonlar ile büyütülerek partikül oluşumunun gerçekleştirilmesi olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.8).



Şekil 2. 8 Nanopartikül üretiminde kullanılan yaklaşımlar [82]

Diğer taraftan nanopartiküllerin sentezinde kullanılan yöntemler baz alınarak kimyasal, fiziksel ve son yıllarda oldukça önem taşıyan biyojenik yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 2.9) [42] [83]. Aşağıda bazı sentezleme yöntemlerinden kısaca bahsedilecektir.



Şekil 2. 9 Biyolojik sentez yönteminin vurgulandığı genel nanopartikül üretim yöntemlerinin şematik gösterimi [84]

2.4.1 Kimyasal Sentez Yöntemleri

Kimyasal reaksiyonların gerçekleştiği yöntemler kimyasal temelli yöntemler olarak adlandırılır [83]. En yaygın kullanılan yöntemler arasında kimyasal redüksiyon, sol-jel, durgun yoğunlaşma ve solvent uçurma yer almaktadır.

2.4.1.1 Sol-jel Yöntemi:

Çözelti formundan yola çıkılarak farklı uygulama alanlarına yönelik olarak seramik, cam ve kompozit malzemeler üretim tekniğine verilen genel isimdir. Metal alkoksit çözeltileri veya metal tozları, nitratlar, hidroksitler ve oksitler gibi inorganik bileşiklerin belirli oranlarda su ve asitle birleştirilerek bir solüsyon meydana getirilmesi ve bu solüsyonun belirli sıcaklıklarda karıştırılması neticesinde solüsyon içerisinde birbirini

izleyen bir dizi kimyasal reaksiyon ve taneciklerin sahip olduğu yüzey yüklerinin elektro kimyasal etkileşimleri ile bir ağı meydana gelmesi (jelleşme) ve bu ağı gitgide büyüyen sistem içerisindeki bütün noktalar ulaşarak komple bir yapı (jel) meydana getirmesidir. Sol; sıvı içerisinde koloidal katı taneciklerinin kararlı bir süspansiyonudur. Bu katı tanecikleri, yerçekiminden daha büyük dispersiyon kuvvetlerinden sorumlu olduğundan yeterince küçük olmalıdır. Gerçekte bu tanecikler ne kadar küçük ise, çözeltideki molekülleri konuşmak daha doğru olacaktır. Kolloid olarak tanımlanan tanecikler gözle görülemeyecek kadar küçük 500 nm ve daha altındaki boyutlara sahip taneciklerdir. Bu tanecikler normal optik mikroskopla görülemezler. Çünkü maksimum boyutları ışığın dalga boyuna eşittir. Jel; Koloidal parçacıkların çöktürülmesiyle elde edilen ve bol miktarda su içeren çökeleklerdir. Jel, katı ve sıvı faz arasında bir ara fazdır. Sol-jel Yönteminin Basamakları:

1. Alkoksit Hidrolizi
2. Peptidleşme veya polimerizasyon
3. Jel eldesi
4. Kalsinasyon/ Sinterleme

Sol-Jel Yönteminin başlıca kullanım alanları ise şunlardır: Aşınmaya dayanıklı kaplamaların yapılması, Optik amaçlı kaplamalar, Fiber optiklerde, Yüksek mukavemetli fiber üretimi, Elektronik ve manyetik malzemelerin üretimi [85].

2.4.2 Fiziksel Sentez Yöntemleri

Mekanik enerjinin kullanıldığı gibi fiziksel özelliklerin ön plana çıktığı yöntemler fiziksel yöntemler olarak adlandırılır [83]. Ses, ışın, radyo dalgaları gibi fiziksel etkenlerin kullanıldığı yöntemler fiziksel uygulamalar altında toplanmaktadır. Buradaki amaç hacimsel malzemenin fiziksel uygulamalar ile nano parçalıklara ayrışmasını sağlamaktır. En yaygın kullanılan fiziksel yöntemler ise ultrasonikasyon, radyasyon (ışın), lazer, mikrodalga, elektrokimyasal teknikler olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.4.3 Biyojenik (Yeşil) Sentez Yöntemleri

İstenilen büyüklük ve morfolojide nanopartikül eldesinde kullanılan ve klasik sentez yöntemleri de diyebileceğimiz kimyasal ve fiziksel yöntemler bazı dezavantajlara sahiptir. Bu istenmeyen durumları üstesinden gelebilmek için ise son dönemlerde git gide artan *Yeşil Kimya* uygulamalarından faydalanılmaya başlanmıştır. Fitoremediasyon, biyojenik sentez vs gibi çeşitli terimlerle ifade edilebilen bu yeşil uygulamalar klasik yöntemlere göre daha çevre dostudur. Ayrıca bu yöntemler basit, uygun fiyatlı ve zararlı madde içermeyen yöntemlerdir.

Biyosentezin temeli canlı organizmalardaki kimyasal faaliyetleri ve canlı bünyesinde süregelen enerjinin ve maddelerin kullanılması ile daha karmaşık ürünler elde edilmesine dayanır. Metal nanotaniciklerinin klasik sentez yöntemleri ile üretiminin karmaşık ve çok pahalı olması, toksik madde kullanımı gerektirmesi, farmakolojik ve biyomedikal uygulamalara uygun olmaması gibi dezavantajlarına karşılık biyosentez ile bu sorunlar bertaraf edilebilmektedir. Yani basit ve ekonomik, toksik madde kullanımı gerektirmeyen, farmakolojik ve biyomedikal uygulamalara uygun, geniş yelpazede ticari üretime elverişli sistematik bir üretim prosesi sağlanabilmektedir. Böylece günümüzde sıkça kullanılan bir yöntem haline gelmiştir.

Metalik nanopartiküllerin yeşil senteziyle ilgili farklı görüşler karşımıza çıkmaktadır. İlk görüşe göre metalik nanopartiküllerin hücre dışında oluştuktan sonra kök zarı boyunca taşınıp hücre içine alındığı ya da bitki içerisinde metal tuzlarının indirgenmesiyle oluştuğunu savunmaktadır. Bir diğer görüş ise nanopartiküllerin kökte oluştuğu ve sonrasında bitkiye taşındığı yönündedir. Bitki bazlı yeşil nanopartikül sentezi için en fazla kabul alan görüş, kullanılacak olan metalin iyonik formunun bitki kök zarı boyunca taşınabilmesi, bitki bünyesinde transloke olması ve metalin tuz formunun elementel haline indirgenmesi yönündedir. Böylece metalik nanopartiküllerin bitkide sentezlenebilmesi için en önemli şart kullanılan metalin çözünebilir olması, taşınabilmesi ve transloke olabilmesidir [86], [87], [88].

Bir nanopartikülün biyosentetik olarak üretilebilmesi için şu özelliklere sahip bir proses olması beklenmektedir (a) güvenli, (b) tek bir tepkime basamağı içermesi, (c) toksik atık üretmemesi, (d) kullanılan hammaddenin yenilenebilir olması, (e) sentezlenen ürünün

basit şekilde (tepkime ortamından) ayrıştırılabilmesi, (f) % 100 verim vermesi. Birçok tepkimede ise bu koşulların tamamını yerine getirmek oldukça zordur [89]. Nanoteknolojide biyosentezden faydalanmak için de bitki ekstraktı ve alg, bakteri, maya, mantar ve insan hücresi gibi canlı organizma ya da kimyasalları kullanarak nanotanecek sentezlemek istenmektedir [13]. Aşağıdaki çizelgede biyogenik olarak elde edilmiş nanopartiküllerin sentezi için kullanılan canlı organizmayı, sentez sonucu meydana gelen partikülün boyut ve şekli ile gösterdiği etkinin bir örneği görülmektedir.

Çizelge 2. 2 Biyogenik nanopartikül sentezi ile ilgili çalışmalara örnekler [84]

BİYOLOJENİK UNSUR	BAŞLATICI MADDE VE ŞARTLAR	NANOPARTİKÜL TÜRÜ, BOYUTU VE ŞEKLİ	ETKİSİ	REFERANS
<i>Bacillus Mycoides</i> (Bakteri)	TiO(OH) ₂ , 12 saat, 37°C	TiO ₂ , 40–60 nm, küresel	E. coli (BW25113) suşuna karşı etkili	Aenishanslins ve ark (2014)
<i>Aspergillus Flavus</i> (Mantar)	TiO ₂ 37°C	TiO ₂ , 62–74 nm, oval	S. aureus suşuna karşı etkili	Rajakumara ve ark. (2012)
<i>Gloriosa Superba</i> Yaprakları (Bitki)	CuNO ₃ , 400°C'de 3-4 dakika	CuO, 5–10 nm, küresel	S. aureus ve Klebsiella Aerogenes' e karşı etkili	Naikaa ve ark (2015)
<i>Humicola Sps.</i> (Mantar)	CeN ₃ O ₉ ·6H ₂ O, 50°C	CeO ₂ , 12–20 nm, spherical	Klinik uygulamalar için elverişli	Khan ve Ahmad (2013)

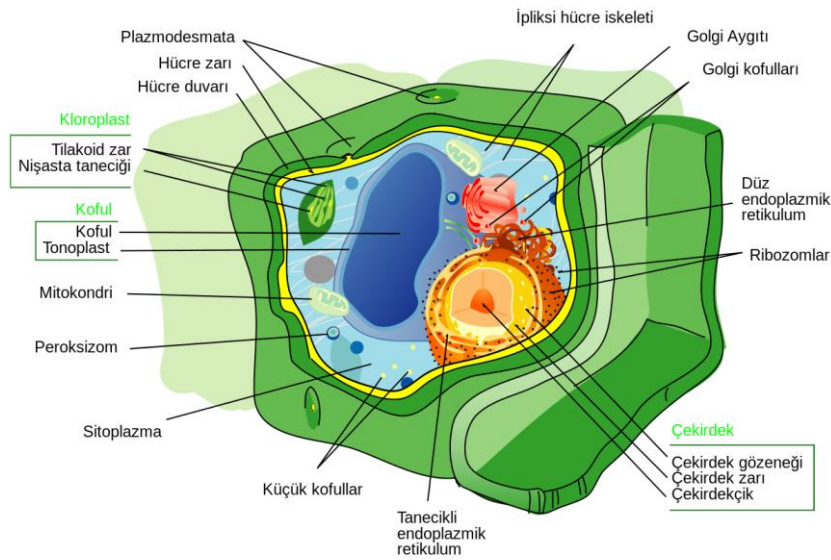
2.4.3.1 Bitki Bazlı Nanopartikül Sentezi

Bitki bazlı biyogenik sentez yönteminde nanopartikül üretimi için baskın malzeme olarak bitkiler kullanılır. Bu yöntem *Fitosentez* olarak da bilinir. Fitosentezde bitkilerin çiçek, yaprak, kök ve tohumları kullanılabilir. Bitkilerin bu organlarından elde edilen ekstraktlar (polisakkaritler, amino asitler, enzimler ya da proteinler gibi) nanopartikül sentezinde reaktif olarak kullanılır. Bu uygulama yüksek oranda nanopartikül üretimi için elverişli bir yöntem olarak kabul edilir ve reaksiyon sonucunda ortaya çıkan atık maddeler çevreye zarar vermeyecek niteliktedir. Diğer mikrobiyal biyosentez yöntemlerine kıyasla bitki bazlı uygulamalar daha hızlı olup elde edilen nanopartiküller ise daha stabil özelliktedir. Fitosentezde üretilen

nanopartiküllerin miktar, boyut ve morfolojileri bitki türüne ve bitkinin kullanılan organına göre çeşitlilik gösterebilmektedir [90]. Bu nedenle sentez yönteminin yanısıra ekstrakt seçimi de önem taşımaktadır. Son yıllarda nanopartikül sentezlerinde medikal alanda kullanılan ve tıbbi bitkiler olarak sınıflandırılan bitkilerin de kullanımı son derece önem kazanmaktadır.

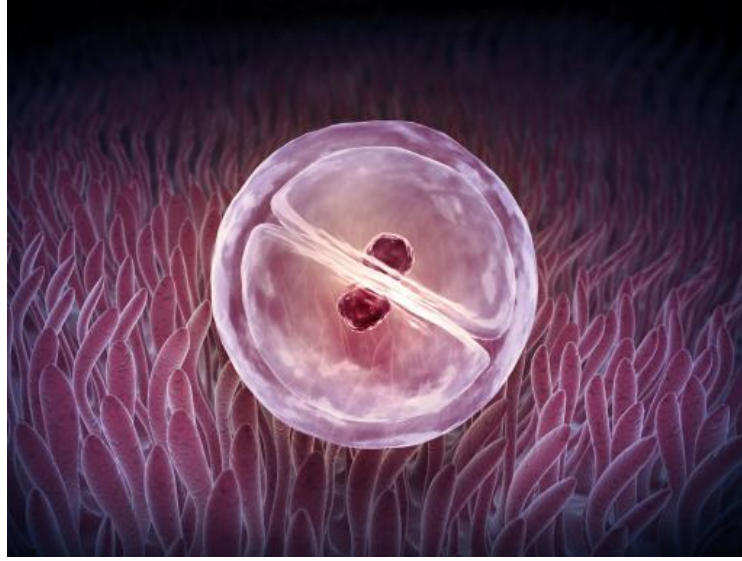
2.5 Hücre Biyolojisi

Hücreler tüm canlı organizmaların yapısal birimleridir [91] (Şekil 2.10). Hücre ve hücrenin kısımlarını konu alan hücre biyolojisi son yıllarda çok hızlı ilerlemeler göstermiş ve canlı organizmaların yapı ve fonksiyonlarını araştırmadaki temel konu olmuştur [92].



Şekil 2. 10 Ökaryotik hücre yapısı

İnsan vücudu yaklaşık iki yüz farklı hücre tipinden oluşmuştur. Bu hücrelerin tümü oosit ile spermin fertilizasyonu ile meydana gelen zigottan oluşur [91]. Zigot; yüksek bölünme hızı ve tüm hücre tiplerine farklılaşma kapasitesine sahip olan totipotent embriyonik kök hücredir. Tüm canlı vücudu bu tek hücreden farklılaşarak meydana gelir (Şekil 2.11). Çok hücreli bir sağlıklı organizmada somatik hücreler, progenitör hücreler ve farklılaşmamış kök hücreler bulunmaktadır. Bazı özel durumlarda ise kontrolsüz çoğalma aktivitesi gösteren kanser hücreleri yer almaktadır.



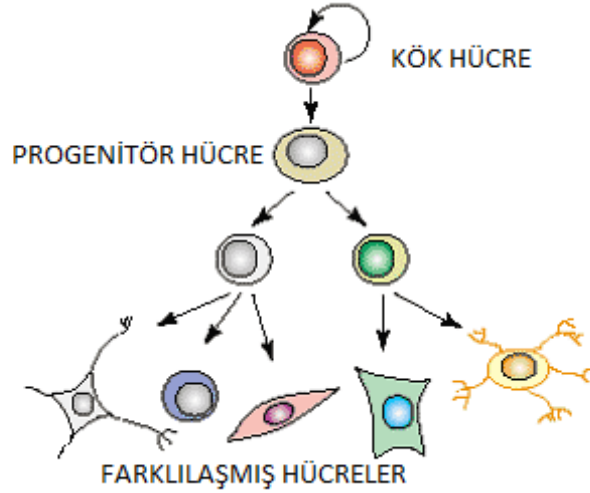
Şekil 2. 11 Yumurta ve spermin fertilizasyonu ile meydana gelen zigot [93]

2.5.1 Somatik Hücreler

Somatik hücreler çok hücreli bir organizmada, üremeye ilgili olan gamet, germ hücresi, gametosit veya farklılaşmamış kök hücre dışındaki diğer tüm hücelere verilen genel isimdir. Bir organizmanın vücudunu oluşturan herhangi biyolojik bir hücre olan somatik hücreler diploid ($2n$ kromozom) yapıdadır. Bu hücreler memelilerde tüm iç organlar, deri, kemik, kan ve bağ dokusunu oluştururlar.

2.5.2 Öncü Hücreler

Yetişkin kaynaklı kök hücreler (KH) bulundukları dokuya/organa ait hücelere tam olarak farklılaşmadan önce ara bir safha geçirirler. Bu ara safhadaki hücelere öncü veya progenitör hücreler adı verilir. Genel olarak farklılaşmamış hücreler kök hücreler olarak adlandırıldığından bu ara safhadaki öncül hücreler de kök hücre sanılabilmektedir. Bu hücrelerin kendilerini yenileyebilme yetenekleri ve farklılaşmaya başlamadan az önceki hücresel gelişimleri kök hücelere benzetilmektedir ancak; fetal ve yetişkin dokudaki progenitör hücreler yarı farklılaşmışlardır ve bölünerek olgun hücelere farklılaşabilirler (Şekil 2.12).



Şekil 2. 12 Öncü hücreler ve kök hücrelerin bulundukları dokulardaki farklılaşma özellikleri

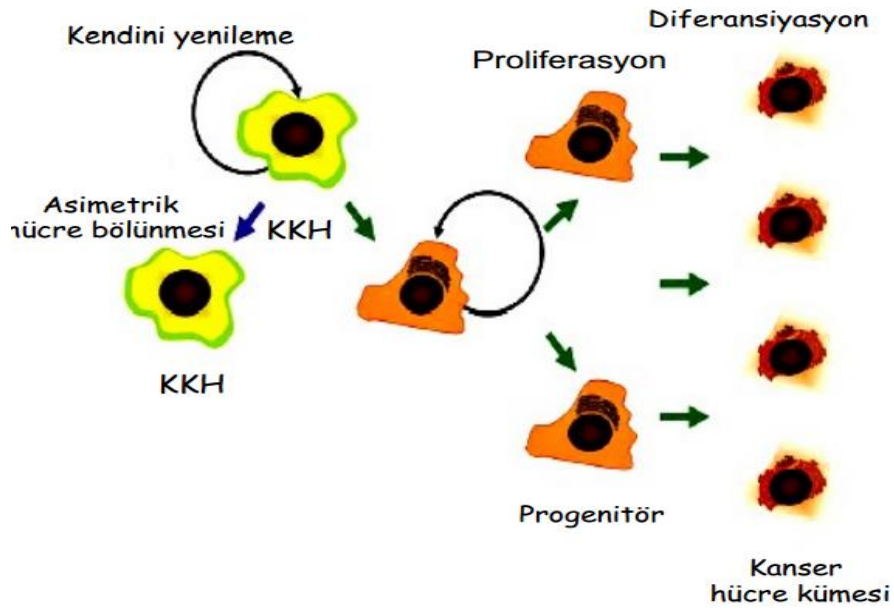
Ayrıca progenitör hücrelerin gelişim süreçlerindeki biyokimyasal özellikleri incelendiğinde kök hücre olmadıkları anlaşılmaktadır [94]. Somatik hücreler bulundukları doku ve organa özgü farklılaşmış ve bölünme hızı ve ömrü kanser ve kök hücrelerine göre çok daha kısa olan hücrelerdir [39].

2.5.3 Kanser Hücreleri ve Kanser Kök Hücreleri

İnsanlarda ve gelişmiş hayvanlarda hücreler; çevrelerindeki hücreler, büyüme faktörleri ve hücreler arası (intraselüler) matrix tarafından uyarılırlar ve normal olarak bölünürler. Kanser hücreleri ise uğradıkları mutasyonlar (DNA hasarı) nedeni ile kontrolsüz veya anormal bir şekilde çoğalırlar. Bu çoğalma sırasında diğer hücreler tarafından uyarılmalarına gerek yoktur [95]. Kanser hücreleri kontrolsüz bölünerek bulundukları dokularda tümör oluşumuna neden olan sıradışı hücrelerdir [96].

Sağlıklı bir bireyin vücudu günde yaklaşık 10.000 mutasyona uğramasına karşın immün sistem sayesinde her an vücut taranır ve kanserli hücreler yok edilir. Bilindiği gibi sağlıklı vücut hücreleri bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması amacıyla bu yeteneklerini kullanırlar ancak bu yetenekleri sınırlıdır. Sonsuz bölünemezler. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Her hücre de bu bölünme sayısını bilir. Buna karşın kanser

hücreleri, bu bilinci kaybeder, kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalırlar [97], [98], [99] (Şekil 2.13).



Şekil 2. 13 Kanser kök hücrelerinin çoğalmasını gösteren şema

Önemli olan esas konu ise kontrolsüzce büyüyen kanserleşmenin sebeplerinin neler olduğudur. Kansere yol açan etkenler genel olarak aşağıdaki şeklide belirtilebilir [98]:

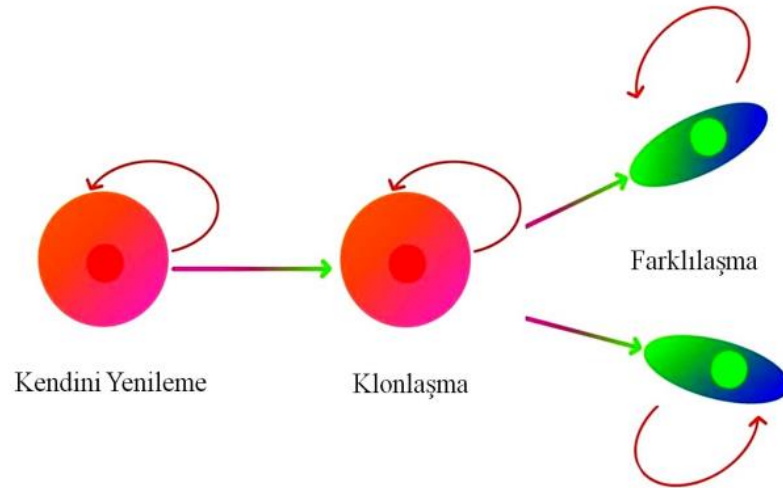
- Radyasyon (radyoaktif maddeler, X-Işını, Ultraviole Işın, Gama Işını)
- Gürültü Kirliliği
- Ozon ve Oksijen Kontaminasyonu
- Kimyasal Kirleticiler
- Kalıtsal Yatkınlık
- Viral Faktörler

2.5.4 Kök Hücreler

Uzun süre bölünerek kendi kendini yenileyebilen ve herhangi bir hücreye farklılaşmamış olan hücrelere kök hücreler adı verilir [40], [100]. Doku ve organların orijini oluşturulan bu hücreler bulundukları germ tabakasına ait hücre serilerine farklılaşarak özelleşmiş hücreleri meydana getirirler [101]. Son yıllarda doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında kullanılan somatik hücrelerin yerini, farklılaşmadan uzun süre bölünebilme, çoğalabilme ve kendilerini yenileyebilme

kapasitesine sahip kök hücreler almıştır. Rejeneratif tıp konusunda yapılan çalışmaların temelini, kök hücreler kullanılarak, hasar görmüş ya da işlevini yitirmiş doku ve organların tamir edilerek yenilenmesi oluşturur [102], [103], [104].

Kök hücreler kendilerini yenileyebilme, klonlayarak bir kopyasını oluşturabilme ve bulunduğu dokudaki diğer hücelere ve pek çok hücre serisine farklılaşabilme yeteneğinde olan özelleşmemiş hücrelerdir [101] (Şekil 2.14).



Şekil 2. 14 Kök hücrelerin genel özelliklerini gösteren şema

2.5.4.1 Kendini Yenileme

Kök hücrelerin temel özelliklerinden biri kendini yenilemedir. Kök hücreler bu özellikleri sayesinde ölümsüz, sürekli ve sınırsız bölünme yeteneğine sahiptirler. Yapılan *in vitro* çalışmalar somatik hücrelerin en fazla 80 kez bölünebildiğini ve daha sonra bu hücrelerin yaşlanması sonucunda replikasyonlarının azaldığını göstermiştir [105].

2.5.4.2 Klonlaşma

Klonlaşma, bir hücrenin aynı yapıya sahip birden fazla hücreyi üretme yeteneğidir. Oluşan homojen hücre grupları ile tamamen aynı hücresel ve genetik yapıya sahip olan hücrelerden bir hücre hattı oluşturulabilir [106].

2.5.4.3 Farklılaşma

Kök hücreler organizmada ihtiyaç duyulduğunda farklı hücrelere dönüşebilme potansiyeli sahip hücrelerdir. Özelleşmemiş hücrelerin özelleşmiş hücrelere kaynaklık etmesine farklılaşma denir. Ancak her kök hücre türü, elde edildiği kaynağa bağlı olarak farklı farklılaşma potansiyeline sahiptir. Kök hücreler farklı sinyaller verildiğinde bu özellikleri *in vitro* koşullarda da gösterebilir. Fetüs kaynaklı kök hücreler erişkin kaynaklardan elde edilen kök hücrelere göre daha geniş farklılaşma yeteneklerine sahiptirler. Bu nedenle kök hücrelerin işlevlerini tanımlamada, hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Kök hücreler mezoderm, endoderm ve ektoderm olarak adlandırılan üç germ tabakasından meydana gelen hücrelerden oluşur. Bu üç germ tabakası, tüm vücut hücrelerinin embriyonik kaynağını oluşturmaktadır. Vücudun oluşumu sırasında, bu üç germ tabakasının her biri farklı özelleşmiş hücreleri meydana getirir [107].

Bir kök hücrenin temel özelliklerinden biri de özelleşmiş herhangi bir dokunun yapısına sahip olmayışıdır. Elde edildikleri kaynaklara bağlı olarak kök hücreler 4 farklı farklılaşma potansiyellerine sahiptirler.

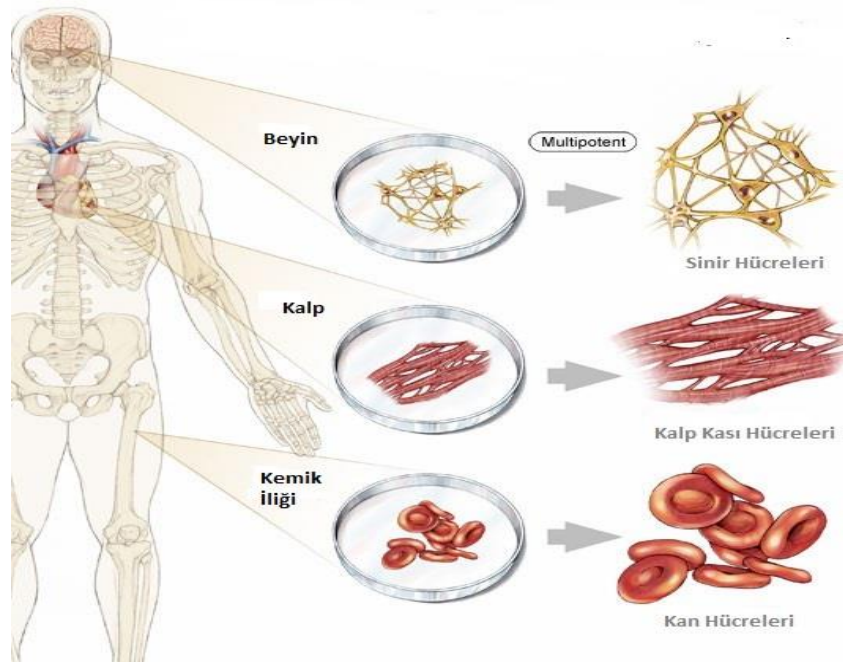
Totipotent hücreler: Embriyonun döllenmeden sonraki 4. gününe kadar oluşan hücrelere “totipotent hücreler” adı verilmektedir. Sperm ile yumurta hücresinin döllenmesi ile oluşan tek hücreli embriyo (zigot) ilk totipotent hücre olarak kabul edilmektedir. Bu hücreler plasenta gibi ekstraembriyonik yapılar da dahil olmak üzere tüm organizmanın yapılarını oluşturabilecek yeteneğe sahiptirler [108].

Pluripotent hücreler: Bir pluripotent kök hücre embriyonun üç germ tabakası olan endoderm, mezoderm ve ektoderme ait hücrelere farklılaşabilme yeteneğindeki hücrelerdir (Şekil 2.15). Bu hücrelerin sahip oldukları farklılaşma potansiyeli ile ekstraembriyonik tabakalar hariç bir canlıyı tümünden oluşturabilecekleri kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda erken dönem insan embriyolarından alınan hücreler ile fetüs dokusunda gonat kaynaklı hücrelerin pluripotent kök hücre oldukları gösterilmiştir [108].



Şekil 2. 15 Zigot embriyo ve blastosist evreleri

Multipotent hücreler: Bir multipotent kök hücre içerisinde yer aldığı germ tabakasına ait hücre ve doku gruplarına farklılaşabilme özelliği gösteren hücrelerdir. Örneğin kan kaynaklı kök hücreler sadece kan hücrelerine farklılaşma göstermektedirler (Şekil 2.16). Bu hücreler sınırlı farklılaşabilme kapasitesine sahip olmalarına rağmen çok sayıda hücre türüne farklılaşabilmektedirler [109].



Şekil 2. 16 Multipotent hücrelerin farklılaşmalarını gösteren şema

Unipotent hücreler: Yalnız bir çeşit hücre grubuna farklılaşabilen hücrelere unipotent hücreler denir. Bulundukları doku ya da organa ait hücre serilerine diferansiye olurlar. Deri kök hücreleri unipotent hücre grubuna örnek verilebilir. Kök hücrelerin sahip olduğu özellikler kaynak aldıkları yerler ile ilişkilidir. Özellikle son yıllarda yapılan

çalışmalarla birlikte organizmanın çeşitli gelişim evrelerinden ve çok sayıda organ ve dokudan kök hücre izole edilmesi başarılmıştır [110].

Embriyonik ve fetüs kaynaklı kök hücreler sınırsız farklılaşabilirlerken yetişkin doku ve organlardan elde edilen (erişkin) kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri daha sınırlıdır. Bu nedenle hücreler farklılaşma potansiyellerine göre sınıflandırılırlar. Erişkin kök hücreler köken aldıkları doku ve organlara göre hematopoetik ve mezenkimal kök hücreler olmak üzere temelde iki gruba ayrılır. Bu iki gruptaki kök hücrelerin temel özellikleri birbirinden farklılık gösterebilmektedir.

Hücre biyolojisinde artan gelişmelere paralel olarak keşfedilen kök hücrelere dair çalışmalar ile kök hücreler ile ilgili bilgiler de giderek artmaktadır. Kök hücreler uzun süre bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yetenekleri ile normalde kendileri çoğalamayan kan, kas veya sinir hücrelerinden farklı olarak çok sayıda bölünebilir ve çoğalabilirler. Özel bir hücreye farklılaşmamış ve pek çok hücre tipine farklılaşabilme kapasitesine sahip olan kök hücrelerin biyolojik bilgileri ve elde edildikleri kaynaklar da en sık incelenilen çalışmalar arasındadır. Sınırsız bölünebilme yeteneklerinin belirlenmesi ile bu alandaki çalışmalar artış göstermektedir [103], [111].

Çizelge 2. 3 Kök hücre tipleri

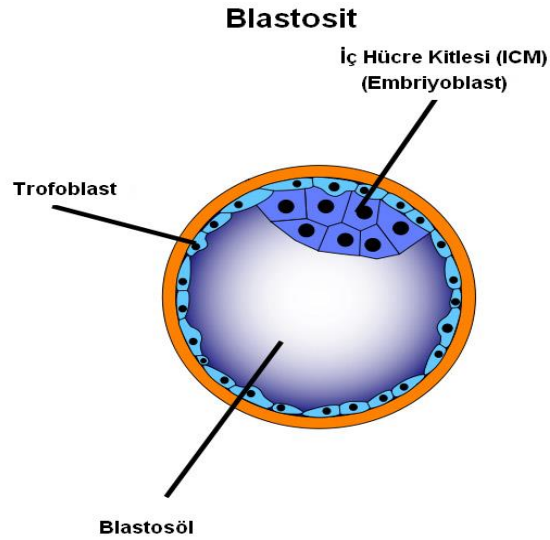
İSİM	YERLEŞİM (GERM LINE)	FARKLI LAŞMA POTANSİYELİ	FARKLI LAŞMA YÖNÜ
Embriyonel Kök Hücre	Morula Aşamasındaki hücreler	Totipotent	Embriyon ve Embriyon dışı tabakalar
Embriyonik Kök Hücre	Blastokist iç hücre kitlesi	Pluripotent	Embriyon gövdesi, Somatik ve Germ Hücreleri
Embriyonik Kök Hücre	Gastrula aşamasındaki epiblast	Pluripotent	Endoderm, Mezoderm ve Ektoderm
Embriyonik Kök Hücre	Ektoderm, endoderm ve mezoderm hücreleri	Pluripotent	Tüm Somatik Hücreler
Erişkin Kök Hücre	Özgün dokü hücreleri	Multipotent	Hematopoetik Kök hücreler: Eritrosit, lökosit, trombosit
Erişkin Kök Hücre	Bir dokudaki yerleşik hücreler	Unipotent	Tek hücre tipi

2.5.5 Embriyonik Kök Hücreler

Fertilize yumurta, olgun bir organizma oluncaya kadar bölünür ve farklılaşır. İnsanın da dâhil olduğu tüm erişkin memeliler, sinir (nöronlar), kas (miyositler), deri (epiteller), kan (eritrositler, monositler, lenfositler, v.b.), kemik (osteositler) ve kıkırdak hücreleri (kondrositler) gibi 200'den fazla hücre çeşidinden oluşur [112].

Embriyonik kök hücrelerinin 1998 yılında Wisconsin-Madison Üniversitesi'nde James Thomson tarafından keşfinden 17 yıl sonra 1998 yılında insan embriyonik kök hücrelerinin (iEKH) elde edilmesi ve kültürünün yapılması, biyoloji bilimi için çok önemli bir ilerleme olmasının yanında doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için de dev bir adım olmuştur [113].

İnsan embriyonik kök hücrelerinin elde edildiği embriyolar, blastokist adı verilen 4–5 günlük içi boş mikroskobik kürelerdir. Blastokist üç yapıdan oluşur: Blastokisti kaplayan katman olan trofoblast, blastokistin içinde bulunan boşluk olan blastosöl ve blastosölün bir ucunda bulunan ve yaklaşık 200 hücreden oluşan iç hücre kitlesidir (Şekil 2.17).

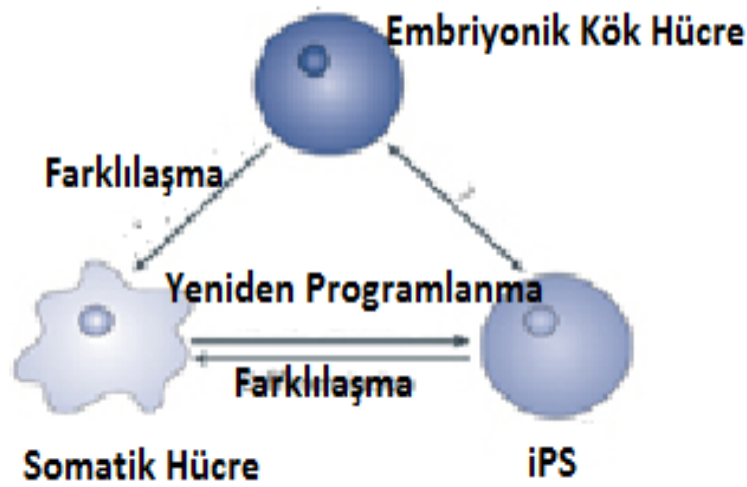


Şekil 2. 17 Blastosit ve iç hücre kitlesi [114]

2.5.6 Erişkin Kök Hücreler

Embriyonik evre sonrasında fetüsün yetişkin dokuları oluşturmaya başlamasından itibaren canlı organizma yetişkin olarak kabul edilebilir. Bu dönemden itibaren elde edilen tüm kök hücreler de embriyonik kaynaklı olmayan kök hücreler olarak

sınıflandırılmaktadır. Yetişkin kaynaklı kök hücre terimi yanıltıcıdır çünkü yeni doğanlarda ve çocuklarda da yetişkin kök hücreler bulunmaktadır. Bu terim yerine postnatal kök hücreler de kullanılabilir. Bu hücreler multipotent hücrelerdir ve canlının dokusunda yer alan dokunun esas hücre serisine farklılaşırlar. Son yıllarda yapılan araştırmalara göre ise hücre plastisitesi olarak adlandırılan hücre gelişimi ile kök hücrelerin farklı dokularda yer alan hücrelere de dönüşebileceği gösterilmiştir [94]. Hatta farklılaşmış bir hücre çeşitli onkogenler ile (Oct3/4, Nanog, Sox 2, CMyc gibi) kök hücreye indüklenebilmektedir. Bu tip hücrelere indüklenmiş kök hücre (iPS) adı verilir [115], [116], [117], [118](Şekil 2.18).



Şekil 2. 18 Embriyonik kök hücrenin somatik hücreye indüklenmesini gösteren şema

Yetişkin kaynaklı bir kök hücre, doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücredir. Bunlar hücre içinde bulunduğu doku veya organın özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilir. Somatik kök hücresi de denilen yetişkin kök hücrelerinin temel görevleri, bulundukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır ayrıca bu hücreler öncü hücrelere ve daha sonra da özelleşmiş hücrelere farklılaşırlar [119]. Ayrıca yetişkin kök hücreler organizmanın yaşamı boyunca kendini yenileyebilme özelliğini korur. Diğer yandan yetişkin kök hücrelerin farklı germ tabakalarında yer alan hücrelerin *in vitro* şartlarda farklılaştırılabileceği de gösterilmiştir. Örneğin kan hücrelerine kaynaklık eden hematopoetik kök hücrelerin farklı embriyonik kaynaklı (ektoderm ve endoderm) hücrelere kaynaklık edebileceği ortaya çıkmıştır.

Bilinen en yaygın yetişkin kök hücre kaynağının kemik iliği olmasına rağmen, bu hücreler özellikle yağ dokusu olmak üzere karaciğer, diş pulpası, kordon kanı ve plasenta, periferik kan gibi birçok doku ve organda bulunabilirler [120].

Yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerin kemik iliğinden elde edilen kök hücreler kadar dönüşüm yeteneğine sahip olduğu bildirilmektedir [121]. Yağ dokusundan kemik iliğine göre daha fazla sayıda hücre elde edilebilir. Bu hücrelerin, bulundukları doku ve organlarda küçük hasarların giderilmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Son yıllara kadar bu hücrelerin sadece belirli bir grup hücreye farklılaşabileceği düşünülüyordu. Ancak günümüzde bu hücrelerin başka değişik hücre tiplerine de dönüşebileceği bilinmektedir. Örneğin; kemik iliği hücreleri karaciğer, sinir, kas ve böbrek hücrelerine dönüşebilmektedir. Hatta günümüzde bir yetişkin kök hücrenin değişime uğrayarak pluripotent özellik taşıyan bir kök hücreye dönüşebileceği gösterilmiştir. Bu özellik karşılıklı farklılaşma (transdiferensiyasyon) olarak adlandırılır [122]. Bu hücrelerin farklı doku tiplerine dönüşebilmelerini ve vücut dışında daha uzun süre yaşabilmelerini sağlamak amacıyla günümüzde yoğun bir şekilde çalışmalar devam etmektedir.

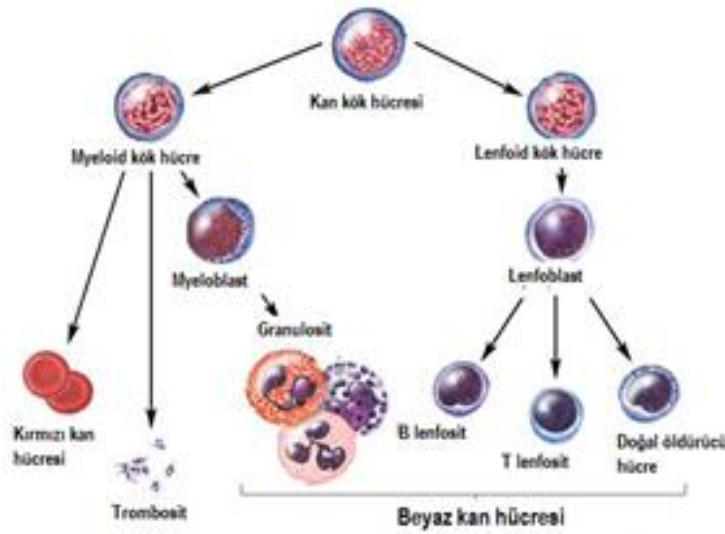
Burun boşluğunu örten dokudan elde edilen kök hücrelerin, embriyonik kök hücreler gibi yüksek bir farklılaşma yetenekleri olduğu gösterilmiştir [123]. Bu hücreler, embriyonik kök hücrelere göre daha kolay elde edilebilmeleri açısından önemli bir kök hücre kaynağı olarak değerlendirilmektedir.

Yetişkin kök hücrelerin kullanımı etik açıdan sorun oluşturmamaktadır. Bu hücreler kişinin bağışıklık sistemine uyum gösterirler. Araştırmacılar henüz erişkin kök hücrelerin embriyonik kök hücrelerinde olduğu gibi her çeşit doku tipine kaynaklık edebileceği konusunda görüş birliğine varmış değildir. Çünkü yetişkin kök hücrelerin tüm hücre tiplerine dönüşemediklerinden dolayı günümüzde kullanımlarının sınırlı olduğu düşünülmektedir.

2.5.6.1 Hematopoetik Kök Hücreler

Hematopoetik kök hücreler (HKH); eritrositler, trombositler ve lökositlere farklılaşma kabiliyetine sahip multipotent hücrelerdir. Kendini yenileme kabiliyetine ve nötrofil, eozinofil, bazofil, trombosit, monosit/makrofaj, eritrosit, mast hücreleri, dendritik

hücreler, B ve T lenfositler gibi fonksiyonel kan hücrelerine de özelleşebilirler (Şekil 2.19).



Şekil 2. 19 Hematopoetik kök hücrelerin farklılaşmalarını gösteren şema

Ayrıca hematopoetik kök hücreler miyeloid ve lenfoid dizileri de içerecek şekilde tüm kan hücresi türlerini meydana getirme kabiliyetine sahiptir. İlk olarak 1963'te E. D. Thomas tarafından tanımlanan hematopoetik kök hücreler klasik kök hücreler olarak kabul edilir. Bu hücreler günümüzde kemik iliği, periferik kan (1981), kordon kanı (1988) ve plasenta gibi dört farklı kaynaktan elde edilebilirler. Bu kaynaklardan edinilen hücrelerin gerekli ekstraselüler ortam sağlandığında iskelet kası, kalp kası, karaciğer, endotel hücreler ve nöronlara farklılaştığını bildiren çalışmalar mevcuttur [124].

2.5.6.2 Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH); başlıca kemik iliğinde bulunan kemik, kas, kıkırdak, tendon, yağ ve kemik iliği stromal hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olan multipotent hücrelerdir. İlk olarak Alman patolog Cohnheim tarafından kemik iliğinde yer alan non-hematopoetik hücrelerin varlığı 1880'li yıllarda ileri sürülmüştür. Daha sonra 1976'da Friedenstein ve arkadaşları, fibroblast kolonisi yapan ünitelerde (colony forming unit-fibroblast, CFU-F), nonhematopoetik kemik iliği progenitörleri olan MKH'lerini tanımlamıştır. Friedenstein, fetal dana serumu içeren kemik iliği materyalinin ortama yayılması sonucunda, adhezyon yeteneği olan, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen, kemik hücreleri ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine

sahip hücre kolonilerinin varlığını bildirmiştir [125]. 1970'lerden günümüze kadar birçok araştırmacının dikkatini çeken bu hücreler için pek çok isimlendirme yapılmıştır: "mesenchymal stem cell", "marrow stromal cell" gibi. Hepsi için mezenkimal kök hücre (MKH) ortak bir kısaltma olarak kullanılmaktadır. Bu konuda karışıklığa yol açmamak için "International Society of Cellular Therapy (ISCT)" son zamanlarda yeni bir tanımlama önermektedir: "multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC)". Birçok araştırmacının ve laboratuvarın ilgisinin MMSC üzerine yönelmesi ve klinik-preklinik çalışmalarda ortak bir dil oluşturulması için ISCT mezenkimal stromal hücre için tanımlama kriterleri belirlemiştir.

Günümüze kadar kemik iliği stromal hücreleri olarak da adlandırılan MKH'ler çoğunlukla kemik iliğinden ve ayrıca subkütanöz yağ dokusu ve fetal karaciğer gibi çeşitli dokulardan izole edilirler. İlk zamanlarda bu hücreler, yağ hücresi (adiposit) ve kemik hücresine (osteosit) farklılaşabilme yeteneğinde olan hücreler olarak nitelendirilmiştir [125]. Takip eden yıllarda yapılan çalışmalarda MKH'lerin her üç germ yaprağından köken alan hücre ve/veya dokulara farklılaşabilen hematopoetik olmayan multipotent kök hücreler oldukları anlaşılmıştır [107]. Kemik dokusu, kemik iliğinde yer alan MKH'ler ve kültüre edilmiş insan kök hücreleri açıklanmış ve insan ile kemirgenlerin kemik iliğinden elde edilen MKH'lerin ayırımına izin veren antijenik belirteçler tanımlanmıştır. Araştırmacılar, MKH'lerin sadece kemik hücresi ve yağ hücresine değil aynı zamanda kıkırdak hücrelerine, iskelet kası ve düz kas hücrelerine de farklılaştığını göstermişlerdir. Bunlara ek olarak, hayvanlarda MKH transplantasyonu kıkırdak veya kemik defektlerinin *in vivo* olarak aşılama ile dokuya spesifik farklılaşma gerçekleştirilmiştir.

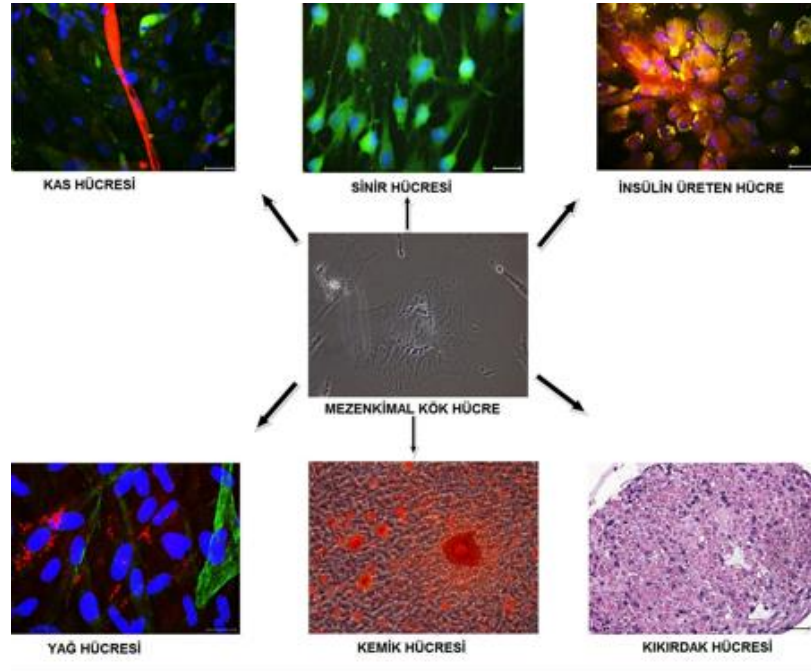
Uluslararası Hücre Tedavileri Topluluğu (UHTT) MKH'leri tanımlamak için 3 özellik bildirmiştir:

- 1.MKH'ler standart kültür ortamında plastik yüzeye tutunabilen hücrelerdir,
- 2.MKH'ler yüzeylerinde CD105 (SH2), CD73 (SH3/4)ve CD90 gibi hematopoetik olmayan hücre yüzey belirteçlerini eksprese etmelerine rağmen, CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 veya CD19 ve HLA-DR gibi tipik hematopoetik belirteçleri eksprese etmezler,

3.*In vitro* koşullarda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilirler.

Kaynaklarına bakılmaksızın farklılaşmamış MKH'ler fibroblast benzeri morfolojiye ve kendi kendilerini kopyalama kabiliyetine sahip hücrelerdir. Dolayısıyla potansiyel olarak doku ve organ rejenerasyonu için yeterli sayılara ulaşmak üzere çoğaltılabilirler.

MKH'ler kültür ortamında çoğalırken ortama bazı büyüme ve transkripsiyon faktörleri eklenmezse çoğalmaya devam etmekte ama farklılaşma görülmemektedir. Farklılaşma sırasında aktive olacak transkripsiyon programlarını belirleyen ve etkileyen içsel ve dışsal faktörler önemlidir [108]. *In vivo* ortamda, bu faktörler (büyüme faktörleri, sitokinler, matriks proteinleri, vb) parakrin veya otokrin olarak salgılanır. *In vitro* koşullarda ise farklılaşma potansiyelinin ortaya çıkarılabilmesi için kültür ortamına bu faktörler eklenmelidir [126]. Bu da MKH'lerin plastisitesi için doku mikroçevresinin ve farklı kültür ortamlarının önemini vurgulamaktadır. Özetle MKH'ler kolay elde edilebilen kültür ortamında birçok pasaj boyunca rahatlıkla çoğaltılabilen, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen ve flasklara yapışma özelliğı olan, bazı yüzey belirteçleri ile immünofenotiplendirilebilen, uygun koşullar altında birçok dokuya (osteojenik, adipojenik, kondrojenik, vb) farklılaşma özelliğı olan hücrelerdir (Şekil 2.20). MKH'lerin hangi dokulardan izole edilebileceğı, en uygun dokunun seçimi, kültür ortamının koşulları, en uygun immünofenotiplendirme belirteçlerinin belirlenmesi, farklılaşma potansiyelinin ortaya çıkarılabilmesi için kültüre eklenecek büyüme ve transkripsiyon faktörlerinin seçimi, miktarı, *in vitro* hangi dokulara farklılaşabildiğı araştırma konusu olmaya devam etmektedir. Bu konuda diğerk bir önemli nokta da MKH'lerin hücreesel tedavideki yeridir.



Şekil 2. 20 Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyelini gösteren şema

Mezenkimal kök hücreler (MKH) elde edildikleri kök hücre kaynağının özelliklerine bağlı olarak doğrudan plakalama ya da hücre yüzey belirteçlerinin kullanımı ile elde edilir [127]. Her iki yöntemde de belirli sınırlamalar bulunmaktadır. Özgün olarak kültür flask tabanına yapışmasıyla elde edilen saflaştırılmış popülasyonun homojenliği, hücrelerin yalnızca % 10-20'sinin multipotent farklılaşma kabiliyetine sahip olması nedeniyle yüksek değildir. MKH'lerin kültürü, doku kültüründe telomeraz enzim aktivitesi faaliyetinin kaybı ile telomerin kısalmasının bir sonucu olarak izole hücrelerin topluluğun 40 kez iki katına çıkması (yaşlı donörler için 25 kez) ile sınırlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, klinik uygulamalar için önemli şekilde, kültürdeki hücreler, bu uzatılmış genişleme yöntemi kullanıldığında 250 kez iki katına çıktıktan sonra genetik instabilite göstermişlerdir. Bu da, uzatılmış *ex vivo* kültür süresi olmaksızın yeterli sayıda hücrenin geliştirilebilmesi için verimli büyütme yöntemleri ve etkin farklılaştırma protokollerinin gerekliliğini göstermiştir [128].

Elde edilen MKH'ler ışık veya faz kontrast mikroskobu ile morfolojik olarak incelendiğinde kültür ortamında füziform şekilli, iğ şeklinde, bipolar yapıda ve fibroblast benzeri hücre toplulukları olarak görülürler. Morfolojik özellikleri fibroblastlara benzemekle birlikte en önemli farkları nükleus yerleşiminin

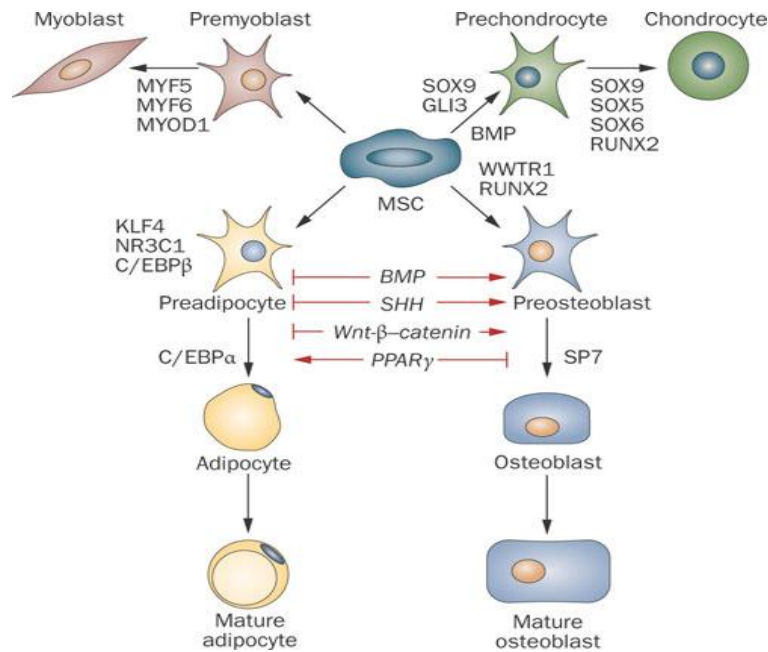
fibroblastlarda asimetrik olmasına karşın bu hücrelerde dışsal yani sitoplazmaya yakın olmasıdır.

MKH'lerin fenotipik özelliklerine dayalı çalışmalar genellikle primer kültürde yer alan hücrelerden çok kültürde çoğaltılmış hücrelerde yapılmıştır. Primer MKH'lerin fenotipik özellikleri hakkında sınırlı sayıda çalışma vardır. Kültürde çoğaltılmış MKH'lerin antijenik özelliklerine bakıldığında kendilerine has bir belirteç taşımadıkları; endotel, epitel ve kas hücrelerine benzer fenotipik özelliklere sahip oldukları görülmektedir. Kültürde çoğaltılmış MKH'ler CD45, CD34, CD14, CD11 gibi hematopoetik belirteçleri ve CD80, CD86, CD40 gibi ko-stimülatör molekülleri eksprese etmezler. MKH için tipik olarak kabul edilen belirteçler CD105 (SH2) ve CD73 (SH3/4)'dür. Fibroblast yüzey belirteci olan STRO-1 MKH'ler tarafından da eksprese edilmektedir. Ayrıca MKH'ler CD71 (transferin reseptör) ve CD90 (Thy-1) taşırlar. Farklı dokulardan elde edilen hücreler genel olarak benzer fenotipik özelliklere sahip olmakla birlikte bazı farklılıklar da göze çarpmaktadır. Örneğin, yağ dokusundan elde edilen MKH'ler yüzeylerinde CD49d taşıırken, CD106 taşımamaktadır; kemik iliği kaynaklı MKH'lerde ise aksine CD49d negatif, CD106 pozitifdir. Erişkin MKH'lerin, hücre yüzeyinde HLA sınıf I antijenlerini zayıf eksprese ettikleri, HLA sınıf II antijenlerini taşımadıkları, ancak hücre yüzeyinde taşınmayan HLA sınıf II antijenlerin sitoplazmada bulunduğu saptanmıştır [129]. MKH'lerin ko-stimülatör molekülleri ve HLA sınıf II antijenleri eksprese etmemeleri gibi özellikleri graft versus host hastalığı tedavisinde kullanılmalarına olanak sağlamıştır [130]. Fetal karaciğer kaynaklı MKH'lerin ise HLA sınıf II antijenleri hem hücre yüzeyinde hem de intrastoplazmik olarak içermedikleri gösterilmiştir [131]. Bu bulgular MKH antijen ekspresyonunun fetal yaşamdan erişkin yaşama geçişte değiştiğini düşündürmektedir.

MKH'ler ve HKH'ler birçok adhezyon molekülünü ortak olarak bulundurlar. Bunların başlıcaları fibronektin, laminin ve kolajene bağlanmadan sorumlu olan integrin ailesi ve L-selektindir [132]. MKH'lerin granülosit-makrofaj koloni stimülatör faktörü, granülosit koloni stimülatör faktör, kök hücre faktörü ve interleükin-6 (GM-CSF, G-CSF, SCF ve IL-6) salgılama yeteneklerinin, allojenik ve otolog hematopoetik kök hücre nakillerinde hematopoetik kök hücrelerin yerleşim, çoğalma ve farklılaşmalarına katkı sağlayarak

nötrofil ve trombosit engraftmanını hızlandırıcı etki gösterdiği düşünülmektedir [133], [134], [135].

Yetişkin kemik iliğinden elde edilen MKH'ler adiposit, miyofibroblast, osteoblast, endotelial hücre, kondrosit, sinir hücresi, kalp kası hücresi, karaciğer hücresi, iskelet kası hücresi, böbrek tübüler hücresi, tenosit gibi farklı dizilere farklılaşabilirler. Farklılaşmalarda rol oynayan genlerin bir kısmı yapılan çalışmalarla belirlenmiştir [136], (Şekil 2. 19).



Şekil 2. 21 Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasında rol oynayan genler

Bu farklılaşmış hücreler CD29, CD44, CD105 ve CD166 için pozitifdir ve yaklaşık iki günde bir iki katına çıkma ömrü vardır, altı kata kadar kültürde gelişebilir ve biyolojik işlevleri yaşlanma ile azalmaz. MKH'lerin basit bir kemik iliği aspiratından 10 hafta içinde yaklaşık 50 kez ikiye katlanarak çoğaltılması mümkündür [137]. Herhangi bir telomer kısalması ya da karyotipik bir anormallik olmaksızın, belirli koşullar altında yüzden fazla kez çoğaltılabilen MKH'lerin CD133 pozitif hücreler içeren bir alt popülasyonunun, yalnızca mezenkimal hücre türlerine değil (osteoblastlar, kondrositler, adipositler, miyositler) aynı zamanda endotel ve nöroektodermal fenotip ve işleve sahip hücrelere de farklılaşma kabiliyeti kanıtlanmıştır. Bunlar, kalıtsal ya da dejeneratif hastalıkların tedavisi ve kırıkta, kemik ve miyokardiyum gibi dokuların onarımı için gelecek vaat eden, daha fazla sayıda kaynak sunmaktadır [103], [138].

İnsan MKH'lerinin, hücresel tedaviler için kabul edilmesinin nedenleri; hastadan kolayca izole edilmeleri, *in vitro* koşullarda hızla çoğaltılabilmeleri, genetik mühendisliğine bağlı olarak ilgili genler ile tedavi yapılmasına uygun olması, nontümörojenik olarak kültür ortamında stres koşulları olmaksızın geniş yayılma göstermesi ve çeşitli mekanizmalarla doku hasarlarının onarılabilmesidir. Bu onarım mekanizmaları şunlardır; (a) dokuya özgü fenotipe farklılaşma, (b) hasarlı hücrelerin onarımı ve hücrelerin çoğalmasını sağlayan kemokinlerin salgılanmasının sağlanması ve (c) olasılıkla mitokondri veya mitokondri DNA'larının transfer edilmesi.

Özelleşmemiş bu hücreler elde edildikleri kaynaklara ve sahip oldukları farklılaşma yeteneklerine göre sınıflandırılmıştır. Özellikle, erken evrede elde edilen MKH'lerin çoğalma ve farklılaşma özellikleri yetişkin evrede elde edilen kök hücrelerden daha yüksektir. Bir başka deyişle, kök hücrelerin bölünme, çoğalma, farklılaşma ve elde edilen kök hücre miktarı, canlının yaşı ile ters orantılı olarak değişmektedir. Örneğin kemik iliği, her 10^4 çekirdekli hücreye karşın 1 MKH içerir (Bu oran kordon kanında $1/10^8$ 'e kadar düşebilmektedir) [139], [140]. Çocuklarda 29 CFU/1 milyon tek çekirdekli hücre oranı bulunurken; ileri yaşlarda bu oran 3,2 CFU/1 milyon tek çekirdekli hücre oranına kadar düşmektedir [141]. Yapılan araştırmalar, fetal MKH'lerin erişkin kök hücrelerden sadece sayısal açıdan değil, doku gelişiminde, hücre bölünmesinde ve immünolojik antijen sunumunda rol oynayan genler açısından da önemli farklılıklar taşıdığını göstermektedir [142], [143].

MKH'lerin önemli bir özelliği de "immune privilege" hücreler olmaları yani; vücuda alındığında immün yanıt oluşturmamalarıdır. Bu nedenle *in vivo* veya *in vitro* koşullarda özellikle klinik olarak immün baskılayıcılara gerek kalmadan kullanılabilecek olmaları önemlidir. Ancak MKH'lerin laboratuvarında farklılaştırılması ve üretilmesi ile bu farklılıklar kaldırılabilir.

2.5.7 Kök Hücre Kaynakları

Son yıllarda kök hücre çalışmalarının artış göstermesi ve çok sayıda, kaliteli nitelikte kök hücre ihtiyacının artması ile kök hücre kaynaklarının araştırılması oldukça önem kazanmıştır. İnsan oluşumundaki ilk hücreler, oluşmakta olan organizmadaki kök hücrelerdir. Kök hücreler ne kadar gençse o kadar fazla gelişebilir ve farklı hücrelere

dönüşebilirler [144]. Yetişkin insan vücudunda hemen hemen her doku ve organ içerisinde farklılaşmamış kök hücrelerin bulunduğu da bilinmektedir. Cilt, kas, kemik, sinir, yağ ve kan dokusu gibi çoğu doku ve organlarda yer alan kök hücreler, hastalıklar ve yaralanmalar nedeniyle oluşan hasarları *in vivo* olarak onarır ve iyileştirirler. Hangi tip dokuya ihtiyaç varsa ona dönüşürler [120]. Doku ve organ içerisinde yer alan kök hücreler bulundukları kaynak ve farklılaştıkları germ tabakasına göre sınıflandırılırlar [121]. Buna göre de kan hücrelerini oluşturan kemik iliği kaynaklı hücrelere hematopoetik kök hücreler (HKH), bağ (stromal, mezenkimal) dokularda bulunan hücrelere kaynaklık eden kök hücrelere ise mezenkimal kök hücreler (MKH) adı verilir.

Çizelge 2. 4 Mezenkimal kök hücre kaynakları

Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları	Kemik iliği
	Kemik trabeküler dokusu
	Kordon kanı
	Plasenta
	Wharton jeli
	Amniyon mayı
	Adipoz Doku
	Tendonlar
	Snovyal membran
	Karaciğer
	Diş pulpası

2.5.7.1 Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücreleri

Vücudun hemen hemen her bölgesinde yağ dokusu bulunur. Diğer doku ve organlardan farklı olarak çok geniş bir yerleşime sahiptir. Deri altında subkütan olarak yer alan ve canlı vücudunun boşluklarını dolduran yağ dokusunun ısı kaybına karşı izolasyonu sağlaması, bazı anatomik kısımları tampon gibi desteklemesi, iç organların etrafını sararak dış etkenlere (darbe ve travma gibi) karşı mekanik koruma sağlaması gibi pek çok işlevi vardır. Ayrıca yağ hücresi ve dokusu; pasif enerji deposu ve aktif metabolik bir endokrin organ olarak görev yapar.

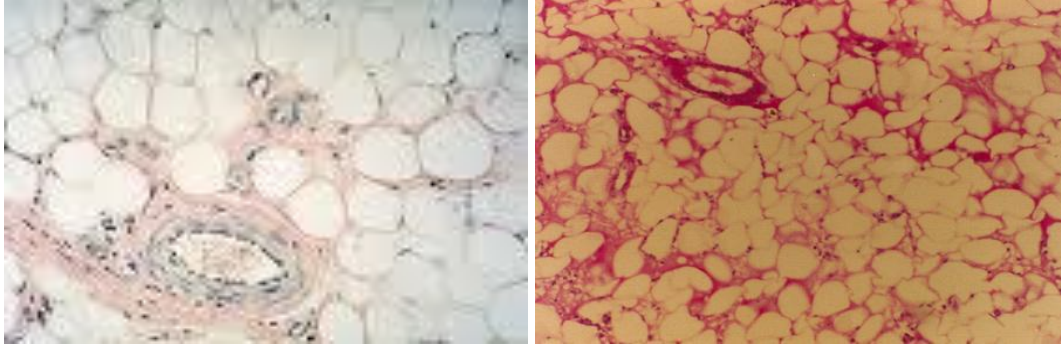
İnsan vücudundan lipoaspirasyon işlemi ile elde edilen yağ dokusuna işlenmiş lipoaspirat-İLA (processed lipoaspirate-PLA) denir. İLA fraksiyonu adipoz dokunun temel hücre serisini oluşturan adipositlerin yanı sıra fibroblastik hücreler, endotelial hücreler, makrofaj ve düz kas hücreleri gibi heterojen bir hücre gurubu da içerir. Tüm bu hücreler ise bilindiği üzere dokularda yer alan kök hücrelerden meydana gelir. MKH'lerden kökenlenen adipositlerin (yağ hücresi) erken evresi olarak bilinen preadipositler gelişimleri sırasında iki farklı yol izlerler [145].

1.Beyaz yağ hücrelerine farklılaşma

2.Kahverengi yağ hücrelerine farklılaşma

Bu farklı hücre proliferasyonu sonucunda yağ dokusu kahverengi yağ dokusu ve sarı yağ dokusu olmak üzere iki farklı yağ dokusu şeklinde meydana gelir.

Beyaz yağ hücreleri: Beyaz yağ dokusu uzun süreli enerji kaynağının ana deposu olarak işlev görür. Sarı yağ olarak da adlandırılan bu hücrelere sarımsı rengi içeriğinde bulunan karoten verir. Karoten yağda eriyen bir maddedir. %95 trigliserid içerir. Bu dokuya kapillerlerden besin gelir [146] (Şekil 2.22).



Şekil 2. 22 Beyaz ve kahverengi yağ dokusunun histolojik görüntüsü

Kahverengi yağ hücreleri: Kahverengi yağ dokusu vücutta ısı kaybına engel (izolatör) olarak görev yapar. Rengini lipokrom pigmentinden alır. Sitokromlarca zengin mitokondrileri vardır. Sempatik adrejenik sinir lifleri içerir. Ayrıca, kahverengi yağ dokusunda beyaz yağ dokusundan çok daha fazla sayıda kan damarı mevcuttur [146].

Adipositler mikroskopik olarak incelendiklerinde içerdikleri lipid granülleri ile karakterize olurlar. Lipid granüllerinin büyüklük ve miktarları da adipositin yaşı ile ilgili bize ipucu verir. Örneğin; genç adipositler çok sayıda küçük lipid granülleri içerirler, yani multioküler haldedir. Karakteristik unioküler halde bulunan olgun adipositler ise tek ve büyük bir lipid granülden oluşur. Küçük lipid damlalarının birleşmesiyle oluşan olgun adiposit içerisindeki büyük yağ damlası sitosol ile doğrudan temas halinde olup bu hali mühür yüzüğü görünümü alır [147].

Her yıl büyük oranda travmaya bağlı yaralanmalar, tümör çıkarılmaları ve doğuştan olan yumuşak doku hasarlarını onarmak için plastik ve rekonstruktif cerrahi işlemler yapılmaktadır. Bu hasarlar genelde büyük oranda yağ dokusun kaybıyla sonuçlanır. Bu hasar ve kayıpların tedavisi için çeşitli yaklaşımlar uygulanmaktadır. Doku hasarlarında erişkin otolog kaynak olma potansiyeli sebebiyle rejeneratif tıpta farklı biyo-materyaller ile birlikte de kullanılabilmeleri ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır [148].

Otuz yılı aşkın süredir kök hücre çalışmalarının temelini, kemik iliği kaynaklı kök hücreler oluşturmaktadır. Bu hücreler, çeşitli rahatsızlıklar için hücresel tedavi yöntemlerinin uygulanabileceği uygun özelliklere sahiptirler. Kemik iliği gibi adipoz doku da *in vitro* ve *in vivo* şartlarda multipotent farklılaşma gösteren hücre plastisitesine sahip stromal mezenkimal hücreler içeren mezodermal bir dokudur. Adipoz dokudan elde edilen hücreler, işlenmiş lipoaspirat (PLA), adipoz dokudan elde

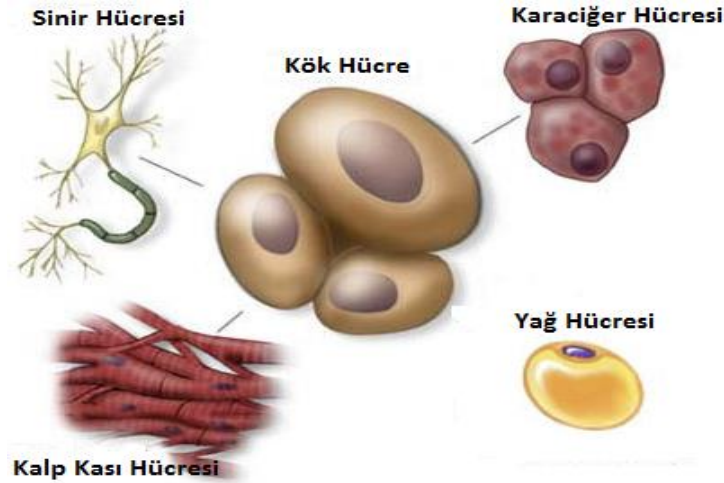
edilen kök hücreler ve adipoz dokudan elde edilen stromal hücreler veya adipoz doku kaynaklı mezenkimal öncül hücreler olarak çeşitli şekillerde adlandırılırlar. Bu tür adlandırmalar ile anılan hücreler aynı hücre popülasyonunu içermektedirler [149]. Son yıllarda hasar görmüş ya da kaybedilmiş yağ dokusunun onarılması için yağ doku özellikleri doku mühendisliği ve rejeneratif tıp çalışmaları esas alınarak incelenmeye başlanmıştır. Yağ dokusu tıpkı kemik iliği gibi mezenkimden köken alır ve kemik iliği gibi zengin bir stroma içerir. Çeşitli araştırmalar sonucunda yağ dokusunda MKH'lerin varlığı tespit edilmiştir ve böylece yetişkin kök hücre kaynaklarına bir yenisi daha eklenmiştir.

Yağ dokusu kök hücreleri yağ dokusundan lokal anestezi altında alınır. *In vitro* kültürü yapılarak elde edilen pluripotent kök hücreler laboratuvar şartlarında fibroblast benzeri hücre toplulukları oluştururlar. Bu kök hücre kaynağından elde edilen hücrelerin adipojenik, kondrojenik, myojenik, ve osteojenik farklılaşma yetenekleri gösterilmiştir [150].

Lipoaspirattan elde edilen örnek üzerine kısa süreli kolajenaz muamelesi uygulandıktan sonra santrifüj ile mononükleer hücrelerine ayrıştırılabilmektedir [151]. Kolay şekilde hücre izolasyonu sağlanabildiği için yağ dokusu son zamanlarda MKH kaynağı olarak oldukça ilgi çekmektedir. PLA'lar uygun stimuluslarla osteojenik, adipojenik, myojenik ve kondrojenik hücrelere diferansiye olur ve o diziye özel gen ve proteinleri içerir, bu da kök hücre fenotipini onaylar. Uzun süreli kültürlerle PLA'ların büyüme kinetikleri ve diferansiyasyon kapasiteleri değişmez. Hücre yüzey belirteçleri KI-MKH'lere benzer. Her ikisi de Stro-1, SH-3 içerirler, her ikisi de hematopoetik marker olan CD31 ve CD45 içermez. *In vitro* kültürlerde CD34 gittikçe azalır. CD105/endoglin -TGF- β reseptör tip III MKH'lerin TGF- β bağımlı kondrojenik diferansiyasyonunu gösterir. Böylece PLA ve MKH aynı hücre tipinin varyantları olarak bilinir. Seri pasajlarla MKH'lere benzeyen homojen fibroblastik bir popülasyon kalır. Bu geri kalan grubun % 80'inin vimentin ve fibroblastik marker AS02 (antisense oligonucleotid) ekspresyonu göstermesi ile bu grubun MKH olduğu anlaşılır [152].

Yağ hücresine hormonlar ve sitokinler aracılığı ile endokrin, parakrin ve otokrin sinyaller gelir. Yağ hücresi membranında ve sitoplazmasında çeşitli hormon ve

sitokinelere ait reseptörler bulunur. Bu nedenle bu doku mezodermal doku tamirinde kullanılabilir [146]. Yağ dokusundan elde edilen MKH'lerin farklılaştırma medyumları ile karaciğer hücresi (hepatosit), kemik hücresi (osteosit), kıkırdak hücresi (kondrosit), yağ hücresi (adiposit) ve sinir hücresine (nöron) farklılaştığı da bilinmektedir [153], [154], [155], [156], [157], [158], [159] (Şekil 2.23).



Şekil 2. 23 Yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerin farklılaşma potansiyelini gösteren şema

Adipoz doku kaynaklı MKH'lerin farklılaşabildiği bu zengin hücre yelpazesi tıp (klinik çalışmalar), doku mühendisliği çalışmaları ve genetik gibi pek çok alanda yeni çalışmalara kucak açmıştır. Tedavisi olmayan Alzheimer, Parkinson vs gibi hastalıklarda rejeneratif tıp çalışmalarını artırmış ve umut kaynağı olmuştur. MKH'lere alternatif olarak, doku mühendisliğinde farklı biyo-materyaller üzerinde farklılaştırılarak çeşitli rejeneratif tedavide kullanımları üzerinde çalışılmaktadır [160], [161], [162].

2.6 Doku Mühendisliği

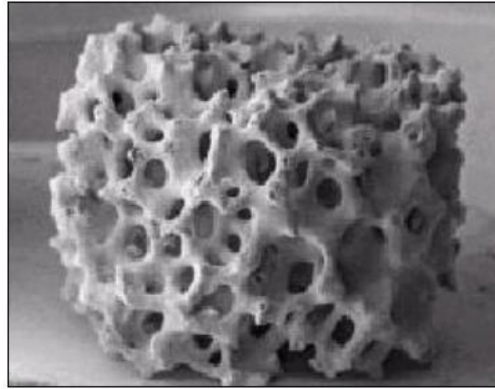
Mühendislik prensipleri ile fen bilimlerinin biyolojik bir dokunun veya bütün bir organın fonksiyonunun geliştirilmesi, iyileştirilmesi ve canlılığının sürdürülmesi amacıyla biraraya gelmesiyle oluşan bu multidisipliner branş Doku Mühendisliği olarak tanımlanmaktadır [163]. Doku mühendisliğinin amacı (genellikle) bozunabilir malzemeler (biyomalzeme), hücreler, büyüme faktörleri ve/veya diğer biyoaktif moleküllerin uygun yöntemler ile bir araya getirilerek *implant edilebilir doku* üretimini gerçekleştirmektir. İmplant edilebilir bu dokular doku iskelesi denilen ve çoğunlukla

polimerik ya da bazen seramik kökenli malzemeler ile üretilebilir. Bu malzemeler üç boyutlu yapıda bir doku iskelesi üretmek amacıyla uygun şekil, boyut, mimari ve fiziksel özellikler kazandırılarak spesifik fonksiyonların yerine getirilmesinde kullanılır [164]. Doku iskelesi olarak kullanılacak polimerik yapıdaki malzemenin üzerine *in vitro* iki boyutlu hücre kültürü çalışmalarındakine benzer bir yaklaşımla canlı hücreler büyüme faktörleri ve/veya biyoaktif moleküller bir araya getirilir ve ekstraselüler matriks oluşumu, hücre proliferasyonu ve farklılaştırılması gibi işlevsel özelliklerin kültür ortamında devam ettirilmesi hedeflenir.

Özetle doku mühendisliği dokuya ve organa özgü (spesifik) hücrelerin *ex vivo* kültür veya doku iskelesi vasıtasıyla kültür edilmesi ile yeni bir doku oluşturmak amacıyla büyütülmesi prensibine dayanır [165]. Buna göre yeni bir dokunun meydana getirilmesi için genel olarak dört temel unsurdan söz edilir:

Hücreler: Spesifik bir doku veya organdan izole edilmiş, kök hücre veya progenitör hücrelerin yanısıra otojenik, allojenik veya xenojenik hücreler olarak sınıflandırılabilirler.

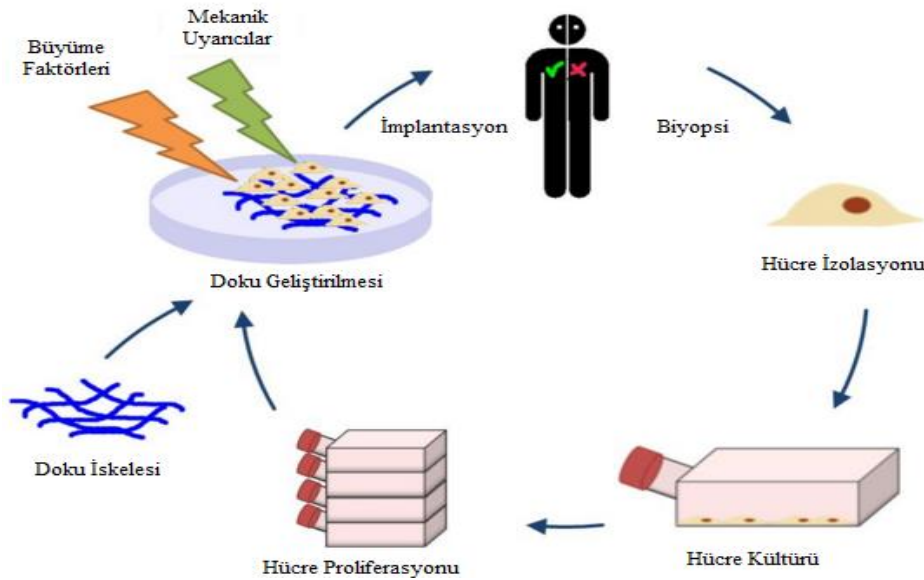
Doku iskelesi: Doku iskeleleri ekstraselüler matriks (ECM) olarak görev yapan materyaller olup, doğal veya sentetik kaynaklı polimerlerden elde edilebilmektedirler (Şekil 2.24).



Şekil 2. 24 Bir doku iskelesi örneği [166]

Biyosinyal molekülleri: Bu moleküller doku oluşumunu indüklemekte görev alırlar.

Biyoreaktörler: *In vitro* şartlar altında kültürün sürdürülebilmesinde ve verimliliğinin sağlanmasında görev alan cihazlardır. Biyoreaktörler, sürekli, kesikli vb. şekillerde sınıflandırılabilirler [165].



Şekil 2. 25 Doku mühendisliği uygulama basamaklarının şematik gösterimi [167]

Şekil 2.25'te görüldüğü üzere takip edilen basamaklar şöyledir;

- (1) Hücreler organizmadan izole edilir
- (2) İzole edilen hücreler kültürlenir
- (3) Kültürlenmiş hücreler üç boyutlu doku iskelesine ekilir
- (4) Doku iskelesi ve hücreler ile üç boyutlu kültür oluşturulur
- (5) Kültürde oluşturulan doku organizmaya implante edilir.

Günümüzde doku mühendisliğinde istenilen uygun doku veya organ üretmek amacı ile sayısı günden güne artan çalışmalar yürütülmektedir. Bu çalışmalar, rejenartif tıp, gelişim biyolojisi, moleküler biyoloji, genetik mühendisliği, immünoloji, patoloji ve biyomühendislik gibi bilim dallarına katkıda bulunmasının yanı sıra, insan genomu projesinin tamamlanması, gen ekspresyonunda rol alan hücre içi ve dışı sinyal moleküllerinin aydınlatılması, monoklonal antikor ve aşı üretimi çalışmalarına da katkı sağlamıştır [168]. Doku mühendisliğindeki bu uygulamalar özellikle üç boyutlu

proliferatif organ çalışmalarında oldukça önemlidir. Özellikle doku ve hücre kültürü tekniklerindeki ilerlemelerle beraber doku mühendisliği çalışmaları da ivme kazanmıştır. Hücre kültürü çalışmalarının en temel zorluğu olan hücrelerin *in vivo* ortamdaki çoğalma, g, besin kullanımı ve gıda sağlanması gibi dinamik özelliklerinin *in vitro* ortamda da srdrlebilmesidir [169]. Bu sebeple doku mühendisliğinde özellikle üç boyutlu (3D) hücre kültürü çalışmaları ile hücrelerdeki bu karmaşık yapı ve organizasyonların nasıl gerçekleştiğini anlamaya yönelik yaklaşımlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Tüm bunlar 3D hücre kültürü yaklaşımlarının ve uygulamalarının doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için önemini gözler önüne sermektedir.

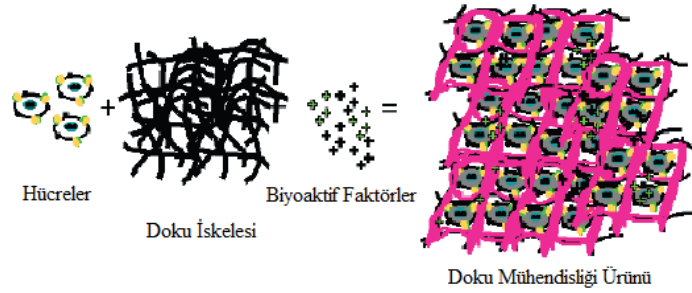
2.6.1 Hücre Yüzey Etkileşimleri

Organizmadaki herhangi bir dokudan elde edilen hücreler, çoğalabilmek, hücresel faaliyetlerini gerçekleştirebilmek ve canlılıklarını sürdürebilmeleri için bir yzeeye tutunmaya ihtiyaç duyarlar bu nedenle doku mühendisliğinde kullanılan hücrelerin, kullanılan doku iskelesinin yüzeyine tutunmaları çok önemlidir. Bir hücrenin yzeeye tutunmasında hem reseptör-ligand ilişkisi, hem de non-spesifik kimyasal etkileşimler (elektrostatik kuvvetler, van der waals etkileşimleri vb.) etkilidir. Etkileşim halindeki hücreler ve yüzey arasında non-spesifik kimyasal etkileşimler her zaman gerçekleşirken, spesifik reseptör-ligand etkileşimleri yalnızca fonksiyonel grupları ile tanınan ligand moleküllerini tanıyan reseptör moleküllerinin hücre dışına eksprese olmasıyla gerçekleşir. Hücreler doku iskelesine yapıştıktan sonra, hücreler ve iskele yüzeyi arasında fiziksel ve kimyasal reaksiyonlar dizisi başlar. Doku iskelesi organizma içine yerleştirildikten sonra veya hücre kültürü ortamına konulduktan sonra hücre yüzey molekülleri vasıtasıyla adsorbsiyon gerçekleşir.

2.6.2 Doku Mühendisliğinde Kullanılan Doku İskeleleri

Doku iskeleleri doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan yüksek gözenekli ve hücre trasplant düzenekleri olarak görev yapan materyallerdir. Bu malzemeler, biyouyumlu, 3D ve birbiri ile bağlantılı gözenek ağına sahip olmak zorundadır. Ayrıca kontrol edilebilir bozunma hızı ve hücrenin metabolik faaliyetlerinin, büyümesinin ve

çoğalmasının gerçekleştirebilmesi için uygun mekanik ve fiziksel özelliklere de sahip olmaları beklenmektedir [170].



Şekil 2. 26 Doku iskelesi temelli doku mühendisliği yaklaşımının şematik gösterimi [171]

Doku iskelelerinin temel görevi, vücut içinde bozunmaya ve emilime uğrarken dokuda ekstraselüler matriks analoğu olarak işlev görmeleridir. Hücreler doku iskelesine yapışıp yayılırken iskele de bozunarak yeni oluşan dokuda ekstraselüler matriksin meydana gelmesine imkân sağlayacaktır (Şekil 2.26). Ayrıca iskele olarak seçilen malzemenin toksik etki göstermemesi ve vücutta enfeksiyona sebep olmaması da önemlidir [165].

2.6.3 Hücre Kültürü ve Tarihçesi

Bir dokudan izole edilmiş hücrelerin adhezyon, proliferasyon ve migrasyon gibi özelliklerinin kontrollü ve uygun şartlar altında yetiştirilmesine hücre kültürü adı verilir. Hücre kültürü tekniklerinin temeli günümüzden yüz yıl öncesinde kullanılmaya başlanmış ve günümüzde hala devam etmektedir [172]. Hücre kültürü ile ilgili ilk çalışmalar 1907 yılında Ross Harrison'ın gerçekleştirdiği kurbağa embriyosu sinir doku liflerinin incelenmesi ve 1912 yılında Alexis Carrel'in tavuk embriyosu kullanması olarak karşımıza çıkar [173], [174], [175], [176], [177]. 1948 yılında ise Katherine Sanford ve arkadaşları tarafından tekli hücrelerin kültür ortamında büyütülmesi söylenebilir. Hücre kültür çalışmaları için en önemli ve kapsamlı bir diğer çalışma da 1955 yılında Harry Eagle tarafından hücre kültüründe az miktarda serum proteinleri ile desteklenmiş tuz karışımlarının kullanılabileceğini göstermesidir. 1992'de de Rosenfield ve ekibinin genetik olarak modifiye edilmiş hücrelerin kültür çalışmalarını

gerçekleştirmeleri ile de çeşitli hastalıklara yönelik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi için büyük bir adım atılmıştır.

2.6.4 Hücre Kültürlerinin Uygulama Alanları

Hücre kültürü çalışmaları son yıllarda oldukça geniş bir alanda çeşitli amaçlara yönelik olarak dünyanın pek çok ülkesinde yürütülmektedir. Hücre kültüründe monoklonal antikorların üretilmesi, kanser aşılarının üretilmesi, çeşitli enzimlerin üretilmesi, hormon ve büyüme faktörlerine yönelik üretimler, viral aşılarda üretilmesi ve teşhis amaçlı kullanımlar, somatik gen tedavisine yönelik çalışmalar, graft eldesi için gerçekleştirilen kültürler, *in vitro* üç boyutlu doku üretilmesine yönelik çalışmalar uygulama alanları olarak sayılabilir.

2.6.5 İki Boyutlu Hücre Kültürü

Hücre kültür çalışmalarında hücreler için; biyolojik bir sıvı içerisinde kültür ortamında serumlar, hormonlar ve büyüme faktörlerinin eklendiği, hücrelerin üremesinin ve büyümesinin sağlanabilmesi için sıvı karışımlarına ihtiyaç vardır. Özellikle sıklıkla dana fetal serumu, insan ve at serumları hücre kültürü ortamlarında kullanılmaktadır. Bu serumlar içeriklerinde temel proteinleri, hormonları, polipeptitleri, besin maddelerini, metabolitleri, mineral ve inhibitörleri barındırdıklarından hücreler için önemli bileşenlerdir. Ayrıca kültürde bulunan hücrelerin bakteri ve mantar gibi patojen ajanlara karşı korunmasının sağlanması için de uygun (penisilin ve gentamisin gibi) antibiyotikler de besi ortamına eklenebilmektedir. Ayrıca hücrelerin oksijen ve nem ihtiyaçlarını karşılamak amacı ile %5 ila %25 oranında oksijen içeren nemli ortam sağlanır.

2.6.6 Üç Boyutlu Hücre Kültürü

Son yıllarda polistiren veya camdan imal edilmiş iki boyutlu (2D) bir yüzey (petri kabı) üzerinde ökaryotik hücreler ve hücre büyümesini destekleyici maddelerin (sinyal molekülleri) bir araya getirilmesiyle gerçekleştirilen 2D hücre kültürü üzerinde yapılan çalışmalar artmıştır. Bugüne kadar yayımlanmış pek çok gelişimsel biyoloji metotları kullanılarak adheziv hücrelerin üretilmesi sağlanmıştır. Ancak bu çalışmaların en büyük

dezavantajı hayvan hücre fizyolojisinin tek tabakalı bir hücresel ortamda birebir taklit edilememesidir. Bu sebeple 2D, cam veya polistiren bir tabaka üzerinde ökaryotik bir canlı hücrenin tam anlamıyla taklit edilmesi mümkün değildir [178]. Sonuç olarak, reseptör ekspresyonu, transkripsiyonel ekspresyon, hücre göçü (migrasyonu) ve apoptoz olayları gibi bilinen pek çok karmaşık yanıt, 2D bir kültür ile canlı hücrelerin esas elde edildikleri organ ve doku bölgelerindeki davranışlarıyla kıyaslandığında önemli ölçüde farklılıklar göstermektedir. Bu sebeple hücre yenilenmesi ve doku fizyolojisinin takip edilmesi gereken çalışmalar için 2D hücre kültürleri, yetersiz kalmaktadır. Diğer taraftan pek çok 2D hücre kültürü tek bir hücre tipi içerdiğinden farklı hücre tipleri arasındaki intraselüler iletişimi gösterilememektedir. Birden fazla hücrenin bulunduğu 2D ko-kültürler ise bu konuda başarılı olsa da doku içinde var olan hücresel fonksiyonların doğru bir şekilde yeniden üretilmesinde aksaklıklar yaşanmaktadır. Bu sebeple geliştirilen 3D hücre kültürleri bu alanda yaşanan sorunlara alternatif olmaktadır [177], [178], [179]. Büyüme ortamının oluşturulması ve porlu, biyouyumlu bir doku iskelesi üzerinde temel bir başlangıç noktasının oluşturulması canlı dokunun olabilecek en yakın taklidinin sağlanabilmesi açısından gereklidir. Ancak kompleks bir 3D hücre kültürünün modellenebilmesi için göz önünde bulundurulması gereken pek çok faktör vardır. Bunlar; doku iskelesi olarak kullanılacak malzemenin seçimi, hücrelerin kaynağı ve pek çok dokunun çalışılabilmesine izin verecek nitelikte bir güncel hücre kültürü metodunun belirlenmesidir [180]. Bu konuda geliştirilen pek çok yaklaşım olmasına rağmen, belirli bir hücre tipi için özel olan hassas doku iskelesi tasarımı, otolog veya yetişkin kökenli kök hücrelerden hangisinin tercih edileceği ve doku iskelesi için hangi doğal veya sentetik polimer malzemesinin kullanılacağı konuları oldukça önemli olup araştırmalar hala devam etmektedir.

Son yıllarda doku mühendisliği çalışmalarında üç boyutlu hücre kültürlerinde doku iskelesi kullanımı artmıştır. Kullanılan iskelelerde biyomateryal türü, ECM, hücre tipinin yanı sıra uygun pH, sıcaklık ve O₂ seviyesi gibi gerekli koşullar özenle kontrol altında tutulmaktadır [181], [182].

MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Ekipman

- Hücre Kültür Odası
- Hava akımlı kabinler
- Karbondiyoksitli inkübatör (New Brunswick scientific CO₂ 150, 37°C)
- İnverted mikroskop (Olympus CKX41)
- Işık mikroskobu (Olympus)
- UV spektrofotometre (Jasco VM530)
- Flow Sitometri (Beckman Coulter, FC500, USA)
- Zeta Sizer Nano Instrument (Malvern Instruments Ltd, Philadelphia, PA)
- 3D yazıcı (Edison, 3Dison Multi 3D Printer)
- Santrifuj (Eppendorf, Thermo Micromax RF, Hettich ZENTRIFUGEN – EBA20)
- Serolojik Pipet Tabancası (Thermo)
- Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR3000)
- Hassas terazi (Precisa Gravimetrics AG)
- Buz makinesi (Scotsman AF100)
- Vortex (LMS VTXM3000L)
- Su banyosu (Gessellschaft Für Labortechnik, Kerman)
- Buzdolabı (Arçelik, +4°C, -20°C)
- Dondurucu (Gessellschaft Für Labortechnik (40°C))

- Azot Tankı (DMC air liquid systems, -195°C)
- Otoklav (Kerman, HIRAYAMA)
- Saf su ve ultra saf su sistemleri (GFL2104)
- Hücre kültür flaskları (25cm² ve 75cm² - TPP, Corning)
- Serolojik pipetler 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml ve 25 ml (Blau Brand Germany)
- Santrifüj tüpleri (15, 50 ml'lik - IsoLAB)
- Mikropipetler (10, 50, 100, 1000 µl'lik - Thermo, Pippetman)
- Çok kanallı pipetler (100, 300 µl'lik - Thermo)
- Tek kullanımlık pipet uçları (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl'lik - AxyGen)
- Kriyotüpler (1 ml'lik - TPP)
- Otoklavlanabilir cam şişeler (50-1000 ml'lik - ISOLAB, SCHOTT)
- Enjektör (2 cc, 5 cc, 10 cc, 50 cc'lik - Ayset)
- Şırınga filtreleri (0,22 µm ve 0,45 µm'lik MILLIPORE, TPP, Sartorius)
- Lam ve Lamel (Isolab)
- Lateks eldiven (Pudrasız - Broche)
- Kuyucuklu plaklar (6, 24, 48, 96 kuyucuklu - TPP)
- pH metre (İnolab WTW Level 1)

3.1.2 Kimyasallar

- Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) (1X)(Invitrogen 11880)
- DMEM-F12 (Sigma D6421)
- RPMI 1640 (Sigma R0883)
- Fetal Bovine Serum, FBS (Biochrom AG 1038K)
- Glutamax™-I (Invitrogen 35050M079)
- Antibiotic-Antimycotic (Invitrogen 15240M062)
- Gentamicine (Invitrogen, GIBCO 15750-045)
- L-Glutamine (Sigma, St. Louis, MO)
- Trypsin, 0.05% (1X) with EDTA 4Na, liquid (Invitrogen 25300M054)
- Tripan blue (%0,5)(Biological Industry 628255)
- DAPI 10 mg (Thermo Fisher Scientific D1306)

- Ethidium Bromide 0,625 mg/mL (Thermo Fisher Scientific 17896)
- Acridine Orange Boyama Solüsyonu (Thermo Fisher Scientific 93001)
- Dimetilsulfoksit (DMSO - Sigma D2650)
- Kolajenaz tip II (Sigma-Aldrich, C6885)
- Mayer's hematoksilen (Thermo Scientific™ TA125MH)
- Hidroklorik asit, HCl (Merck 100314)
- Sodyum Hidroksit, NaOH (Riedel de Haen)
- Sodyum klorur, NaCl (Sigma)
- Sodyum bikarbonat, NaHCO₃ (Merck)
- Potasyum hidroksit, KOH (Merck)
- Dipotasyum fosfat, K₂HPO₄ (Sigma)
- Potasyum di hidrojen fosfat, KH₂PO₄ (Riedel de Haen8210A)
- Sodyum di hidrojen fosfat mono hidrat, NaH₂PO₄H₂O (Merck)
- Di sodyum hidrojen fosfat, Na₂HPO₄ (Riedel de Haen81890)
- Potasyum klorur, KCl (Carlo Erba 360107)
- Azot gazı (BOS)

3.1.3 Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.1.3.1 PBS Solüsyonunun (1X) Hazırlanması

Kullanım amacı: Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu tamponu hücre içi ve dışındaki ozmotik basıncı dengede tutan, böylece hücrelerin su alıp şişmesini ve büzülerek zarar görmesini engelleyen bir solüsyondur. İçeriğindeki inorganik tuzlar ve su, hücre metabolizmasını destekler. Ortamın pH'ını tamponlayarak hücreler için uygun bir ortam sağlar.

İçeriği: 8 g NaCl (Fluka, 71376) 0,2 g KCl, (Fluka, 1118) 1,44 g Na₂HPO₄ (Riedel de Haen) ve 0,24 g KH₂PO₄ (Riedel de Haen, 04248), 1 L bidistile su.

Hazırlanışı: 1x PBS çözeltisinin hazırlanması için 8 g NaCl (Fluka, 71376) 0,2 g KCl, (Fluka, 1118) 1,44 g Na₂HPO₄ (Riedel de Haen) ve 0,24 g KH₂PO₄ (Riedel de Haen, 04248) tartılıp 900 mL bidistile suda çözdürüldü. pH 7,4'e ayarlandı ve son hacim

bidistile su ile 1 L'ye tamamlandı. Cam şişelerin içinde 1 atm basınç, 121°C sıcaklığa ayarlanmış otoklavda 20 dakika steril edildi. Soğutucuda +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.3.2 Kriyoprotektan (Dondurma Solüsyonu) Hazırlanması

Kullanım Amacı: Süspanse hücrelerin hücre zarını parçalamadan içerdikleri suyu kaybetmelerini ve dondurulmalarını sağlar.

İçeriği: Dimetil sülfoksit (DMSO-AppliChem, A8361) ve Fetal bovine serum.

Hazırlanışı: %10 dondurma solüsyonu için 1 mL DMSO ve 9 mL FBS karışımı 15 ml'lik falkon tüp içerisinde hazırlandı.

3.1.3.3 Tripsin EDTA Hazırlanması

Kullanım Amacı: Tripsin hücre pasajlarında kullanılan serin proteaz tipi temel bir enzimdir. Tripsin, lizin ve arjinin aminoasitlerinden peptid bağlarını yıkarak hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılmasını sağlar.

İçeriği: Trypsin, 0.05% (1X) with EDTA 4Na, liquid (Invitrogen 25300M054)

Hazırlanışı: Tez çalışmasında kök hücrelerin pasajında ticari olarak temin edilen %0,25 EDTA'lı tripsin solüsyonu kullanıldı.

3.1.3.4 Besiyerlerinin Hazırlanması

3.1.3.4.1 %10 FBS içeren DMEM Besiyerinin Hazırlanması

Kullanım Amacı: Eagle bazal medyumunu literatürdeki ilk orijinal formülasyonundan beri birçok modifikasyona uğratarak günümüze kadar geliştirilmiştir. En yaygın olarak kullanılan modifikasyonu ise DMEM bazal medyumudur. DMEM, Bazal Besiyeri Eagle'ın (Basal Medium Eagle) aminoasit ve vitaminlerinin bunların yanında diğer destekleyici bileşiklerin de fazla bulunduğu modifikasyonudur. Orijinal DMEM formülasyonu ilk olarak fare embriyonik hücrelerinin kültüründe gösterilmiştir ve 1000mg/L glukoz içerir. 4500mg/L glukoz eklenmiş olan daha gelişmiş bir modifikasyonunun da belirli hücre tipleri için daha optimum koşulları oluşturduğu gösterilmiştir [183].

İçeriği: DMEM (Gibco-Invitrogen, 31053), FBS (Biochrom AG, 1038K), Glutamax (Gibco-Invitrogen, 35050-079) ve Anti-anti (Gibco-Invitrogen, 15240)

Hazırlanışı: Tez çalışmamızda kullanıma hazır hali için 50 mL %5 FBS (Biochrom AG, 1038K) içeren DMEM (Gibco-Invitrogen, 31053) besiyerinin hazırlanmasında 44 mL stok DMEM, 5 mL FBS, 0,5 mL Glutamax (Gibco-Invitrogen, 35050-079) ve 0,5 mL Anti-anti (Gibco-Invitrogen, 15240) 50 mL'lik santrifüj tüpü içinde karıştırıldı. Soğutucuda +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.3.4.2 %FBS içeren DMEM F-12 Besiyerinin Hazırlanması

Kullanım Amacı: DMEM F-12 besiyeri DMEM ve Ham's F12 besiyerlerinin 1:1 oranında karıştırılması ile oluşturulmuştur. Böylece, özellikle fetal sığır serumu (FBS) ile desteklendiğinde daha geniş bir hücre hattının kültüre edilmesinde fayda sağladığı görülmüştür. Ham's karışımı ilk olarak Chinese Hamster Ovary (CHO), akciğer hücreleri ve fare L hücrelerinin serumsuz ortamda çoğaltılması için geliştirilmiştir. Bu besiyeri sıklıkla serum, hormon, selenyum ve benzeri eklentiler ile serumsuz ortamda hücre çoğaltılması için kullanılabilmektedir. Kemirgenlerden tavşan ve sıçanlardan elde edilen hücrelerin ve özellikle miyeloma ve hibridoma hücrelerinin çoğaltılmasında tercih edilir [184].

İçeriği: DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, D621), FBS (Biochrom AG, 1038K), L-Glutamine (BioXtra, G6392) ve PEST (Biochrom-AG (penisilin/streptomisin: 10000 unite /10000 µg/mL), A2213,0337K)

Hazırlanışı: Tez çalışmamızda 500 mL stok içerisine 5 mL L-Glutamine ve 2,5 mL PEST eklendi. 500 mL stok DMEM/F12 içerisinden 45 mL alındı ve 5 mL FBS eklendi. Soğutucuda +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.3.4.3 %10 FBS içeren RPMI 1640 Besiyerinin Hazırlanması

Kullanım Amacı: RPMI 1640 besiyeri Roswell Park Memorial Enstitüsü'nde 1966'da Moore ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. McCoy's 5A Medium'un bir modifikasyonu olan bu besiyeri süspanse halde kültüre edilen limfoblastoid hücrelerin desteklenmesi için formülize edilmiş ve günümüze kadar yaygın bir şekilde çeşitli hücre

hatlarının kültüründe kullanılmaya devam edilmektedir. İlk zamanlarda destekleyici bir serum olarak kullanılmak istenen RPMI 1640 besiyeri pek çok hücrenin serumsuz ortamda da çoğaltılabilmesini sağlamaktadır. Besiyerinin ayrıca pek çok hibrit hücrelerin füzyon protokollerinde de kullanıldığı gösterilmiştir [185].

İçeriği: RPMI 1640 (Sigma R0883), FBS (Biochrom AG, 1038K), Gentamicine (Invitrogen, GIBCO 15750-045) ve 5 mL L-Glutamine

Hazırlanışı: Tez çalışmamızda kullanıma 500 mL stok içerisine 0,5 mL Gentamicine ve 5 mL L-Glutamine eklendi. 500 mL stok RPMI 1640 içerisinden 45 mL alındı ve 5 mL FBS eklendi. Soğutucuda +40C'de muhafaza edildi.

3.1.3.4.4 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreleri Farklılaştırma Medyumlarının Hazırlanması

3.1.3.4.4.1 Adipojenik Farklılaştırma Medyumunun Hazırlanması

Kullanım Amacı: Kök hücrelerin farklılaşması için gerekli uyarınları içeren farklılaşma medyumlarındandır. Kök hücrenin adipojenik olarak yağ hücrelerine farklılaşması için gerekli ekstraselüler etkenleri içerir.

İçeriği: Ticari üründür. 4,5 g/L D-Glucose, 100 mg/L Sodium piruvate, Glutamax-1.

Hazırlanışı: Ticari olarak satın alınan basal medyum ve farklılaştırma supplementi karıştırılarak hazırlandı. 50 mL adipojenik farklılaştırma medyumunu hazırlamak için 45 mL bazal medyum, 5 mL farklılaştırma supplementi ve 0,25 mL Gentamicine eklendi. Soğutucuda +4⁰C'de muhafaza edildi.

3.1.3.4.4.2 Osteojenik Farklılaştırma Medyumunun Hazırlanması

Kullanım Amacı: Kök hücrelerin farklılaşması için gerekli uyarınları içeren farklılaşma medyumlarındandır. Kök hücrenin osteojenik olarak kemik hücrelerine farklılaşması için gerekli ekstraselüler etkenleri içerir.

İçeriği: Ticari üründür. 1 g/L D-Glucose, 110 mg/L Sodium piruvate, Glutamax-1.

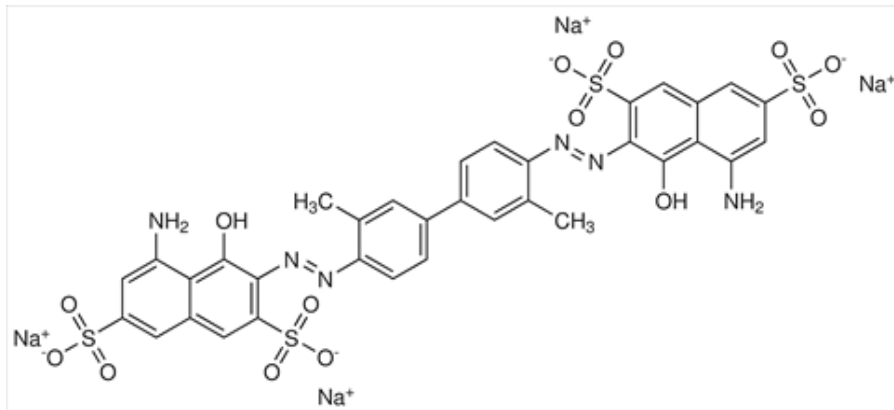
Hazırlanışı: Ticari olarak satın alınan basal medyum ve farklılaştırma supplementi karıştırılarak hazırlandı. 50 mL osteojenik farklılaştırma medyumunu hazırlamak için 45

mL bazal medyum, 5 mL farklılaştırma suplementi ve 0,25 mL Gentamicine eklendi. Soğutucuda +4°C’de muhafaza edildi.

3.1.3.5 Boyama Solüsyonlarının Hazırlanması

Tripan Mavisi Solüsyonunun Hazırlanması

Kullanım Amacı: Tripan Mavisi molekül yapısı $C_{34}H_{23}N_6O_{14}S_4Na_4$ olan (Şekil 3. 1), canlı hücrelerde fagositoz olayını incelemek için kullanılan vital bir boyadır. Canlı hücreler boyanmazken, ölü hücreler hücre zarından boyayı geçirerek mavi renkte görülür.



Şekil 3. 2 Tripan mavisi molekül yapısı ($C_{34}H_{23}N_6O_{14}S_4Na_4$) [186]

İçeriği: Konsantre Tripan mavisi solüsyonu (Biological Industry, 628255), distile su.

Hazırlanışı: 100 mL’lik ambalajlarda % 0,5 konsantrasyon şeklinde Tripan mavisi solüsyonu (Biological Industry, 628255) ticari olarak satın alındı. Hücre sayımı için 10 µL Tripan mavisi boya, 90 µL distile su ile seyreltilerek sayım solüsyonu hazırlandı. Sayım solüsyonundan 98 µL alındı ve 2 µL hücre süspansiyonu eklenerek 100 µL karışım elde edildi.

Oil Red O solüsyonunun hazırlanması

Oil red stok çözeltisinin hazırlanması: Stok çözeltisi olarak kullanılacak solüsyon için 300 mg Oil Red O toz (Sigma-Aldrich, 058K0720) tartıldı ve 100mL %99’luk izopropanol içinde çözdürüldü. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Oil Red O çalışma solüsyonunun hazırlanması: Cam bir kap içerisinde 3 birim Oil Red O stok solüsyonu 2 birim distile su içinde çözüldü. Oda sıcaklığında on dakika bekletildi.

Daha sonra ise 0,2 µm'lik filtreden geçirildi. Raf ömrü iki saat olduğu için solüsyon boyama işleminden hemen önce hazırlandı.

%60 izopropanol hazırlanması: 6 mL %99,8'lik izopropanol ve 4 mL distile su alınarak cam bir kapta karıştırıldı.

4,6-Diamidino-2-fenilindol Boyama Solüsyonunun Hazırlanması

Kullanım Amacı: 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) floresan mikroskopi ve akım sitometride DNA'yı işaretlemek amacı ile kullanılır.

İçeriği: Bidistile su, methanol, DAPI boya

Hazırlanışı: Stok solüsyonun hazırlanması için 5mg tartılan DAPI flakon içine aktarılır. Üzerine 250µl bidistile su eklenip vortekslenir. Stok solüsyon 1µg/ml olacak şekilde metanol ile seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlanır.

Etidyumbromür/Akridinoranj Boyama Solüsyonunun Hazırlanması

Kullanım Amacı: Mikroskobik olarak nucleus ve kromatini işaretlemek amacı ile kullanılır.

İçeriği: Etidyumbromür, akridinoranj, bidistile su

Hazırlanışı: Stok Etidyumbromür ve akridinoranj solüsyonlarından 100µg/mL olacak şekilde alınır ve distile su içinde çözündürülür.

3.1.3.6 Gümüşnitrat Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Gümüş nitrat (AgNO_3) solüsyonunda 2.54 g tartılır ve 1,5 ml distile su içinde çözündürülür. Stok +4°C'de saklanır.

3.1.3.7 Ekstrakt Hazırlanması

Bitkiden elde edilen ekstrakt uygun bir çözücü içinde hazırlanır. Bu çözücü su veya metanol olabilir. Hazırlanan solüsyondaki ekstrakt kalıntılarını uzaklaştırmak amacı ile solüsyon filtre kâğıdından geçirilir. 3 mg bitki parçaları 1 ml distile su içinde çözündürülür.

NOT: Döner vakum cihazı yoksa kuru bitki maddesi su içinde kaynatılarak ekstrakt hazırlanır ve filtrelendir.

3.2 Metod

3.2.1 Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

Çalışmada nanopartiküller kimyasal sentezleme ve yeşil sentezleme yöntemleri ile hazırlanarak elde edildi. Kimyasal yol ile elde edilen nanopartiküller Yıldız Teknik Üniversitesi Malzeme Mühendisliği Bölümü Malzeme Laboratuvarı'nda elde edildi. Elde edilen nanopartiküllerin dinamik ve elektroforetik ışık saçılması ölçümleri ve taramalı elektron mikroskopisi analizleri gerçekleştirildi.

3.2.1.1 Kimyasal Yöntemler ile Nanopartikül Sentezlenmesi

TiO₂ Nanopartiküllerin Sol-Jel Yöntemi ile Sentezi: Sol-jel yöntemi ile titanyumtetraklorürün (TiCl₄) etanol içerisine damla damla eklenmesi yoluyla sentezlendi. Oda sıcaklığında gerçekleşen reaksiyona daha sonra Cl₂ ve HCl gazları da katıldı. Daha sonra elde edilen solüsyon gaz üretiminin durması için tekrardan oda sıcaklığına getirildi. En son aşamada ise solüsyonun 80°C'de birkaç saat boyunca bir fırın içerisinde kurutulmasının ardından TiO₂ nanopartikülleri elde edildi. TiO₂ nanopartiküllerinin ışık absorpsiyon aralıklarını görünür ışığa çekmek için ise geçiş elementlerini bulunduran solüsyonlar ile TiO₂ nanotozları seyreltildi.

Ag Nanopartiküllerinin Sol-Jel Yöntemi ile Sentezi: Gümüş nanopartikülleri de sol-jel yöntemi ile sentezlendi. Sodyum hidroksi solüsyonu (1 mol/L, 300 mL, [Merck, Darmstadt, Germany] ve AgNO₃ solüsyonları (0,5 mol/L, 500 mL) karıştırılır. Elde edilen kahverengi (pH: 10) çökelti 5mL sodyumdodesilsülfat (Merck, Darmstadt, Germany-1 mol/L) eklenerek homojen bir kıvam elde edilene kadar karıştırıldı. Hidrazin hidrat damla damla eklendi ve distile su ile yıkama yapılarak solüsyon 80°C'de 48 saatlik kurumaya bırakıldı. Son olarak 350°C'de iki saat kalsinasyon işlemi yapıldı.

TiO₂@Ag Nanopartiküllerinin Solvent Uçurma Yöntemi ile Sentezi: Solvent uçurma yöntemi ile sentezlenen TiO₂@Ag nanopartikülleri titanyum izopropoksit (TTIP), gümüş nitrat (AgNO₃), 2-propanol (C₃H₈O) ve polivinilpirolidon (PVP) ile hazırlandı. İlk aşamada 10 mL TTIP ve 20 mL 2-propanol karıştırıldı ve manyetik karıştırıcı içinde damla damla 400 mL deiyonize su eklendi. Karışımın pH değeri TTIP ilavesinden önce nitrik asit ile

1,5'te sabitlendi. 24 saatlik karıştırma işlemi sonucunda renksizleşen sıvı içine damla damla TiO_2 eklendi. Hazırlanan solüsyon 180°C 'de 2 saat boyunca otoklavlandı. Sentez sonrasında pH değeri 3 olan solüsyonun rengi Ag eklenmesi nedeni ile kahverengine döndü. $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ kompozit nanopartikülleri deiyonize su ile yıkandı ve 80°C 'de 72 saat boyunca kurutuldu.

3.2.1.2 Biyojenik Yöntem ile Nanopartikül Sentezlenmesi

Absorbsiyon ve biyolojik birikim özelliklerinden faydalanılan ve ekosistem için önemli bir bileşen olan bitkilerin kullanılması ile gerçekleştirilir [163], [187]. Bu yöntemde bitkilerin çiçek, yaprak, kök ve tohumlarından faydalanılır [185]. Biz de çalışmamızda *Teucrium stocksianum* Bioss bitkisinin yaprak ekstraktlarını kullandık.

TiO_2 , Ag ve $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ Nanopartiküllerinin Biyojenik Sentezi: *Teucrium stocksianum* Bioss bitki tozundan elde edilen ekstrakt 50 mg/ml olacak şekilde distile su içinde çözdürüldü. Ekstrakt $0.45\mu\text{m}$ 'lik filtreden geçirildi. titanyumdioksit çözeltisinin farklı konsantrasyonları (1mM, 2mM vb gibi) hazırlandı. Filtrelenmiş ekstraktlar sırası ile tek tek TiO_2 çözeltisi, Ag çözeltisi ve $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ çözeltisi ile 1:10 oranında karıştırıldı. Karışım 6 saat süreyle oda sıcaklığında veya belirlenmiş farklı sıcaklıklarda, karıştırılarak inkübe edildi. İnkübasyon karanlık ortamda gerçekleştirdi. Titanyumdioksit için beyazdan sarıya doğru, gümüş için sarıdan kahverengiye doğru ve $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ için beyazdan sarıya (açık kahverengiye) doğru renk değişimleri gözlemlendi. İnkübasyon sonrasında nanopartikül karışımı 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet distile su ile yıkandı. Pellet 80°C 'de kurutularak kuru toz ekstraktı elde edildi.

3.2.2 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.2.2.1 Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Ölçümleri

Sentezlenen nanopartiküllerin dinamik ve elektroforetik ışık saçılması deneyleri, Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Protein Analiz Laboratuvarı'nda bulunan Malvern marka Zeta sizer Nano ZS cihazı ile gerçekleştirildi. Cihazda 633nm'lik 4,0 mW'lık He-Ne lazeri bulunmaktadır. Dinamik ışık saçılması yöntemi sayesinde bir sıvıda

çözünmüş parçacıkların boyutu analiz edilir. Elektroforetik ışık saçılması yöntemi de bir sıvıda çözünmüş parçacıkların zeta potansiyelini analiz eder. 5 nm'den 10 µm'ye kadar olan parçacıkların zeta potansiyelleri ölçülebilmektedir. Tüm ölçümler cihaz için özel üretim olan kuvvetlerde $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ hassaslığında 25°C 'de gerçekleştirildi. Boyut ölçümlerinde ve zeta potansiyel ölçümlerinde kullanılan parametreler cihaz programında ayarlanamış ve sabit olup, ölçüm süreleri ve voltaj seçimi otomatikçe ayarlanmıştır.

3.2.2.2 Taramalı Elektron Mikroskopisi

Nanopartikül tozlarının Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) analizleri Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda Zeiss marka EVO® LS 10 model cihaz ile gerçekleştirildi. Örnekler altın-palladyum ile kaplanarak düşük voltajda görüntülendi.

3.2.3 Hücre Kültürü

3.2.3.1 Hücre Çözdürme

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'nda bulunan kriyobank içerisinden çalışmalarda kullanılmak üzere daha önceden American Type Culture Collection (ATCC) Merkezi'nden temin edilmiş L929, J774 hücre hatları ve adipoz dokudan elde edilmiş mezenkimal kök hücreler uygun çözdürme teknikleri ile temin edildi. Hücre çözdürme işlemi için 37°C su banyosu hazırlandı. Kullanılacak sarf malzemeler ve kimyasallar çalışma alanı olan laminar hava akım kabinine yerleştirildi. Besiyerleri su banyosunda 37°C 'ye ısıtıldı. Santrifüj tüpüne 5 mL hücre hattına uygun besiyeri koyuldu. Diğer taraftan sıvı azottan kriyotüpler çıkartıldı ve hemen su banyosuna alınarak 30-60 saniye içinde çözdürme işlemi gerçekleştirildi. Kriyoptüp laminar hava akım kabinine alındı ve alkol ile temizlenerek alevden geçirildi. Daha sonra kriyotüpün kapağı açılarak hücre süspansiyonu pipet ile alındı ve santrifüj tüpüne aktarıldı. Santrifüj tüpü L929 ve J774 hücre hatları için 1000 rpm'de 5 dakika, ADMKH için 1200rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak hücrelerin Tripan mavisi ile sayımı yapıldı. Her 1 mL'de 200.000 hücre olacak şekilde 5'er mL besiyeri içeren kültür flasklarına aktarıldı.

3.2.3.2 L929 Hücre Hattı Kültürü

Kriyobanktan çözdürülen L929 hücre hattı 25cm²'lik kültür flaskında %10 FBS ve fenol kırmızısı içeren DMEM-F/12 besiyeri ile 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. inkübe edilen hücreler günlük olarak mikroskopik inceleme ile takip edildi. Hücrelerin üzerindeki besiyeri 3 günde bir değiştirilerek kültüre adaptasyonu sağlandı. Kültür ortamına adapte olduktan ve uygun miktarı elde edildikten sonra hücreler pasajlanarak süspanse edildi. Daha sonra 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Dipteki pellet üzerine %10 FBS ve fenol kırmızısı içeren DMEM-F/12 besiyeri eklendi. Inkübasyona devam edildi.

3.2.3.3 J774 Hücre Hattı Kültürü

Kriyobanktan çözdürülen J774 hücre hattı 25cm²'lik kültür flaskında %10 FBS ve fenol kırmızısı içeren RPMI-1640 besiyeri ile 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. inkübe edilen hücreler günlük olarak mikroskopik inceleme ile takip edildi. Yarı süspanse olan hücre hattının içerisinde bulunduğu besi ortamı 2 günde bir değiştirilerek kültüre adaptasyonu sağlandı. Kültür ortamına adapte olduktan ve uygun miktarı elde edildikten sonra hücreler pasajlandı. Daha sonra 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Dipteki pellet üzerine %10 FBS ve fenol kırmızısı içeren RPMI-1640 besiyeri eklendi. Inkübasyona devam edildi.

3.2.3.4 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

Kriyobankta bulunan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreleri (ADMKH) kriyobanktan çıkarıldı ve çözdürüldü. Hücre süspansiyonu steril bir santrifüj tüpünde 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Pellet 10 mL %10 FBS (Biochrom AG, 1038K) içeren, Glutamax (Gibco Invitrogen 35050) ve Anti-anti (Gibco Invitrogen, 100X, 15240) ile zenginleştirilmiş DMEM ile süspanse edilerek 2-3 adet kültür flaskına ekildi. 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılarak çoğaltıldı. Kültürdeki hücreler 3-4 gün içinde bir flask tabanını % 40-50 kapladılar. Monolayer hücre tabakası üzerinde bulunan metabolit uzaklaştırıldı. PBS ile yıkanan hücrelere 5 ml %10 FBS içeren DMEM ilave edilerek hücreler tekrar inkübasyona bırakıldı. Kültür flaskını 6-7 günde %70-80 kaplayan hücreler pasajlama işlemi için hücreler 2 mL PBS ile 2 defa yıkanarak üzerine

Trypsin/EDTA (Gibco Invitrogen, 1X, %0,05, 25300) eklendi ve 5–10 dakika 37°C’de %5 CO₂ içeren etüvde bekletildi. Hücrelerin üzerine FBS içeren besiyerinden 5 mL eklenerek hücre süspansiyonu 15 mL’lik falkon tüpe aktarıldı ve 1200 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti üzerine besiyeri eklendi ve 5 mL %10 FBS içeren besiyeri bulunan flask içine alındı ve 37°C’de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi.

3.2.3.5 Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Kolonijenik İnceleme: Tek bir hücrenin oluşturacağı koloniler mikroskopik olarak kültür ortamında incelendi. Fibroblast benzeri soliter (tek) hücrelerin CFU (colony forming unit) koloni oluşturmadaıkları mikroskopik gözlem ile belirlendi. Diğer kök hücre kaynaklarından elde edilen mezenkimal kök hücrelerin aksine adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin koloni oluşturmadaıkları belirlenmiştir.

İmmünohistokimyasal İnceleme: Kontrol grubu, adipojenik farklılaşma grubu ve osteojenik farklılaştırma grupları olarak her bir kuyucuğa % 10 FBS içeren DMEM içerisinde 50.000 hücre ekildi. Hücrelerin kültür kabı tabanına tutunmaları ve çoğalmaları için üç gün 37°C’de %5 CO₂ etüvünde inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda hücreler PBS ile yıkandı. Adipojenik farklılaştırma grubu için 2mL adipojenik farklılaştırma medyumunu, osteojenik farklılaştırma için 2mL osteojenik farklılaştırma medyumunu ve kontrol grubu için 2mL kontrol medyumunu ile hücrelerin besiyeri değiştirildi ve 37°C’de %5 CO₂ etüvünde farklılaşma süresi boyunca inkübe edildi. İki günde bir mikroskop altında takip edildi ve her gruba ait medyumlar ile üç günde bir besiyerlerinin değişimi yapıldı.

Oil Red O boyama: Hücreler PBS ile yıkandı ve üzerlerine 2 mL %10’luk formalin eklendi. Oda sıcaklığında 30-60 dakika bekletildi. Daha sonra formalin uzaklaştırıldı ve hücreler distile su ile yıkandı. Hücrelerin üzerine %60 izopropanol eklendi ve 5 dakika bekletildi. İzopropanol uzaklaştırıldıktan sonra 2 mL Oil Red O çalışma solüsyonu eklendi. 10-15 dakika sonra hücreler musluk suyu ile yıkandı. Hematoksilin boya eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika bekletildikten sonra hücreler musluk suyu ile renksizleşinceye kadar yıkandı. Hücreler faz kontrast mikroskop altında incelendi.

Alizarin Red S Boyama: Hücreler PBS ile 2 kere yıkandı. Hücrelerin üzerine Alizarin Red S boyası eklendi ve 30 saniye–5 dakika (genellikle 2 dakika) oda sıcaklığında bekletildi.

Boya uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzeri aseton ile kaplandı. Aseton hücrelerin üzerinden uzaklaştırıldı ve 1/1 oranında aseton/ksilen karışımı ilave edildi. Daha sonra ksilen eklendi. Oda sıcaklığında kurutulan preparatın üstü gliserol ile kaplanarak mikroskopik olarak incelendi.

İmmünfenotipleme: Kültürün dördüncü pasajında bulunan hücreler tripsinlendi ve santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücre pelleti PBS ile yıkandı ve sayım yapıldı. 1mL’de 5×10^5 hücre olacak şekilde üzerine CD34 Mouse Anti-Human ve CD90 Mouse Anti-Human’dan 10’ar μ L eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra CellLab Quanta cihazı ile ölçümleri yapıldı.

3.2.4 Nanopartikül Hücre Toksisite Çalışmaları

3.2.4.1 Hücrelerin Ekimi

Kültürde bulunan J774, L929 ve ADMK hücreleri yukarıda belirtildiği üzere pasajlandı. Pasajlanan hücreler 15’lik santrifüj tüpüne aktarıldı. J774 ve L929 hücreleri 1000 rpm’de 5 dakika, ADMK hücreleri 1200 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında hücrelerin (yukarıda belirtildiği gibi) Thoma lamında Tripan mavisi ile sayımı yapıldı. Bu esnada plak içerisindeki kuyucuların her birine 100 μ L fenol kırmızısı içermeyen hücre tabiatına uygun besiyeri ilave edildi. Hücre süspansiyonlarından her bir kuyucuğa 20.000 adet hücrenin ekimi gerçekleştirildi. Hücreler 37°C’de %5 CO₂ içeren nemli etüvde kuyucukların tabanına tutunmaları için bir gece inkübasyona bırakıldı.

3.2.4.2 Hücrelere Nanopartikül Eklenmesi

Kuyucuklu plaklara hücrelerin ekimi sonrasında 24 saatlik inkübasyonun ardından J774, L929 ve ADMK hücrelerinin üzerine 1 μ g/mL ile 100 μ g/mL arasında değişen beş farklı konsantrasyonda nanopartiküller eklendi. Nanopartikül eklenen hücreler 72 saat 37°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında hücrelerin canlılıkları MTT yöntemi ile ölçüldü.

3.2.4.3 Nanopartiküllerin Hücre Kültürleri Üzerinde Canlılıklarına Etkisi

Kullanılan tüm nanopartiküllerin, belirlenen konsantrasyonları ile kültürü yapılan mezenkimal kök hücrelerin canlılıklarına olan etkisi, 72 saat sonrasında inkibatörden alınarak hücrelerin canlılıkları MTT, hücre döngüleri ise akım sitometrisi ile analiz edildi. Böylece hücre gelişimi süresinde meydana gelen hücresel değişimler takip edildi.

Tripan Mavisi ile Hücre Canlılıklarını Belirleme: Kültürü devam eden hücreler 1X Tripsin ile flask tabanından kaldırıldı. Hücre süspansiyonu % 10 serum içeren uygun besiyeri ile 1:1 oranında karıştırılarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılıp pellet 1mL besiyeri içerisinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonundan 2 µL, Tripan mavisi solüsyonundan 50 µL ve PBS'ten 48 µL alınarak toplamda 100 µL karşım içerisinde 20 µL alınarak Thoma lamında sayım yapıldı. Canlı hücreler boyanmazken, ölü hücreler hücre zarından boyayı geçirerek mavi renkte görüldü.

MTT Yöntemi ile Sitotoksosite Belirleme: Hücre sitotoksitesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan MTT (tetrazolium tuzu 3-[4,5- dimethythiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi enzimatik bir testtir. Bu yöntem ile hücre kültüründeki canlı hücreler oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak tespit edilebilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır [188]. MTT yönteminde mitokondrial bir enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan kristallerine dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyası ile inkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır [189]. MTT yönteminin uygulanması amacı ile de kültürü devam eden hücreler 1X Tripsin ile flask tabanından kaldırıldı. % 10 serum içeren DMEM besiyeri ile hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılıp pellet 1mL besiyeri içerisinde süspanse edildi. Thoma lamında sayım yapıldıktan sonra hücreler ml'de 20.000 olacak şekilde alınacak ve 96'lık ELISA kuyucuklarına ekildi. Farklı

konsantrasyondaki nanopartiküller ile 72 saatlik inkübasyon sonrasında formazan kristallerinin oluşması için MTT solüsyonu ile 4 saat daha inkübe edildi. Daha sonra reaksiyonun durması için her bir kuyucuğa DMSO eklenerek yarım saat sonra 570 nm dalga boyunda ELİSA okuyucuda hücrelerin canlılıkları tayin edildi.

EtBr/AO Yöntemi ile Hücre Canlılıklarını Belirleme: Plaklara ekilmiş olan hücreler %70 konfluent olunca PBS ile iki kere yıkandı. Trypsin ile kaldırıldı. Kalkan hücrelerin üzerine AO/EtBr karışımı eklendi ve hücre süspansiyonundan birer damla alınarak lam üzerine koyuldu. Işıma yapan hücreler 20 dakika içerisinde floresan mikroskop (OLYMPUS, Japan, CKX41) altında incelendi. Boyanan hücrelerden (1) canlı hücreler parlak yeşil nükleus, (2) erken apoptozda olan hücreler yeşil nükleus ile birlikte yoğunlaşmış kromatinin parlak yeşil rengi, (3) geç apoptotik hücreler turuncu ile kırmızı arası nükleus ile yoğunlaşmış / parçalanmış kromatin ve (4) nekrotik hücreler kondanse olmuş bir yapı ile tamamen turuncu ya da kırmızı nükleus ile tanımlandılar. Apoptotik hücre %'si aşağıdaki formül (3.1.) kullanılarak hesaplandı.

$$\frac{\text{Apoptotik Hücre Sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}} \times 100 \quad (3.1)$$

DAPI Yöntemi ile Hücre Canlılıklarını Belirleme: Plaklara ekilmiş olan hücreler %70 konfluent olunca PBS ile iki kere yıkandı. Her bir kuyucuğa metanol:su (1:1) karışımı eklendi ve -20°C'de 10 dakika fiksasyon için bekletildi. Fikse edilen hücreler tekrar PBS ile yıkandı ve üzerlerine DAPI (1µg/mL) boya eklendi ve 37°C'de bekletildi. Bekleme süresi sonunda boyanan hücreler PBS ile yıkandı ve üzerine PBS : gliserin (1 : 1) karışımı eklenerek 30 dakika içerisinde floresan mikroskop (OLYMPUS, Japan, CKX41) altında 40X objektif ile incelendi. Boyama sonunda apoptotik nükleusların DNA'sı DAPI ile boyanarak ışımaya yaptığı gözlemlendi. Apoptotik hücre %'si aşağıdaki formül (3.2) kullanılarak hesaplandı.

$$\frac{\text{Apoptotik Hücre Sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.5 Nanopartiküllerin Mezenkimal Kök Hücre Kültürleri Üzerinde Farklılaşmaya Etkisi

Devamlı kültürü elde edilen ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilen ADMK hücreler altı farklı nanopartikülün beş farklı konsantrasyonu ile birlikte yeniden kültüre edildi ve bu nanopartiküllerin ADMK hücreler üzerindeki adipojenik ve osteojenik farklılaşmalarına etkisi incelendi.

3.2.5.1 Nanopartiküllerin Mezenkimal Kök Hücre Kültürleri Üzerinde Adipojenik Farklılaşmaya Etkisi

Kültürde bulunan hücreler 48 kuyucuklu plaklara 40.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Bir gece 37°C ve %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerine altı farklı nanopartikülün beş farklı konsantrasyonu uygulandı ve yeniden bir gece inkübe edildi. Bu süre sonunda hücrelerin üzerinde bulunan %10 FBS içeren DMEM besiyeri uzaklaştırıldı ve ticari olarak temin edilmiş olan adipojenik farklılaştırma medyumuna eklendi. Hücrelerin besiyerleri üç günde bir yenilendi. 14 günlük adipojenik farklılaşma süreci boyunca hücreler her gün mikroskopik olarak gözlemlendi ve hücreler üzerindeki değişimler takip edildi.

3.2.5.2 Nanopartiküllerin Mezenkimal Kök Hücre Kültürleri Üzerinde Osteojenik Farklılaşmaya Etkisi

Kültürde bulunan hücreler 48 kuyucuklu plaklara 40.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Bir gece 37°C ve %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerine altı farklı nanopartikülün beş farklı konsantrasyonu uygulandı ve yeniden bir gece inkübe edildi. Bu süre sonunda hücrelerin üzerinde bulunan %10 FBS içeren DMEM besiyeri uzaklaştırıldı ve ticari olarak temin edilmiş olan osteojenik farklılaştırma medyumuna eklendi. Hücrelerin besiyerleri üç günde bir yenilendi. 21 günlük osteojenik farklılaşma süreci boyunca hücreler her gün mikroskopik olarak gözlemlendi ve hücreler üzerindeki değişimler takip edildi.

3.3 İstatistiksel Analiz

Deneyler en az 3 kez tekrarlandı. GraphPad Prism 5 programı kullanıldı. Varyansların homojenitesi ANOVA one-way varyansı ile belirlendi. $p<0.005$ değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışmanın amacına uygun olarak deneysel çalışmalar hücre kültür çalışmaları ve nanopartiküllerin sentez ve karakterizasyon çalışmaları şeklinde iki temel başlık altında toplandı.

İlk aşama olan hücre kültürü çalışmalarında kriyobankta bulunan iki farklı somatik hücre hattı (L929 ve J774) ve insan adipoz dokusundan elde edilmiş mezenkimal kök hücreler (ADMKH) çözdürüldü. Hücrelerin kültür ortamına adaptasyonu, devamlı kültürünün yapılması ve yeniden kriyobankının oluşturulması amacı ile hücrelerin yeniden dondurulması sağlandı.

İkinci aşamada nanopartikül eldesi çalışmaları için gümüş (Ag), titanyumdioksit (TiO_2) ve titanyumgümüş ($\text{TiO}_2\text{@Ag}$) kompozit nanopartikülleri kimyasal ve yeşil sentezleme yöntemleri kullanılarak üretildi ve daha sonra da karakterize edildi.

Çalışmada üç hücre hattı (L929, J774 ve ADMKH) üzerinde iki farklı sentez yöntemi (kimyasal ve biyojenik) ile üretilen üç farklı nanopartikülün (TiO_2 , Ag ve $\text{TiO}_2\text{@Ag}$) beş konsantrasyonda ($1\mu\text{g/mL}$, $10\mu\text{g/mL}$, $20\mu\text{g/mL}$, $50\mu\text{g/mL}$ ve $100\mu\text{g/mL}$) etkileri incelendi.

4.1 Hücre Kültürü Deneysel Çalışmaları

4.1.1 Hücre Çözdürme

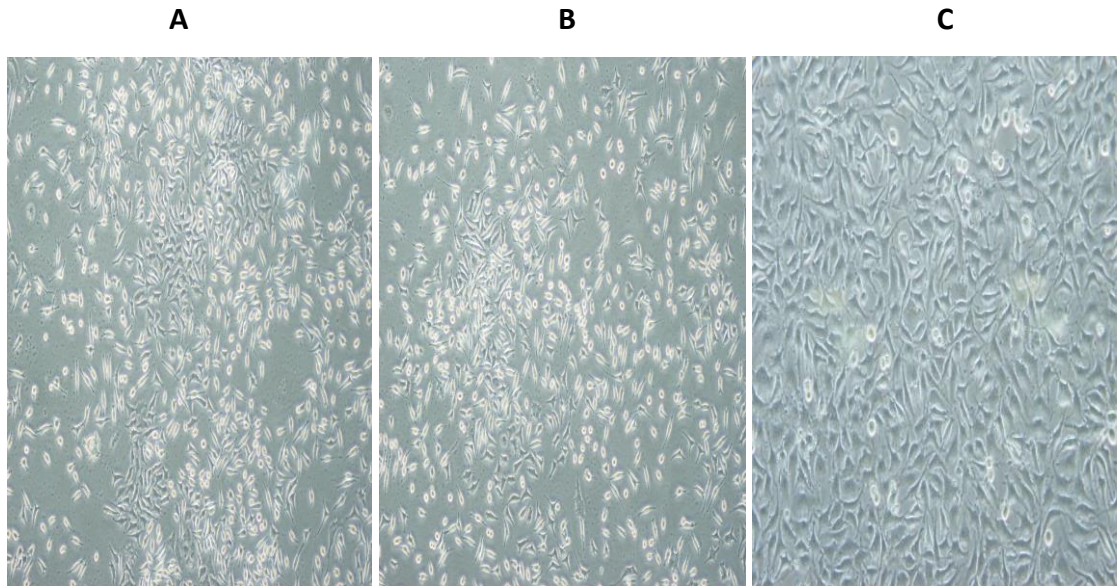
Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'nda (laboratuvar sorumluları Prof. Dr. Adil M. Allahverdiyev ve Yrd. Doç. Dr. Melahat Bağirova) bulunan kriyobanktan L929, J774

ve insan adipoz dokusundan elde edilmiş mezenkimal kök hücreler (ADMKH) temin edildi. Daha önce uygun kriyoprezervasyon yöntemleri ile dondurulan hücreler Bölüm3.2.2.de bulunan Hücre Çözdürme başlığında belirtildiği üzere uygun çözündürme yöntemi ile çözündürüldü. Hücreler kültür ortamına aktarıldı.

4.1.2 Devamlı Hücre Kültürü Çalışmaları

4.1.2.1 L929 Hücre Hattının Devamlı Kültürü

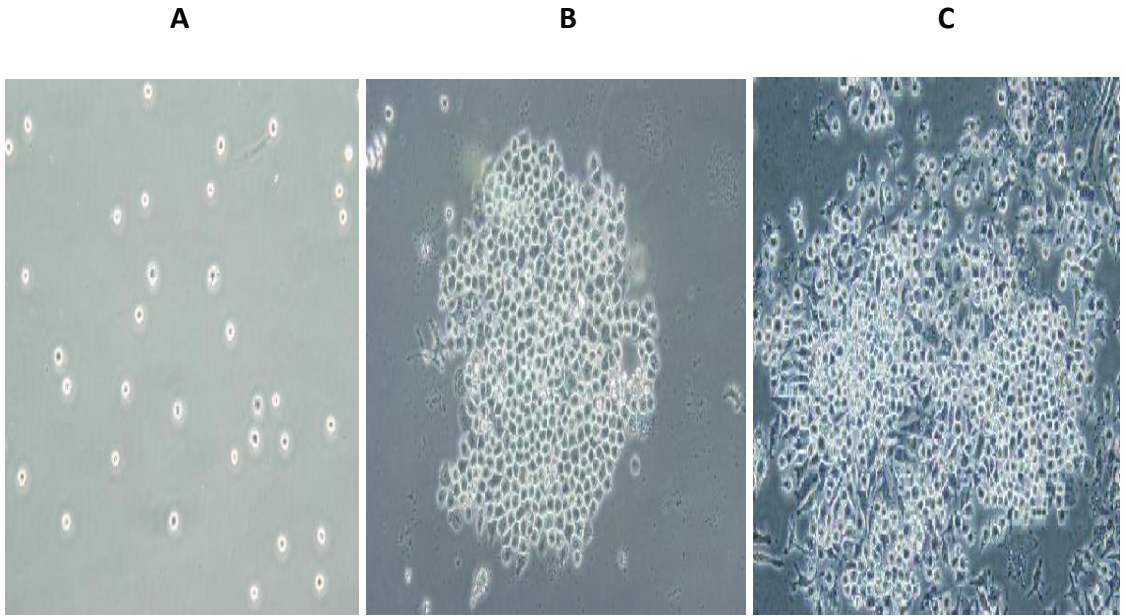
Kriyobanktan çıkarılan fare fibroblast hücre hattı (L929) kültür ortamına alındıktan sonra her gün mikroskopik olarak incelendi. Adeziv bir hücre olan L929 hücre hattında bulunan hücreler morfolojik olarak takip edildi. Klasik iğ şeklindeki fuziform fibroblast morfolojisi gösterdikleri ve asimetrik nükleus yerleşimi ile karakterize oldukları gözlemlendi. Hücrelerin canlılıklarını ve proliferatif özelliklerini devam ettirdikleri belirlendikten sonra deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere kültür çalışmalarına devam edildi (Şekil 4.1). Sağlıklı hücreler çoğalıp hücre sayılarını artırdıkça pasajlanarak kültürün devamlılığı sağlandı.



Şekil 4. 47 Çözdürme sonrası ve kültüre adapte L929 hücre hattı mikroskopik görüntüsü (A ve B 10X, C 40X)

4.1.2.2 J774 Hücre Hattının Devamlı Kültürü

Kriyobanktan çıkarılan J774 fare makrofaj hücre hattı kültür ortamına alındıktan sonra her gün mikroskopik olarak incelendi. Yarı-adezif (yarı süspanse) bir hücre olan J774 hücre hattında bulunan hücreler flask yüzeyine tutunduktan sonra koloni oluşturarak çoğalmaları ve yuvarlak (globüler) morfoloji sergilemeleri ile karakterizedir. Bu özellikleri hem adezif hem de süspanse hücrelerde gözlemlendi. Hücrelerin canlılıklarını ve proliferatif özelliklerini devam ettirdikleri de belirlendikten sonra deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere kültür çalışmalarına devam edildi (Şekil 4.2). Sağlıklı hücreler çoğalıp hücre sayılarını artırdıkça pasajlanarak Bölüm 3.2.3.3'te belirtildiği üzere kültürün devamlılığı sağlandı.



Şekil 4. 48 Çözdürme sonrası ve kültüre adapte J774 hücre hattı mikroskopik görüntüsü (A, B ve C 10X)

Tüm hücre hatları ile ilgili olarak devamlı hücre kültür yöntemleri adapte edilmiş ve rutin yöntem devam etmektedir.

4.1.2.3 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü

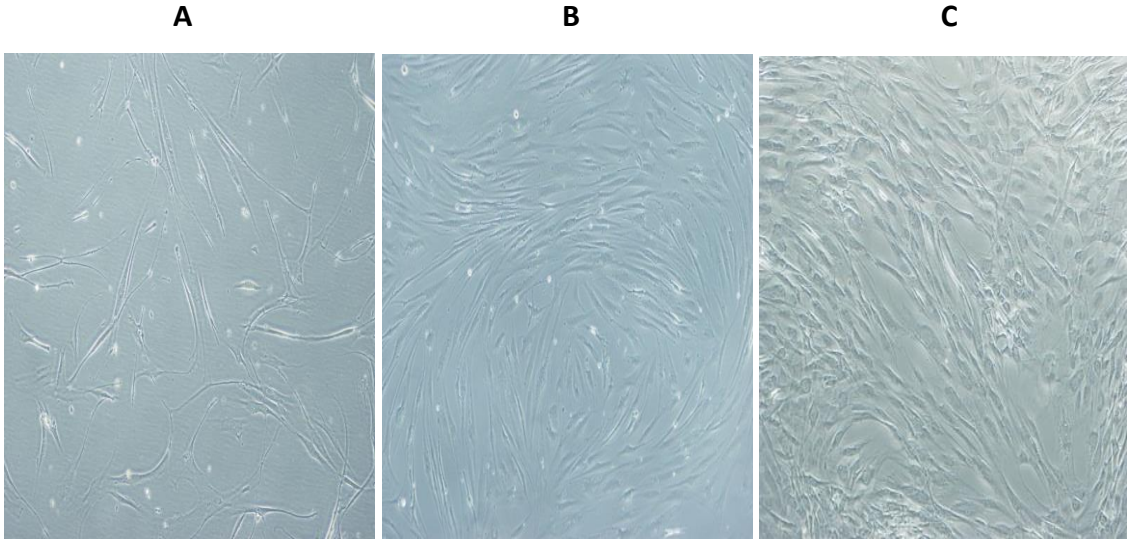
Daha önceki çalışmalar kapsamında laboratuvar şartlarında enzimatik yöntem ile izole edilmiş karakterizasyonu yapılmış ve dondurulmuş mezenkimal kök hücreler kriyobanktan çözündürülerek çıkartıldı. Yıkama işlemlerinin ardından hücreler Bölüm

3.2.2’de belirtildiği üzere kültür ortamına alındı. Her gün mikroskopik olarak hücreler takip edildi. Kültür flaskına tutunarak adezif özellik gösteren, fibroblastik morfolojileri ve dışal nükleus yerleşimleri ile karakterize olan hücrelerin canlılıklarını devam ettirdikleri belirlendi. Hücre sayısının miktarı karakterizasyon ve deneysel çalışmalar için uygun sayıya gelene kadar kültür ortamında çoğaltıldı. Morfolojik olarak sağlıklı hücrelerin elde edildiği örnekler dördüncü pasajda karakterize edildi ve 5-9 pasaj arasında da deneysel çalışmalarda kullanıldı. Proliferasyona devam eden hücreler %70-80 konfluent olduklarında pasajlama işlemi ile deneyler için yeni flasklara aktarılırken kriyoprezervasyon işlemi ile de bir kısmı kriyobankta muhafaza edildi.

4.1.2.4 Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu

İnsan adipoz dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücreler daha önceki çalışmalar için izolasyonun ardından karakterize edilmişti. Ancak kriyoprezervasyon işlemi sonrasında kriyobankta bir süre bekletilen hücrelerin çözdürüldükten sonra aynı kök hücre morfolojisi ve karakterini taşıyıp taşımadıklarının tespit edilmesi amacı ile kök hücre karakterizasyon çalışmaları tekrar edildi.

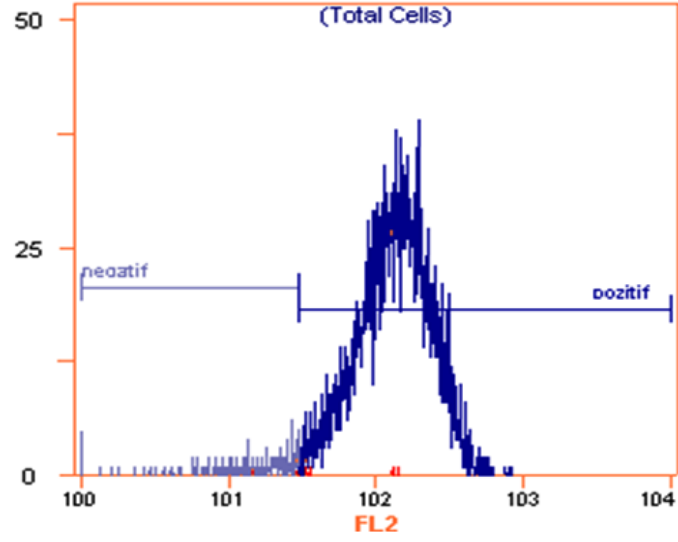
Mikroskopik İnceleme: Kriyobanktan çıkarılan ADMK hücreler flask içerisinde mikroskopik olarak incelendi ve takip edildi. Kök hücre morfolojisi olarak tanımlanan fibroblastik ve iğ şeklinde bulunan monolayer hücre tabakaları izolasyonun 3-7. günlerinde elde edilmeye başlandı. İlk haftalarda sayısı az olan bu tanımlanmış hücre gruplarının sayısı kültür ortamının besiyeri tazelandıkçe arttı ve hücre çoğalması devam etti (Şekil 4.3).



Şekil 4. 49 İnsan adipoz doku mezenkimal kök hücrelerin kültür ortamına adaptasyon sürecinde mikroskopik görünüm (A ve B 10X, C 20X)

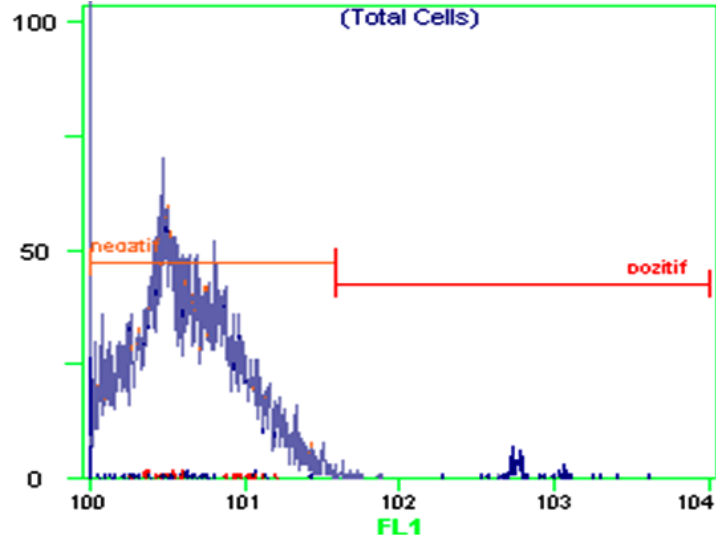
Kolonijenik İnceleme: Kültür ortamına alınan hücre gruplarının morfolojik olarak tanımlanmasının yanı sıra kök hücrelerin her birinin kendini yenileyerek koloni oluşturma potansiyelleri de mikroskopik olarak incelenmektedir. Kolonijenez yani koloni oluşturma yeteneği bir kök hücre için çok önemli bir parametredir. ADMKH kültüründe bulunan hücreler dilüe edilerek tek bir hücreden yeni bir hücre kolonisi oluşturma yetenekleri gözlemlendi. Ancak adipoz doku mezenkimal kök hücrelerinin diğer kaynaklardan elde edilen kök hücrelerden farklı olarak koloni oluşturmadıkları bilinmektedir. Elimizde bulunan hücrelerin de koloni oluşturmada adeziv bir çoğalma gösterdikleri tespit edildi.

İmmünofenotipleme: Kültürde bulunan hücrelerin mezenkimal kök hücre olup olmadıklarının belirlenmesi için flowsitometrik analiz gerçekleştirildi. 1mL’de 5×10^5 hücre olacak şekilde temin edilen hücrelerin üzerine CD34 Mouse Anti-Human ve CD90 Mouse Anti-Human’dan 10’ar μ L eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası CellLab Quanta cihazı ile ölçümleri yapıldı. Elde edilen verilere göre Şekil 4.4’te görüldüğü üzere hücrelerin mezenkimal kök hücre yüzey belirteci olan CD90 bakımından %96,77’si pozitiflik gösterdi.



Şekil 4. 50 Mezenkimal kök hücrelerin flow sitometrik olarak CD90 analizi

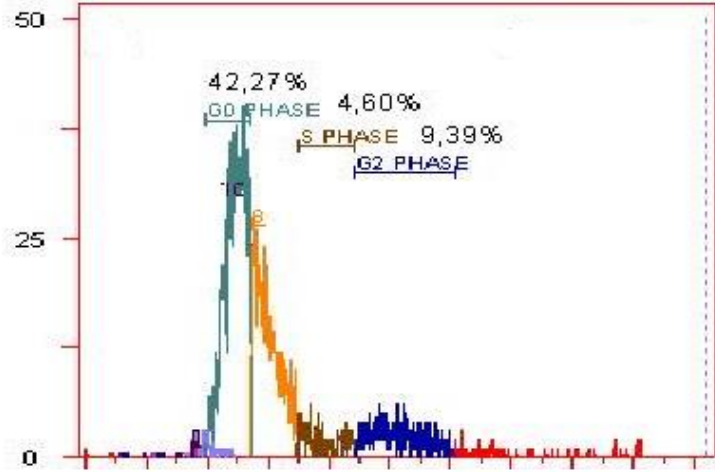
Kök hücrelerde bulunmaması gereken CD34 bakımından ise %97,88'inin negatif olduğu tespit edildi (Şekil 4.5). Böylece hücrelerin mezenkimal kök hücre yüzey antijeni bulundurduğu, hematopoetik kök hücre yüzey antijeni taşımadığı belirlendi.



Şekil 4. 51 Mezenkimal kök hücrelerin flow sitometrik olarak CD34 analizi

Hücre Döngüsü: Kültürde çoğalan hücrelerin bir kısmı ile de hücre döngüsü incelenmiş ve hücrelerin sonuçlarına bakıldığında ise % 42,27'sinin G0/G1 fazında olduğu, %4,6'sının S fazında olduğu, %9,39'unun ise G2 fazında olduğu tespit edildi (Şekil 4.6). Böylece %42,27 oran ile hücre miktarının bir bölümünün kültür şartlarında siklusunu tamamlamış ve yeni bir uyarı ile G1 faza girmek için bekleyen hücrelerden oluştuğunu görüldü. Böylece G1/G0 fazında bulunmayan % 57,73'lük orana sahip diğer

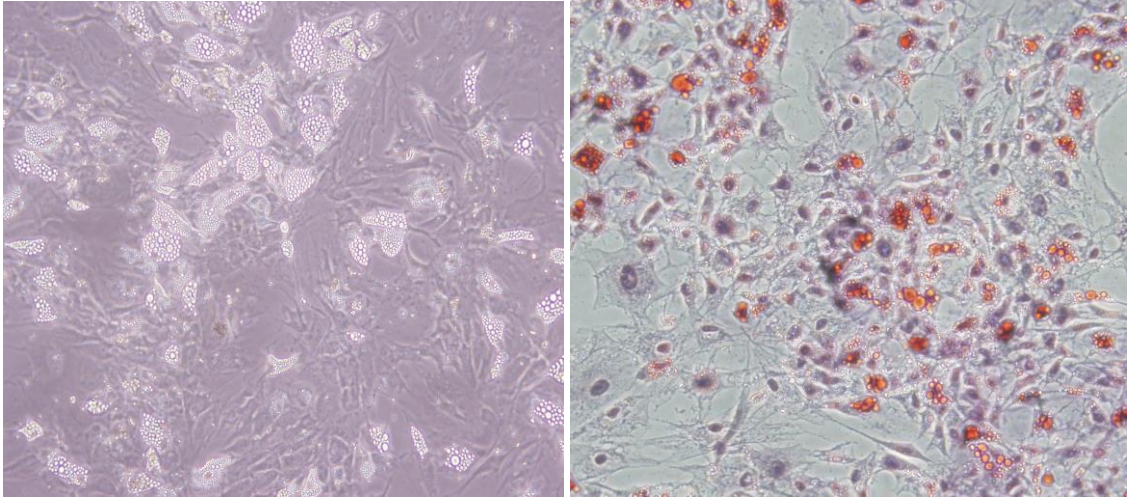
hücrelerin farklılaşmadan kendini yenileyen bir hücre grubu olduğu belirlendi. Böylece hücre kültür ortamında replikasyon yeteneği yüksek bir popülasyonun varlığını tespit edildi.



Şekil 4. 52 Yağ dokusu mezenkimal kök hücrelerinin hücre döngüsü analizi

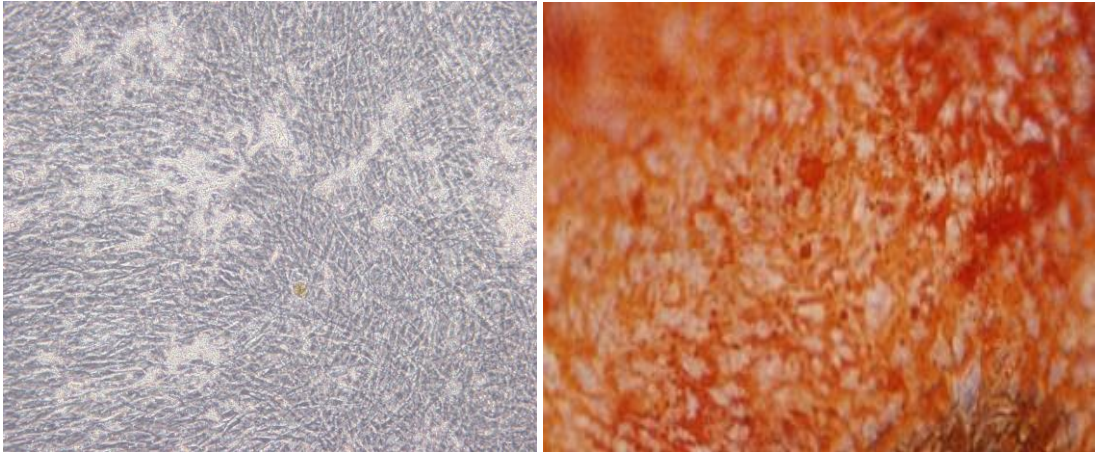
İmmunositokimyasal Karakterizasyon: Kültüre adapte olan ve flowsitometrik analizleri yapılan hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyelleri belirlendi.

Adipojenik farklılaştırma: Kültür ortamında bulunan hücreler beşinci pasajda (P:5) adipojenik farklılaştırma medyumuna ile 14 gün boyunca inkübe edildi. Hücre ortamının besiyeri 3 günde bir değiştirildi. İlk haftadan itibaren hücreler sitoplazmalarında lipid granülleri oluşturmaya başladılar. İnkübasyon sürecinin sonunda ise kültür ortamındaki hücrelerin çok büyük bir kısmı adipositlere özgü lipid granüllerince zengin bir hücre popülasyonuna erişti. Hücreler Oil Red O boyama ile boyanarak lipid granülleri spesifik olarak ayırt edilebilir hale getirildi. Şekil 4.7’de ADMK hücrelerin adipojenik farklılaşma süreci, Oil Red O boyama ve bu süreçte hücre ortamında adipositlere farklılaşan hücre miktarları görülmektedir.



Şekil 4. 53 Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin adipojenik farklılaşması ve Oil Red O boyama

Osteojenik farklılaştırma: Kriyobanktan çıkarılan ve kültüre adapte olan hücreler beşinci pasajda (P:5) osteojenik farklılaştırma medyumuna ile 24 gün boyunca inkübe edildi. Hücre ortamının besiyeri 3 günde bir değiştirildi. İnkübasyondaki hücrelerde ikinci haftadan itibaren hücre içi birikimler ile osteojenik değişiklikler gözlenmeye başlandı. İnkübasyon sürecinin sonunda kültür ortamındaki hücreler boyanarak kalsifikasyonlar gözlemlendi. Şekil 4.8’de ADMK hücrelerin osteojenik farklılaşma süreci ve Alizarin Red S boyama sonuçları görülmektedir.



Şekil 4. 54 Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması ve Alizarin Red S boyama

Kök hücre karakterizasyon çalışmalarının sonucunda kriyobanktan çıkarılan AD mezenkimal kök hücrelerinin biyolojik özelliklerini taşımaya devam ettikleri belirlendi. Böylece deneylerde kullanılmak üzere kültür çalışmalarına devam edildi.

4.1.2.5 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kriyoprezervasyonu

Kriyobanktan çıkarılan, kültüre adaptasyonu sağlanan ve karakterizasyon çalışmaları yapılan ADMK hücre gruplarının %20 DMSO içeren FBS ile hazırlanmış kriyoprotektan ile 1:1 oranında kademeli soğutma yöntemi ile kriyoprezervasyonu yapılarak yeniden donduruldu. Bu işlem için öncelikle hücreler flask tabanından kaldırıldı ve besi ortamından arındırıldı. Yıkanan hücreler 1×10^6 /mL olacak şekilde kriyoprotektan ile damla damla karıştırıldı ve kriyotüp içerisine alındı. Hücreler 2 saat buzdolabı şartlarında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 2 saat dondurucu şartlarında -20°C 'de ve bir gece derin dondurucu şartlarında -40°C 'de bekletilerek sıvı azot tankına (-186°C 'deki kriyobanka) yerleştirildi. Kriyobanka yerleştirilen hücreler ihtiyaç olunan durumlarda çözündürülerek tekrar kültür ortamına aktarıldı.

4.2 Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

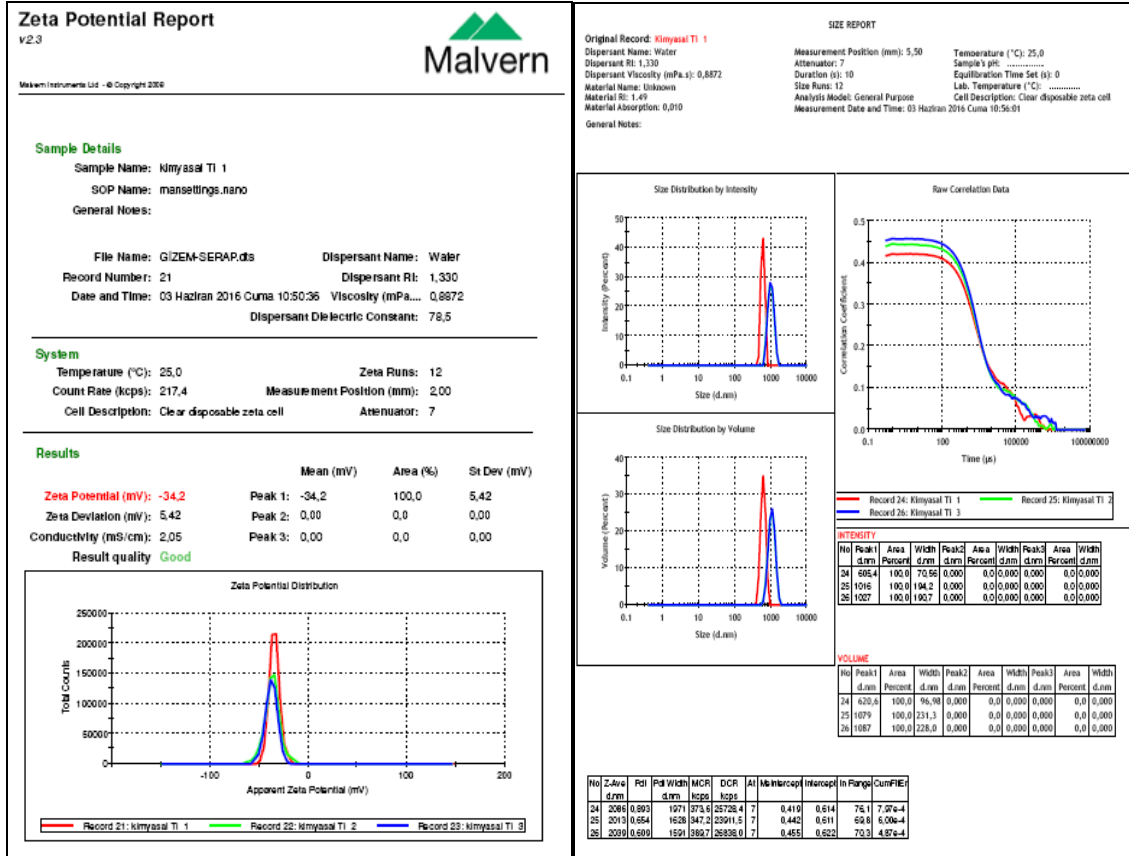
Tez çalışmasında titanyumdioksit (TiO_2), gümüş (Ag) ve titanyum ile gümüş karışımı olan titanyumgümüş kompozitinin ($\text{TiO}_2@\text{Ag}$) nanopartikülleri kullanıldı. Nanopartiküller sentezlenme şekillerine göre iki gruba ayrılmaktadır. İlk grup nanopartikül Yıldız Teknik Üniversitesi Malzeme Mühendisliği Laboratuvarı'nda sentezlenen kimyasal nanopartiküllerdir. Diğer bir grup olan biyojenik olarak sentezlenmiş biyojenik nanopartiküller de YTÜ Biyomühendislik Bölümü Doku Mühendisliği ve Hücre Kültür Laboratuvarı'nda biyojenik olarak bitkisel proses (fitosentez) ile elde edilen nanopartiküllerdir. Üç farklı nanopartikül iki farklı yöntem ile elde edildikten sonra altı farklı numune de yüzey yükü ölçümü ve partikül taraması yapılarak karakterize edildi.

4.2.1 Kimyasal TiO_2 Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

4.2.1.1 Kimyasal TiO_2 Nanopartiküllerinin Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Ölçümleri

Kimyasal yöntem ile sentez sonrasında steril distile su içerisinde homojen karışımı elde edilen TiO_2 nanopartikülleri Zeta sizer ile parçacık dağılımı ve parçacık boyutu için analiz edildi. Elde edilen verilere göre malzemenin zeta potansiyeli $-34,2$ mV olan

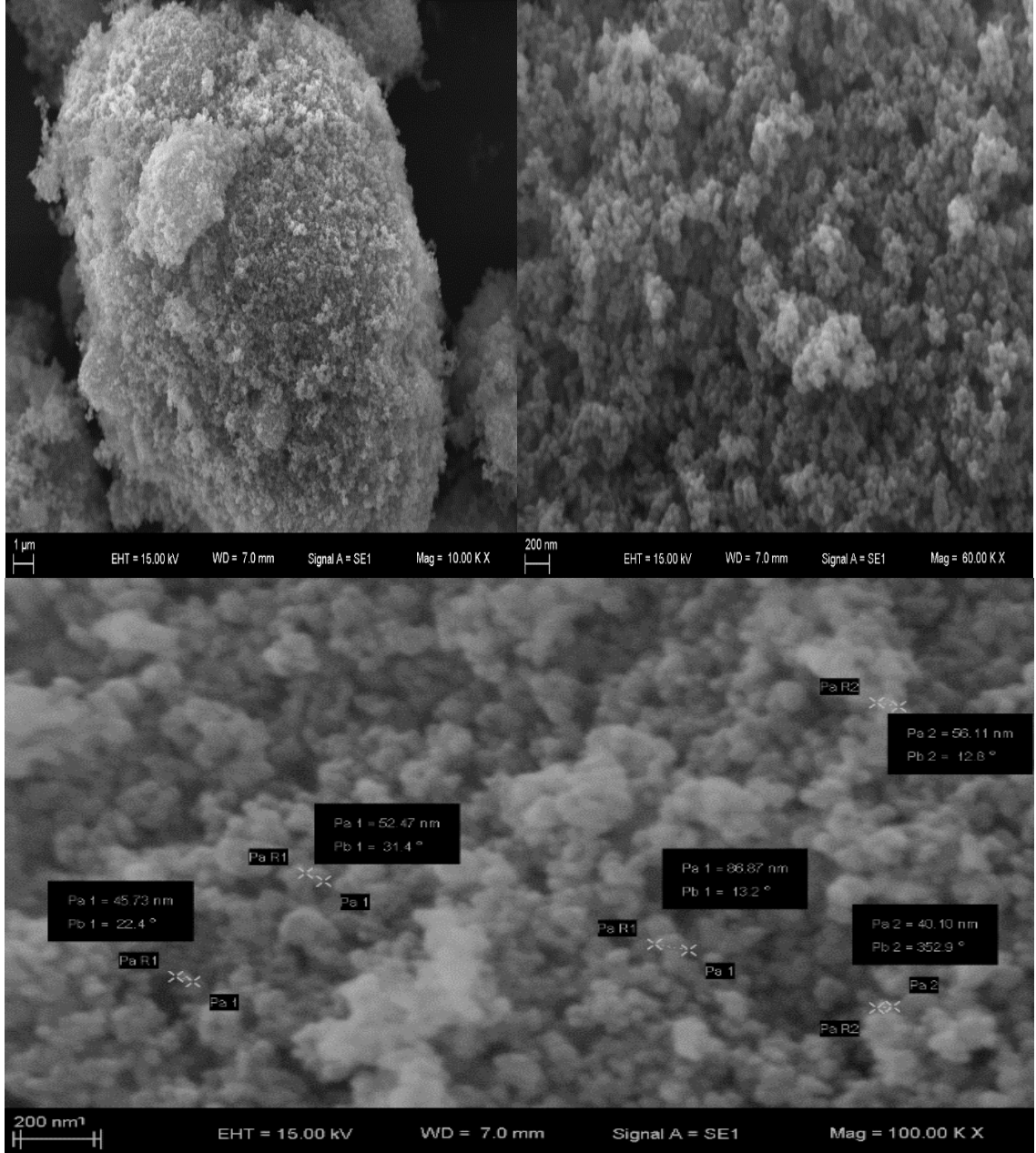
negatif yüzey yüküne sahip bu partikülün ortalama boyutu 130 nm'dir. Şekil 4.6'da Zeta sizer sonuçları yer almaktadır. Ölçümler 3 kere tekrarlanmış olup her bir tekrar farklı renkteki pik ile Şekil 4.9'da görülmektedir. Malzemedeki nanotozların boyutları birbirinden farklılık gösterip elde edilen sonuçlar spektrum neticesindeki ortalama değeri 100 nm'dir.



Şekil 4. 55 Kimyasal TiO₂ nanopartikülünün zeta verilerine göre partikül yükü ve boyutu

4.2.1.2 Kimyasal TiO₂ Nanopartiküllerinin SEM Analizi

Kimyasal yöntem ile sentezlenen TiO₂ nanotozları altın-palladyum kaplama ile kaplandı ve düşük voltajda SEM analizi gerçekleştirildi. SEM analizine göre de nanopartikül boyutları 40 nm - 86 nm arasında ölçüldü. Ölçümleri alınan nanopartiküllerin 10.000X, 60.000X ve 150.000X büyütme ile tane ve agregat şeklindeki görüntüleri elde edildi (Şekil 4.10).



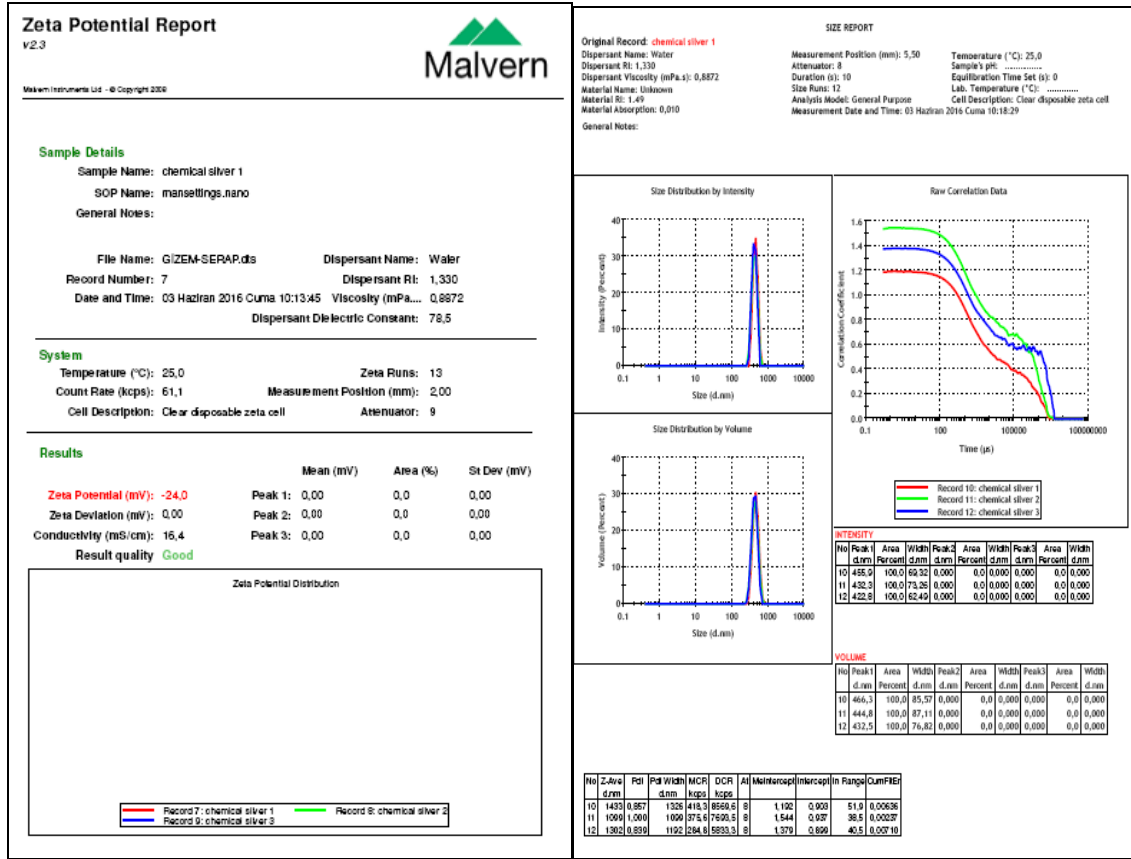
Şekil 4. 56 Kimyasal TiO_2 nanopartikülünün SEM Görüntüleri (A) 10.000X, (B) 60.000X, (C) 100.000X

4.2.2 Kimyasal Ag Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

4.2.2.1 Kimyasal Ag Nanopartiküllerinin Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Ölçümleri

Kimyasal yöntem ile sentez sonrasında steril distile su içerisinde homojen karışımı elde edilen Ag nanopartikülleri Zeta sizer ile parçacık dağılımı ve parçacık boyutu için analiz

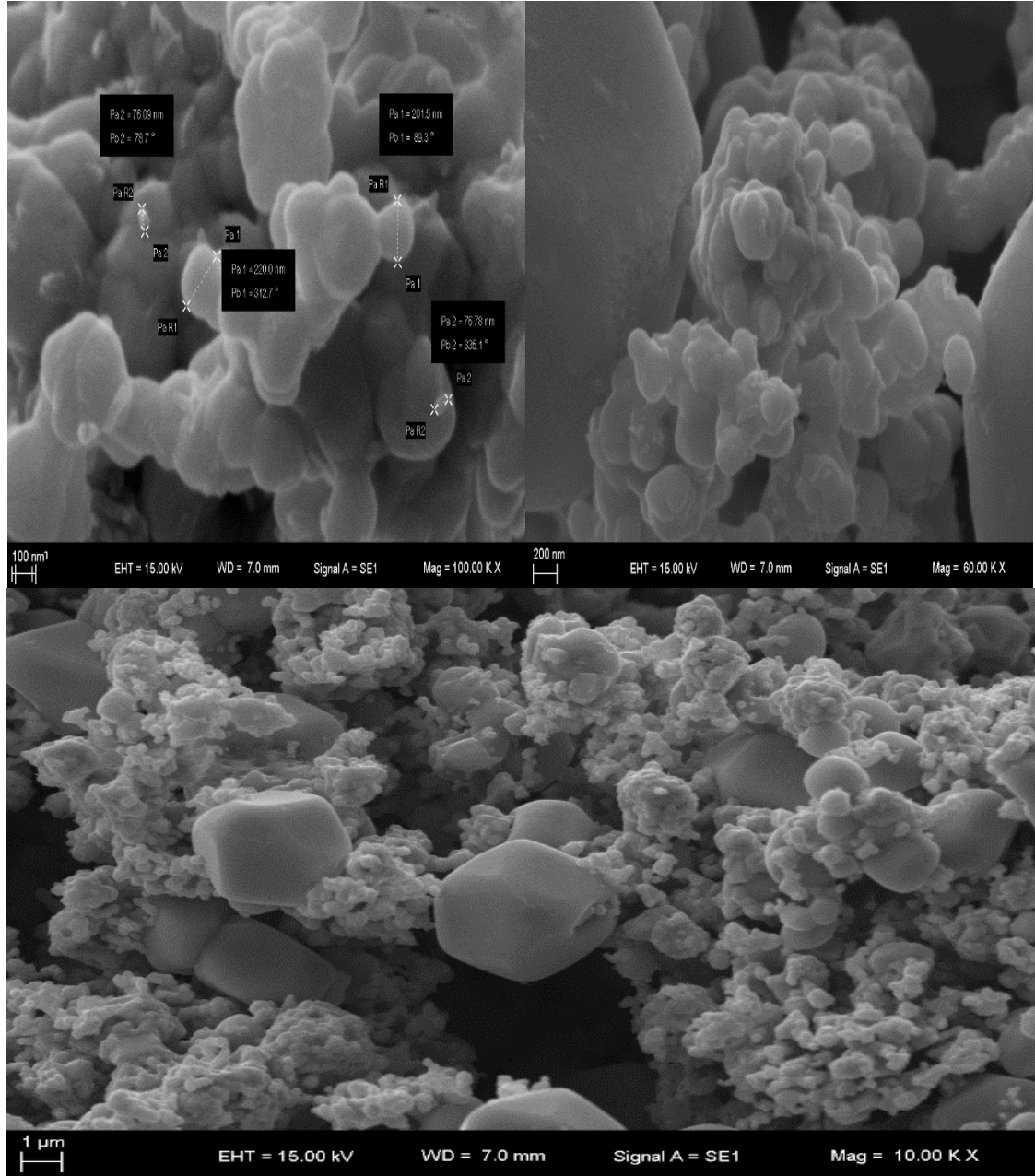
edildi. Elde edilen verilere göre malzemenin zeta potansiyeli -24 mV olan negatif yüze yüküne sahiptir. Şekil 4.8’de Zeta sizer sonuçları yer almaktadır. Ölçümler 3 kere tekrarlanmış olup her bir tekrar farklı renkteki pik ile Şekil 4.11’de görülmektedir. Malzemedeki nanotozların boyutları birbirinden farklılık göstermektedir. Elde edilen sonuçlar spektrum neticesindeki ortalama değeri olup 40 nm – 100 nm aralığındadır.



Şekil 4. 57 Kimyasal TiO₂ nanopartikülünün zeta verilerine göre partikül yükü ve boyutu

4.2.2.2 Kimyasal Ag Nanopartiküllerinin SEM Analizi

Kimyasal yöntem ile sentezlenen Ag nanotozları altın-palladyum kaplama ile kaplandı ve düşük voltajda SEM analizi gerçekleştirildi. SEM analizine göre de nanopartikül boyutları 76 nm - 200 nm arasında ölçüldü. Ölçümleri alınan nanopartiküllerin 10.000X, 60.000X ve 150.000X büyütme ile tane ve agregat şeklindeki görüntüleri elde edildi (Şekil 4.12).



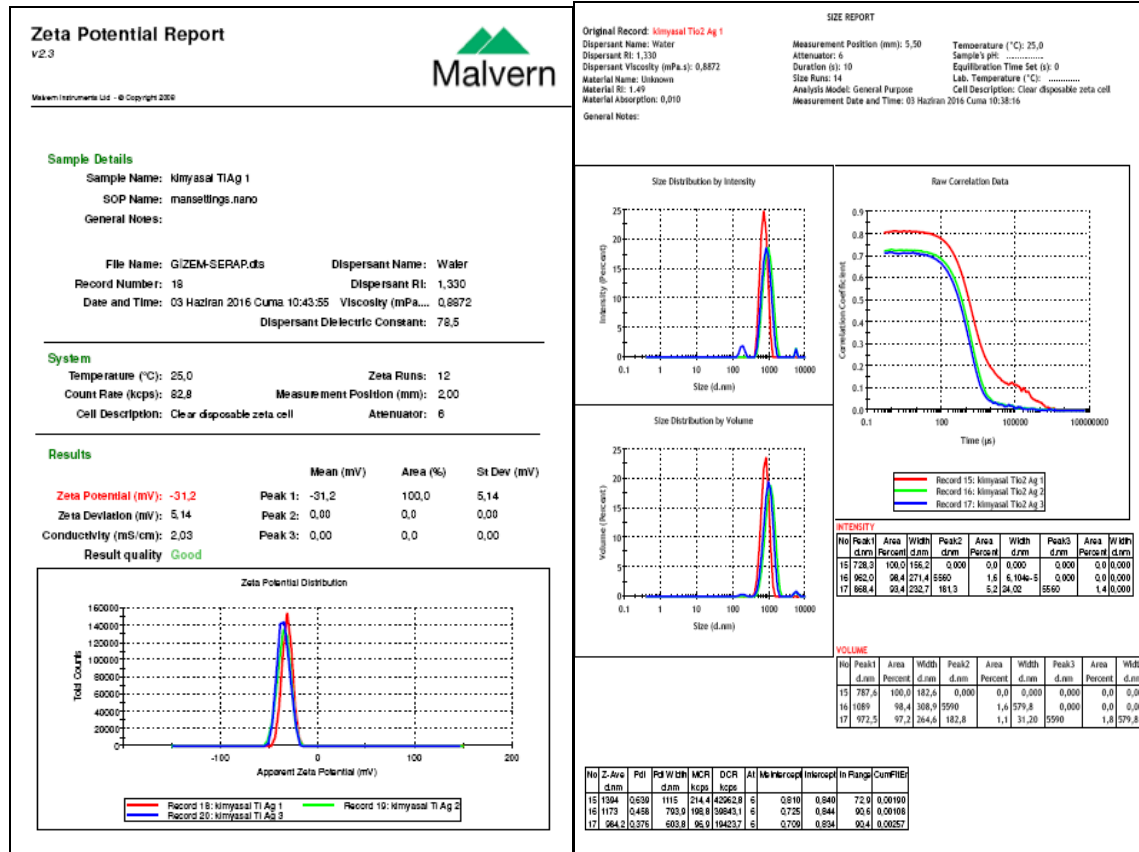
Şekil 4. 58 Kimyasal Ag nanopartikülünün SEM Görüntüleri (A) 10.000X, (B) 60.000X, (C) 100.000X

4.2.3 Kimyasal TiO₂@Ag Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

4.2.3.1 Kimyasal TiO₂@Ag Nanopartiküllerinin Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Ölçümleri

Kimyasal yöntem ile sentez sonrasında steril distile su içerisinde süspanse edilen TiO₂@Ag nanopartikülleri Zeta sizer ile parçacık dağılımı ve parçacık boyutu için analiz edildi. Elde edilen verilere göre malzemenin zeta potansiyeli -31,2 mV olan negatif

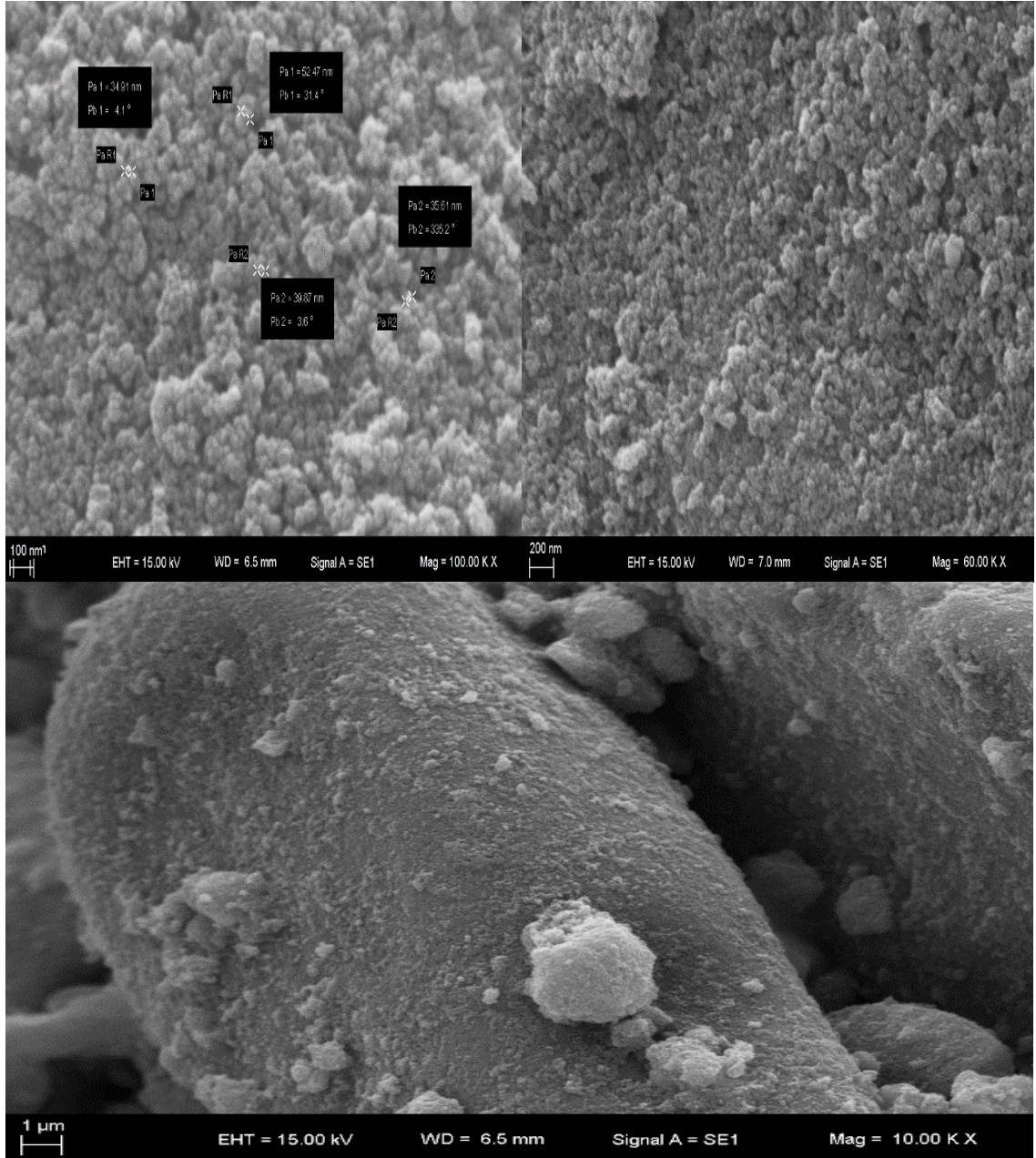
yüzey yüküne sahiptir. Şekil 4.15'te Zeta sizer sonuçları yer almaktadır. Ölçümler 3 kere tekrarlanmış olup her bir tekrar farklı renkteki pik ile Şekil 4.13'te görülmektedir. Malzemedeki nanotozların boyutları birbirinden farklılık gösterip elde edilen sonuçlar spektrum neticesindeki ortalama değeri 100 nm'dir.



Şekil 4. 59 Kimyasal TiO₂@Ag nanopartikülünün zeta verilerine göre partikül yükü ve boyutu

4.2.3.2 Kimyasal TiO₂@Ag Nanopartiküllerinin SEM Analizi

Kimyasal yöntem ile sentezlenen TiO₂@Ag nanotozları altın-palladyum kaplama ile kaplandı ve düşük voltajda SEM analizi gerçekleştirildi. SEM analizine göre de nanopartikül boyutları 35 nm - 65 nm arasında ölçüldü. Ölçümleri alınan nanopartiküllerin 10.000X, 60.000X ve 150.000X büyütme ile tane ve agregat şeklindeki görüntüleri elde edildi (Şekil 4.14).



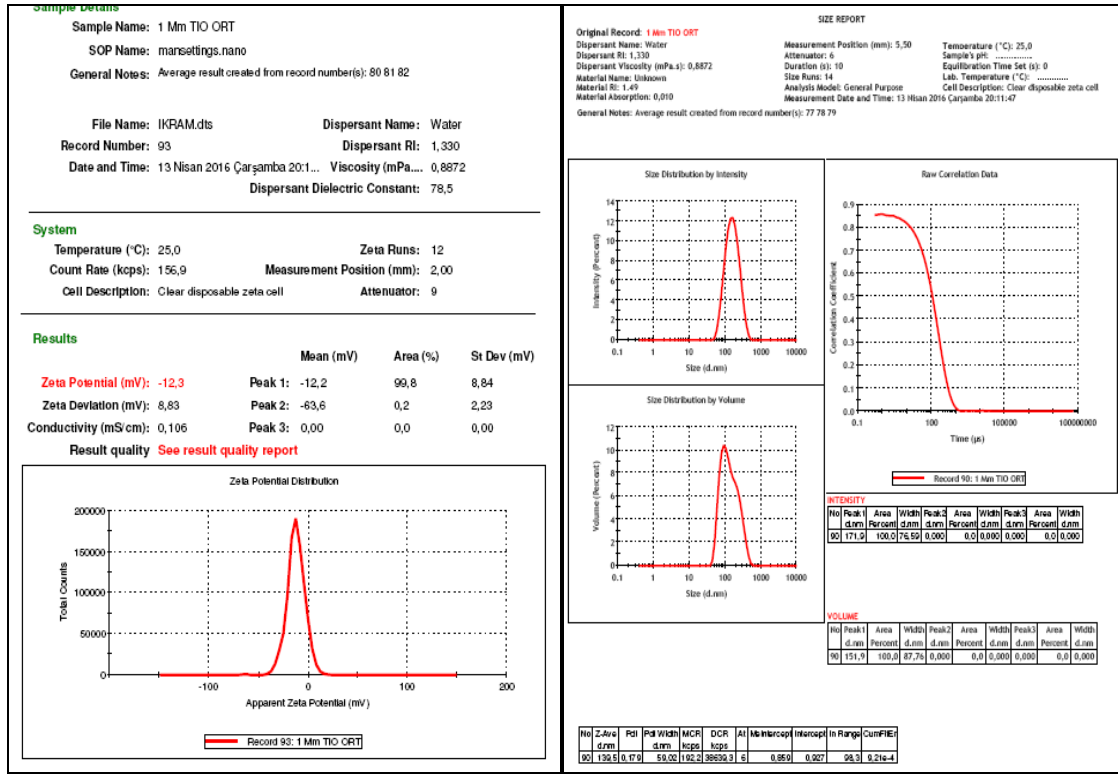
Şekil 4. 60 Kimyasal $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ nanopartikülünün SEM Görüntüleri (A) 10.000X, (B) 60.000X, (C) 100.000X

4.2.4 Biyojenik TiO_2 Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

4.2.4.1 Biyojenik TiO_2 Nanopartiküllerin Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Ölçümleri

Yeşil yöntem ile sentez sonrasında steril distile su içerisinde homojen karışımı elde edilen TiO_2 nanopartikülleri Zeta Sizer ile parçacık dağılımı ve parçacık boyutu için analiz edildi. Elde edilen verilere göre malzemenin zeta potansiyeli -12,3 mV olan

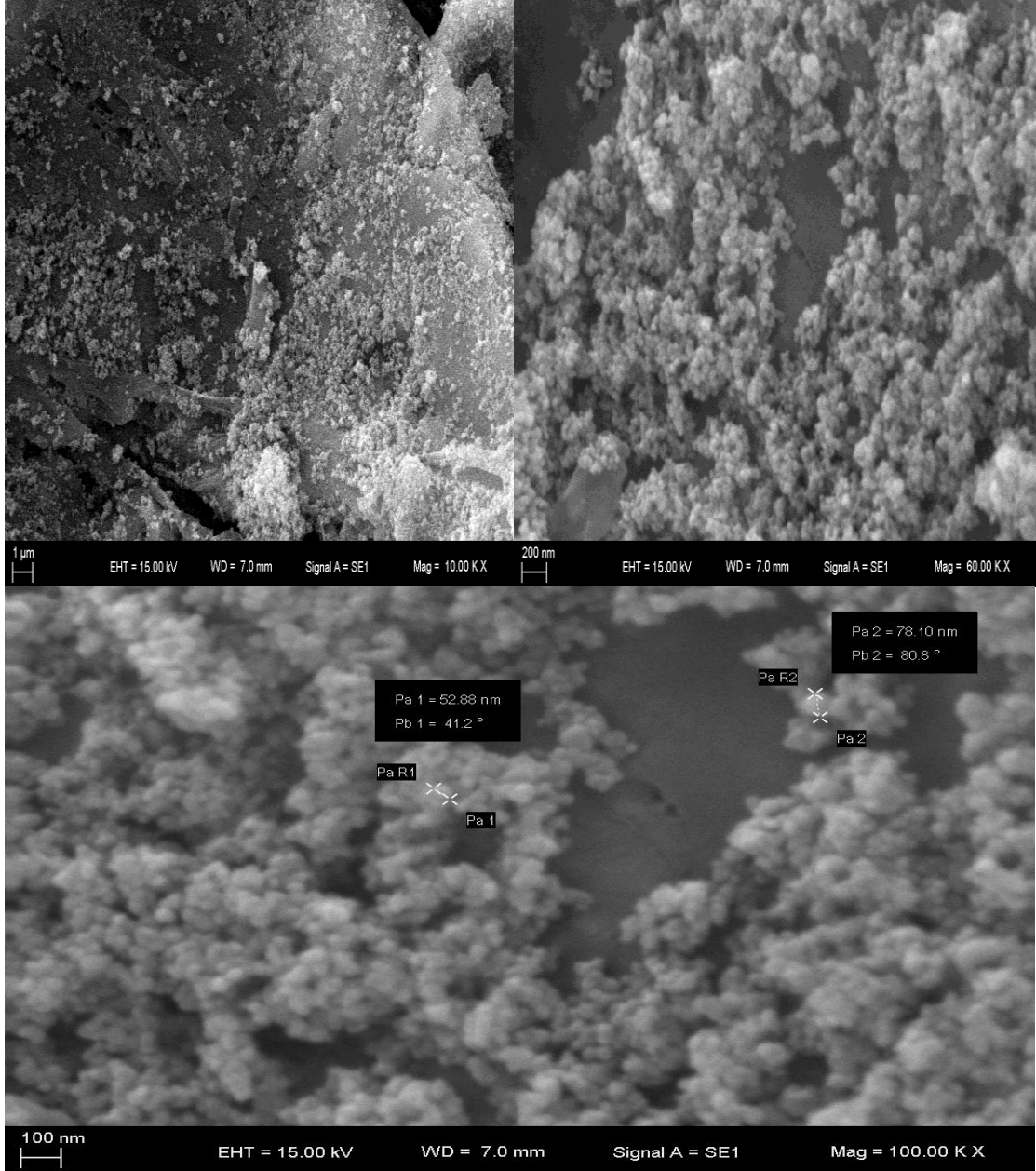
negatif yüzey yüküne sahiptir. Şekil 4.15'te Zeta Sizer sonuçları yer almaktadır. Ölçümler 3 kere tekrarlanmış olup şekilde ortalama değer için pik alınmıştır. Malzemedeki nanotozların boyutları birbirinden farklılık gösterip elde edilen sonuçlar spektrum neticesindeki ortalama değer 65 nm'dir.



Şekil 4. 61 Biyojenik TiO₂ nanopartikülünün zeta verilerine göre partikül yükü ve boyutu

4.2.4.2 Biyojenik TiO₂ Nanopartiküllerinin SEM Analizi

Biyojenik yöntem ile sentezlenen sıvı haldeki TiO₂ çözeltisi liyofilize edildi. Elde edilen nanotozlar altın-palladyum kaplama ile kaplandı ve düşük voltajda SEM analizi gerçekleştirildi. SEM analizine göre de nanopartikül boyutları 52 nm - 78 nm arasında ölçüldü. Ölçümleri alınan nanopartiküllerin 10.000X, 60.000X ve 150.000X büyütme ile tane ve agregat şeklindeki görüntüleri elde edildi (Şekil 4.16).



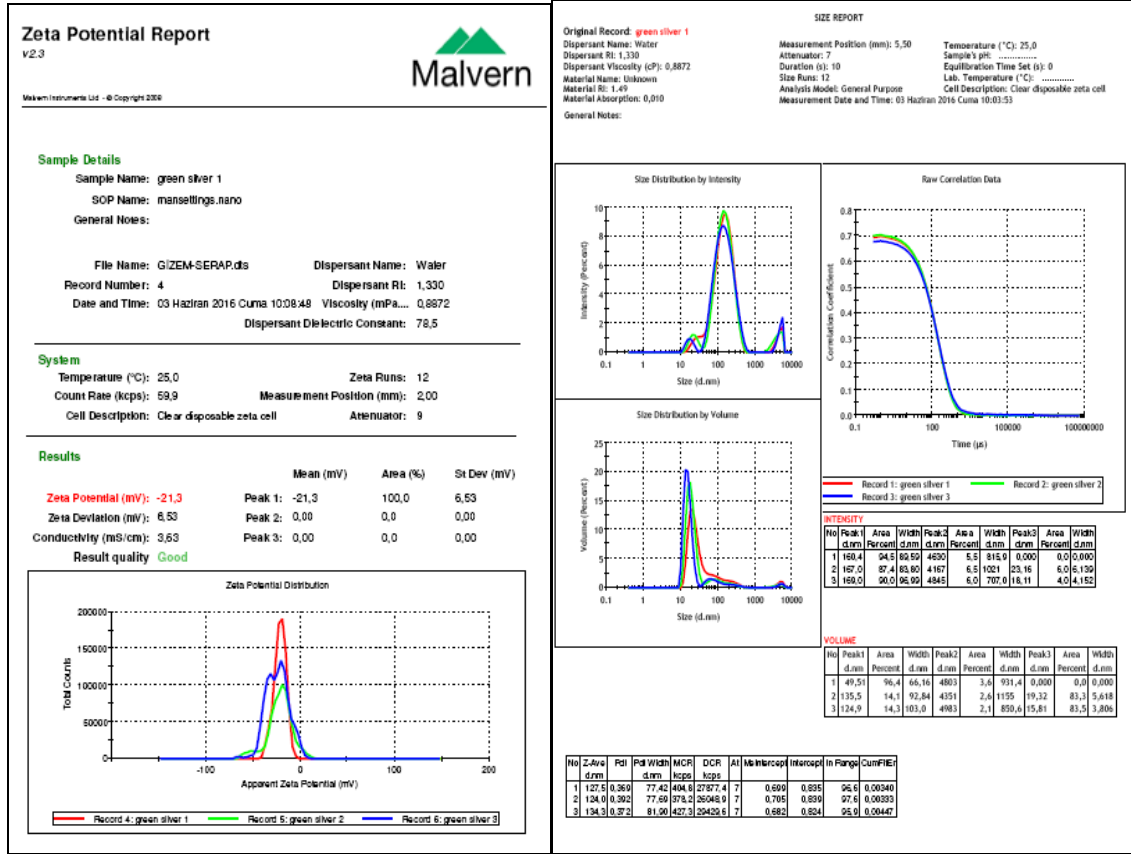
Şekil 4. 62 Biyojenik TiO₂ nanopartikülünün SEM Görüntüleri (A) 10.000X, (B) 60.000X, (C) 100.000X

4.2.5 Biyojenik Ag Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

4.2.5.1 Biyojenik Ag Nanopartiküllerinin Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Ölçümleri

Biyojenik yöntem ile sentez sonrasında steril distile su içerisinde homojen karışımı elde edilen Ag nanopartikülleri Zeta Sizer ile parçacık dağılımı ve parçacık boyutu için analiz edildi. Elde edilen verilere göre malzemenin zeta potansiyeli -21,3 mV olan negatif

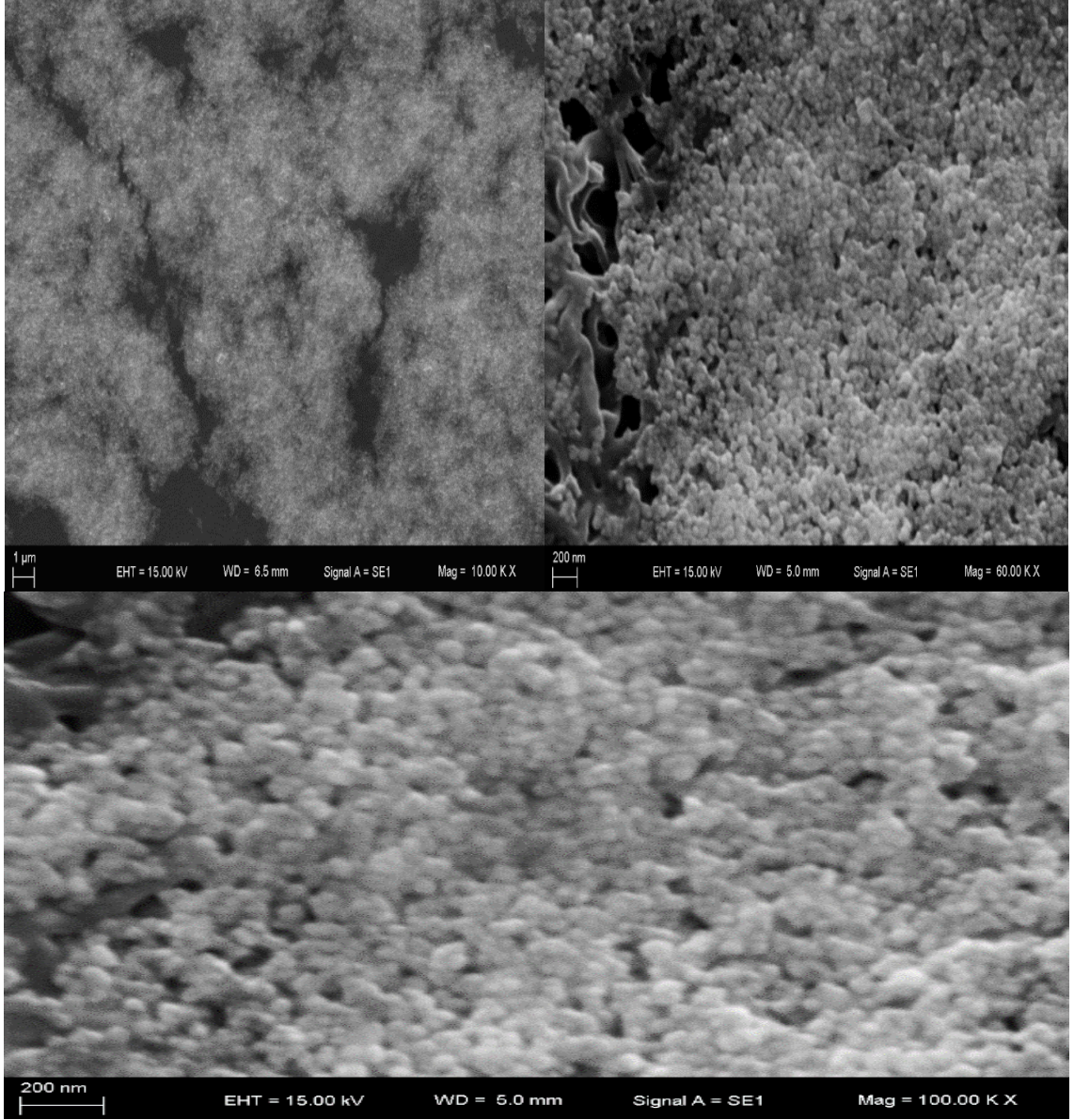
yüzey yüküne sahiptir. Şekil 4.7’de Zeta Sizer sonuçları yer almaktadır. Ölçümler 3 kere tekrarlanmış olup her bir tekrar farklı renkteki pik ile Şekil 4.14’te görülmektedir. Malzemedeki nanotozların boyutları birbirinden farklılık gösterip elde edilen sonuçlar spektrum neticesindeki ortalama değer 77 nm - 81 nm aralığındadır.



Şekil 4. 63 Biyojenik Ag nanopartikülünün zeta verilerine göre partikül yükü ve boyutu

4.2.5.2 Biyojenik Ag Nanopartiküllerinin SEM Analizi

Biyojenik yöntem ile sentezlenen sıvı haldeki Ag çözeltisi liyofilize edildi. Elde edilen nanotozlar altın-palladyum kaplama ile kaplandı ve düşük voltajda SEM analizi gerçekleştirildi. SEM analizine göre de nanopartikül boyutları 35 nm - 50 nm arasında ölçüldü. Ölçümleri alınan nanopartiküllerin 10.000X, 60.000X ve 150.000X büyütme ile tane ve agregat şeklindeki görüntüleri elde edildi (Şekil 4.18).



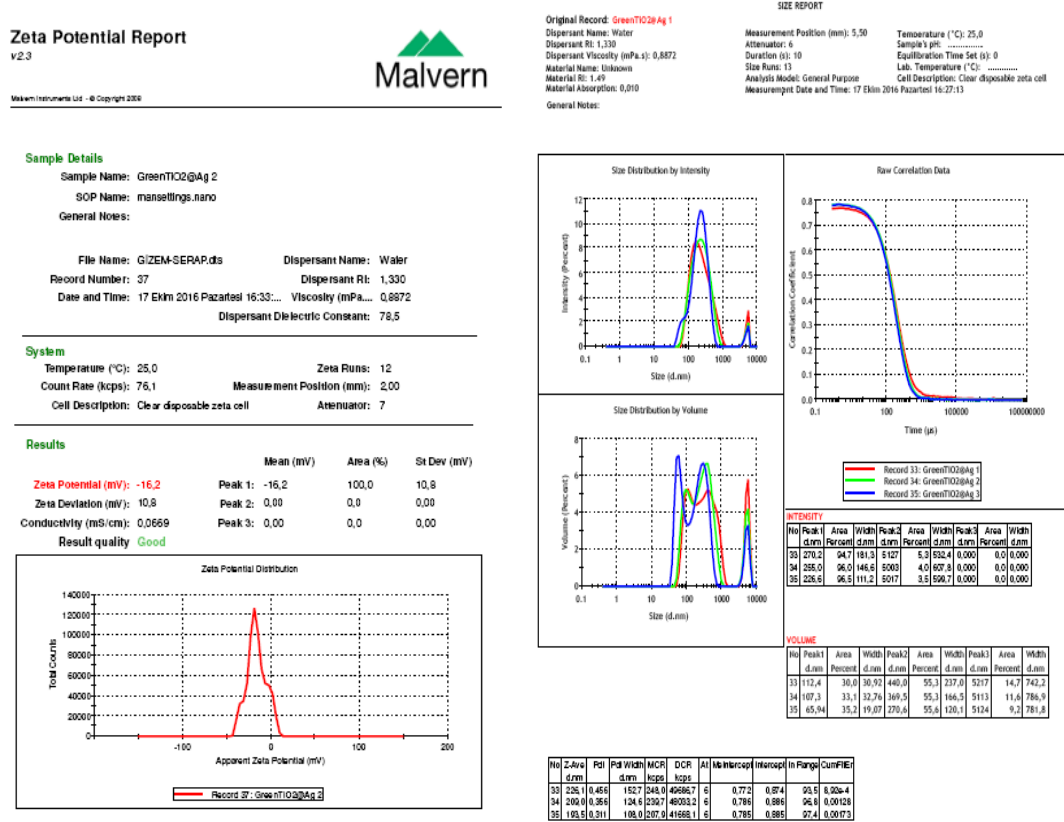
Şekil 4. 64 Biyojenik Ag nanopartikülünün SEM Görüntüleri (A) 10.000X, (B) 60.000X, (C) 100.000X

4.2.6 Biyojenik TiO₂Ag Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

4.2.6.1 Biyojenik TiO₂@Ag Nanopartiküllerinin Zeta Sizer Sonuçları

Yeşil yöntem ile sentez sonrasında steril distile su içerisinde süspanse edilen TiO₂@Ag nanopartikülleri Zeta sizer ile parçacık dağılımı ve parçacık boyutu için analiz edildi. Elde edilen verilere göre malzemenin zeta potansiyeli -16,2 mV olan negatif yüzey yüküne sahiptir. Şekil 4.16'da Zeta sizer sonuçları yer almaktadır. Ölçümler 3 kere tekrarlanmış olup her bir tekrar farklı renkteki pik ile Şekil 4.16(A)'da görülmektedir.

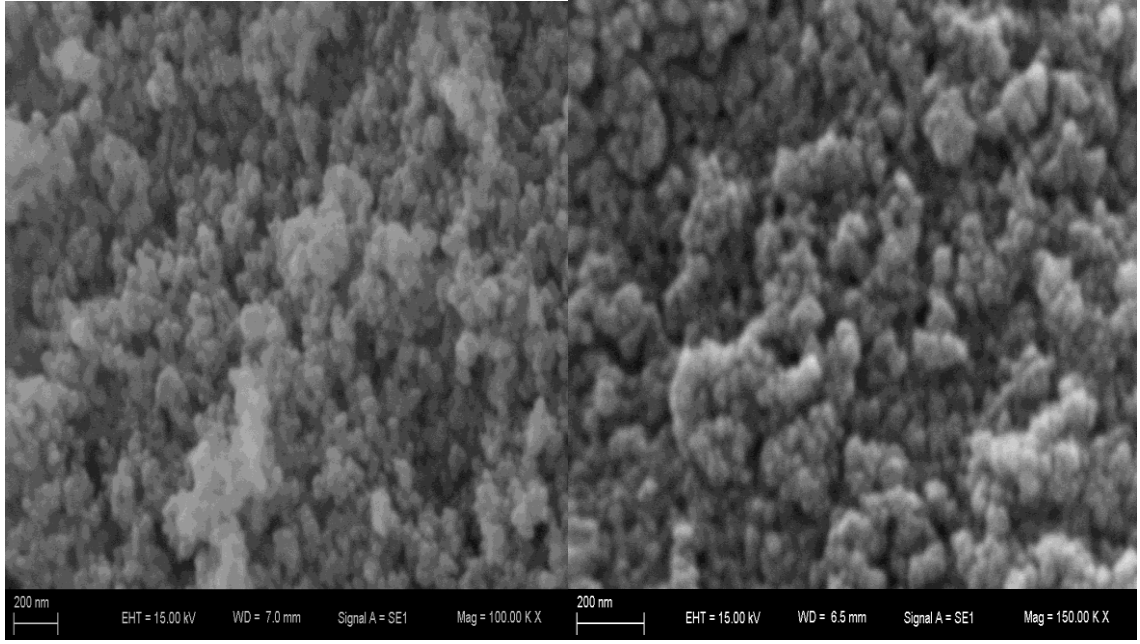
Ölçümlerden alınan ortalama değer de tek pik halinde Şekil 4.19(B)'de gösterilmektedir. Malzemedeki nanotozların boyutları birbirinden farklılık göstermektedir. Elde edilen sonuçlar spektrum neticesindeki ortalama değer olup 95 nm - 103 nm'dir.



Şekil 4. 65 Biyojenik TiO₂@Ag nanopartikülünün zeta verilerine göre partikül yükü ve boyutu

4.2.6.2 Biyojenik TiO₂@Ag Nanopartiküllerinin SEM Analizi

Yeşil yöntem ile sentezlenen TiO₂@Ag nanotozları altın-palladyum kaplama ile kaplandı ve düşük voltajda SEM analizi gerçekleştirildi. SEM analizine göre de nanopartikül boyutları 50-100 nm arasında ölçüldü. Ölçümleri alınan nanopartiküllerin 100.000X, ve 150.000X büyütme ile tane ve agregat şeklindeki görüntüleri elde edildi (Şekil 4.20).



Şekil 4. 66 Biyojenik TiO₂@Ag nanopartikülünün SEM Görüntüleri (A) 100.000X, (B) 150.000X

4.3 Nanopartiküllerin Hücre Kültürü Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

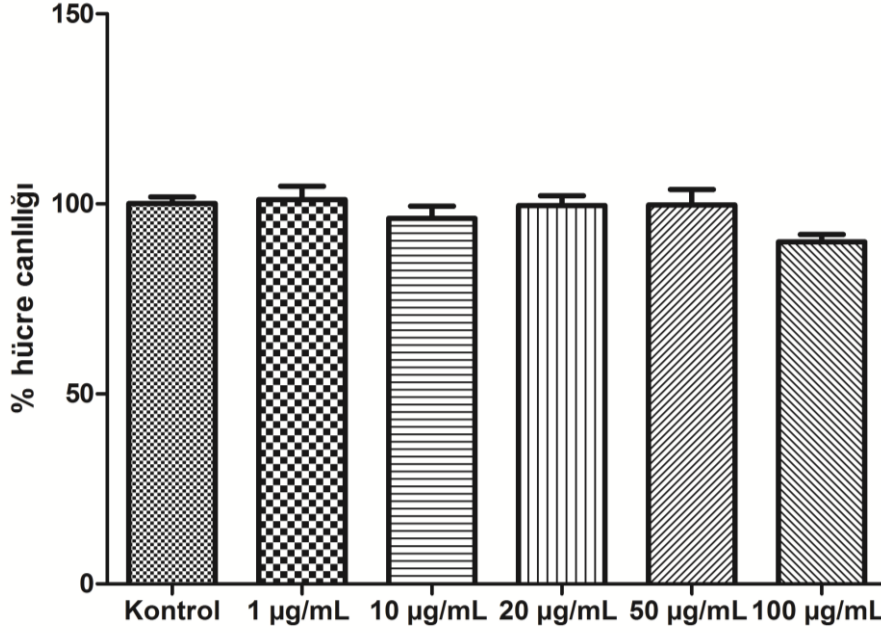
Bölüm 3.2.4.2’de belirtildiği gibi 3 farklı nanopartikülün kimyasal ve yeşil yöntem ile hazırlanan 6 farklı nanopartikül türü 5 farklı konsantrasyonda (1µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL, 50µg/mL ve 100µg/mL) hazırlandı. Her bir konsantrasyondaki nanopartiküller üç farklı hücre hattı (L929, J774 ve ADMKH) üzerine eklendi ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda Bölüm 3.2.4.3.2’de anlatılan MTT Yöntemi ile nanopartiküllerin hücre proliferasyonları üzerindeki etkileri spektrofotometrik olarak incelendi.

4.3.1 TiO₂ Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

Kimyasal yöntem ile sentezlenmiş TiO₂ NP’nün Zeta ve SEM analizleri sonucunda -21,3 nm yüzey yüküne sahip 40 nm - 86 nm boyut aralığında olduğu ve yeşil yöntem ile sentezlenmiş TiO₂ NP’nün Zeta ve SEM analizleri sonucunda -12,3 mV yüzey yüküne sahip 52 nm -78 nm boyut aralığında partiküllere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu verilere göre de aşağıda TiO₂ NP’nün hücre hatları üzerindeki etkileri görülmektedir.

4.3.1.1 Kimyasal TiO₂ Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

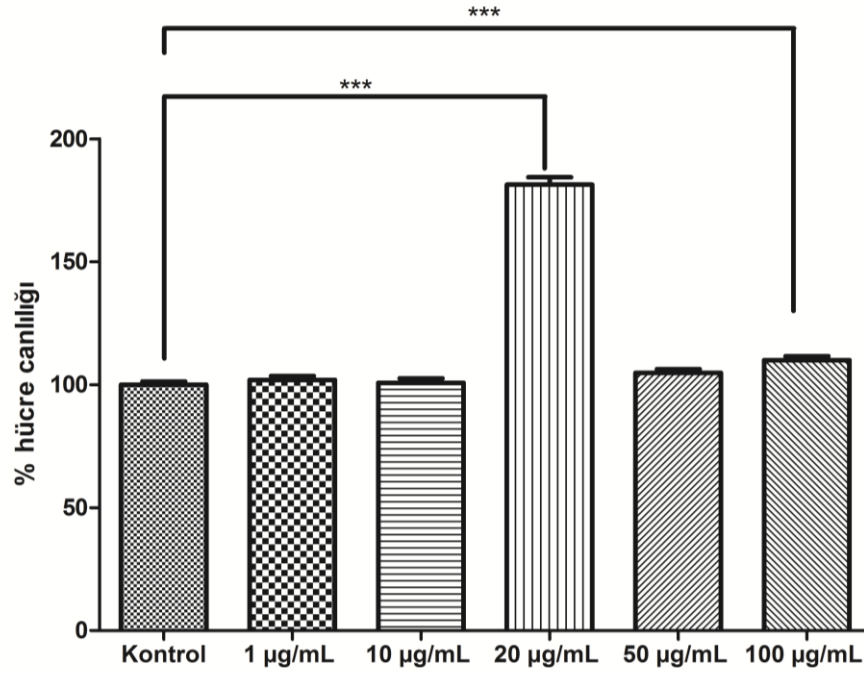
Kimyasal yöntem ile elde edilmiş TiO₂ NP L929 hücre hattı üzerinde hücre proliferasyonuna ciddi bir etkisi görülmemiştir. Artan NP konsantrasyonu ile birlikte hücre proliferasyonunun kontrol grubundan farklı belirtiler göstermediği saptanmıştır (Şekil 4.21).



Şekil 4. 67 Kimyasal TiO₂ nanopartikülünün L929 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi

4.3.1.2 Biyojenik TiO₂ Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

Biyojenik yöntem ile sentezlenmiş TiO₂ NP L929 hücre hattı üzerinde düşük (1µg/mL ve 10 µg/mL) konsantrasyonlar ile yüksek (50 µg/mL ve 100 µg/mL) konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunda farklılıklar saptanmazken 20 µg/mL konsantrasyonda hücre proliferasyonunun büyük oranda arttığı görülmektedir (Şekil 4.22).

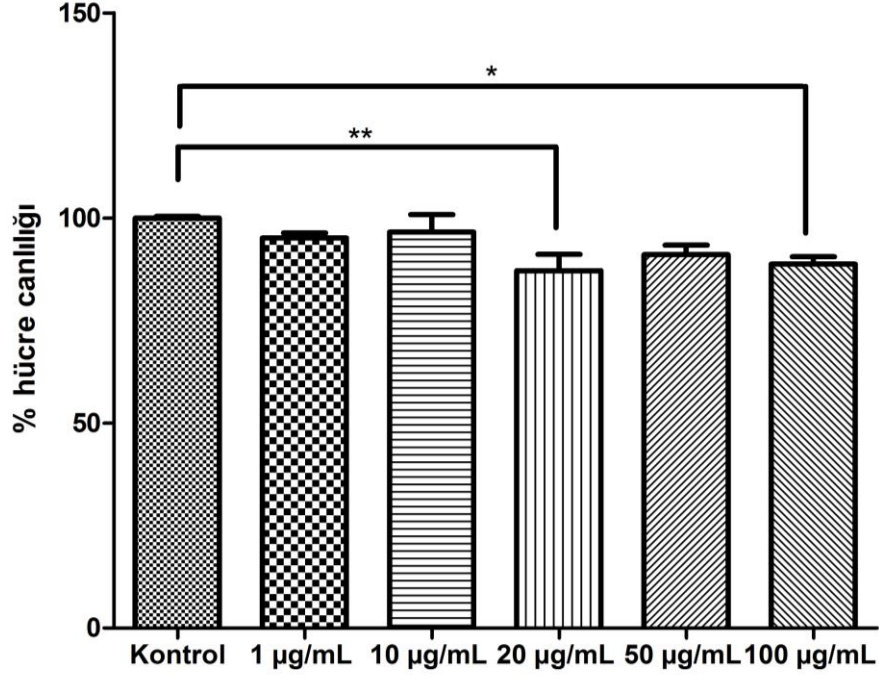


Şekil 4. 68 Biyojenik TiO₂ nanopartikülünün L929 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi

4.3.2 TiO₂ Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

4.3.2.1 Kimyasal TiO₂ Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

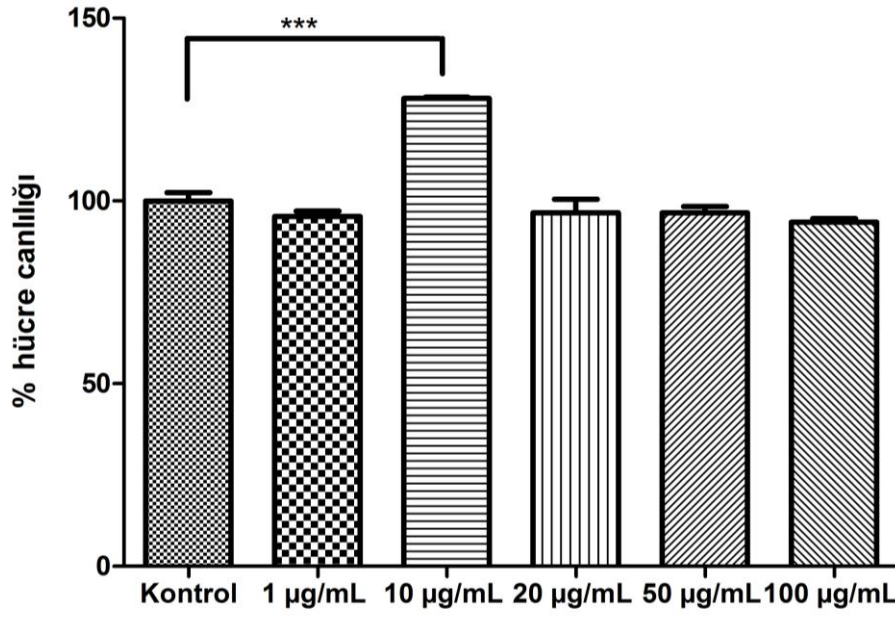
Kimyasal yöntem ile sentezlenmiş TiO₂ NP J774 hücre hattı üzerindeki etkisine bakıldığında artan nanopartikül konsantrasyonları ile birlikte farklı proliferatif etkilerin meydana geldiği görülmektedir. Proliferasyonu en fazla inhibe eden konsantrasyon Şekil 4.23'te görüleceği üzere 20 µg/mL'dir.



Şekil 4. 69 Kimyasal TiO₂ nanopartikülünün J774 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi

4.3.2.2 Biyojenik TiO₂ Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

Biyojenik yöntem ile sentezlenmiş TiO₂ NP J774 hücre hattı üzerindeki etkisine bakıldığında 10 µg/mL konsantrasyonu ile hücre canlılığını artırdığını gözlemlerken diğer konsantrasyonlar kontrol grubu ile benzer canlılık oranına sahip olmaktadır (Şekil 4.24). Yüksek konsantrasyonlarda bir miktar inhibisyon göze çarpmaktadır.



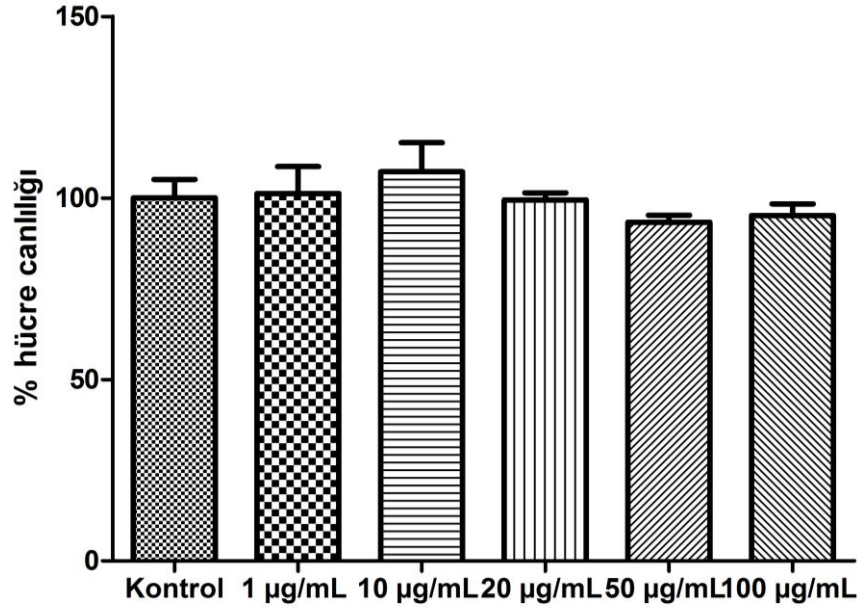
Şekil 4. 70 Biyogenik TiO₂ nanopartikülünün J774 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi

Yüzey yükü (-34,2 mV) ve boyut 40-86nm olan kimyasal TiO₂ ile yüzey yükü (-12,3 mV) ve boyut 52 nm - 78 nm olan biyogenik TiO₂ nanopartikülünün L929 ve J774 hücre hatları üzerindeki etkileri incelendiğinde mevcut konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu inhibe etmediği ve hücre canlılıklarının devam ettiği görülmektedir. biyogenik yöntem ile sentezlenen TiO₂ nanopartikülünün hücre canlılıklarını ise özellikle L929 için 20 µg/mL (%80), J774 için 10 µg/mL (%28) konsantrasyonlarda diğer konsantrasyonlardan farklı olarak belirgin bir şekilde artırdığı belirlendi.

4.3.3 TiO₂ Nanopartiküllerinin ADMKH Proliferasyonuna Etkisi

4.3.3.1 Kimyasal TiO₂ Nanopartiküllerinin ADMKH Proliferasyonuna Etkisi

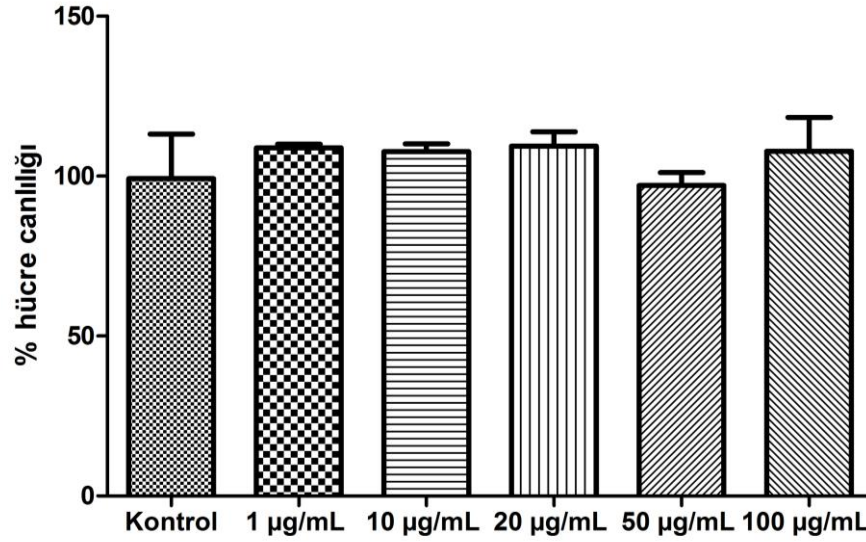
Mezenkimal kök hücreler üzerinde kimyasal TiO₂ nanopartikülünün proliferatif etkisine bakıldığında en fazla etki 10 µg/mL'lik konsantrasyonda olup artan konsantrasyonlarda bu etki azalmakta ve kontrol grubuna yaklaşmaktadır (Şekil 4.25).



Şekil 4. 71 Kimyasal TiO₂ nanopartikülünün ADMKH üzerindeki proliferasyonuna etkisi

4.3.3.2 Biyojenik TiO₂ Nanopartiküllerinin ADMKH Proliferasyonuna Etkisi

Biyojenik yöntem ile sentezlenmiş TiO₂ NP'nün mezenkimal kök hücrelerin canlılığına etkisine bakıldığında hemen hemen tüm konsantrasyonların hücre proliferasyonunu bir miktar artırıcı etki gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4. 72 Biyojenik TiO₂ nanopartikülünün ADMKH üzerindeki proliferasyonuna etkisi

Yüzey yükü (-34,2 mV) ve boyut 40 nm - 86 nm olan kimyasal TiO₂ ve Yüzey yükü (-12,3 mV) ve boyut 52 nm - 78 nm olan biyojenik TiO₂ nanopartikülünün ADMKH üzerindeki

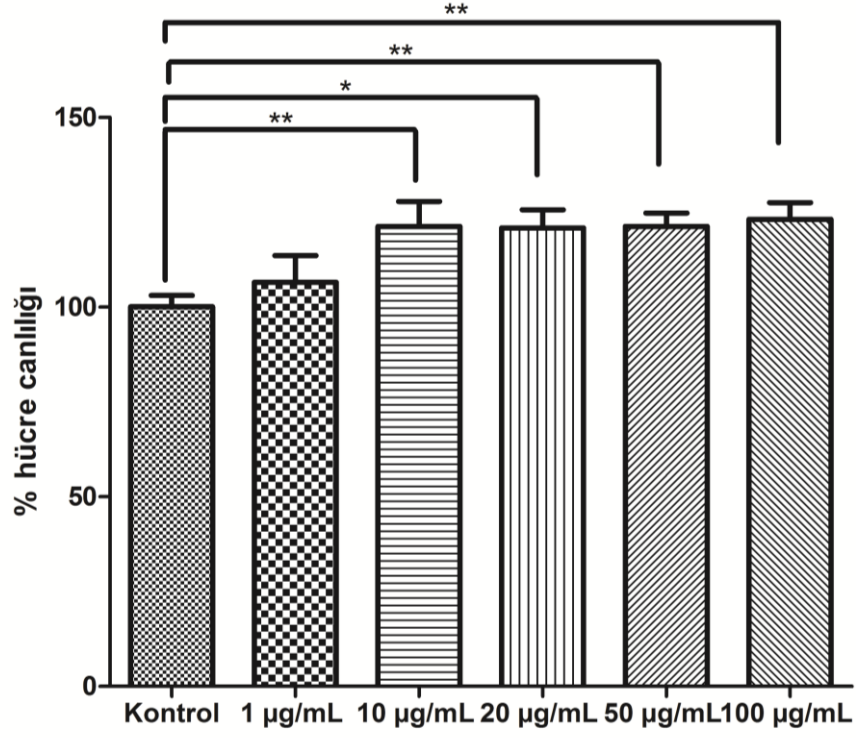
etkisi incelendiğinde kimyasal TiO₂ NP için yüksek konsantrasyonların hücre canlılığını inhibe etmeye başladığı, hücre canlılığını ise 72 saatlik inkubasyonunun sonucunda en fazla %7 oranla 10 µg/mL konsantrasyonda artırdığı belirlendi. Biyojenik TiO₂ NP ise tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığını artırırken (ortalama %8-9 artış) 50 µg/mL konsantrasyonda %3 oranında düşüş tespit edildi (Şekil 4.26). Genel olarak TiO₂ nanopartikülünün hücreler üzerinde belirlenen boyut ve konsantrasyonlarda toksik etkisinin bulunmadığı görüldü.

4.3.4 Ag Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

Kimyasal yöntem ile sentezlenmiş Ag NP'nün Zeta ve SEM analizleri sonucunda -24 mV yüzey yüküne sahip 76 nm - 200 nm boyut aralığında olduğu ve yeşil yöntem ile sentezlenmiş Ag NP'nün Zeta ve SEM analizleri sonucunda -21,3 mV yüzey yüküne sahip 35 nm - 50 nm boyut aralığında olduğu belirlenmiştir. Bu verilere göre de aşağıda Ag NP'nün hücre hatları üzerindeki etkileri görülmektedir.

4.3.4.1 Kimyasal Ag Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

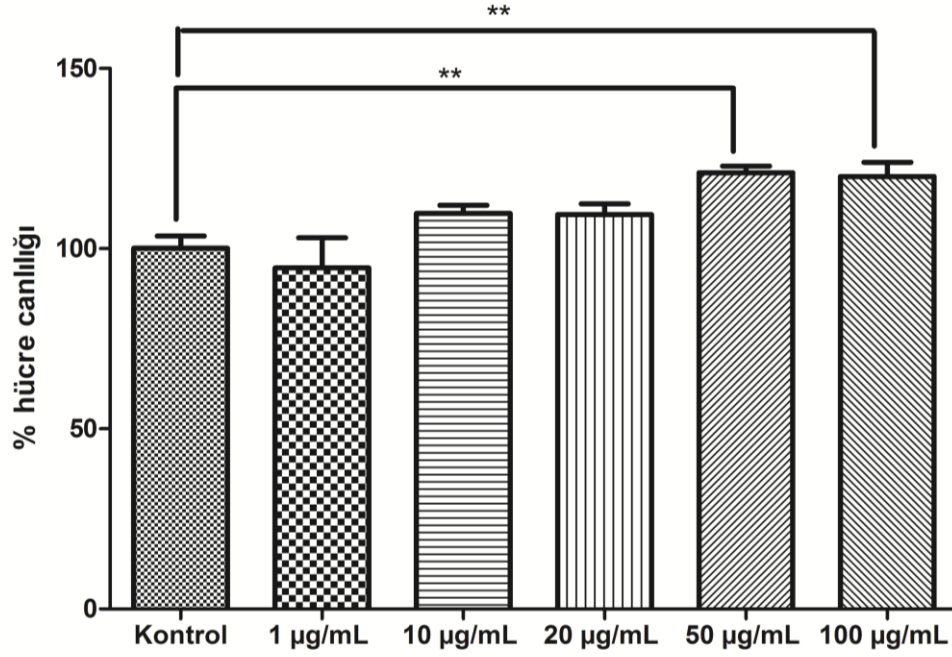
Kimyasal yöntemler ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerinin L929 hücre hattı üzerinde artan konsantrasyonlar ile birlikte proliferasyonu da artırıcı etkileri Şekil 4.27'de görülmektedir.



Şekil 4. 73 Kimyasal Ag nanopartikülünün L929 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi

4.3.4.2 Biyojenik Ag Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

Biyojenik yöntem ile sentezlenen Ag nanopartiküllerinde 1 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığında azalma görülürken konsantrasyonlar arttıkça canlı hücre sayısının da arttığı görülmektedir (Şekil 4.28).

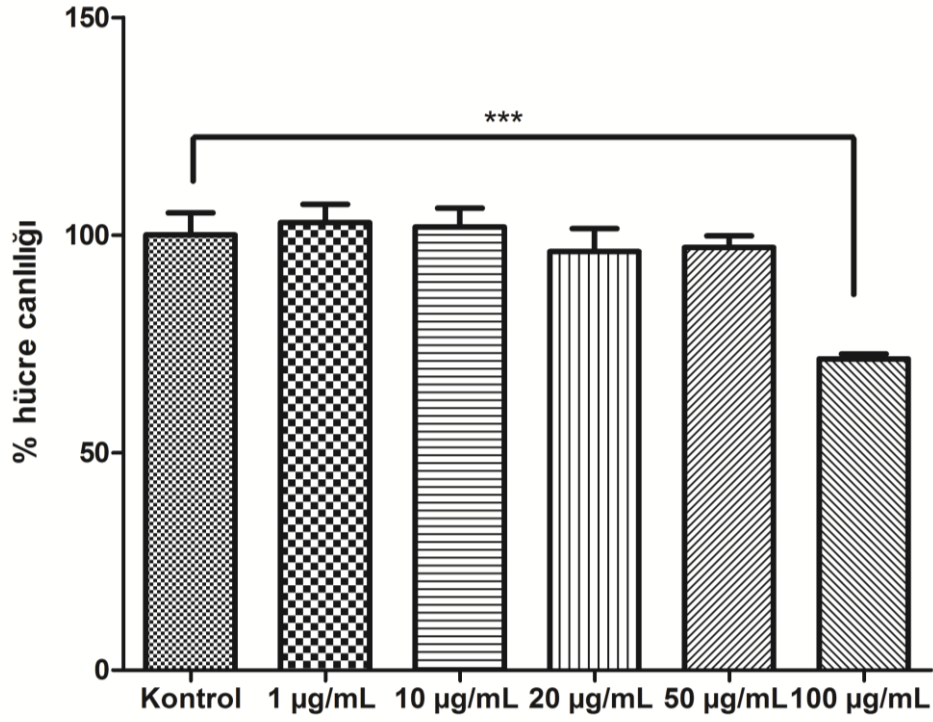


Şekil 4. 74 Biyojenik Ag nanopartikülünün L929 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi

4.3.5 Ag Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

4.3.5.1 Kimyasal Ag Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

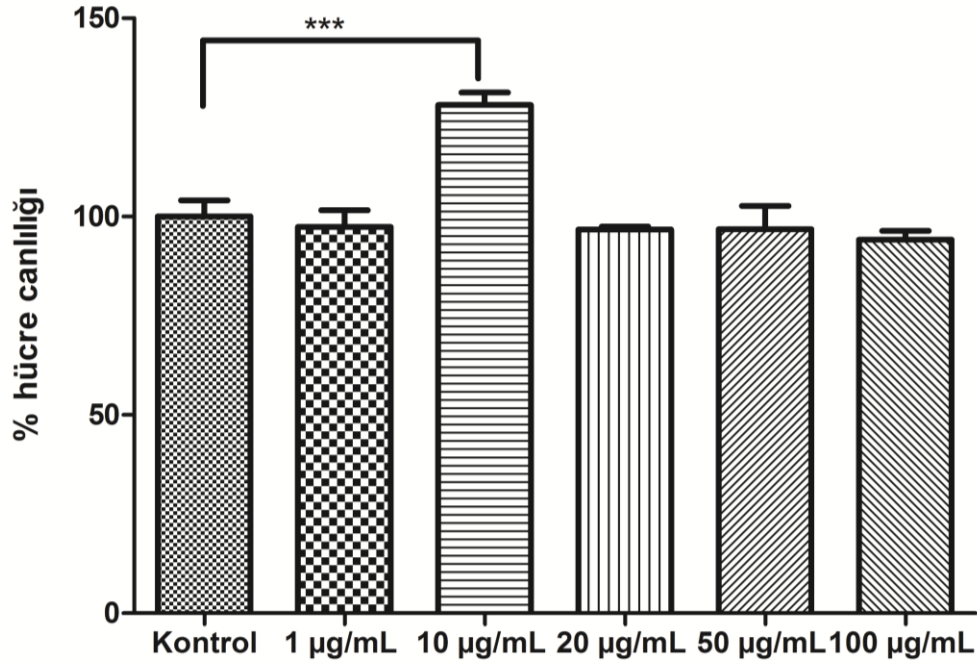
J774 hücre hattı üzerinde kimyasal yöntemler ile sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerinin 1 µg/mL - 50 µg/mL konsantrasyonlarda pozitif ya da negatif etkisi bulunmaz iken 100 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığı ciddi azalma göstermiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4. 75 Kimyasal Ag nanopartikülünün J774 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi

4.3.5.2 Biyojenik Ag Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

Biyojenik yöntem ile sentezlenmiş Ag NP'lerinin J774 hücre hattı üzerindeki canlılığına bakıldığında 10 µg/mL konsantrasyonun hücre poliferasyonunu artırdığı, diğer konsantrasyonların ise Şekil 4.30'da de belirtildiği üzere kontrol grubu ile paralel canlılık gösterdiği görülmektedir.



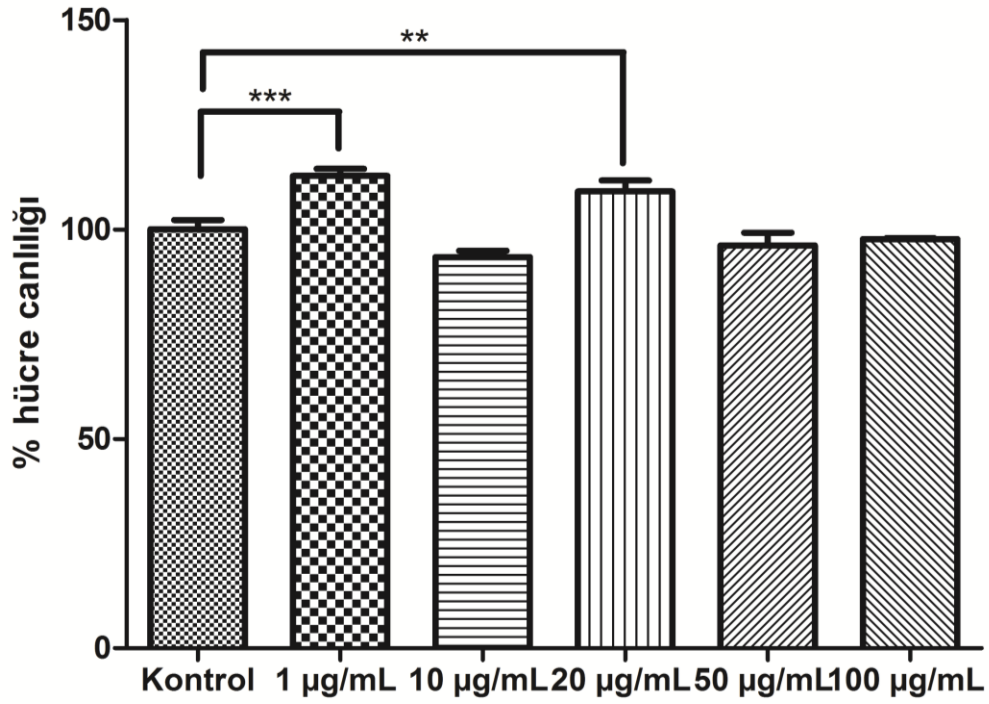
Şekil 4. 76 Biyojenik Ag nanopartikülünün J774 üzerindeki proliferasyonuna etkisi

L929 ve J774 hücre hatları üzerinde yüzey yükü (-24 mV) ve boyutu 76 nm - 200 nm olan kimyasal Ag nanopartikülü ile yüzey yükü (-21,3 mV) ve boyutu 35 nm - 50 nm olan biyojenik gümüş nanopartikülünün etkisi incelendiğinde L929 hücrelerinin her iki sentez ile elde edilen Ag NP'lerinde de proliferasyonunu % 25'e kadar arttığı belirlendi. J774 hücre hattında ise nanopartiküllerin hücre proliferasyonuna etkisinin bulunmadığı yalnızca biyojenik Ag NP'lerinin 100 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığını düşürdüğü tespit edildi.

4.3.6 Ag Nanopartiküllerinin ADMK Hücre Proliferasyonuna Etkisi

4.3.6.1 Kimyasal Ag Nanopartiküllerinin ADMK Hücre Proliferasyonuna Etkisi

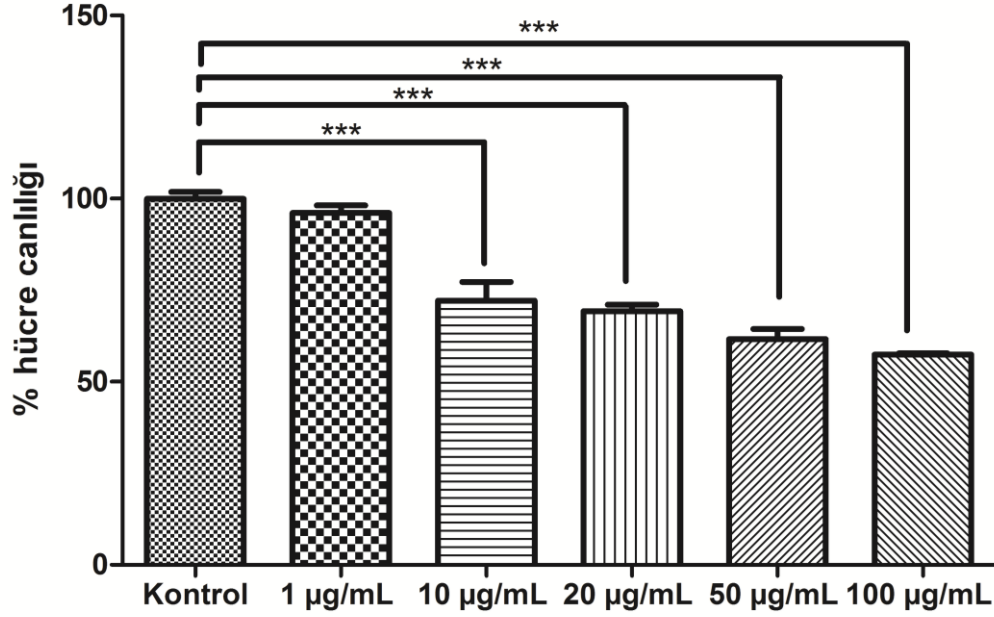
İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerinde kimyasal yöntem ile elde edilen Ag NP'lerinin farklı konsantrasyonlarda farklı etkiler gösterdikleri görülmektedir. Şekil 4.31'e bakıldığında 1 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyonlarda hücrelerin proliferasyonu artarken ($p < 0,005$) 50 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlar ise kontrol grubu ile benzer canlılığa sahip olmaktadır.



Şekil 4. 77 Kimyasal Ag nanopartikülünün ADMKH üzerindeki proliferasyonuna etkisi

4.3.6.2 Biyojenik Ag Nanopartiküllerinin ADMK Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerinde yeşil yöntem ile sentezlenmiş Ag NP'lerinin etkilerinde ise konsantrasyonların artması ile birlikte hücre canlılığında da büyük oranda azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4. 78 Biyojenik Ag nanopartikülünün ADMKH üzerindeki proliferasyonuna etkisi

Yüzey yükü (-24 mV) ve boyutu 76 nm - 200 nm olan kimyasal Ag nanopartikülü ile yüzey yükü (-21,3 mV) ve boyutu 35 nm - 50 nm olan biyojenik gümüş nanopartikülünün ADMKH üzerindeki etkisine bakıldığında ise kimyasal nanoaprtiküllerin farklı konsantrasyonlarda farklı etkiler gösterdiği biyojenik nanopartiküllerin ise konsantrasyonlar arttıkça hücrlerine mitokondriyal etkinliğinin azaldığı belirlendi ($p < 0,005$).

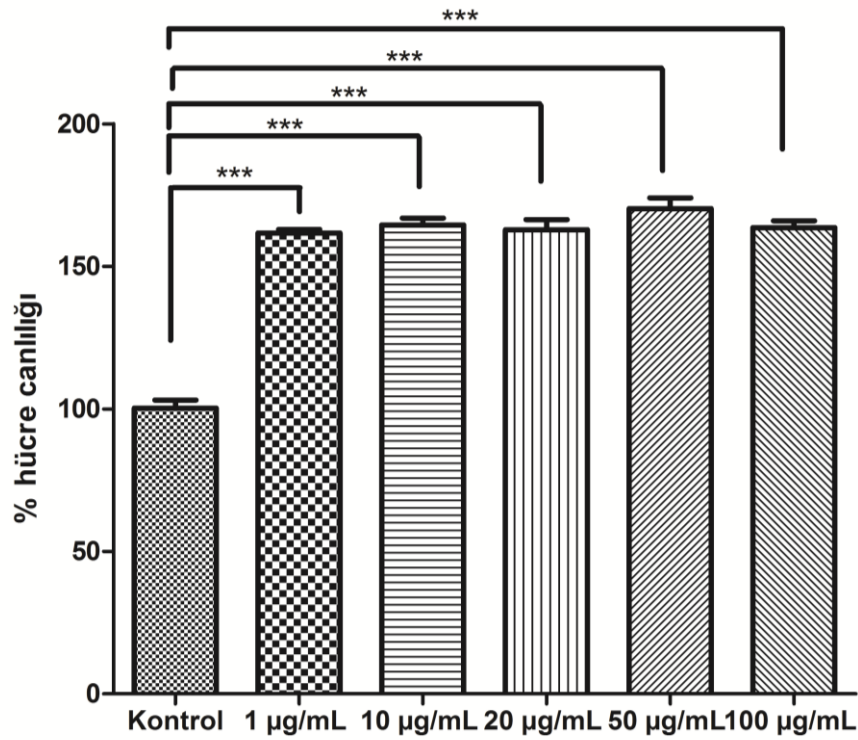
4.3.7 TiO₂@Ag Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

Kimyasal yöntem ile sentezlenmiş TiO₂@Ag NP'nün Zeta ve SEM analizleri sonucunda - 31,2 mV yüzey yüküne sahip 35 nm - 65 nm boyut aralığında olduğu ve yeşil yöntem ile sentezlenmiş TiO₂@Ag NP'nün Zeta potansiyelinin (-16,2 mV) ve boyut aralığının 55 nm - 100 nm olduğu belirlendi. Bu verilere göre de aşağıda TiO₂@Ag NP'nün hücre hatları üzerindeki etkileri görülmektedir.

4.3.7.1 Kimyasal TiO₂@Ag Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

Kimyasal yöntem ile sentezlenmiş TiO₂@Ag NP'nün L929 hücre hattında en düşük konsantrasyondan başlayarak en yüksek konsantrasyona kadar hücre proliferasyonunu

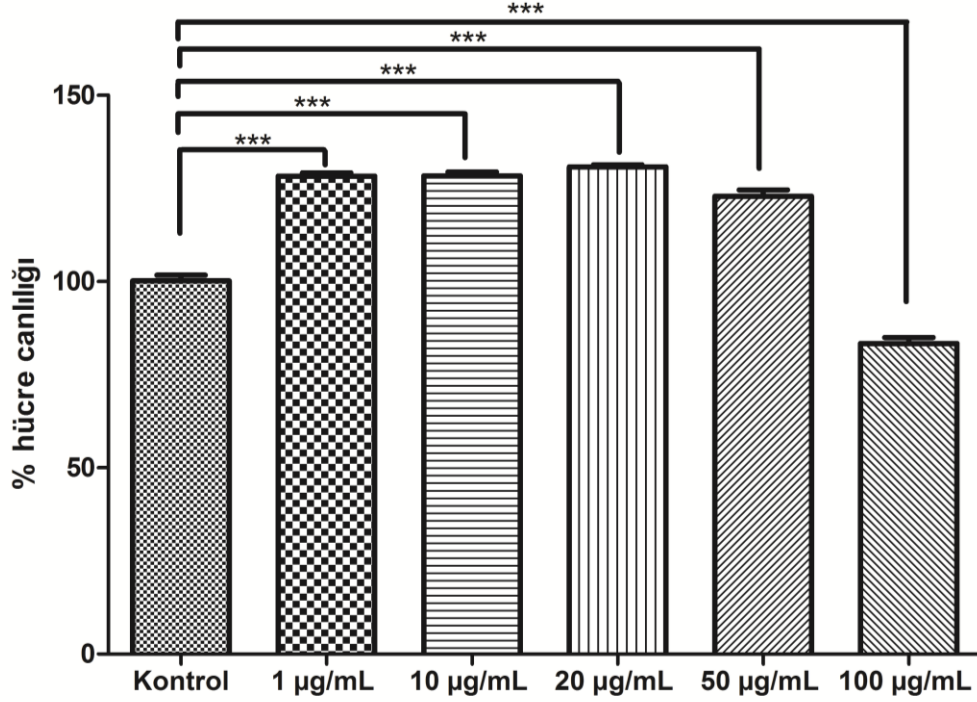
hemen hemen aynı oranda artırdığı Şekil 4.33'te görülmektedir. Bu nanopartikül çeşidi L929 hücre hattında proliferasyonunu artırmıştır ($p<0,005$).



Şekil 4. 79 Kimyasal TiO₂@Ag nanopartikülünün L929 üzerindeki proliferasyonuna etkisi

4.3.7.2 Biyojenik TiO₂@Ag Nanopartiküllerinin L929 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

Biyojenik yöntem ile sentezlenen TiO₂@Ag NP'nün 100 µg/mL'lik konsantrasyonunda L929 hücrelerinde inhibisyon görülürken diğer konsantrasyonların da hücre canlılığını kontrol grubuna nazaran artırdığı Şekil 4.34'te gösterilmektedir.

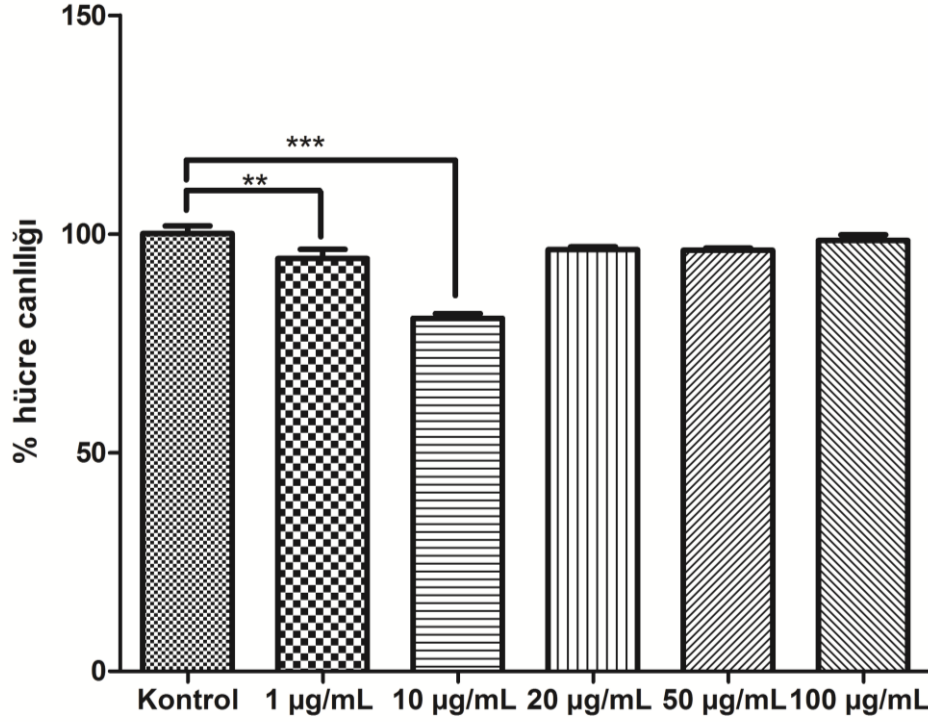


Şekil 4. 80 Biyojenik TiO₂@Ag nanopartikülünün L929 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi

4.3.8 TiO₂@Ag Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

4.3.8.1 Kimyasal TiO₂@Ag Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

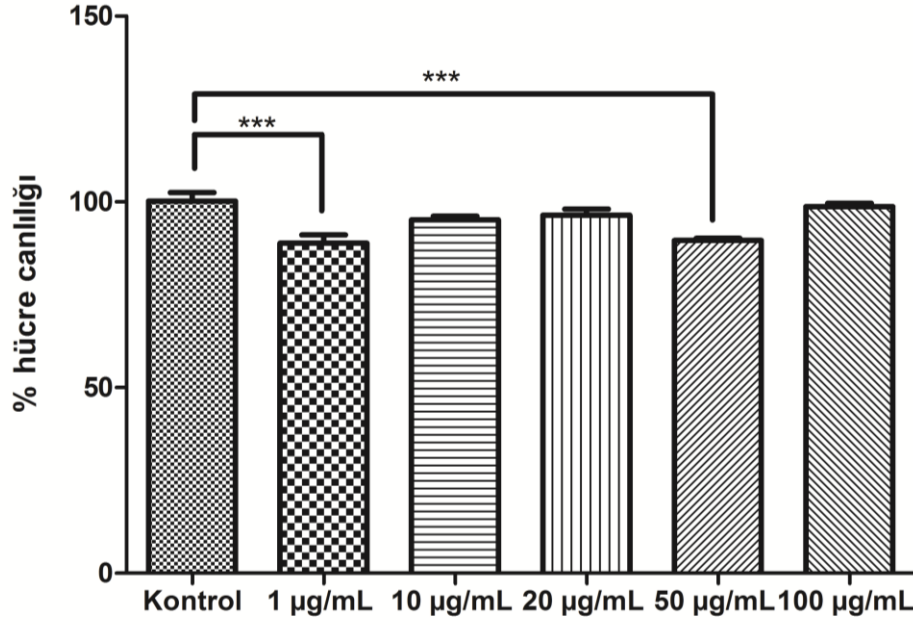
J774 hücre hattı proliferasyonuna kimyasal yöntem ile sentezlenen TiO₂@Ag nanopartikülünün etkileri incelendiğinde 10 µg/mL konsantrasyonunda hücre canlılığında azalma görülürken diğer tüm konsantrasyonların kontrol grubu ile benzer proliferatif özellik gösterdikleri görülmektedir (Şekil 4.35).



Şekil 4. 81 Kimyasal $\text{TiO}_2\text{@Ag}$ nanopartikülünün J774 hücre hattı üzerindeki proliferasyonuna etkisi

4.3.8.2 Biyojenik $\text{TiO}_2\text{@Ag}$ Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattı Proliferasyonuna Etkisi

Biyojenik yöntem ile sentezlenen $\text{TiO}_2\text{@Ag}$ nanopartikülünün J774 hücre hattı üzerindeki proliferatif etkisi farklı konsantrasyonlarda farklı etkiler göstermektedir. Düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığını inhibe ederken 100 µg/mL konsantrasyonunda kontrol grubu ile aynı oranda canlılık göstermektedir (Şekil 4.36).



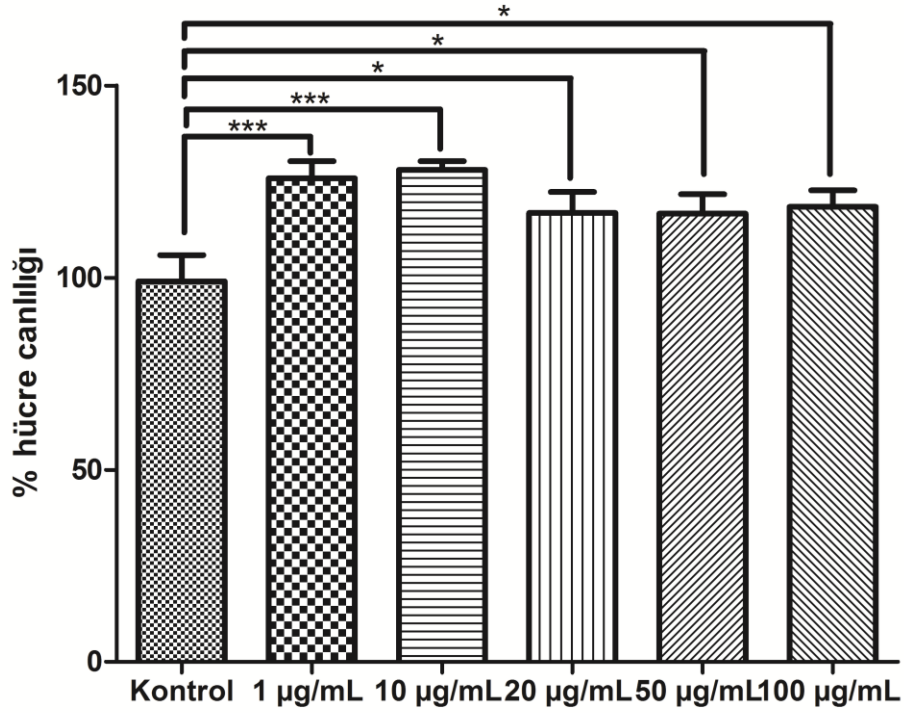
Şekil 4. 82 Biyojenik TiO₂@Ag nanopartikülünün J774 üzerindeki proliferasyonuna etkisi

Titanyumdioksit ve gümüş nanopartiküllerinden meydana getirilen TiO₂@Ag kompozit nanopartikülünün J774 ve L929 hücre hatları üzerindeki etkileri incelendiğinde -31,2 mV yüzey yükü ile 35 nm - 65 nm boyut aralığındaki kimyasal TiO₂@Ag ve -16,2 mV yüzey yükü ile 55 nm - 100 nm boyut aralığındaki yeşil yöntem ile sentezlenmiş TiO₂@Ag NP'nün farklı konsantrasyonlarda farklı etkilerinin olduğu görüldü. Kimyasal nanopartikülün L929 hücreleri mitokondriyal aktivitelerini artan konsantrasyonlarda yaklaşık %80 oranında artırırken J774 hücrelerinde ise etkinlik göstermemiş ve 10 µg/mL konsantrasyonda mitokondriyal aktiviteyi %25 oranında azalttığı belirlendi ($p<0,005$). Diğer taraftan biyojenik nanopartikül L929 hücre hattının proliferasyonunu 1-50 µg/mL konsantrasyon aralığında artırdığı ancak 100 µg/mL konsantrasyonda azalttığı tespit edildi. Tüm bu verilerden farklı olarak da biyojenik TiO₂@Ag NP J774 hücre hattı için 1 µg/mL ve 50 µg/mL için proliferasyonu azaltıcı ($p<0,005$), diğer konsantrasyonlar için ise etkisiz olduğu görüldü.

4.3.9 TiO₂@Ag Nanopartiküllerinin ADMK Hücre Proliferasyonuna Etkisi

4.3.9.1 Kimyasal TiO₂@Ag Nanopartiküllerinin ADMK Hücre Proliferasyonuna Etkisi

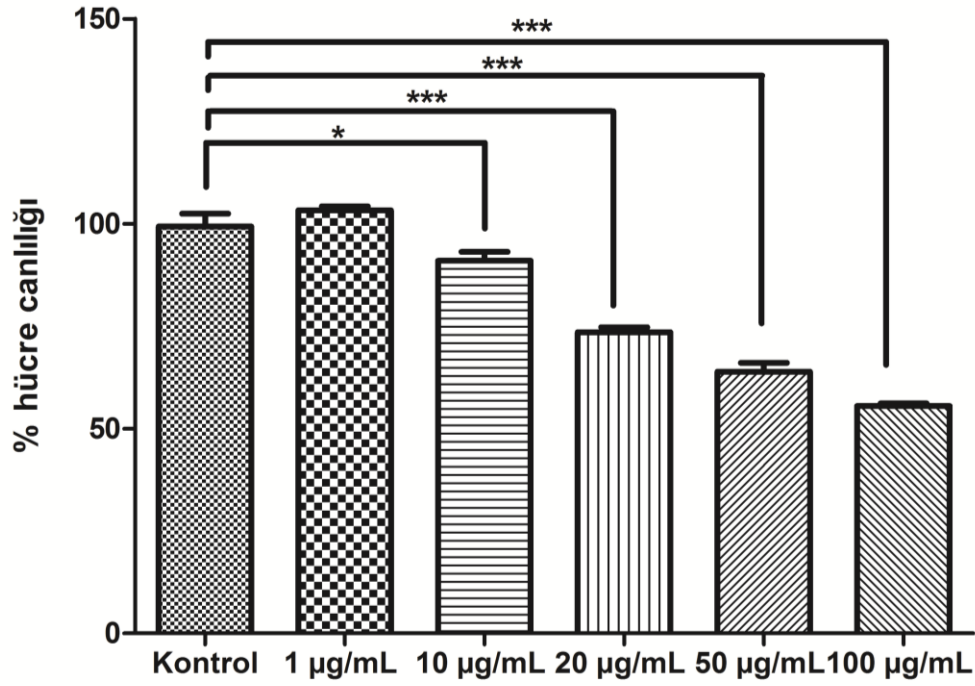
Kimyasal yöntemler ile sentezlenen TiO₂@Ag NP'nün tüm konsantrasyonlarda mezenkimal kök hücrelerin canlılığını artırdığı en yüksek canlılığın 10 µg/mL'de en düşük canlılığın ise 50 µg/mL'de görüldüğü ve bu değerlerin dahi kontrol grubuna göre daha fazla proliferasyon değerleri olduğu görülmektedir (Şekil 4.37)



Şekil 4. 83 Kimyasal TiO₂@Ag nanopartikülünün ADMKH üzerindeki proliferasyonuna etkisi

4.3.9.2 Biyojenik TiO₂@Ag Nanopartiküllerinin ADMKH Proliferasyonuna Etkisi

TiO₂@Ag nanopartikülünün kimyasal (-31,2 mV yüzey yükü ile 35 nm - 65 nm boyut aralığı) ve biyojenik (-16,2 mV yüzey yükü ile 55 nm - 100 nm boyut aralığı) özellikteki iki farklı türünün ADMKH üzerindeki etkilerinin birbirinden farklı sonuçlar gösterdiği belirlendi (Şekil 4.38). Kimyasal TiO₂@Ag nanopartikülü adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin mitokondriyal etkinliklerini tüm konsantrasyonlarda artırırken, biyojenik nanopartikül artan konsantrasyonlar ile azalttığı görüldü ($p < 0,005$).



Şekil 4. 84 Biyojenik TiO₂@Ag nanopartikülünün ADMKH üzerindeki proliferasyonuna etkisi

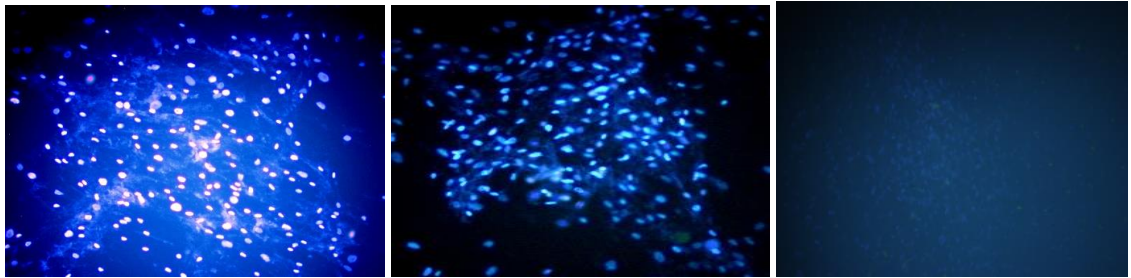
4.3.10 DAPI Boyama ile Apoptotik ADMKH Tayini

Nanopartiküller ile muamele edilen mezenkimal kök hücrelerin canlılıkları DAPI boyama ile de incelendi. DAPI boyama ile hücrelerin apoptozu tayin edildi. Hücrelerin nanopartiküller ile 72 saatlik muamelesinden sonra DAPI boyama gerçekleştirilerek nükleer canlılık oranları mikroskopik olarak her örnek için üçer kuyucuk sayılması ile elde edildi. Mikroskopik incelemede her alanda bulunan boyanmamış canlı hücreler ve DNA'sı boyanmış ölü hücreler sayıldı. Ölü hücrelerin tüm hücre sayısına oranının % oranı ile belirlendi. Boyama sonrası elde edilen veriler Çizelge 4.1'de yer almaktadır.

Çizelge 4. 2 Mezenkimal kök hücrelerin apoptotik yüzde oranları (DAPI boyama)

Apoptotik Hücre %	Kimyasal TiO ₂	Kimyasal Ag	Kimyasal TiO ₂ @Ag	Biyojenik TiO ₂	Biyojenik Ag	Biyojenik TiO ₂ @Ag
Kontrol	%3,8	%4,7	%4,8	%4,9	%4,4	%4,2
1 µg/mL	%4	%2,7	%3,8	%4,4	%6,2	%5,9
10 µg/mL	%3,4	%4,9	%3,2	%4,4	%8,8	%6,7
20 µg/mL	%4,5	%3,5	%4,3	%4,3	%11,6	%9,3
50 µg/mL	%4,8	%4,5	%4,6	%6	%12,1	%9,9
100µg/mL	%5	%6	%4,4	%4,3	%11,8	%12,0

Mezenkimal kök hücreler üzerinde apoptoza neden olan ve/veya olmayan konsantrasyonlar ile nanopartiküller tespit edildi. Buna göre de kimyasal TiO₂@Ag nanopartikülünün kontrol grubuna kıyas ile tüm konsantrasyonlarında daha az hücre apoptozuna neden olduğu belirlendi. Diğer taraftan ise biyojenik gümüş nanopartikülünün en fazla apoptoza neden olan nanopartikül türü olduğu tespit edildi. Elde edilen DAPI sonuçları MTT sonuçları ile de benzerlik gösterdi. Elde edilen bazı boyamalar Şekil 4.39'da verilmiştir.



Şekil 4. 85 Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin DAPI boyamalarından elde edilen bazı görüntüler

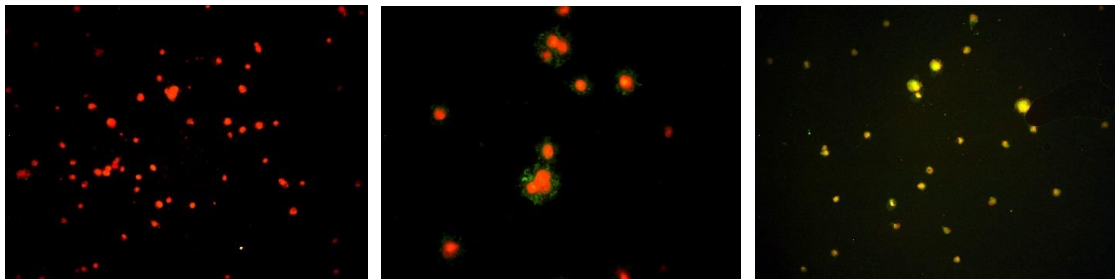
4.3.11 EtBr/AO ile ADMKH Apoptotik Tayin

Nanopartiküller ile muamele edilen mezenkimal kök hücrelerin canlılıkları ayrıca EtBr/AO boyama ile de incelendi. Hücrelerin yüzde oran ile apoptozu tayin edildi. Boyama sonrası elde edilen veriler Çizelge 4.2’de yer almaktadır.

Çizelge 4. 3 Mezenkimal kök hücrelerin apoptotik yüzde oranları (EtB/AO boyama)

Apoptotik Hücre %	Kimyasal TiO ₂	Kimyasal Ag	Kimyasal TiO ₂ @Ag	Biyojenik TiO ₂	Biyojenik Ag	Biyojenik TiO ₂ @Ag
Kontrol	%3,8	%4,1	%4,6	%3,9	%4,1	%4,4
1 µg/mL	%3,9	%2,6	%3,0	%3,2	%4,9	%4,9
10 µg/mL	%3,2	%5	%2,8	%3,4	%8,3	%5,7
20 µg/mL	%4,7	%3,4	%3,7	%3,5	%9,6	%9,7
50 µg/mL	%5,3	%4,5	%3,7	%5,2	%11,3	%11,2
100µg/mL	%5	%4,2	%3,5	%3,6	%12,1	%11,5

Mezenkimal kök hücreler üzerinde nanopartiküllerin apoptotik etkilerinin belirlenmesi için yapılan bir diğer boyama da EtBr/AO oldu. Buna göre de elde edilen veriler DAPI boyama ile paralellik göstermekte olup biyojenik gümüş nanopartikülünün hücre ölümünü her konsantrasyonda artırdığı belirlendi. Elde edilen EtBr/AO boyamalarından bazıları Şekil 4.40’ta verilmiştir.



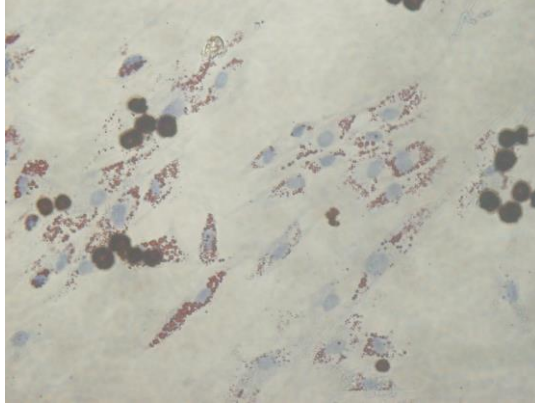
Şekil 4. 86 Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin EtBr/AO boyama boyamalarından elde edilen bazı görüntüler

4.4 Nanopartiküllerin ADMKH Kültürü Farklılaşmasına Etkisi

4.4.1 TiO₂ Nanopartiküllerinin ADMKH Farklılaşmasına Etkisi

4.4.1.1 Kimyasal TiO₂ Nanopartiküllerinin ADMKH Farklılaşmasına Etkisi

Adipojenik Farklılaşma: Şekil 4.41'e bakıldığında kimyasal TiO₂ nanopartikülünün ADMKH farklılaşmasında en etkin konsantrasyonun 20 µg/mL en düşük (inhibe edici) konsantrasyonun ise 10 µg/mL olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 87 Kimyasal TiO₂ nanopartikülü ile inkübe edilen kök hücrelerin adipojenik farklılaşmaları (Oil Red O Boyama, 20 µg/mL)

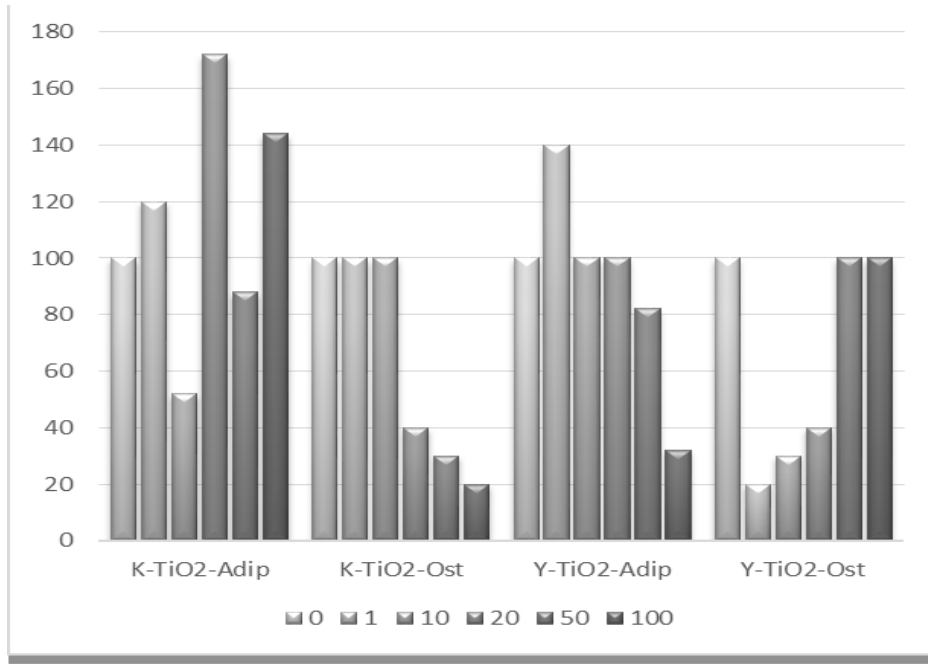
Osteojenik Farklılaşma: Osteojenik farklılaşma sürecinde artan konsantrasyonlar ile birlikte hücrelerin bulundukları flask yüzeyinde kalkmaya başladıkları ancak 1 µg/mL ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda farklılaşmanın kontrol grubu ile benzer şekilde devam ettiği görülmüştür.

4.4.1.2 Biyojenik TiO₂ Nanopartiküllerinin Kök Hücre Farklılaşmasına Etkisi

Adipojenik Farklılaşma: 1µg/mL konsantrasyonda TiO₂ NP'ü ADMKH farklılaşmasını artırırken 10 µg/mL ve 20 µg/mL'de farklılaşmalar kontrol grubu ile benzer olup 50 µg/mL ve 100 µg/mL'de farklılaşan hücrelerin sayısı sırası ile azalmaktadır.

Osteojenik Farklılaşma: Osteojenik farklılaşmanın 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda devam ettiği, kontrol grubu ile benzer özellik gösterdiği ancak düşük konsantrasyonlarda ise hücrelerin bulundukları flask yüzeyinden kalktıkları görülmektedir.

Kimyasal ve biyojenik sentez ile elde edilen TiO_2 nanopartikülünün ADMKH farklılaşmasına etkisine bakıldığında (Şekil 4.42) adipojenik farklılaşmaya en fazla etki eden nanopartikülün kimyasal TiO_2 nanopartikülü olduğu ve en etkin konsantrasyonlarının da 20 $\mu\text{g/mL}$ ve 100 $\mu\text{g/mL}$ olduğu bunun yanında biyojenik TiO_2 nanopartikülünün de adipojenik farklılaşmayı indüklediği (1 $\mu\text{g/mL}$) tespit edildi. Diğer taraftan osteojenik farklılaşmada TiO_2 nanopartikülünün etkin bir özellik göstermediği belirlendi.

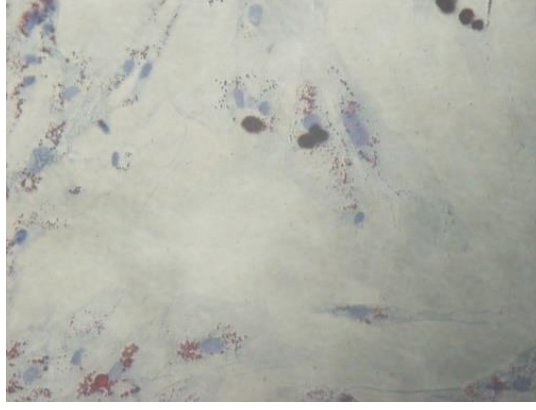


Şekil 4. 88 TiO_2 nanopartikülünün kök hücre farklılaşmasına etkisinin korelasyonu (K: kimyasal, TiO_2 : titanyumdioksit, Y: yeşil, Adip: adipojenik, Ost: osteojenik)

4.4.2 Ag Nanopartiküllerinin ADMKH Farklılaşmasına Etkisi

4.4.2.1 Kimyasal Ag Nanopartiküllerinin ADMKH Farklılaşmasına Etkisi

Adipojenik Farklılaşma: Kimyasal Ag NP'nün farklılaşmaya etkisine bakıldığında 50 $\mu\text{g/mL}$ ve 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarının farklılaşmayı büyük oranda inhibe ettiği, ancak diğer konsantrasyonların ise kontrol grubundan daha fazla farklılaşmış hücrelere sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 89 Kimyasal Ag nanopartikülü ile inkübe edilen kök hücrelerin adipojenik farklılaşmaları (Oil Red O Boyama, 50 µg/mL)

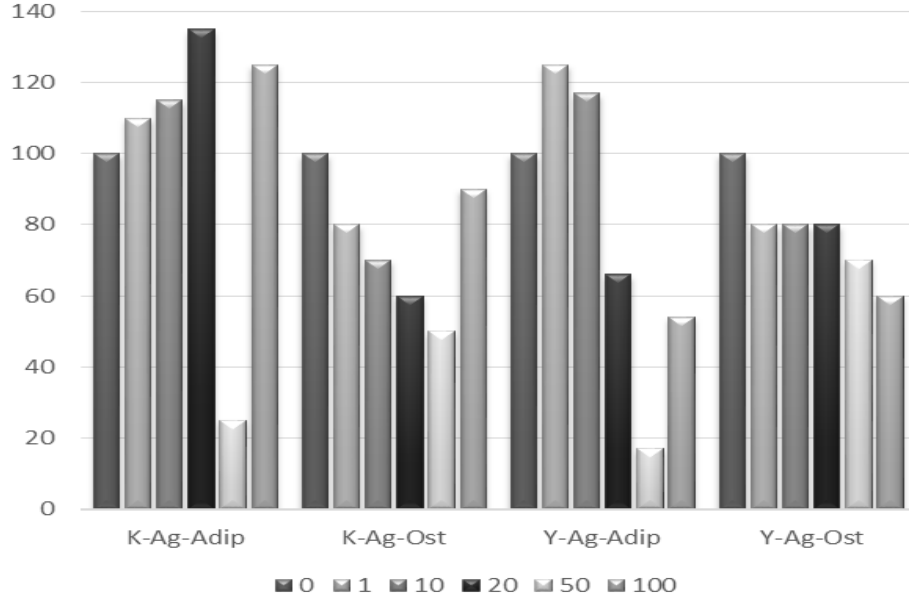
Osteojenik Farklılaşma: Hücrelerin 100 µg/mL konsantrasyonda farklılaşmaya devam ettikleri ancak kontrol grubundan daha yavaş farklılaştıkları görülmüştür. Diğer düşük konsantrasyonlarda ise hücreler bulundukları flask yüzeyinden kalkmışlardır.

4.4.2.2 Biyojenik Ag Nanopartiküllerinin Kök Hücre Farklılaşmasına Etkisi

Adipojenik Farklılaşma: Yeşil yöntem ile sentezlenen Ag NP'nde ise farklılaşma 1 µg/mL ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda artarken 20 µg/mL, 50 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda azalma görülmektedir. Farklılaşmada en fazla inhibisyon etkisi 50 µg/mL'de karşımıza çıkmaktadır.

Osteojenik Farklılaşma: Hücrelerin en fazla farklılaştıkları konsantrasyon 100 µg/mL olarak görülmüş, diğer konsantrasyonlarda ise hücreler canlılıklarını sürdürseler dahi farklılaşmaları kontrol grubuna oranla daha azdır.

Gümüş nanopartiküllerinin ADMKH farklılaşmasına etkisine bakıldığında adipojenik farklılaşmada kimyasal ve biyojenik Ag nanopartiküllerinin konsantrasyonlara bağlı etkinliği görüldü. Ancak yüksek konsantrasyonda farklılaşmalarda azalma ve hücre deadezyonları ile karşılaşıldı (Şekil 4.44).

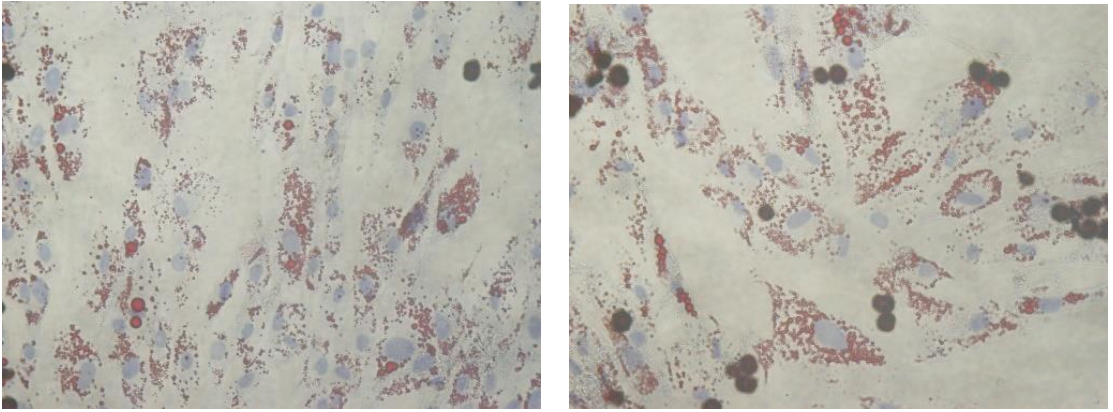


Şekil 4. 90 Ag nanopartikülünün kök hücre farklılaşmasına etkisinin korelasyonu (K: kimyasal, Ag: gümüş, Y: yeşil, Adip: adipojenik, Ost: osteojenik)

4.4.3 TiO₂@Ag Nanopartiküllerinin ADMKH Farklılaşmasına Etkisi

4.4.3.1 Kimyasal TiO₂@Ag Nanopartiküllerinin ADMKH Farklılaşmasına Etkisi

Adipojenik Farklılaşma: Kimyasal TiO₂@Ag NP'nün adipojenik farklılaşmayı 1 µg/mL, 10 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda artırdığını 20 µg/mL'de kontrol grubu ile benzer özellik gösterdiğini 100 µg/mL konsantrasyonda ise inhibe ettiği belirlenmiştir.



Şekil 4. 91 Kimyasal TiO₂@Ag nanopartikülü ile inkübe edilen ADMKH adipojenik farklılaşmaları (Oil Red O Boyama, 10 µg/mL ve 50 µg/mL)

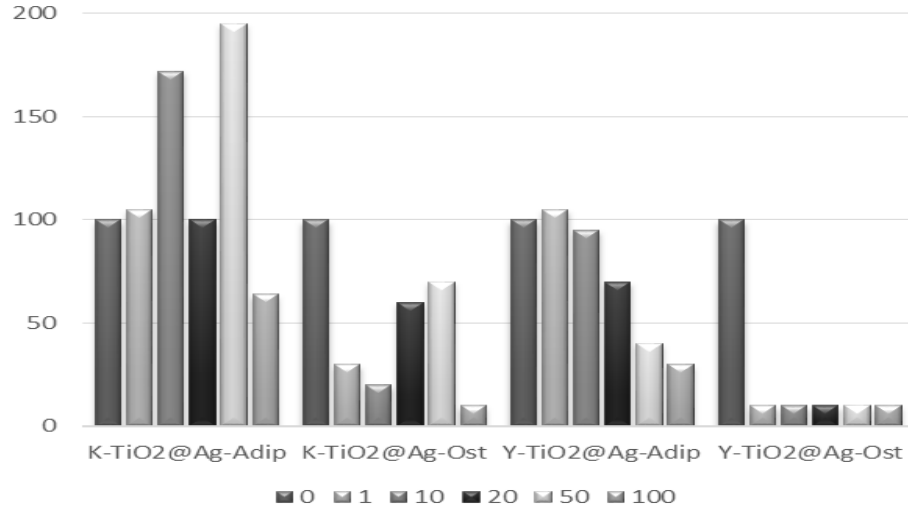
Osteojenik Farklılaşma: Farklılaşma süreci 20 µg/mL ve 50 µg/mL’de takip edilebilmiş, 14 günlük inkübasyon sonrasında hücrelerin flask tabanından kalkmaları nedeni ile sadece 50 µg/mL’lik konsantrasyonlarda hücrelerin kontrol grubu ile benzer farklılaşma gösterdikleri görülmüştür.

4.4.3.2 Biyojenik TiO₂@Ag Nanopartiküllerinin ADMKH Farklılaşmasına Etkisi

Adipojenik Farklılaşma: İnsan adipoz dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin adipojenik farklılaşmasını en fazla indükleyen konsantrasyonun 50mg/mL olduğu tespit edildi. Bu indüksiyonu takiben 10mg/mL konsantrasyondaki TiO₂@Ag ve 20mg/mL konsantrasyona sahip TiO₂@Ag NP gelmektedir. Aşağıdaki şekilde görüleceği gibi farklılaşma üzerinde aktive edici NP ise biyojenik TiO₂@Ag NP (50mg/mL) olmuştur.

Osteojenik Farklılaşma: Osteojenik farklılaşmada ise hücrelerin uygulanan tüm konsantrasyonlar sonrasında flask tabanından kalkarak farklılaşma sürecine giremedikleri belirlendi.

TiO₂@Ag nanopartikülünün ADMKH farklılaşması üzerindeki etkileri incelendiğinde en fazla adipojenik indüksiyona kimyasal TiO₂@Ag nanopartikülünün 10 mg/mL ve 50 mg/mL konsantrasyonlarında karşılaşıldı. Diğer konsantrasyonların hücre farklılaşmasına etkisi kontrol grubu ile benzer özellikler gösterdiği tespit edildi. Biyojenik TiO₂@Ag nanopartikülünün artan dozlar ile adipojenik farklılaşmayı azalttığı görüldü. Osteojenik farklılaşmada ise TiO₂@Ag nanopartikülünün etkinliği görülmedi ve hücrelerin morfolojilerinde bozulmaların meydana gelmesi ile birlikte deadezyona uğrayarak flask tabanından ayrıldıkları belirlendi (Şekil 4.46).



Şekil 4. 92 TiO₂@Ag nanopartikülünün kök hücre farklılaşmasına etkisinin korelasyonu (K: kimyasal, TiO₂@Ag: titanyumgümüş, Y: yeşil, Adip: adipojenik, Ost: osteojenik)

Farklı konsantrasyonlardaki nanopartiküllerin hücrelerin farklılaşmalarına olan etkileri yukarıda belirtilen şekillerde, her alanda görülen farklılaşmış hücre sayılarının belirlenmesi ile elde edilmiştir. Buna göre de adipojenik ve osteojenik farklılaşmaların en fazla ve en düşük olduğu konsantrasyonlar tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda elde edilen verilere göre insan adipoz dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmalarında farklı parametreler kullanılarak etkin indükleyici konsantrasyonların mevcut olduğu belirlendi. Buna göre de biyomedikal alanlarda amaca uygun olarak nanopartikülün istenilen proliferatif ve farklılaşma özelliği göz önüne alınarak uygun nanopartikülün, uygun sentez yöntemi ile elde edilmesi ve daha sonra da uygulamaya geçilmesinin önemi ortaya çıkmaktadır.

4.5 Tartışma

Kök hücreler ve nanoteknoloji son yılların büyüyen en önemli iki alanıdır. Her iki alanda yapılan çalışmalar intradisipliner faaliyetler gerektiren ve böylece hızla gelişen bilim dallarıdır. Bu iki bilim dalı birleşerek kök hücre nanoteknolojisi adı altında yeni bir çalışma alanı doğurmuştur [1, 2]. Bulundukları doku ve organların devamlılığını sağlayan kök hücreler rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinde son derece önemli rol alırken [3-9], nano boyutta yapılar da çeşitli endüstriyel [10-12] ve medikal alanlara [13] ek olarak özellikle son yıllarda doku mühendisliğinde de giderek daha çok önem

kazanmaktadır [14, 15]. Bunun nedeni nanopartiküllerin ultra küçük boyutta olmaları, geniş yüzey alanına sahip olmaları ve bu sayede hücresel boyutta etkileşimlere girebilmeleridir [16-23]. Kök hücre nanoteknolojisinde gelişmeler yaşanırken yapılan çalışmaların tartışmalara neden olduğu da bildirilmektedir [24-29].

Son yıllara kadar doku mühendisliği ve hücresel tedavi çalışmalarında somatik hücrelerden ağırlıklı olarak faydalanılmaktaydı. Ancak farklılaşmamış ve kendilerini yenileyebilme özellikleri nedeni ile kök hücreler daha büyük ilgi çekmektedir. Günümüzde kök hücreler rejeneratif tıp çalışmalarında hasar görmüş ya da işlevini yitirmiş çeşitli doku ve organların yenilenmesinde [30-35], anti-inflamatuvar etkileri sayesinde immünoterapilerde [36-38], hedeflendirilmiş sistemlerde [39] ve hücresel tedavilerde [40, 41] başarı ile kullanılmaktadır.

Nanopartiküller kozmetik, tekstil, gıda ve boya gibi sanayi kollarında ve ilaç salınım sistemleri, mikrobiyoloji, rejeneratif tıp gibi çeşitli medikal alanlarda kullanılmaktadır [42, 43]. Nanopartiküllerin bu kadar geniş bir alanda kullanılmaya başlanması ile birlikte toksik etkileri ile ilgili bilgilerin yetersizliği çeşitli endişelere neden olmaktadır [44]. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda insanların solunum, ağız yolu, dermal kontakt, intavenöz uygulamalar ve subkütanöz uygulamalar ile nanopartiküllere maruz kaldıkları kesin olarak belirlenmiştir [45]. İnsan vücudunun nanopartiküllere maruz kalmasının meydana getirdiği endişeler nedeni ile nanopartiküllerin etkilerinin detaylı şekilde incelenmesine her geçen gün daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak bu yöndeki çalışmaların temelini *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar oluşturmaktadır. Günümüzde yaygın kullanılan altın, bakır, karbon, demir, gümüş ve titanyum gibi nanopartiküllerin çok sayıda somatik hücre hatları üzerinde, az sayıda ise kök hücreler üzerinde etkileri ile ilgili bilgiler bulunsa da bu nanopartiküllerin somatik ve kök hücreler üzerinde etkisinin kıyaslanmasına yönelik literatür çalışmaları oldukça sınırlıdır. Diğer taraftan TiO₂@Ag nanopartikülünün kendisini oluşturan her bir nanopartikülden farklı olarak somatik ve mezenkimal kök hücreler üzerinde etkisini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca son yıllarda gelişmekte olan ve daha çok önem kazanan yeşil nanopartiküllerin somatik ve kök hücreler üzerinde kıyaslamalı etkisine dair çalışmalar oldukça azdır. Son yıllarda kimyasal nanopartiküllerin yanı sıra daha kısa sürede, daha ucuz ve toksik kalıntı oluşturmeyen yeşil yöntemler ile nanopartiküller sentezlenmeye

başlanmıştır. Yeşil nanopartiküllerin kimyasal nanopartiküller yerine kullanılmaya başlanması ve bu nedenle de somatik ve kök hücreler üzerindeki etkilerinin incelenmesi önem kazanmaktadır. Yapılan yeni bir çalışmada kimyasal ve yeşil yöntem ile sentezlenen Ag nanopartikülünün insan fibroblast (HDFa) ve kanser hücre (NCI-H460) hatları üzerinde etkisi kıyaslanmıştır. Ancak TiO_2 ve $TiO_2@Ag$ nanopartikülleri ile ilgili olarak bu şekilde bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, ilk kez olarak çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip kimyasal ve biyojenik nanopartiküllerin (Ag, TiO_2 , $TiO_2@Ag$) normal hücre hatları (L929 ve J774) ve insan adipoz dokusundan elde edilmiş mezenkimal kök hücreler (ADMKH) üzerindeki etkisinin kıyaslamalı olarak incelenmesi, incelenen nanopartiküllerin kök hücrelerin farklılaşmasına etkisinin belirlenmesi ve elde edilen sonuçların doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanılmak üzere önerilmesi olmuştur.

Amaca ulaşmak için çeşitli hedefler belirlenmiştir. Belirlenen hedefler;

- Somatik hücre hatlarının ve kök hücrelerin kültüre adaptasyonunun sağlanması,
- Hücrelerin devamlı kültürünün yapılması,
- Hücrelerin kriyoprezervasyonu
- Nanopartiküllerin sentezlenmesi ve karakterizasyonu
- Nanopartiküllerin somatik ve kök hücreler üzerindeki etkisinin incelenmesi olmuştur.

Hedeflere uygun olarak çalışmanın birinci aşamasında somatik hücre hatlarının ve kök hücrelerin kültürünün yapılması gerçekleştirildi. Öncelikle kriyobankta bulunan somatik hücreler (L929 ve J774) çözdürülerek çıkarıldı ve kültür ortamına adaptasyonu sağlandı. Hücrelerin morfolojileri ve proliferasyonları mikroskopik olarak gözlemlendi. Hücrelerin kültüre adaptasyonu ve çoğaltılma çalışmaları iki ay sürdü. Bir diğer taraftan da hücrelerin yedeklenmesi amacı ile kriyoprezervasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Böylece ileride nanopartiküllerin etkilerini incelemek için yapılacak deneylerde kullanılabilecek hücreler elde edildi. Adipoz doku mezenkimal kök hücreleri de somatik hücreler gibi kriyobanktan çıkarıldı ve kültür ortamına adapte edildi. Ancak bu hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesine ek olarak immünofenotipik ve histokimyasal yöntemler de uygulandı. Mezenkimal kök hücrelerin kriyobanktan

çözdürüldükten sonra kök hücre özelliklerini koruyup korumadıklarının belirlenmesi amacı ile CD90(+) ve CD34(-) hücre yüzey belirteçleri flow sitometrik olarak analiz edildi. Diğer taraftan da hücrelerin farklılaşma potansiyelleri incelenerek adipojenik ve osteojenik differasyonları gerçekleştirildi. 14 günlük adipojenik ve 21 günlük osteojenik farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesinin ardından mezenkimal kök hücreler de somatik hücre hatları gibi iki aylık bir süreçte kullanıma hazır halde elde edilmiş oldu.

Hedefe uygun olarak tez çalışmasının ikinci aşamasında kimyasal ve yeşil nanopartiküller sentezlendi ve karakterize edildi. Kimyasal yöntem ile sentezlenmiş TiO_2 nanopartikülünün Zeta ve SEM analizleri sonucunda -21,3 mV yüzey yükü ile 40 nm-86 nm boyut aralığında olduğu ve yeşil yöntem ile sentezlenmiş TiO_2 nanopartikülünün Zeta ve SEM analizleri sonucunda -12,3 mV yüzey yüküne sahip 52 nm -78 nm boyut aralığında partiküller olduğu belirlendi. Gümüş nanopartikülüne bakıldığında kimyasal yöntem ile sentezlenmiş Ag nanopartikülünün Zeta ve SEM analizleri sonucunda yüzey yükünün -24,0 mV ve boyut aralığının da 76 nm - 200 nm arasında olduğu, yeşil yöntem ile sentezlenmiş Ag nanopartikülünün ise -21,3 mV yüzey yükü ile 35 nm - 50 nm boyut aralığında olduğu belirlendi. TiO_2 ve Ag nanopartiküllerinin kombinasyonu olarak sentezlenen $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ nanopartikülünün ise kimyasal yöntem ile sentezlendiğinde Zeta ve SEM analizleri sonucunda -31,2 mV yüzey yüküne sahip 35nm-65nm boyut aralığında, yeşil yöntem ile sentezlediğinde Zeta ve SEM analizleri sonucunda -27,8 mV yüzey yüküne sahip 56 nm – 200 nm boyut aralığında olduğu belirlendi. Nanopartiküllerin sentez ve karakterizasyonlarının yapılarak deneylerde hazır nanotozlar haline getirilmesi 4 ay sürdü. Böylece nanopartiküller ile hücre hatlarının etkileşimlerinin incelenmesi için gerekli çalışmalar tamamlandı.

Amaca uygun olarak çalışmanın daha sonraki aşamasında sentezlenmiş kimyasal ve yeşil nanopartiküllerin elimizde bulunan somatik hücre hatları ve kök hücreler üzerindeki etkisi incelendi.

Deneylerde ilk olarak 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aralığında beş farklı konsantrasyonda hazırlanmış kimyasal TiO_2 nanopartikülünün L929 hücre hattı üzerindeki etkisi incelendi. Ancak incelenen konsantrasyonların hücre proliferasyonu üzerinde belirgin

bir etkisi görülmedi. Yapılan bir çalışmada 24 saat inkübe edilmiş insan deri fibroblastları üzerinde TiO_2 nanopartikülünün toksik bir etkisi belirlenmedi [190]. Böylece elde ettiğimiz veriler literatürde yer alan çalışmaların verileri ile uygun gelmektedir. Diğer taraftan literatürde TiO_2 nanopartikülünün hamster embriyo fibroblastlarında apoptoza, endotel hücrelerinde ise inflamasyona neden olduğu, epidermal (A431) [191] ve bronşiyal epitelyal hücrelerde (BEAS-2B) [192] ise hücre ölümüne neden olduğu ifade edilmektedir. Elde ettiğimiz verilerin önceki çalışmalar ile farklı sonuçlar göstermesinin sebepleri arasında TiO_2 nanopartikülünün boyut ve yüzey yükündeki farklılık, hücreler üzerinde uygulanan konsantrasyonların değişkenliği ve inkübasyonun maruziyet süresi yer alabilmektedir [1], [193].

Çalışmamızda daha sonra yine $1\mu\text{g/mL}$ - $100\mu\text{g/mL}$ aralığındaki kimyasal TiO_2 nanopartikülü fare makrofaj hücre hattı olan J774 üzerinde incelendi. Kimyasal TiO_2 nanopartikülünün konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığını %10-15 oranlarında inhibe ettiği belirlendi. Literatürde bu konu ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. TiO_2 nanopartikül ve nanofibril yapılarının kıyaslamalı olarak fare peritoneal monosit-makrofaj hücre hattı (Raw 264.7) üzerinde bir çalışma gerçekleştirilmiş ve 72 saatlik inkübasyon sonrasında TiO_2 nanofibrillerinin hücre canlılığının %78 oranında azalttığı ancak TiO_2 nanopartiküllerinin hücre canlılığını etkilemediği bildirilmiştir [194]. Böylece kimyasal TiO_2 nanopartikülünün, belirtilen boyut ve yüzey yükü ile ilgili konsantrasyonlarda, J774 hücre hattı üzerindeki etkisi ile ilgili literatürde ilk kez olarak bir çalışma gerçekleştirmiş olmaktadır.

Literatürde belirtildiği üzere özellikle gıda, eczacılık ve medikal alanlarda gümüş nanopartikülü yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bunun en büyük sebebi antimikrobiyal etkisi ile ürünlerin mikrobiyal kontaminasyonunun engellenmesinin amaçlanmasıdır. Tez çalışmamızda kimyasal gümüş nanopartikülünün L929 ve J774 hücre hatları üzerindeki etkisini incelediğimizde artan konsantrasyonlar ile birlikte L929 hücre hattının proliferasyonu artarken, J774 hücre hattında ise sadece yüksek konsantrasyonda ($100\mu\text{g/mL}$) hücre canlılığının yaklaşık %25 oranında azaldığı ortaya çıkmıştır. L929 hücre hattı için özellikle $10\mu\text{g/mL}$ - $100\mu\text{g/mL}$ aralığında hücre canlılığının benzer düzeyde devam ettiği tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada insan dermal fibroblast (HDFa) hücre hattı üzerinde 104 nm boyutu ve $-10,4\text{ mV}$ yüzey

yüküne sahip kimyasal Ag nanopartikülünün toksik etki göstermediği belirtilirken [90] bir başka çalışmada yara örtüsü yapımı için kitosan-PVP-nano gümüşoksit kombinasyonunun L929 hücre hattı üzerindeki toksisite çalışmalarında artan gümüşoksit konsantrasyonu ile birlikte hücre canlılığında azalma olduğu da belirtilmiştir [195]. Bir diğer çalışmada ise yine kültür ortamına Ag nanopartikülü eklenmesi ile L929 hücre hattında proliferasyon üzerinde belirgin bir değişiklik gözlenmez iken, aynı çalışmada gümüş filmler üzerine ekilen L929 hücrelerinin artan film kalınlığı ile birlikte morfolojik bozulmalara uğradığı ve hücre ölümlerinin meydana geldiği gösterilmiştir [196]. Buna göre de yaptığımız çalışmada nanopartikül halindeki gümüş materyalinin diğer çalışmalardaki non-toksik etkilerine karşı kullandığımız Ag nanopartikülünün sahip olduğu fizikokimyasal özelliklerin hücre proliferasyonunu artırdığı görülmektedir. Literatürde J774 hücre hattı üzerindeki toksisite çalışmaları ise oldukça sınırlı olup yapılan bir çalışmada THP-1 ve RAW 264.7 hücre hatları üzerinde 22 ± 3.5 nm boyutunda ve 50 µg/mL konsantrasyonda Ag nanopartikülünün uygulanması ile birlikte 24 saat sonunda her iki hücre hattında da hücre canlılığının yaklaşık %20 azaldığı, bir başka çalışmada ise hücrelerin 12.1 ± 7.0 nm boyutunda ve çok daha düşük konsantrasyondaki (5 µg/mL) Ag nanopartikülünün benzer sürede çok daha fazla oranda hücrenin canlılığını yitirdiği bildirilmiştir [197]. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada elde ettiğimiz veriler diğer çalışmalar ile paralellik gösterirken, uyguladığımız konsantrasyon ve nanopartikülün fizikokimyasal özellikleri ve özellikle de kullanılan makrofaj hücrelerinin kaynağı oldukça önemli olup verilerin birbirinden farklılık göstermesine sebep olmaktadır. Buna göre de çalışmamızda kullanılan nanopartikülün özellikleri ve hücre hattı ele alındığında daha önce böyle bir çalışmaya rastlamadık.

Böylece kimyasal ve yeşil yöntemler ile sentezlenmiş TiO₂ ve Ag nanopartiküllerinin L929 ve J774 hücre hatları üzerindeki etkileri incelendi. TiO₂ ve Ag nanopartiküllerinin yanısıra ayrıca kombinasyonlarının da L929 ve J774 hücre hatları üzerindeki etkileri incelendi.

Son yıllarda nanoteknolojinin gelişmesi ile birlikte nanopartiküllerin tek tek kullanımının yanı sıra kombinasyonlarının da kullanılmaya başlanması oldukça önem kazanmaktadır. Bunun sebebi kombinasyonların kendisini oluşturan nanopartiküllerden farklı özellikler sergilemesi ve etkilerinin değişiklikler göstermesidir.

TiO₂@Ag nanopartikülü de son yıllarda antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi ile özellikle medikal alanlarda kullanımı için önerilebilmektedir. Bu nanopartikül kombinasyonu ile ilgili literatürde yer alan çalışmalar oldukça az olup somatik hücreler üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Buna göre de tez çalışmamızda TiO₂@Ag nanopartikülünün 1µg/mL-100 µg/mL konsantrasyon aralığında L929 ve J774 hücre hatları üzerindeki etkisini inceledik. L929 hücre hattı üzerinde proliferasyonu tüm konsantrasyonlarda yaklaşık %60-75 aralığında artırdığı gözlenen kombinasyonun J774 hücre hattı üzerinde ise belirgin bir etkisi olmadığı ancak sadece 10 µg/mL’de hücre canlılığında azalmaya (yaklaşık %20 oranında) sebep olduğu saptandı.

Kimyasal TiO₂ nanopartikülünün tek başına L929 hücre hattının proliferasyonuna etkisi olmaz iken kimyasal Ag nanopartikülünün hücre hattının canlılığını artırdığını belirtmiştik. TiO₂@Ag kombinasyonunun etkisine baktığımızda ise L929 hücre proliferasyonunu Ag nanopartikülünün tek başına yaptığından daha fazla oranda artırdığı gözlenmektedir. Ayrıca J774 hücre hattı üzerinde TiO₂ nanopartikülü artan konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu bir miktar inhibe etmiş ancak bu inhibisyon Ag nanopartikülünde sadece 100 µg/mL’de gözlenmiş idi. TiO₂@Ag nanopartikülünün etkisi incelendiğinde ise 10 µg/mL’nin hücrelerin inhibisyonunda en etkili konsantrasyon olduğu belirlenmiştir. Bu da kombine nanopartiküllerin etkilerinin kullanılan hücre hattı üzerinde değişiklik etkiler gösterebileceğini ve uygulanan konsantrasyonların da farklı sonuçlar sunabileceğini açıkça göstermektedir.

Çalışmanın daha sonraki aşamasında üretim sırasında toksik kalıntılar bırakmayan, daha kısa süren ve daha ekonomik olan yeşil yöntemler kullanılarak nanopartikül sentezi gerçekleştirildi. Yeşil uygulamalar ekolojik olarak zararsız olması nedeni ile oldukça önemli bir araştırma alanıdır. Bu nedenle çalışmanın bu aşamasında biz de yeşil yöntem ile sentezlenen nanopartiküllerin hücre hatları üzerindeki etkilerini inceledik.

Yeşil yöntem ile sentezlenen TiO₂ nanopartikülünün sırası ile L929 ve J774 hücre hatları üzerindeki etkilerini incelediğimizde, L929 hücrelerinin proliferasyonunda tüm konsantrasyonların az miktarda artışa neden olduğu görülürken sadece 20 µg/mL’de hücre proliferasyonunun 72 saatlik inkübasyon sürecinin sonunda %100 oranında artış

gösterdiği belirlendi. Literatürde kimyasal yöntem ile üretilen TiO₂ nanopartikülünden farklı olarak biyogenik TiO₂ nanopartikülünün somatik hücreler üzerindeki etkisine dair bilgiler oldukça yetersizdir. Yapılan bir çalışmada *Origanum vulgare* ile sentezlenen TiO₂ nanopartikülü ile muamele edilen rat modelinde yaralı bölgenin iyileşmesinde hız kazandırdığı gösterilmiştir. Fibroblast, makrofaj ve kolajen miktarını artıran biyogenik TiO₂ nanopartikülünün doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanımı için olumlu veriler sunulmuştur [198]. Elde edilen bu veriler de yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz verileri desteklemekte ve böylece doku mühendisliğinde kullanılmak üzere seçilen nanopartiküllerin konsantrasyonlarının da belirlenmesinin önemini göstermektedir. Biyogenik TiO₂ nanopartiküllerin J774 hücre hattı üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışma bulunmayıp yaptığımız deneylerde 10 µg/mL konsantrasyondaki nanopartikülün hücre proliferasyonunu yaklaşık %20 oranında artırdığı, diğer konsantrasyonların ise kontrol grubu ile paralel sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

Gümüş nanopartikülünün yaygın kullanımı ile birlikte yeşil yöntem ile sentezlenmesine dair çalışmalara olan ilgi de giderek artmaktadır. Biz de yaptığımız çalışmada L929 hücre hattı üzerinde biyogenik Ag nanopartiküllerinin artan konsantrasyon ile birlikte hücre canlılığını 72 saatlik inkübasyon sonunda %6 ila %23 oranına kadar artırdığını belirledik. Yapılan bir başka çalışmada *Nyctanthes arbortristis* ekstraktından elde edilen gümüş nanopartiküllerinin (5nm-20nm) L929 hücre hattına 24 saatlik uygulama sonrasında hücrelerin canlılıklarına devam ettiği, konsantrasyon arttıkça canlılıkta düşüş görüldüğü ve maksimum konsantrasyonda (250µg/mL) %83 oranında canlılığın devam ettiği belirtilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada gümüş nanopartikülünün adjuvan olarak aşı çalışmalarında da kullanılmaya başlandığı ve non-toksik veriler ile başarı elde edildiği rapor edilmiştir [199]. *Teucrium stocksianum* Bioss ile sentezlediğimiz Ag nanopartikülünün J774 hücre hattı üzerindeki etkisini incelediğimizde non-toksik özellik göstermiş ve 10 µg/mL konsantrasyonda hücre proliferasyonunda yaklaşık %15 artış elde edilmiştir. Literatürde biyogenik Ag nanopartikülünün J744 hücre hattı üzerinde yapılmış bir çalışması bulunmamakla beraber farklı kaynaklardan elde edilen makrofaj hücre hatları (RAW264.7) üzerinde anti-inflamatuvar etkisi *in vitro* olarak incelenmiş ve elde edilen sonuçlar düşük boyut (<10nm) ve yüksek konsantrasyon uygulamalarının hücreler üzerinde toksik etki gösterdiği ancak 10 nm'den büyük boyuttaki Ag

nanopartikülünün toksik etkisinin azaldığı ifade edilmiştir [199]. Bu veriler de elde ettiğimiz nanopartikülün boyut ve yüzey yükü göz önüne alındığında çalışmamızı destekler nitelikte olup daha önce J774 hücre hattı üzerinde bu konuda bir çalışma bulunmaması nedeni ile de bir ilk olmaktadır.

TiO₂ ve Ag nanopartiküllerinin tek tek yeşil sentez ile üretiminin yanısıra TiO₂@Ag nanopartikülü de biyojenik olarak elde edilmiştir. L929 hücre proliferasyonunu 1 µg/mL – 50 µg/mL konsantrasyon aralığında ortalama %27'lik bir artış göstermektedir. 100 µg/mL konsantrasyonda ise %17 oranında apoptoza neden olduğu tespit edildi. Biyojenik TiO₂@Ag nanopartikülünün J774 üzerinde tüm konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu azalttığı (ortalama %7), en fazla hücre ölümünün ise 1 µg/mL konsantrasyonda (%12) olduğu tespit edildi.

Biyojenik TiO₂ ve Ag nanopartikülleri tek tek hücre proliferasyonunda belli bir düzeye kadar ya da sadece tek bir konsantrasyonda artış sağlayabilirken bu nanopartikül kombinasyonu tek başına çok daha farklı bir etki göstermektedir. Ayrıca kimyasal TiO₂@Ag nanopartikülünden farklı olarak artan konsantrasyonda hücre ölümüne neden olmaktadır. Bunun nedeni yeşil sentez ile elde edilen nanopartiküllerin daha yüksek boyutu olarak gösterilebilir. Literatürde bu konu ile ilgili bir çalışma bulunmamakta olup ilk kez olarak tarafımızdan gerçekleştirilmiştir.

Nanopartiküllerin somatik hücreler üzerindeki etkilerinin incelenmesinin yanı sıra mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi de oldukça önemlidir. Biz de çalışmamızda kimyasal ve yeşil yöntem ile sentezlenen nanopartiküllerin ADMKH proliferasyonu ve farklılaşması üzerindeki etkilerini inceledik.

Yaptığımız çalışmalarda kimyasal TiO₂ nanopartikülünün farklı konsantrasyonlarının mezenkimal kök hücre canlılığı üzerinde farklı etkileri olduğu görüldü. 1 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyonda hücreler kontrol grubu ile benzerlik gösterirken en fazla proliferatif etki %7 oranında 10 µg/mL'lik konsantrasyonda belirlendi. 50 µg/mL - 100 µg/mL'de ise proliferasyonun bir miktar (%7 ve %5) azalma gösterdiği tespit edildi. Literatürde yer alan bir çalışmada elde ettiğimiz verileri destekler şekilde TiO₂ nanopartikülünün insan yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücreler üzerinde 625 nM konsantrasyona kadar toksik etki göstermediği belirtilmektedir [197].

Kimyasal Ag nanopartikülünün ADMKH üzerindeki etkilerine bakıldığında 1 µg/mL ($\approx$ %13) ve 20 µg/mL (%9) konsantrasyonlarda proliferasyonun kontrol grubuna nazaran daha fazla olduğu, 50 µg/mL ve 100 µg/mL’de kontrol grubu ile paralel olduğu ancak 10 µg/mL’de hücre canlılığını azalttığı belirlendi. Literatürde bu konu ile ilgili çalışmaların sınırlı olmasının yanında 100 nm çapındaki gümüş nanopartikülünün 5 µg/mL ve üzeri konsantrasyonlarda mezenkimal kök hücreler üzerinde toksik etki gösterdiği, nontoksik konsantrasyonlarda ise konsantrasyon arttıkça hücre aktivasyonunu (IL-8 salınımı) azalttığı bildirilmektedir [200].

Mezenkimal kök hücreler üzerinde kimyasal TiO₂@Ag nanopartikül kombinasyonun etkileri incelendiğinde ise tüm konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu etkin bir şekilde (yaklaşık %16’dan %28’e kadar) artırdığı görüldü. Literatürde bu konu ile ilgili bir çalışma bulunmayıp elde edilen veriler ilk kez olarak sunulmaktadır.

Yeşil yöntemler ile sentezlenen nanopartiküllerin mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkilerinin incelenmesi ise son yıllarda önem kazanan bir başka araştırma konusudur. Buna göre de nanopartiküllerin organizmaya girişi ile beraber doku ve organların devamlılığını sağlayan kök hücrelerin biyosentetez ile üretilen nanopartiküller ile etkileşiminin incelenmesi de oldukça önemlidir.

Yeşil yöntem ile sentezlenen TiO₂ nanopartikülünün ADMK hücrelerinin canlılığını tüm konsantrasyonlarda eşit olacak şekilde %8-9 oranında artırdığı yalnızca 50 µg/mL konsantrasyonda %3 oranında hücre proliferasyonlarında azalma olduğu görüldü. Literatürde bu konu ile ilgili bir çalışma bulunmaz iken kimyasal TiO₂ nanopartikülünün ADMKH etkisine kıyasla biyojenik TiO₂ NP hücreler üzerinde hemen hemen tüm konsantrasyonlarda proliferasyona olumlu etki göstermektedir.

Biyojenik gümüş nanopartikülünün ADMKH etkisine bakıldığında hücre canlılığında artan konsantrasyonlar ile birlikte kademeli olarak azalma görüldü ve en fazla inhibisyon 100 mg/mL konsantrasyonda %43 oranında olarak tespit edildi. Kimyasal sentez ile elde edilen Ag nanopartikülüne nazaran biyojenik Ag nanopartikülünün ADMKH üzerindeki apoptotik etkisinin oldukça fazla olduğu görülmektedir. Literatürde biyojenik Ag nanopartikülü ile ilgili az sayıda çalışma bulunmakla beraber spermatogoniyal kök hücreler üzerinde boyuta bağlı toksik etkilerinin olduğu rapor

edilmiştir [201]. Bu nedenle yapılan bu çalışma farklı dozlardaki yeşil Ag nanopartiküllerin ADMKH üzerindeki etkisinin incelenmesi açısından bir ilk olmaktadır.

Biyojenik TiO₂@Ag nanopartikülünün ADMKH canlılığında kullanılan konsantrasyonlar arttıkça hücre proliferasyonunu azalttığı görüldü. Biyojenik TiO₂@Ag nanopartikülünde bulunan TiO₂ ve Ag nanopartiküllerinin tek başlarına olan etkilerinden farklı bir etki göstermiştir. Literatürde bu konu ile ilgili çalışmalar son derece yetersizdir. Böylece ilk kez olarak gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada kombine nanopartiküllerin yeni birer nanopartiküller olarak kullanımının önemi ortaya çıkmaktadır.

Nanopartiküllerin kök hücrelerin proliferasyonları üzerine etkileri incelenirken merak edilen bir diğer konu da hücrelerin farklılaşmalarına olan etkileridir. Kimyasal ve yeşil yöntem ile sentezlenmiş nanopartiküllerin ADMK hücrelerinin adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları incelendi.

Yaptığımız çalışmalarda kimyasal TiO₂ nanopartikülünün 10 µg/mL konsantrasyonda adipojenik farklılaşmayı inhibe ettiği, ancak 20 µg/mL’de kontrol grubuna kıyasla çok daha fazla farklılaşmış hücrelerin bulunduğu mikroskopik olarak tespit edildi. Osteojenik farklılaşmaya olan etkiler incelendiğinde ise 1 µg/mL ve 10 µg/mL konsantrasyonda hücrelerin kontrol grubuna kıyasla daha fazla farklılaşmış hücre grupları içerdiği ancak artan konsantrasyonlarda plate içerisinde hücrelerin morfolojilerinde bozulmalar ile birlikte deadezyona uğradıkları saptandı. Biyomedikal ürünlerin tasarımında kullanılan titanyum nanopartiküllerinin insan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ile 3 hafta etkileşimi sonrasında %64 oranında kalsiyum birikimi olduğu [202], diğer taraftan bir başka çalışmada TiO₂ nanopartikülü ile kaplanmış implantların kullanımında sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin hücre adezyonunun ve osteojenik farklılaşmasının tetiklendiği rapor edilmektedir [203]. Biyomedikal alanlarda kullanımı artan TiO₂ nanopartikülünün etkileri incelendiğinde yüzey kaplama şekilde yapılan çalışmaların kalsifikasyonu artırması ile ilgili bilgiler bizi desteklerken, elde ettiğimiz verilerin hücre ortamına eklenen düşük konsantrasyonlarda ve belli bir boyut aralığında nanopartikül kullanımının farklı sonuçlara neden olması ile de diğer çalışmalardan farklı sonuçların alınmasına neden olmuştur.

Kimyasal Ag nanopartikülünün ADMKH farklılaşmasına etkisi incelendiğinde adipojenik farklılaşmanın kontrol grubuna kıyasla artan konsantrasyon ile birlikte hızlandığı ancak 50 µg/mL'lık konsantrasyondan itibaren hücrelerin bulundukları yüzeyden kalkarak deadezyona uğradıkları tespit edildi. Yapılan bir çalışmada Ag nanopartikülünün toksik olmayan konsantrasyonlarının mezenkimal kök hücreler üzerinde adipojenik farklılaştırmayı konsantrasyon arttıkça düşürdüğü tespit edilmiştir [204]. Böylece çalışmamız diğer araştırmalar tarafından da desteklenmektedir. Bir başka çalışmada ise biyomedikal ürünlerde antibakteriyal amaçlı kullanılan Ag nanopartiküllerinin (10nm-20 nm boyutu ve 10 µg/mL konsantrasyonda) kök hücre canlılığına minimal düzeyde etki ettiği ve adipojenik farklılaşmasına ise etkisinin olmadığı bildirilmiştir [205]. Ayrıca Ag NP'lerinin 80 nm'den büyük boyutlarda olduğu zaman 24 saatlik süre sonrasında hücre zarından girdikleri ancak nükleus içine giriş yapmadıkları ve endolizozomlar içerisinde agregatlar şeklinde bulundukları rapor edilmektedir [206]. Böylece yaptığımız çalışmalarda toksik etki göstermedikleri belirlenen Ag nanopartiküllerinin kullandığımız boyut ve dozların seçimi ile desteklendiği ve daha önce bu özelliklere sahip Ag NP'lerinin kullanılmaması nedeni ile de çalışmamızda elde edilen verilerin bir ilk olduğu ortaya çıkmaktadır. Ag NP'lerinin osteojenik farklılaşmaya olan etkileri incelendiğinde ise en fazla osteojenik farklılaşma en yüksek konsantrasyonda olarak, düşük konsantrasyonlardaki gruplarda çok sayıda hücrenin deadezyona uğradıkları tespit edildi. Ag NP'lerinin osteojenik farklılaşma üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmada NP'lerinin düşük boyut ve düşük konsantrasyonlarda (10 nm – 20 nm boyutu ve 10 µg/mL konsantrasyon) etkisinin olmadığı bildirilmiştir [207]. Yapılan bir başka çalışmada fare femoral bölgede meydana getirilen bir yaranın Ag nanopartikülü ile desteklenmiş biyomateryal sayesinde bölgenin iyileştiği ve osteojenezin hızla gerçekleştiği tespit edilmiştir [208]. Bir başka çalışmada da yine implantlarda antimikrobiyal etkinin artırılması amacı ile paslanmaz çelik yüzeye farklı boyutlarda Ag NP'lerinin işlenmesi ile yalnızca antimikrobiyal etkinliğin değil ayrıca osteojenik farklılaşmanın da arttığı tespit edilmiştir [209]. Diğer bir yandan Ag nanopartiküllerinin spesifik hücre fonksiyonlarını inhibe ederek ve osteokalsin üretimini bloke ederek osteojenik farklılaşmayı azalttığı rapor edilmiştir. Çalışmada 80nm boyutunda sırası ile 2,5µg/mL, 5µg/mL ve 10µg/mL konsantrasyonlarda uygulanan Ag nanopartikülünün

etkilerinin nanopartikülün yüzey fonksiyonelliğine, konsantrasyonuna, oksijen taşıma miktarına ve sıcaklığa bağlı olarak değişiklik gösterebileceğini belirtmiştir [210]. Buna göre de yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz verilerin diğer çalışmalarda kullanılan konsantrasyonlar ile birbirinden farklı olmasının esas nedeninin farklı konsantrasyonlarda osteojenik farklılaşmanın farklı etkiler göstermesinin tespit edilmesi ile diğer araştırmacılar tarafından da desteklenmektedir.

Kimyasal $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ nanopartikülünün ADMK hücrelerin adipojenik farklılaşmaya etkisini incelediğimizde kontrol grubunda farklılaşma normal seyrinde devam ederken 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyona kadar hücrelerin farklılaşmasında artış, 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de ise hücrelerin morfolojilerinde bozulmalar ve deadezyon meydana geldi. Osteojenik farklılaşmada ise kontrol grubuna kıyas ile en fazla farklılaşmış hücre 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda gözlenirken, 20 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda hücre farklılaşmasının oldukça düşük ve deadezyon miktarının fazla olduğu ortaya çıktı. Böylece doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen nanopartiküllerin türü, boyutu ve yüzey yükünün yanısıra uygun konsantrasyonun seçiminin önemi de ortaya çıkmaktadır.

Kimyasal nanopartiküllerin ve kombinasyonlarının kök hücreler üzerindeki etkileri incelenirken bu nanopartiküllerin yeşil olanlarının incelenmesi de son derece önemli ve gereklidir. Bu nedenle biz de çalışmada yeşil nanopartiküllerin ADMKH farklılaşmaları üzerindeki etkilerini inceledik.

Biyojenik TiO_2 nanopartikülünün adipojenik farklılaşmayı artırdığı konsantrasyon 1 $\mu\text{g/mL}$, inhibe ettiği konsantrasyon ise 100 $\mu\text{g/mL}$ iken diğer konsantrasyonlar kontrol grubu ile benzer farklılaşma süreci izlediler. Osteojenik farklılaşma için ise farklılaşmanın 50 $\mu\text{g/mL}$ ve 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda devam ettiği, kontrol grubu ile benzer özellik gösterdiği ancak düşük konsantrasyonlarda hücrelerin bulundukları flask yüzeyinden kalktıkları tespit edildi. Yeşil yöntem ile sentezlenen Ag NP'nde adipojenik farklılaşma 1 $\mu\text{g/mL}$ ve 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda artarken 20 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ ve 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda azalma görülmektedir. Farklılaşmada en fazla inhibisyon etkisi 50 $\mu\text{g/mL}$ 'de karşımıza çıkmaktadır. Hücrelerin biyojenik gümüş nanopartikülü ile maruziyetinde osteojenik olarak en fazla farklılaştıkları konsantrasyon

ise 100 µg/mL olarak görüldü, diğer konsantrasyonlarda hücrelerin canlılıklarını sürdürmelerine rağmen dahi farklılaşma oranlarının kontrol grubuna oranla daha az olduğu belirlendi. İnsan adipoz dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin adipojenik farklılaşmasını en fazla indükleyen konsantrasyonun 50 µg/mL olduğu tespit edildi. Bu indüksiyonu takiben 10 µg/mL konsantrasyondaki TiO₂@Ag ve 20 µg/mL konsantrasyona sahip TiO₂ NP gelmektedir. Aşağıdaki tabloda görüleceği gibi farklılaşma üzerinde inhibe edici NP ise biyojenik Ag NP (50 µg/mL) olmuştur. Osteojenik farklılaşmada ise hücrelerin uygulanan tüm konsantrasyonlar sonrasında hücre morfolojilerinin bozulmasını takiben flask tabanından kalkarak farklılaşma sürecine giremedikleri belirlendi. Böylece gümüş nanopartiküllerin biyomedikal ürün tasarımlarında kullanımı önerilmiştir [211].

Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen bilgiler ışığında farklı nanopartiküllerin farklı sentez yöntemleri ile üretilmesi, farklı hücre hatlarının kriyobanktan çıkarılarak laboratuvar şartlarına adapte edilerek devamlı hücre kültürlerinin elde edilmesi ve nanopartiküllerin hücre hatları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen sonuçlar TÜBİTAK tarafından yayınlanan 2003-2023 Teknoloji Öngörü Çalışmasında, Türkiye’de kök hücre teknolojilerinin geliştirilmesi ve kök hücrelerin özellikle rejeneratif tıp uygulamalarında kullanılabilir hale gelmesi gerekliliği ve nanoteknolojik çalışmaların geliştirilmesi talebine de uygun olarak yapılmıştır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Sonuç Değerlendirmesi

Çalışmamızda dünyada ve ülkemizde ilk kez olarak TiO_2 , Ag ve bu iki nanopartikülün kompoziti olan $\text{TiO}_2@\text{Ag}$ nanopartikülü hem kimyasal ve hem de yeşil yöntem ile sentezlendi. Nanopartiküller dünyada ilk kez *Teucrium stocksianum* Bioss bitkisi kullanılarak biyojenik olarak elde edildi. Hem kimyasal hem de yeşil yöntem ile elde edilen bu nanopartiküllerin beş farklı konsantrasyonları kullanılarak somatik (L929 ve J774) ve adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin (ADMKH) proliferasyonlarına etkileri incelendi. Daha sonra nanopartiküllerin aynı konsantrasyonlarının mezenkimal kök hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları üzerindeki etkileri gözlemlendi. Kimyasal ve yeşil yöntem ile sentezlenmiş nanopartiküllerin hücrelerin canlılıklarına olan etkilerinin farklı sonuçlara neden olduğu tespit edildi. Ayrıca bu nanopartiküllerin etkileri kullanılan hücre hattı ve kullanılan doza bağlı olarak proliferasyon ve diferasyonda farklılıkların meydana geldiği de ortaya koyuldu.

5.2 Öneriler

Nanopartiküllerin kullanılacağı alana ve etki edeceği çevreye/organizmalara bağlı olarak uygun hücre hatlarının belirlenmesi, nanopartiküllerin farklı boyut ve dozlarda kullanılarak non-toksik değerlerinin tespit edilmesi, nanopartikül kombinasyonlarının

tek tek nanopartiküllerden farklı özelliklere sahip olması nedeni ile yeni alanlarda kullanımının tercih edilebileceği önerilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Shaddack, Chemical structure of Trypan blue, C. Draw, ed^eds. PNG.
- [2] Yükseltürk, A., (2009). Nanoteknolojinin Tarihçesi, www.nanoturkiye.net, 15 Mayıs 2014.
- [3] Shams, S. Mohsin, S. Nasir, G.A. Khan, M. ve Khan, S.N., (2015). "Mesenchymal Stem Cells Pretreated with HGF and FGF4 Can Reduce Liver Fibrosis in Mice", Stem Cells Int, 2015: 747245.
- [4] Cüce, M., (2009). "Nanoteknoloji", Journal, 4.
- [5] Yükseltürk, A., (2008). Taramalı Tünelleme Mikroskopu.
- [6] Nanobilim ve Nanoteknolojide Türkiye'nin Bir Mükemmeliyet Merkezi, Bilim ve Teknik Dergisi, 2016:2.
- [7] Zhao, J. ve Castranova, V., (2011). "Toxicology of nanomaterials used in nanomedicine", J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 14: 593-632.
- [8] Suri, S.S. Fenniri, H. ve Singh, B., (2007). "Nanotechnology-based drug delivery systems", J Occup Med Toxicol, 2: 16.
- [9] C.N.R. Rao, A.K.C., (2006). Materials Science at the Nanoscale, Y. Gogotsi, ed. Nanomaterials Handbook. London: Taylor & Francis Group.
- [10] Goldstain, A., (1997). Handbook of Nanophase Materials, C.N.R.M. Rao, A. Cheetham, A. K, ed. The Chemistry of Nanomaterials Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA.
- [11] Li, X. Hu, D. Dang, Y. Chen, H. Roco, M.C. Larson, C.A. ve Chan, J., (2009). "Nano Mapper: an Internet knowledge mapping system for nanotechnology development", J Nanopart Res, 11: 529-552.
- [12] Service, R.F., (2005). "Nanotechnology. Calls rise for more research on toxicology of nanomaterials", Science, 310: 1609.
- [13] Makarov, V.V. Love, A.J. Sinitsyna, O.V. Makarova, S.S. Yaminsky, I.V. Taliansky, M.E. ve Kalinina, N.O., (2014). ""Green" nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants", Acta Naturae, 6: 35-44.
- [14] Curtis, A. ve Wilkinson, C., (2001). "Nanotechniques and approaches in biotechnology", Trends Biotechnol, 19: 97-101.

- [15] Tiller, J.C. Liao, C.J. Lewis, K. ve Klibanov, A.M., (2001). "Designing surfaces that kill bacteria on contact", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 5981-5985.
- [16] Taylor, P.L. Ussher, A.L. ve Burrell, R.E., (2005). "Impact of heat on nanocrystalline silver dressings. Part I: Chemical and biological properties", *Biomaterials*, 26: 7221-7229.
- [17] Tepeközcan, A., (2013). İndiumtinoksit ve Bizmut(III)oksit Nanomateryallerinin Mutajenik Özelliklerinin Ames Test ile Araştırılması, ed^eds. Biology. Afyon: Afyon Kocatepe 15.
- [18] Chen, H. Titushkin, I. Strosio, M. ve Cho, M., (2007). "Altered membrane dynamics of quantum dot-conjugated integrins during osteogenic differentiation of human bone marrow derived progenitor cells", *Biophys J*, 92: 1399-1408.
- [19] Muller, L. Riediker, M. Wick, P. Mohr, M. Gehr, P. ve Rothen-Rutishauser, B., (2010). "Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways", *J R Soc Interface*, 7 Suppl 1: S27-40.
- [20] Health, N.I.O., Roadmap for Medical Research: Nanomedicine, <http://nihroadmap.nih.gov/nanomedicine/>, 3 Ocak 2014.
- [21] Oberdorster, G., (2010). "Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology", *J Intern Med*, 267: 89-105.
- [22] Nepple, K.G. Yang, L. Grubb 3rd, R.L. ve Strobe, S.A., (2012). "Population Based Analysis of the Increasing Incidence of Kidney Cancer in the United States: Evaluation of Age Specific Trends From 1975 to 2006", *The Journal of Urology*, 187: 32-38.
- [23] Lansdown, A.B., (2002). "Metallothioneins: potential therapeutic aids for wound healing in the skin", *Wound Repair Regen*, 10: 130-132.
- [24] Morones, J.R. Elechiguerra, J.L. Camacho, A. Holt, K. Kouri, J.B. Ramirez, J.T. ve Yacaman, M.J., (2005). "The bactericidal effect of silver nanoparticles", *Nanotechnology*, 16: 2346-2353.
- [25] Panacek, A. Kvitek, L. Prucek, R. Kolar, M. Vecerova, R. Pizurova, N. Sharma, V.K. Nevecna, T. ve Zboril, R., (2006). "Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity", *J Phys Chem B*, 110: 16248-16253.
- [26] Sakthivel, S. Shankar, M.V. Palanichamy, M. Arabindoo, B. Bahnemann, D.W. ve Murugesan, V., (2004). "Enhancement of photocatalytic activity by metal deposition: characterisation and photonic efficiency of Pt, Au and Pd deposited on TiO₂ catalyst", *Water Res*, 38: 3001-3008.
- [27] Accomasso, L. Gallina, C. Turinetti, V. ve Giachino, C., (2016). "Stem Cell Tracking with Nanoparticles for Regenerative Medicine Purposes: An Overview", *Stem Cells Int*, 2016: 7920358.

- [28] Allahverdiyev, A.M. Abamor, E.S. Bagirova, M. Baydar, S.Y. Ates, S.C. Kaya, F. Kaya, C. ve Rafailovich, M., (2013). "Investigation of antileishmanial activities of Tio2@Ag nanoparticles on biological properties of *L. tropica* and *L. infantum* parasites, in vitro", *Exp Parasitol*, 135: 55-63.
- [29] Asharani, P.V. Lian Wu, Y. Gong, Z. ve Valiyaveetil, S., (2008). "Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models", *Nanotechnology*, 19: 255102.
- [30] Freitas, R.A., Jr., (2005). "What is nanomedicine?", *Nanomedicine*, 1: 2-9.
- [31] ISO (International Organisation for Standardization)/TS27687:2008, Nanotechnologies-Terminology and Definitions for nano objects- nanoparticle, nanofibre and nanoplate, http://www.iso.org/iso/iso_catalogue.htm, 30 Haziran 2015.
- [32] Roursgaard, M., (2009). Inflammatory effects of nanoparticles in lungs of mice.
- [33] Hyung, W. Ko, H. Park, J. Lim, E. Park, S.B. Park, Y.J. Yoon, H.G. Suh, J.S. Haam, S. ve Huh, Y.M., (2008). "Novel hyaluronic acid (HA) coated drug carriers (HDCs) for human breast cancer treatment", *Biotechnol Bioeng*, 99: 442-454.
- [34] Hu, Y. Fine, D.H. Tasciotti, E. Bouamrani, A. ve Ferrari, M., (2011). "Nanodevices in diagnostics", *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 3: 11-32.
- [35] Medintz, I.L. Mattoussi, H. ve Clapp, A.R., (2008). "Potential clinical applications of quantum dots", *Int J Nanomedicine*, 3: 151-167.
- [36] Ullah, R. ve Dutta, J., (2008). "Photocatalytic degradation of organic dyes with manganese-doped ZnO nanoparticles", *J Hazard Mater*, 156: 194-200.
- [37] Berger, M., (2007). "Nanotechnology risk assessment could benefit from nanoparticle categorization framework read more: Nanotechnology risk assessment could benefit from nanoparticle categorization framework ", Available at. Accessed.
- [38] Swai, H. Semete, B. Kalombo, L. Chelule, P. Kisich, K. ve Sievers, B., (2009). "Nanomedicine for respiratory diseases", *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 1: 255-263.
- [39] Pan, Z. Lee, W. Slutsky, L. Clark, R.A. Pernodet, N. ve Rafailovich, M.H., (2009). "Adverse effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells", *Small*, 5: 511-520.
- [40] Xu, J. Sun, Y. Huang, J. Chen, C. Liu, G. Jiang, Y. Zhao, Y. ve Jiang, Z., (2007). "Photokilling cancer cells using highly cell-specific antibody-TiO(2) bioconjugates and electroporation", *Bioelectrochemistry*, 71: 217-222.
- [41] Sauer, U.G., (2009). "Animal and non-animal experiments in nanotechnology - the results of a critical literature survey", *ALTEX*, 26: 109-128.
- [42] Kavaz, D., (2011). Nanopartiküller, Nanobülten. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 12-19.

- [43] Donaldson, K. Stone, V. Tran, C.L. Kreyling, W. ve Borm, P.J., (2004). "Nanotoxicology", *Occup Environ Med*, 61: 727-728.
- [44] Oberdorster, G. Oberdorster, E. ve Oberdorster, J., (2005). "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles", *Environ Health Perspect*, 113: 823-839.
- [45] Donaldson, K. ve Stone, V., (2003). "Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles", *Ann Ist Super Sanita*, 39: 405-410.
- [46] Moss, O.R. ve Wong, V.A., (2006). "When nanoparticles get in the way: impact of projected area on in vivo and in vitro macrophage function", *Inhal Toxicol*, 18: 711-716.
- [47] Greish, K. Thiagarajan, G. Herd, H. Price, R. Bauer, H. Hubbard, D. Burckle, A. Sadekar, S. Yu, T. Anwar, A. Ray, A. ve Ghandehari, H., (2012). "Size and surface charge significantly influence the toxicity of silica and dendritic nanoparticles", *Nanotoxicology*, 6: 713-723.
- [48] Khare, P. Sonane, M. Nagar, Y. Moin, N. Ali, S. Gupta, K.C. ve Satish, A., (2014). "Size dependent toxicity of zinc oxide nano-particles in soil nematode *Caenorhabditis elegans*", *Nanotoxicology*: 1-10.
- [49] Yang, H.N. Park, J.S. Jeon, S.Y. Park, W. Na, K. ve Park, K.H., (2014). "The effect of quantum dot size and poly(ethylenimine) coating on the efficiency of gene delivery into human mesenchymal stem cells", *Biomaterials*, 35: 8439-8449.
- [50] Angeli, E. Buzio, R. Firpo, G. Magrassi, R. Mussi, V. Repetto, L. ve Valbusa, U., (2008). "Nanotechnology applications in medicine", *Tumori*, 94: 206-215.
- [51] Iavicoli, I. Leso, V. Fontana, L. ve Bergamaschi, A., (2011). "Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies", *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 15: 481-508.
- [52] Nielsen, G.D. Roursgaard, M. Jensen, K.A. Poulsen, S.S. ve Larsen, S.T., (2008). "In vivo biology and toxicology of fullerenes and their derivatives", *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 103: 197-208.
- [53] Asharani, P.V. Hande, M.P. ve Valiyaveetil, S., (2009). "Anti-proliferative activity of silver nanoparticles", *BMC Cell Biol*, 10: 65.
- [54] Braydich-Stolle, L. Hussain, S. Schlager, J.J. ve Hofmann, M.C., (2005). "In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells", *Toxicol Sci*, 88: 412-419.
- [55] Greulich, C. Diendorf, J. Simon, T. Eggeler, G. Epple, M. ve Köller, M., (2011). "Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells", *Acta Biomaterialia*, 7: 347-354.
- [56] Berry, C.C. Wells, S. Charles, S. Aitchison, G. ve Curtis, A.S., (2004). "Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation", *Biomaterials*, 25: 5405-5413.

- [57] de la Fuente, J.M. Berry, C.C. Riehle, M.O. ve Curtis, A.S., (2006). "Nanoparticle targeting at cells", *Langmuir*, 22: 3286-3293.
- [58] El-Sadik, A.O. El-Ansary, A. ve Sabry, S.M., (2010). "Nanoparticle-labeled stem cells: a novel therapeutic vehicle", *Clin Pharmacol*, 2: 9-16.
- [59] Schafer, D.A., (2002). "Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis", *Curr Opin Cell Biol*, 14: 76-81.
- [60] Chithrani, B.D. Stewart, J. Allen, C. ve Jaffray, D.A., (2009). "Intracellular uptake, transport, and processing of nanostructures in cancer cells", *Nanomedicine*, 5: 118-127.
- [61] Verma, A. ve Stellacci, F., (2010). "Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions", *Small*, 6: 12-21.
- [62] Cho, W.S. Cho, M. Jeong, J. Choi, M. Cho, H.Y. Han, B.S. Kim, S.H. Kim, H.O. Lim, Y.T. Chung, B.H. ve Jeong, J., (2009). "Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles", *Toxicol Appl Pharmacol*, 236: 16-24.
- [63] Tran, D.N. Ota, L.C. Jacobson, J.D. Patton, W.C. ve Chan, P.J., (2007). "Influence of nanoparticles on morphological differentiation of mouse embryonic stem cells", *Fertil Steril*, 87: 965-970.
- [64] Liu, K.K. Wang, C.C. Cheng, C.L. ve Chao, J.I., (2009). "Endocytic carboxylated nanodiamond for the labeling and tracking of cell division and differentiation in cancer and stem cells", *Biomaterials*, 30: 4249-4259.
- [65] Wang, L. Deng, J. Wang, J. Xiang, B. Yang, T. Gruwel, M. Kashour, T. Tomanek, B. Summer, R. Freed, D. Jassal, D.S. Dai, G. Glogowski, M. Deslauriers, R. Arora, R.C. ve Tian, G., (2009). "Superparamagnetic iron oxide does not affect the viability and function of adipose-derived stem cells, and superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging identifies viable cells", *Magn Reson Imaging*, 27: 108-119.
- [66] Chang, J.C. Su, H.L. ve Hsu, S.H., (2008). "The use of peptide-delivery to protect human adipose-derived adult stem cells from damage caused by the internalization of quantum dots", *Biomaterials*, 29: 925-936.
- [67] Ostrowski, A. Nordmeyer, D. Boreham, A. Holzhausen, C. Mundhenk, L. Graf, C. Meinke, M.C. Vogt, A. Hadam, S. Lademann, J. Ruhl, E. Alexiev, U. ve Gruber, A.D., (2015). "Overview about the localization of nanoparticles in tissue and cellular context by different imaging techniques", *Beilstein J Nanotechnol*, 6: 263-280.
- [68] Crissman, J.W. Goodman, D.G. Hildebrandt, P.K. Maronpot, R.R. Prater, D.A. Riley, J.H. Seaman, W.J. ve Thake, D.C., (2004). "Best practices guideline: toxicologic histopathology", *Toxicol Pathol*, 32: 126-131.
- [69] Kittel, B. Ruehl-Fehlert, C. Morawietz, G. Klapwijk, J. Elwell, M.R. Lenz, B. O'Sullivan, M.G. Roth, D.R. ve Wadsworth, P.F., (2004). "Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups", *Exp Toxicol Pathol*, 55: 413-431.

- [70] Hubbs, A.F. Sargent, L.M. Porter, D.W. Sager, T.M. Chen, B.T. Frazer, D.G. Castranova, V. Sriram, K. Nurkiewicz, T.R. Reynolds, S.H. Battelli, L.A. Schwegler-Berry, D. McKinney, W. Fluharty, K.L. ve Mercer, R.R., (2013). "Nanotechnology: toxicologic pathology", *Toxicol Pathol*, 41: 395-409.
- [71] Porter, D.W. Hubbs, A.F. Mercer, R.R. Wu, N. Wolfarth, M.G. Sriram, K. Leonard, S. Battelli, L. Schwegler-Berry, D. Friend, S. Andrew, M. Chen, B.T. Tsuruoka, S. Endo, M. ve Castranova, V., (2010). "Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes", *Toxicology*, 269: 136-147.
- [72] van Landeghem, F.K. Maier-Hauff, K. Jordan, A. Hoffmann, K.T. Gneveckow, U. Scholz, R. Thiesen, B. Bruck, W. ve von Deimling, A., (2009). "Post-mortem studies in glioblastoma patients treated with thermotherapy using magnetic nanoparticles", *Biomaterials*, 30: 52-57.
- [73] Adachi, K. Yamada, N. Yamamoto, K. Yoshida, Y. ve Yamamoto, O., (2010). "In vivo effect of industrial titanium dioxide nanoparticles experimentally exposed to hairless rat skin", *Nanotoxicology*, 4: 296-306.
- [74] Marquis, B.J. Love, S.A. Braun, K.L. ve Haynes, C.L., (2009). "Analytical methods to assess nanoparticle toxicity", *Analyst*, 134: 425-439.
- [75] Liu, H. Liu, T. Wang, H. Li, L. Tan, L. Fu, C. Nie, G. Chen, D. ve Tang, F., (2013). "Impact of PEGylation on the biological effects and light heat conversion efficiency of gold nanoshells on silica nanorattles", *Biomaterials*, 34: 6967-6975.
- [76] Riehemann, K. Schneider, S.W. Luger, T.A. Godin, B. Ferrari, M. ve Fuchs, H., (2009). "Nanomedicine--challenge and perspectives", *Angew Chem Int Ed Engl*, 48: 872-897.
- [77] Pawley, J., (1997). "The development of field-emission scanning electron microscopy for imaging biological surfaces", *Scanning*, 19: 324-336.
- [78] Hollister, L.S. Bindi, L. Yao, N. Poirier, G.R. Andronicos, C.L. MacPherson, G.J. Lin, C. Distler, V.V. Eddy, M.P. Kostin, A. Kryachko, V. Steinhardt, W.M. Yudovskaya, M. Eiler, J.M. Guan, Y. Clarke, J.J. ve Steinhardt, P.J., (2014). "Impact-induced shock and the formation of natural quasicrystals in the early solar system", *Nat Commun*, 5: 4040.
- [79] Hubbs, A.F. Mercer, R.R. Benkovic, S.A. Harkema, J. Sriram, K. Schwegler-Berry, D. Goravanahally, M.P. Nurkiewicz, T.R. Castranova, V. ve Sargent, L.M., (2011). "Nanotoxicology--a pathologist's perspective", *Toxicol Pathol*, 39: 301-324.
- [80] Fagerland, J.A. Wall, H.G. Pandher, K. LeRoy, B.E. ve Gagne, G.D., (2012). "Ultrastructural analysis in preclinical safety evaluation", *Toxicol Pathol*, 40: 391-402.
- [81] Kempen, P.J. Thakor, A.S. Zavaleta, C. Gambhir, S.S. ve Sinclair, R., (2013). "A scanning transmission electron microscopy approach to analyzing large volumes of tissue to detect nanoparticles", *Microsc Microanal*, 19: 1290-1297.

- [82] Aktaş, F., Nanopartikül üretiminde kullanılan yaklaşımlar, <http://forum.malzembilimi.net/index.php?topic=548.0>, 14 Mayıs 2015.
- [83] Gürmen, S.E., Burçak "Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri - 1", Journal: 31-38.
- [84] Hussain, I. Singh, N.B. Singh, A. Singh, H. ve Singh, S.C., (2016). "Green synthesis of nanoparticles and its potential application", Biotechnol Lett, 38: 545-560.
- [85] Kavaz, D., (2013). "Nanopartiküller", Hacettepe Nanobülten, 13: 14-15.
- [86] Üçüncü Tunca, E., (2015). "Nanoteknolojinin Temeli Nanopartiküller ve Nanopartiküllerin Fitoremediasyonu", Ordu University Journal of Science Technology, 5: 23-34.
- [87] Marshall, A.T. ve Haverkamp, R.G., (2008). "Production of hydrogen by the electrochemical reforming of glycerol–water solutions in a PEM electrolysis cell", International Journal of Hydrogen Energy, 33: 4649-4654.
- [88] Parsons, J.G. Gardea-Torresdey, J.L. Tiemann, K.J. Gonzalez, J.H. Peralta-Videa, J.R. Gomez, E. ve Herrera, I., (2002). "Absorption and emission spectroscopic investigation of the phyto-extraction of europium(III) nitrate from aqueous solutions by alfalfa biomass", Microchemical Journal, 71: 175-183.
- [89] D., P., (2010). "Green synthesis of gold and silver nanoparticles using Hibiscus rosa sinensis", Physica E, 42: 1417-1424.
- [90] Duan, H. Wang, D. ve Li, Y., (2015). "Green chemistry for nanoparticle synthesis", Chem Soc Rev, 44: 5778-5792.
- [91] Carlos, L.v.C., J. , (2006). Temel Histoloji: Nobel Tıp Kitapları.
- [92] Ozban, N., (1982). Hücre, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları
- [93] Time, D., Zygote, An early stage of a zygote, dreamstime.com, 13 Ekim 2016.
- [94] Saber, S.E., (2009). "Tissue engineering in endodontics", J Oral Sci, 51: 495-507.
- [95] Pribluda, A. Elyada, E. Wiener, Z. Hamza, H. Goldstein, Robert E. Biton, M. Burstain, I. Morgenstern, Y. Brachya, G. Billauer, H. Biton, S. Snir-Alkalay, I. Vucic, D. Schlereth, K. Mernberger, M. Stiewe, T. Oren, M. Alitalo, K. Pikarsky, E. ve Ben-Neriah, Y., (2013). "A Senescence-Inflammatory Switch from Cancer-Inhibitory to Cancer-Promoting Mechanism", Cancer Cell, 24: 242-256.
- [96] Lee, E.S. Gao, Z. ve Bae, Y.H., (2008). "Recent progress in tumor pH targeting nanotechnology", J Control Release, 132: 164-170.
- [97] Maugeri-Sacca, M. Vici, P. Di Lauro, L. Barba, M. Amoreo, C.A. Gallo, E. Mottolese, M. ve De Maria, R., (2014). "Cancer stem cells: are they responsible for treatment failure?", Future Oncol, 10: 2033-2044.
- [98] Baek, S.J. Ishii, H. Tamari, K. Hayashi, K. Nishida, N. Konno, M. Kawamoto, K. Koseki, J. Fukusumi, T. Hasegawa, S. Ogawa, H. Hamabe, A. Miyo, M.

- Noguchi, K. Seo, Y. Doki, Y. Mori, M. ve Ogawa, K., (2015). "Cancer stem cells: The potential of carbon ion beam radiation and new radiosensitizers (Review)", *Oncol Rep*, 34: 2233-2237.
- [99] Hardavella, G. George, R. ve Sethi, T., (2016). "Lung cancer stem cells-characteristics, phenotype", *Transl Lung Cancer Res*, 5: 272-279.
- [100] Wang, Y.X. Hussain, S.M. ve Krestin, G.P., (2001). "Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging", *Eur Radiol*, 11: 2319-2331.
- [101] Tapp, H. Hanley, E.N., Jr. Patt, J.C. ve Gruber, H.E., (2009). "Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair", *Exp Biol Med (Maywood)*, 234: 1-9.
- [102] Gimble, J.M. Katz, A.J. ve Bunnell, B.A., (2007). "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine", *Circ Res*, 100: 1249-1260.
- [103] Caplan, A.I., (2007). "Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine", *J Cell Physiol*, 213: 341-347.
- [104] Gadkari, R. Zhao, L. Teklemariam, T. ve Hantash, B.M., (2014). "Human embryonic stem cell derived-mesenchymal stem cells: an alternative mesenchymal stem cell source for regenerative medicine therapy", *Regen Med*, 9: 453-465.
- [105] Hosseinkhani, M. Shirazi, R. Rajaei, F. Mahmoudi, M. Mohammadi, N. ve Abbasi, M., (2013). "Engineering of the embryonic and adult stem cell niches", *Iran Red Crescent Med J*, 15: 83-92.
- [106] Ross, C.A. ve Akimov, S.S., (2014). "Human-induced pluripotent stem cells: potential for neurodegenerative diseases", *Hum Mol Genet*, 23: R17-26.
- [107] Pittenger, M.F. Mackay, A.M. Beck, S.C. Jaiswal, R.K. Douglas, R. Mosca, J.D. Moorman, M.A. Simonetti, D.W. Craig, S. ve Marshak, D.R., (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells", *Science*, 284: 143-147.
- [108] Mitalipov, S. ve Wolf, D., (2009). "Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming", *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 114: 185-199.
- [109] Sarugaser, R. Hanoun, L. Keating, A. Stanford, W.L. ve Davies, J.E., (2009). "Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy", *PLoS One*, 4: e6498.
- [110] Hong, K.U. Reynolds, S.D. Watkins, S. Fuchs, E. ve Stripp, B.R., (2004). "In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations", *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286: L643-649.
- [111] Huang, G.T. Gronthos, S. ve Shi, S., (2009). "Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine", *J Dent Res*, 88: 792-806.
- [112] Watt, F.M. ve Driskell, R.R., (2010). "The therapeutic potential of stem cells", *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365: 155-163.

- [113] Placzek, M.R. Chung, I.M. Macedo, H.M. Ismail, S. Mortera Blanco, T. Lim, M. Cha, J.M. Fauzi, I. Kang, Y. Yeo, D.C. Ma, C.Y. Polak, J.M. Panoskaltsis, N. ve Mantalaris, A., (2009). "Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles", *J R Soc Interface*, 6: 209-232.
- [114] Vogelstein, B. Alberts, B. ve Shine, K., (2002). "Genetics. Please don't call it cloning!", *Science*, 295: 1237.
- [115] Ezech, U.I. Turek, P.J. Reijo, R.A. ve Clark, A.T., (2005). "Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma", *Cancer*, 104: 2255-2265.
- [116] Okita, K. Ichisaka, T. ve Yamanaka, S., (2007). "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells", *Nature*, 448: 313-317.
- [117] Okita, K. Nakagawa, M. Hyenjong, H. Ichisaka, T. ve Yamanaka, S., (2008). "Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors", *Science*, 322: 949-953.
- [118] Takahashi, K. ve Yamanaka, S., (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors", *Cell*, 126: 663-676.
- [119] Hodgkinson, T. Yuan, X.F. ve Bayat, A., (2009). "Adult stem cells in tissue engineering", *Expert Rev Med Devices*, 6: 621-640.
- [120] Brignier, A.C. ve Gewirtz, A.M., (2010). "Embryonic and adult stem cell therapy", *J Allergy Clin Immunol*, 125: S336-344.
- [121] Madonna, R. ve De Caterina, R., (2010). "Adipose tissue: a new source for cardiovascular repair", *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 11: 71-80.
- [122] Reinecke, H. Minami, E. Zhu, W.Z. ve Laflamme, M.A., (2008). "Cardiogenic differentiation and transdifferentiation of progenitor cells", *Circ Res*, 103: 1058-1071.
- [123] Kim, T.H. Lee, H.M. Lee, S.H. Choe, H. Kim, H.K. Lee, J.H. Oh, K.H. ve Lee, S.H., (2009). "Expression and distribution patterns of the stem cell marker, nestin, and the stem cell renewal factor, BMI-1, in normal human nasal mucosa and nasal polyps", *Acta Otolaryngol*, 129: 996-1001.
- [124] Korbling, M. ve Anderlini, P., (2001). "Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter?", *Blood*, 98: 2900-2908.
- [125] Friedenstein, A.J., (1976). "Precursor cells of mechanocytes", *Int Rev Cytol*, 47: 327-359.
- [126] Yang, J.Y. Yang, M.Q. Arabnia, H.R. ve Deng, Y., (2008). "Genomics, molecular imaging, bioinformatics, and bio-nano-info integration are synergistic components of translational medicine and personalized healthcare research", *BMC Genomics*, 9 Suppl 2: I1.

- [127] Zhang, A.P. ve Sun, Y.P., (2004). "Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells", *World J Gastroenterol*, 10: 3191-3193.
- [128] Andersen, H.B. Holm, M. Hetland, T.E. Dahl, C. Junker, S. Schiotz, P.O. ve Hoffmann, H.J., (2008). "Comparison of short term in vitro cultured human mast cells from different progenitors - Peripheral blood-derived progenitors generate highly mature and functional mast cells", *J Immunol Methods*, 336: 166-174.
- [129] Trivedi, P. ve Hematti, P., (2008). "Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells", *Exp Hematol*, 36: 350-359.
- [130] Dazzi, F. ve Marelli-Berg, F.M., (2008). "Mesenchymal stem cells for graft-versus-host disease: close encounters with T cells", *Eur J Immunol*, 38: 1479-1482.
- [131] Gotherstrom, C. Ringden, O. Tammik, C. Zetterberg, E. Westgren, M. ve Le Blanc, K., (2004). "Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells", *Am J Obstet Gynecol*, 190: 239-245.
- [132] Brooke, G. Tong, H. Levesque, J.P. ve Atkinson, K., (2008). "Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta", *Stem Cells Dev*, 17: 929-940.
- [133] D'Agostino, B. Sullo, N. Siniscalco, D. De Angelis, A. ve Rossi, F., (2010). "Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease", *Expert Opin Biol Ther*, 10: 681-687.
- [134] Kogler, G. Radke, T.F. Lefort, A. Sensken, S. Fischer, J. Sorg, R.V. ve Wernet, P., (2005). "Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells", *Exp Hematol*, 33: 573-583.
- [135] Liao, T.S. Yurgelun, M.B. Chang, S.S. Zhang, H.Z. Murakami, K. Blaine, T.A. Parisien, M.V. Kim, W. Winchester, R.J. ve Lee, F.Y., (2005). "Recruitment of osteoclast precursors by stromal cell derived factor-1 (SDF-1) in giant cell tumor of bone", *J Orthop Res*, 23: 203-209.
- [136] Sammons, J. Ahmed, N. El-Sheemy, M. ve Hassan, H.T., (2004). "The role of BMP-6, IL-6, and BMP-4 in mesenchymal stem cell-dependent bone development: effects on osteoblastic differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D(3)", *Stem Cells Dev*, 13: 273-280.
- [137] Baddoo, M. Hill, K. Wilkinson, R. Gaupp, D. Hughes, C. Kopen, G.C. ve Phinney, D.G., (2003). "Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection", *J Cell Biochem*, 89: 1235-1249.
- [138] Pistoia, V. ve Raffaghello, L., (2010). "Potential of mesenchymal stem cells for the therapy of autoimmune diseases", *Expert Rev Clin Immunol*, 6: 211-218.

- [139] Raoufi, M.F. Tajik, P. Dehghan, M.M. Eini, F. ve Barin, A., (2011). "Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord blood", *Reprod Domest Anim*, 46: 95-99.
- [140] Shetty, P. Cooper, K. ve Viswanathan, C., (2010). "Comparison of proliferative and multilineage differentiation potentials of cord matrix, cord blood, and bone marrow mesenchymal stem cells", *Asian J Transfus Sci*, 4: 14-24.
- [141] Zhou, S. Greenberger, J.S. Epperly, M.W. Goff, J.P. Adler, C. Leboff, M.S. ve Glowacki, J., (2008). "Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts", *Aging Cell*, 7: 335-343.
- [142] Gucciardo, L. Lories, R. Ochsenbein-Kolble, N. Done, E. Zwijsen, A. ve Deprest, J., (2009). "Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potential use in perinatology and regenerative medicine", *Bjog*, 116: 166-172.
- [143] Jo, C.H. Kim, O.S. Park, E.Y. Kim, B.J. Lee, J.H. Kang, S.B. Lee, J.H. Han, H.S. Rhee, S.H. ve Yoon, K.S., (2008). "Fetal mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord sustain primitive characteristics during extensive expansion", *Cell Tissue Res*, 334: 423-433.
- [144] Barry, F.P. ve Murphy, J.M., (2004). "Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization", *Int J Biochem Cell Biol*, 36: 568-584.
- [145] Billon, N. Monteiro, M.C. ve Dani, C., (2008). "Developmental origin of adipocytes: new insights into a pending question", *Biol Cell*, 100: 563-575.
- [146] Carlos, L., Carneiro, J. and J., (2006). *Temel Histoloji*, : Nobel Tıp Kitapları.
- [147] Cartwright, M.J. Tchkonja, T. ve Kirkland, J.L., (2007). "Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms", *Exp Gerontol*, 42: 463-471.
- [148] Flynn, L. Prestwich, G.D. Semple, J.L. ve Woodhouse, K.A., (2009). "Adipose tissue engineering in vivo with adipose-derived stem cells on naturally derived scaffolds", *J Biomed Mater Res A*, 89: 929-941.
- [149] Aksu, A.E. Horibe, E. Sacks, J. Ikeguchi, R. Breitingner, J. Scozio, M. Unadkat, J. ve Feili-Hariri, M., (2008). "Co-infusion of donor bone marrow with host mesenchymal stem cells treats GVHD and promotes vascularized skin allograft survival in rats", *Clin Immunol*, 127: 348-358.
- [150] Zuk, P.A. Zhu, M. Mizuno, H. Huang, J. Futrell, J.W. Katz, A.J. Benhaim, P. Lorenz, H.P. ve Hedrick, M.H., (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies", *Tissue Eng*, 7: 211-228.
- [151] Zhu, M. Gao, J.H. ve Lu, F., (2008). "[Cell biological study of cultured cells derived from the fattyoffluid portions of liposuction aspirates]", *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*, 24: 138-144.

- [152] Mizuno, H. ve Hyakusoku, H., (2003). "Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells", *J Nippon Med Sch*, 70: 300-306.
- [153] Fu, Y. Deng, J. Jiang, Q. Wang, Y. Zhang, Y. Yao, Y. Cheng, F. Chen, X. Xu, F. Huang, M. Yang, Y. Zhang, S. Yu, D. Zhao, R.C. Wei, Y. ve Deng, H., (2016). "Rapid generation of functional hepatocyte-like cells from human adipose-derived stem cells", *Stem Cell Res Ther*, 7: 105.
- [154] Liqing, Y. Jia, G. Jiqing, C. Ran, G. Fei, C. Jie, K. Yanyun, W. ve Cheng, Z., (2011). "Directed differentiation of motor neuron cell-like cells from human adipose-derived stem cells in vitro", *Neuroreport*, 22: 370-373.
- [155] Lauritano, D. Palmieri, A. Vinci, R. Azzi, L. Taglabue, A. ve Carinci, F., (2014). "Adipose derived stem cells: basic science fundaments and clinical application. An update", *Minerva Stomatol*, 63: 273-281.
- [156] Yeh, D.C. Chan, T.M. Harn, H.J. Chiou, T.W. Chen, H.S. Lin, Z.S. ve Lin, S.Z., (2015). "Adipose tissue-derived stem cells in neural regenerative medicine", *Cell Transplant*, 24: 487-492.
- [157] Bertheuil, N. Chaput, B. Menard, C. Varin, A. Garrido, I. Grolleau, J.L. Sensebe, L. Watier, E. ve Tarte, K., (2015). "[Adipose-derived stromal cells: history, isolation, immunomodulatory properties and clinical perspectives]", *Ann Chir Plast Esthet*, 60: 94-102.
- [158] Tanaka, Y. Sonomoto, K. Kondo, M. Oshita, K. Zhang, X.M. Fukuyo, S. ve Yamaoka, K., (2015). "[Mesenchymal stem cells for the treatment and repair of inflammatory arthritis]", *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 38: 86-92.
- [159] Forcales, S.V., (2015). "Potential of adipose-derived stem cells in muscular regenerative therapies", *Front Aging Neurosci*, 7: 123.
- [160] Koch, T.G. Berg, L.C. ve Betts, D.H., (2009). "Current and future regenerative medicine - principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine", *Can Vet J*, 50: 155-165.
- [161] Korecka, J.A. Verhaagen, J. ve Hol, E.M., (2007). "Cell-replacement and gene-therapy strategies for Parkinson's and Alzheimer's disease", *Regen Med*, 2: 425-446.
- [162] Lopez-Leon, M. Reggiani, P.C. Herenu, C.B. ve Goya, R.G., (2014). "Regenerative Medicine for the Aging Brain", *Enliven J Stem Cell Res Regen Med*, 1: 1-9.
- [163] Langer, R. ve Vacanti, J.P., (1993). "Tissue engineering", *Science*, 260: 920-926.
- [164] Carletti, E. Motta, A. ve Migliaresi, C., (2011). "Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture", *Methods Mol Biol*, 695: 17-39.
- [165] N., B., (2008). Hema-laktat dekstran kriyojellerin üretimi ve doku mühendisliğinde uygulamaları, ed^eds. Biyomühendislik. Ankara: Hacettepe.
- [166] Li, J.M. Menconi, M.J. Wheeler, H.B. Rohrer, M.J. Klassen, V.A. Ansell, J.E. ve Appel, M.C., (1992). "Precoating expanded polytetrafluoroethylene grafts

alters production of endothelial cell-derived thrombomodulators", J Vasc Surg, 15: 1010-1017.

- [167] Seden Bedir, Rejeneratif biyoloji ve tıp uygulamaları, <http://www.acikbilim.com/2015/08/dosyalar/rejeneratif-biyoloji-ve-tip-uygulamalari.html>, 15 Mayıs 2015.
- [168] Uslu B, A.S., Biltekin B, Denir S, Özbaş-Turan S, Akbuğa J, Bilir A. , (2008). Farklı Kitozan Formlarının Fibroblast Hücre Aktivitesi Üzerine Proliferatif Etkisinin İn vitro Karşılaştırması, Medical Faculty. Istanbul: Marmara
- [169] Uslu B., A.S., (2010). "Doku Mühendisliğinde Kitozanın Kullanım Alanları", Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 1.
- [170] Chen, W., Villa-Diaz, L. G., Sun, Y., Weng, S., Kim, J. K., Lam, R. H. W., Han, L., Fan, R., Krebsbach, P. H. and Fu, J., 2012, Nanotopography Influences Adhesion, Spreading, and Self Renewal of Human Embryonic Stem Cells,. American Chemical Society NANO,".
- [171] Chang H., Wang Y., (2011), "Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds", Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials, p.569-581."
- [172] Karakeçili, A., G., (2006). Mikrodeseenli biyoaktif malzemelerin dizaynı, karakterizasyonu ve doku mühendisliğindeki uygulamaları, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [173] Hutmacher, D.W., (2000). "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage", Biomaterials, 21: 2529-2543.
- [174] Sanford, K.K. Earle, W.R. ve Likely, G.D., (1948). "The growth in vitro of single isolated tissue cells", J Natl Cancer Inst, 9: 229-246.
- [175] Freshney, R.I. (1994). Culture of Animal Cells. New York:Wiley-Liss Inc.
- [176] Lengner, C.J., (2010). "iPS cell technology in regenerative medicine", Ann N Y Acad Sci, 1192: 38-44.
- [177] Harrison, R. (1907). Observations on the Living Developing Nerve Fiber.
- [178] Pai-Dhungat, J.V. ve Parikh, F., (2015). "Alexis Carrel (1873-1944)", J Assoc Physicians India, 63: 94-95.
- [179] Carrel, A. (1912). On the Permanent Life of Tissues Outside of the Organism.
- [180] Rosenfeld, M.A., Yoshimura, K., Trapnell, B.C., Yoneyama, K. (1992). In Vivo Transfer of the Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene to the Airway Epithelium. Cell, 68, 143-155.
- [181] Snyder, E.Y., Deitcher, D.L, Walsh, C., Arnold-Aldea, S., Hartweig, E.A., Cepko, C.L. (1992). Multipotent Cell Lines Can Engraft and Participate in Development of Mouse Cerebellum. Cell, 68, 33-51.
- [182] Maniatis, T.,Hardison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connel, C., Quon, D. (1978). The Isolation of Structural Genes from Libraries of Eukaryotic DNA. Cell, 15, 687-701.

- [183] Kayıran S., (2010) "Kornea onarımında kullanılmak üzere antiinflamatuvar etkin madde içeren destek matriks (doku iskelesi) formülasyonlarının tasarımı ve değerlendirilmesi", Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [184] Freshney, I. R. (2005) Culture of animal Cells. A Manual of Basic Technique, 5 ed. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- [185] Haycock, J.W., "John W. Haycock (ed.), 3D Cell Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 695,".
- [186] Lee, J. Cuddihy, M.J. ve Kotov, N.A., (2008). "Three-dimensional cell culture matrices: state of the art", Tissue Eng Part B Rev, 14: 61-86.
- [187] Lavik, E. ve Langer, R., (2004). "Tissue engineering: current state and perspectives", Appl Microbiol Biotechnol, 65: 1-8.
- [188] MacArthur, B.D. ve Oreffo, R.O., (2005). "Bridging the gap", Nature, 433: 19.
- [189] Maniatis, T. Hardison, R.C. Lacy, E. Lauer, J. O'Connell, C. Quon, D. Sim, G.K. ve Efstratiadis, A., (1978). "The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA", Cell, 15: 687-701.
- [190] Szacilowski, K. Macyk, W. Drzewiecka-Matuszek, A. Brindell, M. ve Stochel, G., (2005). "Bioinorganic photochemistry: frontiers and mechanisms", Chem Rev, 105: 2647-2694.
- [191] Singh, R.P. ve Ramarao, P., (2012). "Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles", Toxicol Lett, 213: 249-259.
- [192] Montazer, M. ve Seifollahzadeh, S., (2011). "Enhanced self-cleaning, antibacterial and UV protection properties of nano TiO₂ treated textile through enzymatic pretreatment", Photochem Photobiol, 87: 877-883.
- [193] Ruffini Castiglione, M. Giorgetti, L. Bellani, L. Muccifora, S. Bottega, S. ve Spanò, C., (2016). "Root responses to different types of TiO₂ nanoparticles and bulk counterpart in plant model system Vicia faba L", Environmental and Experimental Botany, 130: 11-21.
- [194] Andreotti, F. Mucha, A.P. Caetano, C. Rodrigues, P. Rocha Gomes, C. ve Almeida, C.M.R., (2015). "Interactions between salt marsh plants and Cu nanoparticles – Effects on metal uptake and phytoremediation processes", Ecotoxicol Environ Saf, 120: 303-309.
- [195] McGahon, A.J. Martin, S.J. Bissonnette, R.P. Mahboubi, A. Shi, Y. Mogil, R.J. Nishioka, W.K. ve Green, D.R., (1995). "The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro", Methods Cell Biol, 46: 153-185.
- [196] Polyzois, G.L. Hensten-Pettersen, A. ve Kullmann, A., (1994). "An assessment of the physical properties and biocompatibility of three silicone elastomers", J Prosthet Dent, 71: 500-504.
- [197] Browning, C.L. The, T. Mason, M.D. ve Wise, J.P., Sr., (2014). "Titanium Dioxide Nanoparticles are not Cytotoxic or Clastogenic in Human Skin Cells", J Environ Anal Toxicol, 4.

- [198] Shukla, R.K. Sharma, V. Pandey, A.K. Singh, S. Sultana, S. ve Dhawan, A., (2011). "ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells", *Toxicol In Vitro*, 25: 231-241.
- [199] Prasad, R.Y. Chastain, P.D. Nikolaishvili-Feinberg, N. Smeester, L. Kaufmann, W.K. ve Fry, R.C., (2013). "Titanium dioxide nanoparticles activate the ATM-Chk2 DNA damage response in human dermal fibroblasts", *Nanotoxicology*, 7: 1111-1119.
- [200] Allegri, M. Bianchi, M.G. Chiu, M. Varet, J. Costa, A.L. Ortelli, S. Blosi, M. Bussolati, O. Poland, C.A. ve Bergamaschi, E., (2016). "Shape-Related Toxicity of Titanium Dioxide Nanofibres", *PLoS One*, 11: e0151365.
- [201] Kummara, S. Patil, M.B. ve Uriah, T., (2016). "Synthesis, characterization, biocompatible and anticancer activity of green and chemically synthesized silver nanoparticles - A comparative study", *Biomed Pharmacother*, 84: 10-21.
- [202] Archana, D. Singh, B.K. Dutta, J. ve Dutta, P.K., (2015). "Chitosan-PVP-nano silver oxide wound dressing: in vitro and in vivo evaluation", *Int J Biol Macromol*, 73: 49-57.
- [203] Sussman, E.M. Casey, B.J. Dutta, D. ve Dair, B.J., (2015). "Different cytotoxicity responses to antimicrobial nanosilver coatings when comparing extract-based and direct-contact assays", *J Appl Toxicol*, 35: 631-639.
- [204] de Luna, L.A. de Moraes, A.C. Consonni, S.R. Pereira, C.D. Cadore, S. Giorgio, S. ve Alves, O.L., (2016). "Comparative in vitro toxicity of a graphene oxide-silver nanocomposite and the pristine counterparts toward macrophages", *J Nanobiotechnology*, 14: 12.
- [205] Sankar, R. Dhivya, R. Shivashangari, K.S. ve Ravikumar, V., (2014). "Wound healing activity of *Origanum vulgare* engineered titanium dioxide nanoparticles in Wistar Albino rats", *J Mater Sci Mater Med*, 25: 1701-1708.
- [206] Asgary, V. Shoari, A. Baghbani-Arani, F. Sadat Shandiz, S.A. Khosravy, M.S. Janani, A. Bigdeli, R. Bashar, R. ve Cohan, R.A., (2016). "Green synthesis and evaluation of silver nanoparticles as adjuvant in rabies veterinary vaccine", *Int J Nanomedicine*, 11: 3597-3605.
- [207] Manikandan, R. Manikandan, B. Raman, T. Arunagirinathan, K. Prabhu, N.M. Jothi Basu, M. Perumal, M. Palanisamy, S. ve Munusamy, A., (2015). "Biosynthesis of silver nanoparticles using ethanolic petals extract of *Rosa indica* and characterization of its antibacterial, anticancer and anti-inflammatory activities", *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 138: 120-129.
- [208] Hackenberg, S. Scherzed, A. Technau, A. Froelich, K. Hagen, R. ve Kleinsasser, N., (2013). "Functional responses of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to metal oxide nanoparticles in vitro", *J Biomed Nanotechnol*, 9: 86-95.

- [209] Greulich, C. Kittler, S. Epple, M. Muhr, G. ve Koller, M., (2009). "Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs)", *Langenbecks Arch Surg*, 394: 495-502.
- [210] Zhang, X.F. Choi, Y.J. Han, J.W. Kim, E. Park, J.H. Gurunathan, S. ve Kim, J.H., (2015). "Differential nanoreprotoxicity of silver nanoparticles in male somatic cells and spermatogonial stem cells", *Int J Nanomedicine*, 10: 1335-1357.
- [211] Zhu, W. Teel, G. O'Brien, C.M. Zhuang, T. Keidar, M. ve Zhang, L.G., (2015). "Enhanced human bone marrow mesenchymal stem cell functions on cathodic arc plasma-treated titanium", *Int J Nanomedicine*, 10: 7385-7396.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Serap YEŞİLKIR BAYDAR
Doğum Tarihi ve Yeri :22.10.1986-İSTANBUL
Yabancı Dili :İngilizce, Almanca
E-posta :serapoloji@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2010
Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2008
Lise	Fen-Matematik	Ayşe Melahat Erkin Anadolu Lisesi	2004

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2012-2015	Rivosem Sağlık Ürünleri San.Tic.A.Ş.	Eğitim ve Uygulama Yöneticisi

YAYINLARI

Makale

1. Batioglu-Karaaltin A, Karaaltin MV, Oztel ON, Ovali E, Sener BM, Adatepe T, Yigit O, Bozkurt E, Baydar SY, Bagirova M, Uzun N, Allahverdiyev A. Human olfactory stem cells for injured facial nerve reconstruction in a rat model. *Head Neck*. 2016 Feb 1. doi: 10.1002/hed.24371.
2. Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Baydar SY, Ates SC, Kaya F, Kaya C, Rafailovich M. Investigation of antileishmanial activities of Tio2@Ag nanoparticles on biological properties of *L. tropica* and *L. infantum* parasites, in vitro. *Exp Parasitol*. 2013 Sep;135(1):55-63. doi: 10.1016/j.exppara.2013.06.001.
3. Topuzogullari M, Cakir Koc R, Dincer Isoglu S, Bagirova M, Akdeste Z, Elcicek S, Oztel ON, Yesilkir Baydar S, Canim Ates S, Allahverdiyev AM. Conjugation characterization and toxicity of lipophosphoglycan-polyacrylic acid conjugate for vaccination against leishmaniasis. *J Biomed Sci*. 2013 Jun 3;20:35. doi: 10.1186/1423-0127-20-35.
4. Allahverdiyev AM, Baydar SY, Bagirova M, Findikli N. Microcapillary culture method: a novel tool for in vitro expansion of stem cells from scarce sources. *Arch Med Res*. 2012 Aug;43(6):423-30.
5. Allahverdiyev AM, Bagirova M, Cakir-Koc R, Elcicek S, Oztel ON, Canim-Ates S, Abamor ES, Yesilkir-Baydar S. Utility of the microculture method in non-invasive samples obtained from an experimental murine model with asymptomatic leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Jul;87(1):81-6.
6. Ates SC, Bagirova M, Allahverdiyev AM, Baydar SY, Koc RC, Elcicek S, Abamor ES, Oztel ON. Detection of antileishmanial antibodies in blood sampled from blood bank donors in Istanbul. *Future Microbiol*. 2012 Jun;7(6):773-9.
7. Allahverdiyev AM, Bagirova M, Elcicek S, Koc RC, Baydar SY, Findikli N, Oztel ON. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a new host cell in latent leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Sep;85(3):535-9

Bildiri

1. Adil M. Allahverdiyev, Melahat Bağirova, Serap Yeşilkır Baydar, Emrah Şefik Abamor, Metalik Nanopartiküllerin Toksisitesinin Tayin Edilmesinde Hücre Kültür Modellerinin Geliştirilmesi, 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücresel Tedavi Kongresi, 20-23 Mart 2014, Kartepe / Kocaeli.
2. Adil M. Allahverdiyev, Melahat Bağirova, Serap Yeşilkır, Serhat Elçiçek, Rabia Çakır, Adipose-derived stem cells (ADMKHS) as new host cell of *Leishmania* parasites, EACID Kongresi, Bakü.
3. O. N. Oztel, R. Cakir, S. Yesilkir, M. Bagirova, A. M. Allahverdiyev. Investigation of Interaction between Adipocyte Stem Cells and PEG, 15th International Biomedical Science and Technology Symposium; (16-19 August 2009, Cyprus), p. 130 (Eng)
4. N. Findikli, S. Yesilkir, O. N. Oztel, M. Bagirova, A. M. Allahverdiyev. Investigation of the Adaptation of Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem ce and Technology Symposium; 16–19 August 2009. Cyprus, p.69 (Eng)Cells’ Derived From Different Donors’ in Culture , 15th International Biomedical Scien
5. Melahat Bağirova, Serap Yeşilkır Baydar, Emrah Şefik Abamor ve Adil M. Allahverdiyev, ZnO Nanopartiküllerinin Farklı Hücre Hatları Üzerindeki Toksisitelerinin Belirlenmesi, 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Derneği, 25-28 Ekim 2011, s:244, Kemer.
6. Adil M. Allahverdiyev; Melahat Bagirova; Rabia Cakir-Koc; Serhat Elcicek; Olga Nehir Oztel; Sezen Canim-Ates; Emrah Sefik Abamor; Serap Yesilkir-Baydar, "Microculture Method As a Sensitive And A Rapid Test For Detection Of Leishmania Parasites In Asymptomatic Balb/C Mouse Model’ 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 4-10 Eylül 2011, Kars.
7. Serap YEŞİLKIR BAYDAR, Melahat BAĞIROVA, Adil M. ALLAHVERDİYEV, Necati FINDIKLI, Investigation of The Effects of Various Cell Culture Media on Isolation and Continious Cell Culture of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells, 1st Annual Congress On Stem Cell Research (with International Participation), 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sapanca.
8. Adil M. ALLAHVERDİYEV, Serap YEŞİLKIR BAYDAR, Melahat BAĞIROVA, Necati FINDIKLI, Investigation of Isolation And Adaptation of Mesenchymal Stem Cell From

Small Amount of Adipose Tissue With Micro Culture Method, 1st Annual Congress On Stem Cell Research (with International Participation), 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sapanca.

9. Serap Yeşilkır Baydar, 'Geleceğe Yatırım: Kök Hücre Bankası', Fikirler Pazarı, 24-25 Mayıs 2011, İstanbul.
10. Adil Allahverdiyev, Melahat Bağirova, Serap Yeşilkır, Serhat Elçiçek, Rabia Çakır, Necati Fındıklı. *Leishmania* Parazitleri Tarafından Üretilen Metabolitlerin Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (ADMKH) Proliferasyonuna Etkisi 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Sayfa: 27, 2-6 Kasım 2009, Adana
11. Sezen CANIM ATEŞ, Serap YEŞİLKIR, Melahat BAĞIROVA Donör Kan Örneklerinin IFAT Yöntemi İle Leishmania Parazitlerine Göre İncelenmesi 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, sayfa:28, 2-6 Kasım 2009, Adana.
12. Serap YEŞİLKIR, Asiye KARAKULLUKÇU, Toplu Taşıma Araçları ile Okula Gelen Üniversite Öğrencilerinin Elllerinde Total Bakteri ve Total Koliform Taraması, Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, Ege Üniversitesi, (20–23 Eylül 2006) (sözlü sunum)

Kitap

1. Allahverdiyev, A. M., Bagirova, M., yaman, S., Koç, R. Ç., Abamor, E. Ş., Ateş, S. C., Baydar, S. Y., Elçiçek, S., & Öztel, O. N. (2013). Development of New Antiherpetic Drugs Based on Plant Compounds. Fighting Multidrug Resistance With Herbal Extracts, Essential Oils And Their Components: Elsevier.
2. Adil M. Allahverdiyev, Malahat Bagirova, Olga Nehir Oztel, Serkan Yaman, Emrah Sefik Abamor, Rabia Cakir Koc, Sezen Canim Ates, Serhat Elcicek and Serap Yesilkir Baydar, DEHYDROGENASES Edited by Rosa Angela Canuto Section 1 Dehydrogenases and Cancer 1, Chapter 1: Aldehyde Dehydrogenase: Cancer and Stem Cells, page: 3, 2013.
3. Adil M. Allahverdiyev, Malahat Bagirova, Serhat Elcicek, Rabia Cakir Koc, Sezen Canim Ates, Serap Yesilkir Baydar, Serkan Yaman, Emrah Sefik Abamor and Olga Nehir Oztel, Section 2, Chapter 4: Dehydrogenases and Some Diseases Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Malaria: A Method to Detect Primaquine-Induced Hemolysis in vitro, page:63-65, 2013.

Proje

1. Prof. Dr. Adil Allahverdiyev yürütücülüğünde 'L.Infantum'un Neden Olduğu Visseral Leishmaniasis'e Karşı Nanopartikül Temelli Aşı Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Koruyucu Etkilerinin Belirlenmesi' Araştırmacı Serap YEŞİLKIR BAYDAR, TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu (SBAG), Proje No: 213S148 (2014-2016) (Devam ediyor).
2. Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA yürütücülüğünde 'Metalik Nanopartiküllerin Toksisitesinin Tayin Edilmesinde Hücre Kültür Modellerinin Geliştirilmesi' Araştırmacı Serap YEŞİLKIR, YTÜ-BAPK Proje No: 2011-07-04-KAP06, (2011-2013). (Tamamlandı).
3. Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA yürütücülüğünde "İstanbul'daki Kan Merkezlerinden Elde Edilen Donör Kan Örneklerinde, Yeni ve Klasik Tanı Yöntemleri ile *Leishmania'nın* İncelenmesi", Araştırmacı Serap YEŞİLKIR, YTÜ-BAPK Proje No: 29-07-04-02, 2009-2011. (Tamamlandı).
4. Prof. Dr. Adil Allahverdiyev yürütücülüğünde "Leishmaniasis'e Karşı Aşı Geliştirilmesinde Polimerlere Dayalı Yeni Bir Yaklaşım: LPG-Polimer Konjugatları", Araştırmacı Serap YEŞİLKIR, TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu (SBAG) 1001 nolu proje, Proje No: 1085170 SBAG-4007, (Tamamlandı).

ÖDÜLLERİ

1. 1-4 Ekim 2009 yılında A. M. Allahverdiyev, M. Bağirova, S. Yeşilkır, S. Elçiçek, R. Çakır, N. Fındıklı. Eurasia Congress of Infectious Diseases (EACID) , Bakü, Adipose-derived stem cells (ADMKHs) as a new host cell of *Leishmania* parasites adlı sunuma üçüncülük ödülü.
2. 2-6 Kasım 2013 yılında Ayşegül Erarslan Karaaltın, Mehmet Veli Karaaltın, Olga Nehir Öztel,ERCÜMENT OVALI, Pelit Merve Şenel, Turgut Adatepe, Özgür Yiğit, Erol Bozkurt, Serap Yeşilkır Baydar, Melahat Bağirova, Nurten Uzun, Adil Allahverdiyev. Türk Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, Hasarlanmış Rat Fasiyal Sinir Rekonstrüksiyonunda İnsan Olfaktör Bölge Nöral Kök Hücre Uygulaması adlı sunuma En İyi Araştırma Birincilik (1.) ödülü.

