



**Erişkin Kök Hücrelerinde Doku Yönelimi ve Dış
Mekanik Etkilere Bağlı Gelişen Altyapısal
Değişikliklerin Karakterizasyonu**

Program Kodu: COST

Proje No: 111T577

Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. Engin Özçivici

Bursiyer(ler):
Levent Demiray
Öznur Başkan

ŞUBAT 2015
İZMİR



ÖNSÖZ

Bu proje TÜBİTAK Kimya ve Biyoloji Araştırma Destek Grubu tarafından desteklenmiş ve Yrd. Doç. Dr.Engin Özçivici yürütücülüğünde tamamlanmıştır. Projenin yürütülmesi sırasında İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Yrd. Doç. Dr. Özden Yalçın Özuysal ve Yrd. Doç. Dr. Gülistan Meşe Özçivici danışmanlık görevi üstlenmişlerdir. Proje desteği ve bulguları, projede bursiyer olarak çalışan İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik programına kayıtlı Levent Demiray ve Öznur Baskan'ın tez muhteviyatını oluşturarak bu öğrencilerin yüksek lisans derecelerini tamamlamalarını sağlamıştır.

Bu projede, yüksek frekans ve düşük yoğunluklu mekanik titreşimlerin erişkin kemik iliği kök hücrelerinde: normal durumlarda, kemik yönelimi sırasında ve yağ yönelimi sırasında gerçekleşen morfolojik ve moleküler değişimlere olan etkileri incelenmiştir. Sonuçlara göre mekanik titreşimler kemik oluşumunu olumlu etkilemekler beraber yağ oluşumu ile ilgili parametreleri baskılama özellikleri olduğu ortaya konulmuştur. Proje sonuç raporunun yazım aşamasında (Şubat 2015) proje sonuçlarından biri yayınlanmış diğeri yazım aşamasında olan 1 uluslararası makale, 3 uluslararası bildiri ve 2 ulusal bildiri ile proje bulguları ve çıkarımları paylaşılmıştır. Hali hazırda yazım aşamasında olan ve 2015 içerisinde uluslararası dergilere gönderilmesi planlanan iki tane daha makale içeriğini proje bulgularından almaktadır.

Proje süresince kullanılan teknikler, analizler ve karşılaşılan problemler konusunda bizlere yardımcı olan sayın Yrd. Doç. Dr. Hadi M. Zareie ve Doç. Dr. Devrim Pesen Okvur'a, ek olarak İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Malzeme Araştırma Merkezi personeline verdikleri teknik destekten dolayı teşekkür ederiz.

ÖNSÖZ	1
İÇİNDEKİLER	2
ŞEKİL LİSTESİ	4
TABLO LİSTESİ	6
ÖZET	7
ABSTRACT	8
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Mekanik sinyallerin yaşamsal önemi	3
2.2 Mekanik kuvvetlerin kemik dokusu için önemi	3
2.3 Kemik için uygulanabilecek mekanik girdilerin parametreleri	4
2.4 Kemik hücrelerinin <i>in vitro</i> mekanik testleri	5
2.5 Mekanik altyapının önemi	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM	8
3.1 Hücre kültürü	8
3.2 Mekanik sinyallerin uygulanması	8
3.3 Hücre görüntüleme yöntemleri	9
3.3.1 Tekli immünohistokimyasal analizler	9
3.3.2 Kalsifiye matris görüntülenmesi	9
3.3.3 Yağ oluşumunun görüntülenmesi	9
3.4 Atomik kuvvet mikroskopu görüntülemeleri	9
3.4.1 Hücre içerisine floresan alımı görüntülenmesi	10
3.5 mRNA ifade analizleri	10



3.6 Veri analizi ve istatistikler	11
4. BULGULAR	12
4.1 Mezenkimal kök hücrelerin istenen yönelimlere girebilmeleri	12
4.1.1 Kök hücrelerin kemik yönelimine sokulması	12
4.1.2 Kök hücrelerin yağ yönelimine sokulması	13
4.2 Mekanik titreşim oluşturabilen bir platformun faaliyete alınması	14
4.3 Mekanik titreşimlerin kemik yönelimine giren kök hücrelere etkisi.....	16
4.3.1 Hücre büyüme ve canlılıkları	16
4.3.2 Hücre aktin altyapısı	16
4.3.3 Moleküler belirteçler.....	21
4.4 Mekanik titreşimlerin yağ yönelimine giren kök hücrelere etkisi	22
4.4.1 Hücre büyüme ve canlılıkları	22
4.4.2 Hücre aktin altyapısı	23
4.4.3 Moleküler belirteçler.....	25
4.5 Mekanik sinyallerin kök hücreler arası iletişime olan etkisi	26
4.5.1 Mekanik sinyallerin kök hücreler arası boya geçişine etkisi.....	26
4.5.2 Mekanik sinyallerin kök hücrelerin Cx43 miktarına etkisi.....	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	31
6. KAYNAKLAR	34



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri.....	6
Şekil 2. Hücre ve çekirdeğinin şematik sunumu.	6
Şekil 3 Kök hücrelerinin kemik yönelimi.	12
Şekil 4. Kemik oluşumuna yönlenmiş kök hücrelerde mineralizasyon.	13
Şekil 5. Yağ yönelimine solukan mezenkimal kök hücrelerin görüntülenmesi..	13
Şekil 6. Mekanik titreşim sinyalleri.....	14
Şekil 7. Mekanik titreşimlerin tekrarlanabilirliği.....	15
Şekil 8. Mekanik titreşimlerin kök hücre aktin yapısı üzerindeki etkileri.	17
Şekil 9. Mekanik titreşimlerin büyüme besiyerindeki hücrelerin altyapısına ekisi.	18
Şekil 10. Mekanik titreşimlerin kemik yönelimindeki hücrelerin altyapısına ekisi.	19
Şekil 11. Hücrelerin atomik kuvvet mikroskobu ile taranmasına ait temsili resim.	20
Şekil 12. Mekanik titreşimlerin büyüme ya da kemik yöneliminde morfolojiye etkisi.....	21
Şekil 13. Mekanik titreşimlerin büyüme ya da kemik yönelimine giren kök hücrelerin çeşitli mRNA belirteçlerinin ifadesi üzerindeki etkisi.	22
Şekil 14. Mekanik titreşimlerin büyüme ya da yağ yönelimine giren kök hücrelerin hücre canlılığı üzerine etkileri.....	23
Şekil 15. Normal besiyerinde (Growth) ya da yağ yöneliminde (Adipogenic) bulunan erişkin mezenkimal kök hücrelerin aktin yapısı.....	23
Şekil 16. Mekanik titreşimlerin büyüme ya da yağ yönelimine giren kök hücrelerin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri.....	24
Şekil 17. Besiyerinde yapılan atomik kuvvet mikroskobu deneylerinin temsili resmi.	25
Şekil 18. Mekanik titreşimlerin büyüme ya da yağ yönelimine giren kök hücrelerin membran morfolojisi üzerindeki etkileri.....	25
Şekil 19. Mekanik titreşimlerin büyüme ya da yağ yönelimine giren kök hücrelerin çeşitli mRNA belirteçlerinin ifadesi üzerindeki etkisi.	26



Şekil 20. Kazıyarak yükleme (scrape loading) deneyinin görüntülenmesi ve Image J kullanılarak analizi	27
Şekil 21. Scrape loading deneyi sonuçları.	28
Şekil 22. Cx43 proteinin hücrelerdeki bulunma oranları.	29
Şekil 23. Cx43 immunohistokimyasal boyamasının sayısallaştırılması.....	30
Şekil 24. Cx43 qPCR sonuçları.	31



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. RT-PCR'da kullanılan primer listesi	11
Tablo 2. Mekanik titreşimlerin hücre sayılarına etkisi.	16

Mekanik titreşim uygulanması hem kemik hücrelerinde mineralizasyonu arttırdığı hem de kemik iliğindeki kök hücrelerini kemik yönelimine soktuğu için kemik kütlesini arttırıcı bir etkiye sahiptir. Mekanik sinyaller ayrıca yağ dokusu oluşumunu kemik iliği ve diğer yağ depolarında engeller özelliklere sahiptir. Kemik ve yağ hücrelerinin ortak bir hücre tipinden geldikleri düşünülürse, mekanik titreşim sinyalleri kullanılarak kemik oluşumu arttırılırken eşzamanlı olarak yağ oluşumu azaltılabilir. Halihazırda kemik iliği kök hücrelerinin bu tip mekanik titreşim sinyallerine duyarlı olup olmadığı ve eğer duyarlıysa bu sinyallere nasıl adapte olduğu henüz net olarak bilinmemektedir. Burada fare kemik iliğinden alınan mezenkimal D1-ORL-UVA kök hücreleri atıl durumda, kemik yöneliminde ya da yağ yönelimindeyken günlük mekanik titreşimlere (0.15g, 90 Hz, 15dk/gün) 7 gün boyunca maruz bırakıldı ve bu titreşimlerin hücrelerde yarattığı hücresel, morfolojik ve moleküler değişimler araştırıldı. Atıl durumdaki kök hücrelerde mekanik sinyaller hücre üremesini, hücrelerin toplam aktin miktarını ve kalınlığını arttırdığı gözlemlendi. Kemik yönelimi sırasında da mekanik sinyaller toplam aktin miktarı, aktin kalınlığı ve hücrelerin membran pürüzlülüklerini arttırdılar. Yağ yönelimi sırasında ise uygulanan mekanik kuvvetlerin hücrelerin yağ biriktirmesinden kaynaklanan morfolojik ve altyapısal etkileri geri çevirdiği gözlemlendi. Mekanik titreşimlerin ayrıca tüm yönelimler için hücrelerarası iletişimi arttırdıkları gözlemlendi. Sonuçlar yüksek frekanslı ve düşük genlikli mekanik titreşimlerin mezenkimal kök hücrelerin yönelimlerini belirleyen faktörlere önemli etkilerde bulduklarını düşündürmektedir. Klinik aşamaya ulaşabilirse bu sonuçlar ilaçtan bağımsız bir etkinin kemik erimesi ve obezite için kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücreler, Mekanik sinyal, Kemik/Yağ yönelimi, Hücre iskeleti, Hücrelerarası iletişim.



ABSTRACT

Application of mechanical vibrations is anabolic to the bone tissue, not only by guiding mature bone cells for increased bone formation but also increasing the osteogenic commitment of progenitor cells. Mechanical signals are also suppressive for fat tissue formation in bone marrow and at other regions in the body. As fat and bone cells have a common progenitor, it may be possible to promote osteogenesis and reduce adipogenesis simultaneously using mechanical signals. However, sensitivity and adaptive response of bone marrow stem cells to this loading regimen is currently not identified. Here, we subjected mouse bone marrow stem cell line D1-ORL-UVA to daily mechanical vibrations (0.15g, 90 Hz, 15min/d) for 7 days during quiescence, osteogenic commitment and adipogenic commitment to identify corresponding ultrastructural adaptations on cellular and molecular levels. During quiescence, mechanical vibrations increased proliferation, total actin content and actin fiber thickness significantly, as measured by phalloidin staining and fluorescent microscopy. During osteogenesis, mechanical vibrations increased the total actin content, actin fiber thickness and cytoplasmic membrane roughness. During adipogenesis, mechanical vibrations reversed morphological, cellular and ultrastructural effects of lipid accumulation in stem cells. Mechanical vibrations also increased cell-to-cell communication in stem cells during quiescence, osteogenesis and adipogenesis. Results show high frequency low magnitude mechanical vibrations can be potent regulators of factors that induce mesenchymal stem cell commitment. If translated to clinic these non-pharmaceutical agents might be effective treatments for osteoporosis and obesity.

Key words: Mesenchymal stem cells, Mechanical signals, Osteogenic/Adipogenic commitment, commitment, Cytoskeleton, Intracellular communication



1. GİRİŞ

Yaşamsal faaliyetler süresince erişkin dokuları ciddi tamir (repair) ve yeniden yapılanma (regeneration) süreçlerinden geçerler. Bu süreçler sırasında erişkin kök hücreleri ihtiyaç doğrultusunda atıl (dormant) hallerini terk ederek bölünmeye ve bölündükçe (sabit bir kök hücre havuzu tutmak koşuluyla) özelleşmeye başlarlar. Bu tarz erişkin kök hücreleri insan vücudunun çeşitli yerlerine dağılmışlardır. Kemik iliğinde de (bone marrow) bulunan mezankimal kök hücreleri (mesenchymal stem cells) normal şartlar altında özelleştikleri zaman mezankimal dokuların (kemik, kas, kıkırdak ve yağ) yapılarına katılabilirler.

Mezankimal orijine sahip bağ dokularından kemik dokusu (osseous tissue), insan ve diğer memelilerin hayatta kalabilmeleri için çok önemli görevlere hizmet eder. Bu görevler arasında yumuşak dokulardan oluşan iç organları destekleme ve onları dış etkilerden korumak, hareket etmek için gerekli mekanizma vazifesi görme, vücut için çok önemli elektrolitler için (Ca²⁺ ve inorganik fosfat) depo görevi, ve ek olarak alyuvar/akyuvar (ve de diğer kan hücreleri) için üretim noktası olmak bulunur. Bu görevlerini sağlıklı bir şekilde yapabilmesi için kemik dokusunun çok dinamik bir yapıda olup modellenme, yeniden yapılanma ve tamir özelliklerine sahip olması gerekir.

Kemiğin bu hayli dinamik yapısını koruyabilmesi osteoblast ve osteoklast adında iki farklı tür kemik hücresi sayesinde gerçekleşir. Bunlardan osteoklast hücreleri hematopoetik yönelimden gelir ve hali hazırda var olan kemiğin yıkılmasından (catabolism) sorumludur. Bu hücreler kemikte tekrarlı yükler sonucunda (yürümek, koşmak vs.) oluşan mikron seviyesindeki çatlakların oluşturduğu hasarlı kemiği yok ederler. Bu hücrelerin yıktığı kemik dokusunda oluşan boşluk osteoblast hücreleri tarafından kusursuz bir şekilde yenilenir (anabolism). Osteoblastlar mezenkimal kök hücre yönelimden gelirler ve görevlerinin son aşamasında kendi yaptıkları kalsifiye olmuş matrisin içerisinde hapis kalarak osteosit hücrelerine dönüşürler.

Osteoblast sayısı ve/veya fonksiyonunda görülebilecek herhangi bir azalma kemik yıkım ve yapım döngüsünü yıkım yönünde bozarak kemik dokusunun miktarında net bir azalmaya yol açar. Bu tarz azalmalara özellikle kemiğin kuvvet taşıma fonksiyonunda görülen kısmi ya da tam kayıplarda karşılaşılr. Bu duruma örnek olabilecek faktörler yaşlılık (aging), yatalak olma (bedrest), kısmi felç (stroke), hareketsizlik (disuse), uzay yolculukları (space travel) ve buna benzer kemiğin olağanın altında veya hiç kuvvet taşımama senaryolarıdır. Kemik dokusundaki azalma kişinin fiziksel durumunda kusurlara yol açabileceği gibi tekrar yüklenme koşullarına döndüğünde (reambulation) kemikte yüklenmeye bağlı kırılma oluşturabilir. Hastalarda mortaliteye kadar varan morbidite oluşturan bu durum toplumun yaşam kalitesinin azalmasına yol açar ve büyük bir sosyo-ekonomik maliyet oluşturur. Genel



anlamda bu riskin önlenmesi, tanısı ve tedavisi için yeni bilimsel yaklaşımlara ihtiyaç vardır.

Genel hareket ve mekanik yüklenme eksikliğinin yol açtığı diğer bir problem de bağ doku ve kemik iliğinde görülebilen yağlanmadır. Osteoblast hücrelerinin mezenkimal kök hücre orijinli oldukları düşünülürse, mekanik kuvvetlerin sadece kemik hücrelerini değil, belki de tüm mezenkimal hücreleri -yönelimlerini tamamlamış olanlardan kök hücrelere kadar etkileyebildikleri hipotezi bu projede test edilmiştir.

Bu araştırmayla elde edilecek temel bilimsel verilerin biyomedikal araştırma kapsamında da belirli önemi ve uygulama alanları vardır. Çağımızda, gelişmekte olan toplumlarda yaşam süresinin uzaması ve fiziksel aktivitenin azalmasıyla birlikte iki önemli hastalığın artışı görülmektedir: Kemik erimesi (osteoporoz) ve şişmanlık (obezite). Bu hastalıkların birinin temelinde kemik yapan hücrelerdeki azalma diğerinde ise yağ hücrelerindeki artış önemli bir rol oynamaktadır. Bu iki tip hücrenin ortak bir atadan, yani mezenkimal kök hücre'den geldikleri düşünülürse hücrelerin bir noktada verdikleri yönelim kararının yağ hücresinden (adipocyte) ziyade kemik oluşumuna yarayan hücrelere (osteoblast) dönüştürülmesinin aynı anda bu iki hastalıkla savaşmada önemli bir avantaj sağlayacağı muhakkaktır.

İlaç tedavisi ve diyet değişiklikleri bu iki hastalığın tedavisinde de önerilen fakat etkileri limitli çözümlerdir. Önerilen bu iki tedavi yöntemiyle kıyaslandığında bireyde hem obezite hem de osteoporoz gelişimini tam tersi yönünde etkileyebilen tek çözüm günlük fiziksel egzersiz hareketleri yapmaktır. Egzersizin kemik (ve kas) yapılımlı ve rejenerasyonunda olumlu etkisi, yağ hücresi oluşumunda ise engelleyici etkisi doku bazında bilinmektedir. Fakat şu ana kadar fiziksel egzersizin ve buna bağlı olarak hücreler üzerinde oluşan mekanik yüklerin hücre bazında özellikle erişkin kök hücreleri üzerinde ne tarz bir etki yarattığı bilinmemektedir.

Bu projede mekanik kuvvetler ve bunların mezenkimal hücre yönelimlerine etkisi in vitro çalışmalar kapsamında değerlendirilecek olup, bu kapsamda seçilen ana test yöntemi floresan mikroskobu ve atomik kuvvet mikroskopudur. Ayrıca, test edilen mekanik özelliklerdeki alt yapısal faktörlerin araştırılması için moleküler biyoloji (genlerin mRNA ifadesi ve hücre iskelet yapısının immunohistokimyasal yaklaşımlar ile analiz edilmesi) yöntemleri de seçilmiştir. Bu bakış açısının getireceği yenilik mezenkimal hücrelerin yönelim belirlemede fiziksel egzersizin ilaç ya da diyet uygulamalarına alternatif, yan etkiden bağımsız bir faktör geliştirilebilme potansiyeli olacaktır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Mekanik sinyallerin yaşamsal önemi

Dışarıdan alınan mekanik sinyalleri algılama ve onlara tepki verme eylemleri, bakteri (Kruse ve Julicher, 2005), maya (Zhou vd., 2003) ve bitki (Neel ve Harris, 1971; Johnson vd., 1998) hücreleri dahil olmak üzere, yeryüzündeki bütün hücrelerin ortak noktalarından biridir. Bu genel özellik memeli hücrelerinde de iyi korunmuş olup bir organizmanın gelişiminden itibaren mekanik kuvvetler organ sistemlerinin bakımı (maintenance) ve tamiri (repair) sırasında önemli roller oynarlar (Ingber, 2005; Orr vd., 2006). Mekanik kuvvetlerin etkilerinin en uygun gözlemlenebildiği organ belki de kas-iskelet dokularıdır ki (musculoskeletal tissue), mekanik fonksiyonun yitilmesi durumunda memeli organizmalarında kas erimesi (sarcopenia) ve kemik erimesi (osteopenia) net bir biçimde görülür. Özellikle kemik erimesi, hastalarda kırılma riskini arttırdığı için yaşam kalitesini oldukça etkiler (Olmeda vd., 1995) ve gelişmiş/gelişmekte olan toplumlara büyük bir sosyoekonomik maliyet oluşturur (Conference, 2000; Marwick, 2000).

2.2 Mekanik kuvvetlerin kemik dokusu için önemi

Kemik dokusunun yapısı “kullan ya da kaybet” ilkesiyle uyumlu bir düzende çalışır, yani kullanmama (disuse) kemik matrisinde yıkıma yol açarken, fiziksel egzersiz kemik yapısının gelişmesini ve güçlenmesini sağlar (Frost, 1987). Mesela yerçekimsiz ortamdaki astronotlar bir ayda, kemik kütlelerinin %2 sini kaybederlerken (Lang vd., 2004) profesyonel tenis oyuncularının servis yapan kol kemikleri topu havaya atan kola oranla %35 daha fazla kemik ihtiva eder (Jones vd., 1977). Buna ek olarak kemik kazancına farklı branşlarda (futbol, halter, buz pateni, jimnastik, vs.) uzun süreli antrenman yapan profesyonel sporcularda rastlanır (Snow-Harter vd., 1992; Heinonen vd., 1995). Kontrollü deneylerde de fiziksel egzersiz yapan hem genç askerlerde (Leichter vd., 1989) hem de ilkökul çağındaki çocuklarda (McKay vd., 2005), egzersiz yapmayan yaşlılarına oranla önemli ölçüde daha fazla kemik birikimi gözlenmiştir. Bu klinik bulguları destekler nitelikte çok sayıda model hayvan deneyinde egzersiz kemik kütlelerini tartışmasız bir şekilde arttırabilen bir faktör olarak öne çıkmıştır (Ozcivici vd., 2010a).

Bütün bu verilere rağmen fiziksel egzersiz kemik erimesine karşı halen daha tam olarak kabul görmüş bir tedavi yöntemi değildir. Bunun sebeplerinden biri bazı klinik çalışmalarda raporlanan kemik kazançlarının istenilen derecede yüksek olmamasıdır. Mesela genç kadınlarda bir yıl süreyle değerlendirilen güç antrenmanları kas kütlelerinde önemli bir artışa sebep olduysa bile kemik kütlelerindeki artış bir istatistiki anlam taşımamıştır (Heinonen vd.,

1996). Bu gibi durumların olası sebepleri kemik modellenmesinde genetik yapı, diyet, cinsiyet ve yaş gibi metabolik faktörlerin henüz literatürde net tanımlanmamış olası etkileri ve bu faktörlerin birbirleriyle olan etkileşimleridir (Peacock vd., 2005; Qiu vd., 2006; Weaver, 2008).

2.3 Kemik için uygulanabilecek mekanik girdilerin parametreleri

Mekanik kuvvetlerin halen daha kemik erimesi tedavisinde kullanılmamasının diğer bir sebebi ise fiziksel egzersiz sırasında kemik matrisinde ortaya çıkabilecek olan normal üstü mekanik gerilmeler ve şekil değiştirmeler (stress - strain) yüzünden zaten fiziksel dayanımı azalmış bir yapıya uzun süreçte faydadan ziyade kısa vadede zarar verilebileceği korkusudur (Augat vd., 2005; Diab vd., 2005). Bu problemin aşılabilmesi için öncelikle fiziksel egzersiz sırasında oluşan hangi mekanik parametrenin kemik hücreleri tarafından algılandığının daha iyi anlaşılması gerekir. Dışarıdan girilen mekanik kuvveti karakterize edebilmek için o girdinin genlik (amplitude), frekans, tekrar sayısı (bout), hacimsel dağılımı ve değişim hızını (rate) tanımlamak gerekir. Yakın tarihte ortaya çıkan bulgular kemik dokusunun belirtilen bütün bu faktörleri ayrı ayrı algılayabildiğini ortaya koymuştur (Lanyon vd., 1982; O'Connor vd., 1982; Lanyon ve Rubin, 1984; Rubin ve Lanyon, 1984; Rubin ve Lanyon, 1985). Böylece yüksek genlikten bağımsız, her türlü kemik yapısı için güvenli ve belki de yer çekimine bile ihtiyaç duymayan -ki böylece uzay yolculuklarında ve yatalak hastalarda kullanılabilir- bir mekanik sinyal kemik erimesi tedavisi için önemli bir alternatif yaratabilme potansiyeline sahip olmuştur.

Yapılan klinik denemeler sırasında geleneksel egzersiz metotları yerine kullanılan düşük genlik ve yüksek frekanslı dışarıdan girilen titreşimlerin kemiğin kütlesi ve yapısına olan katkıları görülmüştür. İlk klinik denemesi menapoz evresindeki kadınlarda (n=64) yapılan titreşim tedavisi, randomize edilmiş çift körlüklü klinik deneylerde, kontrol grubunda %2.13 kemik mineral yoğunluğu kaybı gözlemlenirken deney grubunda ortalama %0.04 (p<0.05) artış görülmüştür (Rubin vd., 2004). Buna benzer olarak genç kadınlarda (n=48) yapılan titreşim egzersizi, randomize edilmiş çift körlüklü klinik deneylerde, titreşim grubu tibia (kaval kemiği), cortical ve trabecular kemik değerleri kontrol grubuna göre %2.0 ve %2.3 (p<0.05) artmıştır (Gilsanz vd., 2006). Ayrıca, cerebral palsy geçirmiş paraplejik çocuklarda (n=20) yapılan titreşim tedavisi, randomize edilmiş çift körlüklü klinik deneylerde, kontrol grubunda %11.9 kemik azalması görülürken, deney grubu kemik sayımında %6.3 artış göstermiştir (Ward vd., 2004). Bu öncül klinik çalışmalar göstermiştir ki, düşük genlikli mekanik titreşimlerin kemik yapısı üzerindeki anabolik potansiyeli biyomedikal uygulamalarla gerçeğe dönüştürülebilir. Bu mekanik sinyallerin ayrıca kemik matrisinde çok düşük şekil

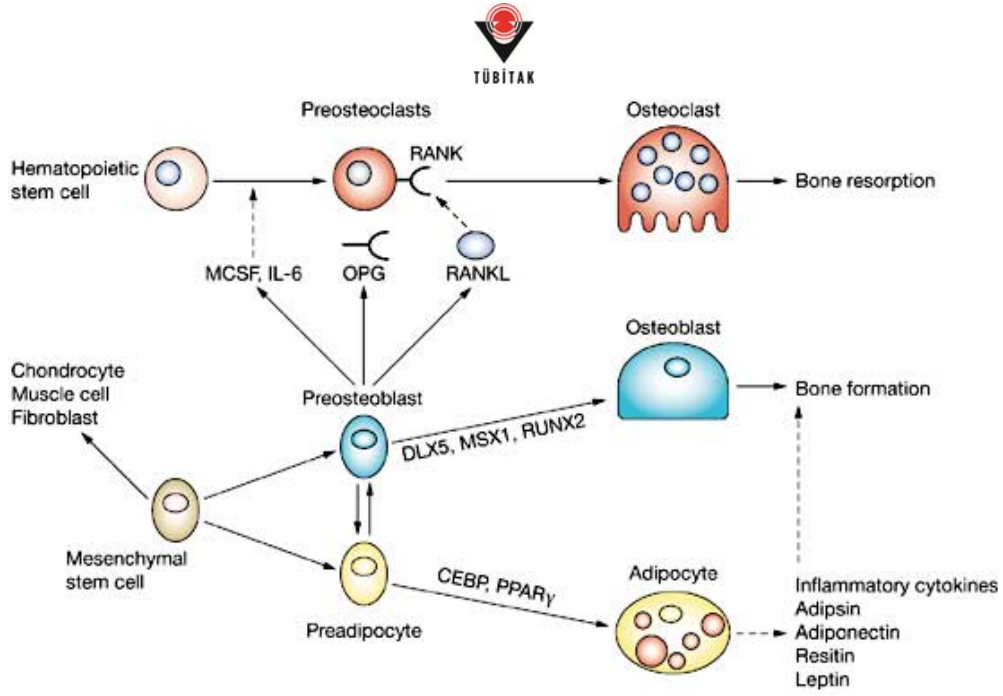


değiştirmelere yol açtığı (Garman vd., 2007a; Garman vd., 2007b; Ozcivici vd., 2007) düşünülürse (yürürken oluşınların 1/100ü kadar), bu sinyalin hücreler üzerindeki etkisinin tam olarak ortaya konulması durumunda yan etkiden bağımsız bir tedavi yöntemi olarak mükemmelleştirilmesi mümkün olacaktır.

Sebe-sonuç ilişkisi bazında ortaya konan klinik verilerin standardize edilmiş bir yöntem olarak uygulanabilirliği için kemik yapabilen hücrelerin hangi mekanizmalarla girdi sinyalini aldıklarının bilimsel olarak ortaya konulması gerekmektedir.

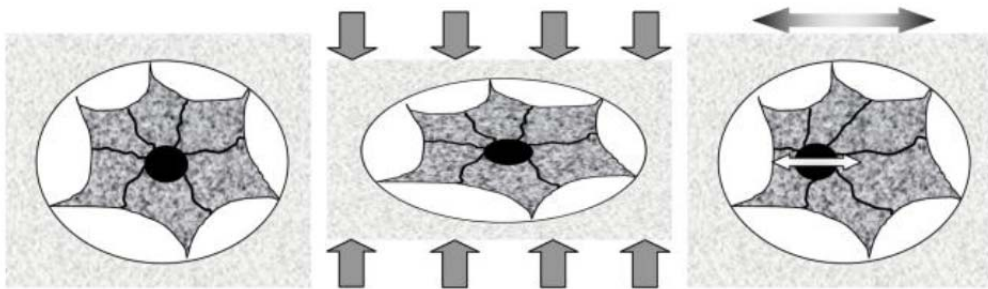
2.4 Kemik hücrelerinin *in vitro* mekanik testleri

Kemiğin dış kuvvetlere gösterdiği adaptasyonunu anlamak için kemik hücreleriyle (osteoblast, osteoclast, osteocyte) yapılan *in vitro* ve *in vivo* deneyler bu sahada önemli bir katkı sağlamayı hedeflemektedir (Tjandrawinata vd., 1997; Case vd., 2008). Fakat bundan bağımsız olarak, yakın zamanda kemik iliğinde barınan erişkin mezenkimal kök hücrelerinin de organizmanın kemik ve yağ fenotipindeki etkisi ortaya çıkmış bulunmaktadır (Rosen ve Bouxsein, 2006). Ayrıca kemik iliğinde bulunan bu hücrelerin üreme (proliferation) ve yönelim (differentiation) karakteristiklerinin de dış mekanik kuvvetlerden etkilenebildikleri görülmüştür (Song vd., 2007; Terraciano vd., 2007). Bu tarz veriler, kemik ve bu doku yönelimindeki hücrelerin mekanik kuvvetlerden etkilenmeleri için kemiğin mineral matrisine tutunma gereksinimini tartışmaya açmıştır. Bu amaca yönelik çalışmalarda neredeyse “0” genliğe sahip titreşim hareketlerinin sırf frekans karakterleriyle *in vivo* osteoblast hücrelerini etkileyip (Garman vd., 2007b) kullanmama karşılığı oluşan kemik yıkımını engellediği gözlemlenmiştir (Ozcivici vd., 2007; Ozcivici vd., 2010b). Yaşlılık ya da hareketsizlik durumunda sadece osteoblast hücrelerindeki azalma değil, kemik iliğindeki yağ hücrelerinin de artışı göz önüne alındığında (Şekil 1) erişkin kök hücrelerinin karar mekanizmalarının mekanik kuvvetlerden etkilendiği düşünülebilir. Bunun anlamı herhangi bir sebepten hareketsiz kalan bir hastada kemik yapımından sorumlu hücre havuzunun azalması ve böylece kemiğin mineral ve mimari yapısının bozulması, ayrıca ilik muhteviyatının yağ hücrelerince istila edilmesidir. Bu sürecin engellenebilir ve/veya geriye döndürülebilir olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Bu cevabın bulunması sunulan bu projenin ana amaçlarından bir tanesidir.



Şekil 1. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri. Kemik iliğine yerleşen kök hücrelerden mezankimal olanları ortamdaki sinyallere göre kemik (osteoblast) ya da yağ (adipocyte) yönelimlerine girerler. Bulunulan aşamada moleküler yolak işaretçileri tam olarak anlaşılabilmiş bu yönelimlerin, dışarıdan girilen mekanik kuvvetlerden de nasıl etkilendikleri henüz bilinmemektedir (Rosen ve Bouxsein, 2006).

Kemik iliğinde herhangi bir katı yüzeye (kemik dokusu) tutunmayan erişkin kök hücrelerinin mekanik kuvvetleri hangi mekanizmayla algılıyor olabilecekleri henüz yanıtlanmamış bir sorudur. Şu ana kadarki genel kabul edilen prensip hücrenin deformasyonu ile başlayan bir protein yolağı sonucunda hücrelerin kemik yapımına katılma kararı verdikleri yönündeydi. Fakat diğer bir olasılık sitoskeleton tarafından tutularak dengelenmiş hücre çekirdeğinin girdi hareketiyle beraber titreşerek hücre zarından bağımsız ayrı bir protein yolağı aktive etmesidir (Şekil 2).



Şekil 2. Hücre ve çekirdeğinin şematik sunumu. Çekirdek hücre membranına sitoskeleton sayesinde bağlanmış durumda (sol panel). Büyük genlikli yüklenmeler sırasında hücre deforme olur ve bu hücrede transkripsiyonel aktiviteyi başlatır (orta panel). Yüksek frekans ve düşük genlikli sinyal uygulandığında hücre içindeki çekirdek ile beraber bir yay sistemiyle bağlıymışçasına hareket eder (sağ panel). Bu son senaryo için tehlikeli olabilecek seviyelerde bir mekanik girdi gereksinimi yoktur (Garman vd., 2007b).

2.5 Mekanik altyapının önemi

Bu durumda hücrenin titreşim hareketi o hücrenin iskelet alt yapısıyla alakalı olabileceği fikri ağırlık kazanır. Hücre alt yapısındaki mekanik değişimleri test etmenin yegane yollarından birisi atomik kuvvet mikroskobu (atomic force microscopy - **AKM**) kullanımınıdır. AKM teknolojisi son yıllarda hücre biyolojisi araştırmalarında gittikçe artan bir yere sahiptir. Küçük bir ankastre çubuğun ucuna takılı olan sivri bir koniden (yarıçapı ~10 nm) oluşan AKM 1968 yılındaki icadından itibaren biyoloji ve biyofizik alanlarında kullanılmaya başlanmıştır (Binnig vd., 1986). AKM teknolojisinin biyomedikal alanda hücre zarı, DNA, protein, biyomalzeme, doku ve benzeri uygulamaları mekanik ve biyoloji alanlarının bir araya getirerek disiplinler arası çalışmalara izin vermesi önemlidir (Turner, 2009). AKM yüzeydeki tek hücreye yaklaşım onu mekanik testten geçirince araştırmacıya o hücrenin şekli ve yüksekliğinin yanı sıra hücrenin elastik ve viskoelastik yapısıyla da ilgili bilgi verir (Kirmizis ve Logothetidis, 2010). Bu bilgi, hücre altyapısının anlaşılmasına yaradığından dolayı (Hassan vd., 1998; Rotsch ve Radmacher, 2000), actin ve intermediate filamenlerin hücrenin mekanik özelliklerine daha çok etki ettiği, mikrotübüllerin ise önemsenmeyecek bir etkiye sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (Elson, 1988). Önemli bir başka husus da, AKM'nin basit olan temel çalışma prensibi sebebiyle çalışılan hücrelerin kültür yapısı bozulmadan, fizyolojik şartlara yakın ortamlarda test edilebilmesidir (Heidemann vd., 1999; Sato vd., 2000; Costa vd., 2003; Trickey vd., 2004). Bugün gelinen noktada AKM, kanser (Lekka vd., 1999), artirit (Jones vd., 1999) ve kalp damar (Zile vd., 1998) hastalıkları sırasında hücre mekanik ve altyapısal özelliklerinde değişimler olduğunu ortaya koyabilmiştir. Buna rağmen erişkin kök hücrelerinin mekanik alt yapısal özelliklerini anlama motivasyonuna sahip olan çalışmalar literatürde oldukça sınırlıdır. İnsandan alınan bir mezenkimal kök hücreye göre bir kemik hücrelerinin daha sert, bir yağ hücrelerinin ise daha yumuşak olduğu AKM kullanılarak elastik modül kapsamında gösterilmiştir (Darling vd., 2008). Fakat henüz bu fenotipi oluşturan alt yapısal değişimler (lipid, actin, desmin, lamin yapıları vs.) ve bu altyapısal değişimlerin gerçekleşmesine olanak kılan mRNA ifadeleri hakkında henüz bir şey bilinmemektedir ve bu proje kapsamında değerlendirileceklerdir.

AKM uygulamaları sadece canlı hücre mekanik testleriyle sınırlı değildir. AKM hücre dışı matrislerin de mekanik yapıları ve fonksiyonları konusunda bize önemli bilgiler verir. Kemik matrisi bu durum için önemli bir örnektir. AKM kullanılarak ölçülen *ex vivo* kemik matris değerleri kemiğin mineral ve collagen yapısı hakkında önemli bilgiler vermiştir (Sasaki vd., 2002; Hassenkam vd., 2004). Ayrıca bu yaklaşımla hücre kültürü ile yapılan kemik mekanik



yapısı anlaşılabilmiştir (Barragan-Adjemian vd., 2006). AKM kullanılarak elde edilen ölçümler, ona en yakın ölçüm metodu olan nanoindentation tarafından inilemeyen bir hassasiyetle ulaşılabilir olup, bu noktada AKM metodunun hastalıklar sırasında oluşabilecek değişikliklerin bulunması için kullanımı biyomedikal yaklaşımlarla ilintili hale gelmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hücre kültürü

Erişkin kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ATCC firmasından temin edilmiştir (D1 ORL UVA). Bu hücre hattı fare kemik iliğindeki mezenkimal kök hücrelerinden elde edilmiş olup, uygun koşullarda osteoblasta dönüşüp mineral matris üretebilir veya adipocyte haline gelip yağ depolayabilir (Poellmann vd., 2010; Mengatto vd., 2011). D1 hücrelerine uygulanan temel besiyeri (DMEM, 10%FBS, 2%PenStrep) şeklinde olup, hücreler deneyler sırasında nemlendirilmiş standart hücre kültürü inkübatöründe saklanmıştır (37°C, 5% CO₂). Ek olarak hücreler geliş itibarıyla birinci pasajda sayılarak 4-7. Pasaj aralığına kadar büyütülerek DMSO içinde sıvı azot buharında saklanmışlardır.

Tüm deneyler için D1 hücreleri 24 ya da 6 kuyuluk hücrelere ekilmiş ve iki gün boyunca plastikte yerleşme ve kaplama yapmalarına izin verilmiştir. Sonrasında hücreler kültür medyasında gerekli modifikasyonlarla (kültüre β -glycerol phosphate (10 mMol), askorbik asit (1000 μ g/ml) – kemik yönelimi, insülin (5 μ g/ml), indomethacine (50 μ M) ve dexamethasone (10 nM) – yağ yönelimi eklenmesiyle) hücrelerin kemik ya da yağ hücrelerine dönüşmeleri sağlanmıştır. Deneyler toplamda 9 gün boyunca sürmüştür ve bu süreçte hücreler için 3 kez besiyeri değişimi yapılmıştır.

Hücrelerin deney sırasında mekanik kuvvetle tahriki gerekiyorsa bu süre boyunca hücreler muhafazalı bir şekilde ortam koşullarında bulunmuşlardır.

3.2 Mekanik sinyallerin uygulanması

Hücrelere mekanik sinyaller sinüsoidal titreşimler üretebilen bir platform tarafından uygulanmıştır. Bu cihaz laboratuvarımızda üretilmiş olup, çalışma şartları ile ilgili veriler bulgular kısmında paylaşılmıştır. Cihaz birer adet sinyal jeneratörü (MULTIMETRIX), güç ampilifikatörü (SPEKON), ivmemetre (KISTLER), veri toplama kartı (NATIONAL INSTRUMENTS) ve de subwoofer hoparlör (WHARFEDALE) kompozisyonundan oluşmaktadır. Mekanik sinyal içeren tüm deneylerde hücrelere 15 dakika boyunca 90 Hz (1/s) ve 0.15g (1g=9.81m/s²) karakterinde fiziksel titreşim dalgaları uygulanmıştır.

3.3 Hücre görüntüleme yöntemleri

3.3.1 Tekli immünohistokimyasal analizler

Lamel'de büyütülen D1 ORL UVA erişkin kök hücreleri iki defa 1XPBS'le yıkandıktan sonra 1X PBS'te hazırlanmış %4 paraformaldehide ile 20 dakika boyunca sabitlenmiştir. %0.1 TritonX-100'lü 1XPBS'le hücre zarının geçirgenliği 15 dakika boyunca artırılmış ve hücreler %3 BSA bulunan %0.1 TritonX-100'lü 1XPBS'le 30 dakika boyunca bloklanmıştır. Daha sonra hücrelere, Alexa488-Phalloidin, Alexa647-Phalloidin ya da 1:500 oranında seyreltilen tavşan anti-Cx43 birincil antikor (rabbit anti-Cx43 antibody (Invitrogen)) bütün gece 4°C'de uygulanmıştır. Cx43 boyaması için ertesi gün birincil antikor üç kere 1XPBS'le yıkandıktan sonra tavşana karşı üretilen floresan molekül bağlı ikincil antikor (Alexa Fluor 555- anti-rabbit antikor (Invitrogen)) 1:200 oranında seyreltilerek 30 dakika boyunca uygulanmıştır. Üç kere 1XPBS'le yıkanan lameller cam lamlara hücre çekirdeğini boyamak için DAPI yükleme solüsyonuyla (mounting medium) yüklenmiştir. Hazırlanan cam lamlar floresan mikroskopta 40X objektifiyle kontrol edilip resimleri çekilmiş, ImageJ programıyla da (NIH) birleştirilmiştir.

3.3.2 Kalsifiye matris görüntülenmesi

Hücre dışında oluşan mineralize yüzeyler Alizarin Red boyama yöntemiyle görüntülenmiştir. Bu boyamada hücreler 3 kez 1x PBS ile yıkandıktan sonra formalinle sabitlenmiş, ardından alizarin boyası ile boyanmışlardır. Oluşan mineral nodüller mikroskop aracılığı ile görüntülenmiştir.

3.3.3 Yağ oluşumunun görüntülenmesi

Hücre içerisinde biriken lipidlerin boyanabilmesi için hücreler 3 kez 1x PBS ile yıkandıktan sonra formalinle sabitlenmiş, ardından oil-red-o boyası ile 37°C de bir saat boyunca inkübe edilmişlerdir. Oluşan kırmızı yağ damlacıkları mikroskop aracılığı ile görüntülenmiştir.

3.4 Atomik kuvvet mikroskopu görüntülemeleri

Atomik kuvvet mikroskopu kullanımı gerektiren deneyler için proje süresince iki farklı yöntem kullanılmıştır. İlk dönem çalışmalarında (kemik yönelimine giren kök hücrelerin altyapısı için) hücrelerin morfolojik yapıları atomik kuvvet mikroskopu ile İYTE Malzeme Araştırma Merkezi'nde (MAM) ölçülmeye başlanmıştır. Bir hafta boyunca normal ya da kemik yönelimi besiyerinde 9mm çapında cam yüzey üzerinde büyütülen hücreler deney günü merkeze götürülmüş ve silikon uçlu bir Digital Instruments-MMSPM Nanoscope IV (Bruker) cihazı ile taramıştır. Bu taramalar için hücreler ultrasaf suyla yıkandıktan sonra 10dk ortam koşullarında kurutulmuştur. Taramalar için silikon (yarı açısı 35° ve yay sabiti 8 N/m) bir uç kullanılmıştır. Tarama öncesi hücre pozisyonları optik mikroskopla belirlenmiştir.



İkinci dönemde İYTE-MAM olanaklarının ötesinde, sıvı içerisinde tarama yapabilen bir atomik kuvvet mikroskobu için İYTE Malzeme Mühendisliği Bölümü olanakları kullanılmıştır. Bu dönemde yağ yönelimine giren hücreler Flexafm (Nanosurf) ve NCLR uç (190 kHz rezonans frekansı, 48 N/m yay sabiti) kullanılarak 71,4143 kHz frekans ve 3,07mV genlikte besiyeri içerisinde taranmıştır.

3.4.1 Hücre içerisine floresan boya alımı görüntülenmesi

Neurobiotin alım deneylerinde hücreler 1x PBS içerisinde %2 Neurobiotin (Vector Labs) bulunan ortamda bulunurlarken 200µl pipet ucu vasıtasıyla kültür plastiği üzerinde düz çizgiler çekilmiş ve 5dk boyunca beklenmiştir. Bu sürenin sonunda hücreler 1X PBS'te hazırlanmış %4 paraformaldehyde ile 20 dakika boyunca sabitlenmiştir. %0.1 TritonX-100'lü 1XPBS'le hücre zarının geçirgenliği 10 dakika boyunca artırılmış ve hücreler %3 BSA bulunan %0.1 TritonX-100'lü 1XPBS'le 15 dakika boyunca bloklanmıştır. Daha sonra hücreler 1:1000 oranında tetra methyl rhodamine isothiocyanate (TRIT-C)'e bağlı streptavidin'le (Pierce) muamele edilmişlerdir. 1XPBS'le yıkanan hücreler floresan mikroskopta 20X objektifiyle kontrol edilip resimleri çekilmiş, ImageJ programıyla da analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.5 mRNA ifade analizleri

Moleküler ifade analizlerinde kullanılmak üzere dizayn edilen primerler (Tablo 1) nükleaz içermeyen suda çözülmüş, kullanım solüsyonu 500X'lik stok solüsyonunu 10X'e seyrelterek elde edilmiştir. Toplam mRNA izolasyonu için, 6 kuyulu platelerde bulunan hücreler iki kere 1XPBS ile yıkandıktan sonra sıvı azotla dondurulmuştur. Sıvı azottan alınan platelerin kuyularına 200µl lysis buffer eklenip hücreler buzun üzerinde 2-3 dk boyunca bekletilmiştir. Kuyulardaki parçalanmış hücreler 1.5 ml'lik eppendorf tüplerde toplanmış ve insülin iğnesi yardımıyla homojenize hale getirilmiştir. Tüpteki sıvılar, üzerlerine kendi hacimleri kadar etanol eklendikten sonra, toplam mRNA izolasyonu PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen) protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Elde edilen örneklerin mRNA konsantrasyonları Nanodrop kullanılarak ölçülmüştür. Eşit miktarlarda mRNA'dan First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) ile elde edilen cDNA'lar RT-PCR analizi için kullanılmıştır. Çevrimler sonucu elde edilen ifade eğrileri kontrollü olarak analiz edilmiştir. Üç tekrarlı (triplicate) olarak yürütülen RT-PCR deneylerinde numune sayısı da üç olarak kullanılmıştır. Bütün mRNA ifade analizi deneylerinde fare GAPDH geni içsel kontrol (housekeeping gene) olarak kullanılmıştır. Tüm deneyler RT-PCR BioRad IQ5 & MYQ sisteminde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Delta-Delta Ct yöntemiyle analiz edilmiştir.

Tablo 1. RT-PCR’da kullanılan primer listesi

Gen	Yön	Sekans
Runx2	F	TCC CTG AAC TCT GCA CCA AGT
	R	TTC CGT CAG CGT CAA CAC CAT
OCN	F	CTG ACA AAG CCT TCA TGT CCA A
	R	GCG CCG GAG TCT GTT CAC TA
β -Actin	F	CTT CTT TGC AGC TCC TTC GTT
	R	TTC TGA CCC ATT CCC ACC A
Desmin	F	GTG AAG ATG GCC TTG GAT GT
	R	GTA GCC TCG CTG ACA ACC TC
Vimentin	F	ACG GTT GAG ACC AGA GAT GG
	R	CGT CTT TTG GGG TGT CAG TT
β -Tubulin	F	GAT GGG CAA CTG TAC CTG ACT G
	R	CTG GGC TCC TCT TGG AAT G
PTK2	F	TTG GAC CTG GCA TCT TTG AT
	R	AGA ACA TTC CGA GCA GCA AT
Adipsin	F	GCT ATC CCA GAA TGC CTC GTT
	R	CCA CTT CTT TGT CCT CGT ATT GC
C/EBP- α	F	TGG ACA AGA ACA GCA ACG AGT AC
	R	GCA GTT GCC CAT GGC CTT GAC
Lamin	F	ATC AAC TCC ACT GGA GAA GAA GT
	R	CAG ACA GGA GGT GGC ATG T
ENC-1	F	AAG CTT CGG CAT A
	R	AAG CT ₁₁ A
β -catenin	F	AAG GAA GCT TCC AGA CAT GC
	R	GCT TGC TCT CTT GAT TGC C
PPAR γ	F	GCC TTG CTG TGG GGA TGT C
	R	TCCTTGCCCTCTGAGATGAG
GAPDH	F	GAC ATG CCG CCT GGA GAA AC
	R	AGC CCA GGA TGC CCT TTA GT

3.6 Veri analizi ve istatistikler

Tüm veriler aksi belirtilmedikçe ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur. İstatistiki karşılaştırmalar Student’s t-test yardımıyla yapılmış ve %5in altında bulunan p değerlerinin

istatistiki anlam ifade ettiği kabul edilmiştir. Tüm qPCR deneylerinde en az 3 örnek kullanılmış, geri kalan deneyler için en az 6 örnek kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Mezenkimal kök hücrelerin istenen yönelimlere girebilmeleri

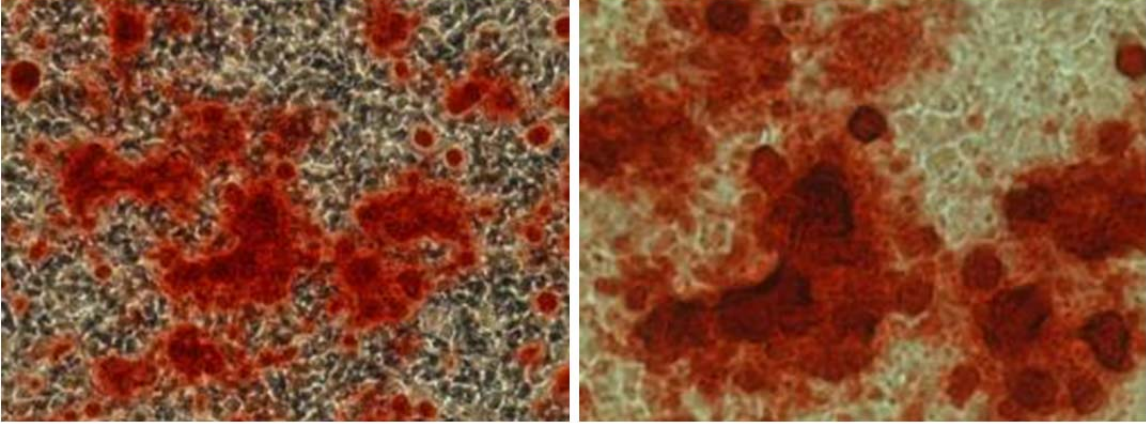
Projede kullanılan D1 ORL UVA hücrelerini proje süresince 3 farklı koşula bağlı olarak devam ettirilmişlerdir. Bunlardan birincisi normal besiyeri (Growth), ikincisi kemik yönelimi sağlayan besiyeri (Osteogenic) ve yağ yönelimi oluşturan besiyeri (Adipogenic). Bu şartlara göre hücrelerin cevapları tespit edilmiştir:

4.1.1 Kök hücrelerin kemik yönelimine sokulması

Hücreler yöntemler kısmında belirtilen kemik yönelimi (osteogenic) şartlar altında 2 ya da 3 hafta boyunca bekletilmişler ve sonuçta hücre dışındaki oluşan mineralize yüzeyler Alizarin Red boyama yöntemiyle görüntülenmiştir. Deney sonucunda kemik oluşumuna yönlendirilen kök hücrelerin fonksiyonel oldukları ve kontrol hücrelerinin özel olmayan (non-specific) mineralize matris oluşturmadıkları gözlemlenmiştir (Şekil 3 ve Şekil 4).



Şekil 3 Kök hücrelerinin kemik yönelimi. Soldaki plastik kuyu 2 sağdaki plastik ise 3 hafta sürdürülen deneyi temsil etmektedir. Hücre kuyularında her bir sıra için soldaki 3 kuyu deneysel sağdaki 3 ise kontrol kuyularıdır. Kontrol kuyularında mineral matris oluşumu gözlenmemiştir.

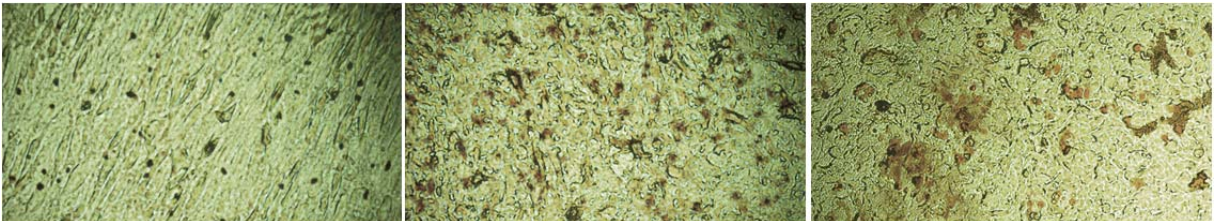


Şekil 4. Kemik oluşumuna yönelmiş kök hücrelerde mineralizasyon. Mezenkimal kök hücrelerinin oluşturdukları hücre dışı matrisinin alizarin boyası ile boyandıktan sonra inverted mikroskop ile çeşitli odaklamalar ile görüntülenmesi. Kırmızı nodüller Alizarin red boyası ile boyanan kalsifiye matrislerdir.

4.1.2 Kök hücrelerin yağ yönelimine sokulması

Bu deneyde 24 kuyulu plastiğe aktarılan hücrelerin büyüme sıvılarına ekim gününü takip eden günden (hücrelerin yüzeye yapıştıklarından emin olunduktan sonra) itibaren büyüme medyasına insülin, indomethacine ve dexamethasone eklenmiştir.

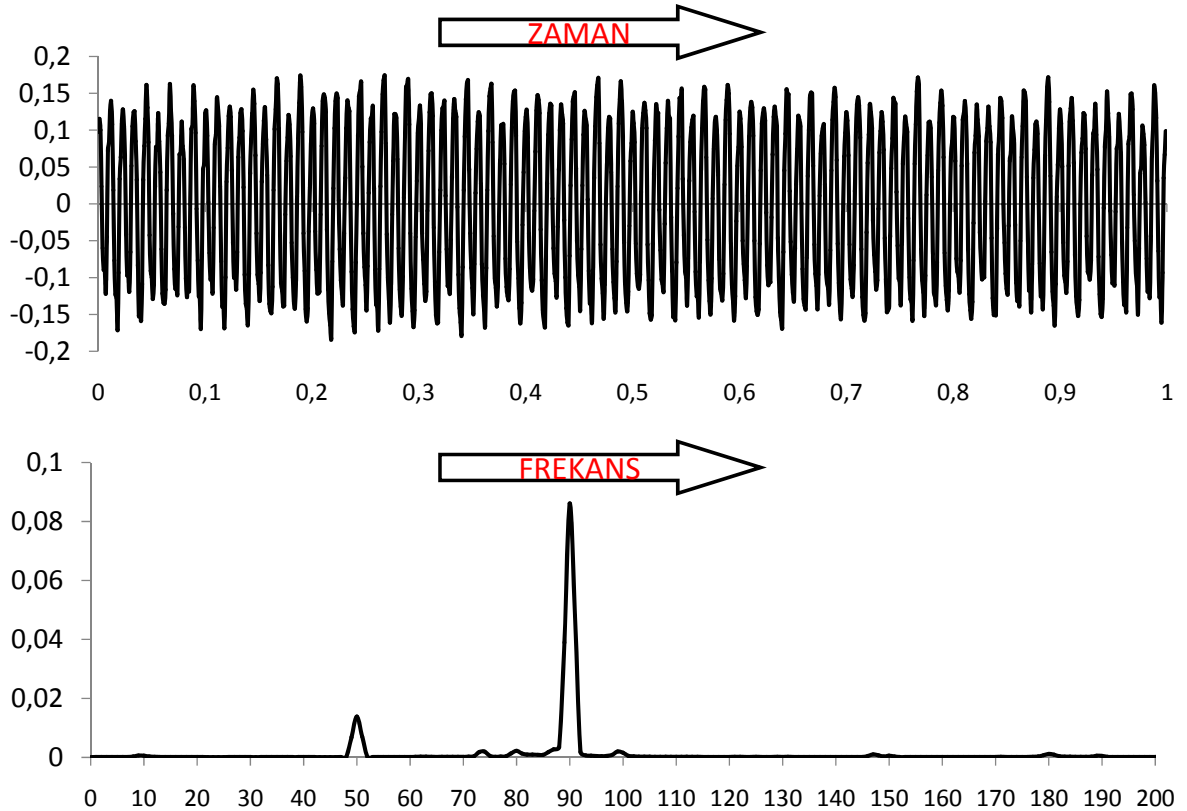
Bu şartlarda 2 hafta büyütülen hücreler ardından oil-red-o boyası ile boyanmışlardır (Şekil 3). Bu boyama teknik açıdan alizarin boyaması ile benzer olup hücrelerin yıkanması ve sabitlenmesi işlemiyle başlatılmıştır. Ardından hücreler isopropanolde çözülmüş oil-red-o boyasıyla 37°C de inkübe edilip fotoğraflandırıldılar (Şekil 5).



Şekil 5. Yağ yönelimine solukan mezenkimal kök hücrelerin görüntülenmesi. İki hafta boyunca bekleyen kontrol hücrelerinde (sol panel) oil-red-o boyaması sonucunda yağ birikimi gözlenmezken, yağ yönelimine sokulan mezenkimal kök hücrelerde ilk (orta panel) ve ikinci hafta (sağ panel) sonunda biriken yağ damlacıkları kırmızı olarak görüntülenmiştir.

4.2 Mekanik titreşim oluşturabilen bir platformun faaliyete alınması

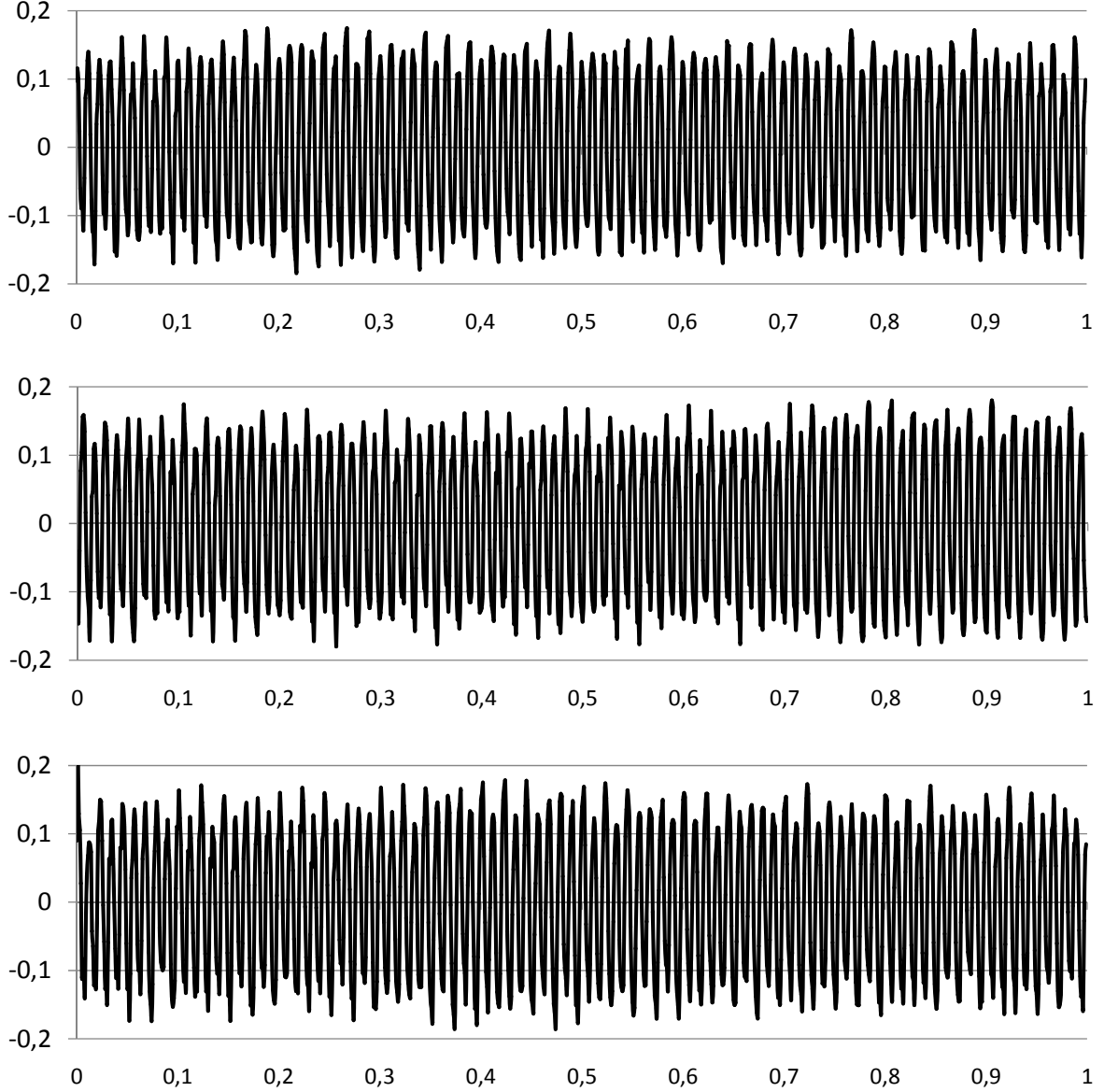
Mekanik titreşim üretebilen bir sarsıcı cihaz tasarlanmış ve kullanıma sokulmuştur. Entegrasyonu laboratuarda tamamlanan cihaz, hücrelere uygulanması planlanan mekanik sinyalin kalitesi açısından test edilmiştir. Jeneratörden çıkan zayıf elektriksel sinyallerin amfi ile güçlendirilmesinden sonra hoparlörde mekanik sinyallere dönüştürülmüştür. Oluşan bu mekanik sinyaller ivmelenmenin genliği, frekansı ve tekrarlanabilirliği açısından ivmemetre aracılığı ile test edilmiş ve sonuçlar olumlu bulunmuştur. Genlik, ivmemetre ile ölçülen sinyalin tepe-çukur mesafesi olarak 90 Hz de (saniyede 90 tekrar), 0.15g cihaz tarafından kolaylıkla üretilbildiği saptanmıştır (Şekil 6). Mekanik sinyal karakterizasyonunda en az genlik kadar öneme sahip frekans elde edilen sinyallerin Fourier Transferi kullanılarak spektral alana aktarımlarıyla test edilebilmiştir. Sarsıcı cihazda elektriksel ve mekanik aksamların beraber çalışmaları sırasında sinyalde herhangi bir frekans farkı oluşup oluşmadığı araştırılmış ve jeneratör sinyaliyle mekanik titreşim sinyali arasında frekans açısından herhangi bir fark gözlemlenmemiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Mekanik titreşim sinyalleri. Tasarımı tamamlanan mekanik titreşim cihazının ivmemetre ile ölçülen sinyal çıktıları. Testler sinyal jeneratöründen 90 Hz çıkışta yapılmıştır. Üst panel Zaman-ivmemetre voltajı grafiği, voltajın tepe tepe mesafesi 0.15g ye karşılık gelmektedir. Alt panel Ölçülen sinyalin frekans çıktısı, beklendiği gibi 90 Hz seviyesinde bir

tepe oluşturmuştur. 50Hz civarında görülen sinyal şehir elektrik şebekesinin yarattığı elektromanyetik alandan kaynaklı olup mekanik bir anlam taşımamaktadır.

Bunlara ek olarak sarsıcı cihazın ürettiği sinyallerdeki tekrarlanabilirlik ayrı zaman gruplarında test edilmiş ve sonuçta sinyal genliğinde herhangi bir değişim olmadığı saptanmıştır (Şekil 7). Bu veriler ışığında hücrelerin günlük 15dk titreşim uygulamaları sırasında sabit bir sinyal görecekları düşünülmektedir.



Şekil 7. Mekanik titreşimlerin tekrarlanabilirliği. Üç farklı zamanda kaydedilen 1 saniyelik süreçler, mekanik titreşimde deney süresince herhangi bir frekans ya da genlik değişimi olmadığını göstermektedir.

4.3 Mekanik titreşimlerin kemik yönelimine giren kök hücrelere etkisi

D1 ORL UVA erişkin kök hücreleri kültüre yerleştirildikten sonra günlük yüksek frekanslı (90Hz) ve düşük yoğunluklu (0.15Hz) titreşimlere maruz bırakılmış ve bu girdinin hücrelerde yarattığı değişiklikler gözlenmiştir. Tüm deney sonuçları için hücreler kontrol (Control - **C**), titreşim (Vibrated - **V**), büyüme besiyeri (Growth Media - **G**) ve kemik yönelimi besiyeri (Osteogenic media - **O**) olarak kodlanmıştır. Bu durumda büyüme besi yerinde bulunan kontrol hücreleri **GC**, titreşim uygulanan büyüme besiyerinde bulunan hücreler **GV**, kemik yönelimindeki kontrol hücreleri **OC**, kemik yönelimindeki titreşim uygulanan hücreler **OV** olarak kodlanmıştır.

4.3.1 Hücre büyüme ve canlılıkları

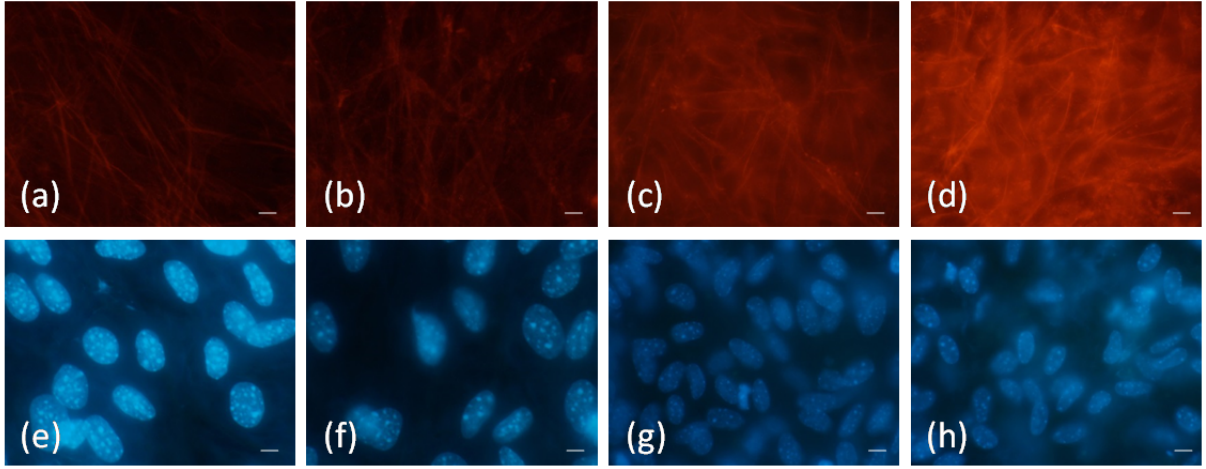
Bir hafta boyunca mekanik girdiye maruz bırakılan hücrelerin bir haftalık uygulama sonunda canlılıkları Trypan Blue sayımı ve MTT analizi ile test edilmiştir. Buna göre GV grubunda sayılan hücre sayısı GC grubuna göre %13 ($p<0.05$) fazla gözükmemektedir (Tablo 2). Benzer şekilde MTT sonucu da anlamlı ($p<0.05$) bir fark göstermiştir. Trypan blue sayımında OC ve OV grupları arasında istatistiki fark gözlenmemiştir ($p=0.32$), fakat MTT sonucu OV grubunda OC grubuna oranla %3 ($p<0.05$) fazla canlılık olduğunu göstermektedir (Tablo 2).

Tablo 2. Mekanik titreşimlerin hücre sayılarına etkisi. (* : $p<0.05$)

Grup	Hücre Sayısı [$\times 10^5$/mL]	Hücre Canlılığı [a.u.]
GC	0.98 \pm 0.17	3.46 \pm 0.05
GV	1.10 \pm 0.25*	3.51 \pm 0.07*
OC	1.54 \pm 0.61	3.40 \pm 0.06
OV	1.72 \pm 0.36	3.49 \pm 0.06*

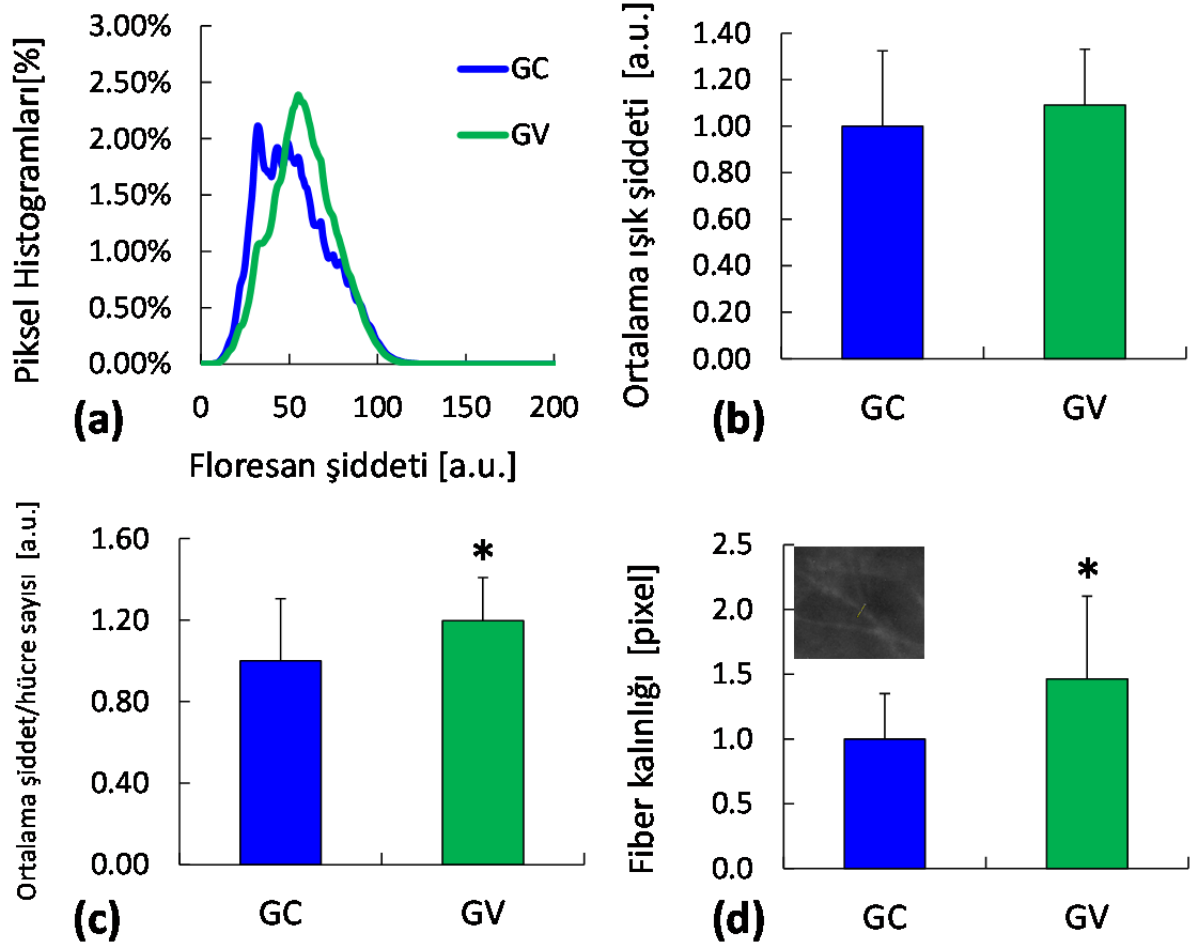
4.3.2 Hücre aktin altyapısı

Bir hafta boyunca mekanik girdiye maruz bırakılan hücrelerin bir haftalık uygulama sonunda aktin altyapısı etkisi Phalloidin boyaması ile tespit edilmiş, gerekli normalizasyonların yapılabilmesi için ek olarak hücreler çekirdek boyaması ile (DAPI) boyanmışlardır (Şekil 8).



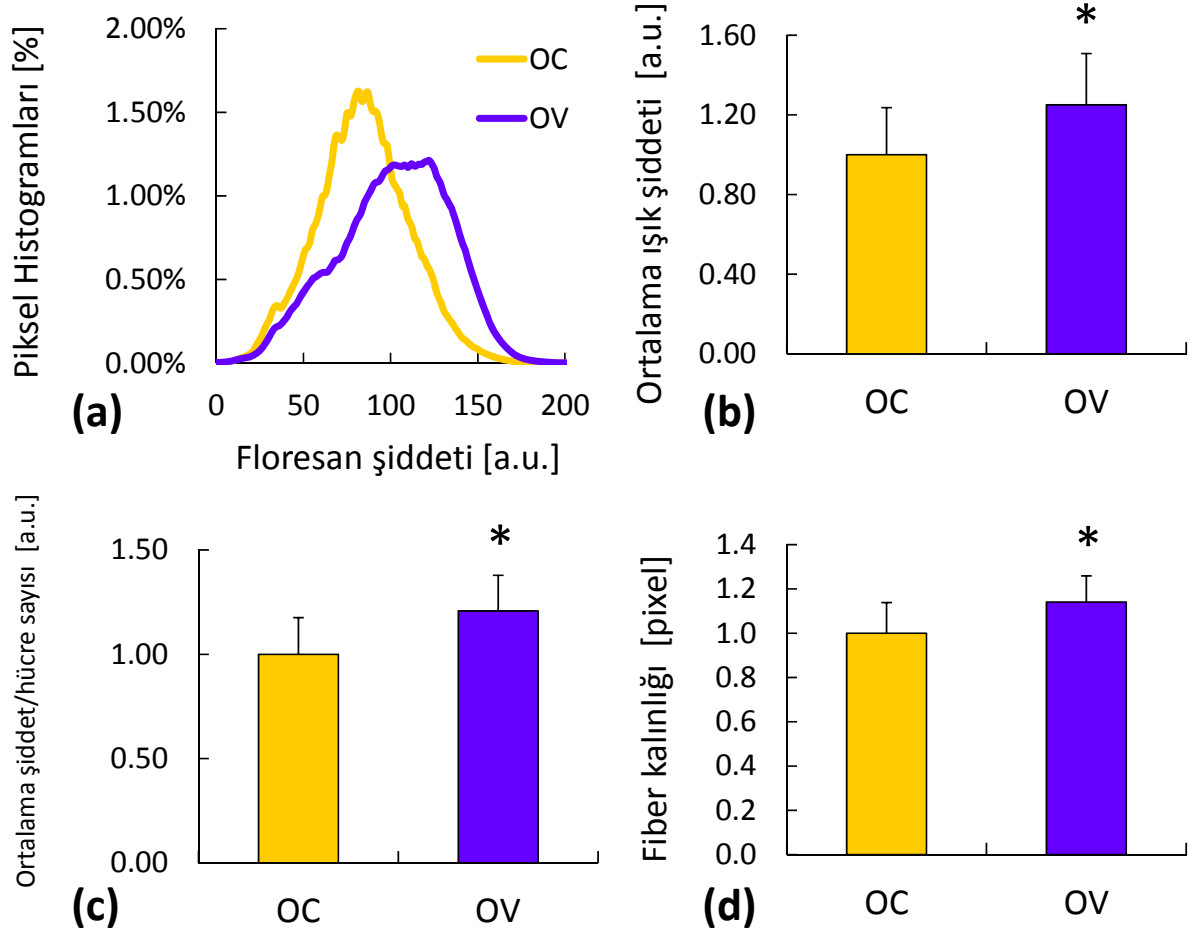
Şekil 8. Mekanik titreşimlerin kök hücre aktin yapısı üzerindeki etkileri. Üst paneller aktin (phalloidin), alt paneller çekirdek (DAPI) boyamalarını göstermektedir. Grup dağılımları: (a,e) GC; (b,f): GV; (c,g): OC; (d,h) OV şeklindedir. Skala: 10 μ m.

Sonuçlara göre titreşim uygulaması GC ve GV grupları için istatistiki olarak benzer aktin ışık şiddeti alınmasına yol açmıştır. Bu sonuçlara hem piksel bazında ışık şiddeti dağılımı, hem de ışık dağılımının ağırlıklı ortalaması bulunarak karar verilmiştir (Şekil 9a ve 9b). Işık miktarı her bir resim için ayrı ayrı sayılan DAPI ile görüntülenmiş hücre çekirdek sayısına normalize edildiğinde ise GC grubuna oranla GV grubunda %20 ($p < 0.05$) daha fazla hücre başına düşen ışık şiddeti gözlenmiştir (Şekil 9c). Bu verilere ek olarak gözlemlenen aktin iplikçiklerin ortalama kalınlıklarına (Şekil 9d iç panel) bakıldığında GV grubuna ait iplikçikler GC grubuna ait olanlara göre %46 ($p < 0.05$) daha kalın olarak gözlenmiştir (Şekil 9d).



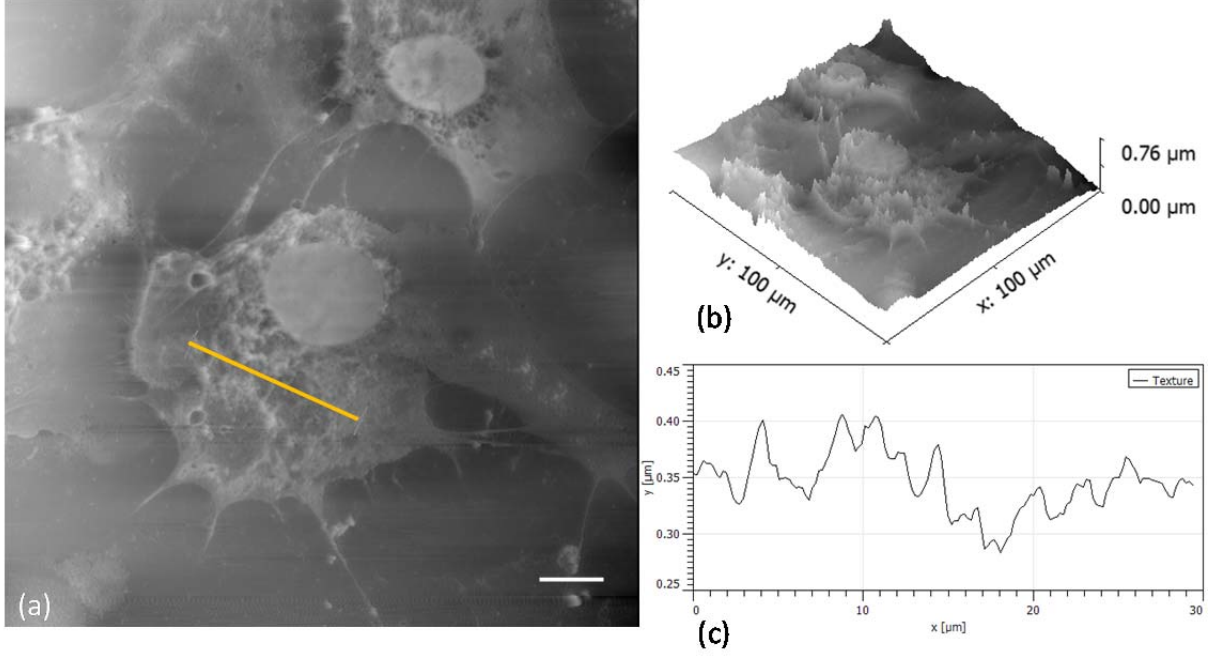
Şekil 9. Mekanik titreşimlerin büyüme besiyerindeki hücrelerin altyapısına ekisi. (a) aktin ışık şiddetinin dağılımı (b) ortalama ışık şiddeti (c) hücre çekirdek sayısına normalize edilmiş ışık şiddeti (d) aktin fiber kalınlığı (* : $p < 0.05$)

Günlük titreşim uygulamasının kemik yönelimine girmiş olan kök hücrelere uygulanması sonucunda aktin ışık şiddeti OV grubunda OC grubuna göre %21 ($p < 0.05$) artmış olarak gözlenmiş (Şeki 10a ve 10b), ayrıca çekirdek sayısına normalizasyon gerçekleştiğinde bu fark %25 ($p < 0.05$) olarak ortaya çıkmıştır (Şekil 10c). Ek olarak hücrelerde bulunan aktin iplikçigi ortalama kalınlıkları OV grubunda OC grubuna oranla %14 ($p < 0.05$) daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 10d).



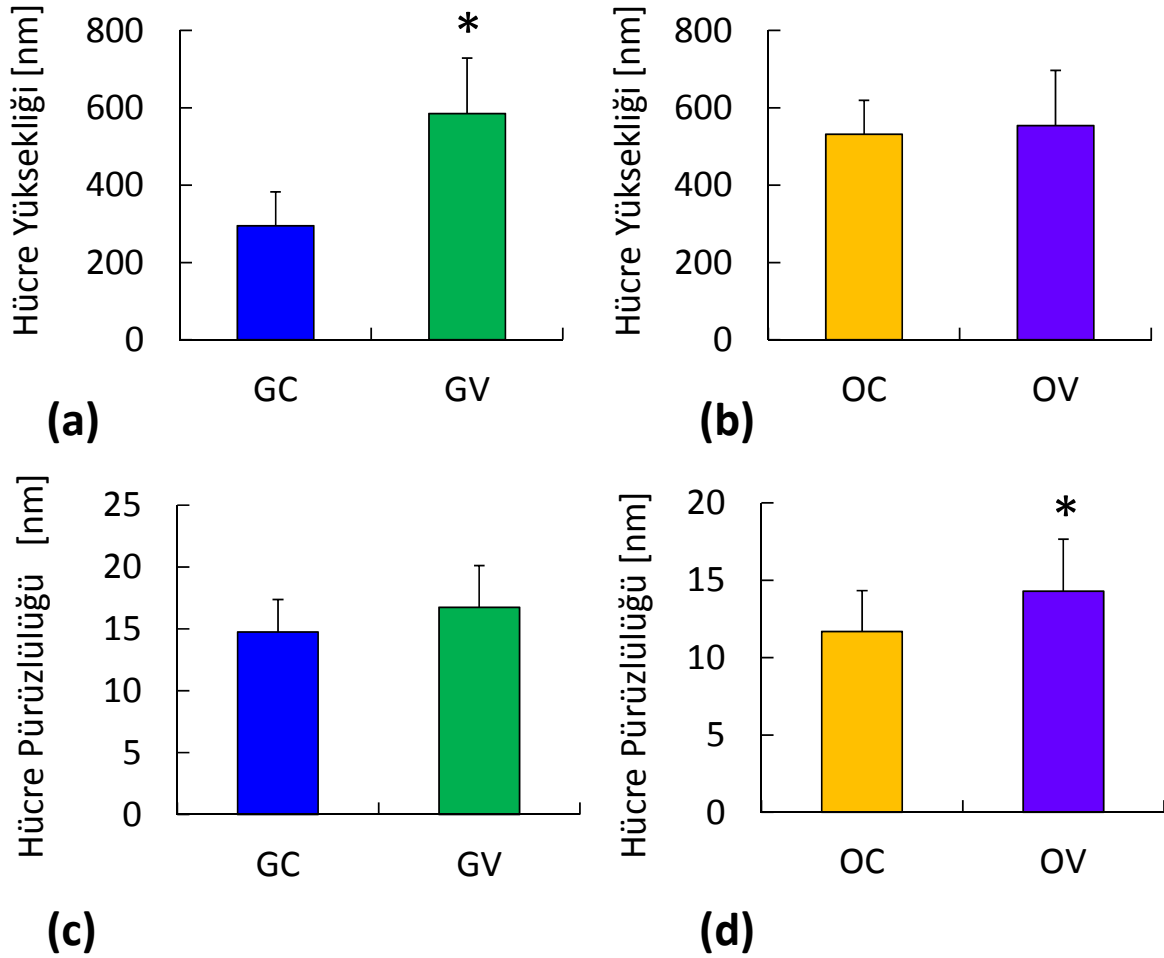
Şekil 10. Mekanik titreşimlerin kemik yönelimindeki hücrelerin altyapısına ekisi. (a) aktin ışık şiddetinin dağılımı (b) ortalama ışık şiddeti (c) hücre çekirdek sayısına normalize edilmiş ışık şiddeti (d) aktin fiber kalınlığı (* : $p < 0.05$)

Floresan görüntülemeye ek olarak hücre morfolojisi atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak da bakılmıştır. Bu yöntemle hücreler bireysel olarak 3 boyutlu taramış, bu taramalar sonucunda hücre yükseklikleri ve membran pürüzlülükleri tespit edilmiştir (Şekil 11).



Şekil 11. Hücrelerin atomik kuvvet mikroskobu ile taranmasına ait temsili resim. (a) haritalanan yüzeyin iki boyutlu görüntüsü (gri tonlar yükseklik değerlerine karşılık gelmektedir, skala: 10µm), (b) aynı yüzeyin üç boyutlu görüntüsü, (c) sarı çizgi aracılığı ile görüntülenen 30µm uzunluğundaki kısımdaki pürüzlülük ve yükseklik dağılımı.

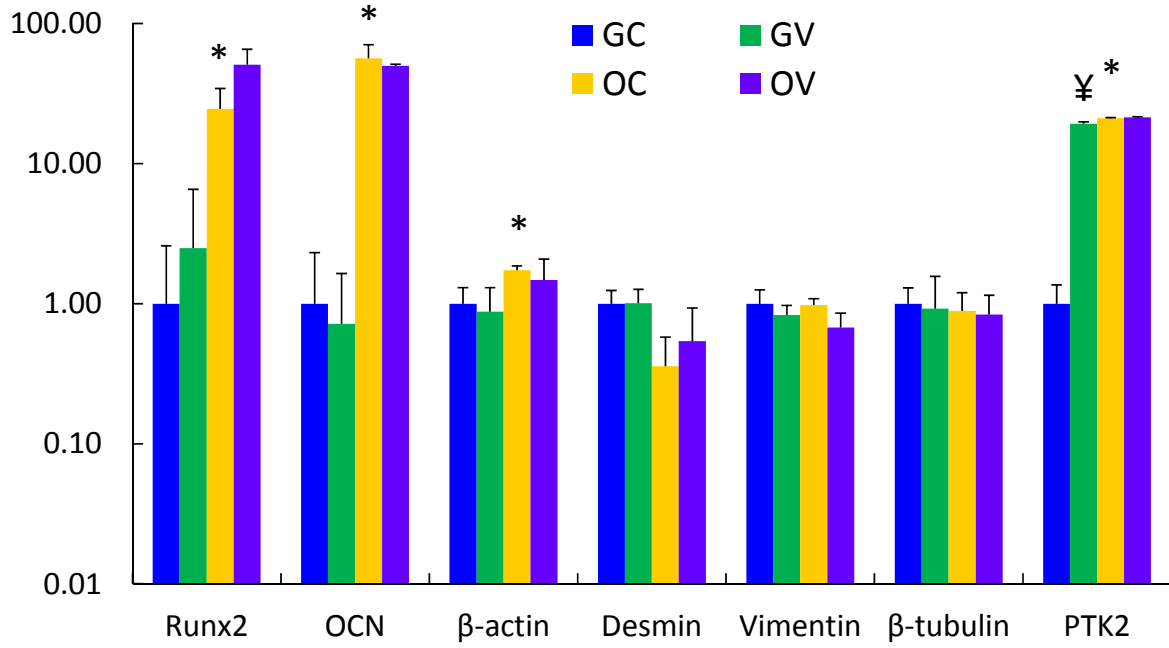
Atomik kuvvet mikroskobu sonuçlarına göre mekanik titreşim uygulaması GV grubu hücrelerinin yüksekliğini GC grubuna göre yaklaşık iki katına ($p < 0.05$) çıkarmış, fakat membran pürüzlülüğüne istatistik olarak anlamlı ($p = 0.1$) bir etki etmemiştir (Şekil 12a ve 12c). Kemik yönelimine giren kök hücrelerde ise tam tersi bir etki gözlenmiş, OV grubunun OC grubuna göre hücre yüksekliği benzerken ($p = 0.32$), hücre pürüzlülüğünün %22 ($p < 0.05$) daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 12b ve 12d).



Şekil 12. Mekanik titreşimlerin büyüme ya da kemik yöneliminde morfolojiye etkisi. (a) büyüme hücre yüksekliği (b) kemik yönelimindeki (c) büyüme hücre pürüzlülüğü (d) kemik yönelimindeki hücre pürüzlülüğü (* : $p<0.05$)

4.3.3 Moleküler belirteçler

Mekanik uygulama sonucunda elde edilen hücrelerde yapılan gerçek zamanlı qPCR sonuçlarına göre kemik yönelimi ile ilgili genlerin mRNA ifadeleri (Runx2 ve OCN) normal besiyeri gruplarına göre 10 kattan ($p<0.05$) fazla artmıştır (Şekil 13). Bu genler için OV ve OC grupları arasında ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Aynı şekilde β -actin ifadesi de kemik yönelimindeki kök hücrelerde 2 kat ($p<0.05$) artmıştır, fakat burada da günlük uygulanan mekanik titreşimler bir değişikliğe yol açmamıştır. Microtubule (β -tubulin) ve intermediate filament (desmin ve vimentin) miktarları da titreşim ve kemik yöneliminden etkilenmemiştir. Ek olarak kemik yönelimine giren hücrelerde focal adhesion kinase (PTK2) mRNA ifadesi normal besiyerinde olan kök hücrelere göre 20 katlık ($p<0.05$) bir artış gösterirken, mekanik titreşim uygulanmış normal besiyerindeki GV hücreleri de bu farkı göstermişlerdir (Şekil 13)



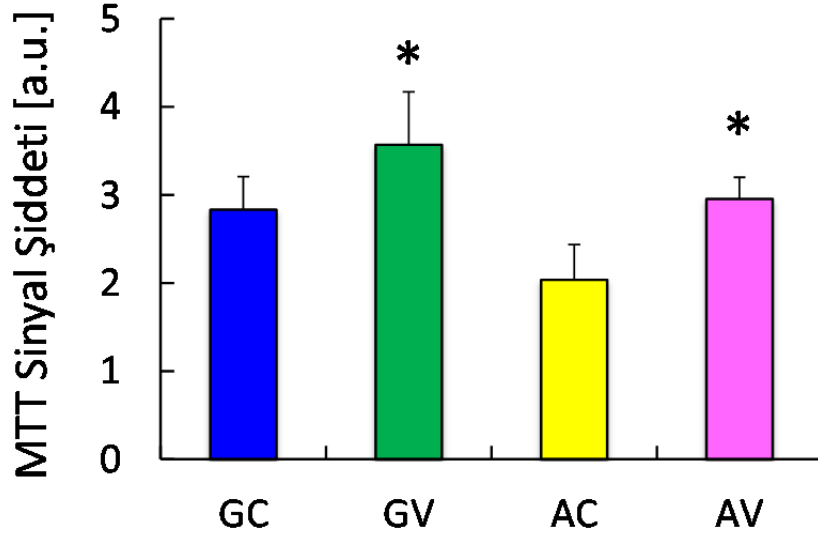
Şekil 13. Mekanik titreşimlerin büyüme ya da kemik yönelimine giren kök hücrelerin çeşitli mRNA belirteçlerinin ifadesi üzerindeki etkisi. (* : GC-OC $p < 0.05$; ¥: GC-GV $p < 0.05$)

4.4 Mekanik titreşimlerin yağ yönelimine giren kök hücrelere etkisi

D1 ORL UVA erişkin kök hücreleri kültüre yerleştirildikten sonra günlük yüksek frekanslı (90Hz) ve düşük yoğunluklu (0.15Hz) titreşimlere maruz bırakılmış ve bu girdinin hücrelerde yarattığı değişiklikler gözlenmiştir. Tüm deney sonuçları için hücreler kontrol (Control - **C**), titreşim (Vibrated - **V**), büyüme besiyeri (Growth Media - **G**) ve kemik yönelimi besiyeri (Osteogenic media - **A**) olarak kodlanmıştır. Bu durumda büyüme besi yerinde bulunan kontrol hücreleri **GC**, titreşim uygulanan büyüme besiyerinde bulunan hücreler **GV**, kemik yönelimindeki kontrol hücreleri **AC**, kemik yönelimindeki titreşim uygulanan hücreler **AV** olarak kodlanmıştır.

4.4.1 Hücre büyüme ve canlılıkları

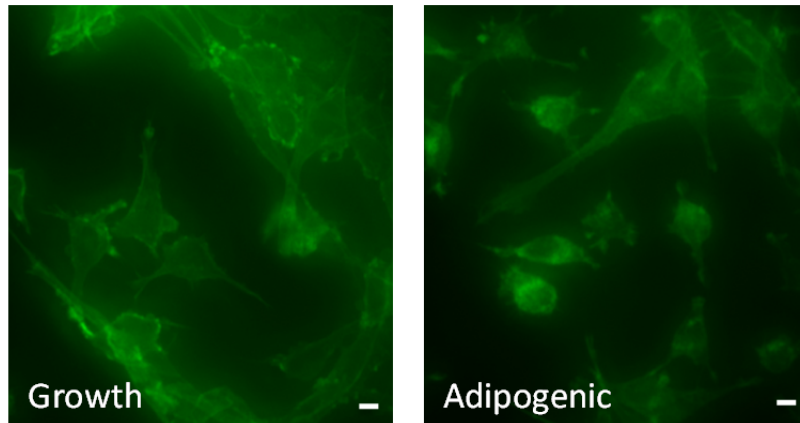
Erişkin mezenkimal kök hücrelerinde yağ yöneliminin tetiklenmesi sonucunda AC grubu canlılık sonuçları GC grubuna göre %28 ($p < 0.05$) azalmıştır (Şekil 14). Buna rağmen günlük uygulanan mekanik titreşimler sonucunda AV grubunda AC grubuna göre %45 ($p < 0.05$) daha fazla canlılık tespit edilmiştir. Bu durum AV grubunun GC grubuyla benzer bir seviyede canlılık göstermesi anlamına gelmektedir.



Şekil 14. Mekanik titreşimlerin büyüme ya da yağ yönelimine giren kök hücrelerin hücre canlılığı üzerine etkileri. (* : $p < 0.05$).

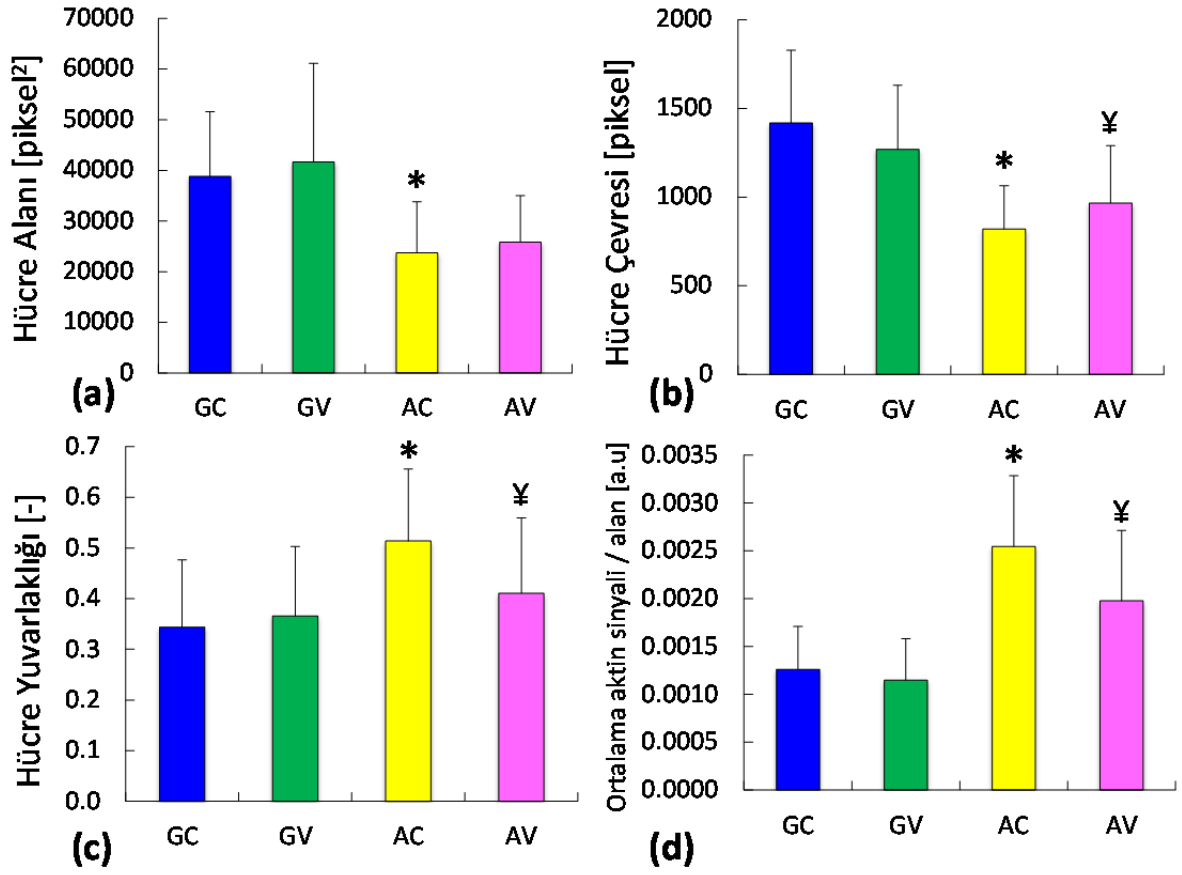
4.4.2 Hücre aktin altyapısı

Bir hafta boyunca mekanik girdiye maruz bırakılan hücrelerin bir haftalık uygulama sonunda aktin altyapısı Phalloidin boyaması ile tespit edilmiş, gerekli normalizasyonların yapılabilmesi için ek olarak hücreler çekirdek boyaması ile (DAPI) boyanmışlardır (Şekil 15). Kemik yönelimine giren gruptan farklı olarak yağ yönelimi için hücreler grup halinde normalize edilerek değil, her bir görüntü için tek tek kontur çizilerek incelenmiştir. Bu sayede hücrelerin sadece aktin altyapılarına ait floresan sinyaller değil, ayrıca hücre morfolojilerinin de incelenmesi fırsatı oluşmuştur.



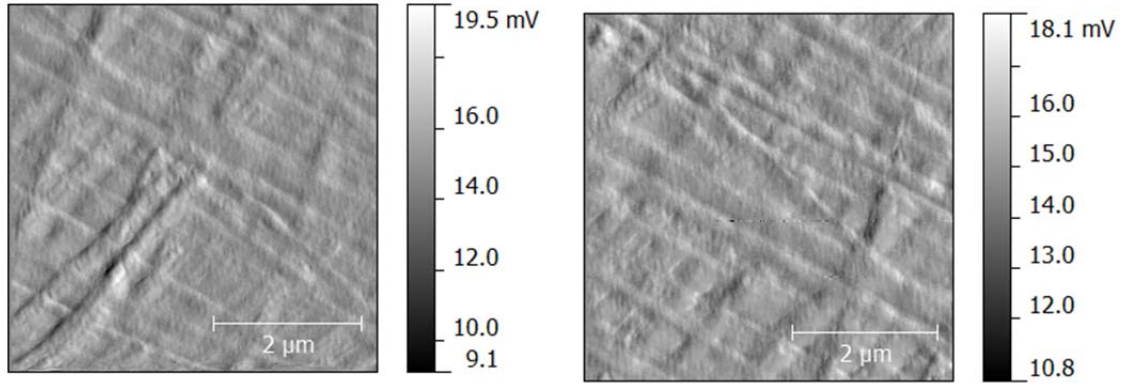
Şekil 15. Normal besiyerinde (Growth) ya da yağ yöneliminde (Adipogenic) bulunan erişkin mezenkimal kök hücrelerin aktin yapısı. Skala: 10 μm .

Yağ yönelimine girmek erişkin kök hücrelerin kapladıkları yüzey alanını %39 ($p<0.05$) ve hücre çevrelerini %42 ($p<0.05$) küçültüp aynı zamanda hücre yuvarlaklıklarını (circularity) %50 ($p<0.05$) arttırmıştır (Şekil 16a, 16b ve 16c). AV grubunda AC grubuna göre hücre alanını istatistiki olarak anlamlı bir şekilde etkilemediği halde, hücre çevresini %18 ($p=0.05$) arttırmış ve hücre yuvarlaklığını %42 ($p<0.05$) düşürerek GC seviyelerine yaklaştırmıştır (Şekil 16a, 16b ve 16c). Aktin ışık yoğunluğu yağ yönelimine giren hücrelerde kontrollere göre yaklaşık iki kat ($p<0.05$) artmıştır (Şekil 16). Günlük mekanik titreşim uygulanması AV grubu hücrelerinin diğer morfolojik parametreler ile uyumlu bir şekilde aktin sinyalini %22 ($p<0.05$) azaltarak büyüme besiyerindeki hücrelere yakın bir seviyeye döndürmüştür.

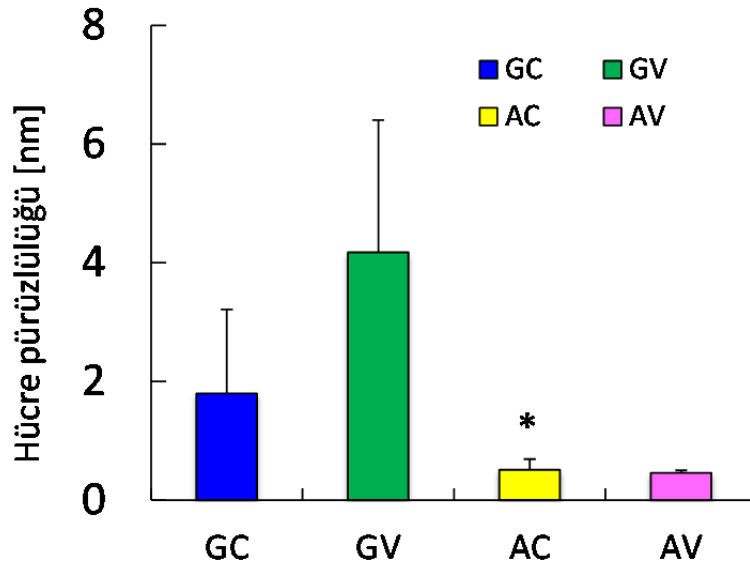


Şekil 16. Mekanik titreşimlerin büyüme ya da yağ yönelimine giren kök hücrelerin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri (a) hücre alanı (b) hücre çevresi (c) hücre yuvarlaklığı (d) hücre birim alanından gelen aktin sinyali (* : GC-AC $p<0.05$; ¥: AC-AV $p<0.05$)

Hücre yüzey pürüzlülükleri tüm normal besiyeri ve yağ yönelimi grupları için atomik kuvvet mikroskobu vasıtasıyla sıvı içerisinde ve yüksek çözünürlükte tespit edilmiştir (Şekil 17). Buna göre GV hücreleri GC hücrelerine oranla iki kattan fazla ($p<0.05$) pürüzlülük göstermiştir. Yağ yönelimi ise kök hücre membran pürüzlülüğünü %60 ($p<0.05$) düşürmüş, fakat mekanik titreşimler bu değişimi etkileyememişlerdir (Şekil 18).



Şekil 17. Besiyerinde yapılan atomik kuvvet mikroskobu deneylerinin temsili resmi.

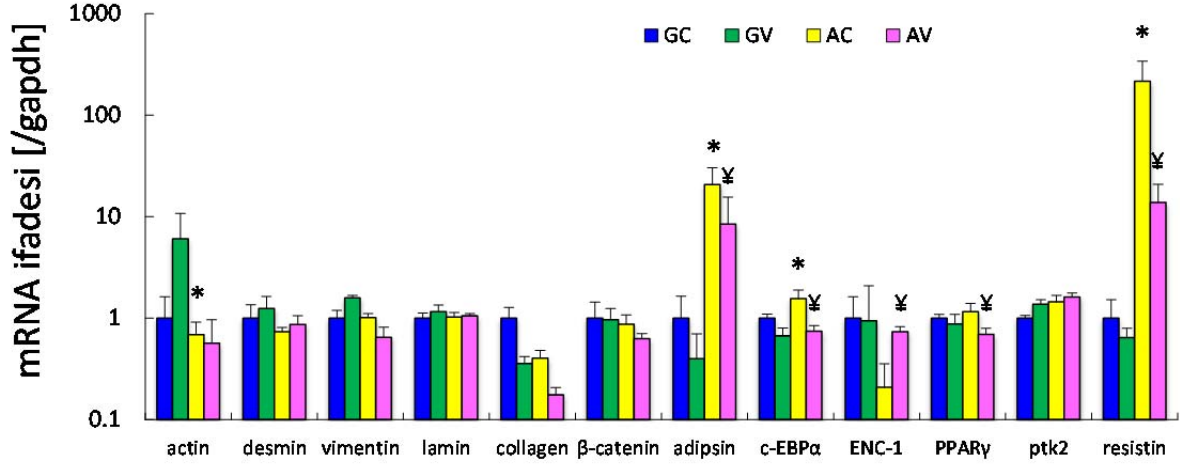


Şekil 18. Mekanik titreşimlerin büyüme ya da yağ yönelimine giren kök hücrelerin membran morfolojisi üzerindeki etkileri. (* : GC-AC $p < 0.05$)

4.4.3 Moleküler belirteçler

Yağ yönelimi sırasında uygulanan mekanik sinyallerin kök hücreler üzerindeki morfolojik etkisine sebep olabilecek moleküler belirteçler qPCR aracılığı ile incelenmiştir. Sonuçlara göre yağ yönelimine girmek bu yönelimin belirteç genleri olan adipsin (x20 artış, $p < 0.05$), c-EBP α (%55 artış, $p < 0.05$), Resistin (200x artış, $p < 0.05$) gibi genleri aktive etmiştir (Şekil 19). Ayrıca yağ yönelimi sırasında aktin ifadesi %31 ($p < 0.05$) düşmüştür. Mekanik titreşimler

sonucunda aktin ifadesinde anlamlı bir değişim olmamış fakat uygulama sonucunda adipsin %59, c-EBPα %52 ve resistin %94 azalarak (tüm $p < 0.05$) normal hücre ifade seviyelerine yaklaşmıştır.



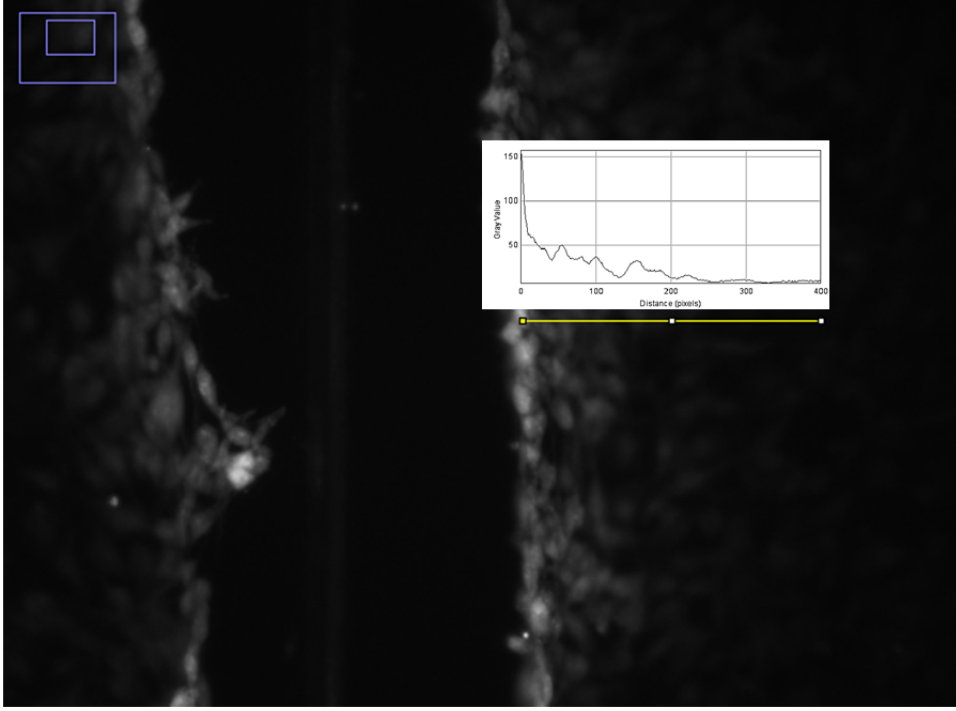
Şekil 19. Mekanik titreşimlerin büyüme ya da yağ yönelimine giren kök hücrelerin çeşitli mRNA belirteçlerinin ifadesi üzerindeki etkisi. (* : GC-AC $p < 0.05$; †: AC-AV $p < 0.05$)

4.5 Mekanik sinyallerin kök hücreler arası iletişime olan etkisi

Projenin ilk kısımlarında mezenkimal kök hücrelerin normal durumlarında ya da kemik ya da yağ gibi yönelimlere girdiklerinde günlük uygulanan mekanik kuvvetlerden nasıl etkilendikleri bireysel hücre morfolojisi ve altyapısı düşünülerek araştırılmıştır. Projenin bundan sonraki kısmında ise kök hücrelerin bir grup olarak nasıl iletişim kurdukları, ve dışarıdan gelen kimyasal ve fiziksel etkilerin bu iletişimi nasıl etkilediği üzerinde durulacaktır.

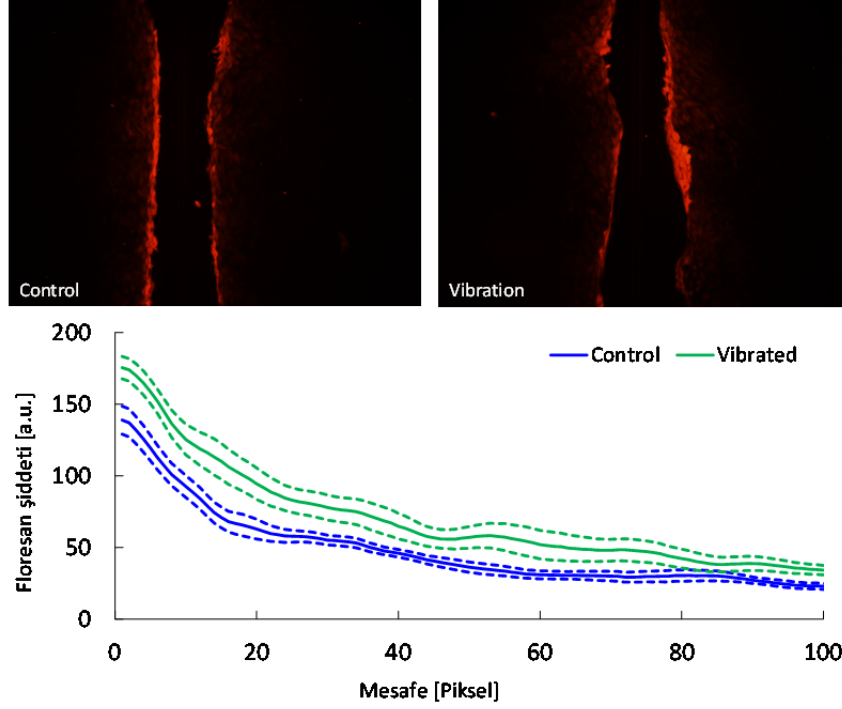
4.5.1 Mekanik sinyallerin kök hücreler arası boya geçişine etkisi

Yüzeyi tamamen kaplayan normal besiyerindeki erişkin kök hücrelerine mekanik titreşim uygulanması sonucunda hücreler arası iletişimde oluşan farkların bulunması için kazıyarak yükleme (scrape loading) testi uygulanmıştır. Bu test sırasında kazıma yapmadan önce besiyerine eklenen Neurobiotin (287 MW, -1 charge) boyasının kazınan yüzeyde bulunan hücreden diğer hücrelere geçiş yoğunluğu gözlenmiştir. Image J kullanılarak yapılan analizlerde (Şekil 20), yüzeyden içeriye doğru olan floresan yoğunluğu tespit edilerek kaydedilmiştir.



Şekil 20. Kazıyarak yükleme (scrape loading) deneyinin görüntülenmesi ve Image J kullanılarak analizi.

Sonuçlara göre mekanik titreşimlere maruz kalan hücreler Neurobiotin floresan boyasını (kırmızı) bitişikteki hücelere kontrol hücrelerine oranla daha fazla geçirerek (Şekil 21), kontrol hücrelerine göre birbirleriyle daha aktif ve yoğun iletişim kurabildiklerini düşündürmüştür.

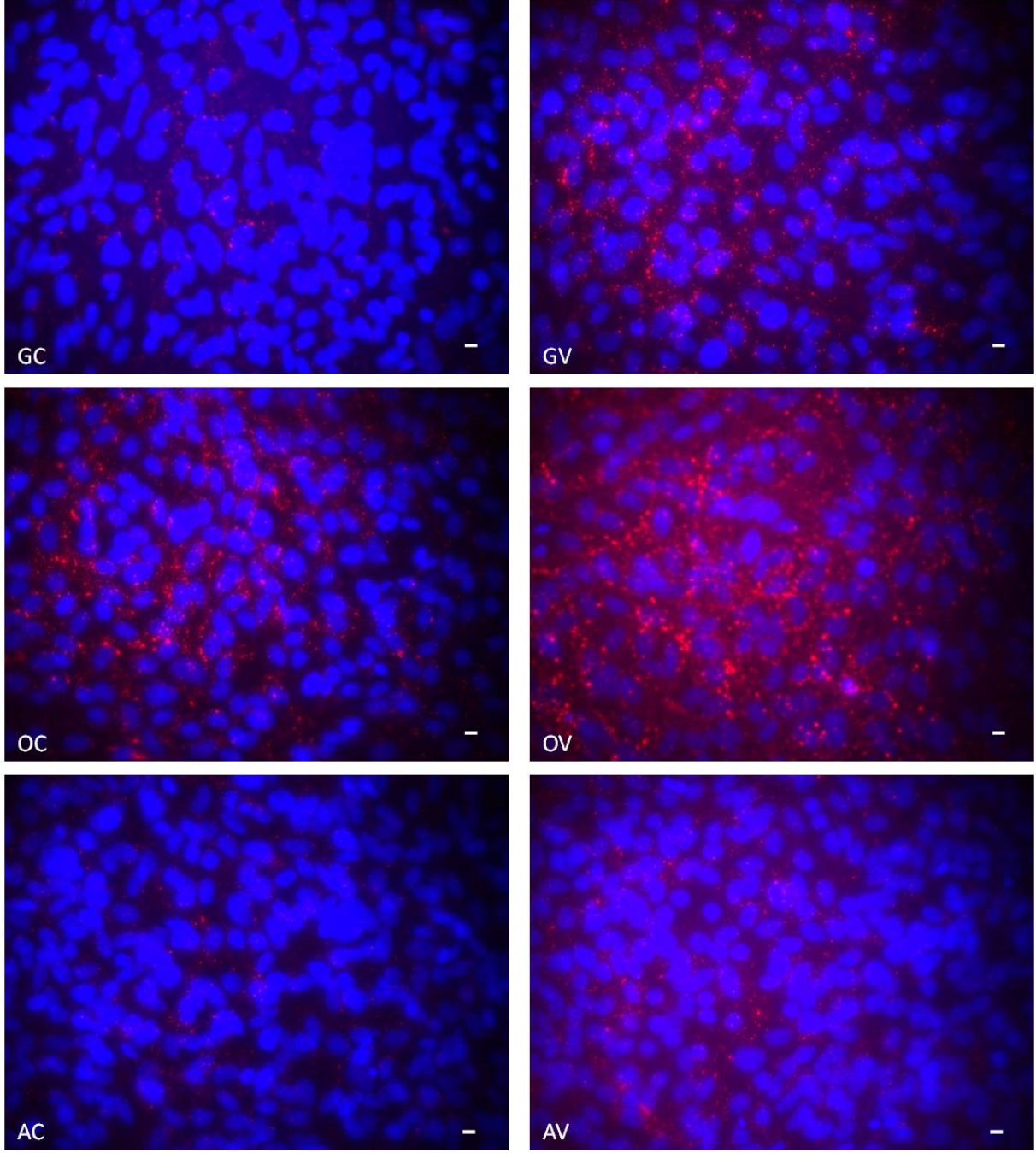


Şekil 21. Scrape loading deneyi sonuçları. Üst panel çekilen resimlerdeki neurobiotin boyasının dağılımını farklı gruplar için gösterirken, alttaki grafik boya şiddetindeki mesafeye göre değişimi göstermektedir (düz çizgi: ortalama, kesik çizgi: standart hata).

4.5.2 Mekanik sinyallerin kök hücrelerin Cx43 miktarına etkisi

Kazıyarak yükleme deneyleri sonrasında mekanik sinyaller sonucu kök hücreler arasındaki iletişimin artmış olabileceği düşünülerek buna sebep olabilecek moleküler faktörlerin arayışına gidildi. Hücreler arası iletişimde rol oynayan en önemli araçlardan birisi olan ve hücreler arası kanalların kurulmasını sağlayan konneksin ailesine ait olan konneksin 43 (Cx43) geni kemik ve kemik iliği hücrelerinde oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. Bu sebeple Cx43 geninin farklı yönelimlere giren kök hücrelerde mekanik etkiye bağlı olarak mRNA ifadesi, protein sentezi ve hücre lokalizasyonu kontrol edilmiştir.

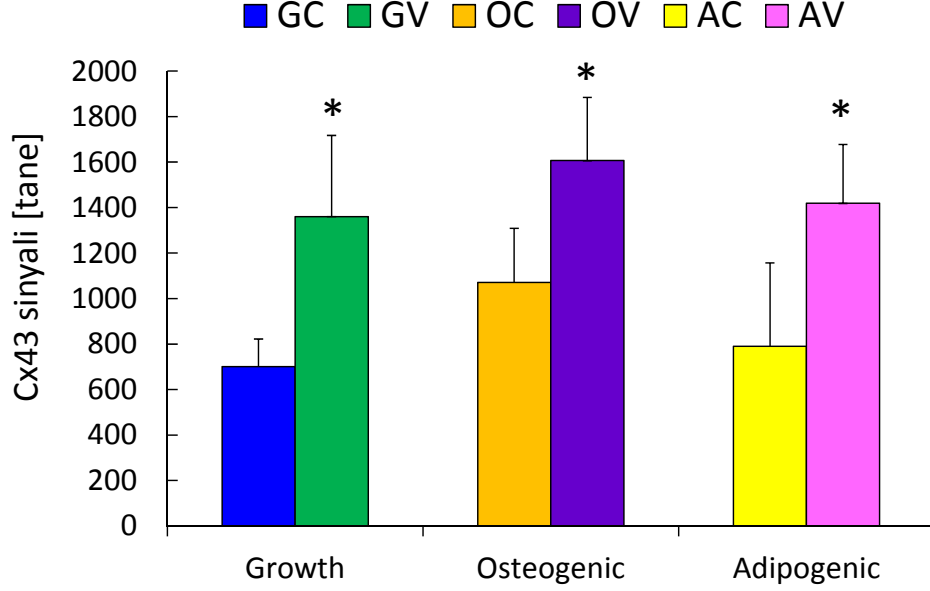
Cx43 immunohistokimyasal boyaması sonucunda mekanik titreşimlerin CX43 sinyalini normal besiyerindeki, kemik yönelimindeki ve yağ yönelimindeki hücrelerde arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 22). Ek olarak kemik yönelimine giriş de kök hücreler için normal besiyerindeki ve yağ yönelimindeki hücreler göre daha çok Cx43 gözükmesine sebep olmuştur.



Şekil 22. Cx43 proteinin hücrelerdeki bulunma oranları. Yatay sıraları normal besiyeri, kemik yönelimi ve yağ yönelimini temsil etmektedir, sol paneller kontrol hücrelerini, sağ paneller ise mekanik girdiye maruz kalan hücreleri göstermektedir. Kırmızı: Cx43, Mavi: DAPI. Skala: 10µm

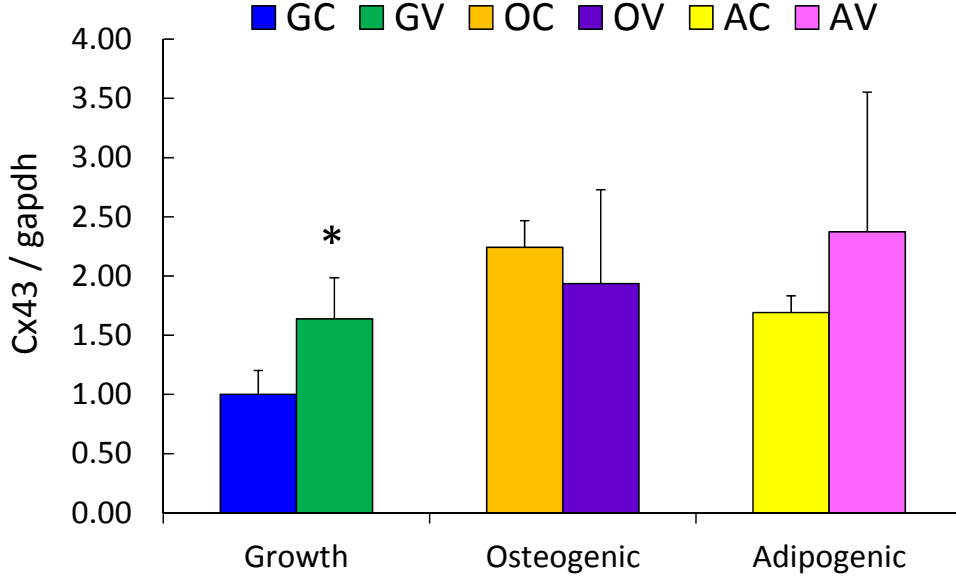
Image J aracılığı ile yapılan analizlerde görüntülerden gelen kırmızı Cx43 sinyali sayısı mekanik titreşim uygulanan gruplarda normal besiyeri, kemik yönelimi ve yağ yönelimi için sırasıyla %94, %50 ve %60 (tüm $p < 0.05$) olarak gözlenmiştir (Şekil 23). Bu durum mekanik

titreşimlerin her durumda kök hücreler arası iletişim kanallarını arttırdığını ortaya koymaktadır.



Şekil 23. Cx43 immunohistokimyasal boyamasının sayısallaştırılması. (*: $p<0.05$ kontrol-titreşim)

Cx43'ün artan kanal sayısının Cx43 mRNA ifadesi ile ilintili olup olmadığını anlamak için qPCR deneyleri yapılmıştır. Sonuçlara göre günlük uygulanan mekanik titreşimler normal besiyerindeki kök hücrelerdeki Cx43 mRNA'sında %64 ($p<0.05$) artışa sebep olurken diğer yönelimdeki kök hücrelerde anlamlı bir değişiklik yaratamamıştır (Şekil 24).



Şekil 24. Cx43 qPCR sonuçları. (*: $p < 0.05$ kontrol-titreşim)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma sonunda düşük frekanslı ve yüksek genlikli mekanik sinyallerin kemik iliği mezenkimal kök hücrelerine kemik ya da yağ yönelimine giriş, ya da atıl kalış sırasında yaptıkları hücresel, morfolojik ve moleküler etkiler çalışılmıştır. Özetlemek gerekirse mekanik sinyal uygulaması hücre sayı ve canlılığını tüm durumlar için arttırmış, ayrıca hücrelerin aktin altyapılarını etkilemiş ve bazı moleküler belirteçlere etki etmiştir. Ayrıca mekanik sinyal uygulaması hücreler arası iletişimin arttığı yönünde sonuçlar elde edilmiştir.

Mekanik sinyallerin düşey (Kim vd., 2012) ya da yatay (Uzer vd., 2013) uygulamadan bağımsız şekilde kemik yönelimindeki kök hücreler için anabolik olduğu önceden gösterilmiştir. Bu proje sonuçlarına göre bu artış sadece kemik yönelimine giren hücrelerde değil aynı zamanda atıl kalan (quiescent) hücrelerde de gözükmektedir. Ek olarak bu etki yağ yönelimine giren kök hücrelerin üremesinde görülen azalmayı ters çevirme niteliğinde de bulunmaktadır.

Hücrelerin mekanik sinyallere adaptasyonu hücre iskeleti yani hücrenin mekanik altyapısında önemli değişikliklerin olması sonucunda olur. Örneğin fibroblast hücreler tekrarlı kesme kuvvetlerine aktin fiberlerin yönelimlerini değiştirip onları güçlendirerek adapte olurlar (Yoshigi vd., 2005). Benzer şekilde kemik hücreleri (osteoblast) tek yönlü (Norvell vd., 2004) ya da titreşimli (Ponik vd., 2007) akış kuvvetlerine yeni aktin fiberleri yaparak cevap verirler. Kemik iliği kök hücrelerinin de buldukları yüzeydeki gerilmelere hücre iskeletlerini adapte ederek cevap verdikleri gösterilmişti (Sen vd., 2013). Bizim çalışmamız kök hücrelerin sadece yüzey gerilmelerine değil aynı zamanda çok düşük genlikli yüksek frekanslı titreşimlere de cevap verebildiklerini ortaya koymuştur. Ayrıca bu cevap sadece kök hücrelerin normal durumları için değil aynı zamanda farklı mezenkimal yönelimlere girmeleri sonucunda da etkili olmaktadır.

Sadece mekanik titreşimler değil aynı zamanda kemik yönelimine girmek de hücrelerin altyapı iskeletlerini önemli ölçüde etkilemekte ve hücreleri sertleştirmektedir (Chen vd., 2010). Mekanik kuvvetlerin ortadan kaldırdıkları durumlarda (örneğin yerçekimsiz ortamda) hücre altyapısı bundan negatif olarak etkilenmektedir. (Qian vd., 2010). Bu manada proje sonuçlarına göre kemik yönelimi ve mekanik titreşimler birbirlerinin etkilerini güçlendirebilme özelliği göstermektedirler. Kemik yönelimine giren kök hücrelerin mekanik titreşimler sonucunda hücresel iskelet altyapılarını daha katı (stiff) bir hale sokmaları hücrelerin daha sonra gelecek olan yeni yüklerle adapte olduğunun göstergesi olabilir (Ingber, 2003). Bu durum daha uzun süreli uygulamalarda etkinin sürerek hücresel boyuttan çıkıp kemik dokusunun makroskopik olarak artmasının sebeplerinden birisi olabilir (Ozcvici vd., 2010a).

Kemik doku yönelimindeki kök hücrelerin günlük mekanik titreşimlere adaptasyonundan farklı olarak yağ yönelimine giren hücrelerde bu etki zıt şekilde oluşmuştur. Yağ yönelimine giren hücrelerde daha normal besiyerine göre daha yoğun aktin sinyali gözlenmiştir fakat bu sinyal tüm hücreden ziyade hücre çepherine lokalize olmuştur. Bu durum hücrenin yağ depolamaya başladığı zaman çevresinin ve yuvarlaklığının büyümesi ve daha sağlam bir yapı oluşumu ile açıklanabilir (Yang vd., 2014). Bu durumda mekanik sinyallerin yağ yönelimindeki kök



hücrelerde aktin sinyalini azaltması, bu hücrelerin sinyale adapte olmamasıyla değil, yağ hücresi olma süreçlerinin geriye dönmesiyle de açıklanabilir. Mekanik titreşimler sonrasında azalan yağ yönelimine ait moleküler belirteçler de bu iddiayı destekler niteliktedir.

Hücrelerarası iletişim vücütteki birçok organın homeostatik çalışması açısından önemli görevler üstlenmektedirler. Özellikle connexin molekülleri tarafından kurulan oluklu bağlantılar hücrelerarası iyon (Na^+ , K^+), küçük metabolit (glucose, glutamate) ve ikincil ulakların (ATP, IP_3 , Ca^{2+}) geçişini sağlayarak hücre büyümesi, gelişimi ve farklılaşması gibi farklı bir çok hücreyel olayı kontrol ederler (Mese vd., 2007). Kemik hücrelerinde (osteocyte) mekanik sinyaller sonucunda hücrelerarası iletişimin arttığı daha önceden gösterilmişti (Uzer vd., 2014). Fakat bu proje sadece olgun kemik hücrelerinin değil kemik iliği kök hücrelerinin de, yağ yönelimine girseler bile, mekanik uygulama sonucunda hücrelerarası iletişimin arttığını göstermektedir.

Sonuç olarak günlük uygulanan düşük genlikte ve yüksek frekanstaki mekanik sinyaller kök hücreleri altyapısal olarak kemik yönelimine girmeye teşvik etmiş, fakat altyapısal olmayabilecek nedenlerle yağ yöneliminden uzaklaşmıştır. Her ne kadar uygulama genel anlamda mekanik sinyallerin kök hücre üzerindeki etkisini ortaya koysa da, hücrelerin optimum cevap verebilecekleri mekanik sinyalin genlik, frekans, süre ve tekrar parametrelerinin optimizasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. Bu optimizasyonun gerçekleşmesi halinde kemik iliğinde ya da başka uzak organlarda bulunan kemik kök hücreleri biyomedikal olarak mekanik yöntemler aracılığı ile hedeflenebilir. Yaşlanan nüfus ve artan refahın oluşturduğu kemik erimesi ve obezite problemine eş zamanlı olarak ve ilaç kullanımına alternatif fiziksel bir çözümlerle tedavi yaratabilme potansiyeli yüzünden bu tip çalışmaların yoğunlaşması önemlidir.



6. KAYNAKLAR

- Augat P., Simon U., Liedert A., Claes L. 2005. "Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone", *OsteoporosInt*, 16 Suppl 2: S36-S43.
- Barragan-Adjemian C., Nicoletta D., Dusevich V., Dallas M. R., Eick J. D., Bonewald L. F. 2006. "Mechanism by which mlo-a5 late osteoblasts/early osteocytes mineralize in culture: Similarities with mineralization of lamellar bone", *CalcifTissue Int*, 79(5): 340-53.
- Binnig G., Quate C. F., Gerber C. 1986. "Atomic force microscope", *Physical Review Letters*, 56(9): 930-3.
- Case N., Ma M., Sen B., Xie Z., Gross T. S., Rubin J. 2008. "Beta-catenin levels influence rapid mechanical responses in osteoblasts", *JBiolChem*, 283(43): 29196-205.
- Chen Q. A., Xiao P., Chen J. N., Cai J. Y., Cai X. F., Ding H., vd. 2010. "Afm studies of cellular mechanics during osteogenic differentiation of human amniotic fluid-derived stem cells", *Anal Sci*, 26(10): 1033-7.
- Conference N. C. D. 2000. "Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy", *NIH ConsensStatement*, 17(1): 1-45.
- Costa K. D., Lee E. J., Holmes J. W. 2003. "Creating alignment and anisotropy in engineered heart tissue: Role of boundary conditions in a model three-dimensional culture system", *Tissue Engineering*, 9(4): 567-77.
- Darling E. M., Topel M., Zauscher S., Vail T. P., Guilak F. 2008. "Viscoelastic properties of human mesenchymally-derived stem cells and primary osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes", *JBiomech*, 41(2): 454-64.
- Diab T., Sit S., Kim D., Rho J., Vashishth D. 2005. "Age-dependent fatigue behaviour of human cortical bone", *EurJMorphol*, 42(1-2): 53-9.
- Elson E. L. 1988. "Cellular mechanics as an indicator of cytoskeletal structure and function", *AnnuRevBiophysBiophysChem*, 17: 397-430.
- Frost H. M. 1987. "Bone "mass" and the "mechanostat": A proposal", *Anatomical Record*, 219(1): 1-9.
- Garman R., Gaudette G., Donahue L. R., Rubin C., Judex S. 2007a. "Low-level accelerations applied in the absence of weight bearing can enhance trabecular bone formation", *JOrthopRes*, 25(6): 732-40.
- Garman R., Rubin C., Judex S. 2007b. "Small oscillatory accelerations, independent of matrix deformations, increase osteoblast activity and enhance bone morphology", *PLoS ONE*, 2(7): e653.
- Gilsanz V., Wren T. A., Sanchez M., Dorey F., Judex S., Rubin C. 2006. "Low-level, high-frequency mechanical signals enhance musculoskeletal development of young women with low bmd", *JBone MinerRes*, 21(9): 1464-74.
- Hassan E., Heinz W. F., Antonik M. D., D'Costa N. P., Nageswaran S., Schoenenberger C. A., vd. 1998. "Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy", *BiophysJ*, 74(3): 1564-78.
- Hassenkam T., Fantner G. E., Cutroni J. A., Weaver J. C., Morse D. E., Hansma P. K. 2004. "High-resolution afm imaging of intact and fractured trabecular bone", *Bone*, 35(1): 4-10.
- Heidemann S. R., Kaech S., Buxbaum R. E., Matus A. 1999. "Direct observations of the mechanical behaviors of the cytoskeleton in living fibroblasts", *JCell Biol*, 145(1): 109-22.



- Heinonen A., Oja P., Kannus P., Sievanen H., Haapasalo H., Manttari A., vd. 1995. "Bone mineral density in female athletes representing sports with different loading characteristics of the skeleton", *Bone*, 17(3): 197-203.
- Heinonen A., Sievanen H., Kannus P., Oja P., Vuori I. 1996. "Effects of unilateral strength training and detraining on bone mineral mass and estimated mechanical characteristics of the upper limb bones in young women", *Journal of Bone and Mineral Research*, 11(4): 490-501.
- Ingber D. E. 2003. "Mechanobiology and diseases of mechanotransduction", *Annals of medicine*, 35(8): 564-77.
- Ingber D. E. 2005. "Mechanical control of tissue growth: Function follows form", *ProcNatlAcadSciUSA*, 102(33): 11571-2.
- Johnson K. A., Sistrunk M. L., Polisensky D. H., Braam J. 1998. "Arabidopsis thaliana responses to mechanical stimulation do not require *etr1* or *ein2*", *Plant Physiol*, 116(2): 643-9.
- Jones H. H., Priest J. D., Hayes W. C., Tichenor C. C., Nagel D. A. 1977. "Humeral hypertrophy in response to exercise", *JBone Joint SurgAm*, 59(2): 204-8.
- Jones W. R., Ting-Beall H. P., Lee G. M., Kelley S. S., Hochmuth R. M., Guilak F. 1999. "Alterations in the young's modulus and volumetric properties of chondrocytes isolated from normal and osteoarthritic human cartilage", *JBiomech*, 32(2): 119-27.
- Kim I. S., Song Y. M., Lee B., Hwang S. J. 2012. "Human mesenchymal stromal cells are mechanosensitive to vibration stimuli", *J Dent Res*, 91(12): 1135-40.
- Kirmizis D., Logothetidis S. 2010. "Atomic force microscopy probing in the measurement of cell mechanics", *IntJNanomedicine*, 5: 137-45.
- Kruse K., Julicher F. 2005. "Oscillations in cell biology", *CurrOpinCell Biol*, 17(1): 20-6.
- Lang T., LeBlanc A., Evans H., Lu Y., Genant H., Yu A. 2004. "Cortical and trabecular bone mineral loss from the spine and hip in long-duration spaceflight", *J Bone MinerRes*, 19(6): 1006-12.
- Lanyon L. E., Goodship A. E., Pye C. J., MacFie J. H. 1982. "Mechanically adaptive bone remodelling", *JBiomech*, 15(3): 141-54.
- Lanyon L. E., Rubin C. T. 1984. "Static vs dynamic loads as an influence on bone remodelling", *JBiomech*, 17(12): 897-905.
- Leichter I., Simkin A., Margulies J. Y., Bivas A., Steinberg R., Giladi M., vd. 1989. "Gain in mass density of bone following strenuous physical activity", *JOrthopRes*, 7(1): 86-90.
- Lekka M., Laidler P., Gil D., Lekki J., Stachura Z., Hryniewicz A. Z. 1999. "Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy", *EurBiophysJ*, 28(4): 312-6.
- Marwick C. 2000. "Consensus panel considers osteoporosis", *JAMA*, 283(16): 2093-5.
- McKay H. A., MacLean L., Petit M., Kelvie-O'Brien K., Janssen P., Beck T., vd. 2005. "'Bounce at the bell': A novel program of short bouts of exercise improves proximal femur bone mass in early pubertal children", *BrJ Sports Med*, 39(8): 521-6.
- Mengatto C. M., Mussano F., Honda Y., Colwell C. S., Nishimura I. 2011. "Circadian rhythm and cartilage extracellular matrix genes in osseointegration: A genome-wide screening of implant failure by vitamin d deficiency", *PLoSONE*, 6(1): e15848.



- Mese G., Richard G., White T. W. 2007. "Gap junctions: Basic structure and function", *The Journal of investigative dermatology*, 127(11): 2516-24.
- Neel P. L., Harris R. W. 1971. "Motion-induced inhibition of elongation and induction of dormancy in liquidambar", *Science*, 173(3991): 58-9.
- Norvell S. M., Ponik S. M., Bowen D. K., Gerard R., Pavalko F. M. 2004. "Fluid shear stress induction of cox-2 protein and prostaglandin release in cultured mc3t3-e1 osteoblasts does not require intact microfilaments or microtubules", *J Appl Physiol* (1985), 96(3): 957-66.
- O'Connor J. A., Lanyon L. E., MacFie H. 1982. "The influence of strain rate on adaptive bone remodelling", *JBiomech*, 15(10): 767-81.
- Olmeda A., Greco F., Timar J., Malgaroli E. 1995. "Death rate in patients submitted to the surgical treatment of fracture of the proximal femur", *Chir Organi Mov*, 80(2): 179-81.
- Orr A. W., Helmke B. P., Blackman B. R., Schwartz M. A. 2006. "Mechanisms of mechanotransduction", *DevCell*, 10(1): 11-20.
- Ozcivici E., Garman R., Judex S. 2007. "High-frequency oscillatory motions enhance the simulated mechanical properties of non-weight bearing trabecular bone", *JBiomech*, 40(15): 3404-11.
- Ozcivici E., Luu Y. K., Adler B., Qin Y. X., Rubin J., Judex S., vd. 2010a. "Mechanical signals as anabolic agents in bone", *Nature reviews Rheumatology*, 6(1): 50-9.
- Ozcivici E., Luu Y. K., Rubin C. T., Judex S. 2010b. "Low-level vibrations retain bone marrow's osteogenic potential and augment recovery of trabecular bone during reambulation", *PLoS One*, 5(6): e11178.
- Peacock M., Koller D. L., Fishburn T., Krishnan S., Lai D., Hui S., vd. 2005. "Sex-specific and non-sex-specific quantitative trait loci contribute to normal variation in bone mineral density in men", *JClinEndocrinolMetab*, 90(5): 3060-6.
- Poellmann M. J., Harrell P. A., King W. P., Wagoner Johnson A. J. 2010. "Geometric microenvironment directs cell morphology on topographically patterned hydrogel substrates", *Acta Biomater*, 6(9): 3514-23.
- Ponik S. M., Triplett J. W., Pavalko F. M. 2007. "Osteoblasts and osteocytes respond differently to oscillatory and unidirectional fluid flow profiles", *J Cell Biochem*, 100(3): 794-807.
- Qian A. R., Yang P. F., Hu L. F., Zhang W., Di S. M., Wang Z., vd. 2010. "High magnetic gradient environment causes alterations of cytoskeleton and cytoskeleton-associated genes in human osteoblasts cultured in vitro", *Advances in Space Research*, 46(6): 687-700.
- Qiu S., Rao D. S., Palnitkar S., Parfitt A. M. 2006. "Differences in osteocyte and lacunar density between black and white american women", *Bone*, 38(1): 130-5.
- Rosen C. J., Bouxsein M. L. 2006. "Mechanisms of disease: Is osteoporosis the obesity of bone?", *NatClinPractRheumatol*, 2(1): 35-43.
- Rotsch C., Radmacher M. 2000. "Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: An atomic force microscopy study", *BiophysJ*, 78(1): 520-35.
- Rubin C., Recker R., Cullen D., Ryaby J., McCabe J., McLeod K. 2004. "Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli: A clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety", *J Bone MinerRes*, 19(3): 343-51.
- Rubin C. T., Lanyon L. E. 1984. "Regulation of bone formation by applied dynamic loads", *JBone Joint Surg[Am]*, 66(3): 397-402.



- Rubin C. T., Lanyon L. E. 1985. "Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude", *CalcifTissue Int*, 37(4): 411-7.
- Sasaki N., Tagami A., Goto T., Taniguchi M., Nakata M., Hikichi K. 2002. "Atomic force microscopic studies on the structure of bovine femoral cortical bone at the collagen fibril-mineral level", *JMaterSciMaterMed*, 13(3): 333-7.
- Sato M., Nagayama K., Kataoka N., Sasaki M., Hane K. 2000. "Local mechanical properties measured by atomic force microscopy for cultured bovine endothelial cells exposed to shear stress", *JBioMech*, 33(1): 127-35.
- Sen B., Xie Z., Case N., Thompson W. R., Uzer G., Styner M., vd. 2013. "Mtorc2 regulates mechanically induced cytoskeletal reorganization and lineage selection in marrow derived mesenchymal stem cells", *J Bone Miner Res*.
- Snow-Harter C., Whalen R., Myburgh K., Arnaud S., Marcus R. 1992. "Bone mineral density, muscle strength, and recreational exercise in men", *J Bone Miner Res*, 7(11): 1291-6.
- Song G., Ju Y., Shen X., Luo Q., Shi Y., Qin J. 2007. "Mechanical stretch promotes proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells", *Colloids SurfB Biointerfaces*, 58(2): 271-7.
- Terraciano V., Hwang N., Moroni L., Park H. B., Zhang Z., Mizrahi J., vd. 2007. "Differential response of adult and embryonic mesenchymal progenitor cells to mechanical compression in hydrogels", *Stem Cells*, 25(11): 2730-8.
- Thurner P. J. 2009. "Atomic force microscopy and indentation force measurement of bone", *WileyInterdiscipRevNanomedNanobiotechnol*, 1(6): 624-49.
- Tjandrawinata R. R., Vincent V. L., Hughes-Fulford M. 1997. "Vibrational force alters mrna expression in osteoblasts", *FASEB J*, 11(6): 493-7.
- Trickey W. R., Vail T. P., Guilak F. 2004. "The role of the cytoskeleton in the viscoelastic properties of human articular chondrocytes", *JOrthopRes*, 22(1): 131-9.
- Uzer G., Pongkitwitoon S., Ete Chan M., Judex S. 2013. "Vibration induced osteogenic commitment of mesenchymal stem cells is enhanced by cytoskeletal remodeling but not fluid shear", *J Biomech*, 46(13): 2296-302.
- Uzer G., Pongkitwitoon S., Ian C., Thompson W. R., Rubin J., Chan M. E., vd. 2014. "Gap junctional communication in osteocytes is amplified by low intensity vibrations in vitro", *PLoS One*, 9(3): e90840.
- Ward K., Alsop C., Caulton J., Rubin C., Adams J., Mughal Z. 2004. "Low magnitude mechanical loading is osteogenic in children with disabling conditions", *JBone MinerRes*, 19(3): 360-9.
- Weaver C. M. 2008. "The role of nutrition on optimizing peak bone mass", *Asia PacJ Clin Nutr*, 17 Suppl 1: 135-7.
- Yang W., Thein S., Wang X., Bi X., Ericksen R. E., Xu F., vd. 2014. "Bsc12/seipin regulates adipogenesis through actin cytoskeleton remodelling", *Human molecular genetics*, 23(2): 502-13.
- Yoshigi M., Hoffman L. M., Jensen C. C., Yost H. J., Beckerle M. C. 2005. "Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement", *JCell Biol*, 171(2): 209-15.
- Zhou X. L., Batiza A. F., Loukin S. H., Palmer C. P., Kung C., Saimi Y. 2003. "The transient receptor potential channel on the yeast vacuole is mechanosensitive", *ProcNatI AcadSciUSA*, 100(12): 7105-10.



Zile M. R., Richardson K., Cowles M. K., Buckley J. M., Koide M., Cowles B. A., vd. 1998.
"Constitutive properties of adult mammalian cardiac muscle cells", *Circulation*, 98(6): 567-79.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. ENGİN ÖZÇİVİCİ
Proje No:	111T577
Proje Başlığı:	Erişkin Kök Hücrelerinde Doku Yönelimi ve Dış Mekanik Etkilere Bağlı Gelişen Altyapısal Değişikliklerin Karakterizasyonu
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	GÜLİSTAN MEŞE ÖZÇİVİCİ, ÖZDEN YALÇIN ÖZUYSAL
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. MÜHENDİSLİK F. MAKİNE MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/09/2011 - 15/12/2014
Onaylanan Bütçe:	381428.0
Harcanan Bütçe:	307422.83
Öz:	<p>Mekanik titreşim uygulanması hem kemik hücrelerinde mineralizasyonu arttırdığı hem de kemik iliğindeki kök hücrelerini kemik yönelimine soktuğu için kemik kütlelerini artırıcı bir etkiye sahiptir. Mekanik sinyaller ayrıca yağ dokusu oluşumunu kemik iliği ve diğer yağ depolarında engeller özelliklere sahiptir. Kemik ve yağ hücrelerinin ortak bir hücre tipinden geldikleri düşünülürse, mekanik titreşim sinyalleri kullanılarak kemik oluşumu artırılırken eşzamanlı olarak yağ oluşumu azaltılabilir. Halihazırda kemik iliği kök hücrelerinin bu tip mekanik titreşim sinyallerine duyarlı olup olmadığı ve eğer duyarlıysa bu sinyallere nasıl adapte olduğu henüz net olarak bilinmemektedir. Burada fare kemik iliğinden alınan mezenkimal D1-ORL-UVA kök hücreleri atıl durumda, kemik yöneliminde ya da yağ yönelimindeyken günlük mekanik titreşimlere (0.15g, 90 Hz, 15dk/gün) 7 gün boyunca maruz bırakıldı ve bu titreşimlerin hücrelerde yarattığı hücresele, morfolojik ve moleküler değişimler araştırıldı. Atıl durumdaki kök hücrelerde mekanik sinyaller hücre üremesini, hücrelerin toplam aktin miktarını ve kalınlığını arttırdığı gözlemlendi. Kemik yönelimi sırasında da mekanik sinyaller toplam aktin miktarı, aktin kalınlığı ve hücrelerin membran pürüzlülüklerini arttırdılar. Yağ yönelimi sırasında ise uygulanan mekanik kuvvetlerin hücrelerin yağ biriktirmesinden kaynaklanan morfolojik ve altyapısal etkileri geri çevirdiği gözlemlendi. Mekanik titreşimlerin ayrıca tüm yönelimler için hücrelerarası iletişimi arttırdıkları gözlemlendi. Sonuçlar yüksek frekanslı ve düşük genlikli mekanik titreşimlerin mezenkimal kök hücrelerin yönelimlerini belirleyen faktörlere önemli etkilerde bulduklarını düşündürmektedir. Klinik aşamaya ulaşabilirse bu sonuçlar ilaçtan bağımsız bir etkinin kemik erimesi ve obezite için kullanılabilceğini düşündürmektedir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Mezenkimal kök hücreler, Mekanik sinyal, Kemik/Yağ yönelimi, Hücre iskeleti, Hücrelerarası iletişim.
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Bone marrow stem cells adapt to low-magnitude vibrations by altering their cytoskeleton during quiescence and osteogenesis (Makale - Diğer Hakemli Makale), 2- Effects of Spaceflight on Cells of Bone Marrow Origin (Makale - Diğer Hakemli Makale), 3- CHARACTERIZATION OF CHANGES INDUCED BY LINEAGE COMMITMENT AND EXTERNAL MECHANICAL STIMULI ON CELLULAR ULTRASTRUCTURE OF ADULT MESENCHYMAL STEM CELLS (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Yüksek Lisans Tezi),