

**BOR İÇEREN NANO HİDROKSİAPATİT SERAMİKLERİN
İNSAN KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER İLE
ETKİLEŞİMİ VE OSTEOPOROZLU TAVŞAN UZUN
KEMİKLERİNE ETKİLERİ**

**THE INTERACTION OF HYDROXYAPATITE NANO-
CERAMICS COMPRISING OF BORON WITH HUMAN
DRIVED MESENCHYMAL STEM CELLS AND ITS
EFFECTS ON RABBITS' LONG BONES WITH
OVARIECTOMY**

Eda ÇİFTÇİ DEDE

Prof. Dr. Feza KORKUSUZ


Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.


2015

Eda ÇİFTÇİ DEDE'nin hazırladığı "Bor İçeren Nano Hidroksiapatit Seramiklerin İnsan Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler ile Etkileşimi ve Osteoporozlu Tavşan Uzun Kemiklerine Etkileri" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI' nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

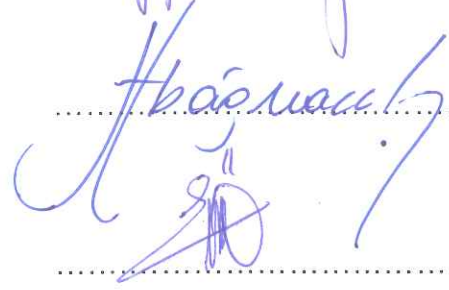
Prof. Dr. Necdet SAĞLAM
Başkan



Prof. Dr. Feza KORKUSUZ
Danışman



Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK
Üye



Doç. Dr. Eylem GÜVEN
Üye



Yard. Doç. Dr. Mesut ŞAM
Üye



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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

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

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

beyan ederim.

30/06/2015

Eda ÇİFTÇİ DEDE

ÖZET

BOR İÇEREN NANO HİDROKSİAPATİT SERAMİKLERİN İNSAN KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER İLE ETKİLEŞİMİ VE OSTEOPOROZLU TAVŞAN UZUN KEMİKLERİNE ETKİLERİ

Eda ÇİFTÇİ DEDE

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Feza KORKUSUZ

Haziran 2015, 49 sayfa

Osteoporoz , kemik dokunun mineral kaybı ile sağlamlığını ve yapısını kaybetmesi sonucu kemik kırıklarına kadar varabilen metabolik bir kemik hastalığıdır. Özellikle osteoporoz sonrasında oluşabilecek kırıkların önlenmesini amaçlayan bu çalışma;

1. Mezenkimal kök hücrelerin B-nHAp seramik malzememiz ile etkileşimlerini
2. Bu seramik malzemelerin çeşitli varyasyonlarının osteoporotik tavşanların femurlarına uygulanmasını içermektedir.

İlk aşamada temin edilen B-nHAp seramik malzemelerin insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreleriyle bir araya getirildiklerinde hücrelerin yapışma, çoğalma ve farklılaşma özelliklerine etkisi olup olmadığı araştırıldı. Hücre kültür çalışmaları sonunda kontrol gruplarına göre B-nHAP ile desteklenen MKH'lerin daha iyi çoğaldıkları ve uygun ortamda kemik hücrelerine dönüşebildikleri belirlendi.

İn vivo deneyden oluşan ikinci aşamada ise;

- Çalışmada kullanılacak altı aylık yerel beyaz tavşanların seramik malzeme enjekte edilecek deney grubuna basitçe yumurtalıkların alınması olarak tanımlanan ovariyektomi ve kontrol grubuna ise sham operasyon uygulanması ardından grupların kemik mineral yoğunlukları, vücut ağırlıkları

ve östrojen seviyesi ölçüldü ve tüm gruplarda ovariyektomi sonrasında, öncesine göre KMY'da bir düşüş gözlemlendi.

- Modelin oluşması ardından deney grubuna belirlenen seramikler enjekte edildi.
- Deney sonunda tavşanlar termine edildi ve femurlar toplanarak ilk önce KMY analizleri yapıldı. Bu analizlere göre B-nHAp ve nHAp enjeksiyonunun yapıldığı gruplardaki kemik mineral yoğunluğu değerlerinde artış görülürken MKH katkılı enjeksiyon gruplarında ise artış olmamasının yanı sıra düşüş gözlemlendi.
- Mikro bilgisayarlı tomografi cihazı ile elde edilen verilere göre B-nHAp ve nHAp uygulanan gruplarda trabeküler kalınlıkta artış, MKH verilerinde de bir düşüş görüldü.

Bu çalışma ile B-nHAp seramik malzemelerin uygulanmasının osteoporoz sonrası görülen kemik kırıklarının önlenmesi için umut vadeden bir yöntem olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: OSTEOPOROZ, BOR, HİDROKSİAPATİT, NANO- SERAMİK, TAVŞAN, İNSAN KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER.

ABSTRACT

THE INTERACTION OF HYDROXYAPATITE NANO-CERAMICS COMPRISING OF BORON WITH HUMAN DRIVED MESENCHYMAL STEM CELLS AND ITS EFFECTS ON RABBITS' LONG BONES WITH OVARIECTOMY

Eda ÇİFTÇİ DEDE

**Master of Science, Nanotechnology and Nanomedicine
Department**

Advisor: Prof. Dr. Feza KORKUSUZ

June 2015, 49 pages

Osteoporosis is a metabolic bone disease which can cause bone fractures at most as a result of the bone tissue's mineral, strength and structure loss. In this study which aims to prevent, particularly, the fractures that can occur after OP, there are two main stages. While the first of these comprises the interaction of mesenchymal stem cells with our B-nHAp ceramic materials, the latter involves the application of diverse variations of these ceramic materials to the femur of osteoporotic rabbits.

When the B-nHAp ceramic materials supplied in the first stage are combined with the human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells whether these materials have an effect on the adhesion, proliferation and differentiation characteristics of the cells has been studied. In the end of the cell culture studies, it has been determined that MSCs supported by B-nHAP proliferate better compared to the control groups and they can turn into bone cells in the fertile environment.

In the second stage comprising in vivo experiment;

- After the ovariectomy procedure application, which is defined as simply defeminizing, to the experimental group to be injected ceramic materials,

which consists of 6-month local rabbits and after sham operation application to the control group; bone mineral densities (BMD), body weights and estrogen level have been measured. As a result of that, BMD decreased between first and second measurements in all groups.

- After the fully establishment of the model, our experimental group of rabbits have been given injections determined during grouping.
- At the end of the experimental process, the rabbits have been terminated and firstly BMD analyses have been carried out after gathering the femur. According to these analyses, while an increase has been observed in BMD values in the groups injected B-nHAp and nHAp, a decrease, in addition to not having an increase, has been detected in the MSC added injection groups.
- According to data which obtained by the micro computed tomography, in the groups applied B-nHAp and nHAp, an increase in trabecular thickness has been detected and a decrease has been observed in MSC data.

In conclusion, the application of B-nHAp ceramic materials looks promising in terms of the prevention of bone fractures seen after osteoporosis.

Keywords: OSTEOPOROSIS, BORON, HYDROKSIAPATITE, NANO- CERAMIC, RABBIT MODEL, HUMAN DRIVED MESENCHYMAL STEM CELLS.

TEŞEKKÜR

Bu projenin gerçekleştirilmesinde sonsuz emek ve katkıları olan, tez çalışmam süresince bana verdiği değerli bilgiler ve eleştirileriyle gelişimime destek olan, sabırla ve bana karşı inancıyla beni çalışmaya teşvik eden değerli hocam ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Feza KORKUSUZ ve çok sevgili hocam Prof. Dr. Petek KORKUSUZ 'a

Tez jürimde bulunarak, tezime kattıkları önerilerinden dolayı değerli hocalarım, Prof. Dr. Necdet SAĞLAM, Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK, Doç. Dr. Eylem GÜVEN ve Yard. Doç. Dr. Mesut ŞAM'a

Çalışmamızın teknik aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, operasyonları gerçekleştirmemde büyük emekleri geçen Vet. Hekim Doç. Dr. Alper ÇETİNKAYA' ya, hücre kültürü aşamalarındaki desteklerinden dolayı sayın Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA' ya ve değerli arkadaşım Sevil ARSLAN' a, biyomekanik testlerde verdiği bilgiler ve emeklerinden dolayı Emir BİRANT' a, Histolojik preparat hazırlama aşamasındaki yardımlarından dolayı Doç. Dr. A. Atila Ertan'a,

Bu süreçte bana inancını asla kaybetmeyen, maddi, manevi her türlü desteklerini ve sonsuz sevgilerini benden esirgemeyen, ortaya çıkaracağım çalışmayı benden bile daha heyecanla bekleyen canımdan değerli anneme, babama ve amcama,

Her zaman bana destek olan, beni yorulmak bilmeden sonuca ulaşmaya heveslendiren ve mekanik bilgisiyle destek olan çok sevgili eşime

Sevgi, saygı ve tüm içtenliğimle,

TEŞEKKÜR EDERİM

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT | iii |
| TEŞEKKÜR..... | v |
| İÇİNDEKİLER..... | vi |
| ŞEKİLLER..... | viii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | ix |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 1.1.Literatür Özeti..... | 2 |
| 1.2.Malzeme Yöntem | 6 |
| 1.2.1. Tasarım..... | 6 |
| 1.2.2. İn vitro Kök Hücre Deneyi | 7 |
| 1.2.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü | 7 |
| 1.2.2.2.Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu | 7 |
| 1.2.2.2.1.Mezenkimal kök hücrelerin immun fenotiplendirilmesi | 7 |
| 1.2.2.2.2.Mezenkimal kök hücrelerin farklılaştırılması | 8 |
| 1.2.2.3. B-nHAP Seramik Malzemesinin MKH'lerin Çoğalma, Farklılaşma ve Morfolojisi Üzerine Etkisi | 8 |
| 1.2.2.3.1.MKH'lerin gerçek zamanlı yapışma, çoğalma ve canlılık analizi ... | 8 |
| 1.2.2.3.2.MKH'lerin farklılaşması | 8 |
| 1.2.2.3.3. MKH'lerin morfolojik analizi | 9 |
| 1.2.3. İn vivo Hayvan Deneyi | 12 |
| 1.2.3.1. Kemik Mineral Yoğunluğu Ölçümleri | 13 |
| 1.2.3.2. Ovariyektomi | 13 |
| 1.2.3.3. Vücut Ağırlığı ve Kanda Östrojen Seviyesi Ölçümleri | 14 |
| 1.2.3.4. B-n-HAp Seramiklerin Cerrahi Uygulaması | 14 |
| 1.2.3.5. Tavşanların Termine Edilmesi | 15 |
| 1.2.3.5. Tavşanların Uterus Ağırlıklarının Ölçülmesi | 16 |
| 1.2.4. Mikro Tomografi ve Sanal Ortam Biyomekanik Analizler | 16 |
| 1.2.5. İstatistiksel Analizler | 18 |
| 2.SONUÇLAR | 19 |
| 2.1. MKH ile B-nHAP Etkileşimleri..... | 19 |

| | |
|---|----|
| 2.1.1. MKH'lerin Gerçek Zamanlı Yapışma, Çoğalma Ve Canlılık Analizi Sonuçları | 19 |
| 2.1.2. MKH'lerin Farklılaşma Analizi Sonuçları | 20 |
| 2.2. OP Modelinin Oluşumunu Destekleyen Veriler | 21 |
| 2.2.1. Vücut Ağırlığı Ölçüm Sonuçları | 21 |
| 2.2.2. Kanda Östradiol Seviyesi Ölçüm Sonuçları | 21 |
| 2.3. Kemik Mineral Yoğunluğu Ölçümü Sonuçları | 21 |
| 2.4. μ -BT Ölçüm Sonuçları..... | 23 |
| 2.5. Sonlu Eleman Analizleri-Sanal Ortam Biyomekanik Test Sonuçları | 25 |
| 3.TARTIŞMA | 26 |
| 4.KAYNAKLAR..... | 29 |
| ÖZGEÇMİŞ | 34 |

ŞEKİLLER

| | |
|---|----|
| Şekil 1. Dünyanın çeşitli bölgelerinde hesaplanmış osteoporotik kırık (yüzde) görülme verileri | 1 |
| Şekil 2. İn vivo çalışmada B-nHAP ve türevlerinin enjeksiyonunun yapılacağı deney grupları ve kontrol gruplarının şematik gösterimi..... | 7 |
| Şekil3. In vitro hücre kültürü çalışmalarında elde edilmiş TEM görüntülerindeki MKH'lerin sitoplazmik uzantıları ile seramiklerin hücreye alımı | 10 |
| Şekil4. In vitro hücre kültürü çalışmalarında elde edilmiş SEM görüntülerindeki MKH'lerin seramiklerle beraber hücre dışı matriks salgılaması | 11 |
| Şekil 5. İn vivo çalışmada B-nHAP ve türevlerinin enjeksiyonunun yapılacağı deney grupları ve kontrol gruplarının zaman-iş organizasyonunun şematik gösterimi | 12 |
| Şekil 6. Deneye katılan tavşanların Lunar DPX DXA cihazı ile kemik mineral yoğunluğu ölçümü | 13 |
| Şekil 7. B-nHAp seramiklerin enjeksiyonu; (A) malzemenin tavşan femur kemik iliğine enjeksiyonu, (B) enjeksiyon sonrası tavşan femurunda açılan deliğin kapatılması | 15 |
| Şekil 8. OVX uygulanmış deney gruplarından bir tavşandan çıkarılmış uterus | 16 |
| Şekil 9. Deneye katılan tavşan femurunda gerçekleştirilmiş mikro-BT analizinin Mimics yazılımındaki 3 boyutlu modellemesi..... | 16 |
| Şekil 10. Mimics programında deney grubundaki tavşanlardan birinin malzemeleri yüklenmiş üç boyutlu model hali..... | 17 |
| Şekil 11. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (xCELLigence, Roche Applied Science and ACEA, Bioscience, ABD) Hücre indeksi/Zaman(saat) tablosu. | 19 |
| Şekil 12. Invitro hücre kültürü deneyindeki osteojenik farklılaşma analizi excel tablosu | 20 |
| Şekil 13. Invitro hücre kültürü deneyindeki adipojenik farklılaşma analizi excel tablosu | 20 |
| Şekil 14. T ₀ ve T ₁ Zamanlarına Göre Her Bir Grup İçin Vücut Ağırlığı Değerlerinin Değişim Tablosu | 21 |
| Şekil 15. T ₀ ve T ₁ Zamanlarına Göre Her Bir Grup İçin KMY Değerlerinin Değişim Tablosu | 22 |
| Şekil 16. T2 zaman aralığında kemik mineral yoğunluğunun gruplara göre karşılaştırılması | 23 |

| | |
|--|----|
| Şekil 17. Mikro-BT ölçümlerinde elde edilen verilere göre KY'nin gruplara göre karşılaştırılma tablosu | 24 |
| Şekil 18. Mikro-BT ölçümlerinde elde edilen verilere göre KH'nin gruplara göre karşılaştırılma tablosu | 24 |
| Şekil 19. Mikro-BT ölçümlerinde elde edilen verilere göre Tb.Ka'nın gruplara göre karşılaştırılma tablosu | 25 |
| Şekil 20. Kontrol ve deney gruplarının basma ve üç nokta eğme biyomekanik testlerinden elde edilen veriler | 25 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

OP: Osteoporoz

OVX: Ovariyektomi

B: Bor

nHAp: Nano Hidroksiapatit

B-nHAp: Borlu nano hidroksiapatit

MKH: Mezenkimal kök hücre

μ -bT: Mikro bilgisayarlı tomografi

DXA: Dual enerji X-ray absorptiometre

KMY: Kemik mineral yoğunluğu

XO: Xylenol Orange

OTC: Oxytetracycline

VA: Vücut ağırlığı

UA: Uterus ağırlığı

KH: Kemik hacmi

KY: Kemik yüzeyi

Tb.Ka.: Trabeküler Kalınlık

1. GİRİŞ

Osteoporoz, zaman içinde kemiklerin ileri düzeyde kalsiyum kaybederek, delikli, zayıf ve kolay kırılabilir hale gelmesi ile seyir eden, kemik erimesi olarak bilinen, bir hastalıktır. Böylece kemiğin içyapısı ve kalitesi bozulur, vücudun kemik çatısı zayıflar, kırıklar ve duruş bozuklukları görülür (1). Bayanlarda özellikle vücuttaki östrojen miktarının azalması, menopoz, eksik beslenme ve hareketsizlik ile tetiklenen bu hastalık, erkeklerde de çeşitli etkenlerle ortaya çıkan ve günümüzde, dünya çapında, önemli sağlık problemlerinden biridir. Osteoporoz tanısı sonrasında uygulanan tedaviler hormon, mineral ve/ya vitamin takviyesi ile etkenleri ortadan kaldırmaya yönelik olabildiği gibi, hastalık sonucu oluşan kırıkların iyileştirilmesine yönelik de olabilmektedir.

| Bölge | Erkek | Kadın | Toplam | Yüzde | Kadın- Erkek Oranı |
|----------------|-------|-------|--------|-------|--------------------------|
| Afrika | 205 | 207 | 412 | 0,7 | 1,0 |
| Amerika | 2621 | 6375 | 8999 | 16,0 | 2,4 |
| Doğu Akdeniz | 746 | 789 | 1535 | 2,7 | 1,1 |
| Avrupa | 6650 | 13927 | 20577 | 36,6 | 2,1 |
| Güneydoğu Asya | 4169 | 4453 | 8622 | 15,3 | 1,1 |
| Batı Pasifik | 7067 | 9003 | 16069 | 28,6 | 1,3 |
| Dünya | 21457 | 34755 | 56212 | 100,0 | 1,6 |

O. Johnell 'ın makalesinden alınmıştır(2).

Şekil 1. Dünyanın çeşitli bölgelerinde hesaplanmış osteoporotik kırık (yüzde) görülme verileri

Seramik malzemeler günümüze kadar birçok kemik hastalığının tedavisinde ve dental problemlerin çözümünde kullanılmıştır. Gerek yapay kemik uygulamalarında gerekse ilaç taşıma sistemleri olarak seramikler kemiklerle sıkça kullanılan malzemelerdendir. Bu malzemelerde kemiğe uyumluk özelliğinin bulunması önemlidir. Çeşitli eser elementlerle kompozit seramik malzemeler tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Osteoporoz çalışmaları ise daha çok yeni kemik oluşumunu ve sağlamlığını destekleyici Stronsiyum, Kalsiyum, Bor gibi elementler ile gerçekleştirilmektedir. Bor kalsiyum ve D vitamini olmak üzere vücut minerallerinin

düzenlenmesinde rol oynadığı gibi kalsiyum ve magnezyumun azalmasını önleyerek kemik yapısını korur ve güçlendirir. Nano boyutlu malzemeler diğer boyutlardaki malzemelere oranla yüzey alanı etkileşimleri ve oluşturulan kompozitlerin sağlamlığı açısından oldukça avantajlılardır. Nano teknoloji ile geliştirilmiş seramik kompozitler de oldukça sık kullanılmaktadır(3,4).

Osteoporoz birçok hayvan modelinde çalışılmıştır (5,6,7,8). Literatür taramalarında, sıçan ve tavşan çalışmaları en sık görülen örneklerdendir. Çalışmamızda osteoporotik tavşan modeli kullanılarak hayvanların femur kemiklerine enjekte edilen borlu nano-hidroksiapatit seramiklerin (B-n-HAp) insan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile veya yalın olarak kemiklerin sağlamlığında ve mikro yapısında oluşabilecek değişiklikler gözlemlenmiştir. Tavşan femur kemiklerine enjekte edilen B-n-HAp'ın kemiğe etkilerinin histomorfometrik, histolojik, biyomekanik ve radyodensitometrik analizlerle değerlendirildiği çalışmamızda kemiklerin mikro yapısının iyileştirilmesi ve kemik sağlamlığını artırması hedeflenmiş ve uzun vadede osteoporoz sebepli oluşan kırıkların önüne geçilebilmesi, yenilikçi ve avantajlı bir tedavi yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamız Hacettepe Üniversitesi HÜTF (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi) Deney Hayvanları Araştırma ve Yetiştirme Ünitesi hayvan evi koşullarında barındırılan hayvanlar kullanılarak gerçekleştirilmiş, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiş ve Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (2013/01-01).

1.1. Literatür Özeti

Kemikler, kasları yapısal olarak destekleyen, hayati organları koruyan ve normalde hücrelerin çalışması için temel gereksinimlerden biri olan kalsiyumu depolayan yapılardır. Osteoporoz, zaman içinde kemiklerin ileri düzeyde kalsiyum kaybederek, delikli, zayıf ve kolay kırılabilir hale gelmesi ile seyir eden bir hastalıktır. Böylece kemiğin içyapısı ve kalitesi bozulur, vücudun kemik çatısı zayıflar (1). Osteoporoz menopoz sonrası kadınlarda sık görülür. Menopoz sonrası düşüş gösteren östrojen normalde kemik mineral yoğunluğunun artmasına ve kırık riskinin azalmasına neden olan steroid bir hormondur (9). Menopoz, östrojen miktarının azalmasına, dolayısıyla kemik mineral yoğunluğu düşmesine sebep olur. Osteoporoz yeni kemik

oluşumunun azalmasıyla, eski kemiklerin çok fazla yıkımıyla ya da her iki sebep bir arada gerçekleştiğinden olabilir. Vücudun kemik oluşumu için ihtiyaç duyduğu kalsiyum mineralinden yoksun kalması da hastalık etmenlerindedir. Bunlar dışında; uzun süreli yatak istirahati, kronik rheumatoid arthritis ve kronik böbrek hastalıkları, beslenme bozuklukları, genetik etkenler, 3 aydan fazla günlük kortikosteroid hormon kullanımı, hiperparatiroit rahatsızlığı ve D vitamini eksikliği osteoporoz nedenlerinden sayılmaktadır (10).

Osteoporoz çeşitli hayvan modellerinde ayrıntılı olarak çalışılmıştır. Bu modeller içerisinde hem kemik boyutlarının kemik iliğine implantasyon uygulamasına elverişli olması, hem de modelin tam ve hızlı bir şekilde gözlemlenebilmesi açısından, tavşan modeli en uygun seçenektir. İnsan kemik fizyolojisine ilişkin çalışmalarda tavşanın uygun bir model olduğu, kemik gelişimi ve maksimum kemik yoğunluğu profillerinin insanlardakine benzediği belirtilmiştir(11). Bu modelde aktif Haversiyen yenilenmesi ve hızlı iskelet olgunlaşması (7-8 ay) gözlemlenebilmektedir. Bunlara ek olarak tavşanların kemik döngüsü de oldukça hızlı seyretmektedir. Yani osteoporoz modeli alınabilecek en hızlı şekilde elde edilebilmektedir (12). Mori ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, ovariyektomi ile birlikte düşük kalsiyum diyeti uyguladıkları tavşanlarda yaptıkları implant denemesinin yanında operasyonu takiben kemik mineral yoğunluğu ölçümlerini gerçekleştirmişlerdir(13). Ovariyektomiden 4 hafta sonra kontrol grubu ile karşılaştırılan düşük kalsiyumlu diyet uygulanan deney grubunun kemik mineral yoğunluğunun %12 düşüş gösterdiği gözlemlenmiştir. Benzer birçok çalışmada tavşan osteoporoz modelinin avantajları vurgulanmıştır (14,15).

Günümüzde mezenkimal kök hücreler çeşitli hastalıklarda olduğu gibi kemik hastalıklarında da kullanılan ve geliştirilmeye devam edilen tedavi yöntemleri arasında yer almaktadır (16,17,18). Özellikle doku mühendisliği ve doku yenilenmesi çalışmalarında sıklıkla mezenkimal kök hücrelerden faydalanılmaktadır. Ye ve arkadaşları bir çalışmada bilateral ovariyektomi ile osteoporoz modeli oluşturulmuş tavşanlardan kemik iliği ve yağ kaynaklı mezenkimal kök hücreleri toplayıp osteojenik ve adipojenik potansiyellerini ölçerek bu otolog hücreleri kalsiyum alignat jel ile kapsülleyerek hayvanların femurlarına geri nakletmişler. Nakledilen bu hücrelerin osteojenik potansiyelleri ve kendini yenileyebilme özellikleri ile kemik iyileşmesine sebep olup olmadıklarını

incelemişler. Çalışma sonucunda, bu hücrelerin kemik yenilenmesini arttırdıklarını gözlemlemişlerdir (19). Başka bir çalışmada Wang ve arkadaşları ovariektomi ile osteoporoz modeli oluşturulmuş tavşanlarda normal ve ovariektomili tavşanlardan alınmış kemik iliği kaynaklı otolog mezenkimal kök hücreler toplanmış ve osteojenik besiyerinde farklılaştırılarak tavşanlara tekrar nakledilmiş. Bu çalışma sonucunda mezenkimal kök hücre naklinin tavşanlarda osteoporotik kemiğin kuvvetlendirilmesinde yardımcı etken olduğu gösterilmiştir (20).

Nanoteknoloji günümüzde hemen hemen her alanda yaygınlık kazanmaya başlayan bir konudur. Tekstilden, savunma sanayiine, kozmetikten sağlık sektörüne birçok alanda oldukça parlak ve gelişime açık bir alandır. Sağlık alanındaki nanoteknolojik gelişmeler son zamanlarda oldukça ivme kazanmıştır. Nanoteknolojik ürünler benzer daha büyük ölçekli ürünlere göre daha dayanıklı, daha sağlıklı, daha sağlam, daha hedefe yönelik olmayı amaçladığı için birçok hastalığın tedavisi için oldukça avantajlı görülmektedir.

Seramik malzemeler günümüze kadar birçok kemik hastalığının tedavisinde ve dental problemlerin çözümünde kullanılmıştır. Gerek yapay kemik uygulamalarında (21) gerekse ilaç taşıma sistemleri olarak (22) seramikler kemiklerle sıkça kullanılan malzemelerdendir. Bu malzemelerde kemiğe uyumluk ve osteokondüktif özellikler bulunması önemlidir. Çeşitli eser elementlerle kompozit seramik malzemeler kullanılmaktadır. Kalsiyum hidroksiapatit seramiklerin ortopedide kullanımını ele alan bir çalışmada bu malzemenin biyolojik olarak uyumlu ve mekanik özelliklerinin kemiğe yakın olmasının gerekliliği belirtilmiştir. Yapılan çalışmalar, kalsiyum hidroksiapatit seramiklerin osteokondüktif özellik taşıdığı ve organizmada yapay kemik olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bu seramikler kemiğin yerini tutabilecek malzemeler olmanın yanı sıra, kontrollü ilaç salım sistemi ve protezlerde yüzey kaplaması olarak da kullanım alanının bulunduğu bildirilmiştir (23). Bir başka çalışmada ise, sıra dışı mekanik özellikleri, esnemeye karşı dayanıklılığı ve yüksek biyouyumluluğu ile Zirkon- Alüminyum seramiğinin dental uygulamalarda kullanıldığından bahsedilmiştir (24). Literatürde bunlar gibi pek çok kemik problemine çözüm getirmeye yönelik çalışmalar bulmak mümkün. Osteoporoz çalışmaları ise daha çok yeni kemik oluşumunu ve sağlığını destekleyici Stronsiyum, Kalsiyum, Bor gibi elementler ile gerçekleştirilmiştir. Stronsiyum, hidroksiapatitler ile birlikte kullanımında kristallere tutunarak kemik korumasında yer

alır. Ayrıca kemik oluşumunu desteklerken aynı zamanda yıkımını da inhibe edici özelliğe sahiptir (25).

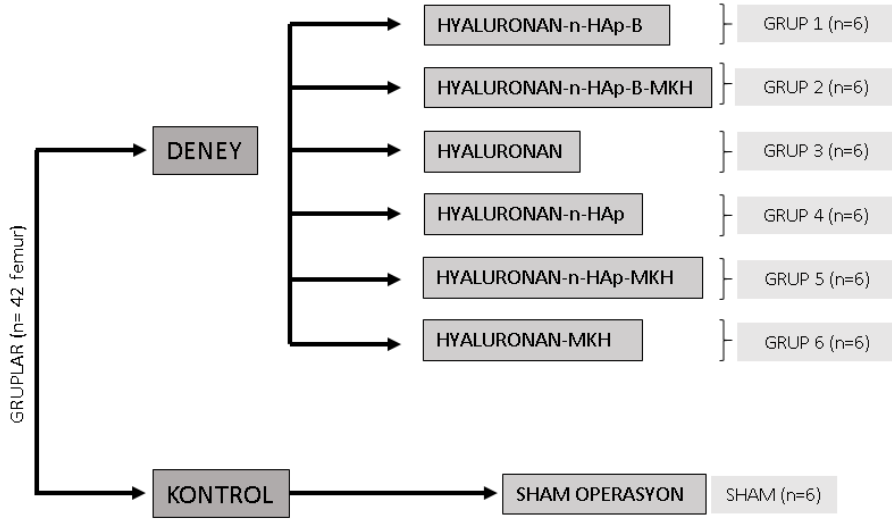
Borun türevlerinin ve bor içeren malzemelerin hücrelere olan toksisitesi sınırlı sayıda yayında gösterilmiştir. Bunlardan en kapsamlı olanı 2000 yılında yayınlanmıştır (26). Bu çalışmada dört adet bor türevinin (triethanolamine borate; N-diethyl-phosphoramidate-propylboronique acid; 2,2 dimethylhexyl-1,3-propanediol-aminopropylboronate and 1,2 propanediol-minopropylboronat) belirlenen biyolojik modeller (tavuk embriyo kıkırdağı ve fibroblast) üzerine olan toksisiteleri ve hücre dışı matrikse olan etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda bor türevlerinin fibroblastların çoğalması üzerinde olumlu ya da olumsuz etkisi olmadığı; fakat hem kıkırdak hem de fibroblastta hücre içi proteoglikan ve proteinlerin hücre dışına (besiyerine) çıktığı gösterilmiştir. Bu sonuç ise bor türevlerinin yara iyileşmesinde kullanılabileceği yönünde değerlendirilmiştir. Başka bir araştırmada bor emdirilmiş nanokristalin elmas filmlerin kemik yenilenmesi için potansiyelinin gözlemlenmesi üzerine çalışılmış aynı zamanda hücrelere toksik etkisi olup olmadığı da incelenmiştir. Çalışma sonucunda borun nanokristalin elmas filmlerin kemik doku rejenerasyonu potansiyelini arttırdığı ve artan bor seviyesinin belli bir oranda hücrelere zararlı bir etkisi olmadığı belirlenmiştir (27). Bir diğer bor çalışmasında (28) ise cerrahi kesim aletlerinde bulunan kübik bor nitritin toz halinde ve farklı konsantrasyonlarda insan nöroblastoma hücreleri ve insan artiriküler kondrositleri üzerindeki toksisitesine (MTT assay ile) ve çoğalmalarına (Xuorescence probe assay ile) olan etkilerine bakılmıştır. Yapılan çalışmada kübik bor nitritin tozun her iki hücre tipinde de çoğalmayı durdurduğu fakat yüksek dozlarda bile (40 µg/ml) hücre canlılığına zarar vermediği sonucuna verilmiştir. Bu proje kapsamında planlanan çalışmanın in vitro kısmına en yakın olan çalışma 2011 yılında yapılmıştır (29). Borun insan mezenkimal kök hücrelerinin kemik farklılaşmasına olan etkisi araştırılmıştır. Bor 0, 1, 10, 100 ve 1,000 ng/ml konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda sadece 1,000 ng/ml bor eklenen hücrelerin çoğalmasının inhibe olduğu görülmüştür. 10 ve 100 ng/ml bor ile etkileştirilen hücrelerin kontrole göre kemiğe daha fazla farklılaştığı saptanmıştır. Sonuç olarak ise doku mühendisliğinde borun insan mezenkimal kök hücreler ile birlikte kullanımının umut verici olabileceği belirtilmiştir.

Borun gavaj yolu ile alımının tavşan tibia ve femur kemiklerine, yüksek enerjili diyet desteği ile sağlamaştırıcı ve mineral yoğunluğunu arttırıcı etkileri olduğu da 2013 yılında yapılmış bir çalışmada gösterilmiştir. Çalışmada değişik konsantrasyonlarda uygulanan borun kalsiyum ve magnezyum konsantrasyonlarını arttırmasının yanı sıra kemik sağlamlığına da etkileri olduğu belirtilmiştir (30). Bakır salınımlı, bor içeren biyomühendislik ürünü biyoaktif cam bazlı hücre iskeletlerinin hücre yenilenmesine ilişkin çalışmada kemik yenilenmesine etkileri araştırılmış ve bu konuda olumlu sonuçlar elde edilmiştir (31). Farklı bir çalışmada ise Bor ve balık yağı kullanımının kemik trabeküler mikro yapısının sağlamlığına etkisi araştırılmıştır. Sonuçta, çalışma başarılı olmuş ve kemik trabeküler mikro yapısında gözlemlenebilir bir sağlamlık tespit edilmiştir (32).

1.2. Malzeme-Yöntem

1.2.1. Tasarım:

Altı aylık yerel ovariyektomili beyaz tavşanının femurları üzerinde prospektif kontrollü iki farklı çalışma tasarlandı. İn vitro deneyler ile de in vivo çalışmanın temeli oluşturuldu. Çalışmada bağımsız değişkenler gruplar (Şekil 1) ve zaman (Şekil 2) olarak; (a) DXA ile ölçülen KMY değişimi, (b) μ -BT ölçümleri ile elde edilen kemik hacmi (KH) (mm³), KH/trabeküler hacim (TH) (%), kemik yüzeyi (KY) (mm²), kesit alanı (KA) (mm²), KY/TH (1/mm), trabeküler model faktörü (Tb.Mf) (1/mm), trabeküler kalınlık (Tb.Ka) (mm), ve trabeküler yüzey (TY) (mm²); ile histomorfometri ise bağımlı değişkenler olarak kararlaştırıldı. Tüm prosedürler Helsinki Hayvan Hakları ve Türk Veteriner Tıp Deontoloji Yönetmeliğine (6343/2) uygundur. Hacettepe Üniversitesi Etik Kurulu bu çalışmayı onaylanmıştır(2013/01-01). Deney grupları (her bir grupta n=6), (1)Hyaluronan-B-n-HAp, (2)Hyaluronan-B-n-HAp-MKH, (3)Hyaluronan, (4)Hyaluronan-n-HAp, (5)Hyaluronan-n-HAp-MKH ve (6)Hyaluronan-MKH seramik malzemelerin cerrahi uygulamasının yapılması tasarlandı (Şekil 1) . Kontrol grubundaki tavşanlara(n=6) ise sham operasyon uygulandı. Bu sonuçlar ile istatistiksel power analiz (ANOVA) yapıldı. Anlamlılık(α) ve güç (β) değerleri sırasıyla 0.05 ve 0.95 olarak tespit edildi.



Şekil 2. *In vivo* çalışmada B-nHAP ve türevlerinin enjeksiyonunun yapılacağı deney grupları ve kontrol gruplarının şematik gösterimi.

1.2.2. *In vitro* Kök Hücre Deneyi:

1.2.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü:

Kemik iliği (Kİ) mononükleer hücreleri (MNH) Ficoll hypaque (1.077 g/L; Biochrom AG, Berlin, Germany) kullanılarak izole edildi. Hücreler düşük glukoz içeren Dulbecco's modified Eagle medium (LG-DMEM; Biochrom AG, Berlin, Germany), %10 fetal dana serumu (FCS; Biochrom AG, Berlin, Germany), %1 penicillin/streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Germany) içeren büyüme besiyerinde kültür edilerek bu besiyeri 3-4 günde bir değiştirildi. Adezyon özelliğinde olan hücreler %70 yoğunluğa ulaştığında %0.25 trypsin/1 mm EDTA kullanılarak süspansiyon hale getirildi ve tekrar di. Deneylerin hepsi pasaj 3 MKH'ler ile yapıldı.

1.2.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu:

1.2.2.2.1. Mezenkimal kök hücrelerin immunfenotiplendirilmesi: MKH'ler (Cat# PT-2501,lot#1F3422, LONZA) flow sitometri (Becton Dickinson FACS Aria; USA) cihazı ile analiz edildi. Hücre süspansiyonu phosphate-buffered saline (PBS) + %2 insan AB serumu + antikolar (mezenkimal marker olarak CD29, CD44, ve CD73; hematopoetik marker olarak CD45, CD14, HLA-DR, CD34 ile birlikte inkübe edildi

ve BD FACSDiva Software v6.1.2 yazılımı (Beckon Dickinson Biosciences, ABD) kullanılarak analizler yapıldı.

1.2.2.2.2.Mezenkimal kök hücrelerin farklılaştırılması: Yağa farklılaşma için MKH'ler büyüme besiyerine eklenen 1 mm deksametazon, 60 mm indometasin, 500 mm isobütilmetilksantin (IBMX) ve 5 mg/mL insülin içeren besiyeri ile birlikte kültür edilerek ve 21. gün sonrasında farklılaşan hücreler Oil Red O boyası ile boyandı. Kemik farklılaşması için MKH'ler büyüme besiyerine eklenen 100 nm deksametazon, 10 mm b-gliserofosfat ve 0.2 mm askorbik asit içeren besiyeri ile birlikte kültür edilerek 21. gün sonrasında farklılaşan hücreler Alizarin Red S boyası ile boyandı. Görüntüler ışık mikroskobu ile analiz edildi.

1.2.2.3. B-nHAP Seramik Malzemesinin MKH'lerin Çoğalma, Farklılaşma ve Morfolojisi Üzerine Etkisi:

B-nHAp seramik malzeme Ortadoğu Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği bölümü hocalarından Prof. Dr. Muharrem Timuçin hocanın uzun yıllardır üzerinde çalıştığı ve geliştirdiği çalışmasının ürünüdür. Kimyasal formülü $Ca_{10}(PO_4)_5.8(BO_4)0.2(OH)1.6$ olarak tanımlanabilir (31).

1.2.2.3.1.MKH'lerin gerçek zamanlı yapışma, çoğalma ve canlılık analizi: xCEELigence cihazı (Roche, ABD) hücre kültürünün yapıldığı E-plate'lerin altında yer alan mikro-elektrotlar ile yapışan özellikteki hücrelerin gerçek zamanlı olarak basıncını ölçerek onların çoğalma ve canlılığı hakkında bilgi veren bir sistemdir. Ölçüm için 9×10^3 MKH E-plate'e ekilerek 24 saat boyunca büyüme besiyeri içerisinde kültür edildi. Inkübasyonun sonunda B-nHAp seramik malzeme (10 μ g/mL) eklenerek 10 gün boyunca gerçek zamanlı analiz gerçekleştirildi. Bu zaman boyunca her 3-4 günde bir besiyeri değişimi yapıldı. Kontrol grubu olarak sadece büyüme besiyeri kullanılarak geliştirilen MKH'ler kullanıldı.

1.2.2.3.2.MKH'lerin farklılaşması: 15×10^3 MKH 12 kuyucuklu kültür kaplarında çoğaltıldı. Hücreler yeterli sayıya ulaştığında (kemik farklılaşması için %70, yağ farklılaşması için %100) B-nHAp seramik malzeme (10 μ g/ml) eklendi. 3 günlük inkübasyonun ardından B içeren besiyeri kaldırılarak yağ veya kemik farklılaşması için gerekli besiyerleri (yağ farklılaşması için; 1 mm deksametazon, 60 mm indometasin, 500 mm isobütilmetilksantin (IBMX) ve 5 mg/ml insülin içeren büyüme

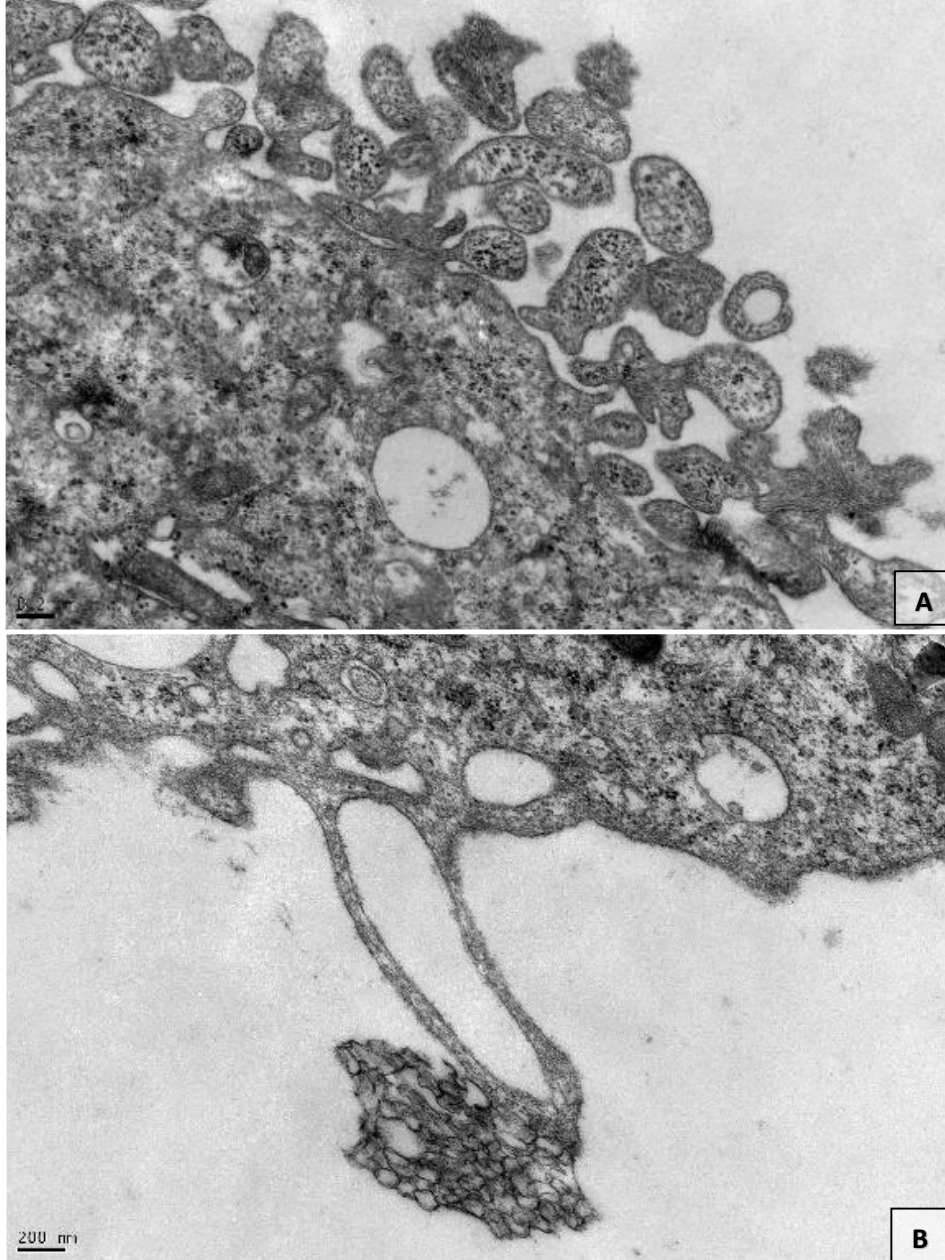
besiyeri; kemik farklılaşması için, 100 nm deksametazon, 10 mm b- gliserofosfat ve 0.2 mm askorbik asit içeren büyüme besiyeri) eklendi ve 3-4 günde bir değiştirildi. 21. günün sonunda hücreler fiske edilerek yağa farklılaşan hücreler morfolojik analiz için Oil Red O ile boyandı ve ışık mikroskopunda görüntüleme yapıldı. Kantitatif analiz için ise içerdikleri Oil Red O boyasının miktarı ELISA okuyucu kullanılarak ölçüldü. Kemiğe farklılaşan hücrelerin morfolojik analizi için hücreler Alizarin Red S boyası ile boyandı. Kantitatif analiz için ise içerdikleri kalsiyum miktarı Quantichrom Calcium Assay Kit (Bioassay Systems, USA) ile tayin edildi. Kontrol grubu olarak sadece büyüme besiyeri kullanılarak geliştirilen MKH'ler kullanıldı.

1.2.2.3.3. MKH'lerin morfolojik analizi: Geçirimli Elektron Mikroskopu (Transmission Electron Microscopy-TEM) analizi için 175 cm² olan kültür kaplarına 3x10⁵ hücre ekilerek, besiyeri 3-4 günde bir değiştirildi ve hücrelerin %70 doluluğa erişmesi sağlandı. Kültür süresinin bitiminde B-nHAp seramik malzeme (10 µg/mL) eklenerek 3 gün boyunca hücreler ile inkübe edildi. Daha sonra besiyeri kaldırılarak hücreler DMEM-LG içerisindeki %2'lik gluteraldehit solüsyonu ile 15 dakika; ardından PBS içerisindeki %2'lik gluteraldehit solüsyonu ile 1 saat fiske edildi. Fiksasyon sonrası hücreler hücre kazıyıcısı (cell scraper) ile kazınarak hücre peleti elde edildi ve pelet PBS içerisindeki %2'lik gluteraldehit solüsyonu ile tekrar fiske edildi. Fiksasyon işlemi sonrasında hücreler tekrar santrifüj edilerek 37 °C'de sıvı hale getirilmiş agaraya gömüldü. Oda ısısında sertleştirilen agarın içerisindeki hücre peletine doku örnekleri için uygulanan rutin elektron mikroskop takibi yapıldı. Kısaca, ozmiyum tetroksit ile post fiksasyon sonrası dereceli alkollerde dehidratasyon ve propilen oksit ile şeffaflandırma yapıldıktan sonra örnekler plastik bloklara gömüldü. Örneklerden elde edilen yarı ince ve ince kesitlerde yeni hücrelerin varlığı ve ultrastrüktürel özellikleri elektron mikroskop altında değerlendirildi. Kontrol ve deney gruplarındaki yeni hücre oranları semi-kantitatif yöntemler ile karşılaştırıldı.

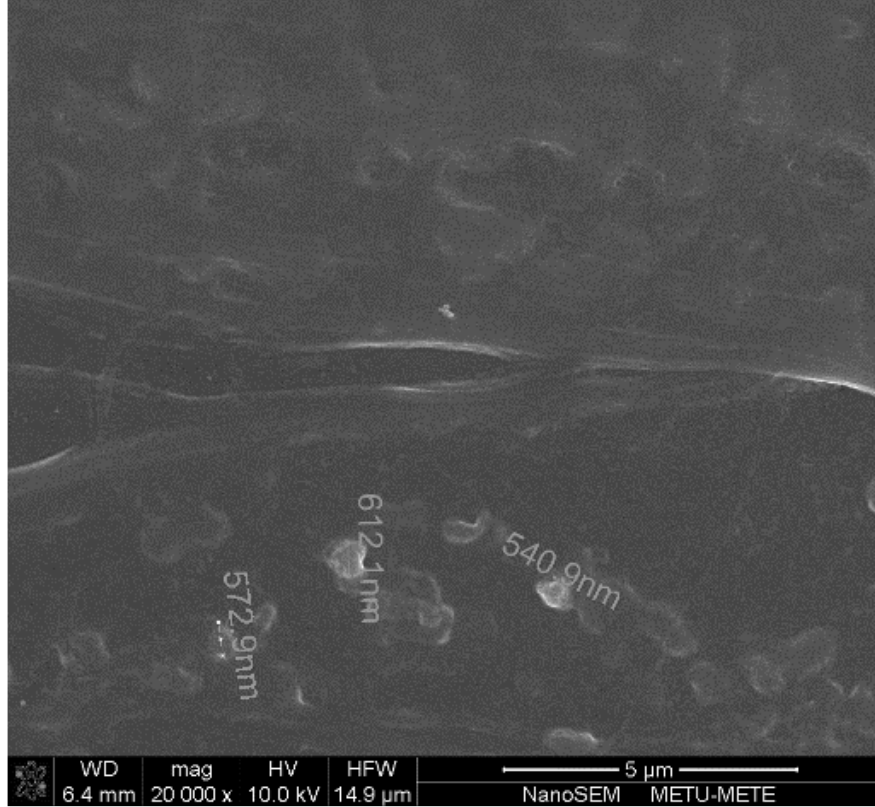
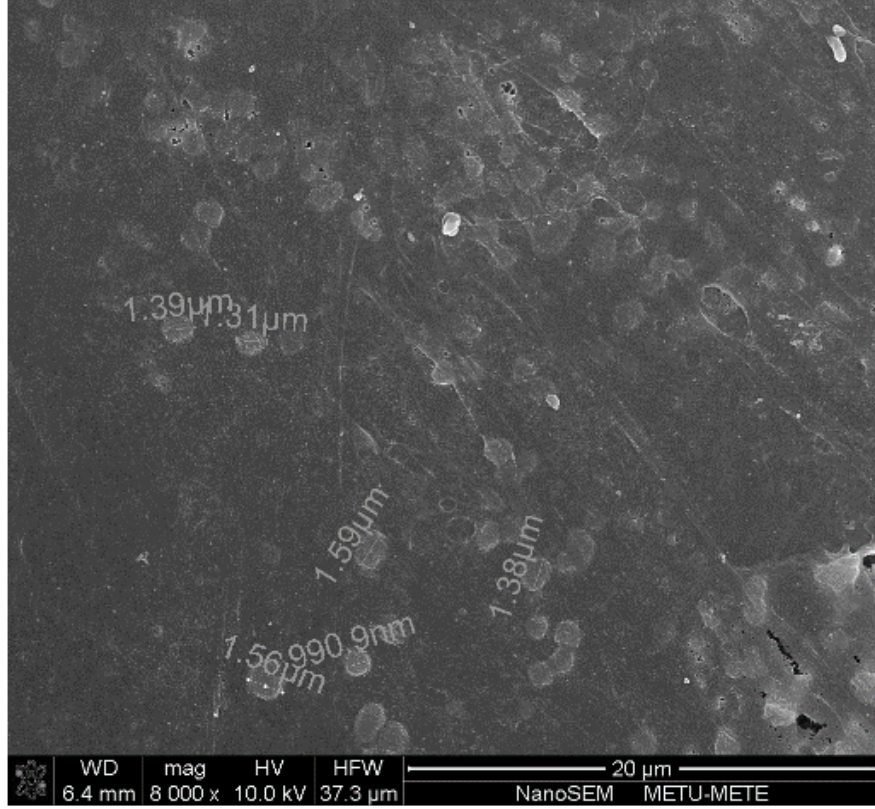
Taramalı elektron mikroskopik (Scanning Electron Microscopy-SEM) analiz için 6 kuyucuklu kültür kaplarına 18x10⁴ hücre ekilerek besiyeri 3-4 günde bir değiştirildi ve hücrelerin %70 doluluğa erişmesi sağlandı. Kültür süresinin bitiminde B-nHAp seramik malzeme (10 µg/ml) eklenerek 3 gün boyunca hücreler ile birlikte inkübe edildi. Ardından besiyeri kaldırılarak hücreler DMEM-LG içerisindeki %2'lik gluteraldehit solüsyonu ile 15 dakika; ardından PBS içerisindeki %2'lik gluteraldehit

solüsyonu ile 1 saat fiske edildi ve alkollerden geçirilerek kurutulduktan sonra altınla kaplanarak incelendi.

Konfokal Mikroskopisi için 1×10^5 hücre $0.5 \mu\text{l}$ DiL boyası ile boyanarak 35 mm'lik konfokal kültür kaplarına ekildi. Hücreler %70 doluluğa ulaştığında B-nHAp seramik malzeme ($10 \mu\text{g/ml}$) eklenerek 3 gün boyunca hücreler ile birlikte inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında konfokal mikroskop ile görüntüleme analizi gerçekleştirildi.



Şekil3. In vitro hücre kültürü çalışmalarında elde edilmiş TEM görüntülerindeki MKH'lerin sitoplazmik uzantıları ile seramiklerin hücreye alımı. (A)'da çok sayıda hücre uzantısı, (B)'de ise bir tane sitoplazmik uzantının seramiği uzanarak alışı gösteriliyor



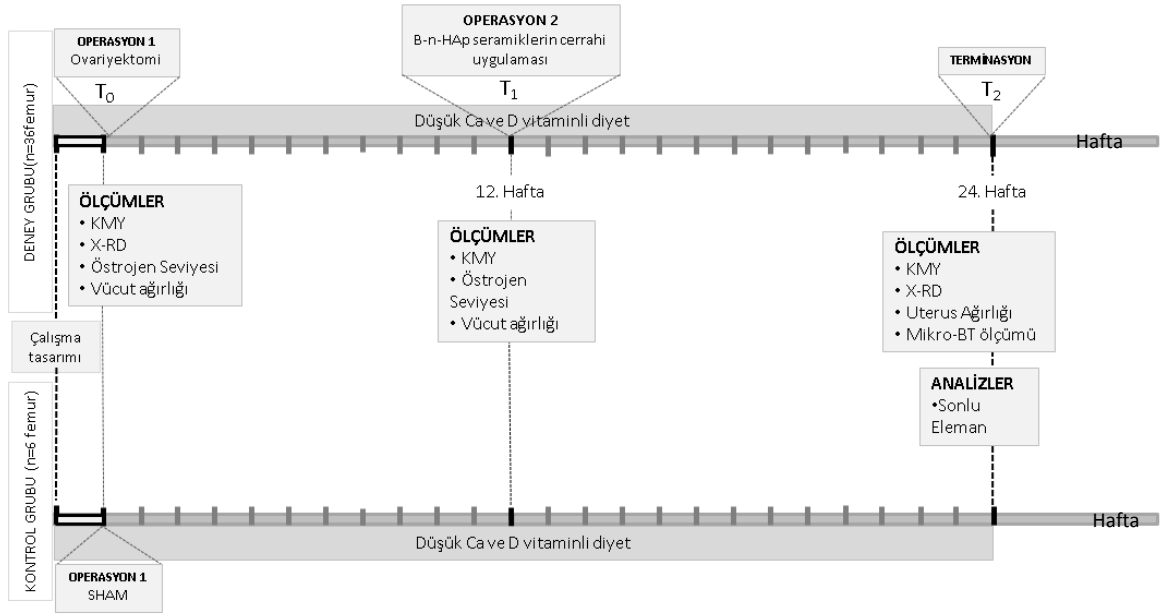
Şekil4. *In vitro* hücre kültürü çalışmalarında elde edilmiş SEM görüntülerindeki MKH'lerin seramiklerle beraber hücre dışı matriks salgılaması (Fotoğraflarda nanoyapılı parçacıkların boyutları verilmiştir)

1.2.3. İn vivo Hayvan Deneyi:

Kobay Tavşancılık'dan temin edilen 6 aylık 25 adet beyaz dişi yerel tavşan (*Oryctolagus cuniculus* L) Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu kararı (2013/01-01) ile çalışmamızda kullanıldı. Hayvanlar deney süresince standart (50X80X50 cm) boyutlarda, paslanmaz çelik kafeslere, her kafeste bir tavşan olacak şekilde barındırıldı. Tüm hayvanların su ve D vitamini ile Ca minerali düşük özel tavşan pelet yemlere (Bil-Yem, Ankara, Türkiye) sınırsız ulaşimleri sağlandı.

Deney başlangıcında veteriner hekim tarafından sağlık kontrolleri sağlanan hayvanlar kontrol (n=3) ve deney grubu (n=18) olmak üzere iki ana gruba ayrıldılar (Şekil 1). Deney grubu da kendi içerisinde 6 gruba, herhangi bir gruba dahil olmayan 4 adet tavşan ise olası aksiliklere karşı yedek grubu olarak ayrıldı. Kontrol grubundaki hayvanlar yalancı ovariyektomi (sham operasyon) işlemine tabi tutuldu.

Ovariyektomi ile implantasyon operasyonları arasında 12 hafta, implantasyon ile terminasyon arasında ise 6 hafta beklendi (Şekil 2).



Şekil 5. İn vivo çalışmada B-nHAP ve türevlerinin enjeksiyonunun yapılacağı deney grupları ve kontrol gruplarının zaman-iş organizasyonunun şematik gösterimi.

Terminasyon aşamasında Hacettepe Üniversitesi HÜTF (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi) Deney Hayvanları Araştırma ve Yetiştirme Ünitesi hayvan evi bünyesinde yetkili veteriner eşliğinde CO₂ verilerek gerçekleştirildi. Sakrifikasyon sonrası enjekte edilen malzemeyi içeren femur kemikleri çıkartılarak testler için uygun hale getirildi.

Deney süresince deney grubundan enfeksiyon sebebi ile 4 adet tavşan deney prosedürüne katılmayarak erken termine edilerek çalışma dışında kaldı. Çalışma dışı bırakılan tavşanların yerlerine yedek grubundaki tavşanlar getirildi.

1.2.3.1. Kemik Mineral Yoğunluğu Ölçümleri

Çalışma boyunca hayvanların ovariyektomi operasyonu öncesinde, malzeme enjeksiyonundan önce ve sakrifikasyon sonrasında olmak üzere toplamda 3 defa kemik mineral yoğunluğu (KMY) ölçümü yapıldı. Ölçümlerde Ortadoğu Teknik Üniversitesi Sağlık ve Rehberlik Merkezinde bulunan kemik mineral yoğunluğu ölçümünde kullanılan Lunar DPX (Lunar Radiation Corp. Madison, ABD) çift enerjili kemik dansitometre (DXA) cihazı kullanıldı ve ölçüm modu 140/70 kVp, 2.0 mA ve 60 Hz olarak belirlendi. Ölçümden önce deneklere uygun doz anestezi (3-5 mg/kg Ksilazin ve 20-25 mg/kg Ketamin HCl) uygulanacaktır. Bu cihazda bulunan küçük deney hayvanları için geliştirilmiş (Lunar, DPX-IQ (Madison, Wisconsin, ABD) osteoporoz analiz programının verdiği değerler ışığında kemik mineral yoğunluğunun durumu takip edilmiştir.



Şekil 6. Deneye katılan tavşanların Lunar DPX DXA cihazı ile kemik mineral yoğunluğu ölçümü

1.2.3.2. Ovariyektomi

Cerrahi bölge, IM anestezi enjeksiyonun (3-5 mg/kg Ksilazin – Alfazyne, Ege Vet, İzmir, Türkiye ve 20-25 mg/kg Ketamin HCl- Alfamine, Ege Vet, İzmir, Türkiye) sonrasında tıraşlandı ve antiseptik ile temizlendi. Bakteriyel enfeksiyonu ve operasyon sonrası ağrıları önlemek için sırasıyla, 10 mg/kg Amikasin (Amikositis, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve 4 mg/kg Meloksikam (Maxicam, Sanovel, İstanbul, Türkiye) IM olarak uygulandı. Tavşanın idrar kesesi boşatıldı ve ön karın kısmı kesilerek, ksifoid'den pubise kadar açıldı. İdrar kesesinin kranial ucunun üst kısmını merkez alan, yaklaşık olarak pubisin kranial dudağı ile umbilikus arasındaki mesafenin yarısı kadar (2.0-3.0 cm'lik) ventral orta hat insizyonu gerçekleştirildi. Abdominal boşluğa Stab insizyon yapmak için linea alba abdominal içerikten ayrıldı. Kesik kranial veya kaudal olarak genişletildi ve abdominal kaslar bilateral olarak ayrıldı. Rahim boynuzları bulundu ve ovaryumları tespit etmek için kranial olarak takip edildi. Asıcı bağ ve ovaryum damarları klamplendi ve bağlandı. Ovaryumlar ligatürlerin arasından çıkartıldı. Kesik, basit devamlı 4-0 emici suture malzemesi ile kapatıldı. Cerrahi bölge likit bandaj ile spraylendi (Opsite Spray, Smith & Nephew, Londra, İngiltere). Sham grup operasyonunda ise yukarıda anlatıldığı gibi, operasyon klempleme ve organ çıkartma olmadan ovaryumların görülmesi ile tamamlandı.

1.2.3.3. Vücut Ağırlığı ve Kanda Östrojen Seviyesi Ölçümleri

Bu ölçümler genel anestezi altındaki tavşanlara Hacettepe Üniversitesi Cerrahi Araştırmalar biriminde uygulandı. Deneş süresince OVX (T₀) ve seramik malzeme enjeksiyonu öncesinde (T₂) birer defa ölçüldü. Her iki ölçüm de osteoporoz modelinin oluşup oluşmadığını daha çok veri ile desteklemek amacıyla yapıldı.

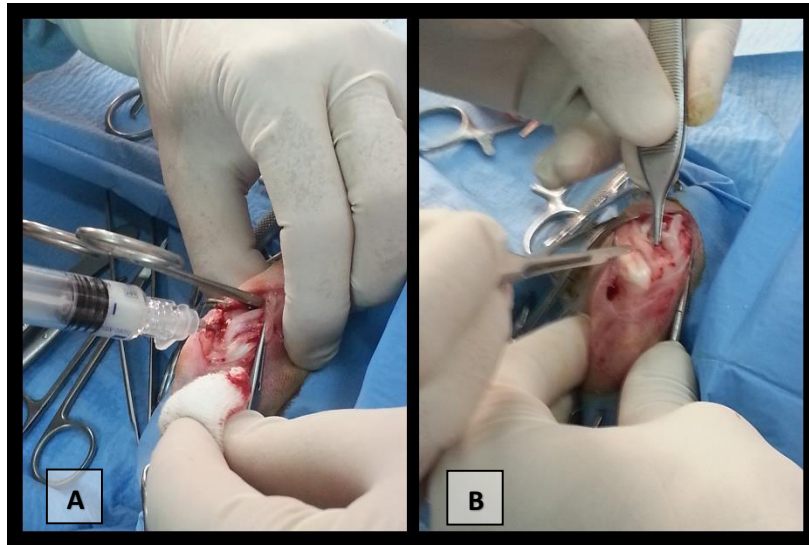
1.2.3.4. B-n-HAp Seramiklerin Cerrahi Uygulaması

B-n-HAp ve diğer malzemeler, deneş gruplarına T1 zamanında (şekil 2), KMY'ndeki ve kan östrojen seviyesindeki değişimlere göre gözlemlenen OP modeli oluştuktan sonra cerrahi uygulama yapılması uygun görüldü.

Bu aşamada kullandığımız B-nHAp seramik malzememiz Ortadoğı Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliğı bölümü hocalarından Prof. Dr. Muharrem Timuçin hocanın uzun yıllardır üzerinde çalıştığı

ve geliştirdiği çalışmasının ürünüdür. Kimyasal formülü $Ca_{10}(PO_4)_5.8(BO_4)_{0.2}(OH)_{1.6}$ olarak tanımlanabilir.

0,0375 mg toz seramik malzeme ile 0,625 ml hyaluronan (ADANT, Sodyum Hyaluronan, Tramedico B.V., Weesp, Hollanda) karıştırılarak kemik iliğine enjekte edilebilir hale getirildi. Yeterli bir genel anestezi altında, daha sonra anti-mikrobiyal ve steroid içermeyen anti- inflamatör ilaçlar OVX'de anlatıldığı gibi verildi ve diz bölgesi genişçe tıraş edildi. Tavşanlar operasyon masasına sırtüstü bir şekilde sabitlendi ve operasyon bölgesi temizlendi ve operasyonu sterilliği için steril ameliyat örtüsü örtüldü. Medial parapatellar kesme operasyonu distal femurdan distal tibiaya doğru 4 cm uzunluğunda bir kesik yapılarak gerçekleştirildi. Diz kapağı boşluğunu görmek için diz kapağı lateral olarak kaydırıldı. Diz kapağı boşluğu, düşük hızlı elektrikli matkap ve 3 mm'lik matkap ucuyla kemik iliği kanalına girmek için delindi. HAP seramik malzeme femurun proksimal bölgesinde açılan bu delikten 16lık intravenöz kataterin ucu sokuldu ve yavaşça geri çekilerek enjekte edildi. Enjekte edilen malzemeler taşıyıcı olarak Hyaluronan(ADANT, Sodyum Hyaluronan, Tramedico B.V., Weesp, Hollanda) kullanılarak kemiğe uygulandı.



şekil 7. B-nHAp seramiklerin enjeksiyonu; (A) malzemenin tavşan femur kemik iliğine enjeksiyonu, (B) enjeksiyon sonrası tavşan femurunda açılan deliğin kapatılması

Enjeksiyondan sonra küçük parçalar halinde bone wax kullanılarak açılan delik kapatıldı. Eklem kapsülü ve hipodermis ayrı katmanlar halinde kapatılması sağlandı.

Daha sonra, deri Ford interlocking modeli ile dikildi. Cerrahi bölge likit bandaj ile kaplandı.

1.2.3.5. Tavşanların Termine Edilmesi

Çalışmalar sonunda (24. hafta) bütün hayvanlar Hacettepe Üniversitesinde uzman veteriner hekim eşliğinde yüksek-doz anestezi ile sonlandırılarak malzeme etkileşimleri için her iki femurları da cerrahi operasyonlar ile dikkatlice yerlerinden çıkartıldı. Çıkartılan femurlar formol solüsyonunda buldukları kabın dışı örnekler ışıktan etkilenmeyecek şekilde sarılı olarak muhafaza edildi.

1.2.3.6. Tavşanların Uterus Ağırılıklarının Ölçülmesi

Termine edilmiş tavşanların son olarak uterusları çıkartıldı ve tartıldı. OVX geçirmiş tavşanların uteruslarında ($1,80 \pm 0,86$ gr) kontrol grubuna ($10,16 \pm 3,40$ gr) göre belirgin bir düşüş görüldü. Östrojen eksikliğinden dolayı bu beklenen bir durumdur.

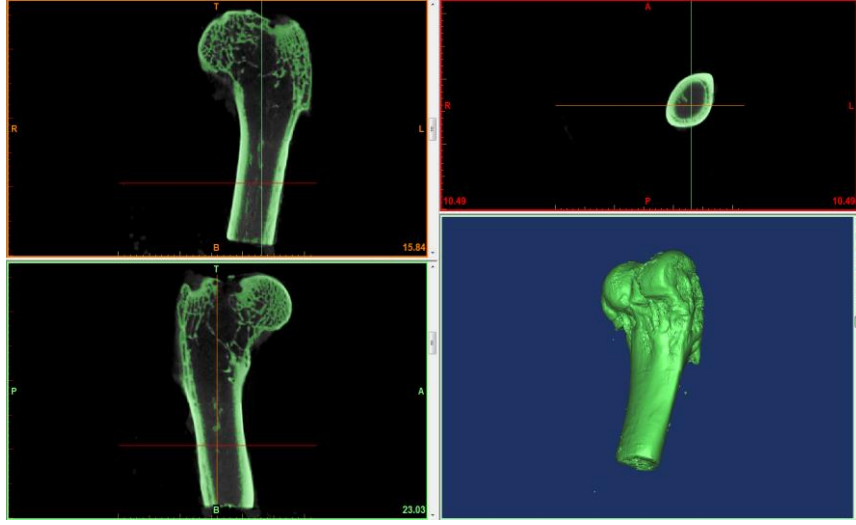


Şekil 8. OVX uygulanmış deney gruplarından bir tavşandan çıkarılmış uterus

1.2.4. Mikro Bilgisayarlı Tomografi, 3D Modelleme ve Sonlu Eleman Analizi

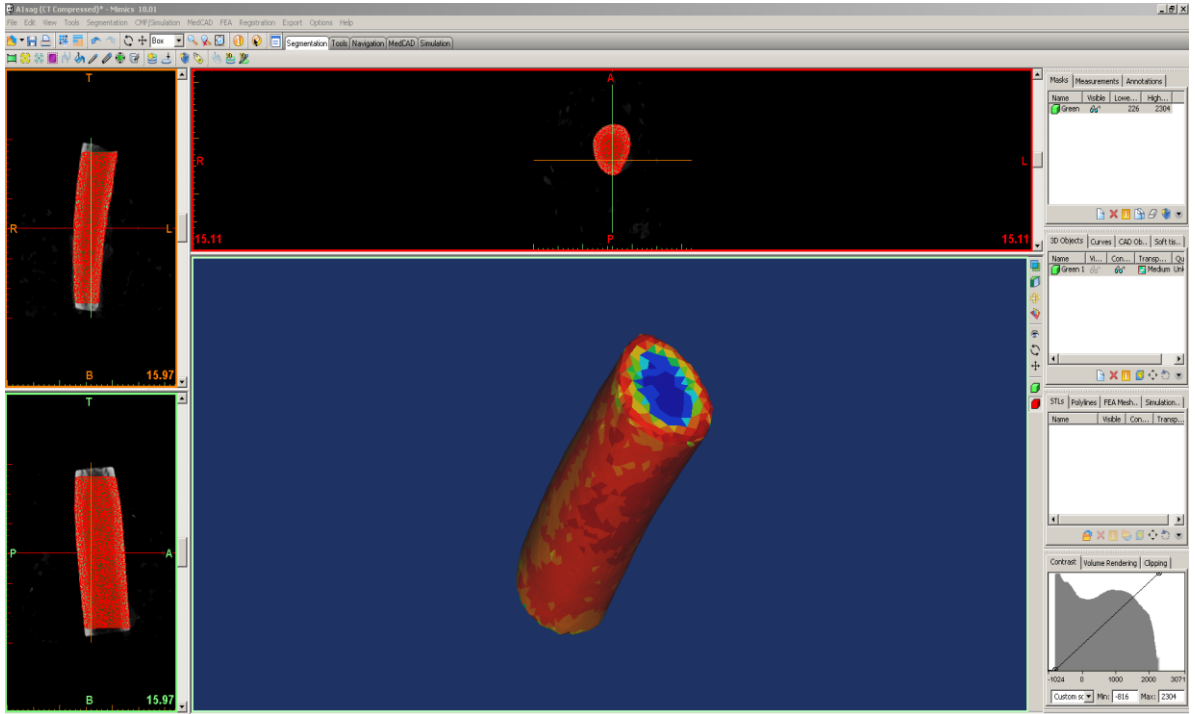
μ -bT ölçümleri Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Bölümü'nde bulunan Skyscan 1174 (Bruker-Skyscan, Kontich, Belçika) masa üstü mikro-tomografi cihazında gerçekleştirildi. Cihaz boyutundan dolayı kemikler yaklaşık olarak üç eşit parçaya bölündü ve her bir femur parçasından $66,0 \mu\text{m}$ kalınlığında 50kV ve $800\mu\text{A}$ 'de kesit görüntüleri elde edildi. Görüntülerdeki kirliliği engellemek amacıyla alüminyum filtre kullanılmamıştır. Yaklaşık olarak her bir parça için 500 görüntünün çekimleri örneklerin 360° ($0,70^\circ$ açısız adım ile) dönüşü ile yapılmıştır. Ölçüm verilerinden elde edilen 2 boyutlu özelliklerin 3 boyuta aktarılması CTAn (Skyscan,

Bruker microCT, CT Analyser v.1.10.1.0, Kontich, Belçika) yazılımı ile gerçekleştirildi.



Şekil 9. Deneye katılan tavşan femurunda gerçekleştirilmiş mikro-BT analizinin Mimics yazılımındaki 3 boyutlu modellemesi

Tomografi çekimlerinden elde edilen 3 boyutlu modellerin Mimics (Materialize, v10.2.1.2, Leuven, Belçika) yazılımı ile ilgili alanları seçildi ve μ -bT verilerine göre malzeme yüklemesi yapıldı.



Şekil 10. Mimics programında deney grubundaki tavşanlardan birinin malzemeleri yüklenmiş üç boyutlu model hali

Malzeme yüklemesi doğrultusunda ANSYS (Mechanical APDL, Release 14.5, Pensilvanya, ABD) programı ile sanal ortamda basma ve üç nokta eğme biyomekanik testleri gerçekleştirilmiştir. Testlerde kemiklerin sanal ortamda birleştirilmesi mümkün olmadığından dolayı en doğru sonucun midshaft kısmından alınılacağı düşünülerek kemiklerin bu parçalarında uygulamalar gerçekleştirildi.

Basma testinde kemik parçasının bir ucu sabit alınarak diğer ucundan 235N'luk bir bileşke kuvvet uygulandı. Uygulanan kuvvetin kemik nokta bulutundaki her bir noktaya uyguladığı basınç hesaplanarak kaydedildi.

Üç nokta eğme testinde ise kemiğin iki u noktası sabitlendi ve tam orta noktasından 235N'luk bileşke kuvvet uygulandı. Yine uygulanan kuvvetin kemik nokta bulutundaki her bir noktaya uyguladığı basınç hesaplanarak kaydedildi.

1.2.5. İstatistiksel Analizler

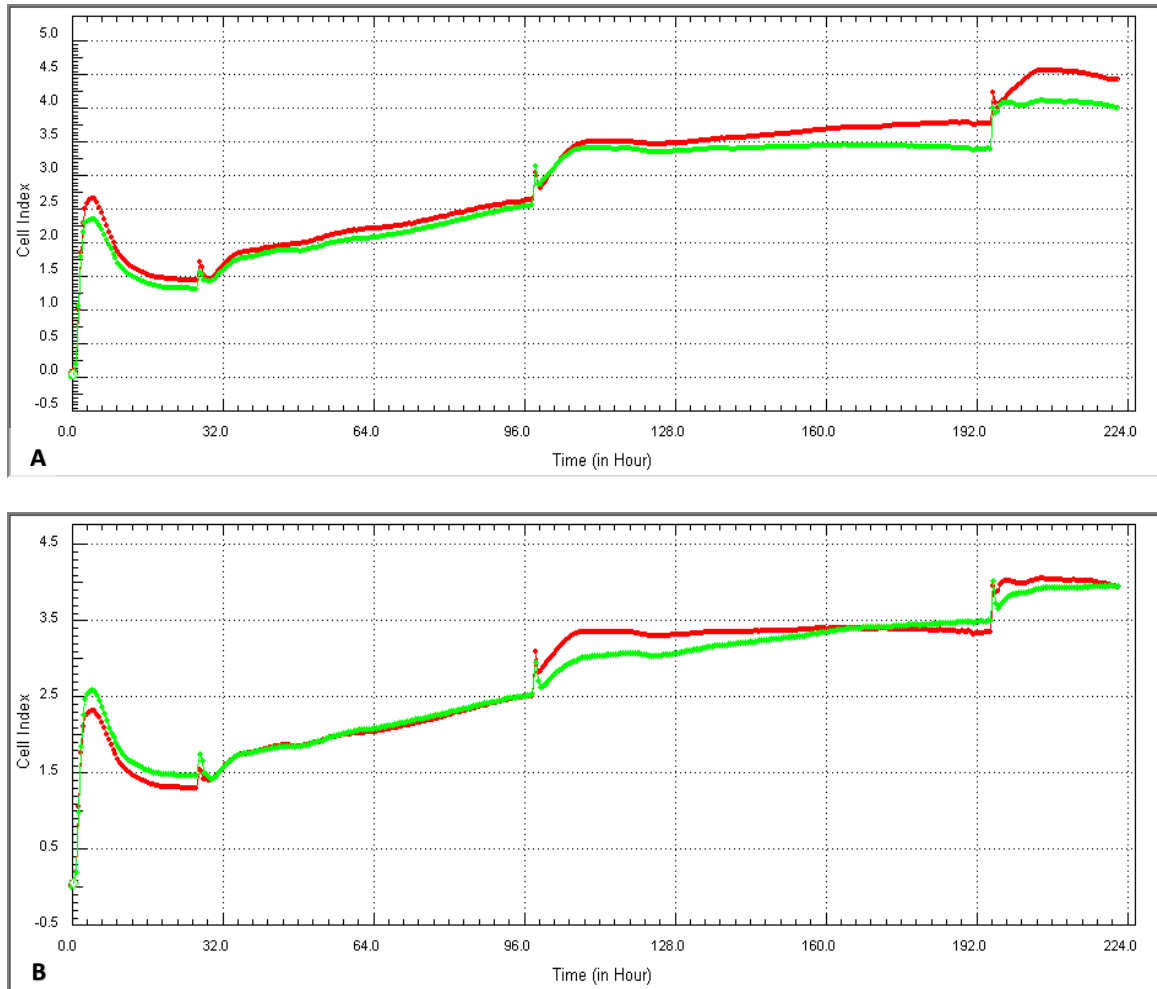
Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 22.0 paket programı kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen değişkenleri ikiden fazla olan gruplar arasındaki genel karşılaştırmada Kruskal Wallis testi, gruplar arası ikili karşılaştırmalarda ise Mann Whitney U testi kullanıldı. İlk - Son gibi normal dağılım göstermeyen iki bağımlı değişkenlerin karşılaştırmasında Wilcoxon Signed Rank testi uygun görülürken, grup içi karşılaştırmalarda Friedman testi, korelasyon için ise Spearman testi uygulandı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak belirlendi.

2. SONUÇLAR

2.1. MKH ile B-nHAP Etkileşimleri:

2.1.1. MKH'lerin Gerçek Zamanlı Yapışma, Çoğalma Ve Canlılık Analizi Sonuçları:

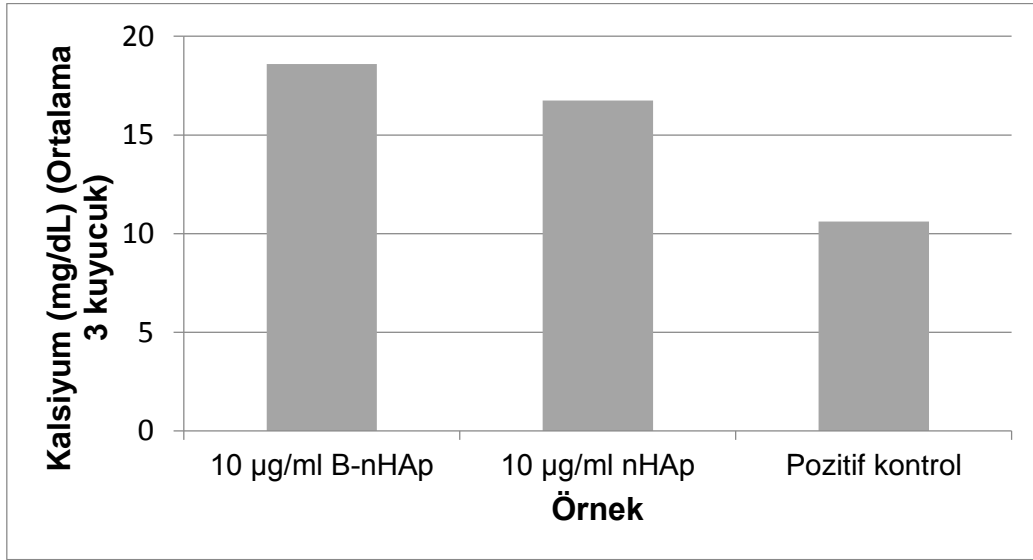
Değerlendirme sonuçlarına göre 9 gün içerisinde nHAp ile inkübe edilmiş olan MKH'lerin gelişimi kontrol grubu ile benzer eğri gösterirken, hücre indekslerinde B-nHAp ile inkübe edilmiş MKH'lerin (4.50 hücre indeksi) gelişiminin kontrol hücrelerinininkinden (4.00 hücre indeksi) daha fazla artış gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil xx). TEM ve SEM analizlerine göre de B-nHAp içeren MKH'lerin sağlıklı ve homojen bir morfolojiye sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 11).



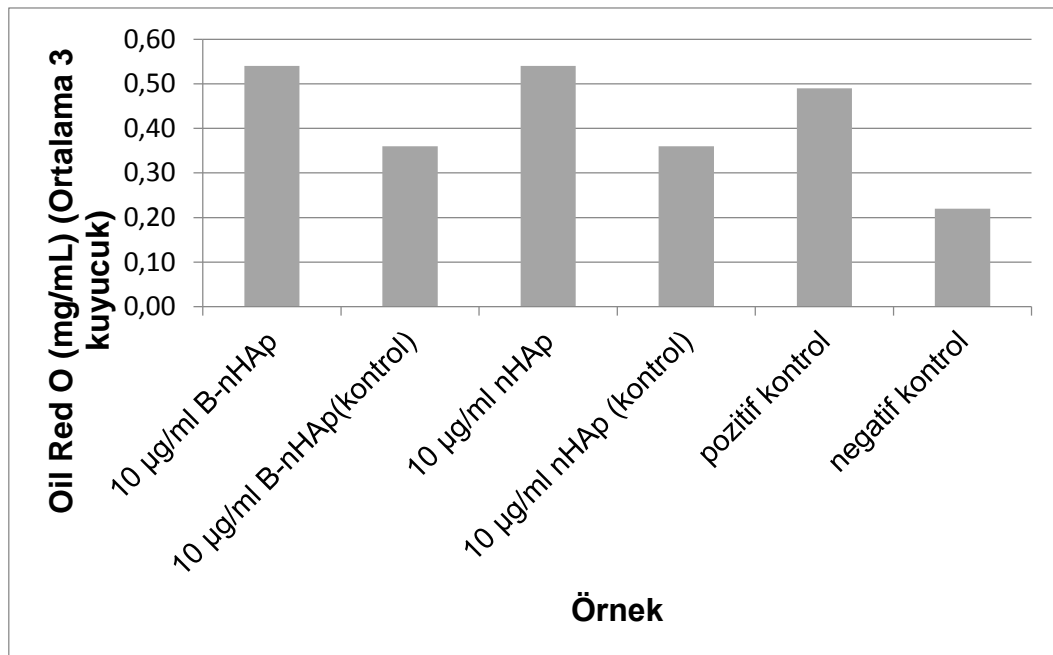
Şekil 11. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (xCELLigence, Roche Applied Science and ACEA, Bioscience, ABD) Hücre indeksi/Zaman(saat) tablosu. (A)'da yeşil hat kontrol hücrelerini, kırmızı hat B-nHAp içeren hücreleri, (B)'de ise yeşil hat nHAp içeren hücreleri, kırmızı hat ise kontrol hücrelerini göstermektedir.

2.1.2.MKH'lerin Farklılaşma Analizi Sonuçları:

Osteojenik farklılaşma belirteci kalsiyum seviyesi yapılan ölçümlerde B-nHAp içeren MKH'lerde (18,6mg/dL) nHAp içeren MKH'lerdekine (16,8mg/dL) göre daha yüksek olarak gözlemlenmiştir (Şekil12). Adipojenik farklılaşma sonuçlarına bakıldığında ise B-nHAp ve nHAp içeren hücrelerin benzer ve kontrol grubundan fazla değerler gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil13).



Şekil 12. Invitro hücre kültürü deneyindeki osteojenik farklılaşma analizi excel tablosu

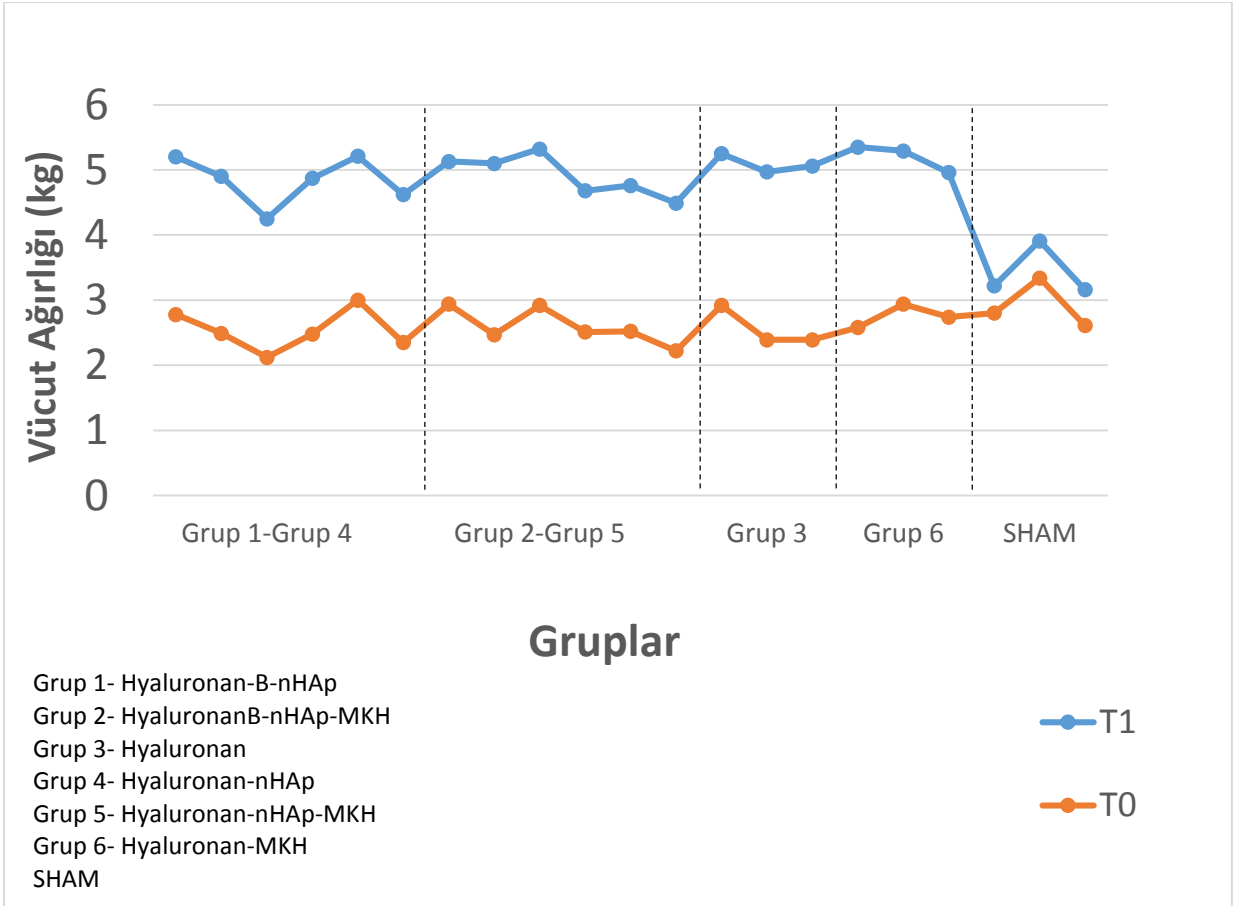


Şekil13. Invitro hücre kültürü deneyindeki adipojenik farklılaşma analizi excel tablosu

2.2. OP Modelinin Oluşumunu Destekleyen Veriler:

2.2.1. Vücut Ağırlığı Ölçüm Sonuçları:

Vücut ağırlıklarının T_0 ve T_1 zamanlarındaki ölçümleri karşılaştırıldığında beklenildiği üzere kontrol grubunda ciddi bir artış görülmezken OVX uygulanmış gruplarda artmıştır.



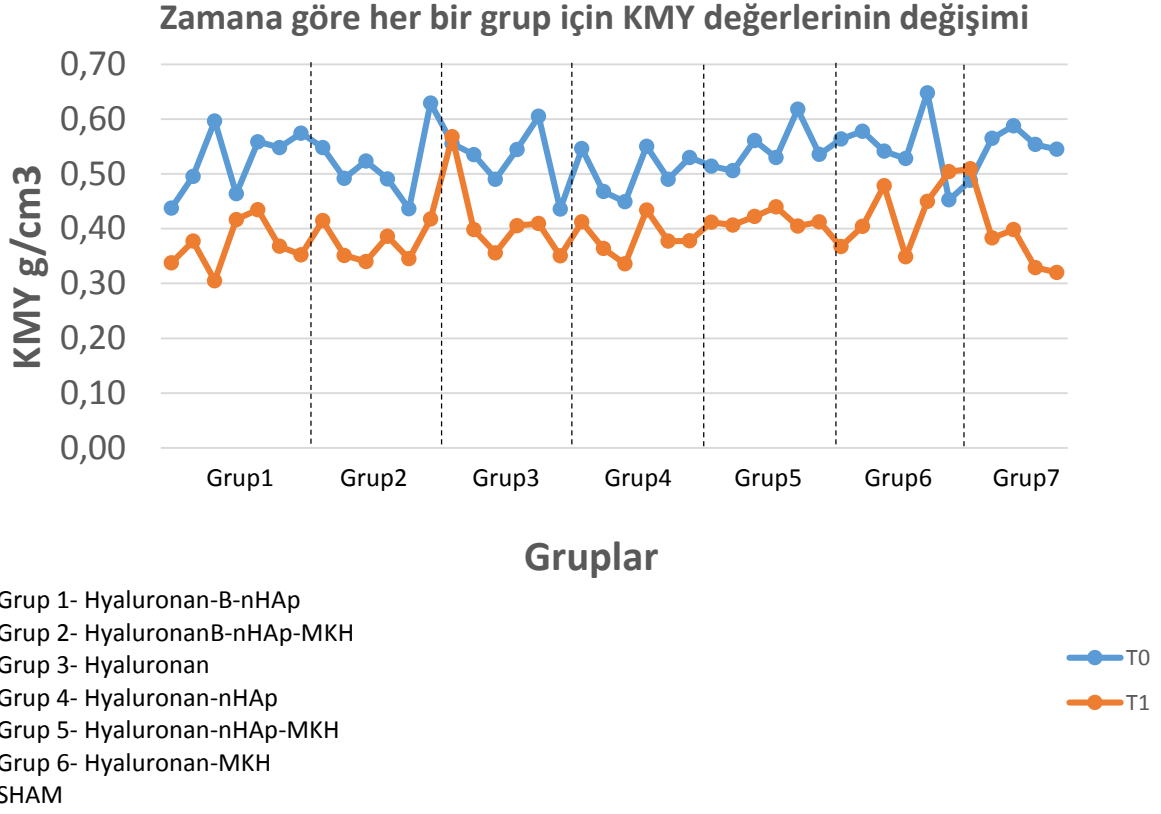
Şekil 14. T_0 ve T_1 Zamanlarına Göre Her Bir Grup İçin Vücut Ağırlığı Değerlerinin Değişim Tablosu

2.2.2. Kanda Östradiol Seviyesi Ölçüm Sonuçları:

Kanda östradiol miktarı ölçümü ile kontrol grubu ($10,2 \pm 3,4$ gr) ile karşılaştırılan OVX gruplarımızda ($1,8 \pm 0,9$ gr) utreus ağırlıklarında çok net bir düşüş olmuştur.

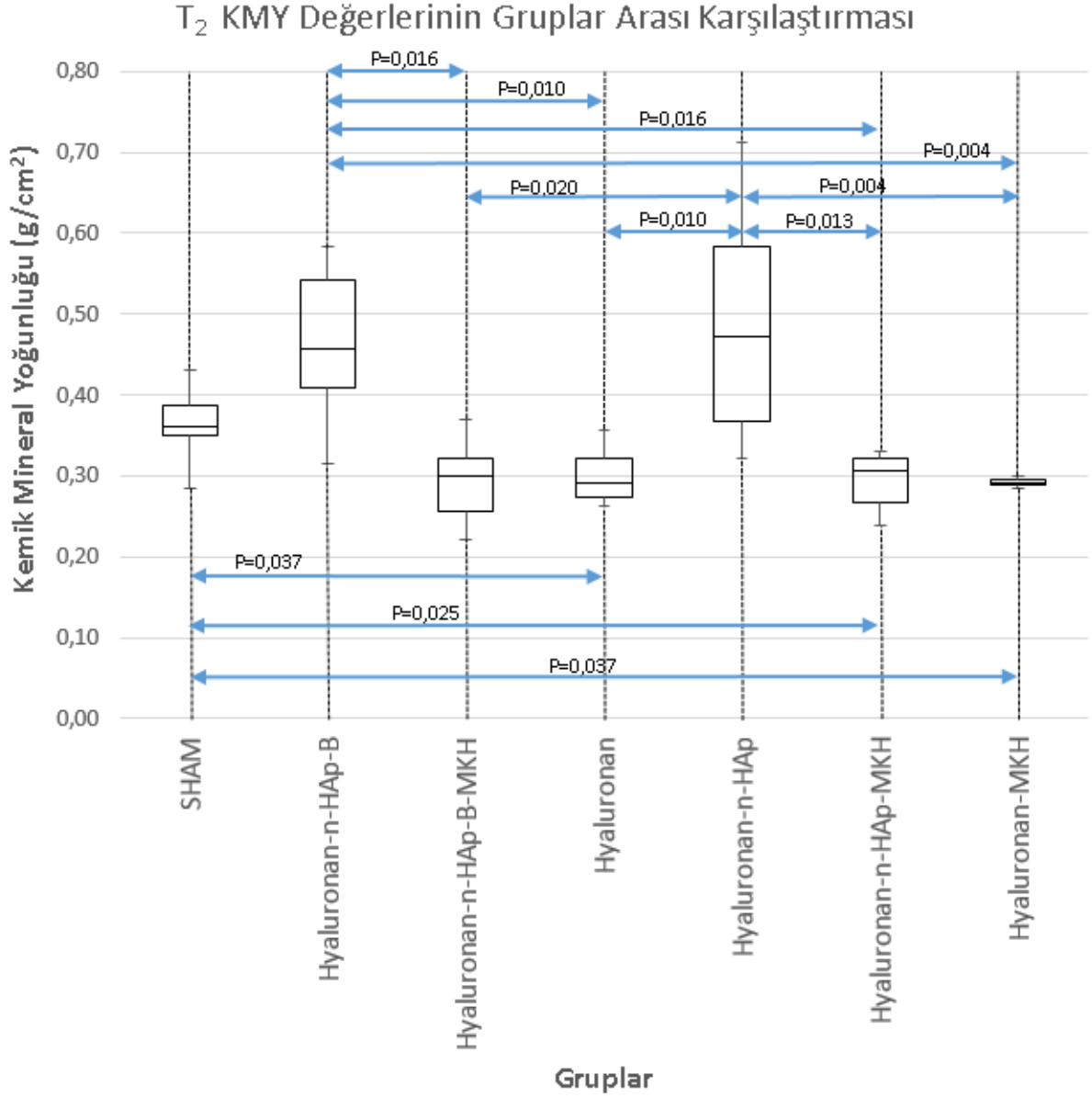
2.3. Kemik Mineral Yoğunluğu Ölçümü Sonuçları:

Elde edilen kemik mineral yoğunluğu verilerinden OVX grubunun östrojen, D vitamini ve kalsiyum eksikliğinin kemik yoğunluğu üzerine olumsuz etkileri genel olarak gözlemlendi. Ovariyektomi operasyonlarından 12 hafta sonra KMY'nin ($p < 0,05$) tüm gruplarda düştüğü belirlendi.



Şekil 15. T_0 ve T_1 Zamanlarına Göre Her Bir Grup İçin KMY Değerlerinin Değişim Tablosu

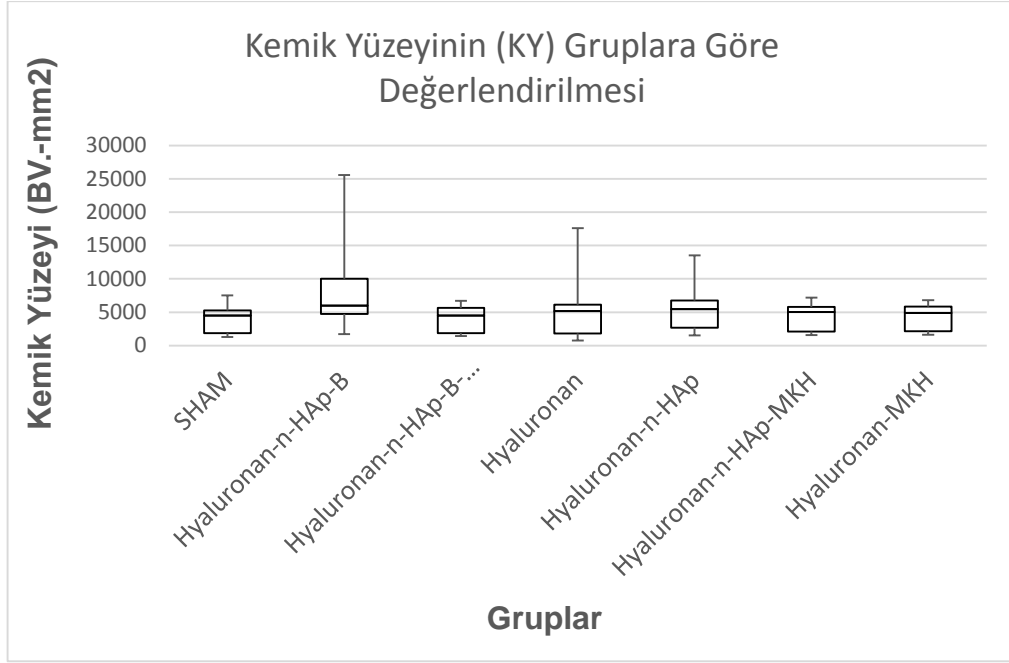
Intramedüler olarak Hyaluronan katkılı B-nHAp seramik uygulamasının ise cerrahi uygulamadan 12 hafta sonra yapılan ölçümlerde KMY ($p < 0,05$) artışına sebep olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, Hyaluronan-n-HAp ve Sham uygulamalarının yapıldığı gruplarda ($p > 0,05$) anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü. Hyaluronanın sade, Hyaluronan-MKH, Hyaluronan-nHAp-MKH ve Hyaluronan-nHAp-B-MKH olarak cerrahi uygulamanın yapıldığı gruplarda ise KMY'nin ($p < 0,05$) düşüş gösterdiği belirlendi.



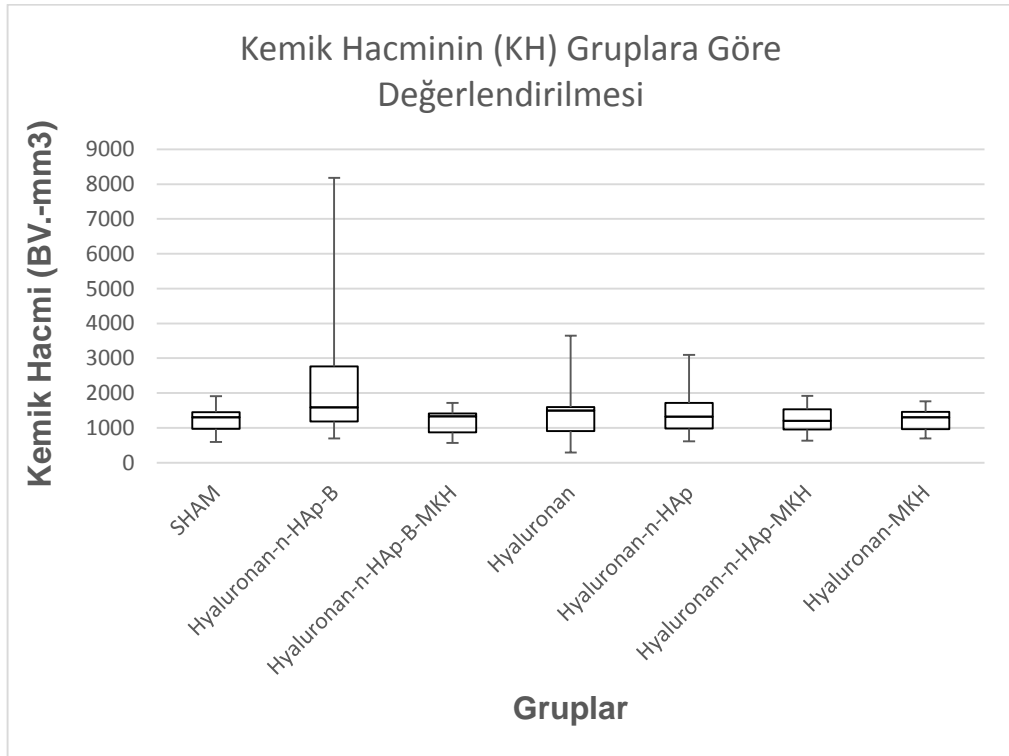
Şekil 16. T₂ zaman aralığında kemik mineral yoğunluğunun gruplara göre karşılaştırılması

2.4. μ -BT Ölçüm Sonuçları

Yapılan ölçümlerden elde edilmiş olan KH, KY ve Tb.Ka değerleri istatistiksel olarak gruplara göre karşılaştırıldı. KH (Şekilxx) ve KY(Şekilxx) KMY değerlerine korele olarak değişiklikler göstermekte ancak değer aralıklarının çok yüksek olmasından dolayı var olan bu değişiklikler ($p > 0,05$) istatistiksel açıdan anlamlı olarak tanımlanamamaktadır.

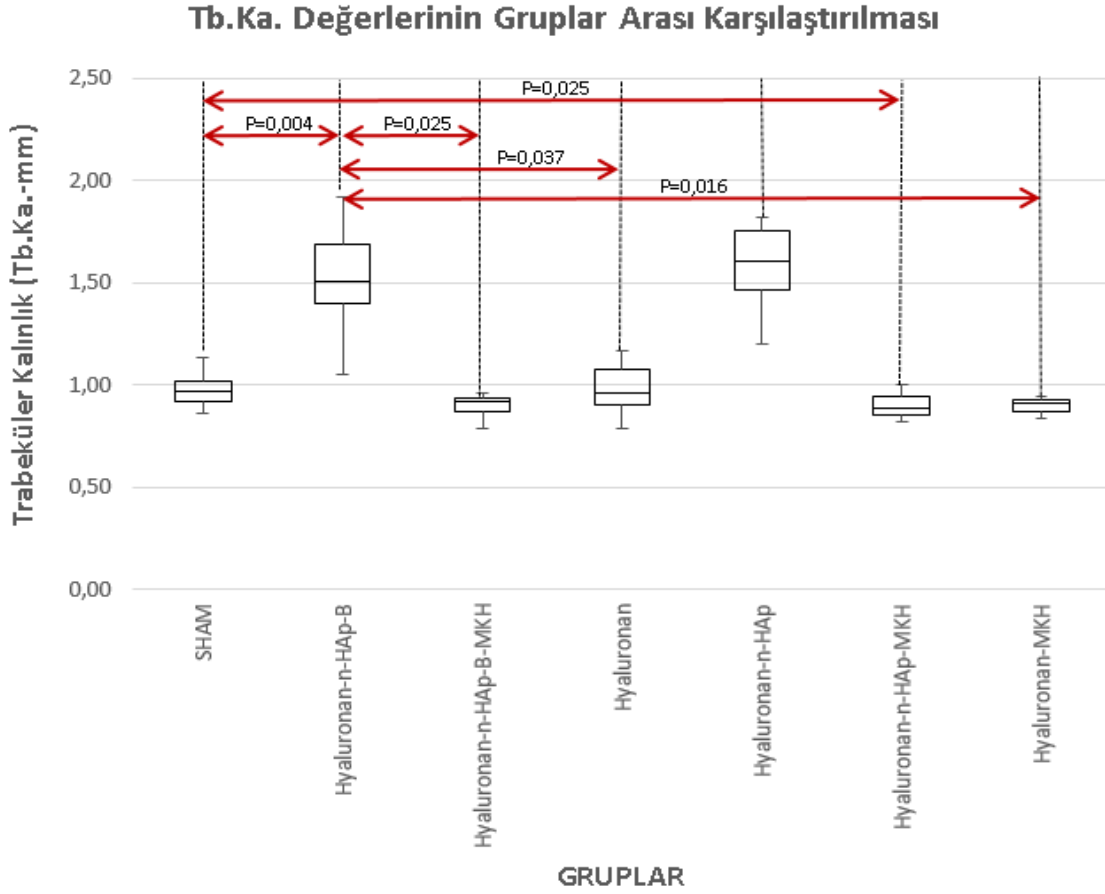


Şekil 17. Mikro-BT ölçümlerinde elde edilen verilere göre KY'nin gruplara göre karşılaştırılma tablosu



Şekil 18. Mikro-BT ölçümlerinde elde edilen verilere göre KH'nin gruplara göre karşılaştırılma tablosu

Tb.Ka değerlerinde ($p < 0,05$) ise özellikle Hyaluronan-B-nHAp enjeksiyonu gerçekleştirilen örneklerde anlamlı olarak artış gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekilxx).



Şekil 19. Mikro-BT ölçümlerinde elde edilen verilere göre Tb.Ka'nın gruplara göre karşılaştırılma tablosu

2.5. Sanal Ortam Biyomekanik Test Sonuçları

Biyomekanik testler gerçekleştirilmiş ve değerlerde anlamlı bir değişikliğe rastlanmamıştır. Ölçümler sırasında karşılaşılan kısıtlamalardan dolayı değerler tutarsız çıkmıştır.

| Gruplar | Basma(Pa) | Üç Nokta Eğme(Pa) |
|-----------------------|------------|-------------------|
| Hyaluronan-B-nHAp | 7.55±6.22 | 6.75±7.87 |
| Hyaluronan-B-nHAp-MKH | 9.40±8.55 | 6.16±11.79 |
| Hyaluronan | 9.11±10.61 | 5.41±5.92 |
| Hyaluronan-nHAp | 7.53±6.11 | 4.49±4.96 |
| Hyaluronan-nHAP-MKH | 8.55±6.84 | 5.92±7.77 |
| Hyaluronan-MKH | 8.48±7.68 | 5.47±7.85 |
| SHAM | 9.10±9.50 | 4.91±6.06 |

Şekil 20. Kontrol ve deney gruplarının basma ve üç nokta eğme biyomekanik testlerinden elde edilen veriler

3. TARTIŞMA

Osteoporoz, kemik mineral yoğunluğunun çeşitli sebeplerle azalması ve kemiğin üç boyutlu yapısının bozulmasıyla kırıklara sebep olabilen, sıklıkla kadınlarda rastlanan ancak erkeklerde de görülme yoğunluğu artan metabolik bir kemik hastalığıdır. Bu hastalığın görülme sıklığı ve hastalığın daha iyi tanınma ihtiyacı osteoporozun çok sayıda araştırmaya konu olmasına, tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine sebep olmaktadır. Kemiğin inorganik bileşeninin yoğunlukla HAp ve diğer eser elementlerden oluşması gerçeğine dayanarak kemiğe uyumlu seramikler ve minerallerin bir arada oldukları kompozitlerin kullanımının tedavi yöntemi olarak geliştirilmesi son zamanlarda literatürde sıkça yer almaktadır (33,34). Hao ve arkadaşları nano-Sr-HAp tozlarının osteokondiktif ve osteoindüktif özelliklere sahip olduklarını ve osteoporotik kırıklardan kaynaklı kemik hasarlarını tedavi edebilme potansiyeli olduğunu ispatlamıştır (35). Bir başka çalışmada ise Mg içeren silikat bazlı bir diyopsit ve Zr içeren silikat bazlı bir bagdadit seramik mikrosferler oluşturarak in vivo çalışma ile osteogenezi destekleyip desteklemediği araştırılmıştır. Çalışma sonucunda bagdaditin β -TCP ve diyopsitten çok daha etkin biçimde kemik oluşumuna katkısı olduğunu ve gelecek vadede bir kemik yenileme malzemesi olduğunu belirtmiştir (36). Bir başka eser element olan B'un kemik mineral yoğunluğunu desteklediği düşünülmektedir (37,38). B kemik metabolizmasında önemli işlevleri bulunan bir elementtir. Çalışmalarda elde edilen bulgular bize B'un yenileyici tıp alanında özgün bir kullanımı olabileceğini düşündürmektedir. Ying ve arkadaşları B'un, insan MKH'lerin farklılaşma ve çoğalma fazı boyunca farklılaşma ile ilgili marker gen sentezini uyararak kemik oluşumunu artırdığını ve kemik doku mühendisliğindeki hücre bazındaki yapılanmada kemikleşme kapasitesini artırma yaklaşımında gelecek vadedebileceğini bildirmişlerdir (39). S.S. Hakkı ve arkadaşları çalışmalarında borik asit kullanmışlar ve B'un kemiğe uyumlu bir yapısı olduğunu göstermişlerdir (40). B'un kullanıldığı sayılı osteoporoz çalışması arasında ise beslenme ile bor alımının hastalığın tedavisinin ve/veya önlenmesinin ve osteoporoz sebepli kemik kırıklarının bor içeren özel doku mühendisliği ürünleri ile tedavisinin konu alındığı çalışmalar göze çarpmaktadır. Bununla birlikte borun direkt olarak dokuya enjeksiyonu ile gerçekleştirilen herhangi bir osteoporoz tedavisine literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışmada birçok projede gözlemlenmiş olan borun kemik mineral yoğunluğuna ve

sağlamlığına olumlu etkileri başka bir açıdan test edilmiştir. Yöntem direk olarak dokuya uygulanmasından dolayı oldukça avantajlıdır.

Mezenkimal kök hücreler, çeşitli hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (41,42,43). Bu hücrelerin farklılaşma potansiyeli, dokulara yenilenme veya iyileşme özelliği sağlar. Kök hücrelerin doku yenilenmesinde kullanımı, kas iskelet bozukluklarını da içine alan tıbbın birçok alanında umut vadetmektedir. Osteoporoz için kök hücre tedavisi, kırık hassasiyetini ve mineral yoğunluk kaybını, kemiğin kendi bünyesindeki, çoğalabilen ve kemik hücrelerine farklılaşabilen kök hücrelerin sayısını arttırarak ya da fonksiyonlarını yenileyerek azaltabilir. Bu gibi osteoporoz tedavileri, kemik iliği, adipoz doku ve göbek kordonu kanı kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ekzogenöz nakli ya da çeşitli ilaçlar veya küçük moleküller ile kuvvetlendirilmiş endogenöz kök hücrelerin osteoporotik bölgelere iletilerek doğrudan tedavi uygulanması şeklinde gerçekleştirilebilir. Mevcut osteoporoz tedavileri ağırlıklı kemik erimesini engelleyici ilaç bazlı ajanlarla yapılmaktadır (44). Mezenkimal kök hücrelerin osteoporoz tedavisinde kullanımı ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Özellikle osteoporotik tavşan kemikleri ile yapılmış birçok çalışma kök hücrelerin, yeni kemik oluşumunu destekleyerek kemiğin dayanıklılığını arttırdığı göstermektedir (19,20). Çalışmamızdan elde ettiğimiz in vitro MKH bulgularımız, B-nHAp seramik malzemenin MKH'lerin yapışma, çoğalma ve farklılaşmasını tetiklediğini göstermiştir. Bu bulgular, yapılan önceki çalışmalarla da desteklenmektedir (39,40). MKH'lar ile elde ettiğimiz in vivo hayvan deneyi çalışmamızda ise diğer olumlu çalışmalara rağmen bizim deney sonuçlarımızda, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin sadece taşıyıcı (Hyaluronan), borlu nano hidroksiapatit seramikler (Hyaluronan-B-n-HAp-MKH) ve sadece hidroksiapatit seramikler (Hyaluronan-n-HAp-MKH) ile verildiği grupların hiçbirinde kemiğin yapısına faydası olmadığı hatta kemik mineral yoğunluklarında anlamlı bir düşüşe sebep olduğu gözlemlenmiştir. Bunu sebebi deney süremizin sadece 24 hafta olarak planlanmış olması olabilir. Bilindiği üzere MKH'ler kemikleşme sürecinde öncelikle osteoklastlara dönüşme eğilimindedir. Histoloji çalışmamızın eksik olması nedeniyle de osteoklast gelişimini gözlemleyemedik.

Çeşitli dokuların üç boyutlu yapılarının incelenmesi mikro bilgisayarlı tomografi cihazları sayesinde gerçekleştirilebilmektedir. Üç boyut analizleri ile kemik hacmi, kemik yüzeyi, trabeküler kalınlık gibi birçok parametre hakkında bilgi edinilebilir.

Özellikle osteoporoz kemiğin üç boyutlu yapısına zarar veren metabolik bir kemik hastalığı olmasından dolayı mikro bilgisayarlı tomografi ile kullanılan B-n-HAp seramiklerin kemiğin mikro yapısına ne gibi etkileri olduğunu gözlemlemenin çalışma açısından oldukça aydınlatıcı olacağı düşünülmüştür. Tek bir ölçüm ile çok sayıda parametre elde edilmesi kemiğin mikro yapısındaki değişikliklerin anlaşılmasında, sonrasında üç boyutlu modelleme sayesinde sanal ortam testlerinin uygulanmasında da oldukça yarar sağlamıştır.

Kemik dayanıklılığı ve sağlamlığının sınındığı çalışmalarda sanal ya da gerçek ortam mekanik testleri kullanılmaktadır. Özellikle uygulama ve analiz kolaylıkları, örnek kısıtlamaları ve görsel zenginliğinden dolayı sanal ortam testleri uygulanmış çalışmalara günümüzde sıklıkla rastlanmaktadır.

S.P Evans ve arkadaşları rat tibiasında sonlu eleman ölçümü yapmışlar ve bu çalışmalarının osteoporoz ve ortopedik implant uygulaması sonrası trabeküler kayıp çalışmaları gibi trabeküler ağın mekanik özelliklerinin çok daha iyi anlaşılması için oldukça önemli potansiyel içerdiğini bildirmişler (45). Başka bir çalışmada ise sonlu eleman analizi ile kemik sertliğini hesaplayarak istatistiksel olarak μ -BT verileri ile karşılaştırmasını yapmışlar. Çalışmalarından kemik sertliği değerlendirmesinin μ -BT görüntülerinden elde ettikleri sonlu eleman analizi ile sadeleştiği ve bu yöntem ile kemik mikro yapısına ışık tutulduğu sonucuna varmışlardır (46). Çalışmamızda biz de sonlu eleman analizine yer verdik. Ancak μ -BT ölçümleri için kullandığımız cihaz haznesinin boyutlarının kemiği bir bütün olarak ölçemeyecek kadar küçük olması kemikleri 3 parçaya ayırarak ölçüm yapma gerekliliğini doğurdu. Kemikleri bölmemizden kaynaklı olarak ölçüm yapılan femurun midshaft kısmında yön tayinin tam olarak yapılamamasından dolayı sonuçlarda anlamlı bir değişiklik gözlemlenememiştir. Daha uygun bir cihaz ile ölçüm yapıldığı takdirde sonuçların tutarlı ve anlamlı çıkacağı olası bir durumdur.

Çalışmamızda uygulanan B-n-HAp seramiklerin hücrelere etkisini ve hücre ilerleyişini izleyebilmek açısından iki farklı floresan boya kullanılmıştır. İki çeşit boya kullanılmasının sebebi farklı zaman aralıklarındaki hücre gelişimlerini farklı renklerde görebilmektir. Bu sayede hem tek bir mikroskop görselinde her iki boyama da görülerek karşılaştırma kolaylaştırılmış bir yandan da çok fazla tavşan kullanılması engellenerek sayı optimumuna indirgenmiştir.

4. KAYNAKLAR

1. www.gebam.hacettepe.edu.tr/oneri/OSTEOPOROZ.pdf (Temmuz **2015**)
2. O. Johnell & J. A. Kanis, An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures, *Osteoporos Int*, 17:1726–1733; 2006
3. Wei G, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 25:4749-57; 2004
4. Dasgupta S, Banerjee SS, Bandyopadhyay A, Bose S. Zn- and Mg-doped hydroxyapatite nanoparticles for controlled release of protein. *Langmuir*, 26:4958-64; 2010
5. K.S. Leung, W.S. Siu, N.M. Cheung, P.Y. Lui, D.H.K. Chow, A. James, L. Qin, Goats As An Osteopenic Animal Model, *Journal Of Bone And Mineral Research* Volume 16, Number 12; 2001
6. Li Y, Cheng H, Liu ZC, Wu JW, Yu L, Zang Y, He Q, Lei W, Wu ZX, In vivo study of pedicle screw augmentation using bioactive glass in osteoporosis sheep, *J Spinal Disord Tech*, 26(4) :E118-23; 2013 Jun
7. K.E.Scholz-Ahrens, G.Delling, B.Stampa, A.Helfenstein, H.-J.Hahne, Y.Açil, W.Timm, R.Barkmann, J.Hassenpflug, J.Schrezenmeir, C.-C.Glüer, Glucocorticosteroid-induced osteoporosis in adult primiparous Göttingen miniature pigs: effects on bone mineral and mineral metabolism, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E385–E395, 2007
8. R Balena, B C Toolan, M Shea, A Markatos, E R Myers, S C Lee, E E Opas, J G Seedor, H Klein, D Frankenfield, The effects of 2-year treatment with the amino-bisphosphonate alendronate on bone metabolism, bone histomorphometry, and bone strength in ovariectomized nonhuman primates, *J Clin Invest*, 92(6): 2577–2586; 1993
9. Lindsay R. Hormone and Bone Health in Postmenopausal Women, *Endocrine* 2004;24:223-30 Pinkerton J.V. Combination therapy for treatment of osteoporosis: A review, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 197559-565; 2007
10. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000360.htm> (Temmuz **2015**)

11. S.A.Norris et al., Calcium metabolism and bone mass in female rabbits during skeletal maturation: effects of dietary calcium intake, *Bone*, Volume 29, Issue 1 , Pages 62-69; July 2001
12. Li Baofeng, Yuan Zhi, Chen Bei, Meng Guolin, Yin Qingshui, and Liu Jian Characterization of a rabbit osteoporosis model induced by ovariectomy and glucocorticoid *Acta Orthopaedica*, 81 (3): 396–401;2010
13. Mori H, Manabe M, Kurachi Y, Nagumo M. Osseointegration of dental implants in rabbit bone with low mineral density. *J Oral Maxillofac Surg*, 55(4):351-361;1997
14. F. Sevil, M. E. Kara, The effects of ovariectomy on bone mineral density, geometrical, and biomechanical characteristics in the rabbit femur, *Vet Comp Orthop Traumatol*, 23: 31–36; 2010
15. S Castañeda, R. Largo, E. Calvo, F. Rodríguez-Salvanés, M. E. Marcos, M. Díaz-Curiel, G. Herrero-Beaumont, Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits, *Skeletal Radiol*, 35: 34–41; 2006
16. Zeng W, Xiao J, Zheng G, Xing F, Tipoe GL, Wang X, He C, Chen ZY, Liu Y, Antioxidant treatment enhances human mesenchymal stem cell anti-stress ability and therapeutic efficacy in an acute liver failure model, *Sci Rep*, 9;5:11100; 2015 Jun
17. El-Shennawy SF, Abdel Aaty HE, Radwan NA, Abdel-Hameed DM, Alam-Eldin YH, El-Ashkar AM, Abu-Zahra FA, Therapeutic Potential Of Mesenchymal Stem Cells On Early And Late Experimental Hepatic Schistosomiasis Model, *J Parasitol*; 2015 May
18. Zhu SF, Hu HB, Xu HY, Fu XF, Peng DX, Su WY, He YL, Human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation restores damaged ovaries, *J Cell Mol Med*. 2015 Apr 29
19. Xinhai Ye, Peng Zhang, Shaobo Xue, Yipin X, Jian Tan, Guangpeng Liu, Adipose-derived stem cells alleviate osteoporosis by enhancing osteogenesis and inhibiting adipogenesis in a rabbit model, *Cytotherapy*, 16: 1643e1655; 2014

20. Zhuo Wang, James Goh, Shamal Das De, Zigang Ge, Hongwei Ouyang, Jeniffer Sue Wee Chong, Siew Leng Low, and Eng Hin Lee, Efficacy of Bone Marrow-Derived Stem Cells in Strengthening Osteoporotic Bone in a Rabbit Model, *Tissue Engineering*, 12(7): 1753-1761; July 2006
21. Ahmed R. El-Ghannam Advanced bioceramic composite for bone tissue engineering: Design principles and structure-bioactivity relationship Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res* 69A: 490-501; 2004
22. J.M. Bray, M.J. Filiaggi, C.V. Bowen, S.D. Beyea Degradation and drug release in calcium polyphosphate bioceramics: An MRI-based characterization *Acta Biomaterial*, Volume 8, Issue 10, Pages 3821-3831; October 2012
23. Feza Korkusuz, Petek Korkusuz Kalsiyum hidroksiapatit seramiklerin ortopedide Kullanımı *Acta Ortop Traumatol Turc* 31:63-67; 1997
24. Hee-Cheol Ko, Jung-Suk Han, Maria Bächle, Jun-Hyeog Jang, Sang-Wan Shin, Dae-Joon Ki Initial osteoblast-like cell response to pure titanium and zirconia/alumina ceramics, *Dental Materials* 23, 1349-1355; 2007
25. Elena Landi, Anna Tampieri, Giancarlo Celotti, Simone Sprio, Monica Sandri, Giandomenico Logroscino Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement, *Acta Biomaterialia* 3, 961-969; 2007
26. Benderdour M, Van Bui T, Hess K, Dicko A, Belleville F, Dousset B. Effects of boron derivatives on extracellular matrix formation. *J Trace Elem Med Biol*, 14(3):168-73; 2000 Oct
27. L. Grausova, A. Kromka, Z. Burdikova, A. Eckhardt, B. Rezek, J. Vacik, K. Haenen, V. Lisa, L. Bacakova, *PLoS ONE* 6(6): e20943; 2011
28. Koga K, Kaji A, Hirosaki K, Hata Y, Ogura T, Fujishita O, Shintani K. Cytotoxic evaluation of cubic boron nitride in human origin cultured cells. *Toxicol In Vitro*, 20(8):1370-7; 2006 Dec
29. Ying X, Cheng S, Wang W, Lin Z, Chen Q, Zhang W, Kou D, Shen Y, Cheng X, Rompis FA, Peng L, Zhu Lu C. Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biol Trace Elem Res*, 144(1-3):306-15; 2011 Dec

30. S.S. Hakki et al. ,Boron enhances strenght and alerts mineral composition of bone in rabbits fed a high energy diets, *Journal of Trace Elements in Medicine And Biology*, 27, 148-153; 2013
31. M.M. Erol et al., Copper-releasing, boron-containing bioactive glass-based scaffolds coated with alginate for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia* 8, 792–801; 2012
32. F.H. Nielsen et al., Boron and fish oil have different beneficial effects on strength and trabecular microarchitecture of bone, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 23,195–203; 2009
33. Hee-Cheol Ko, Jung-Suk Han, Maria Bächle, Jun-Hyeog Jang, Sang-Wan Shin, Dae-Joon Ki Initial osteoblast-like cell response to pure titanium and zirconia/alumina ceramics dental materials 23, 1349–1355; 2007
34. Elena Landi, Anna Tampieri, Giancarlo Celotti, Simone Sprio, Monica Sandri, Giandomenico Logroscino Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement *Acta Biomaterialia* 3, 961–969; 2007
35. Hao Y, Yan H, Wang X, Zhu B, Ning C, Ge S, Evaluation of osteoinduction and proliferation on nano-Sr-HAP: a novel orthopedic biomaterial for bone tissue regeneration, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*,12(1):207-12; 2012 Jan
36. Luo T, Wu C, Zhang Y, The in vivo osteogenesis of Mg or Zr-modified silicate-based bioceramic spheres. *J Biomed Mater Res Part A:00A:000–000*; 2012
37. Nielsen F H, Studies on the relationship between boron and magnesium which possibly affects the formation and maintenance of bones, *Magnesium and Trace Elements*, 9(2):61-69; 1990
38. Volpe S L, Taper L J, Meacham S, The relationship between boron and magnesium status and bone mineral density in the human: a review, *Magnesium Research : Official Organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium*, 6(3):291-296; 1993
39. Xiaozhou Ying, Shaowen Cheng, Wei Wang, Zhongqin Lin, Qingyu Chen, Wei Zhang, Dongquan Kou, Yue Shen, Xiaojie Cheng, Ferdinand An Rompis, Lei Peng, Chuan zhu Lu, Effect of Boron on Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells, *Biol Trace Elem Res*, 144:306–315; 2011

40. Sema S. Hakki, Buket S. Bozkurt, Erdogan E. Hakki, Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1), *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* Volume 24, Issue 4, Pages 243–250; October 2010
41. Yang C, Lei D, Ouyang W, Ren J, Li H, Hu J, Huang S, Conditioned Media From Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells And Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Efficiently Induced The Apoptosis And Differentiation In Human Glioma Cell Lines In Vitro, *Biomed Res Int.*, 109389;2014
42. Wei CC1, Lin AB, Hung SC, Mesenchymal stem cells in regenerative medicine for musculoskeletal diseases: bench, bedside, and industry, *Cell Transplant.*, 23(4-5):505-12; 2014
44. Fan CQ1, Leu S, Sheu JJ, Zhen YY, Tsai TH, Chen YL, Chung SY, Chai HT, Sun CK, Yang JL, Chang HW, Ko SF, Yip HK, Prompt Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy Enables Early Porcine Heart Function Recovery from Acute Myocardial Infarction, *Int Heart J.* 2014 Jun 25.
45. Evans SP, Parr WC, Clausen PD, Jones A, Wroe S, Finite element analysis of a micromechanical model of bone and a new 3D approach to validation, *J Biomech.*, 11;45(15):2702-5; 2012 Oct
46. Yuchin Wu, Samer Adeeb, Michael R. Doschak, Using Micro-CT Derived Bone Microarchitecture to Analyze Bone Stiffness – A Case Study on Osteoporosis Rat Bone, *Front Endocrinol (Lausanne).*, 6: 80; 2015

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Eda Çiftci Dede

Doğum Yeri: Çankaya

Medeni Hali: Evli

E-posta: eda.ciftci@hacettepe.edu.tr

Adresi: Ayrancı Mahallesi Reşat Nuri Sokak 22/11 Çankaya/Ankara

Eğitim

Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (ileri)

İş Deneyimi

Fame-Med Medikal Ltd. Şti. AR-GE sorumlusu, Biyolog (1 sene+)

Deneyim Alanları

Deney Hayvanları, Micro-BT ve DXA cihazları kullanımı, Sonlu eleman analizi, Histoloji

Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi

Hacettepe Üniversitesi, BAP (18.900TL)

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Eda Ciftci, Sevil Köse, Petek Korkusuz, Muharrem Timuçin, Feza Korkusuz, Boron Containing Nano Hydroxyapatites (B-n-HAp) Stimulate Mesenchymal Stem Cell Adhesion, Proliferation and Differentiation, Key Engineering Materials Vol. 631 (2015) pp 373-378

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- Bioceramics 26 kongresi (Poster Sunumu: Boron Containing Nano Hydroxyapatites (B-n-HAp) Stimulate Mesenchymal Stem Cell Adhesion, Proliferation and Differentiation)
- TOTBİD 24. Ulusal Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi (Sözlü Sunum: Bor İçeren Nano Hidroksiapatit Seramikler Ovariyektomili Tavşanların Femurlarına Hyaluronan İle Birlikte İntramedüller Uygulandığında Kemik Mineral Yoğunluğunu Arttırır)
- ORS (Orthopaedic Research Society) 2015 Genel Toplantısı (Poster Sunumu: Intramedullary Boron Containing Nano-Hydroxyapatite Bioceramic Application Improves Bone Mineral Density, Volume and Surface of Ovariectomized Rabbit Femurs)