

TC.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ
ANABİLİM DALI

MANYETİK YÜKLÜ ALTIN KAPLI NANOPARTİKÜLLERİN
YÜKLENDİĞİ KEMİK İLİĞİ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERLE KALVARİYAL KEMİK DEFECTİ ONARIMI
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Murat GÜREL

UZMANLIK TEZİ

KIRIKKALE

2012

TC.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ
ANABİLİM DALI

MANYETİK YÜKLÜ ALTIN KAPLI NANOPARTİKÜLLERİN
YÜKLENDİĞİ KEMİK İLİĞİ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERLE KALVARİYAL KEMİK DEFEKTİ ONARIMI
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Murat GÜREL

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. İbrahim VARGEL

Bu çalışma Kırıkkale Üniversitesi BAP tarafından desteklenmiştir.

KIRIKKALE

2012

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ ANABİLİM DALI

Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı uzmanlık programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **UZMANLIK TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

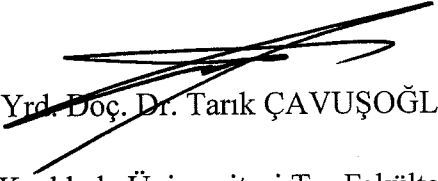
Tez Savunma Tarihi: .././2012


Doç. Dr. İbrahim VARGEL

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

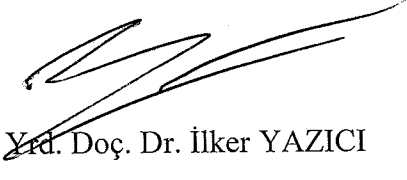
Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi AD. Başkanı

Jüri Başkanı


Yrd. Doç. Dr. Tarık ÇAVUŞOĞLU

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi AD.


Yrd. Doç. Dr. İlker YAZICI

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi AD Üye

Üye

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimine başladığım ilk günlerde, eğitimim için çok meşakatli yollardan geçeceğimi hiç düşünmemiştim. İlerleyen zamanlarda gelişen olaylarla birlikte zorlu bir hal alan uzmanlık eğitimimi tamamlamış bulunmaktayım. Bu zaman zarfında kimi zaman umutsuzluklarla dolu, kimi zaman heyecanlı bazen de meraklı bekleyişlerle geçirdiğim günlerin sonunda, Kırıkkale Üniversitesi Plastik ve Rekonstruktif Cerrahi Anabilim dalında eğitime başladığım günden beri, bilgi, deneyim ve tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. İbrahim VARGEL'e, daha önceki uzmanlık eğitimimde geçen süremin sayılmasında çok büyük katkıları olan kıymetli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Tarık ÇAVUŞOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. İlker YAZICI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hacettepe üniversitesindeki çalışmalarımız sırasında bizden yardımını esirgemeyen kıymetli hocalarımız Prof. Dr. Hakan Hamdi ÇELİK ve Prof. Dr. Petek KORKUSUZ'a, Biyokimyasal çalışmalarından dolayı Prof. Dr. Üçler KISA'ya, Doku Kültürü üretiminde fedakarlığını hiç esirgemeyen Doç. Dr. Mustafa TÜRK'e, ve mikrotomografi çalışmalarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Orkun ERSOY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kliniğe başladığım ilk günden, bitirdiğim son güne kadar her zaman yanımda olan ve beni dektekleyen Dr. Cahit VURAL'a, çok teşekkür ederim.

Kliniğimizde beraber çalıştığım araştırma görevlisi arkadaşlarım Dr. Sevin FARIZ, Dr. Osman Ünsal DEMİR ve Dr. Burak Çakmak'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu günlere gelmemde emeği geçen anne ve babama sonsuz teşekkürlerimi, her zaman daima yanımda olan eşim Semiha ve Oğlum Akın Doruk'a sevgilerimi sunarım.

Dr. Murat GÜREL

Kırıkkale 2012

ÖZET

Gürel M., Manyetik yüklü altın kaplı nanopartiküllerin yüklendiği kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerle kalvariyal kemik defekti onarımı değerlendirilmesi, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim dalı Uzmanlık Tezi, Kırıkkale, 2012

Konjenital ve edinsel pek çok nedene bağlı olarak, plastik cerrahi kliniklerinde karşılaşılan kalvariyal defektlerin onarımı hem hasta hem de hekim için büyük önem taşımaktadır.

Güncel yaklaşımda bu tür defektler en çok otogreft yöntemi ile onarılmaktadır. Tüm greftleme işlemlerinde olduğu gibi bu yöntemde de uzun ve kısa vade de çeşitli sorunlar ortaya çıkmakta ve tedavinin sonuçlarını olumsuz etkilemektedir. Yara enfeksiyonu, kanama, parestezi, bölgesel doku hasarı, hareket etmede kısıtlılık,verici kemikte kırık ve kronik ağrı ve kötü kozmetik sonuçlar greftleme yöntemlerinden sonra karşılaşılabılır Bu tür sorunları aşmak için günümüzde doku mühendisliği var olan defektleri onarmak için doku uyumlu iyileşmeye pozitif etkileri olan faktörleri barındıran yapay doku iskelesi tasarlayacak teknolojiler geliştirmektedir.

Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler kemik iyileşmesine olumlu katkı yapabilecek bir çok faktörü barındırmaktadır. Bu projede nano hedefli (targeting) yapay doku iskelesi üzerine kemik stromal hücrelerinin yerleştirilerek ve nano hedefli doku iskelesinin kalvariyal defektlerin onarımında ne tür bir etki yaptığının ortaya konması amaçlanmıştır.

Scaffold grubunda toplam 7 adet, Scaffold + Manyetik yüklü altın kaplı nanopartikül grubunda toplam 12 adet, diğer grupların her birinde toplam 6 adet olmak üzere negatif kontrol grubu dahil toplam beş grup oluşturulmuştur. Tüm deneklerde 6 mm'lik kranial defekt oluşturulduktan sonra gruba spesifik işlemler yapılmıştır. Dördüncü haftada Scaffold + Manyetik yüklü altın kaplı nanopartikül grubundan 6 adet, diğer her bir gruptan 3 adet rat kurbanı edilib incelemeye alınmıştır. 16. Haftada Scaffold grubundan 4 adet, Scaffold + Manyetik yüklü altın kaplı nanopartikül grubundan 6 adet, diğer her bir gruptan 3 adet olmak üzere ratlar

sakrifiye edilip gerekli histolojik, biyokimyasal ve radyolojik incelemeye tabii tutulmuştur.

Sonuçlar incelendiğinde, birinci ayda çoklu karşılaştırmada deney ve kontrol grupları arasında histolojik parametreler olan defekt içindeki yeni kemik oranı ($p=0.016$) ve mm2 cinsinden yeni kemik alanı ($p=0.016$) anlamlı farklılıklar gösterdi. Mikrotomografi ve kan ALP değerleri bu dönemde gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi. Buna göre birinci ayda magnetik taneciklerle MKH uyulanan grup (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.001$) otograft grubundaki (sırasıyla $p=0.034$ ve $p=0.034$) yeni oluşan kemik alanı ve total defekte oranı defektin boş bırakıldığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha fazlaydı. Birinci ayda altın standart olarak kabul edilen otograft grubundaki yeni kemik alanı ve bu alanın total defekt alanına oranı boş skafold uygulanan gruba göre anlamlı biçimde fazlaydı (sırasıyla $p=0.022$ ve $p=0.022$).

Dördüncü ayda çoklu karşılaştırmada deney ve kontrol grupları arasında histolojik parametreler olan defekt içindeki yeni kemik oranı ($p=0.028$) ve mm2 cinsinden yeni kemik alanı ($p=0.015$) ile birlikte mikrotomografik ölçüm değerleri ($p=0.010$) anlamlı farklılıklar gösterdi. Bu dönemde mikrotomografi değerleriyle histolojik yeni kemik alanı ölçümleri bazı gruplarda orta derecede korelasyon ($p=0.005$) gösterdi. Dördüncü ayda otograft uygulanan gruptaki yeni kemik miktarı ve bunun defekt alanına oranı boş bırakılan defekt grubu (sırasıyla $p=0.003$ ve $p=0.005$); boş doku iskelesinin uygulandığı grup (sırasıyla $p=0.004$ ve $p=0.005$) ve magnetik partiküllerle MKH uygulanan gruba göre (kemik miktarı anlamlı farklı değil, kemik oranı için $p=0.049$) daha çoktu. Dördüncü ayda mikrotomografik olarak defekt alanında ölçülen kemik hacmi otograft grubunda, MKH ve magnetik partikülle MKH uygulanan gruplara göre daha çoktu (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.006$). Diğer yandan dördüncü ayda mikrotomografik olarak yeni kemik hacmi MKH uygulanan grupta boş defekt grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olarak ölçüldü ($p=0.020$).

Doku iskelesi (skafold) uygulanan gruplarda biyomalzemeye hafif ila orta derecede bir doku yanıtı olduğu saptanmıştır. Daha önce biyomalzemenin doku uyumu başka çalışmalarımızda kantitatif olarak değerlendirilip biyoyumlu olarak saptandığından, bu çalışmada skorlanmamıştır. Biyomalzeme çevresinde lenfosit,

makrofaj ve yer yer yabancı cisim dev hücreleri izlenmekle birlikte nekroza rastlanmamıştır. Bu sonuçlara göre incelenen tüm zaman dilimlerinde otograft uygulanan gruplarda aktif kemik yapımı en ileri seviyededir. Birinci ayda daha belirgin olmak üzere magnetik partiküllerle MKH uygulanan gruplarda aktif kemik yapımı altın standart olan otograft uygulamasına yakın düzeyde belirgin biçimde artmıştır. Buna rağmen grupların hiçbirisinde dördüncü ayda kritik büyüklükteki kalvariyal defekt tam olarak kemikleşmemiştir. Manyetik yüklü altın kaplı nanopartiküllerin yüklendiği kemik iliği kökenli mezankimal kök hücrelerle kalvariyal kemik defekti onarımının daha kapsamlı araştırmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kalvariyal defekt, otograft, nanopartikül, altın kaplı, manyetik işaretli, kemik stromal hücre, yapay doku iskelesi, manyetik etki, kemikleşme, targeting

Destekleyen Kurumlar: Kırıkkale üniversitesi BAP tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Gürel M., Evaluation of calvarial bone defect repair with Magnetic nanoparticles coated with gold-loaded bone marrow-derived mesenchymal stem cells, Kırıkkale University, Faculty of Medicine, Department of Plastic and Reconstructive Surgery Dissertation, Kırıkkale, 2012

Due to many congenital and acquired reasons, regeneration of calvarial defects encountered in plastic surgery clinics is crucial for both the physician and patient.

Most current approaches such defects repaired by the method of autograft. As with all grafting methods in this way a variety of emerging problems exists and, both long-and short-term negative impact on results of therapy. Wound infection, bleeding, paresthesia, local tissue damage, the lack of donor bone fractures and chronic pain and poor cosmetic results may be encountered after grafting methods. To overcome this kind of problem that exists today, tissue engineering is designing and developing under the light of nanotechnologies bone marrow derived magnetically labeled osteoblast cells which can contribute to bone regeneration in order to repair the exiting defects.

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells contain many positive factors that can contribute to bone healing. In this project, it was aimed to reveal the affect of nano targeting scaffold on calvarial defects by placing bone stromal cells on artificial nano targeting scaffold.

In total five experiment groups were formed including the negative control group, 7 rats in total in the scaffold group, 12 rats in scaffold + magnetically loaded gold coated nanoparticles groups and 6 rats in each of the other groups. After forming 6 mm cranial defect in each test animal, the group was specifically treated. At week four, 6 rats from scaffold + magnetically loaded gold coated nanoparticles groups, 3 rats from each of the other groups were sacrificed and examined. At week sixteen, 4 rats from the scaffold group, 6 rats from scaffold + magnetically loaded gold coated nanoparticles groups and autograft groups, 6 rats from each of the other

groups and 3 rats from each of the other groups were sacrificed and exposed to the necessary histological, biochemical and radiological examinations.

When the results were examined, in the first month, in the multi comparison of experiment and control groups, new bone ratio ($p=0,016$) and new bone area in mm^2 ($p=0.016$) in the defect area, which are histological parameters have shown significant differences. Micro-tomography and blood ALP values have not shown significant differences among the groups during the same period. According to this, in the first month, the new bone area and its ratio to the total defect was statistically significantly higher in the group to which MSC was applied with magnetic particles ($p=0.001$ and $p=0.001$ respectively) and in the autograft group ($p=0.034$ and $p=0.034$ respectively) than the control group in which the defect was left alone. In the first month, the new bone area in the autograft group assumed as the gold standard and the ratio of this area to the total defect area was significantly higher than the scaffold-alone group ($p=0.022$ and $p=0.022$ respectively).

In the fourth month, in the multi comparison of experiment and control groups, micro-tomographic measurement values ($p=0.010$) as well as new bone ratio within the defect ($p=0.028$) and new bone area in mm^2 ($p=0.015$), which are histological parameters, have shown significant differences. In this period, micro-tomography values and histological new bone area measurements have shown medium level correlation ($p=0.005$) in some groups. In the fourth month, the new bone volume and its ratio to the defect area was higher in the group to which autograft was applied than the defect-alone group ($p=0.003$ and $p=0.005$ respectively); the group to which scaffold-alone was applied ($p=0.004$ and $p=0.005$ respectively); and the group to which MSC was applied with magnetic particles (difference in bone volume was not significant, for bone ratio $p=0.049$). In the fourth month, the bone volume micro-tomographically measured in the defect area was higher in the autograft group than the groups to which MSC and MSC with magnetic particles was applied ($p=0.001$ and $p=0.006$ respectively). On the other hand, in the fourth month, the new bone volume measured microtomographically was significantly higher in the group to which MSC was applied than the defect-alone group ($p=0.020$).

It has been determined that there was a small and medium level tissue response towards the biomaterials in the group to which scaffold was applied. As the tissue compatibility of the biomaterials was evaluated quantitatively in previous studies and those with bio-compatibility were chosen, this data was not scored in this study. Although lymphocyte, macrophage and partly foreign substance giant cells were monitored around the biomaterial, no necrosis was found. According to these results, in all the periods evaluated, active bone regeneration is most advance in groups to which autograft was applied. In this first month, active bone regeneration has distinctly increased in the groups to which MSC was applied with magnetic particles on a level close to the autograft application in which the active bone formation was the gold standard. Despite this, in none of the groups critical-sized calvarial defect was ossified in the forth month. It is necessary that calvarial bone defect repair with bone marrow-derived mesenchymal stem cells loaded with magnetically loaded gold coated nanoparticles is supported with more comprehensive researches.

Keywords: Calvarial defect, autografts, nanoparticles, gold-coated, magnetic checked, bone stromal cells, artificial tissue scaffolds, magnetic domains, ossification, Targeting

Acknowledgement: This work was funded by Kırıkkale University Department of Academic Experimental Studies

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	viii
İÇİNDEKİLER	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
TABLOLAR ve ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
RESİMLER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KALVARYAL DEFEKT.....	3
2.2. KEMİK DOKUSU	3
2.3. KEMİK MORFOLOJİSİ.....	6
2.4. KEMİKTE GELİŞİM VE BÜYÜME	8
2.5. KEMİK İYİLEŞMESİ.....	11
2.6. KAYIPLI KEMİK YARALANMALARINDA ONARIM MATERYALLERİ.....	13
2.7. KEMİK STROMAL HÜCRELER.....	17
2.8. MANYETİZMA VE MANYETİK NANOPARTİKÜLLER	20
2.9. MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN ALTINLA KAPLANMA METODLARI VE BUNLARIN UYGULAMA ALANLARI.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. DENEY GRUPLARI	29
3.2. KALVARYAL DEFEKT OLUŞTURULMASI.....	31
3.3. KEMİK İLİĞİ KÖK HÜCRELERİNİN İZOLASYONU.....	38

3.4. ALTIN KAPLI MANYETİT NANOPARTİKÜLLERİN ÜRETİMİ.....	39
3.4.1. Manyetit (Fe ₃ O ₄) Nanopartikül Sentezi.....	39
3.4.1.1. Yüksek sıcaklıkta mekanik karıştırmalı ikili çöktürme yöntemi ile manyetit üretimi.....	40
3.4.1.2. Kullanılan Maddeler	41
3.4.2. Sitrat İndirgeme Ajanıyla Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi	41
3.4.3. Altın Kaplı Manyetik (Fe ₃ O ₄ /Au) Nanopartiküllerin Katyonik Hale Getirilmesi	43
3.4.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	44
3.5. WST METODU İLE SİTOKSİSİTENİN BELİRLENMESİ	46
3.5.1. Hücre içersine Floresein ile işaretli nanopartiküllerin aktarılması	46
3.5.2. İkili boyama metodu ile Nekrozun belirlenmesi.....	47
3.6. MIKNATISLARIN HAZIRLANMASI.....	48
3.7. DOKU İSKELELERİNİN HAZIRLANMASI	50
3.8. RATLARDAN ÖRNEKLERİN ALINMASI	50
3.9. RADYOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	52
3.10. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	52
3.11. BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	53
3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.	53
4. BULGULAR.....	54
5. SONUÇ	62
6. TARTIŞMA	68
7. KAYNAKLAR	73

SİMGELER ve KISALTMALAR

Au	Altın
BMP	Kemik morfojenik protein
BMSCs	Kemik iligi stroma kök hücreleri
CT	Bilgisayarlı Tomografi
DKM	Demineralize kemik matrisi
EGF	Epidermal büyüme faktörü
Fe	Demir
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL	İnterlökin
MAPCs	Multipotent yetiskin progenitör hücreler
MKH	Mezenşimal kök hücre
MPCs	Mezodermal progenitör hücreler
MSC	Mezanşimal kök hücreler
PDGF	Platlet derive growth factor
PEI	Polietilenimin
RNA	Ribonükleik asit
TGF- β ,	Transforming Growth factor
TNF	Tümör nekrotizan faktör

TABLolar, GRAFİKLER ve ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

- Tablo 5.1.** 15 dakika manyetik alan uygulanmış ve uygulanmamış manyetik partiküllerin mezenkimal hüclerlerine toksisitesini (%canlılık oranları) gösteren tablo. 64
- Tablo 5.2.** Floresan işaretli manyetik partiküllerin mezenkimal kök hücre kültüründe 15dak. inkübasyonda hücre içersine girme %oranları..... 65
- Tablo 5.3.** Manyetik partiküllerin 15 dak. inkübasyondaki %nekrotik hücre sayısını gösteren tablo..... 66
- Grafik 4.1. A, B, C, D:** A ve B’de birinci ayda, C ve D’de dördüncü ayda deney ve kontrol gruplarında defekt alanındaki kemik oranı ve kemik alanına ait tanımsal istatistikler görölmektedir. 59
- Grafik 4.2. A, B, C, D:** A ve B’de birinci ayda, C ve D’de dördüncü ayda deney ve kontrol gruplarında defekt alanındaki mikrotomografik kemik hacmi ve kan alkale fosfataz değerlerine ait tanımsal istatistikler görölmektedir. 61
- Şekil 3.1.** Manyetit sentezi için deney düzeneği. 40
- Şekil 5.1.** Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerinin mikroskop fotoğrafları. 65
- Şekil 5.2.** İkili boyama ile muamele edilmiş kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerinin mikroskop fotoğrafları. 67

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No:

Resim 3.1.	Kraniyal defekt için ameliyat bölgesi	31
Resim 3.2.	Kraniyal defekt oluşturmak için İnsizyon.....	32
Resim 3.3.	Subkutan doku ve periostun flep şeklinde kaldırılması	32
Resim 3.4.	Kranial defekt oluşturulmasında kullanılan döner testere	33
Resim 3.5.	Kemik defektinin oluşturulması.....	33
Resim 3.6.	Kemik defektinin oluşturulması.....	34
Resim 3.7.	Standart Kalvaryal Defekt	34
Resim 3.8.	Oluşturulan defektin scaffold ile kapatılması	36
Resim 3.9.	Oluşturulan defektin scaffold ile kapatılması	36
Resim 3.10.	Kemik stromal hücre yüklenmiş doku iskelesi	37
Resim 3.11.	Manyetik yüklü altın kaplı nanopartiküllerin yüklendiği kemik stromal hücreleri içeren scaffoldla onarılmış kemik defekt ve düşük magnetizmaya tabii tutulması.	37
Resim 3.12.	Kranial Defektin son hali	38
Resim 3.13.	Yüzeyi işlenmiş mıknatıs.....	47
Resim 3.14.	Magnetlerin hazırlanması	48
Resim 3.15.	Hazırlanan magnetlere uygun deliklerin açılması.	49
Resim 3.16.	Mıknatısların gücünü ölçen Gaussmeter.....	49
Resim 3.17.	Scaffoldun hazırlanması.....	50
Resim 3.18.	Örnek alınma işlemi görüntüsü.....	51
Resim 3.19.	Örneğin üstten görüntüsü.....	51
Resim 4.1.	Örneklerin 1. Ay Histolojik İncelemedeki Mikoskopik Görüntüleri....	56
Resim 4.2.	Örneklerin 1. Ay Histolojik İncelemedeki Mikoskopik Görüntüleri....	57

1. GİRİŞ

Kalvaryum kemikleri oksipital ve frontal kemik haricinde çift ve simetrik olup canlıların en önemli destek dokularından birini oluşturmaktadır. Kemik iliğinin az olması ve diğer kemiklere nazaran kanlamanın daha farklı olması sebebiyle diğer kemiklerden farklı değerlendirilir [1]. Kalvarium kemikleri membranöz kemiklerdendir ve epifizleri yoktur. Rejenerasyonda bu durum avantaj sağlamaktadır. Kranium kemiklerinin gelişimi doğumdan sonra ergenlik dönemi kadar devam etmektedir. Kraniyofasiyal cerrahi planlanan hastalarda doku gelişiminin sınırlı olması büyük sorun teşkil etmektedir [2-4].

Kalvaryal hasarların onarılması hasta içinde cerrah içinde büyük önem taşımaktadır. Sınırlı donor alanı olan hastalarda kraniyofasiyal defekt onarımı sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Büyük defektlerin onarımı esnasında çoğu zaman greft kullanım ihtiyacı olmaktadır. Kullanılacak greft ya otogreft, allogreft ya da dışarıdan sağlanabilecek sentetik greft şeklindedir. Otogreft kullanımı günümüzde altın standart görülmektedir. Fakat kanama, enfeksiyon, bölgesel doku hasarı, estetik sonuç, sinir hasarları gibi hem alıcı hem de verici sahada erken ve geç pek çok komplikasyona yol açabilmektedir [5-7]. Bu gibi sorunlardan dolayı doku mühendisliği tekniğiyle kemik doku onarımlarına yönelik pek çok araştırmalar yapılmaktadır. Biyouyumlu yapay iskeleler ile inşa edilerek oluşan doku kayıplarının onarımı çalışmaları yapılmaktadır. Biyomedikal mühendislik alanındaki bu gelişmeler sayesinde otogreftten beklenen yararlı özellikler yapay iskelelere aktarılıp, komplikasyonları önlenmeye çalışılmakta ve yapay doku iskelerinin dokuya mükemmel uyumu amaçlanmaktadır [1, 8-10].

Doku mühendisliği alanında son zamanlarda yapılan araştırmalar, kök hücreler ve kemik iliği stroma hücreleri önem kazanmıştır [10]. Yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitesi olan kök hücreler, embriyonik kök hücreler ya da erişkinden elde edilmiş kök hücreler olabilir. Günümüzde doku mühendisliği var olan defektleri onarmak için kemik iyileşmesine katkıda bulunabilecek kemik iliği kökenli, manyetik işaretli mezenkimal kök hücrelerini nano teknolojiler ışığında tasarlayarak

geliştirmektedir. Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler, kemik iyileşmesine olumlu katkı yapabilecek birçok faktörü barındırmaktadır.

Plastik cerrahide kalvaryal defektlerin doku iskeleleri ile onarılması yönünde birçok ümit veren yeni çalışmalar yapılmaktadır [11, 12]. Doğumdan önceki gelişim süreçleri, doğumdan sonraki iskelet tamiri ve yenilenme kapasitesinin hızlandırılması için model olmuştur [1].

Doku mühendisliği; temel olarak yapay bazı malzemeler ve hücrel bileşenlerden yararlanarak, hasar görmüş dokunun yerine yenisini koymayı amaçlar. Bu anlamda: yapay ağlar (matriksler), in vitro koşullarda elde edilen hücreler ve sistemik veya yerel düzenleyici farmakolojik ajanlar bu alanın asal bileşenleridir.

Altın, eski dönemlerden beri hem iletken olması hem de dokuya uyumlu olmasından dolayı tıp bilimlerinde tedavi yönetimi için yardımcı araç olarak kullanılmaktadır. Mühendislikteki gelişmeler var olan pek çok maddeyi nanometre seviyesine indirmekte ve özellikleri kaybolmadan nano seviyede maddelerin uygulamalarda kullanımına olanak sağlamaktadır. Günümüzde manyetik nanopartiküller rutin olarak hedef organlar (akciğer ve karaciğer) ve lenf nodülleri için kontrast ajan olarak kullanılmaktadır. Yeni gelişmeler moleküler görüntüleme ve hücre izleme üzerine odaklanmıştır. Uygulamalara getirdikleri kolaylıklar ve kazandırdıkları özellikler sebebiyle biyomedikal alanlarda manyetik nanopartiküllerin kullanımları hızla yaygınlaşmaktadır.

Nanopartiküller kataliz, manyetizma ve elektronik gibi pek çok alanda sahip oldukları dikkat çekici özelliklerinden dolayı çalışılmıştır. Endüstriyel uygulamalarda; manyetik motor kapakları, banka çeklerindeki manyetik mühürler, manyetik kayıt ortamı, manyetik rezonans fark ortamı gibi ve biyomedikal uygulamalarda; kanser tedavisinde kullanılan teröpatik ajanlar gibi birçok alanda kullanımları geniş yer kaplamaktadır

Bu projede manyetik yüklü altın kaplı nanopartiküllerin yüklendiği kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerinin jelatin esaslı doku iskelesine yerleştirilerek manyetik alan etkisinde kalvaryal kemik defektlerin onarılmasında manyetik işaretli mezenkimal kök hücrelerin kemik iyileşmesine yaptığı etkinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KALVARYAL DEFEKT

Kalvaryum frontal, parietal kemikler, oksipital ve temporal kemiğin oluşturduğu, beyin dokusunu çevreleyen tas benzeri bir yapıdır. İç ve dış tabula olmak üzere iki kortikal tabaka ve bunların arasında yer alan kemik iliği aralığından (diploe) oluşur [1, 2, 8].

Kalvaryal defektler konjenital anomalilerde rastlandığı gibi, travma ve malignensiler gibi başka sebeplerle hayatın ilerlemiş yıllarında da oluşabilir. Kalvarium kemikleri membranözdür ve epifiz alanları yoktur [1, 8]. Bu durum osseöz rejenerasyon için iyi bir özelliktir. Kranium, 3-4 yaşlarında gelişmenin %80'ine erişirken 7-8 yaşlarında %100'e ulaşır [2]. Daha sonraki yıllarda sadece kalınlığında artış meydana gelir. İskelet sisteminin diğer kemiklerinde olduğu gibi kalvaryal kemiklerde de sürekli bir döngü süreci yaşanmaktadır [1].

2.2. KEMİK DOKUSU

Kemik biyomekanik ve mekanik özelliklerinin sayesinde destek materyali olarak iş görür. Kemik, embriyolojik olarak mezenkimal hücrelerden encondral ya da membranöz kemikleşme yolu ile oluşan bir dokudur. Kemikler iskelet sistemini oluşturup hareketi sağlamakta kaslarla birlikte çalışır, vücudu yapılandırır, hayati organları çevreleyip korur, kan hücrelerinin üretildiği kemik iliğini içerir ve kalsiyum deposu olarak görev alır. Kemik; bir çatı içerisinde birçok hücreden oluşup, metabolik ve biyolojik yönden dinamik bir dokudur. Bu özelliği değerlendirildiğinde, büyüme ve iyileşmesi çok sayıda biyokimyasal, biyomekanik, hücrenel, hormonal ve patolojik olayın zincirleme reaksiyonu gibi düşünülebilir. Kemik aynı zamanda kendisini yapısal olarak onarabilen, mineral depolama özelliği sayesinde hücre dışı sıvı dengesinin korunmasında etkili olan bir yapıya sahiptir [13, 14].

Kemiği içten ve dıştan saran iki adet zar vardır. Bu zarlar periosteum ve endosteumdur. Periosteum, kaba, vasküler, konnektif bağ doku tabakasıdır ve eklem yüzeyleri hariç tüm kemiği dıştan çevreler. Periosteumun kemiğin beslenmesinde, gelişiminde ve tamirinde önemli rolleri vardır. Yapısında temel olarak kollajen ve elastik lifler bulunur. “Sharpey lifleri” adı verilen kollajen uzantılar ile kemiğe yapışmaktadır. Periosteum çok damar içeren, iki tabakalı bir zardır. Kalın dış tabaka “fibröz tabaka” olarak da isimlendirilir ve düzensiz, yoğun konnektif dokudan oluşur. Daha ince ve zayıf olan iç tabaka ise “osteojenik tabaka” olarak adlandırılır ve gevşek bağ dokusu şeklinde ve hücreden zengindir. Her bir tabakanın ayrı fonksiyonu vardır. Dış kat dolaşımda rol alan damarları ve lenfatikleri içerir. İç tabakada bulunan hücreler ise kemik hasarında osteoblast haline dönüşerek yeni kemik oluşumunu sağlar. Kemik onarımında var olan bu hücreler normal koşullarda aktif değillerdir. Endosteum tabakası, kemik iliği kavitesini ve kompakt kemiğin kanal sistemlerini döşeyen ince bir retiküler bağ dokusudur. Periosteumdan incedir ve tek tabaka osteojenik hücre içerir. Bu tabakanın osteoprogenitor hücreler yanında, hemopoetik hücrelere de farklılaşma özelliği vardır [13, 14].

Kemik dokusu yapım, yıkım ve onarımda görevli hücreler vardır [15].

Kemik Hücreleri

- Osteoblastlar
- Osteoklastlar
- Osteositler,
- Osteoprogenitör hücreler
- Kemik iliği hematopoetik hücreler

Osteoblastlar, matürdür ve metabolik olarak aktiftir. Kemik organik matriksinin yapımından sorumludur. Bu hücreler, kübik ya da alçak prizmatik olabilir. Büyük nükleusları vardır ve sitoplazmaları koyu bazofiliktir. Osteoid doku ve tip I kollajeni, glikoproteinleri, proteoglikanları ve osteokalsin, osteonektin, osteopontin, osteoprotegerin gibi bazı proteinleri salgılar. Bunların yanında kemik rejenerasyonunda önemli rol aldıkları düşünülen, BMP (bone morphogenic protein), TGF-β, IGF-I, IGF-II, IL-1, PDGF gibi sinyal proteinlerini salgılar. Kemik yapım aktivitesi sonlanmaya başladığında, osteoblastların bir kısmı oluşturdukları matriks

içinde hapsolarak osteositlere dönüşürken, diğer kısmı periost ve endosteal örtücü yüzey hücrelerine dönüşürler [16-18].

Osteoklastlar büyük ve çok çekirdekli hücrelerdir. Bunların görevi kemik yıkımı gerçekleştirerek kemik dokuda yeni boşluklar oluşturmaktır. Genellikle kemik yüzeyinde bu hücrelerin açmış oldukları boşluklara Howship lakünleri veya erime bölgeleri denir. Osteoklastlar hormonal ve hücrel mekanizmaların kontrolünde, 4 ile 40 arasında çekirdekleri olan ve kemik rezorpsiyonunda görevli hücrelerdir. Kemik yüzeylerine tutunmuş olarak bulunan “cutting cones” şeklinde isimlendirilen gruplardaki bu hücrelerin fonksiyonu; içerdikleri kollajenaz ve diğer proteolitik enzimleri salgılamak, kemiğin inorganik ve organik matriksini ve kalsifiye kartilajı çözmektir. Osteoklastlar, kemik iliğinde var olan makrofaj öncülerinden köken alan monositlerin füzyonuyla oluşur. İnterlökin-1, -3, -6 ve -11, TNF- α ve TGF- α 'nın osteoklast oluşumunu etkilediği düşünülmektedir. Osteoklastlar hormonlara karşı da çok duyarlıdırlar. Parathormon, kalsitonin ve osteoklast stimule edici faktör bağlayan reseptörleri vardır. Örneğin paratiroid hormonu hücrede RNA sentezini artırırken, kalsitonun hormonu bunun tersi etki yapmaktadır. Kemik yıkımı, kemiğin şekillenmesinde önemli role sahiptir. Osteoklastlar osteoblastlarla birlikte mekanik streslere bağlı olarak kemiğin yeniden şekillenmesini sağlarlar. Kemikte depolanmış kalsiyumun dönüşümünü sağlar. Osteoklastların sayı ve etkinlikleri hormonal denetim altında olup paratiroid ve tiroksin hormonları etkisiyle yükselir, kalsitonin ve östrojen hormonları etkisiyle alçalır. Bu olay osteoklast ve osteoblastların senkronize çalışması neticesinde gözlenmektedir [15].

Osteositler kemiğin olgun hücreleridir. Dokuda matriksle çevrelenmiş durumdadırlar. Osteoblastların transformasyonu ile oluşan hücrelerdir. Kemik dokusu yapısının korunmasında görevlidirler. Işık mikroskopunda yıldız şeklinde uzantıları olan ve halkasal olarak sıralanmış şekilde görünürler. Her bir osteositten çıkan sitoplazmik uzantılar diğer osteositlere ulaşarak ağ şeklinde bir yapı oluştururlar. Osteositlerde osteoblastlar gibi matriksin kollajen tip I liflerini ve glikozaminoglikanlarını üretirler. Bazı araştırmacılara göre osteositik osteolizis ile de kemik doku yıkımı yapılmakta olup kalsiyum iyonları serbestleştirilerek kana verilmektedir. Lakünlerde bulunan kanaliküller vasıtasıyla kan damarlarına ve diğer lakünlere bağlanırlar. Lokal çevre faktörlerinden etkilenirler ve kemiğe etki eden

kuvvetler sebebiyle siklik adenosin monofosfat (cAMP), osteokalsin ve IGF salgırlarlar. Bu faktörler salgılandıktan sonra, öncül osteoblastların sayısı artarak kemikte remodeling oluşur ve kemik apozisyonu görülür. Ayrıca osteositler ekstrasellüler kalsiyum ve fosfor konsantrasyonun regülasyonunda önemli görev alırlar. Osteositlerin ölümünün devamında matriks rezorpsiyonu oluşur [15].

Osteoprogenitor hücreler sıklıkla istirahat halindedir veya uygun uyarılma ile osteoblastlara farklılaşarak kemik matriksinin sentezlenmesini sağlarlar. Bu hücreler normal büyüme esnasında ve yetişkinde kemiğin şekil değiştirdiği durumlarda aktifleşirler. Bunlar kemik yüzeylerini saran periosteumun iç yüzeyinde, endosteumun altında ve Volkmann kanalları ile Havers kanalları içini döşeyen endosteumda bulunurlar. Osteoprogenitor hücreler istiharat halinde yassı, genellikle soluk boyanan nükleusa sahiptir ve sitoplazmaları asidofilik bazen bazofilik boyanır. Çekirdekleri yassı ve oval şekillidir. Granüllü endoplazmik retikulumları, serbest ribozomları ve küçük golgileri bulunmaktadır. Osteoprogenitör hücreler mitozla çoğalan, mezenşimden gelişen, kemik yapıcı öncü hücreler olup, osteoblastlara veya düşük oksijen konsantrasyonunda kondrojenik hücrelere dönüşebilirler. Kemik büyümesinde ve kırık tamirinde aktif hale geçerek bölünür ve osteoblast hücrelerine dönüşürler [15].

2.3. KEMİK MORFOLOJİSİ

Kemik morfolojik olarak nonlameller, kortikal ve kansellöz kemik olarak üçe ayrılır.

Nonlameller kemik embriyonik dönemde, kırık iyileşmesinde, hiperparatiroidizm ve Paget hastalığı gibi patolojik süreçlerde oluşur. Gelişigüzel dizili kollajen lifler ve osteoblastlar ile döşeli düzensiz vasküler boşluklardan meydana gelir. Daha sonraki dönemde yeniden yapılanma ile kortikal veya kansellöz kemiğe dönüşür.

Kortikal kemik, kompakt veya lameller kemik olarak isimlendirilir. Nonlameller kemikten yeniden yapılanma sonucu meydana gelir. Yassı kemiklerin iç ve dış tabakalarında, uzun kemiklerin dış yüzünde var olan kemiktir. Kortikal kemiğin temel yapısı “Havers sistemi” olarak da adlandırılan osteondur. Osteon

vertikal uzanımlı vasküler kanalları (Havers kanalları) saran silindirik şekilli vasküler kemikten oluşur. Horizontal dizilimli kanallar (Volkman kanalları) komşu osteonları birbirine bağlar [19]. Volkman kanalları sayesinde, Havers kanalları kemik iliği ve periosteumla bağlantı halindedir. Sert bir matrikse sahip olan kemik dokusunda diffüzyon gerçekleşemediğinden kanal ve kanaliküllerle kemiğin dışından içine her yerinde bağlantı sağlanır ve bu şekilde metabolizma için gerekli maddeler damar ve kanaliküllerle hücrelere taşınır. Kortikal kemiğin mekanik gücü osteonların sıkı dizilimiyle gerçekleşir [15].

Kansellöz kemik (trabeküler kemik) kortikal kemik yüzleri arasında, bal peteği görünümlü, boşluklarında hematopoetik dokuları içeren, 1 mm kalınlığında trabeküllerden meydana gelir. Kortikal kemiğe göre daha zayıf yapıda olmasına rağmen, özellikle femur başında ve vertebralarda, trabeküllerin kortekse dik yerleşimi sayesinde dış kuvvetlere karşı yapısal olarak direnme gücü oluşur. Kansellöz kemiğin iç endosteal yüzeyinde sürekli yeniden yapılanma meydana gelir.

Kemik matriksin organik ve inorganik elemanları vardır. Kemiğin organizmadaki gerekli işlevlerini tam olarak yerine getirebilmesi, ancak dokudaki organik ve inorganik matriks elemanlarının uyumlu birlikteliğiyle sağlanır. Kemik ağırlığının yaklaşık %20'si sudur. Hacminin ise çoğunu kollajen oluştururken, kuru kemik ağırlığının %60-70'ini inorganik kalsiyum fosfat, %30-35'ini ise organik fibröz protein ve kollajen oluşturur. Kemik iliğiyle kıyaslandığında, kemikteki hücre sayısı çok azdır [19].

Osteoid, osteoblastlar tarafından salgılanan mineralize olmamış bir kemik organik matriksidir. %90'ını tip I kollajen; %10'unu ise nonkollajenöz proteinler (glikoproteinler, proteoglikanlar), peptitler, karbohidratlar ve lipidler oluşturur. Nonkollajenöz proteinlerin büyüme faktörlerinin salınımında, hücrelerin organik matrikse tutunmalarında ve organik matriksin kalsifikasyonunda görev aldıkları düşünülmektedir. Olgunlaşmış kemik dokusunda lifler paralel ve porlar bırakacak şekilde sıralanmış olup, aralarında hidroksiapatit kristalleri bulunmaktadır [15].

Kemik inorganik elemanları kalsiyum, fosfat, sitrat, magnezyum, sodyum gibi maddelerden meydana gelir. Ayrıca vücuttaki kalsiyumun %99'u, fosforun %85'i, magnezyum ve sodyumun %40-60'ı iskelet sisteminde bulunmaktadır. Kalsiyum ve fosfat hidroksiapatit kristallerini oluşturur ve kemik kollajenlerinin

arasında amorf madde ile birlikte içiçe organize olarak kemikte yerleşmişlerdir. Hidroksiapatit kristalleri osteoid mineralizasyonunda bulunarak, kollajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamakta önemli bir görev almaktadırlar [19].

Kemiğin yapısında bulunan kollajen, mineraller ve hücreler stabil olmayıp devamlı olarak yenilenirler. Yenilenme kemiğe etki eden kuvvetlerle ilişkili olup, basınç altındaki kemikte rezorpsiyon, gerilim kuvvetleri altında ise apozisyon şeklinde görülür. Ölen hücreler yerine yenisi ile değişirken, kollajen ve mineraller sürekli olarak rezorbe edilip, tekrar yeniden yapılırlar [19]. “Remodelling” şeklinde tanımlanan, rezorpsiyon ve depozisyon hızları arasındaki dengenin sabit olması ile kemiğin şekli ve hacmi neredeyse değişmeden kalır. Rezorpsiyon depozisyon kadar hızlı gelişmediğinde kemiğin kırılabilirliği yükselir (Paget hastalığı). Yeniden yapılanmadaki (remodelling) denge rezorpsiyon lehine bozulursa osteoporoz görülür [15].

Kemik metabolizması hormonlar ve lokal faktörlerin etkisi altındadır. Bunlardan parathormon, kalsitonin ve vitamin D en önemli temel hormonlardır. Osteoblastlar kalsiyum reseptörleri içeren tek kemik hücreleridir. Osteoblastları paratiroid hormon bu sebeple etkilemektedir. Parathormon kemikte kalsiyum içeren boşluklara kalsiyumun geçişini hızlandırarak ekstrasellüler kalsiyum seviyesinin düzenlenmesinde görevlidir. Vitamin D ise intestinal ve renal kalsiyum bağlayıcı proteinleri etkileyerek aktif kalsiyum transportunun daha kolay meydana gelmesini sağlar. Kalsitonin ise kalsiyumun plazma seviyesindeki akut artışına cevap olarak tiroid bezinin parafoliküler hücrelerinden salgılanır ve kalsiyuma bağlı hücreler metabolik aktiviteyi inhibe eder [15, 19].

2.4. KEMİKTE GELİŞİM VE BÜYÜME

Kemik oluşumu ile beraber kemiğin büyüme ve gelişimi embriyonik dönemde başlar ve genç erişkin döneme kadar devam eder. İntramembranöz ve endokondral olmak üzere 2 tür kemikleşme şekli vardır [19]. Bunlardan intramembranöz kemikleşme bağ dokusu yardımıyla, endokondral kemikleşme ise kıkırdak dokunun katılımıyla meydana gelmektedir. Kemikleşme hangi şekilde olursa olsun, ilk oluşan kemik dokusuna birincil kemik adı verilir ve olgunlaşmamış

kemiktir. Birincil kemik asıl kemik olmayıp yerini olgun lamelli kemik dokuya bırakacaktır.

İntramembranöz kemikleşme, mezenşimal bağ dokusunda meydana gelen kemik şekillenmesidir. İskelet sistemindeki kafatası, sternum, pelvis gibi yassı kemiklerde, yüz kemiklerinde, mandibulanın processus coronoideus ve simfisis dışındaki bölgelerinde, kısa ve uzun kemiklerin kompakt kısımlarında gözlenir. Mezenşim hücreleri önce hızlı bölünme şeklinde çoğalır ve osteoprogenitör hücreye farklılaşırlar, daha sonra da osteoblastlara dönüşerek kemik matriksi oluştururlar. Bol kılcal damarların bu dokuda var olduğu gözlenir ve bu damarlar osteoid dokuya kalsiyum ve fosfor iyonlarını ve beslenme için gerekli diğer maddeleri taşır. Kalsiyum ve fosfor iyonları, osteoblastlar tarafında salgılanan alkalen fosfataz aracılığıyla kalsiyum fosfat moleküllerine dönüşerek kalsifikasyonu sağlarlar. Meydana gelen dokuya kemik trabekülleri denir. Trabeküller içinde kalan osteoblastlarda daha sonra aktivitesi azalmış osteositlere dönüşür. Şekillenen trabeküllerin yüzeyinde osteoprogenitör hücrelerden farklılaşan osteoblastlar tek sıra halinde sıralanırlar ve kemik lamelleri meydana getirirler. Bu olayın tekrar tekrar yapılması sonucu birincil kemik trabeküllerinin yüzeylerinde ve kenarlarında lamelli ikincil kemik dokusu meydana gelir. Trabeküller kalınlaşır ve uzarlar. Bu sırada osteoklastlar tarafından kemiklerin iç yüzlerinde rezorbsiyon yapılırken, osteoblastlar da bir taraftan kemik trabeküllerin yüzeyinde yeni kemik lamelleri yaparak eklerler. Böylece birincil kemik dokusu içeren trabeküller tamamen ortadan kalkar, ikincil kemik yapısındaki trabeküller ortamda kalır. Komşu trabeküller birbirleriyle kaynaşarak spongiyoz kemiği meydana getirir. Bu kemiklerin iç ve dış yüzlerinde intramembranöz yolla tekrar bir miktar kompakt kemik yapılarak eklenir ve kemikleşme sona erer. Trabeküllerin aralarında kalan mezenşim dokusundan da kemik iliği oluşturulur [19].

Enkondral kemikleşme uzun ve kısa kemiklerde gözlenir. Kemikleşme hiyalin kıkırdaktan ufak bir modelle başlar ve kemik dokusu oluşumuyla sona erer. Modelde diyafiz kıkırdağını örten perikondriyumun iç katında bulunan mezenkim hücreleri osteoprogenitör hücrelere farklılaşır ve onlar da osteoblastlara dönüşür. Osteoblastlar da üst üste yerleşen kemik lameller oluşturur. Böylece yeni kemiğin periosteumu ile kıkırdak dokusu arasında silindirik biçimde bir kemik manşet oluşur.

Kemik manşet, bariyer yaparak kondrositlerin beslenmesine engel olur. Oluşan iskemi, kondrositlerin önce hipertrofiye olmalarına, ardından diyafizin orta kısmından başlayarak tahrip olup, ölmelerine sebep olur [20, 21]. Kıkırdak modelin ortasında birbiriyle bağlantılı boş kaviteler meydana gelir (kemik iliği kavitesi). Periosteumdaki osteoklastlar kemik manşette yer yer delikler açarak foramen nutrisyumlari oluştururlar. Periosteumdaki kan damarları bu deliklerden girerek, osteoprogenitör ve hematopoetik hücreleri taşırlar. Damarlarla ortama taşınan kalsiyum ve fosfor iyonları, alkalen fosfataz tarafından birleştirilerek kıkırdak matrikse çöker ve bunun sonucunda diyafizde bir kemikleşme merkezi meydana gelir. Diyafizde oluşan boşluklara kan damarları ile gelen mezenşim hücrelerinden farklılaşarak oluşan osteoblastlar, kalsifiye kıkırdak matriksi üzerinde tek sıra yerleşerek kemik dokusu yapmaya başlarlar. Böylece santralinde kalsifiye kıkırdak, yüzeyleri ise kemik dokusundan oluşan kemik trabekülleri meydana gelir. Kemik trabekülleri ile kan damarlarının aralarında kalan boşluklarda kemik iliği şekillenir. Bu arada kıkırdak modelin epifizleri ile diyafizi arasında bulunan kondrositler mitoz ile çoğalıp alt alta sıralanan gruplar oluştururlar. Böylece kıkırdak modelin boyu sürekli olarak uzar. Ayrıca kemik manşet de kalınlaşır ve epifizlere doğru yönelir. Kondrositlerin bulunduğu bölgeyi dışarıdan çevreler. Kemikleşme merkezinde gözleendiği gibi ilk olarak kıkırdak matriks, sonrasında da ilk şekillenenlerin devamı halinde kemik trabekülleri gelişir. Enkondral kemikleşme epifizlere ulaşınca, epifizlerin iç kısmında ikincil kemikleşme merkezleri gözlenir. Eski ve yeni kemikleşme bölgeleri arasında bulunan kıkırdak bir disk kalır ki buna epifiz plağı adı verilir. Kemikleşme sonlanana kadar epifiz plaklarındaki kıkırdak hücreleri diyafiz yönüne doğru mitoz ile çoğalarak sürekli kıkırdak dokusu yapar, bu oluşan kıkırdak dokusu da devamlı olarak yeni kemik dokusunu oluşturur. Sonuç olarak kemikler belli bir yaşa gelene kadar uzamaya devam eder. En sonunda epifiz plaklarının kemikleşmesiyle kemiğin uzaması sonlanır [19].

2.5. KEMİK İYİLEŞMESİ

Organizmada hasar gören dokular esas olarak fibröz skar ile onarılır. Bunun vücuttaki tek istisnası kemik dokusudur. Bu dokuda oluşan hasar uygun şartlar sahipse, yeni bir kemik dokusu oluşarak bölge tamamen normal hale gelmektedir [20, 22].

Birincil kırık iyileşmesi, rijit internal fiksasyonu yapıldıktan sonra oluşur ve belirli bir dış kallus oluşmaz ve sadece iç kallus dokusuyla oluşan temas iyileşmesidir. Kırık kapalı yöntemle tedavi edilirse, ikincil kırık iyileşmesi gözlenir ve evrelere bölünebilir [23]. Histolojik olarak yapılan sınıflamalarda genel olarak aynı bulgular kabul edilip benzer evrelemeler yapılmıştır. Genel olarak 3 evrede incelenir: erken inflamatuvar dönem, onarım dönemi, yeniden yapılanma dönemi (remodeling) [20]. Evreleri birbirinden zaman olarak kesin sınırlarla ayırmak zordur ve her evre daima kendinden bir önceki veya bir sonraki evre içinde bulunabilir [21-23].

Doku travmalarında gözleendiği gibi, kırıklarda da dokunun ilk cevabı “inflamasyon” yani “yangı”dır. Bu dönem ilk 3–4 günlük süreyi içerir. Bu evrede var olan hematoma ve hücre ölümü enflamasyonu başlatır. Kırığın etrafına toplanan kan ve lenf sıvısına kırık hematoma adı verilir. Hematom kırık uçlarını bir arada tutan bir basınç uygular. Kırık hematoma içinde bulunan trombositler ve ortamdaki diğer hücreler tarafından epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombositlerden üretilmiş büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β), kemikten türetilmiş büyüme faktörü (BDGF), interlökin-1 (IL-1) gibi proteinler ortama salgılanır [22, 23].

Erken dönemde vazokonstriksiyon oluşur ve sonrasında vazodilatasyon takip eder. Salınan prostoglandinlerin de yardımıyla bölgeye akut yangı hücreleri (nötrofiller, monositler, lenfositler) gelir. Kırık uçlarında bozulan dolaşıma bağlı olarak kemik dokuda daha fazla olmak üzere nekroz alanı oluşur. Ortama gelen nötrofiller ve makrofajlar hasarlı dokunun ortadan kaldırılmasında görev alırlar. Kırık bölgesindeki hematoma 48 saat içinde organize olur ve fibrinden bir yapı haline dönüşür. Nötrofiller ve makrofajların yardımı ile fibrin matriks oluşur. Fibrin matriks içindeki öncü hücreler, lokal biyolojik faktörlerle değişik dokuları oluşturmak için farklılaşarak görev üstlenirler [21, 22].

Onarım evresi, kırık oluşumundan sonraki saatlerde başlasa da tipik halini meydana getirmesi 7–12 gün sürer. Bu evrede nekrotik dokular rezorbe edilir ve fibroblastların bölgede oluşmasıyla onarım evresi başlar. Onarım döneminde var olan hücreler mezanşimal kökenli, çok yönlü gelişim gücünü içinde barındıran (pluripotent) hücrelerdir. Osteoklastlar nekrotik kemik dokusunu kaldırırken osteoblastlara farklılaşan hücreler öncelikle kemiğe yakın bölgelerde gözlemlenir. Bu evrede lokal faktörlerin etkisiyle hassaslaşan öncü hücreler, yeni damar, fibroblast, destek hücreleri ve diğer hücreleri oluşturmak üzere farklılaşmaya ve organize olmaya başlar. Bu önü hücreler granülasyon dokusundan, periosteumun osteojenik olan iç tabakasından ve endosteumdan köken alan pluripotent hücrelerdir. Bu aşamada kimyasal, elektriksel ve mekanik uyarılar söz konusudur [23]. Prostaglandinlerin etkisi ile yeni osteoklastların oluşumu ve mevcut osteoklastların aktivitesinde artış gözlenirken; fibroblastların kollajen, kondroblastların kollajen ve glikozaminoglikan, osteoblastların ise osteoidi ortama salgıladıkları gözlenir. Fibroblastlar, vasküler oluşuma yardım etmek üzere stromaya yerleşmeye başlar. Vasküler oluşum arttıkça, kollajen matriks oluşumu artar. İyileşen kemiğin gerilmeye karşı dayanıklılığı, kapsadığı kollajen içeriğiyle yakından ilişkilidir [23]. Bu esnada osteoid sekresyonu takiben mineralizasyonun başladığı gözlenir. Kırık hattı bölgesi ve çevresinde yumuşak kallus meydana gelir. İlk 4–6 haftalık süre içinde gelişen bu kallusun harekete karşı direnci zayıftır. Bu nedenle kırık tespitinin sağlam olması oldukça önemlidir [21].

Kırık iyileşmesinin ilk evrelerinde periosteal damarlar, geç evrelerde ise besleyici (nutrisyen) damarlar kılcal damar tomurcuklarının oluşmasına yardımcı olur. Sonuçta kallus ossifiye olur ve kırık yüzleri arasında nonlameller kemik köprüsü meydana gelir. Eğer stabil immobilizasyon yapılmazsa kallus ossifikasyonunun oluşmasında yetersizlik olur ve hareketli fibröz birleşme gelişebilir. Periosteumun yaralanması ya da kemikten uzaklaştırılması kırık iyileşmesini yavaşlatır [23]. Kemik iyileşmesi en uzun faz olan ve uzun yıllar sürebilen yeniden yapılanma evresi ile sonlanır. Bu fazda kemik orijinal güç, şekil ve yapısını kazanır. Aksiyal yüklenme ile güçlü ama düzensiz olan sert kallusun normal veya normale yakın güçteki düzenli lameller kemiğe dönüşümü bu fazda gerçekleşir. Wolf kanuna göre kemiğin fonksiyonel durumundaki değişiklik, kemik dokuda

yapısal değişikliklere neden olmaktadır. Bu kanun günümüzde de kemiğin yeniden şekillenmesinde temel bir kural olarak kabul edilmektedir. Mekanik strese maruz kalan kemiğin dış bükey yüzü pozitif, iç bükey yüzü ise negatif elektrikle yüklendiğinden, osteoklastik aktivitenin hakim olduğu dış bükey yüzde geri emilim ve osteoblastik aktivitenin egemen olduğu iç bükey yüzde ise yeni kemik yapımı olmaktadır [22, 23].

Kemik iyileşmesinde etkili faktörler lokal ve sistemik faktörler olarak iki alanda incelenir. Lokal faktörler; yüksek enerjili travma, kırık uçlarının ucuca gelmemesi, yetersiz immobilizasyon ve kanlanma, eşlik eden yumuşak doku yaralanması, enfeksiyon ile kanser gibi yerel patolojiler ve denervasyon olarak sayılabilir. Sistemik faktörler içinde ise ileri yaş, sigara, sistemik hastalıklar ve enfeksiyonlar, beslenme bozuklukları, hormonal bozukluklar, vitamin eksiklikleri (A, C, D, B6, K), bazı ilaçlar (nonsteroid antiinflatuar ilaçlar, steroid, sitotoksik ilaçlar) ve radyoterapi sayılabilir [20-23].

2.6. KAYIPLI KEMİK YARALANMALARINDA ONARIM MATERYALLERİ

Günümüzde iskelet sistemindeki kemik deformitelerinin rekonstrüksiyonunu gerektiren travma, kemik enfeksiyonları, konjenital anomaliler, kas iskelet sistemi tümör cerrahileri, revizyon artroplasti cerrahiler ve spinal cerrahiler esnasında oluşan kemik defektlerini onarmak amacıyla sentetik veya doğal kaynaklı olan birçok çeşit malzeme kullanılmaktadır. Greft uygulamalarında nakledilen materyaller immünolojik özelliklerine göre şu şekilde sınıflandırılmaktadır [24-26].

Kemik grefti olarak otogreftler ve allogreftler kullanılır. Kemik yerine geçebilecek veya kemik oluşumunu uyarabilecek maddeler arasında ise seramikler (doğal ve sentetik), demineralize kemik matriksi, BMP (kemik morfojenik protein), otolog kemik iligi, büyüme faktörleri ve kompozit greftler kullanılabilir [25-27].

Kemik doku mühendisliğinin amacı, kemik defektlerinde kemik iyileşmesi için yanıt oluşturmaktır. Klinik başarıya, oluşan kemiğin yeniden şekillenme sonucu

orjinal kemik dokusu ile yapısal olarak bütünleşmesi (integration) ve oluşan kemiğin işlevler esnasında yeterli mekanik dayanıklılığa sahip olması ile karar verilir [26].

Osteointegrasyon: Greftin arada fibröz doku gelişmeden alıcı kemik yüzeyine kimyasal ve yapısal olarak tutunabilmesidir.

Osteokondüksiyon: Alıcı kemikten vasküler ve perivasküler yapıların grefte invazyonu için greftin iskele görevi üstlenerek yüzeyinde yeni kemik oluşumunu sağlayabilmesidir.

Osteoindüksiyon: Plüripotent hücrelerin ortamda osteoblastik fenotipe farklılaşmalarını uyarabilmektir.

Osteogenezis: Greft materyali bünyesinde bulunan hücresel elemanların, transplantasyon sonrası hayatta kalarak, transplante edilen alanda yeni kemik oluşumunu yapabilmesidir.

Yeni kemik dokusu yapımının meydana gelebilmesi için öncelikle yeterli sayıda "osteojenik progenitor hücreler" ortamda bulunmalıdır. Kullanılan greft materyalleri osteointegrasyon, osteogenezis, osteokondüktif veya osteoindüktif özelliklerin birine veya birden fazlasına sahiptirler. Bu özelliklerin bazıları sentetik materyallerde ve saflaştırılmış büyüme faktörlerinde de bulunmaktadır. Doku mühendisliğinde, mevcut maddelerin kombinasyonları veya yeni materyaller ile kırık iyileşmesi için en uygun ortamın ve greftleme metotlarının geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu sayede greftleme tekniklerindeki maliyetin azaltılması ve tedavide yeni daha iyi başarıların elde edilmesi amaçlanmaktadır [26-28].

Aynı bireyde bir alandan başka bir alana nakledilen grefte otogreft denir. Otolog ya da otojen greft olarak da adlandırılır. Tek yumurta ikizleri arasında yapılan doku nakillerinde, nakledilen doku izogreft olarak isimlendirilir. Allogreft ya da allojenik greft aynı türden fakat genetik olarak farklı iki canlı arasında yapılan doku naklidir. Xenogreft ise, bir türden farklı bir türe aktarılan doku naklidir.

Otolog Kemik Greftleri: Otolog greftler; kansellöz, damarlı (vaskülarize) olmayan kortikal, damarlı kortikal ve kemik iliği şeklinde yapılabilir. Farklı derecelerde osteojenik, osteokondüktif ve osteoindüktif özelliklere sahiptir.

Otolog kansellöz kemik greftleri spinal füzyon, kemik defektlerinin onarılması ve kırık tedavisinde halen kemik iyileşmesini sağlayan en etkili greft materyali olarak kabul edilir. Otojen kansellöz kemik içinde osteojenik kemik ve

kemik iliği hücreleri, osteokondüktif kollajen ve mineral matriksi, matriks proteinleri ve osteoindüktif matriks proteinleri nakledilir. Otojen kemik grefti uygulamaları sırasında yüzyüze kalınan sorunlar nedeniyle alternatif greft materyalleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Kemik greftinin yerini alabilecek ideal malzemeler; biyo-uyumlu, biyo-çözünür, osteokondüktif, osteoindüktif, yapısal olarak kemiğe benzer, kullanımı kolay ve ekonomik olmalıdır [26, 28].

Kortikal kemik greftleri, otojen kansellöz kemik greftlerine nazaran biyolojik uyum açısından daha az başarılıdır. Kortikal kemiğin porozitesinin az olması sebebiyle damarsal yapıların greft içine doğru invazyonu güç ve yavaştır. Kortikal kemik, trabeküler kemiğe göre daha az sayıda osteoblastik progenitor hücre içerir. Kortikal kemikteki hücreler, oksijen difüzyonu ve besin aktarımının az olması nedeniyle nakledilmeye kansellöz kemiğe nazaran daha az uygundur [29].

Kemik grefti cerrahi esnasında defekt alana yerleştirildiğinde; kanama, inflamasyon, dokunun revaskülarizasyonu ve greftin lokal doku ile yer değiştirmesi ve yeniden yapılanması (remodelasyonu) sıra ile meydana gelir. Başarılı bir greft inkorporasyonu; nakledilen dokunun orijinal doku kadar iyi sağlam ve dayanıklı olması ile fonksiyon ve mekanik bütünlüğünü greft inkorporasyonu sırasında ve sonrasında sürdürmesi şeklinde tanımlanabilir [29].

Kemik iliğinin osteojenik greft gibi tek başına kullanımı yapılabilir. Aspirasyon sonrası elde edilen kemik iliği; osteoblastik progenitorler, sitokinler, diğer kemik iliği kökenli hücreler ve revaskülarizasyonu hızlı olan emilebilir biyolojik fibrin matriksten oluşur.

Allogreftler; gözenekli yapıları içinde progenitor ve endotelial hücrelerin tutunduğu birçok kimyasal alan barındırırlar. Aynı zamanda, ortamda osteoklastlar tarafından yıkılan ve serbest kalan kemik matrikste var olan büyüme faktörlerini de içerirler. Allogreft kemikte, osteoindüktif özelliği ile önemli kabul edilen kemik morfojenik proteinleri de bulunur. Demineralizasyon, allogreft kemik matriksindeki büyüme faktörlerinin salınımını arttırarak kemik iyileşmesinin uyarılmasında önemli göreve sahiptir [28, 29].

Demineralize kemik matriksi (DKM), osteokondüktif ve farklı seviyelerde osteoindüktif bir materyal olarak kemik defektlerini onarmak için kullanılır. DKM

tekrar damarlanması hızlı bir şekilde gerçekleşir ve aynı zamanda otolog kemik iliği için iyi bir taşıyıcıdır [26].

Kemik morfojenik proteinleri, kollajen olmayan düşük molekül ağırlıklı glikoproteinlerdir. Bu protein ailesi çok sayıda büyüme ve farklılaşma faktörünü içinde barındıran TGF- β (transforme edici büyüme faktörü- β) grubuna dahil olup dimerik moleküllerden oluşmaktadır. BMP adı ile anılan BMP-2'den BMP-18'e kadar toplam on yedi üyesi insan vücudunda tespit edilmiş olmasına rağmen osteojenik proteinler, kırık kaynaklı morfojenik proteinler ya da büyüme ve farklılaşma faktörleri gibi çeşitli isimlerle anılan otuzdan fazla molekül bu aile içinde sayılmaktadır. Ayrıca hepsi birlikte TGF- β grubunun üçte birinden fazlasını oluşturmaktadırlar. Kemik morfojenik proteinleri, tüm kemik proteinlerinin ancak %0,1'ini ağırlık olarak oluştururlar [28].

İçinde kemik morfojenik proteinlerini barındıran DKM immünojeniktir. Ancak saf olarak elde edilen BMP, immünojenik ve türlere özgü değildir. Rekombinant gen teknolojisi kullanılarak kemik morfojenik proteinleri tek tek üretilmiştir. Klinik kullanımda ise BMP karışımları saflaştırılmış kemik ekstrallerinden sağlanmaktadır. Çalışılmakta olan rekombinant BMP'ler; rh-OP-1 (osteojenik protein 1), rh-BMP-2 ve rh-BMP-7'dir.

Kemiğin ekstrasellüler matriksinden elde edilen büyüme faktörleri gibi (DKM, BMP) kan dolaşımında bulunan diğer büyüme faktörlerinin de kırık iyileşmesinde etkisi vardır. TGF- β , kemik metabolizmasında en çok araştırılan büyüme faktörüdür. BMP'leri oluşturan molekül ailesinin hepsini kapsar. Trombosit kaynaklı büyüme faktörünün (PDGF), tavşanların tibialarına yapılan osteotomilerde araştırılmış ve kırık iyileşmesini uyardığı tespit edilmiştir. Cerrahi esnasında otolog büyüme faktörleri, "cell saver" cihazı kullanılarak toplanan kan pıhtısından santrifüj sonrası elde edilirler. Elde edilen bu madde özellikle TGF- β ve PDGF'den oldukça zengindir. Kırık iyileşmesinde etkili diğer faktörlerden temel fibroblast büyüme faktörünün de (bFGF) klinikte kullanımı vardır [30].

Gen tedavisi ile ex vivo veya in vivo olarak elde edilen nükleik asit materyallerinin (DNA veya RNA) hücre içine transferi yapılmaktadır. Konjenital veya edinsel hastalıkların tedavisinde gen tedavisinde araştırmalar devam etmektedir. Gen tedavisinin, ekzojen kaynaklı osteoindüktif kemik morfojenik proteinlerinin

bolus olarak ortama verilmesine göre farklı avantajları vardır [31]. Hücresel taşıyıcı ile modifiye edilmiş genetik materyalin kullanılması, osteokondüktif matrikse göre zamanlama ve konsantrasyon olarak daha fizyolojiktir. Kemik iyileşmesinde etkili bazı genler, çeşitli vektörlerin yardımıyla iyi sonuçlarla transfer edilmiştir. (TGF- β 1, LMP-1 ve BMP-2) Viggeswarapu ve ark. LIM mineralizasyon protein-1'i adenoviral vektör aracılığıyla transfer etmiştir [32]. Bu gen tedavisi sayesinde sistemik veya lokal kemik yapımı arttırılarak kırık iyileşmesini daha iyi olacağı tahmin edilmektedir [26, 29, 33, 34].

2.7. KEMİK STROMAL HÜCRELER

Kök hücreler, farklı hücelere dönüşebilen ve dönüştüğü hücre fonksiyonlarına sahip başkalaşım geçirmemiş hücrelerdir [35].

Birçok çalışma kemik iliği stroma hücreleri “*multipotent yetiskin progenitör hücreler*” (MAPCs), “*kemik iliği stroma kök hücreleri*” (BMSCs) ve “*mezodermal progenitör hücreler*” (MPCs) “*mezanşimal kök hücreler*” (MSC’ler) gibi isimlerle tanımlanmaktadır. Birçok çalışmada çeşitli dokulara dönüşebildiğini göstermektedir. Sanchez-Ramos kemik iliği stroma hücrelerinin nöronlara dönüşebildiğini; Ferrari ve ark. ise iskelet kas dokusunun onarımında görev alabildiğini göstermiştir [36, 37].

Birçok doku ve organda var olan kök hücrelerin günümüzdeki gelişmelerle hücre biyolojisi çok daha iyi anlaşılmaktadır. İn vitro kültür metotlarındaki ilerlemeler önceleri imkansız olarak kabul edilen değişik hücre tiplerinin çoğaltılmasını rutin bir uygulama haline getirmiştir. MSC’ler doğum sonrasında kemik iliğinin hematopoetik olmayan stromasında bulunur. Son yayınlar kemik iliği stroma hücrelerinin osteoblast, kondrosit, myoblast, adipozit, kardiyomyozit, hepatosit ve nöral hücelere farklılaşabildiğini göstermektedir [7]. MSC’ler kemik iliği, periost, trabeküler kemik, sinovium, adipoz doku, iskelet kasları, diş pulpası ve periodonsiyumdan izole edilerek çoğaltılmıştır. Bu hücreler kemik, yağ, kırık ve kas dokuları gibi konnektif doku hücrelerine dönüşebilmektedir. Kök hücreler ihtiyaç

halinde kan-kemik iliği bariyerinden geçerek vücut dolaşıma katılırlar ve ihtiyaç olan dokuya giderek tamir olayına katılırlar [35].

Kemik iliği stromal dokusu retiküler hücreler, adipoz hücreleri, osteojenik hücreler, düz kas hücreleri, endotelial hücreler ve makrofajlar gibi heterojen bir hücre popülasyonlarından meydana gelmiştir. Bir şekilde yaralanma olursa stromal dokuda bulunan kök hücrelerin katılımıyla onarım yapılmaktadır. Kemik iliği stroması dışında MSC'ler periost, yağ dokusu ve deriden de izole edilebilmektedir. MSC'ler kırıkta, kemik, kas ve yağ dokusu gibi çeşitli bağ dokusu hücrelerine dönüşebilen multipotent hücrelerdir. MSC'lerin in vivo ve in vitro olarak osteoblastlara dönüşebildiği birçok yayında belirtilmiştir [9]. Literatürde MSC'ler içinde ender de olsa sadece mezodermal değil, ayrıca endodermal dokulara dönüşebilen pluripotent hücrelerin de bulunduğu rapor edilmiştir [7]. İzole edilmesinin kolay oluşu ve geniş başkalaşım potansiyeli ile MSC'ler klinikte kullanım yönünden diğer kök hücrelerle değerlendirildiğinde çok daha avantajlıdır. Yetişkin MSC'lerin çok yönlü dönüşüm potansiyelinin yanında allojenik transfer sonrası immün reaksiyonun çok az olması MSC'nin hücre terapi uygulamalarında doku onarım ve rejenerasyon amaçlı kullanım için ideal hücre tipi olmasını sağlamaktadır. Sistemik hastalıklar tedavisinde ve lokal doku defektlerinin onarımında MSC'lerin faydalı olabileceği birkaç çalışmada gösterilmiştir [9]. İn vivo olarak çok az sayıda hücre izole edilebildiği için MSC'lerin in vivo uygulama yapılmadan önce otolog serum desteğinde in vitro olarak çoğaltılması gerekmektedir. Bazı koşullarda kemik iliğinden izole edilen MSC'ler kemik ve kırıkta dokuya dönüşebilirler. Kemik dokusunda hem farklılaşmamış hem de farklılaşmış osteoprogenitör hücrelerin var olduğu gösterilmiştir. Kemik kırıldığında kemik iliği, kemik iliği kavitesi dışına açılmakta ve bol miktarda kanama sonucu hematoma oluşmakta ve sonuçta tamir potansiyeli yüksek bir doku meydana gelmektedir. İn vivo olarak eklem kırıkta hasarlanırsa tamir için çok kısıtlı kapasiteye sahiptir. Kırıkta kondrosit progenitör hücrelerin var olup olmadığı halen kesinleşmemiştir [9]. Kırıkta yaralanmalarında kök hücreler onarım işleminde görev almaktadır, fakat sayıları ve düzenleyici faktörler sınırlıdır. Bu onarımda çalışan hücrelerin çevredeki kas, kemik ve diğer kırıksız dokulardan ortama göç ettiği düşünülmektedir [35].

Kırık iyileşmesi günümüzde bile çözülememiş kısımları var olan birçok karmaşık biyolojik olayın sonucu gerçekleşmektedir. Bu olaylardan birisini de kemik indüksiyonu ve kondüksiyonu için hücre içi ile hücre dışı sinyal sistemi gerçekleştirmektedir. Kemik kırığında birinci gün hematoma oluşur, mezenşimal hücreler olay yerine göç ederler ve kemik iliğindeki MSC'lerde osteojenik farklılaşma başlar. İntramembranöz kemikleşme için preosteoblastlar ve osteoblastların değişim ve başkalaşımı ile birlikte anjiyogenez üçüncü gün başlar. 7 ve 10. günler arasında intramembranöz kemikleşmede hücre proliferasyonu zirve noktasına varmış, kırıkta oluşumu ve endokondral kemikleşme gözlenmeye başlamıştır. 14. Günde hücre proliferasyonu kesilir fakat osteoblastik aktivite sürmektedir. Yumuşak kallusta mineralizasyon, kırıkta rezorpsiyon oluşurken yeni kemiğin oluşumu 21. güne kadar devam etmektedir. Bu safha kemikleşmenin olduğu en aktif zaman aralığıdır. 21. günde kemik remodelizasyonu başlar ve lameller kemik meydana gelir. Serebral yaralanma, miyokardiyal iskemi/infarkt, kas distrofileri ve kemik kırıkları ile ilgili konularda yapılan hayvan deneyleri ile MSC'lerin intravenöz enjeksiyonu veya lokal uygulamalarında yaralanma bölgesine ulaşarak ihtiyaç olan hücre tipine farklılaştığı gösterilmiştir. MSC'nin osteosit ve kondrosite dönüşebildiğini ispat etmiş laboratuvar çalışmaları ışığında doku tamiri konusunda bir çok in vivo çalışma yapılmaktadır. Değişik cins birçok hayvanda kritik büyüklükte oluşturulan kemik defektlerinin onarımının değerlendirilmesinde MSC kullanılmıştır. Mezenşimal dokulardaki bir genetik bozukluk sonucu oluşan osteogenezis imperfektalı radyasyona maruz bırakılmış farelere sağlıklı kemik iliğinden elde edilmiş stromal hücreler aşılandığında nakledilen hücrelerden fonksiyonel kemik ve kırıkta formasyonu geliştiği tespit edilmiştir. Benzer olarak osteogenezis imperfektalı çocuklara kemik iliği hücreleri aşılandığında yan etki görülmediği gibi üç ay sonra osteoblast sayısında belirgin artış, yeni lameller kemik oluşumunda ve tüm vücut mineral içeriğinde yükselme sağlanmıştır. Bunlara ek olarak kırık sıklığında azalma olup vücut büyüme oranı artmıştır [9, 35].

Shirley ve ark. yaptıkları deneyde florasan ile işaretli kök hücreleri sistemik olarak tavşanlara vermişler, işaretli bu hücrelerin kemik kırığının tamirinde rol aldıklarını tespit etmişlerdir. Bu çalışma, onarımda faaliyet gösteren bazı osteoblastların kemik kırığından uzak bölgelerdeki kemik iliği veya diğer dokulardan

kan dolaşımına katılarak kırık bölgesine gelen kök hücrelerden kaynaklandığını ispatlamaktadır.

Tümör, travma ve deformitelere bağlı oluşan kemik defektleri maksillofasiyal cerrahlar için önemli bir sorun olarak karşılımlarına çıkmaktadır. Büyük ve kompleks morfolojideki defektlerin onarımında bu patolojiler klinik zorluklara neden olmaktadır. Otojen greftler altın standartta olarak kabul edilse de yetersiz kemik hacmi, donör saha komplikasyonları ve oluşturdukları deformiteler ile cerrahi sonrasında sebep oldukları rahatsızlıklar nedeniyle kullanımları kısıtlıdır. Doku mühendisliği; bilimsel prensipler ışığında biyomateryaller, hücreler ve faktörleri birlikte veya ayrı ayrı kullanarak yasayan dokuların tasarımı, yapımı, modifikasyonu ve gelişimini sağlamaktadır. Osteogenezi artırmak için hücreler verici sahada herhangi bir soruna sebep olmadan tanımlanmış birçok otolog kaynaktan elde edilebilmektedir. Alınan kısıtlı sayıdaki hücreler doku mühendisliği yöntemleri ile çok büyük sayılara kadar çoğaltılabilmektedir. Son zamanlarda kraniyofasiyal rejenerasyonda mezenşimal kök hücre kullanılarak birçok hayvan çalışması yapılmaktadır [35].

2.8. MANYETİZMA VE MANYETİK NANOPARTİKÜLLER

Nanopartiküller kataliz, manyetizma ve elektronik gibi birçok alanda var olan dikkat çekici özelliklerinden dolayı çok kez çalışılmıştır. Endüstriyel uygulamalarda; manyetik motor kapakları, banka çeklerindeki manyetik mühürler, manyetik kayıt ortamı, manyetik rezonans fark ortamı gibi ve biyomedikal uygulamalarda; kanser tedavisinde kullanılan teröpatik ajanlar gibi birçok alanda kullanımları büyük yer kaplamaktadır [38].

Her uygulama alanı farklı özellikler gerektirmektedir. Biyomedikal uygulamalarında oda sıcaklığında süperparamanyetik özellik gösteren nanopartiküller tercih sebebidir. Dahası biyolojik uygulamalarda, tıbbi teşhis ve tedavide kullanılacak manyetik partiküllerin su, nötr pH' da ve fizyolojik tuz koşullarında kararlı olması zorunludur.

Biyomedikal kullanımlarda boyu 100 nm' den küçük partikülleri uygulamanın en önemli avantajları; ligantların yüzeye kolaylıkla tutturulmasını

sağlayacak yüksek etkinlikteki yüzey alanları, yüksek kararlılıkta düşük çökme hızları ve gelişmiş dokusal difüzyon göstermeleridir. Çok yüksek manyetik özelliğe sahip nikel ve kobalt gibi maddeler, oksitlenme zaafı ve toksisiteye neden olmaları nedeniyle biyolojik uygulamalarda çok ilgi çekmezler [38].

Sonuç olarak, kullanıma getirdikleri kolaylıklar ve kazandırdıkları özellikler sebebiyle biyomedikal alanında kullanımları araştırılan ve hızla yaygınlaşan manyetik nanopartiküllerin kullanıldığı tıbbi konular şunlardır; in-vivo teşhis amaçlı manyetik rezonans görüntüleme, in-vivo tedavi amaçlı kontrollü ilaç uygulamaları, hipertemi, gen tedavisinde taşıyıcı vektör, yönlendirme ve tetikleme ajanı olarak kullanımları, in-vitro teşhis ve tedarik amaçlı çeşitli biyolojik moleküllerin izolasyonu ve saflaştırılması.

Günümüzde manyetik nanopartiküller rutin olarak hedef organlar (akciğer ve karaciğer) ve lenf nodülleri için kontrast ajan olarak görüntülemede kullanılmaktadır. Yeni gelişmeler moleküler görüntüleme ve hücre izleme üzerine odaklanmıştır. Nanopartiküllerin yüzeyine işlevsellik kazandırılması zor bir çalışmadır. Diğer bir zorluk ise kan dolaşım sisteminde uzun süre nanopartiküllerin gizli dolaşması ve ilişkili ligantların tümör hücrelerinde spesifik internalizasyonudur [38].

Manyetizma, elektrik yüklerinin hareketinden oluşmaktadır. Bütün materyallerin manyetik özelliği vardır ancak çoğunun etkisi çok küçüktür. Bir atomun elektronları, spin yada spin ve orbital hareketleri nedeniyle manyetik bir moment kazanır. Kendi çevresinde dönüş hareketi yapan yüklü bir küreciğe benzer davranışı atom çekirdeği ve etrafındaki dolaşma hareketi yapan elektronların yapması manyetik özellik kazanmasına neden olur [39]. Yörüngede dönen bir elektronun uygulanan manyetik alana cevabı maddenin spin konfigürasyonu ile belirlenmektedir. Her birimin manyetik momenti elektron spinlerinin, elektronlar arası süper değişken etkileşimlere bağlı olarak kendiliğinden dizilimleri sonucunda ortaya çıkar [40]. Böylece manyetik dipollerin yönlenmesiyle mıknatıslanma meydana gelir. Manyetik alan arttıkça dipollerin yönlenme derecesi fazlalaşır ve harika sıralanıma ulaşıncaya doyumluk mıknatıslığı sağlanır. Manyetik partiküller 1'den 100 nm boyuna kadar değişen skalada metal ve metal oksitlerden meydana gelmektedir. Bu metal ve metal oksitler Ni, Co, Fe, Fe₃O₄ ve Fe₂O₃'den oluşmaktadır [38].

Manyetik nanopartiküllerin sentezinde medikal gözlem kullanımları için çok sayıda kimyasal metot kullanılmaktadır:

- Mikroemülsiyon
- Sol-Jel Sentezi
- Sonokimyasal Reaksiyon
- Hidrotermal Reaksiyon
- Prekürsörlerin Hidrolizis ve Termolizisi
- Akış İnjeksiyon Sentezi
- Elektrospray Sentezi

Süperparamanyetik nanopartiküllerin üretimi kolloidal yapıları sebebiyle karmaşık bir süreçtir. İlk temel sorun monodispers olarak manyetik taneciklerin uygun boyutta oluşumu için deney şartlarının belirlenmesidir. İkinci önemli nokta ise ultrasantrifüksiyon, büyüklük ayırma kromatografisi, manyetik filtrasyon ya da akış alanı eğimi gibi karmaşık bir saflaştırma prosedürü olmadan üretilebildiği tekrarlanabilir bir uygulamanın seçimidir. Bu yöntemler yakın aralıkta boyut dağılımı ve homojen kompozisyonda partiküllerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Ancak manyetit üretimi için en sık kullanılan metot demir tuzlarının kimyasal ikili çöktürme yöntemidir [38].

Manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin yüksek manyetik momente sahip olmaları, toksik olmamaları ve kolay sentezlenebilmeleri gibi avantajları sebebiyle manyetik demir oksit nanopartikülleri biyotıp alanında çok tercih edilen bir malzeme haline gelmiştir. Manyetik nanopartiküllerin en önemli avantajı ortamda manyetik alan kullanımıyla kolaylıkla ayrıştırılabilmeleridir. Bu özelliklerine ek olarak fiziksel ortamlarda kararlılığını koruması ve biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere yüzeyine biyolojik bir molekül eklenebilmesi için polisitiren, polietilen glikol, polivinil alkol ve kitosan gibi değişik doğal ve sentetik polimerler ile işlevselleştirilerek kompozit yapıları oluşturulmaktadır [38].

Günümüzde manyetik partiküllere yeni fonksiyonlar kazandırmak, inert bir yapı oluşturmak, manyetik çekirdeğin oksidasyonunu engelleyerek manyetik özelliğini kaybetmeyecek inert bir dış kabuk oluşturmak için yeni denemeler içine girilmiştir. Bunun sonucunda altın, gümüş gibi metalik malzemelerle kaplı manyetik

nanopartiküller ortaya çıkmıştır [41]. İlk olarak 2001 yılında Cui ve arkadaşları bu yeni kompozit partikülleri oluşturmuşlardır [42].

Altın hem insan hem hayvan uygulamaları için biyouyumlu olması, toksik olmaması, kimyasal kararlı olması ve yüzey plasmon özelliği sebebiyle UV-görünür bölgede bir absorpsiyon bandı vermesi gibi özellikleri nedeniyle en çok kullanılan kabuk malzemesi olmaktadır. Ayrıca enzim, protein, DNA gibi biyolojik moleküller kovalent olarak altın yüzeyine şu anki bulunan malzemelere nazaran daha güçlü bağlanabilmektedir. DNA ya da antikor gibi biyolojik moleküller manyetik-altın nanopartiküllere doğrudan bağlanamazlar. Geleneksel bağlanma yöntemleri ikiye ayrılır. Birincisi biyotinlenmiş DNA kullanarak avidinle aktifleştirilmiş manyetik-Au nanopartiküllerine bağlanma gerçekleştirilmiştir. Diğer yöntem ise altının tiyole olan ilgisi kullanılarak tiyol modifiye edilmiş DNA gibi biyolojik moleküllerin kullanılmasıdır. İkinci yöntemde diğerine göre daha az zaman ve emek harcanarak sonuca ulaşılmaktadır. Sonuç olarak altın kabuğunun biyolojik uygulamalara uygun olması, gösterdiği optik özelliği, manyetik çekirdek partikülün manyetik özelliği nedeniyle hem altının hem de manyetitin özelliklerinin birlikte kullanılabilmesi çok işlevselli partiküller ortaya çıkmıştır [38, 41, 43].

2.9. MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN ALTINLA KAPLANMA METODLARI VE BUNLARIN UYGULAMA ALANLARI

Altın kaplı manyetik nanopartikül elde edilmesi manyetik çekirdek ve altın kabuk olmak üzere iki ana prosesten meydana gelmektedir. Altın kaplı manyetik nanopartikül sentez yöntemleri iki şekilde yapılmaktadır. Bunlardan birincisi manyetit partikülleri ve bunun çevresini kaplayacak altını içeren sabit reaktörler şeklindeki ters miçel yöntemidir. Ters miçel metodunda verim düşük, üretim zordur. İkinci metod ise hem magnetite nanopartiküllerin hem de kaplama işleminin sulu fazda gerçekleştirilmesidir. Demir tuzlarının alkalın bir ortamda ikili çöktürülmesiyle elde edilen manyetit nanopartiküllerinin kloraurik asit ile indirgenerek altın kaplamanın yapılmasıdır. Bu su fazlı yöntemde basit, hızlı bir şekilde üretilen partiküller su içinde dağıtılabilmektedir. Bu metodda partikül boyu, altın kabuk

kalınlığı çok zor değerlendirilmektedir. Ayrıca altın ile kaplanmış partiküller ile kaplanmamış manyetit nanopartiküller aynı örnek içinde var olup birbirinden ayrıştırılması sorun oluşturmaktadır [38, 41].

Üçüncü bir metotta ise manyetit sentezi ve altın kaplamanın organik fazda yapılmasıdır. Demir (III) oleatın ısı bozulmasıyla meydana gelen manyetit nanopartiküllere kaplayıcı bir ajan varlığında altın asetatın indirgenmesiyle kaplama oluşturulmaktadır. Organik yöntemde partikül boyu ve altın kabuk kalınlığı kontrol edilebilirken manyetik özellikleri zayıf olup sulu çözelti fazına geçtiklerinde çökme göstermektedirler. Ek olarak işlemden uygulanan çözücüler çevre dostu olmayıp büyük ölçekte sentez de problem oluşturmaktadır.

Partikül boyutunu kontrol edip bulunduğu sulu ortamda kararlılığını sağlamak için manyetik özellikteki çekirdeğin organik fazda altın kaplama işleminin sulu bir düzenekte yapıldığı sentez metodu geliştirilmiştir. Bu metotta partikül boyutu çok iyi kontrol edilirken tamamen kaplama işlemi bir seviyede başarılı olup kararlılığının sağlanması bütünüyle keşfedilememiştir.

Manyetit nanopartikül yüzeyini çepeçevre kaplamayacak şekilde altın nanopartiküllerin bağlandığı altın-manyetit kompozitleri yapılmıştır. Bu kompozitler, protein ayırma, optik görüntüleme ya da kataliz gibi tam kaplama gerektirmeyen uygulamalar için kullanışlı malzemelerdir. Bu tarz kompozitler amin ya da tiyol grupları gibi işlevsel molekülleri bulduran manyetit nanopartikül yüzeyine altın nanopartiküllerin kovalent ya da gama ışınları uyarılmasıyla bağlanarak hazırlanmaktadır. Bu metodla kompozit yapıların kararlılığını oluşturabilecek seviyede manyetit yüzeyine bağlanan altın nanopartikülü kontrol edememektedir. Komple altın nanopartikül ile kaplanmamış kompozitler manyetit çekirdeğin bozulması ya da okside olması sebebiyle çok sınırlı çevrelerde kullanılabilir. Özellikle partiküllerin bir araya gelip aglomerasyon oluşturduğu kan damarlarının tıkanması gibi istenmeyen durumların olduğu in vivo uygulamalarda partikül aglomerasyon kararlılığı çok önemli bir konudur. Demir oksit kararlılığını etkileyen partikül boyu, yüzey fonksiyonallitesi, pH ve iyonik güç gibi parametreler olduğu bilinmekte olup, Au-Fe₃O₄ kompozitler için aglomerasyon kararlılığının neler olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir [38, 41].

Mandal ve grubu, miçel çözeltisinde 13 nm boyutundaki Fe_3O_4 nanopartiküllerini üretip kararlılığını korumak ve okside olmasını engellemek amacıyla altın, gümüş gibi metallerle kaplamışlardır. Fe_3O_4 nanopartiküllerini toksik olmayan glukoz indirgeme ajanı ile kaplayarak $(Fe_3O_4)_{\text{çekirdek}}-(Au)_{\text{kabuk}}$ ve $(Fe_3O_4)_{\text{çekirdek}}-(Ag)_{\text{kabuk}}$ yapısında partiküller oluşturmuşlardır. Çeşitli yöntemlerle karakterize ederek manyetik özellikleri değerlendirilmiştir. Üretilen partiküllerin MRI ve DNA sensörü gibi uygulamalarda kullanılabileceğini belirtmişlerdir [44].

Cui ve arkadaşları, altın kaplı manyetik nanopartikülleri üreterek IgG ve IgM antibadilerini partikülün yüzeyinde immobilize etmişlerdir. Kan içindeki HBV antijenini göstermek için bunları katı faz substrat olarak kullanmışlardır. Yapılan araştırmalar neticesinde bunları immunolojik ve affinite esaslı tayinler için yeni bir substrat olabileceklerini belirtmişlerdir [42].

Wang ve arkadaşları, yetişkin bir sıçanın omiriliğinden sinir kök hücrelerini eld etmişler ve elde edilen sinir kök hücrelerine altın kaplı manyetik nanopartikülleri yükleyerek manyetik rezonans görüntüleme kontrast artırıcı olarak kullanılabilirliğini çalışmışlardır. 20 hücreyi bu partiküller ile işaretledikten sonra sıçanların omiriliğine yerleştirerek 48 saat ve bir ay sonra MRI ile görüntülemişlerdir. Yaptıkları araştırmalar neticesinde altın kaplı manyetik nanopartiküllerin güçlü kontrast artırıcı özellikleri olduğunu ve nakledilen hücrelerin uzun süreli in vivo izlenmesi için güzel MRI işaretleri olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir [45].

Jeong ve arkadaşları, maghemit (Fe_2O_3) nanopartiküllerini sentezleyip altın tuzunu hidroksilamin ile indirgeyerek çevresinde altın kabuk oluşturmuşlardır. Altın kaplı bu manyetik partiküllerin yüzeyine karboksil içeren alkil tiyol grubu olan merkaptohexadekanioik asit (MHA) bağlayarak pozitif yüklü hekza-argin esteraz (Arg_6 -esterase) enzimi ile işaretlemişlerdir. Esteraz enzimi takılmış bu altın kaplı manyetik partikülleri ile p-nitrofenol butirat olan renkli substratının kopma (dissociation) hızı izlenerek enzimatik aktivitesini değerlendirmişlerdir. Yüzeyinde enzim immobilize partiküller substrat çözeltisiyle etkileştirilip UV-görünür alan spektrumu ile p-nitrofenol butirat ürününün kopma hızı izlenmiştir. Enzim immobilize partiküller manyetik etki yardımıyla ayrılıp tekrar yeni bir substrat çözeltisi ile etkileştirilerek tekrar tekrar bu partiküllerin kullanılabilirliği

araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmalar neticesinde her bir manyetik ayırmadan sonra enzim immobilize edilmiş altın kaplı manyetik nanopartiküllerin hiçbir enzim aktivitesinde azalma olmadan tekrar tekrar kullanılabilirdiğini rapor etmişlerdir [46].

Goon ve arkadaşları 50-150 nm aralığında manyetit-altın kompozitleri üretmişlerdir. Manyetit nanopartikülleri ikili çöktürme metoduyla hazırlayıp manyetit nanopartiküllerin yüzeyini biyoyumlu polietilenimin ile kaplayarak 2 nm boyutundaki altın nanopartiküllerin bu yüzeye bağlanmasını gerçekleştirmişlerdir. Partiküllerin aglomerasyona karşı kararlılığını PEI ile sağlarken altın nanopartiküllerin manyetit yüzeyine bağlanmasıyla manyetit çekirdeğin kimyasal saldırılarına karşı koruyucu bir tabaka meydana getirmişlerdir [47].

Pham ve arkadaşları 15-40 nm boyutundaki altın kaplı manyetik nanopartikülleri sitrat indirgeme ajanı kullanarak üretmişlerdir. Manyetit çekirdeği Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzlarının kuvvetli bir alkalın çözeltisi ile ikili çöktürülmesi sonucu meydana getirerek bu manyetit çekirdeği sitrat ile stabilize edip altın tuzunu ilave ederek kaplama gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen altın kaplı manyetik nanopartikülün yüzey plasmon rezonans peak ölçümü 528 nm olarak rapor etmişlerdir. Ürettikleri bu partikülleri IgG proteininin biyolojik ayırma işleminde kullanmışlardır. Bu uygulama ile 400 ng/ml konsantrasyonunda %35 en yüksek verimde IgG ayrımı sağlamışlardır [48].

Liu ve arkadaşları, hücre ayırma gibi biyomedikal uygulamalar için polyol prosesi ile eş boyutlu altın kaplı manyetik nanokristalleri üretmişlerdir. Fe_3O_4 -Au nanokristallerinin yüzeyi karboksil gruplarıyla işlevselleştirilmiş ve üzerine karbodimid aktivasyonu ile FITC'li streptavidin immobilize etmişlerdir. Hazırlanan bu nanokristaller, hücre karışımları içinde biyotinli anti CD^{4+} antibadisi bağlanmış hücrelere yüksek seçicilik ve verimde bağlanarak hücrelerin ayrılması başarılmıştır. Bu şekilde sıçan dalağında izole edilmiş CD^{4+} T lenfositlerine üretilen bu partiküllerin bağlanabilirliği kontrol edilmiştir. Yapılan çalışmalar neticesinde bu partiküllerin bütün dalak hücrelerinden CD^{4+} T lenfositlere yüksek seçicilikte bağlandığını tespit etmişlerdir. Böylece bu nanokristallerin, hücre ayırma işlemleri için kullanışlı malzemeler olabileceği ek olarak çeşitli hastalıkların tanısı, izlenmesi ve tedavisini kapsayan biyomedikal uygulamalarda kullanılabilecek malzemeler olduğu belirtilmiştir [49].

Pita ve arkadaşları, kobalt ferrit nanopartiküllerini üreterek, altın tuzunun tekrarlamalı indirgenmesiyle eş boyutlu suda dağılılabir 21-29 nm aralığında altın kaplı manyetik nanopartikülleri meydana getirmişlerdir. Tiyol modifiye edilmiş peptit nükleik asit oligomerleri ile bu partikülleri işlevsel hale getirip çözeltideki hedef DNA molekülü ile hibridizasyonunu Rodamin 6G floresan işareti ile değerlendirmişlerdir. Tek nükleotit mutasyonu da araştırılarak uzun süren DNA genotipleme uygulamaları için biyosensör çalışmalarında bu partiküllerin kullanılabileceği bildirmişlerdir [50].

Seino ve arkadaşları kompozit altın-demir oksit nanopartikülleri sonokimyasal bir metotla üretilip bunları polietilenimin (PEI) gibi suda çözünen katyonik polimerle modifiye etmişlerdir. Altın kaplı manyetik nanopartiküller PBS gibi biyolojik sistemlerde kullanılan tamponlar içinde büyük topaklanmalar meydana getirirler. Bu sebepten ötürü asidik solüsyon içinde kompozit bu nanopartiküllerin dağılımını PEI modifikasyonu ile geliştirmişlerdir. PEI sayesinde partiküllerin biyolojik tampon içinde topaklanmasını azaltarak elde edilen partiküller özellikle sülfür içeren amino asitlerle etkileşime girerek dışarıdan bir manyetik alan uygulanması ile çözelti içinden toplanabildiğini göstermişlerdir. Bu esnada da partiküller PEI sayesinde pozitif yük yüklenmişlerdir. Böylece elde edilen bu kompozit nanopartiküller PEI ile modifiye olduğunda hem Au-S bağı yapabildiğini hem de tampon çözeltiler içinde iyi dağılım gösterdiğini rapor etmişlerdir [51].

Polietilenimin (PEI) gibi suda çözünen hem amino hem imin gruplarına sahip olan katyonik polimerlerle de elektrostatik olarak manyetik-altın nanopartikülleri kaplanabilmektedir. Sun ve arkadaşları, PEI modifiye edilmiş Fe_3O_4 -Au nanopartikülleri üretilerek bunlarla memeli hücrelerinin genomik DNA'nın yüksek verim ve saflıkta ekstraksiyonu ve DNA'nın serbest bırakılmasını başarmışlardır [43].

Manyetik altın kaplı nanopartiküller in vivo gen ve ilaç salımı uygulamalarında taşıyıcı olarak da tercih edilmektedirler. Jafari ve arkadaşları, ters miçel yöntemiyle elde ettikleri manyetik-altın nanopartikülleri ilaç salımı ve MRI için biyoyumlu poligliserol ile kaplamışlardır. Manyetik özellikleri incelenerek MTT ile hücreye toksik olmadığını ve biyomedikal uygulamalar için uygun bir taşıyıcı olabilecekleri belirtilmiştir [52].

Silva ve arkadaşları, 9nm boyunda demir oksit nanopartikülleri mikroemülsiyon metodu ile üretim indirgeme ajanı olarak glikozu tercih etmişlerdir ve altın ile kaplamayı gerçekleştirmişlerdir. Yeni bir altın çekirdek oluşumundan sakınıp altın kabuğun oluşumunu kontrol ederek çeşitli metodlarla karakterize edip kaplama sonucunda manyetik özelliğinde azalma olduğunu göstermişlerdir [53].

Süperparamanyetik demir nanopartikülleri (SPION), hücre işaretleme ve ayırma, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), ilaç salımı ve manyetik hypertermia gibi biyomedikal alanlarda çok kullanılmaktadır. Bu partikülleri altın ile kaplayarak ve biyolojik moleküller ile fonksiyonel hale getirerek biyomedikal kullanımlarda çeşitli fırsatlar oluşmaktadır. Suda dağılan altın kaplı demir oksit nanopartikülleri genellikle manyetik çekirdek yüzeyinde Au^{3+} iyonlarının hidroksilamin ya da sitrat ile tekrarlı indirgenmesiyle sentezlenmektedir. Lu ve arkadaşları sitratla Au^{3+} iyonlarını manyetik nanopartikül çekirdekleri yüzeyinde indirgeyerek altın ile kaplamayı oluşturmuşlardır. Bu partiküllerin manyetik özelliklerini inceleyerek saf altın nanopartiküllerde herhangi bir manyetik özellik gözlenmezken, altın kaplı manyetik partiküllerinde süperparamanyetik özellik gözlendiğini belirterek bu partiküllerin manyetik ayırma ve saflaştırma gerektiren biyomedikal çalışmalarda kullanılabileceğini bildirmişlerdir [38, 54].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmadaki cerrahi işlemler, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları ve Araştırma laboratuvarında yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan jelatin sponge (GelSpon-P®) doku iskeleleri Kırıkkale Üniversitesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.D.nda hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan rat kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücreleri Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Bankası laboratuvarında izole edilip Kırıkkale Üniversitesi Biyoloji Bölümünde Hücre Kültürü laboratuvarında çoğaltılmıştır ve cerrahi esnasında doku iskelesine kök hücreler emdirilip implante edilmiştir. Çalışmanın histomorfometrik değerlendirmeleri Hacettepe Üniversitesi Histoloji Anabilim Dalı'nda, mikroCT incelemeleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda, gerçekleştirilmiştir. Çalışmada alınan kan örnekleri Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında incelemeye tabii tutulmuştur.

Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan **2011/51-5** karar numarası ile etik kurul onayı alınmıştır.

Çalışmada 250-300 g ağırlığında, toplam 37 adet erkek Wistar-Albino rat kullanılmıştır. Denekler veteriner hekim idaresindeki Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları ünitesinden temin edilmiştir. Çalışmada aynı çevresel ortamda yetiştirilmiş, ratlar kullanılmıştır. Deney öncesi 20-21 °C sıcaklıkta 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ritmine tabii tutulup sıçanların anestezi uygulamasından 2 saat öncesine kadar gıdaya serbest erişimleri sağlanmıştır.

3.1. DENEY GRUPLARI

Scaffold grubunda toplam 7 adet, Scaffold + Manyetik yüklü altın kaplı nanopartikül grubunda toplam 12 adet, diğer grupların her birinde toplam 6 adet olmak üzere negatif kontrol grubu dahil toplam beş grup oluşturulmuştur. Tüm deneklerde 6 mm'lik kranial defekt oluşturulduktan sonra gruba spesifik işlemler

yapılmıştır. Dördüncü haftada Scaffold + Manyetik yüklü altın kaplı nanopartikül grubundan 6 adet, diğer her bir gruptan 3 adet rat sakrifiye edilip incelemeye alınmıştır. 16. Haftada Scaffold grubundan 4 adet, Scaffold + Manyetik yüklü altın kaplı nanopartikül grubundan 6 adet, diğer her bir gruptan 3 adet olmak üzere ratlar sakrifiye edilip gerekli histolojik, biyokimyasal ve radyolojik incelemeye tabii tutulmuştur.

Negatif Kontrol Grubu: Toplam 6 adet rat kontrol grubuna dahildir. Bu grupta 6 mm'lik kranial defekt oluşturulduktan sonra defekt onarımı için ek bir işlem yapılmadan sekonder iyileşmeye bırakılmıştır, gruptaki ratların 3 adeti 4. Haftada geri kalan 3 adeti ise 16 haftada sakrifiye edilerek incelemeye tabii tutulmuştur.

Otogreft Grubu: Bu grupta toplam 6 adet rat kullanıldı. Standart oluşturulan kranial defekt sonrası, oluşan defekt çıkartılan kemik parçası ile tekrar onarılıp 4. Haftada 3 adet ve 16. Haftada 3 adet olmak üzere sakrifiye edilip gerekli incelemeler yapıldı.

Scaffold Grubu: Bu grupta toplam 7 adet rat kullanıldı. Standart kranial defekt oluşturulduktan sonra, kranial defekt içerisine 6 mm çapta hazırlanan jelatin sponge (GelSpon-P ®) doku iskelesi yerleştirilerek 4. Haftada 3 adet, 16. Haftada 4 adet olmak üzere sakrifiye edilip incelemeye tabii tutuldu.

Scaffold + Kemik İliği Kökenli Mezenşimal Kök Hücre Grubu: Bu grupta toplam 6 adet rat kullanıldı. Daha önce rat femurundan izole edilip çoğaltılan kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücreleri cerrahi esnasında, 6 mm çapta hazırlanan jelatin sponge (GelSpon-P ®) doku iskelesine, mikropipet ile 50 mikrolitresinde 1.000.000 hücre olan medium emdirilerek yerleştirildi ve daha sonra standart olarak oluşturulmuş olan kranial defekt içerisine bu scaffold yerleştirildi. Onarım sonrası 4. Haftada 3 adet ve 16. Haftada 3 adet olmak üzere ratlar sakrifiye edildikten sonra gerekli incelemeler yapıldı.

Scaffold + Manyetik yüklü altın kaplı nanopartikül grubu: Bu grupta toplam 12 adet rat kullanıldı. Daha önce rat femurundan izole edilip çoğaltılan kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücrelerine Doku Mühendisliği Bölümü'nde üretilmiş olan altın kaplı manyetik yüklü nanopartiküller Hücre Kültürü laboratuvarında yüklendi. Cerrahi esnasında, 6 mm çapta hazırlanan jelatin sponge (GelSpon-P ®) doku iskelesine mikropipet ile 50 mikrolitresinde 1.000.000 manyetik yüklü

mezenşimal kök hücre olan medium emdirildi. Daha sonra standart olarak oluşturulmuş olan kranial defekt içerisine bu scaffold yerleştirildi. Onarım sonrası kranial defekt üzerine denk gelen cilde manyetik etki gösteren mıknatıs deney süresince sutüre edilerek orda kalması sağlandı. Postoperatif 4. Haftada 6 ve 16. Haftada 6 olmak üzere tüm ratlar sakrifiye edildi ve incelemeye tabii tutuldu.

3.2. KALVARYAL DEFEKT OLUŞTURULMASI

İntraperitoneal ketamin (Ketalar®, 500mg 10ml flakon Pfizer; 90 mg/kg) ve ksilazin (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Almanya; 10 mg/kg) ile genel anestezi uygulandıktan sonra, kraniyumun dorsal kısmı traş edilip lokal antiseptikler ile temizlik sağlanıp örtülmüştür (Resim 3.1).



Resim 3.1. Kranial defekt için ameliyat bölgesi

Sagital strden uzak bir C insizyon ile kesi yapıldıktan sonra deri, subkutan doku ve periost kaldırılıp parietal kemiğe ulaşılmıştır (Resim 3.2, 3.3).

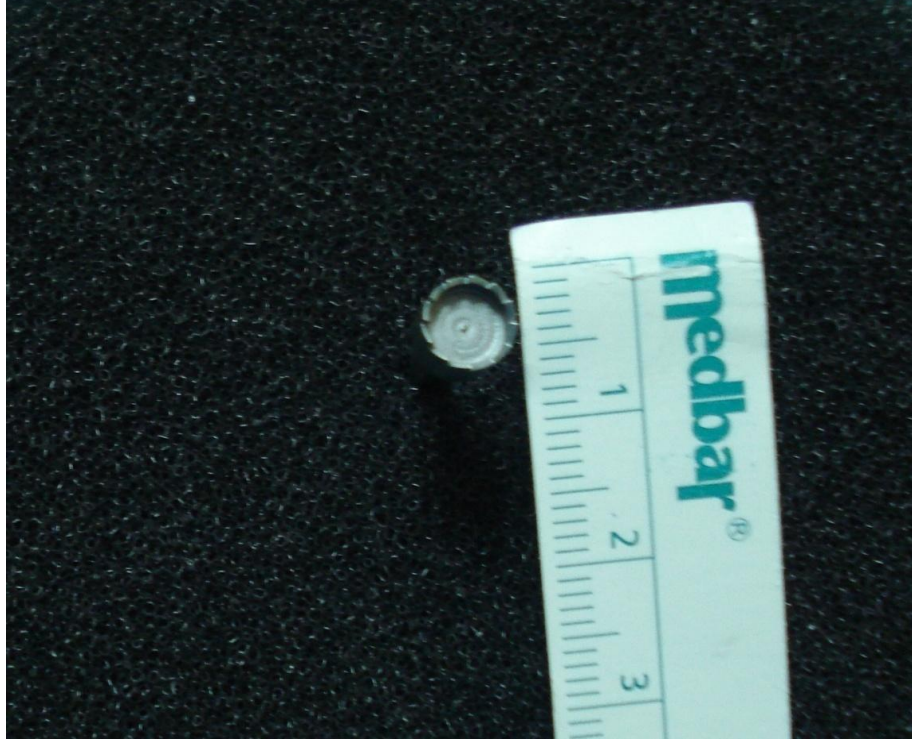


Resim 3.2. Kraniyal defekt oluşturmak için İnsizyon



Resim 3.3. Subkutan doku ve periostun flep şeklinde kaldırılması

Bu işlemlerin ardından 6mm çaplı döner testere kullanılarak kalvaryal kemikte 6 mm çapında standart boyutta kemik defekti oluşturulmuştur (Resim 3.4-3.7).



Resim 3.4. Kranial defekt oluşturulmasında kullanılan döner testere



Resim 3.5. Kemik defektinin oluşturulması



Resim 3.6. Kemik defektinin oluşturulması



Resim 3.7. Standart Kalvaryal Defekt

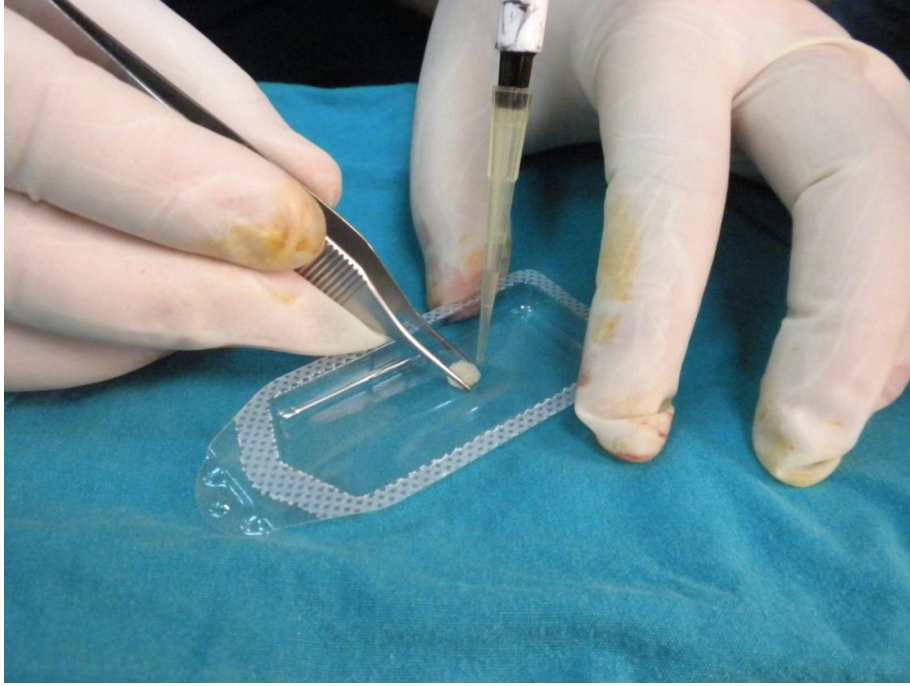
Kontrol grubunda 6 mm'lik kalvaryum defekti oluşturulduktan sonra bu kısım boş bırakılmıştır. Ototogreft grubunda ise aynı yöntemle kaldırılan 6 mm çaplı kemik grefti yerine iade edilerek otogreft ile onarım gerçekleştirilmiştir. Scaffold grubunda kranial defekt içerisine 6 mm çapta hazırlanan jelatin sponge (GelSpon-P ®) doku iskelesi yerleştirilerek onarım gerçekleştirilmiştir. Scaffold + Kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücre grubunda daha önce rat femurundan izole edilip çoğaltılan kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücreleri, cerrahi esnasında, 6 mm çapta hazırlanan jelatin sponge (GelSpon-P ®) doku iskelesine mikropipet ile 50 mikrolitresinde 1.000.000 hücre olan medium emdirilerek yerleştirildi ve daha sonra standart olarak oluşturulmuş olan kranial defekt içerisine bu kök hücre emdirilmiş scaffold yerleştirilerek onarım gerçekleştirilmiştir. Scaffold + Manyetik yüklü altın kaplı nanopartikül grubunda daha önce rat femurundan izole edilip çoğaltılan kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücrelerine Doku Mühendisliği Bölümü'nde üretilmiş olan manyetik yüklü altın kaplı nanopartiküller Hücre Kültürü laboratuvarında yüklendi. Cerrahi esnasında, 6 mm çapta hazırlanan jelatin sponge (GelSpon-P ®) doku iskelesine mikropipet ile 50 mikrolitresinde 1.000.000 manyetik yüklü mezenşimal kök hücre olan medium emdirildi. Daha sonra standart olarak oluşturulmuş olan kranial defekt içerisine bu manyetik yüklü kök hücre emdirilmiş scaffold yerleştirilerek onarım gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu grupta onarım sonrası kranial defekt üzerine denk gelen cilde manyetik etki gösteren 2 mm kalınlığında 1 cm çaptaki mıknatıs sütüre edildi ve deney süresince uygulandı (Resim 3.8-3.11).



Resim 3.8. Oluşturulan defektin scaffold ile kapatılması



Resim 3.9. Oluşturulan defektin scaffold ile kapatılması

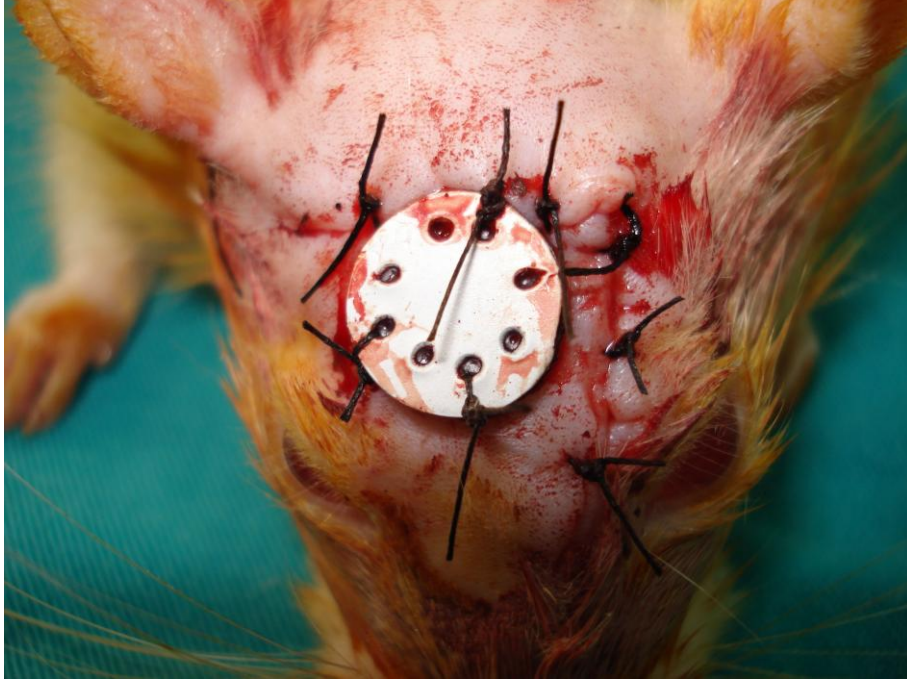


Resim 3.10. Kemik stromal hücre yüklenmiş doku iskelesi



Resim 3.11. Manyetik yüklü altın kaplı nanopartiküllerin yüklendiği kemik stromal hücreleri içeren scaffoldla onarılmış kemik defekt ve düşük magnetizmaya tabii tutulması.

Başlangıçta kaldırılan sub-periosteal flepler tanımlandığı şekilde 4/0 ipek (nonabsorbable suture) ile kapatılıp işleme son verilmiştir (Resim 12).



Resim 3.12. Kranial Defektin son hali

3.3. KEMİK İLİĞİ KÖK HÜCRELERİNİN İZOLASYONU

Genel anestezi altındaki erkek sıçanların femur ve tibiası çıkartılmıştır. Femur ve tibia, %5 penisilin/streptomisin (Sigma, Almanya) bulunan DMEM-F12 Ham's (Sigma, Almanya) içerisinde (taşıma ortamı) hücre kültür laboratuvarına getirilmiştir. Laminer akış kabini içerisinde femur ve tibia içeriği taşıma ortamı ile yıkanmıştır. Hücreler 1200 rpm de 5 dakikada 2 kez yıkanmıştır. 25 cm² lik Petri kaplarına 1x10⁵ hücre/cm² yoğunlukta hücre, %20 FBS (Fetal Sığır Serum) (Sigma, Almanya), %1 penisilin/streptomisin/gentamisin ve 2 mM glutamin (Sigma, Almanya) bulunan DMEM-F12 Ham's içerisinde 37 °C de %5 CO₂ içeren inkübatör içerisinde kültür edilmiştir. Kültür kabına 48 saat sonra yapışmayan hücreler uzaklaştırılmış ve taze kültür ortamı ilave edilmiştir. Kültür ortamları 3-4 günlük arayla değiştirilmiştir. %70–80 konflüent olan kültür kabındaki hücreler, %0,25 Tripsin/EDTA (Sigma, Almanya) kullanılarak kaldırılmıştır. Trypan mavisi ile

canlılık ve hücre sayısı hesaplanmıştır. Daha sonra Hücre Kültürü laboratuvarında hücre kültürlerine 30 milyon hücreye ulaşana kadar pasajlar yapılmıştır.

3.4. ALTIN KAPLI MANYETİT NANOPARTİKÜLLERİN ÜRETİMİ

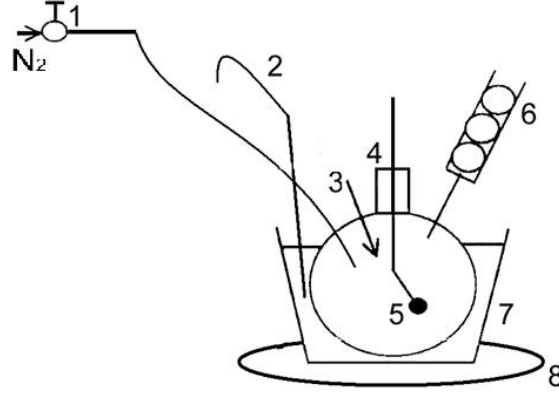
Üretilen manyetit nanopartiküller bulunduğu çözeltide demir oksit yüzeyinde Au^{3+} iyonlarının hidroksil amin, trisodyum sitrat gibi çeşitli indirgeyici ajanlar ile indirgenmesi yöntemiyle altınla kaplanmıştır. Bu sentez çalışması için Dr. Filiz Sayar' ın Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Doktora tezinde çalıştığı reaksiyon koşulları ve optimize ettiği prosedür değerleri temel alınmıştır [38, 41].

3.4.1. Manyetit (Fe_3O_4) Nanopartikül Sentezi

Tez çalışması boyunca manyetik nanopartiküllerin üretiminde çalışma grubumuzda bulunan Filiz Sayar'ın Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Yüksek Lisans tezi kapsamında kullandığı yüksek sıcaklıkta mekanik karıştırma ile gerçekleştirilen ikili çöktürme yöntemi kullanılmıştır [41]. Bu yöntemle farklı boylarda partiküller üretmek için belirtilen tezde optimize edilmiş değerlere en yakın ve uygun değerler kullanılarak birçok kez sentez yapılmıştır [38].

Manyetit nanopartiküllerin üretiminde kullanılan reaktif demir tuzları $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ve $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ve çöktürme ajanı olarak kullanılan NaOH Sigma (ABD) 'dan satın alma yoluyla temin edilmiştir. Partiküllerin aglomerasyonunu önlemek ve kararlılığını sağlamak için sentez sonrası yine Sigma (ABD)'dan temin edilen katı toz halinde TMAOH kullanılmıştır. Bütün deneylerde ultra saf su kullanılmıştır.

3.4.1.1. Yüksek sıcaklıkta mekanik karıştırılmalı ikili çöktürme yöntemi ile manyetit üretimi



Şekil 3.1. Manyetit sentezi için deney düzeneği.

(1) Vana, (2) Termoçift, (3) Demir Çözeltisi ve NaOH Çözeltisi için besleme ağzı, (4) Reaktör, (5) Mekanik Karıştırıcı (6) Geri Soğutucu, (7) Su banyosu ve (8) Elektrikli Isıtıcı.

Manyetik nanopartiküller Filiz Sayar'ın Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Yüksek Lisans tezinde optimize ettiği değerlere en yakın ve uygun değerler (karıştırma hızı hariç) seçilerek Fe(II) ve Fe(III) iyonlarının NaOH gibi alkali ortamda çöktürülmesiyle üretilmiştir.

Şekil 3.1.'de şematik olarak verilen deney düzeneğinde nanopartiküllerin üretimi için izlenen yöntem şöyledir: Dört boyunlu bir reaktörde geri soğutucu altında, mekanik karıştırıcı ve su banyosu kullanılarak, N₂ atmosferinde, 80°C'deki 160 ml deionize su içine yüksek karıştırma hızında 120 ml 1.25 M Fe²⁺ ve Fe³⁺ tuz çözeltisi ile 120 ml 5M NaOH çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyonun hemen başında siyah bir çökelek oluşumu gözlenmiştir. Bu çözelti 80°C'de 2 saat çok yüksek karıştırma hızında karıştırılmıştır. Manyetik ayırıcı (MCB 1200 Biomagnetic Processing Platform, Sigris, İngiltere) yardımıyla manyetik olan partiküller ile olmayan partiküller birbirinden ayrıldıktan sonra birkaç defa su ile yıkama işlemi uygulanmıştır. 0.1 M'lık tetrametilamonyum hidroksit (TMAOH, Sigma, ABD) çözeltisi ile stabilize edilerek 0.01 M'lık HNO₃ ile bir kere yıkanmıştır. 0.01 M'lık HNO₃ çözeltisinde dağıtılan nanopartiküller 80-90°C'de çözelti rengi kahverengi olana kadar karıştırılmıştır. Bu şekilde okside olan Fe₃O₄ nanopartikülleri 0.1 M'lık

TMAOH çözeltisi içinde süspansiyon edilip pH 11 olana kadar su ile yıkanmıştır. Tetrametil amonyum ile stabilize edilmiş okside Fe_3O_4 nanopartikülleri hazırlanmıştır.

3.4.1.2. Kullanılan Maddeler

Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin üretiminde indirgeyici ajan olarak kullanılan tri-sodyum sitrat Analar (İngiltere)'dan satın alma yoluyla temin edilmiştir. Altın tuzu gold (III) chloride trihydrate ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$) Sigma-Aldrich (ABD)'den satın alma yoluyla temin edilmiştir. Altın kaplı olan ve olmayan partikülleri ayırma amacıyla kullanılan Okzalot çözeltisi için gerekli olan okzalot asit Merk (Almanya) 'dan ve di-amonyum okzalot Merk (Almanya) 'dan hidroklorik asit (HCl) Merk (Almanya) 'dan satın alma yoluyla temin edilmiştir. Bütün deneylerde ultra saf su kullanılmıştır [38].

3.4.2. Sitrat İndirgeme Ajanyla Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi

Tez kapsamında sentezlenen bu manyetik nanopartiküllerin altınla kaplanmasında indirgeyici ajan olarak trisodyum sitrat kullanılmıştır. Çekirdek/kabuk (Fe_3O_4/Au) yapısındaki nanopartiküllerin sentezi, ilk olarak manyetik özellik gösteren manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin üretimi daha sonra bunların altın ile kaplanması olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. 1.2 ml tetrametil amonyum ile stabilize edilmiş okside Fe_3O_4 nanopartikülleri 100 ml deionize su içinde süspansiyon edilip, 0.7 ml 0.155 mM'lık trisodyum sitrat çözeltisi ilave edilerek sitrat iyonlarının OH^- iyonları ile değişmesi için 15 dakika sonike edilmiştir. Daha sonra çözelti yüksek karıştırma hızında kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır. Çözelti ilk kaynama noktasına ulaştığında etrafını altınla kaplamak için Au^{3+} iyonlarının Fe_3O_4 nanopartiküllerinin etrafında indirgenmesi için 5 ml 12 mM'lık tetrakloraurat ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$) çözeltisi eklenerek 15 dakika kaynama noktasında (96 °C) karıştırılmıştır. Bu süre sonunda çözelti oda sıcaklığına gelinceye

kadar yüksek hızda karıştırmaya devam edilmiştir. Başlangıçta açık sarı olan çözelti rengi kahverengi ve koyu renge dönerek en son parlak kırmızı kahve olmuştur. Elde edilen nanopartiküller 15000 rpm'de santrifüjlenerek mıknatıs yardımıyla manyetik olan nanopartiküller ile manyetik olmayanlar birbirinden ayrılmıştır. Bu şekilde manyetik özellik göstermeyen çekirdeğinde manyetit nanopartikülü içermeyen sadece küresel altın nanopartiküller uzaklaştırılmıştır. Bu işlem birkaç defa tekrarlanmıştır. Daha sonra altın ile kaplanmamış manyetit nanopartikülleri altın kaplı olanlardan ayırmak için her ikisi de manyetik özellik göstermesi nedeniyle manyetik ayırma yapılamamıştır. Literatürde altın ile kaplanmamış manyetit nanopartikülleri ayırmak için 1 M HCl zeltisi ile yıkanıp birkaç kez de su ile yıkama işlemi ile gerçekleştirilmiştir [42]. Ancak Liu ve arkadaşları altın kaplı manyetik nanopartiküllerin 2 M ve zeri HCl zeltisi içinde stabilitesini incelemişlerdir. Yapılan alışma sonucu hem manyetit nanopartiküllerin hem de altın kaplı manyetik nanopartiküllerin derişik asit zeltisi içinde hemen zndğn belirtmişlerdir [49]. Bu nedenle altın kaplı olmayan manyetit nanopartikülleri kaplı olanlardan ayırmak için karışım 0.02 M'lık okzalat zeltisinde 1 saat mekanik karıştırılmıştır. Okzalat zeltisi içersinde sadece manyetit nanopartiküllerin zndğ literatürde belirtilmiştir [49]. Tekrar su ile santrifüjleme işlemi yapılarak süpernatant kısmında znmş manyetit nanopartiküllerin olması nedeniyle çöken kısımda altın kaplı manyetik nanopartiküller mıknatıs yardımıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır [38].

Dr. Filiz Sayar'ın Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalında yaptığı doktora tezinde kullandığı yukarıda anlatılan reçetedeki trisodyum sitrat, tetrakloraurat miktarı, kullanılan nanopartikül miktarı ve bunlara ek olarak farlı boydaki partiküller kullanılarak bunların altın kabuk oluşumuna etkileri ayrıca incelenmiştir. Trisodyum sitrat miktarı 0.155, 0.310, 0.078 mM olarak; tetrakloraurat miktarı 12, 24 mM olarak; altınla kaplanacak manyetit partikül miktarı 0.5, 1, 0.25 ml (100 g/ml) olarak; 55, 155, 90 nm boyutlarındaki manyetit nanopartiküller kullanılmış ve altın kabuk oluşumuna etkisi araştırılmıştır [38].

3.4.3. Altın Kaplı Manyetik (Fe₃O₄/Au) Nanopartiküllerin Katyonik Hale Getirilmesi

Sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküller hücre ile etkileşebilmesi için katyonik özellik göstermesi gerekmektedir. Bu amaçla partiküllerin altın yüzeyine pozitif özellik kazandırmak amacıyla, ‘kendiliğinden yerleşen tek tabakalar’ (‘self-assemblying monolayers’ – ‘SAMs’) oluşturacak kabiliyete sahip moleküller bağlanmıştır. Bunun için bir uçlarında altın ile etkileşecek tiyol (SH) diğer uçlarında amino grubu (NH₂) bulunan molekül olarak 2-aminoethantiyol seçilmiştir. Bu moleküllerin “-SH” gruplarıyla altın yüzeylere tek tabaka oluşturacak şekilde yerleşmeleri diğer uçlarındaki “-NH₂” grupları nedeniyle pozitif yük sağlamaları öngörülmüştür [38].

Niidome ve arkadaşları amin-modifiye edilmiş 100 nm boyutundaki altın nanopartikülleri plazmid DNA ile etkileştirip kültüre edilmiş kemik stromal hücrelerinde transfeksiyon etkinliğini incelemişlerdir. H₂AuCl₄ ‘ün sodyum bor hidrür (NaBH₄) ile indirgenmesi ve 2-aminoethantiyol ilavesi sonucu ile katyonik altın nanopartiküller hazırlamışlar. Sentez reçetelerinde Au/NaBH₄/2-aminoethantiyol oranı 56:0.1:85 (mol/mol/mol) olarak rapor edilmiştir. Partiküllerin yükünün zeta potansiyeli +36.2 mV olarak belirlemişlerdir. Partiküllerin plazmid ile kompleks oluşturduğunda negatif bir potansiyel yük oluşturduğunu (-33.2 mV) rapor etmişlerdir [55]. Sonrasında Zhang ve arkadaşları aynı reçeteyi uygulayarak katyonik altın nanopartikülleri üretmişlerdir. Sentezlenen partiküllerin boyutu 10-48 nm arası değişmekte olup zeta potansiyel ile yükü +31.8 mV değerinde olduğu rapor edilmiştir [56]. Bu iki araştırma grubu referans alınarak sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartikülleri 10 mM ve 1M arası değişen 2-aminoethantiyol’ ün farklı konsantrasyonlarında muamele edip yük değişimleri sonuçlar bölümünde rapor edilmiştir. Transfeksiyon amaçlı kullanılacak potansiyel yük değeri literatüre en uygun olan katyonik altın kaplı manyetik nanopartiküller şu şekilde sentezlenmiştir:

Sentezlenen 100 ml altın kaplı manyetik nanopartikül çözeltisi çöken partikülleri tek bir tüpte toplayıp yoğunlaştırmak amacıyla 13000 rpm de sürekli santrifüjlenmiş ve üst faz sürekli atılıp dipteki partiküller alınarak 100 µg/ml konsantrasyonuna sahip 1ml stok çözelti haline getirilmiştir. 2-aminoethantiyol çözeltisinin konsantrasyonu 20 mM ile 1M arası denenmiş olup en iyi pozitif yük

veren konsantrasyon hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır. En iyi sonuç 400 µl 213 mM 2-aminoethantiyol çözeltisi kullanımında bulunmuştur. Yukarıda verilen partikül konsantrasyonuna sahip çözeltilere 400 µl 213 mM 2-aminoethantiyol çözeltisini ekleyip oda sıcaklığında 2 saat karanlıkta karıştırılmıştır. 2 saatin sonunda mıknatısla partiküller tüpün yanında tutulmuş ve bağlanmayan 2-aminoethantiyol moleküllerini uzaklaştırmak amacıyla partikül harici sıvı alınmış ve bu işlem birkaç kez tekrarlanmıştır. Hazırlanan altın kaplı manyetik yüklü, yüzeylerinde 2-aminoethantiyol ile SAMs oluşturulmuş nanopartiküllerin Zeta Potansiyel ile yükleri tayin edilmiştir ve sonuçlar bölümünde belirtilmiştir. Aynı partiküllerin boyut ve UV/vis absorpsiyon spektrumu ölçümleri de sonuçlar bölümünde verilmiştir [38].

3.4.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Hazırlanan manyetit ve altın kaplı manyetik nanopartiküllerinin boy ve boy dağılımlarını belirlemek için Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Cihaz ölçüm yöntemi olarak Dinamik Işık Saçılması (DLS) kullanılmaktadır. Dinamik ışık saçılması, mikro saniyenin onda biri ile mili saniye zaman aralığında, örnek çözeltinin küçük bir kısmından saçılan ışığın zamanla değişiminin ölçülmesidir. Sentez sonrası yıkanıp, santrifüjlenen partiküller ultra saf su kullanılarak seyreltilmiş ve yaklaşık 2 ml hacimli örnek çözeltisi polistiren küvet içersine konulmuştur [38].

Aynı cihaz, partiküllerin zeta potansiyellerini de vermektedir. Partikül yüzeyinden belli bir uzaklıkta bulunan iyonlar hareket eden partikül ile birlikte sürüklenmemektedir. Bu uzaklığa kayma düzlemi denilmekte ve bu aralıkta ölçülen elektrik potansiyeli zeta potansiyeli olarak tanımlanmaktadır. Cihaz mikroeletroforez tekniğini kullanarak zeta potansiyeli ölçmektedir. Bu teknik bir elektrik alanı içindeki yüklü partikülün hızının ölçülmesi esasına dayanmaktadır [41]. Altın kaplı manyetik partiküllerin ve katyonik altın kaplı manyetik partiküllerin yüklerini belirlemek amacıyla zeta potansiyelleri ölçülmüştür.

Nanopartiküllerinin kimyasal yapısı Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR, Shimadzu, DR 8101, Japonya) kullanılarak

belirlenmiştir. Sentezlenmiş olan partiküller etüvde kurutulduktan sonra potasyum bromür (KBr) ile (ağırlıkça %1 olacak şekilde) karıştırılarak disk haline getirilmiş ve FTIR spektrumları oda sıcaklığında çekilmiştir.

Üretilen manyetit (Fe_3O_4) partiküllerin ve altın kaplı manyetit nanopartiküllerin (Fe_3O_4/Au) karakterizasyonu ve kristal yapısının belirlenebilmesi için X-ışını kırınım difraktometresi (Rigaku D/MAX-2200 Ultima+/PC, Japonya) kullanılmıştır. Cu (bakır) kaynaklı X ışını tüpüne sahip cihaz ile “40kVx40mA” gücünde, 15-100° aralığındaki 2θ açısında partikül spektrumları çekilmiştir.

Nanopartiküllerin manyetik özelliklerinin bulunmasında bir Titreşimli Manyetometre (Vibrating Sample Magnetometer, Fieldial Mark II Varian, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Etüvde kurutulmuş olan örneklerin 0 – 20000 ve -20000 – 0 oersted (Oe) manyetik alandaki mıknatıslık değerleri, oda sıcaklığında ölçülmüştür. Manyetik alan içindeki partiküllerin manyetik özellikleri birim kütle başına manyetik moment (emu) şeklinde ifade edilmiştir. Bu ölçüm tekniğinde kurutulmuş olan örneğe sabit frekansta manyetik alan uygulanmaktadır. Eğer örnek manyetik özelliğe sahipse bir mıknatıs gibi davranır ve geçici bir manyetik akış nedeniyle iletken çubuğun içinde potansiyel farkı oluşur. Titreşimli manyetometre bu potansiyel farkı ölçerek örneğin manyetik özelliğini belirlemektedir [38].

Nanopartiküllerin manyetik özellikleri bir de Elektron Spin Rezonans spektrometresi (ESR, Varian E-L X Band spectrometer, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir. Vakum etüvü içerisinde kurutulmuş olan örneklerin 1000-5000 G’luk bir manyetik alanda oda sıcaklığında ESR spektrumları çekilmiştir. Örnek kavitesi homojen, değeri doğrusal olarak değiştirilebilen bir dış manyetik alan oluşturan elektromıknatısın kutupları arasına konulmuştur. ESR spektrumları mikrodalga frekansı 9.3 GHz ‘de sabit tutulup manyetik alan değiştirilerek soğurma eğrisinin birinci türevi olarak çizdirilmiştir.

Hücre kültürü aşamalarında kullanılacak olan manyetit ve altın kaplı manyetit nanopartiküllerin fiziksel yapısını, büyüklüklerini görüntülemek ve manyetik özellik gösterip göstermediğini anlamak amacıyla atomik kuvvet mikroskobu (NanoMagnetic Instruments Ltd, Türkiye) kullanılmıştır. Örnek, stok çözeltiden (yaklaşık 100 $\mu\text{g/ml}$) 50 μl (manyetit için) ve 10 μl (altın kaplı manyetit için) alınarak ultrasonik banyoda 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra mika üzerine

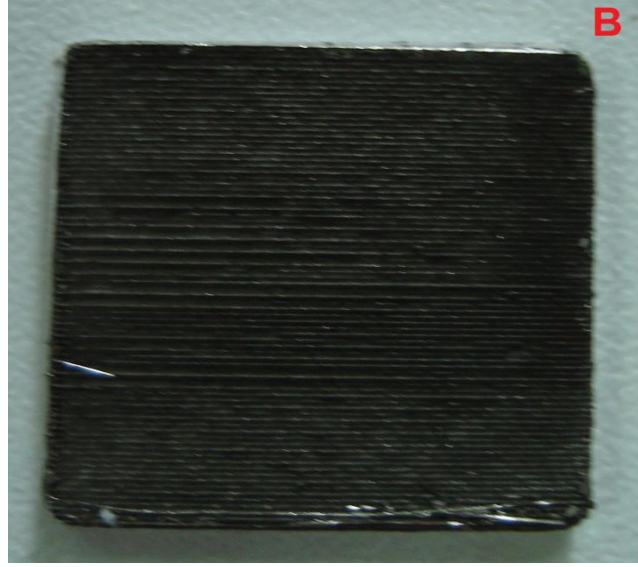
damlatılarak azot atmosferinde kurutulmuştur. Mika üzerindeki örneklerin ölçümü manyetik özellik taşıyan kobalt kaplı tipler kullanılarak MFM de yapılmıştır. AFM cihazının yazılımı kullanılarak, XY eksenine göre nanopartiküllerin boyutları hesaplanmıştır [38].

3.5. WST METODU İLE SİTOTOKSİSİTENİN BELİRLENMESİ

Mezenkimal kök hücreleri 48 well platelere her bir kuyucuğa 10000 hücre düşecek şekilde ekim yapıldı. Farklı miktarlarda (2,5, 5, 10, 20 ve 40 µg/ml) altın kaplı partikül manyetik ilave edildi. 48 well plate üç farklı bölüme ayrılarak ilk bölüme partikül ilave edilmedi sadece medium eklendi. İkinci bölüme manyetik alan 15 dak. süre ile uygulandı ve üçüncü bölüme sadece partikül ilave edildi. 24 saat sonunda her kuyucuğa 15 µl WST-1 çözeltisi ilave edilir. 37 °C'de 4 saat inkübasyondan sonra hücre yaşayabilirliğinin tespiti için 48kuyucuklu platelerin absorbans yoğunluk değerleri ELİSA plate okuyucuda 420-480 nm'de okunur. Yaşayan hücreler sarı renk oluştururken, ölü hücrelerde renk oluşumu gözlenmez. Kontrol grubu absorbans değerleri 100%olarak kabul edilerek farklı konsantrasyonda ki partiküllerin %canlılık değerleri hesaplanmıştır.

3.5.1. Hücre içersine Floresein ile işaretli nanopartiküllerin aktarılması

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan mezenkimal kök hücrelere floresein bağlanmış nanopartiküllerin hücre içersine girip girmediği, araştırılmasıdır. Bunun içinde yine yukarıda belirtildiği gibi 48 wellerde hücreler hazırlanmıştır. Daha sonrada 1mg/ml patiküller 1µM floresein çözeltisi içersinde 1 saat karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Ardından Partiküller santrifüj ve mıknatıs (Resim 3.13) ile ortamdan ayrıldıktan sonra 0.15 M NaCl içersinde hücrele uygulanmıştır. Uygulandıktan 15 dakika sonra wellere 500 mikrolite serum içeren besi yeri ilave edilmiştir. 4 saat inkübasyonun sonunda besi yeri wellerden alınarak PBS ile 3 kez hücreler yıkanmıştır. Son olarak da floresan inverted mikroskopta hücreler FITC filitresi ile incelenmiştir.



Resim 3.13. Yüzeyi işlenmiş mıknatıs

3.5.2. İkili boyama metodu ile Nekrozun belirlenmesi

Mezenkimal kök hücreleri 48 well platelere her bir kuyucuğa 10000 hücre düşecek şekilde ekim yapıldı. Farklı miktarlarda (2,5, 5, 10, 20 ve 40 $\mu\text{g/ml}$) altın kaplı manyetik partikül ilave edildi. 48 well plate üç farklı bölüme ayrılarak ilk bölüme partikül ilave edilmedi sadece medium eklendi. İkinci bölüme manyetik alan 15 dak. süre ile uygulandı ve üçüncü bölüme sadece partikül ilave edildi. 48 saat karbondioksitli etüvde 37 oC' de 5%'lik karbondioksitli ortamda inkübe edildi. Süre sonunda well tabanından kalkmış hücreleri falkona toplanan hücreler santrifüj edilir. Süpernatanı atılıp ve üzerlerine ikili boyama solüsyonu (RNase (2 $\mu\text{l/ml}$), hoechst 33342(2 $\mu\text{l/ml}$), propidium iodide (2 $\mu\text{l/ml}$) 106 hücreye 100 μl solüsyon konuldu ve 20 dak etüvde inkübe edildi. Lam üzerine damlatıldıktan sonra lamelle kapatılır ve floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak normal hücreler ve FITC (480-520 nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır. Well tabanına yapışık hücreler enzimle kaldırılmadan aynı işlemlere tabii tutularak incelenmiştir. Değerlendirme Floresan mikroskopta (Leica DMI70, Almanya) 10 farklı alan (yaklaşık 1000 hücre) sayılarak ortalaması alınmıştır ve nekrotik indeks yüzde (%) olarak ifade edilmiştir. Değerlendirmede normal nekrotik olmayan hücreler çekirdekleri sönük mavi, çekirdekte DNA dağılmamış, hücrede veziküller

oluşmamış olarak görülmektedir. Kültür kabında yüzeye tutunan hücreler kaldırılmadan yukarıda belirtilen floresan boyama solüsyonu 100 µl/well hücrelere uygulanarak da inceleme yapıldı. İkili boyama sonucunda normal hücrelerin çekirdekleri Hoechst 33342 floresan boyası ile boyanmıştır. İkili boyamada kullanılan diğer boya propodium iyodid (PI) ise nekroza uğramış hücreleri göstermek amacı ile kullanılmıştır. PI floresan boyası normal de canlı ve hücre zarlarında hasar olmayan hücrelere giremez ve bu hücreler PI ile boyanmazlar. Fakat hücre nekroza uğradığında veya hücre zarı hasar gördüğünde hücre içersine girer ve çekirdeği kırmızıya boyar. Floresan ışık (FITC veya kırmızı floresan ışık) altında bakıldığında nekroza uğrayan hücrelerin çekirdekleri kırmızı renkte görülür.

3.6. MIKNATISLARIN HAZIRLANMASI

Kalınlığı 2mm PVC kaplamalı bükülebilir özellikte magnet plakadan 1 cm. çapında yuvarlak şekilli pul magnet “elde vurma zımba” ve “çekiç” yardımıyla hazırlandı (Resim 3.14).



Resim 3.14. Magnetlerin hazırlanması

Daha sonra bu elde edilmiş olan 1 cm.lik çaptaki pul magnet parçalarına “biz “ denilen iğne geçirilecek yeri delmek için kullanılan, ağaç saplı, ucu sivri, çelikten yapılmış alet ile kenarlarına tam 8 adet delik açıldı (Resim 3.15).



Resim 3.15. Hazırlanan magnetlere uygun deliklerin açılması.

Hazırlanmış 1 cm çapta 2 mm. kalınlıkta pul tarzındaki magnetlerin gücü LakeShore marka 3-Channel Gaussmeter 460 model 46895 seri no’lu cihaz ile ölçüldü. Mıknatıslar temas yüzeyinde 500 gauss, 1,5 cm kağıt kalınlığında 200 gauss gücünde ölçüldü (Resim 3.16).



Resim 3.16. Mıknatısların gücünü ölçen Gaussmeter

3.7. DOKU İSKELELERİNİN HAZIRLANMASI

Scaffold olarak gelatin sponge seçildi (GelSpon-P®). Defekte yerleştirilecek doku iskeleleri; dermatom bıçağı ile 3 mm. kalınlıkta split edilen jelatin köpük plakadan 6mm. çapında punch biyopsi bıçağı yardımıyla hazırlandı (Resim 3.17).



Resim 3.17. Scaffoldun hazırlanması

3.8. RATLARDAN ÖRNEKLERİN ALINMASI

İntraperitoneal ketamin (Ketalar®, 500mg 10ml flakon Pfizer; 90 mg/kg) ve ksilazin (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Almanya; 10 mg/kg) ile genel anestezi uygulandı. Transtorasik perkütan enjektör yardımıyla ratlardan intrakardiyak 5cc. kan alındı. Ratlara karbondioksit gazı ile ötenazi uygulandı. Sakrifikasyon sonrası histolojik inceleme için kemik örnekleri alındı.

Daha sonra cilt flebi diseke edilerek cranium ve servikal bölge ortaya kondu. Kraniaumdaki temporal kaslar bilateral kaldırıldı (Resim 3.18).



Resim 3.18. Örnek alınma işlemi görüntüsü

Aynı şekilde oksibital bölgede oksibital kemiğe insersiyoy yapan kaslar ve ligamanlar serbestleştirilerek foremen magnum ortaya kondu. Tel kesme makası yardımıyla foremen magnumdan başlayarak bilateral temporal ve frontal kemik kesildi ve histolojik örnek alındı. Daha sonra histolojik örnekler formaldehit solusyonuna yerleştirildi (Resim 3.19).



Resim 3.19. Örneğin üstten görüntüsü

3.9. RADYOLOJİK DEĞERLENDİRME

Deney gruplarındaki ratların 4. Haftadaki ve 16. Haftadaki genel anestezi altında gerçekleştirilen sakrifikasyonları sonrası, kraniyal defektleri Hacettepe üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalında SkyScan marka 1174 model MicroCT’de çekilerek kemik iyileşmesi değerlendirilmiştir.

Formolda 5 gün örnekler bekletildikten sonra mikro CT çekimleri yapıldı. Örnekler cihaza yerleştirildikten sonra;

- Resolution : 21 mikrometre
- Rotation step : 0,50
- Averaging (frames) : 2
- Update flat-field before scanning, seçeneği işaretleniyor.
- Partial width : 100%

Çekim ayarları ile görüntüleme yapıldı.

Ham tomografi görüntüleri NRecon (Skyscan, Belçika) yazılımı ile tomografik kesitlere dönüştürüldü. Image J isimli açık kaynaklı bir görüntü işleme yazılımı için yazılmış olan bir plugin yardımı ile her bir kesitteki kemik boşluğunu kaplayan dairesel bir alan çizildi. Her bir kesitteki alan interpolate edilerek hacimsel olarak kemik boşluğuna küresel analiz hacmi yerleştirilmiş oldu. Bu küresel hacim içinde kalan ve belli bir yoğunluğa ulaşmış olan remineralizasyon kısımlarının hacimleri hesaplandı.

3.10. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Deney gruplarındaki ratların 4. Haftadaki ve 16. Haftadaki genel anestezi altında gerçekleştirilen sakrifikasyonları sonrası, kraniyal defektleri Hacettepe üniversitesi Tıp Fakültesi histoloji Anabilim Dalında incelenmiştir.

Kalvariyal kemik örnekleri %10’luk tamponlanmış nötral formalin çözeltisinde tespit edildikten sonra 1 ve 4 aylık örnekler mikrotomografiye gönderildi. Mikrotomografi sonrası örnekler De Castro çözeltisinde (kloral hidrat, nitrik asit, distile su) kontrollü olarak dekalsifiye edildi ve sabit vakumlu otomatik

doku takip cihazı ile izlenerek parafine gömüldü. Her bloktan beş mikrometre kalınlığında yirmi kesit alınarak ardışık olarak her kesit hematoksilin eozin (HE) veya Masson trikrom (MT) ile boyandı. MT ile kompakt kemiğin kırmızı, osteoid ve kıkırdığın yeşil, hücre sitoplazmalarının eflatun boyandığı yüksek kontrastlı görüntüler elde edildi. Kalvariyal defekt alanı, bilgisayar ve dijital kamera (Leica DFC 480, Westlar Almanya) bağlantılı Leica DMR (Westlar Almanya) marka ışık mikroskopunda görüntüledikten sonra defekt alanı en küçük büyütmede saklanıp Qwin plus marka (Leica, Westlar Almanya) görüntü analiz programı ile kantitatif olarak değerlendirildi. Defektteki yeni kemik alanı iki şekilde kantitatif olarak hesaplandı. İlk olarak yeni kemik alanı MT ile boyalı 10 kesitte total milimetre kare olarak ölçülerek normalize edilen değer kaydedildi. İkinci olarak ölçülen yeni kemik alanı total defekt alanına oranlanarak elde edilen oran yüzde olarak kaydedildi [57, 58]

3.11. BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Deney gruplarındaki ratların 4. Haftadaki ve 16. Haftadaki genel anestezi altında gerçekleştirilen sakrifikasyonları sonrası, alınan kan numuneleri santrifüj edildikten sonra -80 °C saklanıp Kırıkkale üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Rat Spesifik ALP kiti (Rat Bone alkaline phosphatase) BALP ELISA Kit, (China) kullanılarak ölçümler gerçekleştirildi.

3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.

Elde edilen veriler SPSS 17 istatistik programı kullanılarak analiz edildi. Bağımsız değişkenler gruplar, bağımlı değişkenler histolojik, biyokimyasal ve mikrotomografik ölçümlerdir. Verilerin normal dağılıp dağılmadığı ve varyansların homojenliği Shapiro-Wilk testiyle değerlendirildi. Tüm veriler parametrik olmayan testlerle (çoklu karşılaştırma için Kruskal Wallis, ikili karşılaştırma için posthoc Dunn testi) değerlendirildi. Spearman korelasyon testiyle biyokimyasal, mikrotomografik ve histolojik verilerin korelasyonu değerlendirildi. Tüm veriler ortanca, minimum ve maksimum değerleriyle temsil edildi. Fark, p 0.05'ten küçük olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

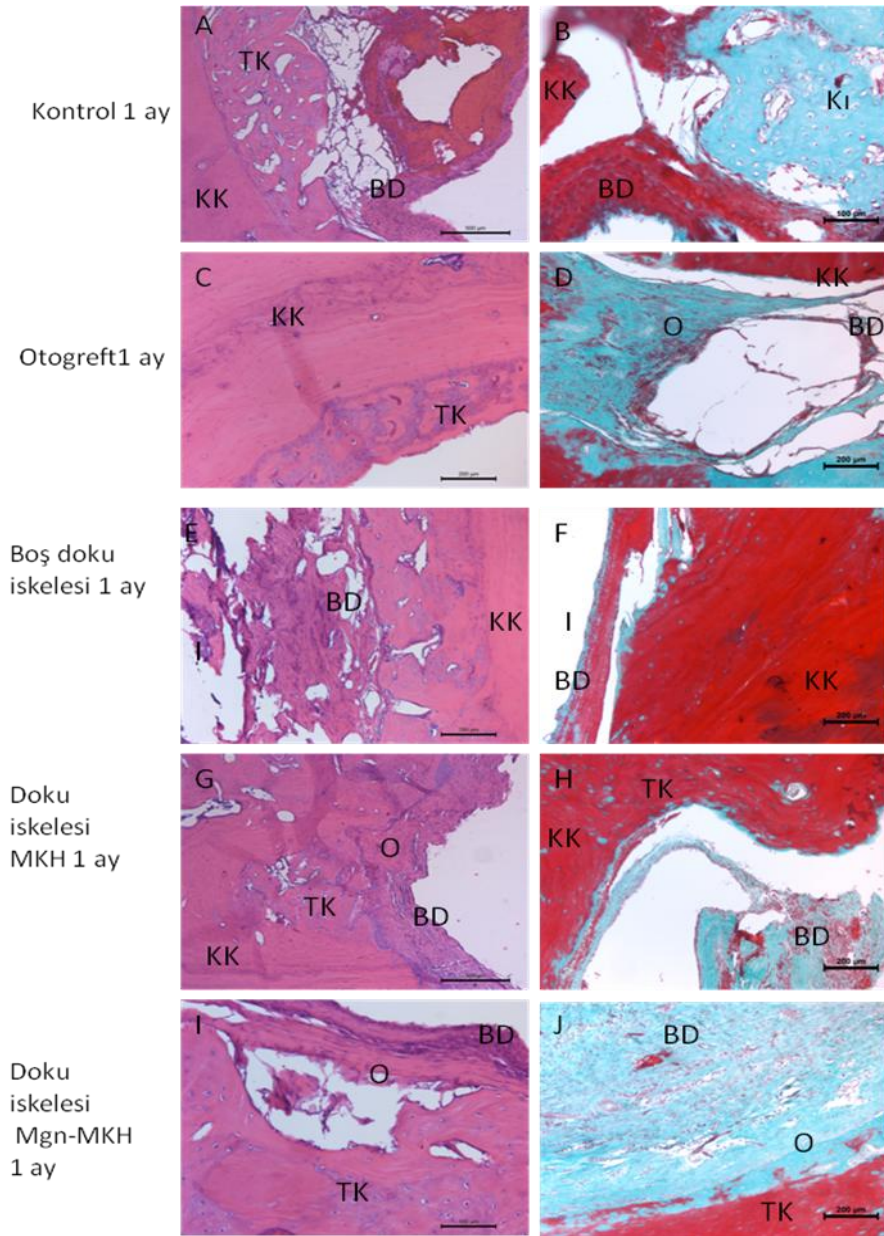
4. BULGULAR

Birinci ayda çoklu karşılaştırmada deney ve kontrol grupları arasında histolojik parametreler olan defekt içindeki yeni kemik oranı ($p=0.016$) ve mm^2 cinsinden yeni kemik alanı ($p=0.016$) anlamlı farklılıklar gösterdi. Mikrotomografi ve kan ALP değerleri bu dönemde gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi. Bu sonuç, ilk ayda kritik boyuttaki defektin henüz kemikleşmeye başlaması nedeniyle adı geçen ölçümlerin anlamlı değerlere ulaşmadığı biçiminde yorumlandı. Buna göre birinci ayda magnetik taneciklerle MKH uygulanan grup (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.001$) otogreft grubundaki (sırasıyla $p=0.034$ ve $p=0.034$) yeni oluşan kemik alanı ve total defekte oranı defektin boş bırakıldığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha fazlaydı. Birinci ayda altın standart olarak kabul edilen otogreft grubundaki yeni kemik alanı ve bu alanın total defekt alanına oranı boş skafold uygulanan gruba göre anlamlı biçimde fazlaydı (sırasıyla $p=0.022$ ve $p=0.022$) (Grafik 4.1, 4.2, Resim 4.1, 4.2).

Dördüncü ayda çoklu karşılaştırmada deney ve kontrol grupları arasında histolojik parametreler olan defekt içindeki yeni kemik oranı ($p=0.028$) ve mm^2 cinsinden yeni kemik alanı ($p=0.015$) ile birlikte mikrotomografik ölçüm değerleri ($p=0.010$) anlamlı farklılıklar gösterdi. Bu dönemde mikrotomografi değerleriyle histolojik yeni kemik alanı ölçümleri bazı gruplarda orta derecede korelasyon ($p=0.005$) gösterdi. Dördüncü ayda otogreft uygulanan gruptaki yeni kemik miktarı ve bunun defekt alanına oranı boş bırakılan defekt grubu (sırasıyla $p=0.003$ ve $p=0.005$); boş doku iskelesinin uygulandığı grup (sırasıyla $p=0.004$ ve $p=0.005$) ve magnetik partiküllerle MKH uygulanan gruba göre (kemik miktarı anlamlı farklı değil, kemik oranı için $p=0.049$) daha çoktu. Dördüncü ayda mikrotomografik olarak defekt alanında ölçülen kemik hacmi otogreft grubunda, MKH ve magnetik partikülle MKH uygulanan gruplara göre daha çoktu (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.006$). Diğer yandan dördüncü ayda mikrotomografik olarak yeni kemik hacmi MKH uygulanan grupta boş defekt grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olarak ölçüldü ($p=0.020$) (Grafik 4.1, 4.2, Resim 4.1, 4.2). Buna göre dördüncü ayda MKH'ler

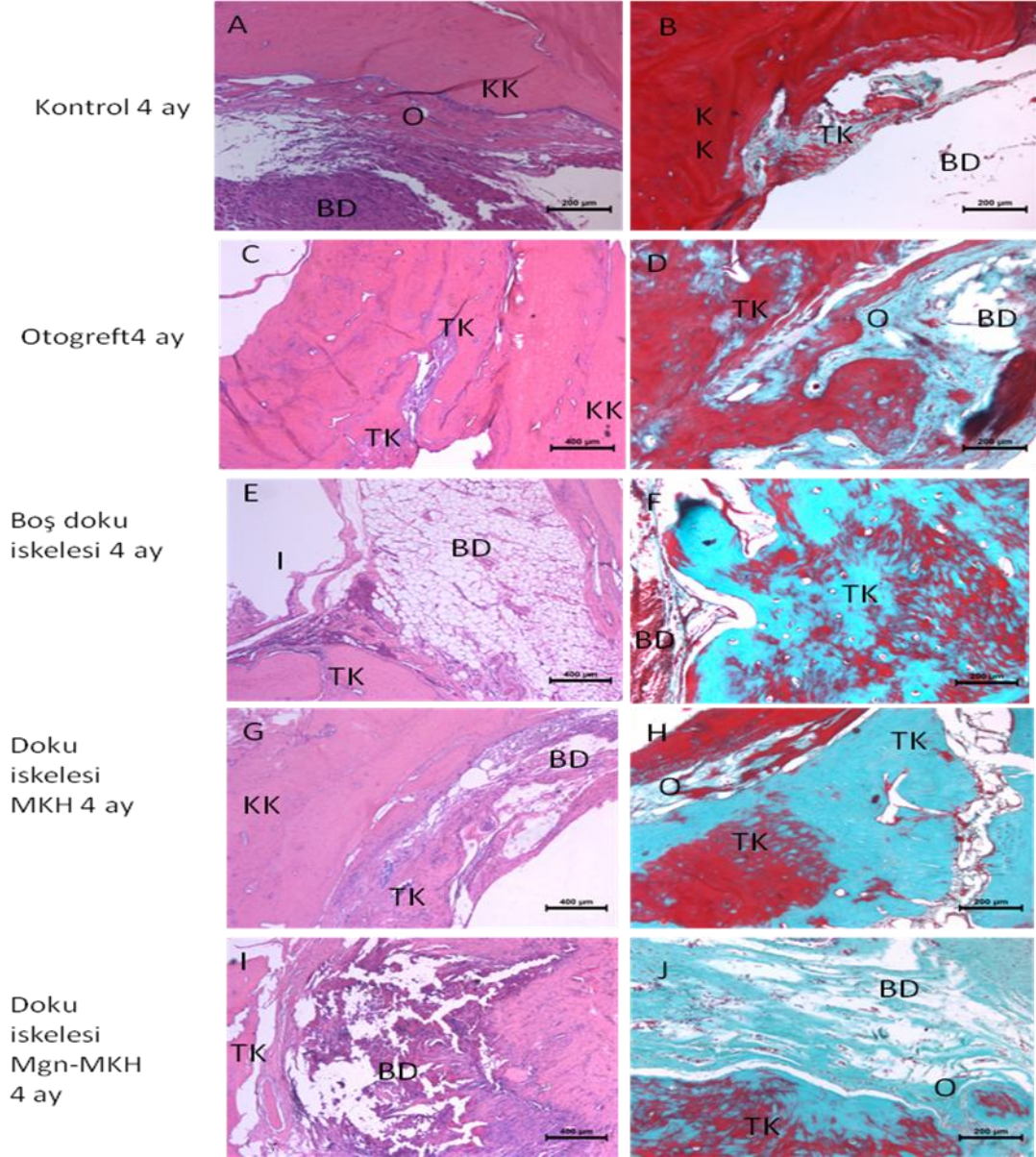
kritik büyüklükteki kalvariyal defektte iyileşme sağlasa da, altın standart olan otograft uygulamasının diğer gruplara göre daha ileri kemikleşme sağladığı sonucuna varıldı.

Doku iskelesi (skafold) uygulanan gruplarda biyomalzemeye hafif ila orta derecede bir doku yanıtı olduğu saptanmıştır. Daha önce biyomalzemenin doku uyumu başka çalışmalarımızda kantitatif olarak değerlendirilip biyoyumlu olarak saptandığından, bu çalışmada skorlanmamıştır. Biyomalzeme çevresinde lenfosit, makrofaj ve yer yer yabancı cisim dev hücreleri izlenmekle birlikte nekroza rastlanmamıştır. Bu sonuçlara göre incelenen tüm zaman dilimlerinde otograft uygulanan gruplarda aktif kemik yapımı en ileri seviyededir. Birinci ayda daha belirgin olmak üzere magnetik partiküllerle MKH uygulanan gruplarda aktif kemik yapımı altın standart olan otograft uygulamasına yakın düzeyde belirgin biçimde artmıştır (Resim 4.1, 4.2, Grafik 4.1, 4.2). Buna rağmen grupların hiçbirisinde dördüncü ayda kritik büyüklükteki kalvariyal defekt tam olarak kemikleşmemiştir. Bu durum literatür ile uyumludur.



Resim 4.1. Örneklerin 1. Ay Histolojik İncelemedeki Mikroskopik Görüntüleri

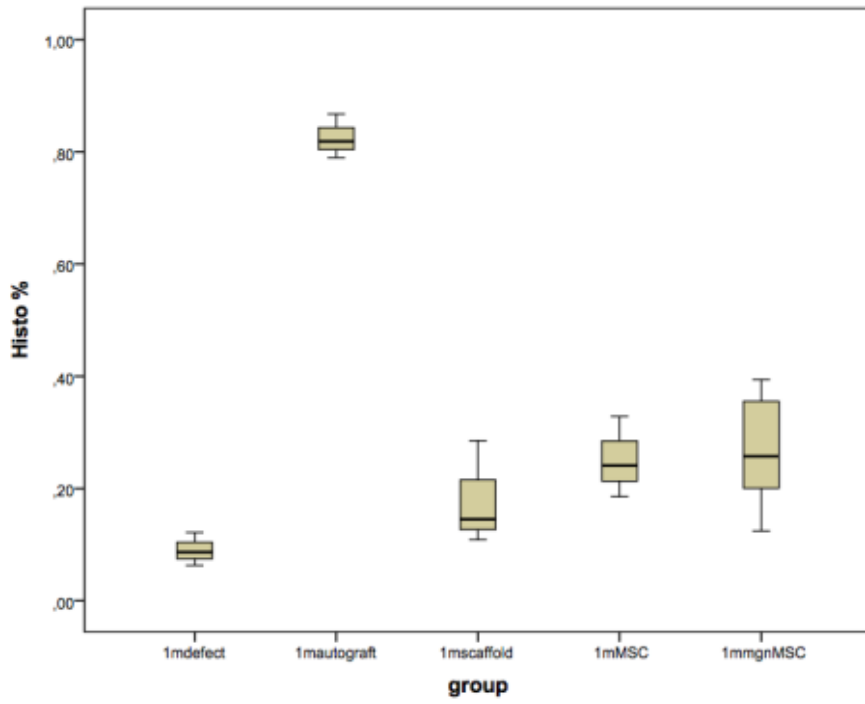
Yukarıdaki sol kolon HE, sağ kolon MT ile boyalı 1 aylık kalvariyal defekt alanının çevre kemikle sınır yaptığı alana ait mikrograflardır. B’de defektin boş bırakıldığı kontrol grubunda kavite kenarındaki kıkırdak oluşumu izlenmektedir. Oto greft, doku iskelesi-MKH ve doku iskelesi-magnetik partikül MKH gruplarında kavitenin kenarındaki yeni kemik oluşumunun kontrole göre daha fazla olduğu izlenmektedir. Doku iskelesi gruplarında biyomalzeme uygulanan alanlar takip sırasında eridiklerinden yerlerinde boşluklar kalmıştır. KK: Kompakt kemik, TK: Trabeküler kemik, BD: Bağ dokusu, I: Doku iskelesi, O: Osteoid, K1: Kıkırdak, Be: Beyin, HE: Hematoksilen eozin, MT: Masson trikrom.



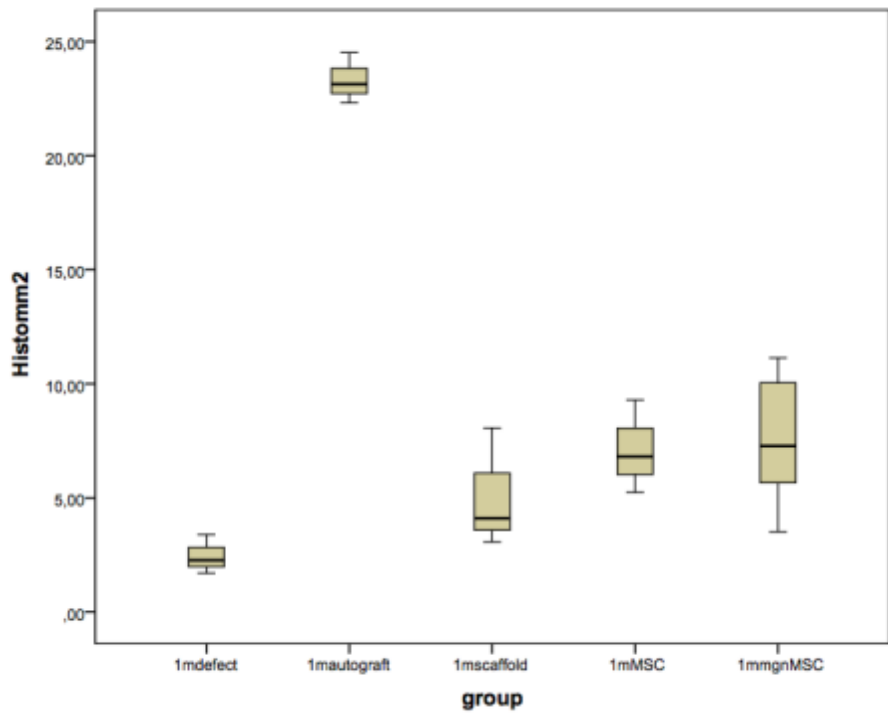
Resim 4.2. Örneklerin 1. Ay Histolojik İncelemedeki Mikroskopik Görüntüleri

Yukarıdaki sol kolon HE, sağ kolon MT ile boyalı 4 aylık kalvariyal defekt alanına ait mikrograflardır. Otogreft, doku iskelesi-MKH ve doku iskelesi-magnetik partikül-MKH uygulanan gruplarda kavitenin osteoide zemin oluşturan düzenli sıkı bağ dokusu ile dolmakta olduğu ve kenardaki yeni kemik miktarının kontrol ve boş doku iskelesi grubuna göre daha fazla olduğu izlenmektedir. Hiçbir grupta kavite tümüyle kemikleşmemiştir. Doku iskelesi gruplarında biyomalzeme uygulanan alanlar takip sırasında eridiklerinden yerlerinde boşluklar kalmıştır. KK: Kompakt kemik, TK: Trabeküler kemik, BD: Bağ dokusu, I: Doku iskelesi, O: Osteoid, K: Kıkırdak, Be: Beyin, HE: Hematoksilen eozin, MT: Masson trikrom.

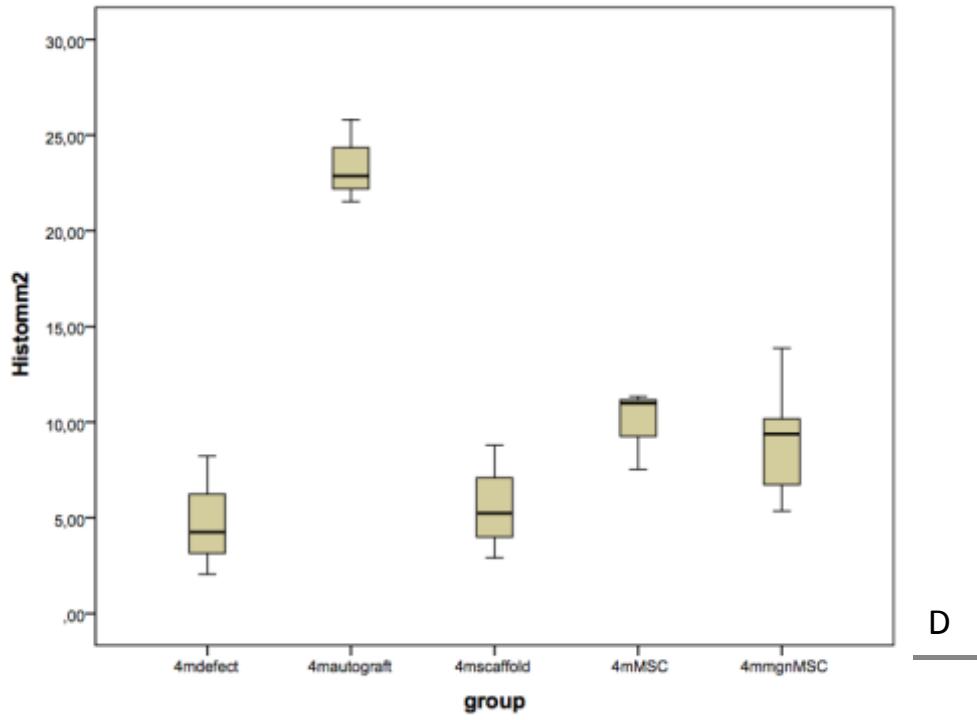
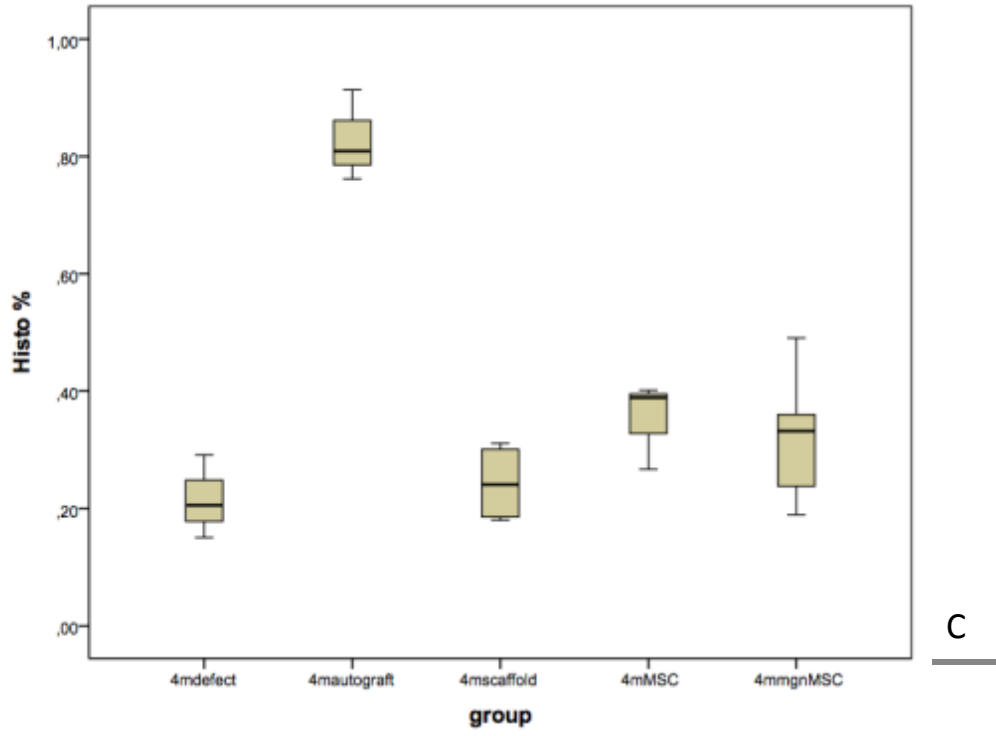
Histo %



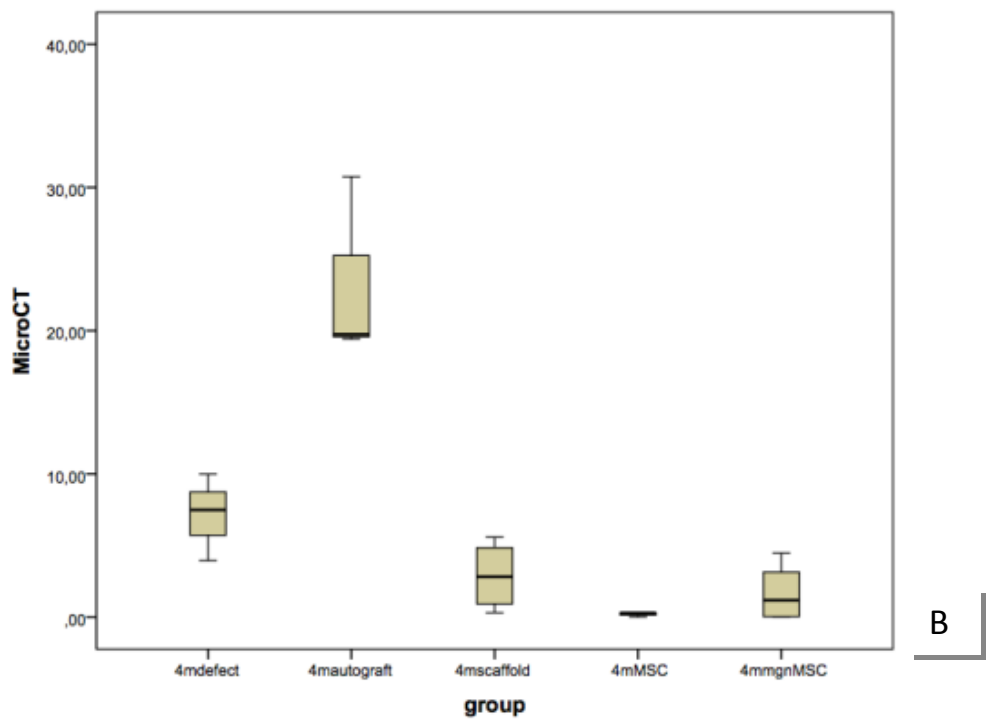
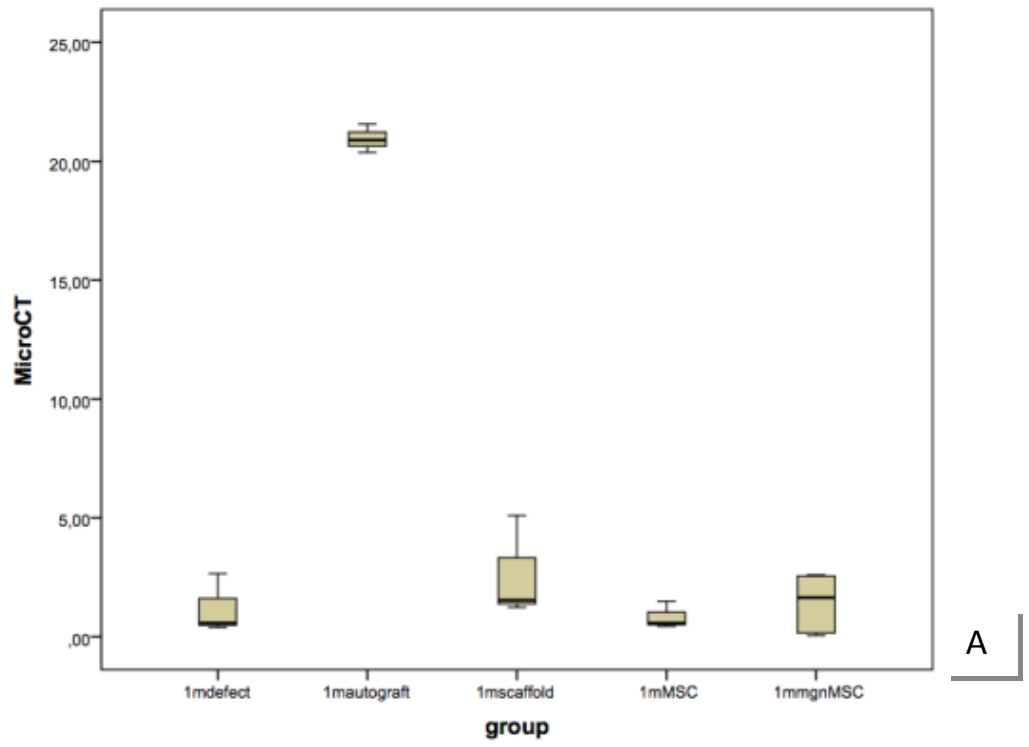
A

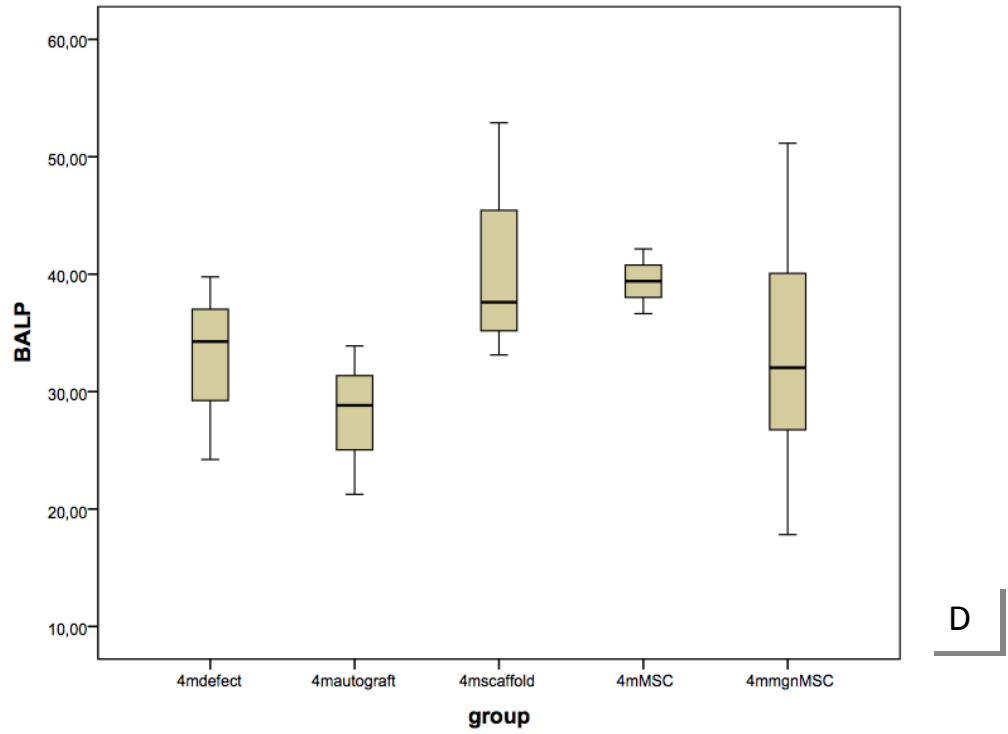
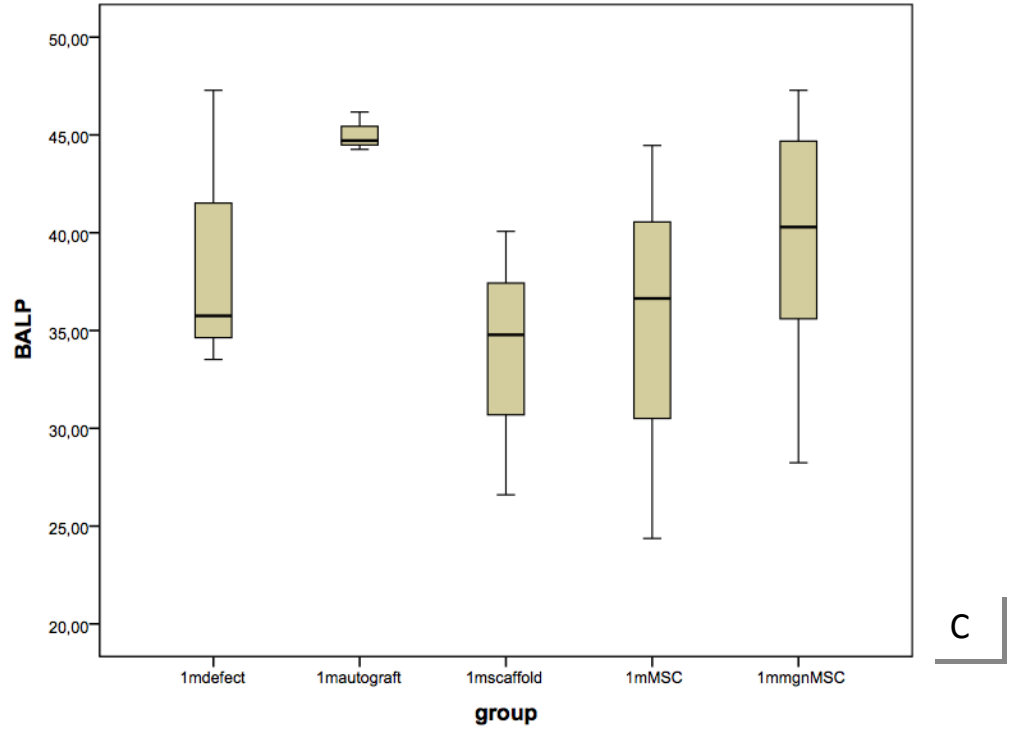


B



Grafik 4.1 A, B, C, D: A ve B’de birinci ayda, C ve D’de dördüncü ayda deney ve kontrol gruplarında defekt alanındaki kemik oranı ve kemik alanına ait tanımsal istatistikler görülmektedir.





Grafik 4.2. A, B, C, D: A ve B’de birinci ayda, C ve D’de dördüncü ayda deney ve kontrol gruplarında defekt alanındaki mikrotomografik kemik hacmi ve kan alkalin fosfataz değerlerine ait tanımsal istatistikler görülmektedir.

5. SONUÇ

Yapılan çalışmada tüm deneklerde anestezi esnasında veya postoperatif dönemde kayıp gözlenmemiştir. Yara yeri enfeksiyonu, greft enfeksiyonu gözlenmedi.

Birinci ay sonuçlarına bakıldığında yeni kemikleşme oranları incelendiğinde en iyi kemikleşmenin otogreft grubunda gerçekleştiği saptandı. Manyetik yüklü altın kaplı nanopartikül yüklenmiş mezenkimal kök hücre-scaffold grubunun otogreft uygulanan grubu yakın şekilde kemikleşme oranı gösterdiği saptandı.

Histolojik olarak scaffoldun organizmaya herhangi bir olumsuz etkisi olmadığı saptandı. Dördüncü ay sonuçları incelendiğinde otogreft grubunun en iyi kemikleşme oranına sahip olduğu gözlemlendi. Manyetik yüklü altın kaplı nanopartikül yüklenmiş kemik stromal hücre-scaffold grubunda boş scaffold grubuna nazaran daha iyi kemikleşme olduğu fakat bu kemikleşmenin otogreft grubu kadar olumlu olmadığı saptandı.

Alkalen fosfataz değerleri ve yeni kemik oluşumu açısından istatistiksel olarak bir korelasyon saptansa da anlamlı bir farklılık bulunamadı.

Çalışmanın sonuçlarına bakıldığında birinci ayda çoklu karşılaştırmada deney ve kontrol grupları arasında histolojik parametreler olan defekt içindeki yeni kemik oranı ($p=0.016$) ve mm² cinsinden yeni kemik alanı ($p=0.016$) anlamlı farklılıklar gösterdi. Mikrotomografi ve kan ALP değerleri bu dönemde gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi. Bu sonuç, ilk ayda kritik boyuttaki defektin henüz kemikleşmeye başlaması nedeniyle adı geçen ölçümlerin anlamlı değerlere ulaşmadığı biçiminde yorumlandı. Buna göre birinci ayda magnetik taneciklerin yüklendiği MKH uygulanan grup (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.001$) ve otogreft grubundaki (sırasıyla $p=0.034$ ve $p=0.034$) yeni oluşan kemik alanı ve total defekte oranı defektin boş bırakıldığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha fazlaydı.

Birinci ayda altın standart olarak kabul edilen otogreft grubundaki yeni kemik alanı ve bu alanın total defekt alanına oranı boş scaffold uygulanan gruba göre anlamlı biçimde fazlaydı (sırasıyla $p=0.022$ ve $p=0.022$).

Dördüncü ayda çoklu karşılaştırmada deney ve kontrol grupları arasında histolojik parametreler olan defekt içindeki yeni kemik oranı ($p=0.028$) ve mm2 cinsinden yeni kemik alanı ($p=0.015$) ile birlikte mikrotomografik ölçüm değerleri ($p=0.010$) anlamlı farklılıklar gösterdi. Bu dönemde mikrotomografi değerleriyle histolojik yeni kemik alanı ölçümleri bazı gruplarda orta derecede korelasyon ($p=0.005$) gösterdi. Dördüncü ayda otograft uygulanan gruptaki yeni kemik miktarı ve bunun defekt alanına oranı, boş bırakılan defekt grubu (sırasıyla $p=0.003$ ve $p=0.005$); boş doku iskelesinin uygulandığı grup (sırasıyla $p=0.004$ ve $p=0.005$) ve magnetik partiküllerin yüklendiği MKH-doku iskelesi grubuna göre (kemik miktarı anlamlı farklı değil, kemik oranı için $p=0.049$) daha çoktu. Dördüncü ayda mikrotomografik olarak defekt alanında ölçülen kemik hacmi otograft grubunda, MKH-doku iskelesi ve magnetik partiküllerin yüklendiği MKH-doku iskelesi uygulanan gruplara göre daha çoktu (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.006$). Diğer yandan dördüncü ayda mikrotomografik olarak yeni kemik hacmi MKH-doku iskelesi uygulanan grupta boş defekt grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olarak ölçüldü ($p=0.020$). Buna göre dördüncü ayda MKH'ler kritik büyüklükteki kalvariye defektte iyileşme sağlasa da, altın standart olan otograft uygulamasının diğer gruplara göre daha ileri kemikleşme sağladığı sonucuna varıldı.

Doku iskelesi (skafold) uygulanan gruplarda biyomalzemeye hafif ila orta derecede bir doku yanıtı olduğu saptanmıştır. Daha önce biyomalzemenin doku uyumu başka çalışmalarımızda kantitatif olarak değerlendirilip biyouyumlu olarak saptandığından, bu çalışmada skorlanmamıştır. Biyomalzeme çevresinde lenfosit, makrofaj ve yer yer yabancı cisim dev hücreleri izlenmekle birlikte nekroza rastlanmamıştır. Bu sonuçlara göre incelenen tüm zaman dilimlerinde otograft uygulanan gruplarda aktif kemik yapımı en ileri seviyededir.

Birinci ayda daha belirgin olmak üzere magnetik partiküllerin yüklendiği MKH-doku iskelesi uygulanan gruplarda aktif kemik yapımı altın standart olan otograft uygulamasına yakın düzeyde belirgin biçimde artmıştır. Buna rağmen grupların hiçbirisinde dördüncü ayda kritik büyüklükteki kalvariye defekt tam olarak kemikleşmemiştir. Bu durum literatür ile uyumludur.

Manyetik yüklü altın kaplı nanopartikül yüklenmiş MKH'lerin otograft kadar etkinlik gösterememesinin bir nedeni de scaffold üzerine yerleştirilen MKH'lerin

tamamının etkinlik gösterememesinden kaynaklanabilir. Kemik iliği hücreleri her ne kadar uygun ortamda alınıp çoğaltılıp taşıyıcıya yüklense de sonuç itibarı ile yabancı bir organizmada uyumluluk problemi göstermiş olabilir. Histolojik incelemede nanopartiküllü MKH grubunda bu savı destekler anlamlı inflamatuvar belirteçler, hücreler tespit edilmemiştir.

Kritik boyuttaki kalvaryal kemik defektlerinin onarımında altın kaplı manyetik yüklü nanopartiküllerin kullanımı ümit vaat etmektedir. Daha kapsamlı araştırmaların yapılması kritik büyüklükteki kranial defektlerin onarımında fayda sağlayacaktır.

Yapılan çalışmada manyetik partiküllerin mezenkimal kök hücrelere farklı miktarlardaki partiküller 15 dak manyetik alan uygulanarak toksik etkileri incelenmiştir. Sonuçlar tablo 5.1’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, partikül toksitesinde en önemli etkenlerden birinin partikül miktarı olduğu tesbit edilmiştir. Diğer önemli etken ise manyetik alan uygulanması olduğu gözlenmiştir. Manyetik alan demir içerikli partiküllerin well tabanına çökmesini sağlayan bir kuvvet oluşturmaktadır. Buda partiküllerin well tabanında yapışık olan hücrelerin içersine girmelerini sağlayıcı bir etki yapmaktadır. Manyetik alan uygulandığında uygulanmayan gruplara göre toksisitenin yaklaşık olarak %8 oranında arttığı gözlenmiştir. Manyetik alan uygulamadan partiküller aynı süre ile hücrelerle etkileştirildiğinde toksik değerlerin daha düşük olduğu görülmüştür.

Tablo 5.1. 15 dakika manyetik alan uygulanmış ve uygulanmamış manyetik partiküllerin mezenkimal hüclerine toksisitesini (%canlılık oranları) gösteren tablo.

Partikül miktarı(µg/ml)	Kontrol	Manyetik alan uygulanmış	Manyetik alan Uygulanmamış
40	100	55.19±0.48	62.36±0.97
20	100	66.32±0.53	69.89±0.76
10	100	74.91±0.65	79.92±0.75
5	100	81.72±0.32	88.88±0.56
2.5	100	86.24±0.24	93.96±0.34

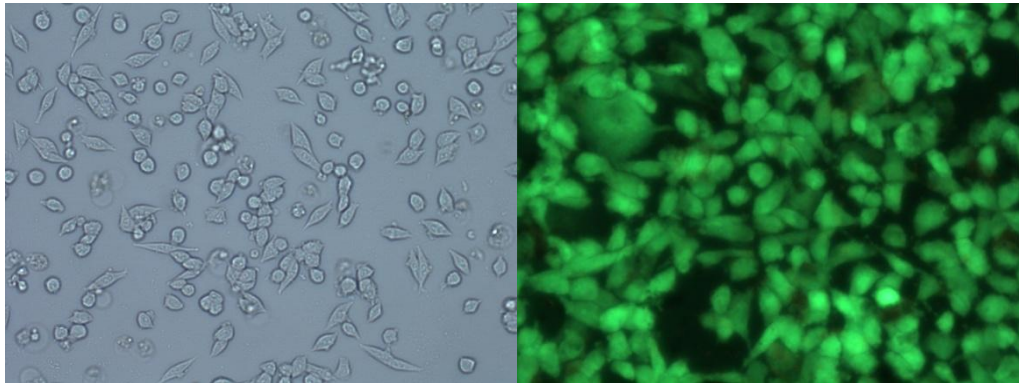
Yapılan çalışmada yukarıda belirtildiği gibi işaretlenmiş manyetik partiküller farklı sürelerde manyetik alan uygulanarak mezenkimal kök hücrelerine hangi

oranlarda girdiği floresan ataçmanlı mikroskopun hem floresan filitresi hemde normal ışık filitresi aynı anda kullanılarak tesbit edilmiştir. Elde edilen oranlar tablo 5.2’te ve floresan mikroskop fotoğrafları Şekil 5.1’de verilmiştir. 48 gözlü kültür kabı 3 gruba ayrıldı. Farklı sürelerde (5, 10, 30dak.) süre ile 1 gruba manyetik alan uygulanmadı, ikinci gruba manyetik alan uygulandı ve üçüncü gruba yönlendirilmiş manyetik alan uygulandı. Elde edilen sonuçlara göre hücre içersine partiküllerin girmesinde partikül miktarının, manyetik alan uygulamasının ve özellikle yönlendirilmiş manyetik alan uygulamasının etkili olduğu saptanmıştır.

Tablo 5.2. Floresan işaretli manyetik partiküllerin mezenkimal kök hücre kültüründe 15dak. inkübasyonda hücre içersine girme % oranları.

Partikül miktarı (µg/ml)	Manyetik alan uygulanmamış	Manyetik alan uygulanmış
2.5	5±1	9±1
5	10±2	17±3
10	21±3	38±3
20	34±4	65±2
40	46±4	82±4

Tabloya bakıldığında düşük oranlarda partikül uygulandığında hücre içersine alınımların da farklı olduğu gözlemlendi. Fakat partikül miktarı arttığında hücre içersine girme oranının arttığı gözlemlendi. Manyetik alan uygulandığında hücre içersine giren partiküllerin oranının arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 5.1 Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerinin mikroskop fotoğrafları.

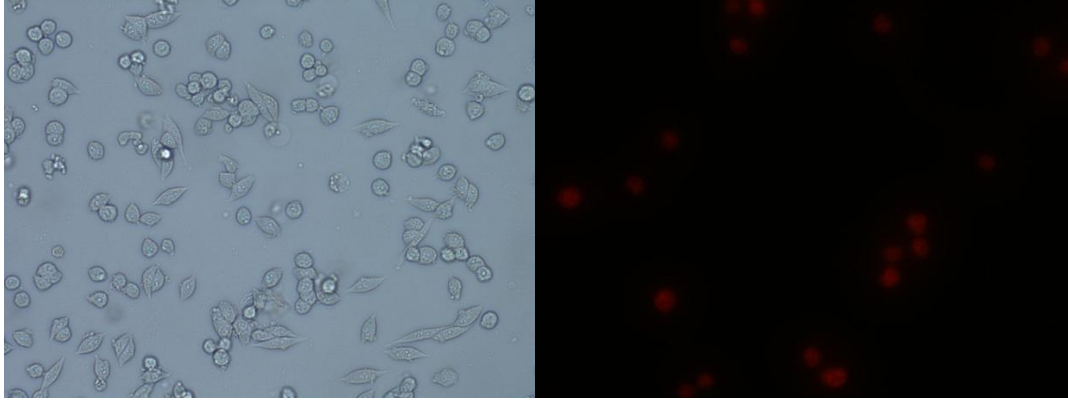
A) Floresan partiküllerle etkinleştirilmemiş kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreleri ışık mikroskop fotoğrafları B) Floresan işaretli manyetik partiküllerin kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerine girdiğini gösteren fotoğraf

MMHKMtiküllerle etkileştirilmiş Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreleri. Yeşil olanlar floresan işaretli partikülleri içersine almış hücreleri göstermektedir. Fotoğraflar Floresan mikroskobun FITC filtresinde çekildi. Bar 45µm göstermektedir.

Nekroz bir diğer hücre ölüm şekli olup hücreler dışarıdan gelen etkilerden aldıkları hasar sonucu ölüme gitmektedir. Yapılan çalışmada aynı toksisite de olduğu gibi bütün basamaklar aynı olup sadece son basamakta hücreler floresan özellikte Hoesth 33342 ve propodium iyodite (PI) boyaları içeren ikili çalışma solusyonu ile boyanmıştır. Bu boyalarda hoesth canlı hücrelerin çekirdeklerini maviye, PI ise ölü veya hücre zarı hasar görmüş hücrelerin çekirdeklerinin kırmızı renge boyamaktadır. Elde edilen sonuçlar tablo 5.3'te ve floresan mikroskop fotoğrafları şekil 5.2 de verilmiştir. Tablo 5.3 e bakıldığında toksisteden elde edilen sonuçlara yakın sonuçlar elde edilmiştir. Tabloda 15 dak. manyetik alan uygulanmış grupların sonuçları verilmiştir. Nekrotik etkinin partikül miktarı ile orantılı olarak arttığı tesbit edildi. Manyetik alan uygulamanın nekrotik etkinin yüksek oranda artmasına neden olduğu tesbit edildi (Şekil 5.2). M manyetik alan uygulanmamış grupta özellikle nekrotik etkinin belli bölgelerde kümelendiği gözlenmiştir. Sonuç olarak manyetik alan uygulamanın partiküllerin hücre içersine yüksek oranda ve daha fazla hücreye girmesini sağladığı söylenebilir.

Tablo 5.3. Manyetik partiküllerin 15 dak. inkübasyondaki %nekrotik hücre sayısını gösteren tablo.

Partikül miktarı(µg/ml)	Kontrol	Manyetik alan uygulanmış	Manyetik alan Uygulanmamış
40	3	47±3	36±2
20	2	35±5	28±3
10	4	26±2	20±3
5	2	19±2	13±3
2.5	2	9±2	5±1



Şekil 5.2. İkili boyama ile muamele edilmiş kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerinin mikroskop fotoğrafları.

A) Partiküllerle etkileştirilmemiş kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreleri ışık mikroskop fotoğrafları, B) Partiküllerle etkinleştirilip manyetik alan uygulanmamış kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerdeki nekroza uğramış hücrelerin floresan mikroskop fotoğrafları

Kırmızı olan hücre çekirdekleri (Propodium ile boyanmış) ölü veya hücre zarı hasar görmüş hücreleri göstermektedir. Fotoğraflar Floresan mikroskopun 480-520nm filtresinde çekildi. Bar 45µm göstermektedir.

6. TARTIŞMA

Konjenital ve edinsel pek çok nedene bağlı olarak, plastik cerrahi kliniklerinde karşılaşılan kalvaryal defektlerin onarımı hem hasta hem de hekim için büyük önem taşımaktadır. Güncel yaklaşımda bu tür defektler en çok otogreft yöntemi ile onarılmaktadır. Tüm greftleme işlemlerinde olduğu gibi bu yöntemde de uzun ve kısa vade de çeşitli sorunlar ortaya çıkmakta ve tedavinin sonuçlarını olumsuz etkilemektedir. Yara enfeksiyonu, kanama, parestezi, bölgesel doku hasarı, hareket etmede kısıtlılık, verici kemikte kırık ve kronik ağrı ve kötü kozmetik sonuçlar greftleme yöntemlerinden sonra karşılaşılabilir. Bu tür sorunları aşmak için günümüzde doku mühendisliği var olan defektleri onarmak için doku uyumlu iyileşmeye pozitif etkileri olan faktörleri barındıran yapay doku iskelesi tasarlayacak teknolojiler geliştirmekte, kök hücreleri kullanmakta ve bunların farklılaşması ve çalışmasını arttıracak sinyalizasyonu geliştirmektedir. Bizde sinyalizasyon yerine manyetik etki ile kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreleri bir bölgede toplamayı ve kök hücrelerin osteogenik yolda çalışmalarını doku uyumlu klinikte kullanılan “gelatine sponge” doku iskelesi kullanarak araştırmak istedik. Çalışmanın sonucunda kök hücrelere göre manyetik etki altında manyetik yüklü altın kaplı nanopartiküllerin yüklendiği kök hücrelerin daha iyi kemik iyileşmesini sağladığını gözlemledik.

Kemik stromal hücresi, kemik iyileşmesine olumlu katkı yapabilecek birçok faktörü barındırmaktadır. Taub, P. Ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kritik büyüklükteki kalvaryal defektin onarımında mezenkimal kök hücre kullanılmış ve defektin kapatılmasında deneysel olarak başarı elde edilmiştir [10].

Altın eski dönemlerden beri hem iletken olması hem de dokuya uyumlu olmasından dolayı tıp bilimlerinde tedavi yönetimi için yardımcı araç olarak kullanılmaktadır. Mühendislikteki gelişmeler var olan pek çok maddeyi nanometre seviyesine indirmekte ve özellikleri kaybolmadan nano seviyede maddelerin

uygulamalarda kullanımına olanak sağlamaktadır. Günümüzde manyetik nanopartiküller rutin olarak hedef organlar (akciğer ve karaciğer) ve lenf nodülleri için kontrast ajan olarak kullanılmaktadır. Yeni gelişmeler moleküler görüntüleme ve hücre izleme üzerine odaklanmıştır. Genellikle son çalışmalarda in vitro olarak kök hücrelerin akümülyasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Uygulamalara getirdikleri kolaylıklar ve kazandırdıkları özellikler sebebiyle biyomedikal alanlarda manyetik nanopartiküllerin kullanımları hızla yaygınlaşmaktadır.

Kollejen doku uyumlu, fizyolojik olarak parçalanabilir ve diğer makromoleküler ve hücrelerle uygun etkileşim sağlayabilen iyi bir üründür. Kollejen süngerler kolay uygulanabilir, su emer özellikte çok amaçlı ürünlerdir. Jelatin, kollojenin irriversible hidrolizinden elde edilmektedir. Suda çözünürlüğü azaltmak ve kalıcılığını arttırmak amacıyla ısıya maruz bırakılmaktadır [70].

Bu çalışmamızda manyetik etki altında manyetik yüklü altın kaplı nanopartikül yüklenmiş kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin doku iskelesi “gelatine sponge” kullanılarak kritik büyüklükteki kalvaryum hasarlarının onarımına olan etkisi araştırıldı.

Li Leo Ma ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada (2009) altın kaplı nanopartiküllerin dış yüzeyindeki dekstran kaplaması ile partiküllerin kümeleşmesini sağlamışlar ve inflamasyon bölgesindeki makrofajların dekstranı bağlayan reseptörleriyle bu nanopartikül kümelerini fagosite ettiğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da hareketli manyetik etki altında nanopatiküllerin hareketlendirilmesi ve hücre içine nanopartüküllerin mekanik olarak yüklenmesi yapılmıştır. Bu uygulamada nanopartiküller tekli yapıdadır, Li Leo Ma ise altın kaplı nanopartikül kümelerini kullanmıştır. Hücre içindeki bu partikül kümelerinin, hücrelerin manyetik yönlendirilmesi ve kümelenmesinde daha fazla etkisi olabileceği ve doku rejenerasyonunu kolaylaştırabileceği göz önünde bulundurulmalıdır [59].

Bir başka deyişle, bu nanopartikül kümeleri yutturulmuş kök hücreler intravenöz uygulama sonrasında yaralanan bölgeye dışarıdan uygulanan manyetik etki altında, söz konusu bölgeye çekilebilir [59].

Yi Yang ve çalışma arkadaşları yaptıkları bir çalışmada transgenik yeşil floresan proteini (t-GFP) taşıyan ratlardan izole edilen kemik iliği kökenli mezankimal kök hücreler ile kranial defektlerin onarımını, jelatin doku iskelesi ve boş defekt ile karşılaştırmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki yalnızca jelatin doku iskelesi kullanılan grupta, boş defekt grubuna göre kemik iyileşmesi daha yüksektir, ancak jelatin doku iskelesine t-GFP taşıyan kök hücrelerin eklendiği grupta kemik iyileşmesi daha erken ve daha kaliteli olmuştur. Bu grubun histomorfolojik incelemelerinde defekt alanı içindeki hücrelerin hem yeşil floresan protein ile işaretli kök hücrelerden hem de işaretli olmayan konak kök hücrelerden oluştuğunu gözlemlenmişlerdir. Çalışmada mikroCT ve histolojik analizlerle ortaya koyulmuştur ki in vitro ekzojen büyüme faktörleri eklenmeksizin çoğaltılan ve kritik boyutlu rat kalvaria defektleri içine jelatin doku iskelesi ile transplante edilen rat kemik iliği kökenli mezankimal kök hücreler, ortopedik mikro çevreye yanıt vererek in vivo osteojenik yola girmişlerdir. Bizim çalışmamızda da kök hücrelerin boş defekt ve jelatin doku iskelesine göre daha iyi kemik iyileşmesi gösterdiğini histolojik olarak gözlemledik [69].

Kang-Hsuan Chiu ve çalışma arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada vardıkları sonuca göre, statik manyetik alanın osteoblastik maturasyonu etkileme mekanizmalarından birisi membran akışkanlığını azaltmak ve membran alanında büyüme faktörlerinin proliferasyonu teşvik eden etkilerini azaltmaktır. Bu şekilde statik manyetik alan tedavisine tabi tutulan osteoblastların çoğalması engellenerek, ALPase faaliyetinde bir artış saptanmış ve daha fazla morfolojik olarak olgunlaşmış osteoblastlar gözlemlenmiştir. Dolayısıyla yazarlara göre statik manyetik alanlar ortopedik rehabilitasyon için potansiyel klinik araçlardır. Bizim çalışmamızda da manyetik nanopariküllerin yüklendiği kök hücrelerde yüklenmemiş kök hücrelere nazaran daha iyi kemikleşme olduğu tespit edilmiştir. Manyetik nanopariküllerin yüklendiği kök hücre grubunda biz manyetik etkiyi deney süresince uyguladık, bu manyetik etkinin de kemikleşmeyi artıran bir etkisi olduğunu düşündük. Ancak bu bulgunun desteklenmesi için başka in vivo çalışmalara gereksinim vardır [60].

Güncel literatür araştırıldığında kemik iliği mezenşimal hücrelerinin kalvaryal hasarlar dahil pek çok hasarlanmada kullanımının olumlu etkileri olduğu görülmektedir [61-63].

Bu bilgilere rağmen Costa-Pinto, A. ve arkadaşları deneysel kalvaryal hasar modelinde scaffold üzerine insan kemik iliği hücreleri yüklemiş ve beklenenin aksine kemik oluşumunda azalma olduğunu bildirmişlerdir [64].

J. Lalande ve arkadaşlarının (2011) yapmış olduğu çalışmada, dekstran ve polietilen glikol ile kaplanmış, 50-80 nm çapındaki manyetik nanopartiküllerin stromal kök hücrelerine yüklenmesi sonrasında in vitro yaptıkları gen ekspresyon çalışması ile bu partiküllerin osteogenik farklılaşmayı ve metabolik aktiviteyi etkilemediğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca, bu stromal hücrelerin polisakkarit ve poroz yapılı doku iskelesi kullanılarak in vivo implantasyonu sonrası akıbeti MRI yardımıyla takip edilebilmiştir. Bu çalışma, statik manyetik alanın, hücrelere toksik etki oluşturmadan defekt alanında hücre yığılmalarının (nanopartiküller yardımıyla) gözlemlenmesi ve hızlı kemik iyileşmesinin gözlenmesi ümit vaat etmektedir. Bizim çalışmamızda ise nanopartiküllerin yüklendiği kök hücrelerin kemik iyileşmesine olumlu etkileri in vivo (histolojik) olarak gözlemlenmiştir. J. Lalande ve çalışma arkadaşlarının yaptığı çalışmadan esinlenerek, söz konusu olumlu etkilerin in vivo MRI ile gözlemlenebileceğini öngörmek mümkündür [68].

Takaaki Kobayashi ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada, 4 saatlik manyetik alan etkisi altında manyetik işaretli MKH'lerin intraartikular enjeksiyon sonrası, patellanın iç yüzde oluşturulmuş olan defekte toplandıklarını göstermişlerdir [65].

Yine Takaaki Kobayashi ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada, dejenere kırıkta parçalarının in vitro rejenerasyonunda 6 saatlik manyetik alan etkisi altında yönlendirilen manyetik işaretli MKH'lerin kültür kabındaki dejenere kırıklara uygulanması ile histolojik olarak kırıkta rejenerasyon bulguları ve hücrelerde tabakalanma gözlenmiştir. Manyetik alan uygulanmayan MKH'lerde ise hücresel oluşum gözlenmemiştir [66].

T. Sugioka ve arkadaşları 2007 yılında in vitro yaptıkları bir çalışmada, MKH-manyetik yüklü antikor kompleksi içeren iki kültüre hücre grubundan birine 24 saat manyetik alan uygulamış ve manyetik alan uygulanan grupta hücrelerin %90 merkezde toplandığını diğer grupta ise hücrelerin yaygın dağıldığını tespit etmişlerdir. 4 haftalık çalışmanın sonunda osteogenik matriks oluşumu manyetik alan uygulanan grupta şiddetli oranda olurken manyetik alan uygulanmayanda zayıf olduğunu göstermişlerdir [67].

Sonuç olarak manyetik etki ile manyetik işaretli hücrelerin akümüasyonu mümkün olabilmekte bu da hücrelerin farklılaşmasını ve işlevlerini yerine getirmesini arttırmaktadır. Biz de çalışmamızda bunun olumlu etkilerini gözlemledik. Bu olumlu etkilerden, mıknatısın gücü ve ekilen hücre miktarı artırılarak otogreft değerlerini yakalayabileceği iddia edilebilir.

Bizim çalışmamızda da manyetik yüklü altın kaplı nanopartiküllerin yüklendiği MKH'ler beklenen kemikleşme oranını göstermese de boş scaffold ve kontrol grubuna göre daha anlamlı bir yeni kemik oluşumu göstermiştir.

Kemik iyileşmesinin değerlendirilmesinde güzel bir model olan kalvarial defekt onarımında, bizim kullandığımız altın kaplı manyetik yüklü nanopartiküllerin yüklendiği kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler sinyalizasyon yerine manyetik etki altında kemik defekt bölgesinde başarıyla tutulmuştur. Hücre akümüasyonun etkisiyle hücreler osteojenik yola girmişler ve kemik iyileşmesinde konağa katkı sağlamışlardır. Bu katkı kullanılan nanopartiküllerin özelliklerinin ve manyetik etki gücünün değiştirilmesi ile daha da fazla arttırılabilecektir. İleride daha iyi başarılar ulaşmak için bu konunun daha kapsamlı araştırmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Tubbs, R.S., A.N. Bosmia, and A.A. Cohen-Gadol, *The human calvaria: a review of embryology, anatomy, pathology, and molecular development*. Childs Nerv Syst, 2012. **28**(1): p. 23-31.
2. G.H, P., *Anatomy of the head and neck*. 1973, Philadelphia: WB. Saunders. 77.
3. Sirola, K., *Regeneration of defects in the calvaria. An experimental study*. Ann Med Exp Biol Fenn, 1960. **38**(Suppl 2): p. 1-87.
4. Prolo DJ., G.R., DeVine JS., Oklund SA., *Clinical utility of allogeneic skull discs. in human craniotomy*. Neurosurgery 1984. **14**(183).
5. Nakagaki, W.R. and J.A. Camilli, *Spontaneous Healing Capacity of Calvarial Bone Defects in mdx Mice*. Anat Rec (Hoboken), 2012.
6. Garrison, K.R., et al., *Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(6): p. CD006950.
7. Otto, W.R. and J. Rao, *Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage*. Cell Prolif, 2004. **37**(1): p. 97-110.
8. Tubbs, R.S. and A. Cohen-Gadol, *The human calvaria*. Childs Nerv Syst, 2012.
9. Derubeis, A.R. and R. Cancedda, *Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances*. Ann Biomed Eng, 2004. **32**(1): p. 160-5.
10. Taub, P.J., et al., *Bioengineering of calvaria with adult stem cells*. Plast Reconstr Surg, 2009. **123**(4): p. 1178-85.
11. Issa, J.P., et al., *Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone formation in the acute distraction osteogenesis of rat mandibles*. Clin Oral Implants Res, 2009. **20**(11): p. 1286-92.
12. Zou, D., et al., *Repair of critical-sized rat calvarial defects using genetically engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha*. Stem Cells, 2011. **29**(9): p. 1380-90.

13. Junqueira LC, C.J., *Basic Histology*. 10th ed ed. 2003, New York: McGraw-Hill. 144-146.
14. Bancroft JD, S.A., *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4 ed. 1996, New York: Churchill Livingstone.
15. Wilkins, B.S., *Histology of normal haemopoiesis: bone marrow histology. I*. J Clin Pathol, 1992. **45**(8): p. 645-9.
16. Travlos, G.S., *Normal structure, function, and histology of the bone marrow*. Toxicol Pathol, 2006. **34**(5): p. 548-65.
17. Ochsner, P.E. and S. Hailemariam, *Histology of osteosynthesis associated bone infection*. Injury, 2006. **37 Suppl 2**: p. S49-58.
18. Barthel, H.R. and M.J. Seibel, [*Role of bone histology in the determination of bone metabolism*]. Med Klin (Munich), 2003. **98**(2): p. 111-2; author reply 113.
19. Schaefer, H.E., [*Cytology and histology of normal human bone marrow*]. Verh Dtsch Ges Pathol, 1983. **67**: p. 80-100.
20. Mavcic, B. and V. Antolic, *Optimal mechanical environment of the healing bone fracture/osteotomy*. Int Orthop, 2012.
21. Tarantino, U., et al., *Bone healing and osteoporosis*. Aging Clin Exp Res, 2011. **23**(2 Suppl): p. 62-4.
22. Schenk, R.K., [*Histology of primary bone healing*]. Fortschr Kiefer Gesichtschir, 1975. **19**: p. 8-12.
23. Brond AR, R.T., *Fracture Healing. Surgery of the Musculoskeletal System*. 2 ed. 1990, New York: Churchill Livingstone.
24. Greenwald, A.S., et al., *Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications*. J Bone Joint Surg Am, 2001. **83-A Suppl 2 Pt 2**: p. 98-103.
25. Moore, W.R., S.E. Graves, and G.I. Bain, *Synthetic bone graft substitutes*. ANZ J Surg, 2001. **71**(6): p. 354-61.
26. Aykın Simsek, G.Ç., Erdal Cila, *Kemik Greftleri ve Kemik Greftlerinin Yerini Tutabilecek Maddeler*. Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği 2004. **3**(3-4).

27. Tancred, D.C., A.J. Carr, and B.A. McCormack, *Development of a new synthetic bone graft*. J Mater Sci Mater Med, 1998. **9**(12): p. 819-23.
28. Costantino, P.D. and C.D. Friedman, *Synthetic bone graft substitutes*. Otolaryngol Clin North Am, 1994. **27**(5): p. 1037-74.
29. Betz, R.R., *Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions*. Orthopedics, 2002. **25**(5 Suppl): p. s561-70.
30. Parikh, S.N., *Bone graft substitutes in modern orthopedics*. Orthopedics, 2002. **25**(11): p. 1301-9; quiz 1310-1.
31. Vaccaro, A.R., *The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft*. Orthopedics, 2002. **25**(5 Suppl): p. s571-8.
32. Viggewarapu, M., et al., *Adenoviral delivery of LIM mineralization protein-1 induces new-bone formation in vitro and in vivo*. J Bone Joint Surg Am, 2001. **83-A**(3): p. 364-76.
33. Parikh, S.N., *Bone graft substitutes: past, present, future*. J Postgrad Med, 2002. **48**(2): p. 142-8.
34. Vaccaro, A.R., et al., *Bone grafting alternatives in spinal surgery*. Spine J, 2002. **2**(3): p. 206-15.
35. Bongso, A., Lee, E. H, *Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources, Stem Cells from Bench to Bedside*. 2005, Singapur: World Scientific Publishing Co.
36. Sanchez-Ramos, J., et al., *Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro*. Exp Neurol, 2000. **164**(2): p. 247-56.
37. Ferrari, G., et al., *Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors*. Science, 1998. **279**(5356): p. 1528-30.
38. Doğan, İ. I., *Altın Kaplı Magnetik Nanopartiküller ile Hücre Transfeksiyonu*, in Biyomühendislik Anabilim Dalı. 2011, Hacettepe Üniversitesi: Ankara.
39. Harris, L.A., *Polymer Stabilized Magnetite Nanoparticles and Poy(propylene oxide) Modified Styrene-Dimethacrylate Networks*. 2002, Virginia Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University: Blacksburg. p. 161.

40. Ozaki, M., ed. *Formation of Magnetic Particles. Fine Particles: Synthesis, Characterization and Mechanisms of Growth.* ed. T.e. Sugimoto. 2000, Marcel Dekker, Inc.: New York. 662-682.
41. Sayar Filiz.. 2010, Hacettepe Üniversitesi,Biyomühendislik AD: Ankara.
42. Banu Kesanli, Y.C., Milton R. Smith,Edward W. Bittner, Bradley C. Bockrath, and Wenbin Lin,, *Highly Interpenetrated Metal-Organic Frameworks for Hydrogen Storage*,. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005. **44**: p. 72 -75.
43. Sun H., Z.X., Zhang L., Zhang Y., Wang D., *Materials Science and Engineering.* 2010. **30**,: p. 311-315.
44. Mandal M, K.S., Ghosh SK, Panigrahi S, Sau TK, Yusuf SM, et al. , *Magnetite nanoparticles with tunable gold or silver shell.* *J Colloid Interface Sci*, 2005. **286**: p. 187-194.
45. J. Luo, P.N., Y. Lin, D. Mott, L. Y Wang and C. J. Zhong, *Langmuir*, 2006, 22, 2892,;
46. Jeong J, H.T., Chung BH *Enhanced reusability of hexa-arginine-tagged esterase immobilized on goldcoated magnetic nanoparticles.* *Anal Chim Acta*, 2006. **569**: p. 203-209.
47. Goon I. Y., L.M., Lai H., Lim M., Munroe P., Gooding J. J., Amal P., *Fabrication and dispersion of gold-shell protected Magnetic Nanoparticles: systematic control using polyethyleneimine.* *Chemistry of Materials*, 2009. **21**.
48. Pham TT, C.C., Sim SJ., *Application of citrate-stabilized gold-coated ferric oxide composite nanoparticles for biological separations.* *J Magn Magn Mater*, 2008. **320**: p. 2049-2055.
49. Hong Ling Liu, C.H.S., Jun Hua Wu a, Kyung-Mi Lee, Young Keun Kim., *Synthesis of streptavidin-FITC-conjugated core-shell Fe₃O₄-Au nanocrystals and their application for the purification of CD4 lymphocytes:.* *Biomaterials*, 2008. **29**: p. 4003-4011.
50. Pita M., A.J.M., Vaz-Dominguez C., Briones C., Mateo-Martí E., Martín-Gago J., Morales M.P., Fernández V.M., *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008. **321**: p. 484-492.
51. Satoshi Seino, Y., Takuya Kinoshita, Takashi Nakagawa, TakaoA.Yamamoto,, *Dispersibility improvement of gold/iron-oxide composite nanoparticles by*

- polyethylenimine modification*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2009. **321**: p. 1404-1407.
52. T. Jafari, A.S., N. Khakpash,, *Synthesis and cytotoxicity assessment of superparamagnetic iron–gold core–shell nanoparticle coated with polyglycerol*. Journal of Colloid and Interface Science, 2010. **345**: p. 64-71.
53. E. Iglesias-Silva J.L. Vilas-Vilela, M.A.L.-Q.J.R., M. Rodríguez, L.M. León, , *Synthesis of gold-coated iron oxide nanoparticles*., Journal of Non-Crystalline Solids 2010. **356**: p. 1233–1235
54. Q.H. Lu, K.L.Y.,, D. Xi, Z.L. Liu, X.P. Luo, Q. Ning,, *Synthesis and characterization of composite nanoparticles comprised of gold shell and magnetic core/cores*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2006. **301**: p. 44-49.
55. Niidome T, H.L.,, *Gene Therapy Progress and Prospects: non-viral Vectors*. Gene Therapy, 2002. **9**(24).
56. Zhang X, D.X., Sawyer GJ, Collins L, Fabre JW., *Regional hydrodynamic gene delivery to the rat liver with physiological volumes of DNA solution*. J Gen Med, 2004. **6**: p. 693-703.
57. Zong, C., et al., *Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds*. Eur Cell Mater, 2010. **20**: p. 109-20.
58. Mokbel, N., et al., *Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft*. Oral Maxillofac Surg, 2008. **12**(2): p. 73-8.
59. Li Leo Ma, et al., *Small Multifunctional Nanoclusters (Nanoroses) for Targeted Cellular Imaging and Therapy*, American Chemical Society, 2009. Vol. 3: p. 2686-2696.
60. Kang-Hsuan Chiu, et al., *Static Magnetic Fields Promote Osteoblast-Like Cells Differentiation Via Increasing the Membrane Rigidity*, Annals of Biomedical Engineering, 2007. Vol. 35: p. 1932-1939.
61. Pelegrine, A.A., et al., *The comparative analysis of homologous fresh frozen bone and autogenous bone graft, associated or not with autogenous bone marrow, in rabbit calvaria: a clinical and histomorphometric study*. Cell Tissue Bank, 2011. **12**(3): p. 171-84.

62. Khadka, A., et al., *Evaluation of hybrid porous biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide 6 and bone marrow-derived stem cell construct in repair of calvarial critical size defect*. J Craniofac Surg, 2011. **22**(5): p. 1852-8.
63. Terella, A., et al., *Repair of a calvarial defect with biofactor and stem cell-embedded polyethylene glycol scaffold*. Arch Facial Plast Surg, 2010. **12**(3): p. 166-71.
64. Costa-Pinto, A.R., et al., *Chitosan-poly(butylene succinate) scaffolds and human bone marrow stromal cells induce bone repair in a mouse calvaria model*. J Tissue Eng Regen Med, 2012. **6**(1): p. 21-8.
65. Takaaki Kobayashi, et al., *A Novel Cell Delivery System Using Magnetically Labeled Mesenchymal Stem Cells and an External Magnetic Device for clinical Cartilage Repair*, 2008, The Journal of Arthroscopic and Related Surgery, **24**: p. 69-76.
66. Takaaki Kobayashi, et al., *Augmentation of Degenerated Human Cartilage In Vitro Using Magnetically Labeled Mesenchymal Stem Cells and an External Magnetic Device*, 2009, The Journal of Arthroscopic and Related Surgery, **25**: p. 1435-1441.
67. Toshihiro Sugioka, et. al., *Accumulation of Magnetically Labeled Rat Mesenchymal Stem Cells Using an External Magnetic Force, and their Potential for Bone Regeneration*, 2007, Journal of Biomedical Materials Research Part A, p. 597-604.
68. C. Lalande, et. al., *Magnetic Resonance Imaging Tracking of Human Adipose Derived Stromal Cells within Three-Dimensional Scaffolds for Bone Tissue Engineering*, European Cells and Materials, 2011. **21**: p. 341-354.
69. Yi Yang, et. al., *Craniofacial defect regeneration using engineered bone marrow mesenchymal stromal cells*, J Biomed Mater Res Part A, 2011:99A:74–85.
70. P.C. Bessa, M. Casal, R.L. Reis, , *Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery)*, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2008, **2**: 81-96.