

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

**17 β -ÖSTRADİOLÜN KİTOSAN - HİDROKSİAPATİT
YAPIDAKİ DOKU İSKELESİNE YÜKLENEN YAĞ
DOKUSUNDAN TÜRETİLMİŞ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELER ÜZERİNDEKİ OSTEOJENİK ETKİSİNİN
DENEYSEL KEMİK DEFECTİ MODELİNDE ARAŞTIRILMASI**

Dr. Mert ÇALIŞ

UZMANLIK TEZİ
Olarak hazırlanmıştır.

ANKARA
2012

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

**17 β -ÖSTRADİOLÜN KİTOSAN - HİDROKSİAPATİT
YAPIDAKİ DOKU İSKELESİNE YÜKLENEN YAĞ
DOKUSUNDAN TÜRETİLMİŞ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELER ÜZERİNDEKİ OSTEOJENİK ETKİSİNİN
DENEYSEL KEMİK DEFEKTİ MODELİNDE ARAŞTIRILMASI**

Dr. Mert ÇALIŞ

**UZMANLIK TEZİ
Olarak hazırlanmıştır.**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Figen ÖZGÜR**

ANKARA
2012

Bu çalışma, jürimiz tarafından Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı:	Prof. Dr. Figen ÖZGÜR (Hacettepe Üniversitesi)	İmza
Üye:	Prof. Dr. M. Emin MAVİLİ (Hacettepe Üniversitesi)	İmza
Üye:	Prof. Dr. Tunç ŞAFAK (Hacettepe Üniversitesi)	İmza
Üye:	Prof. Dr. Aycan KAYIKÇIOĞLU (Hacettepe Üniversitesi)	İmza
Üye:	Prof. Dr. Gökhan TUNÇBİLEK (Hacettepe Üniversitesi)	İmza

TEŞEKKÜR

Uzmanlık tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübeleri ile her zaman öğretici ve yol gösterici olan, tezimin yürütülmesi ve sonuçlandırılması boyunca hoşgörü, anlayış ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Figen Özgür'e ve eğitim sürecim boyunca bende emeği geçen bütün değerli hocalarıma,

Tez çalışmamın yönlendirilmesi ve yürütülmesi konusunda gerekli hiçbir desteği esirgemeyen ve beni her zaman cesaretlendiren Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na,

Çalışma süresince kafa kafaya verdiğimiz, kendisini tanımaktan büyük mutluluk duyduğum arkadaşım Tuğrul Tolga Demirtaş'a,

Çalışmanın histolojik analizini gerçekleştiren Prof. Dr. Nur Çakar ve Doç. Dr. Pergin Atilla'ya,

Mikrotomografi analizini gerçekleştiren Prof. Dr. Hamdi Çelik ve Doç. Dr. İlkan Tatar'a ve sonuçların volumetrik analizinde yardımcı olan Orkun Ersoy'a,

Bu çalışmaya destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi'ne,

Hayvan deneyleri boyunca beni yalnız bırakmayan araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca attığım her adımda beni destekleyen, sevgilerini esirgemeyen ve akademik duruşlarıyla bana mükemmel birer örnek olan anne ve babama,

Her zaman neşe kaynağım olan kardeşime,

Hayatıma girdiği ilk günden itibaren bana destek olan sevgili eşime,

En içten teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

ÖZET

Çalış M., 17β-östradiolün kitosan-hidroksiapatit yapıdaki doku iskelesine yüklenen yağ dokusundan türetilmiş mezenkimal kök hücreler üzerindeki osteojenik etkisinin deneysel kemik defekti modelinde araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi. Ankara, 2012.

Bu çalışmada 17β-östradiolün yağ dokusundan türetilmiş kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını tetikleyici bir etkisi olabileceği hipotez edilmiş ve bu hipotezi test etmek amacıyla bir deneysel çalışma planlanmıştır. Çalışmada 36 adet Sprague-Dawley sıçan kullanılmış ve hayvanlar 6 eşit deney grubuna ayrılmıştır. Grup farketmeksizin hayvanların kalvariyumunda her iki parietal kemik de kullanılacak şekilde birbirinden bağımsız 7mm. çapında yuvarlak şekilli tam kalınlıkta kemik defektleri oluşturuldu. Oluşturulan defektlerin birbirinden bağımsız iyileştikleri ve tedavi yöntemlerine birbirinden bağımsız yanıt verdikleri için her bir sıçandan 2 bağımsız örnek elde edildi. Birinci deney grubuna sadece kemik defekti (defekt) oluşturuldu, ikinci gruba defek oluşturulmasını takiben boş doku iskelesi (Dİ) yerleştirildi. Üçüncü gruba suda çözünen 17β-östradiol yüklü doku iskelesi (WE-Dİ) yerleştirildi. Dördüncü gruba 17β-östradiol yüklü PLGA nanopartiküller yüklenmiş doku iskelesi (PE-Dİ) yerleştirdi. Beşinci gruba suda çözünen 17β-östradiol ve AdMCS yüklü doku iskelesi (WE-Dİ-H) yerleştirildi. Altıncı gruba 17β-östradiol yüklü PLGA nanopartiküller ve AdMSC yüklenmiş doku iskelesi (PE-Dİ-H) yerleştirildi. Erken ve geç kemikleşmenin ayrı ayrı değerlendirilebilmesi amacıyla sırasıyla 4. ve 12. haftada hayvanlar sakrifiye edilerek örnekler elde edildi. Elde edilen örnekler klinik olarak, histoloji ve mikro tomografi ile değerlendirildi. Sonuç olarak 4. ve 12. hafta elde edilen sonuçlar açısından değerlendirildiğinde AdMSC yerleştirilen grupların (WE-Dİ-H ve PE-Dİ-H) diğer deney gruplarına göre anlamlı olarak daha iyi kemikleştiği görüldü ($p<0,005$). Bu iki grup arasında 4. hafta sonuçları açısından anlamlı fark olmasa da 12. hafta elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında PE-Dİ-H grubunun WE-Dİ-H grubuna göre daha iyi kemikleştiği görülmüştür. Uzun dönemde farklılık 17β-östradiolün bu grupta daha uzun süreye yayılarak kontrollü salınımına bağlanabilir. Sonuç olarak bu veriler ışığında 17β-östradiol AdMSC'ler üzerindeki osteojenik etkisiyle kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabilir bir yeni ajan olarak gözükmektedir.

Anahtar kelimeler: 17β-östradiol, mezenkimal kök hücre, kritik boyutlu kemik defekti, kemik doku mühendisliği

ABSTRACT

Çalış M., Evaluation of the effect of 17 β -estradiol on osteogenic differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells loaded in chitosan-hydroxyapatite scaffolds for reconstruction of experimental bone defect model. Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery Department, Ankara, 2012.

It was hypothesized that 17 β -estradiol may induce osteogenic differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells. An experimental study is conducted to test this hypothesis. 36 Sprague-Dawley rats used in the experiment were divided into 6 equal groups and two bilateral full thickness defects (7mm. in diameter) were created in the calvarium of animals. As a result 2 independent samples from each animal were obtained. First experimental group was the blank defect group, and the second group received blank scaffold (Dİ). Third experimental group was treated with water soluble 17 β -estradiol loaded scaffold (WE-Dİ). Fourth group was treated with scaffolds with 17 β -estradiol loaded PLGA nanoparticles (PE-Dİ). Fifth group received scaffolds loaded with water soluble 17 β -estradiol and AdMSCs (WE-Dİ-H) and sixth group scaffolds loaded with 17 β -estradiol loaded PLGA nanoparticles and AdMSCs (PE-Dİ-H). Evaluation was performed using macroscopical view, histology and microCT at 4th and 12th week after transplantation to see and compare early and late bone formation. The groups with AdMSCs (WE-Dİ-H and PE-Dİ-H) displayed significantly more bone generation both in early and late periods ($p < 0,005$). There was no significant difference between these two groups in means of early bone formation but sixth group scaffolds loaded with 17 β -estradiol loaded PLGA nanoparticles and AdMSCs (PE-Dİ-H) healed significantly better in long term period ($p < 0,005$). This late term difference is related to the controlled release of 17 β -estradiol from PLGA nanoparticles for a lengthy period. These data strongly supports that 17 β -estradiol stimulates AdMSC on osteogenic differentiation and appears to be a novel agent for cell based bone engineering studies.

Key Words: 17 β -estradiol, mesenchymal stem cells, critical sized bone defect, bone tissue engineering

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
TABLolar	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KEMİK DOKU ANATOMİSİ.....	3
2.2. KEMİK DOKU HİSTOLOJİSİ	5
2.3. DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE REJENERATİF TIP.....	6
2.4. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ.....	7
2.4.1. Tarihçe.....	7
2.4.2. Doku İskelesinde Kullanılan Biyomalzemeler	8
2.4.3. Doku İskeleleri ve Yapısal Özellikleri.....	10
2.4.4. Doku iskeleleri ve üretim yöntemleri.....	11
2.5. KÖK HÜCRE KAVRAMI	13
2.5.1. Yağ Dokusu ve Mezenkimal Kök Hücreler	15
2.5.2. Yağ Dokusundan Türetilmiş Kök Hücrelerin İn Vitro ve İn Vivo Farklılaşma Potansiyelleri.....	17
2.6. ÖSTROJENİN KEMİK ÜZERİNDEKİ ETKİSİ.....	19
2.6.1. Östrojen.....	19
2.6.2. Östrojen Reseptörleri	20
2.6.3. Östrojenin Kök Hücreler Üzerindeki Etkisi.....	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	23

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE BİYOLOJİK MATERYALLER	23
3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN DOKU İSKELESİ MODELİ.....	24
3.2.1. Kitosan / HA Doku İskelesinin Polimer Yapısı	24
3.2.2. Kitosan / HA doku iskelesinin üretimi.....	25
3.2.3. Kitosan / HA Doku İskelesinin Karakterizasyonu	26
3.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN ÖSTROJEN MOLEKÜLÜ.....	27
3.3.1. Suda çözünen 17 β -östradiol	27
3.3.2. 17 β -östradiol Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Sentezi.....	27
3.4. ÇALIŞMADA KULLANILAN KÖK HÜCRELERİN ELDE EDİLMESİ	28
3.4.1. Sıçan Yağ Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre (AdMSC) İzolasyonu ve pasajlanması.....	28
3.4.2. AdMSClerin karakterizasyonu.....	29
3.6. ANESTEZİ.....	31
3.7. CERRAHİ İŞLEM	32
3.8. CERRAHİ SONRASI İZLEM	33
3.9. ÖTENAZİ	33
3.10. HİSTOLOJİK ANALİZ	34
3.11. MİKRO TOMOGRAFİK ANALİZ	34
3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. DOKU İSKELESİNİN KARAKTERİZASYON SONUÇLARI.....	36
4.2. KULLANILAN 17B-ÖSTRADİOL FORMLARININ SALIM KİNETİKLERİ.....	36
4.2.1. Suda çözünen 17 β -östradiolün salım kinetiği	36
4.2.2. 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküllerin salım kinetiği	37
4.3. AdMSC'lerin KARAKTERİZASYON SONUÇLARI.....	38
4.4. KLİNİK BULGULAR	39

4.5. HİSTOLOJİK BULGULAR	43
4.5.1. Birinci grup – Kontrol / Kritik boyutlu kemik defekti grubu.....	43
4.5.2. İkinci grup – Boş doku iskelesi grubu.....	43
4.5.3. Üçüncü grup –Suda çözünen 17 β - östradiol grubu (WE-Dİ).....	45
4.5.4. Dördüncü grup – 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller yüklenmiş doku iskelesi grubu (PE-Dİ):.....	46
4.5.5. Beşinci - Suda çözünen 17 β -östradiol ve AdMSC yüklü doku iskelesi grubu (WE-Dİ-H).....	48
4.5.6. Altıncı grup - 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller ve AdMSC yüklenmiş doku iskelesi (PE-Dİ-H).....	49
4.6. MİKRO TOMOGRAFİ BULGULARI	51
4.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	53
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ	63
7. REFERANSLAR	64

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	: Yüzde
3D	: Üç boyutlu
α -MEM	: Minimum Essential Medium Alpha Modification
AdMSC	: Yağ dokusundan türetilmiş mezenkimal kök hücre
ALP	: Alkalen fosfataz
BMP	: Kemik morfojenik protein
CBFA-1	: Core binding factor alpha -1
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
ER	: Östrojen reseptörü
FBS	: Föetal sığır serumu
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
HA	: Hidroksiapatit
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
mg.	: miligram
ml.	: mililitre
mm.	: milimetre
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
PDGF	: Platelet-kaynaklı büyüme faktörü
PLGA	: Poli(Laktik-Ko-Glikolik Asit)
SEM	: Taramalı elektron mikroskopisi
SVF	: Stromal vasküler fraksiyon
SPH	: Süper gözenekli hidrojel
TGF- β	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü

ŞEKİLLER

Sayfa No:

Şekil 2.1.	Kemik dokunun kesitsel anatomisi, Havers ve Volkmann kanalları	4
Şekil 2.2.	Dekalsifiye kompakt kemiğin ışık mikroskobu görüntüsü	6
Şekil 2.3.	17 β -östradiolün kimyasal yapısı	19
Şekil 3.1.	Çalışmada kullanılan kitosan/HA yapıdaki doku iskeleleri	24
Şekil 3.2.	17- β Östradiol içeren PLGA (65:35) nanopartiküllerin enjekte edilerek yüklendiği doku iskelelerin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri: X3000	26
Şekil 3.3.	Skalpte yapılan V insizyon	
Şekil 3.4.	Kalvariyumda oluşturulan 7mm.lik defekt.....	32
Şekil 3.5.	Oluşturulan biparietal kemik defektleri ve doku iskelesinin defekte yerleştirilmesi	33
Şekil 4.1.	Siklodekstrin kaplı suda çözünen 17 β -östradiolün salım kinetiğine ait grafik.....	37
Şekil 4.2.	17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküllerin salım kinetiğine ait grafik	37
Şekil 4.3.	Sıçan kökenli AdMSC'lere ait akış sitometri analiz sonuçları.	38
Şekil 4.4.	Kontrol grubunda 3 ay sonunda kemikleşme	39
Şekil 4.5.	Kontrol grubu gün ışığında olmadığı görülmektedir transillüminasyon göstermektedir	39
Şekil 4.6.	Boş doku iskelesi yerleştirilen grupta 4. ve 12. hafta sonunda kemikleşme.....	40
Şekil 4.7.	Suda çözünen 17 β -östradiol yüklenmiş doku iskelesi yerleştirilen grupta 4. ve 12. hafta sonunda kemikleşme	40
Şekil 4.8.	17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller yüklenmiş doku iskelesi yerleştirilen grupta 4. ve 12. hafta sonunda kemikleşme	41
Şekil 4.9.	Suda çözünen 17 β -östradiol ve AdMSC yüklü doku iskelesi yerleştirilen grupta 4. ve 12. hafta sonunda kemikleşme	42

Şekil 4.10. 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller ve AdMSC yüklenmiş doku iskelesi yerleştirilmiş grupta 4. ve 12. hafta sonunda kemikleşme.....	42
Şekil 4.11. Kontrol / Kritik boyutlu kemik defekti grubu; 12. haftada elde edilen örnekte defekt alanını dolduran granülasyon dokusu (*) ve çevresinde kemik komşuluğunda düzensiz sıkı bağ dokusu tabakası izleniyor. Hematoksilen-Eozin X200.....	43
Şekil 4.12. Boş doku iskelesi grubu (Boş Dİ)	44
Şekil 4.13. Suda çözünen 17 β - östradiol grubu (WE-Dİ)	46
Şekil 4.14. 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller yüklenmiş doku iskelesi grubu (PE-Dİ).....	47
Şekil 4.15. Suda çözünen 17 β -östradiol ve AdMSC yüklü doku iskelesi grubu (WE-Dİ-H)	49
Şekil 4.16. 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller ve AdMSC yüklenmiş doku iskelesi (PE-Dİ-H).....	50
Şekil 4.17. Kontrol / Kritik boyutlu kemik defekti oluşturulan grubun 12. haftada elde edilen mikro-BT görüntüsü.....	51
Şekil 4.18. Boş doku iskelesi yerleştirilen grupta elde 4. ve 12. haftada elde edilen mikro-BT görüntüleri	51
Şekil 4.19. Suda çözünen 17 β -östradiol yüklü doku iskelesi yerleştirilen grubun 4. ve 12. haftada elde edilen mikro-BT görüntüleri.....	52
Şekil 4.20. 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller yüklenmiş doku iskelesi yerleştirilen grubun 4. ve 12. haftada elde edilen mikro-BT görüntüleri	52
Şekil 4.21. Suda çözünen 17 β -östradiol ve AdMSC yüklü doku iskelesi yerleştirilen grubun 4. ve 12. haftada elde edilen mikro-BT görüntüleri	53
Şekil 4.22. 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller ve AdMSC yüklenmiş doku iskelesi yerleştirilen grubun 4. ve 12. haftada elde edilen mikro-BT görüntüleri	53

TABLolar

Sayfa No:

Tablo 4.1. Doku iskelesinin fiziksel özellikleri.....	36
Tablo 4.2. 4. ve 12. haftanın sonunda mikro-bt sonuçlarına göre gruplarda elde edilen kemikleşme yüzdelerinin tanımlayıcı istatistiksel bilgileri (Kruskal-Wallis testi)	54
Tablo 4.3. 4. haftada deney gruplarında elde edilen kemikleşme sonuçlarının ikili olarak karşılaştırılması (Conover çoklu karşılaştırma testi).....	55
Tablo 4.4. 4. haftada deney gruplarında elde edilen kemikleşme sonuçlarının ikili olarak karşılaştırılması (Conover çoklu karşılaştırma testi)	56

1. GİRİŞ

Plastik cerrahide karşılaşılan en büyük problemlerden biri kemik defektlerinin rekonstrüksiyonudur (1). Günümüzde kemik doku defektlerinin rekonstrüksiyonu için başvurulan seçeneklerin başında greft veya mikrovasküler tekniklerle serbest flep olarak otojen kemik dokunun transferi gelmektedir. Her iki teknikle de kemik transferinin belirli kısıtlamaları olup bunların başında donör alanda ağrı, deformite gelişimi, komşu anatomik yapılara zarar verilmesi, ameliyat süresinin uzun olması, skar gelişimi, maliyet, uzun yatış süreleri, kemik dokunun kaybı ya da rezorbsiyon riski gelmektedir (2). Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda kullanılan bir başka seçenek de distraksiyon osteogenezidir. Distraksiyonun da iki seanslı ameliyat gereksinimi, tedavi süresi boyunca cihaz kullanımı, fibröz kaynama ve kaynamama gibi kendi içinde kısıtlamaları vardır (3). Bu gibi kısıtlamalar ve otojen doku transferi ile elde edilebilecek dokunun sınırlı olması nedeniyle doku mühendisliği ile kemik doku alternatiflerinin üretilmesi gündeme gelmiştir (4). Doku mühendisliği uygulamalarında taşıyıcı yapı olarak kullanılan doku iskelesinin etkinliğinin artırılması amacıyla büyüme faktörleri ve hücre bazlı uygulamalar son yıllarda önem kazanmış ve artmıştır (5).

Son yıllarda hücre bazlı bu uygulamaların merkezinde yağ dokusunun kolay ulaşılabilir, bol miktarda rezervi olması, elde edilmesi amacıyla lipoaspirasyon gibi plastik cerrahinin rutin kolay prosedürlerinden birine ihtiyaç duyulması nedeniyle yağ dokusundan türetilmiş kök hücreler (AdMSC) yer almaktadır (6).

Kemik doku mühendisliğinde kök hücrelerin çalışmalar adapte edilmesinden sonra hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin artırılması amacıyla büyüme faktörlerinin uygulanması ilgi uyandırmıştır (7).

17 β -östradiol östrojen hormonunun etkin formu olup, güncel çalışmalarla mezenkimal kök hücrelerde ER reseptörlerinin eksprese olmasından dolayı östrojen

etkisinde sitokin ve büyüme faktörlerinin uyarılması sonucunda proliferasyon ve farklılaşmanın uyarılacağı düşünülmektedir (8).

Hipotezimiz, 17β -östradiolün AdMSC`lerde östrojen reseptörlerinin eksprese olmasından dolayı kemik defektinde uygulanması halinde bu hücrelerin osteojenik farklılaşmalarını uyaracağı yönündedir. Bu hipotezi test etmek amacıyla literatür verileri ışığında sıçan kalvariyumunda oluşturulan kritik boyutlu kemik defekti modelinde 17β -östradiolün AdMSC`ler üzerindeki etkisini araştıran bir deneysel çalışma planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KEMİK DOKU ANATOMİSİ

Kemik doku bağı dokunun rijit formu olup iskeletin büyük bir kısmını oluşturarak vücudun destek sisteminin başında gelmektedir. Vücutta destek ve koruma fonksiyonları dışında kan hücrelerinin yapımı ve bazı minerallerin depolanması fonksiyonlarından birkaçıdır. Kemikler ayrıca kasların tutunma yerleri oldukları için lokomotor sistemin önemli bir kısmını oluştururlar (9).

Uzun kemiklerin orta bölümü diafiz (diaphysis), iki uç bölümü epifiz (epiphysis), bunların arasında kalan kısa bölüme ise metafiz (metaphysis) denir.

İnsan iskeleti embriyolojik olarak iki ayrı kemik tipinden oluşmuştur. Enkondral kemikler, kıkırdak öncünün kemikleşmesi ile oluşurken, membranöz kemikler mezenkimal öncülerin direkt ossifikasyonu ile oluşur. Enkondral kemiklere örnek apendiküler iskeletin uzun tübüler kemikleridir. Membranöz kemikler ise aksial ve kraniofasial iskelette bulunurlar (10).

Kemiklerin eklem yüzeyleri dışında kalan kısımları periosteum denilen zar ile sarılıdır. Periosteum dışta fibröz ve içte osteojenik olmak üzere iki kısımdan oluşur. Bu iki katlı membran yapı kırık iyileşmesi ve anjiyogenezde önemli role sahiptir. Fibröz kısım eklem kapsülü ile devamlılık göstermekte iken damarlanmadan zengin olan osteojenik tabaka kemikle devamlılık göstererek kemikte enine büyümeye katkıda bulunur (11).

Kortikal kemiğin iç yüzü endosteum denilen fibröz bir örtü ile kaplıdır. Görevi tam olarak bilinmemekle beraber kemik iyileşmesinde rolü olduğu düşünülmektedir. Kortikal kemiğin içindeki kavitede, kansellöz kemik ve kemik iliği bulunur. Kortikal kemik ve kemik iliği için destek vazifesi gören kansellöz kemik,

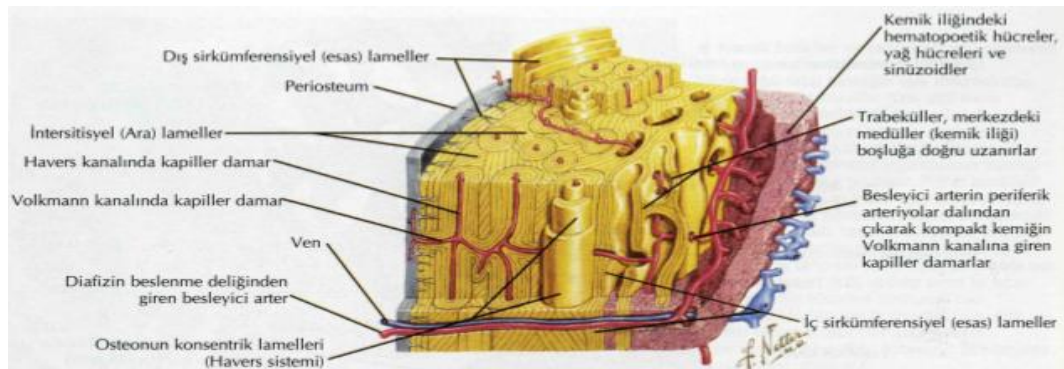
değişik kalınlıklarda trabeküler kemikten oluşmuş olup en kalın yerlerinde olgun osteonları barındırır.

Morfolojik olarak kemik doku iki kısımdan oluşur:

- Kortikal (kompakt) kemik
- Kansellöz (sponjiyöz) kemik

Tüm kemiklerin kortikal ve kansellöz komponentleri vardır. Kompakt kemik kemiklerin dış kısımlarını oluşturur. İçerisinde *Havers kanalları* denilen çok sayıda ince kanalcıklar mevcuttur. Bu kanallarda kemik dokusunun kılcıl damar dolaşımı (kapillerler) bulunur. Havers kanalları yanlara doğru uzanan *Volkman kanallarının* içerisinde yer alan, kemik iliği ile periost arası uzanan damarlarla anastomoz yaparlar, çok sayıda enine kanallar aracılığı ile birbiriyle bağlantılıdır ve kemiğin dış yüzeyine kadar uzanır. Her Havers kanalını saran lakün kemiğin temel ünitesi olup osteon ya da Havers sistemi olarak bilinir (12) (Şekil 2.1).

Kansellöz kemik, kemiklerin iç kısımlarında yer alır. Bu tabakada kemik matriksi yük taşıma amacıyla basınç ve gerilmenin vektörüne uygun olarak trabekulalar oluşturur. Uzun ve yassı kemiklerde bu trabekulalar arasında bulunan boşluğa meduller boşluk denir. Meduller boşlukta hematopoetik kök hücrelerden zengin kemik iliği bulunur (12).



Şekil 2.1. Kemik dokunun kesitsel anatomisi, Havers ve Volkman kanalları (13)

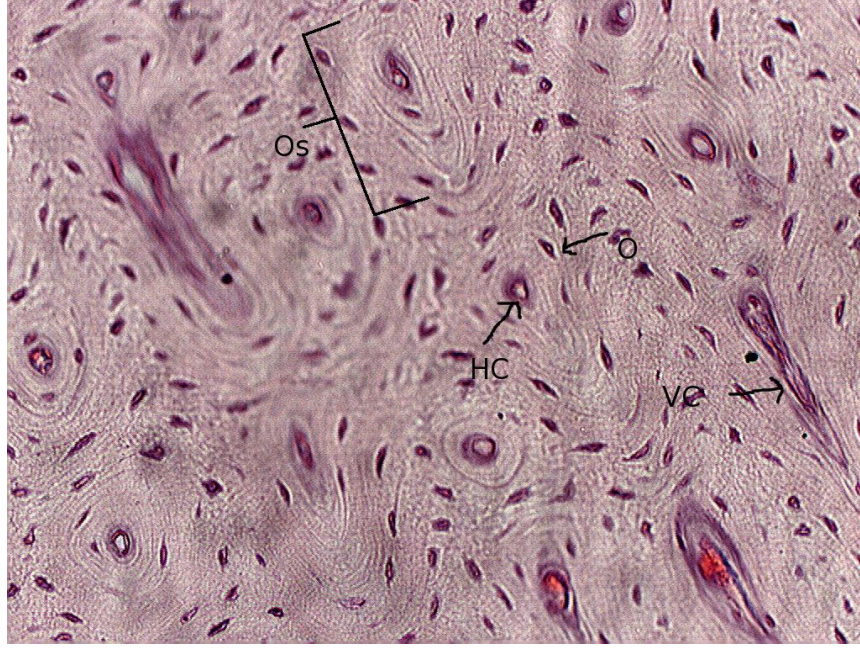
2.2. KEMİK DOKU HİSTOLOJİSİ

Kemik doku mineralize olması yönüyle bağ dokusu olarak benzersizdir. Biyokimyasal olarak %35 organik matriks ve %65 inorganik elementlerden oluşur. İnorganik komponenti kalsiyum hidroksiapatit oluşturur. Kalsiyum hidroksiapatit kemik dokusuna sertlik ve dayanıklılığını verir ve tüm vücudun kalsiyum rezervinin %99'unu, fosfor rezervinin %85'ini ve sodyum ve magnezyumun %65'ini oluşturur. Kemik dokunun organik kısmını ise hücreler ve matriks proteinleri oluşturur. Bu hücreler osteositler, osteoblastlar ve osteoklastlardır. Bu hücrelerin oluşum ve uyarılmasını çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri düzenler (14).

Osteoblastlar kemik matriksinin inorganik bileşenlerinin (Tip 1 kollajen, proteoglikan ve osteopontin ve osteokalsin gibi glikoproteinler) sentezinden sorumludur. Bu hücreler kemik yüzeyinde epitel hücreleri gibi yanyana dizilirler. Sentez faaliyetleri ile beraber alkalen fosfataz (ALP) seviyesi artar ve sitoplazma bazofilik hale gelir. Osteoblastlar, yeni sentez edilmiş matriks ile çevresi sarıldığında osteosit adını alırlar.

Osteositler, osteoblastlardan köken almış hücreler olup matriks lamelleri arasında bulunan lakünalar içine yerleşmişlerdir. Sitoplazmik uzantıları sayesinde çevre matriksten beslenebilmeleri mümkün olur. Bu hücreler kemik matriksin devamlılığı için aktif rol alırlar ve osteositlerin ölümü ile birlikte matriks rezorpsiyonu tetiklenir.

Osteoklastlar mononükleer fagositik sistem kapsamı içinde yer alan çok büyük, ileri derecede dallanmış hareketli hücrelerdir. Bu hücreler çok çekirdekli olup kemik rezorpsiyonunun başladığı bölgelerde, enzimatik olarak açılmış olan *Howship lakünası* adı verilen boşluklarda bulunurlar. Osteoklastlar asidofilik ağırlıklı olup kemik matriksini etkileyen asit, kollajenaz gibi lizozomal enzimleri salgılayarak organik matriks bileşenlerinin yıkımını gerçekleştirirler (15).



Şekil 2.2. Dekalsifiye kompakt kemiğin ışık mikroskobu görüntüsü

Os: osteon, O: osteosit, HC: Havers kanalı, VC: Volkman kanalı Hematoksilen-Eozinx100 (16)

2.3. DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE REJENERATİF TIP

Doku mühendisliği klinisyenler, mühendisler ve bilimadamlarından oluşan interdisipliner bir takım çalışması sonucunda hasarlı veya kayıp organ ve doku iyileştirilmesi amacıyla eksik olanın yerine konması için sınırsız ve her zaman ulaşılabilir bir doku eşleniği elde etmeyi amaçlayan bilim alanıdır (1). Konjenital kraniofasiyal anomaliler, travma, tümör rezeksiyonu ve dejeneratif hastalıklar sonucu meydana gelen doku defekleri için en sık başvurulan tedavi yöntemi aynı bireyden gerçekleştirilen greftleme veya flep cerrahileridir.

Cerrahi olarak bu işlemlere bir diğer alternatif transplantasyon cerrahisi olup bütün bu girişimlerin bir takım dezavantaj ve kısıtlamaları mevcuttur. Tıpta problemlerin sadece doku ve organ eksiklikleri olmadığı ve birçok patolojinin hücresel düzeyde başladığı göz önüne alındığında disfonksiyonel bir genin, proteinin, hücrenin, dokunun ve sonuç olarak tüm organ yapısının yerine konması ortak bir konseptin içinde yer almaktadır. Rejeneratif tıp tüm bu konseptleri ortak

başlık altında toplar ve gen tedavisi, hücresel tedavi, doku mühendisliği ve organ transplantasyonu alt başlıklarını oluşturmaktadır.

Sonuç olarak doku mühendisliği in vivo ve in vitro ortamda biyolojik dokuların organik, inorganik ve sentetik materyallerle manipülasyonu sonucu fonksiyon kayıplarını gidermeyi amaçlamaktadır ve rejeneratif tıbbın güncel ve hızla gelişmekte olan alt kategorisidir (3).

2.4. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

2.4.1. Tarihçe

1985 yılında Ulusal Bilim Konseyi'nin toplantısında UCSD (University of California San Diego) den Y.C.Fung tarafından “Doku Mühendisliği” terimi ilk olarak ortaya atılmıştır (17). Buna rağmen birçokları tarafından Langer ve Vacanti Science dergisinde 1993 yıllarında yayınlanan biyolojik olarak uyumlu sentetik doku iskelesi yardımıyla in vitro ortamda canlı hücre elde ettikleri çalışmaları nedeniyle doku mühendisliğinin “babaları” olarak nitelendirilirler. Bu makalede doku mühendisliğini “biyoloji ve mühendislik prensipleri ile doku ve organ fonksiyonlarının restorasyonu, idamesi ve geliştirilmesi amacıyla biyolojik eşlenik geliştiren interdisipliner alan” olarak nitelendirmektedirler (18).

Doku mühendisliği ile elde edilen ilk implant kondrosit entegre edilmiş sentetik bir doku iskelesi olup 1991 yılında Poland Sendromu'na sekonder konjenital sternum agenezisi olan 12 yaşındaki bir erkek hastaya uygulanmıştır (19).

Kemik doku mühendisliği için en kritik gelişmelerden biri Urist tarafından 1965 yılında kemik morfojenik protein (BMP)nin bulunması ve popularize edilmesidir (7). Kemik doku oluşumunu tetikleyen ve düzenleyen bir maddenin keşfi heyecan uyandırmış ve bu maddenin Wozney ve ark. tarafından klonlanması ile in vivo uygulanabilir olması kemik araştırmalarına ciddi bir ivme kazandırmıştır (20).

BMP ailesinin keşfedilmesinden sonra kemik iyileşmesini hızlandırıcı etkisi olabilecek vasküler endothelial büyüme faktörü (VEGF), insulin benzeri büyüme faktörü 1 ve 2 (IGF1-2), asidik ve basık fibroblast büyüme faktörü gibi büyüme faktörü ile araştırmalar gerçekleştirilmiştir (21-23).

Diğer bir taraftan doku iskelesi amacıyla kullanılan materyaller bakımından da gelişmeler devam etmiş ve günümüzde trikalsiyum fosfat, hidroksiapatit, polilaktik asit, polilaktik asit ko-glikolik asit ve bileşenleri sıklıkla kullanılmaktadır (24).

Schnell ve ark. 2007 yılında yayınlanan çalışmalarında polikoprolakton ve kollajen/polikoprolakton nanofiberler yoluyla sinir dokusunda aksonal uzama ve sinir dokusu üretimi ortaya koymuşlardır (25).

Macchiarini ve ark. 2008 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada kataraktan alınan trakeyi asellüler hale getirdikten sonra alıcı hastanın kök hücrelerinden türetilen hücreleri yükleyerek in vitro ortamda elde edilen dokuyu alıcı hastaya transplante etmişlerdir. Bu klinik deneyim bilinen en önemli doku mühendisliği ile elde edilen organ naklidir. Rejeneratif tıbbın temel alanlarından olan doku mühendisliği, kök hücre biyolojisi ve transplantasyon cerrahisinin bir arada uygulanması açısından oldukça önemlidir (26).

2.4.2. Doku İskelesinde Kullanılan Biyomalzemeler

Doku iskelelerinin sentezinin temel amacı in vivo ortamda hedeflenen dokunun oluşmasını sağlamak olduğu için kimyasal içeriği ne olursa olsun sağlıklı in vivo davranış için belirli bazı kriterleri karşılaması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan polimer:

1. *Osteoindüksiyon* - Doku iskelesine yüklenen kök hücreye veya mikroçevrede yer alan donör hücrelerine toksik olmamalı hatta hedeflenen bu multipotent kök hücreleri ve çevredeki endojen dokuları osteojenik seride çoğalmaları yönünde uyarması ve tetiklemesidir.

2. *Osteointegrasyon* - Kimyasal olarak alıcı dokuya tutunabilmelidir. Biyolojik olarak inert olmalı ve alıcı dokuda herhangi immunojenik yanıt oluşturmamalıdır. Olası immunojenik yanıt rejenerasyon mekanizmalarını inhibe edecektir.
3. *Osteokondüksiyon* – Kullanılan kimyasal malzeme uygulanan dokuda yeni kemik oluşumunu desteklemelidir. Uygun mekanik dirence sahip olmalıdır.
4. İdeal bir bozunma kinetiğine sahip olmalıdır. Uygulanan anatomik bölgenin ihtiyaçlarını karşılamalı ve arzu edilen mekanik dirence ve yük taşıma kapasitesine sahip olmalı ancak öte yandan hedef dokuda kemikleşme gerçekleşirken osteojenik maturasyona izin verecek şekilde biyobozunur olmalıdır (1, 4).

Bu kriterleri belli ölçüde karşılayan ve doku mühendisliğinde kullanılan malzemeler:

1. Doğal polimer yapıda doku iskeleleri (kollajen, hyaluronik asit, kalsiyum aljinat, kitosan ve fibrin)
2. Mineral bazlı doku iskeleleri (kalsiyum fosfat, seramik, biyoaktif cam)
3. Sentetik polimer yapıda doku iskeleleri (polilaktik asit, poliglolikolik asit, polilaktik ko-glikolik asit, polidaksanon, polikaprolakton)
4. Hidrojel yapıda doku iskeleleri (örn. Peptit hidrojel)

olarak gruplanabilir (4, 27, 28).

Bu malzemelerden doğal ve mineral bazlı olan doku iskelelerinin osteoindüksiyon kapasitesi yüksek olmalarına karşın kırılğan olmaları, mekanik olarak yük taşıma kapasitelerinin düşük olması nedeniyle klinik olarak hedeflenen geniş kemik defektlerine uygulanması uygun görülmemektedir.

Buna karşın sentetik polimer yapıda doku iskeleleri ise kemiğin yerine geçebilecek gerekli mekanik, yük taşımaya yönelik özelliklere sahipken osteoindüksiyon gücü diğer malzemeler kadar fazla değildir.

İdeal bir doku iskelesinde bulunması gereken yukarıda belirtilen bütün özellikleri tek başına bulunduran tek bir ideal polimer bulunmamaktadır. Bu noktada hidrojel yapıda doku iskeleleri ısıya dayalı faz değişimi özellikleri, kimyasal ve 3 boyutlu mikromimarilerinin manipüle edilebilir olmalarıyla güncel ilgi alanlarından biridir (29, 30). Optimum mekanik özelliklere sahip olmamalarına karşın kolay ulaşılabilir olmaları, hücrelerle karışık uygulanabilmesi, küçük moleküllerin hedef dokuya ulaştırılabilmesi nedeniyle rejeneratif potansiyelinin yüksek olduğuna inanılmaktadır (31). Bunun dışında sıklıkla gerçekleştirilen uygulama maksimum osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon elde edilmesi amacıyla doğal, mineral bazlı polimerlerle sentetik polimerlerin hibridizasyonu ile kompozit materyal kullanımındır (32). Örnek olarak hidroksiapatit / polimer, kalsiyum fosfat / polimer, biyoaktif cam / polimer gibi (33-35). Bu tez çalışmasında da optimum kemikleşme etkisinin gözlenmesi amacıyla kitosan polimer yapı içerisinde hidroksiapatit içeren doku iskeleleri kullanılmıştır.

2.4.3. Doku İskeleleri ve Yapısal Özellikleri

İdeal bir doku iskelesinin hücre proliferasyonu, neovaskülarizasyon, besin ve metabolik artıkların uzaklaştırılması için birbiri ile bağlantılı ve biyouyumlu uygun genişlikte gözenekli yapıya, in vivo ve in vitro ortamda doku gelişimine uygun, kontrol edilebilir bozunma hızına, hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşmasına elverişli yüzey kimyasına sahip olması gerekmektedir.

Kemik doku iskeleleri için bu durum ele alındığında sentezlenen doku iskelesinin osteoindüksiyon özelliklerini temelde içerdiği kimyasal bileşim belirlerken osteokondüksiyon gücü sahip olduğu makroskobik ve mikroskobik yapısal özelliklerine göre şekillenmektedir (4).

Kemik doku mühendisliği hedeflenen doku iskelelerinin bozunma kinetiği ele alındığında en az 6 ay (4 ay hücre kültürü ve 2 ay in situ) fiziksel özelliklerini korumaları gerekmektedir. Ardından kendilerine karşı bir yabancı cisim reaksiyonu gelişmeksizin 12-18 ayda mekanik özelliklerini kaybedip metabolize

edilmelidirler.(36) Bozunma kinetiği hücre ekimi dikkate alındığında ekilen hücrenin kendi ekstrasellüler matriksini sentezlemesine izin verecek süre dikkate alınarak planlanır. Ayrıca implante edilen doku iskelesinin in vivo ortamda biyouyumlu olması, mekanik stress ve yüke dayanabilecek özelliklerde olmasına ayrıca sterilizasyonu esnasında fiziksel özelliklerini kaybetmemesi dikkate alınmalıdır (37).

Tüm bu konseptler ışığında hedef doku ve implantasyon yeri dikkate alınarak doku iskelesinin şu belli başlı fiziksel özellikleri önem kazanmaktadır (4):

- Porozite derecesi
- Gözenek / Tüp boyutları
- Yüzey / Hacim oranı

Yapılan çalışmalar sonucunda kemik doku mühendisliğinde implantın uygun mikroçevre varlığında sağlıklı kemik sentezi için genel prensip olarak porozite derecesinin en az %90 ve gözenek boyutunun 300-500 µm arasında olması kabul edilmektedir (4, 32).

2.4.4. Doku iskeleleri ve üretim yöntemleri

Doku mühendisliğinde doku iskelesi oluşturulmasının bir başka önemli basamağı iskelenin fabrikasyonudur. Günümüzde doku iskelesinin optimizasyonu amacıyla sürekli yeni teknikler gelişmektedir. Doku iskelesinin mikromimari yapısı önem kazandıkça hedef dokuyu ve endojen ekstrasellüler matriksi en uygun şekilde simüle eden nanoteknolojik yöntemler önem kazanmıştır (4).

Temelde doku iskelesi fabrikasyon yöntemleri geleneksel / klasik yöntemler ve bilgisayar destekli yöntemler olarak ikiye ayrılabilir (38).

Geleneksel yöntemler:

- tekstil teknolojileri
- fiber bağlama

- çözücü dökümü / parçacık uzaklaştırma
- membran laminasyonu
- eriyik kaplama
- ekstrüzyon
- gaz köpükleştirme
- faz ayrımı
- elektro-eğirme
- yerinde (insitu) doku iskelesi üretim teknikleri
- dondurarak kurutma yöntemi

Bilgisayar destekli üretim yöntemleri ise ısı, ışık, kalıp ve yapıştırıcı kullanımına göre 4 ana başlık altında toplanmıştır (39).

Bu tez çalışmasında köpükleşmenin ve jelleşmenin gerçekleşmesi için gaz köpükleştirme yöntemi ve mikrodalga ışıma ile çapraz bağlanmanın bir araya getirildiği bir yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem ile eş zamanlı jelleşme ve köpükleşme sağlanmıştır (38, 40).

Gaz köpükleştirme yöntemi polimer içinde yayılan gaz kabarcıkları gözenekli bir yapı oluşturmak için kullanılmaktadır. Gaz köpükleştirme tekniğinde, köpükleştirme amacıyla sodyum karbonat (Na_2CO_3) veya sodyum bikarbonat (NaHCO_3) gibi iyonik karbonatlar kullanılmaktadır. Bunların asitle etkileşmesi sonucu veya yüksek sıcaklıkta bozunmasıyla karbondioksit baloncukları meydana gelmekte ve yapı içerisinde hapsedilerek gözeneklerin oluşması sağlanmaktadır (38, 41, 42). Bu teknikte kullanılan ajanların kolay ulaşılabilir olmaları nedeniyle bu yolla gözenekli hidrojel elde edilmesi düşük maliyetli bir yöntem haline gelmiştir (43).

Mikrodalga ışıma ile ısıtma/pişirme 1960'lı yıllardan beri gıda alanında kullanılmaktadır. Son 10 yıldır mikrodalgaların çok sayıda farklı endüstri ve laboratuvarlarda kullanımları da giderek yaygınlaşmaktadır. Alternatif bir ısıtma yöntemi olarak mikrodalgaların kullanılmasıyla laboratuvarlarda pek çok kimyasal reaksiyon da gerçekleştirilebilmektedir. Laboratuvarlardaki özel gereksinimleri karşılamak amacıyla ev tipi mikrodalga fırınlardan farklı olarak, özel mikrodalga

sistemleri geliştirilmiştir. Bu tip mikrodalga fırınlar, sürekli akış kangalı, manyetik karıştırıcı ve geri soğutucu gibi çeşitli aksesuarlarla zenginleştirilebilmektedir. Mikrodalga ışıma ile polimerizasyon, 20 yıl önce reaksiyonların hızını artırmak için kullanılmaya başlanmıştır ancak bu tekniğin sıklıkla kullanımı ve geliştirilmesi son yıllarda artmıştır. mikrodalga ışıma ile ısıtma geleneksel ısıtmaya göre çok daha hızlı ve verimli bir şekilde gerçekleşmektedir (44, 45).

2.5. KÖK HÜCRE KAVRAMI

Kök hücreler kendilerini sürekli yenileme kapasitesi, uzun yaşam süresi ve çoklu hücre serilerine dönüşebilme yeteneğine sahip hücreler topluluğudur.

Rejeneratif tıpta kök hücreler elde edildikleri biyolojik kaynağa göre ikiye ayrılır (46):

- Embriyonik kök hücreler
- Erişkin kök hücreler

Embriyonik kök hücreler preimplantasyon aşamasındaki blastositin iç hücre tabakasından elde edilirler (47). Bu evredeki kök hücre pluripotent olup endoderm, mesoderm ve ektodermden gelişen tüm hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğine sahiptir ve geniş uygulama alanı mevcuttur (48). Genetik ve kültür ortamı değiştirilerek embriyonik kök hücrelerin hematopoetik hücre öncüllerine, adipositlere, kas hücrelerine, kondrositlere ve diğer dokulara dönüşebildikleri gösterilmiştir (49-52). Embriyonik kök hücreler bu özellikleriyle büyük ilgi uyandırsalar da hücre stabilitesi, onkolojik kaygılar, etik ve yasal düzenlemeler nedeniyle uygulama alanları sınırlıdır (46).

Erişkin kök hücreler ise farklılaşmış hücre grupları arasında farklılaşmadan kalan ve bulunduğu doku çevresindeki hücrelere dönüşebilen hücrelere denir. Kemik iliği bugün bilinen en önemli kök hücre kaynaklarından olup radyoterapi ve

kemoterapi sonrasında gelişen klinik tablolarda kemik iliğinin yerine konması amacıyla kemik iliğinden elde edilen kök hücreler kullanılmaktadır.

Kemik iliği iki farklı kök hücre grubuna ev sahipliği yapmaktadır:

- Hematopoetik kök hücreler
- Mezenkimal / stromal kök hücreler

Hematopoetik kök hücreler kan dokusunun hücre elemanları olan lökositler, eritrositler ve trombositlerin gelişiminden sorumludur. Mezenkimal stromal kök hücreler ise in vitro ve in vivo ortamda kemik, kıkırdak, yağ ve kas gibi çeşitli bağ dokusu elemanlarının hücresel gelişimine yol açar (46).

Doku mühendisliği uygulamaları açısından kök hücre kavramı değerlendirildiğinde gerek yasal düzenlemeler gerekse etik tartışmalar nedeniyle pluripotent olmalarına rağmen embriyonik kök hücrelerin kullanımı tereddütlerle karşılanırken potansiyelleri embriyonik kök hücrelere göre daha kısıtlı olmasına rağmen yine multipotent olmaları yönüyle mezenkimal kök hücrelerin kullanımı çok daha fazla heyecan uyandırmıştır. Ancak yine kemik iliği biyopsisi tekniğinin ağrı, morbidite ve düşük hücre elde edilebilmesi gibi kısıtlamaları nedeniyle ilk dönemde pratik olarak bazı dezavantajlar ortaya çıkmıştır. Sonrasında yapılan çalışmalarda bazı canlı türlerinde bağ dokusu matriksinde mezenkimal kök hücre tespit edilmesi heyecan uyandırmıştır (53, 54). Bu çalışmalardan birkaç yıl sonra Zuk ve ark. tarafından 2002 yılında doku mühendisliği uygulamalarında büyük ivmelenmeye yol açan bir çalışma ile kemik iliği dışında mezenkimal kök hücrelerin insan yağ dokusunda da bulunduğunu göstermişlerdir (55). Yağ doku kolay ulaşılabilir olması, insanda geniş bir alana yayılmış olması ve plastik cerrahi için rutin bir prosedür olan liposuction / lipoaspirasyon tekniği ile elde edilebilmesi nedeniyle kök hücre çalışmalarında çok önemli bir kaynak haline gelmiştir (46, 56).

2.5.1. Yağ Dokusu ve Mezenkimal Kök Hücreler

Uzun yıllar boyunca yağ dokusunun sadece enerji metabolizması ile ilişkili depo ve üretim fonksiyonu olduğu kabul edildi. Az miktarda yağ dokusunda büyük miktarda enerji depolanması mümkün olabilmektedir. Su ihtiyacı karşılandığı takdirde bir insan ortalama 30-40 gün arası açlık sürecini yağ dokusundan karşılanan enerji ile tolere edebilmektedir (57).

Enerji metabolizması dışında yağ dokusu seks steroidlerinin metabolizmasında, leptin gibi yağ dokuya spesifik biyoaktif faktörlerle nöroendokrin fonksiyon ile metabolizmanın düzenlenmesi, yapısal destek ve visseral organların korunması, immün sistemin düzenlenmesi ve homeostazi gibi fonksiyonları mevcuttur (58, 59).

Yağ dokusunun ekstrasellüler matriksi ile ilgili yapılan araştırmalarda esas olarak kıkırdak dokunun temel elemanlarından olan tip 2 kollajen dışındaki kollajen tiplerinin bulunduğu, bunun dışında değişen oranlarda laminin ve fibronektinin yer aldığı gösterilmiştir (60). Yine vücutta yer alan diğer dokularda olduğu gibi başta fibroblast büyüme faktörü (FGF), transforming büyüme faktörü beta (TGF- β) ve trombositlerden türetilmiş büyüme faktörü (PDGF) olmak üzere büyüme faktörlerinin bulunduğu gösterilmiştir (61).

Yağ dokusun içinde yer alan hücre popülasyonu incelendiğinde adipositlerin dışında, preadipositler, endotelial hücreler, düz kas hücreleri, perisitler, fibroblastlar ve mezenkimal kök hücrelerin (AdMSC) bulunduğu görülmüştür (57).

AdMSC`ler erişkin tip kök hücrelere ait olmaları nedeniyle deneysel ve klinik uygulamaları embriyonik kök hücreler hakkında süregelen hararetli etik ve yasal tartışmaların dışında kalmıştır. Embriyonik kök hücrelerin esnek farklılaşma kabiliyetine sahip olmamalarına karşın AdMSC`lerin yağ, kemik, kıkırdak, kas ve sinir dokularına dönüşebildikleri gösterilmiştir (55, 62) .

AdMSC`ler kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler (BMSC) ile karşılaştırıldıklarında doku kültüründeki davranışları, morfoloji, büyüme hız ve

paternleri ve hücre yüzey profillerleri açısından büyük oranda benzerlikler dikkat çekmektedir. Aslında iki hücre grubunun da farklı anatomik lokalizasyonlardan elde edilmelerine karşın stromal kökenli (kemik iliği yağ dokusu ve cilt altı yağ dokusu) olmaları nedeniyle bu hiç şaşırtıcı değildir. Bu açıdan durum ele alındığında AdMSC`lerin kolay elde edilebilmeleri, fazla miktarda bulunmaları ve geniş alana yayılmış olmaları BMSC`lere oranla avantajları olarak görülebilir (63).

Ortalama olarak bir kemik iliği transplantında toplam 6×10^6 hücre mevcut ve bu fraksiyonun sadece %0.01 ile %0.001`i kadarı kök hücre içermekteyken, liposuction aspiratında ortalama stromal vasküler fraksiyon hücre sayısı 1 gram yağ dokusu başına $0.5-2.0 \times 10^6$ olup kök hücre yüzdesi bunun %1 ile 10^{-5} arasında değişmektedir. Sonuç olarak 1 gram yağ dokusundan 0.5×10^4 ile 2×10^5 arasında değişen miktarlarda kök hücre izole edilebilmektedir (64, 65).

Genel olarak mezenkimal kök hücreler (MSC) hücre kültür kabına yapışma kapasiteleri ile izole edilirler. Bu ilk izolasyon kriterinin dışında spesifik hücre markır panelleri ile immunohistokimyasal olarak ayrımları gerçekleştirilir. Buna rağmen MSC`lerin karakterizasyonu definitif hücre belirteçlerine sahip olmamaları nedeniyle oldukça güç olmaktadır.

International Society for Cellular Therapy hücre kültürü ortamında MSC tanımlanması amacıyla 3 minimal kriter tanımlamıştır:

- Plastik yüzeye tutunabilme
- CD73, CD90 ve CD105 ekspresyonu; CD11b veya CD14, CD19 veya CD79 α , CD45 ve HLA-DR ekspresyonunun olmaması
- Adiposit, kondrosit ve osteoblast serisine dönüşebilme yeteneği (66)

MSC`lerin olmadığı gibi AdMSC`lerin tanımlanmasında kullanılan tek bir spesifik hücre markır bulunmamaktadır. Traktuev ve ark. gerçekleştirdikleri çalışmaya göre AdMSC`lerin yoğunlukla yağ dokusunun mikrovasküler dolaşımının çevresine yerleşmiş ve temelde CD34+ / CD31- fenotipe oldukları bulunmuştur (67). Aynı grubun bir başka çalışmasıyla da AdMSC`lerin bu yönüyle in vivo

ortamda alıcı endotel hücreleriyle sinerjistik etkileşime girerek neovaskülarizasyonu tetikledikleri tanımlanmıştır (68).

Kök hücrelerin buldukları doku içerisinde kendilerini yenileme ve çoğalıp farklılaşmalarını destekleyen yaşam bölgesine hücre nişi (lokal mikroçevre) adı verilir. Bu niş ortamı oksijen ve büyüme faktörlerinin ortama ulaşmasını sağlayan 3 boyutlu ekstrasellüler matriks bileşenleri ve destek hücrelerden oluşmaktadır. Kök hücrenin bulunduğu niş hücrenin fonksiyon, devamlılık ve hücrel fenotipini belirler. AdMSC`lerin yüzey markırlarına ilişkin türler arasında ve aynı tür içinde farklı anatomik lokalizasyonlar arasında bu bağlamda çeşitli farklılıklar bulunsa da sonuç olarak AdMSC`lerin yağ dokusu içinde perivasküler bir nişte yer aldıkları ve CD34+/ CD90+/CD31-/CD45-/CD146- fenotipi gösterdikleri söylenebilir (66).

2.5.2. Yağ Dokusundan Türetilmiş Kök Hücrelerin İn Vitro ve İn Vivo Farklılaşma Potansiyelleri

AdMSC`lerin preadipositlerin meydana gelmesiyle yağ dokusuna farklılaşmaları en olası hücre serisi olarak gözükmektedir. 3 haftalık bir farklılaşma zamanı sonucunda bu gerçekleşmektedir (69). İlk haftanın sonunda hücre içinde yağ depolanması başlamakta ve 3. haftanın sonucunda yağ dokusuna farklılaşmayı ortaya koyan hücre belirteçleri belirlenebilmektedir. AdMSC`lerin bu potansiyelleri kozmetik amaçlı yağ grefti uygulamalarında da dikkate alınmalıdır. Yağ grefti uygulamalarında amaçlanan sadece matür adipositlerin transferi değil aynı zamanda adipositlere farklılaşma ve uygulama alanında yeni damar oluşumun tetikleme potansiyelleri bulunan AdMSC`lerin de transferi olmalıdır (57).

AdMSC`lerin 3 hafta sonunda uygun farklılaşma ortamında hücre yoğunluğunun fazla olduğu kültür ortamında kartilajinöz matriks elemanları sentezleyerek kondrositlere farklılaştıkları gösterilmiştir (70). Kıkırdak dokunun self rejenerasyon yeteneği olmadığı göz önünde bulundurulduğunda kıkırdak doku mühendisliğinde uygun doku iskelesi varlığında kıkırdak defektlerin

rekonstrüksiyonu amacıyla AdMSC`lerin kullanımı büyük heyecan uyandırmaktadır (46).

AdMSC`lerin myositlere farklılaşması diğer doku serileriyle kıyaslandığında daha güç ve düşük konversiyon hızıyla gerçekleşmektedir. AdMSC`lerin myogenez sonucunda kas dokusuna dönüştükleri sentezlenen hücrelerin myoD, myogenin, myosin zincirleri eksprese etmeleriyle anlaşılabilir. Bu farklılaşma kaskadının tamamlanması diğer serilere göre daha uzun sürmekte ve 6 haftayı bulmaktadır (71).

Mezodermik orijinde olması nedeniyle ektodermal orijinde olan sinir dokusuna farklılaşması beklenmemesine rağmen AdMSC`lerin sinir benzeri doku farklılaşması gösterdikleri gösterilmiştir. Yapılan bir hayvan çalışmasında arteria cerebra media oklüzyonu olan canlılarda ventriküllere implante edilen AdMSC`lerin beyaz cevheri takip ederek hasarlı beyin bölgelerine yerleşip nörolojik fonksiyonları iyileştirici rejenerasyon gerçekleştirdikleri tespit edilmiştir (72). Bu yönüyle bilimsel platformlarda AdMSC`lerin sadece mesodermal dokulara değil diğer embriyolojik hücre tabaklarından köken almış hücre serilerine de farklılaşabilmeleri nedeniyle multipotent değil pluripotent olduğu yönünde kavramsal tartışmalar mevcuttur. Ancak hücre morfolojisi pluripotent hücrelerden farklı olması nedeniyle bu önerge bilimsel çevrelerde yaygın olarak kabul görmemektedir (66).

AdMSC`lerin en yaygın üzerinde araştırma yapılan farklılaşma paternlerinin başında kemik serisine farklılaşması gelmektedir. Kemik farklılaşması için de yine in vitro ortamda uygun ortamda en az 3 hafta zaman gerekmektedir. Bu zamanın sonunda AdMSC`ler mineralize ekstrasellüler matriks sentezlemeye başlamakta ve kemikleşme eksprese olan matür osteoblast markırları osteopontin, osteokalsin, CBFA-1 ve tespit edilen alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi gibi belirteçlerle değerlendirilmektedir (73).

Bunun dışında AdMSC`lerin kemikleşme potansiyelleri in vivo ortamda gerçekleştirilen çalışmalarda değerlendirilmiştir. Cowen ve ark. gerçekleştirdikleri çalışmada farede kritik boyutlu kemik defektine AdMSC`ler implante etmişler ve kemikleşme potansiyelini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonunda AdMSC`lerin kemik rejenerasyonuna katkıda buldukları görülmüştür (74). AdMSC`lerin klinik

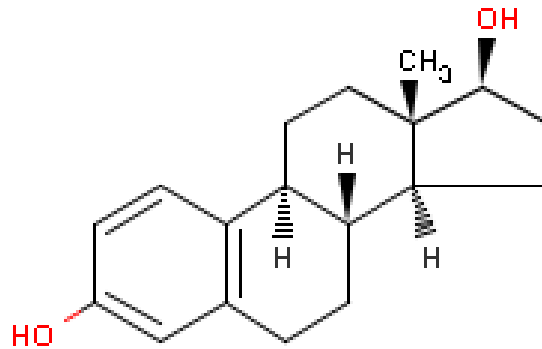
uygulanmasına ilişkin ilk yayın tek bir olgunun sunumu şeklinde Lendeckel ve ark. tarafından 2004 yılında yayınlanmıştır. Bu hastada travma sonucunda meydana gelmiş olan ve kronik enfeksiyonla komplike olmuş olan kalvariya kemik defektin rejenerasyonu amacıyla otolog AdMSC`ler uygulanmıştır. AdMSC`ler kemik fragmanları, fibrin glue, doku iskelesi görevi görmesi amacıyla biyobozunur polimerik materyal yardımıyla kemik defektine uygulanmış ve sonuç olarak hedeflenen kemik iyileşmesi gözlenmiştir (75).

AdMSC`ler bahsedilen hücre serilerine farklılaşma potansiyellerinin dışında salgıladıkları anjiyojenik ve büyüme faktörleri yardımıyla çevre dokunun büyümesi ve gelişmesini desteklemektedirler (76).

2.6. ÖSTROJENİN KEMİK ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

2.6.1 Östrojen

Östrojen vücutta büyüme, farklılaşma, metabolizma ve üreme gibi fonksiyonlar üzerinde etkisi olan 18 karbonlu steroid yapıda bir hormondur. Gebelik dışında kadınlarda büyük oranda overlerden, küçük bir oranda ise adrenal korteksten salgılanmaktadır. Gebelik sürecinde ise büyük oranda plasentadan salgılanır.



Şekil 2.3. 17 β-östradiolün kimyasal yapısı

Kanda üç tip östrojen bulunmaktadır (77):

- Östron
- 17 β -östradiol
- Östriol

Salgılanan başlıca östrojen olan 17 β -östradiol, dolaşımında östron ile denge halindedir. Östron, daha sonra östriole metabolize olur. Bu dönüşümün büyük bir kısmı karaciğerde gerçekleşir. Bu üç östrojen içinde etkisi en potent olanı 17 β -östradiol, en zayıf olanı ise östrioldür. Dolaşımdaki östradiolün %2'si serbesttir. Kalanı ise %60'ı albümine, %38'i testosteronu da bağlayan seks steroid-bağlayıcı globuline olmak üzere proteinlere bağlıdır (78).

Östrojenin kemik üzerindeki temel görevi kemik yoğunluğunun korunması ve kemik dokuyu osteoporoza karşı korumaktır. Menopoz sonrasında overlerden premenapozal dönemde salgılanan östrojenin artık hemen hemen hiç salgılanmamaktadır. Postmenopozal dönemdeki kadınlarda ortaya çıkan bu östrojen eksikliği osteoporoza yol açmaktadır. Bu dönemde osteoblastik aktivite azalırken osteoklastik aktivitede artış meydana gelir ve fonksiyonel yaşam süresinin osteoklast için uzaması ve osteoblast için kısılması sonucu kemik yıkım-yapım dengesinin yıkım lehine bozular. Bunun sonucunda osteoporoz ve kemik kırıkları gibi patolojilerle seyreden klinik tablo ortaya çıkmaktadır (79).

2.6.2. Östrojen Reseptörleri

Östrojen hormonu yukarıda bahsedilen fonksiyonlarını bağlandığı reseptörü yoluyla (ER) gerçekleştirir. Östrojen reseptörü ligand bağımlı transkripsiyon faktörlerinin süper ailesine dahil olup hücre nükleusunda yer alan bir hormon reseptörüdür. Bugüne kadar ER α ve ER β olmak üzere 2 çeşit reseptör tanımlanmıştır (80). ER α , 66 kDa moleküler ağırlıkta olup, 595 amino asit içerir. ER β ise ER α 'dan daha kısa olup, 54 kDa moleküler ağırlıkta ve 530 amino asitten oluşur (81).

Östrojen reseptörü ile hücrenel değişiklikleri kontrol eder indükler. Östrojenin etkisini gösterdiği klasik mekanizmada östrojen steroid yapıda olup lipofilik bir

molekül olduğu için kolaylıkla hedef hücreye diffüze olur ve nükleusta lokalize ER'ye bağlanır. Bu bağlanma, reseptörde konformasyonel bir değişikliği uyarır ve östrojen yokluğunda hsp90 şaperonlarına bağlı haldeki reseptörün hsp90'dan ayrılmasını sağlayarak reseptör dimerlerinin oluşumunu sağlar. Meydana gelen östrojen-ER kompleksi; reseptörün DNA'ya bağlanan domaini aracılığıyla ya koaktivator ya da korepresör proteinlerle birlikte hedef genin promotor ve/veya enhancer bölgelerinde yer alan gen dizilerine bağlanır. Sonuçta bazen hedef genin transkripsiyonu uyarılır, bazen de inhibe edilir ve ilgili protein konsantrasyonu hücrenin ihtiyacına göre düzenlenmiş olur (82).

Östrojen reseptörleri kemik doku dışında merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, immün sistem, ürogenital sistem, sindirim sistemi, böbrekler, karaciğer, akciğerler ve meme dokusu (83) gibi birçok organda ve güncel çalışmalar göstermiştir ki embriyonik ve mezenkimal kök hücrelerde eksprese olmaktadır (84).

2.6.3. Östrojenin Kök Hücreler Üzerindeki Etkisi

Güncel çalışmalar ile östrojen reseptörlerinin kök hücrelerde de eksprese olduğunun gösterilmesiyle östrojenin kök hücre fonksiyonlarını modifiye edebileceği düşünülmektedir (85).

Hamada ve ark. gerçekleştirdikleri çalışmaya göre 17 β -östradiol endotelial progenitör hücrelerin hasarlı damar ve iskemik myokardial dokulara migrasyon ve proliferasyonu tetikleyerek rejenerasyona katkıda bulunmaktadır (86).

Embriyo ve embriyonik kök hücrelerde embriyolojik hayatın ilk günlerinden itibaren ER α ve ER β 'nin eksprese olması östrojenin insan embriyonik kök hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşmasında etkili olduğunu düşündürmektedir (85). Han ve ark. gerçekleştirdikleri çalışmada embriyonik kök hücrelerinde 17 β -östradiol etkisiyle nükleik asit yapısına 3-H timidine katılımının artmasıyla DNA sentezinin uyarıldığı, tam tersine ER blokörü olan tamoksifen kullanımıyla inhibe olduğu

gösterilmiştir. Östrojen etkisiyle ER ekspresyonu ve c-fos, c-jun ve c-myc gibi protoonkogenlerin mRNA ekspresyonu artmaktadır (87).

MSC`ler bakımından konsept değerlendirildiğinde ER reseptörlerinin bu hücrelerde de eksprese olmasından dolayı östrojen etkisinde sitokin ve büyüme faktörlerinin uyarılması sonucunda proliferasyon ve farklılaşmanın uyarılacağı düşünülmektedir (8).

Östrojenin MSC`lerin üzerine bir başka etkisinin de kemik seriye farklılaşmaları yönündedir. 17β -östradiolün MSC`leri osteoblastik aktivite yönünde daha çok $Er\alpha$ üzerinden uyardığı düşünülmektedir (88). Kemik iliğinden türetilmiş MSC`ler 17β -östradiol ile beraber osteojenik farklılaşma ortamına maruz bırakıldıklarında kemik morfojenik protein (BMP) ve osteokalsin ekspresyonun, ekstrasellüler matriks mineralizasyonunun anlamlı olarak arttığı görülmüştür. 17β -östradiolün ayrıca MSC`lerin osteojenik genler olan ALP, kollajen tip 1, ve TGF- β 1 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (84).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Deney hayvanlarının tüm cerrahi işlemleri, bakımları ve izlemleri bu laboratuvarında yapıldı. Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan gerekli izin alındı (Karar No:2011/44-12).

Çalışmada toplam 36 adet 200-250 gram ağırlığında, erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Kullanılan deney modeli literatürde sıkça kullanılan sıçan türü için kritik boyutlu kemik defekt modeli ve yapılan benzer çalışmalar baz alınarak planlanmıştır (89, 90). Tüm hayvanlar, standart çevresel koşullar sağlanacak şekilde, oda sıcaklığında, hareket arkanları kafeslerle sınırlandırılarak ve her kafeste birer sıçan olacak şekilde barındırıldı. İşlem öncesi değerlendirmede deneye dahil edilen hayvanların hiçbirinde enfeksiyon, açık yara, malnutrisyon veya başka bir sağlık bozukluğu yoktu. Beslenmelerinde standart sıçan yemi ve musluk suyu kullanıldı. Çalışma yapılacak sıçanlara, çalışmadan 6 saat önce, sıvı ve yiyecek kısıtlaması yapıldı. Profilaktik antibiyoterapi uygulanmadı.

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE BİYOLOJİK MATERYALLER

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve biyomalzemeler üç başlık altında toplanabilir:

1. Doku iskelesi
2. Östrojen
3. Kök Hücre

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN DOKU İSKELESİ MODELİ

Çalışmada kullanılan eş zamanlı mikrodalga ışıma ile çapraz bağlama/gaz köpükleştirme yönteminin kullanıldığı kitosan/hidroksiapatit toz süper gözenekli (SPH) doku iskelesi modeli ve üretim tekniği Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği ve Biyomühendislik Bölümü Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Laboratuvarı'nda tanımlanmış olup bu çalışmada kullanılan doku iskelelerinin üretim ve karakterizasyonu da aynı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir (91).



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan kitosan/HA yapıdaki doku iskeleleri

3.2.1. Kitosan / HA Doku İskelesinin Polimer Yapısı

Kitosan, kitinin alkalik deasetilasyonu ile elde edilmiş bir amino polisakkarittir. Kitin, selülozdan sonra dünyada en yaygın olarak bulunan ikinci biyopolimerdir. Kabuklu su canlılarının, böceklerin iskeletinde ve mantarların hücre duvarında bulunur (92).

Kitosan biyobozunur, biyoyumlu, allerjik ve toksik olmayan özellikleri nedeniyle biyomedikal uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tip sentetik polimerlerin tersine hücre tutunması, çoğalmasını ve farklılaşmasını destekleyen hidrofilik yüzeyi vardır ve minimum yabancı cisim reaksiyonu oluştururlar (93). Kimyasal yapısındaki reaktif grupların modifikasyonu ile kimyasal ve fiziksel özelliklerinde değişiklikler mümkün olmaktadır (94).

Kitosan bunlar dışında ayrıca osteokondüktif özelliğe sahip olup in vitro ve in vivo ortamda kemik oluşumunu desteklemektedir. Kitosanın polisakkarit iskelet yapısı

kemiğin ekstrasellüler matriks temel elemanlarından glikozaminoglikanlar ile benzerliğinden dolayı kemik doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilmektedir (31).

Kitosan tek başına biyoaktif özelliğe sahip değildir bu nedenle yapısında HA gibi biyoaktif seramiklerin katılımı doku iskelesinin osteoindüktif özellik kazanması açısından önemlidir (95, 96).

3.2.2. Kitosan / HA doku iskelesinin üretimi

Bu tez çalışmasında organik yapıda olan kitosan ile inorganik yapıda olan HA polimerlerinin eş zamanlı mikrodalga ışıma ile çapraz bağlama/gaz köpükleştirme yönteminin kullanılarak bir araya getirilerek kitosan/HA SPH doku iskeleleri sentezlenmiştir (38, 40).

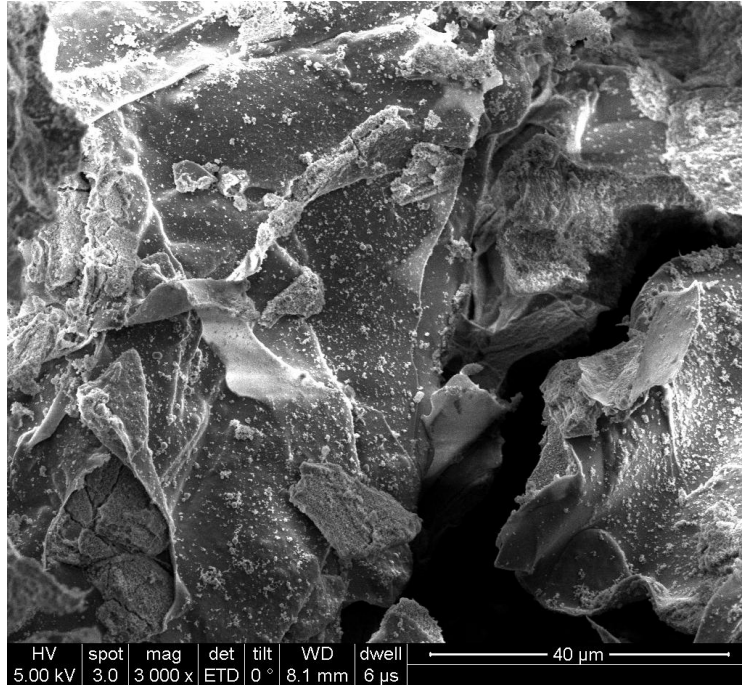
Kitosan/HA SPH'lerin sentezi için, 0.2 g kitosan 0.1 M asetik asit çözeltisi içinde yaklaşık 1 gün süreyle manyetik karıştırıcı ile karıştırılmak suretiyle çözülmüştür. Elde edilen %2'lik kitosan çözeltisinden 2 mL alınarak 24 gözlü Petri kaplarının gözlerine yerleştirilmiştir. Ardından, sırasıyla çapraz bağlayıcı glyoxal (4µL) ve köpükleştirici ajan NaHCO₃ (6 mg) ve 100 mg. HA tozu eklenerek hazırlanan karışım homojenize edilmiştir. Petri kabı hızlıca 2450 MHz'de 90-1200 W güç aralığında çalışabilen mikrodalga fırın (Arçelik, MD 554, Türkiye) içerisine yerleştirilmiştir. Köpük oluşumu gözlemlendiğinde güç kesilmiştir. 90 Watt gücünde ve 45-90 s zaman aralığında jelleşme meydana gelmiştir. Sonuçta, mikrodalga fırında gaz köpükleştirme yöntemi ile yapı içerisinde gözenekler oluşurken, eş zamanlı olarak mikrodalga ışıma ile de jelleşme meydana gelmiştir. Jelleşme sonrasında, petri kabının gözlerinin şeklini almış olan küçük silindirik formundaki hidrojeller, kısa bir süre etil alkol içerisinde bekletildikten sonra gözlerden çıkarılmışlardır. Alkol ve su moleküllerinin yer değiştirmeleri hidrojellerin bir miktar büzülmesine neden olmuş, bu durum da hidrojellerin gözlerden çıkarılmasına kolaylık sağlamıştır. Gözlerden çıkarılan hidrojeller saf suda şişirilerek yapılarındaki safsızlıkların uzaklaşması sağlanmıştır. Saf sudan alınan örnekler, dondurarak kurutma cihazında (Christ, Almanya) -80°C'de tamamen kurumaları için 1 gün boyunca liyofilize edilmiştir.

Kurutma cihazından çıkan hidrojeller gözeneklerinin çökmesini engellemek amacıyla 1 gece boyunca %96'lık etanolde bekletilmiştir. Ardından, hidrojeller 1 gün daha kurutularak etanolün uzaklaşması sağlanmıştır (38, 40).

3.2.3. Kitosan / HA Doku İskelesinin Karakterizasyonu

Sentezlenen kitosan / HA doku iskelesinin karakterizasyon ve fiziksel özelliklerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen testler:

1. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi
2. Şişme deneyi sonuçları
3. Mekanik dayanım sonuçları
4. Termal Analiz
5. Yoğunluk analizi
6. Boşluk kesri analizi



Şekil 3.2. 17- β Östradiol içeren PLGA (65:35) nanopartiküllerin enjekte edilerek yüklendiği doku iskelelerin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri: X3000

3.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN ÖSTROJEN MOLEKÜLÜ

Bu tez çalışması kapsamında östrojen hormonunun en potent formu ve fonksiyonlarından büyük oranda sorumlu olan 17 β -östradiol kullanılmıştır. 17 β -östradiolün bu çalışmada AdMSC'ler üzerindeki etkinliğini araştırmak amacıyla iki formu kullanılmıştır:

1. Suda çözünen 17 β -östradiol
2. 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller

3.3.1. Suda çözünen 17 β -östradiol

17 β -östradiol maddesinin hidrofobik bir yapıda olması nedeniyle doku iskelesine yüklenmesi ve stabilitesi bu formda mümkün olmayacağından ticari olarak mevcut siklodektrin kaplı etkin formu (Sigma, Kat. No: E4389) doku iskelesine yüklenmesi amacıyla kullanıldı. Mevcut ticari formun suda çözünürlüğü 25 mg/L. olup, 1 gramında 40-55 mg. 17 β -östradiol içermektedir.

3.3.2. 17 β -östradiol Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Sentezi

Nanopartikül üretiminde hammadde olarak Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nce (FDA) onaylanmış bir sentetik polimer olan PLGA (polilaktik glikolik asit) kullanılmıştır. PLGA, oldukça yavaş bir biçimde bozularak vücutta şeker metabolizmasının bir ara ürünü olan laktik asite dönüştüğü için normal hücre fonksiyonlarını etkilememektedir (97). PLGA, farklı son ürünlerin sentezlenmesinde kullanılabilen, uygulamalarda esneklik sağlayabilen, farklı polimerlerle kompozit oluşturabilen, graft kopolimer olarak kullanılabilen ve birbiri ile bağlantılı gözenekler oluşturabilen bir kopolimerdir (98).

PLA/PGA 65:35 bileşimlerine sahip PLGA kopolimerleri ve %10'u konsantrasyonda olacak şekilde 17 β -östradiol (Sigma, Kat. No: E2758)(suda

çözünürlüğü 5 mg/L.) etil asetat içerisinde çözülerek %2'lik (w/v) organik faz oluşturulmuştur. Elde edilen organik faz, içerisinde %1 (w/v) oranında çözünmüş DMAB bulunan sulu faza ilave edilmiş ve oluşan karışım yüksek hızlı homojenizatörde 15,000 rpm'de karıştırılmıştır. Karışıma sıcak su eklenerek içerisinde bulunan organik fazın uçması beklenmiş ve sulu fazda süspansiyon halinde 17 β -östradiol/polimer oranı (w/w) %10 olan PLGA nanopartiküller üretilmiştir. İki ayrı deney gruplarında doku iskelelerine emdirilerek 0.07 mg. 17 β -östradiol/doku iskelesi yüklenmiştir.

Çalışmada kullanılan östrojen formlarının salım kinetikleri ayrıca incelenerek malzemelerin karakterizasyonu amacıyla değerlendirilmiştir.

3.4. ÇALIŞMADA KULLANILAN KÖK HÜCRELERİN ELDE EDİLMESİ

3.4.1. Sıçan Yağ Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre (AdMSC) İzolasyonu ve pasajlanması

Tez çalışmasında kullanılan AdMSClerin izolasyon ve karakterizasyon çalışmaları Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Kök Hücre Laboratuvarı ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir.

AdMSClerin izolasyonunda kullanılan protokol ise şu şekildedir: (99)

- Laparotomi insizyonu ile retroperitoneal bölgede sıçanların perirenal adipose dokusu ortaya konuldu
- Yağ dokusu izole edildikten sonra 1x PBS içerisinde yıkayıp başka bir petri kabında fragmantasyon edildi.
- Yağ dokunun parçalanması amacıyla yaklaşık 25 ml. %0.075 tip 1 kollajenaz (0.01875g. kollajenaz / SigmaC2674 ve 25 ml. Ca⁺² içermeyen Hank's dengeli tuz solüsyonu / Biochrome AG Cat No:L2045) içerisinde 37 °C de belirli aralıklarla çalkalanarak 60 dakika bekletildi. İnkübasyon sonunda tüpler yeniden çalkalandı.

- 60 dakika sonra PBS ile homojenize edilip 1800 rpm.de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası supernatant ortam atılıp üzerine 10 ml. hücre kültürü ortamı eklenerek 1800 rpm.de 10 dakika daha santrifüj edildi. Bu işlem 2 defa tekrar edildi.
- Santrifüj sonrası supernatant atılıp elde edilen SVF (stromal vasküler fraksiyon) 70 µm.lik süzgeçten geçirildi.
- Süzgeçle elde edilen hücreler ve doku parçaları: α-MEM, %15 FBS, gentamisin, %0.1 P/S ve %0.1 amfoterisin B içeren kültür ortamına alındı.
- 72 saat sonra kültür kabı değiştirilip üreme sonucunda kültür kabının %75i kaplanınca pasajlama gerçekleştirildi.
- Tüm hücrelerin yüzeyden kalkıkları gözlemlendikten sonra 600 µl. Tripsin-EDTA 5 ml. ortam ile seyreltilerek santrifüj tüplerine toplandı ve 800 rpm.de 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler 1 e 4 oranında yeni doku kültürü ortamına aktarıldı.
- Dondurulacak olan hücreler santrifügasyon sonrası hücre kültür ortamında homojenize edilip sayıldıktan sonra 300.000-600.000 hücre / ml. dondurma ortamı olacak şekilde dondurma tüplerine aktarılıp donduruldu.

3.4.2. AdMSClerin karakterizasyonu

Sıçan kökenli AdMSC'lerin kültürde ürerken fenotipik karakterlerini koruduğunu doğrulamak amacıyla farklılaştırılmamış mezenkimal hücrelere akış sitometri analizi yapılmıştır. Analizler Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği ve Biyomühendislik Bölümü Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Laboratuvarı tarafından gerçekleştirilmiştir.

Uygulanan protokolle AdMSC'ler yüzeyden kaldırılarak hücre derişimi 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde süspanse edilmiştir. Santrifüjden sonra yıkama tamponunda süspanse edilen hücrelere 300 µL floresan izotiyosiyanat (FITC)-konjuge antikolar eklenerek oda sıcaklığında 45 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Akış sitometri analizi için FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, USA) cihazı

kullanılmıştır. Hücrelerin immüno-fenotiplemesinde CD29, CD90, CD54, CD45, CD106, MHC sınıf 1 ve MHC sınıf 2 antijenlerine uygun sıçan antikorları ve antikorlar için önerilen izotip kontrolleri kullanılmıştır.

Karakterizasyon işlemleriyle AdMSClerin uygunluğu doğrulandıktan sonra 1×10^6 hücre/doku iskelesi olacak şekilde ilgili deney gruplarına uygulandı.

3.5. DENEY GRUPLARI

Çalışmada kullanılan sıçanlar, her bir grupta 6 sıçan olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. Grup farketmeksizin hayvanların kalvariyyumunda her iki parietal kemik de kullanılacak şekilde birbirinden bağımsız 7mm. çapında yuvarlak şekilli tam kalınlıkta kemik defektleri oluşturuldu. Sıçanlarda biparietal defekt oluşturuldu. Oluşturulan defektlerin birbirinden bağımsız iyileştikleri ve tedavi yöntemlerine birbirinden bağımsız yanıt verdikleri için her bir sıçandan 2 bağımsız örnek elde edildi. Erken ve geç dönem kemikleşme karşılaştırılması amacıyla 4. ve 12. haftanın sonunda örnekler alındı. Böylece her bir gruptan 6 tanesi 4. hafta diğer 6 tanesi de 12. hafta kemikleşmeyle ilişkili toplam 12 bağımsız örnek elde edilmiş oldu.

Birinci grup, kontrol grubu (DEFEKT) olarak belirlendi. Bu grupta standart 7mm. kritik boyutlu kemik defekti oluşturuldu ve herhangi bir tedavi edici uygulama gerçekleştirilmeksizin işleme son verildi. Erken ve geç kemikleşmenin ayrı ayrı değerlendirilebilmesi amacıyla sırasıyla 4. ve 12. haftada hayvanlar sakrifiye edilerek örnekler elde edildi.

İkinci grup, boş doku iskelesi grubu (Dİ) olarak belirlendi. Bu grupta standart 7mm. kritik boyutlu kemik defekti oluşturuldu ve oluşturulan defekte herhangi bir kimyasal veya biyolojik materyal yüklü olmayan 7mm. çapında 3mm. kalınlığındaki boş kitosan/HA yapıda doku iskelesi yerleştirilip işleme son verildi. Erken ve geç kemikleşmenin ayrı ayrı değerlendirilebilmesi amacıyla sırasıyla 4. ve 12. haftada hayvanlar sakrifiye edilerek örnekler elde edildi.

Üçüncü grup, suda çözünen 17 β -östradiol yüklü doku iskelesi grubu (WE-Dİ) olarak belirlendi. Bu grupta standart 7mm. kritik boyutlu kemik defekti oluşturuldu ve oluşturulan defekte 7mm. çapında 3mm. kalınlığındaki suda çözünen 17 β -östradiol yüklü doku iskelesi yerleştirilip işleme son verildi. Erken ve geç kemikleşmenin ayrı ayrı değerlendirilebilmesi amacıyla sırasıyla 4. ve 12. haftada hayvanlar sakrifiye edilerek örnekler elde edildi.

Dördüncü grup, 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller yüklenmiş doku iskelesi (PE-Dİ) olarak belirlendi. Bu grupta standart 7mm. kritik boyutlu kemik defekti oluşturuldu ve oluşturulan defekte 7mm. çapında 3mm. kalınlığındaki 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller yüklenmiş doku iskelesi yerleştirilip işleme son verildi. Erken ve geç kemikleşmenin ayrı ayrı değerlendirilebilmesi amacıyla sırasıyla 4. ve 12. haftada hayvanlar sakrifiye edilerek örnekler elde edildi.

Beşinci grup, suda çözünen 17 β -östradiol ve AdMSC yüklü doku iskelesi grubu (WE-Dİ-H) olarak belirlendi. Bu grupta standart 7mm. kritik boyutlu kemik defekti oluşturuldu ve oluşturulan defekte 7mm. çapında 3mm. kalınlığındaki suda çözünen 17 β -östradiol ve AdMCS yüklü doku iskelesi yerleştirilip işleme son verildi. Erken ve geç kemikleşmenin ayrı ayrı değerlendirilebilmesi amacıyla sırasıyla 4. ve 12. haftada hayvanlar sakrifiye edilerek örnekler elde edildi.

Altıncı grup, 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller ve AdMSC yüklenmiş doku iskelesi (PE-Dİ-H) olarak belirlendi. Bu grupta standart 7mm. kritik boyutlu kemik defekti oluşturuldu ve oluşturulan defekte 7mm. çapında 3mm. kalınlığındaki 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller ve AdMSC yüklenmiş doku iskelesi yerleştirilip işleme son verildi. Erken ve geç kemikleşmenin ayrı ayrı değerlendirilebilmesi amacıyla sırasıyla 4. ve 12. haftada hayvanlar sakrifiye edilerek örnekler elde edildi.

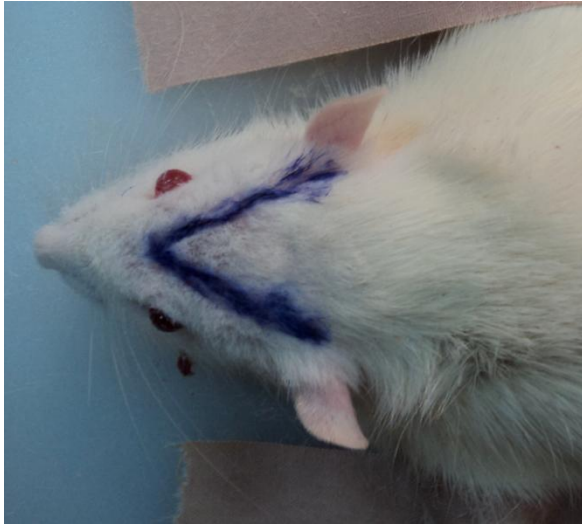
3.6. ANESTEZİ

Tüm hayvanlarda anestezi induksiyonu intraperitoneal ketamin (90 mg/kg - Ketalar®, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve ksilazin (10 mg/kg - Rompun®, Bayer,

Türkiye) karışımı ile sağlandı. Anestezi derinliği, cilt veya parmak kıştırma testine ekstremitelere çekme yanıtı ile değerlendirildi. Deney devam ederken sıçanın idrar ve dışkı çıkarması veya uyanması durumunda ek doz olarak 10 mg/kg ketamin ve 2mg/kg ksilazin verilerek anestezinin devamı sağlandı.

3.7. CERRAHİ İŞLEM

Anestezi indüksiyonunu takiben, grup fark etmeksizin tüm deneklerin skalp bölgesi tıraşlanmasını takiben povidon – iyodin solüsyonu ile temizlenip steril bir şekilde örtüldü. Dorsal V şeklinde bir insizyonla periost da dahil edilecek şekilde skalp flebi kaldırılıp, kemik ortaya konuldu. Sağ ve sol parietal kemikler üzerinde dental burr yardımıyla saggittal sütür hattına göre simetrik olacak şekilde 7 mm. lik yuvarlak şekilli tam kalınlıkta kemik defekti oluşturuldu. Defekt oluşturulurken sürekli %0.9luk serum fizyolojik çözeltisi ile irrigasyon uygulanıp duranın ve orta hatta yer alan venöz sinusün travmatize olmamasına özen gösterildi.



Şekil 3.3. Skalpte yapılan V insizyon



Şekil 3.4. Kalvariyumda oluşturulan 7mm.lik defekt

Defektlerin hazırlanmasını takiben deney grubu dikkate alınarak ilgili deneysel işlem gerçekleştirilip kaldırılan skalp flebi kemik defektlerini örtecek şekilde yerine iade edilerek cilt insizyonu 4-0 ipek suture materyali (Doğsan, Türkiye) ile onararak işleme son verildi.



Şekil 3.5. Oluşturulan biparietal kemik defektleri ve doku iskelesinin defekte yerleştirilmesi

3.8. CERRAHİ SONRASI İZLEM

Hayvanlar işlemi takiben kafeslerine alınarak cerrahi sonrası ağrı tedavisi amacıyla içme sularına 2 mg/ml parasetamol eklendi. Hayvanlar deney süreci boyunca ad libitum olarak standart yem ile beslendi; günlük olarak, genel durum, vücut ağırlığı, malnutrisyon, enfeksiyon bulguları yönünden değerlendirildi.

3.9. ÖTENAİZİ

Gruplarda deney sürecinin tamamlanmasını takiben deneyde kullanılan hayvanlara yüksek doz anestetik verilerek ötenazi uygulandı.

3.10. HİSTOLOJİK ANALİZ

Parietal kemikte defekt yapılmış ve içine doku iskeleleri yerleştirilmiş doku örnekleri %10'luk nötral formalin içinde 72 saat tespit edildikten sonra De Castro solusyonunda dekalsifiye edildiler. Kemik örnekleri dekalsifikasyonu takiben rutin ışık mikroskop doku takip yöntemine (artan derecede alkollerde dehidratasyon, ksilolde şeffaflandırma) göre takip edilerek parafine gömüldü. 5µm kalınlığında alınan seri kesitler Hematoksilen-Eozin ve Masson Trikrom ile boyandıktan sonra Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalında Leica DM-6000B (Germany) ışık mikroskobu ile incelendi ve görüntüler DC500 dijital kamera (Leica, Wetzlar-Germany) ile bilgisayara aktarıldı.

3.11. MİKRO TOMOGRAFİK ANALİZ

Tüm mikro tomografi sistemleri çeşitli yollar boyunca seyahat eden X-ışınları ile objenin aydınlatılması ve bu yollar boyunca ışın yoğunluğundaki azalmayı ölçmek için dizayn edilmişlerdir.

Sıkça kullanılan bir konfigürasyonda, taranacak olan obje eş düzlemlerle X-ışınlarının yelpaze ışın demeti içerisinde yerleştirilmektedir. Örnek içerisinde geçen X-ışınlarının atenuasyonları bir dedektör yayı tarafından ölçülmektedir. Atenuasyon ölçümleri objenin farklı açılardan görüntüsünü elde edecek biçimde numunenin bir ekseninde döndürülmesi esnasında yapılır. Bu veriden, X-ışını düzleminde, objenin içerisindeki çizgisel X-ışını atenuasyon katsayısını haritalayan iki boyutlu bir görüntü oluşturulur.

Komşu kesitlerin üst üste kümelenmesi ile 3D (üç boyutlu) görüntü elde edilir. Bu 3D görüntü izo yüzeyleme, hacim oluşturma veya animasyonlarla en iyi şekilde gösterilebilir.

Tez çalışmasında parietal kemiklerden elde edilen örnekler mikro tomografi yöntemiyle taranmak üzere Hacettepe Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı'na teslim edildi. Doku örnekleri burada nondestrüktif olarak Skyscan (Bruker) marka 1174

model x-ışınları tomografisi ile görüntülenmiştir. X-ışını kaynağı 50 kV gerilim ve 625 μ A akım altında çalıştırılmıştır. 12 μ m lik piksel boyutu çözünürlüğünde görüntüler elde edilmiştir. Tarama süresince hareket etmemeleri için numuneler hızlı sertleşen bir macun yardımı ile sabitlenmişlerdir. Örnekler dik ekseninde 360 derece döndürülmüş, her 2 derecede bir görüntü alınmıştır. Her bir örneğin taranması yaklaşık 1 saat 7 dakika sürmüştür.

Ham x-ışınları tomografisi verileri NRecon (Skyscan) yazılımı ile yeniden oluşturulmuş, numunelerin yatay tomografi kesitleri elde edilmiştir. Tarama sırasında polikromatik bir sistemde taranmadan dolayı istenmeyen etkiler meydana gelebilmektedir. Uygun tarama protokolleri ile minimize veya yok edilse de, birçok tarama yapay olgusu (artifact) mikro tomografi görüntülemesini etkileyebilir.

Mevcut artefaktlar NRecon (Skyscan) yazılımı ile minimize edilmeye çalışılmıştır.

Yeniden oluşturulan kesitler CTAn (Skyscan) yazılımı ile analiz edilmişlerdir. Her bir kesitte kemikte açılmış olan defect kadar bir ilgi alanı (region of interest-ROI) oluşturulmuş ve bu alanda kemikleşme hesaplanmıştır. Kemikleşme oranı tüm defekte hesaplanarak hacimsel olarak defekteki kemik yüzdesi verilmiştir.

3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Her bir gruptan elde edilen oluşturulan kemik defektinde kemikleşme yüzdesinin istatistiksel analizi, SPSS (Statistical Package for SociSciences) 17.0 programı kullanılarak yapıldı. Birbirinden bağımsız altı grubun karşılaştırılması için, grup verilerinin parametrik olmayan şekilde dağılım göstermesi nedeniyle, parametrik olmayan testlerden Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırma testi olarak Conover'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. $P < 0,005$ olduğunda elde edilen sonuçlar istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. DOKU İSKELESİNİN KARAKTERİZASYON SONUÇLARI

Tez çalışmasında kullanılan kitosan/HA yapıdaki doku iskelesinin fiziksel özelliklerini ortaya koyan karakterizasyon analizi sonuçları Tablo 4.1.de verilmiştir.

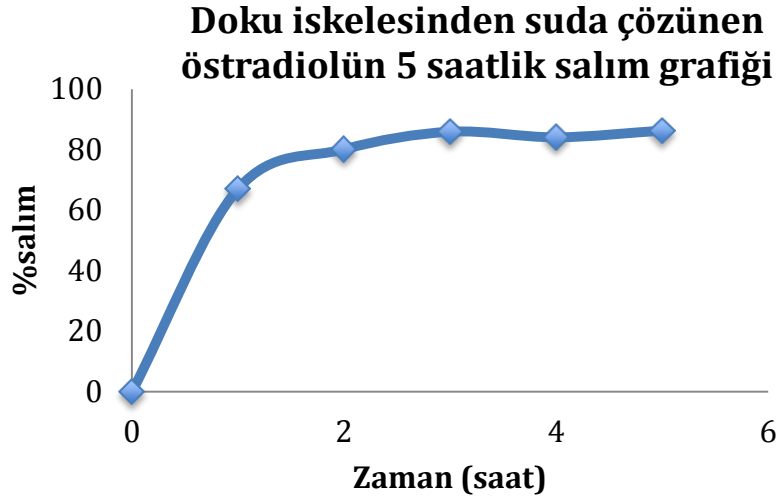
Tablo 4.1. Doku iskelesinin fiziksel özellikleri

Karakterizasyon Analizi	Elde edilen değer
Denge şişme oranı	41.94 ± 0.24
Dengeye ulaşma süresi	60
Elastik Modül değeri (N/mm ²)	0.93 ± 0.74
Termal bozunmanın başlangıcı (°C)	250
Yoğunluk (g/mL)	0.08 ± 0.0042
Boşluk Kesri (mL/g)	1.28 ± 0.02
Gözenek boyutu (µm.)	100-300

4.2. KULLANILAN 17B-ÖSTRADIOL FORMLARININ SALIM KİNETİKLERİ

4.2.1. Suda çözünen 17β-östradiolün salım kinetiği

Kitosan/HA doku iskelelerine 0,2mg 17β-östradiol içeren siklodekstrin+17β-östradiol kompleksi PBS içinde çözülerek doku iskelelerine emdirme yöntemi ile yüklenmişlerdir. Daha sonra freeze-drier da kurutulmuşlardır. Yüklenen hidrojellere ait salım grafikleri Şekil 4.1deki gibidir.

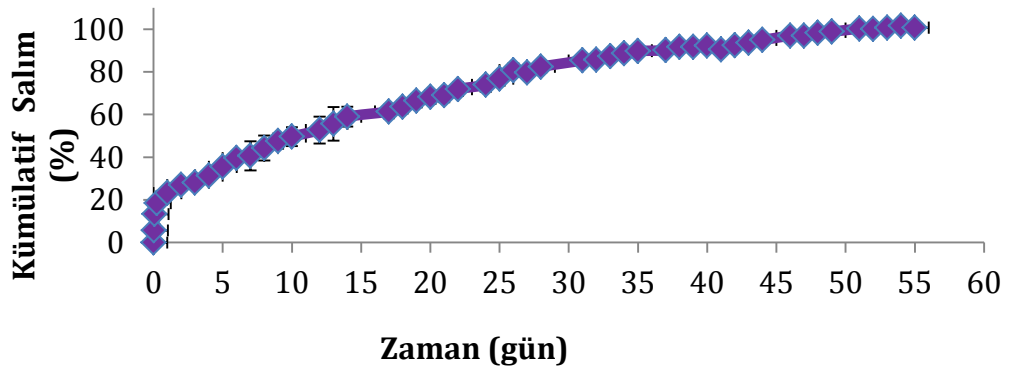


Şekil 4.1. Siklodekstrin kaplı suda çözünen 17β-östradiolün salım kinetiğine ait grafik

4.2.2. 17β-östradiol yüklü PLGA nanopartiküllerin salım kinetiği

7 mm. x 3 mm. boyutlarındaki Kitosan/HA doku iskelelerine süspansiyon halinde bulunan partikülden 100 µL (0.7 mg partikül) emdirilerek yüklenmiştir. 0.7 mg partikül içinde 0.0175 mg 17β-östradiol bulunmaktadır.

Sentezlenen nanopartiküllerde 17-β östradiol/partikül oranı %5 dir. Enkapsülasyon verimi=%50 dir. Yüklenen nanopartiküllere ait salım grafikleri Şekil 4.2.deki gibidir.



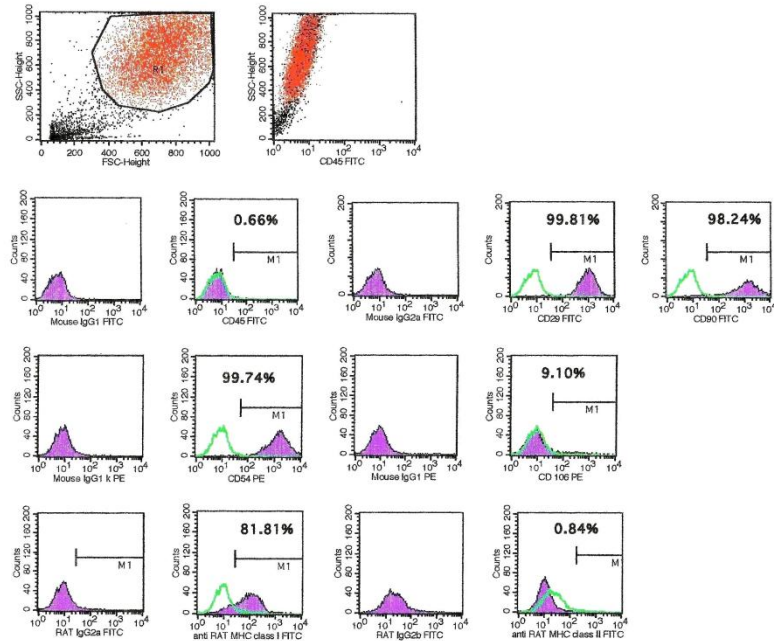
Şekil 4.2. 17β-östradiol yüklü PLGA nanopartiküllerin salım kinetiğine ait grafik

4.3. AdMSC'lerin KARAKTERİZASYON SONUÇLARI

Tez çalışmasında kullanılan AdMSClerin karakterizasyon analizi için akış sitometri analizi gerçekleştirilmiştir. Akış sitometri analizi, hücrelerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesidir. Bu analiz ile bir süspansiyon halindeki hücreler lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi, hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece hücrenin yüzey antijenleri, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir (100).

Mezenkimal kök hücrelerde bulunması ve bulunmaması gereken yüzey antijenlerinden bazıları şu şekilde belirlenmiştir: fenotip pozitif antijenler ($\geq 95\%$): CD105, CD73, CD90, CD29 ve fenotip negatif antijenler ($\leq 2\%$): CD45, CD34, CD14, CD79 (101).

Tez kapsamında kullanılan sıçan kökenli AdMSC'lere ait akış sitometri analiz sonuçları Şekil 4.3'de verilmiştir.



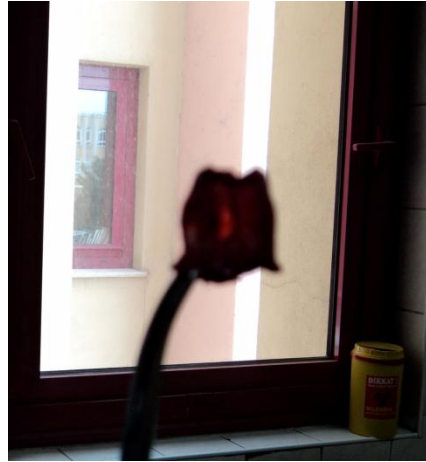
Şekil 4.3. Sıçan kökenli AdMSC'lere ait akış sitometri analiz sonuçları.

4.4. KLİNİK BULGULAR

Klinik olarak kontrol grubunda 4. ve 12. haftalık grupların her ikisinde de oluşturulan kritik boyutlu kemik defektinin kemikleşmediği sadece ince bir membran yapısının oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4.5). Gün ışığı yardımıyla defektin transillüminasyon verdiği görüldü (Şekil 4.5).



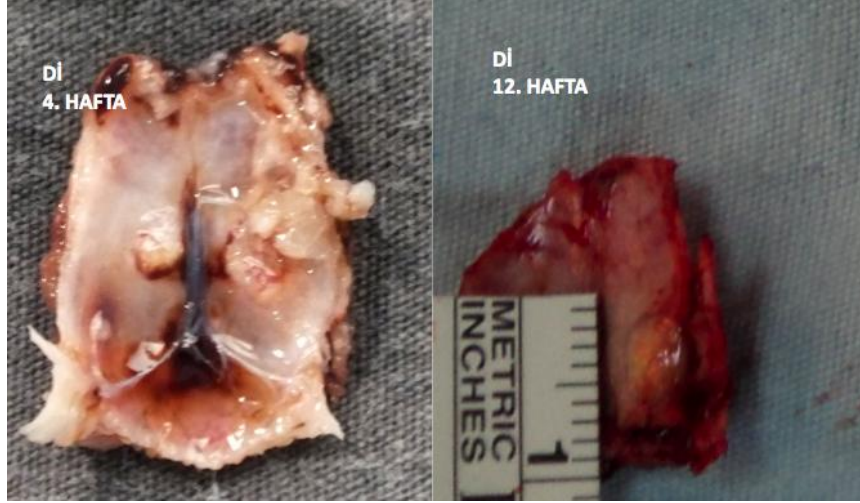
Şekil 4.4. Kontrol grubunda 3 ay sonunda kemikleşme



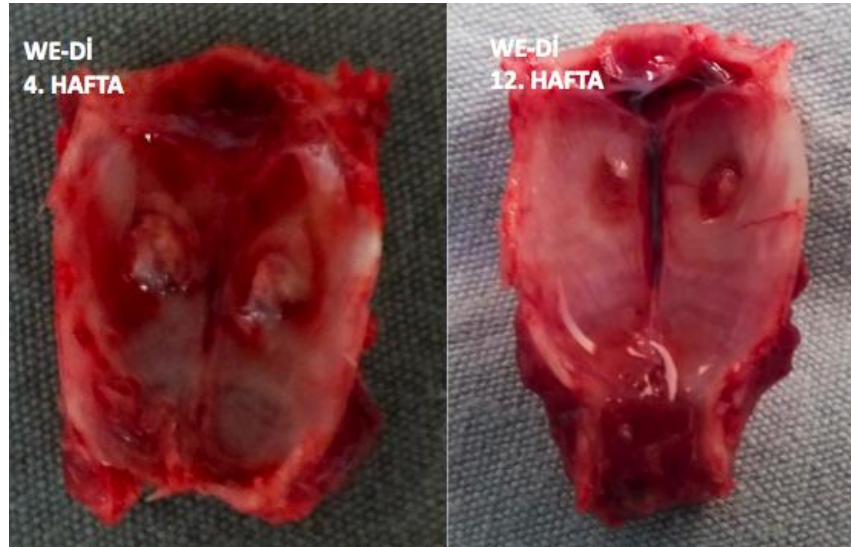
Şekil 4.5. Kontrol grubu gün ışığında olmadığı görülmektedir transillüminasyon göstermektedir

Klinik olarak boş doku iskelesi (Dİ), suda çözünen 17 β -östradiol yüklü doku iskelesi grubu (WE-Dİ) 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller yüklenmiş doku iskelesi (PE-Dİ) yerleştirilen grupta 4. ve 12. haftada herhangi bir enfeksiyon bulgusunda rastlanmadı. 4. haftada elde edilen örneklerde doku iskelesinin sebat

ettiği, 12. haftada elde edilen örneklerde ise doku iskelesinin büyük çoğunluğunun degrade olduğu sadece kalıntılarının kaldığı çevresinde de fibrosis ve fibroz bağ dokusu benzeri görünüm gözlemlendi. Gruplar arası klinik olarak belirgin fark gözlemlenmedi (Şekil 4.6, 4.7, 4.8).



Şekil 4.6. Boş doku iskelesi yerleştirilen grupta 4. ve 12. hafta sonunda kemikleşme

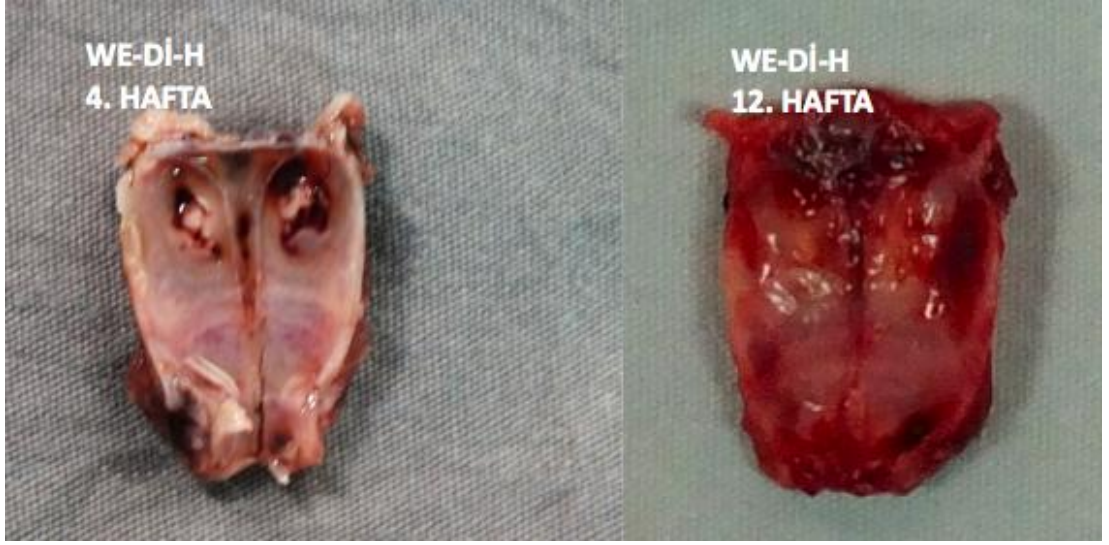


Şekil 4.7. Suda çözünen 17β-östradiol yüklenmiş doku iskelesi yerleştirilen grupta 4. ve 12. hafta sonunda kemikleşme



Şekil 4.8. 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller yüklenmiş doku iskelesi yerleştirilen grupta 4. ve 12. hafta sonunda kemikleşme

Klinik olarak suda çözünen 17 β -östradiol ve AdMSC yüklü doku iskelesi (WE-Dİ-H) ve 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller ve AdMSC yüklenmiş doku iskelesi grupları (PE-Dİ-H) incelendiğinde 4. ve 12. hafta örneklerinde herhangi bir enfeksiyon ya da yabancı cisim reaksiyonu gözlenmedi. 4. hafta sonunda elde edilen örneklerde doku iskelesinin sebat ettiği ve üzerinde fibröz bir membran oluştuğu görüldü. 12. hafta sonunda elde edilen örneklerde ise doku iskelesinin büyük bir çoğunluğunun yıkıldığı ve çevresinde kök hücre olmayan grupların aksine fibröz bağ dokusundan çok kemikleşme izlenimi uyandıran doku geliştiği görüldü. Defekt çevresi fibrozis kök hücre olmayan gruplara göre daha sınırlı olarak gözlemlendi (Şekil 4.9, 4.10).



Şekil 4.9. Suda çözünen 17β -östradiol ve AdMSC yüklü doku iskelesi yerleştirilen grupta 4. ve 12. hafta sonunda kemikleşme

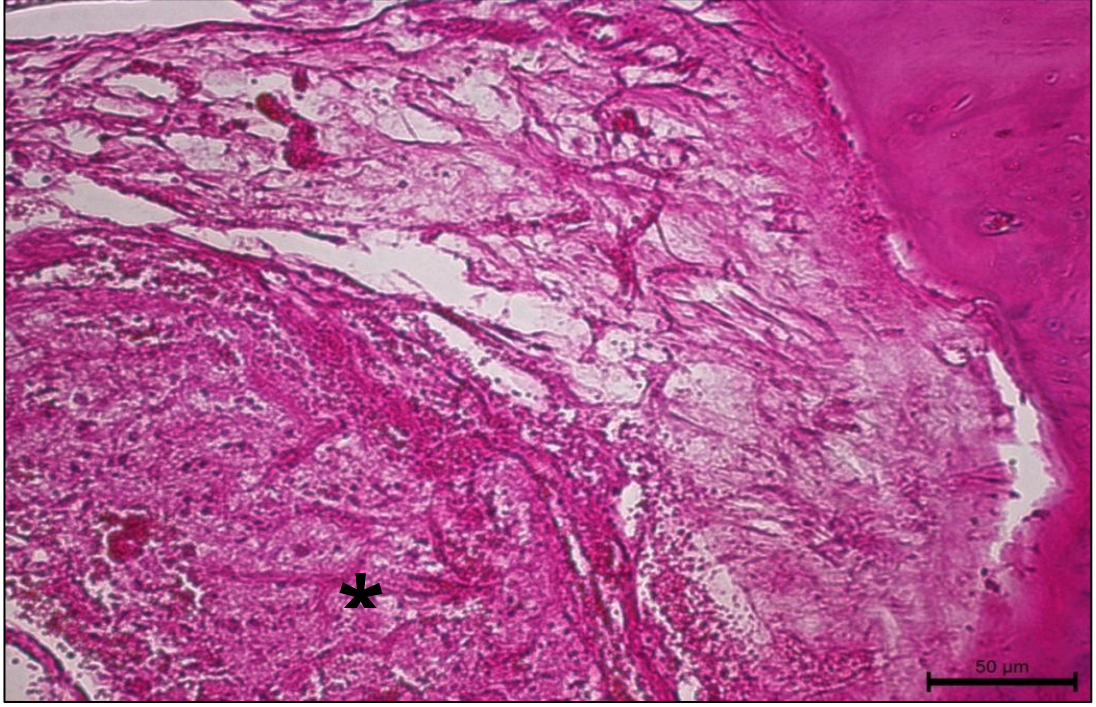


Şekil 4.10. 17β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller ve AdMSC yüklenmiş doku iskelesi yerleştirilmiş grupta 4. ve 12. hafta sonunda kemikleşme

4.5. HİSTOLOJİK BULGULAR

4.5.1. Birinci grup – Kontrol / Kritik boyutlu kemik defekti grubu

Parietal kemikler içinde oluşturulmuş defekt alanlarının 3 ay sonunda kalın düzensiz sıkı bağ dokusu yapısında bir bağ dokusu tabakasıyla çevrelediği ve defekt alanının granülasyon dokusu ile dolduğu gözlemlendi (Şekil 4.11). Granülasyon dokusunun içinde çok sayıda mononükleer hücre infiltrasyonu vardı.



Şekil 4.11. Kontrol / Kritik boyutlu kemik defekti grubu; 12. haftada elde edilen örnekte defekt alanını dolduran granülasyon dokusu (*) ve çevresinde kemik komşuluğunda düzensiz sıkı bağ dokusu tabakası izleniyor. (Hematoksilen-Eozin X200).

4.5.2. İkinci grup – Boş doku iskelesi grubu

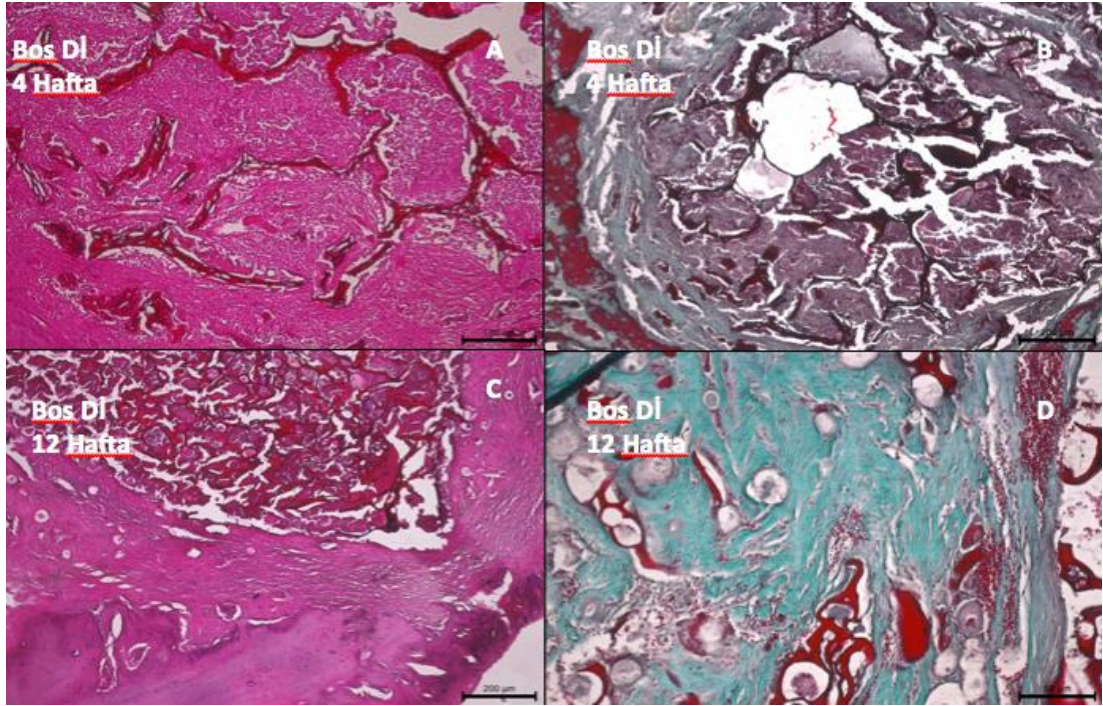
4. hafta sonuçları

Defekt bölgesine doku iskelesi yerleştirilip bir ay beklenen grupta, çevre kemik dokusu ile çevrelenmiş defekt bölgesinde doku iskelesi erimeden durmaktaydı. İskele parçalarının araları granülasyon dokusu ile dolmaya başlamıştı

(Şekil 4.12-A). Bazı alanlarda granülasyon dokusunun içinde ufak demetler halinde kollagen fibrillerin varlığı gözlemlendi (Şekil 4.12-B). Ancak yer yer henüz granülasyon dokusunun tam olarak oluşmadığı alanlar da vardı (Şekil 4.12).

12. hafta sonuçları

Kemik altında defekt bölgesinin dış kısımlarında oluşmuş olan düzensiz sıkı bağ dokusu tabakasının doku iskelesi konmamış defekt grubuna göre daha organize olduğu, kollagen fibrillerin belli yönlerde demetler halinde düzenlendiği gözlemlendi. Defekt alanında doku iskelesi parçaları arasında yer yer granülasyon dokusunun organize olduğu, kollagen fibrillerin ve yeni oluşan damarların varlığı gözlemlendi. Ancak bazı bölgelerde kollagen fibriller henüz yoktu. Bu grupta defekt bölgesinde kemik oluşumu izlendi. Mononükleer hücre infiltrasyonu çok yaygın olmamakla birlikte bu grupta da vardı (Şekil 4.12-C,D).



Şekil 4.12. Boş doku iskelesi grubu (Boş Dİ)

A. 4. Haftada elde edilen bu örnekte doku iskelesi parçaları ve aralarını dolduran granülasyon dokusu ileri mikroskop büyütmesinde ayrıntılı olarak gözlenmekte. Hematoksilen-Eozin X100 **B.** 4. Haftada elde edilen bu örnekte defekt bölgesini dolduran iskele parçalarının arasında granülasyon dokusu içinde yer yer kollagen fibriller (ok) görülmekte. Masson Trikrom X50 **C.** 12. Haftada elde edilen bu örnekte defekt bölgesi içinde doku iskelesi parçaları (parlak kırmızı) ve aralarını dolduran granülasyon dokusu gözlenmekte. Defekt çevresinde belli yönde düzenlenmiş kollagen fibriller izlenmekte. Hematoksilen-Eozin X50 **D.** 12. Haftada elde edilen bu örnekte defekt bölgesinin çevresini saran ve yer yer erimiş doku iskelesi parçaları çevresinde organize olmuş kollagen fibriller bu boya ile yeşil renkte gözlenmekte. Bu bölgede yeni damarlar oluşmuştur. (Masson Trikrom X200)

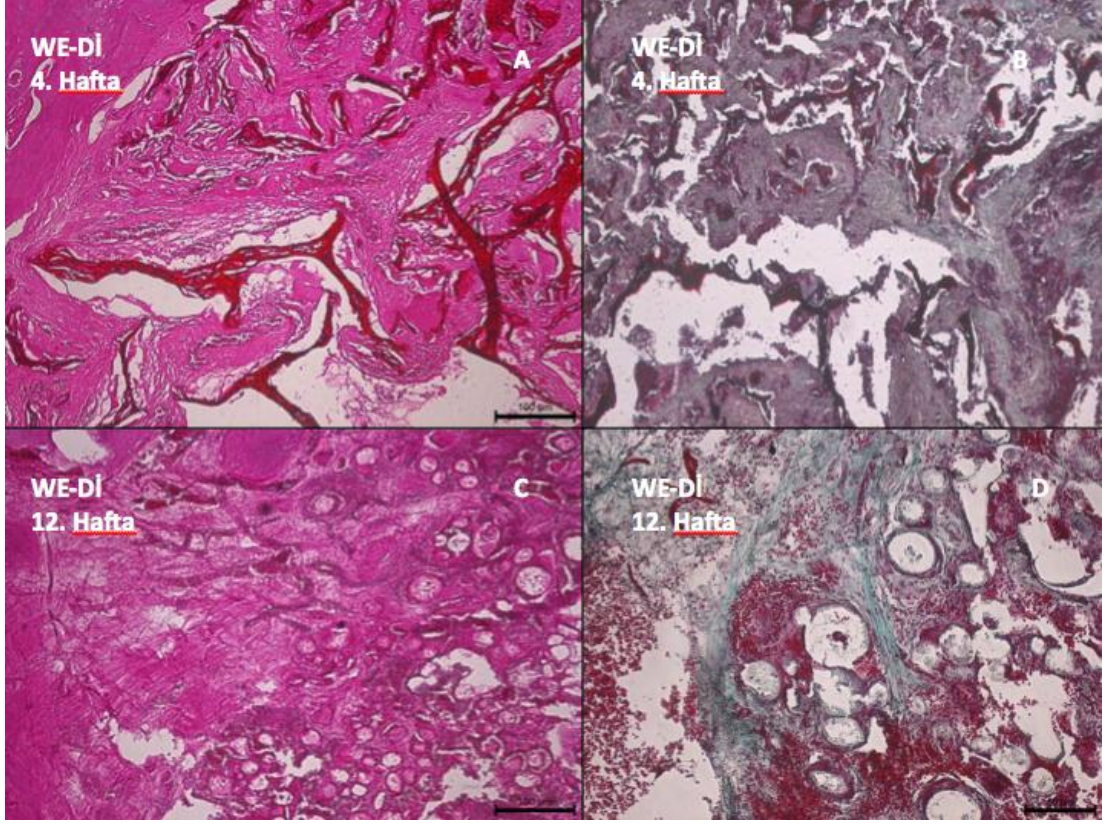
4.5.3. Üçüncü grup –Suda çözünen 17 β - östradiol grubu (WE-Dİ)

4. hafta sonuçları

Defekt bölgesine water soluble östrojen kaplanmış doku iskelesi yerleştirilip 1 ay beklenen grupta, PLGA östrojen kaplanmış 1 ay doku iskelesi yerleştirilmiş gruba benzer biçimde, defekt bölgesinde erimemiş doku iskelesi parçaları bulunmaktaydı. Doku iskelesinin aralarındaki bölgeler granülasyon dokusu ile dolmuştu ancak bazı bölgelerde, iskele parçalarının aralarında henüz granülasyon dokusunun tam olarak oluşmadığı alanlar da bulunmaktaydı (Şekil 4.13-A). Yer yer çevre kemik dokusu altından damarları taşıyan, düzensiz kollagen fibrillerin bulunduğu bağ dokusu bölmelerin granülasyon dokusunun içine doğru uzandığı gözlemlendi (Şekil 4.13-B).

12. hafta sonuçları

Defekt bölgesinin water soluble östrojenle kaplanmış doku iskelesi ile doldurulduğu grupta, iyileşme iskele ve PLGA'lı iskele grubuna benzer biçimdeydi. İskele parçalarının henüz tamamen erimediği ancak bazı alanlarda yer yer erimeye başlamış olduğu gözlemlendi. İskele parçaları çevresinde granülasyon dokusu ve aralarda mononükleer hücre infiltrasyonu dikkati çekti (Şekil 4.13-C,D). Defekli saran kemik altındaki bölgede ise PLGA kaplı iskele uygulanmış grupta olduğu gibi oldukça sıkı ve düzenli bir bağ dokusu tabakası bulunmaktaydı (Şekil 4.13-C,D).



Şekil 4.13. Suda çözünen 17 β - östradiol grubu (WE-Dİ)

A. 4. Haftada elde edilen örnekte defekt bölgesininin periferinde, defekti çevreleyen kemik dokusu ve doku iskelesi ilişkisi görülmektedir. Bazı bölgelerde kemik çevresinden bağ dokusu demetleri iskelenin aralıklarını dolduran granülasyon dokusu içine doğru uzanmaya başlamıştır. Hematoksilen-Eozin X100 **B.** 4. Haftada elde edilen örnekte granülasyon dokusu içine doğru uzayan kollagen demetler ve aralarında doku iskelesi parçaları görülmektedir. Masson Trikrom X100 **C.** 12. Haftada elde edilen örnekte defekt bölgesini dolduran iskele parçaları ve aralarında granülasyon dokusu gözlenmekte. Çevrede düzensiz sıkı bağ dokusu dikkati çekmektedir. Hematoksilen-Eozin X100 **D.** 4. haftada elde edilen örnekte defekt bölgesinde erimeye başlamış iskele parçaları, aralarında kollagen fibriller ve mononükleer hücre infiltrasyonu görülmektedir. (Masson Trikrom X200)

4.5.4. Dördüncü grup – 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller yüklenmiş doku iskelesi grubu (PE-Dİ):

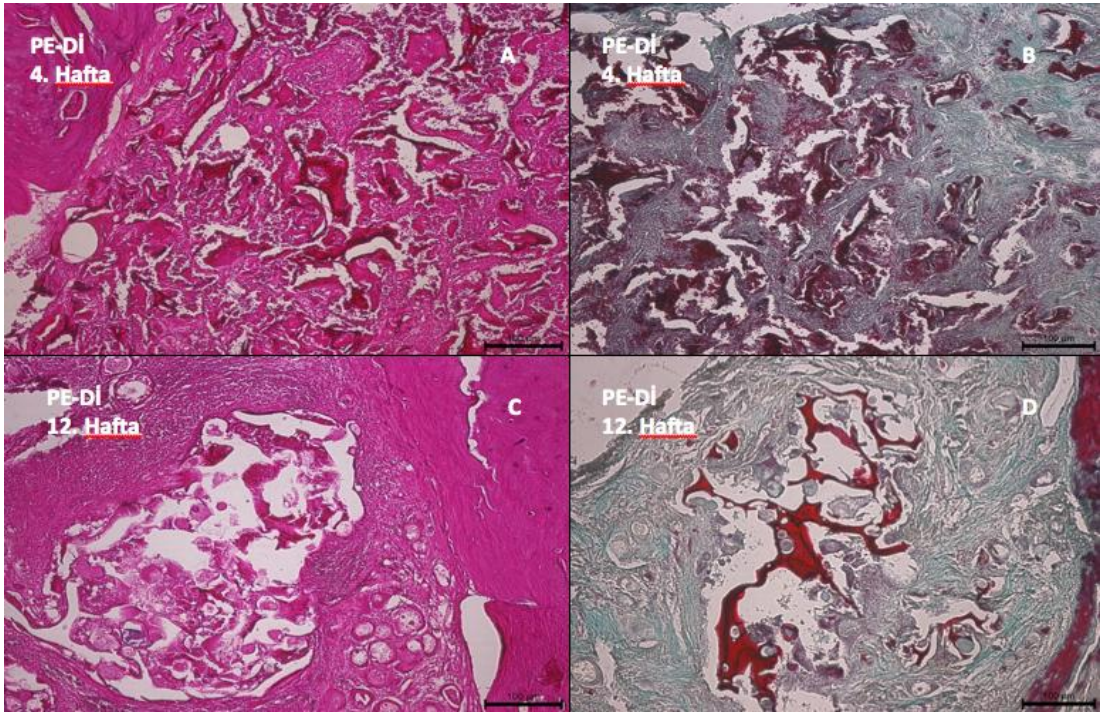
4. hafta sonuçları

Doku iskelesinin PLGA östrojen kaplanarak defekt bölgesine yerleştirildiği grupta 1 ay sonra erimemiş iskele parçaları çevre kemik dokusu altında, defekt bölgesinde gözlenmekteydiler. Bu grupta da yalnızca doku iskelesi yerleştirilip 1 ay beklenen grupta gözlendiği gibi granülasyon dokusunun tam olarak oluşmadığı bölgeler vardı (Şekil 4.14-A). Ancak iskele parçalarının aralarını dolduran granülasyon dokusu daha sıkı düzenlenmişti ve kollagen fibrillerin arasında damarlar

bulunmaktaydı. Çevre kemik dokusunun altındaki yoğun kollagen fibriller içeren oldukça sıkı bağ dokusu bölmelerinin ve damarların defekt bölgesine doğru uzamaya başladıkları dikkati çekti (Şekil 4.14-B).

12. hafta sonuçları

Defekt bölgesine PLGA östrojen kaplanmış doku iskelesi yerleştirilmiş grupta, yalnızca doku iskelesi konmuş gruba göre belirgin bir fark gözlenmedi. Doku iskelesi benzer biçimde yer yer erimişti. Defekt bölgesinin çevresinde kemik dokusu altında erimekte olan iskele parçaları arasında kollagen fibrillerin belli yönde düzenlenmeye başladıkları gözlemlendi. Defekt bölgesinde ise iskele parçaları arasında granülasyon dokusu bulunmaktaydı. Mononükleer hücre infiltrasyonu bu grupta da vardı (Şekil 4.14-C,D).



Şekil 4.14. 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller yüklenmiş doku iskelesi grubu (PE-Dİ)

A. 4. Haftada elde edilen örnekte çevre kemik dokusu altında gözlenen defekt bölgesinde iskele parçaları ve aralarını dolduran içinde damarların bulunduğu organize olmaya başlamış granülasyon dokusu. Hematoxilen-Eozin X100 **B.** 4. Haftada elde edilen örnekte defekt bölgesi etrafındaki kemik dokusunun altındaki bağ dokusundan granülasyon dokusunun içine doğru uzanana kollagen fibriller (yeşil) gözlenmekte. Masson Trikrom X100 **C.** 12. Haftada elde edilen örnekte defekt bölgesi içinde iskele parçaları, aralarında granülasyon dokusu ve defekti çevreleyen, kemik altındaki bölgede erimekte olan iskele parçaları arasında organize olmaya başlamış kollagen fibriller gözlenmekte. Hematoxilen-Eozin X100 **D.** 12. Haftada elde edilen örnekte erimekte olan doku iskele parçaları arasında ve defekt çevresinde kollagen fibriller. (Masson Trikrom X100)

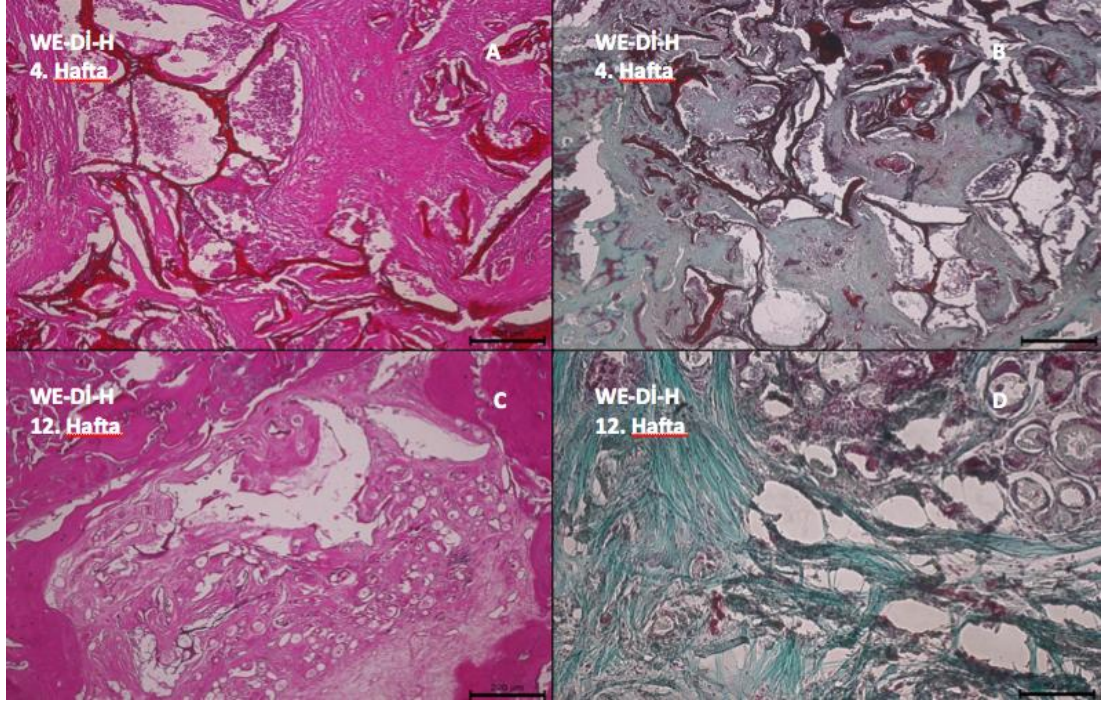
4.5.5. Beşinci - Suda çözünen 17 β -östradiol ve AdMSC yüklü doku iskelesi grubu (WE-Dİ-H)

4. hafta sonuçları

Suda çözünen östrojen kaplanan ve kök hücre eklenerek defekt bölgesine yerleştirilip 1 ay beklenen grupta, çevre kemik dokusundan defekt bölgesine doğru, bol damarlı, kök hücre eklenmemiş gruba göre kollagen fibrillerin daha birbirlerine paralel düzenli demetler oluşturduğu bağ dokusu bölmelerin uzandıkları gözlemlendi (Şekil 4.15-A). İskele parçaları, 1 ay beklenen tüm gruplarda olduğu gibi bu grupta da defekt bölgesinde henüz erimemiş durumdaydılar ve araları granülasyon dokusu ile dolmuştu. Kök hücre eklenmemiş gruptakine benzer biçimde bu grupta da granülasyon dokusunun tam organize olmadığı alanlar vardı ancak organizasyonun tam olduğu alanlarda, oldukça sıkı, bol damarlı, iskele parçaları çevresinde paralel dizilimli kollagen fibril demetlerinin bulunduğu bir bağ dokusu oluşmuştu (Şekil 4.15-B).

12. hafta sonuçları

Defekt alanına suda çözünen östrojenle kaplanmış ve kök hücre eklenmiş doku iskelesi yerleştirilip 3 ay beklenen grupta, yalnızca doku iskelesi veya Suda çözünen östrojen kaplı doku iskelesi yerleştirilmiş gruplara oranla granülasyon dokusunun daha iyi organize olduğu gözlemlendi. Defekti dolduran iskele büyük ölçüde erimiş, defekt alanının çoğu iyi organize olmuş, oldukça sıkı bir bağ dokusu ile dolmuştu (Şekil 4.15-C,D) Erimiş iskele parçalarının çevresinde bol damarlı sıkı düzenli bağ dokusu oluşmuştu (Şekil 4.15-C,D)



Şekil 4.15. Suda çözünen 17β -östradiol ve AdMSC yüklü doku iskelesi grubu (WE-Dİ-H)

A. 4. Haftada elde edilen örnekte iskele parçalarının çevresinde yer yer birbirlerine paralel düzenlenmiş kollagen fibrillerin gözleendiği, damarlı ve oldukça sıkı bağ dokusu gözlenmekte. Hematoksilen-Eozin X100 **B.** 4. Haftada elde edilen örnekte iskele parçalarının arasını dolduran düzenli demetler oluşturmuş kollagen fibriller gözlenmekte. Masson Trikrom X50 **C.** 12. Haftada elde edilen örnekte erimiş iskele parçalarının arasını dolduran sıkı bağ dokusu gözlenmekte. Hematoksilen-Eozin X50 **D.** 12. Haftada elde edilen örnekte erimiş iskele parçaları ve kollagen fibriller gözlenmekte. (Masson Trikrom X200)

4.5.6. Altıncı grup - 17β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller ve AdMSC yüklenmiş doku iskelesi (PE-Dİ-H)

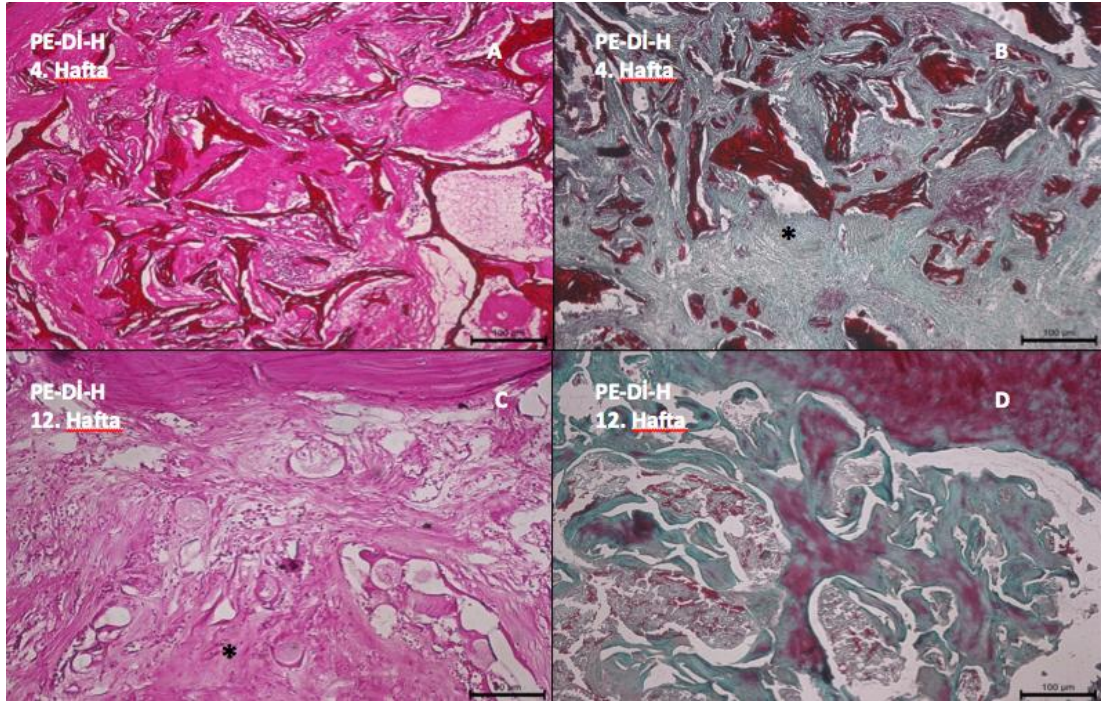
4. hafta sonuçları

PLGA östrojen kaplanıp kök hücre eklenen doku iskelesi defekt bölgesine yerleştirilip 1 ay beklenen grupta, kemik dokusunun çevresinden uzanan bol damarlı sıkı bağ dokusunun iskele parçalarının aralarını doldurduğu gözleendi (Şekil 4.16-A) İskele parçalarının erimeye başladıkları dikkati çekti. Kök hücre eklenmemiş PLGA doku iskelesi grubu ile karşılaştırıldığında iskele parçalarının aralarını dolduran granülasyon dokusunun yerini yoğun kollagen fibrillerden oluşan bol damarlı düzensiz sıkı bağ dokusunun aldığı dikkati çekti (Şekil 4.16-A,B) Bağ dokusunun içinde yer yer kalsifikasyon odakları vardı (Şekil 4.16-A)

12. hafta sonuçları

Defekt alanına PLGA östrojen kaplı doku iskelesi ve kök hücre yerleştirilmiş olan grupta, yalnızca doku iskelesi veya PLGA kaplı doku iskelesi yerleştirilmiş gruplara oranla granülasyon dokusunun yeni kemik dokusu oluşturmak üzere farklılaşmaya başladığı gözlemlendi.

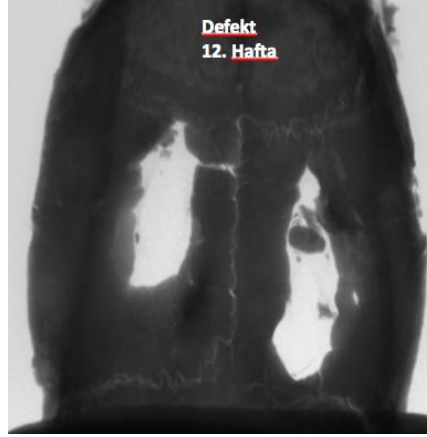
Defekti dolduran iskele büyük ölçüde erimiş, defekt alanının tamamına yakını iyi organize olmuş oldukça sıkı bir bağ dokusu ile dolmuştu. Bu dokuda yer yer kemik dokusunun oluşmaya başladığı gözlemlendi. Bazı bölgelerde yeni oluşan kemik dokusunda kalsifikasyon da başlamıştı (Şekil 4.16-C,D)



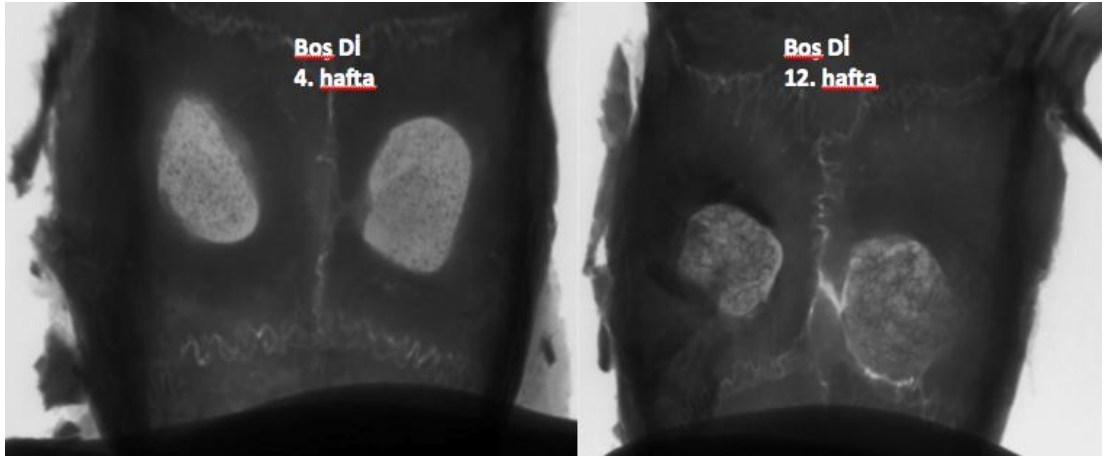
Şekil 4.16. 17 β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller ve AdMSC yüklenmiş doku iskelesi (PE-Dİ-H)

A. 4. Haftada elde edilen örnekte doku iskelesi parçalarının arasını dolduran bol damarlı, düzensiz sıkı bağ dokusu gözlenmektedir. Hematoksilen-Eozin X100 **B.** 4. Haftada elde edilen örnekte doku iskelesi parçaları arasını dolduran düzensiz sıkı bağ dokusundaki yoğun kollajen fibriller ve kalsifikasyon odakları (*) gözlenmektedir. Masson Trikrom X100 **C.** 12. Haftada elde edilen örnekte erimiş iskele parçaları çevresinde organize olan sıkı bağ dokusu içinde yeni oluşan kemik bölgeleri (*) gözlenmektedir. Hematoksilen-Eozin X200 **D.** 12. Haftada elde edilen örnekte erimiş doku iskelesi parçaları arasında yeşil renkte yeni oluşan kemik dokusu ve bu dokuda kalsifikasyonun başladığı kırmızı bölgeler gözlenmektedir. (Masson Trikrom X100)

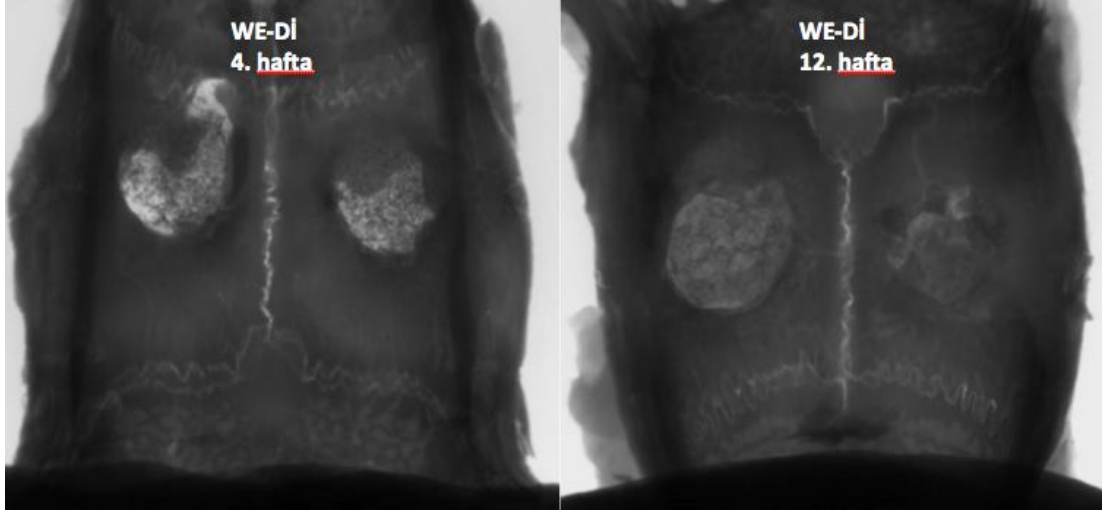
4.6. MİKRO TOMOGRAFİ BULGULARI



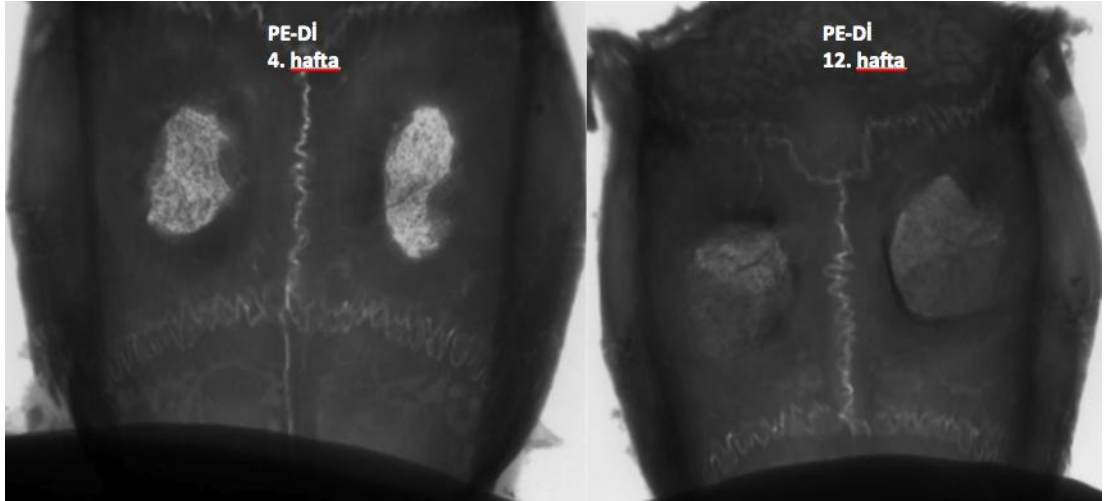
Şekil 4.17. Kontrol / Kritik boyutlu kemik defekti oluşturulan grubun 12. haftada elde edilen mikro-BT görüntüsü



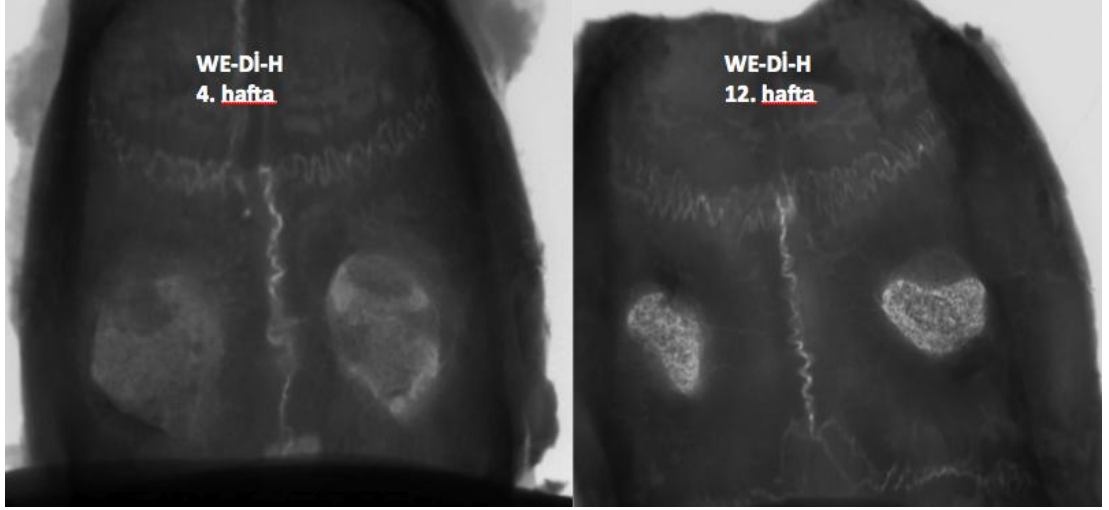
Şekil 4.18. Boş doku iskelesi yerleştirilen grupta elde 4. ve 12. haftada elde edilen mikro-BT görüntüleri



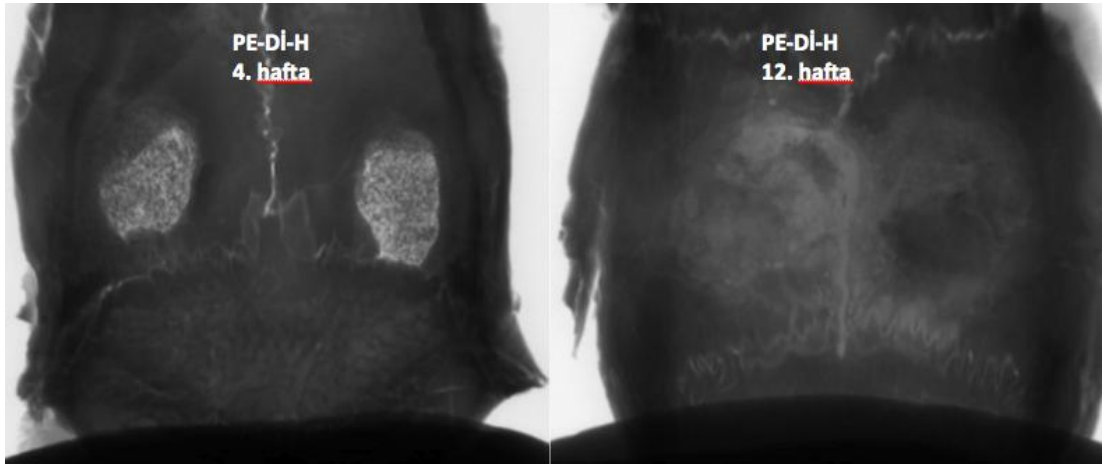
Şekil 4.19. Suda çözünen 17β -östradiol yüklü doku iskelesi yerleştirilen grubun 4. ve 12. haftada elde edilen mikro-BT görüntüleri



Şekil 4.20. 17β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller yüklenmiş doku iskelesi yerleştirilen grubun 4. ve 12. haftada elde edilen mikro-BT görüntüleri



Şekil 4.21. Suda çözünen 17β -östradiol ve AdMSC yüklü doku iskelesi yerleştirilen grubun 4. ve 12. haftada elde edilen mikro-bt görüntüleri



Şekil 4.22. 17β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller ve AdMSC yüklenmiş doku iskelesi yerleştirilen grubun 4. ve 12. haftada elde edilen mikro-BT görüntüleri

4.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Her bir gruptan elde edilen oluşturulan kemik defektinde kemikleşme yüzdesinin istatistiksel analizi, SPSS (Statistical Package for SociSciences) 17.0 programı kullanılarak yapıldı. Birbirinden bağımsız altı grubun karşılaştırılması için, grup verilerinin parametrik olmayan şekilde dağılım göstermesi nedeniyle, parametrik olmayan testlerden Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Çoklu

karşılaştırma testi olarak Conover'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. $P < 0,005$ olduğunda elde edilen sonuçlar istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi.

Deney gruplarından 4. ve 12. haftanın sonunda mikro-BT sonuçlarına göre elde edilen kemikleşme sonuçlarının tanımlayıcı istatistiksel bilgileri Tablo 4.2.de verilmiştir. Gruplar arasında 4. ve 12. hafta sonunda elde edilen sonuçlar açısından istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttur ($p < 0.001$).

Tablo 4.2. 4. ve 12. haftanın sonunda mikro-BT sonuçlarına göre gruplarda elde edilen kemikleşme yüzdelерinin tanımlayıcı istatistiksel bilgileri (Kruskal-Wallis testi)

Deney Grupları:	Ortalama \pm Standart sapma	Ortanca	p değeri
4 HAFTA	(%)	(%)	
Defekt	2.659 \pm 2.08	2.445	< 0.001
Boş Dİ	38.967 \pm 2.71	38.930	
WE-Dİ	40.420 \pm 11.29	45.140	
PE-Dİ	32.440 \pm 9.25	32.035	
WE-Dİ-H	56.397 \pm 5.99	57.650	
PE-Dİ-H	56.788 \pm 11.14	60.320	
Toplam	38.661 \pm 18.81	41.255	
Deney Grupları:	Ortalama \pm Standart sapma	Ortanca	p değeri
12 HAFTA	(%)	(%)	
Defekt	2.659 \pm 2.08	2.445	< 0.001
Boş Dİ	57.159 \pm 13.48	57.200	
WE-Dİ	56.363 \pm 6.347	56.010	
PE-Dİ	63.123 \pm 6.009	63.065	
WE-Dİ-H	71.530 \pm 10.552	71.070	
PE-Dİ-H	82.901 \pm 9.157	82.590	
Toplam	57.768 \pm 25.614	63.065	

Deney gruplarından 4. hafta sonunda elde edilen sonuçlar gruplar arasında çoklu olarak karşılaştırıldığında (Tablo 4.3.) defekt grubu ile diğer bütün gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,005$). Boş doku iskelesi (Dİ), suda çözünen doku iskelesi (WE-Dİ) ve 17β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller yüklenmiş

doku iskelesi (PE-Dİ) yerleştirilen grupların kemikleşme sonuçları açısından kendi aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,005$). Bu üç grubun sonuçları (Dİ, WE-Dİ, PE-Dİ) kök hücre yüklenen gruplarla (WE-Dİ-H, PE-Dİ-H) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p<0,005$). Kök hücre yerleştirilen iki grup (WE-Dİ-H ve PE-Dİ-H) kendi arasında karşılaştırıldığında 4. hafta sonuçları açısından anlamlı fark görülmemiştir.

Tablo 4.3. 4. haftada deney gruplarında elde edilen kemikleşme sonuçlarının ikili olarak karşılaştırılması (Conover çoklu karşılaştırma testi)

	Defekt	Boş Dİ	WE-Dİ	PE-Dİ	WE-Dİ-H	PE-Dİ-H
Defekt	-	*	*	*	*	*
Boş Dİ	*	-	-	-	*	*
WE-Dİ	*	-	-	-	*	*
PE-Dİ	*	-	-	-	*	*
WE-Dİ-H	*	*	*	*	-	-
PE-Dİ-H	*	*	*	*	-	-

- : $P > 0.005$; * : $P < 0.005$

Deney gruplarından 12. hafta sonunda elde edilen sonuçlar gruplar arasında çoklu olarak karşılaştırıldığında (Tablo 4.4.) benzer olarak defekt grubu ile diğer bütün gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,005$). Boş doku iskelesi (Dİ), suda çözünen doku iskelesi (WE-Dİ) ve 17β -östradiol yüklü PLGA nanopartiküller yüklenmiş doku iskelesi (PE-Dİ) yerleştirilen grupların kemikleşme sonuçları açısından kendi aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,005$). Bu üç grubun sonuçları (Dİ, WE-Dİ, PE-Dİ) AdMSC yüklenen gruplarla (WE-Dİ-H, PE-Dİ-H) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p<0,005$). AdMSC yüklenen grupların 12. Hafta sonunda elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında WE-Dİ-H grubu ile PE-Dİ-H grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p<0,005$).

Tablo 4.4. 4. Haftada deney gruplarında elde edilen kemikleşme sonuçlarının ikili olarak karşılaştırılması (Conover çoklu karşılaştırma testi)

	Defekt	Boş Dİ	WE-Dİ	PE-Dİ	WE-Dİ-H	PE-Dİ-H
Defekt	-	*	*	*	*	*
Boş Dİ	*	-	-	-	*	*
WE-Dİ	*	-	-	-	*	*
PE-Dİ	-	-	-	-	-	*
WE-Dİ-H	*	*	*	-	-	*
PE-Dİ-H	*	*	*	*	*	-

- : $P > 0.005$; * : $P < 0.005$

5. TARTIŞMA

Plastik cerrahide karşılaşılan en büyük problemlerden biri kemik defektlerinin rekonstrüksiyonudur. Günlük plastik cerrahi pratiğinde kullanılmakta olan çözümlerin maliyet, uzun yatış süreleri, donör ve alıcı saha morbiditesi gibi sorunları mevcuttur (1).

Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda kullanılabilir seçeneklerin başında kemik greftleri gelmektedir. Konjenital, travmatik ve onkolojik rezeksiyonlar sonrasında oluşan defektlerin rekonstrüksiyonu amacıyla iliak krest, kalvariyum ve kostal kemik greftleri alınabilmektedir (102).

Kemik defektlerinin geniş olduğu, radyoterapi görmüş olan alıcı yatağın uygun olmadığı travmatik, postonkolojik defektlerin rekonstrüksiyonunda serbest flep olarak vaskülarize kemik transferi tercih edilebilmektedir. Bu amaçla iliak kemik, fibula, radius, skapula en belli başlı kemik flebi seçenekleridir (103).

Bu her iki teknikle de kemik transferinin belirli kısıtlamaları olup, donör alanda ağrı, deformite gelişimi, komşu anatomik yapılara zarar verilmesi, ameliyat süresinin uzun olması, skar gelişimi, maliyet, uzun yatış süreleri, kemik dokunun kaybı ya da rezorbsiyon riski bunların başında gelmektedir (2).

Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda kullanılan bir başka seçenek de distraksiyon osteogenezidir (3). Distraksiyon osteogenezi ile osteotomi yapılan segmente tedrici olarak çekme gücü ve gerginlik uygulanarak yeni kemik oluşumu sağlanır. Bu yöntemle kemik segmentinde uzamaya ek olarak çevre yumuşak dokularda da büyüme sağlanır. Distraksiyonun da iki seanslı ameliyat gereksinimi, tedavi süresi boyunca cihaz kullanımı, fibröz kaynama ve kaynamama gibi kendi içinde kısıtlamaları vardır. (104)

Bu gibi kısıtlamalar ve otojen doku transferi ile elde edilebilecek dokunun sınırlı olması nedeniyle doku mühendisliği ile kemik doku alternatiflerinin üretilmesi fikri heyecan yaratmıştır (105).

Doku mühendisliği uygulamalarında taşıyıcı yapı olarak kullanılan doku iskelesinin etkinliğinin artırılması amacıyla büyüme faktörleri (5) ve hücre bazlı uygulamalar son yıllarda önem kazanmış ve artmıştır (6).

Doku mühendisliğinin plastik cerrahide klinik uygulamalarından biri 2009 yılında Behnia ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada dudak damak yarığına sekonder gelişen alveolar kleftin tedavisinde 2 olguda mezenkimal kök hücre yüklenmiş demineralize kemik matriksi kullanılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (106). Van Hout ve ark. 2011 yılında yayınladıkları çalışma ile BMP katkılı doku mühendisliği uygulamalarının alveolar kleft tedavisinde kemik greftinin yerini alabileceğini belirtmişlerdir (107).

Plastik cerrahide doku mühendisliği uygulamaları için bir başka kilometre taşı Zuk ve ark. tarafından yağ dokusundan mezenkimal kök hücrelerin izole edilmesidir (55). Yağ dokusunun kolay ulaşılabilir, bol miktarda rezervi olması, elde edilmesi amacıyla lipoaspirasyon gibi plastik cerrahinin rutin kolay prosedürlerinden birine ihtiyaç duyulması doku mühendisliği çalışmalarına zaten ilgisi olan plastik cerrahinin bu konuya sarılmasına neden olmuştur (108).

Literatürde kemik doku mühendisliği alanında AdMSClerle gerçekleştirilen bir çok in vivo çalışma mevcut olup bunlardan birinde Vergroesen ve ark. hayvanda geliştirdiği spinal füzyon modelinde doku iskelesine AdMSCler yükleyerek kemikleşme gözlemlemiştir (109). Rada ve ark. AdMSClerin osteojenik farklılaşma potansiyelleri üzerine in vitro ve in vivo çalışmalar gerçekleştirmiştir (110).

Kemik doku mühendisliğinde kök hücrelerin çalışmalar adapte edilmesinden sonra hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin artırılması amacıyla büyüme faktörlerinin uygulanması ilgi uyandırmıştır. Kemik gelişimi üzerinde dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) ve insulin benzeri büyüme faktörünün etkileri dikkat çekici olup (7), ilerleyen yıllarda başka büyüme faktörlerinin etkinliği de gösterilmiştir (1).

AdMSClerin üzerinde etkisi en iyi bilinen ve literatürde en çok araştırılan faktörlerin başında BMP ailesi gelmektedir. Wan ve ark. 2006 yılında gerçekleştirdikleri çalışma ile BMPnin AdMSClerin kemik serisine farklılaşmaları yönünde etkisi olduğunu in vivo çalışma ile göstermiştir (111). Cowan ve ark. ise BMP-2nin ekzojen uygulanmasının kemikleşmeyi arttırdığını in vivo hayvan çalışması ile göstermiştir (74).

Bu büyüme faktörleri dışında platelet lizat, osteojenik büyüme peptidi ve eritropoietinin kemikleşme üzerinde etkisi de son yıllarda araştırılmıştır (112-114).

Bu tez çalışmasında daha önceki deney modelleri ve çalışmalar dikkate alınarak AdMSClerin taşıyıcı bir doku iskelesi yardımıyla oluşturulan kritik boyutlu kemik defektinde östrojen etkisinde kemik serisine farklılaşma potansiyelini gözlemlemeyi amaçladık.

Kritik boyutlu kemik modeli Hollinger ve ark. tarafından geliştirilmiş (89, 115) olup kemik doku mühendisliği uygulamalarında altın standart olarak kabul edilmektedir. Kritik boyutlu kemik defekti modelinde dışarıdan bir uygulama olmaksızın kemik defektinin kendi kendisine canlılığının yaşam süresi boyunca iyileşmeyeceği kabul edilmektedir. Bu defekt büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla birçok canlı türünde çeşitli çalışmalar yapılmıştır (1).

Bu çalışmada doku iskelesi modeli olarak kitosan / hidroksiapatit yapıda doku iskelesi geliştirilmiş olup, üretim tekniği olarak eş zamanlı olarak mikrodalga ışıma ve gaz köpükleştirme tekniği kullanılarak süpergözenekli hidrojel doku iskelesi sentezlenmiştir. Yapısında doğal bir polimer olan kitosanın bulunması osteoindüksiyon ve inorganik kemik doku ekstrasellüler matriks elemanı olan hidroksiapatitin eklenmesi ile de osteokondüksiyon özellikleri kazanması sağlanmıştır. Bu iki kavramın birarada bulunması ideal bir doku iskelesinde bulunması istenen iki temel özelliktir. Bu doku iskelesinin üretim tekniği Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği ve Biyomühendislik Bölümü Hücre ve Doku

Mühendisliği Araştırma Laboratuvarı`nda tanımlanmış olup aynı merkezde gerçekleştirilen çalışmalarla etkinliği kanıtlanmıştır (38, 40).

Çalışmada AdMSCler üzerinde etkinliği araştırılan 17β-östradiolün yapılan kök hücre çalışmalarında reseptörlerinin bulunması, ve 2006 yılında Hong ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada in vitro ortamda adipojenik ve osteojenik farklılaştırma potansiyellerinin olduğuna dair çalışmalar gerçekleştirilmesi tez çalışması için cesaret verici olmuştur (84). Buna rağmen literatürde 17β-östradiolün in vivo bir çalışmayla AdMSCler zerindeki etkisi daha önce gösterilmemiştir.

Çalışmada etkisinin araştırılması planlanan 17β-östradiolün lipofilik yapıda olması nedeniyle bu formuyla doku iskelesine yüklenmesi mümkün olmamaktadır. Bu nedenle ticari olarak ulaşılabilir siklodektrin kaplı suda çözünen formu ve PLGA kaplı nanopartikül formları çalışmada kullanılmıştır. Çalışmada kullanılacak olan 17β-östradiolün doku iskelesine yüklenecek dozu belirlenirken literatürde daha önce gerçekleştirilen benzer çalışmalar dikkate alındı (84, 116, 117). Bu iki formun gerçekleştirilen salım kinetik çalışmalarında siklodektrin kaplı 17β-östradiolün 5 günde ortama tamamen salındığı ancak PLGA kaplı nanopartikülden 17β-östradiolün toplamda 60 günde kontrollü olarak salındığı gösterilmiştir. İn vitro farklılaşma ortamında bile kök hücrelerin osteojenik farklılaşmalarının en az 3 haftayı bulduğu değerlendirilecek olursa kök hücreleri etkilemesi hipotetik olarak öngörülen 17β-östradiolün daha uzun salınma kinetiğine sahip formunun kök hücre çalışmalarında daha ideal olduğu söylenebilir.

Kontrol grubuna (kritik boyutlu kemik defekti) ait sonuçlar değerlendirildiğinde klinik ve histolojik olarak kemikleşmenin olmaması oluşturulan deney modelinin uygun olduğunu göstermektedir. Histolojik olarak sadece granülasyon dokusunun olması ve klinik olarak ince bir membran gözlenmesi, transillüminasyon görölmesi beklenmektedir.

Boş doku iskelesi, suda çözünen 17β-östradiol ve PLGA kaplı 17β-östradiol yüklü nanoküre yüklenmiş doku iskelesi yerleştirilen gruplarda benzer histolojik

sonuçlar elde edilmiş olup; zayıf damarlanma paterni, dzensiz kollajen demetleri ve mononkleer infiltrasyon ağırlıktadır. Bu gruplarda elde edilen klinik sonuçlar birbirine oldukça benzemekte olup 12. haftada sonunda elde edilen gruplarda doku iskelesinin büyük çoğunluğu erimesine rağmen çevresinde kemik dokusu yerine granulasyon dokusunun varlığı dikkat çekicidir.

AdMSC eklenmiş olan gruplarda ise klinik bulgular daha olumlu gözükmektedir. Doku iskelelerinin büyük çoğunluğu erimesine rağmen iskele çevresinde diğer gruplara göre daha az hatta bazı örneklerde hemen hemen hiç halo görünümü izlenmemiştir. Klinik olarak WE-Dİ-AdMSC grubu ile PE-Dİ-AdMSC grupları arasında belirgin fark gzkmezken histolojik olarak PE-Dİ-AdMSC grubunda damarlanmanın daha zengin, kollajen dizilinin düzenli ve kemikleşmenin daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Bu durum PLGA nanopartiküller yoluyla 17β-östradiolün daha uzun zaman ortama salınarak etkinliğinin daha uzun olmasına bağlanabilir.

Mikro ct sonuçları değerlendirildiğinde 4. ve 12. hafta sonunda AdMSC yüklenmiş WE-Dİ-H ve PE-Dİ-H gruplarının boş doku iskelesi (Dİ), suda oznen 17β-stradiol (WE-Dİ) ve PLGA kaplı 17β-östradiol yüklü nanoküre yüklenmiş doku iskelesi (PE-Dİ) yerleştirilen gruplardan daha iyi kemikleşme sonuçları gösterdiğini görmekteyiz. AdMSC yüklü olmayan bu üç grubun kendi arasında 4. ve 12. haftada elde edilen sonuçlar açısından fark olmaması çalışmada 17β-östradiolün AdMSC ortamda olmaksızın anlamlı bir fark yaratmadığını göstermektedir. AdMSC yüklenmiş grupların sonuçlarının AdMSC yüklenmemiş gruplarla karşılaştırıldığında daha olumlu olması bu hücrelerin kemik rejenerasyonuna olumlu katkıda bulunduğu lehine yorumlanabilir. WE-Dİ-H ve PE-Dİ-H grupları arasında 4. haftanın sonunda anlamlı bir fark olmamasına rağmen 12. haftanın sonunda PE-Dİ-H grubunun daha iyi kemikleşme göstermesi suda oznen 17β-östradiolün toplam 5 günde ortama salınması ancak PLGA kaplı 17β-östradiol nanopartiküllerden salınmanın 60 güne kadar devam etmesi ile açıklanabilir. 17β-östradiolün lipofilik yapısı nedeniyle

nanoküre ile ortama taşınması ve kontrollü salım göstermesi gerçekleştirilen çalışmada uzun vadeli kemikleşme açısından olumlu katkıda bulunmuştur.

Canlılardan 4. ve 12. hafta sonunda elde edilen örnekler doku iskelesinin yıkım kinetiği açısından değerlendirildiğinde 4. haftada sebat ettiği, 12. haftada ise büyük kısmı erimesine rağmen devamlılık gösterdiği görülmektedir. Doku iskelesi yıkılırken yerini kemik dokunun alması kemik doku mühendisliği çalışmalarında hedeflenmektedir. Literatürdeki in vivo çalışmalar dikkate alındığında bazı çalışmalarda örneklerin daha geç haftalarda elde edilebildiği görülmektedir (90, 109).

Çalışmada 12. hafta sonunda elde edilen örneklerde kemikleşme ve kemik ekstrasellüler matriks sentezi yönünde histolojik ve mikrotomografik bulgular elde edilmesine rağmen tercih edilen doku iskelesinin yıkım kinetiği ve AdMSC uygulanan literatürdeki bazı diğer çalışmalar da dikkate alındığında geç kemikleşmeye ilişkin örneklerin daha ileri haftalarda elde edilmesi durumunda daha organize kemikleşme paternleri görülebileceği öngörülebilmektedir (90, 109).

6. SONUÇ

Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında yağ dokusundan türetilmiş kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasında 17 β -östradiolün tetikleyici etkisi olduğu kanısındayız. Kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmakta olan büyüme faktörleri ile kıyaslandığında daha ucuz ve daha basit bir molekül olması nedeniyle güncel olarak kullanılmakta olan ajanlara alternatif olabileceği ve doku mühendisliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir.

7. REFERANSLAR

1. Calvert, J.W., L.E. Weiss, ve M.J. Sundine, *New frontiers in bone tissue engineering*. Clin Plast Surg, 2003. **30**(4): p. 641-8, x.
2. Perry, C.R., *Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes*. Clin Orthop Relat Res, 1999(360): p. 71-86.
3. Jenkins, D.D., ve ark., *Tissue engineering and regenerative medicine*. Clin Plast Surg, 2003. **30**(4): p. 581-8.
4. Panetta, N.J., D.M. Gupta, ve M.T. Longaker, *Bone tissue engineering scaffolds of today and tomorrow*. J Craniofac Surg, 2009. **20**(5): p. 1531-2.
5. Rose, F.R., Q. Hou, ve R.O. Oreffo, *Delivery systems for bone growth factors - the new players in skeletal regeneration*. J Pharm Pharmacol, 2004. **56**(4): p. 415-27.
6. Vats, A., ve ark., *Stem cells*. Lancet, 2005. **366**(9485): p. 592-602.
7. Urist, M.R., *Bone: formation by autoinduction*. Science, 1965. **150**(3698): p. 893-9.
8. Ray, R., ve ark., *Sex steroids and stem cell function*. Mol Med, 2008. **14**(7-8): p. 493-501.
9. Taner, D., *Fonksiyonel Anatomi : Ekstremiteler ve Sirt Bölgesi*1996, Ankara: Hekimler Yayın Birliği.
10. Moore, K.L., *Overview of Anatomy*, in *Clinically Oriented Anatomy*, M. KL., Editor 1992, Williams & Wilkins: Baltimore. p. 11-16.
11. Mehrara BJ, M.J., *Repair and Grafting of Bone*, in *Plastic Surgery* M. SJ, Editor 2006, Saunders Elsevier: Philadelphia. p. 639-718.
12. Mersher, A.L., *Junqueira's Basic Histology*. 12 ed2009, USA: McGraw-Hill Medical. 141-160.
13. Ovalle WK. , N.P., *Kemiğin Yapısı*, in *Netter Temel Histoloji*, K.F. Müftüoğlu S, Atilla P, Editors. 2009, Güneş Tıp Kitabevi: Ankara. p. 131-56.
14. Rosenberg, A., *Bones, Joints and Soft Tissue Tumors*, in *Robbins Pathologic Basis of Disease*, K.V. Cotran R. , Collins T. , Editor 1999, W.B. Saunders Company: Philadelphia. p. 1216-18.

15. Junqueira L.C. , C.J., Kelly R.O., *Basic Histology*. 7 ed1992, Lebanon: Appleton&Lange.
16. Online, in www.bcrc.bio.umass.edu.
17. Megee, D.M., ve ark., *Tissue engineering: bridging the gap between replantation and composite tissue allografts*. Clin Plast Surg, 2007. **34**(2): p. 319-25, xi.
18. Langer, R. ve J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
19. Vacanti, C.A., *The history of tissue engineering*. J Cell Mol Med, 2006. **10**(3): p. 569-76.
20. Wozney, J.M., ve ark., *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities*. Science, 1988. **242**(4885): p. 1528-34.
21. Zambonin, G., ve ark., *Hydroxyapatite coated with insulin-like growth factor 1 (IGF1) stimulates human osteoblast activity in vitro*. Acta Orthop Scand, 1999. **70**(2): p. 217-20.
22. Santos, T.C., ve ark., *VEGF and FGF-2 incorporation in starch-based bone tissue engineering constructs promote the in vivo expression of neovascularisation mediators*. Tissue Eng Part A, 2012.
23. Bai, Y., ve ark., *BMP-2, VEGF and bFGF synergistically promote the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Biotechnol Lett, 2012.
24. Calvert, J.W., ve ark., *Characterization of osteoblast-like behavior of cultured bone marrow stromal cells on various polymer surfaces*. J Biomed Mater Res, 2000. **52**(2): p. 279-84.
25. Schnell, E., ve ark., *Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-epsilon-caprolactone and a collagen/poly-epsilon-caprolactone blend*. Biomaterials, 2007. **28**(19): p. 3012-25.
26. Macchiarini, P., ve ark., *Clinical transplantation of a tissue-engineered airway*. Lancet, 2008. **372**(9655): p. 2023-30.
27. Giordano, R.A., ve ark., *Mechanical properties of dense polylactic acid structures fabricated by three dimensional printing*. J Biomater Sci Polym Ed, 1996. **8**(1): p. 63-75.

28. Qi, X., J. Ye, ve Y. Wang, *Alginate/poly (lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement scaffold with oriented pore structure for bone tissue engineering*. J Biomed Mater Res A, 2009. **89**(4): p. 980-7.
29. Kim, I.L., R.L. Mauck, ve J.A. Burdick, *Hydrogel design for cartilage tissue engineering: a case study with hyaluronic acid*. Biomaterials, 2011. **32**(34): p. 8771-82.
30. Reddi, A.H., J. Becerra, ve J.A. Andrades, *Nanomaterials and hydrogel scaffolds for articular cartilage regeneration*. Tissue Eng Part B Rev, 2011. **17**(5): p. 301-5.
31. Gupta, D.M., N.J. Panetta, ve M.T. Longaker, *The use of polymer scaffolds in skeletal tissue engineering applications*. J Craniofac Surg, 2009. **20**(3): p. 860-1.
32. Boccaccini, A.R. ve J.J. Blaker, *Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds*. Expert Rev Med Devices, 2005. **2**(3): p. 303-17.
33. Koleganova, V.A., ve ark., *Bioactive glass/polymer composite materials with mechanical properties matching those of cortical bone*. J Biomed Mater Res A, 2006. **77**(3): p. 572-9.
34. Schumacher, G.E., ve ark., *The use of amorphous calcium phosphate composites as bioactive basing materials: their effect on the strength of the composite/adhesive/dentin bond*. J Am Dent Assoc, 2007. **138**(11): p. 1476-84.
35. Hesaraki, S., M. Safari, ve M.A. Shokrgozar, *Composite bone substitute materials based on beta-tricalcium phosphate and magnesium-containing sol-gel derived bioactive glass*. J Mater Sci Mater Med, 2009. **20**(10): p. 2011-7.
36. Hutmacher, D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. Biomaterials, 2000. **21**(24): p. 2529-43.
37. Hutmacher, D.W., ve ark., *Tissue engineering research: the engineer's role*. Med Device Technol, 2000. **11**(1): p. 33-9.
38. Kaynak, G., *Mikroalga destekli çapraz bağlanma/çökeltme reaksiyonları ile kitosan-HA doku iskelelerinin hazırlanması ve kemik doku mühendisliğinde*

- kullanımının araştırılması, Biyomühendislik Anabilim Dalı*2012, Hacettepe Üniversitesi: Ankara.
39. İ., B., *Biyoseramik ve biyosinyal moleküllerle desteklenmiş poli (kaprolakton) doku iskeleleri: sentez, karakterizasyon ve kemik doku mühendisliği uygulamaları, Fen Bilimleri Enstitüsü*2008, Hacettepe Üniversitesi: Ankara.
40. Durukan, M.D., *Mikrodalga destekli doku iskelesi üretimi ve in vitro kemik doku mühendisliği, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı*2012, Hacettepe Üniversitesi: Ankara.
41. Gumusderelioglu, M., D. Erce, ve T.T. Demirtas, *Superporous polyacrylate/chitosan IPN hydrogels for protein delivery. J Mater Sci Mater Med*, 2011. **22**(11): p. 2467-75.
42. Chen, J., H. Park, ve K. Park, *Synthesis of superporous hydrogels: hydrogels with fast swelling and superabsorbent properties. J Biomed Mater Res*, 1999. **44**(1): p. 53-62.
43. Annabi, N., ve ark., *Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. Tissue Eng Part B Rev*, 2010. **16**(4): p. 371-83.
44. Rizzatti-Barbosa, C.M. ve M.C. Ribeiro-Dasilva, *Influence of double flask investing and microwave heating on the superficial porosity, surface roughness, and knoop hardness of acrylic resin. J Prosthodont*, 2009. **18**(6): p. 503-6.
45. Piatkowski, M., D. Bogdal, ve B. Ondruschka, *Microwave-assisted synthesis of poly(aspartic acid). Polimery*, 2009. **54**(7-8): p. 573-576.
46. Hedrick, M.H. ve E.J. Daniels, *The use of adult stem cells in regenerative medicine. Clin Plast Surg*, 2003. **30**(4): p. 499-505.
47. Martin, G.R., *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(12): p. 7634-8.
48. Woodbury, D., ve ark., *Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res*, 2000. **61**(4): p. 364-70.
49. Wiles, M.V. ve G. Keller, *Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. Development*, 1991. **111**(2): p. 259-67.

50. Dani, C., ve ark., *Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro*. J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 11)**: p. 1279-85.
51. Rohwedel, J., ve ark., *Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents*. Dev Biol, 1994. **164(1)**: p. 87-101.
52. Kramer, J., ve ark., *Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4*. Mech Dev, 2000. **92(2)**: p. 193-205.
53. Young, H.E., ve ark., *Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs*. Dev Dyn, 1995. **202(2)**: p. 137-44.
54. Warejcka, D.J., ve ark., *A population of cells isolated from rat heart capable of differentiating into several mesodermal phenotypes*. J Surg Res, 1996. **62(2)**: p. 233-42.
55. Zuk, P.A., ve ark., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13(12)**: p. 4279-95.
56. Aksu, A.E., ve ark., *Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells*. Ann Plast Surg, 2008. **60(3)**: p. 306-22.
57. Tholpady, S.S., ve ark., *Adipose tissue: stem cells and beyond*. Clin Plast Surg, 2006. **33(1)**: p. 55-62, vi.
58. Siiteri, P.K., *Adipose tissue as a source of hormones*. Am J Clin Nutr, 1987. **45(1 Suppl)**: p. 277-82.
59. Zhang, Y., ve ark., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372(6505)**: p. 425-32.
60. Carpaneda, C.A., *Collagen alterations in adipose autografts*. Aesthetic Plast Surg, 1994. **18(1)**: p. 11-5.
61. Nakajima, I., ve ark., *Adipose tissue extracellular matrix: newly organized by adipocytes during differentiation*. Differentiation, 1998. **63(4)**: p. 193-200.
62. Zuk, P.A., ve ark., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Eng, 2001. **7(2)**: p. 211-28.

63. Katz, A.J., ve ark., *Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells*. *Stem Cells*, 2005. **23**(3): p. 412-23.
64. De Ugarte, D.A., ve ark., *Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow*. *Cells Tissues Organs*, 2003. **174**(3): p. 101-9.
65. Aust, L., ve ark., *Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates*. *Cytotherapy*, 2004. **6**(1): p. 7-14.
66. Baer, P.C. and H. Geiger, *Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity*. *Stem Cells Int*, 2012. **2012**: p. 812693.
67. Traktuev, D.O., ve ark., *A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks*. *Circ Res*, 2008. **102**(1): p. 77-85.
68. Traktuev, D.O., ve ark., *Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells*. *Circ Res*, 2009. **104**(12): p. 1410-20.
69. Tholpady, S.S., A.J. Katz, and R.C. Ogle, *Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro*. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2003. **272**(1): p. 398-402.
70. Huang, J.I., ve ark., *Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue*. *Plast Reconstr Surg*, 2004. **113**(2): p. 585-94.
71. Mizuno, H., ve ark., *Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells*. *Plast Reconstr Surg*, 2002. **109**(1): p. 199-209; discussion 210-1.
72. Kang, S.K., ve ark., *Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats*. *Exp Neurol*, 2003. **183**(2): p. 355-66.
73. Halvorsen, Y.C., W.O. Wilkison, and J.M. Gimble, *Adipose-derived stromal cells--their utility and potential in bone formation*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000. **24 Suppl 4**: p. S41-4.

74. Cowan, C.M., ve ark., *Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(5): p. 560-7.
75. Lendeckel, S., ve ark., *Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report*. J Craniomaxillofac Surg, 2004. **32**(6): p. 370-3.
76. Rehman, J., ve ark., *Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells*. Circulation, 2004. **109**(10): p. 1292-8.
77. W.F., G., *Review of Medical Physiology*. 21 ed2003: McGraw-HillProfessional.
78. D.K., G., *Hormones of the gonads*, in *Harper's Biochemistry*, M.R.G.D.K.M.P.R. V.W., Editor 2000, McGraw-Hill: USA. p. 594-609.
79. Guyton, A.C., *Guyton & Hall Textbook of Medical Physiology*. 11 ed2005: Saunders/Elsevier.
80. Gennari, L., ve ark., *Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review*. Am J Epidemiol, 2005. **161**(4): p. 307-20.
81. Walter, P., ve ark., *Cloning of the human estrogen receptor cDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(23): p. 7889-93.
82. Deroo, B.J. and A.V. Buensuceso, *Minireview: Estrogen receptor-beta: mechanistic insights from recent studies*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(9): p. 1703-14.
83. Kuiper, G.G., ve ark., *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta*. Endocrinology, 1997. **138**(3): p. 863-70.
84. Hong, L., A. Colpan, and I.A. Peptan, *Modulations of 17-beta estradiol on osteogenic and adipogenic differentiations of human mesenchymal stem cells*. Tissue Eng, 2006. **12**(10): p. 2747-53.
85. Hong, S.H., ve ark., *Expression of estrogen receptor-alpha and -beta, glucocorticoid receptor, and progesterone receptor genes in human embryonic stem cells and embryoid bodies*. Mol Cells, 2004. **18**(3): p. 320-5.
86. Hamada, H., ve ark., *Estrogen receptors alpha and beta mediate contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to functional recovery after myocardial infarction*. Circulation, 2006. **114**(21): p. 2261-70.

87. Han, H.J., J.S. Heo, and Y.J. Lee, *Estradiol-17beta stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of MAPKs and CDKs as well as protooncogenes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(4): p. C1067-75.
88. Wang, Q., ve ark., *Temporal expression of estrogen receptor alpha in rat bone marrow mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **347**(1): p. 117-23.
89. Hollinger, J.O., ve ark., *Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration*. J Biomed Mater Res, 1998. **43**(4): p. 356-64.
90. Zong, C., ve ark., *Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds*. Eur Cell Mater, 2010. **20**: p. 109-20.
91. Beskardes, I.G., ve ark., *Microwave-assisted fabrication of chitosan-hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds*. J Tissue Eng Regen Med, 2012.
92. Li, B., ve ark., *Biodegradation and compressive strength of phosphorylated chitosan/chitosan/hydroxyapatite bio-composites*. Materials & Design, 2011. **32**(8-9): p. 4543-4547.
93. Li, Z., ve ark., *Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2005. **26**(18): p. 3919-28.
94. Akman, A.C., *Periodontal doku mühendisliği uygulamaları için kitosan temelli doku iskelelerinin üretilmesi, kemik morfojenik protein-2 (bmp-2) , bazik fibroblast büyüme faktörü (bfgf), deksametazon (dex) salım kinetiklerinin ve in vitro etkinliklerinin tayini* in Fen Bilimleri Enstitüsü2007, Hacettepe Üniversitesi: Ankara.
95. Chen, J., ve ark., *Effects of in situ and physical mixing on mechanical and bioactive behaviors of nano hydroxyapatite-chitosan scaffolds*. J Biomater Sci Polym Ed, 2011. **22**(15): p. 2097-106.
96. Han, J., ve ark., *Alginate-chitosan/hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds: preparation and characterization*. Int J Biol Macromol, 2010. **46**(2): p. 199-205.

97. Panyam, J. and V. Labhasetwar, *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(3): p. 329-47.
98. Mundargi, R.C., ve ark., *Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives*. J Control Release, 2008. **125**(3): p. 193-209.
99. Çapkın, M., *Sıçan kemik iliğinden ve yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin PCL, PCL-kollajen nanofibröz yüzeylerde sinir hücrelerine farklılaştırılması*, in *Biyomühendislik Anabilim Dalı2010*, Ege Üniversitesi: Bornova-İzmir.
100. Mayle, A., ve ark., *Flow cytometry analysis of murine hematopoietic stem cells*. Cytometry A, 2012.
101. Karaoz, E., ve ark., *Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers*. Histochem Cell Biol, 2009. **132**(5): p. 533-46.
102. Burgess E, M.M., Hollinger JO *Bone grafting and substitutes*, in *Plastic Surgery: operations, indications, outcomes*, E.E. Achauer B, editors, Editor 2000, CV Mosby: New York. p. 657-72.
103. Kim, B.C., ve ark., *Mandibular reconstruction with vascularized osseous free flaps: a review of the literature*. Asian Pac J Cancer Prev, 2012. **13**(2): p. 553-38.
104. Yu, J.C., ve ark., *Distraction Osteogenesis of the Craniofacial Skeleton*. Plast Reconstr Surg, 2004. **114**(1): p. 1E-20E.
105. Panetta, N.J., ve ark., *Tissue engineering in cleft palate and other congenital malformations*. Pediatr Res, 2008. **63**(5): p. 545-51.
106. Behnia, H., ve ark., *Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2009. **108**(2): p. e1-6.
107. van Hout, W.M., ve ark., *Reconstruction of the alveolar cleft: can growth factor-aided tissue engineering replace autologous bone grafting? A literature review and systematic review of results obtained with bone morphogenetic protein-2*. Clin Oral Investig, 2011. **15**(3): p. 297-303.

108. Zuk, P.A., *Tissue engineering craniofacial defects with adult stem cells? Are we ready yet?* *Pediatr Res*, 2008. **63**(5): p. 478-86.
109. Vergroesen, P.P., ve ark., *The use of poly(L-lactide-co-caprolactone) as a scaffold for adipose stem cells in bone tissue engineering: application in a spinal fusion model.* *Macromol Biosci*, 2011. **11**(6): p. 722-30.
110. Rada, T., ve ark., *Osteogenic differentiation of two distinct subpopulations of human adipose-derived stem cells: an in vitro and in vivo study.* *J Tissue Eng Regen Med*, 2012. **6**(1): p. 1-11.
111. Wan, D.C., ve ark., *Osteogenic differentiation of mouse adipose-derived adult stromal cells requires retinoic acid and bone morphogenetic protein receptor type IB signaling.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(33): p. 12335-40.
112. Chevallier, N., ve ark., *Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate.* *Biomaterials*, 2010. **31**(2): p. 270-8.
113. Shuqiang, M., ve ark., *Osteogenic growth peptide incorporated into PLGA scaffolds accelerates healing of segmental long bone defects in rabbits.* *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2008. **61**(12): p. 1558-60.
114. Garcia, P., ve ark., *Low dose erythropoietin stimulates bone healing in mice.* *J Orthop Res*, 2011. **29**(2): p. 165-72.
115. Zegzula, H.D., ve ark., *Bone formation with use of rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2).* *J Bone Joint Surg Am*, 1997. **79**(12): p. 1778-90.
116. Qu, Q., ve ark., *Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture.* *Bone*, 1998. **22**(3): p. 201-9.
117. Zhou, S., ve ark., *Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice.* *J Cell Biochem Suppl*, 2001. **Suppl 36**: p. 144-55.