



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

YAĞDAN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL KÖK  
HÜCRELERİN YAĞ HÜCRELERİNE  
DİFERANSİYASYONU VE PROLİFERASYONU ÜZERİNE  
KİTOSAN DOKU İSKELESİNİN ETKİSİ

Dr. Duran ÇEKİÇ  
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Şakir ÜNAL

MERSİN - 2019



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

YAĞDAN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL KÖK  
HÜCRELERİN YAĞ HÜCRELERİNE  
DİFERANSİYASYONU VE PROLİFERASYONU ÜZERİNE  
KİTOSAN DOKU İSKELESİNİN ETKİSİ

Dr. Duran ÇEKİÇ  
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Şakir ÜNAL

MERSİN – 2019

## TEŐEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimim boyunca; meslek ahlakı, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, hocam olmasından onur duyduğum, tez ile ilgili çalışmalarım süresince yardımlarını benden esirgemeyen, hep yanımda olan, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Şakir ÜNAL'a;

Uzmanlık eğitimim süresince bana bilgi ve tecrübelerini aktararak tıp ahlakı çerçevesinde elimden gelenin en iyisini yapmayı öğreten, hocalarım olmalarından daima onur duyacağım; Prof. Dr. Yavuz DEMİR, Prof. Dr. Alper SARI, Prof. Dr. Yavuz BAŐTERZİ, Prof. Dr. Nazım GÜMÜŐ, Doç. Dr. Göktekin TENEKECİ'ye;

Tez çalışmam süresinde çok emeği olan Prof. Dr. Şakir Necat YILMAZ, Prof. Dr. Selma ÜNAL, Prof. Dr. Meltem NASS DUCE, Doç. Dr. Nimet BÖLGEN, Arş. Gör. Gülsen BAYRAK, Arş. Gör. Didem DEMİR, Arş. Gör. Merve TÜRKEGÜN'e;

Gece gündüz birlikte çalışarak birçok anı biriktirdiğimiz, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum başta Arş. Gör. Ali Cem OKTAY'a, asistan arkadaşlarıma; hastane çatısı altında birlikte çalıştığım başta servis sorumlumuz Hatice AKTAŐ, Serap RANDA ve tüm hastane personeli arkadaşlarıma;

Beni büyütüp yetiştiren, bugüne kadar maddi ve manevi her türlü fedakârlığı yapan, destekleri sayesinde bugünlere geldiğim ve bir ferdi olmaktan gurur duyduğum, başta babam Kadir ÇEKİÇ, annem Hediye ÇEKİÇ ve ablalarım Seher ÇEKİÇ, Sevgi ÇEKİÇ olmak üzere tüm aileme;

Daima yanımda olan ve hayatta her zaman en büyük destekçim olan canım eşim Fatma Cansu ÇEKİÇ' e ve enerji kaynağım kızım Duru Hediye ÇEKİÇ'e;

Ve beni destekleyen tüm yakınlarıma, dostlarıma ve arkadaşlarıma; sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

**Dr. Duran ÇEKİÇ**

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa No</b>
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	7
GİRİŞ VE AMAÇ	9
GENEL BİLGİLER	11
GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
BULGULAR	40
TARTIŞMA	52
SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR	60
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	64
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	66
TABLolar DİZİNİ	69

## ÖZET

### **Yağdan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Yağ Hücrelerine Diferansiyasyonu ve Proliferasyonu Üzerine Kitosan Doku İskelesinin Etkisi**

Kök hücreler, farklı hücre tiplerine dönüşme potansiyeline sahip olup, çoğalarak yeni kök hücreler ve olgun işlevsel hücrelere diferansiye olabilmektedirler. Ancak çoğunlukla istenilen hedef doku hücre diferansiyasyonu sağlamakta zorluk yaşanmakta, verildiği bölgede kök hücreler ya farklı doku kompartmanlarına geçebilmekte, ya işlevsiz kalmakta ya da ölerек ortadan kaldırılmaktadır. Çalışmamız, kök hücreleri bir iskele üzerine yerleştirerek istenilen doku formatına diferansiyasyonunu sağlamak ve hücrelerin farklı doku kompartmanlarına geçmesini engellemek amacı ile yapıldı.

Deney hayvanlarının inguinal bölgelerinden anestezi altında yaklaşık 1 cm<sup>3</sup> yağ greftleri alınarak, steril tuzlu fosfat tamponu (PBS) ile yıkandıktan sonra steril bir bistüriyle küçük parçalara (yaklaşık 1 mm<sup>3</sup>) bölündü. Bu parçalar %0.075 konsantrasyonda Tip 1 kollajenaz içeren medyumda 37 °C sıcaklıkta 30 dakika bekletilerek enzimatik parçalanma gerçekleştirildi. Daha sonra bu süspansiyon 70 µm'lik steril hücre filtresinden geçirilerek büyük debrislere arındırıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu 200 g hızında 10 dakika santrifüj edildikten sonra pellet steril PBS ile resüspand edilerek yıkandı ve tekrar aynı hız ve sürede santrifüjden sonra %20 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin-streptomisin ve %1 amfoterisin içeren DMEM medyumunda resüspand edildi. Hücreler Thoma™ lamı ile sayıldıktan sonra cm<sup>2</sup> başına 3×10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde uygun petri kaplarına ekildi. Hücreler konfluense ulaştıktan sonra tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırıldı ve sonra pasajlanarak çoğaltıldı. Hücreler yeterli sayıya ulaştıklarında steril edilmiş kitosan parçacıklar üzerine ekildi ve tutunmalarını takiben defekt onarımı için kullanıldı. Kültüre edilen kök hücrelerin medyumunda sürekli olarak 10 mM konsantrasyonda timidin analogu BrdU bulundurulmuş mitozla bölünen hücrelerin işaretlenmesi sağlandı.

Tavşanlar sadece kök hücre verilen, üzerine kök hücre ekilmiş kitosan verilen ve sadece kitosan verilen olmak üzere 3 gruba ayrıldı (n=8). Hazırlanan süspansiyonlar, anestezi altında hayvanların sağ maksiller bölgesine enjekte edildi. Sol maksiller bölgeleri ise kontrol olarak kullanıldı. Sağ maksiller bölgede

cilt üzerinde şişlik oluşan bölgelerin kılları tıraşlanarak, verilen bölgeler işaretlendi. Tavşanlar 3 hafta kafes ortamında standart koşullarda takip edildi. Sonrasında 18 tavşandan bilgisayarlı tomografi yardımı ile görüntüler elde edildi. Elde edilen görüntüler yardımı ile volümetrik inceleme yapıldı. Anestezi altında tavşanların tıraşlanan cilt bölgeleri periost üzerinden eksize edildi. Daha sonra tavşanlar yüksek dozda anestezi ile sakrifiye edildi. Alınan doku örnekleri immün işaretleme ile ve histopatolojik olarak değerlendirildi. Verilen mezenkimal kök hücrelerin yağ hücrelerine diferansiyasyonu ve proliferasyonu değerlendirilerek kitosan iskelesinin etkileri kıyaslandı. Mezenkimal kök hücreler, birçok hastalık tedavisinde kitosan doku iskelesi sayesinde kullanılabilir. Hastalıkların morbidite ve mortalitesini azaltarak ekonomik açıdan da maliyetlerde ciddi azalmalar sağlayabilir.

**Anahtar kelimeler:** Diferansiyasyon, Kitosan, Kök Hücre, Kriyojel, Proliferasyon

## ABSTRACT

### **The Effect of Chitosan Tissue Scaffold on Differentiation and Proliferation of Mesenchymal Stem Cells Obtained from Fat**

Stem cells are pluripotent and differentiated into various cells in the body. However, it is difficult to achieve the desired target tissue cell differentiation, and the stem cells can be transferred to different tissue compartments. Our study is carried out with the aim of placing the stem cells on a scaffold to provide differentiation to the desired tissue format and to prevent their cells from passing into different tissue compartments.

Approximately 1 cm<sup>3</sup> of fat grafts will be taken from the inguinal regions of the experimental animals under anesthesia. The fat grafts taken will be washed with sterile saline phosphate buffer (PBS) and then divided into small pieces (approximately 1 mm<sup>3</sup>) with a sterile scalpel. These fractions will be kept in a 0.075% concentration of type I collagenase medium at 37 ° C for 30 minutes and enzymatic degradation will be carried out. This suspension is then passed through a 70 µm sterile cell filter to remove large debris. The resulting cell suspension was centrifuged at 200 g for 10 minutes and resuspended with sterile PBS. Once the cells are counted with a Thoma™ slide, they will be planted in suitable petri dishes that will have 3 × 10<sup>5</sup> cells per cm<sup>2</sup>. After the cells are confluent, they will be replicated by trypsin-EDTA solution. Once the cells have reached a sufficient number, they will be sown on sterile chitosan particles and will be used for defect repair following attachment. In the medium of the cultured stem cells, the thymidine analogue BrdU will be continuously present at a concentration of 10 mM. Cells will internalize this substance at each cleavage by adding to the genomes and cells will be marked histochemically.

Stem cells; one million for the experimental group with scaffold chitosan to be made into a solution of 1cc, another million with 1cc isotonic is used for the other group. 18 rabbits will be divided into three groups. The left maxillary region will be the control group in the right maxillary region of the first group under anesthesia. the left maxillary region will be the control group to give chitosan, which is the only tissue scaffold to the right maxillary region of the

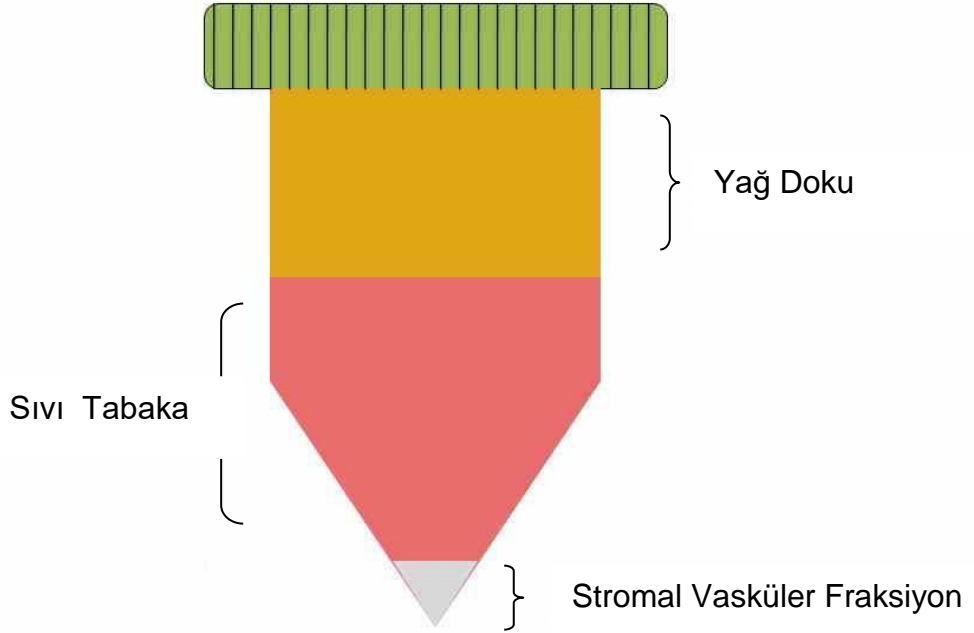
second group. Chitosan and stem cells will be given to the right maxillary region of the third group and left maxillary region will be the control group. In the right maxillary region, the areas of the skin that have swelling on the skin will be trimmed and the regions indicated will be marked. 3 weeks rabbits will be followed under natural conditions in cage environment. After 18 rabbits, images will be obtained with the help of computer tomography. Volumetric analysis will be performed with the help of the obtained images. The skin areas of the rabbits under anesthesia will be excised through the periosteum. They will be divided into experimental and control groups. Rabbits will be sacrificed with high doses of anesthesia. Tissue samples taken will be evaluated histopathologically. The differentiation and proliferation of mesenchymal stem cells to fat cells will be evaluated and the effects of chitosan scaffold will be compared. Mesenchymal stem cells will be used for the treatment of many diseases thanks to the chitosan tissue scaffold. There will be significant reductions in the costs of the diseases, which will reduce the morbidity and mortality of the diseases.

**Key words:** Differentiation, Chitosan, Stem Cell, Cryogel, Proliferation



## GİRİŞ VE AMAÇ

Kök hücreler, özelleşmemiş temel hücreler olmakla birlikte asimetrik bölünme yetenekleri ile özelleşmiş hücre ve yeni kök hücreler üretebilirler<sup>1,2,3</sup>. Mezenkimal kök hücreler vücutta kemik iliği, yağ doku, diş pulpası, sünnet derisi gibi birçok dokudan elde edilebilirler. Totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent, unipotent kök hücre tipleri mevcut olup yağdan elde edilen mezenkimal kök hücreler multipotent kök hücre niteliğindedirler<sup>4</sup>. Yağdan elde edilen kök hücreler CD73, CD90, CD105 pozitif, CD14,CD11b, CD34, CD45, CD19 ve CD79 alfa negatiftir (Cluster of. Differentiation) fenotiplerine sahiptirler<sup>5, 6</sup>. Cilt altı yağ dokusu mezenkimal kök hücrelerden zengin olmakla birlikte enzimatik parçalanma sonrasında elde edilen stromal vasküler fraksiyon içerisinde bulunurlar (Şekil 1)<sup>7</sup>. Stromal vasküler fraksiyon, mezenkimal kök hücrelerle birlikte endotelial ve hematopoetik hücreleri içerir<sup>8, 9</sup>.



**Şekil 1.** Stromal vasküler fraksiyon

Kök hücreler, canlıda verildiği bölgede dağılmakta olup istenilen doku formatından farklı doku formlarına dönüşmektedirler. Çalışmamızda kök

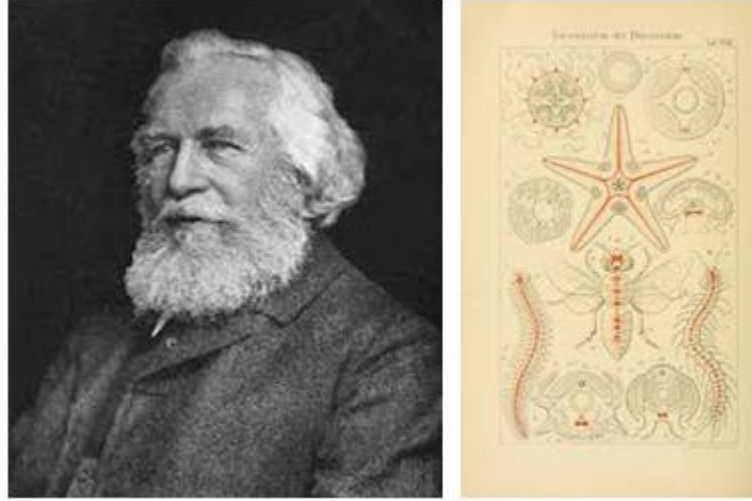
hücrelerin in vitro ortamda bir doku iskelesine tutunmalarını sağlayarak in vivo ortama taşımayı ve hedeflenen dokuda diferansiyasyon ve proliferasyon özelliklerini araştırmayı amaçladık<sup>10</sup>. Kök hücreler in vivo ortamda niş adı verilen kendilerine özgü bir mikro çevrede yerleşirler. Bu çevrede başka kök hücreler, çeşitli matür hücreler, bağ dokusu elemanları, kan damarları gibi niş bileşenleri bulunur. Nişler, kök hücrelerin varlığı ve devamlılığı için büyük önem taşırlar<sup>11</sup>. Kök hücreler genellikle morfolojik olarak belirli bir biçime sahip olmayan özelleşmemiş hücrelerdir. Ancak hücre içinden veya dışında uygun uyarılarla karşılaştıklarında bir yandan çoğalmaya bir yandan da farklılaşmaya başlarlar. Bu uyarılar hücrenin kendi içinden veya bulunduğu mikro çevreden kaynaklanabilir. Ayrıca hormonlar gibi daha uzaktan gelen bazı sinyal molekülleri de kök hücrelerin uyarılarak çoğalmasını ve farklılaşmaya başlamasını sağlayabilir<sup>12</sup>.

Doku mühendisliğinde kozmetik ve rekonstrüktif cerrahide hücrelerin tutunabileceği biyolojik uyumlu, biyobozunur, nontoksik doku iskeleleri üzerinde çalışmalar mevcuttur<sup>13</sup>. Literatürde trikalsiyum fosfat, Tip 1 kollajen, kitosan gibi birçok doku iskelesi çalışmalarda kemik ve kırıkta defekt modellerinin rekonstrüksiyonu üzerinde kullanıldı<sup>10, 14, 15</sup>. Çalışmamızda doku iskelesi olarak; enjekte edilebilen kitosan kriyojel mikroküre kullanıldı. Kitosan kriyojel mikroküre nontoksik biyolojik uyumlu biyobozunur bir maddedir. Genellikle yengeç, karides, istakoz kabuğunun kitin kısmında bulunmaktadır. Çapraz bağların sonucunda mikroküreler üzerinde duvarları ince, birbirleriyle bağlantılı ve hücrelerinin tutunabileceği makroporlar vardır. Makroporlar arasındaki bağlantılar, tıpkı bir karınca yuvası gibi birbirleriyle ilişkili olup, hücrelerin sinyal molekülleri ile etki etmelerini ve birbirleriyle iletişim kurmalarını sağlayacağını düşünmekteyiz. Ayrıca mikrokürelerin pembe iğne ucu lümeninden geçerek minimal invazyon yaratması bu doku iskelesini değerli kılmaktadır<sup>15</sup>. Doku iskelesi üzerine tutunan hücrelerin, taşındıkları ortamda canlı kalıp, aynı doku formatına diferansiye olmaları ya da proliferere olmaları kök hücre tedavisine farklı bakış açısı kazandıracaktır. Çalışmamızda kök hücrelerin kullanım metotlarına yeni bir teknik kazandırarak literatüre katkı sağlanması amaçlandı.

## GENEL BİLGİLER

### KÖK HÜCRELER

Kök hücre kavramı literatüre ilk kez 1868 yılında Alman biyolog Ernst Haeckel tarafından kazandırılmıştır. Charles Darwin'in evrim kuramının önemli destekçilerinden biri olan Haeckel, organizmaların evrimsel bir soy ağacını da sunduğu 'Doğal Yaratılış Hikayesi' isimli kitabında ilk kez kök hücre (stammzelle) adını kullanmıştır (Şekil 2). Haeckel bu terimin, döllenmiş yumurta hücresi ve yeryüzündeki tüm canlıların köken aldığı evrimsel atamız olan tek hücreli organizmayı tanımlamak için kullanılmasını da aynı eserinde önermiştir<sup>16</sup>. 1971 yılında Profesör Doktor Süreyya Tahsin Aygün ülkemizde ilk hücre kültürünü yapmıştır. Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün'ün veba ve şarbon aşılıları üzerinde çalışmaları mevcut olup yeni metotlar geliştirmiştir. Talidomid'in ülkemize girişini engelleyerek ülkemizde bir felaketin önüne geçmiştir. Kemik iliğindeki morfolojik yapıları fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin kemik ve yağ hücrelerine farklılaşabildiklerini göstermiştir.



**Şekil 2.** Ernst Haeckel, Doğal Yaratılış Hikayesi

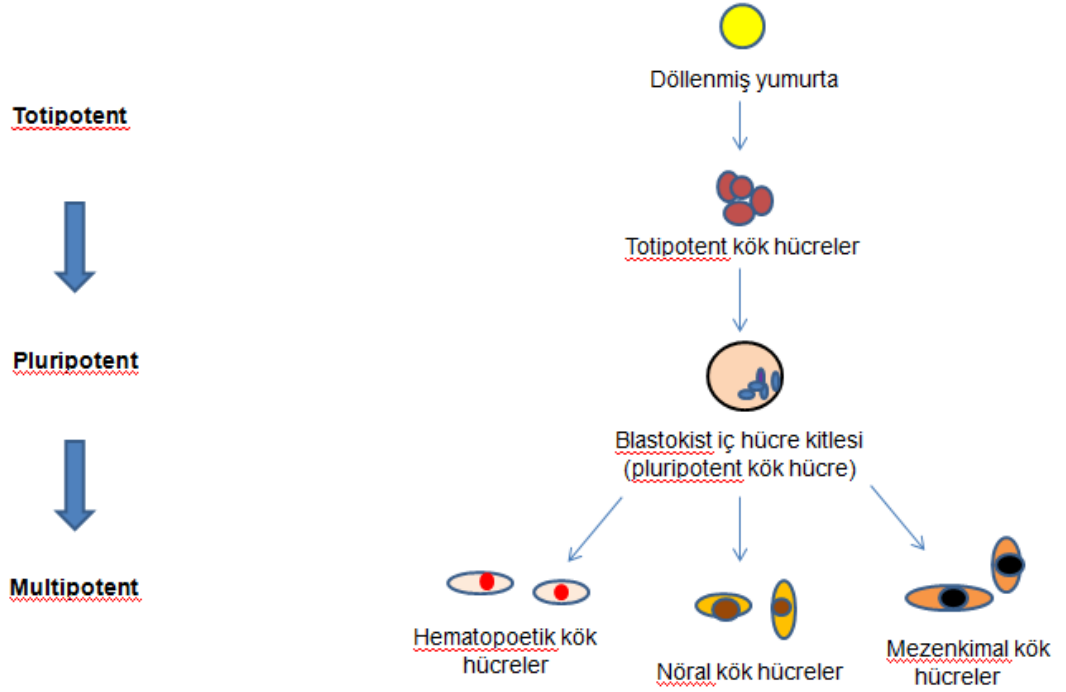
Kendisini yenileyebilen ve farklı tip hücrelere dönüşebilen hücrelere kök hücre denir<sup>17</sup>. Kök hücrelerin karakteristik özellikleri, kendi kendilerini yenileyebilmeleri ve bulunduğu dokuda farklı tip hücrelere diferansiye

olabilmeleridir<sup>18</sup>. Kök hücreler vücutta oluşan doku hasarında tamir mekanizması olarak görev almaktadırlar.

Farklı hücre tiplerine farklılaşma yetenekleri sayesinde yüksek plastisite gösterirler. Örneğin hematopoetik kök hücreler, endotel hücresine, kas ve hepatosit hücrelerine dönüşebilirler<sup>19</sup>.

Kök hücrelerin spesifik özellikleri; kendi kendini yenileyebilme, tek bir hücreden birden fazla hücre tipine farklılaşabilme, in vivo olarak dokunun fonksiyonunu kazanabilmeleridir. Farklılaşma potansiyellerine göre farklı kök hücre tipleri tanımlanmaktadır. Embriyonik ve ekstraembriyonik tüm hücre tiplerine farklılaşma potansiyeli taşıyan hücreler **totipotent** olarak adlandırılır. Döllenmiş yumurta hücresi yani zigot ve birkaç hücreden ibaret moruladan elde edilen blastomerler totipotent hücreler olarak kabul edilir. Bu hücrelerin bir tanesi ait oldukları organizma türündeki bir bireyi eksiksiz olarak geliştirme yeteneğine sahiptirler. Yani bir morulanın tüm blastomerleri birbirinden ayrılıp uygun koşullarda çoğaltılırsa her biri eksiksiz yeni bireyler oluşturabilir. **Pluripotent** kök hücreler, totipotentlerin devam eden soyları niteliğindedir ve neredeyse organizmadaki her hücre tipine dönüşebilirler. Bu hücreler her üç germ yaprağından (endoderm, mezoderm, ektoderm) köken alan hücrelere dönüşebilme potansiyeli taşırlar. Blastokist evresindeki embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilebilirler. Tüm embriyonik hücre ve dokuları oluşturabilirler ancak ekstraembriyonik dokulara dönüşemezler. **Multipotent** kök hücreler, daha kısıtlı sayıda hücreye kaynaklık edebilen kök hücrelerdir. Organizmadaki her hücreyi oluşturamazlar. Potansiyelleri belli bir dokunun farklı hücre tiplerini oluşturmakla sınırlıdır. Klasik bir örnek olarak kemik iliğindeki hematopoetik kök hücre multipotenttir ve tüm kan hücrelerine dönüşebilen bu hücre in vivo koşullarda bir nörona ya da bir pankreas hücresine dönüşmez (Şekil 3). **Oligopotent** kök hücreler ise, daha da sınırlı hücre soylarına kaynaklık ederler. Bir dokudaki belirli sayıda hücre tipini meydana getirebilirler. Yine kemik iliği örneğinden devam edecek olursak, myeloid ve lenfoid seri kan hücrelerini oluşturan hücreler oligopotent kök hücrelerdir. **Unipotent** kök hücreler isimlerine uygun bir biçimde yalnızca tek bir hücre tipinin kaynağıdırlar. İskelet kasının satelit hücreleri buna örnektir<sup>4</sup>. Günümüzde çok sayıda kök hücre tipi izole edilmiş ve çoğaltılmıştır. Zaman geçtikçe kök hücre listesine yenileri

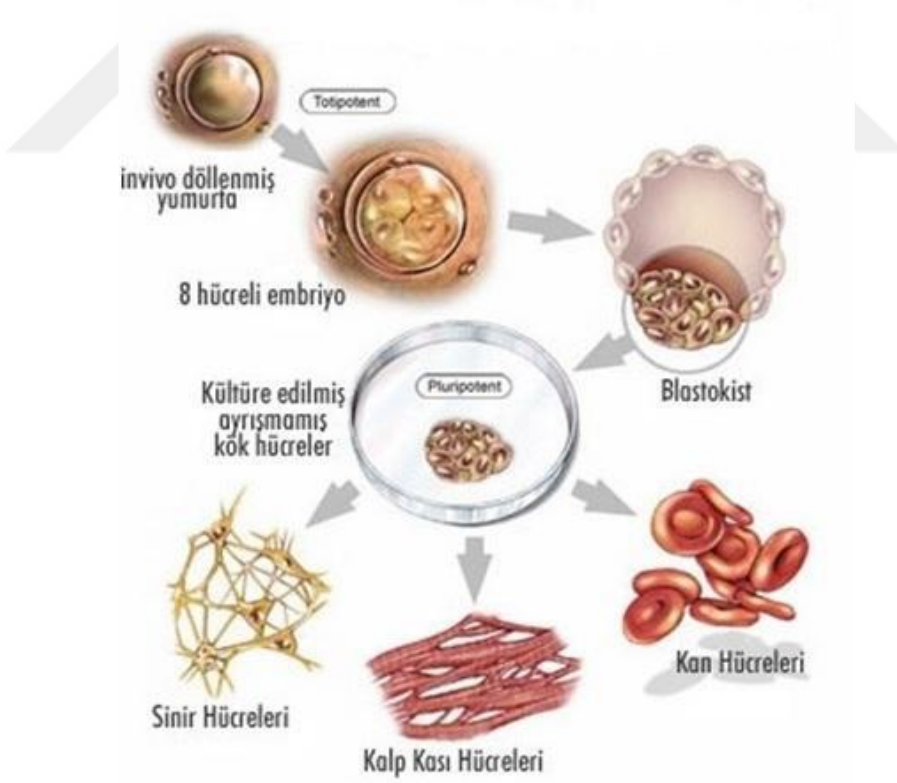
eklenmektedir. En yaygın olarak bilinen ve çalışılan kök hücre tipleri embriyonik kök hücreler, yetişkin kök hücreler, uyarılmış pluripotent kök hücrelerdir<sup>4, 17</sup>.



**Şekil 3.** Kök hücre tipleri

## Embriyonik kök hücreler

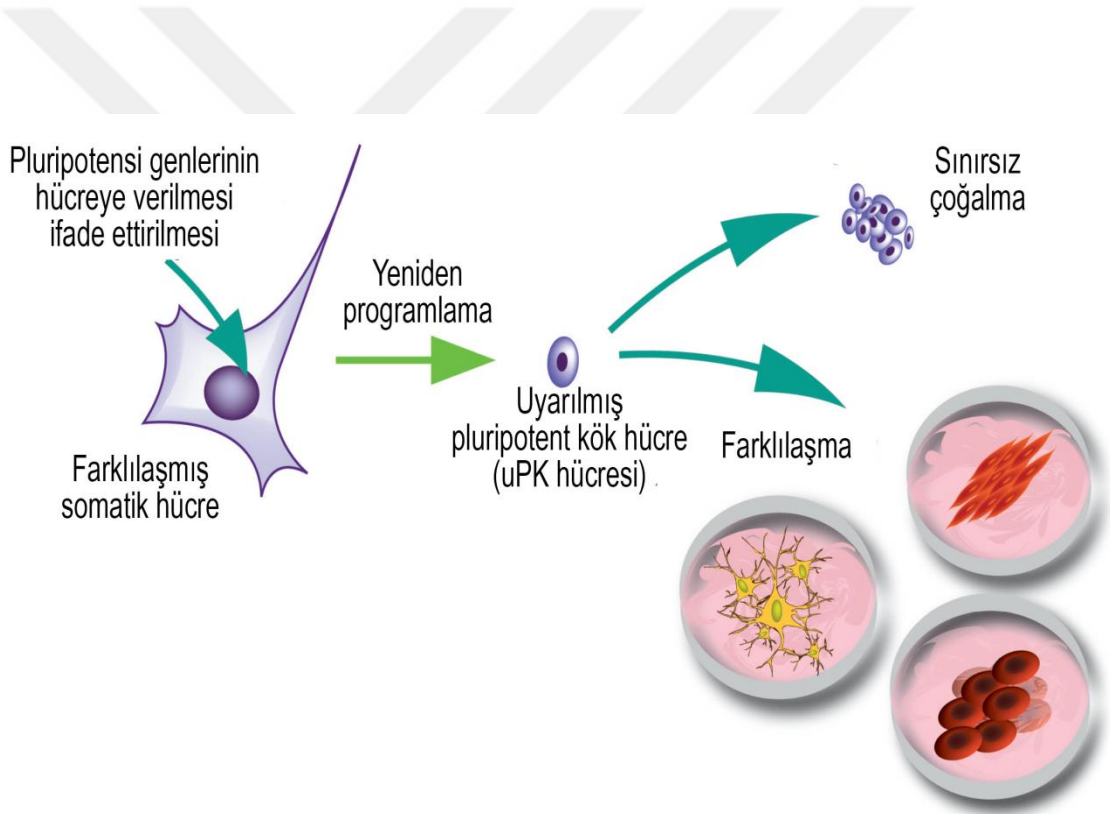
İlk bölünmelerini gerçekleştirmiş embriyonun 2-4 blastomerli aşamasından alınan hücreler totipotent embriyonik kök hücrelerdir<sup>4</sup>. Her tip hücreye ve dokuya dönüşebilirler ve dönüşümleri baskılanırsa in vitro ortamda çok sayıda üretilebilirler. Embriyonik kök hücreler, kültür ortamında kök hücre özelliğini kaybetmeden canlılığını korur ve yenilenebilirler. Bu hücreler dondurma yöntemiyle saklanabilir ve çalışmalarda tekrar tekrar kullanılabilirler. Tedavide kullanılmaları en çok ümit vadeden hücrelerdendir. Ancak sınırsız bölünme potansiyelleri olması nedeni ile kanserleşerek teratom oluşturma riskine sahiptirler. Benzer şekilde blastokistlerden, immüno cerrahi yöntemiyle izole edilen pluripotent embriyonik kök hücreler de hastalık tedavisinde yüksek kullanılma potansiyeline sahiptir. Fakat bu hücrelerinde de kanserleşme riski yüksektir(Şekil 4).



Şekil 4: Embriyonik kök hücreler

## Uyarılmış pluripotent kök hücreler

Uyarılmış pluripotent kök hücreler, diferansiye bir yetişkin hücreninin in vitro ortamda dediferansiye edilmesiyle elde edilen pluripotent hücrelerdir. Yetişkin dokularından izole edilen bir matür hücrenin, yeniden programlanarak pluripotent özellik kazanması sağlanır. Dokuya ait hücrelerin her biri, gerekli sinyal molekülleri etkileşimi sağlandıktan sonra atasına yönlendirilerek, kök hücreler elde edilebilir. Bu hücreler pek çok farklı germ yaprağına ait hücelere dönüşme potansiyeline sahiptirler. Elde edilmeleri oldukça kolay olmakla birlikte pluripotent hücelere transfeksiyon yöntemleri kullanılarak dediferansiye edilirler (Şekil 5)<sup>17, 20, 21</sup>.

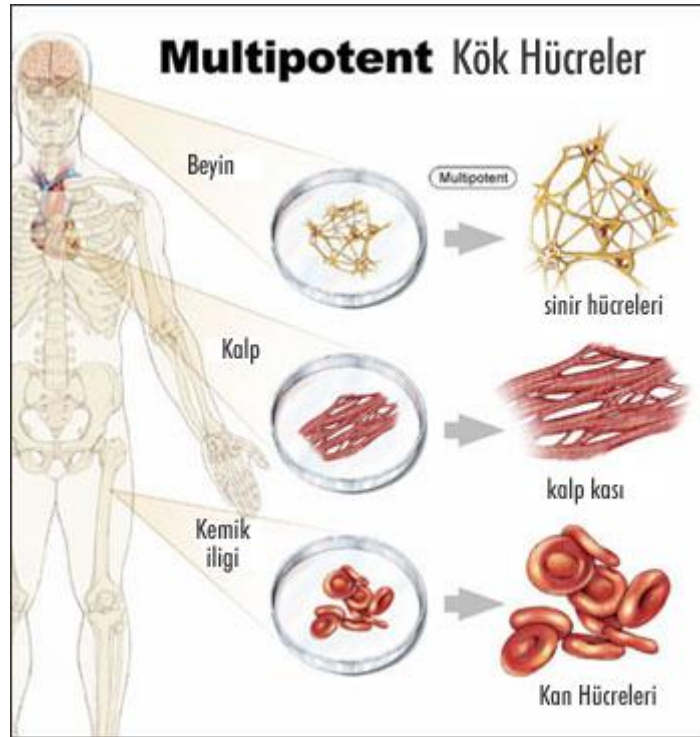


**Şekil 5:** Uyarılmış pluripotent kök hücreler

## Yetişkin kök hücreler

Yetişkin kök hücreler somatik kök hücreler olarak da isimlendirilirler. Tıpkı mezenkimal kök hücreler gibi yetişkin dokulardan köken alırlar. Genellikle buldukları dokuların onarım ve yenilenmesinde görev alırlar<sup>17</sup>. Bu hücreler multipotent olmakla birlikte elde edildikleri doku kaynağını temsil ederler. Anti enflamatuvar özellikleri ile de doku hasarı ve onarımında rol oynamaktadırlar. Fakat in vitro ortamda diferansiyasyon potansiyelleri sınırlıdır. Yetişkin hücrelerin elde edilebilirlikleri kolay ve otolog olarak kullanılmalrı, klinik uygulamalarda önemli avantaj sağlamaktadır. Yetişkin kök hücreler; kemik iliği, yağ dokusu, kıl follikülü, diş pulpası gibi birçok dokudan elde edilen kök hücrelerdir(Şekil 6)<sup>17</sup>. Temel hücre kültürü teknikleriyle çoğaltılabilir ve pek çok farklı hücre tipine dönüşebilirler.

Özellikle kemik iliği ve yağ dokusu yetişkin kök hücreler açısından zengin olup, bu hücreler salgıladıkları büyüme faktörleri ve sinyal molekülleri ile hasarlı doku bölgesinde iyileşmeye katkı sağlamaktadırlar.

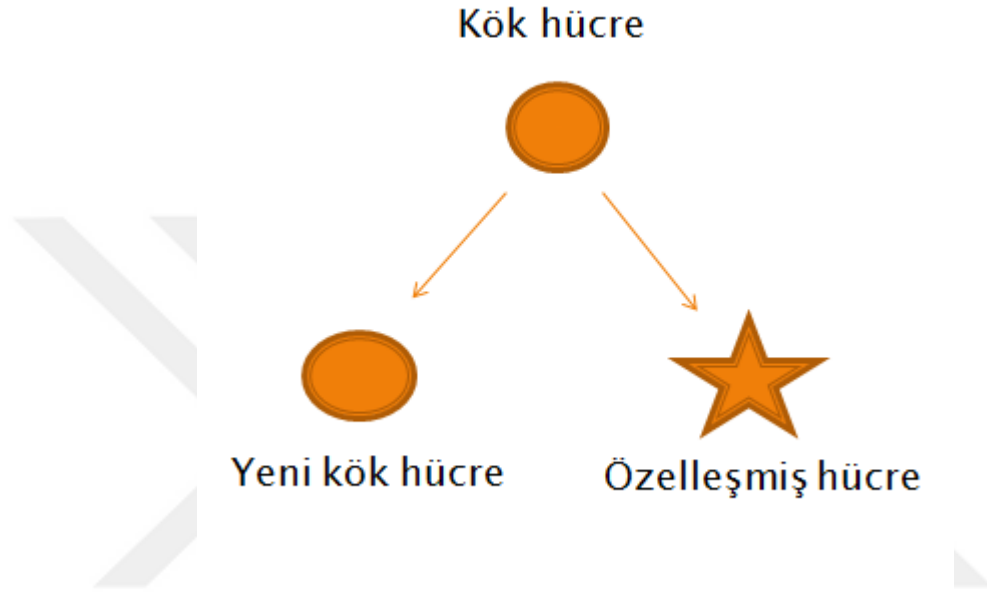


**Şekil 6:** Yetişkin kök hücre kaynağı örnekleri



## Mezenkimal kök hücreler

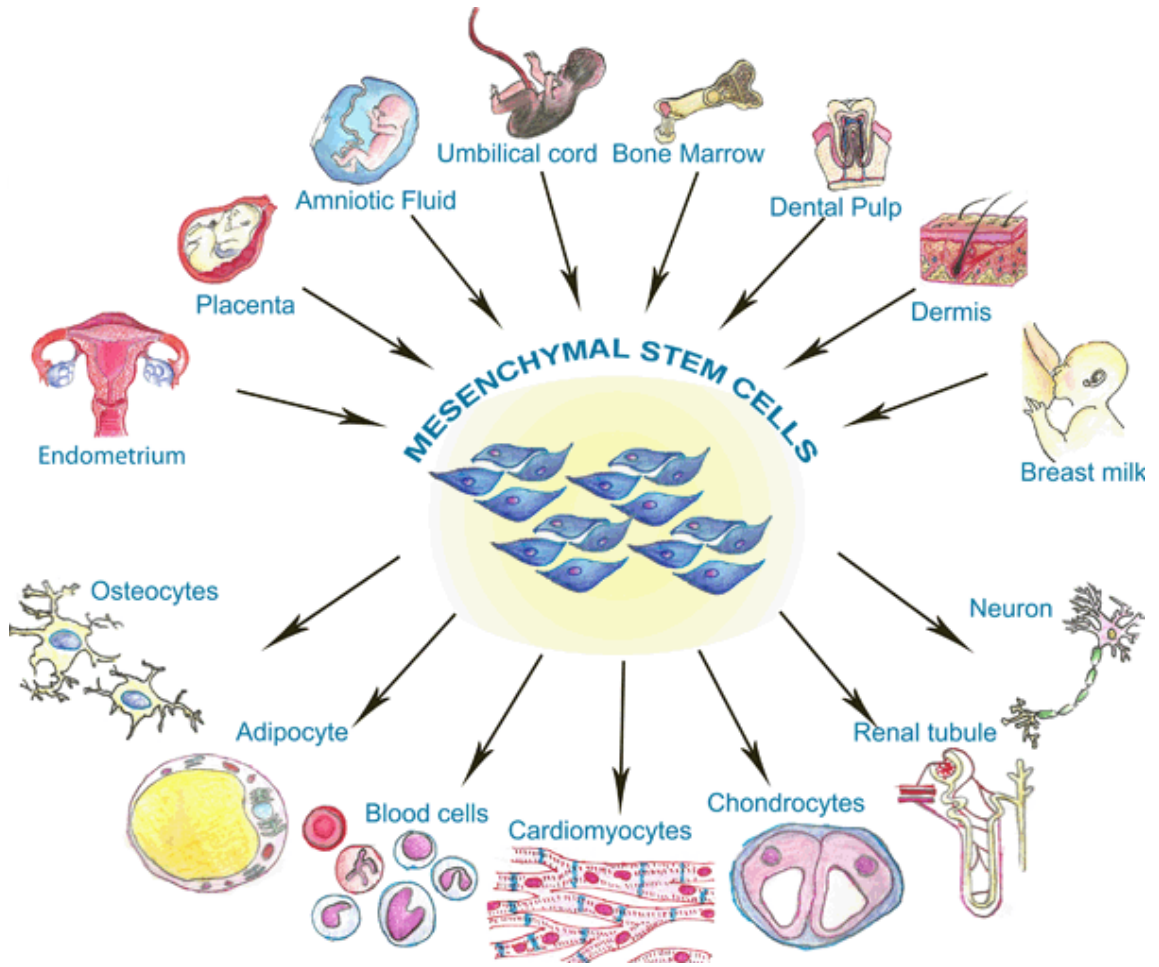
Mezenkimal kök hücreler, kendini yenileyebilen farklı tip hücrelere diferansiyasyon olabilen multipotent stromal hücreler olarak tanımlanan yetişkin kök hücre tiplerinden birisidir<sup>22</sup>. Bu hücreler, kültür ortamında asimetrik bölünme yetenekleri ile yeni kök hücreler ve özelleşmiş hücreler oluşturabilirler(Şekil 7)<sup>22</sup>.



**Şekil 7:** Kök hücrelerin asimetrik bölünme özellikleri

Mezenkimal kök hücrelerin, (MKH) kültür ortamında uzun süre kültüre edilmesi ve güvenilir olmaları nedeniyle, hücresel tedavi ve doku mühendisliği alanlarında kullanımı son yıllarda önem kazanmıştır. MKH'lerin kolay izole edilmeleri ve kültür ortamında hızlı çoğalmaları, kök hücre tedavisinde kullanımlarını değerli kılmaktadır. Vücutta yağ doku, endometrium, plasenta, amniyotik sıvı, umbilikal kord, kemik iliği, dental pulpa, dermis ve anne sütü gibi hemen hemen tüm dokulardan izole edilebilmektedir. MKH'ler yağ doku, kemik doku, kan hücreleri, kalp kası hücreleri, kırık doku, böbrek dokusu, sinir dokusu, gibi birçok dokuda bulunan hücrelere dönüşebilmektedirler(Şekil 8)<sup>22-24</sup>. Dokuda ihtiyaç halinde salgılanan sinyal molekülleri ile göç edebilme yeteneklerinin olması, hasarlı hücre ile füzyon yeteneklerinin olması ayrıca antiinflamatuvar özellikte olmaları MKH'leri değerli kılmaktadır<sup>25</sup>. Kültür ortamında plastik yüzeye yapışan ve asimetrik bölünme özellikleriyle, yeni kök

hücre ve özelleşmiş hücre üretebilen dokuda oluşan herhangi bir gereksinimde CD73, CD90 ve CD105 pozitif olan, CD34, CD45, CD14, CD19 negatif olan MKH'ler eksik olan doku hücrelerine dönüşebilme özelliklerine sahiptir. MKH'lerin belirlenmesinde yüzey antijenleri önem taşımaktadır. Belirtilen yüzey antijenlerine sahip kök hücrelerin özellikle yağ doku, kemik doku, kıkırdak dokuya dönüşebilme potansiyelleri yüksektir<sup>6</sup>.



**Şekil 8:** Mezenkimal kök hücre kaynakları ve farklılaşabildikleri dokular <sup>24</sup>

## Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Mezenkimal kök hücreler ilk kez 1976 yılında Friedenstein tarafından tanımlanmıştır. Freidenstein kemik iliğinde hematopoetik olmayan fibroblastoid yapıda hücre kolonilerinin bulunduğunu ve bu hücrelerin kemik ve yağ hücrelerine diferansiye yeteneğine sahip olduklarını göstermiştir<sup>22</sup>. Sonraki yapılan çalışmalarda bu hücrelerin hematopoetik özellikte olmayan multipotent kök hücreler olduğu, farklı tip hücrelere diferansiye olma kapasitelerinin bulunduğu gösterilmiştir.

Mezenkimal kök hücreleri belirlemek için 3 kriter vardır.

1. Plastik yüzeye tutunabilme
2. Yüzeylerinde spesifik antijenler bulundurma
3. İn vitro koşullarda kemik, kıkırdak ve yağ hücrelerine diferansiye olabilme.

MKH'lerin yüzey antijenleri ilk defa 1999 yılında Pittenger ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır<sup>25</sup>. MKH'ler çok çeşitli yüzey antijenlerini taşımakla birlikte Uluslararası Hücresel Tedavi Derneğini (ISCT) MKH'lere spesifik olarak yüzey antijenleri CD73, CD90, CD105 pozitif ve CD14, CD34, CD45, CD19 ve HLA-DR (Human Leucocyte Antigen-DR) negatif şeklinde fikir birliği sağlamıştır<sup>5</sup>. MKH'ler in vitro koşullarda başta adiposit, osteoblast, kondrosit, miyosit, hepatosit, sinir hücreleri, endotel ve epitel hücrelerine diferansiyasyon yeteneğine sahiptir<sup>5, 22</sup>. MKH'ler, yüksek kendini yenileme kapasitesi, pluripotent ve immünmodülatör özellikler sergilerler. Diğer hücreleri etkileyen önemli sinyal mekanizmaları mevcut olup, bu sinyal moleküllerinin depolandığı keseleri mevcuttur. MKH'lerin insanda kaynağını yaygın olarak kemik iliği oluşturmakla birlikte yağ dokusu, dental doku, cilt ve sünnet derisi, tükürük bezi, ekstremitte tomurcuğu menstural kan, perinatal doku gibi birçok doku yapısında bulunmaktadır. Kemik iliğinden MKH'lerin elde edilmesi ağırlı olması ve anestezi gerektirmesi nedeni ile klinik çalışmalarda kısıtlılık yaratmaktadır. Yağ doku ise MKH'lerden zengin ve vücutta yüksek orana sahip dokudur. Minimal invazyon ile kök hücrelerin elde edilmesi doku mühendisliğinde, otojenik veya allojenik kök hücre tedavisinde büyük önem arz etmektedir. Amnion, korion gibi perinatal dokular MKH'ler için kaynak oluşturur. MKH'ler birçok perinatal dokuda

bulunmasına rağmen, umbilikal kord dokusu ve umbilikal kord kanı kök hücre elde edilmesi için sık sık kullanılmaktadır. Ayrıca umbilikal kord dokusunda umbilikal kord kanına göre daha fazla MKH vardır<sup>22, 26</sup>.

### **Yağdan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücreler**

Kemik iliği gibi yağ doku da mezoderm orjinlidir. Yağ dokusu ilk olarak 2001 yılında MKH'lerin kaynağı olarak tanımlanmıştır. Kemik iliğine göre daha az minimal invazyon gerektirmesi ve daha fazla kök hücre barındırması nedeni ile yağ dokusu önem arz etmektedir. Ancak elde edilen MKH'lerin sayısını ve viabilitesini yaş, cinsiyet, BMI, lokasyon, yağ dokusu tipi, doku toplama metodu, kültür şartları etkilemektedir<sup>26</sup>. Yağ doku MKH'den zengin olup tek seferde bol miktarda hücre elde edilebilir. İzolasyonun kolay olması, yağ doku miktarının sınırlı olmaması bu doku kaynaklı hücreler için önem arz etmektedir. Bu hücreler de adipojenik, osteojenik, kondrojenik, nörojenik ve miyojenik farklılaşma yeteneğine sahiptir(Şekil 9)<sup>27</sup>. Yağdan elde edilen MKH'lerin, immün cevap oluşturma olasılığı daha düşük ve uzun dönemde kültür koşullarında daha dirençlidirler. Kök hücrelerin etkinliği ve güvenilirliği değerlendirildiğinde klinik uygulamalarda bolca kullanılmaktadır<sup>22, 27</sup>.

Uluslararası Yağ Uygulamaları Teknolojileri Topluluğu (International Fat Applied Technology Society) yağ dokusu kök hücrelerini, yağ dokudan elde edilen, plastik kültür kabının yüzeyine tutunan, seri olarak pasajlanan ve multipotent özellik gösteren hücre popülasyonu şeklinde tanımlar<sup>7</sup>.

Sağlıklı, yetişkin bir bireyin toplam vücut ağırlığının %10-15'i yağ dokusudur. Bu dokunun yaklaşık yarısı cilt altında, geri kalanı da mezenter, omentum ve iç organlar arasında yer alır. Cilt altı yağ dokusu aynı zamanda iyi bir MKH kaynağıdır ve genellikle klinik olarak bu kısım kullanılmaktadır<sup>7</sup>. Yağ dokudan elde edilen stromal vasküler fraksiyonun, kültüre edilmesi sonucunda %3 oranında mezenkimal kök hücre içerdiği anlaşılmış olup, yağ dokunun kemik iliğinden yaklaşık 2500 kat daha fazla kök hücre içerdiği gösterilmiştir<sup>22</sup>. CD146 ekspresyonu gösteren hücrelerin perivasküler MKH'lerin belirteci olduğu gösterilmiştir. Yağdan elde edilen kök hücreler fibroblastoid morfolojidedir.

Donör alanı, yaş, BMI (Body Mass Index), cinsiyet ve etnik köken önceki hastalıklara göre değişkenlik gösterebilmektedir. BMI arttıkça kök hücre ve diferansiyasyon kapasitesi azalmaktadır. Yaş ilerledikçe vücutta kök hücre sayısı azalmaktadır<sup>22</sup>.

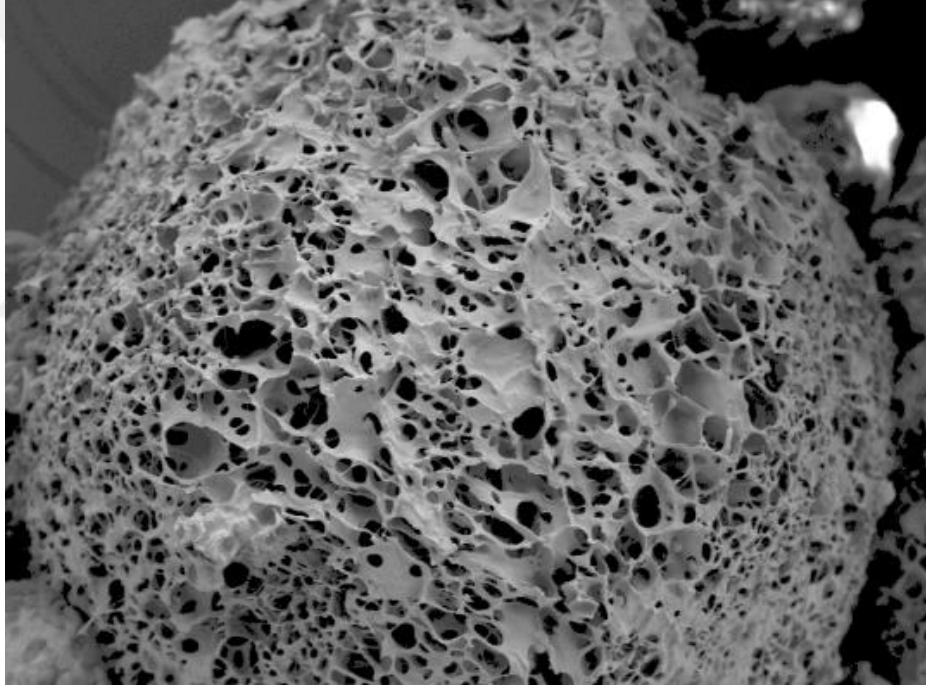
Yağ dokudan kök hücre alma tekniklerinin verimliliği kıyaslandığında, en yüksek verim sırasıyla eksizyon, Coleman tekniği, liposakşındır. Abdominal, lomber bölge, aksillanın kök hücre rezervleri açısından farklılıkları olmamakla birlikte stromal vasküler fraksiyon en fazla abdominal bölgeden elde edilebilir<sup>28</sup>. MKH'lerin viabilitesini alınma tekniği etkilemektedir. Eksizyon yöntemi ile elde edilen hücrelerin viabiliteleri en yüksektir. Sonrasında Coleman tekniği ile elde edilen hücreler takip etmektedir. Liposakşın tekniğinde ise hücre viabilitesi diğer tekniklere göre azalmaktadır<sup>29, 30</sup>. Abdominal bölgeden alınan MKH'lerin kültür ortamında ikiye katlanmaları daha kısa sürede olmaktadır. Ayrıca abdominal bölge MKH'lerin adipojenik diferansiyasyonları daha hızlı ve fazladır. Göğüs bölgesinde elde edilen MKH'lerin osteojenik diferansiyasyonları da daha hızlı ve fazladır. Proliferasyon abdominal bölgede ve göğüste aynıdır<sup>31</sup>.



**Şekil 9:** Yağdan elde edilen hücrelerin dönüşebildikleri doku örnekleri

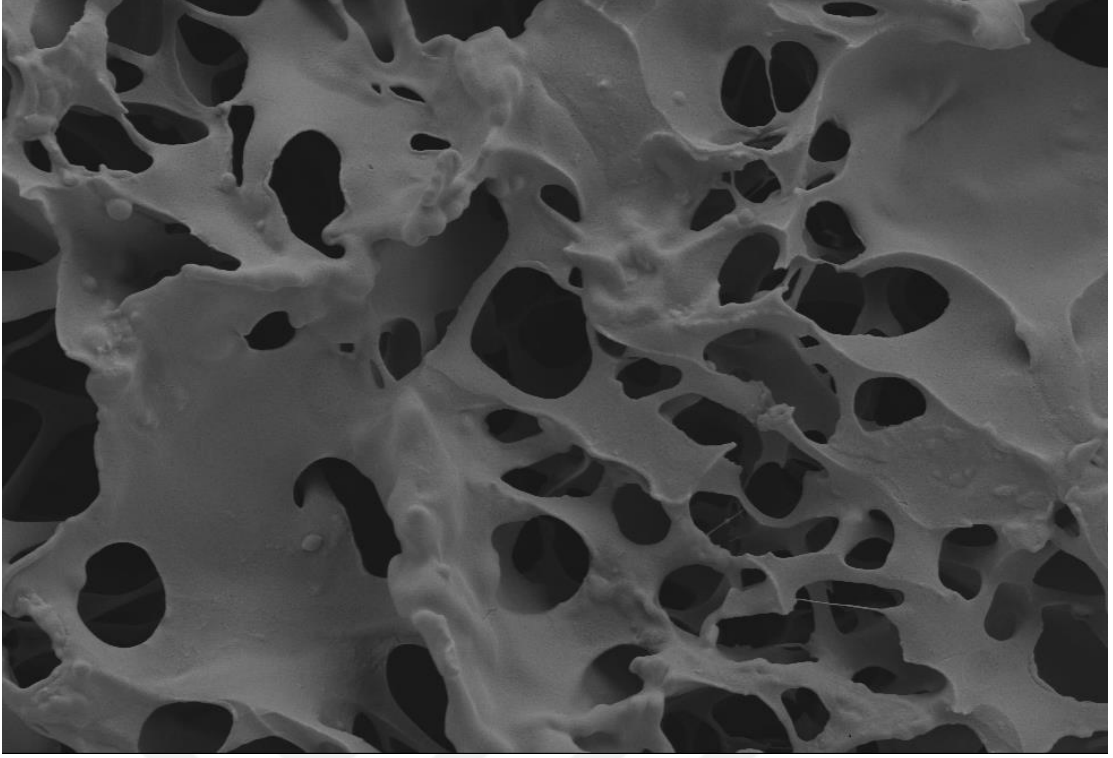
## Kitosan Kriyojel Mikroküre

Kitosan nontoksik, biyolojik uyumlu biyobozunur bir maddedir. Kitosan genellikle yengeç, karides, istakoz kabuğunun kitin kısmında bulunmaktadır. Kitosan, biyomedikal ve ilaç uygulamalarında hidrojel, ince filmler, nanofiberler, süngerler, mikropariküller, mikroküreler formlarında kullanılmıştır. Kriyojelasyon ile makroporlar arasında bağlantıların olduğu, por duvarlarının ince olduğu, kriyojel yapısında mikroküreler elde edilmiştir(Şekil 10). Bu bağlantılar, hücrelerin sinyal molekülleri ile etki etmelerini ve birbirleriyle iletişim kurmalarını sağlayacaktır. Dolayısıyla doku mühendisliğinde bu kriyojel yapısı dikkat çekmektedir<sup>15</sup>.



**Şekil 10:** Kitosan kriyojel mikroküre

Kriyojel yapısının elde edilmesi sırasında oluşan çapraz bağlar sonrasında enjekte edilebilen kitosan kriyojel mikroküre (EEKM) doku iskelesi oluşturulmuştur. Minimal invazyon ile dokuya zerk edilmesi, bu doku iskelesini değerli kılmaktadır. Mikroküreler üzerindeki porlar arasında tıpkı bir karınca yuvasını andıran bağlantılar vardır(Şekil 11). Ayrıca EEKM'ler fiziksel, kimyasal ve morfolojik özellikleri ile iyi bir doku iskelesidir<sup>15</sup>.



**Şekil 11:** Birbirleriyle bağlantılı makroporlar

Mikroküreler dağılma ortamı içinde emülsiyon faz oluşturma ve kriyojelasyon sürecinde çapraz bağlanma tekniklerinin bir arada kullanılması ile üretilmiştir. Polimer olarak kitosanın %2'lik (w/v(Hacimde Ağırlıkça Yüzde)) çözeltisi %6'lık sulu asetik asit çözeltisi (v/v(Hacimce Yüzde)) kullanılarak hazırlanmıştır. Homojen haldeki bu çözeltiden 2 mL(mili litre) şırıngaya alınarak; mekanik karıştırıcıda karıştırılarak oluşturulan dağılma ortamına (37.5 mL petrol eteri, 10 mL ayçiçeği yağı ve 2.5 mL Span 80) oda sıcaklığında şırınga pompası yardımıyla damla damla ilave edilmiştir. Ekleme işlemi bittikten sonra karışıma 1 mL %3'lük (v/v) gluteraldehit çözeltisi hızlıca ilave edilip; kriyojelasyonun gerçekleşmesi için 2 saat -16 °C'de kriyostatta bekletilmiştir. Dağılma ortamında donmuş olan örnekler, daha sonra 24 saat süreyle yine -16 °C sıcaklıkta dondurucuda bekletilmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra örnekler oda sıcaklığında erimeye bırakılmıştır. Eriyen örnekler sırasıyla; petrol eteri, etanol ve distile suyla yıkanarak reaksiyona girmemiş monomerlerin, çapraz bağlayıcı ve dağılma ortamını oluşturan emülsiyonlaştırıcıların tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkanan mikroküre formundaki kriyojeller filtre kağıdından süzölmüş ve liyofilizatörde kurutulmuştur<sup>15</sup>.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız, Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 09/10/2017 tarihli 22 numaralı kararı sonucu etik kurul onayı alınarak, Bilimsel Araştırma Projeleri birimi desteği ile yapılmıştır(Şekil 12).

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
09/10/2017	08	22

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü Plastik, Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Şakir ÜNAL'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan "Yağdan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Diferansiyasyonu ve Proliferasyonu Üzerine Kitosan Doku İskelesinin Etkisinin Araştırılması" adlı araştırma için hazırlanmış olan ve 06/10/2017 tarihinde sunulan Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ile ilgili belgeler ve araştırmada deney hayvanları üzerinde yapılacak tüm işlemler gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın yürürlükte olan ilgili yasal düzenlemelere uyularak yürütülmesi ve sonuçlandırılması koşulu ile gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Başkan  
Prof. Dr. Şakir ÜNAL

(Katılmadı)  
Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ  
Üye

Doç. Dr. Gülhan TEMEL  
Üye

Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN  
Üye

Prof. Dr. Yusuf AMLICA  
Üye

Yrd. Doç. Dr. Leyla ŞAHİN  
Üye

Dr. Vet. Hek. Tamer YENER  
Üye

(Katılmadı)  
Uzm. Vet. Hek. Cem FIRAT  
Üye

Avukat Lale DAĞLI  
Üye

**Şekil 12:** Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 09/10/2017 tarihli 22 numaralı kararı

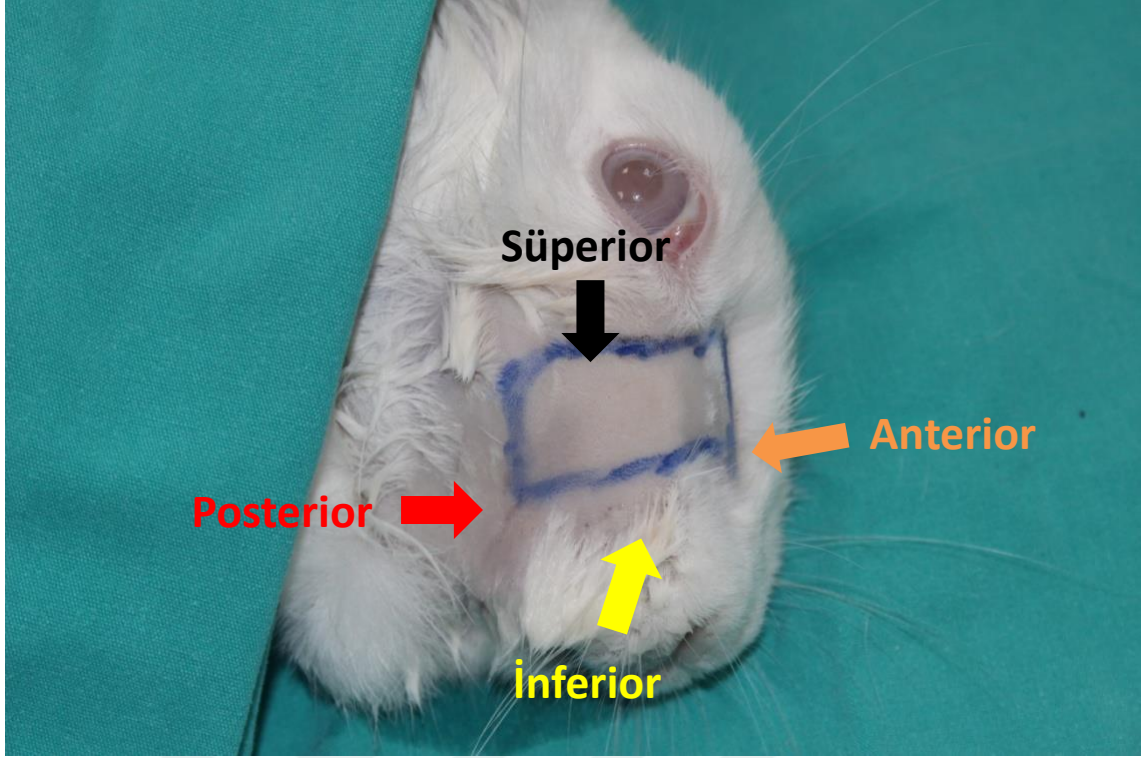






Çalışmamızda doku iskelesi üzerine tutunan MKH'lerin etkinliğini araştırmak amacıyla 3 grup oluşturuldu. Grup 1'e sadece kitosan, Grup 2 'ye sadece kök hücre, Grup 3'e kitosan+kök hücre uygulandı. Gruplarda altışarlı olmak üzere toplamda 18 adet Yeni Zelanda cinsi; genç, erişkin, dişi tavşan kullanıldı(Tablo 1).

**Tablo 1: Çalışma Grupları**

	n	
<b>Grup 1</b>	6	Sadece Kitosan
<b>Grup 2</b>	6	Sadece Kök Hücre
<b>Grup 3</b>	6	Kitosan+Kök Hücre

Tavşanların sağ malar bölgeleri deney grubu, sol malar bölgeleri kontrol grubu olarak değerlendirildi. Tavşanların kulak heliksinde bulunan vene, katater yardımı ile damar yolu açıldı. Xylazine 35 mg/kg (miligram/kilogram) ketamin 5 mg/kg dozunda anestezi protokolü uygulandı. Sağ malar bölgede anatomik sınırlarını; posteriorda masseter kasının anterior sınırı, süperiorda infraorbital rim, anteriorda lateral nazal duvar, inferiorda oral kommissürün oluşturduğu alanın ortasına uygulama yapıldı(Şekil 13). Anatomik sınırları belirlenen alanı, cilt ile periost arasında sadece yağ doku bulundurması değerli kılmaktadır. Çünkü kök hücrelerin verildikleri doku kompartımanları içerisinde çoğu göç etmektedir. Çevre dokulardan ya da hasarlanmış dokulardan gelen sinyal molekülleri, hücrelerin farklı doku kompartımanlarına geçmesine neden olmaktadır. Çalışmamızda ise, kök hücrelerin in vitro ortamda doku iskelesi üzerine tutunmalarını sağlayarak, in vivo ortama taşımayı ve hedeflenen doku kompartımanında bu hücrelerin kalabilmelerini, doku yapısındaki hücrelere diferansiye olabilmeleri ve hedeflenen dokuda proliferere olabilmelerini amaçladık. Bundan yola çıkarak deneğin bu bölgesinde doku kompartımanlarının az olması, bu alanı çalışmamızda uygulama alanı olarak tercih etmemizi sağlamıştır.



-  Posteriorunu masseter kasının anterior sınırı
-  Süperiorunu infraorbital rim
-  Anteriorunu lateral nazal duvar
-  İnfieriorunu oral kommüssür

**Şekil 13:** Tavşanların sağ malar bölgelerinde uygulama yapılan alanın anatomik sınırları

## Grup 1

Sadece kitosan kriyojel mikroküre uygulanan grup. 20 mg kitosan kriyojel mikroküre 1.5 cc serum fizyolojik ile süspansiyon edildi. Elde edilen süspansiyon 5 cc'lik enjektörlere alındı(Şekil 14). Tavşanlara daha önce belirlenen anestezi protokolü uygulandı. Sedatize edilen tavşanların pembe iğne ucu ile nazal dorsum orta hatta hatta 90 derece açı ile subkutan periost üzerindeki plana girildikten sonra zemine paralel sağ malar bölgede anatomik sınırları belirlenen alanın ortasına bu planda ulaşıldı(Şekil 15).

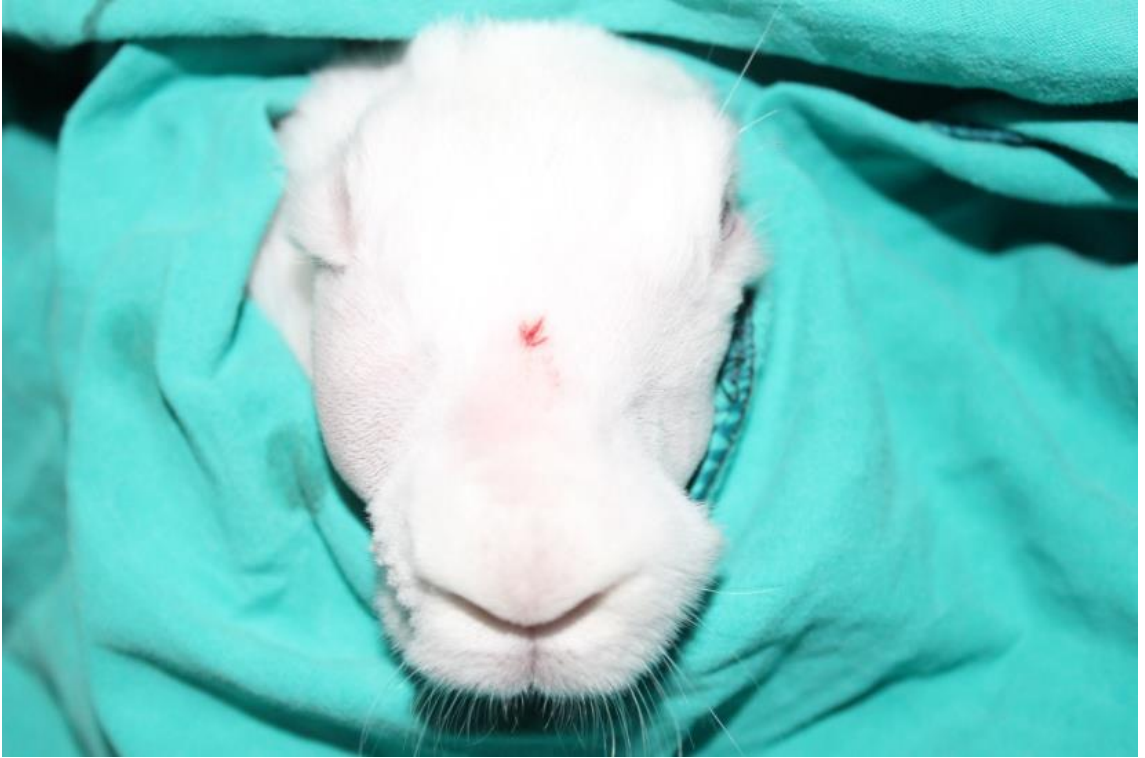


**Şekil 14:** Kitosan kriyojel süspansiyonu

Sonrasında elde edilen kitosan kriyojel mikroküre süspansiyonu hedeflenen plana, pembe iğne ucu ile 5 cc'lik enjektör içerisinde minimal invazyon yaratılarak enjekte edildi. Enjeksiyon sonrasında sağ malar bölgede, sol malar bölgeye göre dokuda ekspansiyon görüldü(Şekil 16).



**Şekil 15:** Sadece kitosan uygulanan grupta enjeksiyon



**Şekil 16:** Enjeksiyon sonrasında sağ malar bölgede oluşan doku genişlemesi



## Grup 2

Sadece kök hücre uygulanan grup. Tavşanlar xylazine ketamin anestezi protokolü ile sedatize edildi. Sağ inguinal bölgeleri tıraşlandı. Sonrasında batikonla uygun saha temizliği yapıldı. Sağ inguinal bölgeye yapılan 3 cm'lik (santimetre) cilt insizyonu ile yağ dokuya ulaşıldı(Şekil 17).

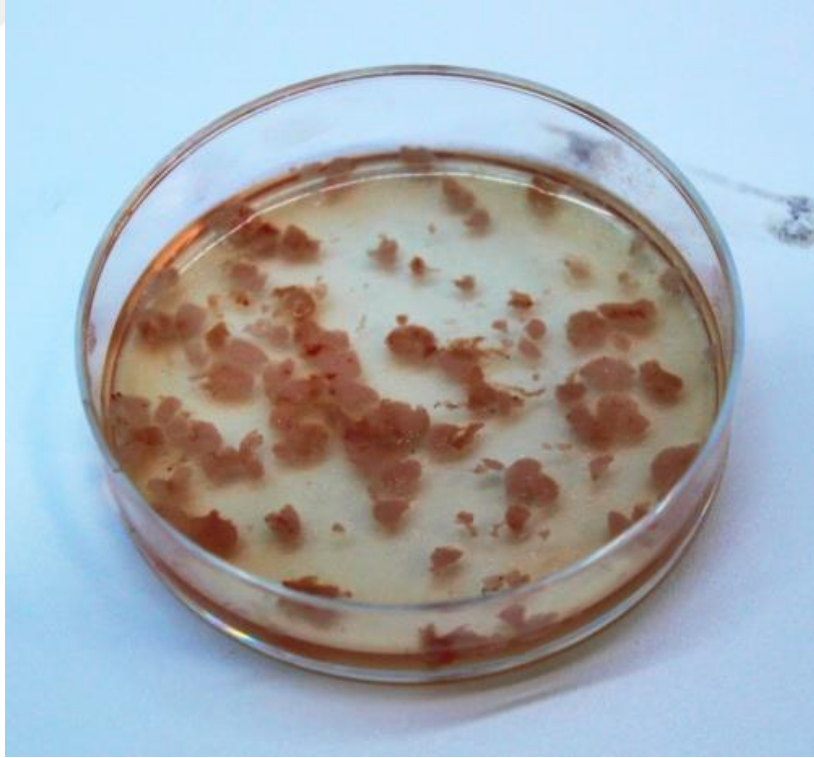


**Şekil 17:** Tavşanların sağ inguinal bölgesine yapılan insizyon

Keskin ve künt diseksiyon ile 1-2 cm<sup>3</sup> yağ dokusu eksize edildi(Şekil 18). Kanama kontrolü sonrasında inguinalde bulunan insizyon hattı cilt altı, cilt onarımı yapılarak kapatıldı. Denekler karanlık bir ortamda ayılmaya bırakıldı. Elde edilen yağ greftleri enzimatik sindirim için fazla büyük olmalarından dolayı, 1-2 mm<sup>3</sup>lük parçalar halinde kesilerek küçültüldü(Şekil 19). Küçültülen yağ dokularında tip 1 kollajenaz enzimi ile enzimatik parçalanma sonrasında mezenkimal kök hücreler izole edildi. Elde edilen mezenkimal kök hücreler kültür ortamına ekildi(Şekil 20).



**Şekil 18:**Eksize edilmek üzere diseke edilen yağ dokusu



**Şekil 19:** Enzimatik sindirimin etkinliğini arttırmak için küçültülmüş yağ dokusu.



**Şekil 20:** Elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kültürü

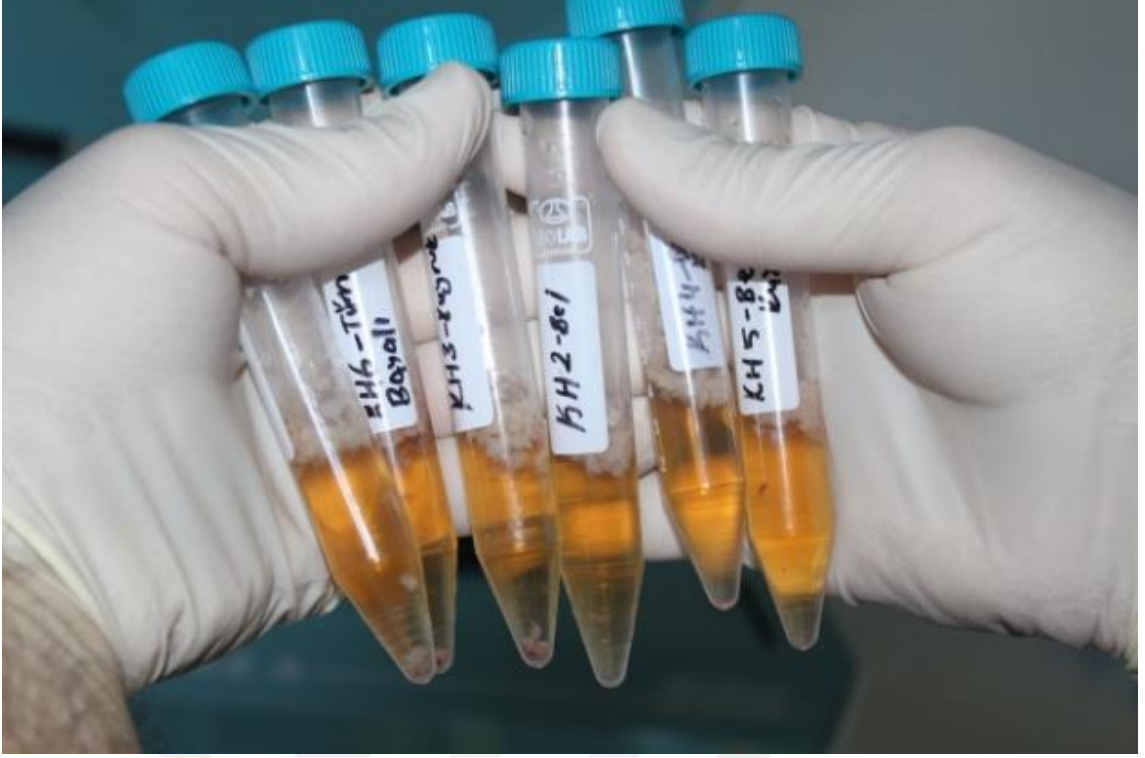
Kök hücreleri in vivo ortamda görüntüleyebilmek için in vitro işaretleme yapılması amacıyla kültür ortamına 10 mM BrdU eklendi. Timidin analogu olan BrdU, mitoz bölünme esnasında hücre içine alınarak DNA'ya (Deoksiribo Nükleik asit) entegre olmaktadır. Aldıkları BrdU'yu uzun süre tutan hücrelerin in vivo ortamda anti-BrdU antikoruyla boyanması sonucu da donör hücreler görüntülenebilmektedir. Buna ek olarak kök hücreler, in vitro ortamda lipofilik ve floresan özellikli ticari bir kit olan ve sitoplazmayı boyayan PKH26 ile de işaretlendi. Böylece hücrelerin in vivo takibinin yapılması hedeflendi. Bu amaçla, her 3-4 günde bir Thoma lamı ile hücre sayımı yapıldı(Şekil 21)ve hücre sayısının 2 milyona ulaştığı görüldü ve tüp içerisinde üretici firmanın önerisine göre işaretlemeler gerçekleştirildi. Tüm işaretleme işlemlerinin sonrasında hücreler 1.5 cc serum fizyolojik ile süspansiyon edildi(Şekil 22).



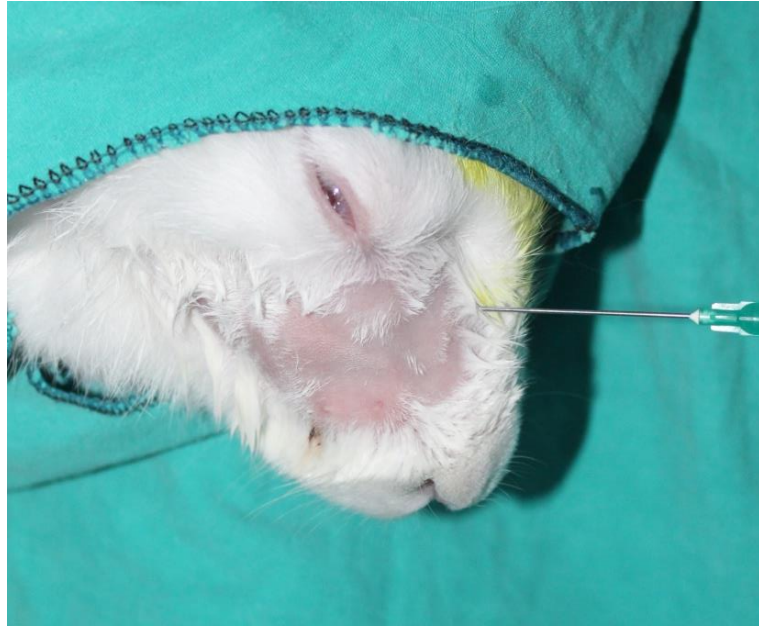
**Şekil 21:** Thoma lamı ile hücre sayımı

Elde edilen süspansiyon enjektör ucu ile nazal dorsum orta hattın 90 derece cilt altı periost üzerine girilerek sağ malar bölgede anatomik sınırları belirlenen alanın ortasına enjekte edildi(Şekil 23).





**Şekil 22:** MKH'lerin falcon tüpü içerisinde görünümü



**Şekil 23:** Nazal dorsumdan minimal invazyon ile belirlenen plana ulaşması

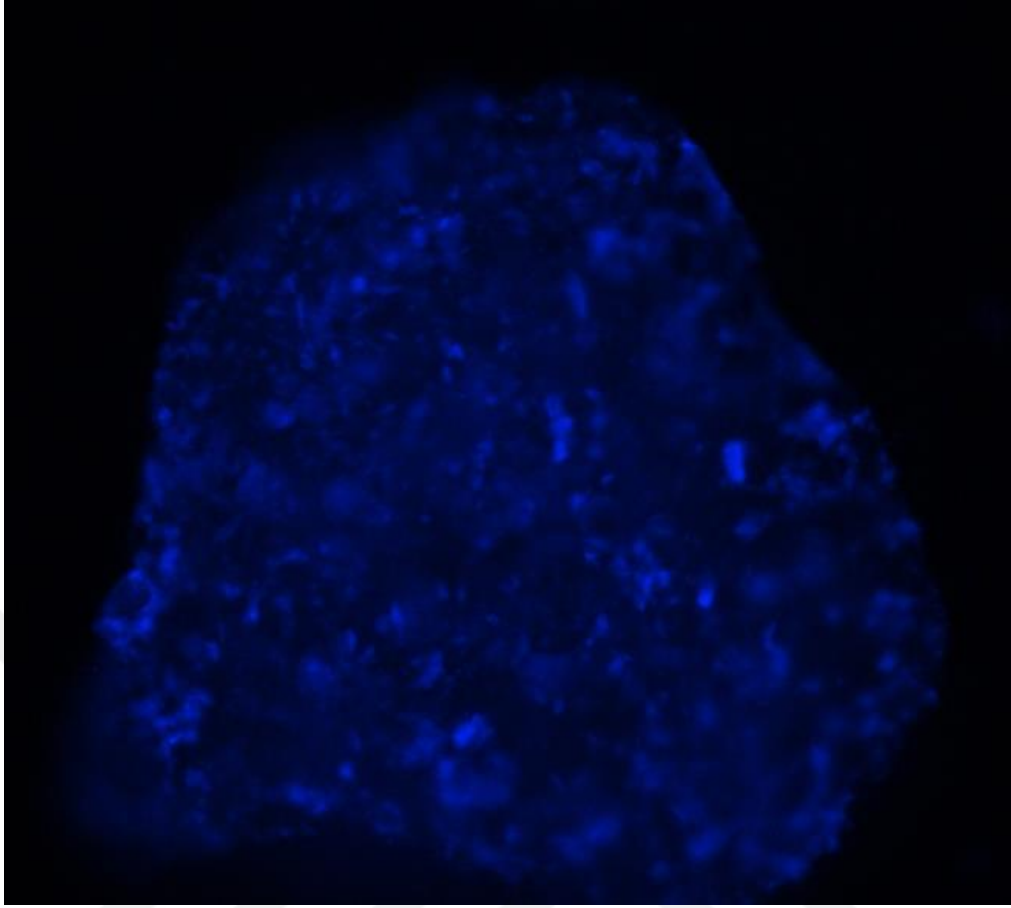
### Grup 3

Kitosan + kök hücre uygulanan grup. Aynı protokolle kök hücreler elde edildi. Kök hücrelerin doku iskelesi kitosan kriyojel mikroküre üzerine tutunmalarını sağlamak için falkon tüpü içerisinde karıştırıldı. Tutunmanın sağlanması için bu karışım, üç gün falkon tüpü içerisinde bekletildi (Şekil 24).



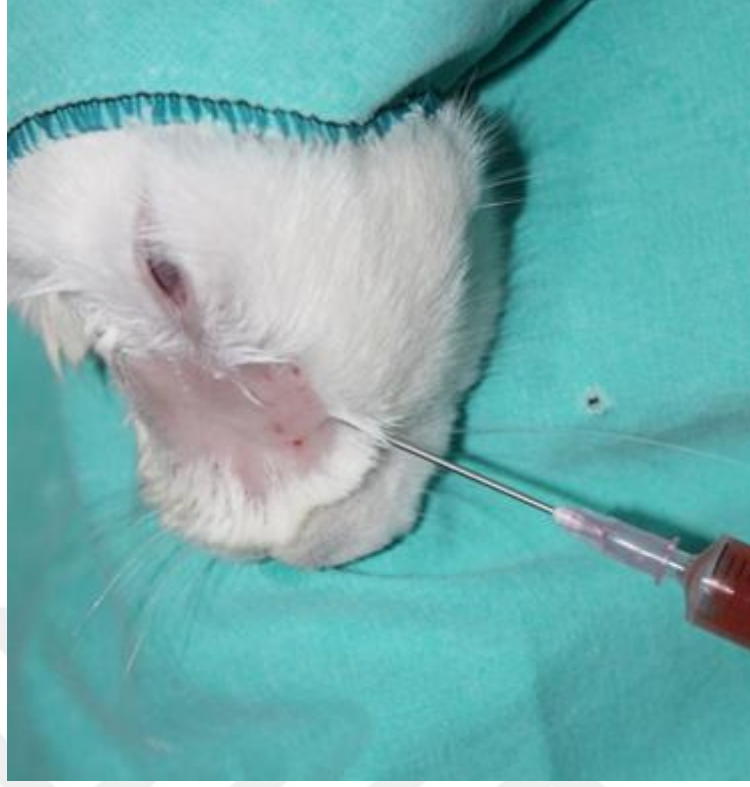
**Şekil 24:** Doku iskelesi kitosan kriyojel mikroküre üzerine kök hücrelerin tutunması için falkon tüpünde birleştirilmesi

Doku iskelesi olan kitosan kriyojel mikroküre üzerine tutunan kök hücreler 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) boyaması ile floresan mikroskop altında gösterildi (Şekil 25). Mikroküre üzerinde hücrelerin dağınık halde ve makroporlar içerisinde yerleşmiş olduğu görüldü. Ancak mikroküre iç kısımlarında tutunan hücreler bu boyama yöntemi ile tespit edilemedi. DAPI boyaması ile mikroküre yüzeyine tutunan hücreler tespit edildi.



**Şekil 25:** DAPI boyaması ile mikroküre yüzeyine tutunan MKH'lerin gösterimi

Elde edilen kök hücre, kitosan kriyojel mikroküre süspansiyonu ejektörlere aktarıldı. Pembe iğne ucu ile nazal dorsum orta hattın 90 derece açılı ile cilt altı periost üzeri plana ulaşıldı, sonrasında sağ malar bölgede anatomik sınırları belirlenen alana, iğne ucu maksillaya paralel olacak şekilde aynı plandan ilerletildi(Şekil 26). Belirlenen alanın orta hattına ulaşıldıktan sonra süspansiyon enjekte edildi. Bütün gruplar normal kafes ortamında 3 hafta takip edildi.



**Şekil 26:** Doku iskelesi kök hücre çözeltisi pembe iğne ucu yardımı ile nazal dorsumdan belirlenen plana ulaşarak minimal invazyon ile süspansiyonun enjeksiyonu

## TOMOGRAFİK GÖRÜNTÜLEME

Deneklerin 21. günde xylazine, ketamin anestezi protokolü altında sedatize edilerek, tomografik görüntüleme yardımı ile kesitleri alındı. Denek pozisyonu, posterior anterior şeklinde planlandı. Bu kesitlerin birleştirilmesi ile 3 boyutlu tomografik görüntüler elde edildi(Şekil 27).



**Şekil 27:** Deneklerden tomografi görüntüleme yardımı ile kesit alınması

Sonrasında aynı anestezi protokolünde tavşanların sağ malar bölgelerinde, anatomik sınırları belirlenen alan periost üzerinden cilt dahil tam kat eksize edildi(Şekil 28).

Tavşanların, inguinalde bulunan eski insizyon skarından girilerek abdominal aortaya ulaşıldı ve kanama yapılarak tavşanlar sakrifiye edildiler.

Sağ malar bölgeden eksize edilen doku parçaları histopatolojik olarak değerlendirilmek üzere formol içerisine koyularak histoloji departmanına ulaştırıldı(Şekil 29).





**Şekil 28:** Sağ malar bölgede eksizyonu plananan alan



**Şekil 29:** Sağ malar bölgede eksizyonu plananan alan, eksizyon yapılan doku

## İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

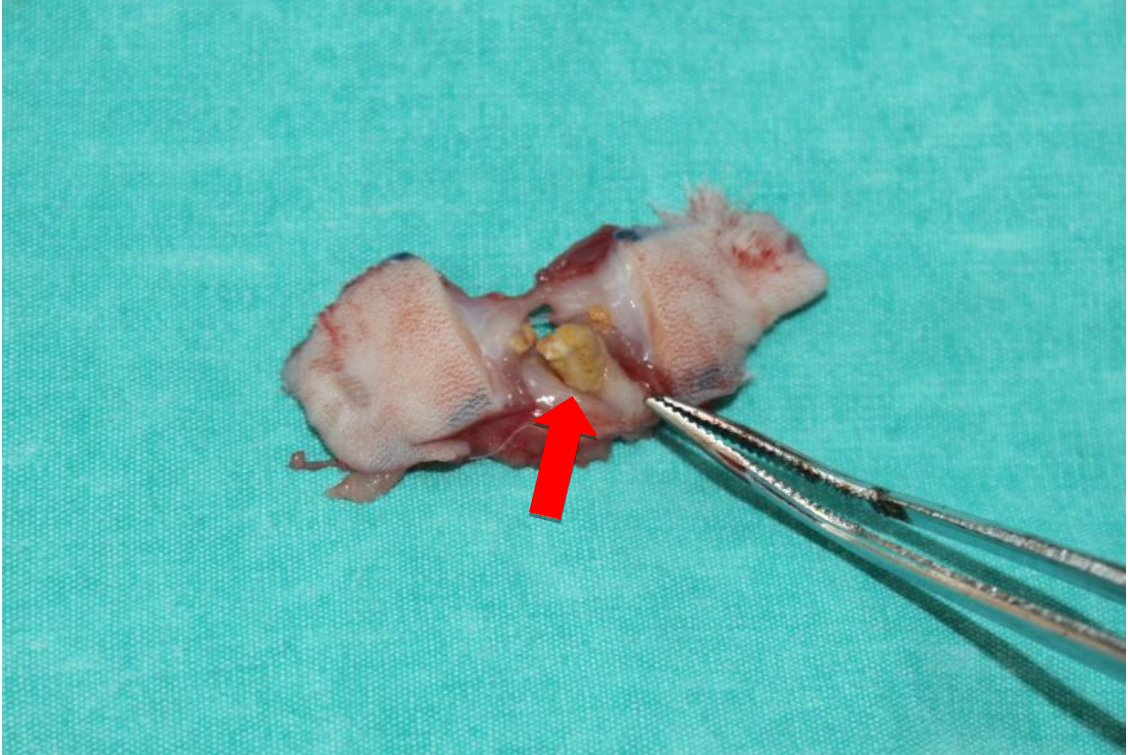
Verilerin istatistiksel analizi STATISTICA Version 13.3 programı ile yapılmıştır. Sürekli değişken hacim ölçümleri ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri ile özetlenmiştir.

Normal dağılım kontrolü için Shapiro Wilk testi, grupların varyanslarının homojenlik kontrolü için Levene istatistiği kullanılmıştır.

Normal dağılıma uygunluk gösteren ve grup varyansları homojenlik gösteren hacim ölçümleri için ikiden fazla bağımsız grup ortalamalarını karşılaştırmak amacıyla parametrik testlerden olan Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) yöntemi kullanılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda farklılık çıkan grupları tespit etmek için çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni LSD testi kullanılmıştır. Tüm karşılaştırmalar için istatistik önem düzeyi ( $p$ )  $<0,05$  olarak alınmıştır.

## BULGULAR

Tavşanların, kafes ortamında takip süreçlerinde kayıp yaşanmadı. İki tavşanın, sağ inguinal bölgelerinde dehisens gelişti, bir tavşanda ise hematom oldu. Hematom boşaltıldı ve oluşan dehisensler lidokain lokal anestezisi yardımıyla uygun saha temizliği ve örtünmeyi takiben tekrar 3/0 monocril ile onarım yapıldı. Sağ malar bölgeden elde edilen doku kitlesi içerisinde yaklaşık 1x1 cm'lik cilt altı yerleşimli çevresi düzenli lezyon palpe edildi. Bu lezyon üzerinde yapılan insizyon sonrasında içerisinde kitosan kriyojel mikroküre yapıları makroskopik olarak izlendi(Şekil 30).

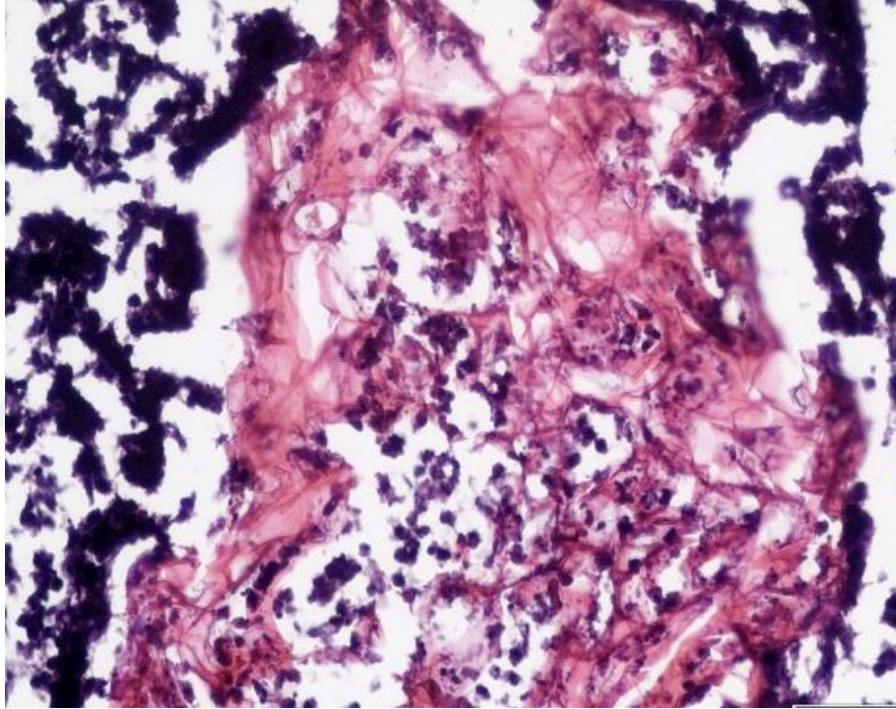


**Şekil 30:** Eksize edilen doku içerisinde makroskopik olarak gözlenen kitosan kriyojel mikroküreler(ok)



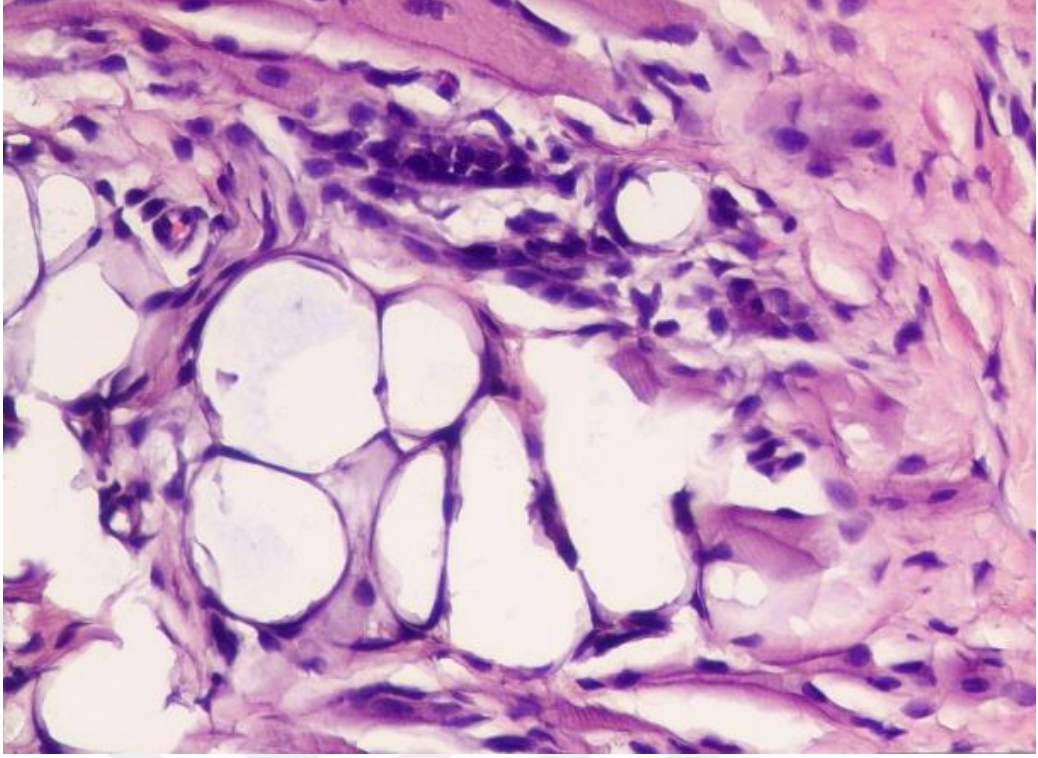
## Hematoksilen- Eozin Boyaması

Elde edilen histolojik kesitlerin hematoksilen-eozin boyaması sonrası değerlendirilmesinde, kitosanın dokuda hasara yol açmadığı gözlemlendi. Grup 1 ve 3 dokuda bulunan hücrelerin hücre bütünlüğünün intakt olduğu izlendi. Yer yer doku kesitleri içerisinde bir kısmında bozulmanın başladığı kitosan kriyojel mikroküre doku iskelelerine rastlandı. Grup 1'de kitosan kriyojel mikroküre etrafında yabancı kapsül oluşumları izlenmekte birlikte, kitosan kriyojel mikrokürenin iç kısımlarına ulaşan yaygın nötrofil infiltrasyonu izlendi(Şekil 31).

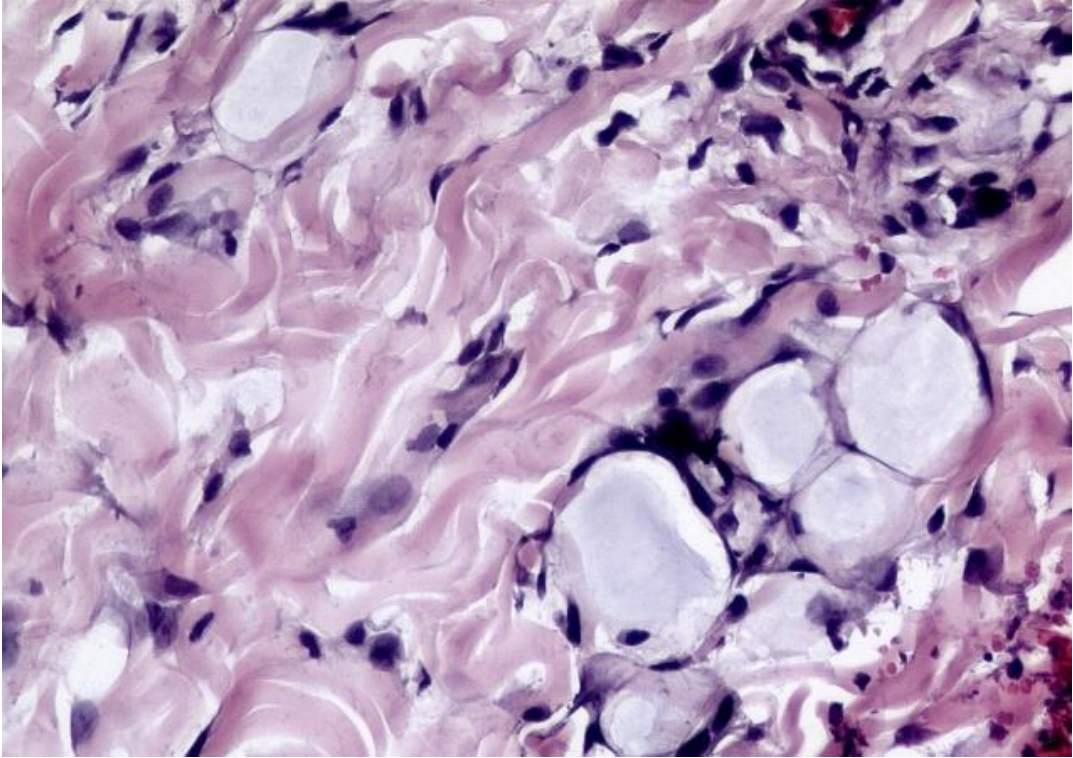


**Şekil 31:** Grup 1'in hematoksilen eozin boyaması

Grup 2'de kesitlerde normal doku paterni izlendi, doku içerisinde lipoblastlar mevcut olup, yer yer dağınık halde nötrofiller bulunmaktaydı. Ayrıca hücreler arasında ekstrasellüler matriks oluşumları mevcuttu(Şekil 32). Grup 3kesitlerinde, tıpkı grup 1'de olduğu gibi, kitosan kriyojel mikroküre etrafında yabancı kapsül oluşumu olmakla birlikte, mikroküre iç yapılarına ulaşan yaygın bir nötrofil infiltrasyonu ile inflamatuvar reaksiyonun olduğu görüldü. Hatta kitosan kriyojel doku iskelesinin yer yer sindirime uğradığı tespit edildi. (Şekil 33)



**Şekil 32:** Grup 2'nin hematoksilen eozin boyaması



**Şekil 33:** Grup 3'ün hematoksilen eozin boyaması

## BrdU Boyaması ile Mikroskopik Değerlendirme

Daha önce kültür ortamında BrdU ile işaretlenen hücrelerin tespiti için anti-BrdU primer antikoru kullanılarak immünohistokimyasal işaretleme yapıldı. Hücreleri görünür hale getirmek için de kromojen olarak diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Kesitlerde DAB + olan hücreler kahverengi olarak izlendi.

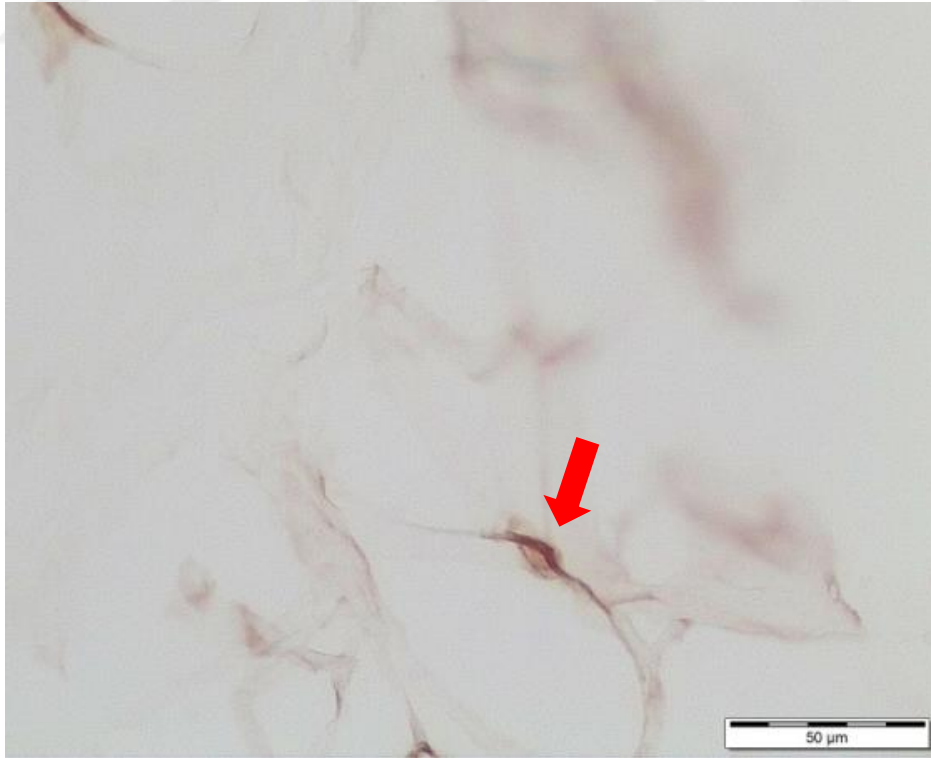
Sadece kök hücre uygulanan grup 2'ye ait kesitlerde DAB+ hücreler tespit edildi(Şekil 34). Yani verdiğimiz kök hücrelerin, 21 gün sonra canlı oldukları ve hücre zarlarının intakt olduğu görüldü. Ancak hücre sayısının verileden az olduğu gözlemlendi. Hücreler, ya nekroze oldu ya da dokular arası kompartımanlara geçtiler. Bazı hücrelerde çekirdeğin sitoplazma içerisindeki yağ damlacığı nedeniyle kenara itilmiş olduğu tespit edildi. Morfolojik olarak bu hücrelerin adipositlere diferansiye olduğu kabul edildi(Şekil 35).21 günlük süre içerisinde, deneklerde oluşan kilo alımının bu hücrelerin adipositlere dönüşümünü tetiklediği düşünüldü.

Kitosan+ Kök hücre uygulanan grup 3'e ait histolojik kesitlerde DAB+ hücreler tespit edildi(Şekil 36). Doku iskelesi hücreleri in vitro ortamdan in vivo ortama taşımıştır. Bu hücreler 21 günün sonunda dokuda canlı hücre zarları intakt olarak görülmüştür. Hücre sayısının grup 2'ye göre biraz daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ancak kantitatif bir ölçüm yapılmamıştır. Yine aynı şekilde yer yer sitoplazması yağ ile dolu çekirdeği kenara itilmiş morfolojik olarak adipositlere diferansiye olan hücreler tespit edildi(Şekil 37). Doku iskelesi üzerinde taşınan bu hücrelerin yine aynı şekilde tavşanlardaki kilo artımının adipositlere dönüşümünü tetiklediği düşünülmüştür.

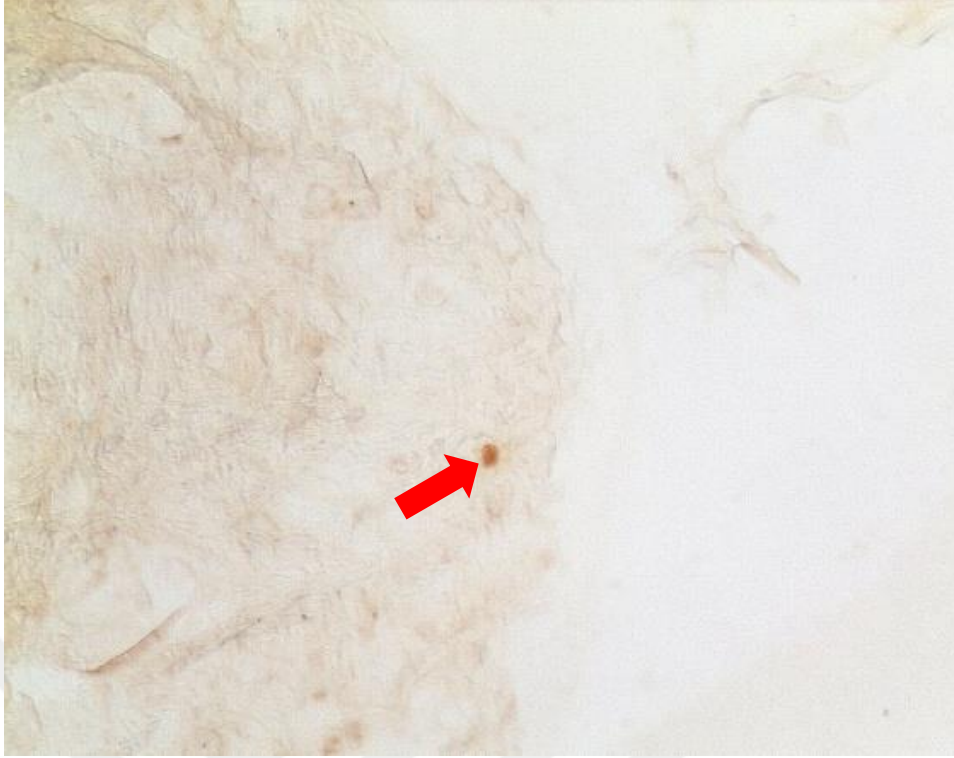




**Şekil 34:**Grup 2'nin BrdU ile işaretlenen hücre



**Şekil 35:** Morfolojik olarak adiposite dönüşen hücre



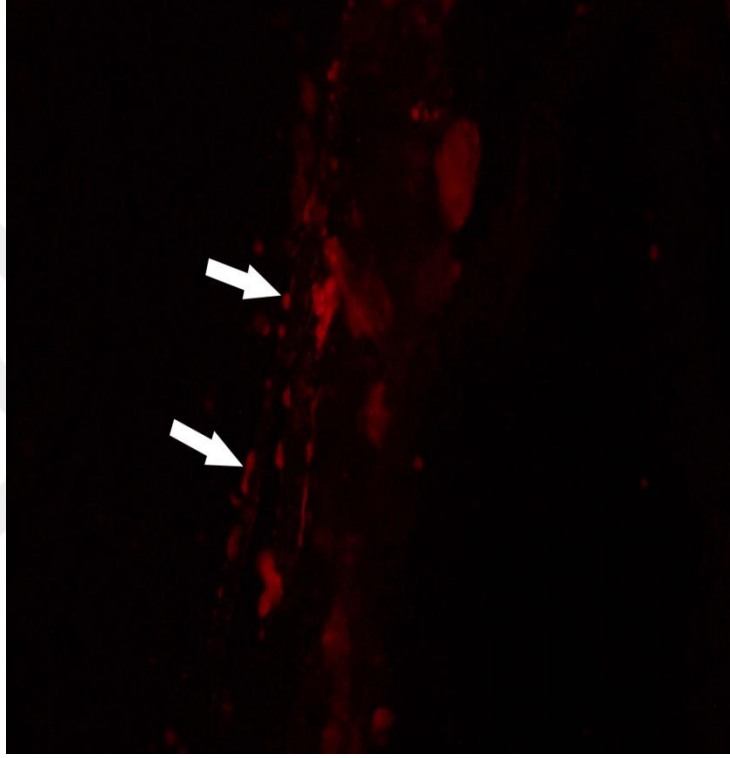
**Şekil 36:** Grup 3'ün BrdU ile işaretlenen hücre



**Şekil 37:** Çekirdeği kenara itilmiş sitoplazması yağ ile dolu morfolojik olarak adiposite diferansiye olan hücre

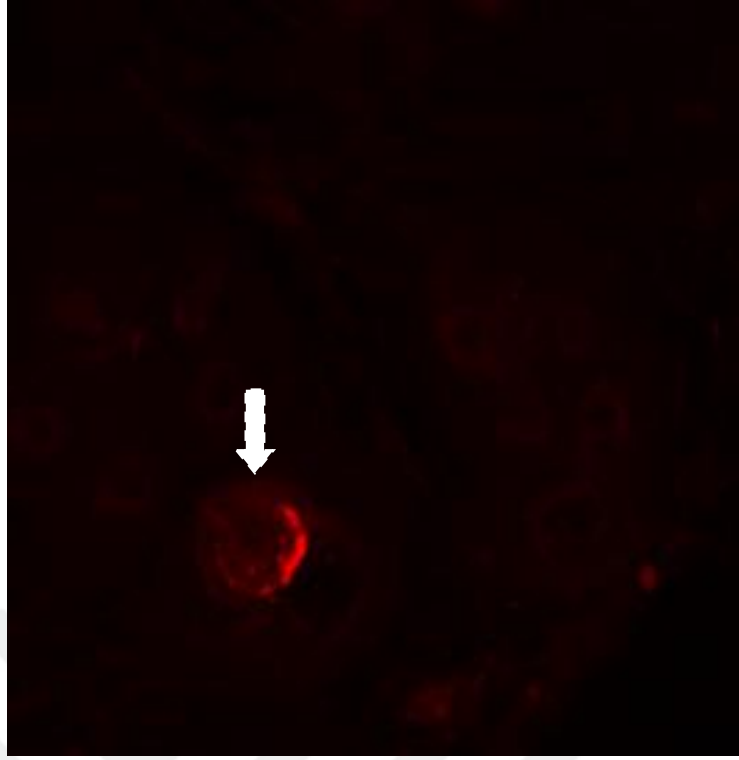
## Konfokal Mikroskopik Değerlendirme

Elde edilen kesitlerde daha önce floresan bir madde olan PKH26 ile işaretlenen hücrelerin konfokal mikroskopik değerlendirmesinde grup 2'de işaretli hücrelerin daha dağınık halde olduğu tespit edildi(şekil 38). Hücrelerin sayı olarak daha az olduğu ve düzensiz olduğu tespit edildi.



**şekil 38:** Grup 2'nin konfokal mikroskopik değerlendirmesinde hücreleri daha dağınık ve düzensiz halde olduğu kesit

Grup 3'te işaretli hücrelerin makroporlar içerisinde ve bir arada olduğu tespit edildi(şekil 39). Hücrelerin sayı olarak daha fazla olduğu ve birbirine yakın kümeler halinde olduğu gözlemlendi.



**Şekil 39:** Grup 3'ün konfokal mikroskopik görüntüsü

### **TOMOGRAFİK GÖRÜNTÜLEME**

Sedasyon altında deneklerin tomografik görüntüleme sonrasında elde edilen kesitleri değerlendirildi

Grup 1'in coronal kesitlerinde sağ malar bölgede yer kaplayan hiperdens lezyon izlendi. (Şekil 40) Sağ malar hacimleri ve sol malar hacimleri manuel olarak Vitrea 2 (Version 4.1.14.0) Vital Images, Inc, USA isimli programda hesaplanarak değerleri kaydedildi. Grup 2'nin kesitlerinde herhangi bir dansite farkı yaratacak yapı izlenmedi(Şekil 41). Sağ ve sol malar bölge hacimleri manuel olarak software vitrea programında hesaplanarak kayıt altına alındı. Grup 3'ün kesitlerinde tıpkı Grup 1'de olduğu gibi sağ malar bölgede cilt altı yerleşimli ve periost üzerinde yer kaplayan lezyon izlendi(Şekil 42). Sağ ve sol malar bölge hacimleri manuel olarak Vitrea 2 (Version 4.1.14.0) Vital Images, Inc, USA programında hesaplanarak kayıt altına alındı. Grup 3'ün tomografik kesitleri kullanılarak oluşturulan 3 boyutlu tomografik görüntüsünde sağ malarda hacimsel artışa neden olan yapı izlendi(Şekil 43).

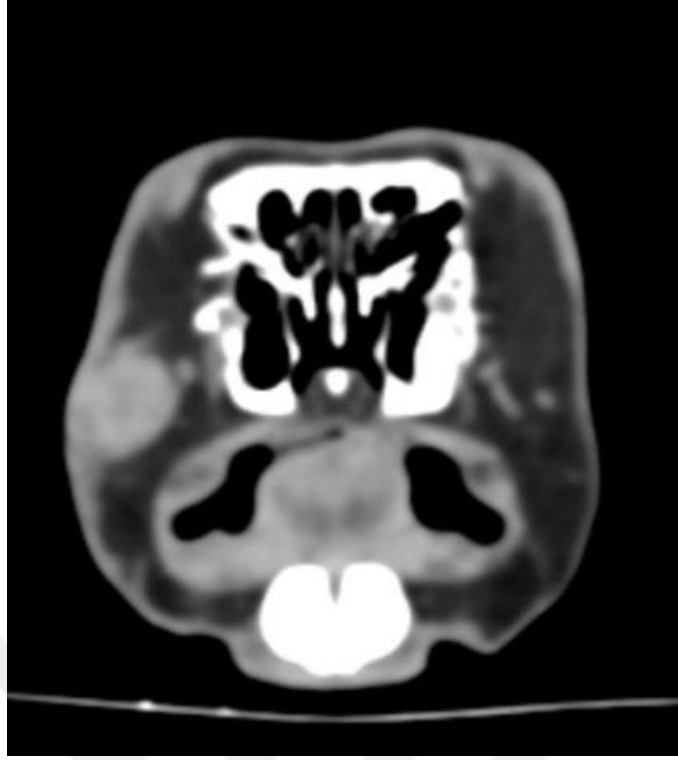


**Şekil 40:** Grup 1'in coronal tomografik görüntüsü

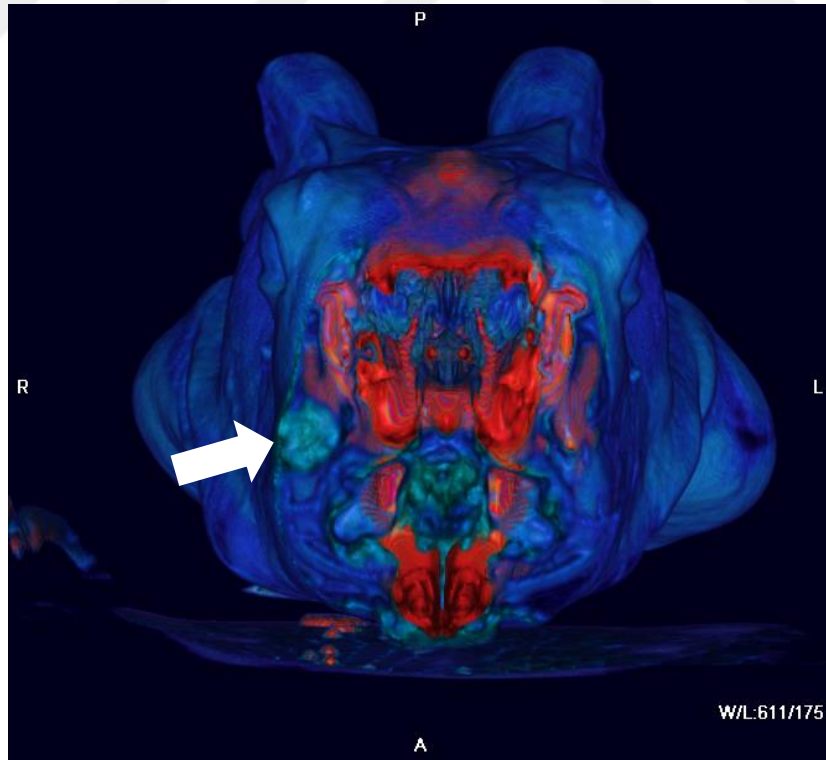


**Şekil 41:** Grup 2'nin coronal tomografik görüntüsü





**Şekil 42:** Grup 3'ün coronal tomografi kesiti



**Şekil 43:** Grup 3'ün 3 boyutlu tomografik görüntüsünde sağ malarda hacimsel artışa sebep olan yapı

## İSTATİSTİK SONÇLARI

ANOVA testi sonucuna göre çalışma grupları arasında sağ sol hacim ortalama farkları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır(Tablo 2) ( $p<0,05$ ). LSD (Least Significant Difference) testine göre kök hücre uygulanan grup ile ve kök hücre+kitosan uygulanan grubun hacim fark ortalaması farkı istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0,01$ ) kitosan uygulanan grup ile ve kök hücre+kitosan uygulanan grubun hacim fark ortalaması farkı istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0,023$ ) .

**Tablo 2:** Grupların sağ sol hacim fark ortalamaları

Grup	Hacim Farkları				
	N	Minimum	Maximum	Ort ±ss	p
Kök Hücre	6	13,61	159,59	64,53±53,72	0,002
Kök Hücre+Kitosan	6	136,54	445,55	291,70±127,70	
Kitosan	6	71,60	262,75	159,48±73,47	

ANOVA testi sonucuna göre çalışma grupları arasında sağ yanak hacim ölçüm ortalamaları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur(Tablo 3)( $p<0,05$ ). Bonferroni testi sonuçlarına göre kök hücre+kitosan uygulanan grubun hacim ortalaması (1665,3133±355,81009) ile sadece kök hücre (870,7883±304,28512) ( $p=0,001$ ) ve sadece kitosan (850,5683±224,51943) ( $p=0,001$ ) uygulanan grubun hacim ortalaması arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır.

**Tablo 3:** Grupların sağ yanak hacim ortalamaları arasındaki istatistiksel fark

	Sağ Yanak Hacmi (mm <sup>3</sup> )			p
	ort±ss	Minimum	Maximum	
Kök Hücre (N=6)	870,78±304,28	382,22	1313,49	<0,001
Kök Hücre+Kitosan (N=6)	1665,31±355,81	1076,87	2133,47	
Kitosan (N=6)	850,56±224,51	481,85	1091,08	

Eşleştirilmiş t testi sonuçlarına göre (Tablo 4);

1. Kök hücre+ kitosan uygulanan grupta sağ (1665,3133±355,81009 ) ve sol (1373,6100±271,04567) hacim ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,05$ ) sağ hacim ortalaması soldan yüksektir.
2. Kitosan uygulanan grupta sağ ve sol hacim ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,05$ ) sağ hacim ortalaması soldan yüksektir.
3. Kök hücre uygulanan grupta sağ ve sol hacim ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0,05$ ).

**Tablo 4:** Eşleştirilmiş t testi sonuçlarına göre sağ sol hacim ortalamaları arasında fark

	ort±ss	Minimum	Maximum	p
Kök Hücre+Kitosan sağ hacmi (mm <sup>3</sup> )	1665,31±355,81	1076,87	2133,47	0,003
Kök Hücre+Kitosan sol hacmi (mm <sup>3</sup> )	1373,61±271,04	914,63	1687,92	
Kitosan sağ hacmi (mm <sup>3</sup> )	850,56±224,51	481,85	1091,08	0,003
Kitosan sol hacmi (mm <sup>3</sup> )	691,08±237,57	321,77	996,11	
Kök Hücre sağ hacmi (mm <sup>3</sup> )	870,78±304,28	382,22	1313,49	0,06
Kök Hücre sol hacmi (mm <sup>3</sup> )	930,78±335,10	368,61	1371,88	

## TARTIŞMA

Kök hücre tedavisinde, doku mühendisliği yeni ve heyecan uyandıran tedavi yaklaşımı sağlamaktadır. Doku mühendisliğinde hasarlanan bölgelerin daha iyi iyileşmesi ya da yenilenmesi için doku iskelelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Birçok çalışmada olduğu gibi çalışmamızda da doku iskelesi kullanıldı.

Kök hücre tedavisinde kullanılan hücreler, otolog (organizmanın kendisinden), allojenik (aynı türdeki canlılar arasında) ve ksenojenik (farklı türe ait organizmalar arasında) kaynaklardan elde edilebilirler. Allojenik ve ksenojenik hücre kullanımında farklı genetik yapıya sahip hücreler organizmalardaki immünolojik hücreler tarafından tanınır ve yok edilmeye çalışılır. Ancak yağdan elde edilen mezenkimal kök hücreler üzerinde, bu tanınmayı sağlayan yüzey molekülleri olmadığından, teorik olarak bu hücreler savunma hücrelerinden kendilerini korur. Son yapılan çalışmalarda bu sistemden bağımsız bir şekilde savunma sisteminin bu hücreleri tanıdığı belirtilmiştir<sup>32</sup>. Bundan yola çıkılarak çalışmamızda otolog yağdan elde edilen mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır.

Kitosan literatürde birçok çalışmada kullanılmış olmakla birlikte biyolojik uyumlu, biyobozunur özelliklerini taşıması nedeni ile iyi bir doku iskelesidir. Doku mühendisliği bu özellikleri nedeni ile kitosan molekülünün farklı form yapılarına odaklanmıştır. Kitosan daha önce biyomedikal ve ilaç uygulamalarında farklı form yapılarında kullanılmıştır<sup>33</sup>. Kitosan alginat ile yapılan çalışmada; mRNA (mesajcı ribo nükleik asit) aşuları sadece in vivo ortama verildiğinde oluşturdukları protein sentezi ile kitosan alginatla birleştirilip verildiğindeki protein sentezi karşılaştırılmıştır. Kitosan alginat'ın aşuların sindirimini azaltarak daha fazla protein sentezi sağladığı gösterilmiştir. Kitosan'ın bu çalışmada T hücreleri ve nötrofillerin salgıladıkları oksidaz tarafından sindirildiği belirtilmiştir. Dolayısıyla çalışmamızda kitosan uygulanan grup 1 ve 3'teki nötrofil infiltrasyonun sebebini anlamaktayız. Kitosan kriyojel sindirimi için bu hücrelerin göç ettiği anlaşıldı. Hatta histolojik kesitlerde kitosan kriyojel yapısının yer yer bozulduğu gözlemlendi<sup>34</sup>. Enjekte edilebilen kitosan kriyojel yapısının doku iskelesi olarak kullanılabilirliği için verilen kök hücrelerin

işaretlenmesi ve bu hücrelerin in vivo ortamda tespit edilmesi gerekmektedir. BrdU çekirdek boyası 6-8 hafta hücre içerisinde kalmaktadır. Ancak son haftalara yaklaştıkça boyanın etkinliği azalmaktadır.<sup>35</sup> Dolayısıyla takip süremiz 21 gün olarak belirlenmiştir. İn vivo ortamda hücrelerin viabil olması doku iskelesinin hücrelere karşı toksik hasar yaratmadığının ve hücreleri in vitro ortamdan in vivo ortama taşıdığıının kanıtıdır. Ancak bir kısmı sindirime uğrayan doku iskelesinin tamamının sindirime uğraması için geçen sürenin ne kadar olduğu tespit edilememiştir. Bu çalışmamızda kitosan kriyojel mikrokürenin doku iskelesi olarak kullanılabilir olduğu görülmüştür. Temel çalışmamızdan çıkardığımız sonuçlar neticesinde yeni çalışmalar planlamaktayız.

Enjekte edilebilen kitosan kriyojel mikroküre in vivo ortamda çalışmamızda ilk defa kullanılmıştır. Kitosan kriyojel mikroküreler dağılma ortamı içinde emülsiyon faz oluşturma ve kriyojelasyon sürecinde çapraz bağlanma teknikleri ile kitosanın yeni formu üretilmiştir. Polimer olarak kitosanın %2'lik (w/v) çözeltisi %6'lık sulu asetik asit çözeltisi (v/v) kullanılarak hazırlanmıştır. Makroporlar kriyojelasyon sonrasında daha ince yapıda olup makroporlar arasında tıpkı bir karınca yuvasını andıran bağlantılar oluşmuştur. Bu bağlantılar kullanılarak hücrelerin sinyal molekülleri ile birbirleri arasında iletişim sağlayacağı ön görülmektedir. Ayrıca pembe iğne ucu lümeninden geçerek minimal invazyon yaratması önem arz etmektedir. Hastalara uygulanan kök hücre tedavisinde minimal invazyon yaratarak hasta konforunu arttıracaktır. Yabancı bir madde olmasına rağmen biyolojik uyumlu olması non toksik olması hematoksilen eozin boyamasından anlaşıldığı üzere dokuda herhangi bir yan etki toksik hasar yaratmaması önem arz etmektedir<sup>15</sup>. Tomografik görüntülerde hacimsel artışın tespit edilmesi, BrdU ile işaretli hücrelerin çekirdeği kenara itilmiş sitoplazması yağ ile dolu morfolojik olarak yağ hücrelerine diferansiye olması mezenkimal kök hücrelerin bu doku iskelesi üzerinde diferansiye ve proliferasyonunun kanıtıdır.

Doku mühendisliğinde, hücrelerin canlı kalabilecekleri ve implante edildiği dokuda onarım ya da yenilenme sağlayabilecekleri doku iskelesi oluşturulması amaçlanmaktadır. Travma oluşan doku bölgesinde çok hareketli ortam mevcut olup ortamda bulunmayan birçok mediyatörler salınıp farklı hücreler bu bölgelere göç etmektedir. Çeşitli mediyatörler ve büyüme faktörleri ile birlikte sinyal molekülleri dinamik bir çevrenin oluşmasını sağlamaktadır<sup>36</sup>. Bu dinamik

çevrede hücrelerin, üzerinde tutunmasını sağlayarak çoğalmalarına olanak verecek, hasarlanan doku onarımı ya da doku yenilenmesi sağlayacak doku iskelesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Ratlarda oluşturulan yanık modelinde yapılan çalışmada mezenkimal kök hücrelerin staz zonunda apoptozisi azalttığı gözlenmiştir. Kök hücrelerin antiinflamatuvar özellikleri ile oluşan inflamasyon daha kısa sürede azalmıştır. Staz zonunda akut dönemde canlı kalan ancak ilerleyen saatlerde hücre hasarına bağlı apoptoza giden hücre sayısında kök hücre uygulanan grupta azalma görülmüştür. Kök hücreler doku hasarı oluşan bölgede antiinflamatuvar özellikleri ve hücrelere olan etkileri ile doku hasarını azaltmıştır<sup>37</sup>. Çalışmamızda, histolojik kesitlerde yaygın inflamatuvar hücreler görülmesine rağmen makroskopik olarak enjeksiyon yapılan bölgede kızarıklık, ısı artışı, ödem gözlenmemiştir. Kitosan kriyojel doku iskelesi inflamatuvar hücreler tarafından sindirilmesi nedeni ile yaygın hücre infiltrasyonu görülmüştür. Ancak makroskopik olarak inflamasyon belirtilerinin görülmemesinin sebebi MKH'lerin antiinflamatuvar özellik göstermelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kitosan doku iskelesi, rosuvastatin ve mezenkimal kök hücreler ile yapılan diğer çalışmada yara iyileşmesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmada kök hücre, kitosan ve rosuvastatin kombine olarak açık yara üzerine uygulanmış ve yara iyileşmesinin her üçünün uygulandığı grupta daha hızlı olduğu tespit edilmiştir. Kitosan kriyojel histolojik kesitlerde yaygın nötrofil infiltrasyonuna neden olsada dokuda makroskopik olarak inflamatuvar bulguya rastlanmamıştır. Mezenkimal kök hücrelerin antiinflamatuvar özellikleri nedeni ile yara iyileşmesine büyük katkı sağlamıştır<sup>38</sup>. Çalışmamızda, kitosan kriyojel form yapısında da aynı inflamatuvar infiltrasyon görülmüştür. Makroskopik olarak MKH'lerin anti inflamatuvar özellikleri sebebi ile makroskopik olarak inflamasyon bulgularına rastlanmamıştır.

Doku onarımında mezenkimal kök hücrelerin salgıladıkları parakrin salgılarıyla etki mekanizmaları mevcuttur. Örneğin; akut böbrek yetmezliği oluşturulan deney hayvanlarında intravenöz verilen mezenkimal kök hücrelerin fonksiyonel olarak böbrek hasarlanmasını azalttığı tespit edilmiş ancak bu hücrelerin tübüler hücrelere diferansiyasyonu görülmemiştir. Yapılan çalışmalarda, kök hücrelerin doku hasarı gelişen bölgelerde parakrin sekresyonlarla etki göstermesinin oluşan doku hasarı onarımına katkı sağladığı

gösterilmiştir. Ancak hücrelerin hasar gelişen dokulara direk dönüşüm sağlayamayabileceği akılda tutulmalıdır. Nitekim çalışmamızda kullanılan doku iskelesi kitosan kriyojel mikroküre üzerinde bulunan makroporlar arasında tıpkı bir karınca yuvasını andıran bağlantılar mevcuttur. Bu bağlantıların parakrin etki ile doku hasarı onarımında büyük rol oynayabileceği düşünülmektedir<sup>39</sup>.

Kollajen bazlı biyomateryaller bu amaca yönelik birçok çalışmada kullanılmıştır. Çünkü kollajen biyolojik olarak uyumlu ve sindirilebilen bir yapıya sahiptir. Tip 1 kollajenin doku iskelesi olarak kullanıldığı in vivo fare modeli çalışmada doku iskelesi üzerinde hücre proliferasyonu ve hücre yaşayabilirliği değerlendirilmiştir. Çalışmada, adipojenik diferansiyon üzerine büyüme hormonlarının etkinliği değerlendirilmiş olup istenilen soyda hücre diferansiyasyonu sağlandığı gösterilmiştir<sup>10</sup>. Çalışmamızda kullanılan MKH'lerin diferansiye olmalarının sebebi olarak, deneklerin takip sürecinde kilo almaları ve bunun sonucu olarak salınan mediyatörler ve sinyal moleküllerinin olduğu düşünülmektedir.

Yağ doku oluşturmada ideal olan kök hücreler yağdan elde edilen mezenkimal kök hücrelerdir. Çünkü yağ dokunun orjin aldığı hücreler bu hücrelerdir. Çalışmalarda yağdan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin doku iskeleleri üzerinde yaşayabildikleri gösterilmiştir. Ayrıca kitosan doku iskelesi üzerinde de yaşayabildikleri ve kitosanın nontoksik, hücreler ile uyumlu ve hücre proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir<sup>40</sup>. Kitosan kriyojel formu yine aynı şekilde doku iskelesi görevini üstlenmiş hücreleri üzerlerinde dokuya taşımıştır. Ayrıca hücrelerin diferansiyasyonlarına engel olmadığı görülmüştür.

Çalışmamızda yağ doku eksizyon sonrası elde edilmiştir. Elde edilen yağ doku çeşitli aşamalardan geçirilerek mezenkimal kök hücreler elde edilmiştir. Mezenkimal kök hücreleri içeren yağ dokunun elde edilmesinde farklı teknikler mevcuttur. Coleman tekniği; 10 ml'lik şırınga ile liposakşın kanülü yardımı ile yağ doku elde etme tekniğidir. Geleneksel liposakşın tekniği ile yağ doku elde edilebilir. Son olarak eksizyon yöntemi ile yağ doku elde edilebilir. Bu üç teknik karşılaştırıldığında, geleneksel liposakşın yönteminde basıncın fazla olması nedeni ile hücrelerin zarar gördüğü ve hücre ömrünün kısa olduğu gözlemlenmiştir. Coleman tekniğinde basıncın daha düşük olması nedeni ile geleneksel liposakşın tekniği ile karşılaştırıldığında hücre yaşayabilirliğinin daha iyi olduğu ve hücrelerin ömürlerinin daha uzun olduğu görülmüştür. Eksizyon



yönteminde ise hücrelerin daha az travmaya maruz kalması ve herhangi bir basınca maruz kalmaması nedeni ile en uzun ömürlü ve verimli hücreler bu teknikle elde edilmiştir<sup>28</sup>.

Tavşanların sağ inguinal bölgeleri tıraşlandıktan sonra lokal antisepsi için betadin kullanıldı. Sonrasında povidon iyot serum fizyolojik ile ortamdaki uzaklaştırıldı. Antiseptiklerin mezenkimal kök hücreler ile temasında hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu azalmaktadır. Ayrıca hücrelerde nekroz ve apoptozu arttırmaktadır. Dolayısıyla çalışmamızda povidon iyot, serum fizyolojik ile cerrahi sahadan uzaklaştırılmıştır<sup>41</sup>.

Yağ dokusu, kök hücreler için iyi bir kaynak olup diğer kaynaklara göre avantajları mevcuttur. Hem alınma kolaylığı hem mezenkimal kök hücre sayısının fazla olması kök hücre tedavisi ve çalışmaları için önem arz etmektedir. Yağ dokunun vücutta dağılımı değerlendirildiğinde rezerv açısından zengin olması kullanımını cazip kılmaktadır. Kültürde ayırımında öncelikle plastik yüzeye yapışkanlık göstermesi, hücresel marker olarak CD73, CD90, CD105 pozitif olması karakteristik özelliğidir<sup>22</sup>. Vücutta karından ve göğüsten elde edilen mezenkimal kök hücreler karşılaştırıldığında, ikiye katlanma sayıları karından alınan kök hücrelerde daha fazla ve daha kısa süre olduğu gözlenmiştir. Karından alınan hücrelerin adipojenik diferansiyasyonları daha hızlıdır. Göğüsten elde edilen mezenkimal kök hücrelerin ise osteojenik diferansiyasyonları daha hızlıdır. Göğüsten alınan kök hücreler göğüs kanserinin invazyonunu sitokin salgılayarak arttırabilmektedir<sup>31</sup>. Çalışmamızda deneklerin inguinal bölge yağ grefti kullanılmasında amaçlanan adipojenik diferansiyasyonu hızlı olan MKH elde etmektir. Tavşanların yağ dokusu içerisinde bulunan MKH'lerin diferansiyasyon hızları açısından değerlendiren literatür çalışması yoktur. Dolayısıyla inguinal bölge, hem yağ doku miktarının fazla olması hem diğer modellerde bu bölgelerden alınan MKH'lerin adipojenik diferansiyasyonlarının yüksek olması nedeni ile donör sahası olarak kullanılmıştır.

Tri-kalsiyum fosfat ile kombine edilen mezenkimal kök hücrelerin kullanıldığı çalışmada ratlarda oluşturulan kemik defektlerinde iyileşmenin daha hızlı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca oluşturulan defekte yağdan elde edilen hücrelerin osteojenik değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun sonucunda hücre diferansiyasyonuna ortamda bulunan sitokin veya büyüme faktörlerinin

majör etkili olduğu görülmüştür. Çalışmamızda tavşanlar kafes ortamlarında kendi diyetleri ile 3 hafta takip edilmiştir. Tavşanlarda kilo alımı tespit edilmiştir. Nitekim beslenme sonrasında yağ hacminde artışa ihtiyaç duyulmuştur. Dolayısıyla daha önceden in vitro ortamda işaretlenen ve doku iskelesi üzerine tutunmaları sağlandıktan sonra yağ doku içerisine bırakılan mezenkimal kök hücreler ortamdaki sinyal moleküllerinin etkileri ile yağ hücrelerine dönüştükleri düşünülmektedir. Doku iskelesi olarak tri-kalsiyum fosfat kullanılan çalışmada oluşturulan kemik defektlerinde aynı mezenkimal kök hücreler sinyal moleküllerinin etkileşimleri sonucunda osteositlere dönüşmüşlerdir<sup>14</sup>.

Wharton jelinden elde edilen MKH'lerin kullanıldığı çalışmada doku iskelesi olarak hücresel olmayan wharton jeli kullanılmıştır. Çalışmada osteojenik dönüşümü destekleyen sinyal molekülleri, wharton jeli doku iskelesi ve kontrol gruplarına eklenmiştir. Osteojenik dönüşüm değerlendirildiğinde wharton jelinin doku iskelesi olarak kullanıldığı grupta daha fazla olduğu görülmüştür. Wharton jelinden elde edilen MKH'lerin osteojenik diferansiyasyonlarının fazla olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan yağdan elde edilen MKH'lerin alındıkları bölgelere göre diferansiyasyon yönelimlerinin değiştiği literatür bilgilerinde mevcut olup nerede ihtiyaç var ise ona yönelik donör alanı seçilmesi gerekmektedir<sup>42</sup>.

Ağ şeklinde hidrojel doku iskelesinin kullanıldığı çalışmada kemik defekti onarımı baz alınmıştır. Hidrojel doku iskelesi içerisine nutrisyon destek materyalleri in vitro ortamda eklenmiştir. Ratların kemik iliğinden elde edilen kök hücreler in vitro ortamda doku iskelesi üzerine infiltre edilmiş olup sonrasında kemik defekti alana oluşan çözelti yerleştirilmiştir. Sekiz hafta sonrasında kemik defektinin onarımının daha iyi olduğu ve bu verilen hücrelerin viabil olduğu tespit edilmiştir<sup>43</sup>. Nitekim çalışmamızda kitosan kriyojel doku iskelesi üzerine in vitro ortamda MKH'lerin tutunmaları sağlanmış olup in vivo ortama doku iskelesi kök hücre çözeltisi enjeksiyon ile nakledilmiştir. Üç hafta sonrasında yapılan histolojik inceleme sonrasında daha önce işaretli olan hücreler tespit edilmiş olup morfolojik olarak yağ hücrelerine diferansiye olan hücreler görülmüştür. Kitosan kriyojel doku iskelesinin hücrelere zarar vermediği, hücreleri üzerleri üzerinde taşıdığı incelemeler sonucu tespit edilmiştir. Ancak verilen 2 milyon kök hücrenin ne kadarının ortamda kaldığı, ne kadarının yaşadığı konusunda daha ayrıntılı çalışma yapılması gerekmektedir.

Doku iskelesi geometrik paterni üzerine yapılan çalışmada topografik ve porosite özellikleri incelenmiştir. Hyalin kıkırdak doku iskelesi üzerine kök hücreler yerleştirilmiştir. Hyalin kıkırdak doku iskelesi 3 farklı geometrik formda kullanılmıştır. Geometrik formlar hep por özellikleri açısından hemde topografik özellikleri açısından farklılıkları mevcuttur. Çalışma sonucunda kök hücreleri proliferasyonları, kolonizasyonları ve diferansiyasyonları açısından farklılıklar görülmüştür. Dolayısıyla doku iskelesinin geometrik paterni kök hücrelerin davranış yeteneklerini etkilediği tespit edilmiştir<sup>44</sup>. Çalışmamızda kitosanın farklı formu olan kriyojel yapısı kendine has topografik özellikleri mevcuttur. Kitosan kriyojel doku iskelesinin porlarının duvarları daha ince olup daha da önemlisi porlar arasında tıpkı bir karınca yuvasını andıran bağlantılar mevcuttur. Gelecekte yapılacak olan karşılaştırmalı çalışmalarda kitosan kriyojel doku iskelesinde bulunan bu bağlantıların daha değerli olacağını düşünmekteyiz. Çünkü bu bağlantıların hücreler arası sinyal molekülleri ile iletişim kurmalarını sağlayacağını düşünmekteyiz. Sinyal molekülleri hücrelerin diferansiyasyonunda, proliferasyonunda büyük öneme sahip olduğu bilinmektedir. Kitosan kriyojel yapısındaki porlar arası bağlantılar değerli olup yapılacak olan çalışmalarda özenle değerlendirilmelidir. Porların duvarlarının daha ince yapıda olması doku iskelesi üzerine tutunan hücrelerin hem sayısını arttıracak, hem de etkileşimlerini arttıracakı düşünmekteyiz.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, mikroinvaziv kitosan kriyojel mikroküre, kök hücreler için iyi bir doku iskelesidir. Nontoksik, biyolojik uyumlu biyobozunur olması bu doku iskelesini değerli kılmaktadır. Çalışmamızda kitosan kriyojel doku iskelesi in vivo ortamda ilk defa kullanılmıştır. Üzerindeki makroporların birbirleriyle bağlantılı olması kök hücrelerin sinyal molekülleri ile etki etmelerini ve iletişim kurmalarını sağlayacağını öngörmekteyiz.

Yağ dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin in vitro ortama doku iskelesi üzerine tutunarak in vivo ortamda canlı kalmaları bu doku iskelesini değerli kılmaktadır. Histolojik kesitlerde morfolojik olarak adipositlere dönüşen hücrelerin görülmesi doku iskelesinin bu hücreleri tutarak ihtiyaç halinde gerekli hücrelere dönüşmelerini sağlayacağını kanıttır.

Plastik cerrahi açısından gelecekte, doku iskelesinin kök hücrelerle birlikte oluşan doku deformitelerinin giderilmesinde kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca kronik yaraların tedavisinde ve estetik amaçlı bir dolgu materyali şeklinde kullanılmasını öngörmekteyiz. Gelecekte de daha konforlu ve daha güven verici kök hücre tedavi tekniği sağlayacağını düşünmekteyiz.

Doku iskeleleri üzerinde birçok çalışmalar yapılmakta olup çalışmamızın bundan sonraki yapılacak çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Doe, C.Q.J.D., Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation. 2008. 135(9): p. 1575-1587.
2. Knoblich, J.A.J.C., Mechanisms of asymmetric stem cell division. 2008. 132(4): p. 583-597.
3. Zhong, W. and W.J.C.o.i.n. Chia, Neurogenesis and asymmetric cell division. 2008. 18(1): p. 4-11.
4. Can, A., A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. Turk J Hematol, 2008. 25(2): p. 57-9.
5. Dominici, M., et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, 2006. 8(4): p. 315-317.
6. Consentius, C., et al., In situ detection of CD73+ CD90+ CD105+ lineage: Mesenchymal stromal cells in human placenta and bone marrow specimens by chipcytometry. 2018. 93(9): p. 889-893.
7. Gimble, J.M., A.J. Katz, and B.A. Bunnell, Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. Circulation research, 2007. 100(9): p. 1249-1260.
8. Traktuev, D.O., 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. 2008. 102(1): p. 77-85.
9. Rehman, J., et al., Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. 2004. 109(10): p. 1292-1298.
10. Venugopal, B., et al., Post implantation fate of adipogenic induced mesenchymal stem cells on Type I collagen scaffold in a rat model. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2017. 28(2): p. 28.
11. Aleksinskaya, M.A., et al., Chronic kidney failure mineral bone disorder leads to a permanent loss of hematopoietic stem cells through dysfunction of the stem cell niche. Scientific Reports, 2018. 8(1): p. 15385.
12. Hyvärinen, L., et al., Focal Adhesion Kinase and ROCK Signaling Are Switch-Like Regulators of Human Adipose Stem Cell Differentiation

- towards Osteogenic and Adipogenic Lineages. *Stem cells international*, 2018. 2018.
13. Wu, L., et al., Data of a stiffness softening mechanism effect on proliferation and differentiation of a human bone marrow derived mesenchymal stem cell line towards the chondrogenic and osteogenic lineages. *Data in Brief*, 2018. 21: p. 133.
  14. Corsetti, A., et al., Repair of bone defects using adipose-derived stem cells combined with alpha-tricalcium phosphate and gelatin sponge scaffolds in a rat model. *Journal of Applied Oral Science*, 2017. 25(1): p. 10-19.
  15. Demir, D. and N. Bölgen, Synthesis and characterization of injectable chitosan cryogel microsphere scaffolds. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2017. 66(13): p. 686-696.
  16. Richards, R.J., *The tragic sense of life: Ernst Haeckel and the struggle over evolutionary thought*. 2008: University of Chicago Press.
  17. Lodi, D., T. Iannitti, and B. Palmieri, Stem cells in clinical practice: applications and warnings. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2011. 30(1): p. 9.
  18. Reya, T., et al., Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *nature*, 2001. 414(6859): p. 105.
  19. Şahin, F., G. Saydam, and S.B. Omay, Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 2005. 1(15): p. 48-56.
  20. Fortier, L.A., Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery*, 2005. 34(5): p. 415-423.
  21. Canatan, H., İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ve hücre tedavisi. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 2013. 4(4): p. 550-561.
  22. Baer, P.C. and H. Geiger, Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem cells international*, 2012. 2012.

23. Caplan, A.I. and S.P. Bruder, Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in molecular medicine*, 2001. 7(6): p. 259-264.
24. Macrin, D., et al., Eminent sources of adult mesenchymal stem cells and their therapeutic imminence. 2017. 13(6): p. 741-756.
25. Pittenger, M.F., et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*, 1999. 284(5411): p. 143-147.
26. Mushahary, D., et al., Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*, 2018. 93(1): p. 19-31.
27. Meza-Zepeda, L.A., et al., High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2008. 12(2): p. 553-563.
28. Iyyanki, T., et al., Harvesting technique affects adipose-derived stem cell yield. *Aesthetic surgery journal*, 2015. 35(4): p. 467-476.
29. Yildiz, K., et al., Comparison of Cellular Alterations in Fat Cells Harvested With Laser-Assisted Liposuction and Suction-Assisted Liposuction. *Journal of Craniofacial Surgery*, 2016. 27(3): p. 631-635.
30. Duscher, D., et al., Suction assisted liposuction does not impair the regenerative potential of adipose derived stem cells. *Journal of translational medicine*, 2016. 14(1): p. 126.
31. Guneta, V., et al., Comparative study of adipose-derived stem cells from abdomen and breast. *Annals of plastic surgery*, 2016. 76(5): p. 569-575.
32. Dressel, R., et al., Pluripotent stem cells are highly susceptible targets for syngeneic, allogeneic, and xenogeneic natural killer cells. *The FASEB Journal*, 2010. 24(7): p. 2164-2177.
33. Dutta, P.K., J. Dutta, and V. Tripathi, Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. 2004.
34. Yan, J., et al., Injectable Biodegradable Chitosan-Alginate 3D Porous Gel Scaffold for mRNA Vaccine Delivery. 2018: p. 1800242.
35. Mineyeva, O.A., et al., Radiation Induces Distinct Changes in Defined Subpopulations of Neural Stem and Progenitor Cells in the Adult Hippocampus. *Frontiers in neuroscience*, 2018. 12.



36. Rameshwar, P., Microenvironment at tissue injury, a key focus for efficient stem cell therapy: A discussion of mesenchymal stem cells. *World journal of stem cells*, 2009. 1(1): p. 3.
37. Öksüz, S., et al., The effect of subcutaneous mesenchymal stem cell injection on stasis zone and apoptosis in an experimental burn model. *Plastic and reconstructive surgery*, 2013. 131(3): p. 463-471.
38. Maged, A., et al., Mesenchymal stem cells associated with chitosan scaffolds loaded with rosuvastatin to improve wound healing. 2018.
39. Gneccchi, M., et al., Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cells in tissue repair, in *Mesenchymal Stem Cells*. 2016, Springer. p. 123-146.
40. Dhillon, J., et al., Peptide-Modified Methacrylated Glycol Chitosan Hydrogels as a Cell-viability Supporting Pro-Angiogenic Cell Delivery Platform for Human Adipose-derived Stem/Stromal Cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2018.
41. Kim, B.-S., et al., The Effect of Antiseptics on Adipose-Derived Stem Cells. *Plastic and reconstructive surgery*, 2017. 139(3): p. 625-637.
42. Ahmadi, M., et al., Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured on PLLA scaffold coated with Wharton's Jelly. 2017. 16: p. 785.
43. Ding, X., et al., Increased stem cells delivered using a silk gel/scaffold complex for enhanced bone regeneration. 2017. 7(1): p. 2175.
44. Theodoridis, K., et al., Hyaline cartilage next generation implants from Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells: Comparative study on 3D-Printed Polycaprolactone scaffold patterns. 2019.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>PBS</b>	:Tuzlu fosfat tamponu
<b>FBS</b>	: Fetal sığır serumu
<b>DMEM</b>	:Dulbecco Modified Eagle Medium
<b>EDTA</b>	:Etilendiamin tetraasetik asit
<b>MM</b>	:Milimetre
<b>CC</b>	:Cubic Centimeter santimetre küp
<b>°C</b>	:Santigrat
<b>cm<sup>3</sup></b>	:Santimetre küp
<b>mm<sup>3</sup></b>	:Milimetre küp
<b>CD</b>	:Cluster of. Differentiation kümeler farklılaşması
<b>MKH</b>	:Mezenkimal kök hücre
<b>ISCT</b>	:The International Society for Cell and Gene Therapy Uluslararası Hücresel Tedavi Derneğini
<b>HLA-DR</b>	: Human Leucocyte Antigen-DR
<b>BMI</b>	:Body mass index-vücut kitle endeksi
<b>EEKKM</b>	:Enjekte edilebilen kitosan kriyojel mikroküre
<b>w/v</b>	:Hacimde Ağırlıkça Yüzde
<b>v/v</b>	:Hacimce Yüzde
<b>mL</b>	:Mili litre
<b>mg</b>	:Mili gram
<b>kg</b>	:Santimetre
<b>DNA</b>	:Deoksiribo Nükleik asit

**DAPI** : 4',6-diamino-2-fenilindol  
**DAB** :Diamino-benzidin  
**LSD** :Least Significant Difference  
**mRNA** :Mesajcı ribo nükleik asit



## ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil 1.</b> Stromal vasküler fraksiyon	9
<b>Şekil 2.</b> Ernst Haeckel, Doğal Yaratılış Hikayesi	11
<b>Şekil 3.</b> Kök hücre tipleri	13
<b>Şekil 4:</b> Embriyonik kök hücreler	14
<b>Şekil 5:</b> Uyarılmış pluripotent kök hücreler	15
<b>Şekil 6:</b> Yetişkin kök hücre kaynağı örnekleri	16
<b>Şekil 7:</b> Kök hücrelerin asimetrik bölünme özellikleri	17
<b>Şekil 8:</b> Mezenkimal kök hücre kaynakları ve farklılaşabildikleri dokular	18
<b>Şekil 9:</b> Yağdan elde edilen hücrelerin dönüşebildikleri doku örnekleri	21
<b>Şekil 10:</b> Kitosan kriyojel mikroküre	22
<b>Şekil 11:</b> Birbirleriyle bağlantılı makroporlar	23
<b>Şekil 12:</b> Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 09/10/2017 tarihli 22 numaralı kararı	24
<b>Şekil 13:</b> Tavşanların sağ malar bölgelerinde uygulama yapılan alanın anatomik sınırları	26
<b>Şekil 14:</b> Kitosan kriyojel süspansiyonu	27
<b>Şekil 15:</b> Sadece kitosan uygulanan grupta enjeksiyon	28
<b>Şekil 16:</b> Enjeksiyon sonrasında sağ malar bölgede oluşan doku genişlemesi	28
<b>Şekil 17:</b> Tavşanların sağ inguinal bölgesine yapılan insizyon	29
<b>Şekil 18:</b> Eksize edilmek üzere diseke edilen yağ dokusu	30

<b>Şekil 19:</b> Enzimatik sindirimin etkinliğini arttırmak için küçültülmüş yağ dokusu.	30
<b>Şekil 20:</b> Elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kültürü	31
<b>Şekil 21:</b> Thoma lamı ile hücre sayımı	32
<b>Şekil 22:</b> MKH'lerin falkon tüpü içerisinde görünümü	33
<b>Şekil 23:</b> Nazal dorsumdan minimal invazyon ile belirlenen plana ulaşması	33
<b>Şekil 24:</b> Doku iskelesi kitosan kriyojel mikroküre üzerine kök hücrelerin tutunması için falkon tüpünde birleştirilmesi	34
<b>Şekil 25:</b> DAPI boyaması ile mikroküre yüzeyine tutunan MKH'lerin gösterimi	35
<b>Şekil 26:</b> Doku iskelesi kök hücre çözeltisi pembe iğne ucu yardımı ile nazal dorsumundan belirlenen plana ulaşılarak minimal invazyon ile süspansiyonun enjeksiyonu	36
<b>Şekil 27:</b> Deneklerden tomografi görüntüleme yardımı ile kesit alınması	37
<b>Şekil 28:</b> Sağ malar bölgede eksizyonu plananan alan	38
<b>Şekil 29:</b> Sağ malar bölgede eksizyonu plananan alan, eksizyon yapılan doku	38
<b>Şekil 30:</b> Eksize edilen doku içerisinde makroskopik olarak gözlenen kitosan kriyojel mikroküreler	40
<b>Şekil 31:</b> Grup 1'in hematoksilen eozin boyaması	41
<b>Şekil 32:</b> Grup 2'nin hematoksilen eozin boyaması	42
<b>Şekil 33:</b> Grup 3'ün hematoksilen eozin boyaması	42

<b>Şekil 34:</b> Grup 2'nin BrdU ile işaretlenen hücre	44
<b>Şekil 35:</b> Morfolojik olarak adiposite dönüşen hücre	44
<b>Şekil 36:</b> Grup 3'ün BrdU ile işaretlenen hücre	45
<b>Şekil 37:</b> Çekirdeği kenara itilmiş sitoplazması yağ ile dolu morfolojik olarak adiposite diferansiye olan hücre	45
<b>Şekil 38:</b> Grup 2'nin konfokal mikroskopik değerlendirmesinde hücreleri daha dağınık ve düzensiz halde olduğu kesit	46
<b>Şekil 39:</b> Grup 3'ün konfokal mikroskopik görüntüsü	47
<b>Şekil 40:</b> Grup 1'in coronal tomografik görüntüsü	48
<b>Şekil 41:</b> Grup 2'nin coronal tomografik görüntüsü	48
<b>Şekil 42:</b> Grup 3'ün coronal tomografi kesiti	49
<b>Şekil 43:</b> Grup 3'ün 3 boyutlu tomografik görüntüsünde sağ malarda hacimsel artışa sebep olan yapı	49

## TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
<b>Tablo 1:</b> Çalışma grupları	25
<b>Tablo 2:</b> Grupların sağ sol hacim fark ortalamaları	50
<b>Tablo 3:</b> Grupların sağ yanak hacim ortalamaları arasındaki istatistiksel fark	50
<b>Tablo 4:</b> Eşleştirilmiş t testi sonuçlarına göre sağ sol hacim ortalamaları arasında fark	51

