

T.C.

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı

**ADİPOZ KÖKENLİ KÖK HÜCRE İLE
YAPAY KIKIRDAK GELİŞİMİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Serkan BARIŞKAN

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Kıvanç GÜNHAN

Manisa, 2014

Cümleler doğrudur sen doğru isen

Doğru bulunmaz sen eğri isen

Yunus Emre

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

İnsan hayatındaki en önemli dönüm noktalarından biri olan meslek seçiminde geriye dönüp baktığımda, mesleklerin en kutsallarından biri olan hekimliğin zorlu yollarını aşarak bugünlere gelebilmenin şükürünü ve heyecanını yaşamaktayım. Bu günlere gelebilmemde maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda hissettiğim aileme ne kadar teşekkür etsem eminim eksik kalır.

Tüm asistanlık sürecim boyunca; tez danışmanım olarak desteğini benden esirgemeyen, mesleki olduğu kadar hayata dair de pek çok konuda tecrübelerini benimle paylaşarak kendisinden çok şey öğrenmemi sağlayan Doç. Dr. Kıvanç GÜNHAN'a; hayatta hiçbirşeyin tesadüf olmadığını, sabretmenin önemli bir erdem olduğunu görmemi sağlayan, desteğini hiçbir konuda bizlerden esirgemeyen Prof. Dr. Asım ASLAN'a; başarılı olmak için planlı olmayı ve detaylara dikkat etmenin gerekliliğini anlamamı sağlayan Prof. Dr. Onur ÇELİK'e; bilgisini ve zamanını bizimle her zaman paylaşan, çalışma azmini örnek aldığı Doç. Dr. Görkem ESKİİZMİR'e emeklerinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

Bu tezin hazırlanmasının tüm aşamalarında katkısını esirgemeyen, her zaman desteğini hissettiğim Prof. Dr. Seda VATANSEVER'e; yardımlarından dolayı araştırma görevlisi Müjde KIVANÇ'a teşekkür ederim.

Asistanlık süresi boyunca birlikte çalışma fırsatı bulduğum, iyi kötü pek çok anı paylaştığım, üzerimde emeği olan kıdemli asistan arkadaşlarıma; eşkıdemlim Dr. Emrah EKİM'e; asistan arkadaşlarım Dr. Nazife HACIOĞLU'na, Dr. Kadri SERT'e, Dr. Mustafa BAYAM'a, Dr. Nevin ŞAHİN'e, Dr. Meltem DEMİRDAĞ'a sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Desteğini hep hissettiğim, her zorluğumda yanımda olan belki de hakkını hiç ödeyemeyeceğim Dr. Gizem KARACA'ya ayrıca teşekkür ederim.

Dr. Serkan BARIŞKAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
1.1 Kök Hücre Tarihçesi	2
1.2 Kök Hücre Nedir?	4
1.3 Kök Hücrelerde Temel Kavramlar	5
1.4 Kök Hücrelerin Sınıflandırılması	6
1.4.1 Farklılaşma Potansiyeline Göre Sınıflandırılması	6
1.4.2 Köken Aldığı Dokuya Göre Sınıflandırılması	9
1.5 Kıkırdak Doku	22
1.6 Biyomateryal	26
GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1 Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Eldesi ve Kültürü	28
2.2 Adipojenik Kök Hücrelerin Kıkırdak Hücrelerine Farklılaştırılması	30
2.3 Kondrositlere Farklılaştırılan Hücrelerin İndirekt İmmunohistokimya Yöntemi ile Karakterizasyonu	30
2.4 Farklılaştırılan Hücrelerin Deneklere Transferi	31
2.5 Örneklerin Işık Mikroskopik Analizi	33
2.6 Parafin Doku Takibi	33
2.7 Hematoksilen-Eozin Boyaması	34
2.8 İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi	35

BULGULAR	38
3.1 Hücre Kültürü Sonuçları	38
3.2 Histokimyasal Sonuçlar	43
3.3 İmmunohistokimyasal Sonuçlar	46
TARTIŞMA	50
SONUÇ	53
ÖZET	54
İNGİLİZCE ÖZET	56
KAYNAKLAR	58

GİRİŞ

Kulak Burun Boğaz Hastalıkları arasında cerrahi tedavi gerektirenlerde, özellikle rekonstrüktif cerrahide mukoza ve kıkırdak doku tamiri önemlidir. Bu durumda tamirde kullanılacak olan uygun dokunun temini en kritik aşamaların başında gelmektedir. Ameliyatta kullanılacak olan materyalin insanın kendi hücrelerinden oluşturulmuş, yani otojen kaynaklı olması vücutta gelişebilecek olan enflamatuvar reaksiyonları en aza indirmekte ve ameliyatın başarı şansını artırmaktadır. Özellikle revizyon cerrahi gerektiren ameliyatlarda, hastanın kendi kıkırdağının kullanılması bazı durumlarda imkansız, çoğunlukla yetersiz ve mümkün olduğu durumlarda da hastada ek morbidite ve mortalite yaratabilmektedir.

Kök hücreler, son yıllarda üzerinde en çok durulan ve her yıl onlarca çalışmanın yapıldığı bir konu haline gelmiştir. Hızla ilerleme kaydeden kök hücre alanındaki çalışmalar organ yetmezlikleri, metabolik hastalıklar, sinir sistemi hastalıkları, romatizmal, kalp, kemik hastalıkları ve kanser başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde umut verici sonuçlar ortaya çıkarmıştır.

Bu tezin amaçları arasında, cerrahide kıkırdak gereksinimi olan olgularda kök hücre kullanımının potansiyelini araştırmak, rejeneratif tıp olarak isimlendirilen bu alanda sıçan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden kıkırdak hücreleri üretmeye çalışmak, üretilen bu hücrelerin kalıp oluşturacak uygun bir biyomateryal ile yaşanabilirliğini sağlamak, kıkırdak hücrelerin dokuda bu kalıbın şeklini almasını ve fonksiyonelliğini histolojik ve immunohistokimyasal yollarla objektif olarak göstermeye çalışmak bulunmaktadır.

GENEL BİLGİLER

1.1 KÖK HÜCRE TARİHÇESİ

Tarih boyunca insanoğlu transplantasyon düşüncesi üzerine yoğunlaşmış olup sfenksler ve deniz kızları mitolojide birer zenotransplantasyon örneği olarak yerini almıştır. Mitolojide, ateşi Olimpos Dağındaki tanrılardan çalarak insanlığa hediye eden ve bunun üzerine Zeus tarafından cezalandırılan Prometheus'un hikayesi de buna bir örnektir. Hikayede, Zeus tarafından Kafkas(Kaf) dağında bir kayaya bağlanan ve karaciğerinin her gün bir kartal tarafından yenilmesi şeklinde bir cezaya çarptırılan Prometheus'un karaciğeri her gün kendini yenilemiştir. Bu, karaciğer hücresinin rejenerasyon yeteneği dolayısı ile kök hücre kavramını ortaya koyan ilk hikayedir. Yüzyıllar sonra bu transplantasyon düşüncesi tıbbi bir profesyonelin eline geçerek klasik edebiyatın örneğini oluşturacak şekilde Mary Shelley'in Frankenstein romanına konu olmuştur.

Bugünün kök hücre tedavisi üzerine dünyada belki de ilk çalışmaları yapan, insan ömrünü uzatmanın yolunun doğum sonrası atılan plasentalarda, kordon hücrelerinde olduğunu söyleyen araştırmacı Prof.Dr.Süreyya Tahsin Aygün'dür. 1950-1960'lı yıllarda kendisi hayvanlarda fetal greftler ve kordon kanı greftleri ile çeşitli hastalıkların tedavisinde araştırmalar yapmıştır.

İlk olarak 1967 yılında tanımlanan embriyonal karsinoma hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması da bu alanda ileri atılmış önemli bir adımdır. O zamandan beri insan ve fare teratokarsinomlarından çok sayıda hücre serisi tanımlanmıştır. Bu hücrelerin diferansiyasyonu; embriyoid cisimcikler olarak adlandırılan embriyo benzeri oluşumların meydana gelmesi ile sonuçlanan hücre agregasyonu ile gelişir. Söz konusu embriyoid cisimcikler ilk olarak embriyonal karsinomlu farelerin asit sıvılarında gözlenmiştir. Bu hücrelerin in vitro diferansiyasyon paternlerinin, embriyogenezin çeşitli yönlerini açıkladığı ve üç germ tabakasının tümünü temsil edici hücrelerin oluşumu ile sonuçlandığı görülmektedir. Aynı zamanda in vitro fertilizasyon kliniklerinden alınan fazla embriyolar kullanılarak insan embriyonik kök

hücrelerinin üretilmesine yönelik çalışmalar da başlamıştır. Bu çalışmalar başlangıçta başarısız olmuş ancak preimplantasyon blastosistlerinden izole edilen hücrelerde diferansiyasyonu incelemek için yapılan bir girişimde tavşan embriyo hücreleri kültür ortamına getirilebilmiştir. 1998'de James Thomson ve ark. ilk olarak insan embriyonik kök hücrelerini kültüre edebilmişlerdir. Aynı zaman diliminde insan primordial germ hücrelerinden embriyonik germ hücreleri elde edilmiştir. Bu kök hücrelerin gelecekte hastalık tedavisi için kullanılabilecek olması büyük bir umut yaratırken, henüz çözümlenmemiş etik sorunlar ciddi bir sorun yaratmıştır. Bu hücrelere karşı gösterilen etik reaksiyonlar sonucu, erişkin kök hücreleri ile ilgili çalışmalar da yoğunlaşmıştır ve sonucunda erişkin ve embriyonik kök hücrelerle ilgili çok sayıda yayın ortaya çıkmıştır. Bunların hepsi kök hücre esaslı tedavi konusunda yeni gelişmeler elde etme amacı taşımaktadır.

Kök hücre esaslı tedavi konusunda yaşanan gelişmelere tarihsel olarak bakacak olursak;

1951 - Lorenz ve ark. ilk defa kemik iliği transplantasyonu ihtimalini ortaya attılar¹.

1959 - Invitro fertilizasyon (IVF) yöntemi ile ilk hayvan (tavşan) üretildi.

1961 - Till ve McCulloch hematopoetik kök hücrelerin sıçanlardaki radyasyona bağlı gelişen hematopoetik yetmezliği düzeltebileceğini ortaya attılar².

1968 - Edwards ve Bavister ilk insan ovumunu in vitro olarak fertilize ettiler³.

1978 - İlk IVF bebek İngiltere'de doğdu.

1981 - Evans ve Kaufman fare embriyonik kök hücrelerini elde ettiler⁴.

1996 - Rhesus maymunlarının embriyonik kök hücreleri elde edildi⁵.

1998 - Thomson ve arkadaşları ilk insan embriyonik kök hücrelerini elde ettiler⁶.

2000 - İnsan embriyonik kök hücrelerinin pluripotent olduğu anlaşıldı⁷.

1.2 KÖK HÜCRE NEDİR?

Kök hücreler, bölünebilme ve kendini yenileyebilme yeteneği olan, özelleşmemiş, hasar gören bir dokuya nakledildiğinde dokuyu işlevsel olarak çoğaltabilen, in vivo ortamda doku hasarının olmadığı durumlarda bile hücrelerin farklılaşmalarını sağlayabilen hücrelerdir^{8,9,10}. Belirli biyolojik sinyaller altında diferansiye olarak tamamen farklı terminal diferansiye hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline sahiptirler.

Kök hücreler, organizmanın tüm yaşamı boyunca kendini yenileme özelliklerine sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı in vitro kültürlerde kolaylıkla çoğalabilmektedirler. Belirli biyolojik sinyaller altında fenotiplerinden tamamen farklı bir hücre tipine dönüşebilirler.

Farklılaşmamış kök hücrelerin, diğer hücrelerden farklı olarak başlangıçtaki hücrenin karakteristik özelliklerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneği (self-renewal, kendini yenileme); tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklılaşabilme yeteneği (multi-lineage differentiation, çoklu seri farklılaşma) ve bir dokunun işlevsel olarak yeniden yapılandırılması özellikleri vardır¹¹. Laboratuvar ortamında kök hücreler uzun zaman süreçlerinde çoğalabilirler. Okarma ve arkadaşları tarafından, embriyonik kök hücre serilerinin 300-400 döngü boyunca çoğalabildikleri gösterilmiştir⁴. Sınırsız bölünme yetenekleri telomeraz enzim aktivitesi sonucu oluşmaktadır. Bu enzim doğrusal kromozomların ucunda bulunan, tekrarlanan "TTAGGG" DNA dizileri olan telomerlerin kısalmasını önlemektedir. Telomerler ne kadar uzun olursa, hücrelerin bölünme kapasitesi de o kadar fazla olur. Bir hücrede telomeraz ne kadar aktifse telomer uzunluğu da o kadar korunabiliyor demektir. Kök hücrelerde de çok aktif telomeraz enzim aktivitesi ve buna bağlı uzun telomer zinciri vardır. Bu nedenle, kök hücreler çok uzun sınırsız bölünme yetenekleri ile kendilerini kopyalarlar.

Özetlemek gerekirse bir kök hücreyi tanımlayabilmek için 5 tane gerekli ölçüt vardır¹²;

1. Kök hücreler uzun süre bölünebilme ve kendini yenileyebilme (self-renewal) özelliğine sahiptir. Hücrelerin uzun bölünebilmesini belirleyen faktörlerden birisi, kromozomların ucunda yer alan telomer denilen ve binlerce kez tekrarlanan kısa DNA tekrar dizileridir. (TTAGGG).

2. Kök hücreler özelleşmemişlerdir. Örneğin bir kök hücre, kalp kasında olduğu gibi kanı vücuda pompalamak için komşu hücrelerle birlikte çalışmaz. Eritrositlerde olduğu gibi oksijeni dokulara taşıyamaz. Ancak özelleşmiş hücrelere dönüşmek için kaynak oluşturabilir.

3. Kök hücreler, özelleşmemiş hücrelere kaynaklık edebilirler. Bu olaya farklılaşma (diferansiasyon) denir. Kök hücreler birden fazla hücre tipine farklılaşabilirler. En iyi örneği zigottur.

4. Kök hücreler, hasar gören alıcıya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrar çoğaltabilirler.

5. Kök hücreler, in-vivokoşullarda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşabilirler.

1.3 KÖK HÜCRELERDE TEMEL KAVRAMLAR

1.3.1 Plastisite (Farklılaşma)

Bir hücrenin köken aldığı dokunun dışındaki dokulara farklılaşma özelliğini tanımlamaktadır. Bunun örnekleri arasında; endotele, kas hücrelerine, kalp kasına ve hepatositlere dönüşebilen kemik iliği kökenli hücreler ve hematopoetik kök hücreler bulunmaktadır¹³. Bir hücre, farklılaşma aşamasına girdiğinde genellikle çoğalmayı bırakır. Bu özellik fetal ve embriyonik kök hücreler için devamlı görülebilmekteyken, erişkin kök hücrelerde sınırlanmıştır.

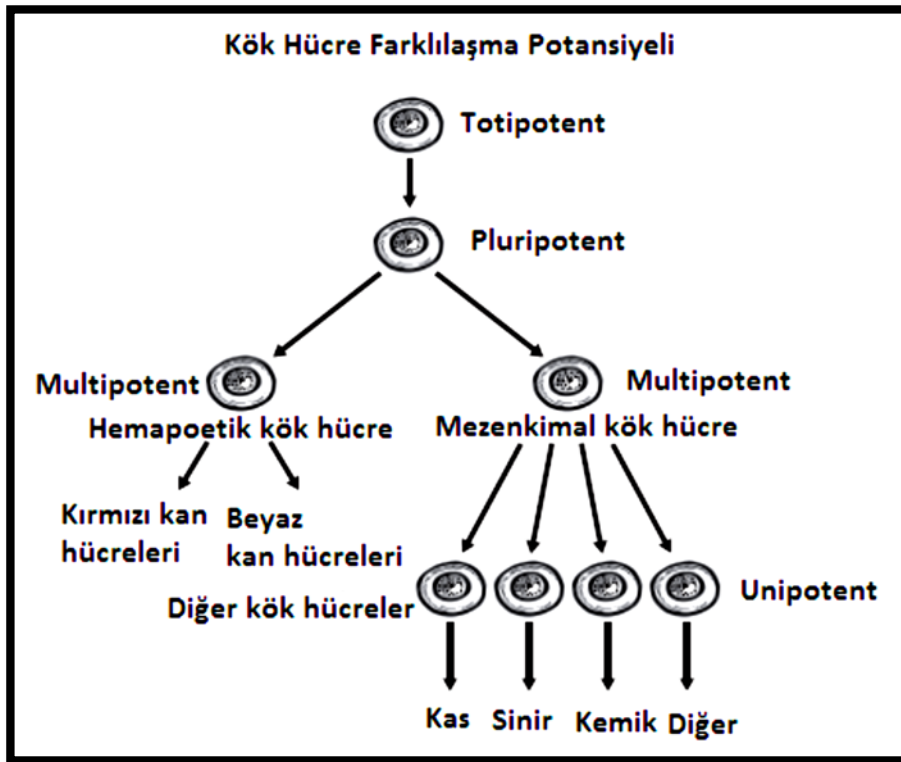
1.3.2 Stemness (Köklülük)

Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran hücresel ve moleküler özellikleri tanımlamak için kullanılır. Kök hücrelerin moleküler imzası olarak bilinen bu özellikler, özgün gen ifadeleri veya transkripsiyon sonrası bir dizi değişimler olup, bunlar sayesinde kök hücreler farklılaşmaksızın özgün yapılarını ve işlevlerini korurlar¹⁴.

1.4 KÖK HÜCRELERİN SINIFLANDIRILMASI

Kök hücreleri sınıflandırmak için kullanılan terminolojiler karmaşık olabilir. Temel olarak 2 çeşit sınıflama kullanılabilir. Birinci sınıflama kök hücrelerin farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyellerine dayanan sınıflandırmadır¹⁵. İkinci sınıflandırma ise kök hücrenin köken aldığı dokuya dayanan sınıflandırma olup, en sık kullanılanıdır.

1.4.1 Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeline Göre Sınıflandırılması:



Şekil 1. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli¹⁶

Totipotent Kök Hücreler

Ovumun döllenmesinden sonraki yaklaşık 4. güne kadar oluşan hücre kitesidir. Zigot en önemli ve ilk totipotent hücre olarak kabul edilir. Totipotent hücreler farklılaşma kapasitesine bakıldığında, vücuttaki tüm hücre ve dokulara farklılaşabilen hücre tipidir. Bu hücreler embriyonik ve embriyonik olmayan dokulara farklılaşabilirler. Bu hücrelerin her birinden ayrı birey elde edilebilir. Totipotent

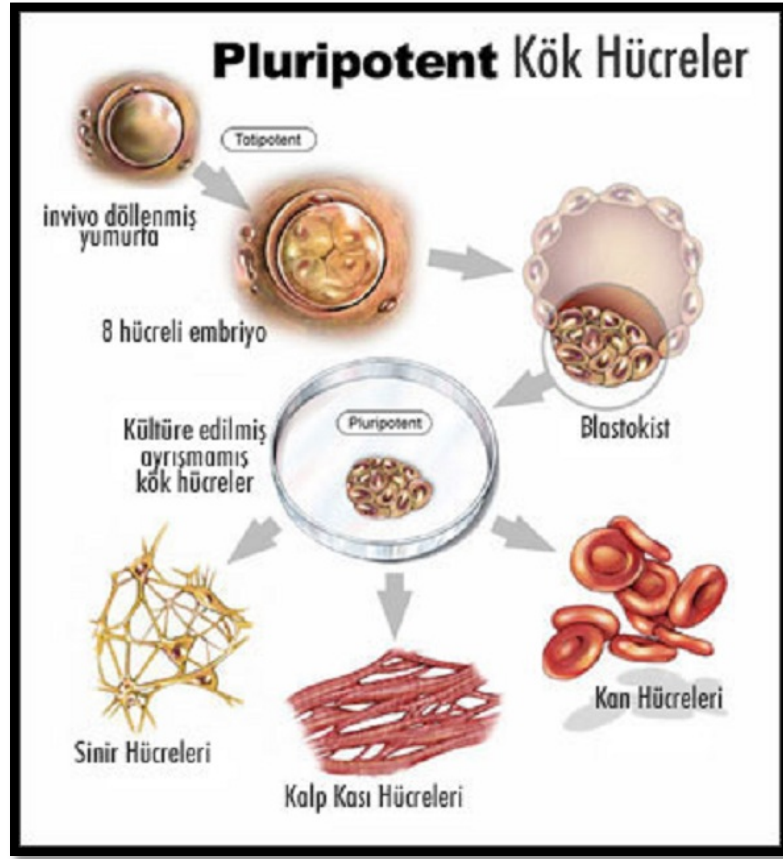
hücrelere 4 hücreden 8 hücreye kadar ki tüm blastomerler örnek olarak verilebilir⁸. Tam bir bireyi oluşturabilecek kapasiteye sahip olan bu hücreler, sınırsız farklılaşma yeteneğine sahiptir. Bu hücreler embriyo, embriyo sonrası tüm doku ve organlar ile embriyo dışı membranların ve organların kaynağını oluşturan kök hücre türleri olarak tanımlanmaktadır¹⁷.

Döllenmiş yumurta tek bir hücre olmakla birlikte, vücuttaki tüm sistemleri meydana getirecek bütün hücreler bu tek hücreden çoğalırlar. Bu döllenmiş yumurta hücresine totipotent hücre denir. Döllenmeden birkaç saat sonra bu totipotent hücre iki eşit parçaya bölünür. Bu iki totipotent hücreden birisi alınıp uterusu implante edilirse, canlı gelişimi devam eder. İki totipotent hücre bilinmeyen sebeplerle birbirinden ayrılıp, her ikisi tek başına gelişebilmektedir^{18,19}. Genetik olarak aynı olan tek yumurta ikizleri de bu şekilde oluşmaktadır.

Pluripotent Kök Hücreler

Embriyonik gelişimde üç germ tabakasından köken alan ve yaklaşık 200 çeşit hücreye dönüşebilen hücrelerdir. Pluripotent hücreler, organizmada birçok dokunun oluşmasına kaynaklık etmesine rağmen, yeni bir birey oluşturamazlar. Bu özellikleriyle totipotent hücrelerden ayrılırlar¹⁷.

Döllenmenin 5. gününden itibaren ve birkaç hücre bölünmesinden sonra totipotent hücreler farklılaşmaya başlayarak blastosist denilen içi boş bir küreye dönüşürler. Blastosistte iki tip hücre vardır; biri dış tabaka(ektoderm), diğeri ise iç tabakadır (endoderm). Blastosistin dış tabakasından yavrunun beslenmesi ve solunumunu sağlayacak plasenta ve koruyucu koryon kesesi gelişir. Blastosistin iç tabakasından göz, kalp, beyin, kaslar, kemikler gibi doku ve organlar gelişir. Ancak bunun için endoderm ve ektodermin bir arada çalışması gerekir. Tek başına endodermden hiçbir canlı gelişemez. Blastosistin iç tabakasındaki hücre kümesi pluripotenttir. Pluripotent hücreler totipotent olmadığından plasenta oluşamaz ve dolayısı ile de canlı gelişimi olmaz.



Şekil 2. Pluripotent Kök Hücre

Multipotent Kök Hücreler

Pluripotent hücrelerden daha sınırlı sayıda hücre tipine dönüşebilen ve tek bir yöndefarklılaşmak üzere programlanmış olan hücrelerdir¹⁷. Farklılaşma yetenekleri kısıtlıdır. Kendi grubundaki hücre ve doku gruplarına farklılaşabilirler. Bu tür hücelere en iyi bilinen örnek, hematopoetik kök hücrelerdir.

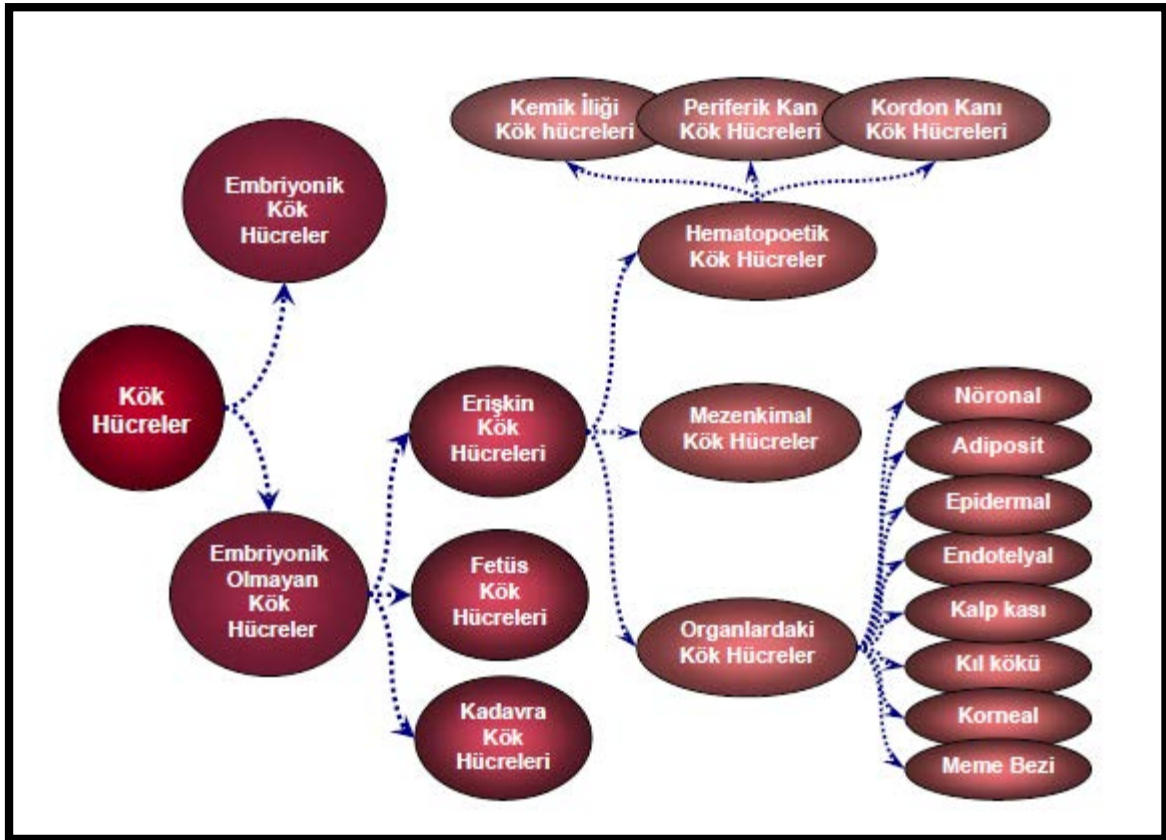
Unipotent Kök Hücreler

Sadece bir hücre grubuna farklılaşabilen hücrelerdir. Kas dokusundaki uydu hücreler buna örnektir.

Tablo 1. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri¹⁵

İsim	Hücre Tipi (Yerleşim)	Farklılaşma Etkinliği	Farklılaşma Yönü
Embriyonel Kök Hücre	Morula aşamasındaki hücreler	Totipotent	Embriyon ve embriyon dışı tabakalar
Embriyonel Kök Hücre	Blastosis aşamasındaki iç hücre kitlesi hücreleri	Pluripotent	Embriyon gövdesi (tüm somatik ve germ hücreleri)
Embriyonel Kök Hücre	Gastrula aşamasındaki epiblast hücreleri	Pluripotent	Endoderm, mezoderm ve ektoderm hücreleri
Embriyonel Kök Hücre	Ektoderm, mezoderm ve endoderm hücreleri	Pluripotent	Tüm somatik hücreler
Erişkin Kök Hücre	Özgün doku hücreleri	Multipotent	Hücrenin bulunduğu dokuya göre bir veya daha fazla türde hücre
Erişkin Kök Hücre	Bir dokudaki yerleşik hücreler	Unipotent	Bir hücre tipi

1.4.2 Kök Hücrelerin Köken Aldığı Dokuya Göre Sınıflandırılması:



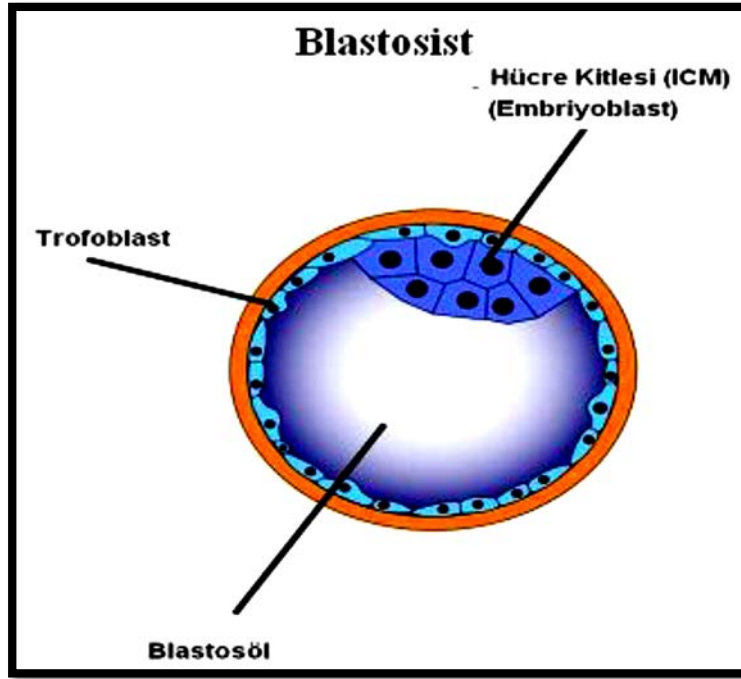
Şekil 3. Kök hücre kaynakları

Kök hücreleri köken aldıkları dokuya göre aşağıdaki gibi sınıflandırabiliriz²⁰.

- Embriyonik kök hücreler
- Embriyonik olmayan kök hücreler
 - 1. Erişkin kök hücreleri
 - a) Hematopoetik kök hücreler
 - I. Kemikiliği kök hücreleri
 - II. Periferik kan kök hücreleri
 - III. Kordon kanı kök hücreleri
 - b) Mezenkimal (stromal) kök hücreler
 - c) Organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreler
 - 2. Fetüs kök hücreleri
 - 3. Kadavra kök hücreleri
 - 4. Partenot hücreleri (partenogenezis)

Embriyonik Kök Hücreler:

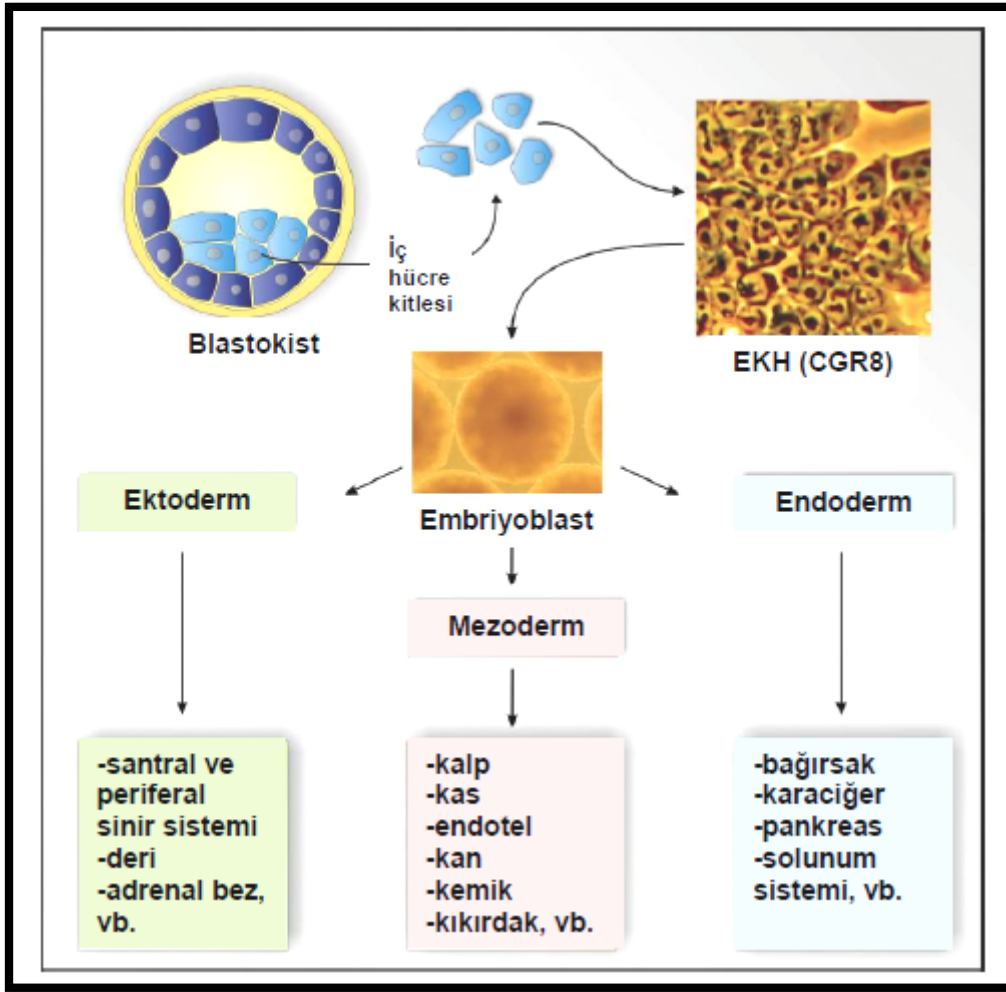
Embriyonik kök hücreler vücuttaki her hücre ve doku tipine farklılaşabilme kapasiteleri ile doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında büyük bir potansiyele sahiptirler²¹. Fare embriyonik kök hücreleri ilk defa yaklaşık 20 yıl önce tanımlanmış olup blastokistin iç hücre kitesinden elde edilmiştir^{22,23,24,25,26,27}. Uygun kültür ortamı sağlandığında bu hücreler farklılaşmadan çoğaldıkları gibi, ortamın değiştirilmesi ile bu hücrelerin farklılaşması da sağlanabilir^{26,27}.



Şekil 4. Embriyonik kök hücreler, embriyonun 4–5 günlük erken dönem formu olan blastosistinyaklaşık olarak 64–200 arası hücreden oluşan iç hücre kitlesinden elde edilirler²⁸.

Embriyonik kök hücrelerin çeşitli hücrelere farklılaşabilme özelliklerinden yararlanılarak doku hasarında daha hızlı iyileşmenin sağlanması veya sinir hücresi gibi hasarlandıktan sonra yerine konması mümkün olmayan hücrelere farklılaştırılarak yara tamirlerinde kullanılması son yıllardaki en önemli araştırma konularındandır.

Embriyonun ilk hücresel farklılaşması morulayı oluşturan hücrelerin blastokist hücrelerine farklılaşmasıdır. Morulanın dış tarafında bulunan hücreler sıvı transportunu sağlayan ve blastoselin oluşmasında rol oynayan trofoblast epitel hücrelerine farklılanır. İçte bulunan morula hücreleri ise blastokistin iç hücre kitlesini oluşturur. İç hücre kitlesini oluşturan hücreler pluripotent kök hücreler olup embriyoyu oluşturacak olan tüm dokuların esas kaynağıdır.



Şekil 5. Embriyonik kök hücrelerin blastokistten eldesi ve pluripotensi²⁷

Embriyonik kök hücre serilerinin zaman içerisinde mutasyonlardan etkilenip etkilenmeyeceği, olabilecek tümör oluşumları, nakledilen hücrelerin reddinin engellenmesine yönelik deneyimlerin geliştirilmesi, kök hücre çalışmalarındaki sorunlar olarak gözükmektedir.

Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

1. Erişkin kök hücreleri
2. Fetüs kök hücreleri
3. Kadavra kök hücreleri
4. Partenot hücreleri (partenogenezis)

1. Erişkin Kök Hücreleri

Erişkin kök hücreleri, bir doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücreler olup, kendini yenileyip köken aldığı organın spesifik hücresine dönüşebilen hücrelerdir^{8,29}. Erişkin kök hücreleri vücutta birçok doku ve organda bulunurlar ve buldukları bölgedeki hücrelerin hasar görmesi durumunda çoğalarak hasarlı kısmın onarılmasını sağlarlar. Yakın zamanda deney hayvanları ile gerçekleştirilen çalışmalarda, buldukları ortama göre daha farklı hücrelere de dönüşebildikleri gösterilmiş olsa da, dönüşebildikleri hücre tipleri sınırlıdır. Organizmada ancak belirli birkaç hücre türü nedönüşebilen erişkin kök hücreleri, laboratuvar koşullarında gerekli ortam ve sinyaller sağlandığında birçok farklı hücre türüne dönüşebilmektedirler.

Erişkin kök hücreleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır.

- a. Hematopoietik Kök Hücreler
 - I. Kemik iliği Kök Hücreleri
 - II. Periferik Kan Kök hücreleri
 - III. Göbek Kordon Kanı Kök Hücreleri
- b. Mezenkimal (stromal) Kök Hücreler
- c. Organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreler

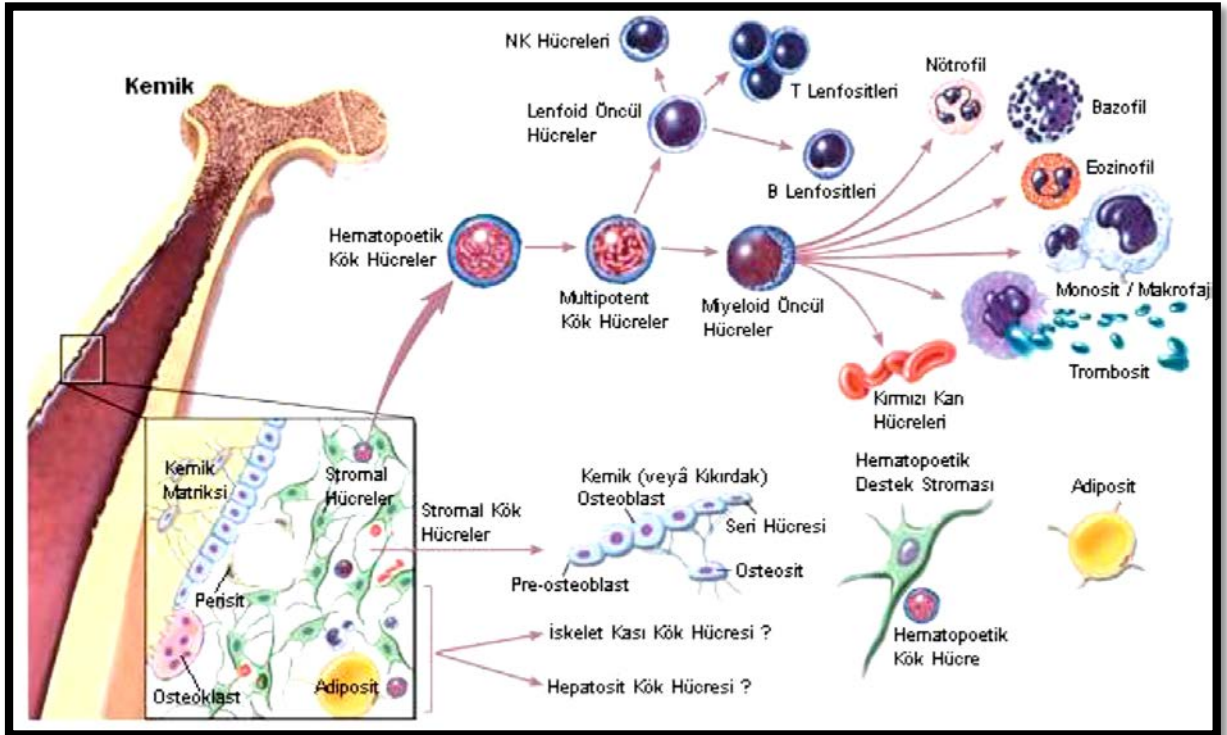
a. Hematopoietik Kök Hücreler:

Üzerinde en çok çalışılan ve tedavide yaygın olarak kullanılan erişkin kök hücre tipidir³⁰. Hematopoietik kök hücrelerin kemik iliğinde sürekli olarak kendilerini yenileyebilme ve kanda bulunan hücre tiplerine farklılaşabilme yetenekleri, bunları temel erişkin kök hücresi sınıfına sokmaktadır^{8,31,32,33,34}. Kemik iliği stromal hücreleri mezenkimal kök hücreleri ve multipotent erişkin progenitör hücreleri içerir³⁵. Kemik iliği stromal hücreleri denilen ikinci grup hücreler önceleri hematopoezi indüklemek amaçlı kullanılırken, daha sonra yapılan çalışmalarda bu hücrelerin osteositlere, kondrositlere, tendinositlere, yağ dokusu hücrelerine ve düz kas hücrelerine dönüşebildikleri gösterilmiştir^{8,34,36}.

Hematopoietik kök hücreler, erişkin insanlardan izole edilebilen az sayıdaki kök hücrelerdendir. Esas itibariyle, kemik iliğinde yerleşik olan hematopoietik kök hücreler normalde fötüsün karaciğerinde, dalağında, göbek kordonunda, plasentada ve erişkin periferik kanında bulunurlar^{8,33,34} ve hücre yüzey antijen belirteçleri CD34+ ve CD38⁻ dir^{22,31,32,33,35}.

I. Kemik İliği Kök Hücreleri:

Hematopoietik kök hücrelerinin bilinen en iyi kaynağı kemik iliğidir. Kemik iliği, heterojen yapıda hematopoietik hücre grubundan oluşur. Bu hücre gruplarının bir kısmını progenitör kök hücreler oluşturur. Kan hücrelerinin çoğunun periferik kanda yaşam süreleri kısadır ve devamlı olarak yenilenmeleri gerekmektedir. Ortalama olarak günde bir milyar yeni hematopoietik hücreye ihtiyaç vardır. Bu üretimin devamlılığı hematopoietik kök hücreler ile sağlanmaktadır.



Şekil 6. Kemik iliği kaynaklı kök hücreler ve farklılaşabildikleri hücreler³⁷

II. Periferik Kan Kök Hücreleri:

Hematopoitik sistemin yeniden kurulmasına ilişkin, kemik iliği kök hücrelerine alternatif olarak son 10-20 yıldır periferik kan kök hücreleri kullanılmaya başlanmıştır³¹. 1980 yılında hastaya kemoterapi verilerek periferik kanda kök hücrelerin mobilize edilebildiği ve bu kök hücrelerin, yeniden hemotopoiezi oluşturma yeteneğine sahip oldukları saptanmıştır. Daha sonra G-CSF ve GM-CSF gibi hematopoitik büyüme faktörlerinin kullanılmaya başlanmasıyla daha fazla sayıda periferik kandan kök hücre toplanabilmiştir¹².

Periferik kan kök hücrelerinin kullanımının avantajları; düşük tümör hücresi kontaminasyon riski, genel anestezi riskinin olmaması, girişimsel bir işlem gerektirmemesi, poliklinik şartlarında uygulanabilmesi, yineleyen ototransplantasyonların mümkün olması, hastanede yatış süresinin az olması, daha ucuz ve konforlu olmasıdır.

Özellikle, hücre ayrıştırma tekniklerinde oluşan gelişmeler ve hematopoitik büyüme faktörlerinin mobilizasyon tekniklerine girmesiyle periferik kandan elde edilen kök hücrelerin oranını arttırmak ve yeterli sayıda kök hücre toplamak mümkün olmuştur. Dolayısıyla, klinik nakilde kullanılan insan hematopoitik hücrelerin birincil kaynakları arasına periferik kan kök hücreleri de girmiştir.

III. Göbek Kordonu Kanı Kök Hücreleri:

Göbek kordon kanı önemli bir kök hücre kaynağıdır ve kök hücre kaynağı olarak dünyada 1988 yılından beri kullanılmaktadır^{38,39}. Bu hücreler, umbilikal venden veya doğumdan hemen sonra ayrılmış plasentadan toplanır, değişik hücre tiplerine farklılaşabilir ve çoğalabilir.

Göbek kordon kanı kök hücre kaynağı olarak kemik iliğine göre daha güçlü bir alternatiftir³⁹. Göbek kordon kanı kök hücrelerinin kullanımı; invaziv olmayan yöntemlerle elde edilmeleri, kültürde daha uzun süre yaşamaları, graft versus host hastalığı insidansının azlığı ve diğer allojenik hematopoitik kök hücre kaynakları

(kemik iliği, periferik kan) ile karşılaştırıldığında bir veya iki HLA uyumsuzluğunu daha iyi tolere edebilir olmasından dolayı avantajlıdır³⁹. Sağladığı bu üstünlükler doğrultusunda göbek kordon kanı toplanması, bankacılığı ve bu hücrelerin tedavide kullanımı bütün dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bunun yanı sıra spesifik donörden sadece tek bağışın kullanılabilir olması, kordon kanı ünitesinde sınırlı sayıda hematopoitik kök hücre bulunması, hematolojik ve immün yanıt oluşumunun gecikmesi ve buna bağlı olarak enfeksiyon, kanama ve erken mortalite riskinin artması göbek kordon kanı kök hücrelerinin kullanımının dezavantajlarıdır³⁹. Az sayıda kök hücre içermesi nedeniyle yetişkinlerde çocuklardaki kadar yaygın kullanımı yoktur.

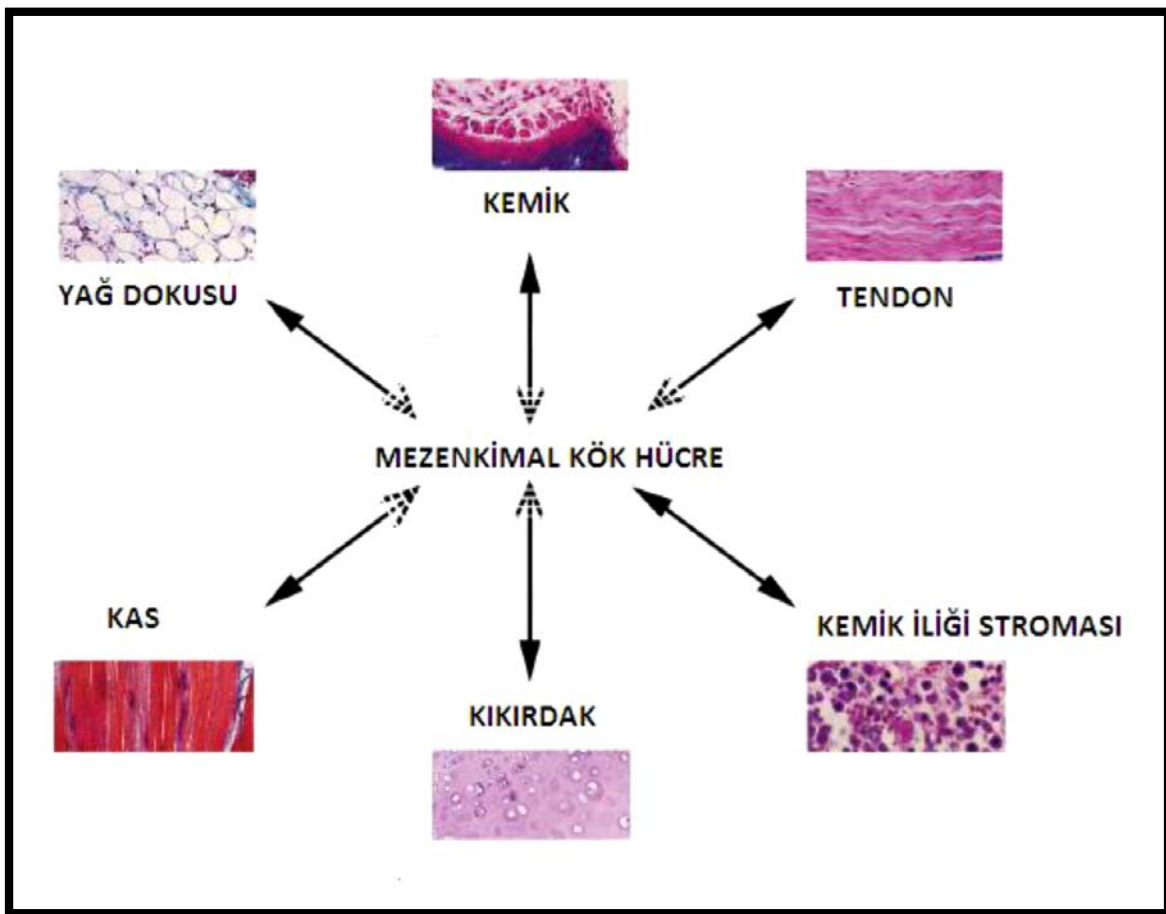
b. Mezenkimal (Stromal) Kök Hücreler:

Mezenkimal kök hücreler erişkin kök hücre alt tiplerinden biridir ve henüz diferansiye olmamış multipotent hücrelerdir. Kemik iliği stromasından ve diğer stromal dokulardan köken alırlar. Bunun yanı sıra tüm dokularda destek hücreleri olan stromal hücrelerinde kökenini teşkil etmektedirler. Mezenkimal kök hücreler kemik iliği haricinde yağ dokusunda, periostta, sinovyal membranda, kasta, dermiste, diş kökünde, perisitlerde, trabeküler kemikte, infrapatellar yağ yastığında, eklem kıkırdağında, dolaşım sisteminde, amnion sıvısında ve umbilikal kordon kanında da bulunmaktadır. Mezenkimal kök hücreler tarafından salgılanan anjiyogenik, antiapoptotik ve mitojenik faktörler hasara uğramış dokuların rejenerasyonunu ve çoğu dokuda gösterilmiş olan endojen kök hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmasını arttırır.

Mezenkimal kök hücreler ilk kez Fridenstein tarafından tanımlanmıştır. Fridenstein ve arkadaşları 1976'da, fetal buzağı serumu kullanılarak yapılan kemik iliği kültürlerinde adezyon yeteneği gösteren, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğunu ve bunların kemik ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olduğunu göstermişlerdir⁴⁰. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda bu hücrelerin hematopoitik özellikte olmayan multipotent kök hücreler olduğu, her üç germ yaprağından köken alan hücrelere farklılaşma yeteneği

bulunduğu ortaya konmuştur⁴¹. Tae ve arkadaşları 2006'da bu hücrelerin yüksek verimlilikte izole edilebildiklerini ve çoğalabildiklerini bildirmiştir⁴². Mezenkimal kök hücrelerin kolay elde edilebilmesi, düşük immünojenitesi ve daha az etik sorun oluşturması çalışmalarda önem kazanmasını sağlamıştır.

Mezenkimal kök hücreler uygun koşullarda, osteojenik, kondrojenik, adipojenik yöndefarklılaşabilmektedirler⁴³. Aynı zamanda fibroblast, iskelet kası hücreleri gibi mezodermal hücreler ile mezodermal kökenli olmayan endotel, nöroektoderm gibi çok çeşitli hücrelere farklılaştıkları gösterilmiştir.



Şekil 7. Mezenkimal kök hücrelerin değişim potansiyeli⁴⁴

Otolog transplantasyonda ilk olarak kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır. Pittenger ve arkadaşları 1999'da mezenkimal kök hücrelerin kemik iliğindeki toplam çekirdekli hücrelerin çok küçük bir kısmını oluşturduklarını bildirmişlerdir⁴⁵. İnvaziv bir işlem olan kemik iliği aspirasyonunda elde edilen 105

hücreden sadece 1-10 tanesinin mezenkimal kök hücre olduğu saptanmıştır⁴⁶. Ayrıca bu hücrelerin yaşla beraber diferansiyasyon kapasitelerinin azalmasına paralel olarak terapötik etkileri de azalmaktadır⁴⁷. Bu nedenlerle araştırmacılar mezenkimal kök hücre elde etmek amacıyla dahakolay ve pratik elde edilebilir kaynaklara yönelmişlerdir.

Kolay elde edilebilmesi, vücutta bol miktarda bulunması nedeni ile mezenkimal kök hücre kaynağı olarak yağ dokusu üzerinde yoğunlaşmıştır. İlk kez 2001 yılında Zuk ve arkadaşları insan lipoaspiratından elde ettikleri stromal vasküler fraksiyonda kök hücreleri göstermiş ve bu hücrelere adipoz kökenli erişkin kök hücre adı verilmişlerdir. Fibroblastlara benzer şekilde olan bu hücrelerin adipojenik, kondrojenik, osteojenik ve myojenik diferansiyasyon kapasiteleri olduğu gösterilmiştir^{48,49}. Ayrıca yağ dokusu kemik iliğine göre mezenkimal kök hücre kaynağı olarak daha zengindir. Bir gram yağ dokusunda yaklaşık 5×10^3 adet mezenkimal kök hücre mevcuttur. Bu sayı 1 gram kemik iliğinde yer alan mezenkimal kök hücre sayısının yaklaşık 500 katıdır^{48,50,51}.

Rejeneratif tıpta mezenkimal kök hücre kullanımının artması üzerine 2003 yılında Gimble ve ark. uygun hücre kaynağı için 5 adet kriter yayınlamıştır:

1. Kaynakta hücre bol miktarda bulunmalıdır.
2. Minimal invaziv teknik uygulanarak mezenkimal kök hücre elde edilmelidir.
3. Çıkarılan dokudan elde edilen hücreler tanımlanmış yöntemlerle birçok farklı hücre tipine diferansiye olma özelliği içermelidir.
4. Otolog ve allojenik transplantasyonları güvenli ve efektif olmalıdır.
5. Günümüzdeki kabul edilmiş standart yöntemlerle elde edilebilmelidir.

Bu kriterlere göre günümüzde yağ dokusu en uygun kaynak olarak görünmektedir⁵².

Mezenkimal Kök Hücreler ve Klinik Çalışmalar

Nöron, kalp kası, kondrosit gibi farklılaşmış hücreler yaşlanma, travma vedejeneratif hastalıklar sonucunda hasara uğradıklarında yenilenemezler. Değişik hücre türlerine farklılaşabilme potansiyeli olan mezenkimal kök hücrelerin, çoğalmalarının kontrol edilebilmeleri halinde, in vitro laboratuvar ortamlarında gerekli olan hücre tiplerine dönüştürülmeleri mümkündür. Yeni ilaçların geliştirilmesinde, etkinlik ve sitotoksitelerinin değerlendirilmesinde, hasarlı hücre onarımı veya ölümü durumunda kök hücrelerin kullanılabileceği öngörülmektedir.

İskemik inmenin deneysel modellerinde mezenkimal kök hücreler, başarı ile denenmiş ve iskeminin oluşturduğu hasarın azaltılmasında etkinliği gösterilmiştir^{53,54}.

Hematopoetik kök hücre transplantasyonunda gelişen graft versus host hastalığının önlenmesi ve tedavisinde, mezenkimal kök hücrelerin katkıları son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Avrupada yaklaşık 50 hastanın tedavisinde kullanılmış ve %70' lere varan başarı oranı görülmüştür⁵⁵. Multipl Skleroz, Amyotrofik Lateral Skleroz gibi hastalıklarda denenmiş vesemptomların gelişiminde yavaşlama olduğu izlenmiştir⁵⁵. Hasarlı miyokard dokusuna kardiyomiyosit sağlayacak kök hücre aktarılması, günümüzde kalp nakli dışında tedavi seçeneği olmayan hastalar için umut verici görülmektedir^{56,57}.

İnsan embriyonik kök hücreleri ve insan mezenkimal kök hücrelerinden kıkırdak dokusu üretilmiştir. Kıkırdak ve kemik onarımı gerekecek hasarlarda, travma ve yaşlılık sonucu ortaya çıkan osteoartritte tedavide mezenkimal kök hücreler kullanılması uygun görülmektedir.

Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanım Açısından Avantajları

1. Elde edilmesinin kolaylığı,
2. Hematopoetik kök hücreler ile yakın ilişkisi ve hematopoezde önemli fonksiyonlarının olması,
3. Yüksek farklılaşma potansiyelleri (mezodermal dokuların dışında diğer germ tabakalarına da farklılaşabilirler),

4. Stromal kaynaklı olduğu için tüm doku hücrelerine destek olarak, fonksiyon ve gelişimlerinde katkıda bulunmaları,
5. Hasarlı dokuya ulaşmada migrasyon yeteneklerini kullanmaları,
6. Gen tedavisine uygun olmaları (transfer kolaylığı, hızlı çoğalma ve dayanıklılık),
7. Enzim defekti olan hastalıklarda enzim üreten hücre olmaları,
8. İmmünsupresif ve immünojenitesinin düşük olması nedeniyle dokuuygunluğunun aranmaması,
9. Kemokinler, büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımı ile hücre ve dokuda destek hücre olarak onarımda yer almaları.

Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanım Açısından Dezavantajları

1. Sayılarının çok az olması nedeniyle in vitro koşullarda, kültürlerde haftalarca süren çoğaltılması gereği,
2. Hücrelerin kültür ortamında pasajlanmaları sonucu maruz kaldıkları çeşitli uyaranlar ve faktörlerin etkisiyle fenotipik, immünolojik ve diğer biyolojik özelliklerinde farklılıklara yol açması,
3. Mikroorganizma kontaminasyonu,
4. Sitogenetik patoloji gelişimi,
5. Kültürde hücre yaşlanması,
6. Telomer kısalması,
7. Hücrelerin immünosupresif özelliklerinin enfeksiyon riskini arttırmada etkili olması.

c. Organlarda Yerleşik Diğer Erişkin Kök Hücreler:

Dokularda farklılaşmamış hücre konumunda olan hücreler organlarda yerleşik erişkin kök hücreler olarak nitelendirilebilir¹⁴. Örneğin:

Deri → Keratinosit kök hücreleri, kıl folikül kök hücreleri, yağ beze kök hücreleri

Testis ve ovaryum → Spermatogonyal kök hücreler, ovaryum kök hücreleri

Diş → Diş pulpası kök hücreleri, periyodontal ligament kök hücreleri

Karaciğer → Oval hücreler

Pankreas → Pankreas mezenkimal kök hücresi

Sinir sistemi → Nöral kök hücreler

Kas → Uydu (satellit) hücre

2. Fetüs Kök Hücreleri

Fötal kök hücreler, spontan olarak sonlanmış ya da ebeveynlerin izni ile ilgili hekimlerce yasal ve sistemli olarak sonlandırılmış olan gebeliklerin sonucu fötuslardan elde edilir⁸. Bu tip kök hücreler oldukça sınırlı sayıdadır ve nöral kök hücrelere, hematopoietik kök hücrelerine ve pankreas adacık öncül hücrelerine farklılaşabilirler.

3. Kadavra Kök Hücreleri

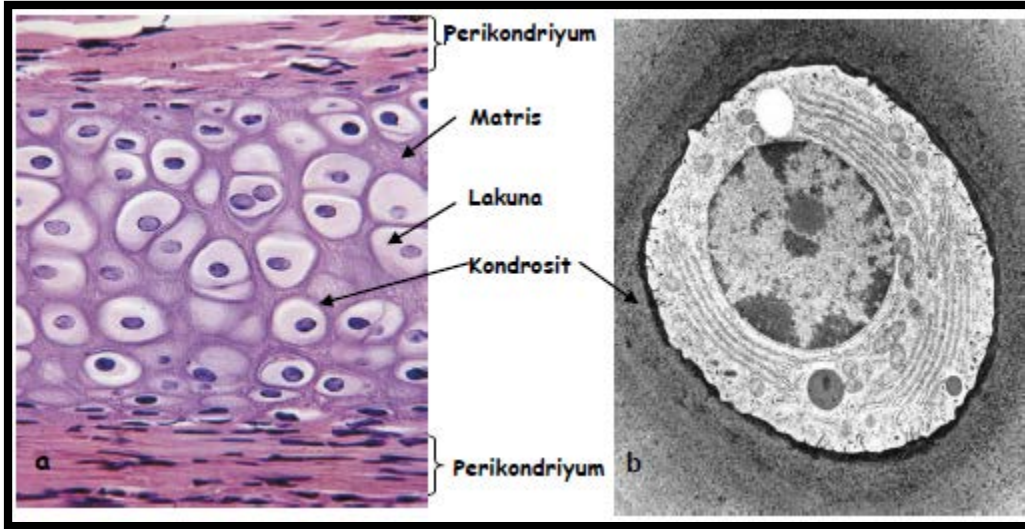
Kadavradan elde edilen kök hücreler; fibroblast, kemik iliği kök hücreleri, korneal epitelyal kök hücreler, nöral kök hücrelerdir. Yine hücrenin özelliğine göre kültüre edilerek farklı hücreler elde edilebilir⁸.

4. Partenot Hücreleri (Partenogenezis)

İnsan olmayan primatlarda yumurta hücrelerinin hiçdöllenenmeden bölünmesi sağlanmıştır. Partenot denilen ve sonuçta elde edilen hücreler atalarının kopyasıdır. Primat partenotlarının embriyonik kök hücrelerden daha kolay bir şekilde geliştikleri belirtilmiştir⁸.

1.5 KIKIRDAK DOKU

Kıkırdak doku, destek dokunun özel bir çeşididir. Kıkırdak dokusunda diğer destek dokularda görülen kan ve lenf damarları ile sinirler bulunmaz. Kıkırdak kondrosit denilen hücrelerden ve bu hücrelerin sentezleyip salgıladıkları hücre dışı matristen (ekstraselüler matris) oluşur. Kondrositler bu matris içinde lakuna adı verilen boşluklarda tek tek ya da tek bir kondrositin mitoz bölünmesiyle 8 hücreye varabilen gruplar halinde bulunurlar (Resim). Hücreler proteoglikan, glikozaminoglikan ve kollajen sentezi yaparak ekstraselüler matrisin devamlılığını sağlarlar. Resimde hücrelerin sitoplazmalarında gözlenen açıkalanlar, yağ damlacıkları ve glikojen depolarıdır.

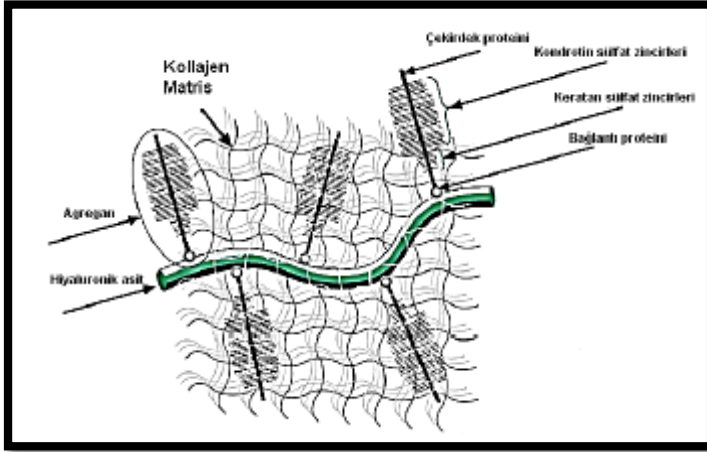


Şekil 7. Kıkırdak doku histolojik kesit görüntüsü (a). Hücreler lakünler içerisinde yer almaktadır. Perikondrium resmin üstünde ve altında pembe ile boyanmış kısımda gösterilmiştir (hemotoksilen-eozin boyaması). Kondrosit elektronmikroskop görüntüsü (b).

Kıkırdağın avasküler yapısı hücrelerin beslenmesini zorlaştırır. Oksijen ve besin alımı için gereken vasküler desteği kıkırdağın etrafındaki bağ dokusu olan perikondrium sağlar. Besin maddeleri, perikondriumdaki kılcal damarlardan kıkırdak matrisine geçer ve difüzyonla hücrelere ulaşır. Kıkırdak matrisinin yapısındaki proteoglikanlara gevşek olarak bağlanan su molekülleri, matrisi koloidal bir özellik kazandırarak difüzyonu kolaylaştırır^{58,59}.

Kıkırdak matriksi, esnek ve oldukça kıvamlı bir yapıya sahip yüksek oranda hidrate bir jeldir. Kıkırdak matriksinin % 60-80'i sudan oluşmaktadır. Kollajen, hiyaluronik asit, proteoglikanlar ve az miktarda değişik glikoproteinler kıkırdak matriksinin bütün tiplerinde bulunan esas makromoleküllerdir. Kıkırdak dokuda baskın olan kollajen, kollajen tip II'dir. Kollajen içeriğinin %90-95'ini oluşturur. Kollajen tip II tensil güç sağlar. Bu tensil güçten yapısındaki glisin, prolin, hidroksiprolin ve hidrojen bağları sorumludur.

Kıkırdak matriksinin esas glikozaminoglikanları isekondroitin sülfat ve keratan sülfattır. Glikozaminoglikan zincirleri, proteoglikan çekirdek proteinlerinden uzanır. Çekirdek proteininin bir ucunda bulunan polipeptid halkasına hiyaluronik asit molekülleri bağlanır. Proteoglikan molekülleri ise bağlayıcı bir protein aracılığıyla hiyaluronik asite bağlanır⁵⁸.



Şekil 8. Kıkırdak matriksinin moleküler yapısı

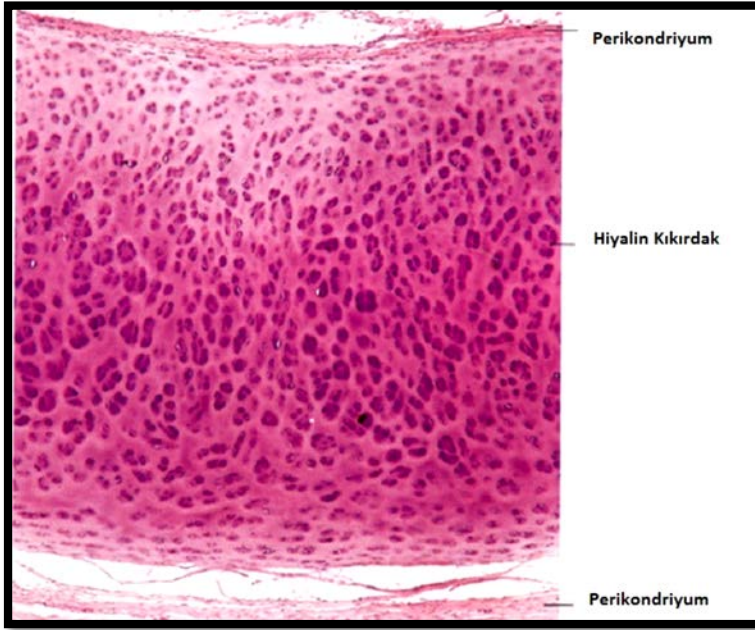
Kıkırdak dokusuna esnekliğini, matriks yapısındaki kollajen ve elastik lifler ile uzanan negatif yüklü glikozaminoglikan zincirlerine sıkıca bağlanan su molekülleri kazandırır. Bu esneklik sayesinde mekanik zorlanmalar karşısında kıkırdak dokusu şeklini korur. Kıkırdağın sert yapısını ise kollajen lifler ile proteoglikan matriksin glikozaminoglikan yan zincirleri arasındaki elektrostatik bağlar oluşturmaktadır^{58,59}.

Kıkırdak dokusunun bileşimindeki değişiklikler, üç tip kıkırdağın ortaya çıkmasında etkilidir.

Hiyalin Kıkırdak:

Vücutta en yaygın bulunan kıkırdak alt tipidir. Burunda, larenkste, kostaların sternumabağlandığı ventral yüzde, trakeal ve bronşial halkalarda, epifiziyal plakta ve hareketli eklem yüzeylerinde bulunur.

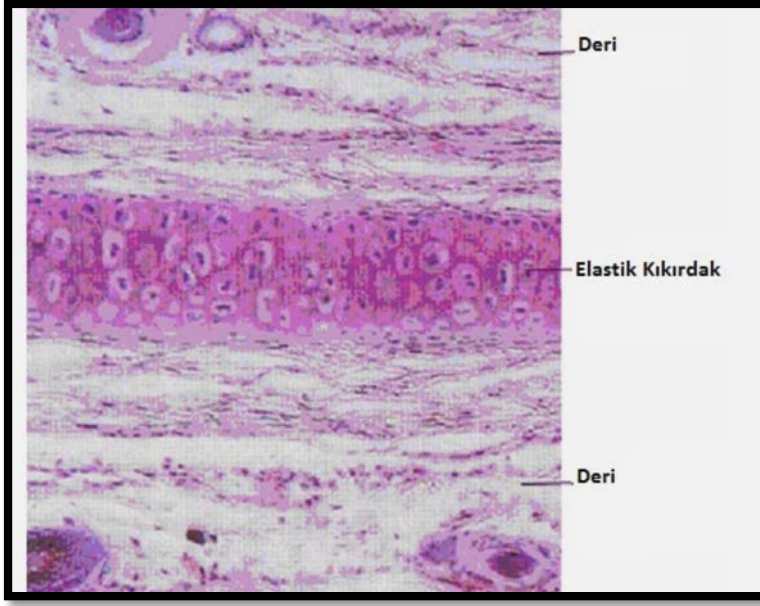
Hiyalin kıkırdak matriks yapısı; kollajen tip II, proteoglikan, glikoprotein ve ekstrasellüler sıvıdan oluşur. Matriksin kuru ağırlığının % 40 'ı kollajendir. Hiyalin kıkırdak matriksi temel olarak kollajen tip II içerir. Fakat tip 9, 10, 11 ve diğer küçük kollajenler de az miktarda bulunur. Temel histolojik yapısı resimde gösterilmiştir.



Şekil 9. Hiyalin kıkırdak dokusu

Elastik kıkırdak:

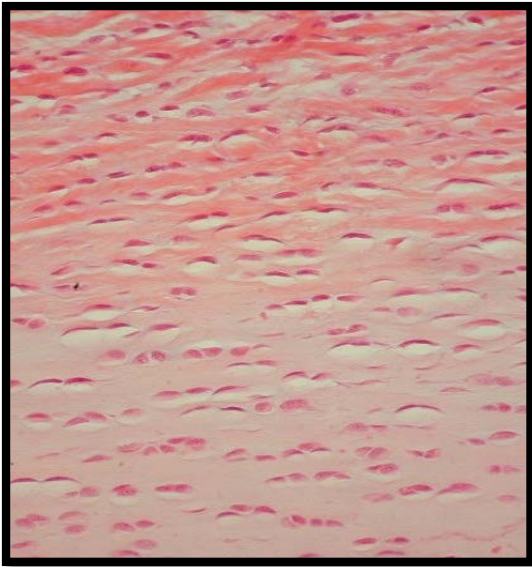
Hiyalin kıkırdağa benzer yapıdadır fakat matriks içeriği bakımından farklılıklar göstermektedir. Matriks ve perikondrium yapıları elastik lifler içermektedir. Vücutta; aurikula, östaki tüpü, epiglott, larenksin bir kısmında bulunmaktadır. Temel histolojik yapısı resimde gösterilmiştir.



Şekil 10. Elastik kıkırdak dokusu (Aurikula)

Fibröz Kıkırdak:

Fibröz kıkırdak yapı olarak perikondriyum içermez ve ekstrasellüler matriks yapısında bol miktarda kollojen tip 1'e sahiptir. Fibröz kıkırdak intervertebral disklerde, simphysis pubiste ve tendonların kemiğe bağlanma noktalarında bulunmaktadır. Temel histolojik yapısı şekil 11'de gösterilmiştir.



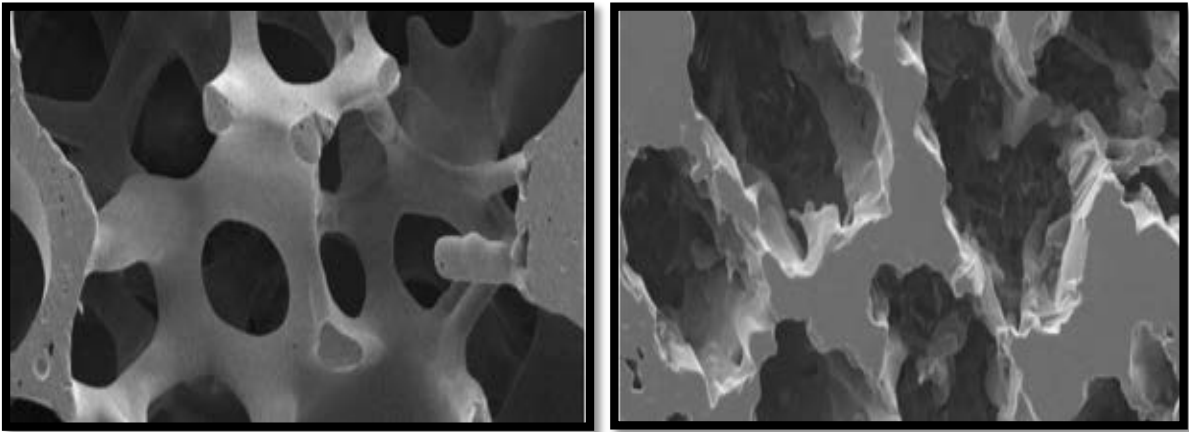
Şekil 11. Fibröz kıkırdak dokusu

1.6 BİYOMATERYAL

Canlı dokuya yerleştirilmiş her türlü doğal ve yapay materyal biyomateryal olarak isimlendirilebilir. Ancak daha kapsamlı bir tanımlama yapmak gerekirse; vücudun tamamını veya bir sistemini tedavi etmek, doku, organ veya vücudun bir fonksiyonunu yerine koymak amacıyla kullanılan ilaç harici doğal veya yapay herhangi bir veya birden fazla maddenin birleşiminden oluşan materyallere biyomateryal denir⁶⁰. Williams'ın yaptığı bir başka tanımlamada ise; işlevini kaybetmiş bir doku veya organı tedavi etmek için doğal veya sentetik toksik olmayan materyalin vücut içine yerleştirilmesi sonrasında, dokuyla arasında en az seviyede uyumsuzluk oluşturan, doku veya organın işlevinin yeniden kazandırılmasına yardımcı materyallere biyomateryaldenir^{61,62}.

Biyouyumluluk, bir biyomateryalin en önemli özelliğidir. Biyoyumlu bir biyomateryal, kendisini çevreleyen dokuların normal değişimlerine engel olmaz ve dokuda enfeksiyon gibi istenmeyen reaksiyonlarmeydana getirmez⁶³.

Biyomateryaller; metaller ve alaşımlar, polimerler, biyoseramikler ve kompozitler olarak sınıflandırılabilir. Biyoaktif cam biyomateryallerin biyoseramik alt grubundadır. Poröz yapıdaki bu biyomateryal, yüzey alanının genişliğinden dolayı iyi bir biyolojik fiksasyon sağlar⁶⁴.



Şekil 12. Poröz yapıda biyoaktif cam⁶⁴

Biyoaktif cam dokuya yerleştirildiği zaman biyofiziksel ve biyokimyasal tepkimeler gerçekleştirerek doku ile materyal arasında mekanik olarak gcl bir bağlantı gerekleřtirir⁶⁵.

Biyoaktif camların başlıca dezavantajları ise iki yönlü cam ağından kaynaklanan mekanik zayıflıkları ve kırılganlıklarıdır⁶⁶.

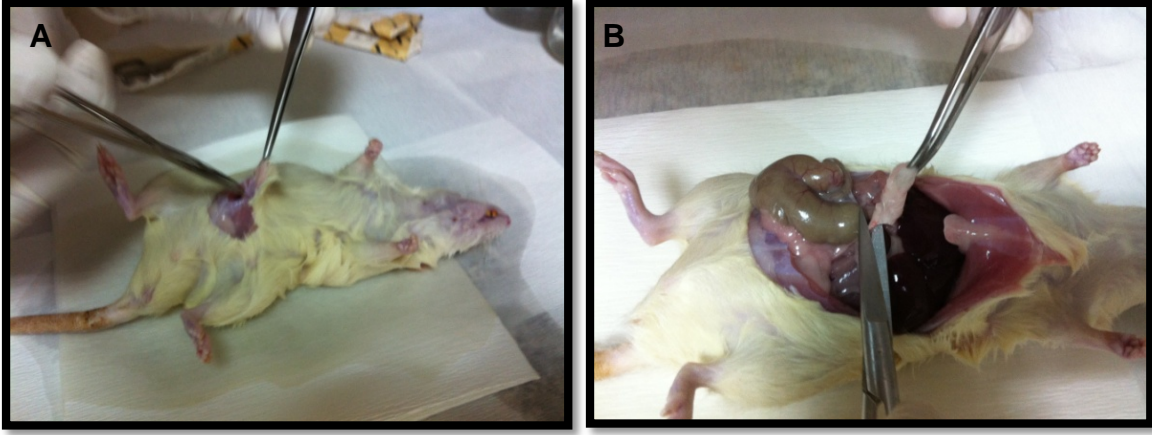
Biyoaktif camın içeriği çeşitli elementlerle zenginleştirilebilir. Seryum (CE) da bu amaçla kullanılabilen elementlerdendir. Schubert ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada seryumun nöroprotektif etkinliği olduğu ve reaktif oksijen radikallerine karşı antioksidan etkisi olduğu gsterilmiřtir⁶⁷. Zhang ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada da seryumun hücrelerin proliferasyonuna ve diferansiyasyonuna olumlu katkı yaptığı gsterilmiřtir⁶⁸.

GEREÇ VE YÖNTEM

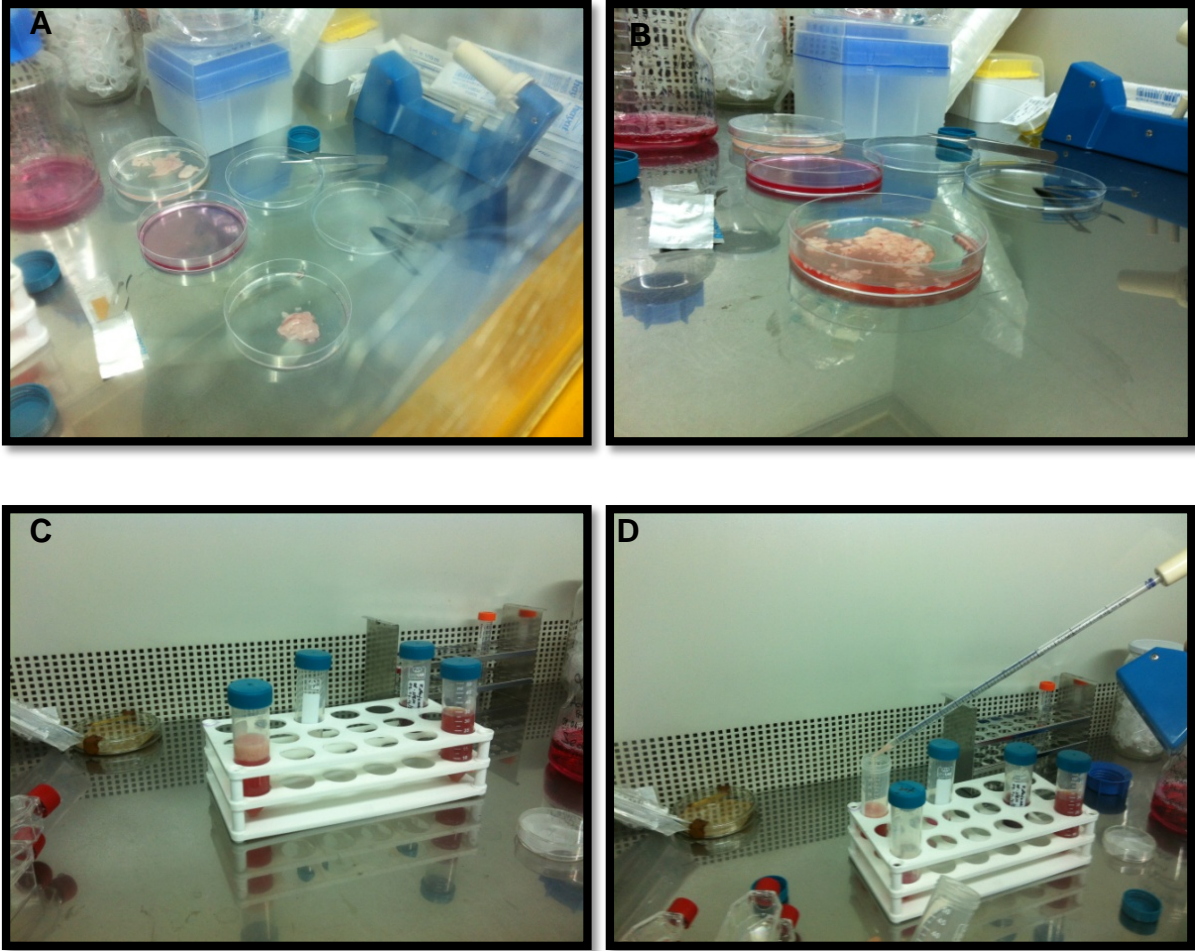
Çalışma için Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 19.02.2014 tarih ve 77.637.435-05 sayılı etik kurulu onayı alındı.

2.1 Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Eldesi ve Kültürü

Çalışmada 6 adet 300-350 gr ağırlığında erkek Wistar albino türü sıçanlar kullanıldı. Sıçanlara intraperitoneal 80 mg/kg ketamin (Eczacbaşı/Türkiye) ve 10 mg/kg Xylazine (Eczacbaşı/Türkiye) ile anestezi uygulandı. Steril koşullar altında abdomen orta hatta insizyon yapıldıktan sonra intraperitoneal ve retroperitoneal yağ doku çıkartıldı. (Resim 1) Yağ doku örnekleri, içerisinde %5 penisilin-streptomisin (Biochrom A-2213) içeren sterilfosfat tampon solüsyonu (PBS BE17-513F Lonza) ile yıkandıktan sonra bistüri yardımı ile mekanik diseksiyon için küçük parçalara ayrılarak içerisinde %0.075 kollejenaz tip 1 (sigma C0130-500MG) bulunan α -MEM içerisinde (sigma M-4526) kültür vasatı içerisinde 30 dakika süre ile 37 °C de %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi (Resim 2). İnkübasyon sonrasında örnekler 5 dk 1000 rpm devirde sentrifüj edildikten sonra üst kısım atılarak hücre peleti 5 ml adipojenik kültür vasatı (α -MEM [sigma M-4526], %20 FCS [Biochrom S-O115], % 0,4 penisilin [Biochrom A-2213], %0,4 streptomisin [Biochrom A-2213, % 0,1 amfoterisin B [Biochrom A-2612], % 1 gentamisin [Biochrom A-2712]) içerisine alınarak kültüre edildi. Her 2 günde bir kültür vasatı değiştirilerek hücreler farklılaştırılmadan 2 hafta kültüre edildi.



Resim 1. Deneğe yapılan abdominal insizyon (A) ve deneğin yağ doku örneğinin alınması (B)



Resim 2. Yağ doku örneğinin (A) mekanik diseksiyonu (B) ile adipojenik kök hücre eldesi için inkübasyonu (C,D)

2.2 Adipojenik Kök Hücrelerin Kıkırdak Hücrelerine Farklılaştırılması

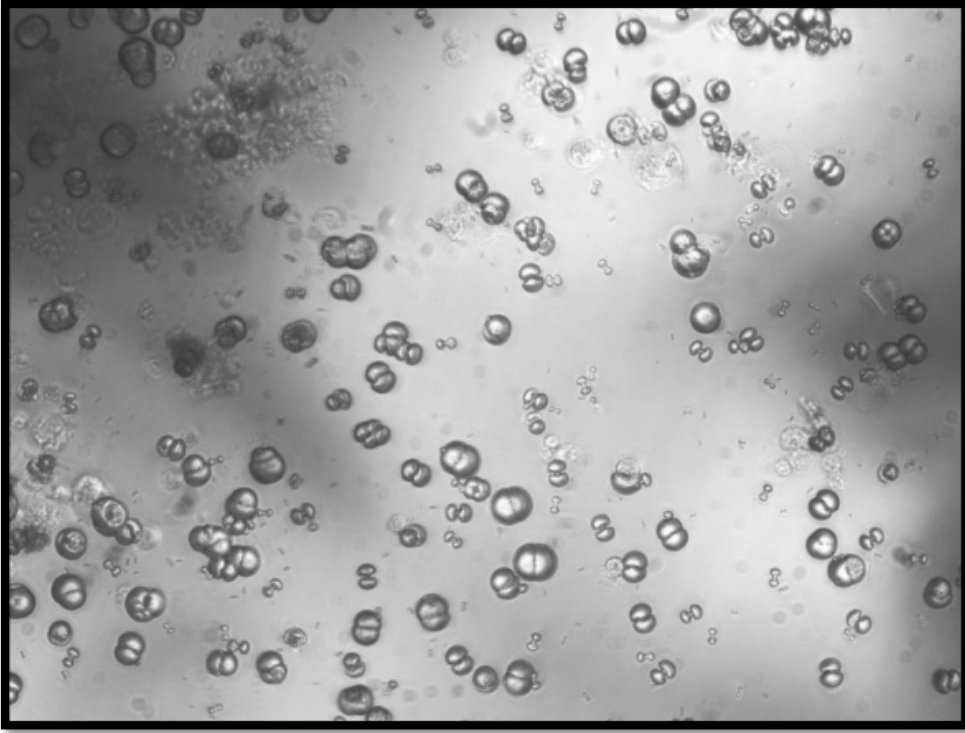
Kök hücreler kıkırdak hücrelerine farklılaştırmak üzere α -MEM, 500 ng/ml bone morphogenic protein-6, 10 ng/ml TGF- β 3, 10⁻⁷ M dexamethasone, 50 mg/ml ascorbate 2 phosphate, 40 lg/ml proline, 100 lg/ml pyruvate and 50 mg/ml ITS + premix içeren kondrojenik farklılaştırma vasatı ilave edilerek kültüre edildi. Her 2 günde bir kültür vasatı değiştirilerek kültüre 21 gün devam edildi.

2.3 Kondrositlere Farklılaştırılan Hücrelerin İndirekt İmmunohistokimya Yöntemi ile Karakterizasyonu

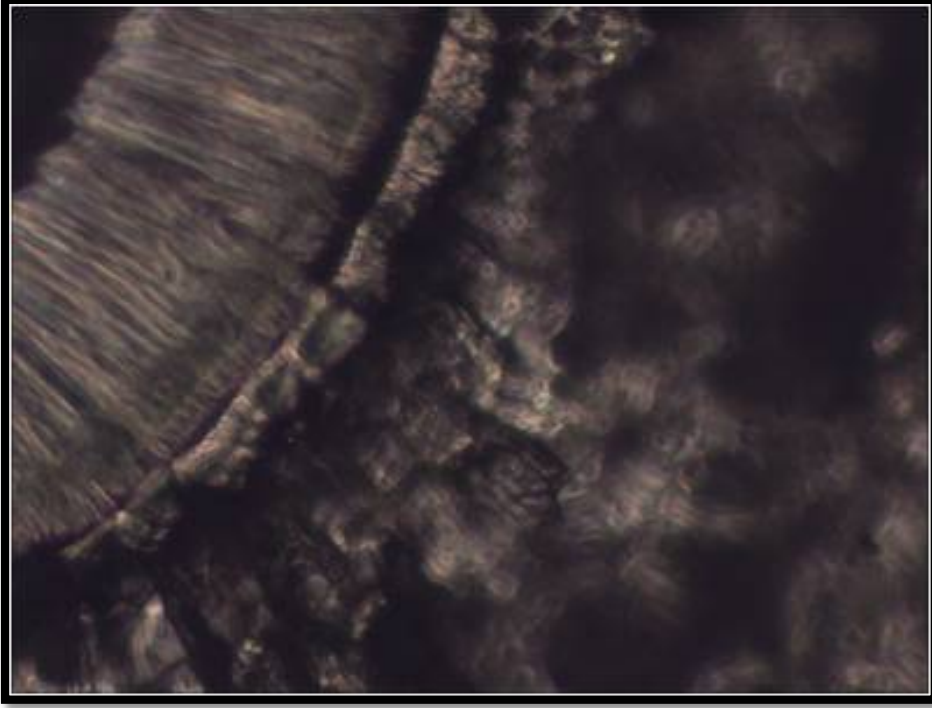
Farklılaştırılan hücrelerin karakterizasyonu için, kültürün 7. ve 21. günlerinde alınan hücrelerde kollajen tip II, bFGF ve Sox-9 immunohistokimya analizi için hücrelerin bir kısmında kültür vasatı uzaklaştırılarak bir defa steril PBS ile yıkandıktan sonra % 4'lük paraformaldehit ile 30 dakika tespit edildi. Tespit işleminden sonra 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 10 dakika % 3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂, K31355100, Merck, Darmstadt, Germany) uygulandıktan sonra, hücreler 3 defa PBS ile yıkandı. Permeabilizasyon için hücreler % 0,1 Triton-X 100 (A4975,0100, AppliChem, Darmstadt, Germany) ile 15 dakika buz üstünde inkübe edildi ve 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra 1 saat bloklama solüsyonu (K023, DBS, California, USA) konularak bekletildi. Daha sonra 1/50 dilüsyonda anti-kollajen-II (sc-52658 Santa Cruz Biotechnology), anti-bFGF (ab65973-100 abcam) ve anti-Sox-9 (sc-20095 Santa Cruz Biotechnology) antikorları ile bir gece +4 C⁰'de inkübe edildi. Ertesi gün 3 defa PBS ile yıkanan hücreler anti-mouse ve anti-rabbit biotinlenmiş ikincil antikor (KP500, DBS, California, USA) ile 30 dakika inkübe edildi. PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkanan hücreler streptavidin hidrojen peroksidaz (KP500, DBS, California, USA) ile 30 dakika bekletildikten sonra tekrar PBS ile 3 defa yıkanarak immunoreaktivitenin görünürlüğünü sağlamak üzere diaminobenzidine (DAB, K007, DBS, California, USA) kromojeni 5 dakika uygulandı ve distile su ile 15 dakika yıkandı. Mayer's Hematoksilen (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland) ile 5 dakika boyama yapıldıktan sonra hücreler distile su ile 15 dakika yıkanarak direkt olarak kapatma medyumu (K002, DBS, California, USA) ile kapatıldı ve Olympus marka BX 40 mikroskop ile incelendi.

2.4 Farklılaştırılan Hücrelerin Deneklere Transferi

Farklılaştırılan hücreler tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırıldıktan sonra her bir kuyucukta 1×10^4 hücre/ml olacak şekilde %1 CE (Seryum) katkılı-13-93B3 bioaktif cam üzerinde ekilerek 24 saat inkübasyonu sağlandı (Resim 3,4).

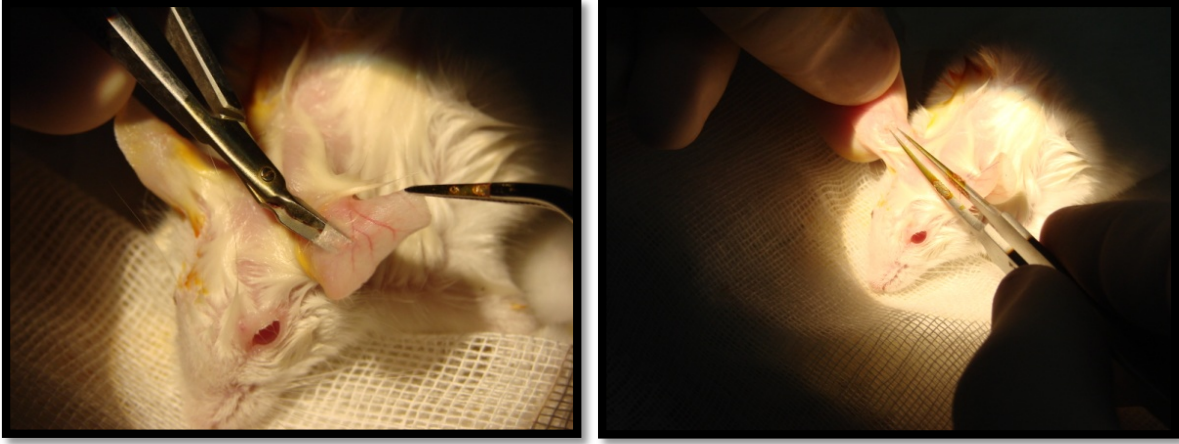


Resim 3. Biyomateryal üzerinde transfer edilen hücreler



Resim 4. Kültürün 1. gününde biyomateryal üzerindeki hücreler

Aynı deneğin sağ kulağı çalışma kulağı, sol kulağı ise kontrol kulağı olarak planlandı. Sıçanlara intraperitoneal 80 mg/kg ketamin (Eczacbaşı/Türkiye) ve 10 mg/kg Xylazine (Eczacbaşı/Türkiye) ile anestezi uygulandı. Her iki retroaurikuler bölge povidon iyodür (Batticon) ile temizlendikten sonra kıl tıraşı yapıldı. Retroaurikuler bölgelere hidrolik elevasyon amacı ile subkutan olarak 0,5 cc serum fizyolojik enjekte edildi ve yaklaşık 0,5 cm insizyon yapıldı. Mikroskop altında subkutan planda makas yardımı ile künt diseksiyon yapılarak implantasyon için uygun alan oluşturuldu. Mikroskop altında çalışma kulağına kök hücre ve biyomateryal, kontrol kulağına ise yalnızca biyomateryalimplante edildi (Resim 5). İnsizyon bölgeleri sütüre edildi. Denekler hergün 1 defa pansumanı yapılarak takibe alındı. Takiplerin 8. ve 12. gününde toplam iki adet deneğin öldüğü saptandı. Cerrahi işlem sonrası 30. günde sadece implantasyon alanı (kulak kıkırdak dokusu alınmadan) eksize edilerek, alınan örnekler histolojik ve immunohistokimyasal analiz için %10 formalin içerisinde tespit edildi. Denekler servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.



Resim 5. Kıkırdak hücre ile biyomateryalin kulağa implantasyonu

2.5 Örneklerin Işık Mikroskopik Analizi

Deneklerden alınan örnekler % 10'luk formalin solüsyonu içerisinde 24- 48 saat süre ile tespit edildikten sonra rutin parafin takip işlemine tabi tutuldu ve dokular bloklanarak rotary mikrotom (RM 2135, Leica) ile 5 µm'lik kesitler alındı. Dokunun morfolojisini incelemek amacıyla hematoksilin-eozin (H-E) boyaması yapıldı. Ayrıca kollajen-II, bFGF ve Sox-9 dağılımları indirekt immunohistokimya yöntemi ile incelendi.

2.6 Parafin Doku Takibi

Fikse edilen örnekler 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 30'ar dakika % 60'dan % 80'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. % 95 alkol içerisinde 1'er saat iki değişim sağlanarak tutulan örnekler 30 dakika 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 1'er saat iki değişim ksilene tabi tutuldu. 1:1 ksilen:parafin içerisinde 30 dakika 60°C'lik etüvde tutulan örnekler birer saat 2 değişim parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra blok kaplarına alınarak parafin içerisinde gömüldü (Tablo 2). Alınan 5 µm'lik kesitlere histokimyasal inceleme için hematoksilin-eozin, immunohistokimyasal inceleme için indirek immunohistokimya boyaması yapıldı.

Tablo 2. Parafin Doku Takibi

İşlem	Madde	Süre
Tespit	% 10 formalin	24- 48 saat
	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 60 etil alkol	30 dakika
	% 70 etil alkol	30 dakika
	% 80 etil alkol	30 dakika
	% 95 etil alkol	1 saat
	% 95 etil alkol	1 saat
Şeffaflaştırma	Ksilen-Alkol	30 dakika
	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
Emdirme 60° C etüvde	Ksilen-Parafin	30 dakika
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

2.7 Hematoksilen-Eozin Boyaması

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5 µm'lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için % 95'den % 60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile 30 dakika boyandıktan sonra, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akar suda yıkandı. Diferansiyasyon için asit alkole batırılıp çıkarılan kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. Daha sonra kesitler 2 dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dakika akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla % 80 ve % 95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim

ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 3).

Tablo 3. Hematoksilen-Eozin Boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	30 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Diferansiyasyon	Asit alkol	2-3 saniye
Boyama	Eosin	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Dehidratasyon	% 80 alkol	1 dakika
Dehidratasyon	% 95 alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	

2.8 İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi

Örneklerden alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından % 95'ten % 60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dakika bekletildi. Pap pen (IM3580,

Immunotech, Marseille, France) ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin (EK001-10K, Biogenex, San Ramon, USA) solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika % 3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler 10 dakika bloklama solüsyonu (85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikolar anti-kollajen-II, anti-bFGF ve anti-Sox-9 ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA) ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB, K007, DBS, California, USA) ile 5 dakika boyandı. Mayer's hematoksilen (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dakika yıkanan kesitler kapatma medyumunu (K002, DBS, California, USA) ile kapatıldı (Tablo 4).

İndirekt immunohistokimya işleminden sonra örnekler iki histolog tarafından farklı zamanlarda değerlendirilerek, immunoreaktiviteler negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve kuvvetli (+++) pozitif olarak değerlendirildi.

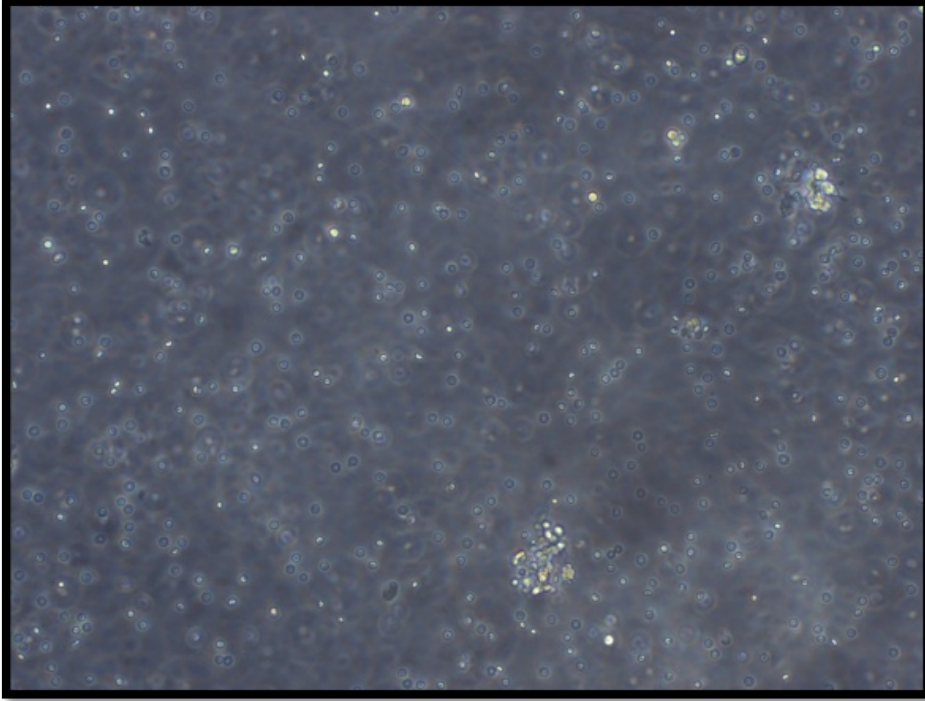
Tablo 4. İndirek İmmunohistokimya Boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Tripsin	15 dakika
	%3'lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solüsyonu	10 dakika
Antikor ile inkübasyon	Anti-kollajen-II, anti-bFGF, anti-Sox-9	1 gece, 4°C'de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	İkincil antikor	30 dakika
	Avidin-biotin kompleksi	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	AEC	5 dakika
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Zıt Boyama	Mayer's hematoksilen	15 dakika
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Kapama	Kapatma mediumu	

BULGULAR

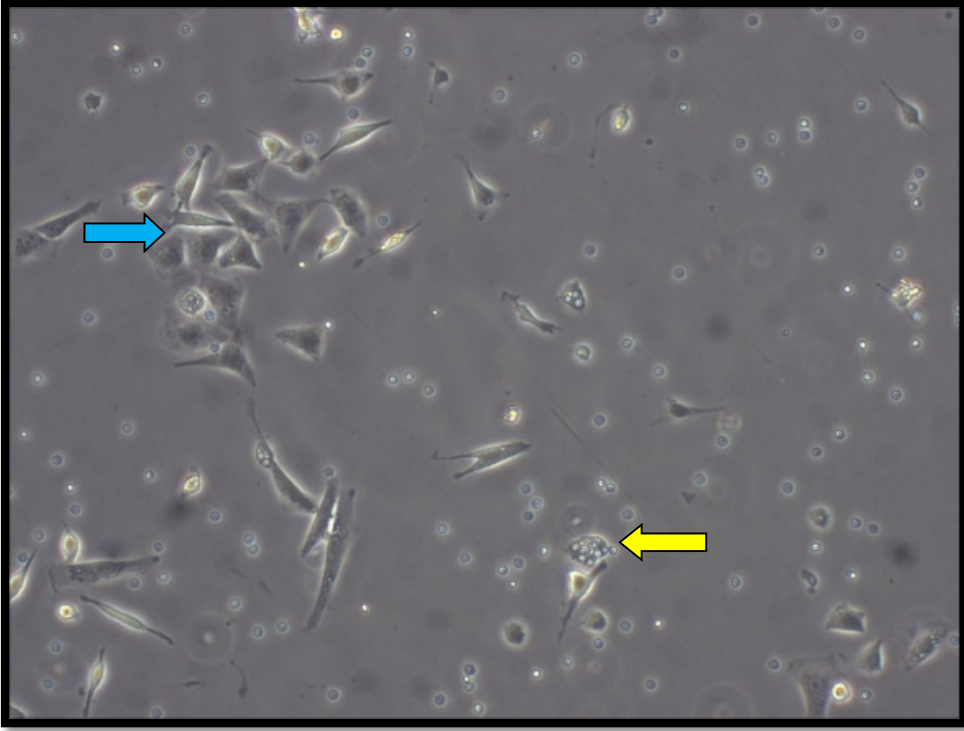
3.1 Hücre Kültürü Sonuçları

Adipojenik dokudan elde edilen hücre süspansiyonunda kültüre başlandığında ortamda hücrelerin süspense halinde oldukları (Resim 6) gözlemlendi. Süspense kültürde serbest halde bulunan tek tek adipojenik hücreler olabildiği gibi, eritrositlerinde olduğu izlendi (Resim 6).

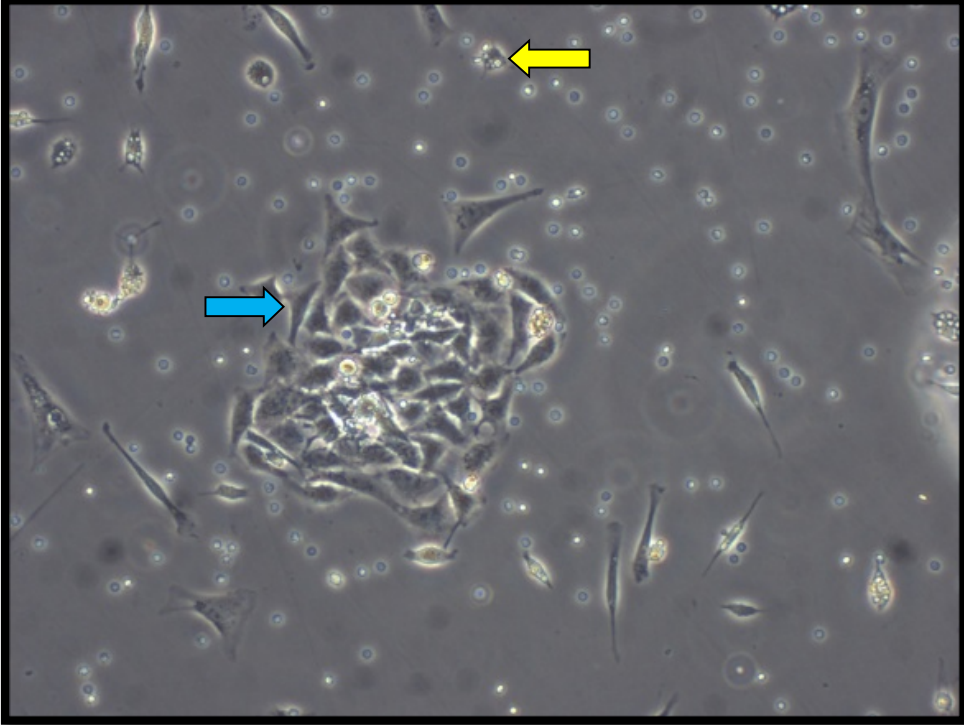


Resim 6. Kültürün başlandığında süspense halde bulunan adipojenik kök hücreler X200.

Kültürün 24. saatinde hücrelerin kültür kabına yapıştıkları ve kültürün 2. gününden itibaren de hem adipojenik hem de kök hücrelere ait hücrelerin olduğu görüldü (Resim 6). Kültürün 1. haftasında ise adipojenik hücreler sitoplazmalarındaki lipid vakuelleri ile kolaylıkla ayırt edilebiliyor iken, kök hücrelerin epiteloid özellikte, sitoplazmalarında lipid vakuelleri olmaması ile adipojenik hücrelerden farklı olarak çoğaldıkları gözlemlendi (Resim 7,8).

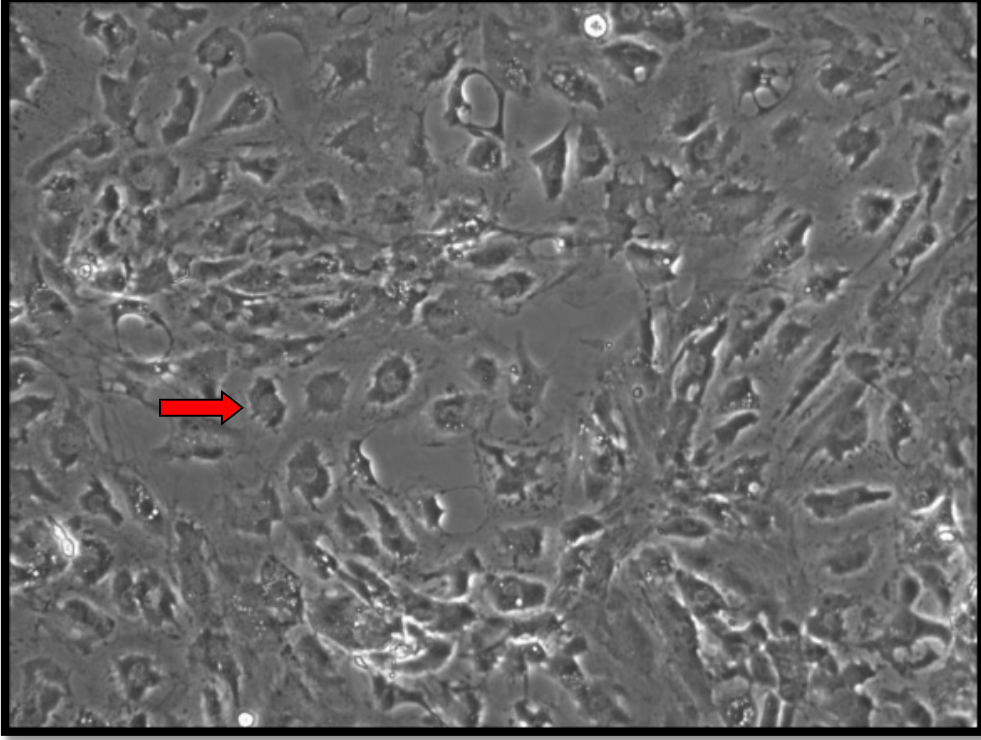


Resim 7. Kùltürün 2. gününde adipojenik kök hücreler ve yağ hücreleri X200.
(Mavi ok adipojenik kök hücreleri, sarı ok yağ hücrelerini göstermekte)

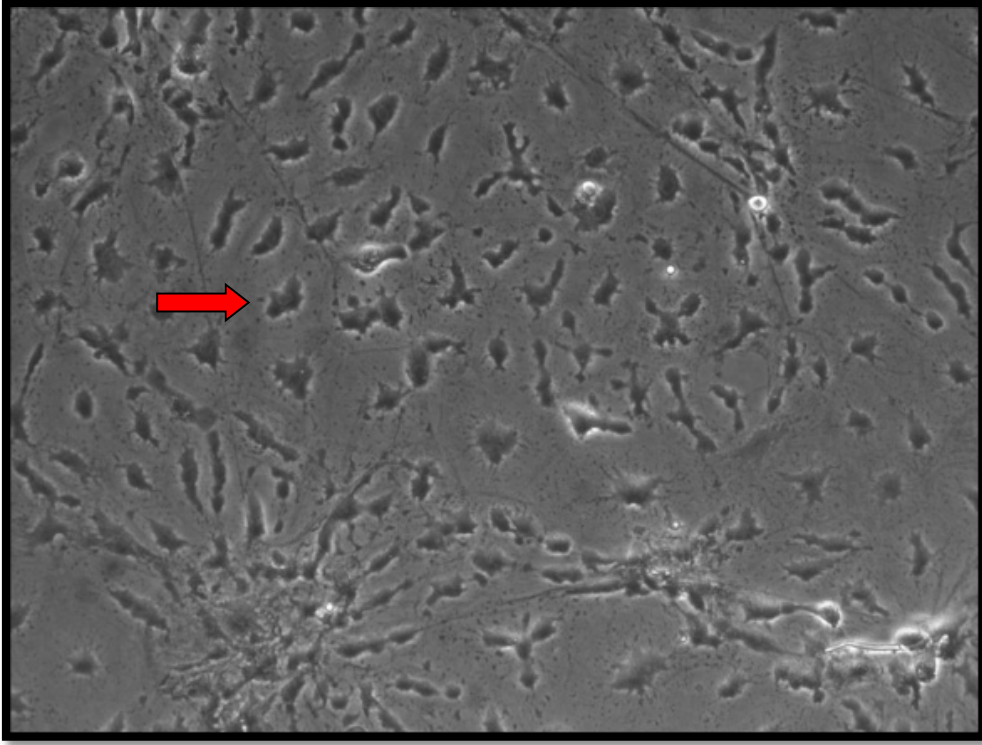


Resim 8. Kùltürün 1. haftasında adipojenik kök hücreler X200.
(Mavi ok adipojenik kök hücreleri, sarı ok yağ hücrelerini göstermekte)

Kültüre farklılaştırma vasatı ilave edildikten sonra olgun adipojenik hücrelerin kültürün 1. haftasından itibaren sayıca azalmaya başladığı, kültüre devam edildiğinde adipojenik hücrelerin ortamda olmadığı, sadece kıkırdak hücrelerine farklılaşan hücrelerin kültürde hakim olduğu izlendi (Resim 9,10).

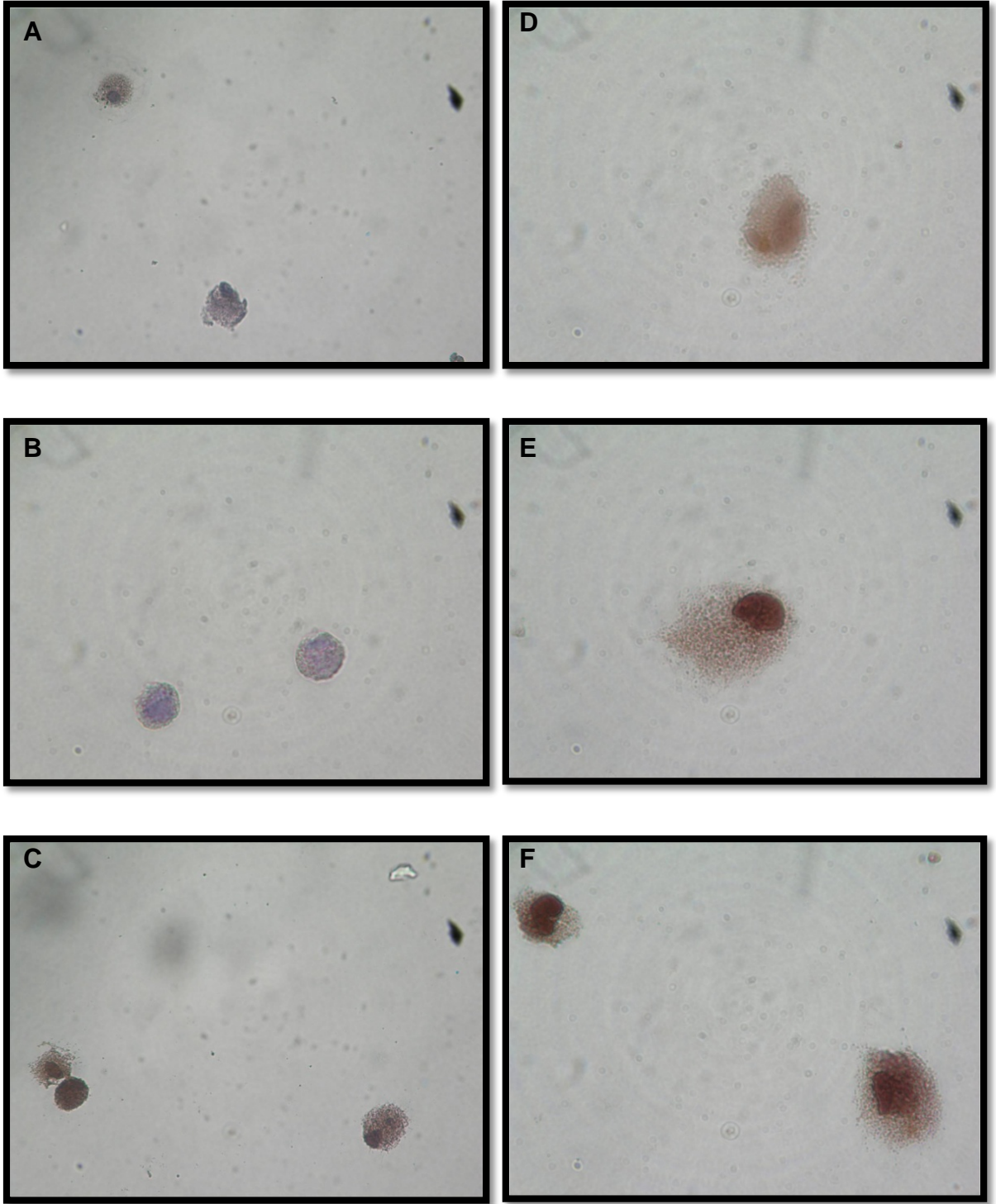


Resim 9. Farklılaştırma ortamında kültürün 7. gününde kıkırdak hücreleri X200. (Kırmızı ok kıkırdak hücrelerini göstermektedir)



Resim 10. Farklılaştırma ortamında kültürün 21. gününde kıkırdak hücreleri X200. (Kırmızı ok kıkırdak hücrelerini göstermektedir)

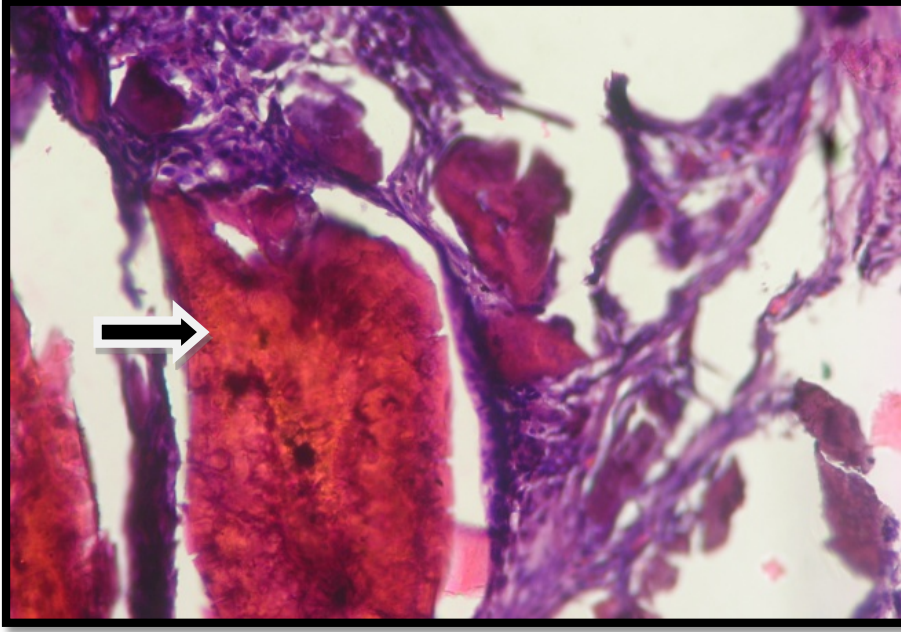
Kültürün 7. ve 21. gününde alınan örneklerin immunohistokimyasal olarak incelenmesi sonucunda ise kıkırdak belirteçlerinden olan kollajen-II, bFGF ve Sox-9 immunoreaktivitelerinin, kültürün 7. gününde kollajen-II (Resim 11A) ve bFGF (Resim 11B) immunoreaktiviteleri zayıf iken, Sox-9 (Resim 11C) immunoreaktivitesinin kuvvetli pozitif olduğu izlendi (Resim 12). Kültürün 21. gününde ise kollajen-II (Resim 11D) ve bFGF (Resim 11E) immunoreaktivitelerinin orta, Sox-9 (Resim 11F) immunoreaktivitesinin kuvvetli pozitif olduğu saptandı. Kültürün 7. gününde Sox-9 immunoreaktivitesinin pozitif olması hücrelerin kıkırdak hücrelerine farklılaşmasında transkripsiyon faktörü olarak görev alan Sox-9 ekspresyonunun fazla olduğunu işaret etmektedir. Kültürün 21. gününde kollajen-II ve bFGF immunoreaktivitelerinin 7. güne nazaran daha fazla olarak gözlenmesi ile kültürün 21. gününde kıkırdak farklılaştırma ortamının adipojenik kök hücrelerin kıkırdak hücrelerine farklılaştığını göstermektedir.



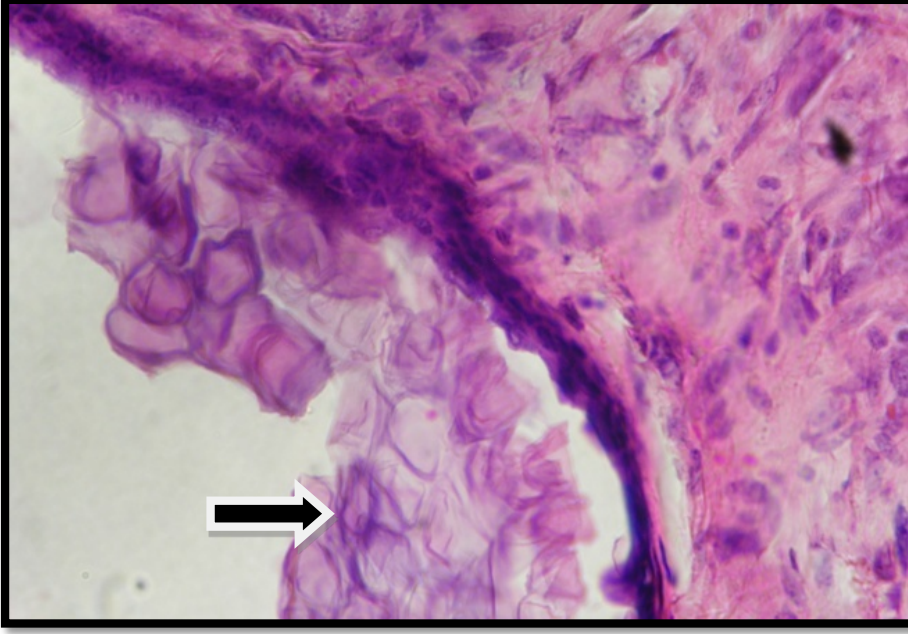
Resim 11. Farklılaşan kondrosit hücrelerinde kültürün 7. (A, B, C) ve 21. gününde (D, E, F) kollajen-II (A,D), bFGF (B, E) ve Sox-9 (C, F) immunoreaktiviteleri. A,B,C: X400; D,E,F: x1000.

3.2 Histokimyasal Sonuçlar

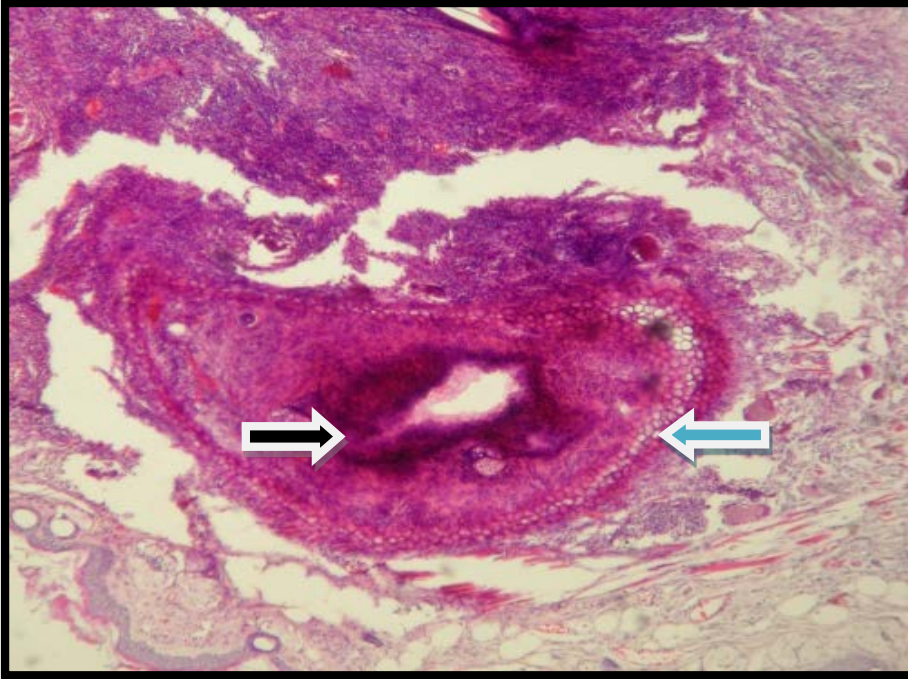
Histolojik incelemeler sonucunda sadece biyomateryal konulan grupta cilt altı ve bağ dokusu içerisinde biyomateryalin çevresinin bağ dokusu ile sarıldığı, genel yapısını koruyarak rezorbe olmaya başladığı gözlendi (Resim 12,13). Kök hcrenden farklılaştırılmış kondrositler ile biyomateryalin birlikte konulduğu grupta ise, biyomateryalin kontrol grubuna benzer olarak bağ dokusu ile sarıldığı, yapısını koruduğu, rezorbe olmaya başladığı vebiyomateryal etrafında kıkırdak hücrelerinin olduğu izlendi (Resim 14,15).



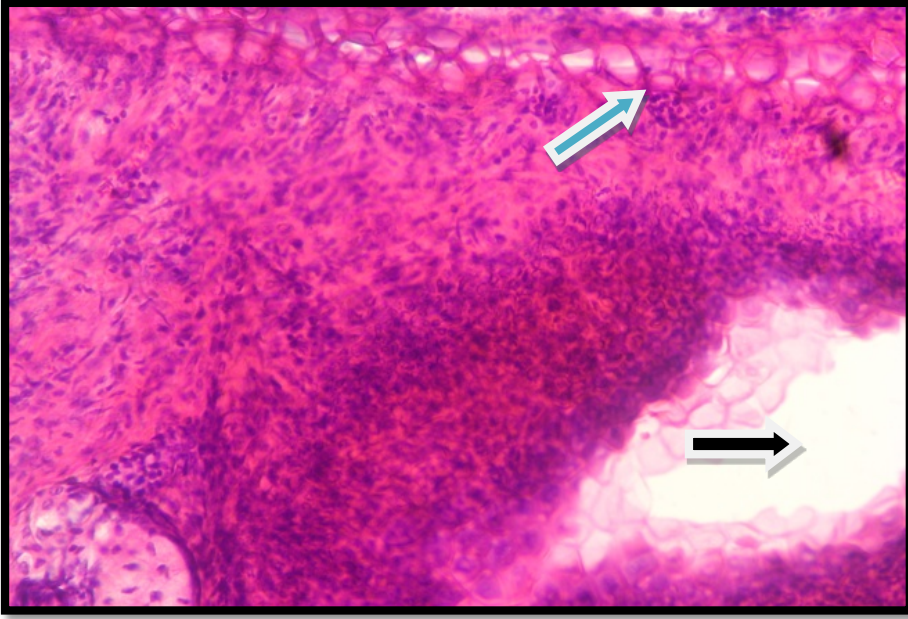
Resim 12. Sadece biyomateryal transfer edilen grup rneği X200.
(Siyah ok biyomateryali göstermekte)



Resim 13. Sadece biyomateryal transfer edilen grup örneği X400.
(Siyah ok biyomateryali göstermekte)



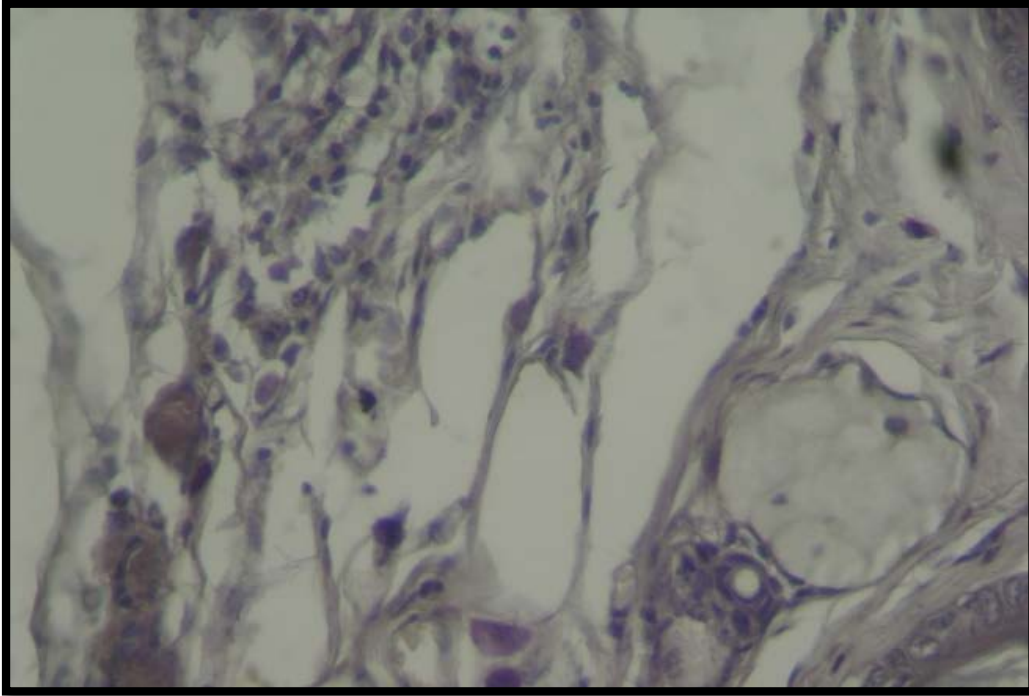
Resim 14. Adipojenik kök hücreden farklılaştırılan kıkırdak hücreleri ile biyomateryal implante edilen grup X100. (Siyah ok biyomateryali, mavi ok düzgün biçimde sıralanmış kıkırdak hücrelerini göstermekte)



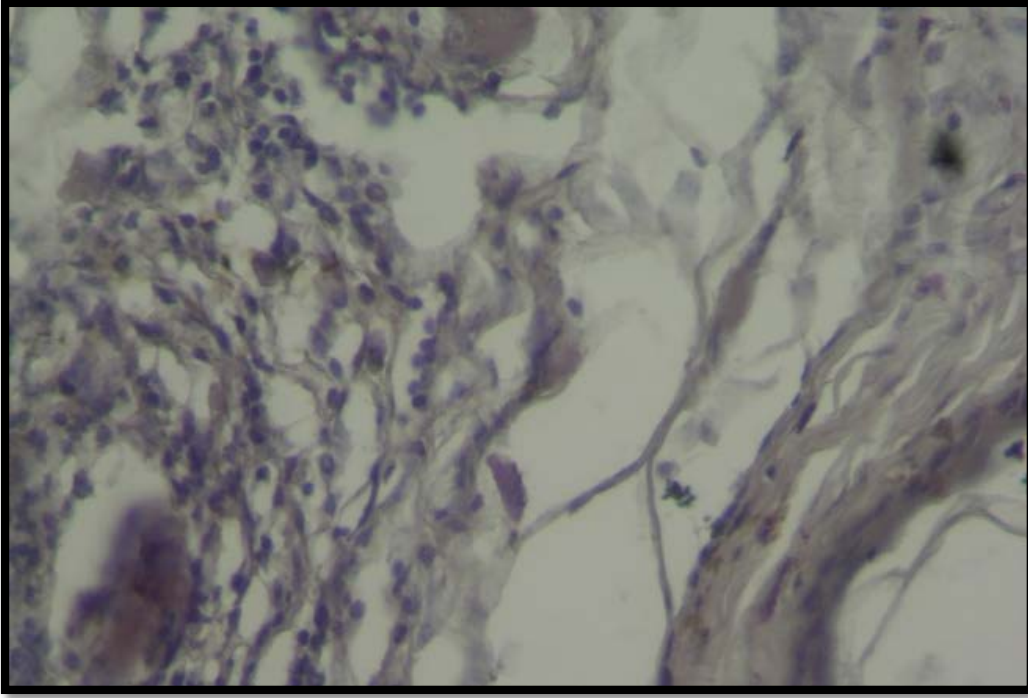
Resim 15. Adipojenik kök hücreden farklılaştırılan kıkırdak hücreleri ile biyomateryal implante edilen grup X400. (Siyah ok biyomateryali, mavi ok düzgün biçimde sıralanmış kıkırdak hücrelerini göstermekte)

3.3 İmmunohistokimyasal Sonuçlar

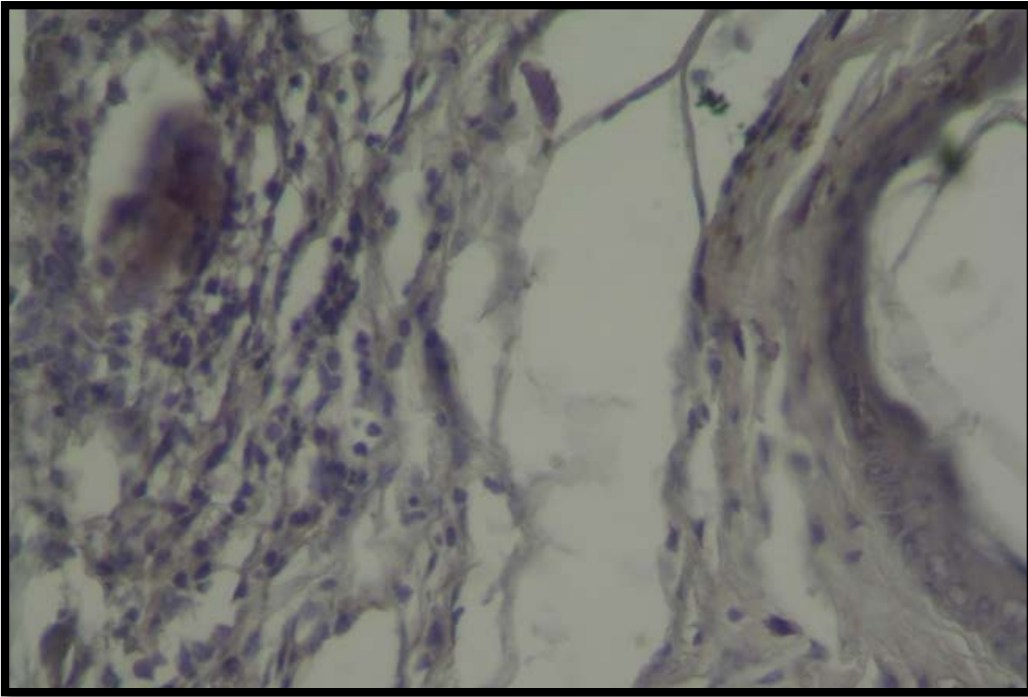
İmmunohistokimyasal analizler sonucunda ise sadece biyomateryal ilavesi yapılan kontrol grubunda biyomateryalin bulunduğu bölgede kollajen-II, bFGF ve Sox-9 immunoreaktiviteleri negatif olarak gözlendi (Resim 16,17,18). Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden farklılaştırılan kıkırdak hücreleri ile biyomateryal transferi yapılan çalışma grubunda ise biyomateryal etrafında kıkırdak hücrelerinin grldğu alanda kollajen-II, bFGF ve Sox-9 immunoreaktivitelerinin pozitif olduğu saptandı (Resim 19,20,21).



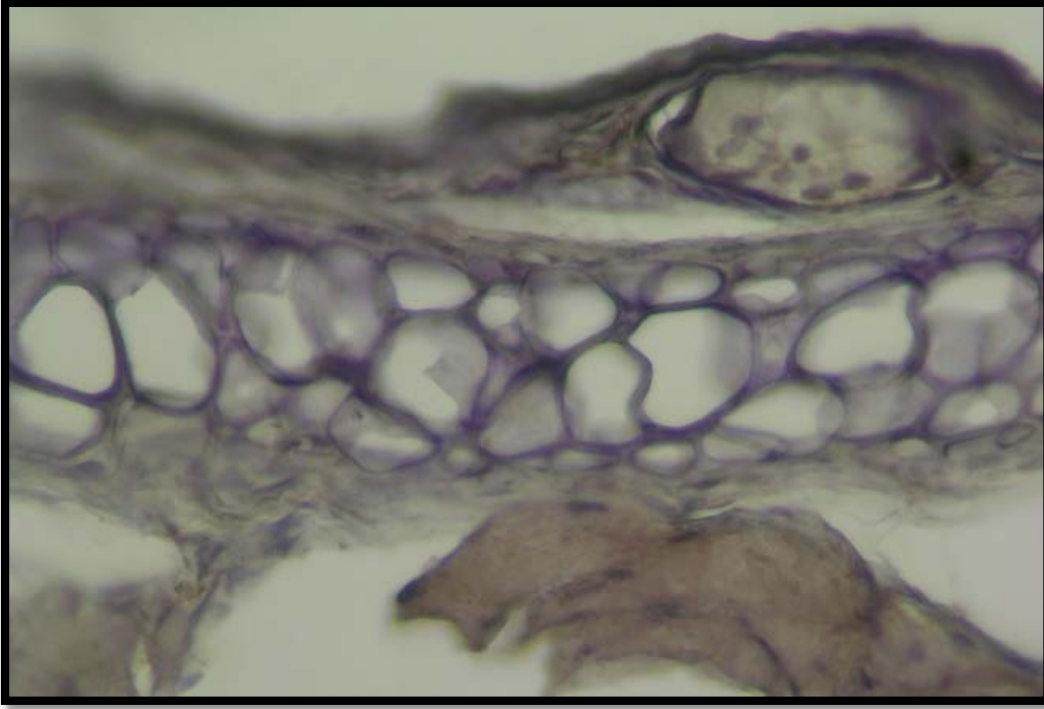
Resim 16. Sadece biyomateryal implante edilen grupta kollajen-II dağılımı X400.



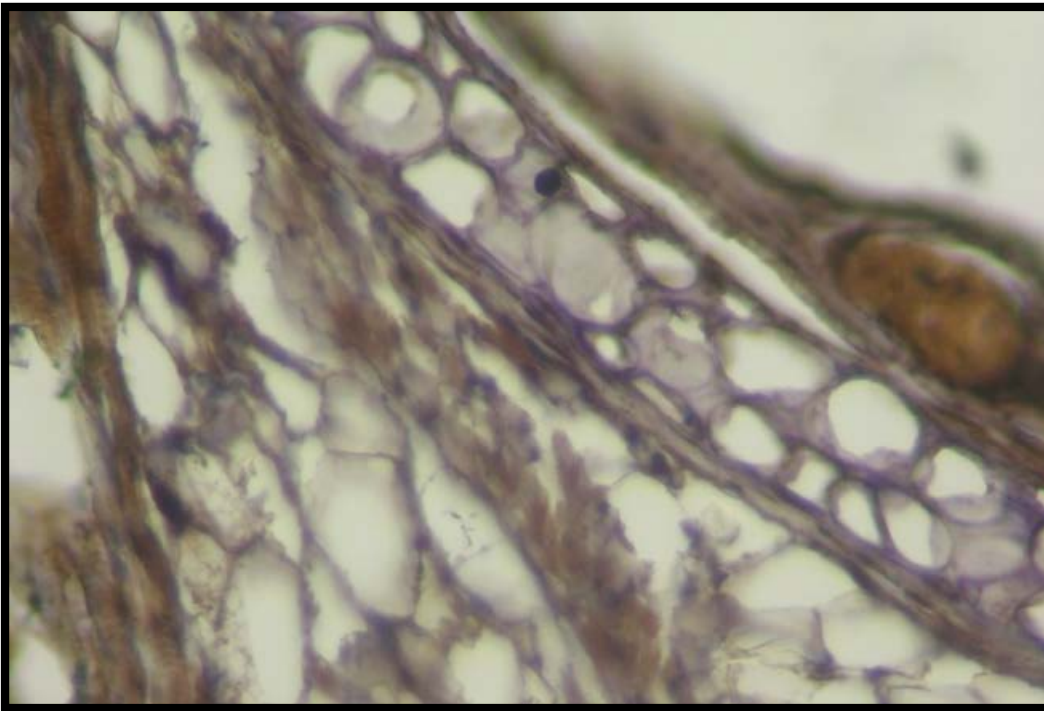
Resim 17. Sadece biyomateryal implante edilen grupta bFGF dağılımı X400.



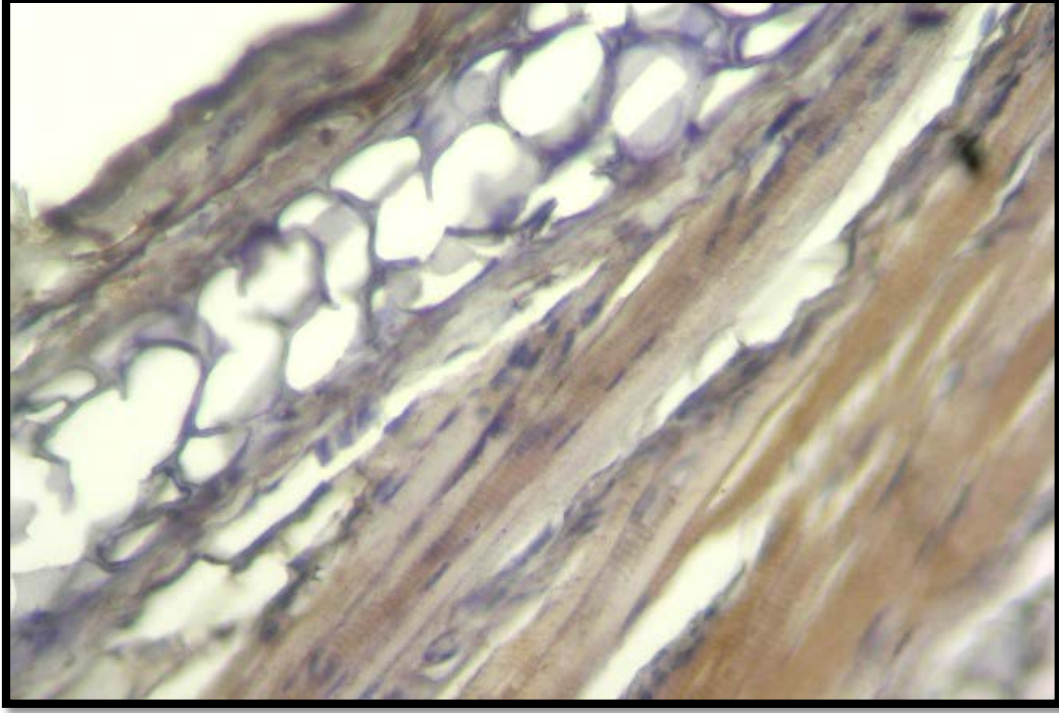
Resim 18. Sadece biyomateryal implante edilen grupta Sox-9 dağılımı X400.



Resim 19. Adipojenik hücrelerden farklılaştırılmış kıkırdak hücresi ile biyomateryalin implante edildiği grupta kollajen-II dağılımı X400.



Resim 20. Adipojenik hücrelerden farklılaştırılmış kıkırdak hücresi ile biyomateryalin implante edildiği grupta bFGF dağılımı X400.



Resim 21. Adipojenik hücrelerden farklılaştırılmış kıkırdak hücresi ile biyomateryalin implante edildiği grupta Sox-9 dağılımı X400.

TARTIŞMA

Kıkırdak dokusu, vücuttaki diğerdokulardan farklı olarak yenilenebilmesi için gerekli sinirsel bağlantıları az, kan ve lenf damarlarından yoksun bir dokudur. Chung ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kondrositlerin hareketsizliği ve çok zor çoğalabilmelerinin kıkırdak doku onarımını zorlaştıran faktörler arasında yer aldığını belirtmiştir⁶⁹. Steinert ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da kıkırdak doku onarımında kök hücre kullanımı ve gen terapisinin alternatif yöntemler olabileceği ve ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekliliği vurgulanmıştır⁷⁰.

Günümüzde rekonstrüktif cerrahide kıkırdak dokusu ile tamir oldukça önemlidir. Tamirde kullanılacak olan materyalin otojen kaynaklı olması gelişen enflamatuvar reaksiyonları en aza indirmekte ve ameliyatın başarı şansını arttırmaktadır. Yapılan çalışmalarda embriyonik ya da erişkin dokulardan elde edilen kök hücrelerin, uygun ortam ve koşullar oluşturularak bir çok hücre tipine in vitro koşullarda farklılaştırılmaları sağlanmıştır⁷¹. Bu fikir ışığında otojen kaynaklı kıkırdak dokusu elde etmenin alternatif yöntemleri düşünüldüğünde, adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden kıkırdak doku eldesinin bir seçenek olabileceği fikrine varıldı.

In vitro koşullarda en çok karşılaşılan sorun kıkırdak hücrelerinin tek tabakalı kültür ortamlarında in vivo koşullardakifenotipik özelliklerinin büyük bir kısmını kaybetmesi sonucu görülen dediferansiyasyondur. Sonuçta hücreler doğal kıkırdak yapısının oluşmasını sağlayan dokuya özgü matriks proteinlerini sentezleyememekte ve doğal kıkırdak yapısı oluşmamaktadır. Zhang ve arkadaşları bu sorunu aşmak amacıyla kıkırdak hücrelerini, çeşitli yöntemler ile hazırlanan doku destek biyomateryalleri üzerinde üç boyutlu şekilde üretme yoluna gitmişlerdir. Böylece doğal kıkırdak yapısına dahayakın kıkırdak dokusu eldesi mümkün olmaktadır⁷². Cowan ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada kök hücrelerin uygun biyomateryal ile birleştirildikten sonra ciddi kalvaryal defektlerin tamirinde efektif olarak kullanılabileceği gösterilmiştir⁷³. Bu bilgiler neticesinde biz de çalışmamızda toksik

etkisinin az, kıkırdak doku ile uyumunun iyi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiş olan %1 CE (Seryum) katkılı-13-93B3 bioaktif camı biyomateryal olarak kullandık^{74,75}.

Bu alışma dizayn edilirken yapılan literatür araştırmasında mezenkimal kök hücre kaynağı olarak yağ dokunun kullanımının avantajlı olduğuna dair bilgilere eriřildi⁷¹. Bunnel ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma kök hücre kaynağı olarak farklı dokuların kullanılabilirliği konusuna eğilmiştir ve yağ dokusunun uygun bir kaynak seçeneği olduğu ve yağ dokusundan mezenkimal kök hücrelerin elde edilme yöntemleri hakkında bilgiler sunmuřtur⁷⁶. Biz de çalışmamızda kolay elde edilebilir olması, vücutta bol miktarda bulunması ve kemik iliğine göre kök hücreden daha zengin olması sebepleri ile yağ dokusunu setik^{77,78}.

Sıçanlarda oluşturulan bu deney modelinde 6 adet Wistar albino türü sıçanın abdominal yağ dokusu mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kullanıldı. Çalışmamızda abdominal yağ dokudan mezenkimal kök hücre eldesi kültürün 2. gününden itibaren gözlendi ve çalışmada kullanılan kültür ortamında çoğaldığı saptandı. Kıkırdak hücrelerine farklılaştırılması amacı için kullanılan kondrojenik kültür vasatı adipojenik hücrelerin ortamda rememesine ve kök hücrelerin kıkırdak hücrelerine farklılaşmasına olanak sağladı. Kıkırdak identifikasyonu için kıkırdak belirteçlerinden kollajen tip II, bFGF ve Sox-9 dağılımları indirekt immuoperoksidaz yöntemi ile analiz edildi. Kültürün 7. gününde özellikle Sox-9 immunoreaktivitesinin gözlenmesi kıkırdak hücrelerin bu dönemde farklılaşmaya başladığını fakat kıkırdak matriksin esas elemanı olan kollajen-II pozitifliğinin 21. günde gözlenmesi, hücrelerin 21 günlük kültür sonrasında farklılaşmasını tamamladığını düşündürdü. Kullanılan biyomateryalin doku ile uyumunun iyi olduğu, dokuya transferinden sonra bağ dokusu ile sarıldığı ve içerisinde yer yer hücrelerin de olduğu saptandı. Biyomateryal etrafında polimornkleer lökositlerin bulunduğu gözlendi. Ancak enfeksiyon bulgularının olmaması sebebi ile bu durum yabancı cisim reaksiyonu olarak değerlendirildi. İmplantasyondan 30 gün sonra ise kıkırdak hücreleri ile birlikte transfer edilen biyomateryalin cilt altında kolaylıkla ayırt edilebildiği, biyomateryalin rezorbe olmaya başladığı,biyomateryal yapısının yanı sıra etrafında kıkırdak hücrelerinin de olduğu saptandı. Kesitler biyomalzeminin bulunduğu kısımdan alındığı ve kesitler kulağa ait kıkırdak dokusunu içermediği için boyanan bu hücrelerin kültür ortamında farklılaştırılan hücreler olduğuna karar verildi. Hücrelerin

implante edilen bölgede kollajen-II, bFGF ve Sox-9 immunoreaktivitelerinin pozitif olmasıda transfer edildikten sonra hücrelerin canlılıklarını koruduğunu, bu hücrelerin in vitro ortamdaki farklılaşma özelliklerinin in vivo olarak da devam ettiğini düşündürdü.

Çalışmamızda, adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreden kıkırdak doku üretimi sağlanmış olup üretilen kıkırdağın tipi değerlendirilmedi. Bunun için histolojik olarak kıkırdak tiplendirmesinde kullanılan özel histokimyasal boyaların kullanımı gereklidir. Daha sonra yapılacak olan çalışmalarda bu bilgi göz önünde bulundurularak kıkırdak tiplerindirmesi yapıp elde edilen kıkırdağın hangi tip kıkırdak olduğu sorusunun cevabı aydınlatılabilir. Kıkırdak hücrelerinin canlılıklarını koruduğu gözlenmesine rağmen var olan bu kıkırdak hücrelerinin dayanıklılığı ve direnci araştırılmadı. Çalışmada kullanılmak üzere seçilen biyomateryale implantasyon öncesi spesifik bir şekil verilmemiş olup, şekillendirilmiş biyomateryal kullanımının sonuçları hakkında fikir elde edilemedi. Bunun için implantasyon öncesi biyomateryalin şekillendirilerek, retroauriküler bölgeden daha geniş bir alana implante edilerek incelenmesi gerektiği düşünüldü. Ayrıca biyomateryalin rezorbe olmaya başlaması, dokuda tamamen rezorbe olacağını düşündürmekle beraber çalışmanın 30 gün sürmesi sebebi ile bu sürenin materyalin tamamen rezorbsiyonunda yeterli olmadığı düşünüldü.

SONUÇ

Yağ doku kemik iliğine kıyasla daha fazla sayıda kök hücre içermesi, vücutta bol miktarda bulunması, kolay elde edilebilirliği ile kök hücre için zengin bir alternatiftir. Mezenkimal kök hücre kaynaklı kıkırdak hücresi üretiminde kök hücre kaynağı olarak yağ doku kullanımı uygun bir seçenektir.

Yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreden kıkırdak hücresinin elde edilebilmesi ve bu hücrelerin in vivo olarak canlılıklarını koruması otojen kaynaklı kıkırdak doku eldesi için mezenkimal kök hücrelerin uygun bir seçenek olduğunu düşündürdü.

Ortaya çıkan veriler neticesinde adipojenik kök hücrelerden elde edilen kondrositlerin uygun biyomateryal kullanarak tedavi amaçlı kullanılacağı, biyomateryal seçiminde %1 CE (Seryum) katkılı-13-93B3 bioaktif camın; dokuda toksik etki göstermemesi, kıkırdak hücreleri ile uyumunun iyi olması, dokuda rezorbe olmaya başlaması göz önünde bulundurulduğunda uygun biyomateryal seçeneği olduğu düşünüldü.

Ayrıca farklılaştırılan kıkırdak hücrelerin in vitro canlılıklarının in vivo olarak da devam etmesinden dolayı bu hücrelerin kıkırdak defektlerinin tamirinde kullanılacağı fikrine varıldı.

Sonuç olarak adipojenik dokudan elde edilen kök hücreler kullanılarak tedavisi zor olan hastalıklara yeni modaliteler oluşturulabilir. Özellikle kulak burun boğaz hastalıklarında sıklıkla kullanılan greft materyali olan kıkırdağın otojen olması oldukça önemlidir. İnsan adipoz dokuları kullanılarak, kıkırdak hücreleri ve dokuları oluşturularak daha az morbiditeyle cerrahi yöntemlerin kullanılabilirliği ileri çalışmalar ile desteklenebilir.

ÖZET

Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ameliyatlarında özellikle rekonstrüktif cerrahide kıkırdak doku tamiri önemlidir.Kök hücreler, son yıllarda üzerinde en çok durulan ve her yıl onlarca çalışmanın yapıldığı bir konu haline gelmiştir.Bu tezin amacı cerrahide kıkırdak gereksinimi olan olgularda kök hücre kullanımının potansiyelini araştırmak, rejeneratif tıp olarak isimlendirilen bu alanda sıçan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden kıkırdak hücreleri üretmeye çalışmak ve üretilen bu hücrelerin fonksiyonelliğini histolojik ve immunohistokimyasal yollarla objektif olarak göstermeye çalışmaktır.

Çalışmada 6 adet 300-350 gr ağırlığında erkek Wistar albino türü sıçanlar kullanıldı. Abdomen orta hatta insizyon yapıldıktan sonra intraperitoneal ve retroperitoneal yağ doku steril şartlar altında çıkartıldı. Yağ doku örnekleriküçük parçalara ayrılarak inkübe edildi.Kök hücreler kıkırdak hücrelerine farklılaştırmak üzerekondrojenik farklılaştırma vasatı ilave edilerek kültüre edildi. Farklılaştırılan hücrelerin karakterizasyonu için, kültürün 7. ve 21. günlerinde alınan hücrelerde kollajen tip II, bFGF ve Sox-9 immunohistokimyasal analizi yapıldı. Kültürün 21. gününde kollajen-II ve bFGF immunoreaktivitelerinin 7. güne nazaran daha fazla olarak gözlenmesi ile kültürün 21. gününde kıkırdak farklılaştırma ortamının adipojenik kök hücrelerin kıkırdak hücrelerine farklılaştığını gösterdi.Farklılaştırılan hücreler%1 CE (Seryum) katkılı-13-93B3 bioaktif cam üzerinde ekilerek inkübasyonu sağlandı.

Aynı deneğin sağ kulağına (çalışma kulağı) kök hücre + biyomateryal, sol kulağına ise (kontrol kulağı) sadece biyomateryal anestezi altında retroaurikuler bölgeye cilt altına implante edildi. Deneklerin hergün 1 defa pansumanı yapıldıktan sonra transfer sonrası 30. günde sadece implantasyon alanı (kulak kıkırdak dokusu alınmadan) eksize edilerek, histolojik ve immunohistokimyasal analiz için %10 formalin içerisinde tespit edildi.

Histolojik incelemeler sonucunda sadece biyomateryal konulan grupta cilt altı ve bağ dokusu içerisinde biyomateryalin çevresinin bağ dokusu ile sarıldığı, genel

yapısını koruduğu ve rezorbe olmaya başladığı gözlendi. Adipojenik kök hücreden farklılaştırılmış kondrositler ile biyomateryalin birlikte konulduğu grupta ise, biyomateryalin kontrol grubuna benzer olarak bağ dokusu ile sarıldığı ve yapısını koruduğunun gözlenmesi yanı sıra,biyomateryal etrafında kıkırdak hücrelerinin olduğu izlendi. Adipojenik kök hücrelerden elde edilen kondrositlerin uygun biyomateryal kullanarak tedavi amaçlı kullanılabileceği fikrine varıldı. %1 CE (Seryum) katkılı-13-93B3 bioaktif camın uygun biyomateryal seçeneği olduğu düşünöldü.

Sonuç olarak adipojenik dokudan elde edilen kök hücreler kullanılarak tedavisi zor olan hastalıklara yeni modaliteler oluşturulabilir. Özellikle kulak burun boğaz hastalıklarında sıklıkla kullanılan greft materyali olan kıkırdağın otojen olması oldukça önemlidir. İnsan adipoz dokuları kullanılarak, kıkırdak hücreleri ve dokuları oluşturularak daha az morbiditeyle cerrahi yöntemlerin kullanılabilirliği ileri çalışmalar ile desteklenebilir.

ABSTRACT

Repair of the cartilage tissue is very important in the field of Otorhinolaryngology especially in reconstructive surgery of ear, nose and throat operations. In recent years there is an increasing emphasis on stem cell studies and every year tens of new studies are published. The aim of this study is to investigate the potential usage of stem cell applications in surgery where cartilage is required, to produce cartilage cells from mesenchymal stem cells of adipose tissue of rat, the field named regenerative medicine and to show objectively the functionality of these cells via histological and immunohistological methods.

In the study 6 male Wistar albino type rats are used, that are 300-350 gr in weight. Intraperitoneal and retroperitoneal adipose tissue are extracted under sterile conditions following a midline abdominal incision. Fat tissue samples are cut into small pieces and incubated. Chondrogenic differentiation broth is added and cultivated in order to differentiate stem cells into cartilage cells. The characterisation of the differentiated cells collagen type 2, bFGF and Sox-9 immunohistochemical analysis are realised in cells derived from the culture on 7th and 21th days. The observation revealed a higher collagen type 2 bFGF and Sox-9 immunoreactivity on 21th day compared to 7th day showing the cartilage differentiation medium has differentiated adipose tissue into cartilage. Differentiated cells are incubated on 1% CE (cerium)doped-13-93B3 bioactive glass.

Stem cell and biomaterial is implanted subcutaneously to the retroauricular area to the right ear of the sample (study ear) under anesthesia, and sole biomaterial to the left ear (control ear). Samples' dressings are changed once daily. On third day just the implantation areas (without ear cartilage tissue) are excised and put into 10% formalin for histological and immunohistochemical analysis.

Histological examinations revealed the biomaterial were covered with connective tissue its general structure were preserved and resorption has started in the group where only biomaterial were placed. In the other group where chondrocytes differentiated from adipose stem cells and biomaterial were placed

like the control group biomaterial were covered with connective tissue, its structure was preserved and cartilage cells were present around the biomaterial. It is concluded that chondrocytes derived from adipogenic stem cells can be used for therapeutic purposes together with appropriate biomaterial. 1% CE (cerium) doped-13-93B3 bioactive glass is thought to be an appropriate biomaterial.

New treatment modalities could be modified for diseases that are currently hard to treat using stem cells derived from adipogenic tissue. Autogenic graft material is very important in the field of Otorhinolaryngology and the surgical treatment of its diseases where cartilage is frequently used. Further studies may support new surgical materials with lower morbidity to obtain where human adipose tissue could be used for the production of cartilage cells and soft tissue.

KAYNAKLAR

1. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. J Natl. Cancer Inst. 1951;12:197.
2. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE Pillars article: Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. Nature. 1963;197:452-454.
3. Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. Nature. 1969;Feb 15;221(5181):632-5.
4. Evans MJ, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981;292:154-156.
5. Pedersen RA, Embryonic stem cells for medicine Sci Am. 1999; Apr; 280(4):68-73.
6. Thomson JA, Marshall VS. Primate embryonic stem cells. Curr Top Dev Biol. 1998;38:133-65.
7. Thore CB, Sudheer S, Janke D, et al. 2008. The origins of human embryonic stem cells: A biological conundrum. Cells tissues organs. 188:9–22.
8. Karaöz E, Ovalı E. Kök hücreler 2004.
9. Sue O, Shea K. Self-renewal vs. Differentiation of mouse embryonic stem cells. Biol Reprod 2004;71:1755- 65.
10. Montoya FU, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. J of bioscience and bioengineering. 2005;100:12- 27
11. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic barriers and opportunities. Science 2000;287:1442-1446
12. Ural AU, Kök Hücreler. TOTBİD dergisi, cilt 5, sayı 3-4;2006.
13. Sahin F, Saydam G, Omay SB, Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi, Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi, Sayı 1, Cilt 15, 2005;Derleme.
14. Can A, Kök hücre biyolojisi ve klinik uygulamalar, Kök hücre tanımları, S:19.
15. Can A, A concise review on the classification and nomenclature of stem cells, Turk J Hematol 2008;25:57-9.

16. Alwattar BJ, Scwarzkopf R, Kirsch T. Stem cells in orthopaedics and fracture healing. Bull NYU hosp JT dis 2011;69(1):6-10 review.
17. Kansu E, Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar. Hacettepe Tıp Dergisi 2005;36:191-197.
18. Thore CB, Sudheer S, Janke D, et al. 2008. The origins of human embryonic stem cells: A biological conundrum. Cells tissues organs. 188: 9–22.
19. The origins of human embryonic stem cells: A biological conundrum. Cells tissues organs. 190:10-23.
20. Stem Cell Basics. <http://www.eurekalert.org>. Erişim Tarihi: 27.12.2008.
21. Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic stem cells. Cell Prolif 2004;37:23- 34.
22. Montoya FU, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. J of bioscience and bioengineering. 2005;100:12- 27.
23. Gadue P, Huber TL, Nostro MC, et al. Germ layer induction from embryonic stem cells. Experimental Hematology 2005; 33: 955- 64.
24. Zwaka TP, Thomson JA. A germ cell origin of embryonic stem cells? Development 2005; 132: 227- 33)
25. Loebel DAF, Watson CM, Young AD et al. Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells. Developmental Biology 2003;264:1- 14.
26. Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. Trends in cell biology 2002;12:432- 38.
27. Doss MX, Koehler CI, Gissel C, et al. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. J Cell Mol Med 2004; 8: 465- 73.
28. Vogelstein B, Bloom BR, Goodman CS, et al. 2002. Stem cells and the future of regenerative medicine, NationalAcademy Press, USA.
29. Henningson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. J Allergy Clin Immunol 2003;111:745-53.
30. Fridenshtein A. Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. Arkh Pathol, 1982;44:3-11.
31. Gunsilius E, Gastl G, Petzer AL. Hematopoietic stem cells. Biomed Pharmacother 2001;55:186-94.

32. Szilvassy SJ. The biology of hematopoietic stem cells. *Archives of medical research* 2003;34:446-60.
33. Bellantuono I. Haemopoietic stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2004;36:607-20.
34. Croft AP, Przyborski SA. Mesenchymal stem cells from the bone marrow stroma: basic biology and potential for cell therapy. *Current anaesthesia & critical care* 2004;15:410-17.
35. Haider HK, Ashraf M. Bone marrow cell transplantation in clinical perspective. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2005;38:225-35.
36. Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control of expansion and differentiation. *Experimental cell research* 2005;306:30-35.
37. <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter5.asp>.
38. Smith OF, Thomson GB. Umbilical cord blood collection, banking, and transplantation: Current status and issues relevant to perinatal caregivers. *Birth* 2000;27:2).
39. Watt SM, Contreras M. Stem cell medicine: Umbilical cord blood and its stem cell potential. *Seminars in fetal & neonatal medicine* 2005;10:209-20.
40. Friedenstein A, Gorskaja U, Kalugina N. 1976. In vitro growth of bone marrow aspirate derived cell colonies. *Exp. Hematol*, 4;267-274.
41. Ben-Ami E, Berrih-Aknin S, Miller A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases, *Auto immunity Rev.* 2011;10:410-5.
42. Tae SK, Lee SH, Park JS, Im GI. 2006. Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. *J. Biomed. Mater*, 1;63-71.
43. Chen Z, Chang M, Peng YL, et al. Osteogenic growth peptide c-terminal pentapeptide [OGP(10-14)] acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes: *Regul Pept.* 2007;142(1-2):16-23.

44. Chen FH, Rousche KT, Tuan RS. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006 Jul;2(7):373-82.
45. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*,284(5411);143-147.
46. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*. 2003;116(9):1827-35.
47. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 2003;33(6):919-26.
48. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: Ten years of research and literature review. *J.Nippon Med Sch*. 2009;76(2):56-66.
49. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.
50. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends biotechnol*. 2006;24(4):150-4.
51. Meliga E, Strem BM, Duckers HJ, et al. Adipose-derived cells. *Cell transplant*. 2007;16(9):963-70.
52. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100(9):1249-60.
53. Chen J, Chopp M. Neurorestorative treatment of stroke: cell and pharmacological approaches. *NeuroRx* 2006;3:466-473.
54. Dharmasaroja p. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. *J Clin Neurosci* 2009;16:12-20.
55. Çetinkaya D.U. Mezenkimal kök hücrelerin klinikte kullanımı. *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar,TÜBA (Türkiye Bilimler Akademisi)*; 2009: 99-103.
56. Parker MA, Anderson JK, Corliss DA, et al. Expression profile of an operationally-defined neural stem cell clone. *Exp Neurol*. 2005;194(2):320-332.

57. Ellis P, Fagan BM, Magness ST, et al. SOX2, A persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci.* 2004;26(2-4):148-165.
58. Akay, T., 2006, Genel Histoloji, Palme yayıncılık, ISBN 975-7477-92-3, Ankara.
59. Junqueira, L.C, Carneiro J, 2005, Basic Histology Text & Atlas, McGraw – Hill Medical; 11th edition, ISBN 978-0071440912, USA, 502p. 262s.
60. Boretos J W, Eden M. Contemporary biomaterials, material and host response, clinical applications, New Technology and Legal Aspects. Noyes Publications, ParkRidge, New Jersey, 1984.
61. Williams D F. Definitions in Biomaterials: Proceedings of a consensus conference of European Society for Biomaterials. Chester, England; 1986:3-5.
62. Williams D F, Black J, Doherty P J. Second consensus conference on definitions in biomaterials. Elsevier, Amsterdam;1992:525.
63. Hulbert, S.F, Bokros, J.C, Hench, L.L, et al 1987.Ceramics in clinical applications – past, present and future, ceramics in clinical applications, Vincenzini, Elsevier, NewYork, 3-27.
64. In vivo evaluation of 13-93 bioactive glass scaffolds with trabecular and oriented microstructures in a subcutaneous rat implantation model Qiang Fu,1,2 Mohamed N. Rahaman,1,2 B. Sonny Bal,3 Keiichi Kuroki,4 Roger F. Brown2,5Received 14 August 2009; revised 18 December 2009; accepted 16 March 2010.
65. Hench L L. Bioceramics: From concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 1991;74:1487-1510.
66. Arstila H, Vedel E, Hupa L, et al. 2007. Factors AffectingCrystallization of Bioactive Glasses, *J. European Ceram. Soc.*, 27,1543-1546.
67. Schubert D, Dargusch R, Raitano J, et al. Cerium and yttrium oxidenanoparticles are neuroprotective. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:86–91.
68. Zhang J, Liu C, Li Y, et al. Effects of cerium ions on the proliferation, differentiation and mineralization function of primary mouse osteoblasts in vitro. *J Rare Earths* 2010;28:138–42.
69. Chung C, Erickson IE. Differential behavior of auricular and articular chondrocytes in hyaluronic acid hydrogelsMauck RL*Tissue Eng Part A.* 2008 Jul;14(7):1121-31. doi: 10.1089/tea.2007.0291, Burdick JA.

70. Steinert AF, Nöth U, Tuan RS. *Injury*. 2008. Concepts in gene therapy for cartilage repair *Apr*;39 Suppl 1:S97-113. doi: 10.1016/j.injury.2008.01.034.
71. Toyserkani NM, Christensen ML, Sheikh SP, et al. Adipose-Derived Stem Cells: New Treatment for Wound Healing? *Ann Plast Surg*. 2014 Mar 29.
72. Zhang J, Wu Y, Thote T, et al. *Biomed Mater*. The influence of scaffold microstructure on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. 2014 May 12;9(3):035011.
73. Aghaloo TL, Amantea CM, Cowan CM, et al. Oxysterols enhance osteoblast differentiation in vitro and bone healing in vivo. *J Orthop Res*. 2007 Nov;25(11):1488-97.
74. Qiang Fu, Mohamed N. Rahaman, B. Sonny Bal et al. Silicate, borosilicate, and borate bioactive glass scaffolds with controllable degradation rate for bone tissue engineering applications. in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.a.32823.
75. Qiang Fu, Mohamed N. Rahaman, B. Sonny Bal et al. In vivo evaluation of 13-93 bioactive glass scaffolds with trabecular and oriented microstructures in a subcutaneous rat implantation model. 14 August 2009; Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.a.32827.
76. Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. 2008 Jun;45(2):115-20.
77. Lopez MJ, Spencer ND. In vitro adult rat adipose tissue-derived stromal cell isolation and differentiation. *Methods Mol Biol*. 2011;702:37-46.
78. Zhu M, Heydarkhan-Hagvall S, Hedrick M, et al. Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates. *J Vis Exp*. 2013 Sep 26;(79):e50585. doi: 10.3791/50585.