

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FOTOTERAPİNİN YAĞ DOKUSUNDAN TÜRETİLMİŞ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN OSTEOJENİK
İNDÜKSİYONUNA ETKİLERİNİN METAKRİLATLANMIŞ
JELATİN HİDROJEL İLE REKONSTRÜKTE EDİLMİŞ KRİTİK
BOYUTLU KRANİYAL KEMİK DEFECTİ MODELİNDE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Mert ÇALIŞ

**İleri Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2019**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FOTOTERAPİNİN YAĞ DOKUSUNDAN TÜRETİLMİŞ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN OSTEOJENİK
İNDÜKSİYONUNA ETKİLERİNİN METAKRİLATLANMIŞ
JELATİN HİDROJEL İLE REKONSTRÜKTE EDİLMİŞ KRİTİK
BOYUTLU KRANİYAL KEMİK DEFECTİ MODELİNDE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Mert ÇALIŞ

**İleri Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Programı
DOKTORA TEZİ**

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

**ANKARA
2019**

ONAY SAYFASI

FOTOTERAPİNİN YAĞ DOKUSUNDAN TÜRETİLMİŞ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN OSTEOJENİK İNDÜKSİYONUNA ETKİLERİNİN METAKRİLATLANMIŞ JELATİN HİDROJEL İLE REKONSTRÜKTE EDİLMİŞ KRİTİK BOYUTLU KRANİYAL KEMİK DEFEKTİ MODELİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

MERT ÇALIŞ

Danışman: Prof. Dr. Figen ÖZGÜR

Bu tez çalışması 28.06.2019 tarihinde jürimiz tarafından "İleri Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Mehmet Emin Mavili*
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.D.

Üye: *Prof. Dr. Tunç Şafak*
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.D.

Üye: *Prof. Dr. Osman Latifoğlu*
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.D.

Üye: *Prof. Dr. İbrahim VARGEL*
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.D.

Üye: *Doç. Dr. Burak KAYA*
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.D.

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

01 Temmuz 2019

Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

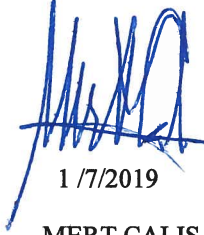
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾


1 /7/2019
MERT ÇALIŞ

¹ "*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*"

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir*

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYANI

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

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

beyan ederim.



1.7.19

MERT ÇALIŞ

TEŞEKKÜR

Doktora 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 hocalarıma

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

Çalışmada kafa kafaya verdiğimiz, tanımaktan büyük mutluluk duyduğum arkadaşım Dr. Tuğrul Tolga Demirtaş'a ve sevgili Dr. Gülseren Irmak'a,

Çalışmanın histolojik analizini gerçekleştiren Prof. Dr. Nur Çakar ve Doç.Dr. Ayten Türkkani'ya,

Mikrotomografi analizini gerçekleştiren Dr. Evren Çubukçu'ya,

Bu çalışmaya destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi'ne

Hayvan deneyleri boyunca beni yalnız bırakmayan araştırma görevlisi arkadaşlarım Dr. Murat Kara ve Dr. G. Gencay Üstün'e,

Hayatım boyunca attığım her adımda beni destekleyen, sevgisini esirgemeyen ve akademik duruşuyla bana mükemmel örnek olan annem Prof. Dr. Sema ÇALIŞ'a,

Her zaman neşe kaynağım olan kardeşime,

Hayatıma girdiği ilk günden itibaren bana destek olan sevgili eşime,

En içten teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını beni çocukluğumda kendi gerçekleştirdiği hayvan deneylerine götürüp, bilimsel çalışmalar yapmak konusunda heveslendiren, 'tıp doktoru olsam da doktora yapmam' gerektiği konusunda öğütlerde bulunan ve her gerçekleştirdiğim deneysel çalışmada kendisini minnetle andığım, beş sene önce kaybettiğim sevgili babam Prof. Dr. Ünsal ÇALIŞ'a ithaf ederim.

ÖZET

Çalış M., Fototerapinin yağ dokusundan türetilmiş mezenkimal kök hücrelerin osteojenik indüksiyonuna etkilerinin metakrilatlanmış jelatin hidrojel ile rekonstrükte edilmiş kritik boyutlu kemik defekti modelinde değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İleri Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Programı Doktora Tezi. Ankara, 2019. Bu çalışmada amaçlanan, polikromatik yolla uygulanan fotobiyomodülasyon (FBM) yaklaşımının kemik doku üzerinde rejeneratif etkisinin ve yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesidir. Çalışmada 36 adet male Sprague-Dawley sıçan kullanılmış ve hayvanlar 3 eşit deney grubuna randomize olarak ayrılmıştır. Tüm hayvanlarda biparietal, 6 mm. çapında, yuvarlak ve tam kalınlıkta kemik defektleri meydana getirildi. Birinci deney grubu kontrol grubu iken, ikinci grubu sadece metakrilatlanmış jelatin yapıda hidrojel doku iskelesi (JEL-MA, üçüncü grubu ise adipoz kökenli mezenkimal kök hücre (AkMKH) yüklenmiş metakrilatlanmış jelatin yapıda hidrojel doku iskelesi (AkMKH+JEL-MA) içermektedir. Tüm gruplar kendi içinde iki alt gruba ayrılarak yarısına FBM uygulanırken, diğer yarısına uygulanmadı. Kemikleşmenin değerlendirilebilmesi amacıyla cerrahi işlem sonrası 20. haftada hayvanlar sakrifiye edilerek kalvariya kemikler bütün olarak çıkarıldı. Elde edilen örnekler makroskopik, histolojik ve mikrotomografik olarak değerlendirildi. Histolojik olarak yeni kemik oluşumu açısından en yüksek değerler JEL-MA ve JEL-MA+AkMKH gruplarında saptanmıştır ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,001$). Mikrotomografik değerlendirme sonucunda en yüksek kemikleşme yüzdesi JEL-MA+AkMKH'lerin uygulandığı grupta elde edilmiştir. FBM- örneklerde ortalama olarak yüzde $60,62\pm 6,34$ kemikleşme gözlenmişken, FBM+ olan örneklerde ortalama kemikleşme yüzdesi $79,93\pm 3,41$ olarak tespit edilmiştir. Fotobiyomodülasyon alma durumuna göre JEL-MA+AkMKH grubuna ait sonuçlar karşılaştırıldığında anlamlı olarak fotobiyomodülasyon uygulama durumunun fark yarattığı gözlemlenmektedir ($p=0,002$). Sonuç olarak, polikromatik ışık kaynakları yoluyla fotobiyomodülasyon uygulamasının kemik iyileşmesine olumlu etkileri olduğu ve yağ dokusundan türetilmiş kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasında uyarıcı etkisi olabileceği yönünde fikir vermiştir.

Anahtar Kelimeler: fotobiyomodülasyon, metakrilatlanmış jelatin hidrojel, mezenkimal kök hücre, kemik doku mühendisliği, kritik boyutlu kemik defekti

ABSTRACT

Çalış M., Evaluation of the effect of photobiomodulation on osteogenic differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells loaded in metacrylated gelatin hydrogel scaffolds for reconstruction of critical sized bone defect model. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Thesis in Advanced Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery Program, Ankara, 2019. The aim of this study was to evaluate the regenerative effect of photobiomodulation (PBM) administered using polychromatic light sources on bone formation and on differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells. 36 Sprague-Dawley male rats were divided into 3 equal groups randomly biparietal full thickness cranial bone defects (6mm. in diameter) were created. First group was the control group, and the second group received metacrylated gelatin hydrogel scaffold (JEL-MA). Third experimental group was treated with adipose derived mesenchymal stem cells loaded metacrylated gelatin hydrogel scaffold (AkMKH+JEL-MA). Each group was subdivided and half of them received FBM while other half did not. Macroscopic, histologic and microtomographic assessments were performed at 20th week after transplantation to evaluate bone formation. Histologically, in terms of new bone formation significantly better results were observed in JEL-MA and AkMKH+JEL-MA groups compared to control group ($p < 0,001$). Microtomographic evaluation revealed highest bone formation in AkMKH+JEL-MA group. FBM – samples show $60,62 \pm 6,34$ percent bone formation in average whereas FBM+ samples displayed mean $79,93 \pm 3,41$ percent of bone formation. FBM administration significantly affected microtomographic results bone formation ($p = 0,002$). In conclusion, administration of photobiomodulation in polychromatic fashion appears to stimulate new bone formation and may stimulate adipose derived mesenchymal stem cells on osteogenic differentiation.

Key Words: photobiomodulation, metacrylated gelatin hydrogels, mesenchymal stem cells, bone tissue engineering, critical sized bone defect

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iii
ETİK BEYANI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
TABLolar	xiii
ŞEKİLLER	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. KEMİK DOKU ANATOMİSİ	2
2.2. KEMİK DOKU HİSTOLOJİSİ	3
2.3. TIPTA DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI	5
2.4. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ	6
2.4.1. Tarihçe	6
2.4.2. Kemik doku mühendisliğinde tercih edilen doku iskelesi özellikleri ve kullanılan polimerler	7
2.4.3. Doku iskeleleri ve üretim yöntemleri	9
2.5. KÖK HÜCRE KAVRAMI	9
2.5.1. Yağ Dokusu ve Mezenkimal Kök Hücreler	11
2.5.2. Yağ Dokusundan Türetilmiş Kök Hücrelerin biyolojik özellikleri ve İn Vitro/İN Vivo Farklılaşma Potansiyelleri	12
2.6. FOTOTERAPİ KAVRAMI	15

2.6.1. Düşük seviyeli lazer ve Işık yayan diyot kavramları	16
2.6.2. Plazma ark ışık kaynakları	18
2.6.3. Fotobiyomodülasyonun hücresel düzeyde etkileri	18
2.6.4. Fotobiyomodülasyonun hücreler üzerindeki etkisi	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM	22
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE BİYOLOJİK MATERYALLER	22
3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN DOKU İSKELESİ MODELİ	22
3.2.1. Metakrilatlanmış Hidrojel Doku İskelesinin yapısı ve üretimi	23
3.2.2. Metakrilatlanmış Hidrojel Doku İskelesinin Karakterizasyonu	23
3.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN AkMKHLERİN İZOLE EDİLMESİ	24
3.3.1. Sıçan Yağ Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre (AkMKH) İzolasyonu ve pasajlanması	24
3.3.2. AkMKH'lerin karakterizasyonu ve in vivo uygulanması	25
3.4. FOTOBİYOMODÜLASYON İÇİN KULLANILAN IŞIK KAYNAĞI	25
3.5. DENEY GRUPLARI	26
3.6. ANESTEZİ	27
3.7. CERRAHİ İŞLEM	28
3.8. CERRAHİ SONRASI İZLEM	29
3.9. ÖTENAZİ	29
3.10. MAKROSKOPİK DEĞERLENDİRME	29
3.11. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME	29
3.12. MİKRO TOMOGRAFİK DEĞERLENDİRME	30
3.13. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	31
4. BULGULAR	32

4.1. HİDROJEL DOKU İSKELESİNİN METAKRİLATLANMA DERECEŚİ VE KARAKTERİZASYON SONUÇLARI	32
4.2. AKMKH'LERİN KARAKTERİZASYON ANALİZ BULGULARI	32
4.3. MAKROSKOPİK BULGULAR	33
4.4. HİSTOLOJİK BULGULAR	35
4.4.1. Birinci grup – Kontrol / Kritik boyutlu kemik defekti grubu	35
4.4.2. İkinci grup – hücreşiz metakrilatlanmış hidrojel doku iskelesi grubu, (JEL-MA)	37
4.4.3. Üçüncü grup – kök hücre içeren metakrilatlanmış hidrojel doku iskelesi grubu, (JEL-MA+AKMKH)	39
4.5. MİKRO TOMOGRAFİ BULGULARI	44
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ	54
7. KAYNAKÇA	55
8. EKLER	68
Ek 1. Turnitin Dijital Makbuz	68
Ek 2. Turnitin Orijinalik Raporu	69
Ek 3. Etik Kurul Onayı	70
9. ÖZGEÇMİŞ	71

SİMGELER VE KISALTMALAR

AkMKH	:	Adipoz kökenli mezenkimal kök hücre
ATP	:	Adenozin trifosfat
BMP	:	Kemik morfojenik protein
BRDU	:	Bromodeoxyuridin
CD	:	Cluster of differentiation
FBM	:	Fotobiyomodülasyon
FITC	:	Floresan izotiyosiyanat
HkKH	:	Hematopoietik kökenli kök hücreler
IR	:	Kızılötesi
JEL-MA	:	Metakrilatlanmış hidrojel doku iskelesi
LED	:	Işık yayan diyotlar
Max	:	Maksimum
Min	:	Minimum
MKH	:	Mezenkimal kök hücreler
NO	:	Nitrik oksit
ROS	:	Serbest oksijen radikalleri
Std	:	Standart sapma
SVF	:	Stromal vasküler fraksiyon
TGF-beta	:	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
UV	:	Ultraviole
VEGF	:	Vasküler endotelial büyüme faktörü

TABLolar

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa No:</u>
3.1. Jel-MA hidrojen doku iskelesi sentez koşulları.	23
3.2. Çalışmada kullanılan histolojik skrolama sistemi	30
4.1. 20. haftanın sonunda örneklerin histolojik değerdendirşilmesi ve skorlamasına göre gruptarda elde edilen yeni kemik oluşumu ve fibröz bağ dokusu oluşum durumlarının tanımlayıcı istatistiksel bilgileri ve gruplar arası karşılaştırma	43
4.2. Mikrotomografi sonuçlarına göre gruptarda elde edilen kemikleşme ve porozite yüzdeleri ve gruplar arası <i>posthoc</i> karşılaştırma	46

ŞEKİLLER

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa No:</u>
2.1. Kemiğin üç boyutlu kesitsel anatomisi, beslenmede aktif görev alan Havers ve Volkmann kanalları	3
2.2. Kortikal kemiğin dekalsifikasyon sonrası ışık mikroskobu görüntüsü	5
2.3. Güneş ışığı, lazer ve LED ışınlarının özellikleri	17
2.4. Fotobiyomodülasyon sonrası hücrede meydana gelen değişiklikler	20
3.1. A. Tez çalışmasında fotobiyomodülasyon uygulanması amacıyla kullanılan ışık kaynağı B. Çalışma kapsamında kraniyel kemik defekti uygulanması	26
3.2. Cerrahi İşlem	28
4.1. Çalışmaya kullanılan aynı tür sıçana ait AkMKH'lerin akış sitometri sonuçları	33
4.2. Makroskopik Bulgular	34
4.3. FBM– Kontrol grubuna ait örneklerin histolojik görünümü.	35
4.4. FBM + Kontrol grubuna ait örneklerin histolojik görünümü.	36
4.5. FBM– JEL-MA grubuna ait örneklerin histolojik görünümü.	37
4.6. FBM+ JEL-MA grubuna ait örneklerin histolojik görünümü.	38
4.7. FBM – JEL-MA+AkMKH.	39
4.8. FBM – JEL-MA+AkMKH.	39
4.9. FBM – JEL-MA+AkMKH.	40
4.10. FBM+ JEL-MA+AkMKH.	41
4.11. FBM+ JEL-MA+AkMKH.	41
4.12. FBM+ JEL-MA+AkMKH.	42
4.13. Mikro Tomografi Bulguları	44

1. GİRİŞ

Doku defektlerinin rekonstrüksiyonu plastik cerrahinin temel ilgi alanlarından olup, bunlar içinde kemik doku rekonstrüksiyonu ayrıcalıklı yere sahiptir. Kemik onarımı için güncel cerrahi tedavi seçenekleri kemik greftlerinin kullanımı (1), vaskülarize olarak kemik transferi, distraksiyon osteogenezi ile kemik defektlerinin giderilmesi olarak sıralanabilir (2). Tüm bu seçeneklerin belirli oranda sınırlamaları ve komplikasyonları mevcuttur. Bu noktada kemik doku mühendisliği ile kemik eşleniği biyomalzemelerin elde edilmesi stratejileri oldukça heyecan vericidir (3).

Doku mühendisliği uygulamaları ile beraber hücrel stratejilerin kullanımı da son yıllarda önem kazanmıştır. Yağ dokusunun kök hücre kaynağı olarak keşfedilmesiyle beraber (4) yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerin rejeneratif amaçlı gerek kök hücre olarak gerekse de stromal vasküler fraksiyon ile uygulanması plastik cerrahide popüler yaklaşımların başında gelmektedir.

Işık kaynaklarının rejeneratif perspektiften faydalı elli yılı aşkın süredir bilinmekle beraber polikromatik ışık kaynakları geniş spektrumda dalga boyunda fotobiyomodülasyon olanağı sağlaması ile yeni bir modalitedir. Işık enerjisinin mitokondriyal düzeyde etki ederek sitokrom C üzerinden hücre içi ATP (adenozin trifosfat) üretimini arttırarak bu etkiyi ortaya çıkardığı yakın geçmişte ortaya konulmuştur. Fotobiyomodülasyonun polikromatik ışık kaynakları ile uygulanmasının rejeneratif etki yarattığı yine grubumuzun çalışmalarıyla (5) ortaya koyulmuş olup, bu çalışmayla hedeflenen kök hücre yüklü hidrojel doku iskeleleri yardımıyla kemik rejenerasyonuna olan etkilerini ve kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasına olan etkilerinin ortaya konulmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KEMİK DOKU ANATOMİSİ

Kemik doku bağ dokunun özellikli bir formu olup, temel özelliği iskeletin büyük bir kısmını oluşturarak vücudun destek sistemini meydana getirmektir. Temel görevi destek ve koruma fonksiyonları olmasına rağmen, hematopoietik sistemde kan hücrelerinin yapımı ve bazı minerallerin depolanması gibi çok önemli fonksiyonları da mevcuttur. Bunlarla beraber, için lokomotor sistem açısından kemikler kasların origo ve insersiyö bölgelerini oluştururlar (6).

Uzun kemikler anatomik olarak, diafiz (diaphysis, orta kesim), epifiz (epiphysis, iki uç kısım), metafiz (metaphysis, bunların arasında kalan kısım) olarak belirli kısımlara ayrılır (7).

Embriyonik olarak ise iskelet yapısı, iki ayrı kemik tipinden oluşmuştur. Mezenkimal öncülerin direkt ossifikasyonu ile membranöz kemik oluşurken, kırıkda öncülün kemikleşmesi ile enkontral kemikler oluşur. Enkontral kemiklere tipik bir örnek ekstremitenin uzun tübüler kemikleri iken, aksial ve kraniofasial iskelete ait kemikler membranöz kemiklere örnek olarak verilebilir (8).

Kemik dokunun eklem dışı kısımlar en dışta, periosteum ile sarılır. Periost, kırık iyileşmesi ve anjiyogenezde önemli role sahiptir ve histolojik olarak, dışta fibröz kısım yer alırken ve içte osteojenik kısım bulunmaktadır. Zengin bir kanlanması olan osteojenik tabaka kemikle devamlılık gösterir ve kemikte horizontal planda büyümeyi sağlar. Dışta yer alan fibröz kısım ise eklem kapsülü ile devamlılık gösterir (1).

Morfolojik olarak kemik dokuda iki temel kısım bulunur (9):

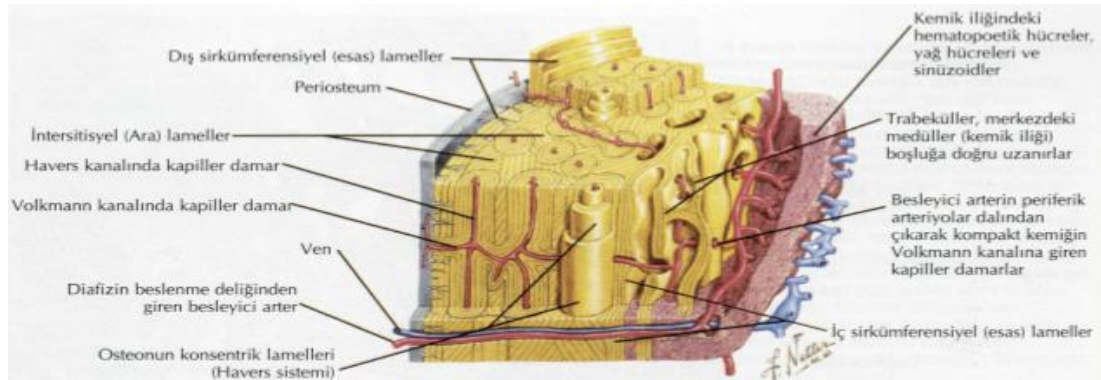
- Kortikal (kompakt) kemik
- Kansellöz (sponjiyöz) kemik

Kortikal kemiğin iç yüzünde endosteum adı verilen, kemik iyileşmesinde rolü olduğu düşünülen fibröz bir örtü yer alır. Kortikal kemiğin içinde yer alan kavitede, kemik iliği ve kansellöz kemik bulunur. Kansellöz kemik, trabeküler kemikten

oluşmuş olup, kortikal kemik ve kemik iliği için destek sağlar ve olgun osteonları barındırır (10).

Matür kemiğin yapısında değişen oranlarda hem kortikal kemik hem de kansellöz kemik yer alır. Kortikal kemik, kemiklerin dış kısımlarını oluşturur. Anatomik olarak kemiğin uzun aksı boyunca uzanım gösteren *Havers kanalları* beslenmesinde önemli bir yer teşkil eder ve bu sistem kapiller dolaşımı simüle etmektedir. *Volkman kanalları* ise enine uzanımlar gösteren ve kemik iliği ve periost arası uzanan kapiller damarlar sistemleriyle Havers kanalları ile anastomoz yaparlar. Kemiğin temel mikro ünitesi osteonlar olup, Havers kanalları çevresinde yerleşim gösterip, *lakün* olarak da isimlendirilebilirler (10) (Şekil 2.1).

Kansellöz kemik ise kemikin iç kısmında yer alıp kemiğin yük ve basınca karşı mukavemet göstermesine katkı sağlar. Trabeküler yapısı olup, trabekülalar arasında medüller boşluk olarak tanımlanan ve kemik iliğinden zengin hematopoietik kök hücre rezervi olarak önemi gittikçe daha fazla anlaşılan kısım yer almaktadır (10).



Şekil 2.1. Kemiğin üç boyutlu kesitsel anatomisi, beslenmede aktif görev alan Havers ve Volkman kanalları (7)

2.2. KEMİK DOKU HİSTOLOJİSİ

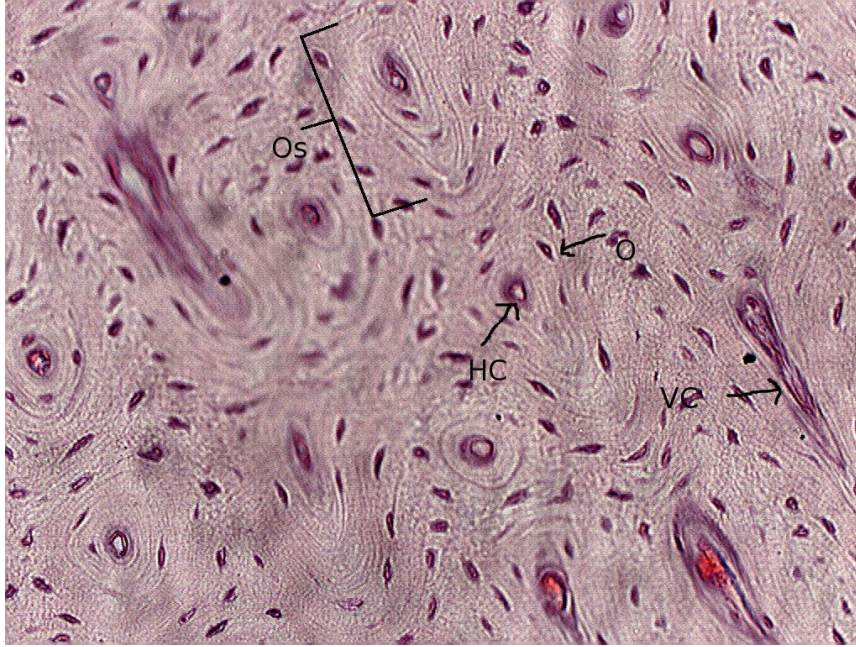
Kemik doku vücuttaki diğer dokulardan miberaliz bir ekstrasellüler matrikse sahip olması yönüyle ayrıcalıklı bir yere sahiptir. Bu mineralize matriks %35 oranında organik bileşenler, %65 oranında inorganik bileşenlere sahiptir. İnorganik bileşenler içinde başlıca olarak kalsiyum hidroksiapatit kemiğin yapısına katılır ve hem doku mühendisliği hem de rekonstrüktif cerrahi stratejilerinde önem

taşımaktadır. Ekstrasellüler matriksin inorganik komponenti, kemiğe dayanıklılığını verir ve kalsiyum, fosfor ve magnezyum gibi elementlerin depolanması görevini yapmaktadır. Kemik dokunun organik kısmını ise matriks proteinleri ve osteositler, osteoblastlar ve osteoklastlar meydana getirir. Hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinler yoluyla kemik mineralizasyonu ve hücrelerin büyümesi kontrol edilmektedir (11).

Kemik dokunun temel hücresi olan osteoblastlar, inorganik bileşenlerin depolanması ve tip 1 kollajen, glikoproteinler, osteopontin gibi ekstrasellüler matriks elemanlarının sentezinden sorumludur. Tüm bu faaliyetler, hücrede alkalen fosfataz (12) seviyesini arttırarak sitoplazmanın bazofilik hale gelmesine yol açar. Osteoblastlar, yeni sentez edilmiş matriks ile beraber osteosite dönüşürler.

Osteositler, osteoblastlardan farklılaşmış hücreler olup matriks lamelleri arasında bulunan lakünalarda yer alırlar. Çevre matriksten beslenebilmeleri, sitoplazmik uzantıları yoluyla mümkün olur. Bu hücreler kemik matriks için yapısal olup, yaşamsallık konusunda belirleyicidir. Osteositlerin yıkımı, matriks rezorbsiyonunu tetiklemektedir (13).

Osteoklastlar ise ileri derecede dallanmış, çok büyük ve hareketli hücreler olup, temel olarak mononükleer fagositik sistem içinde yer almaktadır. Bu hücreler kemik rezorbsiyonunun başladığı bölgelerde, *Howship lakünası* adı verilen, degradasyon ile beraber enzimatik olarak açılmış olan boşluklarda yer alırlar. Osteoklastlar kemik matriksini etkileyen matriks metalloproteinazlarını salgılayarak, matriks yıkımına sebep olurlar (14).



Şekil 2.2. Kortikal kemiğin dekalsifikasyon sonrası ışık mikroskobu görüntüsü

Os: osteon, O: osteosit, HC: Havers kanalı, VC: Volkman kanalı, Hematoksilen-Eozin x100 (15)

2.3. TIPTA DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI

Doku mühendisliği interdisipliner bir takım çalışması sonucunda klinisyenler, mühendisler ve bilim insanlarının ortak çalışması ile doku iyileştirilmesi ve hasarlı, kayıp doku ve organların tedavisi ve eksik olanın yerine konması için yapay doku ortaya çıkarmayı hedeflemektedir (16). Doğumsal kraniofasiyal anomaliler, tümör rezeksiyonu, dejeneratif hastalıklar ve travmatik deformiteler sonucu meydana gelen doku defeklerinin tedavisi için günümüzde en sık başvurulan yöntem otojen olarak gerçekleştirilen greftleme veya flep cerrahileridir.

Doku mühendisliği uygulamaları, rejeneratif tıbbın hızla gelişmekte olan ve önemli bir alt kategorisi olup, laboratuvar ortamında organik ve inorganik materyallerin kullanımı ile hücresel stratejileri kombine ederek doku alternatifi elde etmeyi amaçlamaktadır (17).

2.4. KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

2.4.1. Tarihçe

“Doku Mühendisliği” terimi ilk olarak 1985 yılında, University of California San Diego’den bir akademisyen olan Y.C. Fung tarafından, Ulusal Bilim Konseyi’nin toplantısında ortaya atılmıştır (18). Eylemsel olarak ise Langer ve Vacanti, 1993 yılında Science dergisinde yayınlanan in vitro ortamda elde ettikleri desellülerize doku ile klinik tedavi gerçekleştirerek bu alanda öncü olmuşlar ve alanın ‘babaları’ olarak nitelendirilmeyi hak etmişlerdir (19).

Doku mühendisliği ile elde edilen ilk implant, 1991 yılında Poland Sendromu nedeniyle doğuştan sternum yokluğu olan bir hastaya uygulanmıştır. Bu amaçla, kondrosit yüklenmiş bir sentetik doku iskelesi kullanılmış olup alanında öncü bir çalışma olarak yer almıştır (20).

Yine kemik rejenerasyonu konusundaki dikkat çekici çalışmalardan birisin Urist ve ark. tarafından kemik morfojenik proteinin (BMP) tanımlanmasıdır (21). Gerek kemik gelişimini uyarması gerekse de regüle etmesi yönüyle hızla bu alanda kenidise yer bulmuştur. Wozney ve ark. ilerleyen dönemde laboratuvar ortamında bu proteinin sentezini gerçekleştirmiş ve in vivo çalışmalar için önemli bir dönüm noktası gerçekleşmiştir (22).

İlerleyen dönemde sadece BMP değil, vasüler endotelial büyüme faktörü, insulin benzeri büyüme faktörü, epidermal, trombositin türetilmiş büyüme faktörü gibi hücresel gelişimi uyarıcı birçok ajan tanımlanıp, rejeneratif uygulamalarda kullanılmıştır (23-25). Diğer bir taraftan kemik doku mühendisliği alanında kullanılabilir hidrokapatit, trikalsiyum fosfat, polilaktik asit, polilaktik asit ko-glikolik asit ve bileşenleri üzerinde çalışmalar yoğunlaşmış ve bu materyaller sıklıkla kullanılmaktadır (26).

2007 yılında, Schnell ve ark. gerçekleştirdikleri çalışma ile polikoprolakton ve kollajen/polikoprolakton nanofiberler yardımıyla sinir dokusunda aksonal uzama ve sinir rejenerasyonu ortaya koymuşlardır (27).

2008 yılında gerçekleştirdikleri önemli çalışmada, Macchiarini ve ark. kadvadan elde edilen trakeyi asellüler hale getirip, alıcı hastanın kök hücrelerinden elde edilen hücreler yardımıyla in vitro ortamda elde edilen trakeyi alıcı hastaya

transplante etmişlerdir. Bu tarihi transplantasyon deneyimi, bilinen en önemli klinik doku mühendisliği uygulamalarının başında gelmektedir. Bu yönüyle doku mühendisliği, hem kök hücre biyolojisi hem de transplantasyon cerrahisinin bir arada uygulanması yönüyle oldukça önemlidir (28).

2.4.2. Kemik doku mühendisliğinde tercih edilen doku iskelesi özellikleri ve kullanılan polimerler

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan doku iskelelerinin temel amacı in vivo ortamda doku/organ eksikliğini gidermek olup, bu amaçla tercih edilen kimyasal polimerlerin de belirli kriterleri karşılaması amaçlanmaktadır (17).

Kemik doku mühendisliği amacıyla tercih edilen polimer:

- *Osteoindüksiyon* - Doku iskelesinin yapısına katılan polimerin, yapısında yüklenmiş olarak bulunan hücrelere veya mikroçevrede yer alan donör hücrelerine karşı toksik bir etkisi olmaması ve bu hücreleri osteojenik farklılaşmaları yönünde uyarıcı etkiye sahip olmasıdır.
- *Osteointegrasyon* – Doku iskelesi yapısına katılan polimerin inert yapıda olması, donörde yabancı cisim reaksiyonuna yol açmaması ve alıcı dokuyla entegrasyon göstermesidir.
- *Osteokondüksiyon* – Doku iskelesi yapısına katılan polimer uygulandığı mikroçevre ile uyumlu olarak kemik dokunun gelişmesine olanak sağlamasıdır. Uygun mekanik dirence sahip olmalıdır.
- *Biyobozunurluk* – Kullanılan doku iskelesi modeli, rejeneratif etki hedeflenen dokuda onarımı sağlarken, yeni doku oluşumuna da olanak sağlamalı ve kemikleşme gerçekleştikçe rezorbe olarak belirli bir sürenin sonunda yerini tamamen otojen dokuya bırakmalıdır (16, 29). Kemik doku mühendisliğinde tercih edilen doku iskelelerinin ortalama olarak 4 ay hücre kültürü / in vitro ortamda ve 2 ay in vivo ortamda olmak üzere, toplamda en az 6 ay süresince fiziksel özelliklerini korumaları gerekmektedir. Bu süre

içinde de immunojenik reaksiyon gelişmeksizin 12-18 ayda tamamen deşrede olmaları beklenmektedir (30).

Bu kriterler ışığında kemik doku mühendisliği uygulamalarında sıkça tercih edilen biyomalzemeler:

1. Doğal polimerler (kollajen, hyaluronik asit, kalsiyum aljinat, kitosan ve fibrin)
2. Mineraller (kalsiyum fosfat, seramik, biyoaktif cam)
3. Sentetik polimerler (polilaktik asit, poliglikolik asit, polilaktik ko-glikolik asit, polidaksanon, polikaprolakton)
4. Hidrojeller (örn. Peptit hidrojel)

olarak gruplanabilir (29, 31, 32).

Doğal ve mineral polimer yapısına sahip doku iskeleleri yüksek osteoindüksiyon kapasitesilerine rağmen özellikle uzun kemik modeli gibi yük taşınması beklenen bölgelerde gerekli onarımı sağlayamamaktadır. Aynı şekilde geniş kemik defektlerinin onarımı amacıyla da tercih edilmemektedirler (33).

Sıkça tercih edilen sentetik polimerler ise biyomekanik açıdan yeterli fiziksel özelliklere sahip olup yük taşıma becerisine sahipken, yeterli osteoindüksiyon kapasitesine sahip olmamaları nedeniyle tek başlarına ideal biyomalzeme olarak gözükmemektedir. Güncel stratejilerden biri iki polimerin kombinasyonu ile birisinin osteoindüktif, diğersinin osteokondüktif etkilerinin sinerjistik etki yaratmasını planlamaktır (34).

Hidrojeller, ısıya dayalı faz değişimi özellikleri, kimyasal ve 3 boyutlu yapılarının kolay şekillendirilebilir olmalarıyla güncel ilgi alanlarından biridir (35, 36). Mekanik özellikleri her zaman optimal olmasa da hücresel tedavilere uygun olması nedeniyle günümüzde özellikle rejeneratif potansiyelinin yüksek olduğuna inanılmaktadır (37, 38). Bu tez çalışması kapsamında da kök hücrelerin kolay uygulanabilmesi amacıyla metakrilatlanmış hidrojel yapıda bir doku iskelesi modeli tercih edilmiştir.

2.4.3. Doku iskeleleri ve üretim yöntemleri

Doku iskelesi modelinin kimyasal bileşeni kadar uygun üretim yöntemiin tercih edilmesi de bir o kadar önemlidir. Özellikle in vivo çalışmalarda optimum sonuçların elde edilmesi için güncel tekniklerin modifikasyonu, güncellenmeleri ve yeni tekniklerin ortaya konulması gerekebilmektedir (29). Hedeflenen uygun üretim tekniği ile doku rejenerasyonun artırılması hem de gerekli fiziksel özelliklerin sağlanmasıdır.

Yakın geçmişe geleneksel yöntemlerle üretim gerçekleştirilirken günümüzde gittikçe artan oranda bilgisayar destekli stratejiler alana giriş yapmıştır (39).

Bu tez çalışmasında kullanılan hidrojel doku iskelesinin fabrikasyonunda da kullanılan mikrodalga ışıma yöntemi 1960'lı yıllardan beri ilk olarak gıda sektöründe kullanılmaya başlanmıştır. Mikrodalga ışıma, özel fırınlar yardımıyla, maddenin elektromanyetik enerjiyi absorbe ederek ısı enerjisine dönüştürme kapasitesine dayanmaktadır. Mikrodalga enerjisinin konvansiyonel enerjiye kıyasla avantajları selektif olması, efektif olması ve zaman kazandırması olarak özetlenebilir. Tüm bunlara ek olarak mikrodalga enerjisinin kullanımı üretim basamaklarından çapraz bağlanmanın etkinliğini arttırmaktadır. Mikrodalga enerjisi hem fabrikasyon hem de fonksiyonalizasyon basamaklarında etkin bir biçimde kullanılmaktadır ve kullanım alanı gitgide artmaktadır (40, 41).

2.5. KÖK HÜCRE KAVRAMI

Kök hücre, somatik bir hücre olup, matür hücrelerden farklı olarak farklı hücre serilerine dönüşüm yeteneğine ve kendi içinde çoğalma ve yenileme yeteneğine sahiptir. Temel olarak iki çeşit olarak bulunurlar (42) Embriyonik kök hücreler implantasyon öncesi blastokistin iç tabakasında yer alırlar (43). Bu hücreler pluripotent özelliktedir ve her üç hücre tabakasına da farklılaşma yeteneğine sahiptir (44). Embriyonik kök hücrelerin, farklı çalışmalarda adipositlere, kas hücrelerine, kondrositlere, hematopoetik hücre öncüllerine ve diğer dokulara dönüşebildikleri gösterilmiştir (45-48). Embriyonik kök hücreler rejeneratif potansiyelleri açısından

büyük ilgi uyandırmalarına rağmen onkolojik kaygılar, etik ve mevcut yasal düzenlemeler nedeniyle uygulama alanları oldukça sınırlıdır (42).

Erişkin kök hücreler ise matür vücut dokularında yer alan somatik hücrelerin farklılaşma potansiyeline sahip özellikli formudur. Bugün bilinen en önemli kök hücre kaynaklarının başınca kemik iliği gelmektedir. Radyoterapi ve kemoterapi sonrasında gelişen kemik iliği yetmezliğinin tedavisinde yine kemik iliğinden elde edilen kök hücreler kullanılmaktadır.

Kemik iliğinde kökenli iki farklı kök hücre grubu yer almaktadır:

1. Hematopoetik kök hücreler
2. Mezenkimal / stromal kök hücreler

Hematopoetik kök hücreler, temel olarak kan dokusunun hücresel elemanları olan lökositler, eritrositler ve trombositlerin gelişiminden sorumludur. Mezenkimal kök hücreler ise kemik, kıkırdak, yağ ve kas gibi çeşitli bağ dokusu elemanlarının hücresel gelişimini sağlarlar (42).

Pluripotent olmalarına rağmen yasal düzenlemeler ve etik tartışmalar nedeniyle embriyonik kök hücrelerin kullanımı kısıtlı iken, multipotent olan mezenkimal kök hücrelerin çok daha fazla heyecan uyandırmıştır.

Kemik iliği başlıca mezenkimal kök hücre kaynağı olarak gözükmekte iken, elde edilmesinin ağrı ve morbidite ve sınırlı miktarda hücre edilebilmesi gibi dezavantajları nedeniyle ilerleyen yıllarda yapılan bazı çalışmalarda bağ dokusu matriksinde de mezenkimal kök hücrelerin bulunduğu keşfedilmesi büyük heyecan uyandırmıştır (49, 50).

2002 yılında doku mühendisliği uygulamalarında büyük ivmelenmeye yol açan bir çalışma Zuk ve ark. tarafından gerçekleştirilmiş mezenkimal kök hücrelerin insan yağ dokusunda da bulunduğunu gösterilmiştir (51). Yağ dokusu insanda geniş bir alana yayılmış olması, kolay ulaşılabilir olması ve plastik cerrahi için rutin bir prosedür olan liposuction / lipoaspirasyon tekniği ile elde edilebilmesi nedeniyle büyük ilgi uyandırmış ve kısa sürede önemli bir kaynak haline gelmiştir (42, 52).

2.5.1. Yağ Dokusu ve Mezenkimal Kök Hücreler

Yağ dokusunun temel hücresel bileşeni adipositler olmakla beraber, yap dokusu preadipositler, fibroblastlar, perisitler ve AkMKH gibi birçok hücre tipini barındırmaktadır (53).

Erişkin tip kök hücre olan AkMKH'ler, embriyonik kök hücrelerin deneysel ve klinik uygulamalarda kullanılması yürütülmekte olan etik ve yasal tartışmaların dışında kalmıştır. Embriyonik kök hücrelerin geniş spektrumlu farklılaşma yeteneğine sahip olmamalarına karşın AkMKH'lerin de yağ, kemik, kıkırdak, kas ve sinir dokularına başarılı bir şekilde farklılaşabildikleri gösterilmiştir (51, 54).

AkMKH'ler, hematopoietik kökenli kök hücreler (HkKH) ile karşılaştırıldıklarında in vitro ortamdaki davranışları, morfoloji ve yüzey belirteçleri dikkate alındığında oldukça benzer olarak değerlendirilebilir. Aslında iki hücre grubunun da farklı donör sahalardan elde edilmelerine karşın stromal kökenli (kemik iliğinin yağ dokusu ve cilt altı yağ dokusu) olmaları nedeniyle bu hiç şaşırtıcı değildir. Bu açıdan durum ele alındığında AkMKH'lerin fazla miktarda bulunmaları ve lipoaspirasyon ile kolaylıkla elde edilebilmeleri HkKH'lere oranla başlıca avantajları olarak görülebilir (55). Bir başka önemli avantajı ise yağ dokusundan elde edilen doku materyalinin çek hücre biyopsisine kıyasla çok daha fazla sayıda ve yopunlukta kök hücre içermesidir. Ortalama olarak kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi ile elde edilen materyalin en fazla %0.001'i kadarı kök hücre içermekteyken, yağ dokusundan elde edilen aspirattan izole edilen stromal vasküler fraksiyonun %10 kadarı mezenkimal kök hücre içermektedir (56, 57).

Temelde mezenkimal kök hücreler (MKH) plastik yüzeye tutunabilme becerileri ile ayırt edilirler. Bu kriterin dışında immunohistokimyasal olarak spesifik hücre belirteç panelleri ile karakterizasyonu analizi gerçekleştirilir.

International Society for Cellular Therapy, hücre kültürü ortamında MKH 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 serilerine farklılaşma yeteneği (58)

AkMKH'lerin karakterizasyonunda kullanılan tek bir spesifik hücre belirteci bulunmamaktadır. AkMKH'lerin yoğunlukla yağ dokusunda mikrovasküler dolaşımın çevresine yerleşmiş olarak bulunduğu ve temelde CD34+ / CD31- fenotipte oldukları Traktuev ve ark. tarafından ortaya konulmuştur (59). AkMKH'lerin in vivo ortamda donör endotel hücreleriyle etkileşime girerek sinerjistik etki ortaya koydukları ve neovaskülarizasyonu tetikledikleri yine aynı grubun bir başka çalışmasıyla gösterilmiştir (60).

Kök hücrelerin yer aldığı mikroçevre 'hücre nişi' olarak isimlendirilir ve hücrelerin proliferasyon ve differensiyasyonu için niş kavramı oldukça önemlidir. Hücre nişini ekstrasellüler matriks bileşenleri ve hücreler meydana getirmektedir. Bu yolla kök hücrelere nutrisyon ve oksijen desteği sağlanmakta ve büyüme faktörleri tarafından etkilenmeleri için uygun ortam meydana gelmektedir. AkMKH'lerin yağ dokusu içinde perivasküler bir nişte yer aldıkları ve CD34+ / CD90+ / CD31- / CD45- / CD146- fenotipi gösterdikleri söylenebilir (58).

2.5.2. Yağ Dokusundan Türetilmiş Kök Hücrelerin biyolojik özellikleri ve İn Vitro/İN Vivo Farklılaşma Potansiyelleri

Kök hücreler, matür hücrelerden farklı olarak sahip oldukları bazı özelliklerle, klinik uygulamalarda önemli bir etki potansiyeline sahip olmaktadır. Bunların başında sahip oldukları trofik etki, yaralanma bölgesine yönelme (homing), immün sistem modülasyonu ve farklılaşmasıdır (61, 62).

Kök hücreler, mikroçevrede gösterdikleri trofik etkiyi uyguladıkları ortama salgıladıkları sitokinler, ekstrasellüler matriks elemanları, ekstrasellüler matriks proteazları, büyüme faktörleri, hormonlar ve lipid mediatörleri yardımıyla gerçekleştirmektedirler. Özellikle vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), hepatosit büyüme faktörü ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF-beta) anjiyogenezi

ve yara iyileşmesini arttırmakta olup, yeni doku oluşumunu ve büyümeyi de uyarıcı etki göstermektedir. Yine yaralanma ile beraber kök hücrelerden salınan granülosit ve makrofaj uyarıcı faktör, interlökin -6,-7,-8, ve -11 ile beraber tümör nekrozu faktör alfa da ortama fagositik hücreleri çağırarak, ortamdaki nekrotik dokuların ve ölü hücrelerin debridmanına katkı sağlamaktadır (61, 63, 64).

Kök hücrelerin, her ne kadar in vitro ortamda önemli ölçüde büyüme faktörü ve benzeri sitokinler salgılasalar da, in vivo uygulamalarda aynı oranda büyüme faktörü salgılamadıkları gösterilmiştir. Bu durum dikkate alınarak klinik uygulamalarda gerekmesi halinde taşıyıcı sistemler ve doku iskeleleri yardımıyla büyüme faktörlerinin mikroçevreye ulaştırılması stratejileri rejeneratif etki için temel oluşturur (65).

AkMKH'lerin uyarılmış lenfositlerin proliferasyonunu hem hücreler arası iletişim üzerinden hem de parakrin sinyal yolları üzerinden inhibe ettikleri gerçekleştirilen in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (66). AkMKH'lerin belirgin immünmodülatuar etkileri olduğu, kolit, artrit ve graft vs. host reaksiyonu gibi inflammatuvar süreçlerin baskılanmasına yol açtığı in vivo çalışmalarda, ortaya konulmuştur. AkMKH'lerin immün tolerans sağlayan bu etkilerini salgıladıkları dönüştürücü büyüme faktörü-beta üzerinden prematür yardımcı T hücrelerin farklılaşmasını uyararak veya salgıladıkları galectin-1 ve -3 yoluyla parakrin yolak üzerinde T hücrelerin baskılanması ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir (67, 68).

Kök hücrelerin belirgin bir başka özellikleri, sistemik veya lokal uygulama sonrasında yaralanma bölgesine yönelmeleri ve yerleşmeleridir (*homing fenomeni*) (69). Bu durumun AkMKH'lerin sahip oldukları epidermal büyüme faktörü ve diğer sitokinlerin yüzey reseptörlerinin yarattığı kemoatraktan etki yoluyla olabileceği düşünülmektedir (70). Kök hücrelerin sistemik uygulamayla beraber hasarlı dokuya yönelmeleri, bazı nörodejeneratif hastalıklar ve graft vs. host reaksiyonu problemlerin tedavisinde etkili olma potansiyeline sahiptir.

Kök hücrelerin farklılaşma yetenekleri, sahip oldukları bir başka özellik olarak dikkat çekmektedir (71). Üç haftalık bir farklılaşma zamanı sonucunda preadipositlerin farklılaşmasıyla AkMKH'lerin yağ dokusuna dönüşümü en olası dönüşüm olarak gözükmektedir (72). Klinik açıdan AkMKH'lerin bu farklılaşma potansiyelinin, yağ grefti

uygulamalarında yeri olduğu açıktır. Güncel olarak yağ grefti uygulamalarında amaç uygulama alanında yeni damar oluşumunu tetikleme ve adipositlere farklılaşma ve potansiyelleri bulunan AkMKH'lerin de nakledilmesi olmalıdır (53).

AkMKH'lerin uygun kültür ortamında 3 hafta sonunda kartilajinöz matriks elemanları sentezleyerek kıkırdak seriye farklılaştıkları gösterilmiştir (73). Kıkırdak dokunun avasküler olduğu ve rejenerasyon yeteneği bulunmadığı değerlendirildiğinde, AkMKH'lerin kullanımının doku mühendisliği yardımıyla kıkırdak defektlerin rekonstrüksiyonu açısından büyük heyecan uyandırmaktadır (42).

Diğer doku serileriyle kıyaslandığında AkMKH'lerin myositlere farklılaşması daha güç ve in vivo ortamda toplamda 8 haftada gerçekleşebilmektedir. AkMKH'lerin kas dokusuna dönüştükleri myogenez sonucunda sentezlenen hücrelerin myoD, myogenin, myosin zincirleri ekspresyonlarıyla anlaşmaktadır (74).

AkMKH'lerin ektodermal orijinde olan sinir dokusuna farklılaşması beklenmemekle beraber, sinir benzeri dokuya farklılaşma gösterdikleri bildirilmiştir. Hayvan modelinde yapılan bir deneysel çalışmada, arteria cerebra media oklüzyonunun tedavisinde intraventriküler uygulanan AkMKH'lerin hasarlı beyin bölgelerine yerleşim gösterip nörolojik fonksiyonları iyileştirdikleri tespit edilmiştir (69). Bu yönüyle bilimsel platformlarda, AkMKH'lerin mesoderm haricindeki diğer embriyolojik hücre tabakalarından köken almış hücre serilerine de farklılaşabilmeleri nedeniyle, multipotent değil pluripotent olduğu yönünde tartışmalar mevcuttur. Ancak farklı hücre morfolojisi nedeniyle pluripotent hücrelerden bu önerge yaygın olarak kabul görmemektedir (58).

AkMKH'lerin üzerinde yapılan güncel araştırmalarda özellikle osteojenik farklılaşma üzerinde durulmaktadır. Osteojenik farklılaşma için de uygun in vitro kültür ortamında yine en az 3 hafta zaman geçmesi gerekmektedir. Bu zamanın sonunda AkMKH'ler mineralize ekstrasellüler matriks sentezlemeye başlamakta ve matür osteoblast belirteçleri olan osteopontin, osteokalsin, CBFA-1 ve alkalin fosfat (12) ekspresyonu ile kemikleşme değerlendirilmektedir (75).

AkMKH'lerin kemikleşme potansiyelleri in vivo ortamda gerçekleştirilen çalışmalarda da değerlendirilmiştir. Farede kritik boyutlu kemik defekti modelinde,

Cowen ve ark. defekt alanına uygulanan AkMKH`lerin, in vivo ortamda kemikleşme potansiyelini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonunda AkMKH`lerin kemik rejenerasyonuna anlamlı katkıda buldukları ortaya konulmuştur (76).

AkMKH`lerin klinik uygulamasına ilişkin ilk çalışma, Lendeckel ve ark. tarafından 2004 yılında tek bir olgunun sunumu olarak yayınlanmıştır. Bu hastada travmatik kalvariyal kemik defektin onarımı amacıyla otolog AkMKH`ler uygulanmıştır. AkMKH`ler fibrin glue, kemik fragmanları ve doku iskelesi görevi görmesi amacıyla biyobozunur bir materyal yardımıyla kemik defektine uygulanmış ve sonuç olarak hedeflenen kemik iyileşmesi elde edilmiştir (77).

2.6. FOTOTERAPİ KAVRAMI

Fototerapi, genel bir kavram olarak ışık enerjisi yardımıyla kaza ve hastalıklar sonucunda meydana gelen hücresel bozuklukların iyileştirilmesi ve biyolojik yanıtın düzenlenmesi olarak tanımlanabilir. ‘Fototerapi’ genel bir kavram olarak ışık enerjisinin iyileştirme ve onarım amacıyla kullanımı tanımlasa da ‘fotobiyomodülasyon’ (78, 79), ‘fotobiyostimülasyon’ (80), ‘düşük seviyeli lazer tedavisi’ (81, 82) gibi farklı biçimlerde de isimlendirilebilmektedir.

Işık kaynaklarının tıp alanında kullanımı, antik çağlara dayansa da modern anlamda öncülerinde biri Niels Finsen olup, tüberküloz tedavisi için ‘kimyasal ışın’ lambası adını verdiği yöntemle ultraviyole (UV) tedavisi uygulamış ve sonradan 1903 yılında Nobel ödülü kazanmıştır (83). Sonradan bir süre popüleritesi kaybeden fototerapi yaklaşımları, 1960’lı yıllarla beraber yakut (ruby) lazerin keşfi ve tıp alanında özellikle göz alanında kullanılmaya başlanmasıyla ivme kazanmıştır.

Rejeneratif tıpta ışık kaynaklarının etkisi ise ilginç olarak bir tesadüf sonucu keşfedilmiştir. 1967 yılında Macaristan Semmelweis Üniversitesi’nde biyofizikçi Profesör Mester, dönemin popüler konularından olan yakut lazerin kansere neden olup olmadığını araştırmak üzere planladığı deneysel çalışma kapsamında, fareleri iki gruba ayırıp sırtlarındaki tüyleri tıraş etmiş ve gruplardan birine lazer uygularken kontrol grubuna herhangi bir tedavi vermemiştir (84). Işık enerjisi uygulanmamış olan hayvanlara kıyasla, lazer uygulanmış olan hayvanların tüylerinin daha hızlı

uzadığını farketmesiyle ışık kaynaklarının ‘biyostimulasyon’ etkisi de ortaya koymuş olmuştur.

Mester’in biyostimülasyon konusunu ortaya atmasında itibaren geçen 50’den fazla yılda birçok çalışma ile düşük seviyeli lazer’ tedavilerinin doku ve hücresele seviyede etkileri araştırılmaya çalışılmıştır (85-87). Mester günümüzde de ‘fotobiyomodülasyonun babası’ olarak tanımlanmaktadır. İlk çalışmasında sonraki dönemde düşük seviyeli lazer uygulamalarının, kemik, kırık, tendon, kas gibi dokularda rejeneratif etkiyi artırıcı etkisinin olduğu yönünde çalışmalar ortaya konulmuştur (88).

2.6.1. Düşük seviyeli lazer ve Işık yayan diyet kavramları

Lazer ışını, doğal ışık kaynaklarının aksine, normal koşullarda evrende bulunmaz. Tek dalga boyunda, monokromatik (tek renk), yapısına dışarıdan elektron eklenen bir atomun yaydığı ve birbirine paralel olarak aynı fazda hareket eden (koherent) foton parçacıklarından oluşan ve saçılım göstermeyen bir ışın demetidir. Lazer ışık kaynakları tek dalga boyunda ışımaya gösterir. Bu nedenle belli frekanstaki yoğun enerji sınırlı bir alanda etki göstermektedir. Lazer sistemleri, foton partiküllerinin oluşmasını sağlayan aktif elementine göre isimlendirilir ve belirli dalga boylarıyla tanımlanırlar. Örnek olarak He-Ne lazer, dalga boyu 632,8 nm.

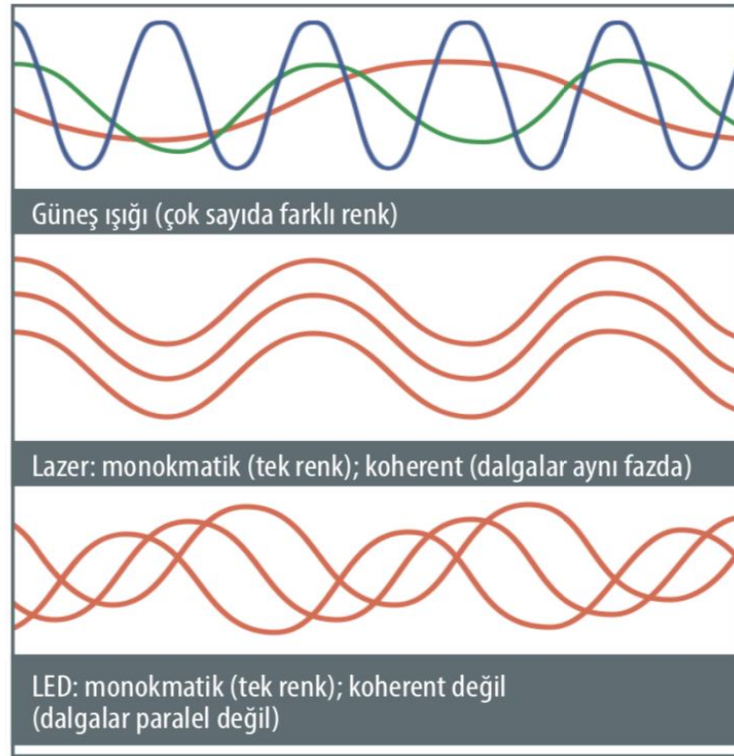
Çıkış güçlerine bağlı olarak günümüzde iki tip lazer kullanılıyor:

- Yüksek seviyeli lazerler (çıkış güçleri 10-100 watt aralığında)
- Düşük seviyeli lazerler (çıkış güçleri milliwatt düzeyinde)

Yüksek enerjili lazerler dokuları kesmek, yakmak veya ablasyon tıpta ve cerrahide sıklıkla kullanılıyor. Uygulama sonucunda yüksek ısı açığa çıkması nedeniyle sıcak lazerler olarak da isimlendirilebilmektedir. Rejeneratif uygulamalar için tercih edilmedikleri gibi, yüksek ısı açığa çıkması nedeniyle yara iyileştirmesinde olumsuz etkileri de olabilmektedir.

Düşük enerjili lazerler ise dokularda sıcaklık değişimine neden olmamaları nedeniyle, fotobiyomodülasyonda kullanılabilir. Bu amaçla kullanılan lazerlerin başında kullanılan lazer modaliteleri ve etkin dalga boyları şu şekildedir:

- Helyum-neon lazer (He-Ne: 632,8 nm)
- Galyum-alüminyum lazer (Ga-Al: 630-685 nm)
- Helyum-neon-arsenit lazer (He-Ne-As: 780-870 nm)
- Galyum-arsenit lazer (Ga-As: 904 nm)
- Yakut / Ruby lazerdir (694 nm)



Şekil 2.3. Güneş ışığı, lazer ve LED ışıklarının özellikleri(89)

Işık yayan diyotlar olarak bilinen, LED ışık kaynakları ise 1990'lı yıllarla beraber geliştirilmiş ve gündeme gelmiştir. LED'lerin yapılarında lazerlerden farklı olarak elektron geçişini sağlayan iki ayrı yarı iletken bulunur. Bu nedenle, LED ışık kaynaklarından farklı dalga boylarında foton partikülleri yayılır. LED'ler monokromatik (tek renk) ancak koherent olmayan (dalgalar paralel değil) ışık

kaynaklarıdır. Bu noktada hareketle doku mühendisliği çalışmalarında LED (*ışık yayan diyotlar-light emitting diodes*) kavramı bir süre sonra alternatif olarak ortaya çıkmış ve halen literatürde hangi modalitenin daha optimum etki sağlayacağı konusunda net bir fikir birliğine varılamamıştır (90).

2.6.2. Plazma ark ışık kaynakları

Plazma ark ışık kaynaklarında, içerisinde birbirinden ayrı iki tungsten elektrot, inert gaz dolu basınçlı bir hazne içerisinde bulunur. Bu elektrotların aralarında bulunan boşluk, yüksek elektrik potansiyeli oluşturulmasına olanak sağlar. Elektrik enerjisinin verilmesi ile beraber, yüksek voltajlı elektrik oluşması elektrotlar arasında bir kıvılcım meydana getirir ve çevresindeki ksenon gazı iyonize olarak plazmayı meydana getirir.

‘Plazma’ kelimesi, yüksek sıcaklıkta, pozitif iyonlardan ve elektrotlardan oluşmuş iyonize gazı ifade eder. Bu yolla yüksek seviyelerde enerji oluşturulabilmektedir. Plazma ark ışık kaynaklarının en önemli özelliği, lazer ve LED ışık kaynaklarından farklı olarak, morötesi (UV), görünür ve yakın kızılötesi (IR) olmak üzere oldukça geniş bir enerji spektrumları vardır (91).

Bu tez çalışması kapsamında polikromatik ışık yayma kapasitesine sahip bir plazma ark ışık kaynağının fotobiyomodülasyon etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

2.6.3. Fotobiyomodülasyonun hücresel düzeyde etkileri

Işık enerjisinin doku üzerinde fotobiyomodülasyon etkisinin olabilmesi için fotobiyolojinin iki temel kriterini karşılıyor olması gerekmektedir:

- Hedef dokuda foton partiküller ile interaksiyona girebilecek bir moleküler kromofor veya fotoakseptör bulunması gerekmektedir.
- Işık enerjisine bağlı yolakların harekete geçebilmesi için dokuların ışık enerjisini soğurabilecek optik özellikleri barındırması gerekmektedir.

Işığın dokuya en etkin şekilde penetre olduğu aralık ‘optik pencere’ olarak isimlendirilmektedir. Bu aralık yaklaşık olarak 650-1200 nm dalga boyu arasındadır. Kısa dalga boylarında kromoforlar (hemoglobulin ve melanin), ışığı çok daha etkin şekilde soğururlar. 1100 nm’den daha büyük dalga boylarında ise su, doku tarafından güçlü bir şekilde absorblanarak dokuda ışı artışına ve termal hasara yol açabilir.

Fotostimülasyon uygulamalarında, dokuların zarar görmemesi için, kırmızı ve kırmızıya yakın dalga boylarında ısı kullanılmaktadır (600-1100nm). Bu yolla, hücresel düzeyde proliferasyonu ve hücre farklılaşmasının gibi birçok biyolojik süreç uyarılmaktadır. Halen bu etkiye yol açan moleküler yollar tam olarak aydınlatılmamış olsa da özellikle etkinin mitokondri düzeyinde gerçekleştiği bilinmektedir.

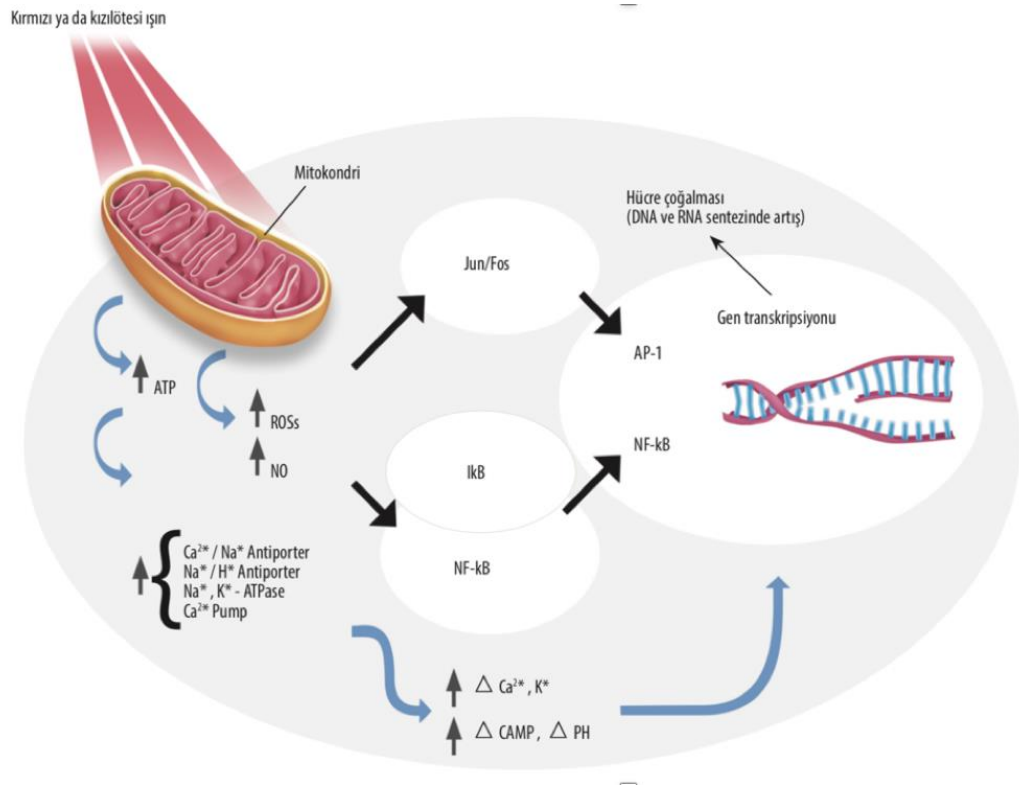
İlk olarak Karu ve ark. tarafından 1989 yılında gerçekleştirilen çalışmada mitokondriye ait kromoforlartarafından monokromatik düşük seviyeli lazer dalgalarının absorbe edildiği ve bunun bir seri hücresel reaksiyonu tetiklediği gösterilmiştir. Hücresel enerji üretiminden sorumlu olan hücrenin bir anlamda ‘güç ünitesi’ görevi gören mitokondrinin iç zarında solunum reaksiyonlarından sorumlu birçok kompleks yer almaktadır. Bunların başında NADH dehidrogenaz (kompleks I), suksinat dehidrogenaz (kompleks II), sitokrom bc1 (kompleks III), sitokrom c oksidaz (kompleks IV), ATP sentetaz ve iki tane serbest ubiquitin ve sitokrom c üniteleri yer almaktadır. Yapılan spektrometrik çalışmalarda bu ünitelerden özellikle sitokrom c oksidaz’ın foton partikülleri için reseptör gibi davrandığı ve enerjinin absorpsiyonuyla bir dizi fosforilasyon reaksiyonunun tetiklendiği gösterilmiştir.

Sitokrom c oksidazın uyarılması ve mitokondriyal solunum reaksiyonlarının tetiklenmesi aynı zamanda hücre içinde nitric oksit (NO) üretimi de arttırmaktadır. Bu yolla hipoksi/rejenerasyon açısından kardiyomyosit modelinde hasara görmüş hücrelerin iyileşme gösterdiği gösterilmiştir. Hücre içi NO düzeylerinin arttığının aynı zamanda travma sonrası iyileşme sürecinde vazodilatasyon ile mikrodolaşımı desteklediği, lenfödem ve ödem tedavisinde katkı sunduğu gösterilmiştir (Donadee 2011).

Fotobiyomodülasyon ile aktarılan ışık enerjisi hücrelerin redoks potansiyelini değiştirirerek hücre içi serbest oksijen radikallerinin (ROS) de seviyesinde artışa neden

olur ((ASC77-79). ROS, serbest radikaller (hidroksil radikalleri, hidrojen peroksitler), süperoksit, ve hidroksil radikalleri içeren oksijen iyonlarıdır. Bu radikaller hücre içinde oksidatif solunum reaksiyonları sonucunda meydana gelmektedir ve hücrel birçok aktivitenin düzenlenmesinde aktif rol oynarlar. Bu aktivitelerin başında, sinyal iletimi, nükleik asit ve protein sentezi, enzim indüksiyonu ve hücre proliferasyonu gelmektedir. ROS/Akt yolu aracılığı ile hücre proliferasyonunu indüklenir. Aynı zamanda, sitoplazmik cevaplar aracılı ile transkripsiyonel değişiklikler de meydana gelmektedir. NF- κ B gibi birçok transkripsiyon faktörü hücrel redoks seviyesindeki değişimler ile düzenlenmektedir (Sekil 2.8) (83).

Fotobiyomodülasyon ile hücre içi sinyal iletimi ile beraber hücrenin membran geçirgenliği de değiştirmektedir (84). Hücre içinde meydana gelen bu etkileşimlerle beraber dokuda proliferasyon ve rejenerasyon kapasitesinde artış görülmektedir. Klinik olarak da yara iyileşmesinde artış, epitelizasyon, anjiyogenez ve mikrodolaşımda iyileşme ile sonuçlanmaktadır (85, 86).



Şekil 2.4. Fotobiyomodülasyon sonrası hücrede meydana gelen değişiklikler (89)

2.6.4. Fotobiyomodülasyonun hücreler üzerindeki etkisi

Fotobiyomodülasyon temelde hücre proliferasyonunda artış ile etki eder. Her ne kadar fotobiyomodülasyonun hücre proliferasyonunu arttırdığı genel kanı olarak yer alsada hücre proliferasyonunu arttırmadığı yönünde çalışmalar da mevcuttur. 830 nm dalga boyunun Ga-Al-As lazer ile yapılan bir çalışmada, fibroblast ve keratinosit hücrelerinin *in vitro* ortamda proliferasyonlarını arttırmadığını göstermiştir. Bir başka çarpıcı çalışmada ise fotobiyomodülasyonun her hücre tipine aynı oranda etki etmediği ve fibroblastların endotel hücrelerine kıyasla daha fazla cevap verdiği gösterilmiştir. Bu noktadan hareketle, fotobiyomodülasyon çalışmalarında hücre tipinin ve dalga boyunun önemi görülmüştür (87).

Fotobiyomodülasyonun MKHler üzerindeki etkisi Hou ve ark. yaptıkları çalışmada indium-galyum-arsenit-fosfat (In-Ga-As-P) ışık kaynağı ve 635 nm dalga boyu ile değerlendirilmiştir. Kemik iliğinden izole ettikleri kök hücrelere, sırasıyla, 75, 150, 300 ve 750 s, 0.5, 1, 2 ve 5 J/cm² enerji yoğunluğunda ışık uygulamışlardır ve hücre proliferasyonu kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır (89). Tuby ve ark. *in vitro* koşullarda, 840 nm dalga boyunda Ga-As lazer kullanarak, kardiyak kök hücrelerin hücre sayısının fotobiyomodülasyon ile önemli ölçüde arttığını göstermişlerdir (90). İnsan dental pulpa kök hücreleri ile yapılan bir diğer çalışmada 660 nm (In-Ga-Al-P) dalga boyunda ve 3 J/cm² enerji yoğunluğunda, hücre büyümesinin anlamlı miktarda artış gösterdiği belirlenmiştir (91). AkMKH'ler ile yapılan fotobiyomodülasyon çalışmasında, 635 nm dalga boyunda, 5 J/cm² enerji yoğunluğunda proliferasyonun uyarıldığı ve β 1-integrin seviyesinin belirgin olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir (80).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli izinin alınmasını takiben (Karar No:2017/29-4) Hacettepe Üniversitesi Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanlarının tüm cerrahi işlemleri, bakımları ve izlemleri bu laboratuvarda yapılmıştır.

Çalışmada ortalama olarak 250-350 gram arasında ağırlığa sahip, toplam 36 adet erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Deney modeli olarak çalışmada kullanılan sıçan türü için kritik boyutlu olarak kabul edilen genişlikte, 'kritik boyutlu kraniyel kemik defekti modeli' kullanılmıştır (92, 93). Tüm hayvanlar, standart oda sıcaklığında ve otokannibalizasyonun önlenmesi amacıyla her kafeste birer sıçan olacak şekilde barındırıldı. İşlem öncesi değerlendirmede çalışmaya dahil edilen hayvanların hiçbirinde enfeksiyon, açık yara, malnutrisyon veya başka bir sağlık problemi gözlenmedi. Beslenmelerinde standart yem ve musluk suyu kullanıldı. Cerrahi işlemden 6 saat öncesinde, hayvanlar aç bırakılarak, 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. Kök hücre
3. Işık kaynağı

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN DOKU İSKELESİ MODELİ

Çalışmada kullanılan mikrodalga ışıma yardımıyla metakrilatlanmış hidrojel (JEL-MA) doku iskelesi üretim tekniği Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği ve Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarı'nda tanımlanmış ve bu çalışmada

kullanılan doku iskelelerinin üretim ve karakterizasyonu da aynı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Metakrilatlanmış Hidrojel Doku İskelesinin yapısı ve üretimi

Tez çalışması kapsamında jelatinin metakrilatlama prosesi için mikrodalga enerjisi (Mw) kullanılmıştır. Bu proseste Tip A Jelatin (%10, w/v) 50°C’de PBS (pH:7.4) içinde karıştırılarak çözülmüş ve çözelti sıcaklık-kontrollü mikrodalga reaktör (Milestone, İtalya) içine alınmıştır. Metakrilik anhidrit (%4, v/v) enjektör pompası aracılığıyla 0.4 mL/dk akış hızında çözeltiye eklenmiş olup bu sırada Mw enerjisi uygulanmış ve metakrilatlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Mw enerjisi ile sistem sıcaklığı ani olarak artacağından dolayı sıcaklığı sabit tutmak için güç kısa aralıklarla verilerek sistem soğuması sağlandıktan sonra güç uygulaması tekrarlanmıştır. Metakrilatlama prosesi için 1,000 W arasında değişen güçlerde mikrodalga uygulanmıştır. Ardından çözelti diyaliz membrana alınarak bir gün süreyle diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Bu sayede reaksiyona girmemiş metakrilik anhidrit yapıdan uzaklaştırılarak çözelti saflaştırılmıştır. Diyaliz işleminden sonra çözelti liyofilizatörde (Christ, Almanya) kurutulmuştur. Kurutulan örnekler -80°C’de saklanmıştır.

Tablo 3.1. Jel-MA hidrojen doku iskelesi sentez koşulları.

Jel-MA üretim yöntemi	MA konsantrasyonu (%)	Güç (W)	Reaksiyon süresi (94)	Diyaliz süresi (95)
Mikrodalga	4	1,000	5 (20s x15)	1

3.2.2. Metakrilatlanmış Hidrojel Doku İskelesinin Karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan hidrojel doku iskelesinin mekanik özelliklerinin belirlenmesi ve karakterizasyon analizi için gerçekleştirilen analizler:

1. Reolojik Analiz
2. Mekanik Analiz
3. Morfolojik Analiz
4. Biyobozunurluk Tayini

3.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN AkMKHLERİN İZOLE EDİLMESİ

3.3.1. Sıçan Yağ Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre (AkMKH) İzolasyonu ve pasajlanması

Tez çalışmasında kullanılan AkMKHlerin izolasyon ve karakterizasyon çalışmaları Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nde çalışma ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir.

AkMKH'lerin izolasyonunda kullanılan protokol ise şu şekildedir (81-84, 86, 88-96:

- Sprague-Dawley türü sıçanların orta hat laparotomi insizyonu ile karın içine girilip, retroperitoneal bölgede yer alan perirenal yağ dokusu ortaya konuldu
- Elde edilen yağ dokusu önce PBS içerisinde yıkanarak sonrasında başka bir petri kabına aktarılıp fragmente edildi.
- Kimyasal lipoliz amacıyla 25 ml. %0,075 tip 1 kollajenaz içerisinde yağ dokusu sonrasında 37 °C de belirli aralıklarla çalkalanıp, toplamda 60 dakika olacak şekilde bekletildi. İnkübasyonu takiben tüpler yeniden çalkalandı.
- Elde edilen solüsyon PBS ile homojenize edilip 1800 rpm.de santrifüj edildi.
- Supernatant solüsyon atılıp üzerine 10 ml. standart hücre kültürü ortamı eklenerek 1800 rpm.de 10 dakika daha santrifüj edildi. Bu işlem 2 defa tekrar edildi.
- Santrifüj sonrası supernatant yeniden atılıp sonuç olarak elde edilen stromal vasküler fraksiyon (SVF) 70 µm.lik süzgeç yardımıyla filtrelendi.
- Hücreler ve doku parçaları: α-MEM, %15 FBS, gentamisin, %0,1 P/S ve %0,1 amfoterisin B içeren standart in vitro kültür ortamına alındı.
- 72 saat sonra kültür kabı değiştirilip üreme sonucunda kültür kabının %75'i kaplanınca pasajlama gerçekleştirildi.

- Tüm hücrelerin yüzeyden kalktıkları gözlemlendikten sonra 600 µl. Tripsin-EDTA 5 ml. ortam ile seyreltilip, 800 rpm.de 5 dakika santrifüj edildi. Sonrasında, hücreler, yeni doku kültürü ortamına 1'e 4 oranında olacak şekilde 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.

3.3.2. AkMKH'lerin karakterizasyonu ve in vivo uygulanması

Sıçan kökenli AkMKH'lerin fenotipik karakterizasyon analizi amacıyla farklılaştırılmamış mezenkimal hücrelere akış sitometri analizi gerçekleştirilmiştir. Analizler Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği ve Biyomühendislik Bölümü Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Laboratuvarı tarafından gerçekleştirilmiştir.

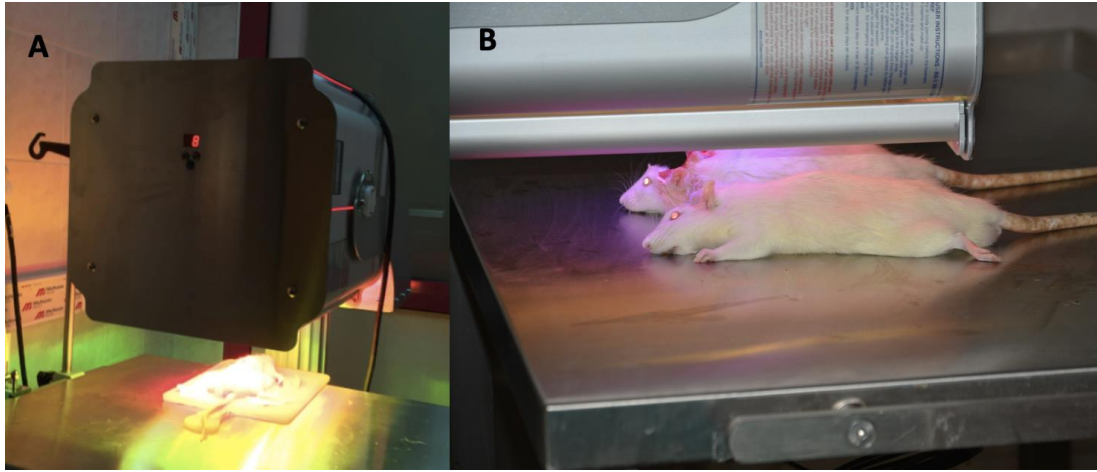
Uygulanan protokolde AkMKH'ler yüzeyden kaldırılarak hücre yoğunluğu 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde süspansiyon edilmiştir. Santrifüjden sonra yıkama tamponunda süspansiyon edilen hücrelere 300 µL floresan izotiyosiyanat (FITC)-konjuge antikorlar eklenerek oda sıcaklığında 45 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir. 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 AkMKHlerin uygunluğu doğrulandıktan sonra, deney gruplarına 1×10^6 hücre/doku iskelesi olacak şekilde ilgili uygulandı.

3.4. FOTOBİYOMODÜLASYON İÇİN KULLANILAN IŞIK KAYNAĞI

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmada fotobiyomodülasyon amacıyla kullanılan ışık kaynağı (Collagentex, Tanses Technologies, Montreal, Quebec, Canada), kuartz plazma ark lamba, özel filtreler ve

reflektör sisteminden meydana gelmektedir (Şekil 3.2). Cihaz, 590-1395 nm arası dalga boylarını kapsayan polikromatik ışık ve kızılötesine yakın foton enerjisi sağlarken, 550 nm altında ve 1500 nm üzerinde dalga boylarının emisyonuna engel olmaktadır. Cihazın çıkış gücü 685 W'dır, plazma ark ışık kaynağı olarak tanımlanmaktadır. Cihazdan yayılan ışık 0,3 m²'lik alanda etkilidir ve enerji yoğunluğu 130 mW/cm²'dir. Fotobiyomodülasyon 48 saat aralıklarda, 10 cm. mesafeden hayvanlar prone pozisyonda yatarken kraniyel bölgeye uygulanmıştır.



Şekil 3.1. A. Tez çalışmasında fotobiyomodülasyon uygulanması amacıyla kullanılan ışık kaynağı B. Çalışma kapsamında kraniyel kemik defekti uygulanması

3.5. DENEY GRUPLARI

Çalışma kapsamında toplamında 36 adet Sprague-Dawşey cinsi sıçan, her bir grupta toplam 12 hayvan olacak şekilde 3 gruba randomize olarak ayrıldı. Standart olarak tüm hayvanların kalvariyumunda biparietal, birbirinden bağımsız 6 mm. çapında tam kalınlıkta kemik defektleri meydana getirildi. Bu şekilde, her bir sıçandan 2 bağımsız örnek elde edildi. Örnekler tüm hayvanlarda 20 hafta sonunda elde edildi. Gruplardaki hayvanların yarısına deney boyunca ışık tedavisi – fotobiyomodülasyon uygulanırken, yarısına uygulanmadı ve deney süresinin sonunda biyomateryallerin ve hücresel tedavilerin kemik iyileşmesine etkisinin yanısıra, fotobiyomodülasyonun de kemikleşmeye ve kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasına katkısının değerlendirilmesi amaçlandı.

- 1. Kontrol grubu:** Bu grupta 6 mm. boyutunda kemik defekti biparietal olarak meydana getirildi ve herhangi bir tedavi edici uygulama gerçekleştirilmeksizin işleme son verildi. 20. haftada hayvanlar sakrifiye edilerek örnekler elde edildi. Bu gruptaki hayvanların randomize olarak belirlenen 6 tanesine fotobiyomodülasyon uygulanırken, 6 tanesine herhangi bir tedavi uygulanmamıştır.
- 2. Hücresiz metakrilatlanmış hidrojel doku iskelesi grubu, (JEL-MA):** Bu grupta 6 mm. boyutlu kemik defekti biparietal olarak meydana getirildi ve oluşturulan defekte kök hücre içermeyen metakrilatlanmış hidrojel yapıda doku iskelesi yerleştirilip işleme son verildi. 20. haftada hayvanlar sakrifiye edilerek örnekler elde edildi. Bu gruptaki hayvanların randomize olarak belirlenen 6 tanesine fotobiyomodülasyon uygulanırken, 6 tanesine herhangi bir tedavi uygulanmamıştır.
- 3. Kök hücre içeren metakrilatlanmış hidrojel doku iskelesi grubu, (JEL-MA+AKMKH):** Bu grupta 6 mm. boyutlu kemik defekti biparietal olarak meydana getirildi ve oluşturulan defekte yağ dokusundan elde edilen kök hücre içeren metakrilatlanmış hidrojel yapıda doku iskelesi yerleştirilip işleme son verildi. 20. haftada hayvanlar sakrifiye edilerek örnekler elde edildi. Bu gruptaki hayvanların randomize olarak belirlenen 6 tanesine fotobiyomodülasyon uygulanırken, 6 tanesine herhangi bir tedavi uygulanmamıştır.

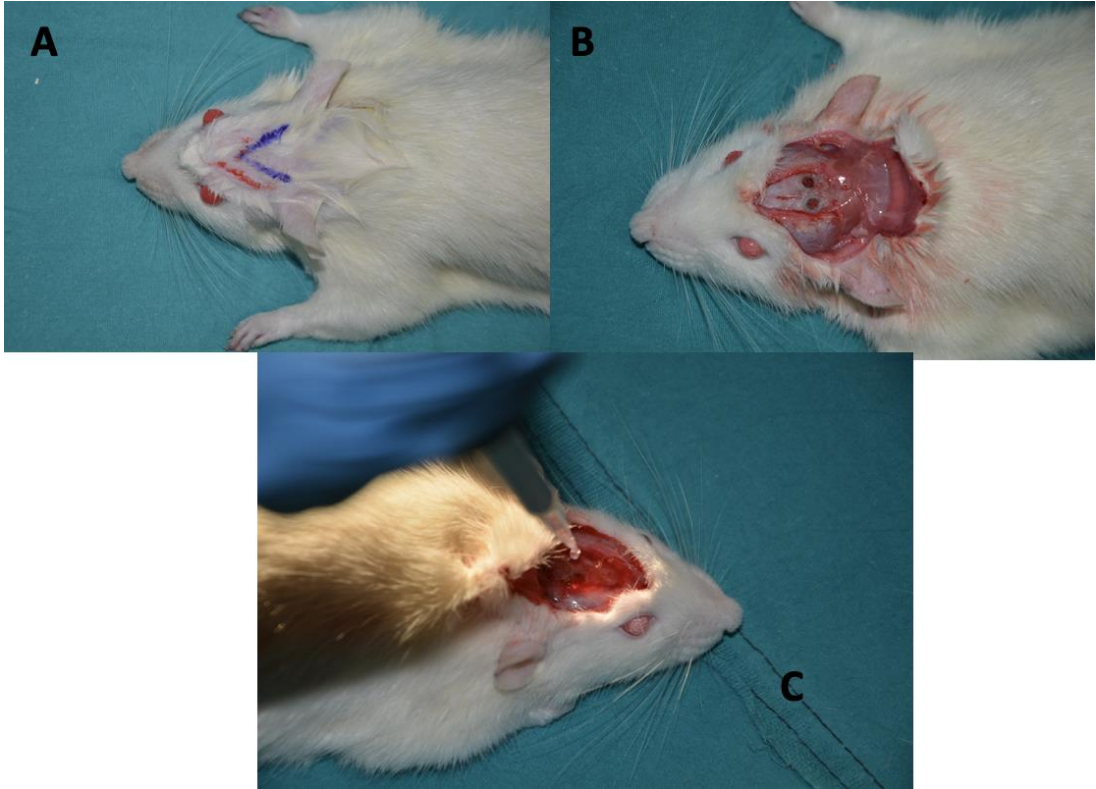
3.6. ANESTEZİ

Tüm hayvanlara intraperitoneal olarak uygulanan ketamin (90 mg/kg - Ketalar®, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve ksilazin (10 mg/kg - Rompun®, Bayer, Türkiye) karışımı uygulanmıştır. Anestezi derinliği, periyodik olarak cilt veya parmak kıstırma testi ile deney süresince değerlendirildi. Deney devam ederken anestezinin yüzeyelleşmesi nedeniyle gerekmesi halinde ek doz olarak 10 mg/kg ketamin ve 2mg/kg ksilazin verilerek anestezinin devamı sağlandı.

3.7. CERRAHİ İŞLEM

Anestezi indüksiyonunu takiben, tüm hayvanların insizyon bölgesi traşlanarak, povidon – iyodin solüsyonu (Batticon, Türkiye) ile antisepsi uygulanmıştır. Cerrahi sahanın hazırlanmasını takiben, steril koşullarda örtülerek işleme başlandı. Dorsal V şeklinde bir insizyonla skalp flebi kaldırılıp, periostun insizyonu ve subperisoteal disseksiyon ile kemik ortaya konuldu. Dental burr yardımıyla sağ ve sol parietal kemikler üzerinde sagittal sütür hattının geçilmemesine ve duranın yaralanmamasına özen gösterilerek 6 mm. lik yuvarlak şekilli tam kalınlıkta kemik defekti oluşturuldu. İşlem boyunca sürekli %0.9'luk serum fizyolojik çözeltisi ile irrigasyon standart olarak tüm hayvanlara uygulanmıştır.

Defektlerin hazırlanmasını takiben deney grubu dikkate alınarak ilgili deneysel işlem gerçekleştirilip kaldırılan skalp flebi yerine iade edilerek cilt insizyonu 4-0 polipropilen sütür materyali (Doğsan, Türkiye) ile onarılarak işleme son verildi.



Şekil 3.2. Cerrahi İşlem

A. Cerrahi işlem öncesinde cerrahi alan traş edilip, dorsal V şeklinde insizyonun planlanmaktadır B. Skalp flebinin kaldırılmasını takiben, biparietal kritik boyutlu kemik defekti oluşturulmaktadır. C. Deneysel çalışma kapsamında mikropipet yardımıyla hidrojel JEL-MA doku iskelesinin defekte uygulanması

3.8. CERRAHİ SONRASI İZLEM

Deney hayvanları, otokannibalizmin önlenmesi amacıyla ayrı ayrı olarak postoperative dönemde kafeslere yerleştirilerek, cerrahi sonrası ağrının kontrolü amacıyla 2 mg/ml parasetamol peroral verildi. Hayvanların deney süreci boyunca; günlük olarak, genel durum, vücut ağırlığı, malnutrisyon, enfeksiyon bulguları yönünden değerlendirildi ve hayvanlar ad libitum olarak standart yem ile beslendi.

3.9. ÖTENAZİ

Deney sürelerinin tamamlanmasını takiben örneklerin elde edilerek deneyin sonlandırılması amacıyla, deney hayvanlarına yüksek doz anestetik uygulanarak sakrifikasyon gerçekleştirilmiştir.

3.10. MAKROSKOPİK DEĞERLENDİRME

Deney süresi sonunda sakrifikasyon öncesinde ve hayvanların sakrifikasyonunu takiben elde edilen örnekler standart zemin üzerinde fotoğraflanarak, enfeksiyon, yabancı cisim reaksiyonu, inflammasyon açısından subjektif olarak değerlendirilmiştir.

3.11. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Deney hayvanlarının sakrifikasyonu sonucunda elde edilen biparietal kemik defekti içeren bütünlüğü korunmuş olan kalvariyum örnekleri, öncelikli olarak %10'luk formaldehit çözeltisi içinde 72 saat bekletildikten sonra dekalsifikasyon amacıyla De Castro solüsyonuna yerleştirilmiştir. Kemik örneklerinin dekalsifikasyonu takiben, alkol ile dehidratasyon ve ksilolde şeffaflandırma gerçekleştirilerek rutin ışık mikroskop doku takip yöntemi takip edilerek parafine gömüldü. Mikrotom yardımıyla, 5µm kalınlığında seri kesitler alınarak, Hematoksilen-Eozin ve Masson Trikrom ile boyandıktan sonra TOBB ETÜ Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı

Laboratuvarları'nda Leica DM-6000B (Germany) ışık mikroskobu ile incelendi ve görüntüler DC500 dijital kamera (Leica, Wetzlar-Germany) ile bilgisayara aktarıldı. Deneyde kullanılan BRDU işaretli kök hücrelerin görüntülenmesi amacıyla bromodeoxyuridin immunohistokimyasal boyaması gerçekleştirilmiştir (Abcam, ab125306-BrDU immunohistochemistry kit).

Histolojik spesimenlerin objektif kriterle değerlendirilmesi amacıyla Bölgen ve ark. tarafından standardize edilmiş bir skorlama sistemi kullanılmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan histolojik skorlama sistemi

Parametre	3	2	1	0
Yeni kemik oluşumu	TAM (%100)	ÇOK (>%50)	AZ (<%50)	YOK
Fibröz bağ dokusu formasyonu	YAYGIN (Sıkı)	ORTA	AZ (İrregüler)	YOK

3.12. MİKRO TOMOGRAFİK DEĞERLENDİRME

Mikro tomografi sistemleri, X-ışınları yardımıyla çekimin gerçekleştirildiği dokunun görüntülenmesine olanak sağlayan ve bu yolla dokunun sahip olduğu mineral yoğunluğu hakkında analize imkan tanıyan görüntüleme yöntemleridir.

Tez çalışması kapsamında deney hayvanlarının bütünlükleri korunmuş halde çıkarılan kalvariyal kemiklerinin mikrotomografik analizi Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirildi. Önce ham görüntülerin elde edilmesi amacıyla, kemikler dokuya zarar vermeksizin, Skyscan (Bruker) marka ve 1272 model x-ışınları tomografisi ile taranmıştır. 50 kV gerilim ve 625 μ A akım altında çalıştırılan X-ışını kaynağı yardımıyla 10 μ m lik piksel boyutu çözünürlüğünde görüntüler elde edilmiştir. Tarama süresince örneklerin hareket etmemeleri mekanik yöntemlerle sağlanmıştır. Örnekler dik ekseninde sırasıyla 180 ve 360 derece döndürülmüş, her 2 derecelik rotasyona bir görüntü alınacak şekilde kesit aralıkları taranmıştır.

Elde edilen ham veriler, sonrasında NRecon (Skyscan) yazılımı ile yeniden işlenmiş ve örneklerin yatay tomografi kesitleri elde edilmiştir. Tarama esnasında ve rotasyon esnasında ortaya çıkabilen artefaktlar, NRecon (Skyscan) yazılımı ile minimize edilmeye çalışılmıştır.

Hem demonstrative açıdan hem de analiz amacıyla tarama sonrasında elde edilen iki boyutlu veriler üç boyutlu olarak rekonstrükte edilmiştir. Üç boyutlu verilerin ileri analizi, CTAn (Skyscan) yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Kemikleşme oranı tüm defektte hesaplanarak hacimsel olarak defektteki kemik yüzdesi verilmiştir. Ayrıca cihaz yardımıyla defect içinde yeni oluşan kemik trabeküllerinin porozite yüzdesi de analiz sonucunda ikinci bir değerlendirme verisi olarak elde edilmiştir.

3.13. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Değişkenlerin analizinde SPSS 25.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, United States) programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile varyans homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Fotobiyomodülasyon uygulama durumu deney gruplarına göre ayrı ayrı olarak, mikrotomografik değerlendirme kapsamında ‘porozite ve kemikleşme yüzdeleri’ açısından parametrik yöntemlerden Independent-Samples T testi Bootstrap sonuçlarıyla birlikte kullanılırken, histolojik değerlendirme kapsamında ‘Yeni kemik ve Fibroz bağ dokusu’ değişkenleri için Mann-Whitney U testi Monte Carlo simülasyon tekniği ile kullanıldı. Deney gruplarının porozite ve kemikleşme yüzdeleri açısından birbiriyle karşılaştırılmasında parametrik yöntemlerden One-Way Anova (Brown-Forsythe); post hoc analizi için Fisher’s Least Significant Difference (LSD) testi kullanılırken, yeni kemik ve fibroz bağ dokusu değişkenleri için nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis H Testi Monte Carlo simülasyon tekniği kullanılmış olup Post Hoc analizler için Dunn’s Testi kullanıldı. Nicel değişkenler tablolarda ortalama \pm std. (standart sapma) ve medyan Range (Maximum-Minimum), Kategorik değişkenler ise n(%) olarak gösterildi. Değişkenler %95 güven düzeyinde incelenmiş olup p değeri 0,05 ten küçük anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. HİDROJEL DOKU İSKELESİNİN METAKRİLATLANMA DERECEŚİ VE KARAKTERİZASYON SONUÇLARI

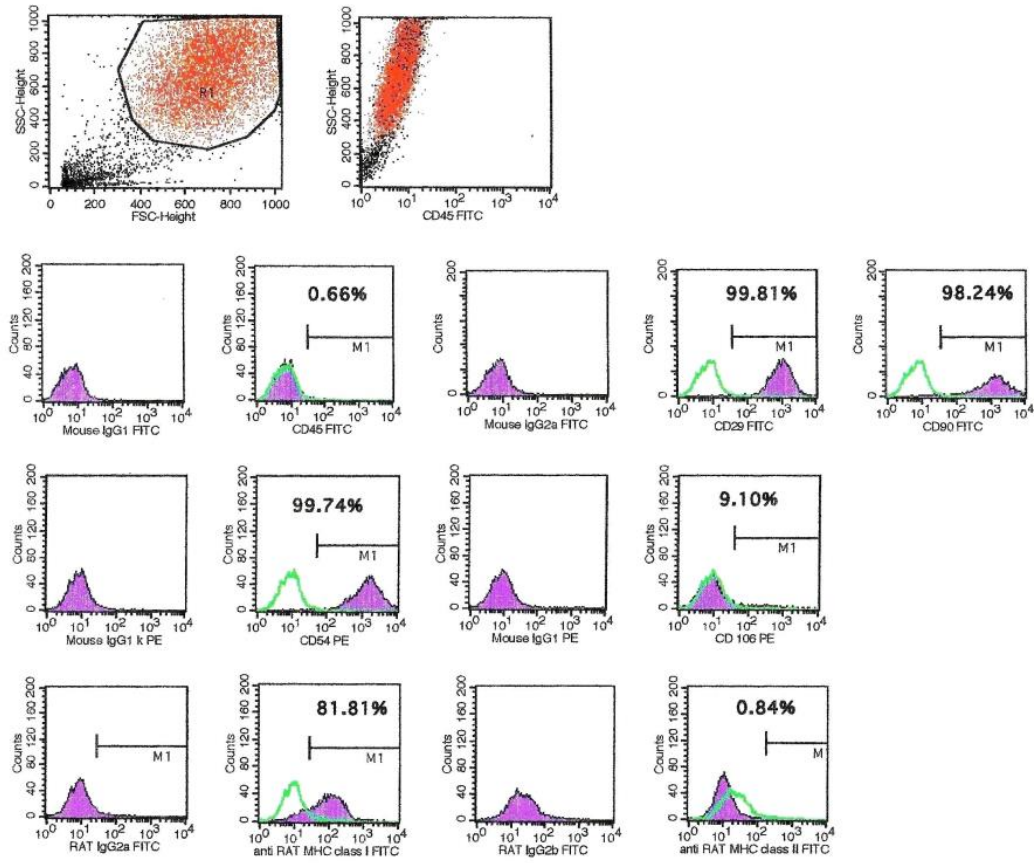
Tez çalışması kapsamında tüm bu sorunların üstesinden gelebilmek amaçlanmıştır. Bu amaçla, mikrodalga destekli metakrilasyon yoluyla Jel-MA'nın mekanik özelliklerini arttırmak, dolayısıyla da Jel-MA hidrojelinin mekanik özelliklerini arttırmak hedeflenmiştir. Çalışma kapsamında mikrodalga destekli metakrilatlanmış Jelatin (Mw-Jel-MA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Jel-MA sentezinin karakterizasyonu kapsamında ¹H-NMR spektroskopisi kullanılmış olup metakrilatlanma derecesi 90,0±1,4 olarak tespit edilmiştir.

4.2. AkMKH'LERİN KARAKTERİZASYON ANALİZ BULGULARI

Çalışma kapsamında kullanılan AkMKH'lerin karakterizasyon analizi akış sitometrisi değerlendirmesi ile hücrelerin akışkan sistem içinde lazer ışığı altında elde edilen sinyaller yardımıyla yüzey antijenlerinin tespit edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Akış sitometrisi ile sadece hücrenin yüzey antijenleri değil, aynı zamanda sahip olduğu DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında da bilgi toplanabilir (97).

Mezenkimal kök hücrelerde yüksek oranda bulunan ve çok düşük oranlarda bulunan yüzey antijenleri temelde şu şekilde belirlenmiştir: fenotip negatif antijenler (\leq %2): CD45, CD34, CD14, CD79 (98) ve fenotip pozitif antijenler (\geq %95): CD105, CD73, CD90, CD29

Çalışmaya kullanılan aynı tür sığana ait AkMKH'lerin akış sitometri sonuçları Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Çalışmaya kullanılan aynı tür sıçana ait AkMKH'lerin akış sitometri sonuçları

4.3. MAKROSKOPİK BULGULAR

Klinik olarak kontrol grubunda 20. haftanın sonunda meydana getirilen kritik boyutlu kemik defektinin tamamen kemikleşmediği, defekt alanında bağ dokusu izlenimi veren bir granülasyon izlenimi edinildi (Şekil 4.2). Kontrol grubuna ait örneklerin hiçbirinde enfeksiyon bulgusuna rastlanmadı. Fotobiyomodülasyon alma durumlarına göre her iki gruba ait kemik örneklerinde herhangi bir farklılığa makroskopik olarak rastlanılmadı.

Makroskopik olarak hüresiz metakrilatlanmış hidrojel doku iskelesi grubuna (JEL-MA) örnekler incelendiğinde kritik boyutlu kemik defektlerinin tam olarak kapanmadıkları ancak periferden santrale doğru kemikleşme meydana geldiği izlenimi edinildi. Hiçbir örnekte enfeksiyon ve yabancı cisim reaksiyonu gözlenmedi. Fotobiyomodülasyon almış veya almamış gruplar arasında makroskopik olarak herhangi bir farklılığa rastlanılmadı.



Şekil 4.2. Makroskopik Bulgular

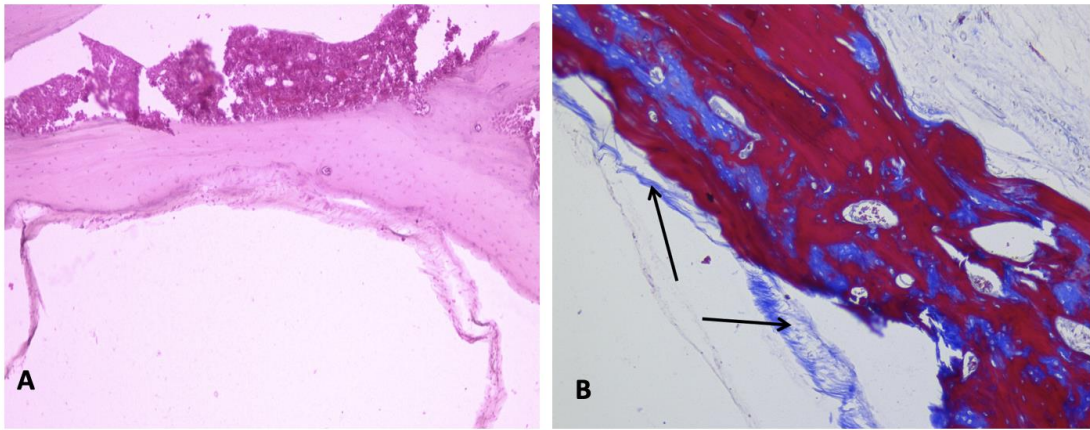
A. Kontrol grubunun 20 hafta sonunda elde edilen makroskopik görüntüleri A1. FBM- örneklere ait görüntüler, A2. FBM+ örneklere ait görüntüler, B. JEL-MA yerleştirilen gruba ait 20. haftada elde edilen makroskopik görüntüleri B1. FBM- örneklere ait görüntüler, B2. FBM+ örneklere ait görüntüler, C. JEL-MA + AKMKH yerleştirilen gruba ait 20. haftada elde edilen makroskopik görüntüleri. C1. FBM- örneklere ait görüntüler, C2. FBM+ örneklere ait görüntüler

Makroskopik olarak kök hücre içeren metakrilatlanmış hidrojel doku iskelesi grubu, (JEL-MA+AKMKH) grubuna ait örnekler incelendiğinde kritik boyutlu kemik defektlerinin tam olarak kapanmadıkları ancak periferden santrale doğru kemikleşme meydana geldiği izlenimi edinildi. Hiçbir örnekte enfeksiyon ve yabancı cisim reaksiyonu gözlenmedi. Fotobiyomodülasyon almış veya almamış gruplar arasında makroskopik olarak farkedilen herhangi bir farklılığa rastlanılmadı.

4.4. HİSTOLOJİK BULGULAR

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

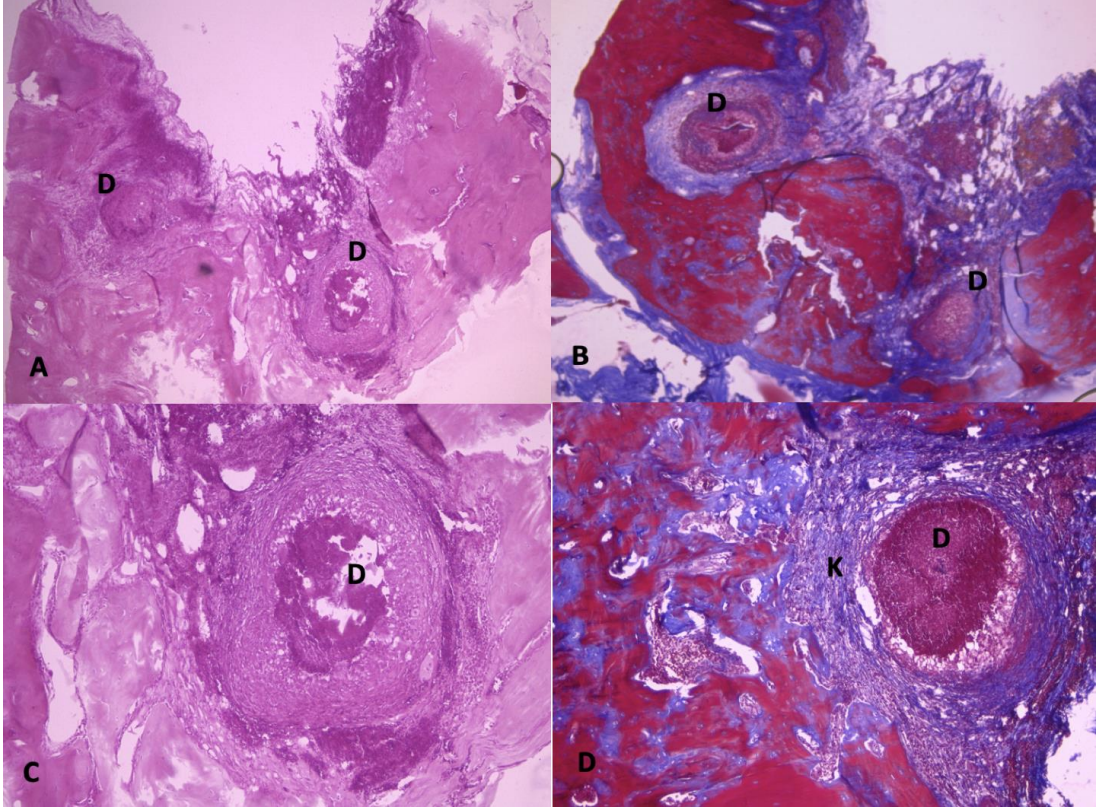
Kontrol grubunda, FBM - örneklerde, her iki kavitenin içi de granülasyon dokusu ile dolmamıştı. Kısmen boş olarak gözlemlendiler. Ancak, kavitelerin çevresinde ince bir tabaka halinde kemiğin iç yüzüne komşu, ince bir sıkı bağ dokusu tabakası gelişmeye başlamıştı (Şekil 4.3 A-B).



Şekil 4.3. FBM– Kontrol grubuna ait örneklerin histolojik görünümü.

A. Defekt bölgesinin kenarlarında yer yer kemikleşme başlangıcını işaret eden sıkı bağ dokusu gelişimi gözlenmektedir. Hematoksilen-eozin boyası X10. B. Defekt bölgesinin kenarlarında yer yer kemikleşme başlangıcını işaret eden sıkı bağ dokusu gelişimi (oklar) Masson trikrom boyası. X10

Kontrol grubunda, FBM+ olan örneklerde, FBM- gruptan farklı olarak, kaviterin içleri bütün gruplarda farklı miktarlarda granülasyon dokusu ile doluydu. Ayrıca, kemiğe komşu çevrede de sirküler düzenli kollagen demetler oluşmaya başlamıştı (Şekil 4.4 A-D).



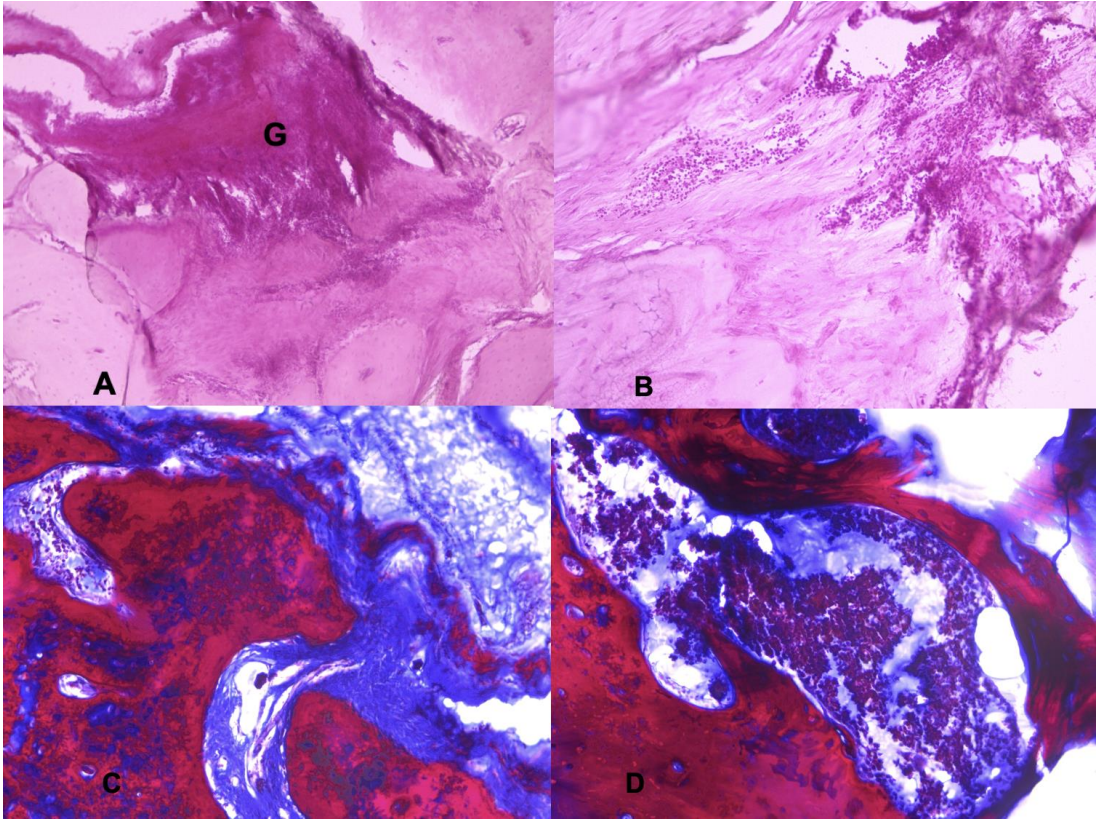
Şekil 4.4. FBM + Kontrol grubuna ait örneklerin histolojik görünümü.

Defekt bölgesi granülasyon dokusu ile dolmuş ve konsantrik yerleşimli düzenli kollagen tabakaları ile çevrelenmiştir.

D; defekt bölgesi, K; kollagen. A: HE X4 B: Masson trichrome X4, C: HE X10 C: Masson trichrome X10

4.4.2. İkinci grup – hücresiz metakrilatlanmış hidrojel doku iskelesi grubu, (JEL-MA)

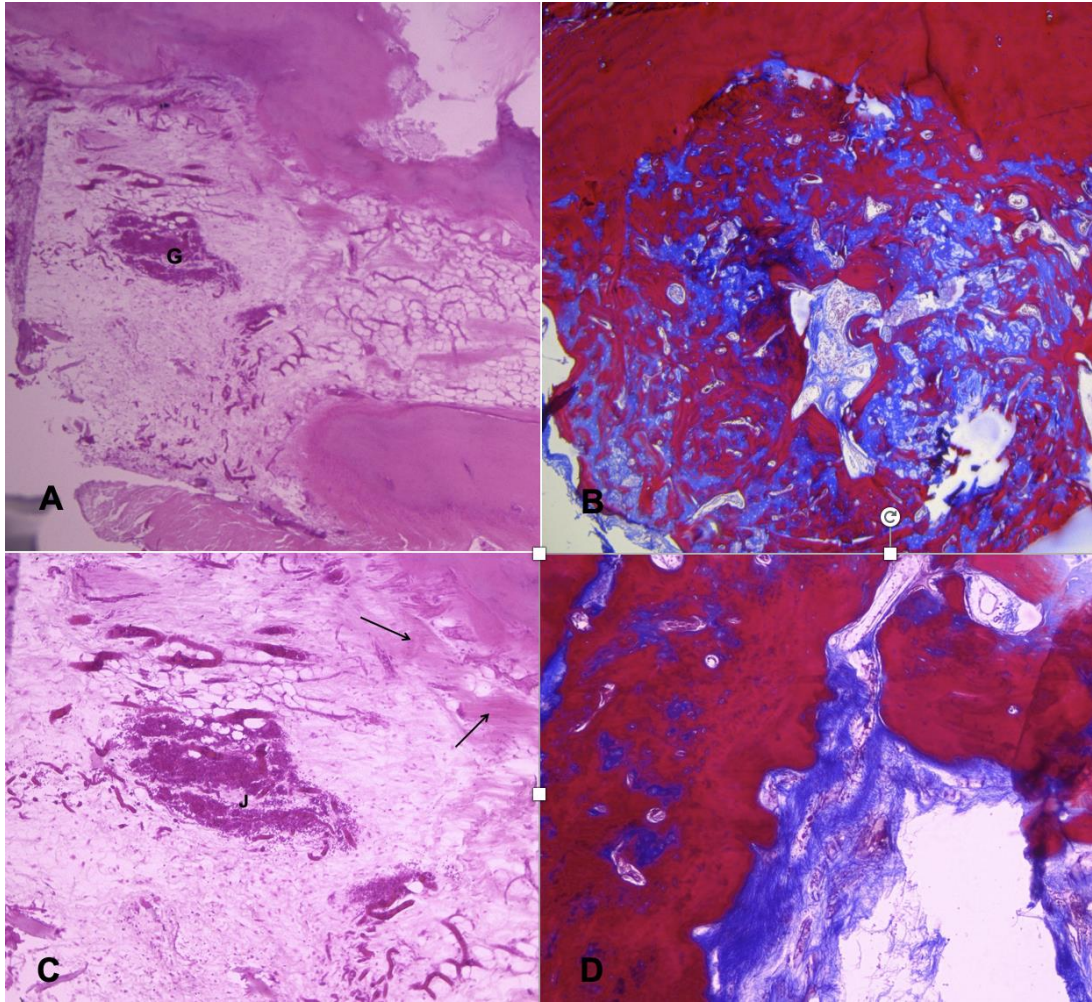
FBM -, JEL-MA grubunda kavitenin içini dolduran JEL-MA çevresinde kemiğe komşu kaba, kalın kollagen demetlerin oluşturduğu intramembranöz kemikleşmenin öncüsü niteliğinde, sıkı bir bağ dokusunun oluştuğu gözlemlendi. Bazı bölgelerde bu bağ dokusu uzantılarının çevresinde ince bir kemiğin oluşmaya başladığı da görüldü (Şekil 4.5 A-D).



Şekil 4.5. FBM– JEL-MA grubuna ait örneklerin histolojik görünümü.

Defekt bölgesini dolduran hidrojel doku iskelesi ve çevresinde sıkı bağ dokusu gelişimi gözlenmekte (A, B). Hematoksilen-eozin boyası. A: X10, B: X20, JEL-MA çevresinde oluşan sıkı bağ dokusu kemik ile çevrelenmiştir (C, D). Masson trikrom boyası. C: X10, D: X20 D; defekt.

FBM+, JEL-MA grubunda doku iskelesi kalıntılarının çevresinde, kaviterin içinin tamamen bol kapiller damarların bulunduğu sıkı bağ dokusu ile dolu olduğu gözlemlendi. Çevredeki kemik dokusuna yakın bölgelerde yeni kemik parçalarının oluşmaya başladığı görülmüyordu. Üçlü boya ile boyalı kesitlerde çevre kemiğe komşu kısımlarda bu bağ dokusunun daha sıkı olduğu seçilmekteydi. Bir örnekte kavitenin henüz şekillenmekte olan orta bölümünde ufak bir bölüm dışında tümü, kalsifiye ince kemik trabekülleri ve aralarında henüz kalsifiye olmamış membranöz kemik taslakları ile dolmuştu (Şekil 4.6 A-D).

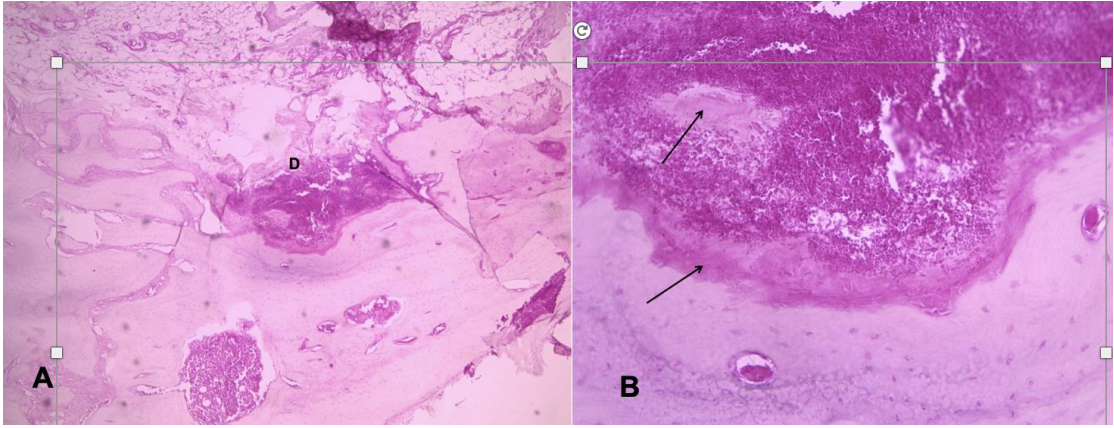


Şekil 4.6. FBM+ JEL-MA grubuna ait örneklerin histolojik görünümü.

A. Defekt bölgesinin içeri dolduran bağ dokusu içinde JEL-MA gözleniyor. G; JEL-MA. Hematoksilen ve eozin boyası. HE X4, B. Bir diğer örnekte defekt kavitesi, ortada bir bölge dışında, tamamen yeni şekillenen kemik ile doludur. Masson trikrom boyası X4, C. JEL-MA kalıntısı çevresinde, kavitenin içeri dolduran bol damarlı bağ dokusu içinde yeni kemik oluşumu gözleniyor (oklar).. J; JEL-MA. Hematoksilen ve eozin boyası. HE X10, D. Kaviteyi dolduran JEL-MA kalıntılarının çevresinde damarlı sıkı bağ dokusu oluşumu. Kemiğe komşu bölgelerde nisbeten paralel dizilmiş kollajen demetler gözlenmektedir. Kavitenin orta kısımlarında henüz belli bir düzen yoktur ve ince dağınık kollajen fibriller gözlenmektedir. Masson trikrom boyası.X10

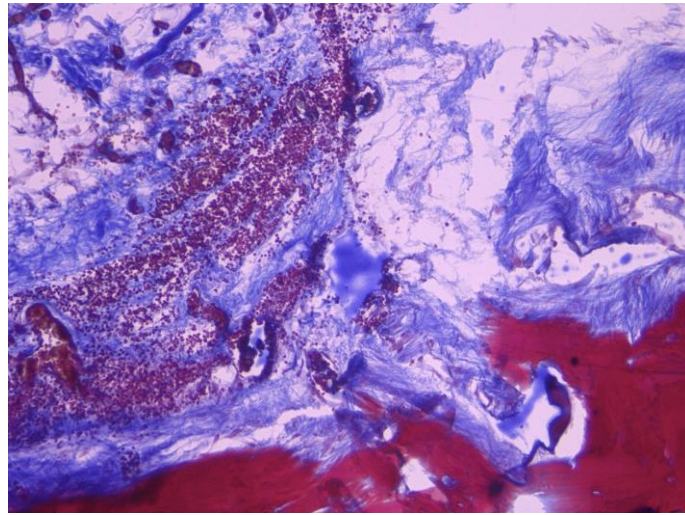
4.4.3. Üçüncü grup – kök hücre içeren metakrilatlanmış hidrojel doku iskelesi grubu, (JEL-MA+AKMKH)

JEL-MA+AKMKH grubunda, FBM - örneklerde, defekt kavitesinin JEL-MA ile dolu olan bölümlerinin çevresinde sıkı bağ dokusu tabakası oluşmuştu. Kavitenin çevresinde ve JEL-MA içinde ufak kemik parçaları da gözlemlendi (Şekil 4.7 A-B). Üçlü boya ile boyanan kesitlerde JEL-MA çevresinde, kemik yüzeyini örten biçimde kalın kaba kollagen fibrillerin oluşumu belirgin biçimde gözlenmekteydi (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. FBM – JEL-MA+AkMKH.

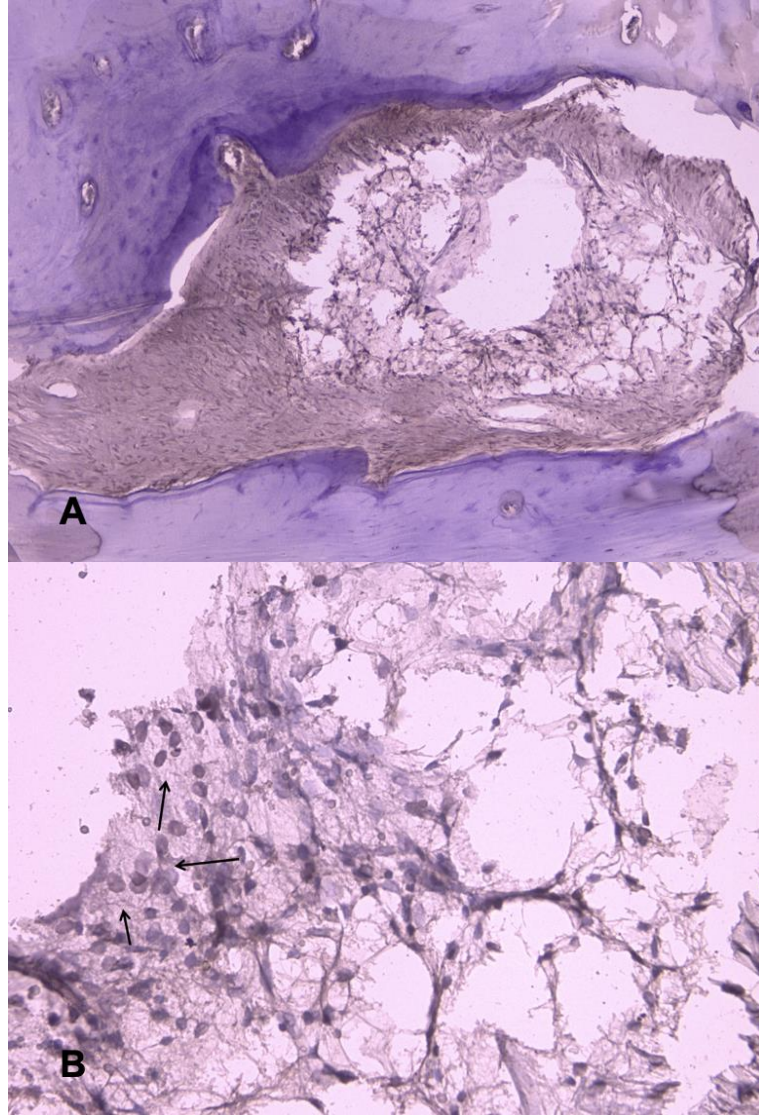
A. Defekt boşluğu kısmen Jel-MA ile doludur. Hematoksilen-eozin boyası. D: Defekt. X4, B. Jel-MA ile dolu defekt boşluğunun çevresinde ve içinde yeni kemik oluşumu gözlenmekte (oklar). Hematoksilen ve Eozin boyası. X20



Şekil 4.8. FBM – JEL-MA+AkMKH.

JEL-MA çevresinde oluşan kollagen demetlerin kemik üzerinde yayıldığı gözleniyor. Masson trikrom boyası. X20.

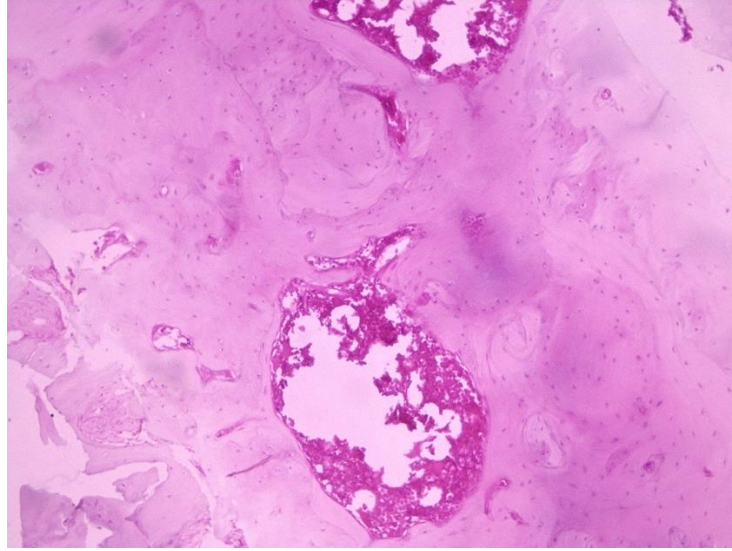
Bu grubun BrDU işaretli kök hücrelerin varlığını araştırmak üzere anti BrDU kullanılarak indirekt immünperoksidaz yöntemiyle boyanan kesitlerinde, kavitelerin dış kısımlarının sıkı bağ dokusu ile dolduğu ancak orta kısımlarında, bol olarak gözlenen kök hücrelerin çevresinde, yeni bağ dokusunun şekillendiği gözlemlendi (Şekil 4.9 A-B).



Şekil 4.9. FBM – JEL-MA+AkMKH.

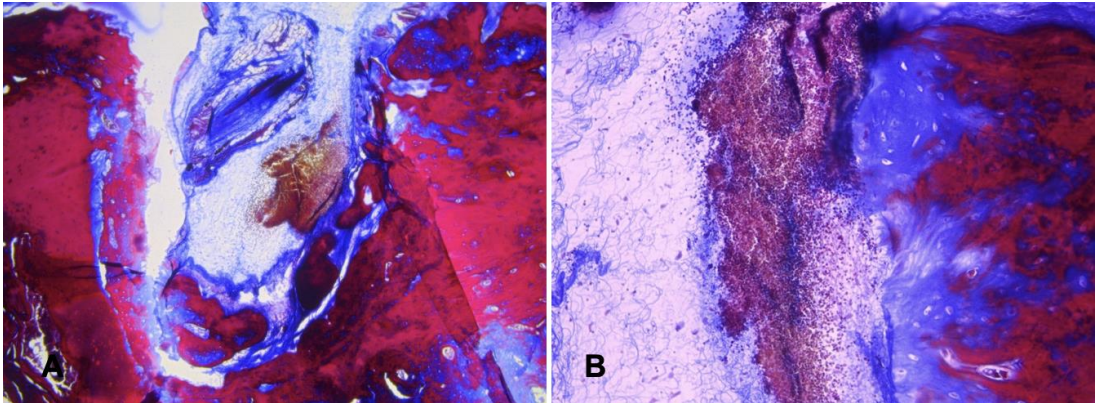
A. Kavite çevresinde oluşmuş sıkı bağ dokusu bölgeleri kemik ile çevrilidir. Kavitenin ortasında henüz şekillenmemiş bölgede, JEL-MA iskele ve içindeki BrDU işaretli kök hücreler görülmekte. Anti BrDU -indirekt immün peroksidaz.X10, B. Kavitenin orta bölgesinde henüz tam şekillenmemiş bağ dokusu içinde BrDU işaretli kök hücreler daha ileri mikroskop büyütmesinde gözleniyor(oklar). Anti BrDU-indirekt immün peroksidaz.X40.

JEL-MA+AKMKH grubunda, FBM+ örneklerde, kavitelerin içinde JEL-MA yer yer öbekler halinde durmaktaydı (Şekil 4.10 ve 4.11). Masson trikrom ile boyalı kesitlerde kök hücrelerin bulunduğu JEL-MA çevresinde kavitelerin büyük ölçüde sıkı bağ dokusu ile dolduğu gözlemlendi. Bu bağ dokusu içinde şekillenmiş kalsifiye kemik trabekülleri seçilmekteydi. Kavite çevresinde de kalsifiye ve kalsifiye olmamış kemik tabakaları gözlenmekteydi (Şekil 4.11).



Şekil 4.10. FBM+ JEL-MA+AkMKH.

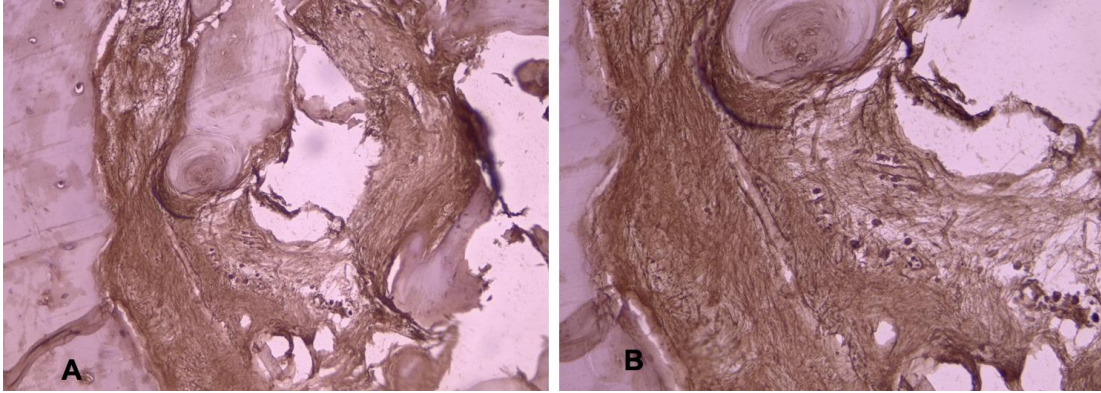
Defekt bölgeleri kemik ile çevrilidir Hematoksilen ve Eozin boyası.X20



Şekil 4.11. FBM+ JEL-MA+AkMKH.

A. Defekt bölgesinde JEL-MA çevresinde sıkı bağ dokusu ile dolmuştur. Bu bölgede yeni şekillenen kemik dokusu gözleniyor(oklar) Masson trichrome stain X4, B. JEL-MA çevresinde sıkı bağ dokusu ve şekillenen membranöz kemik dokusu gözleniyor. Masson trichrome X20.

Anti-BrDU kullanılarak yapılan indirekt immün peroksidaz boyamalarında da kavileri dolduran sıkı bağ dokusunun periferde sıkı biçimde organize olduğu, kök hücrelerin de ortaya yakın kısımda bulunan daha yeni organize olan bölgede yoğunlaştığı gözlemlendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. FBM+ JEL-MA+AkMKH.

BrDU ile işaretlenmiş kök hücreler kemik dokusunu saran sıkı bağ dokusu içinde gözleniyorlar. Anti-BrDu indirekt immün peroksidaz.

A: X10, B: X40

FBM + örneklerde kavilerin içi ortada bir bölge dışında hemen tamamen sıkı bağ dokusu ile dolu.FBM - örneklere oranla çok daha sıkı ve yaygın olarak FBM+ grupta bu doku içinde ve çevrede membranöz ve kalsifiye kemik çok daha belirgin gözlenmiştir.

Histolojik değerlendirme sonuçlarına göre 20 hafta sonunda elde edilen kemikleşme sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir. Yeni kemik oluşumu açısından hem FBM- hem de FBM+ örnekler kendi içerisinde karşılaştırıldığında gruplar arası farklılık saptanmıştır ($p < 0,001$). Yeni kemik oluşumu açısından en yüksek değerler JEL-MA ve JEL-MA+AKMKH gruplarında saptanmıştır. Fotobiyomodülasyon uygulanma durumuna göre bu gruplardan elde edilen örneklerde anlamlı farklılık saptanmamıştır (sırasıyla $p = 0,542$ ve $p = 0,999$).

Gruplar arasında yeni kemik oluşumu açısından posthoc analiz sonucunda JEL-MA ve JEL-MA+AKMKH grupları arasında FBM- örneklerle, FBM+ örnekler arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p < 0,999$).

Fibröz bağ dokusu oluşumu açısından hem FBM- hem de FBM+ olan örnekler kendi içerisinde karşılaştırıldığında gruplar arası farklılık saptanmıştır (sırasıyla $p=0,019$ ve $p=0,002$). Bu açıdan en düşük sonuçlar kontrol grubunda saptanırken, fotobiyomodülasyon uygulama durumuna göre anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p=0,062$). Fibröz bağ dokusu oluşumu açısından en yüksek sonuçlar JEL-MA+AKMKH grubunda elde edilen örneklerde gözlenmiştir ancak her üç deney grubunda da fotobiyomodülasyon uygulama durumu açısından sonuçlar kendi içinde karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Gruplar arasında fibröz bağ dokusu oluşumu açısından posthoc analiz sonucunda JEL-MA ve JEL-MA+AKMKH grupları arasında hem FBM- örnekler arasında ($p=0,776$), hem de FBM+ örnekler arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0,403$).

Tablo 4.1. 20. haftanın sonunda örneklerin histolojik değerlendirilmesi ve skorlamasına göre gruplarda elde edilen yeni kemik oluşumu ve fibröz bağ dokusu oluşum durumlarının tanımlayıcı istatistiksel bilgileri ve gruplar arası karşılaştırma

	Yeni kemik oluşumu		P	Fibröz Bağ dokusu oluşumu		P
	FBM -	FBM +		FBM -	FBM +	
	Med.(Min/Max)	Med.(Min/Max)		Med.(Min/Max)	Med.(Min/Max)	
AkMKH -A	2 (1 / 2)	2 (2 / 3)	0,542 ¹	2 (2 / 2)	3 (2 / 3)	0,062 ¹
JEL-MA -B	2 (1 / 2)	2 (2 / 2)	0,999 ¹	2 (1 / 2)	2,5 (2 / 3)	0,277 ¹
Kontrol -C	0 (0 / 0)	0 (0 / 1)	0,458 ¹	1 (1 / 1)	2 (1 / 2)	0,062 ¹
P değeri	<0,001²	<0,001²		0,002²	0,019²	
İkili karşılaştırma						
A→B	0,999	0,999		0,776	0,403	
A→C	0,003	0,001		0,001	0,015	
B→C	0,003	0,005		0,024	0,570	

¹ Mann Whitney u test(Monte Carlo), ² Kruskal Wallis Test(Monte Carlo); Post Hoc Test : Dunn's Test, Med.:Median, Min:Minimum, Max.:Maximum

4.5. MİKRO TOMOGRAFİ BULGULARI

Mikrotomografik analiz amacıyla taranan görüntülerden elde edilen 2 boyutlu görüntüler, kritik boyutlu kemik defektinin kemikleşme yüzdesi ve elde edilen kemik matriksin porozite yüzdesinin hesaplanması amacıyla 3 boyutlu olarak rekonstrükte edilmiş ve analizler bu görüntüler yardımıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Mikro Tomografi Bulguları

A. Kontrol grubunun 20 hafta sonunda elde edilen mikrotomografi görüntüleri A1. FBM- örneklere ait görüntüler, A2. FBM+ örneklere ait görüntüler, B. JEL-MA grubuna yerleştirilen gruba ait 20. haftada elde edilen mikro-BT görüntüleri B1. FBM- örneklere ait görüntüler, B2. FBM+ örneklere ait görüntüler, C. JEL-MA + AKMKH yerleştirilen gruba ait 20. haftada elde edilen mikro-BT görüntüleri C1. FBM- örneklere ait görüntüler, C2. FBM+ örneklere ait görüntüler

20 hafta sonunda mikrotomografi sonuçlarına göre elde edilen kemikleşme sonuçları Tablo 4.2'de paylaşılmıştır. Gruplar arasında 20 hafta sonunda elde edilen sonuçlar açısından FBM+ ve FBM- örnekler açısından, hem % kemikleşme hem de % porozite değerleri dikkate alındığında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttur ($p<0,001$).

Kemikleşme yüzdesi açısından sonuçlar değerlendirildiğinde, en yüksek kemikleşme oranları JEL-MA+AKMKHlerin uygulandığı grupta elde edilmiştir. FBM- örneklerde ortalama olarak yüzde $60,62\pm 6,34$ kemikleşme gözlenmişken, FBM+ olan örneklerde ortalama kemikleşme yüzdesi $79,93\pm 3,41$ olarak tespit edilmiştir. Fotobiyomodülasyon alma durumuna göre JEL-MA+AKMKH grubuna ait sonuçlar karşılaştırıldığında anlamlı olarak fotobiyomodülasyon uygulama durumunun fark yarattığı gözlemlenmektedir ($p=0,002$).

JEL-MA uygulanan grupta elde edilen örneklerde FBM- kemiklerde ortalama kemikleşme yüzdesi $54,30\pm 7,35$ olarak tespit edilmiş olup, FBM+ olan örneklerde bu oran $68,02\pm 4,88$ olarak bulunmuştur. Fotobiyomodülasyon uygulamasının anlamlı olarak kemikleşme oranlarını arttırdığı gözlenmiştir ($p=0,008$). Yüzde kemikleşme açısından en düşük değerler kontrol grubunda gözlenmiş olup, FBM- örneklerde ortalama olarak yüzde $28,60\pm 11,94$ olarak kemikleşme gözlenirken, FBM+ olan örneklerde ise yüzde $30,82\pm 4,65$ olarak tespit edilmiştir. Diğer gruplardan farklı olarak fotobiyomodülasyon uygulaması kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark yaratmamıştır ($p=0,643$).

Gruplar arasında posthoc analiz sonucunda JEL-MA ve JEL-MA+AKMKH grupları arasında FBM- örneklerde anlamlı fark gözlenmezken ($p=0,237$), FBM+ örneklerde anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0,001$).

Porozite yüzdesi açısından mikro-BT sonuçları değerlendirildiğinde, kontrol grubunda FBM- örneklerde yüzde $71,74\pm 11,93$ oranında kemikleşme alanı içinde porozite gözlenmişken, FBM+ örneklerde bu oran yüzde $69,18\pm 4,65$ olarak tespit edilmiştir. Fotobiyomodülasyon uygulanma durumuna göre kontrol grubu örneklerinde porozite açısından anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p=0,601$).

Porozite yüzdesi açısından en düşük sonuçlar JEL-MA+AKMKH uygulanan grupta gözlenmiş olup, FBM+ örneklerde bu oran yüzde 20,08±3,41 iken, FBM- örneklerde ise ortalama yüzde 39,38±6,34 olarak tespit edilmiştir. Fotobiyomodülasyon uygulanma durumunun hem JEL-MA hem de JEL-MA+AKMKH anlamlı olarak porozite yüzdesini etkilediği gözlenmiştir (sırasıyla p=0,008 ve p=0,002).

Gruplar arasında posthoc analiz sonucunda JEL-MA ve JEL-MA+AKMKH grupları arasında FBM- örneklerde anlamlı fark gözlenmezken (p=0,238), FBM+ örneklerde anlamlı fark gözlenmiştir (p<0,001).

Tablo 4.2. Mikrotomografi sonuçlarına göre gruplarda elde edilen kemikleşme ve porozite yüzdeleri ve gruplar arası *posthoc* karşılaştırma

	% Porozite		P	% Kemikleşme		P
	FBM -	FBM +		FBM -	FBM +	
	Mean±SD.	Mean±SD.		Mean±SD.	Mean±SD.	
AkMKH -A	39,38±6,34	20,08±3,41	0,002¹	60,62±6,34	79,93±3,41	0,002¹
JEL-MA -B	45,69±7,37	31,98±4,88	0,008¹	54,30±7,35	68,02±4,88	0,008¹
Kontrol -C	71,74±11,93	69,18±4,65	0.601 ¹	28,60±11,94	30.82±4,65	0,643 ¹
P değeri	<0,001²	<0,001²		<0,001²	<0,001²	
İkili karşılaştırma						
A→B	0,238	<0,001		0,237	<0,001	
A→C	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	
B→C	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	

¹ Independent Samples T Test(Bootstrap), ² OneWay ANOVA (Brown-Forsythe); Post Hoc Test: Fisher's Least Significant Difference (LSD), SD.:Standart deviasyon

5. TARTIŞMA

Kemik defektlerinin onarımı plastik cerrahinin temel ilgi alanlarındandır. Günümüzde bu amaçla başvuru alan cerrahi seçeneklerin başında otojen kemik greftlerinin kullanımı gelmektedir (99). Doğumsal, travmatik veya onkolojik nedenlerle rezeksiyonlar sonrasında meydana gelen kemik defektlerinin onarımı amacıyla sıklıkla hastanın kendi iliak krest, kalvariya veya kostal kemik greftleri greft veya vasküler olarak serbest flep olarak transfer edilebilmektedir. Mikrocerrahi yöntemlerden faydalanılarak serbest kemik transferleri için iliak, fibula, radius ve skapula en sık tercih edilen donör seçenekleridir. Her iki cerrahi çözüm seçeneğinin de uzun yatış süreleri, alıcı saha morbiditeleri, işleme bağlı rezorbsiyon veya doku kaybı gibi komplikasyon profilleri ve maliyet gibi kısıtlamaları mevcuttur.

Kemik defektlerinin onarımı amacıyla başvurulabilecek bir başka seçenek de distraksiyon osteogenezidir (100, 101). İlk olarak Codvilla ve Abott'un çalışmaları ile alt ekstremitede başlayan distraksiyon uygulaması, osteotomiye takiben meydana gelen kallus dokusunun traksiyonuna dayanmaktadır. İlerleyen yıllarda Joseph McCarty kraniyofasiyal iskelette önce hayvan modelinde sonra da klinik olarak distraksiyon uygulamasını başarılı bir şekilde gerçekleştirerek plastik cerrahi için distraksiyon uygulamalarının en önde gelen kemik defekt onarım seçeneklerinden biri haline gelmesini sağlamıştır (102). Bu yöntemle kemik segmentinde uzamaya ek olarak, distraksiyon histiogenezi adı verilen biyolojik süreçle çevre yumuşak dokularda da büyüme sağlanır. Tüm bu avantajlarına rağmen, tedavi süresi boyunca cihaz kullanımı, iki seanslı ameliyat gereksinimi, sonrasında fibröz kaynama veya kaynamama gibi kendi içinde kısıtlamaları olması nedeniyle distraksiyon da ideal seçenek olarak nitelendirilememektedir.

Güncel cerrahi seçeneklerin kendi içinde birçok dezavantaj ve kısıtlılık barındırması nedeniyle, otojen dokular ile elde edilebilecek dokunun sınırlı olması nedeniyle sürekli ulaşılabilir, immunojenik olmayan ve hedef dokunun yerine geçecek biyomateryaller üretme ideali olan doku mühendisliği çalışmaları büyük heyecan uyandırmaktadır. Kemik doku mühendisliği açısından son yıllarda önem kazanan strateji, kemik eşleniği olacak ideal biyomalzemelerin üretimi ve hücre bazlı uygulamalarla bunların kombine edilmesi olarak özetlenebilir. Bu noktada

gerçekleştirilen birçok çalışma olup, elde edilen kazanımların klinik uygulamalara yansması konusunda halen katedilmesi gereken uzun bir yolculuk olduğu rahatlıkla söylenebilir.

Plastik cerrahiye doku mühendisliği uygulamalarının ilk klinik yansımalarından birisi 2009 yılında Behnia ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada dudak damak yarığına ikincil gelişen alveolar kemik yarığın tedavisinde 2 olguda mezenkimal kök hücre yüklenmiş demineralize kemik matriksi kullanılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (103). Yine alveolar kemik greftleme için BMP destekli stratejilerin uygulanabileceğini Van Hout ve ark. 2011 yılında ortaya atmışlardır (104).

Plastik cerrahi için devrim niteliğinde çalışmada Zuk ve ark. abdominal yağ dokusunun mezenkimal kök hücrele kaynsığı olduğunu göstermişlerdir (51). Yağ dokusunun vücutta bol miktarda bulunması, kolay ulaşılabilir olması, lipoaspirasyon gibi rutin bir prosedür ile elde edilmesi, doku mühendisliği çalışmalarına halihazırda ilgisi olan plastik cerrahların bu konuya sıkı sıkıya sarılmasına neden olmuştur (4).

Kemik doku mühendisliği alanında AkMKHlerle gerçekleştirilen bir çok in vivo çalışma mevcuttur. Vergroesen ve ark. geliştirdiği spinal füzyon modelinde doku iskelesi ve AkMKHler implante ederek hasarlı alanda kemikleşme elde etmiştir (105). Rada ve ark. AkMKHlerin osteojenik farklılaşma potansiyelleri üzerine in vitro ve in vivo çalışmalar gerçekleştirmiştir (106).

AkMKH uygulamalarında önde gelen stratejilerden birisi, kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinden rejeneratif etki elde edebilmek amacıyla faydalanmak amacıyla bu hücreleri istenilen hedef hücre serisine indükleyecek büyüme faktörlerinin veya trofik ajanların uygulanması olmuştur. Bu amaçla uygulanan trofik ajanlardan birkaçı, kemik doku üzerinde dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) ve insulin benzeri büyüme faktörü olmuştur. Cowan ve ark. da BMP-2nin ekzojen uygulanmasının kemikleşmeyi arttırdığını gerçekleştirdiği deneysel çalışma ile ortaya koymuştur (76).

AkMKHlerin rejeneratif potansiyeline odaklanmış hücresel stratejilerle en çok combine edilen büyüme faktörlerinden birisi kemik morfojenik protein (BMP) ailesidir. İn vivo ortamda da BMP'nin AkMKH'ler üzerinde osteojenik farklılaşma

yönünde tetikleyici etki gösterdiğini ortaya koyan ilk çalışmalardan birisi Wan ve ark. tarafından 2006 yılında gerçekleştirilmiştir (107). Platelet lizat, osteojenik büyüme peptidi ve eritropoietin de ayrıca kemikleşme üzerinde etkisi son yıllarda gösterilmiş büyüme faktörleridir (108-110). Bu alanda gerçekleştirilen güncel çalışmalardan birisinde Çalış ve ark. 17β -östradiolün AkMKH'ler üzerinde kemikleşme açısından olumlu etki gösterdiğini ve muhtemelen bu hücrelerin kemik seriye dönüşümlerini indüklediğini ortaya koymuştur (71).

Rejeneratif tıp alanında son yıllarda ilgi uyandıran konulardan birisi de fotobiyomodülasyon kavramıdır. Işık enerjisinin Mester'in çalışmaları sonucunda rejeneratif potansiyeli olduğu 1970'li yıllarda ortaya konulmuştur (84, 111, 112). Işık enerjisinin mitokondri düzeyinde özellikle sitokrom c oksidaz üzerinden tetiklediği bir dizi reaksiyon sonucunda hücre içi ATP sentezi artmakta ve bunun da hücresel düzeyde proliferasyonun, yara iyileşmesinin artması, bununla beraber inflammasyonun ve ödemin azalmasına katkı sağladığı görülmüştür. Düşük seviyeli lazer tedavilerinin yara iyileşmesinin her üç fazında da etkili olduğu ve ayrı ayrı inflammasyon, proliferasyon ve remodeling fazları üzerinde biostimülasyon etkisi gösterdiği ortaya konulmuştur. Kök hücrelerin de ışık enerjisinin absorpsiyonu ile beraber onarım, yenileme ve farklılaşma etkinliklerinin ivme kazanabileceği düşünülmüştür.

Fotoenerji ile işlev gösteren her cihazın aynı rejeneratif etkiyi göstermediği bilinmektedir. Yüksek enerjili lazer modaliteleri gerek yüksek dalga boyu ile çalıştıkları gerekse de etkiledikleri kromoforlar nedeniyle rejeneratif amaçla değil, tam tersine ablative amaçlarla kullanılabilir. Dolayısıyla, dokuda istenilen etkiyi elde etmek için uygun ışık kaynağının seçimi ve fotobiyomodülasyon uygulamasının uygun dalga boyunda gerçekleştirilmesi konusu son yıllarda gittikçe önem kazanmıştır.

Bu noktadan hareketle, bu tez çalışmasında amaçlanan yeni bir fotobiyomodülasyon modalitesi olan bu çalışmada kullanılan plazma ark ışık kaynağının AkMKH yüklenmiş hidrojel doku iskelesi ile rekonstrükte edilmiş kraniyel kemik defekti modelindeki *in vivo* rejeneratif etkisini ve fotobiyomodülasyonun polikromatik olarak uygulanmasının AkMKH'ler üzerinde osteojenik farklılaşma üzerindeki indüksiyon etkisinin araştırılmasıdır.

Kritik boyutlu kemik defekt modeli Hollinger ve ark. tarafından tanımlanmış (92, 113) ve bu alandaki çalışmalarında altın standart olarak kabul edilmektedir. Temel olarak, terapötik bir girişim olmaksızın kemik defektinin kendi rejenrasyon potansiyeli ile tam iyileşme göstermeyeceği kabul edilmektedir. Hayvan türlerine spesifik defekt büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla birçok çalışma yapılmış ve (16) bu çalışmada kullanılan deney modeli için tercih edilen hayvan türü, Sprague Dawley sıçan için 5mm. ve üzerindeki defektler kritik boyutlu olarak kabul edilmektedir.

Bu çalışmada metakrilatlanmış hidrojel bir doku iskelesi modeli kullanılmıştır. Doğal bir polimer olan tip A jelatin ile metakrilik anhidrit doku iskelesinin yapısını oluşturmaktadır. Jelatin, ekstrasellüler matriksin bir bileşeni olup, bulunan kollajenin denatürasyonu ile elde edilmektedir (114). Doğal bir polimer olması yönüyle yüksek osteoindüktif kapasiteye sahiptir ve tamamen biyouyumlu ve biyobozunur özelliktedir. Metakrilik anhidrit ile fonksiyonelleştirme doku iskelesine osteokondüktif özellik kazandırmaktadır. Kemik doku mühendisliği için ideal doku iskelesi modeli, hem osteoindüktif ve hem de osteokondüktif olmalıdır. JEL-MA elde edilmesinin en temel basamağı, jelatin yan gruplarının metakrilik anhidrit ile stabil fonksiyonelleştirilmesidir. Bu çalışmada tip A jelatin, tip b formuna göre daha fazla reaktif amino grubuna sahip olması nedeniyle, kimyasal yapısındaki avantaj nedeniyle daha verimli metakrilatlanma potansiyeline sahip olduğu için tercih edilmiştir (115). Metakrilatlanmış jelatin hidrojel doku iskeleleri ilk olarak Van Den Buleke ve ark. tarafından ortaya atılmıştır (116). Bu konvansiyonel yaklaşımda, metakrilat zincirler jelatin makromolekülünün primer amine grubu (lizin veya hidroksi lizin) ile reaksiyona 50°C sıcaklıkta 1-3 saat süreyle girmektedir. Bu yöntemin getirdiği bir takım dezavantajlar bulunmaktadır (117, 118). Bunların başında kontrolsüz metakrilatlanma ile bu metakrilik anhidrit gruplarının hücrelere toksik olabilmeleri ve in vivo doku mühendisliği çalışmaları için yeterli mekanik ve reolojik özelliklere sahip olamamaları gelmektedir.

JEL-MA hidrojel doku iskelelerinin bu tez çalışmasında uygulanan üretim tekniği çalışma ekibimiz tarafından tanımlanmış olup aynı merkezde gerçekleştirilen çalışmalarla etkinliği kanıtlanmıştır. Bu fabrikasyon yöntemiyle konvansiyonel yaklaşımın kısmen kısıtlamalarının önüne geçilmiş ve literatürde ilk kez olacak şekilde JEL-MA doku iskeleleri mikrodalga ışıma yardımıyla elde edilmiştir. Çok daha

hızlı olarak ortalama olarak 5 dk. sürede JEL-MA sentezi gerçekleştirilmiştir. Yine bahsi geçen çalışmada farklı güçte mikrodalga enerjisinin uygulanmasının farklı etkileri araştırılmıştır. 600, 800 ve 1000 W enerji uygulandığında benzer metakrilatlanma sonuçları (yaklaşık olarak %98 kadar) elde edilmesine rağmen, 1000 W uygulanan grupta akrilik protonlardan elde edilen sinyalin daha keskin olduğu ve lizin gruplarının metakrilatlanmasının daha doymuş seviyeye ulaştığı sonucu elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında da en optimum in vitro sonucun elde edildiği güç profile olan 1000 W mikrodalga enerjisi standart olarak tüm doku iskelelerinin fabrikasyonunda tercih edilmiştir.

Çalışmada AkMKHler üzerinde etkinliği araştırılan fotobiyomodülasyon modalitesi daha önceki benzer çalışmalarda kullanılan düşük seviyeli lazer ve ışık yayan diyot kaynaklarının ikisinden de farklı özelliklere sahiptir. Cihaz, polikromatik ışık uygulama kapasitesine sahip olup, 590 nm ile 1395 nm. arasında geniş spektrumda dalga boyuna sahiptir. İdeal fotobiyomodülasyon için 550 nm altındaki ve 1500 nm üzerindeki dalga boyunda foton emisyonu da cihaz tarafından bloke edilmektedir. Polikromatik ışık yardımıyla fotobiyomodülasyonun in vivo ortamda mikrodolaşıma olan etkisini sorgulayan öncü nitelikteki çalışmayı çalışma ekibimiz gerçekleştirmiş olup, bu çalışmada bu yolla gerçekleştirilen fotobiyomodülasyonun sıçan pediküllü TRAM flep modelinde zon 4'ün yaşamsallığı anlamlı olarak arttırdığı ortaya konulmuştur (5). Bu tez çalışması da polikromatik, plazma ark ışık kaynağı yardımcı gerçekleştirilen fotobiyomodülasyonun AkMKH'lerin üzerindeki etkisini in vivo kemik defekt modelinde araştırması yönüyle oldukça önemlidir.

Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde, kontrol grubunda klinik ve histolojik olarak kontrol grubunda 20. haftanın sonunda meydana getirilen kritik boyutlu kemik defektinin tamamen kemikleşmediği, defekt alanında bağ dokusu izlenimi veren bir granülasyon izlenimi edinilmiştir. Histolojik olarak sadece granülasyon dokusunun olması ve irregüler bağ dokusunun gelişimi beklenen bir sonuç değerlendirilebilir. Makroskopik olarak dikkat çekici olarak, hiçbir örnekte enfeksiyon ve yabancı cisim reaksiyonu gözlenmemiştir.

Deney sonucunda elde edilen kemik dokuların histolojik değerlendirilmesinde, JEL-MA grubunda doku iskelesi kalıntılarının çevresinde, kavitelerin içinin tamamen

bol kapiller damarların bulunduğu sıkı bağ dokusu ile dolu olduğu gözlenmekle beraber, çevredeki kemik dokusuna yakın bölgelerde yeni kemik parçalarının oluşmaya başladığı görülmektedir. JEL-MA+AKMKH grubunda, dikkat çekici olarak, defekt alanının içinde doku iskelesinin yer yer öbekler halinde bulunduğu ve kök hücrelerin bulunduğu doku iskelesi kalıntılarının çevresinde de defect alanının büyük ölçüde sıkı bağ dokusu ile dolduğu gözlenmiştir. Bu bağ dokusu içinde şekillenmiş kalsifiye kemik trabekülleri seçilme olup, defekt çevresinde de kalsifiye ve kalsifiye olmamış kemik tabakaları gözlenmemiştir. Fotobiyomodülasyonun etkisinin karşılaştırılabilmesi ve standardize değerlendirme amacıyla skorlama yardımıyla elde edilen histolojik sonuçların yeni kemik oluşumu ve fibröz bağ dokusu oluşumu açısından değerlendirildiğinde ise, dikkat çekici olarak her iki parameter için de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hem JEL-MANın tek başına hem de AkMKHler ile beraber uygulandığında anlamlı olarak kemikleşmeye katkıda bulunduğu görülmektedir. Fotobiyomodülasyonun ise gruplarda elde edilen sonuçlar üzerinde anlamlı bir katkısı gözlenmemiştir.

Mikrotomografik değerlendirme açısından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, dikkat çekici olarak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hem JEL-MANın tek başına hem de AkMKHler ile beraber uygulandığında anlamlı olarak kemikleşmeye katkıda bulunduğu görülmektedir. Kemikleşme yüzdesi açısından sonuçlar değerlendirildiğinde, en yüksek kemikleşme oranları JEL-MA+AKMKH'lerin uygulandığı grupta elde edilmiştir. Fotobiyomodülasyon alma durumuna göre JEL-MA+AKMKH grubuna ait sonuçlar karşılaştırıldığında anlamlı olarak fotobiyomodülasyon uygulama durumunun fark yarattığı gözlemlenmektedir. Yine benzer olarak JEL-MA uygulanan grupta elde edilen örneklerde de fotobiyomodülasyon uygulamasının anlamlı olarak kemikleşme oranlarını arttırdığı gözlenmiştir. Kontrol grubunda ise diğer grupların aksine, fotobiyomodülasyon uygulaması örnekler arasında anlamlı fark yaratmamıştır.

Kök hücre içeren JEL-MA+AKMKH grubuna ait sonuçların immunohistokimyasal boyaması değerlendirildiğinde, dikkate değer olarak histolojik olarak yeni kemik oluşum ve fibröz bağ dokusu oluşum alanlarında 20. haftanın sonunda preoperatif olarak işaretlenmiş olan BrdU+ AkMKHlerin varlıklarını sürdürdükleri gözlenmektedir. Her ne kadar fototerapinin hücreler üzerindeki etkisini

karşılaştırabilmek için kantatif değerlendirme için örnekler olarak vermemiş olsalar da, hücrelerin yeni kemik oluşum alanında yer aldıklarının onaylanması, fotobiyomodülasyonun olası osteoindüktif etkisi konusunda fikir uyandırmıştır.

Deney süresinin sonunda JEL-MA yapısındaki hidrojel doku iskelesi modelinin yıkım kinetiği değerlendirildiğinde, 20 haftanın sonunda kısmen devamlılık gösterdiği görülmüştür. Kemik doku mühendisliği çalışmaları için tercih edilecek doku iskelesi modelinin tamamen biyobozunur olması ve geç kemikleşime sonuçlarının optimum olarak değerlendirilmesi için yerini yeni kemik oluşumuna terk etmesi beklenmektedir. Bu noktada, JEL-MA doku iskelesi modelinin biyobozunurluğunu daha iyi değerlendirmek amacıyla daha ileri haftalarda örneklerin alındığı in vivo çalışmalarla yeniden değerlendirilmesi uygun olacaktır. Bu şekilde özellikle hücresel stratejilerle desteklendiğinde daha ileri haftalarda daha organize kemikleşme gözlemlenmesi olasıdır.

6. SONUÇ

Sonuç olarak, polikromatik ışık kaynakları yoluyla fotobiyomodülasyon uygulamasının ve bu çalışmada tercih edilen metakrilatlanmış jelatin hidrojel doku iskelesi modelinin kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda kemik iyileşmesine olumlu etkileri olduğu gözlenmiştir. Ayrıca yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin varlığı rejeneratif etkinin daha da arttığı, fotobiyomodülasyonun hücrelerin varlığında kemikleşme yönünde rejeneratif etki yarattığı ortaya konulmuştur. Ek olarak, fotobiyomodülasyonun bu kök hücrelerin osteojenik farklılaşmalarında uyarıcı etkisi olabileceği yönünde fikir vermiştir. Polikromatik ışık yoluyla fotobiyomodülasyonun, hem rejeneratif tıp hem de hücre bazlı doku mühendisliği çalışmalarında gelecekte alternatif bir modalite olarak kullanılabilir.

7. KAYNAKÇA

1. Mehrara BJ MJ. Repair and Grafting of Bone. In: SJ M, editor. Plastic Surgery 2ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. p. 639-718.
2. Yu JC, Fearon J, Havlik RJ, Buchman SR, Polley JW. Distraction Osteogenesis of the Craniofacial Skeleton. Plastic and reconstructive surgery. 2004;114(1):1E-20E. Epub 2004/06/29.
3. Golas AR, Hernandez KA, Spector JA. Tissue engineering for plastic surgeons: a primer. Aesthetic Plast Surg. 2014;38(1):207-21. Epub 2014/01/01.
4. Zuk PA. Tissue engineering craniofacial defects with adult stem cells? Are we ready yet? Pediatric research. 2008;63(5):478-86. Epub 2008/04/23.
5. Calis M, Demirtas TT, Sert G, Irmak G, Gumusderelioglu M, Turkkani A, et al. Photobiomodulation with polychromatic light increases zone 4 survival of transverse rectus abdominis musculocutaneous flap. Lasers in surgery and medicine. 2019. Epub 2019/02/02.
6. Taner D. Fonksiyonel Anatomi : Ekstremiteler ve Sırt Bölgesi. Ankara: Hekimler Yayın Birliği; 1996.
7. Ovalle WK. NP. Kemiğin Yapısı. In: Müftüoğlu S KF, Atilla , P, editors. Netter Temel Histoloji. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi; 2009. p. 131-56.
8. Moore KL. Overview of Anatomy. In: KL. M, editor. Clinically Oriented Anatomy. 3 ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1992. p. 11-6.
9. Junqueira L.C. CJ, Kelly R.O. Basic Histology. 7 ed. Lebanon: Appleton&Lange; 1992.
10. Mersher AL. Junqueira's Basic Histology. 12 ed. USA: McGraw-Hill Medical; 2009. 141-60 p.
11. Rosenberg A. Bones, Joints and Soft Tissue Tumors. In: Cotran R. KV, Collins T. , editor. Robbins Pathologic Basis of Disease. 6 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1999. p. 1216-18.

12. Alperovich M, Lee ZH, Friedlander PL, Rowan BG, Gimble JM, Chiu ES. Adipose stem cell therapy in cancer reconstruction: a critical review. *Ann Plast Surg.* 2014;73 Suppl 1:S104-7. Epub 2014/07/09.
13. Bonewald LF. The Role of the Osteocyte in Bone and Nonbone Disease. *Endocrinology and metabolism clinics of North America.* 2017;46(1):1-18. Epub 2017/01/31.
14. Kylmaoja E, Nakamura M, Tuukkanen J. Osteoclasts and Remodeling Based Bone Formation. *Current stem cell research & therapy.* 2016;11(8):626-33. Epub 2015/10/20.
15. Online. www.bcrbiomass.edu.
16. Calvert JW, Weiss LE, Sundine MJ. New frontiers in bone tissue engineering. *Clinics in plastic surgery.* 2003;30(4):641-8, x. Epub 2003/11/19.
17. Jenkins DD, Yang GP, Lorenz HP, Longaker MT, Sylvester KG. Tissue engineering and regenerative medicine. *Clinics in plastic surgery.* 2003;30(4):581-8. Epub 2003/11/19.
18. Megee DM, Berry N, Russell RC, Neumeister MW. Tissue engineering: bridging the gap between replantation and composite tissue allografts. *Clinics in plastic surgery.* 2007;34(2):319-25, xi. Epub 2007/04/10.
19. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260(5110):920-6. Epub 1993/05/14.
20. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2006;10(3):569-76. Epub 2006/09/23.
21. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965;150(3698):893-9. Epub 1965/11/12.
22. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 1988;242(4885):1528-34. Epub 1988/12/16.
23. Zambonin G, Grano M, Greco G, Oreffo RO, Triffit JT. Hydroxyapatite coated with insulin-like growth factor 1 (IGF1) stimulates human osteoblast activity in vitro. *Acta orthopaedica Scandinavica.* 1999;70(2):217-20. Epub 1999/06/15.

24. Santos TC, Morton T, Moritz M, Pfeifer S, Reise K, Marques A, et al. VEGF and FGF-2 incorporation in starch-based bone tissue engineering constructs promote the in vivo expression of neovascularisation mediators. *Tissue engineering Part A*. 2012. Epub 2012/11/24.
25. Bai Y, Li P, Yin G, Huang Z, Liao X, Chen X, et al. BMP-2, VEGF and bFGF synergistically promote the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biotechnology letters*. 2012. Epub 2012/11/13.
26. Calvert JW, Marra KG, Cook L, Kumta PN, DiMilla PA, Weiss LE. Characterization of osteoblast-like behavior of cultured bone marrow stromal cells on various polymer surfaces. *Journal of biomedical materials research*. 2000;52(2):279-84. Epub 2000/08/22.
27. Schnell E, Klinkhammer K, Balzer S, Brook G, Klee D, Dalton P, et al. 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):3012-25. Epub 2007/04/06.
28. Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*. 2008;372(9655):2023-30. Epub 2008/11/22.
29. Panetta NJ, Gupta DM, Longaker MT. Bone tissue engineering scaffolds of today and tomorrow. *J Craniofac Surg*. 2009;20(5):1531-2. Epub 2009/10/10.
30. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000;21(24):2529-43. Epub 2000/11/09.
31. Giordano RA, Wu BM, Borland SW, Cima LG, Sachs EM, Cima MJ. Mechanical properties of dense polylactic acid structures fabricated by three dimensional printing. *Journal of biomaterials science Polymer edition*. 1996;8(1):63-75. Epub 1996/01/01.
32. Qi X, Ye J, Wang Y. Alginate/poly (lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement scaffold with oriented pore structure for bone tissue engineering. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2009;89(4):980-7. Epub 2008/05/13.
33. Kozusko SD, Riccio C, Goulart M, Bumgardner J, Jing XL, Konofaos P. Chitosan as a Bone Scaffold Biomaterial. *The Journal of craniofacial surgery*. 2018;29(7):1788-93. Epub 2018/08/30.

34. Calis M, Demirtas TT, Vatansever A, Irmak G, Sakarya AH, Atilla P, et al. A Biomimetic Alternative to Synthetic Hydroxyapatite: "Boron-Containing Bone-Like Hydroxyapatite" Precipitated From Simulated Body Fluid. *Annals of plastic surgery*. 2017;79(3):304-11. Epub 2017/04/22.
35. Kim IL, Mauck RL, Burdick JA. Hydrogel design for cartilage tissue engineering: a case study with hyaluronic acid. *Biomaterials*. 2011;32(34):8771-82. Epub 2011/09/10.
36. Reddi AH, Becerra J, Andrades JA. Nanomaterials and hydrogel scaffolds for articular cartilage regeneration. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2011;17(5):301-5. Epub 2011/05/21.
37. Gupta DM, Panetta NJ, Longaker MT. The use of polymer scaffolds in skeletal tissue engineering applications. *The Journal of craniofacial surgery*. 2009;20(3):860-1. Epub 2009/05/23.
38. Boccaccini AR, Blaker JJ. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. *Expert review of medical devices*. 2005;2(3):303-17. Epub 2005/11/18.
39. Kaynak G. Mikrodalga destekli çapraz bağlanma/çökeltme reaksiyonları ile kitosan-HA doku iskelelerinin hazırlanması ve kemik doku mühendisliğinde kullanımının araştırılması. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2012.
40. Rizzatti-Barbosa CM, Ribeiro-Dasilva MC. Influence of double flask investing and microwave heating on the superficial porosity, surface roughness, and knoop hardness of acrylic resin. *Journal of prosthodontics : official journal of the American College of Prosthodontists*. 2009;18(6):503-6. Epub 2009/05/13.
41. Piatkowski M, Bogdal D, Ondruschka B. Microwave-assisted synthesis of poly(aspartic acid). *Polimery-W*. 2009;54(7-8):573-6.
42. Hedrick MH, Daniels EJ. The use of adult stem cells in regenerative medicine. *Clinics in plastic surgery*. 2003;30(4):499-505. Epub 2003/11/19.
43. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(12):7634-8. Epub 1981/12/01.

44. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of neuroscience research*. 2000;61(4):364-70. Epub 2000/08/10.
45. Wiles MV, Keller G. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development*. 1991;111(2):259-67. Epub 1991/02/01.
46. Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, et al. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *Journal of cell science*. 1997;110 (Pt 11):1279-85. Epub 1997/06/01.
47. Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold HH, Hescheler J, Wobus AM. Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Developmental biology*. 1994;164(1):87-101. Epub 1994/07/01.
48. Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Muller PK, Rohwedel J. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mechanisms of development*. 2000;92(2):193-205. Epub 2000/03/23.
49. Young HE, Mancini ML, Wright RP, Smith JC, Black AC, Jr., Reagan CR, et al. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 1995;202(2):137-44. Epub 1995/02/01.
50. Warejcka DJ, Harvey R, Taylor BJ, Young HE, Lucas PA. A population of cells isolated from rat heart capable of differentiating into several mesodermal phenotypes. *The Journal of surgical research*. 1996;62(2):233-42. Epub 1996/05/01.
51. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*. 2002;13(12):4279-95. Epub 2002/12/12.
52. Aksu AE, Rubin JP, Dudas JR, Marra KG. Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Annals of plastic surgery*. 2008;60(3):306-22. Epub 2008/04/30.

53. Tholpady SS, Llull R, Ogle RC, Rubin JP, Futrell JW, Katz AJ. Adipose tissue: stem cells and beyond. *Clinics in plastic surgery*. 2006;33(1):55-62, vi. Epub 2006/01/24.
54. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001;7(2):211-28. Epub 2001/04/17.
55. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells*. 2005;23(3):412-23. Epub 2005/03/08.
56. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells, tissues, organs*. 2003;174(3):101-9. Epub 2003/07/02.
57. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 2004;6(1):7-14. Epub 2004/02/27.
58. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem cells international*. 2012;2012:812693. Epub 2012/05/12.
59. Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circulation research*. 2008;102(1):77-85. Epub 2007/10/31.
60. Traktuev DO, Prater DN, Merfeld-Clauss S, Sanjeevaiah AR, Saadatzadeh MR, Murphy M, et al. Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circulation research*. 2009;104(12):1410-20. Epub 2009/05/16.
61. Kapur SK, Katz AJ. Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie*. 2013;95(12):2222-8. Epub 2013/06/19.
62. Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010;5(2):103-10. Epub 2009/11/28.

63. Kiess W, Petzold S, Topfer M, Garten A, Bluher S, Kapellen T, et al. Adipocytes and adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22(1):135-53. Epub 2008/02/19.
64. Kim WS, Park BS, Sung JH. The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2009;9(7):879-87. Epub 2009/06/16.
65. Kokai LE, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Transl Res.* 2014;163(4):399-408. Epub 2013/12/24.
66. McIntosh KR. Evaluation of cellular and humoral immune responses to allogeneic adipose-derived stem/stromal cells. *Methods Mol Biol.* 2011;702:133-50. Epub 2010/11/18.
67. Li MO, Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity.* 2008;28(4):468-76. Epub 2008/04/11.
68. Hammami I, Chen J, Bronte V, DeCrescenzo G, Jolicoeur M. L-glutamine is a key parameter in the immunosuppression phenomenon. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;425(4):724-9. Epub 2012/08/14.
69. Kang SK, Lee DH, Bae YC, Kim HK, Baik SY, Jung JS. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Experimental neurology.* 2003;183(2):355-66. Epub 2003/10/14.
70. Baer PC, Schubert R, Bereiter-Hahn J, Plosser M, Geiger H. Expression of a functional epidermal growth factor receptor on human adipose-derived mesenchymal stem cells and its signaling mechanism. *Eur J Cell Biol.* 2009;88(5):273-83. Epub 2009/01/27.
71. Calis M, Demirtas TT, Atilla P, Tatar I, Ersoy O, Irmak G, et al. Estrogen as a novel agent for induction of adipose-derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation: in vivo bone tissue-engineering study. *Plast Reconstr Surg.* 2014;133(4):499e-510e. Epub 2014/03/29.
72. Tholpady SS, Katz AJ, Ogle RC. Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. *The anatomical record Part A,*

- Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology. 2003;272(1):398-402. Epub 2003/04/22.
73. Huang JI, Zuk PA, Jones NF, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick MH, et al. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plastic and reconstructive surgery*. 2004;113(2):585-94. Epub 2004/02/06.
 74. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plastic and reconstructive surgery*. 2002;109(1):199-209; discussion 10-1. Epub 2002/01/12.
 75. Halvorsen YC, Wilkison WO, Gimble JM. Adipose-derived stromal cells--their utility and potential in bone formation. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2000;24 Suppl 4:S41-4. Epub 2000/12/29.
 76. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nature biotechnology*. 2004;22(5):560-7. Epub 2004/04/13.
 77. Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2004;32(6):370-3. Epub 2004/11/24.
 78. Hosseinpour S, Fekrazad R, Arany PR, Ye Q. Molecular impacts of photobiomodulation on bone regeneration: A systematic review. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2019. Epub 2019/04/20.
 79. Dodd EM, Winter MA, Hordinsky MK, Sadick NS, Farah RS. Photobiomodulation therapy for androgenetic alopecia: A clinician's guide to home-use devices cleared by the Federal Drug Administration. *Journal of cosmetic and laser therapy : official publication of the European Society for Laser Dermatology*. 2018;20(3):159-67. Epub 2017/10/12.
 80. Lubart R, Lavi R, Friedmann H, Rochkind S. Photochemistry and photobiology of light absorption by living cells. *Photomedicine and laser surgery*. 2006;24(2):179-85. Epub 2006/05/19.

81. Aimbire F, Albertini R, Pacheco MT, Castro-Faria-Neto HC, Leonardo PS, Iversen VV, et al. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF α levels in acute inflammation. *Photomedicine and laser surgery*. 2006;24(1):33-7. Epub 2006/03/01.
82. Bayat M, Azari A, Golmohammadi MG. Effects of 780-nm low-level laser therapy with a pulsed gallium aluminum arsenide laser on the healing of a surgically induced open skin wound of rat. *Photomedicine and laser surgery*. 2010;28(4):465-70. Epub 2009/10/03.
83. Kropp R. (Niels Ryberg Finsen). *Pneumologie*. 2014;68(10):696-9. Epub 2014/10/08. Niels Ryberg Finsen.
84. Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *American journal of surgery*. 1971;122(4):532-5. Epub 1971/10/01.
85. Smith RJ, Birndorf M, Gluck G, Hammond D, Moore WD. The effect of low-energy laser on skin-flap survival in the rat and porcine animal models. *Plastic and reconstructive surgery*. 1992;89(2):306-10. Epub 1992/02/01.
86. Szymanska J, Goralczyk K, Klawe JJ, Lukowicz M, Michalska M, Goralczyk B, et al. Phototherapy with low-level laser influences the proliferation of endothelial cells and vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta secretion. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2013;64(3):387-91. Epub 2013/08/21.
87. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers in surgery and medicine*. 2007;39(4):373-8. Epub 2007/04/26.
88. Gupta A, Avci P, Sadasivam M, Chandran R, Parizotto N, Vecchio D, et al. Shining light on nanotechnology to help repair and regeneration. *Biotechnology advances*. 2013;31(5):607-31. Epub 2012/09/07.
89. Gumusderelioglu M. Fototerapinin Yeri. *Bilim ve Teknik, TÜBİTAK Yayınları*. Şubat 2015.
90. Fushimi T, Inui S, Nakajima T, Ogasawara M, Hosokawa K, Itami S. Green light emitting diodes accelerate wound healing: characterization of the effect and its molecular basis in vitro and in vivo. *Wound repair and regeneration : official*

publication of the Wound Healing Society (and) the European Tissue Repair Society. 2012;20(2):226-35. Epub 2012/03/03.

91. Cakmak AS, Cakmak S, Vatansever HS, Gumusderelioglu M. Photostimulation of osteogenic differentiation on silk scaffolds by plasma arc light source. *Lasers in medical science*. 2017. Epub 2017/12/19.
92. Hollinger JO, Schmitt JM, Buck DC, Shannon R, Joh SP, Zegzula HD, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. *Journal of biomedical materials research*. 1998;43(4):356-64. Epub 1998/12/17.
93. Zong C, Xue D, Yuan W, Wang W, Shen D, Tong X, et al. Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds. *European cells & materials*. 2010;20:109-20. Epub 2011/01/21.
94. Rogers JJ, Young HE, Adkison LR, Lucas PA, Black AC, Jr. Differentiation factors induce expression of muscle, fat, cartilage, and bone in a clone of mouse pluripotent mesenchymal stem cells. *The American surgeon*. 1995;61(3):231-6. Epub 1995/03/01.
95. Sharma RK, Lee CA, Gunasekaran S, Knight LC, Bielby M. Stenting for bilateral congenital choanal atresia--a new technique. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2006;70(5):869-74. Epub 2005/11/19.
96. Çapkın M. Sıçan kemik iliğinden ve yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin PCL, PCL-kollajen nanofibröz yüzeylerde sinir hücrelerine farklılaştırılması. Bornova-İzmir: Ege Üniversitesi; 2010.
97. Mayle A, Luo M, Jeong M, Goodell MA. Flow cytometry analysis of murine hematopoietic stem cells. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2012. Epub 2012/06/28.
98. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochemistry and cell biology*. 2009;132(5):533-46. Epub 2009/08/19.

99. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res.* 1999(360):71-86. Epub 1999/04/02.
100. Schaefer RB, Stadler JA, 3rd, Gosain AK. To distract or not to distract: an algorithm for airway management in isolated Pierre Robin sequence. *Plastic and reconstructive surgery.* 2004;113(4):1113-25. Epub 2004/04/15.
101. Sesenna E, Magri AS, Magnani C, Brevi BC, Anghinoni ML. Mandibular distraction in neonates: indications, technique, results. *Italian journal of pediatrics.* 2012;38:7. Epub 2012/02/04.
102. McCarthy JG, Schreiber J, Karp N, Thorne CH, Grayson BH. Lengthening the human mandible by gradual distraction. *Plastic and reconstructive surgery.* 1992;89(1):1-8; discussion 9-10. Epub 1992/01/01.
103. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Khoshzaban A, Keshel SH, et al. Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics.* 2009;108(2):e1-6. Epub 2009/07/21.
104. van Hout WM, Mink van der Molen AB, Breugem CC, Koole R, Van Cann EM. 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. *Clinical oral investigations.* 2011;15(3):297-303. Epub 2011/04/06.
105. Vergroesen PP, Kroeze RJ, Helder MN, Smit TH. 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. *Macromolecular bioscience.* 2011;11(6):722-30. Epub 2011/03/15.
106. Rada T, Santos TC, Marques AP, Correlo VM, Frias AM, Castro AG, et al. Osteogenic differentiation of two distinct subpopulations of human adipose-derived stem cells: an in vitro and in vivo study. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine.* 2012;6(1):1-11. Epub 2011/02/05.
107. Wan DC, Shi YY, Nacamuli RP, Quarto N, Lyons KM, Longaker MT. Osteogenic differentiation of mouse adipose-derived adult stromal cells requires retinoic acid and bone morphogenetic protein receptor type IB signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006;103(33):12335-40. Epub 2006/08/09.

108. Chevallier N, Anagnostou F, Zilber S, Bodivit G, Maurin S, Barrault A, et al. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials*. 2010;31(2):270-8. Epub 2009/09/29.
109. Shuqiang M, Kunzheng W, Xiaoqiang D, Wei W, Mingyu Z, Daocheng W. Osteogenic growth peptide incorporated into PLGA scaffolds accelerates healing of segmental long bone defects in rabbits. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery: JPRAS*. 2008;61(12):1558-60. Epub 2008/08/05.
110. Garcia P, Speidel V, Scheuer C, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, et al. Low dose erythropoietin stimulates bone healing in mice. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2011;29(2):165-72. Epub 2010/08/27.
111. Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. (Effect of laser radiation on the wound healing). *Zeitschrift fur experimentelle Chirurgie*. 1971;4(5):307-12. Epub 1971/01/01. Wirkung der Laserstrahlen auf die Wundheilung.
112. Mester E, Varteresz V, Doklen A, Gartner J, Hejjas M. (Effect of laser rays on hemoglobin synthesis in vitro). *Radiobiologia, radiotherapia*. 1971;12(5):669-75. Epub 1971/01/01. Die Wirkung der Laserstrahlen auf die Hamoglobinsynthese in vitro.
113. Zegzula HD, Buck DC, Brekke J, Wozney JM, Hollinger JO. Bone formation with use of rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2). *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1997;79(12):1778-90. Epub 1997/12/31.
114. Bogdanovic J, Halsey NA, Wood RA, Hamilton RG. Bovine and porcine gelatin sensitivity in children sensitized to milk and meat. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(5):1108-10. Epub 2009/08/12.
115. Hutson CB, Nichol JW, Aubin H, Bae H, Yamanlar S, Al-Haque S, et al. Synthesis and characterization of tunable poly(ethylene glycol): gelatin methacrylate composite hydrogels. *Tissue engineering Part A*. 2011;17(13-14):1713-23. Epub 2011/02/11.
116. Van Den Bulcke AI, Bogdanov B, De Rooze N, Schacht EH, Cornelissen M, Berghmans H. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules*. 2000;1(1):31-8. Epub 2001/11/17.

117. Nichol JW, Koshy ST, Bae H, Hwang CM, Yamanlar S, Khademhosseini A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*. 2010;31(21):5536-44. Epub 2010/04/27.
118. Sutter M, Siepmann J, Hennink WE, Jiskoot W. Recombinant gelatin hydrogels for the sustained release of proteins. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2007;119(3):301-12. Epub 2007/05/01.

8. EKLER

Ek 1. Turnitin Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Mert Çalış
Ödev başlığı: MERT'İN DOKTORA TEZİ
Gönderi Başlığı: FOTOTERAPİNİN YAĞ DOKUSUND..
Dosya adı: Dosya boyutu:56.74M
Sayfa sayısı: 77
Kelime sayısı: 15,394
Karakter sayısı: 107,103
Gönderim Tarihi: 30-Haz-2019 12:06AM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1142278100

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FOTOTERAPİNİN YAĞ DOKUSUNDAN TÜRETİLMİŞ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN OSTEOJENİK
İNDÜKSİYONUNA ETKİLERİNİN METAKRİLATLANMIŞ
JELATİN HİDROJEL İLE REKONSTRÜKTE EDİLMİŞ KRİTİK
BOYUTLU KRANİYAL KEMİK DEFECTİ MODELİNDE
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Mert ÇALIŞ

İleri Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2019

Copyright 2019 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

Ek 2. Turnitin Orjinalik Raporu

FOTOTERAPİNİN YAĞ DOKUSUNDAN TÜRETİLMİŞ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN OSTEOJENİK İNDÜKSİYONUNA ETKİLERİNİN METAKRİLATLANMIŞ JELATİN HİDROJEL İLE REKONSTRÜKTE EDİLMİŞ KRİTİK BOYUTLU KRANİYAL KEMİK DEFEKTİ


ORJİNALLIK RAPORU

% 19 BENZERLİK ENDEKSİ	% 18 İNTERNET KAYNAKLARI	% 2 YAYINLAR	% 5 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
----------------------------------	---------------------------------------	------------------------	--------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	katalog.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	% 14
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
3	www.kadinlardunyasi.org İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% 1
5	www.tgcd.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	ÇALIŞ, Mert, ÖZ, Zeynep and ÖZGÜR, Figen.	<% 1

Ek 3. Etik Kurul Onayı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 - 41

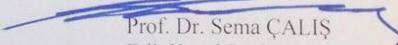
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 28.03.2017 (SALI)
TOPLANTI SAYISI : 2017/03
DOSYA KAYIT NUMARASI : 2017/29
KARAR NUMARASI : 2017/29 -4
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ : Prof. Dr. Figen ÖZGÜR

HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI : Yrd. Doç. Dr. Mert ÇALIŞ, Dr. Tuğrul Tolga DEMİRTAŞ
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Yrd. Doç. Dr. Mert ÇALIŞ, Dr. Tuğrul Tolga DEMİRTAŞ, Prof. Dr. Ayşe Nur ÇAKAR, Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Arş. Gör. Dicle AKSÖYLER, Arş. Gör. Gülseren IRMAK

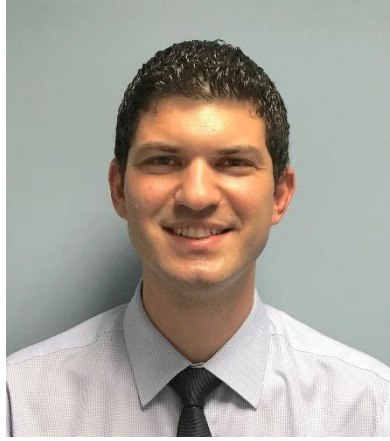
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : 60 Adet Wistar Albino Rat

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Figen ÖZGÜR'ün araştırma yürütücüsü olduğu 2017/29 kayıt numaralı "*Metakrilatlanmış Jelatin (Jel-MA) Hidrojel ve Adipoz Kök Hücre (ADMSCs) Sistemlerinde Fototerapi Etkisiyle Kranial Kemik Defektlerinin Rekonstrüksiyonunun İn-vivo Rat Modelinde İncelenmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir. Kurul üyesi Prof. Dr. Sema ÇALIŞ çıkar çatışması nedeni ile tartışma ve oylamaya katılmamıştır.


Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 06100 Sıhhiye-Ankara Ayrıntılı Bilgi için:
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

9. ÖZGEÇMİŞ



Dr. Mert ÇALIŞ

Dr. Mert ÇALIŞ, 16 Kasım 1983 tarihinde Ankara’da dünyaya gelmiştir. Orta ve lise eğitimini Ankara Atatürk Anadolu Lisesi’nde 2000 yılında tamamlamış, 2006 yılında Hacettepe Üniversitesi İngilizce Tıp Fakültesi’nde mezun olup tıp doktoru ünvanını almıştır. 2013 yılında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı’nda uzmanlık eğitimini tamamlayarak ‘plastik cerrahi uzmanı’ ünvanı kazanmıştır. 2013-2015 yılları arasında devlet hizmet yükümlülüğünü Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi Plastik Cerrahi Kliniği’nde gerçekleştirmiştir. 2014 yılından beri Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İleri Plastik Cerrahi doktora programı kapsamında çalışmalarını sürdürmektedir. 2015-2018 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı’nda yardımcı doçent olarak görev yapmış olup, 2018 yılından itibaren aynı kurumda görevine doçent olarak devam etmektedir.

2005 yılında Prof. Dr. Şeref Zileli – Yılın Başarılı Tıp Fakültesi Öğrencisi, 2012 yılında Türk Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Derneği 34. Ulusal Kurultayı Asistan Bildiri Yarışması Klinik Dal Birincilik, 2013 yılında Türk Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Derneği 35. Ulusal Kurultayı Uzman Araştırma Yarışması Deneysel Kategori Birincilik, 2016 yılında Türk Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Derneği 38. Ulusal Kurultayı Uzman Araştırma Yarışması Deneysel Kategori Birincilik ödülleriyle layık görülmüştür.

2013 yılında European Board of Plastic Surgery (EBOPRAS) sınavlarını başarıyla tamamlayarak da Avrupa Plastik Cerrahi Yeterlilik ünvanı olan FEBOPRAS (Fellow of EBOPRAS) ünvanını elde etmiştir.

2011 yılında Yale Üniversitesi'nde, 2018 yılında University of Washington Seattle Children's Hospital'da pediatrik plastik cerrahi ve kraniyofasiyal cerrahi alanlarında eğitim amacıyla çalışmalarda bulunmuştur.

Uluslararası SCI ve SCI-E indeksleri kapsamında yayınlanmış 35 adet, ulusal indekslerde ise 10'dan fazla bilimsel makalesi mevcuttur.

Mesleki ilgi alanları arasında estetik cerrahi, kraniyomaksillofasiyal cerrahi ve dudak damak yarıkları yer almaktadır.
