

ECE İREM RAYALI

← Adınızı soyadınızı giriniz

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya  
(sol yandaki gibi) olacak.



DOKTORA TEZİ

Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;

← Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

İSTANBUL-2021

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız



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

**(DOKTORA TEZİ )**

**KOMPOZİT POLİMER GREFT ÜZERİNDE PRİMER PULPA KAYNAKLI  
MEZENKİMAL HÜCRE FARKLILAŞMASININ TEM VE  
İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

**ECE İREM RAVALI**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. AYFER KAYNAR**

**AĞIZ DİŞ ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI  
AĞIZ DİŞ ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ  
PROGRAMI**

**İSTANBUL-2021**

## TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

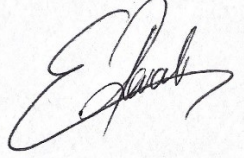


## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

ECE İREM RAVALI

(İmza)



## İTHAF

Canım Aileme ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bütün bilgi ve tecrübeleri, bilimsel vizyonu ile ufkumu genişleten, akademiye olan merakımı arttıran, ahlaki ve etik değerleriyle bana yol gösteren, her konuda verdiği destekle bugünlere gelmemi sağlayan çok sevgili ve saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ayfer Kaynar'a

Tez çalışmamın deney aşamasında, hücre kültürü hakkındaki bütün deneyimsizliklerimi tolere ederek, bilgileriyle becerileriyle ve üstün tecrübeleriyle çalışmamın başarıya ulaşmasına en büyük katkıyı veren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu başta olmak üzere, Biyolog/ Yüksek Lisans Öğrencisi Sibel Doğan, Araştırma Görevlisi İlkay Özdemir ve Araştırma Görevlisi Emel Usta'ya

Doktora hayatımı güzelleştiren ve aynı yollarda yürüdüğümüz tüm bölüm arkadaşlarıma,

Eğitim hayatım süresince her an yanımda olan Orkun Tuna Ertan'a

Uzak da olsa yanımda olan canım arkadaşlarım Gizem Duman, Birke Koca'ya,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, beni sevgi ve destekleriyle bulunduğu noktaya getiren annem Sevil Uzunay, babam Ahmet Ravalı ve kardeşim Ege Ravalı'ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30713

## İÇİNDEKİLER

|                                                            |      |
|------------------------------------------------------------|------|
| TEZ ONAYI.....                                             | İİ   |
| BEYAN.....                                                 | İİİ  |
| İTHAF.....                                                 | İV   |
| TEŞEKKÜR.....                                              | V    |
| İÇİNDEKİLER.....                                           | VI   |
| TABLolar LİSTESİ.....                                      | İX   |
| ŞEKİLLER LİSTESİ.....                                      | X    |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....                       | Xİ   |
| ÖZET.....                                                  | Xİİ  |
| ABSTRACT.....                                              | Xİİİ |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                      | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                     | 4    |
| 2.1. Doku Mühendisliği.....                                | 4    |
| 2.1.1. İskele Biyomateryalleri ve Klinik Kullanımları..... | 5    |
| 2.1.1.1. Doğal Organik Materyaller.....                    | 6    |
| 2.1.1.2. Doğal İnorganik Materyaller.....                  | 7    |
| 2.1.1.3. Sentetik Organik Materyaller.....                 | 8    |
| 2.1.1.4. Sentetik İnorganik Materyaller.....               | 9    |
| 2.1.1.5. Kompozit Malzemeler.....                          | 10   |
| 2.1.1.6. Hidrojeller.....                                  | 13   |
| 2.1.2. Hücre Kaynakları.....                               | 16   |
| 2.1.2.1. Embriyonik Kök Hücreler.....                      | 19   |
| 2.1.2.2. Fetal Kök Hücreler.....                           | 20   |
| 2.1.2.3. Umbilikal Kök Hücreler.....                       | 20   |
| 2.1.2.4. Erişkin Kök Hücreler.....                         | 20   |
| 2.1.2.5. Mezenkimal Kök Hücreler.....                      | 20   |
| 2.1.3. Biyokimyasal Faktörler – Biyomoleküller.....        | 28   |
| 2.2. Kemik Doku.....                                       | 32   |
| 2.2.1. Kemik Doku Hücreleri.....                           | 33   |
| 2.2.1.1. Osteoblastlar.....                                | 33   |

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.1.2. Osteositler.....                                                          | 33 |
| 2.2.1.3. Osteoprojenitör Hücreler.....                                             | 34 |
| 2.2.1.4. Osteoklastlar.....                                                        | 34 |
| 2.2.2. Kemik formları.....                                                         | 34 |
| 2.2.2.1. Kompakt Kemik.....                                                        | 34 |
| 2.2.2.2. Süngerimsi Kemik.....                                                     | 35 |
| 2.2.3. Kemiğin Organik ve İnorganik İçeriği.....                                   | 35 |
| 2.2.3.1. Organik İçerik.....                                                       | 35 |
| 2.2.3.2. İnorganik İçerik.....                                                     | 35 |
| 2.2.3.3. Periosteum.....                                                           | 35 |
| 2.2.3.4. Endosteum.....                                                            | 36 |
| 2.2.4. Kemik Oluşumu (Osteogenezis).....                                           | 36 |
| 2.2.4.1. İntramembranöz Kemikleşme.....                                            | 36 |
| 2.2.4.2. Endrokondral Kemikleşme.....                                              | 37 |
| 2.2.5. Kemiğin Tamiri / İyileşmesi.....                                            | 37 |
| 2.2.6. Vaskülarizasyon.....                                                        | 41 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                            | 47 |
| 3.1. Dental Pulpa ve Gingiva Hücrelerinin Kullanıma Hazırlanması.....              | 47 |
| 3.2. DMEM-F12 Hazırlanması.....                                                    | 47 |
| 3.3. İnsan Göbek Kordonu Veni Hücrelerinin(HUVEC) Kullanıma Hazırlanması.....      | 48 |
| 3.4. Hücrelerin Pasajlanması.....                                                  | 48 |
| 3.5. Hücre Sayımı.....                                                             | 48 |
| 3.6. Deney Düzenekinin Hazırlanması.....                                           | 48 |
| 3.7. Hücrelerin Fiksasyonu.....                                                    | 49 |
| 3.8. Hücrelerin Geçirimli Elektron Mikroskobu Görüntülemesi İçin Hazırlanması..... | 49 |
| 3.9. Hücrelerin İmmünohistokimyasal Değerlendirme İçin Hazırlanması.....           | 50 |
| 4. BULGULAR.....                                                                   | 52 |
| 5. TARTIŞMA.....                                                                   | 54 |
| KAYNAKLAR.....                                                                     | 64 |
| HAM VERİLER.....                                                                   | 79 |
| FORMLAR.....                                                                       | 80 |
| ETİK KURUL KARARI.....                                                             | 81 |
| PATENT HAKKI İZNİ.....                                                             | 83 |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI..... | 84 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                   | 85 |



## TABLÖLAR LİSTESİ

Şekil tablosu ögesi bulunamadı.



## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2-1 Temel anlamda doku mühendisliği hastadan biyopsiyle elde edilen hücrelerin monolayer hücre kültürü koşullarında çoğaltılması, üç boyutlu bir iskele üzerinde kültüre edilmesiyle oluşan greftin defektin kapatılması için kullanılmasıdır.....                                                                                                                                                                                                                          | 4  |
| Şekil 2-2 Diş ve çevre dokulardan elde edilen kök hücreler(Zavan and Bressan 2016).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 22 |
| Şekil 2-3 (A)Kemiğin hücresel yapısı. (B)Gelişmekte olan kemiğin hücresel yapısının mikroskopik görünümü. Ob:Osteoblast, Oc:Osteosit, M:Mezenkim, Os:Osteoid, B:Kemik matriksi(Junqueira, Carneiro et al. 2003).....                                                                                                                                                                                                                                                              | 33 |
| Şekil 2-4 Kompakt ve süngerimsi kemik(Junqueira, Carneiro et al. 2003).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 36 |
| Şekil 3-1 (A) Steril Kabin. (B) CO <sub>2</sub> inkübatörü.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 49 |
| Şekil 3-2 (A)Dişin kırılması (B)Dental pulpa dokusu (C)25cm <sup>3</sup> flask içerisinde pulpa dokusu (D) CO <sub>2</sub> inkübatörü içerisinde dental flasklar (E) 24 saatlik çalışma grubu.....                                                                                                                                                                                                                                                                                | 49 |
| Şekil 3-3 Hücre sayımı sırasında kullanılan kare sistemi.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 50 |
| Şekil 3-4 Yumurta akı içerisindeki hücrelerin elektron mikroskobuna hazırlanması.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 53 |
| Şekil 3-5 (A) Polimerizasyonu tamamlanmış ve kesilmiş 3T3 hücre grubu elektron mikroskobu kesitleri. (B) Polimerizasyonu tamamlanmış ve kesilmiş dental pulpa hücre grubu elektron mikroskobu kesitleri. (C) Elektron mikroskobu.....                                                                                                                                                                                                                                             | 53 |
| Şekil 3-6 (A) CD31 antikoru. (B) P-selektin antikoru. (C) RUNX2 antikoru. (D) Blok solüsyonu, Sekonder antikor, Streptavidin Peroksidaz. (E) Sekonder antikor. (F) AEC Kromojen. (G)Su bazlı kapatıcı. (H) ışık mikroskobu için hazırlanmış lamalar.....                                                                                                                                                                                                                          | 54 |
| Şekil 4-1 1. Haftada hücrelerin ışık mikroskobu fotoğrafları A)3T3 hücrelerinin kompozit materyal çevresinde kümелendiği görülmektedir. B) Kompozit materyalin yakın çevresindeki ve temas halindeki pulpa hücrelerinin zemine tutunarak çoğaldığı görülmektedir.....                                                                                                                                                                                                             | 55 |
| Şekil 4-2 CD31 ile boyanmış pulpa hücrelerinin ışık mikroskobu fotoğrafları. A) 24 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; B) 48 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; C) 72 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; ; D) 96 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; E) 96 saat inkübasyon grubunda bölgesel ve hafif boyanma gösteren hücrelerin bulunduğu görülmektedir. F) 1 hafta süreli inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı görülmektedir..... | 56 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4-3 P-selektin ile boyanmış pulpa hücrelerinin ışık mikroskobu fotoğrafları. A)24 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; B)48 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; C)72 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı D)96 saat inkübasyon grubunda yaygın boyanma gösteren hücrelerin bulunduğu görülmektedir. E)1 hafta inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı görülmektedir.....                                       | 56 |
| Şekil 4-4 Runx2 ile boyanmış pulpa hücrelerinin ışık mikroskobu fotoğrafları. A)72 saat inkübasyon grubunda hücrelerde yaygın boyanma olduğu; B)96 saat inkübasyon grubunda hücrelerde yaygın boyanma olduğu; C)1 hafta inkübasyon grubunda hücrelerde yaygın boyanma olduğu görülmektedir.....                                                                                                                                                 | 57 |
| Şekil 4-5 CD31 ile boyanmış gingiva hücrelerinin ışık mikroskobu fotoğrafları. A) 48 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; B)72 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; C)96 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; D)1 hafta inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı görülmüştür.....                                                                                                                                     | 57 |
| Şekil 4-6 P-selektin ile boyanmış gingiva hücrelerinin ışık mikroskobu fotoğrafları. (A)24 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; (B)48 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; (C)72 saat inkübasyon grubunda bölgesel ve hafif boyanma gösteren hücrelerin bulunduğu; D)96 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; (E)1 hafta inkübasyon grubunda bölgesel ve hafif boyanma gösteren hücrelerin bulunduğu görülmüştür..... | 58 |
| Şekil 4-7 Runx2 ile boyanmış gingiva hücrelerinin ışık mikroskobu fotoğrafları. A)72 saat inkübasyon grubunda hücrelerde yaygın boyanma olduğu; B)96 saat inkübasyon grubunda hücrelerde yaygın boyanma olduğu; C)1 hafta inkübasyon grubunda hücrelerde yaygın boyanma olduğu görülmektedir.....                                                                                                                                               | 58 |
| Şekil 4-8 Kontrol grubu fotoğrafları. A) 48 saat HUVEC inkübasyon grubunda p-selektin antikoru ile yaygın boyanmanın olduğu; B) 24 saat 3T3 inkübasyon grubunda CD31 antikoruyla boyanmanın olmadığı; C)72 saat 3T3 p-selektin antikoruyla boyanmanın olmadığı; D) 72 saat 3T3 inkübasyon grubunda Runx2 antikoruyla boyanmanın olmadığı görülmüştür.....                                                                                       | 59 |

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AEC: 3-Amino-9-Ethylcarbazole  
ALP: Alkalen Fosfataz  
BMP: Kemik Morfojenik Proteini  
DFPC: Dental Folikül Kaynaklı Kök Hücreler  
DPSC: Dental Pulpa Kaynaklı Kök Hücreler  
ECM: Ekstrasellüler matriks  
EM: Elektromanyetik  
FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü  
GDF: Büyüme ve Farklılaşma Faktörü  
GMSC: Gingival Mezenkimal Kök Hücreler  
HA: Hidroksiapatit  
HUVEC: İnsan Göbek Kordonu Ven Endotelyal Hücresi  
IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü  
IL: İnterlökin  
KDM: Kemik Doku Mühendisliği  
MSC: Mzenkimal Kök Hücreler  
MTA: Mineral Trioksit Agregat  
NDP-SC: Natal Dental Pulpa Kök Hücreleri  
PCL: Poli( $\epsilon$ -Kaprolakton)  
PDGF: Platelet Kökenli Büyüme Faktörü  
PDLSC: Periodontal Ligament Kök Hücreleri  
PLA: Poli-Laktik Asit  
PLCL: Poli(laktik-ko-kaprolakton)  
PLGA: Poli(laktik-ko-glikolik asit)  
PRP: Plateletten Zengin Plazma  
RGD: Arginin-glisin-aspartik asit  
Runx2: Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2  
SCAP: Apikal Papilla Kök Hücreleri

SHED: Eksfoliye Süt Dişlerinden Elde Edilen Kök Hücreler ( ),

SSEA: Seviye Spesifik Embriyonik Antijen

TCP: Tri-Kalsiyum Fosfat

TGF: Dönüştürücü Büyüme Faktörü

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

qRT-PCR: Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu



## ÖZET

Ravalı, E.İ. (2020). Kompozit polimer greft üzerinde primer pulpa kaynaklı mezenkimal hücre farklılaşmasının TEM ve immunohistokimyasal yöntemlerle incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Anahtar Kelimeler: Doku mühendisliği, Dental pulpa, Neovaskülarizasyon, Pluripotent kök hücreler, Polimer kompozitler

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30713

Güncel rejeneratif tıp uygulamaları, kaybedilen dokuların geri kazanımı için çeşitli seçenekler sunmaktadır. Bu seçeneklerden biri olan doku mühendisliği çalışmaları, rezorbe olabilen bir doku iskelesi üzerinde laboratuvarında üretilen hücrelerin çoğaltılması, doğru hücre ve iskele seçimine dayanmaktadır. Doğru hücre ve iskele seçimi yapılmadığı durumlarda vaskülarizasyon problemleri ortaya çıkmaktadır, bu da kemik doku mühendisliğinin (KDM) en sık karşılaşılan sorunlarından biridir. Bu çalışmanın amacı kompozit greft materyali üzerinde kültüre edilen dental pulpa ve gingiva kaynaklı hücrelerin, kemik oluşumunun erken safhalarında mineralizasyon ve vaskülarizasyon mekanizmaları üzerindeki etkilerini değerlendirmektir. Kontrol grubu olarak *İnsan Göbek Kordonu Veni Endotel Hücreleri* (HUVEC) ve *fibroblast* (3T3) hücre grubu kullanılmıştır. Hücresel farklılaşmanın tespiti için standart in-vitro kültür koşullarında 24, 48, 72, 96 saat ve 1 haftada; CD31, p selektin ve Runx2 antikorları kullanılarak immünositokimyasal boyama ile değerlendirilmiştir. 72 saat dental pulpa hücreleri grubu geçirimli elektron mikroskobu ile incelenmiştir. İmmünositokimyasal boyama, kullanılan antikora özel kullanım kuralları esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Pulpa hücrelerinde yalnızca 96. saatte CD31+ boyanma görülürken, gingiva hücreleri boyanmamıştır. Yalnızca pulpa 96 saat ve gingiva 72 saat, 1 hafta gruplarında p selektin ile boyanma görülmüştür. Pulpa ve gingiva hücreleri 72, 96 saatler ve 1 haftada Runx2 ile boyanmıştır. Bulgularımız doğrultusunda, pulpa ve gingiva kaynaklı hücrelerin standart kültür koşullarında osteoblastik farklılaşma için uygun hücreler oldukları gözlemlenmiştir. Ayrıca gingiva hücrelerinin pulpa hücrelerine göre, endotelial farklılaşma potansiyelinin dikkat çekici olduğu görülmüştür. Sonuç olarak; doku mühendisliği uygulamalarında dental pulpa ve gingiva hücrelerin kullanılabileceği, hücrelerin çok yönlü farklılaşma potansiyellerinin daha farklı deney modelleri kullanılarak değerlendirilmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

## ABSTRACT

Ravali E.İ. (2020). Evaluation of primary pulp-derived mesenchymal cell differentiation on composite polymer graft by TEM and immunohistochemical methods. İstanbul University, İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, PhD Thesis. İstanbul.

**Key Words:** Tissue engineering, Dental pulp, Neovascularization, Pluripotent stem cells, Polymer composites

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 30713

Recently, regenerative medicine applications offer different alternatives for the recovery of lost tissues. Tissue engineering, as one of these options, is based on the reproduction of cells in the laboratory on the resistant tissue skeleton, with the correct selection of cells and scaffolds. Vascularization problems arise when the correct cell and scaffold selection is not made, which is one of the most common problems in bone tissue engineering. The aim of this study is to evaluate the effects of dental pulp and gingiva-derived cells cultured on composite graft material on mineralization and vascularization mechanisms in the early stages of bone formation. Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells (HUVEC) and the fibroblast (3T3) cell group were used as the control group. To observe cellular differentiation, under standard in-vitro culture conditions at 24, 48, 72, 96 hours and Week 1; CD31, p selectin and Runx2 antibodies was used by immunocytochemical staining. Dental pulp cells at 72 hour group was examined by transmission electron microscopy. Immunocytochemical staining was based on the instructions specific for the antibody used. While CD31 + staining was seen in pulp cells only at 96 hours, gingiva cells were not stained. P selectin staining was observed in the pulp cells at 96 hour and gingival cells at 72 hour, 1 week groups. Pulp and gingiva cells were stained with Runx2 at 72, 96 hours and 1 week. In line with our findings, it was observed that pulp and gingiva derived cells were suitable cells for osteoblastic differentiation under standard culture conditions. In addition, it has been observed that gingival cells have more endothelial differentiation potential than pulp cells. As a result; It was concluded that dental pulp and gingival cells can be used in tissue engineering applications, and that the multi-differentiation potential of these cells should be evaluated using various additional experimental tools and models.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kaybedilen dokunun geri kazanılması başlarda tıbbi bilimlerin, sonrasında biyomedikal ve mühendislik disiplinlerinin bulunduğu multidisipliner bir alandır. Bu konu, ortalama yaşam süresinin artması ve biyoteknolojik olanakların çeşitlenmesiyle araştırmacıların ilgi alanı olmaya devam etmektedir. Doku kazanımı amacıyla kullanılan otojen greftler, allogreftler, alloplastlar gibi materyallerin avantajları olduğu kadar dezavantajları ve uygulama sınırlamaları bulunmaktadır. Bu sınırlamalar; otojen greft sahalarının sınırlı olması ve donör saha morbiditesi riski taşıması, allogreftlerin immün cevaba, alloplastların ise yabancı cisim reaksiyonuna neden olması ve bunların sonucunda ortaya çıkan entegrasyon sorunlarıdır.

Son yıllarda rejeneratif tıp uygulamaları, yeni kemik kazanımları konusunda farklı alternatifler sunmaktadır. Bu alternatiflerden biri olan doku mühendisliği çalışmaları, rezorbe olabilen bir doku iskelesi üzerinde laboratuvarında üretilen hücrelerin çoğaltılması yoluyla yapılmaktadır. Onlarca yıldır aktif bir araştırma alanı olmasına rağmen, klinik uygulamaları hala sınırlıdır. Pratik uygulamalarda karşılaşılan en büyük problemlerden biri, implantasyondan sonraki ilk aşamada iskelede neovaskülarizasyonun sağlanamamasıdır. İmplantasyon sonrası vaskülarizasyon hızı doku mühendisliğinde önemli bir kriter olduğundan, güncel doku mühendisliği çalışmaları, implantasyon sonrası konak vaskülarizasyonunun yeterli kaldığı, deri veya kıkırdak gibi ince veya avasküler dokularla sınırlıdır (Jain, Au et al. 2005). Kemik ve kas gibi daha büyük yapıların doku mühendisliği pratiğine girebilmesi neovaskülarizasyon sorunlarının çözümlerine bağlıdır.

Yetersiz vaskülarizasyon, iskelelerde hücrel entegrasyon bozukluklarına veya hücre ölümüne yol açabilir. Konağa implante edilen doku kültürüne, oksijen ve besinlerin ulaştırılması en yakın kılcal damardan 100-200 µm'lik bir mesafede difüzyonla sağlanır. Bu mesafenin artması dokunun entegrasyonunu engeller. Büyük boyutlu dokuların implantasyon sonrası canlılığı için dokunun vaskülarizasyonu şarttır, bu da ancak dokuya besinleri iletebilen bir kılcal ağı oluşturulması ile sağlanır. Erken dönemde implante edilen dokudaki hipoksik ortam, damar ağı oluşturacak olan prekürsör hücreleri tetikler. Sonuçta ortaya çıkan vasküler büyüme, günde birkaç mikrometre ile sınırlıdır ki bu da, birkaç milimetrelilik bir implantın tam

vaskülarizasyonu için gereken sürenin haftalarca olduğu anlamına gelir (Clark and Clark 1939). Bu süre zarfında yetersiz vaskülarizasyon; besin eksiklikleri, atık ürünlerin dokudan uzaklaştırılamaması ve dokuda hipoksiyle sonuçlanır. Ayrıca, implantın dış bölgelerinde, homojen olmayan hücre farklılaşması ve dolayısıyla eksik doku fonksiyonuna yol açabilecek besin ve oksijen yetersizlikleri görülecektir (Malda, Rouwkema et al. 2004).

Doku mühendisliğinde vaskülarizasyon stratejilerinin; İskeleler, hücreler ve stimulan sinyallerden oluşan üç değişkeni vardır. Bunlar arasında yeni biyo-aktif materyallerin üretilmesi, uygun hücrelerin iskele içerisine kontrollü dağılımı, sinyal moleküllerinin kullanımı ve mevcut cerrahi yöntemlerin etkinliğini arttırmayı amaçlayan klinik değişiklikler yer alır. Kemik doku mühendisliği (KDM) çalışmalarının klinik pratiğine girebilmesinin; hızlandırılmış osteogenez ve konak dokuya daha iyi uyum sağlayan vasküler yapı stratejilerinin birlikte kullanımıyla mümkün olacağı düşünülmektedir (Mercado-Pagán, Stahl et al. 2015). İskele stratejileri ise, dezavantajları en aza indirmeye ve iskelenin fiziksel özelliklerini optimize etmeye dayanır. Bu iskeleler üzerinde kullanılan hücreler immün reaksiyon riskini minimuma indirebilmek amacıyla otolog kaynaklardan seçilir. Kullanılan hücreler çoğunlukla farklılaşmamış, yaşam süresi uzun ve bulunduğu ortamın koşullarına göre farklılaşabilen kök hücrelerdir. Son zamanlarda diş ve çevre dokulardan elde edilen hücreler doku mühendisliği araştırmalarında sık kullanılan kök hücre kaynaklarından biri haline gelmiştir. Dental dokular ektomezenkimal kökeni sayesinde ektoderm ve mezoderm karakteristiği gösterdiğinden; odontoblast, sementoblast, osteoblast ve fibroblastlara farklılaşabildiği gibi endotelial ve epitelyal hücrelere de dönüşebilmektedir (Zavan and Bressan 2016). Dental kök hücreler, diş çevre dokularından ya da sağlıklı veya enflamasyonlu dişlerin çekimi ile kolayca elde edilebilir. Bu nedenle, dental dokuların kök hücre temini için kullanımı yaygınlaşmış, güncel kemik doku mühendisliği çalışmalarında ilgi odağı haline gelmiştir.

Bu çalışmanın amacı kompozit greft materyali üzerinde kültüre edilen dental pulpa ve gingiva kaynaklı hücrelerin, kemik oluşumunun erken safhalarında mineralizasyon ve vaskülarizasyon mekanizmaları üzerindeki etkilerini değerlendirmektir. Dental pulpa kaynaklı hücrelerin vasküler ve osteoblastik farklılaşma potansiyelleri, transplante edilebilir kemik dokusunun oluşumu üzerindeki etkileri, histolojik ve fiziksel karakteri, immünositokimyasal yöntemlerle ve geçirirli elektron mikroskopunda incelenmesi

planlanmıştır. Böylece dental kaynaklı hücrelerinin uygun doku iskelesiyle birlikte doku mühendisliği alanlarında kullanılabilirliğinin in-vitro koşullarda değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

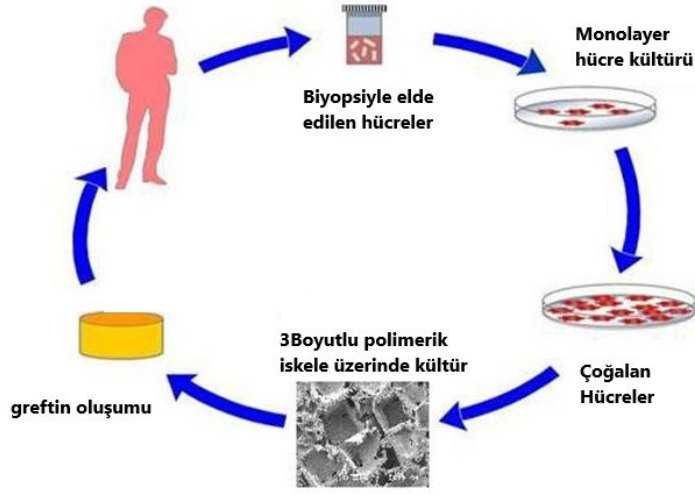


## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği terimi 1980’li yılların ortalarına dek, protetik cihaz veya biyomateryal kullanılan uygulamaları tanımlamak için kullanılmıştır. Bu tanım 1987 yılında, mühendislik prensipleri ve metotlarının yaşam bilimlerine uygulanması, yapı-fonksiyon ilişki mekanizmasının sağlıklı ve patolojik memeli dokularında anlaşılması ve bu dokuları korumak ve iyileştirmek amacıyla geliştirilen modelleri tanımlamak için kullanılmaya başlanmıştır. Doku mühendisliği alanında yapılan ilk çalışmalar doku ve hücre kültürü üzerine kurulmuştur. Ljunggren ve Jolly, hücreleri ilk defa vücut dışında laboratuvar şartlarında üretmiş, Harrison bu ortamda ilk defa hücresel büyümeyi gözlemlemiştir (Ljunggren 1898, Harrison 1910). Bu çalışmalardan beri; hücre biyolojisi ve in-vitro hücre kültürü klasik doku mühendisliği uygulamalarının ana bileşeni olmuştur (Meyer, Meyer et al. 2009). Green 1970’li yıllarda kondrosit hücre grubuyla, kemik iskelesini birlikte kullanarak kıkırdak doku üretimini incelediği bir dizi çalışma yapmıştır (Sokoloff, Malemud et al. 1970, Green Jr and Research 1971, Green Jr, Ferguson et al. 1975). Bu çalışmalarla yeni kıkırdak doku üretilmemiş olsa da, iskele-hücre yaklaşımı doku mühendisliği kavramının temellerini atmıştır (Meyer, Meyer et al. 2009). Vacanti ve arkadaşlarının doku mühendisliği uygulamalarını tanımladığı 1993 yılında yayınlanan makale, bu alanda yeni bir biyomedikal disiplinin tanıtılmasını sağlamış, daha sonra bu alanda yapılan çalışmalar hızla artış göstermiştir (Vacanti, Kim et al. 1993). Laurencin 1999 yılında doku mühendisliği uygulamalarını “tek başına veya kombine halde biyomalzemeler, hücreler ve faktörler kullanarak canlı dokuların onarımı veya yenilenmesine yönelik biyolojik, kimyasal ve mühendislik prensiplerinin uygulanması” olarak tanımlamıştır (Laurencin, Ambrosio et al. 1999) (O’Keefe and Mao 2011). BBC’de, doku mühendisliği çalışmalarıyla kıkırdak üretiminin mümkün olduğunu gösterdikleri ünlü “fare üzerinde geliştirilen kulağın” yayınlanmasıyla doku mühendisliğine gösterilen toplumsal ilgi artmıştır (Meyer, Meyer et al. 2009).

## Doku mühendisliğinin temel prensipleri



**Şekil 2-1 Temel anlamda doku mühendisliği hastadan biyopsiyle elde edilen hücrelerin monolayer hücre kültürü koşullarında çoğaltılması, üç boyutlu bir iskele üzerinde kültüre edilmesiyle oluşan greftin defektin kapatılması için kullanılmasıdır.**

Kemik dokusu mühendisliği(KDM) ise, osteoprogenitör hücrelerin göçünü ve kullanımını içeren dinamik ve karmaşık bir işlemdir. Kemiğin yeniden şekillenmesiyle birlikte çoğalma, farklılaşma, matriks yapının oluşumlarını içerir (Ghanbari and Vakili-Ghartavol 2016). KDM dört ana bileşenden oluşur: 1) Ekstrasellüler matriksi (ECM) taklit eden biyouyumlu bir iskele, 2) Osteojenik özellikleri olan ve matriks içerisine yayılacak hücreler, 3) Hücrelerin istenilen fenotipe değişimini stimüle etmek için morfojenik sinyaller, 4) Büyüyen, gelişen dokunun beslenme ve metabolik artıkların uzaklaştırılması için gerekli vaskülarizasyon. İskele destekli kemik doku mühendisliği çalışmalarında iletimi gerekli sinyaller; osteojenik ve vaskülojenik faktörler, genetik olarak düzenlenmiş hücreler, proteinler ve ilaçlar gibi biyokimyasal faktörler aracılığıyla iletilir. Kemik doku mühendisliği çalışmalarının bileşenleri üç ana başlık altında incelenmektedir:

- İskele Biyomateriyalleri ve Klinik Kullanımları
- Hücre Kaynakları
- Biyokimyasal Faktörler-Biyomoleküller

### 2.1.1. İskele Biyomateryalleri ve Klinik Kullanımları

Kemik doku mühendisliğinde ilgili bölgede dokuyu taklit ederek çatı görevi gören ve istenilen hücrelerin taşınmasına yardımcı olan iskele (greft) materyallerine ihtiyaç duyulmaktadır. Klinik beklenti, oluşan yeni kemiğin çevre kemik dokusu ile yapısal olarak bütünleşmesi (entegrasyon) ve mekanik dayanıklılığıdır (Şimşek, Çakmak et al. 2004). Kemik greftlerinin iyileşme üzerindeki etkilerini anlamak için bazı kavramların açıklanması gereklidir. Bunlar:

**Osteointegrasyon:** Greftin arada fibröz doku oluşumuna yol açmayacak şekilde alıcı kemik yüzeyine kimyasal olarak tutunabilmesidir.

**Osteokondüksiyon:** Alıcı kemikten vasküler ve perivasküler yapıların grefte ilerlemesi için greftin çatı görevi üstlenerek yüzeyinde yeni kemik oluşumunu destekleyebilmesidir.

**Osteoindüksiyon:** Plüripotent hücrelerin çevre dokuda osteoblastik fenotipe farklılaşmalarını uyarabilmektir.

**Osteogenezis:** Yeni kemik dokusunun oluşabilmesi için öncelikle kemiği meydana getirebilecek yeterli sayıda osteojenik progenitor hücreler bulunmalıdır. Bu hücrelerin transplantasyon sonrası canlılıklarını korumaları ve nakledilen alanda yeni kemik oluşturabilmeleri osteogenezis olarak adlandırılır.

Greftler kaynağına göre de isimlendirilirler;

**Otogreft:** Canlıdan alınan greftin yine aynı canlının başka bir bölgesine nakledilmesidir.

Otolog ya da otojen greft olarak da isimlendirilirler.

**İzogreft:** Aynı türde ve genetik yapıda canlılar arasında yapılan doku naklidir.

**Allogreft:** Aynı türden fakat genetik olarak farklı iki birey arasında yapılan doku naklidir. Allojenik greft olarak da isimlendirilir.

**Xenogreft:** Farklı iki tür canlı arasında yapılan doku naklidir.

**Alloplastlar:** Sentetik olarak üretilen biyoyumlu materyallerdir.

Greftlere duyulan ihtiyacın ve kullanım alanlarının artmasıyla birlikte özelliklerinin geliştirmesi için yapılan çalışmalar da artmıştır. Doku uyumluluğu ve yüzey özellikleri gibi niteliklerin geliştirilebilmesi için uygun materyal arayışları sürmektedir. Doku mühendisliğinde kullanıma uygun materyallerin sahip olması beklenen özellikler:

- Hücrelerin adhezyonuna imkân vermesi,
- Hücrelerin büyüme ve gelişmesine imkân vermesi,
- Biyoyumluluğu,

- Biyo  z  n  r ve non-toksik olması,
- Hücre göçünü sağlayacak şekilde bağlantılı bir mikro gözenek a  ına sahip olması,
- Çözünürlük sürecinde mekanik özelliklerinin doku iyileşmesi tamamlanana dek bozulmaması,
- Talebe uygun ve ekonomik şekilde   retilmesi olarak tanımlanmaktadır.

Deneysel ve klinik çalışmalarda kullanıma girmiş temel dört çeşit materyal bulunmaktadır. Bunlar: Doğal organik materyaller, doğal inorganik materyaller, sentetik organik materyaller ve sentetik inorganik materyallerdir.

#### **2.1.1.1. Doğal Organik Materyaller**

Çeşitli canlılardan elde edilen ve doğada fazla miktarda bulunan protein, polisakkarit ve polinükleotid (DNA) yapıdaki biyomateryallerdir. Biyoyumlu, biyo  z  nebilir ve hücresel aktiviteleri bulunan; buna karşılık mekanik özellikleri sentetik polimerlere göre zayıf biyomateryallerdir (Zhu and Marchant 2011). Omugalıların doğal ekstrasellüler matrisi içeriğinde olan kollajen, hyalüronan ve bazı proteoglikanlar ve memeli olmayan canlılarda bulunan aljinat ve kitosan gibi materyaller iskele yapımında yaygın olarak kullanımı bulunan doğal organik materyallerdir.

#### **Kitosan**

Kabuklu deniz hayvanlarının kabuğunda bulunan kitinin kimyasal işlemden geçirilmesi sonucu elde edilir. Osteojenik hücrelerin kitosan yüzeyine tutunmasıyla kemik gelişimi uyarılabildi  inden kemik doku mühendisliği için yaygın olarak kullanılmaktadır (Uslu and Arbak 2010). Yapısal olarak doğal glikozaminoglikanlara benzer özelliklere sahiptir ve insan enzimleri tarafından bozunabilmektedir (Meyer, Meyer et al. 2009). Enjeksiyona uygun formları bulunmaktadır.

#### **Hyal  ronan**

Kıkırdak dokusu içerisinde bulunan bir glikozaminoglikan olan hyalüronan, geçtiğimiz yıllarda doku mühendisliği çalışmalarında sıkça kullanılmıştır. Aljinat ve kollajenle birlikte üretilen hidrojelere ise iskeletsel defekt sahalarında uygulanmaktadır (Meyer, Meyer et al. 2009).

## **Kollajen**

Bağ dokusu, kemik, kırık gibi dokularda bolca bulunan proteinlerdir. Ekstrasellüler matriksin ana bileşenlerindendir. Kemik ve kırık doku mühendisliğinde de iskele olarak kullanımı bulunmaktadır (Cen, Liu et al. 2008). Tip I kollajen genellikle kemik dokunun içeriğinde bulunurken, tip II kollajen ise kırık doku dokunun ekstrasellüler matriksini oluşturur. Kollajen içerikli iskelelerin özellikleri çeşitli kimyasal ve fiziksel faktörlerle değiştirilebildiğinden, iskele çalışmada beklenen sonuca göre modifiye edilebilmektedir (Meyer, Meyer et al. 2009).

## **Aljinat**

Doku mühendisliği çalışmalarında kullanımı yaygın olan materyallerden biri de aljinattır. Düşük toksik özellikleri bulunur ve jel formunda kullanıma elverişlidir (Meyer, Meyer et al. 2009).

### **2.1.1.2. Doğal İnorganik Materyaller**

Kemik ya da çeşitli mercan türlerinden elde edilen hidroksiapatit (HA) çalışmalarda en çok kullanılan doğal inorganik materyaldir. Elde edildiği yere göre inorganik yapısı değişim göstermektedir. Eser miktarda magnezyum, karbonat gibi iyonlar içerebilmektedir (Meyer, Meyer et al. 2009).

### **Hidroksiapatit (HA)**

Kemiğin yapısında da bulunduğu biyouyumluluğu oldukça iyidir ve biyoçözünürlüğü yüksektir. Vücut sert dokularına benzer kimyasal özellikleri sebebiyle birçok çalışmada kullanılmıştır (Chu, Ou et al. 2013). Kemik defekti onarımında kullanıldığı çalışmalarda yüksek oranda kemikleşme gösterdiği rapor edilmiştir. Piyasada sık kullanılan ürünler sığır kökenli hidroksiapatitlerdir.

### **2.1.1.3. Sentetik Organik Materyaller**

Kemik ve kırık doku mühendisliği uygulamalarında polihidroksiasitler, polilaktidler, poliglikolidler ve bunların kopolimerleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle poli-laktid-glikolid içerikli materyaller kemik ve kırık hücrelerinin tutunmasını ve proliferasyonuna izin verdiğinden literatürde kullanımı yaygındır (Meyer, Meyer et al. 2009). İstenilen sonuca göre özellikleri modifiye edilebilen materyallerdir.

### **Poli-Glikolik Asit (PGA)**

Doku içinde 90 günde rezorbe olabilen bir materyal olan PGA, tıp pratiğinde uzun yıllardır dikiş materyali olarak kullanılmaktadır. Doku mühendisliği uygulamalarında kitosan gibi polimerlerle birlikte kompozit iskele materyali olarak da kullanılmaktadır.

### **Poli-Laktik Asit (PLA)**

Vücutta da üretimi olan laktik asitten üretildiğinden dokuda hızlı bir şekilde rezorbe olabilen PLA, plastik üretim sanayisinde kullanımının yanı sıra, stent ve cerrahi dikiş üretiminde de kullanılmaktadır (İbrahim and Koçak 2012).

### **Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)**

Tek başına oda sıcaklığından yüksek camsı geçiş sıcaklığına ve fazla uzun bozulma hızına sahip olan polilaktit ve oda sıcaklığından düşük camsı geçiş sıcaklığına ve kısa bozulma süresine sahip poliglikolit polimerlerinin sentezlenmesiyle elde edilmiş bir kopolimerdir (Amini, Laurencin et al. 2012). İlaç üretimi ve çalışmalarında yaygın olarak kullanılan PLGA, doku uyumu ve kontrollü rezorbsiyonu dolayısıyla doku mühendisliği çalışmalarında önemli yer tutmaktadır.

### **Poli( $\epsilon$ -Kaprolakton) (PCL)**

Polikaprolakton (PCL), doku mühendisliği alanlarında yoğun olarak araştırılan birkaç polyesterden biridir. Doku mühendisliği uygulamaları için kontrollü ilaç salınımlarında taşıyıcı olarak ve rezorbe olabilen dikişlerin üretiminde kullanılmaktadır (Huang, Li et al. 2003). PCL iskele olarak görece toksik olmayan bir materyal olup; yeterli mekanik dayanıklılığa, biyouyumluluğa ve termal stabiliteye sahiptir. Yaklaşık -60°C'lik düşük camsı geçiş sıcaklığına sahiptir. Oda sıcaklığında kauçuk benzeri bir yoğunluğa sahip olan bu polimer yük taşımaya uygun iskelelerin yapımında kullanılabilir (Ciardelli, Chiono et al. 2005). PCL bu zamana dek kırıkta, kemik, deri, düz kas, kalp kapakçığı, sinir rejenerasyonu gibi doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmıştır (Ciardelli, Chiono et al. 2005, Williams, Adewunmi et al. 2005, Kalpan, Shalini et al. 2007). Bu uygulamalarda kullanım için film, sünger, ağ, lif ve hidrojel formlarında üretilmişlerdir. PCL kullanımındaki en büyük sınırlama, yavaş rezorbsiyon hızı, yüksek hidrofobik ve kristal yapısı olarak görülmektedir. Bunun sonucunda PCL; polisakkaritler, selüloz propionat, selüloz asetat bütirat, poli (laktik asit), poli (laktik-ko-glikolik asit) ve PEG gibi polimerlerle karıştırılarak kullanılmaya başlanmıştır (Huang, Li et al. 2003, Ciardelli, Chiono et al. 2005, Kalpan, Shalini et al. 2007)

### **Poli(laktik-ko-kaprolakton) (PLCL)**

Biyomedikal alanda kullanımı oldukça yaygın olan PCL ve PLA polimerlerinin sentezi sonucu elde edilir (Fernández, Etxeberria et al. 2012). Elastik ve mekanik yapısı nedeniyle doku mühendisliği alanlarında kullanıma uygundur.

İdeale yakın mekanik özelliklere ve biyouyumluluğuna rağmen hidrofobik yüzey özellikleri; hücre tutulumu ve proliferasyonu için yetersiz kalması ve biyofonksiyonel olmaması hücrel yanıtın kontrolünü etkilemektedir (Garkhal, Verma et al. 2007).

Materyalin hidrofilik özelliğini artırarak hücre adhezyonunu iyileştirmek için; fibronektin, laminin gibi adeziv özelliklere sahip ekstrasellüler matriks proteinleri ve bunların fonksiyonel peptitleri olan Arginin-Glisin-Aspartik asit (RGD) ve Tyr-Ile-Gly- Ser-Arg (YIGSR) iskele yüzeylerine kaplanmaktadır (Pompe, Keller et al. 2007).

#### **2.1.1.4. Sentetik İnorganik Materyaller**

Kalsiyum fosfat içerikli çeşitli bileşenler gibi doğal kemik remodeling mekanizmasını destekleyebilen sentetik inorganik materyaller kemik doku mühendisliği çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak; trikalsiyumfosfat, oktokalsiyumfosfat, magnezyum, çinko ve karbon içerikli kalsiyum fosfat bileşikler verilebilir. Karbon içerikli bileşenler pH stabilitesinin iyileştirilmesi ve magnezyum kristalleşmenin azaltılması için eklenmektedir (Meyer, Meyer et al. 2009).

#### **Tri-Kalsiyum Fosfat (TCP)**

Diş minesinin yapısında da bulunan ve vücutta hidroksiapatite dönüştürülebilen bir bileşiktir. Gelişmiş osteokondüktif özellikleri ve yetersiz osteoindüktif özellikleri bulunmaktadır. Porözitesi hücre geçişine engel olduğundan tanecikli halde daha çok kullanılır. Biyouyumluluğu yüksek olduğundan kemik rejenerasyon çalışmalarında en çok kullanılan malzemelerden biridir (Wu, Chen et al. 2006).

#### **2.1.1.5. Kompozit Malzemeler**

Doku mühendisliği alanında çeşitli materyaller kullanılmaktadır. Kompozit malzemeler, bu materyallerin dezavantajlarını minimuma indirmek ya da gidermek amacıyla bazı maddelerin kombinasyonlarıyla oluşturulan malzemelerdir. Kemik doku mühendisliği çalışmaları beş genel terapötik hedefe odaklanmaktadır: osteogenez, vaskülarizasyon, büyüme faktörleri, mekanik çevre ve osteokondüktif iskele (Jahan and Tabrizian 2016). Giannoudis ve arkadaşları, başarılı kemik rejenerasyonu için beş ana

elementin ideal olarak en az üçlü bir kombinasyonda incelenmesi gerektiğini belirtir (Giannoudis, Einhorn et al. 2007, Giannoudis, Einhorn et al. 2008). “Politerapi” olarak adlandırılan bu strateji genellikle uygun mekanik ortamın sağlandığı durumda anjiyogenezin gerçekleşeceği varsayımıyla osteojenik hücrelerin, büyüme faktörlerinin ve iskelelerin araştırılmasına odaklanmaktadır (Calori and Giannoudis 2011).

İskele üretmek için kullanılan malzemeler metal, seramik ve polimerler olarak sınıflanmaktadır (Davim 2013). Bu malzemeler kullanıma uygun malzemeler olmalarına rağmen, kendi başlarına biyolojik dokuları -özellikle kemik dokuyu- sınırlı ölçüde taklit edebilirler. Örneğin bir seramik, kemiğin inorganik bileşeninin yerine geçebilse de osteogenezin gerçekleşmesi için yeterli mikro ortamı yaratan kolajenden yoksun olduğundan organik yapısını taklit edemez. Bu sınırlamadan hareketle biyokompozit materyaller üretilmiştir. Kompozit biyomatemeryaller, taşıyıcı materyallerinin şekline göre gruplandırılabilir: liflerin matrikse dahil edildiği (lifli) ve partikül esaslı (Davim 2013). Bir iskelenin yapısı, hücresel fonksiyonları etkilemesi nedeniyle doku oluşumunu doğrudan etkiler. İskelenin yapısında kullanılan malzeme kadar, iskelenin geometrisi, makro ve mikro yapısı, fizikokimyasal özellikleri de seçim ve imalat işlemi sırasında dikkate alınır. Materyalin üretim aşamasında kullanılan gözeneklerin boyutları ve aralarındaki bağlantı, özellikle neovaskülarizasyonun beklendiği bir süreçte, besin ve oksijen dağılımı için önemlidir. Ayrıca gözenek boyutları hangi moleküllerin materyal içinde hareketli olacağının da belirleyicisidir. Yüzey-hacim oranı yüzeye tutunabilen hücrelerin sayısını belirleyen önemli bir faktördür (Jahan and Tabrizian 2016). Materyalin sıkıştırılma oranı bir diğer deyişle *elastisite* ya da *Young modülü* olarak da tanımlanmaktadır. Her polimerin kendine özgü bir *Young modülü* bulunmaktadır (Jahan and Tabrizian 2016). İskelelerdeki bozunma hızı, bu değişkenlere uygun oranda büyüyen doku ve hücrelerle eşleştirilir (Hutmacher 2000). Hücresel yanıt bir iskele tasarımında dikkate alınan en önemli faktörlerden biridir. Element yapısı, *Van der Waals* bağlarının yapısını etkileyerek, yüzeyin ıslanabilirliğini, topografyasını ve bu yolla hücresel tutunma kapasitesini, protein adhezyonunu ve emilimini de belirlemektedir (Jahan and Tabrizian 2016). Tek bileşenli materyallerin sertlik, yüzey pürüzlülüğü veya biyolojik taklit gibi alanlarda yetersiz kaldığı noktalarda kompozit materyaller iskele-hücre arası bağlantıyı güçlendirmek amacıyla kullanılmaktadır.

İskele fabrikasyon teknikleri çeşitli sınıflara ayrılmaktadır: Bunlar PGA, PLA gibi yarı kristal liflerde sıkça kullanılan tekstil tipi üretimi sağlayan elektro-döndürme, bileşene katılan tuzların süzülmesi yoluyla yapılan partikül-süzdürme, katı-sıvı fazların ayrılması yoluyla yapılan faz ayrılması da bu metotlardan bazılarıdır. Son zamanlarda kullanımı yaygınlaşan polimer tozlarının belirli sekanslar halinde dökümünü sağlayan üç boyutlu yazıcıların kullanımı da artmıştır (Bongso and Richards 2004).

Kemik doku mühendisliğinde son çalışmalar, daha gelişmiş bir fonksiyonel yapı elde etmek ve uygun kompozit iskelenin oluşturulması için iki veya daha fazla biyomateryalin birleştirilerek elde edilen hibrit materyaller üzerine odaklanmıştır. Bu formlar ko-polimerler, polimer-polimer karışımları ve polimer-seramik kompozitler olarak adlandırılmaktadır. Bu materyaller kemik iskele kullanımları için optimal özelliklere sahip gelişmiş materyaller olarak kabul edilmektedir (Amini, Laurencin et al. 2012).

**Ko-polimerler:** iki veya daha fazla monomerin sentezlenmesiyle oluşur ve PLGA, PLGA-PCL gibi ko-polimerler bu sisteme örnektir (Amini, Laurencin et al. 2012).

**Polimer-polimer Kompozitler:** İki polimerin karışımıyla oluşturulurlar. Uygun moleküller arası bağlara ya da *Van der Waals* bağlarına sahip polimerlerin seçilmesiyle gelişmiş özelliklere sahip karışım sistemleri oluşturulabilir. PLGA polimerinin bozunma süresince asidik atık yan ürünler ürettiği ve uzun dönem bu ürünlere maruz kalmanın doku toksisitesi yoluyla nekroza yol açabileceği belirtilmiştir. PLGA ile kombine edilen polifosfazenler fosfor ve nitrojen atomlarına sahip inorganik bir polimer olup, çözünme sürecinde amonyum, alkol ve fosfat gibi vücutta çözünebilen ürünler ortaya çıkarmaktadır (Krogman, Weikel et al. 2009). Bu nedenle PLGA, çeşitli polifosfazenlerle bileşikleriyle karıştırılarak neredeyse normale yakın çözünme ürünleri ortaya çıkartan yeni tip materyaller üretilmektedir (Deng, Nair et al. 2008, Krogman, Weikel et al. 2009). Doğal polimerler olan ipek fibrin ile *kitosanın* karıştırılmasıyla elde edilen film üzerinde kemik iliği kaynaklı mezenkimal hücreler kültüre edilmiş, proliferasyon ve osteojenik-adipojenik farklılaşma özelliklerinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu iskelenin kemik, kırıldak, adipoz ve deri doku mühendisliği çalışmaları için uygun bir kaynak olduğu rapor edilmiştir (Li, He et al. 2018).

**Polimer-Seramik Kompozitler:** İnorganik kristallerin ve organik komponentlerin birleştirilmesiyle elde edilirler. Hidroksiapatit ile PLA, PGLA, jelatin,

kitosan, kollajen gibi polimerlerin birleşiminden oluşan birçok kompozit materyal üretilmiş, yapılan in-vivo ve in-vitro çalışmalar sayesinde gelişmiş kemik oluşumu gözlemlenmiştir (Rodrigues, Serricella et al. 2003, Zhang, Ni et al. 2003, Wei and Ma 2004, Kim, Kim et al. 2005, Kim, Park et al. 2006). Bu materyaller dokuyu taklit eden materyaller olarak tanımlanmakta ve simüle edilmiş vücut sıvısından kalsiyum fosfat oluşumunu, çökmesini ve birikmesini teşvik ettiği ve böylece kemik-matriks arayüz gücünün artmasına neden olduğu düşünülmektedir (Krogman, Weikel et al. 2009). Goldstein ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; 6 haftalık in-vitro kültürde PLLA iskelelere göre PLLA/HA kompozit iskelelerin, üstün osteokondüktif özellikleri olduğu ve osteoblastik hücre sağ kalım oranını, proliferasyonu, kemik sialoproteini ve osteokalsin gibi kemiğe özgü belirteçlerin salınımını stimüle edici özellikleri bulunduğu bildirilmiştir (Goldstein, Juarez et al. 2001). Haj ve arkadaşları, biyouyumlu ve ekstrasellüler matriksi taklit eden hibrit bir iskele elde etmek için, mercan kaynaklı hidroksiapatit-kalsiyum karbonat partiküller ve PCL nanofiberin elektro-döndürme düzenekleriyle sentezleyerek bu iskele üzerinde insan kaynaklı mezenkimal hücreleri kültüre etmişlerdir. Kemik doku ekstrasellüler matrikse benzerliği mikro ve nano ölçekte değerlendirilmiş, mezenkimal hücre proliferasyonunu indüklediği rapor edilmiştir (Haj, Haj Khalil et al. 2017).

#### **Sığır Kemik matriksi/poli(l-laktik-ko-ε-Kaprolakton)/jelatin kompozit**

Ticari adıyla SmartBone, (Industrie Biomediche Insubri SA (IBI), Mezzovico-Vira, Switzerland) kemik ksenogreftlerinin, mekanik özelliklerini geliştirmek için, rezorbe olabilen sentetik poli(L-laktid-co-ε-kaprolakton) ve doğal polisakkarit polimerlerle kaplanmasıyla doku mühendisliği çalışmalarında kullanmak için üretilmiştir (Pertici, Rossi et al. 2014).

Sığır kemik matriksinin içeriği ve morfolojisi insan kemiğine benzer, büyük oranda kalsiyum hidroksiapatitten oluşmaktadır. Gözenek yapısı insan kemik morfolojisine yakındır. Rijit ve düşük elastisitesi olduğundan kolaylıkla kırılır. Sterilizasyon süreci doğal porozitesini genişleterek bozmakta ve hücre adhezyonunu olumsuz etkilemektedir. Sığır kaynaklı kemik grefti polimerlerle kaplanarak *elastik modülusu* güçlendirilmiş, kırılabilirliği azaltılmış, porlar insan kemik morfolojisine benzer şekilde küçültülmüştür. Son olarak hayvansal kaynaklı RGD içeren kollajen fragmanları ile -hücre canlılığını, hidrofilik özellikleri ve dolayısıyla biyouyumluluğu ve osteoentegrasyonu arttırmak için- kaplanmıştır (Jeong, Lee et al. 2008, Pertici, Carinci

et al. 2015). Polimer kaplanmış mineral iskele ayrıntılı olarak incelenmiş ve iyi adhezyon özellikleri kanıtlanmıştır (Pertici, Rossi et al. 2014).

Sığır Kemik matriksi/poli(l-laktik-ko-ε-Kaprolakton)/jelatin kompozit kemik grefti; İmplantasyondan sonra daha iyi osteoentegrasyon sağlayan, sağlıklı iliak kemik benzeri %27 porözite oranına sahip, rijit standart mikro yapıya sahiptir (Pertici, Rossi et al. 2014). Mayer ve arkadaşları, in-vitro ortamda mezenkimal hücreleri tek katlı greftsiz kontrol, ksenogreft ve biyo-aktif greft (SmartBone, Industrie Biomediche Insubri SA (IBI), Mezzovico-Vira, İsviçre) üzerinde kültüründe 2,24,48 saat süreyle gözlemlemiş ardından da sıçan diş çekim soketlerinde 8 hafta süreyle bekletmişlerdir. Bu çalışmaya göre; in-vitro ortamda 2. saatte biyo-aktif greft grubunda metabolik aktivitenin arttığı görülürken, ksenogreft grubunda bir değişiklik görülmemiştir. Metabolik aktivite ve hücre canlılığında 20 ve 48 saatin sonunda ksenogreft grubunda azalma görülmüş ancak biyo-aktif kemikte bir değişiklik gözlenmemiştir. Sonuç olarak biyo-aktif greft grubunda diğer gruplara göre artan proliferasyon ve canlılık oranları gözlenmiştir (Mayer, Ginesin et al. 2018). Hibrit greft materyalinin istenilen formda ve özelliklerde üç boyutlu bilgisayar destekli üretim teknolojileriyle üretilmektedir. Bunlar; zigomatik rekonstrüksiyon, tümör cerrahisi sonrası sfenoid kemiğin rekonstrüksiyonu gibi cerrahilerde kullanılmıştır (Grecchi, Perale et al. 2015).

#### **2.1.1.6. Hidrojeller**

Hidrojeller uygun biyolojik ve fiziksel özellikleri sebebiyle doku mühendisliği alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ekstrasellüler olarak kullanımının yanı sıra, matriks topografisini ve gerekli biyoaktif ajanları taklit edebildiğinden doku rejenerasyonu üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinmektedir (Slaughter, Khurshid et al. 2009). Doğal kollajen-jelatin hidrojellerden, sentetik poli(etilen glikol), poli(vinil alkol) içerikli hidrojel sistemler gibi birçok kullanım formu literatüre girmiştir (Slaughter, Khurshid et al. 2009).

Son zamanlarda literatürde, enjekte edildikten sonra doku sıvıları yardımıyla defektin şeklini alan, tamamen biyolojik, biyouyumlu, biyo-çözünabilir özelliklere sahip RAD16-I (PuraMatrix™, Cambridge, MA) benzeri kendiliğinden birleşen peptit sistemlerinin kullanımları da görülmektedir (Kyle, Aggeli et al. 2010).

#### **İskele Üretim Teknikleri**

Kemik dokusunun mekanik özellikleri dokunun yeri ve fonksiyonu gibi birçok faktörden etkilenir. Kaybedilen doku geri kazanılması için üretilen materyaller, defekt bölgesinin mekanik gereksinimleri dikkate alınarak üretilmelidir. İskelenin içeriği mekanik özelliklerini büyük oranda etkilemektedir. Hidroksiapatit ve kalsiyum fosfat gibi yoğun seramikler insan kemik dokusuna benzer bir elastik uyaran ve sıkıştırma gücüne sahip olmasının yanı sıra kırılğan ve uzun çözünme süresine sahiptir (Rezwan, Chen et al. 2006). Öte yandan biyo-çözünebilir polimer iskeleler insan süngerimsi kemiği benzeri mekanik özellikler ve ayarlanabilir çözünme süresine sahiptir. Bu nedenle üretilen polimer-seramik kompozit iskelelerde iskele özellikleri -hacmi, morfolojisi ve inorganik partikül fazının polimer matrisindeki düzenini etkin bir şekilde kontrol ederek- konak dokunun belirli mekanik ve fizyolojik ihtiyaçlarına göre ayarlanabilir (Amini, Laurencin et al. 2012). Kullanılan iskele materyallerinin fiziksel özellikleri kök hücrelerin farklılaşma mekanizmalarını da etkilemektedir (O'brien 2011). Örneğin; mezenkimal kök hücrelerin (MSC), elastikiyeti kas dokusuna benzeyen sıkıştırılmış jel iskeleler üzerinde kültüre edildiğinde miyojenik yönde farklılaşarak kas dokusu benzeri dokulara dönüştüğü, rijit jeller üzerinde kültüre edildiğinde ise, osteojenik yönde farklılaşarak prekalsifiye bir doku oluşturduğu bildirilmiştir (Engler, Sen et al. 2006).

Son zamanlarda, doku içinde rezorbe olabilen metaller yeni nesil biyomalzemeler olarak kullanıma girmiştir. Yeterli mekanik özellikleri sayesinde, kortikal kemik benzeri mekanik özelliklere sahip iskeleler yapmak için güçlü bir seçenek olabilirler. Özellikle, magnezyum, kortikal kemiğe benzer yoğunluk ve mekanik dirence sahip olduğu için dikkat çekmektedir (Witte 2010). Kemiklerde eser miktarda bulunan magnezyumun, önemli bir dezavantajı, kontrolsüz çözünmesidir. Bu sorun kısmen magnezyumun çinko ve alüminyum gibi diğer metallerle alaşım haline getirerek kontrol edilebilse de, kemik doku mühendisliğinde magnezyum bazlı iskele sistemlerinin geliştirilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Staiger, Pietak et al. 2006).

Mikro gözeneklilik, iskele malzemesinin osteokondüktif özelliklerinin ve sonuçta ortaya çıkan kemik dokusunun büyümesi ve vaskülarizasyonu için kritik bir unsurdur. İskele gözenek yapısı, doğru hücre büyümesi, hücre göçü, besin akışı, vaskülarizasyon, hücre büyümesi ve ekstrasellüler matriks üretimi için önemli bir değişkendir (Zeltinger, Sherwood et al. 2001, Logeart-Avramoglou, Anagnostou et al.

2005). Optimal porozite ve gözenek boyutu ile ilgili kesin bir bilgi bulunmamakla birlikte 200  $\mu$ m'den küçük gözenek boyutlarının osteoblastlarda sınırlı proliferasyon ve farklılaşmaya sebep olduğu, 300  $\mu$ m'den büyük gözenek boyutlarının tüm iskele boyunca düzenli kemikleşmeyi sağladığı gösterilmiştir. 300  $\mu$ m'den daha büyük gözenek yapısının mekanik dayanıklılığı azalttığı da bilinmektedir (Amini, Laurencin et al. 2012). Yüksek oranda gözenekli yapı iskeleleri üretmek için; gaz köpürme, dondurarak kurutma ve faz ayırma gibi çeşitli geleneksel yapı iskelesi imalat teknikleri ile kombinasyon halinde porojen süzme de kullanılmıştır (Schugens, Maquet et al. 1996, Hou, Grijpma et al. 2003, Kim, Ahn et al. 2007). Bununla birlikte, gözeneklilik ve ortalama gözenek boyutları arttıkça, mekanik dayanıklılık azalır; mekanik dayanıklılık ile gözeneklilik arasındaki dengenin belirlenmesi çok önemlidir (Amini, Laurencin et al. 2012).

İskeleler geçici olarak ekstrasellüler matriksi taklit eden, hücre yapışmasını ve üç boyutlu kemik dokusu oluşumunu yönlendiren materyallerdir. Doku içerisindeki kemik hücrelerinin nano proteinler ve minerallerle etkileşim halinde olduğu bilinmektedir. Materyalin gözenek boyutlarının nano boyutlara düşürülmesiyle yüzey alanında, yüzey sertliği ve alan-hacim oranında belirgin bir artış görülmekte kemik ekstrasellüler matriksinin ana bileşenlerinden olan nanometre boyundaki Tip-1 kollajen fibrilleri, hidroksiapatit kristalleri ve diğer yaşamsal moleküller arası etkileşimi de arttırmaktadır (Pertici, Rossi et al. 2014). Kemik doku mühendisliği uygulamalarında nano-topografinin osteoindüktivite ve osteointegrasyon üzerindeki etkisi literatürde gösterilmiştir. Yapılan çalışmalara göre osteoblastların hücre yapışma özellikleri, proliferasyon, alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi, Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (Runx2), osteokalsin ve kemik sialoproteini gibi odontoblastik farklılaşma belirteçleri nano-topografik özelliklere sahip materyallerde artmıştır (Ward and Webster 2006). Elektro-döndürme, moleküler kendiliğinden birleşme ve faz ayrılma teknikleriyle nano-topografik yüzey özelliklerine sahip materyaller üretilmektedir (Amini, Laurencin et al. 2012).

Daha iyi bir doku rejenerasyonu için kullanılan bir başka teknik de iskele içlerinde hücrelerin yapışması ve yaşaması için uygun alanlar oluşturulmasıdır. Bu da hücrelerin ya da iskelenin kontrollü olarak üretilmesiyle gerçekleştirilebilir (Shin, Jo et al. 2003). İskele, hücrelerden gerekli belirteçlerin serbestlenmesini sağlamak üzere üretilmiştir. İskele ayrıca mezenkimal kök hücrelerin yerleşmesi için uygun

kemokinlerin serbestlenmesini sağlamaktadır. Hücrelerin mobilizasyonunu etkileyen ana bileşenler henüz tam olarak tanımlanmamış olmasına rağmen, birkaç anahtar molekül öne çıkmaktadır. Schantz ve arkadaşları, sıçan modelinde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), stromal hücreden üretilmiş faktör-1 (SDF-1) ve kemik morfojenik proteini-6 (BMP-6) salınımı yapan polikaprolakton yapı iskeleleri içinde hücre göçü ve proliferasyonda artış bildirmişlerdir (Schantz, Chim et al. 2007). Ayrıca iskele içerisine, Arginin-Glisin-Aspartik asit (RGD) gibi çeşitli mimetik peptit sekanslarının dâhil edilmesi, defekt bölgesine çekilen hücrelere bağlanması için kullanılabilir. Ayrıca Garcia ve Reyes bu iskeleyi kullandığı in-vivo çalışmalarda, osteoblastların osteointegrasyon olumlu etkilerini göstermişlerdir (García and Reyes 2005).

Son zamanlarda kişiye özel tasarlanmış kemik greftleri üç boyutlu bilgisayar destekli tasarım ve üç boyutlu baskı teknikleriyle birlikte kullanıma girmiştir. Bu gelişmeler mikro ve nano mimariyle de birleştirilerek kemik benzeri hiyerarşik yapıya sahip iskeleler üretilmeye başlanmıştır (Amini, Laurencin et al. 2012). Bu teknik aynı zamanda metalik ya da polimerik materyallerle de kullanılabilir (Goldstein, Juarez et al. 2001).

Doku mühendisliği iskelelerinde üretim genellikle “baştan sona” denilen tekniklerle üretilmektedir. Bu üretim tekniği çeşitli şekillendirici alet ve mekanizmalarla üretilen iskeleleri tarif etmektedir. Drexler, 1981 yılında moleküler mühendislik sayesinde nano-üretim tekniklerini tanımlamıştır. Bu iskeleler modül denilen daha küçük bileşenlerin DNA yönetiminde kendi kendine birleşmesi ve kontrol altında birleştirilmesi yöntemleriyle oluşturulmaktadır (Drexler 1981). Modüller işlevlerine göre iskelelere eklenebilmektedir. Kendi kendine birleşme stratejileri, bulunduğu ortama uyum sağlayan organize dokuların üretimine imkân tanımaktadır. Üç boyutlu hibrit iskelelerin mimarisini kontrol edebilmek doğal ekstrasellüler matriksin daha iyi taklit edilmesini ve böylece doku mühendisliği için gelişmiş iskelelerin üretimini sağlamaktadır (Elbert 2011).

Klinik uygulamalar açısından kemik doku mühendisliği yöntemleri yüksek maliyetler ve yetersiz üretim yöntemleri nedeniyle altın standart olmasa da, son çalışmalar, klinik kullanımda kanıtlanmış doku mühendisliği yöntemlerinin uygulanması açısından heyecan verici yöntemler ortaya koymuştur (Amini, Laurencin et al. 2012).

### 2.1.2. Hücre Kaynakları

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan çeşitli hücrelerin kendine özgü avantaj ve dezavantajları vardır. Bu hücrelerin elde edildiği yöntemler arasında en sık en sık kullanılanı hastadan elde edilen ve immün cevabı minimum olan otolog hücrelerdir. Otolog hücrelerin elde edilmesi için sınırlı sayıda alan ve hücre tipi bulunmakta, bu işlem minimum da olsa donör saha morbiditesi yaratabilmektedir. Geriatrik hastalar ve patolojik dokulardan elde edilen hücreler uygulamalarda yetersiz kalabilmektedir (Heath 2000). Bu hücre gruplarına alternatif diğer bir grup ise sınırlı sayıda insan donörler ve ksenotransplantasyon için genetik olarak modifiye edilmiş hayvan donörlerden elde edilen hücrelerden oluşturmaktadır. Kullanılan yöntemlerin belirgin kısıtlamaları olması yanında virüs gibi enfeksiyöz ajanların bulaşma riski gibi nedenlerle ortaya çıkan etik, ahlaki ve sosyal tartışmalar bu alanın klinik pratiğinde karşımıza çıkan sorulardır (Lanza, Langer et al. 2011).

Doku mühendisliği çalışmalarında kullanıma girmiş hücre türleri arasında en sık kullanılan grup kök hücrelerdir. Kök hücreler, farklılaşmamış hücreler olup, kendini yenileme yeteneğine sahiptirler. Kaynaklandıkları dokuların özelleşmiş hücrelerine farklılaşabildikleri gibi özel biyolojik sinyallerle fenotipik olarak prekürsöründen farklı özel hücrelere de farklılaşabilirler. Kök hücreler için en iyi örnek kemik iliği kaynaklı özelleşmemiş kök hücrelerdir. Bu hücreler; antikor üretimi, enfeksiyona yanıt, gaz taşınması gibi özel işlevleri bulunan kan hücrelerine dönüşürler (Bongso and Lee 2005).

Kök hücre teriminin literatürde ilk kullanım alanı Ernst Haeckel'in 1868 yılındaki çalışmalarına dayanmaktadır. "Darwin'in evrim teorisini inceleyen Haeckel, filogenetik ağaçlar geliştirerek bütün çekirdekli organizmalara evrimleşen, ata tek hücreli yapıya 'Stammzelle' (stem cell) adını vermiştir (YÜKSEL,2012). 1887 yılında, Theodor Boveri ve Valentin Hacker ise hayvan embriyolarında germ hücrelerini tanımlamışlardır. 1892 yılında Valentin Hacker kök hücreleri, oositleri ve gonadları oluşturan hücreler olarak tanımlamıştır. Erken dönem kök hücre çalışmalarında yukarıda adı geçen hücrelerden "primordial germ hücreleri" olarak söz edilmiştir. Embriyolog Edmund Wilson 1896 yılında, Alman bilim insanlarının çalışmalarını incelemiş ve incelemelerini "Gelişim ve Kalıtımda Hücre" isimli kitabında yayınlarak dünya çapında kök hücre teriminin kullanımının temelini atmıştır. 1980'li yıllarda California Üniversitesi'nden Gail Martin

sıçan embriyolarından izole ettiği hücrelere ‘embriyonik kök hücre’ ismini vermiştir (Chang and Appasani 2006).

Kök hücrelerin tanımı için 5 faktör bulunmaktadır; (Ural 2006)

1-) Kök hücreler uzun süre boyunca bölünebilir ve kendini yenileyebilir. Bölünebilmeyi belirleyen faktörlerden birisi, kromozomların ucunda yer alan telomer adı verilen kısa DNA tekrar dizileridir.

2-) Kök hücreler kas, endotel, kemik gibi spesifik doku hücrelerine özelleşmemiş hücrelerdir ancak bu hücreler için kaynak görevi görebilirler.

3-) Kök hücreler, birden çok spesifik hücreye farklılaşma (diferansiasyon) özelliğine sahiptir.

4-) Kök hücreler, hasarlı sahaya nakledilerek dokunun işlevsel olarak yeniden yapımını sağlayabilirler.

5-) Kök hücreler, laboratuvar koşullarında dahi farklılaşma özelliklerini koruyabilirler (YÜKSEL 2012).

Farklılaşma özelliği bir hücrenin kökeni olan doku dışında dokulara dönüşebilme yeteneğidir. Örneğin kemik iliği kökenli kök hücreler, endotel, kas hücreleri, kalp kası ve hepatositlere farklılaşabilmektedir (Şahin, Saydam et al. 2005). Fetal ve embriyonik kök hücreler, farklılaşma evresindeyken çoğunlukla çoğalmayı bırakır, ancak erişkin kök hücrelerinde bu durum görülmeyebilir.

Köklülük kavramı kök hücreler ve diğer hücreler arasındaki farkı tanımlayan hücresel ve moleküler özelliklerdir. Kök hücrelere spesifik olarak bilinen bu özellikler, özgün gen sekansı veya translasyon sonrası bir dizi değişimlerdir. Bu özellikler kök hücrelerin farklılaşmadan özgün yapı ve işlevlerini korumasını sağlar (Can 2009).

### **Kök Hücrelerin Sınıflaması**

Kök hücrelerin tasnifinde temel olarak 2 çeşit sınıflama kullanılmaktadır. En sık kullanılan kök hücrenin köken aldığı dokuya dayanan sınıflamadır. İkinci sınıflama daha çok fonksiyonel olan ve kök hücrelerin potansiyel gelişimlerini temel alan sınıflamadır (Can 2008).

### **Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerine Göre Sınıflaması**

**Totipotent Kök Hücreler:** Totipotent kök hücre uygun maternal destek altında bir canlıyı yaratabilir. Bu hücreler embriyonik ve ekstraembriyonik dokulara dönüşebilir. Zigot en önemli ve ilk totipotent hücre olarak kabul edilir. Vücuttaki tüm

hücre ve dokulara farklılaşabilen hücre tipidir. Bu hücreler embriyonik ve embriyonik olmayan dokulara farklılaşabilirler (Can 2008).

**Pluripotent Kök Hücreler:** Pluripotent kök hücreler; ektoderm, mezoderm ve endoderme ait tüm hücrelere farklılaşabilir ancak totipotent hücrelerden farklı olarak embriyonik olmayan hücrelere farklılaşamazlar. Fetusun gonadal hücreleri pluripotent hücrelerdir (Can 2008).

**Multipotent Kök hücreler:** Farklılaşma yetenekleri kısıtlı olduğundan yalnızca kendi grubundaki hücre ve doku gruplarına farklılaşabilirler. Örnek olarak, hematopoetik hücrelerin sadece kan hücrelerine farklılaşması verilebilir (Can 2008).

**Unipotent Kök Hücreler:** Yalnızca bir hücre grubuna farklılaşabilen hücrelerdir. Kas dokusundaki uydu hücreler ve sinir hücreleri örnek olarak verilebilir (Can 2008).

### **Kök Hücrenin Kaynağı Olan Dokuya Göre Sınıflama**

Kök hücreler kaynaklandıkları dokuya göre embriyonik, erişkin, fetal ve umbilikal olarak 4 sınıfa ayrılmaktadır. Bu gruplar da kendi içinde alt gruplara ayrılmaktadır. Fetal ve erişkin kök hücrelerin embriyonik hücrelerin kalıntıları olduğunu ve yaralanma sürecinde bu kalıntıların görev yaptığı da teoriler arasındadır (Bongso and Lee 2005)

#### **2.1.2.1. Embriyonik Kök Hücreler**

Embriyo; blastula, gastrula ve nörola evrelerinden geçer. Zigot oluştuktan sonra, blastula evresinde, embriyonik ve embriyonik olmayan hücreler ortaya çıkar. Böylece iç hücre topluluğu ve trofoblastlar olmak üzere iki tip hücre oluşur. Embriyonik hücreler iç hücrelerden oluşurken, trofoblastlar plasenta ve koryonik membrana dönüşür. Embriyonal gelişimde hücreler aralarındaki kontak sayesinde iletişim kurar, koordine olur ve farklılaşır (Friel, Van Der Sar et al. 2005).

Embriyonik gelişim; primer, sekonder ve tersiyer olmak üzere 3 evrede şekillenir.

Primer indüksiyon; Gastrülasyon ve hücrelerin ektoderm, mezoderm ve endoderm olmak üzere 3 germ yaprağını oluşturduğu hareketi kapsar.

Sekonder indüksiyon; Germ tabakalarının etkileşimi sonucu periferik sinirler, beyin, ve spinal kordun olduğu nörolasyon aşamasını kapsar.

Tersiyer indüksiyon; Organogenezin tüm aşamalarını kapsar (Panno 2014).

Memeli canlılarda totipotent hücreler; Zigot, 2 hücre, 4 hücre, 8 hücre ve morula evrelerinde bulunur. Pluripotent hücreler embriyonik iç tabaka hücrelerinde ve 5-6 günlük blastositlerde bulunur (Bongso and Lee 2005).

İnsan embriyonik kök hücreleri pluripotent ve farklılaşmamış hücrelerin belirteçleri olan; CD9, CD24, Oktamer bağlayıcı protein (Oct-4), Nanog, ALP, LIN 28, Thy-1, Seviye Spesifik Embriyonik Antijen (SSEA)-3 ve 4 antijenleri eksprese ederler (Ural 2006).

#### **2.1.2.2. Fetal Kök Hücreler**

Karaciğer, böbrek, fetal kan, kemik iliği gibi birçok dokudan elde edilmesi mümkün olan multipotent hücrelerdir. Embriyonik kök hücrelere göre daha az etik tartışmaya, erişkin kök hücrelere göre daha fazla diferansiyasyon kapasitesine sahiptir. Kordon kanı hematopoetik kök hücreleri son 20 yıldır kullanılmaktadır. Parkinson tedavisinde kullanımı ile hastalığın tedavisinde önemli adımlar atılmıştır (O'Donoghue and Fisk 2004).

#### **2.1.2.3. Perinatal Kök Hücreler**

Kordon kanından elde edilen kök hücrelerdir. Kemik iliği kaynaklı kök hücrelere kıyasla daha düşük Graft Versus Host reaksiyonu göstermesinin sebebi bu hücreler yardımıyla İnterlökin(IL)-10 seviyesinin artması ve  $\beta$ -2 mikroglobulin düzeyinin azalmış olmasıdır.

Göbek kordonundaki mezenkimal hücreler de karaciğer hücreleri ve nöronlara dönüşebilen multipotent hücrelerdir. Bu nedenle “Warton Jeli” olarak isimlendirilip, sonrasında kullanılmak üzere depo edilmeye başlanmıştır ([YÜKSEL 2012](#)).

#### **2.1.2.4. Erişkin Kök Hücreler**

Erişkin kök hücreler, erişkin canlılarda kemik iliği, yağ dokusu, akciğer, testis, prostat, over, kalp, böbrek, meme, beyin, deri, karaciğer, göz, gastrointestinal sistem, pancreas gibi organlarda tespit edilmiştir. Yüksek telomeraz aktivitesine sahip olmasına rağmen embriyonik kök hücrelere göre daha az farklılaşma kapasitesine sahiptir ve sınırlı miktarda progenitör hücre oluşturabilmektedir. Sayıca çoğalabilir ve dokuya özel hücre tiplerine farklılaşabilirler (Ural 2006).

2007 yılında Takahashi ve ark. erişkin kök hücrelerinden yeniden embriyonik kök hücre benzeri hücreler elde etti ve bu hücreleri “induced pluripotent stem cells (iPS)”

olarak isimlendirdi. Bu hücreler gen ekspresyonu, morfoloji ve telomeraz aktivitesi olarak embriyonik kök hücrelere benzediğinden kök hücre araştırmalarında alternatif oluşturmaktadır (Takahashi, Tanabe et al. 2007).

#### **2.1.2.5. Mezenkimal Kök Hücreler**

İnsan mezenkimal kök hücreleri (MSC) ilk olarak Friedenstein ve arkadaşları tarafından kemik iliğinde fibroblast prekürsörlerinin görülmesiyle tanımlanmıştır (Friedenstein, Chailakhjan et al. 1970). Stroma kökenli bu hücreler, erişkin bağ dokusunun temelini oluşturan hücrelerdir. Kemik iliği, iskelet ve kalp kası, diş ve çevre dokuları, karaciğer, testis, overler, deri, beyin, kan, akciğer gibi vücudun çeşitli dokularından izole edilmişlerdir. Uygun koşullar sağlandığında osteojenik, kondrojenik, adipojenik ve nörojenik hücrelere farklılaşabilmektedir (Pittenger, Mackay et al. 1999, Ding, Shyu et al. 2011). Yenidoğan aspiratlarındaki kök hücre oranı 1/ 10.000 iken, 80 yaşlarına doğru 1/2.000.000 oranına kadar azalır (Fibbe 2002). Uygulamada en sık olarak adipoz doku, kemik iliği, dişler ve çevre dokularından elde edilmektedir. Kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin küçük hayvanlara implante edilmesiyle kemik dokusu oluşturulması ilk olarak Friedenstein ve arkadaşları tarafından 1966 yılında yapılmıştır (Friedenstein, Piatetzky-Shapiro et al. 1966). Literatürde kemik iliği kaynaklı hücrelerin kullanımı yoğun olarak görülse de yağ dokusu ve diş dokusu kaynaklı kök hücreler kemik iliği kaynaklı olanlara oranla daha az invaziv işlemlerle elde edilmekte, hatta çoğunlukla medikal atık olarak sınıflandırılmış dokulardan izole edildiğinden son zamanlarda daha sık tercih edilmektedir. Rezai Rad ve arkadaşları, yanak, karın ve kalça yağ dokularından izole ettikleri mezenkimal kök hücreleri karşılaştırdıkları çalışmada, yanak yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin proliferasyon, sayıca katlanma süresi, osteojenik ve endotelial sinyallerin salınımı açısından diğer hücre gruplarından üstün olduğunu belirtmişlerdir (Rezai Rad, Bohloli et al. 2017). Mezenkimal kök hücre kaynaklarının in-vivo osteojenik potansiyellerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; adipoz doku, periost ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal hücreler domuz kalvaryal defekti modelinde incelenmiş ve aralarında anlamlı bir fark görülememiştir (Stockmann, Park et al. 2012). Bu hücrelerin embriyonik kök hücrelere göre sınırlı kapasiteleri vardır. Sayıları az olduğundan laboratuvar ortamında defalarca pasajlanarak çoğaltılabilmekte bu da telomeraz aktivitelerinin ve farklılaşma kapasitelerinin düşmesine sebep olmaktadır. Çoğunlukla kaynak dokuya farklılaşma eğilimindedir (İnan and Özbilgin

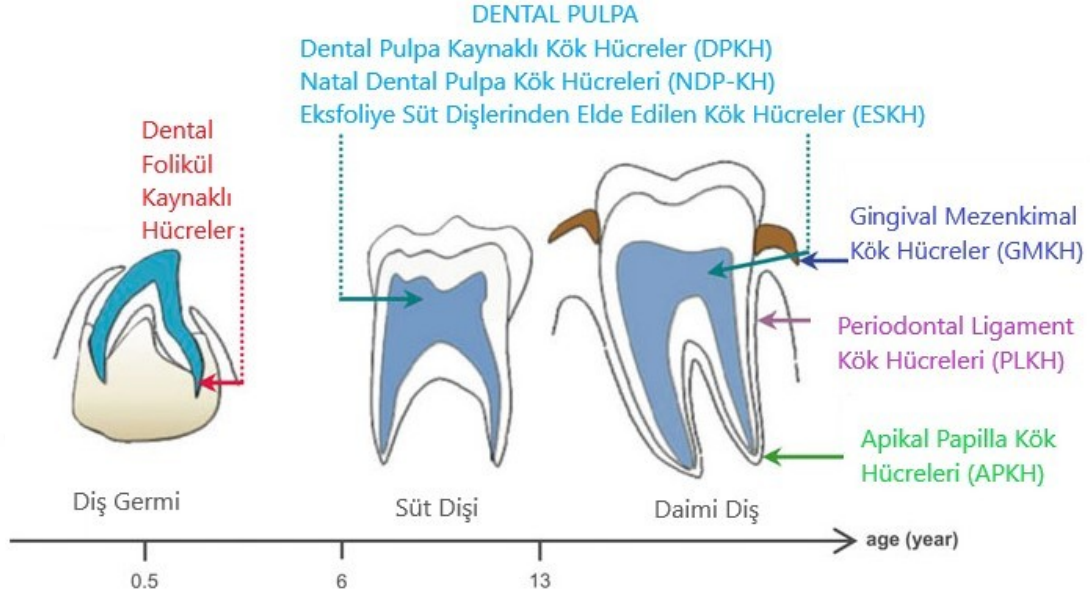
2009). Di Nicola ve arkadaşları mezenkimal kök hücrelerin, T-hücrelerinin proliferasyonunu baskılayarak immünomodülatör özellikler gösterdiğini bildirmiştir (Di Nicola, Carlo-Stella et al. 2002). Bu çalışma, mezenkimal hücrelerin immünosupresif özelliklerinin üzerinde yapılan çalışmaların artmasına neden olmuştur. Babunlarda yapılan bir in-vivo çalışmada mezenkimal kök hücrelerin immün cevabı geciktirdiği görülmüş ve böylece greft vs host hastalığının ve transplante edilen doku reddinin önlenmesinde yararlı olabileceğini düşündürmüştür (Bartholomew, Sturgeon et al. 2002). Ayrıca mezenkimal kök hücrelerin dendritik hücreler ve T hücreleri üzerindeki etkileri aşağıdaki gibi özetlenebilir. 1)Hücrelerin sitokin üretimini arttırmak, 2) Hücre olgunlaşması ve aktivasyonunu engellemek, 3)Lenfosit reaksiyonları içerisindeki CD4+, CD25+ sinyallerini regüle eden hücrelerin miktarını arttırmak yoluyla immün cevabı baskılamaktadır (Augello, Tasso et al. 2007, Gholamrezanezhad 2011)

### **Dental Kök Hücre Kaynakları**

Diş ve çevre dokular; embriyolojik olarak, memeli dişleri oral epitel ve nöral krista türevi mezenkim arasındaki karşılıklı etkileşimlerden gelişir. Bu dokulardan dentin, dental pulpa, sement, periodontal ligament ve alveolar kemik kranial nöral krista kökenlidir. Diş tabakadaki mineralize mine tabakası ektodermal kaynaklı tek bileşendir (Zavan and Bressan 2016).

Dental kök hücreler, ümit verici bir erişkin kök hücre kaynağı olarak kabul edilir, çünkü diş çekimi ile kolayca temin edilebilirler. Bunun yanı sıra dental kök hücreler enfekte dokulardan da izole edilebilir ve özellikleri sağlıklı dokulardan elde edilen dental kök hücrelerin özelliklerine benzerdir. Bu nedenle, dental kök hücrelerin en azından bir dereceye kadar kök hücre özelliklerini ve doku rejenerasyon potansiyelini koruyabildiğine ve bunları rejeneratif tıpta gelecekteki gelişmeler için önemli bir araç haline getireceğine inanılmaktadır (Zavan and Bressan 2016).

Kök hücre kaynağı olarak dişlerin bir başka avantajı, ektomezenkimal kökenleri nedeniyle, dental kök hücrelerin hem mezoderm hem de ektoderm özellikleri gösterebilmeleridir (Huang, Gronthos et al. 2009). Bu özellik mezenkimal (odontoblastlar, sementoblastlar, osteoblastlar ve fibroblastlar) ve epitel (ameloblastlar) kök hücrelerinin birleşmesi yeni bir dişin yenilenmesi veya üretilmesi için gereklidir. Günümüze dek yedi farklı dental kök ve progenitor hücre çeşidi izole edilmiştir. (Şekil 2-2) Bunlar: Kaynaklı Kök Hücreler (DPSC), Eksfoliyeye Süt Dişlerinden Elde Edilen Kök Hücreler (SHED), Dental Folikül Kaynaklı Kök Hücreler (DFPC), Periodontal



Ligament Kök Hücreleri (PDLSC), Apikal Papilla Kök Hücreleri (SCAP), Gingival Mezenkimal Kök Hücreler (GMSC), Natal Dental Pulpa Kök Hücreleri (NDP-SC) dir (Zavan and Bressan 2016). Bunlardan DPSC, ESSC, SCAP pulpa ile ilişkili kök hücreler olarak sınıflanırken, DFPC ve PDLSC periodonsiyum ile ilişkili kök hücrelerdendir (Zavan and Bressan 2016).

Başarılı bir hücre bazlı kemik onarımı için seçilen hücre popülasyonunun sahip olması gereken özellikler:

- Kemiği oluşturan hücelere farklılaşmak veya doku onarımını uyarmak,
- Kontrolsüz büyüme ve farklılaşmayı engellemek,
- Konakçı bağışıklık sistemi tarafından tolere edilebilmek,
- Neoanjiyogenez ve kan akışını destekleyebilmek,
- İskele malzemeleri ile biyokompleksler oluşturabilmek,
- Kriyoprezervasyon sonrası kök hücre özelliğini koruyabilmek ve
- Kolayca ve uygun maliyetle donörden elde edebilmek olarak tanımlanmıştır.

Dental kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerine yapılan çalışmalar birçok dental kaynaklı kök hücrenin yukarıda belirtilen kriterleri taşıdığını göstermektedir.

Osteojenik sinyal cevapları kemik iliği kaynaklı kök hücelere benzer, pluripotent hücelere göre minimum onkojenik potansiyel gösterirler. Kırık bölgelerinde iyi tolere edilmelerinin yanında bazı alt türlerin immünsüpresif özellikler gösterebildiği, bazı alt türlerin de neovaskülarizasyonu teşvik ettiği bildirilmiştir (Zavan and Bressan 2016).

### **Dental Folikül Kaynaklı Kök Hücreler**

Dental folikül, mine organını çevreleyen ektodermal bağ dokusudur ve erüpsiyondan önce gelişen diş germinin dış papillasıdır (Ten Cate 1997). Başlıca işlevi, osteoklastogenez ve osteogenez süreçlerinin düzenlenmesi yoluyla diş erüpsiyonunun koordinasyonudur (Wise, Frazier-Bowers et al. 2002). Diş folikülü, sementoblast, periodontal ligament ve osteoblast oluşturan progenitör hücreleri içerir (Zavan and Bressan 2016). Oluşmakta olan kök yakınındaki dental folikül hücrelerinin sementoblastlara, alveolar kemiğe yakın olanların ise osteoblastlara farklılaşabildiği, bu iki hücre grubunun arasında kalan alandaki hücrelerin ise ekstrasellüler matriks üreten fibroblastlara farklılaştığı düşünülmektedir (Zavan and Bressan 2016). İlk olarak Morsczeck ve arkadaşları tarafından, 2005 yılında gömük 3. molar dişlerin dental folikül bölgesinden izole edilmiştir. Literatürde bu hücreler “Dental folikül prekürsör hücreleri (DFPCs)” olarak da tanımlanır ve nöral kristadan köken alan ektomezenkimal hücreleri içermektedir. Diş oluşumu için hayati bir rol oynamasının yanı sıra periodonsiyumun öncü hücrelerini de barındırır. Periodontal Ligament (PDL), osteoblast ve sementoblasta dönüşebilmekte, uygun koşullar altında kemik iliği kök hücreleri benzeri koloni oluşturma ve yapışabilme özelliği de bulunmaktadır (Morsczeck, Petersen et al. 2009).

### **Eksfoliyeye Süt Dişlerinden Elde Edilen Kök Hücreler**

Süt dişleri genel olarak çocuklarda 20 adet olup, 6 aydan sonra oluşur ve 6 ve 13 yaşları arasında yerini alttan gelen kalıcı dişlere bırakır. Kök hücreler süt dişlerin rezorpsiyonu sırasında kalan kuron içerisinde pulpa dokusundan izole edilmektedir. İlk olarak Mira ve arkadaşları tarafından 2003 yılında 7-8 yaş arasındaki çocukların süt dişlerinden izole edilmiştir (Zavan and Bressan 2016). Daha yakın zamanda izole edilmiş olmasına rağmen literatürde ilgi çeken ve yüksek farklılaşma potansiyelinden dolayı geniş bir çalışma imkânı sunan kök hücre kaynaklarıdır. Diş hekimliğinde süt dişi çekiminin rutin işlemlerden olması sebebiyle kolay ulaşılabilir. Ayrıca bu kaynağın doğrudan biyolojik atık olarak değerlendirilmesi çalışmanın etik tartışmalarını

azaltmaktadır. Eksfoliye süt dişi kaynaklı kök hücrelerin bu özellikleri son yıllarda bir “SHED Bank” fikrini doğurmuştur (Alipour, Adib et al. 2013).

### **Periodontal Ligament Kök Hücreleri**

İnsan vücudunun oldukça karmaşık bağ dokularından biri olan periodontal ligament; sementum ve alveoler kemik socketinin iç duvarı arasında bulunur. Periodontal ligament yalnızca dişlerin desteklenmesinde yer almaz; aynı zamanda dişlerin beslenmesi, homoeostaz ve hasarlı dokuların onarımında da rol oynar (Beertsen, McCulloch et al. 1997, Shimono, Ishikawa et al. 2003). Periodontal ligament sementoblast ve ostoblastlara farklılaşabilen heterojen hücre popülasyonlarından oluşur. Periodontal ligament hücreleri; kollajen lifleri, ekstrasellüler matriks proteinleri, alkalen fosfataz, osteokalsin, osteoklastogenez aktivatörü gibi alveolar kemik metabolizmasında yer alan birçok molekülün üretimini de sağlamaktadır (Gholamrezanezhad 2011). Wang ve arkadaşları periodontal ligamentin asimetrik olarak dağılmış kök hücreler içerdiği ve bu hücrelerin özelliklerinin elde edilen dokuya ve bölgeye göre değişebildiğini bildirmişlerdir. Alveolar kemik yüzeyine yakın bölgeden alınan hücrelerin, kök yüzeyinden alınan hücrelere oranla daha güçlü bir proliferasyon kapasitesinin bulunduğu ve alveolar kemik rejenerasyonunda daha aktif rol oynadığı bildirilmiştir (Zavan and Bressan 2016).

Periodontal ligament kök hücreleri Seo ve arkadaşları tarafından 2004 yılında diş çekimi sonrası periodontal ligamentten izole edilmiş ve 24 saat kültür sonrası dental pulpa kök hücrelerine benzer proliferasyon oranına sahip fibroblast benzeri hücreler olarak tanımlanmıştır (Seo, Miura et al. 2004).

### **Apikal Papilla Kök Hücreleri**

Apikal papilla kök hücreleri ilk olarak 2006 yılında Sonoyama ve arkadaşları tarafından, 18-20 yaşındaki hastaların 3. molar dişlerin apikal papillalarından izole edilmiştir (Sonoyama, Liu et al. 2006). Apikal papilla, gelişmekte olan kalıcı dişin apikalinde bulunan ve sonunda olgun dişin pulpa dokusu haline gelen yumuşak dokudur (Linde and Goldberg 1993). Gelişimini tamamlamamış üçüncü molar dişlerin, apikal papilla ve kök yüzeyinin nazikçe ayrılmasıyla elde edilir (Zavan and Bressan 2016). Sonoyama ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışma ise, apikal papillanın histolojik olarak pulpadan farklı görüldüğünü ve kendine özel mezenkimal kök hücreler içerdiğini göstermiştir (Sonoyama, Liu et al. 2008).

Yapılan in-vitro çalışmalar apikal papilla kök hücrelerinin, odontoblastik / osteoblastik, adipojenik, kondrojenik ve nöral farklılaşma yeteneği olduğunu bildirmişlerdir (Sonoyama, Liu et al. 2006, Sonoyama, Liu et al. 2008)

### **Dental Pulpa Kök Hücreleri**

Dental pulpa dişin merkezinde dentin, mine ve sement gibi sert dokularla çevrili yumuşak bir bağ dokusudur. Pulpa dokusu dört katmandan oluşur; en dıştaki dentin üreten odontoblast tabakası, bir alt katmanda hücreden yoksul kollajen lif tabakası, bunun altında hücreden zengin fibroblast ve farklılaşmamış mezenkimal hücrelerden oluşan tabaka, en ite ise kan damarları ve sinirlerin bulunduğu tabaka bulunur. Diş pulpasında kök hücrelerin varlığı 1985'te Yamamura tarafından bildirilmiş olsa da (Yamamura 1985), yetişkin insan diş pulpasından elde edilen kök hücreler ilk olarak Gronthos ve arkadaşları tarafından 2000 yılında tanımlanmıştır (Gronthos, Mankani et al. 2000, Zavan and Bressan 2016). Literatürde, dental pulpa kök hücrelerinin in-vitro şartlarda dentin mineralize matriksini oluşturan hücreler olan odontoblastlara dönüşebileceğini gösteren makaleler bulunmaktadır. Gronthos ve Mankani, dental pulpa hücreleri hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat iskele üzerine ekerek sağlıklı bir fareye transplante ederek, kan damarları ve odontoblastlar içeren kollajen matriks elde etmişlerdir (Gronthos, Mankani et al. 2000).

Dental pulpa hücreleri, sık uygulanan non-invaziv cerrahi girişimlerle erişkin insandan da elde edilebilir. İnsan nc molar dişlerinden elde edilen dental pulpa genellikle dentisyonda yer bulamadığından ve çekimi gerektiğinden çalışmalar için uygun bir kaynaktır. Alongi ve arkadaşları, enfekte pulpa dokusundan üretilen dental pulpa kök hücrelerinin, immün sistemi baskılanmış farelere transplante edildiğinde, sağlıklı DPSC'lere benzer dentin / pulpa benzeri bir yapı oluşturduğunu bildirmişlerdir (Alongi, Yamaza et al. 2010). Pulpektomiden sonra rutin olarak atılan iltihaplı pulpanın kök hücre kaynağı içeriyor olması umut verici bir sonuçtur.

Pulpanın izolasyonu için diş, mine-sement sınırından dental aletler yardımıyla ikiye ayrılır. Pulpa yavaşça segmentlerden çıkartılır ve kk parçalara ayrılır. Bu parçalardan dental pulpa kök hücreleri enzimatik sindirim (Gronthos, Mankani et al. 2000) ya da doku fragmanlarında kök hücrelerin büyütülmesi teknikleriyle elde edilir. Enzimatik sindirim Tip 1 kollajenaz enzimiyle hücre süspansiyonu elde edilmesine dayanır. Huang ve arkadaşları bu iki izolasyon yöntemini karşılaştırdıkları çalışmada, enzimatik sindirimle elde edilen hücrelerin diğer tekniğe göre daha yüksek

proliferasyon oranına sahip olduklarını bildirmişlerdir (Huang, Sonoyama et al. 2006). Hilken ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise aynı donörden alınan ve aynı şartlar altında saklanan ancak farklı tekniklerle üretilen hücreler arasında morfoloji, proliferasyon oranı, mezenkimal farklılaşma potansiyeli ve kök hücre belirteçlerinin salınımı açısından bir fark olmadığını bildirmişlerdir (Hilken, Gervois et al. 2013).

Yapılan çalışmalar, dental pulpa kök hücrelerinin uzun süre hayatta kalabileceğini ve birçok defa pasajlanabileceğini göstermektedir. Suchanek ve arkadaşları, dental pulpa kök hücrelerinin kemik iliği için tasarlanmış kültür ortamında 60 defa pasajlanabildiğini göstermişlerdir (Suchánek, Soukup et al. 2007). Laino ve arkadaşları ise, dental pulpa kök hücrelerinin substrat etkileşimini ve hücre-hücre iletişimini koruyarak, salgılanan ekstrasellüler matriksin merkez bölgesinde 80 pasaj gerçekleştirmişler, farklılaşma yeteneklerini kaybetmeden uzun süre boyunca dondurularak saklanabilirliğini göstermiştir (Laino, d'Aquino et al. 2005).

Dental pulpa kök hücrelerinin CD146, STRO-1, CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 ve CD166 belirteçlerine pozitif yanıt verdiği, CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR gibi hematopoetik belirteçlere ise negatif yanıt verdiği bilinmektedir (Huang, Gronthos et al. 2009). Ancak farklı medyum ve koşullarda CD34 pozitif yanıt verdiği bilinmektedir (Simmons and Torok-Storb 1991). Farklılaşmamış dental pulpa kök hücreleri aynı zamanda alkalen fosfataz, Tip-1 kollajen, osteonektin, osteopontin, osteokalsin ve kemik sialoproteini salınımı yapmaktadır. Bütün mezenkimal kök hücreler gibi dental mezenkimal kök hücreler de heterojen özellikler taşırlar ve sözü edilen belirteçlerin bu hücrelerin alt grupları tarafından serbestlenebileceği de bilinmelidir (Huang, Gronthos et al. 2009). Laino ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, 30-45 arası hastalardan elde edilen dental pulpa dokularında %10 oranında osteoblastlara dönüşebilen ve stromal kemik üreten dental pulpa kök hücrelerine rastlanmıştır, immün olarak baskılanmış farelere implante edildiğinde lamelli kemik elde edildiği gösterilmiştir. Bu hücrelerin aynı zamanda osteokalsin, Runx2 ekspresyonu, Tip-1 kollajen ve alkalen fosfataz salınımı gerçekleştirdiği belirtilmiştir (Laino, d'Aquino et al. 2005). Laino ve arkadaşları, insan dental pulpa kaynaklı kök hücrelerini in-vito şartlarda gözlemleyerek osteoblast farklılaşmasının yanında yüksek oranda vasküler endotelial büyüme faktörü ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü A salınımı yaptığını bildirmişlerdir. Kırk günlük kültür sonrası üç boyutlu süngerimsi kemik benzeri yapılar ve yeni damar yapılarının

oluştugu, aynı doku sıçan modeli üzerine implante edildiğinde ise vaskülarize kemik dokusu oluşturduğu rapor edilmiştir (Paino, La Noce et al. 2017).

Dental pulpa kök hücrelerinin tanımlanmış koşullar altında birkaç hücre soyuna farklılaşma yeteneği, yakın tarihli bir çalışmada da gösterilmiştir (Ferroni, Gardin et al. 2015). Sırasıyla nöronal, glial, endotelyal ve osteojenik faktörlerin eklendiği hiyalüronan bazlı bir yapı iskelesine ekilmiş ve diş pulpası benzeri bir dokunun in-vitro rekonstrüksiyonu için iyi bir strateji olduğu kanıtlanmıştır. Pulpa kök hücrelerinin bu özelliği (plastisitesi ve çok yönlülük kabiliyeti) hem ektodermal hem de mezenkimal bileşenlerden oluşması ile açıklanabilmektedir (Zavan and Bressan 2016).

### **Gingival Mezenkimal Kök Hücreler**

Gingiva; alveolar kemik, diş soketlerine bağlı mukozal bariyer olarak görev yapan ve oral mukozal immün cevaptan sorumlu dokudur (Zhang, Shi et al. 2009). Gingiva dört katmandan oluşmaktadır. Bu tabakalar en alttan yüzeye doğru bazal, spinöz, granüler ve keratinize olarak isimlendirilir. Kök hücreler genellikle -homojen dağılmış çok sayıda hücre ve ekstrasellüler matriks proteinleri içeren bir tabaka olan-spinöz tabakadan elde edilir (Zhang, Shi et al. 2009, Karamzadeh and Eslaminejad 2013). Gingivanın en belirgin karakteristik özelliklerinden biri hızlı yenilenme ve minimum skar dokusu ile yara iyileşmesi kapasitesi olarak kabul edilmektedir. Zhang ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada, rutin dental işlemler sırasında ortaya çıkan fazla dokuları kullanarak gingival mezenkimal kök hücreleri gingival dokudan izole etmişlerdir (Zhang, Shi et al. 2009). Böylece insan gingiva hücreleri dental kök hücrelere bir alternatif olarak literatüre girmiştir. Gingivanın kök hücre kaynağı olarak kullanılmasında birinci avantaj diş ve çevre dokularından kök hücre elde etmek için dişin kalıcı olarak zarar görmesine gerek kalmadan minimal invaziv işlemlerle büyük miktarlarda kök hücre sağlanabilmesidir (Zavan and Bressan 2016).

Gingival mezenkimal kök hücreler düzenli bir fibroblast benzeri morfolojiye sahip, plastisitesi ve adhezyon potansiyeli yüksek hücreler olarak tanımlanmıştır (Zhang, Shi et al. 2009). Bu hücrelerin kararlı fenotip sergilediği ve uzun süreli kültürlerde normal karyotip ve telomeraz aktivitesini koruduğu belirtilmiştir (Tomar, Srivastava et al. 2010).

GMKH'in yüzey belirteçlerinden CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, STRO-1, Oct-4 ve SSEA-4 antijenlerine pozitif yanıt verdiği öte yandan CD14, CD34,

CD45 ve HLA-DR gibi hematopoetik belirteçlerin salınımı yönünden de yetersiz kaldığı bilinmektedir (Zhang, Shi et al. 2009, Tomar, Srivastava et al. 2010).

Tek bir koloniden üretilmiş gingival mezenkimal kök hücrelerin in-vitro şartlarda bulunduğu ortamın özellikleri doğrultusunda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücrelere dönüşebildiği rapor edilmiştir. Ayrıca uygun kültür ve besiyeri uygulandığında endotelyal ve nöral farklılaşma gösterdikleri, endotelyal farklılaşma durumunda CD31 salınımı gerçekleştirdiği de görülmüştür (Zhang, Shi et al. 2009). Osteojenik potansiyelin incelendiği başka bir çalışmada gingival kaynaklı kök hücreler hidroksiapatit-trikalsiyumfosfat partiküllerinin üzerinde 24 saat süreyle inkübe edilmiş, osteojenik medyum içerisinde 10 gün bekletilmiş ve immün olarak baskılanmış farelere subkutan olarak implante edilmiştir. On hafta sonunda çıkartılan implantlarda yüksek oranda mineralize doku tespit edilmiştir (Tomar, Srivastava et al. 2010)

#### **Natal Dental Pulpa Kaynaklı Kök Hücreler**

Natal dişler; yenidoğanda oluşan, genellikle kök oluşumu içermeyen ve 2000-3000 doğumda bir görülen süt dişleridir. Karaöz ve arkadaşları tarafından, 2010 yılında, sağlıklı bir yenidoğandan alınan natal dişlerden izole edilmişlerdir (Karaöz, Doğan et al. 2010). Kurunun kırılmasının ardından ortaya çıkarılan pulpa, kollajenaz enzimi yardımıyla hücre süspansiyonu haline getirilmiştir. Kültür ortamında flaska yapışan bir miktar hücrenin fibroblast benzeri morfolojiye sahip olduğu bildirilmiştir. Natal dental pulpa kaynaklı kök hücrelerin, erişkin dental pulpa kaynaklı kök hücreler ve eksofoliyel süt dişlerinden elde edilen kök hücrelere göre daha yüksek bir proliferasyon potansiyeli olduğu bildirilmiştir (Zavan and Bressan 2016). Osteoblast, adiposit, kondroblast, miyoblast ve nöral-glial hücre benzeri hücrelere farklılaşabildiği in-vitro çalışmalarla kanıtlanmıştır.

#### **2.1.3. Biyokimyasal Faktörler – Biyomoleküller**

Biyomolekül ajanlarının bir iskele veya implant üzerinden kontrollü bir şekilde yayılımı ya da entegrasyonu sağlayarak kırık iyileşmesini in-vivo olarak eşzamanlı kurgulama stratejisi, kemik rejenerasyonunda terapötik amaçlı kullanılabilir (Chang, Huang et al. 2013). Bu strateji, iskele veya implantın elverişli özellikleri değişmeden, biyoaktif maddenin kırık bölgesine daha yüksek lokal konsantrasyonda iletilmesini (lokalize dağıtım) sağlar. İskelelere entegre edilen çözünebilir biyokimyasal moleküller arasında, kemik dokusu onarımındaki etkilerinden dolayı çok fazla dikkat çeken, Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF) $\beta$ , BMP, VEGF, insülin benzeri büyüme faktörü

(IGF) ve Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) gibi proteinler / büyüme faktörleri bulunur. Bu büyüme faktörleri, mezenkimal hücrelerin üretimi ve farklılaşması yoluyla; osteogenezi, kemik dokusu rejenerasyonunu ve ekstrasellüler matriks(ESM) oluşumunu kontrol ederler (Cao and Kuboyama 2010).

Diğer bir yaklaşım, hücre bağlayıcı peptitlerin kimyasal veya fiziksel düzenleme yoluyla biyomateryallere dahil edilmesidir. Hücre bağlayıcı peptidler, ekstrasellüler matriks ve protein zincirlerinin yanı sıra, hücre reseptörleri ile spesifik etkileşimler sağlayabilen kısa peptid dizilerini içerir (Shin, Jo et al. 2002, Shin, Jo et al. 2003). Bu uygulamalar için farklı özelliklere sahip çok sayıda sentetik polimer mevcuttur. Çözülmesi gereken önemli bir sorun, in vivo ortamda yabancı cisim reaksiyonlarına yol açan iskeleler ve onların yüzeyine tutunması beklenen hücreler arasındaki yetersiz etkileşimdir. Bu nedenle, hücre tanıma reseptörlerinin polimerik malzemelere bağlanması yoluyla hücreler ve sentetik substratlar arasındaki kontrollü etkileşim elde edilebilir (Hubbell 1995).

Pierschbacher ve Ruoslahti'nin 1984 yılında yaptığı çalışma, fibronektinin hücre adhezyon aktivitesinin büyük oranda Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptidine bağlı olduğunu göstermiştir (Pierschbacher and Ruoslahti 1984). Bu çalışmayı takiben, hücresel adhezyon sağlayan RGD bölgeleri, vitronektin, fibrinojen, von Willebrand faktörü, kollajen, laminin, osteopontin, tenasin ve kemik sialoproteininin yanı sıra membran proteinleri ve bakteriyel proteinler dahil olmak üzere birçok başka ESM proteininde tanımlanmıştır (Schaffner, Dard et al. 2003). Hücre adhezyonunu integrinler olarak adlandırılan RGD yapışma reseptörleriyle sağlanır (Ruoslahti 1991). RGD dizisi -hücre zarı adhezyon reseptörü tarafından tanındığından- hücre yapışması ve göçü sinyal dizisi olarak adlandırılmıştır. Şimdiye kadar, 24 integrinin yaklaşık yarısının ECM moleküllerine RGD vasıtasıyla bağlandığı gösterilmiştir:  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_6$ ,  $\alpha_v\beta_8$ ,  $\alpha_2\beta_1$  ve  $\alpha_4\beta_1$  (Anselme 2000, Schaffner, Dard et al. 2003). RGD peptitlerinin keşfinden bu yana, Ruoslahti ve Pierschbacher, hücre yapışma reseptörlerinin, farklı RGD içeren protein ligandlarına özgü olma yeteneğini açıklamak için iki mekanizma önermiştir (Ruoslahti and Pierschbacher 1987): Bir mekanizma, RGD dizisinin paylaşılan bir bağlanma bölgesi olarak kullanılması ve her ligand için benzersiz olan ikinci bölgenin spesifik adhezyon için kullanılması. Diğer bir mekanizma, ligandın spesifik RGD diziliminin adaptasyonuna bağlı olmasıdır. RGD dizisi etrafındaki diğer amino asitler, RGD'yi her ligand için doğru adaptasyona zorlar.

Bu mekanizma, RGD içeren peptidlerin  $\alpha_5\beta_1$  reseptörü ve fibronektin reseptörü tarafından tanındığını gösteren çalışmalara dayanarak daha olası görünmektedir (Lee, Qi et al. 2002, Cutler and García 2003, Niu, Wang et al. 2005)

Doku rejenerasyonu, hücreler ve büyüme faktörleri arasındaki ilişkinin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Büyüme faktörleri ve sinyal molekülleri hücre salınımı, hücre göçünü, doku oluşumunu ve morfogenezini kontrol eder. Kemik gelişimi ve iyileşmesi süresince çeşitli hücre tipleri ve sinyal molekülleri sürece dahil olur. Bu yüzden ortopedik araştırmacılar kemik iliği aspirat konsantrelerini ve trombositten zengin plazma ürünlerinin kullanılmasını önermişlerdir (Amini, Laurencin et al. 2012). Kemik iliği aspirat konsantreleri çoğunlukla iliak kemiklerden elde edilir ve osteojenik hücreler, osteokondüktif büyüme faktörleri, endotelial öncü hücreler, hematopoietik kök hücreler, trombositler, lenfositler ve granülositler gibi bileşenler içerirler. Lenfositler endotelial öncü hücrelerin göç ve proliferasyonunu uyarırken, endotelial öncü hücreler anjiogenezini uyarır, granülositler VEGF salınımını sağlar, hematopoietik kök hücreler büyüme faktörü salgılayan trombositlere, mezenkimal kök hücreler kemik ve kırıkta öncü hücrelere dönüşürler. Trombositler ise hücre salınımı ve büyüme faktörlerini kontrol ederler. Literatürde ilk örneklerine 1978 yılında rastlanmaya başlayan kemik iliği aspirat konsantreleri günümüzde de kırıkların ve kemik defektlerinin tedavisinde kullanılmaktadır (Salama, Weissman et al. 1978, Connolly, Guse et al. 1991, Neen, Noyes et al. 2006).

Trombositten zengin plazma (PRP) -bir kök hücre kaynağı olmamasına rağmen- içeriğindeki yoğun büyüme faktörleri sebebiyle, ekstrasellüler matriks sentezini, hücre farklılaşmasını, proliferasyonunu ve kemotaksisi uyarır. Bu nedenle kemik doku mühendisliği uygulamalarında ve kemik iyileşmesini stimüle etmek için kullanılabilir. PRP anjiogenez özelliklere sahip olmasının yanında, endotel hücrelerinin pre-osteojenik fenotipe dönüşümünü indükler. PRP konsantreleri içerisinde hazırlanmış ve donörden kaynaklanan farklılıklar nedeniyle farklı oranlarda büyüme faktörü bulunur. PRP klinikte yumuşak dokuda, kas, tendon, kırıkta, ligament ve sinir yaralanmalarında kullanılmakla birlikte kemik doku mühendisliği çalışmalarıyla ilgili yararlılığı klinik olarak bildirilmemiştir (Del Buono, Papalia et al. 2011, Mei-Dan, Carmont et al. 2011).

### **Biyo-reaktörler**

Fonksiyonel kemik doku mühendisliği çalışmalarında, in-vitro ortamda istenen boyutlarda homojen kemik dokusu gelişimi sağlamak amacıyla biyo-reaktör iskele sistemlerinin kullanılması önerilmiştir (Salter, Goh et al. 2012). Hedefi; hücre tutunma oranının artması, osteojenik hücrelerin mekanik stimülasyonunun artması ve bu hücrelerin sabit bir kültürde ortaya çıkacak difüzyon eksikliklerine bağlı beslenme sorununun aşılması olarak belirtilmiştir. Sıcak, basınç gibi parametrelerdeki değişim, besin kaynaklarının ulaştırılması ve atık ürünlerin uzaklaştırılması gibi farklı yaklaşım biçimlerinin tamamen otomatik hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Böylece üretim maliyetlerinin azaltılarak standardize edilmiş doku mühendisliği uygulamaları büyük çaplı uygulama alanlarına dönüşebilir.

*Şişe karıştırma, dönen biyo-reaktörler ve perfüzyon biyo-reaktörleri* gibi birçok uygulama şekli bulunmaktadır. Şişe karıştırma tekniği bu uygulamaların içinde uygulama kolaylığı ve fiyat açısından ilk sırada yer almaktadır. Bu sistemde, şişenin ortasına yerleştirilen hücre ekilmiş iskelelerin çevresinde orta akışa izin veren bir karıştırıcı tarafından konvektif kuvvetler oluşturulur. *Şişe karıştırma biyo-reaktörlerinde* statik -petri kaplarındaki- kontrol gruplarına göre, osteojenik hücre çoğalması, osteojenik belirteç genlerin ekspresyonu ve mineralizasyon seviyelerinin arttığı belirtilmiştir (Meinel, Karageorgiou et al. 2004). Ancak, *şişe karıştırma biyoreaktör* sisteminin kullanılması, şişe içinde bulunan hücelere oksijen ve besin iletimini engelleyebilecek oranda yoğun bir hücre tabakasının oluşmasına sebep olmaktadır (Stiehler, Bünger et al. 2009).

*Dönen biyo-reaktör sistemleri*, içerisindeki eş merkezli silindirler yatay olarak döndükçe laminer bir akış oluştururlar. NASA tarafından tasarlanmış *dönen biyo-reaktörler* üzerinde yapılan çalışmalarda, artmış osteoblastik aktivite ve mineralizasyon bildirilmiştir (Jeong, Kim et al. 2004). Öte yandan *dönen biyo-reaktörler*, olası bir iskele ve biyo-reaktör duvarı çarpışması sonucu iskele ve üzerine tutunan hücelere zarar verebilmektedir (Sikavitsas, Bancroft et al. 2002).

*Perfüzyon biyo-reaktörleri* tüm besleyici faktörler ve oksijenin iskele boyunca dengeli bir biçimde dağılmasını sağlar. *Perfüzyon biyo-reaktörleriyle* yapılan in-vitro çalışmalarda, tüm iskele boyunca homojen osteojenik hücre dağılımı ve yoğunluğu, artmış proliferasyon ve farklılaşma kapasitesi ve mineralize ekstrasellüler matriks rapor edilmiştir (Goldstein, Juarez et al. 2001). *Perfüzyon biyo-reaktörleriyle* yapılan

çalışmalarda benzer şekilde, statik kültürlere oranla artmış kemik yoğunluğu bildirilmiştir (Wang, Uemura et al. 2003)

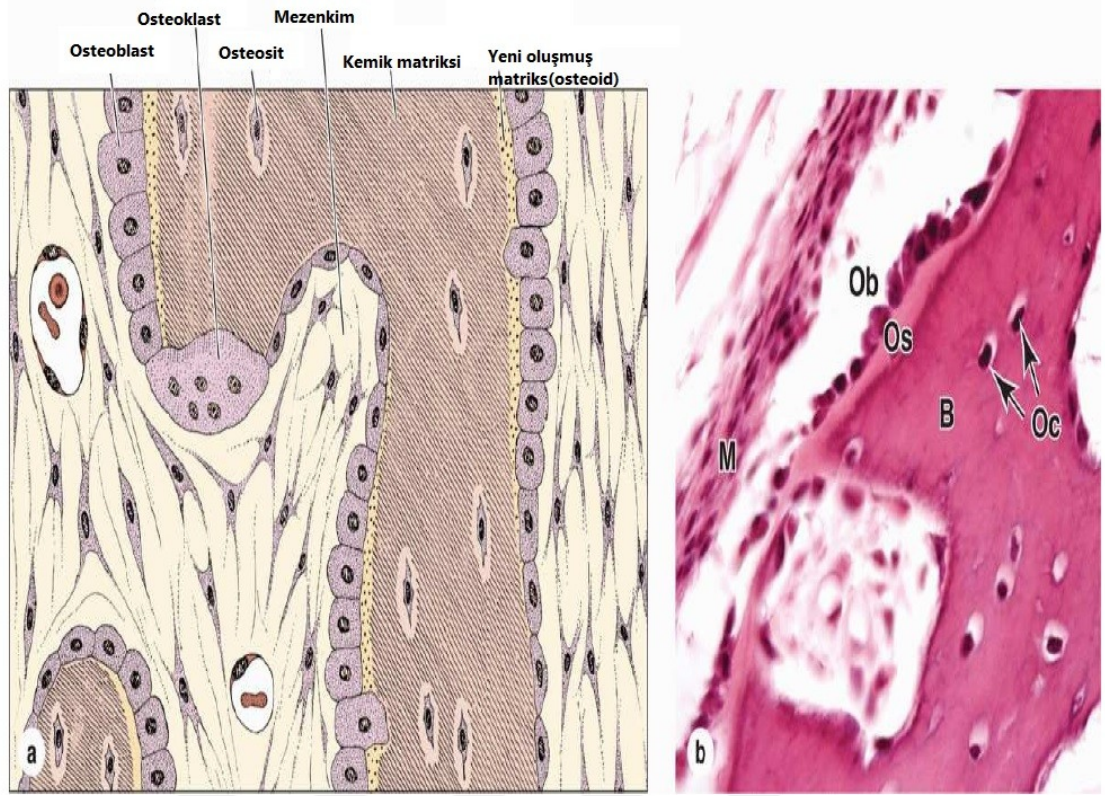
Kemik mekanik kuvvetlere karşı hassas ve aktif bir doku olduğu için, bazı biyoreaktörler kültür yapıları üzerinde doğrudan mekanik stimlasyon üretmek üzere tasarlanmıştır. Direkt mekanik gerilim uygulayabilen bir biyoreaktör sisteminde, artan ALP aktivitesi, mineralize matriks üretimi ve osteojenik gen ekspresyonları bildirilmiştir. Puwanun ve arkadaşları; kemik iliği ve periost kaynaklı kök hücrelerinin polikaprolakton iskele üzerinde kemik matriks üretiminin standart salınımlı sıvı akışı sağlayan tahterevallı düzeneği ile stimülasyonunun değerlendirildiği çalışmada, her iki hücre tipinin de artmış oranda mineralize doku ürettiğini bildirmişler ve bu tip bir düzeneğin dudak damak yarıkları gibi küçük defektlerin tedavisinde kullanımı için uygun olduğunu rapor etmişlerdir (Puwanun, Delaine-Smith et al. 2018).

Kemik doku mühendisliği çalışmalarında yüksek verimliliği belirleyen kritik bir faktör de hücrelerin homojen ve yeterli oranda iskeleye infiltre olabilmesidir. Kemik oluşum ve mineralizasyon oranı ekilen hücrelerin yoğunluğuyla doğrudan ilişkilidir (Holy, Shoichet et al. 2000). Manuel olarak hücre ekimi yapılan çalışmalarda daha sık kullanılmakta olup, iskeleye dağılmış üniform olmayan hücre grupları ve düşük verimlilik gösteren hücre ekimi sorunları çeşitli biyo-reaktörlerle çözülebilmektedir. Biyoreaktrlerin, literatürde bildirilen tüm yararlarına rağmen insan çalışmalarında kullanılabilmesi için devletler tarafından ‘‘İyi Uygulama Pratikleri’’ kapsamında onaylanması gerekmektedir (Amini, Laurencin et al. 2012).

## **2.2. Kemik Doku**

Yetişkin iskeletin ana bileşeni olan kemik dokusu vcoda destek sağlar, hayati organları korur ve kan hücrelerinin oluştuğu kemik iliğini içeren boşlukları barındırır. Kemik dokusu, vücut sıvılarında konsantrasyonları sabit tutmak için kontrollü bir şekilde salınabilen veya depolanabilen kalsiyum, fosfat ve diğer iyonlar için rezervuar görevi görür. Ek olarak, kemikler iskelet kaslarının kasılması sırasında oluşan kuvvetleri taşıyan ve bunları vücut hareketlerine dönüştüren bir kaldıraç sistemi oluşturur.

Kemik, kalsifiye hücre dışı materyal olan kemik matriksi ve osteositler, osteoblastlar ve osteoklastlardan oluşan özel bir bağ dokusudur (Junqueira, Carneiro et al. 1993). (şekil 2-3)



**Şekil 2-3 (A)Kemiğin hücresel yapısı. (B)Gelişmekte olan kemiğin hücresel yapısının mikroskopik görünümü. Ob:Osteoblast, Oc:Osteosit, M:Mezenkim, Os:Osteoid, B:Kemik matriksi(Junqueira, Carneiro et al. 2003)**

### 2.2.1. Kemiğin Organik ve İnorganik İçeriği

#### 2.2.1.1. Organik İçerik

Kemiğin organik matriksi temel olarak tip I kollajenden oluşur. Az miktarda Tip V kollajen ve eser miktarda Tip III, XI, XIII kollajen de içermektedir. Hyalüronik asit, kondroitin sülfat, keratan sülfat gibi glikozaminoglikanları; osteonektin gibi glikoproteinleri; sialoprotein I,II ve osteopontin gibi sialoproteinleri içerir. Aynı zamanda içeriğinde osteokalsin, insülin benzeri büyüme faktörü, kemik morfojenik proteini ve interleükinler gibi çok sayıda düzenleyici proteinler de bulunmaktadır (Eşrefoğlu).

#### 2.2.1.2. İnorganik İçerik

İnorganik içerik, kemik matriksinin kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini oluşturur. İçeriğinde kalsiyum ve fosfor ağırlıklı olmak üzere, bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum iyonları da bulunur. Elektron mikroskobu incelemelerinde kemiğin hidroksiapatit kristalleri kollajen liflerin yanında tabakalar halinde görülürler. Hidroksiapatit kristallerinin yüzeyindeki iyonlar su ile karışık ve kristalin etrafında su

ve iyon tabakası oluşturur. Kristaller ve vücut sıvıları arasındaki iyon değişimini kolaylaştıran bu tabakaya hidrasyon kabuğu ismi verilmektedir (Junqueira, Carneiro et al. 2003).

## **2.2.2. Kemik Doku Hücreleri**

### **2.2.2.1. Osteoblastlar**

Osteoblastlar Tip I kollajen, proteoglikanlar ve glikoproteinler gibi kemiğin organik matriksinin üretiminden sorumlu, kemik yüzeylerinde yan yana sıralanmış şekilde bulunan hücrelerdir. Osteokalsin, osteonektin, sialoprotein I-II, osteopontin, trombospondin, çeşitli proteoglikanlar ve alkalen fosfataz salınımında görevlidir (Eşrefoğlu). Sitoplazmaları aktif matriks sentezi yaparken kübik-prizmatik, işlevleri azaldıkça yassılaşan bazofilik hücrelerdir. Osteoblastlar yeni oluşan matriksle çevrelendiğinde osteosit haline gelirler. Bu işlem sırasında laküna isimli boşluklar meydana gelir. Osteoblastlarda paratiriod hormon reseptörleri sayesinde uyarıldıklarında osteoklast uyarıcı faktör olan sitokin üretimi yaparlar (Junqueira, Carneiro et al. 2003).

### **2.2.2.2. Osteositler**

Osteoblastlar, salgıladıkları matriks içerisinde aktivitelerini azaltırlar ve osteositlere dönüşürler. Bu hücreler, sınırlı oranda kemik matriksi sentezleyebilen ve reabsorbe edebilen ancak bölünme yetenekleri bulunmayan hücrelerdir. Heterokromatik nükleus ve bazofilik sitoplazmalıdır ve kemik lakünaları içinde yer alırlar ayrıca (Eşrefoğlu), aktif olarak kemik matriksinin bakımından sorumludur. Hücre ölümünü takiben matriks rezorbsiyonu görölmektedir (Junqueira, Carneiro et al. 2003).

### **2.2.2.3. Osteoprojenitör Hücreler**

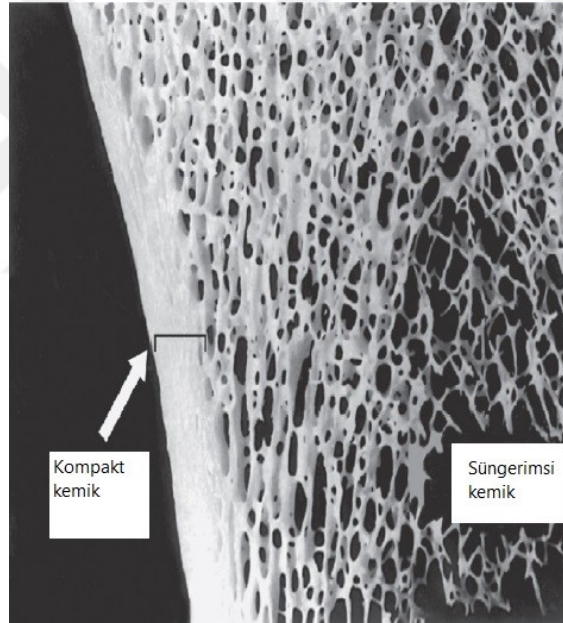
Kemik iliği kaynaklı mezenkimal hücrelerden kaynağını alırlar. Çekirdek bağlama faktörü  $\alpha$  yardımıyla mitoz bölünüp farklılaşarak osteoblastları oluştururlar. Bulundukları bölgeye göre isimlendirirler. Periostun iç yüzünde yer alanlara *periosteal hücreler*, Havers ve Volkmann kanallarının iç yüzünü döşeyenlere ise *endosteal hücreler* ismi verilmiştir. Uzun, asidofil veya hafif bazofil sitoplazmalı, oval nükleuslu, mekik şekilli yassı hücrelerdir (Eşrefoğlu).

#### 2.2.2.4. Osteoklastlar

Osteoklastlar büyük, çok çekirdekli hareketli hücrelerdir ve kemik büyümesi ve yeniden yapılanması sırasında matriks rezorbsiyonunda rol oynarlar. Kemik iliğinden elde edilen hücrelerin füzyonuyla oluşurlar. Enzimatik reaksiyonlarla rezorbe edilmiş *Howship lakünası* adı verilen kemik çukurlarında bulunurlar. Bölgesel kollajen sindirimini ve kalsiyum tuz kristallerinin eritilmesini başlatan kollajenaz ve diğer enzimleri salgırlar. Osteoklastların işlevleri sitokinler ve hormonlarla kontrol edilir. Osteoklastlarda kalsitonin reseptörleri bulunur (Junqueira, Carneiro et al. 2003).

#### 2.2.3. Kemik formları

Kemik dokusu dış tarafında kompakt kemik adı verilen ve kemik kütesinin %80'ini oluşturan ve iç tarafında süngerimsi kemik denilen ve kütenin %20'sini kaplayan iki tip kemikten oluşur (Mescher 2013). (Şekil 2-4)



Şekil 2-4 Kompakt ve süngerimsi kemik(Junqueira, Carneiro et al. 2003)

##### 2.2.3.1. Kompakt Kemik

*Havers kanalları* ve çevresindeki lamellerin oluşturduğu osteon olarak isimlendirilen yapılardan oluşur ve *Volkmann kanalları*yla birbirine bağlanırlar. Sert ve az boşluklu yapısı nedeniyle difüzyonla beslenmesi mümkün değildir. Beslenme görevi kanaliküllerle sağlanır (Mescher 2013)

#### 2.2.3.2. Süngerimsi Kemik

Kompakt kemiğe oranla daha boşluklu bir yapısı olan, düzenli lamelleri bulunmayan bal peteğine benzer bir görünümü vardır. Kemik trabekülleri adı verilen boşlukları sayesinde içinde bulunan kemik iliğinin zengin damarlarından difüzyonla beslenebilir. Trabeküller, lakünalar içerisinde yer alan osteosit ve kemik kanalikulilerini barındırır. Trabekülleri saran endosteum, osteoprogenitor hücreler, osteoblastları ve osteoklastları içerir (Eşrefoğlu).

#### 2.2.3.3. Periosteum

Kemiğin dış ve iç yüzeyleri, periosteum ve endosteum adı verilen kemik oluşturan hücelere sahip doku katmanları ile kaplıdır. Periostun dış katmanı kolajen demetleri ve fibroblastça yoğun bağ dokusudur. *Sharpey lifleri* adı verilen kollajen lif demetleri, kemik matriksine nüfuz ederek kemik ve periost arası bağlantıyı kurar (Junqueira, Carneiro et al. 2003). Periosteumun iç bölgesi kemik astar hücreleri, osteoblastlar ve osteoprogenitor hücreler adı verilen mezenkimal kök hücreleri içeren hücreden yoğun bir tabakadır. Temel işlevleri, kemik dokusunu beslemek ve apozisyonel kemik büyümesi veya onarımı için sürekli yeni osteoblast tedariki sağlamaktır (Mescher 2013).

#### 2.2.3.4. Endosteum

Kemiğin dahili sisteminde çok ince bir yapıda bulunan endosteum, kemik iliği boşluklarına yansıyan küçük kemikli matriks trabeküllerini kapsar. Periosta göre çok daha incedir, ayrıca osteoprogenitor hücreler, osteoblastlar ve kemik astar hücrelerini içerir (Mescher 2013).

#### 2.2.4. Kemik Oluşumu (Osteogenezis)

Kemik gelişimi veya osteogenezis iki yoldan biriyle oluşur:

Osteoblastların salgıladığı matrikse doğrudan minerallerin çökmesiyle *intramembranöz kemikleşme*,

Önceden mevcut kıkırdak matriksin zamanla kalsifiye olmasıyla *endokondral kemikleşme* (Junqueira, Carneiro et al. 2003).

Endokondral ve intramembranöz kemikleşme süreçleri arasında belirgin farklar olmasına rağmen bazı moleküler düzenleyiciler her iki süreç için ortaktır. Hint kirpi proteini, paratiroid hormon peptidi, kemik morfojenik proteini, vasküler endotelyal büyüme faktörü ve fibroblastik büyüme faktörü gibi faktörler, bu süreçler için ortak ve hayati önem arz eden proteinlerdir (Mescher 2013).

#### **2.2.4.1. İntramembranöz Kemikleşme**

İntramembranöz kemik gelişimi gebeliğin yaklaşık 8. haftasında başlar. Kafatasının frontal, parietal, oksipital ve temporal kemikleri ile mandibula ve maksilla bölümleri başlangıçta intramembranöz kemikleşme ile üretilir. Mezenkim hücreleri bir araya gelerek gruplar oluştururlar bu yapılar membrana benzetildiği için intramembranöz kemikleşme ismi verilmiştir. Alanda hücre birikimi ve vaskülarizasyon artar, mezenkim hücreler önce osteoprogenitör hücrelere dönüşür, sonra osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönüşerek osteoid dokunun kollajen ve diğer matriks proteinlerini salgılamaya başlar. Kemik dokusu birikimi arttıkça osteoblastlar osteositlere dönüşerek lakünalarda sıkışırlar. Başlangıçta mineralize olmayan bu doku zamanla mineralize olup sertleşerek süngerimsi kemiğe dönüşür. Süngerimsi kemiklerden bazıları yeniden yapılanarak kompakt kemiğe dönüşürken, trabeküller arası mezenkim dokudan kemik iliği gelişir (Junqueira, Carneiro et al. 2003).

#### **2.2.4.2. Endrokondral Kemikleşme**

Endokondral kemikleşme, uzun kemiklerde belirgin olarak görülen, vücudun çoğu kemiğinin kemikleşme türüdür (Mescher 2013). Fetusta 12. haftadan itibaren görülmektedir. Endokondral kemikleşme, oluşacak kemiğin küçük bir modeline benzeyen hyalin kıkırdak parçası içinde gerçekleşir. Bu tür kemik gelişimi kıkırdak çevreleyen perikondriyumun periosteuma dönüşmesiyle başlar. Periosteumun osteojenik katmanındaki hücreler osteoblastlara dönüşerek kemik sentezlemeye başlarlar. Böylece kıkırdak modelin dış tabakasında ince bir kemik tabakası oluşmuş olur, iç ve orta tabakadaki kondrositler kalsifikasyona bağlı olarak ölürler. Matriksin yıkılması sonucu büyüyen boşluklara periosteal hücreler kan damarları ile birlikte göç ederler. Osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara dönüşerek, diafizin ortalarında kemiğin sentezlenmesiyle primer kemikleşme alanları oluşmaya başlar. Bu doku trabeküler spongios kemiktir. Trabeküller arasındaki boşlukları kemik iliği doldurur. Kıkırdak modelin uçları birbirlerinden ayrılır ve çapları giderek artarken, bu alanlardaki kıkırdak doku dejeneratif değişikliklere uğramaya devam eder. Bunun sonucunda gelişmekte olan kemik, kemiksi bir diafiz ve bunun iki ucunda bulunan kıkırdak yapısında epifizlerden oluşur. Epifizler diafiz plağı ismi verilen büyüme plaklarını içerirler. Bu bölgede kıkırdağın sürekli büyümesiyle orantılı olarak artan kemik birikimi gözlenir.

Büyüme döneminin sonunda epifiz plakları tamamen kemik dokusu haline gelir, diafiz ve epifizler birleşmesiyle kemik gelişimi sona erer (Eşrefoğlu).

#### **2.2.5. Kemiğin Tamiri / İyileşmesi**

Kemik kırığını takiben kemik matriksi yıkılır ve kırığa komşu kemik hücreleri ölür. Hasara uğrayan kan damarları bölgesel kanamaya yol açarak kan pıhtısını meydana getirir. İyileşme sürecinde kan pıhtısı ,hücreler ve hasarlı kemik matriksi makrofajlarla bölgeden uzaklaştırılır. Periosteum ve endosteum hızlı ve yoğun hücre çoğalmasıyla kırığı saran bir doku hazırlar ve kırık uçları arasına göçer. Endokondral ve intramembranöz kemikleşme yoluyla oluşmuş düzensiz kemik dokusu geçici olarak kırık uçlarını birleştirerek kemik kallusunu oluşturur. Eğer kemik dokusu kırık sonrası doğru konumlandıysa, kallus dokusu kademeli biçimde eriyerek remodeling yoluyla kemik eski haline dönecektir (Eşrefoğlu). Kemik onarım süresince kemik üzerine uygulanan kuvvetler kemik kallusunun yeniden şekillenmesini (remodeling) sağlar. Eğer bu kuvvetler büyüme sırasında oluşan kuvvetlerle aynı ise kemiğin yapısını etkileyecektir (Eşrefoğlu). Kemiğin sürekli olarak yeniden şekillenmesi, plastisitesini ve yapısını korumasını sağlar. Çene kemiğindeki dişlerin pozisyonlarının ortodontik aparatların ürettiği yan basınçlarla değiştirilebilmesi bu mekanizma sayesinde olur. Traksiyonun uygulandığı tarafta kemik oluşurken, basıncın uygulandığı zıt tarafta rezorbsiyon görülür. Bu şekilde, kemik yeniden yapılandırılırken dişler çene içinde hareket ettirilir (Mescher 2013).

#### **Kemik İyileşme Hızını Etkileyen Faktörler**

Kemik iyileşmesi dış (biyomekanik) ve iç (biyolojik) uyarılarla manipüle edilebilir. Kırık iyileşmesini arttırmak için çeşitli biyolojik, mekanik ve fiziksel müdahaleler geliştirilmiştir.

#### **Mekanik Uyarılar**

Kemik iyileşmesini etkileyen faktörlerden biri de kemiğin karşı karşıya kaldığı mekanik faktörlerdir. Mekanik yüklenmenin ve kırık hattındaki mikro hareketlerin kemik iyileşmesini hızlandığı ortopedik literatürde bildirilmiştir (Duncan and Turner 1995). Mikro hareketlerin kırık hattına yansıttığı mekanik uyarılardan yararlanan tespit yöntemlerinin (yarı-rijit fiksasyon tekniği) klinik olarak kemik iyileşmesini hızlandığı bildirilmiştir (Braddock, Houston et al. 2001). Kırık bölgesine periyodik hareket uygulanarak iyileşme oranının, kallus oluşumunun derecesinin ve kan akış

miktarının arttırıldığı bildirilmiştir. Ancak aşırı hareketliliğin anjiyogenez üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır (Hannouche, Petite et al. 2001).

### **Ozon Terapisi**

Kemik iyileşmesi için kullanılan diğer bir fiziksel uyarıcı yöntem ozon tedavisidir. Ozon normal olarak bir gaz halinde bulunur. Vasküler sistemin bileşenleri (eritrositler, lökositler, trombositler ve endotel hücreleri) ile reaksiyona girebilir ve oksijen metabolizmasını, hücre enerjisini, immünomodüler özelliği, antioksidan savunma sistemini ve dokulardaki mikro dolaşımı olumlu yönde etkiler. Bu etkiler, düşük düzeyli lazer tedavisine benzer biyostimülatör özellik göstermektedir (Kazancıoğlu, Ezirganlı et al. 2014). Ancak diş hekimliğinde ozon kullanımını dikkate alan yayınlanmış makalelerin çoğu, antimikrobiyal etkileriyle ilişkilidir. Ozonun oral ve maksillofasial bölgede uygulanmasına ilişkin yeterli veri bulunmamaktadır (Kazancıoğlu, Ezirganlı et al. 2013).

### **Hiperbarik Oksijen**

Hiperbarik oksijen uygulamalarının hücrel hipoksi sebebiyle sekteye uğrayan yara iyileşmesi üzerinde, kollajen üretimi, neovaskülarizasyon, epitelizasyon ve fibroblastik aktiviteyi stimüle edici etkisi bulunmaktadır. Osteoblast ve osteoklast aktivitesini optimize ederek, osteogenezi arttırdığı bilinmektedir. Antimikrobiyal, antitoksik ve ödem azaltıcı etkileri bulunmaktadır. Osteomyelit, osteoradyonekroz ve iyileşmeyen kırıkların tedavisinde hiperbarik oksijenden yararlanılmaktadır. Distraksiyon uygulamalarını takip eden ilk 7 günde uygulanan hiperbarik oksijen uygulamalarının kemik doku rejenerasyonu ve mineralizasyonunu hızlandığı bildirilmiştir (Ueng, Lee et al. 1998). Kaynar ve arkadaşlarının sıçan tibia distraksiyon modelinde optimum ve hiperfizyolojik hızlarda hiperbarik oksijen tedavisinin etkilerini inceledikleri çalışmada, hiperbarik oksijenin kas dokusunda distraksiyon sonucu ortaya çıkan dejeneratif değişiklikleri üzerinde olumlu etkileri bulunduğu bildirilmiştir (Kaynar, Civelek et al. 2014).

### **Ultrason**

Ultrasonun (US) kırık iyileşmesine uygulanması ilk olarak Duarte tarafından ortaya atılmıştır. Hayvan araştırmaları ve klinik araştırmalar US'nin kırık iyileşmesini artırma yeteneğini doğrulasa da, kesin fiziksel mekanizma tam olarak bilinmemektedir. İn vitro, düşük yoğunluklu US'nin hücre fizyolojisi üzerinde doğrudan etkileri vardır, kırık sonrası enflamatuar fazı kısaltır ve piezoelektrik etkisiyle anjiyoneogenezi tetikler

(Zorlu, Tercan et al. 1998). Kalsiyum iyonlarının kırıkta ve kemik hücrelerinin kültürüne katılımını artırır ve agregan, IGF ve TGF-  $\beta$  dahil iyileşme sürecinde yer alan çok sayıda genin ekspresyonunu teşvik eder. Ultrasonik faktörler ayrıca, osteoblastlarda COX-2'nin düzenlenmesi ile PGE2 üretimini artırır, yumuşak kallus oluşumunu artırır ve endokondral ossifikasyonun daha erken başlamasına neden olur (Kokubu, Matsui et al. 1999, Hannouche, Petite et al. 2001). Babuccu ve arkadaşları, sıçan tibia defekt modelinde düşük yoğunluklu atımlı ultrasonun kemik iyileşmesi üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada, 14 ve 21. günde kemikleşme ve kemik köprüsü oluşumunun kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (Babuccu, Keklikoğlu et al. 2014).

### **Lazer**

Son yıllarda lazer, yumuşak ve sert doku hasarlarının tedavisi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bilimsel bulgular lazerin, yumuşak dokunun iyileşmesini (Mester, Spiray et al. 1971), sinirlerin yenilenme hızını (Rochkind, Nissan et al. 1986) ve büyüme faktörlerinin salınımıyla artan yeni kılcal damarların oluşumunu arttırdığını göstermektedir (Kovacs, Mester et al. 1974). Farelerde kırık modeli üzerinde Helyum-Neon lazerle (HeNe lazer) günlük ışınlama yapılan çalışmada 3 hafta içerisinde daha hızlı bir iyileşme ve daha sıkı bir trabekül ağı ile iyileşme sağlandığı bildirilmiştir (Trelles, Mayayo et al. 1987). Babuccu ve arkadaşları, sıçan tibia defekt modelinde düşük düzeyli lazer tedavisinin kemik iyileşmesi üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada, 14 ve 21. günde kemikleşme ve kemik köprüsü oluşumunun kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (Babuccu, Keklikoğlu et al. 2014). Etki mekanizması halen tam olarak anlaşılmamakla birlikte, düşük doz lazerlerin kırık iyileşmesinde olumlu etkileri bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca Ginani ve arkadaşlarının sistematik taramasına göre, düşük doz lazer tedavisinin mezenkimal hücrelerin proliferasyonunu olumlu etkilediği bildirilmiştir (Ginani, Soares et al. 2015).

### **Elektrostimülasyon**

Elektriksel ve elektromanyetik (EM) alanların, mekanik stres uygulamaları ile aynı prensiplerle kemiğin iyileşmesinde rol oynadığı varsayılmaktadır. Kemiğe mekanik yük uygulandığında, şekil değiştirme gradyanı gelişir. İnterstisyel sıvıdaki basınç gradyanları, kanaliküllerden sıvıyı yüksek basınç bölgelerinden alçak basınç bölgelerine taşır ve osteosit membranlarını akış kaynaklı strese ve akış sonrasındaki elektriksel

potansiyellere maruz bırakır. EM uygulamaları; mekanik stresin kemik üzerindeki etkisini taklit etmek içindir (Victoria, Petrisor et al. 2009). Hem in vitro hem de in vivo klinik öncesi çalışmalar EM'nin, yapısal hücre dışı matriks (ECM) proteinlerinin sentezini uyardığını ve elektrik düzenlemesinde rol oynayan proteinlerin üretiminde ve elektrik potansiyellerinin sinyal iletimini gösteren olayları başlattığını göstermiştir (Ciombor and Aaron 2005). Elektrik stimülasyonunun avantajı; diğer girişimsel yöntemlere kıyasla düşük komplikasyon oranları olarak kabul edilmekle birlikte girişimsel elektrostimülasyon tekniklerinde yüksek oranda enfeksiyon ve ağrı rapor edilmiştir (Ciombor and Aaron 2005).

### **Biyolojik faktörler**

Kırık, patolojik ya da konjenital nedenlerle oluşan kemik defektlerinin iyileşmesinde kullanılan alternatif tedavilerde; osteokondüktif materyaller, osteoindüktif büyüme faktörleri ve maddeleri gibi biyolojik ajanlardan yararlanılabilir (Einhorn 1995).

Kemik iyileşmesini stimüle etmek için kemik greftleri ve kemik iliği aspiratları da kullanılmaktadır. Kemik iliği aspiratları osteoindüktif sinyallere cevap olarak osteoblastlara dönüşebilen kök hücreler içerir ve genellikle iliak kemik, vertebra, humerus ve tibiadan elde edilirler (Emara, Diab et al. 2015).

Kemik morfojenik proteini(BMP), büyüme faktörleri ve hormonlar kemik iyileşmesini teşvik etmek için kullanılabilir. BMP'ler, kemik oluşumunu ve kırıkta onarımını uyaran biyolojik ajanlardır. BMP-7 ve BMP-2 en sık kullanılan kemik morfojenik proteinlerindendir. Bu proteinlerin, nonunion kırıkların iyileşmesini olumlu etkilediği bildirilen birçok çalışma bulunmaktadır (Emara, Diab et al. 2015). Kırıktan hemen sonra hematomda bulunan bir bileşen olan, vasküler endotelial büyüme faktörü(VEGF) hasarlı bölgede neovaskülarizasyonun sağlanmasında görevlidir. Street ve arkadaşları, VEGF'nin kemik defekt bölgesine uygulanmasının, anjiyogenez ve kemik oluşumunu uyardığını ileri sürmüştür (Street, Bao et al. 2002).

Kök hücreler, kendini yenileyebilme ve belirgin hücre tipine farklılaşabilme yetenekleri sayesinde kemiğin iyileşme ve remodeling mekanizmasında önemli bir yere sahiptir. Plateletten zengin plazma ve plateletten zengin fibrin gibi birçok büyüme faktörünü içeren kan ürünleri de kemik iyileşmesini stimüle etmek için kullanılan

ajanlardandır. Hakimi ve arkadaşları, domuzların uzun kemiklerinde yalnızca otolog spongiöz greft ile, otolog spongiöz greft ve PRP'yi karşılaştırmış, PRP eklenen grupta anlamlı derecede yüksek kemik rejenerasyonu bildirilmiştir (Hakimi, Jungbluth et al. 2010). Yamada ve arkadaşları köpek mandibula defekt modelinde mezenkimal kök hücreler ve PRP kombinasyonunun etkisini inceledikleri çalışmada, mezenkimal hücre ve PRP kullanılan grupta neovaskülarizasyon ve olgunlaşmış kemik miktarı yönünden anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (Yamada, Ueda et al. 2004).

#### **2.2.6. Vaskülarizasyon**

Kemik oldukça vaskülarize bir yapıdır. Bu nedenle kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak bir kemik iskelesinin performansı, yeni kan damarı oluşumunu indüklenme kabiliyeti ile belirlenir (Bose, Roy et al. 2012). İmplantasyon sonrası kemik oluşumu büyük oranda vaskülarize alanlar çevresinde görülmektedir. Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan 200 µm'den küçük porlara sahip iskelelerde vaskülarizasyon sağlanamadığından, metabolik artıkların bölgeden uzaklaştırılması ve beslenme diffüzyonla sağlanabilmektedir (Muschler, Nakamoto et al. 2004). Diffüzyondaki yetersizlik sebebiyle ancak yüzeysel hücreler oksijen ve besine ulaşabilmekte, geri kalan bölgelerdeki hücreler beslenemediğinden osteointegrasyon süreci başarısız olmaktadır. İskele materyali üzerinde vaskülarizasyonu stimüle edebilmek için birkaç yaklaşım bulunmaktadır. Bunlar iskele dizaynı, anjiojenik büyüme faktörlerinin eklenmesi, in-vitro erken dönem vaskülarizasyon, in-vivo erken dönem vaskülarizasyon olarak sayılabilir (Amini, Laurencin et al. 2012).

İskele tasarımı implantasyon sonrası vaskülarizasyon için en önemli bileşenlerden biridir. Özellikle iskele gözenek büyüklüğünün, vaskülarizasyon ve yeni damar oluşumu için 300 µm'den büyük olması gerektiği belirtilmiştir (Place, Evans et al. 2009). Gözeneklerin bağlantı yapısı da hücre göçünü ve dolayısıyla vaskülarizasyonu etkilemektedir. Bu nedenle iskele üretim tekniklerinden olan *faz ayırma*, *gaz köpürme* ve *kurularak dondurma* gibi yöntemler yerini, *termal sinterleme* ve *porojen süzme* gibi istenilen gözenek büyüklüğü ve hacmin ayarlanabildiği tekniklere bırakmıştır. Bu tekniklerle üretilen iskelelerin vaskülarizasyonu desteklemenin yanında, kemik iyileşmesi için gerekli mekanik desteği de sağladığı bildirilmiştir (Nukavarapu and Amini 2011). Katman katman üretimi sağlayan serbest form fabrikasyon teknikleri son dönemde kullanıma girmiştir. Bu fabrikasyon sistemlerinin yardımıyla iyi tasarlanmış ve bağlantılı gözeneklere sahip bir iskele elde etmek mümkün hale gelmiştir (Moroni,

De Wijn et al. 2006). Xu ve arkadaşları, midyelerin adheziv yapısından ve aktif iyon şelasyonu özelliklerinden esinlenerek, üç boyutlu çizim tekniğiyle, polidopamin/apatit hibrit biyo-seramik iskeleler oluşturmuş, böylece osteogenez ve anjiyogenezi sinerjik olarak arttırmayı planlamışlardır. Trikalsiyum Fosfat iskeleler üç boyutlu üretim teknikleriyle oluşturulmuş, iki gruba ayrılarak dopamin-tri/HCL ve Dopamin-stimüle edilmiş doku sıvısıyla muamele edilmiştir. İki grup da, trikalsiyum fosfat iskelelere oranla kemik iliği stromal hücrelerinin osteogenez ve insan göbek kordonu ven endotel hücrelerinin (HUVEC) anjiyogenez yeteneklerini anlamlı şekilde arttırmıştır (Xu, Zhai et al. 2016).

Anjiogenik faktörlerin lokal olarak bölgeye eklenmesi implante edilmiş greft üzerindeki vaskülarizasyonu hızlandırdığı düşünülmektedir. Faktörler bölgeye iskele dizaynı yoluyla ya da ekilmiş hücreler vasıtasıyla eklenebilmektedir. İskele dizaynı faktör salınımı stratejilerinde; iskele ıslatma teknikleriyle hızlı faktör salınımı, iskele içine kapsüller halinde faktör gömülmesi, kovalent bağlarla hareketsizleştirilmiş faktörlerin yavaş salınımı gibi teknikler bulunmaktadır. Bunun yanında ortama verilecek anjiogenik faktörün seçimi ve uygun dozu da önemlidir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü, platelet kaynaklı büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü bu alanda kullanılmakta olan büyüme faktörlerindendir. Kemik dokusu gelişimi çoklu büyüme faktörlerinin etkileşimi ile kontrol edildiğinden, kombine faktörlerinin kullanımı da göz önünde bulundurulmalıdır. Vasküler endotelyal büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörlerinin birlikte iskele içine gömüldüğü bir sistemde, endotelyal progenitör hücrelerin bölgeye hareketi stimüle edilmiş ancak, hızlanmış vaskülarizasyon sonucu oluşan hücrelerin deforme ve düzensiz olduğu bildirilmiştir. Bu sorunun çözümü için iskele modeline platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü-  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ve anjiyopoietin 1 (Ang1) dahil olmak üzere damarların stabilizasyonu ve olgunlaşması için düz kas hücrelerinin veya perisitlerin alımını uyarıcı büyüme faktörlerinin eklenmesi düşünülebilir (Richardson, Peters et al. 2001, Jain 2005). Bu tip büyüme faktörü iletimi ya pasif difüzyon tarafından yönlendirildiğinden ya da biyomateryal bozulma hızına bağlı olduğundan büyüme faktörü salınımı, ilave edilen büyüme faktörü miktarı ya da malzemenin bozulma oranı değiştirilerek kontrol edilebilir. Bu nedenle tekniğin sınırlamaları, kemik iyileşme mekanizmaları ve hücresel taleplerle uyumlu değildir (Zisch, Lutolf et al. 2003). Öte yandan, iskelelere kovalent olarak bağlı büyüme faktörleri hücresel taleplere göre salınabilir. Vasküler endotelyal

büyüme faktörünün kontrollü salınımı ile oluşturulan vasküler yapının, kontrolsüz VEGF salınımından ortaya çıkan yapıya göre, daha organize olduğu gösterilmiştir (Ehrbar, Djonov et al. 2004). İnsan rekombinant büyüme faktörlerinin yüksek maliyetli olması, bu alana ilgiyi azaltmıştır. Diğer yandan, genetik olarak modifiye edilmiş hücrelerin iskelele entegre edilmesi umut veren bir yöntem olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalara göre vasküler endotelial büyüme faktörü salınımı yapan adipojenik kök hücrelerin iskele sistemine eklenmesi gelişmiş vasküler formasyona neden olmaktadır (Jabbarzadeh, Starnes et al. 2008). Ek olarak, osteojenik ve anjiyojenik faktörlerin kombinasyonunu serbestleyen hücrelerin, tek başına verilen faktörlere kıyasla vaskülarizasyonun yanında, rejenere kemik miktarını da arttırdığı gösterilmiştir (Huang, Kaigler et al. 2005). Tüm avantajlarına rağmen gen terapisi, çeşitli güvenlik ve etik risklere sahip olduğu için klinik kullanım için uygun görülmemektedir.

Güncel in-vitro erken dönem vaskülarizasyon tekniklerinden bazıları; iskelele önceden hücrelerin ekilmesi ve osteojenik-endotelial hücrelerin ortak kültürü olarak sayılabilir (Buschmann, Welte et al. 2011). Bu stratejinin altında yatan mekanizma, bu iki hücre tipinin doğrudan ve dolaylı iletişimine bağlıdır. İn-vitro koşullarda endotelial hücreler yardımıyla prematüre damarların oluşumu sağlanır ve vasküler yapı implantasyon sonrası olgunlaşarak konak vasküler yapısıyla anastomoz yapar. Bu yöntemin vaskülarizasyonu hızlandırmasının yanında osteojenik farklılaşmayı da stimüle ettiği bildirilmiştir (Fedorovich, Haverslag et al. 2010, Amini, Laurencin et al. 2012). Böylece vaskülarizasyon için gerekli sürenin haftalardan günlere indirilebilmesi mümkün hale gelmiştir (Amini, Laurencin et al. 2012). Shanbhag ve arkadaşları 2017 yılında; kraniyofasiyal defektlerde mezenkimal kök hücrelerin endotelial hücrelerle birlikte kullanımının vaskülarizasyon üzerindeki etkilerini inceledikleri meta-analizde, vaskülojenik ve osteojenik hücrelerin birlikte kullanımının kemik rejenerasyonunu olumlu etkilediğini bildirmişlerdir. Aynı çalışma, bu alanda yapılan histomorfometrik analizlerin ve damar oluşumu üzerindeki etkilerin yetersiz olduğunu, dolayısıyla tedavi sonucu üzerindeki etkisinin gözardı edilebilir olduğunu bildirmişlerdir (Shanbhag, Pandis et al. 2017). Pedersen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre; mezenkimal kök hücreler insan göbek kordonu ven endotel hücrelerinin, poli(L-laktid-co-1,5-dioksepan-2-one) ve (poly(LLA-co-DXO)) kopolimer iskele üzerinde bir arada kültürünün osteojenik ve anjiyojenik gen ekspresyonunu etkilediği bildirilmiştir. Aynı zamanda, mezenkimal hücrelerin in-vivo ortamda monokültürüne göre vasküler endotelial

büyüme faktörü salınımında artış gözlemlenmiştir. Grellier ve arkadaşları in-vivo implantasyondan önce in-vitro koşullarda RGD entegre edilmiş aljinat mikrokürelerde HUVEC ve mezenkimal kök hücreleri birlikte kültüre etmişlerdir. Ko-kültür yapılan çalışma grubunda mezenkimal kök hücrelerin mono-kültürüne kıyasla, osteojenik gen ekspresyonunun yanı sıra in-vitro ve in-vivo mineralizasyonda artış bildirilmiştir (Grellier, Granja et al. 2009). Bidarra ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, HUVEC'lerin mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını kontrol etmesinin yanında ve proliferasyon hızını da arttırdığı bildirilmiştir (Bidarra, Barrias et al. 2011). In-vitro erken dönem vaskülarizasyon çalışmalarının çoğunda HUVEC'ler kullanılmaktadır ancak bu hücreler makrovasküler hücrelerdir. Bu nedenle kılcal damarlardan kaynağını alan mikrovasküler hücrelerin mezenkimal kök hücre aktivitesi üzerindeki etkisini değerlendirirken bu fark göz önünde bulundurulmalıdır. Makro ve mikro endotelial matriks bileşenlerinin önemli ölçüde farklı olduğu ve dolayısıyla farklı şekillerde mezenkimal kök hücreleri etkilediği bilinmelidir (Lozito, Kuo et al. 2009, Brennan, Davaine et al. 2013). Rouwkema ve arkadaşları, mezenkimal kök hücreler ve HUVEC'lerin ko-kültürü sonucunda endotel hücrelerinin üç boyutlu vasküler yapılar oluşturabildiği ancak konak yapıyla anastomozun sınırlı miktarda olduğunu rapor etmişlerdir (Rouwkema, Boer et al. 2006). Sasaki ve arkadaşları, üç boyutlu iskele üzerinde kısa ve uzun vadeli kültür sırasında mezenkimal kök hücreler ve HUVEC'lerin etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmaya göre, HUVEC'ler iskeleye dahil edildikten 7 gün sonra hücre canlılığı ve büyüme faktörü üretiminde artış görülmüştür. Ayrıca, HUVEC'lerin, mezenkimal kök hücrelerle etkileşerek gözenekli yapıların içerisine proliferasyon yaptığı ve kendi kendine organize olduğu gözlemlenmiştir. 50 günlük uzun süreli kültürden sonra, mezenkimal kök hücre ve HUVEC grubunda, sadece mezenkimal kök hücre grubuna göre daha fazla mineralize matriks oluşumu görülmüştür. Transmisyon elektron mikroskobu ve niteliksel analiz, mineralize matrikslerin gözenekli süngerimsi kemik benzeri dokular içerdiğini ortaya koymuştur (Sasaki, Hashimoto et al. 2015). Villars ve arkadaşları HUVEC'lerin insan kemik iliği stromal hücreleriyle ko-kültürünün stromal hücrelerin proliferasyonunu arttırdığı, ancak yalnızca direk temasta olduğu stromal hücrelerin alkalen fosfataz aktivitesini arttırdığını bildirmişlerdir (Kanczler and Oreffo 2008). Byambaa ve arkadaşları GelMA içerikli vasküler endotelial büyüme faktörleri salınımı yapan hidrojel silindirlerin kemik mimarisini taklit eden biçimde dizilmesiyle elde ettikleri iskelelerin, mezenkimal kök hücrelerin

yaşayabilirliğini ve proliferasyonunu teşvik ettiği, 21 gün sonunda içi endotelle döşeli perfüzyona uygun lümen oluşturduğunu bildirmişlerdir (Byambaa, Annabi et al. 2017). Platelet lizatından üretilen hidrojel üzerinde kültürlendirilen mezenkimal kök hücrelerin endotelyal farklılaşmayı ve pro-anjiyojenik aktiviteyi teşvik ettiği, fare arka bacak iskemi modeline implante edildiğinde 8. günde kontrol grubuna göre doku perfüzyonunu anlamlı biçimde arttırdığı bildirilmiştir (Robinson, Douglas et al. 2016). Vaskülarizasyon uygulamalarında kullanılmak için olgun endotelyal hücreler vücudun çeşitli bölgelerinden biyopsileriyle elde edilebilmekte ancak miktarının yetersiz kalması ve proliferatif özelliklerinin yetersiz olması sebebiyle yayılım ve çoğalma gösterememektedir (Buschmann, Welti et al. 2011). Öte yandan endotelyal öncü hücreler yüksek ve uzun dönem proliferatif potansiyelleri, iyi anjiyojenik özellikleri sebepleriyle öne çıkan hücre gruplarından olmuştur. Yu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, endotelyal öncü hücreler mezenkimal kök hücrelerle birlikte kültüre edildiğinde iskele merkezinde nekroz görülmediği belirtmiştir (Jabbarzadeh, Starnes et al. 2008). Buna benzer şekilde, mezenkimal kök hücreler ve adipoz dokudan elde edilen stromal vasküler hücreler gibi hem osteojenik hem de vaskülogenic öncü yapıdaki hücre grupları kemik doku mühendisliği çalışmalarında sık kullanılmaktadır.

İn-vivo erken vasküler ağ oluşum stratejileri iki aşama içerir. İlk olarak kemik iskelesi vaskülerize alana implante edilmekte, ardından doku bu alandan uzaklaştırılarak pediküllü serbest kemik grefti gibi hedef dokuya anastomozla bağlanmaktadır. Donör bölge morbiditesi açısından; İkincil bir cerrahi gerektirmesi, maliyeti, konak doku vasküler yapısına bağlı rastgele bir vaskülarizasyon düzeni gibi potansiyel dezavantajları bulunmaktadır (Cassell, Hofer et al. 2002). Diğer bir teknik, mikro cerrahi işlemler için uygun damar yapısı olması durumunda kullanılabilmekte ve ikinci bir cerrahi alan gereksinimi bulunmamaktadır. Bu tekniğin dezavantajı ise çoğu yük taşıyıcı iskelenin arteriyovenöz dokulara göre şekillendirilememesidir.

Fonksiyonel kemik doku mühendisliği terimi, implantasyon sonrası tam fonksiyonel yeterlilikleri olan grefti tanımlamak için kullanılmıştır. Bu yaklaşımda, implante edilecek kemik grefti, ameliyat sonrasında hemen kullanımını sağlayabilmek için tasarlanmış biyomekanik özelliklere sahip olmalıdır. Bunun yanında yeni oluşmuş kemiğin çevre dokuyla tam bir entegrasyon içinde bulunduğu, doğal kemiğin taşıdığı tüm fonksiyonel özellikleri taşıyan bir yaklaşım türüdür. Yeni üretilen kemiğin kalitesi ve özellikleri çevre konak dokuya tamamen uymalıdır. Gelecekte fonksiyonel kemiğin

retimini sağlamak için etkili kalite değerlendirme testleri geliştirilmelidir. Böylece implantasyon öncesi ideal dokunun üretimi ve kalite kontrolü sağlanarak, doku mühendisliği uygulamaları klinik uygulamalarda yerini alabilir (Amini, Laurencin et al. 2012).

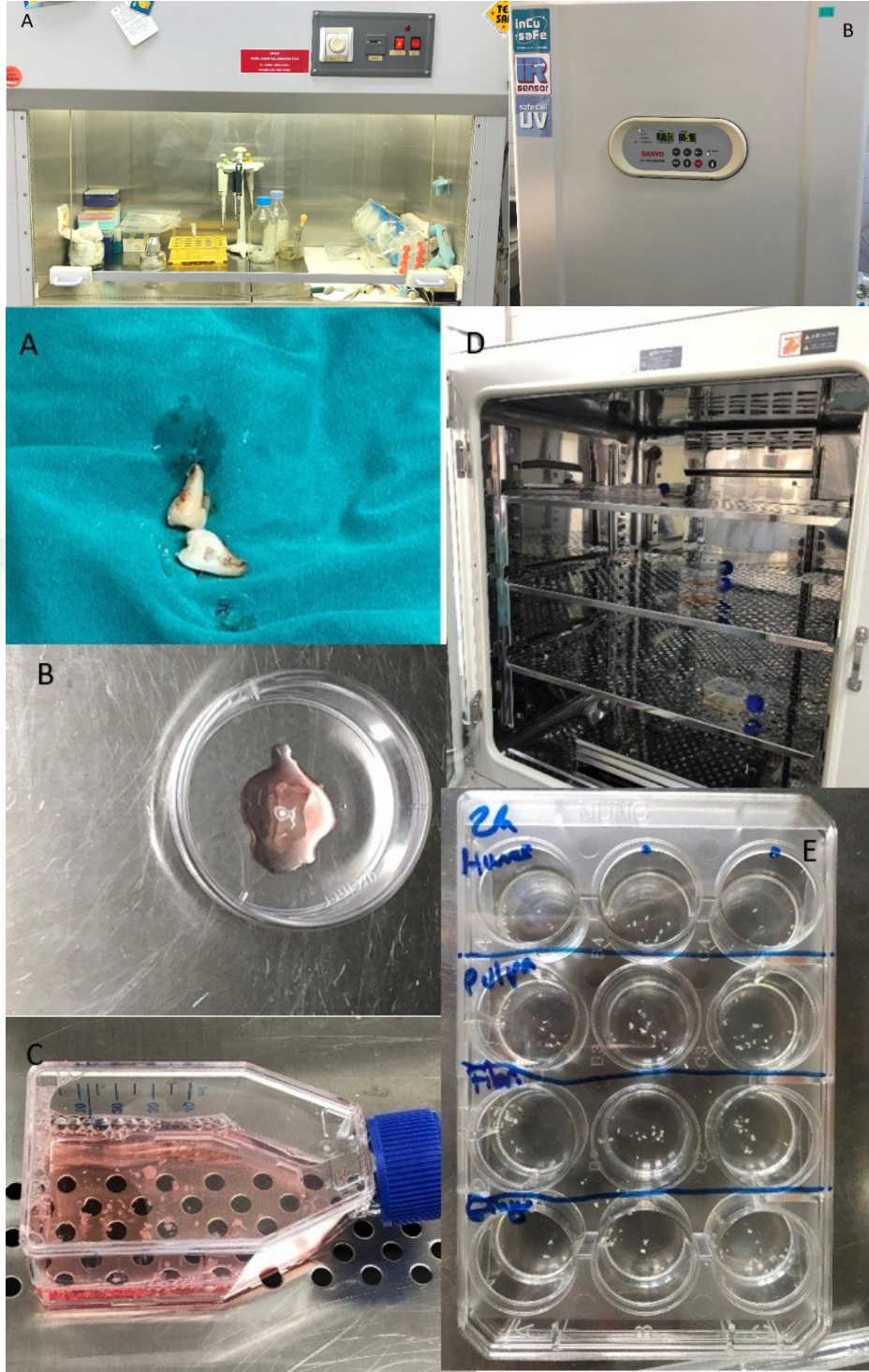


### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'nın ortak çalışmasıyla gerçekleştirilmiştir. İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun, 2018/11 dosya nolu, 15/03/2018 tarih ve 66 sayılı toplantısında uygun görüldüğü üzere, Kasım 2019 tarihinde kliniğimize başvuran 18-22 yaş aralığında hastalardan yazılı onay alınarak çekilmiş 3. molar dişlerin pulpalari, çevre gingivadan alınan 1mm<sup>3</sup>lik doku örnekleri ve insan göbek kordonu ven endotel hücreleri (HUVEC, Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak yapılmıştır.

#### 3.1. Dental Pulpa ve Gingiva Hücrelerinin Kullanıma Hazırlanması

Yazılı onam alınan 6 sağlıklı donörden, insan kaynaklı 3. Molar dişleri ve çevre dokular %75 alkollü tampon ile temizlendikten sonra uygun lokal anestezi altında çekildi. Çekimi takiben dişler %75 etil alkole batırıldı ve ateşten geçirildi. Diş ve gingiva dokuları, içerisine besiyeri (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM-F12, Biological Industries, Kibbutz BeitHaemek, İsrail) konulan kapaklı tüpler (TPP, Trasadingen, Switzerland) içerisinde İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına götürüldü. Dişler steril ortamda çekiç yardımıyla kırılarak pulpa dokusu ayrıldı.(Şekil 3-1) Gingiva ve pulpa dokuları, steril kabin (Tezsan, İstanbul, Türkiye) içinde, bistüri ile 0,5 mm<sup>3</sup>lük parçalara ayrıldı. Parçalanmış doku örnekleri, 25 cm<sup>3</sup>lük flasklar (Orange Scientific, Belgium) içerisine %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum: FBS Scientificlabs, Yorkshire, İngiltere), 100 IU/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin DMEM-F12 besiyeri ile ekilerek 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren CO<sub>2</sub> inkübatöründe 1 atmosfer basınç altında (Sanyo CO<sub>2</sub> incubator, Japonya) kültüre edildi. (Şekil 3-1) 48 saat sonra besiyeri değiştirilerek kültür kabının tabanına yapışmayan hücreler uzaklaştırıldı. Hücreler enfeksiyon riskine karşı, düzenli olarak inverted mikroskopta (Leitz, Wetzlar, Almanya) kontrol edildi ve 72 saatte bir besiyeri değiştirildi.



**Şekil 3-6 (A)Dişin kırılması (B)Dental pulpa dokusu (C)25cm3 flask içerisinde pulpa dokusu (D) CO2 inkübatörü içerisinde dental flasklar (E) 24 saatlik çalışma grubu**

### **3.2. DMEM-F12 Hazırlanması**

Kaynamış ve soğumuş 1 lt distile su içerisine glukoz, amino asitler, ve vitaminler içeren 10 gr besiyeri ve 1 ml penisilin-streptomisin karışımı eklenerek manyetik

karıştırıcıda 1 saat karıştırıldı. Sartorius filtreden süzülerek şişelere bölünen karışım, kullanılacağı zaman tekrar filtrelenerek serum ve glutamin ilave edildi.

### 3.3. İnsan Göbek Kordonu Veni Hücrelerinin(HUVEC) Kullanıma Hazırlanması

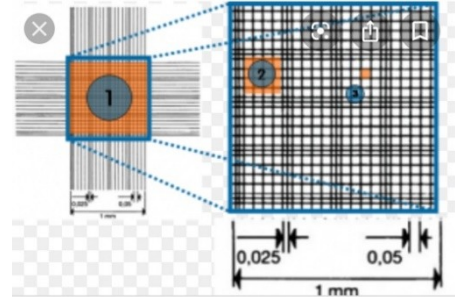
Soğuk zincirde gelen insan göbek kordonu ven hücreleri 37°C'lik su banyosunda bekletildi. Çözülen hücreler santrifüj için tüpe aktararak %10 fetal sıgır serumu içeren besiyeri eklendi ve 2000 rpm hızında 3 dakika Santrifüj (Nüve, NF 815, Ankara, Türkiye) edildi. Üst sıvı pipet yardımıyla çekilip, yerine fetal sıgır serumlu besiyeri konularak bu işlem 2 defa daha yinelendi. Son santrifüjden sonra pelet üzerine serumlu besiyeri eklendi ve süspansiyon haline getirilen hücreler pipet yardımıyla 25cm<sup>3</sup>lük kültür şişelerine ekildi.

### 3.4. Hücrelerin Pasajlanması

Kültür şişeleri içerisindeki besi yeri pipet yardımıyla çekildi. Şişe içerisine %3'lük tripsin (100 ml CMF-PBS, 3gr tripsin) eklendi ve 37°C'lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe kontrollü bir biçimde yüzeyden ayrılımları sağlandı. Yüzeyden ayrılan hücrelere besiyeri ilave edilerek 2000 rpm hızla ve 3 dakika süreyle santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırılarak yerine besiyeri kondu ve şişelere ekilerek 37°C'lik CO<sub>2</sub> inkübatörüne yerleştirildi.

### 3.5. Hücre Sayımı

*Neubauer* lamında sayma kamarası hazırlandı, hücre süspansiyonu 45° açıyla verildi. Lam üzerindeki 4 ayrı bölgede hücreler sayılarak aritmetik ortalaması alındı. Elde edilen sayı, kullanılan besiyeri miktarı ve 10<sup>4</sup> ile çarpılarak toplam hücre sayısı elde edildi. (Şekil 3-2)



Şekil 3-7 Hücre sayımı sırasında kullanılan kare sistemi

### 3.6. Deney Düzenekinin Hazırlanması

Hücreler flasklar içerisinde %70-80 oranında yoğunlaştığında CMF-PBS ile yıkandı. Kültür şişeleri içerisine kalsiyum magnezyum içermeyen fosfat tamponu içinde %1'lik tripsin çözeltisi ekledikten sonra CO<sub>2</sub> inkübatöründe 1-3 dakika aralıklarla kontrol edilerek hücrelerin zeminden ayrılması beklendi. Hücreler zeminden ayrılmaya başladığında pipetaj yapılarak elde edilen hücre süspansiyonu tüplere aktarıldı ve üzerine 1-2 ml serumlu besiyeri eklenmek suretiyle tripsinin etkisi durdurulan

süspansiyon ivmesi 300 G'ye ayarlı santrifüjde 3-5 dakika süreyle çevrildi. Tripsinli üst sıvı pipet yardımıyla uzaklaştırıldı, tüpte kalan hücre çökeltisi üzerine, yoğunluğuna göre 3-5 ml taze besiyeri ilave edildi. Hücre sayımı yapılarak, tabanlarına yuvarlak lameller yerleştirilmiş 12 ve 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekim yapıldı. Bu kuyucukların tabanına, kompozit greft parçaları (SmartBone, Industrie Biomediche Insubri SA (IBI), Via Cantonale 67, 6805 Mezzovico-Vira, Switzerland) eşit oranda bölünerek steril bir prob ile yerleştirildi. Materyal üzerine ekim yapılacak çalışma grupları oluşturuldu ve her grup süresine uygun olarak bekletilmek üzere 37°Clik CO<sub>2</sub> inkübatörüne yerleştirildi.

Çalışma grupları 12 kuyucuklu kültür tabakalarına 24, 48, 72 saat ve 1 haftalık deney grupları şeklinde hazırlandı. Her kuyucukta yaklaşık 8x10<sup>3</sup> HUVEC, 15x10<sup>3</sup> dental pulpa, 20x10<sup>3</sup> Gingiva, 62x10<sup>3</sup> 3T3 hücresi kullanıldı.(Şekil 3-1) Tabakaların üzerine kompozit greftler yerleştirildi. Elektron mikroskobu incelemesi için 6 kuyucuklu kültür tabakasına pulpa ve fibroblast hücreleri lamel olmaksızın ekildi, ortama greftler yerleştirildi.

| HUVEC   | HUVEC   | HUVEC   |
|---------|---------|---------|
| Pulpa   | Pulpa   | Pulpa   |
| 3T3     | 3T3     | 3T3     |
| Gingiva | Gingiva | Gingiva |

### 3.7. Hücrelerin Fiksasyonu

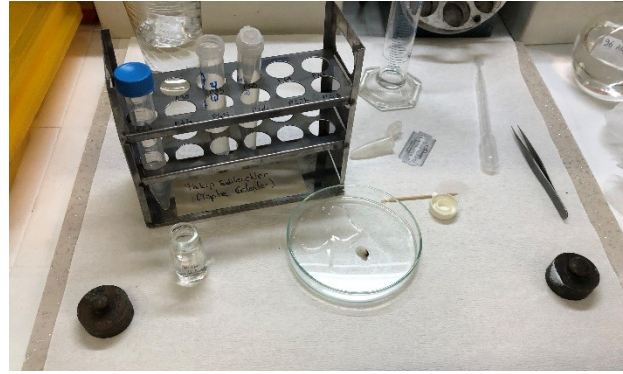
Deney süreleri tamamlanan gruplar CO<sub>2</sub> inkübatöründen çıkartılarak mikroskop altında incelendi, fotoğraflandı. Kuyucuklar içindeki besiyeri pipet yardımıyla çekilerek, tabana yapışık greft ve hücreler kuyucuk içinde bırakıldı. Fosfat tamponu (PBS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) içinde %70 alkol çözeltisi, pipet ile kuyucuklara konulup 10 dakika bekletildi. Fiksasyon sağlandıktan sonra alkol pipetle çekildi; kuyucuklara PBS eklenerek immünositokimyasal boyama yapılmak üzere +4°C de saklandı.

### 3.8. Hücrelerin Geçirimli Elektron Mikroskobu Görüntülemesi İçin Hazırlanması

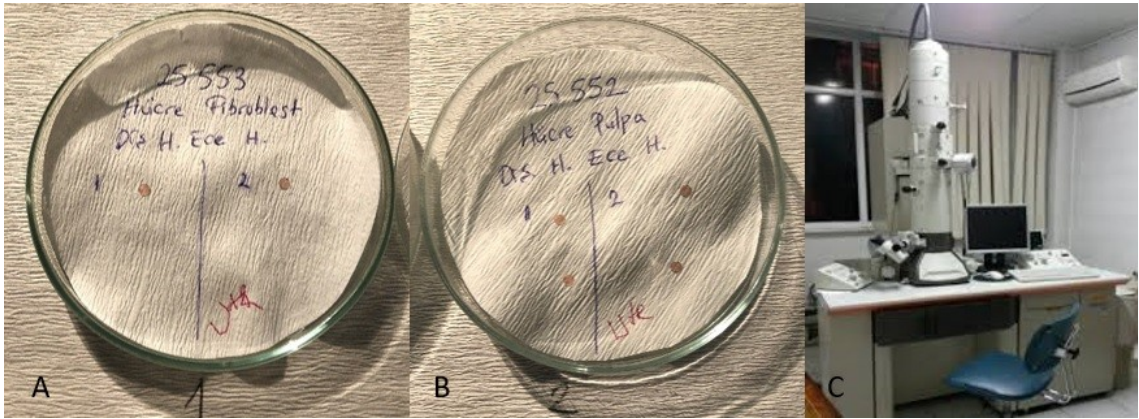
Elektron mikroskobunda değerlendirme için hazırlanan ve 72 saat kültüre edilen altılı kuyucuktaki besiyeri pipetle çekildi. Kuyucuklar fosfat tamponu ile yıkandı. %3 lük tripsin solüsyonu eklenerek CO<sub>2</sub> inkübatöründe kontrollü biçimde 3-5 dakika

bekletildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı mikroskop altında gözlendiğinde, pipet yardımıyla tüplere alındı ve ivmesi 300G'ye ayarlı santrifüjde 3 dakika süreyle çevrildi. Çöken hücrelerin üzerindeki tripsin, pipet yardımıyla alındı. Pellet üzerine PBS konularak bir kez daha 3 dakika santrifüj edilmek suretiyle yıkama gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası çökelti üzerindeki PBS alınarak, yerine PBS içerisinde hazırlanan %2,5 gluteraldehit çözeltisi kondu ve pipetajla tüm hücrelerin tespiti sağlandıktan sonra tüpler +4°C de 30 dakika süreyle bekletildi. Buzdolabından çıkarılan tüpler 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı çekilerek yerine PBS konuldu ve +4°C de 24 saat bekletildi.

Bir gün boyunca bekletilen tüplerdeki PBS, pipet yardımıyla çekildi, hücre çökeltisi üzerine distile su ile hazırlanmış %1'lik osmik asit çözeltisi kondu ve pipetajla süspansiyon haline getirilen hücreler +4°C de 1 saat bekletildikten sonra 300G'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi ve sonrasında üst sıvı uzaklaştırıldı. Çökelti üzerine 2.5 ml distile su konulup 5 dakika santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırıldı. Su- uranil asetat karışımı 4/1 oranında hazırlanarak tüpe eklendi, +4°C de 20 dakika bekletildi, 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı pipetle alındı ve distile su ile 5 dakika daha santrifüj edildi. Distile su çekildikten sonra kağıt filtreden geçirilerek süzölmüş olan yumurta akı eklenmek suretiyle oluşturulan karışım Eppendorf tüpler içerisine alındı, 5 dakika süreyle 300G'de santrifüj edildi. Yumurta akının fazlası uzaklaştırılarak çökelti üzerine %70lik alkol tüp kenarından sızdırma şeklinde eklenerek 48 saat +4°C de bekletildi. Bu süre sonunda yumurta akının üzerindeki alkol pipetle çekildi, yumurta akı ve hücreler ince bir spatula ve bistüri yardımıyla ayrılarak 3 parçaya bölündü ve cam tüpler içerisine %70 alkol konularak rotatorda 10 dakika bekletildi ve üzerindeki alkol çekilerek yerine %90 alkol konuldu ve 10 dakika daha bekletildi. Daha sonra, %90'lık alkol, %100 alkol ile değiştirilerek 10 dakika daha beklendi. Ardından aynı işlem %100'lük alkol ile iki kez tekrarlandı ve iki defa da %100'lük propilen oksit içerisinde 10'ar dakika bekletildi. Bu aşamanın ardından alkol çekilerek 1-1 oranında propilen alkol-epon karışımında 1 saat bekletildi. Propilen oksit-epon oranı 3-1 olacak şekilde işlem tekrarlanıp 1 saat daha beklendi. Eklenen karışım alındıktan sonra saf Epon içinde bir saat daha bekletilen hücreler şeffaf tüplere gömülerek, 45 °C'ye ayarlı etüv içerisinde 18 saat süreyle polimerizasyon gerçekleştirildi.



**Şekil 3-8 Yumurta akı içerisindeki hücrelerin elektron mikroskobuna hazırlanması.**



**Şekil 3-9 (A) Polimerizasyonu tamamlanmış ve kesilmiş 3T3 hücre grubu elektron mikroskobu kesitleri. (B) Polimerizasyonu tamamlanmış ve kesilmiş dental pulpa hücre grubu elektron mikroskobu kesitleri. (C) Elektron mikroskobu.**

### **3.9. Hücrelerin İmmünohistokimyasal Değerlendirme İçin Hazırlanması**

Bu çalışmada; hücrelerin endotelial karakterizasyonun tespiti için CD31 antikor (ABCAM, Cambridge, Birleşik Krallık), P-Selectin antikor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) ve osteoblastik farklılaşma tespiti için; RUNX2 antikor (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Teksas, ABD) primer antikor olarak kullanıldı. İmmünohistokimyasal boyama için kuyucukların dibindeki lameller dışarıya çıkartılarak PBS ile 3 defa 5 er dakika dikkatli biçimde yıkandı. Blok solüsyonunda (Lab Vision™ UltraVision™ Large Volume Detection System: anti-Polyvalent, HRP, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) 5 dakika bekletildi. Blok solüsyonu uzaklaştırılarak 1/1000 oranında primer antikor içerisinde +4°C de bir gece bekletildi. Primer antikordan arındırmak için PBS ile 3 defa 5er dakika yıkandı. 1/1000 seyreltilmiş sekonder antikor içerisinde (Goat Anti-Rabbit IgG H&L

(HRP), ABCAM, Cambridge, UK) 25 dakika bekletildi. Antikor uzaklaştırılıp, 3 defa PBS ile 5 er dakika yıkandı. Streptavidin Peroksidaz solüsyonunda (Lab Vision™ UltraVision™ Large Volume Detection System: anti-Polyvalent, HRP, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) 25 dakika bekletildi. Solüsyondan çıkartılıp 3 defa 5er dakika PBS ile yıkandı. AEC kromojen (Ultravision detection system Large volume AEC Substrate System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) 1/100 oranında seyreltilerek uygulandı. Kontrol gruplarından referans alınarak P-selektin grubu 13 dakika, Runx2 grubu 14 dakika, CD31 grubu ise 20 dakika bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için distile su ile 3 defa 5 er dakika yıkandı. Mayer hematoksilin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) içerisinde 30 saniye bekletildi. Musluk suyunda daldırma yöntemiyle yıkandı. Lam üzerine yerleştirilen lameller su bazlı kapatıcı (Lab Vision™ Vision Mount, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) ile kapatıldı. Lamelin çevresi bütül asetat içerisinde çözölmüş nitroselüloz ile



çevrildi.

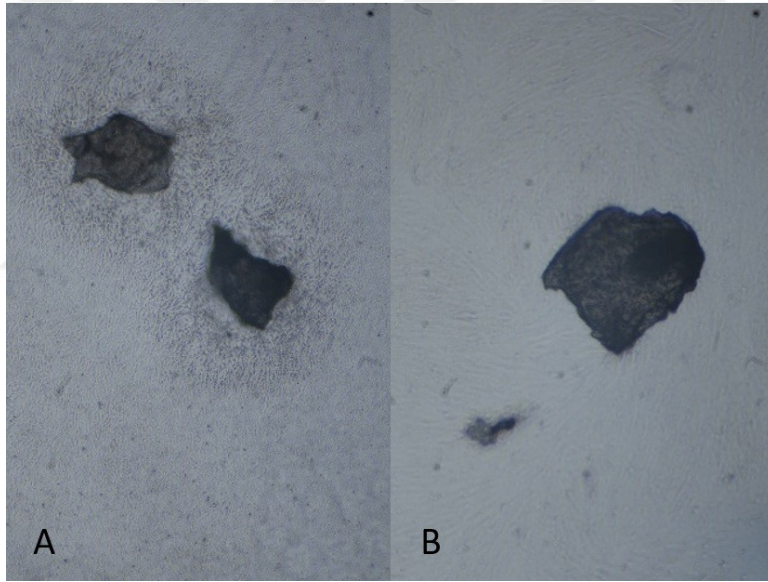
**Şekil 3-10 (A) CD31 antikor. (B) P-selektin antikor. (C) RUNX2 antikor. (D) Blok solüsyonu, Sekonder antikor, Streptavidin Peroksidaz. (E) Sekonder antikor. (F) AEC Kromojen. (G)Su bazlı kapatıcı. (H) ışık mikroskobu için hazırlanmış lamalar.**



#### 4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen dental pulpa hücreleri 18-35 yaş arası bireylerden seçilmiştir. Toplanan örnekler arasında 18-22 yaş arası bireylerden alınan pulpa ve gingiva dokusu hücreleri in-vitro kültür şartlarında canlılığını korurken, 25-35 yaş arası bireylerden alınan dokulardan elde edilen hücreler canlılığını yitirmiş ve çalışmaya katılamamıştır.

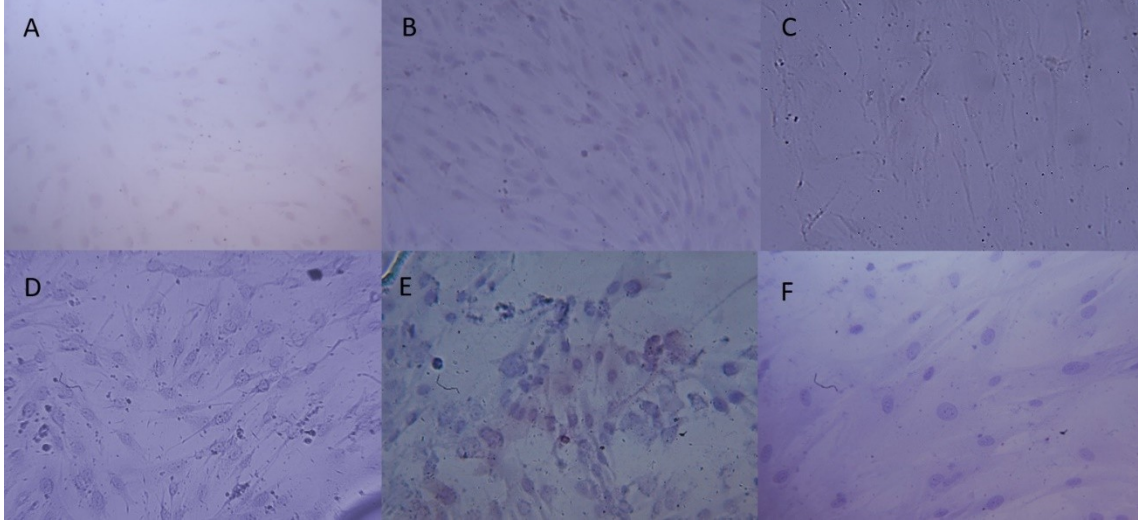
Oluşturulan monolayer kültür ortamında 24 saatte ışık mikroskobu altında yapılan incelemeye göre 3T3 hücre grubunda bir değişikliğe rastlanmamıştır. 1. haftada yapılan incelemede 3T3 hücrelerinin belirgin biçimde greft materyalinin etrafına toplandığı görülmüştür.



**Şekil 4-11 1. Haftada hücrelerin ışık mikroskobu fotoğrafları A)3T3 hücrelerinin kompozit materyal çevresinde kümелendiğı görülmektedir. B) Kompozit materyalin yakın çevresindeki ve temas halindeki pulpa hücrelerinin zemine tutunarak çoğaldığı görülmektedir.**

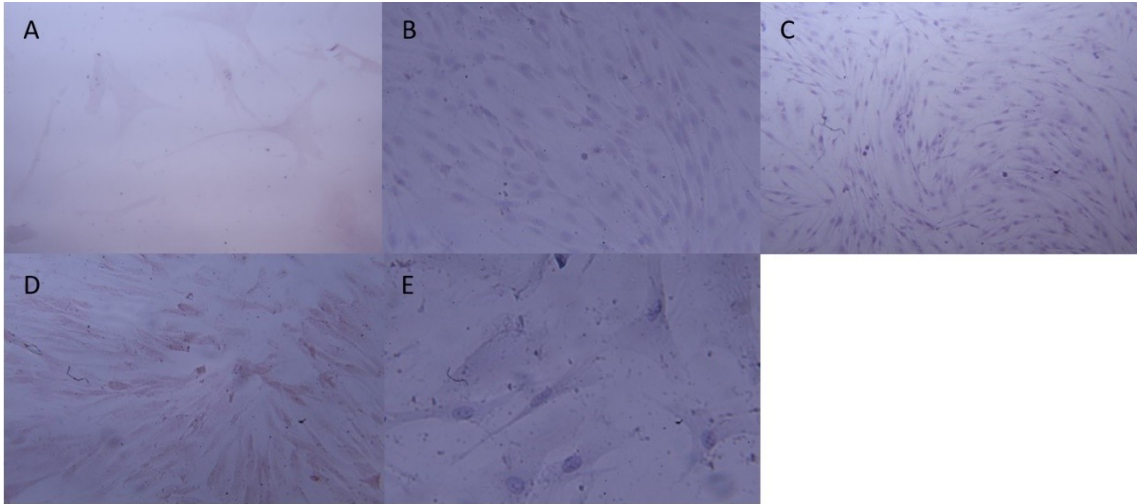
İmmünohistokimyasal analiz sonuçları:

Pulpa hücrelerinde endotelial farklılaşma potansiyelini incelemek için oluşturulan 24 saat, 48 saat,72 saat ve 1 haftalık gruplardaki hücrelerin sitoplazmalarında CD31 ile kırmızı boyanma görölmezken, 96 saatte bölgesel olarak (+) boyanmıştır.(Şekil 4-2)



**Şekil 4-12 CD31 ile boyanmış pulpa hücrelerinin ışık mikroskobu fotoğrafları. A) 24 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; B) 48 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; C) 72 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; ; D) 96 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; E) 96 saat inkübasyon grubunda bölgesel ve hafif boyanma gösteren hücrelerin bulunduğu görülmektedir. F) 1 hafta süreli inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı görülmektedir.**

Pulpa hücrelerinde endotelyal farklılaşma potansiyelini incelemek için oluşturulan 24 saat, 48 saat, 72 saat ve 1 haftalık gruptaki hücrelerin sitoplazmalarında p selektin ile boyanma görülmezken, 96. saatte soluk (+) boyanmıştır.

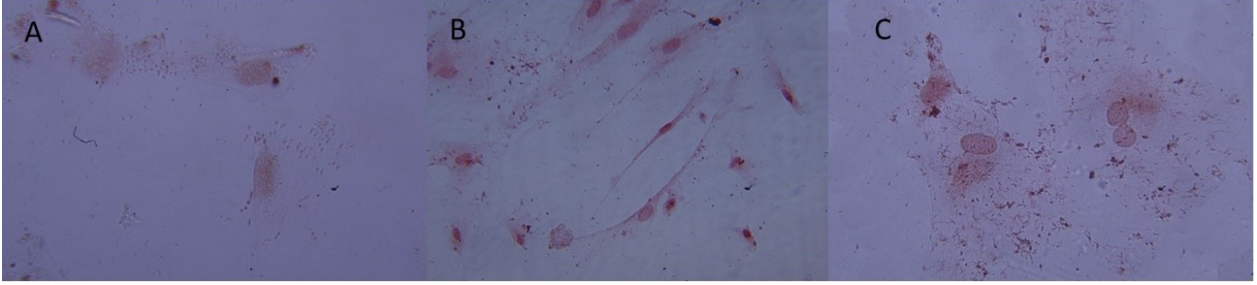


(Şekil 4-3)

**Şekil 4-13 P-selektin ile boyanmış pulpa hücrelerinin ışık mikroskobu fotoğrafları. A)24 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; B)48 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; C)72 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı D)96 saat inkübasyon grubunda yaygın boyanma gösteren hücrelerin bulunduğu**

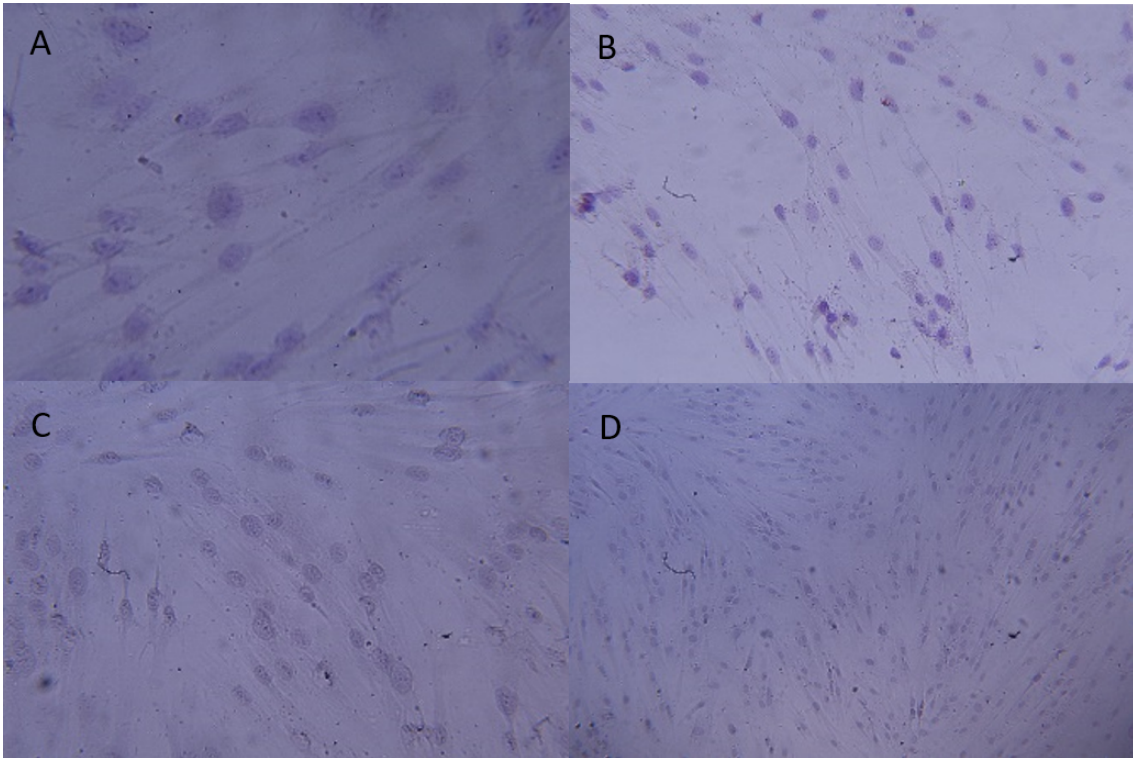
**görülmektedir. E)1 hafta inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı görülmektedir.**

Pulpa hücrelerinde osteoblastik farklılaşma potansiyelini incelemek için oluşturulan 72 saat,96 saat ve 1 haftalık gruplardaki hücrelerin çekirdekleri Runx2 ile boyanmıştır. (Şekil 4-4)



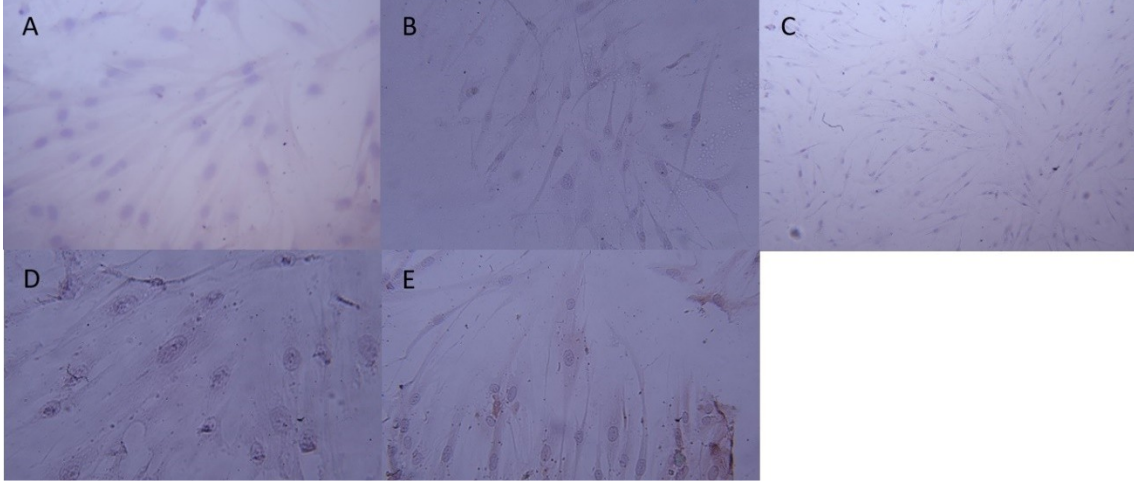
**Şekil 4-14 Runx2 ile boyanmış pulpa hücrelerinin ışık mikroskobu fotoğrafları. A)72 saat inkübasyon grubunda hücrelerde yaygın boyanma olduğu; B)96 saat inkübasyon grubunda hücrelerde yaygın boyanma olduğu; C)1 hafta inkübasyon grubunda hücrelerde yaygın boyanma olduğu görülmektedir.**

Gingiva hücrelerinde endotelial farklılaşma potansiyelini incelemek için oluşturulan 48 saat,72 saat,96 saat ve 1 haftalık gruplardaki hücrelerin sitoplazmaları CD31 ile boyanmamıştır. (Şekil 4-5)



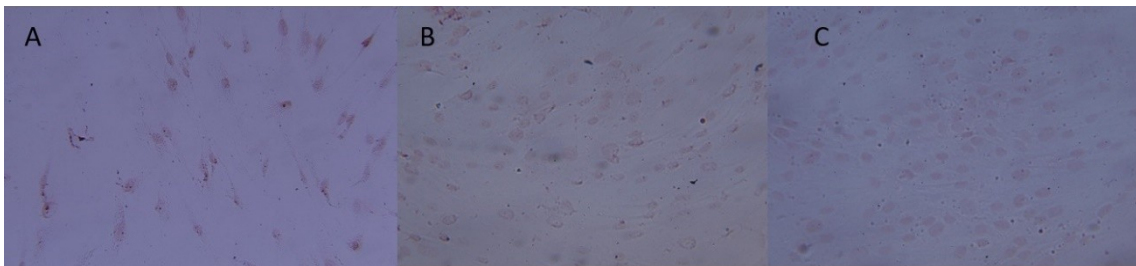
**Şekil 4-15 CD31 ile boyanmış gingiva hücrelerinin ışık mikroskobu fotoğrafları. A) 48 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; B)72 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; C)96 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; D)1 hafta inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı görülmüştür.**

Gingiva hücrelerinde endotelial farklılaşma potansiyelini incelemek için oluşturulan 24 saat,48 saat,96 saat gruplarındaki hücrelerin sitoplazmalarında p selektin ile boyanma görülmezken, 72 saat ve 1 haftalık gruplarda soluk (+) boyanma izlenmiştir.(Şekil 4-6)



**Şekil 4-16 P-selektin ile boyanmış gingiva hücrelerinin ışık mikroskobu fotoğrafları.(A)24 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; (B)48 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; (C)72 saat inkübasyon grubunda bölgesel ve hafif boyanma gösteren hücrelerin bulunduğu; D)96 saat inkübasyon grubunda boyanmanın olmadığı; (E)1 hafta inkübasyon grubunda bölgesel ve hafif boyanma gösteren hücrelerin bulunduğu görülmüştür.**

Gingiva hücrelerinde osteoblastik farklılaşma potansiyelini incelemek için oluşturulan 72 saat, 96 saat ve 1 haftalık gruplardaki hücrelerin çekirdekleri Runx2 ile boyanmıştır. (Şekil 4-7)



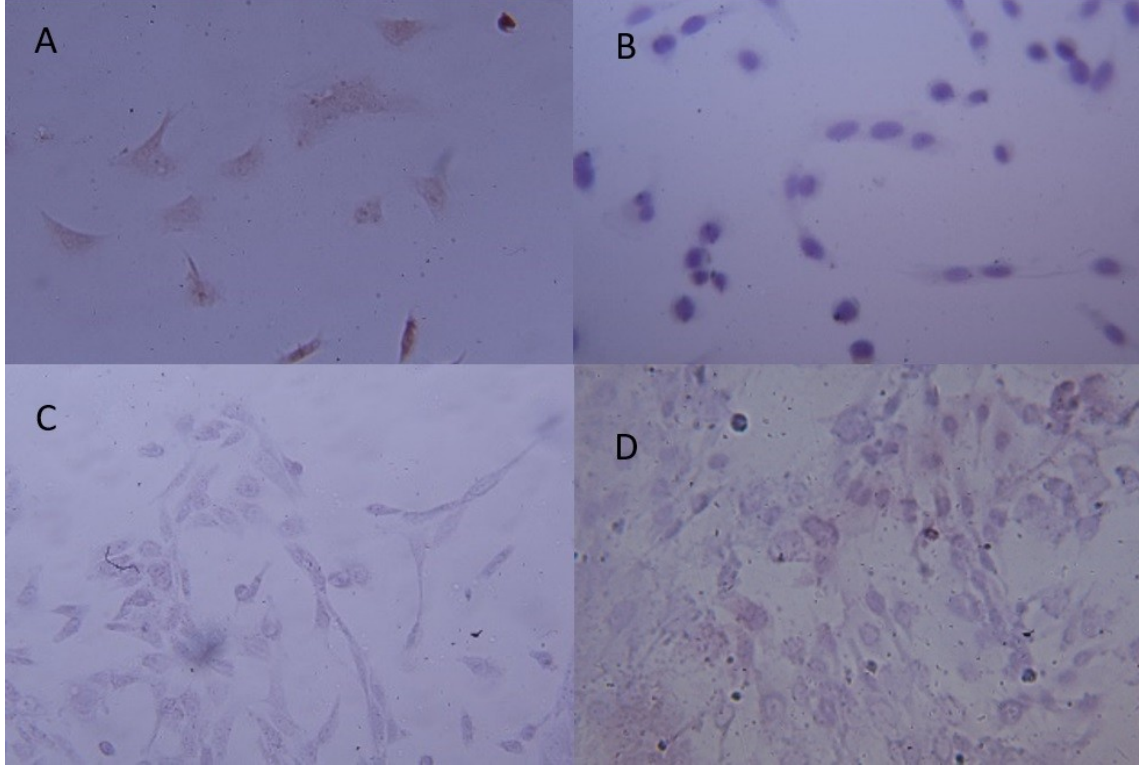
**Şekil 4-17 Runx2 ile boyanmış gingiva hücrelerinin ışık mikroskobu fotoğrafları. A)72 saat inkübasyon grubunda hücrelerde yaygın boyanma olduğu; B)96 saat inkübasyon grubunda hücrelerde yaygın boyanma olduğu; C)1 hafta inkübasyon grubunda hücrelerde yaygın boyanma olduğu görülmektedir.**

Kontrol grubu olarak oluşturulan insan göbek kordonu ven endotelial hücrelerinin sitoplazmaları 24 saat ve 48 saat gruplarında CD31 ile, 48 saat grubunda p selektin ile soluk (+) boyanmıştır. (Şekil 4-8)

Kontrol grubu olarak oluşturulan 3T3 hücreslerinin sitoplazmaları 48 saat ve 72 saat saatlik gruplarda p selektin ile boyanmamıştır. (şekil 4-8)

Kontrol grubu olarak oluşturulan 3T3 hücreslerinin sitoplazmaları 24 saat grubunda CD31 ile boyanmamıştır. (şekil 4-8)

Kontrol grubu olarak oluşturulan 3T3 hücreslerinin çekirdekleri 72 saatlik grupta Runx2 ile boyanmamıştır. (şekil 4-8)



**şekil 4-18 Kontrol grubu fotoğrafları. A) 48 saat HUVEC inkübasyon grubunda p-selektin antikoruyula yaygın boyanmanın olduğu; B) 24 saat 3T3 inkübasyon grubunda CD31 antikoruyula boyanmanın olmadığı; C) 72 saat 3T3 p-selektin antikoruyula boyanmanın olmadığı; D) 72 saat 3T3 inkübasyon grubunda Runx2 antikoruyula boyanmanın olmadığı görülmüştür.**

#### **Elektron mikroskobu bulguları:**

Pulpa ve 3T3 hücreleri 72 saatlik kültürün ardından elektron mikroskobunda incelenmiştir. Elektron mikroskobu incelemelerinde hücreler zemine tutunmalarını takiben tripsinle işleme tabi tutularak yüzeyden ayrılmış ve elektron mikroskobu incelemesi için hazırlanmış olmasına rağmen, kesitlerde yer yer kümelandıkları görülmektedir. Pulpa hücrelerinde hücreler küçük gruplar halinde görülrken, 3T3 hücrelerinin kesitlerde soliter konumlandıkları izlenmiştir.(şekil 4-10)

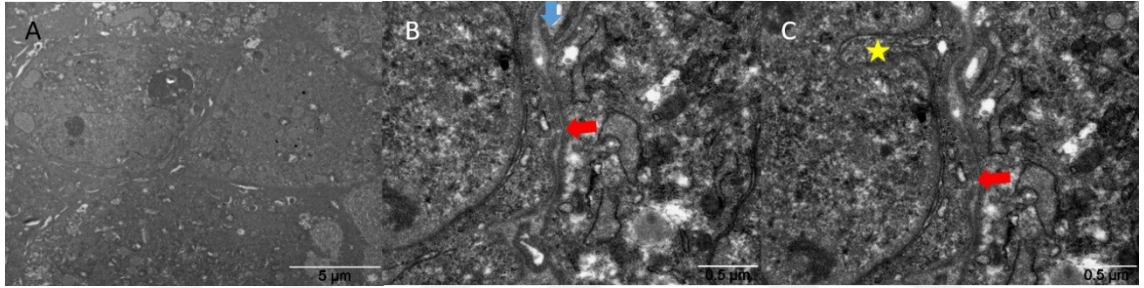
Pulpa hücrelerinin oluşturduğu gruplarda hücreler arasında desmozom ve sıkı bağlantı komplekslerinin bulunduğu görülmüştür. (Şekil 4-9)

Pulpa hücrelerinde yer yer sitoplazma ve çekirdek zarında protrüzyonlar izlenmiştir. (Şekil 4-10)

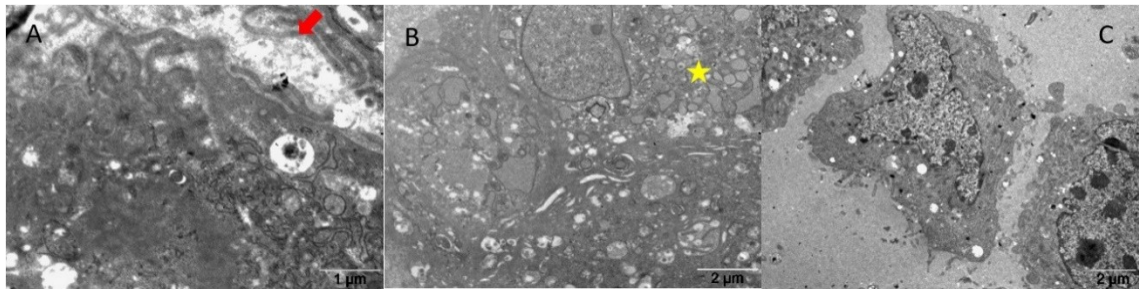
Pulpa hücrelerinde kaba endoplazma retikulumunun sitoplazma içinde yaygın dağılım gösterdiği ve sarnıçlarının genişlemiş olduğu gözlenmiştir. (Şekil 4-10)

3T3 hücrelerinin birbirinden ayrı konumlandığı, hücrelerin birbirleriyle bağlantıdan çok temas düzeyinde ilişkili olduğu görülmüştür. (Şekil 4-10)

Bazı bölgelerde 3T3 hücrelerinin bir arada konumlanmasına rağmen hücreler arasında yapısal bağlantı kompleksleri bulunmadığı görülmüştür.



**Şekil 4-9 A) Kümelenmiş durumda izlenen pulpa hücrelerinin, B) desmozom (kırmızı ok) ve sıkı bağlantı noktaları (tight junction) yapılarını C) Çekirdek zarında invajinasyon (yıldız) görülen elektron mikroskobu görüntüleri.**



**Şekil 4-10 (A) Pulpa hücrelerinde endoplazma retikulumu protrüzyonlarını gösteren elektron mikroskobu fotoğrafı. (B) Pulpa hücrelerinde genişlemiş granüllü endoplazma retikulumu sarnıçlarını (yıldız) gösteren elektron mikroskobu fotoğrafı. (C) 3T3 hücreleri arasında tutunma bölgelerinin bulunmadığını gösteren elektron mikroskobu fotoğrafı.**

## 5. TARTIşMA

Kaybedilen organ ve dokuların yerine konulabilmesi için sıklıkla kullanılan otojen greftlerin ve allogreftlerin kullanım sınırlamaları, konuyla ilgili araştırmaların doku mühendisliğine doğru evrilmesine yol açmıştır. Kemik dokusu gibi vaskülarize ve karmaşık dokuların laboratuvarıda üretilebilmesi için hem in-vitro, hem de in-vivo çok aşamalı deneysel modeller kullanılmaktadır.

Günümüzde doku mühendisliği çalışmaları in-vivo ve in-vitro yöntemlerle sürse de; in-vivo çalışmaların ekonomik boyutu ve etik tartışmaları gibi kısıtlayıcı unsurları dikkate alınarak, bu çalışmada in-vitro yöntemler tercih edilmiştir. İn-vitro doku mühendisliği uygulamaları:

- 1) İskele(greft),
- 2) Hücre kültürleri,
- 3) Stimülan faktörlerden oluşmaktadır.

Bir doku mühendisliği düzeneğinde öncelikle kullanılacak iskele materyalinin ön çalışmalarla -hücre canlılığı ve proliferasyonu açısından- değerlendirilmesi gerekmektedir. Klinikte uygulanan mevcut iskele materyallerinin, dezavantajlarını iyileştirmek, biyolojik özelliklerini geliştirmek için son zamanlarda 3. nesil biyomateryaller üretilmiştir. Bu materyaller rezorbe olabilen, hücresel yanıtları stimüle ederek moleküler düzeyde değişimlere neden olabilen materyallerdir. Üçüncü nesil biyomateryaller iskele üzerine -prevaskülarizasyonu stimüle etmek ve hücresele afiniteyi arttırmak için- çeşitli biyoaktif sinyaller, proteinler ve peptitler gibi moleküllerin entegrasyonuıla elde edilmektedir.

Thein-Han ve arkadaşlarının insan göbek kordonu mezenkimal hücrelerinde beş farklı fonksiyonel ajanın etkilerini inceledikleri çalışmalarında, kalsiyum fosfat sement iskele üzerinde RGD, fibronektin, fibronektin benzeri polimer protein (Sigma, St. Louis, MO), ekstrasellüler matriks Geltrex (Thermo Fisher Scitific, ABD) ve insan platelet konsantrasyonu kullanılmıştır. Çalışma gruplarındaki mezenkimal hücrelerde Runx2, alkalen fosfataz, osteokalsin ve kollajen I gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı biçimde yükseldiği bildirilmiştir. Aynı zamanda çalışma gruplarında proliferasyon, osteojenik diferansiyasyonu, hücre tutunurluğu ve mineral sentezinin kontrol grubuna göre belirgin biçimde yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ancak gruplar

arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı gözlemlenmiştir (Thein-Han, Liu et al. 2012).

Chen ve arkadaşları, kalsiyum fosfat sement iskelede insan osteoblast ve HUVEC'lerin ko-kültürünün prevaskülarizasyonu üzerinde RGD'nin etkisini doğrulamak için başka bir çalışma yapmıştır. Çalışma sonrasında RGD peptidinin, hem osteojenik hem de anjiyojenik farklılaşma üzerindeki uyarıcı etkisinden dolayı HUVEC ve osteoblast fonksiyonlarına destek olarak mineralize mikropiller yapıları oluşturduğu bildirilmiştir (Chen, Thein-Han et al. 2014).

Lin ve arkadaşları, kalsiyum fosfat sement iskelede RGD peptitleri entegre etmişler, RGD eklenen grupta kontrol grubuna kıyasla hücre atışmanını ve kemik prevaskülarizasyonunun arttığını bildirmişlerdir (Lin, Huang et al. 2019).

Çalışmamızda, iskele materyali olarak RGD kaplı sığır kemik matriksi/poli(l-laktik-ko-ε-Kaprolakton)/jelatin içerikli kompozit malzeme seçilmiştir. Aynı iskele materyaliyle yapılan çalışmalarda RGD kollojen fragmanların, hücre canlılığını ve materyalin hidrofilik özelliklerini desteklediğini bildirmişlerdir (Jeong, Lee et al. 2008, Pertici, Carinci et al. 2015).

Mayer ve arkadaşları aynı kompozit materyali kullanarak yaptıkları çalışmada, polikaprolakton kaplanmış ksenogreftlerin, standart ksenogreftlere oranla mezenkimal kök hücre canlılığını, organizasyonunu ve proliferasyonunu anlamlı ölçüde arttırdığını bildirmişlerdir (Mayer, Ginesin et al. 2018).

Pertici ve arkadaşlarının MG63 hücre grubu ve inek kondroma hücreleriyle yapılan çalışmasında, aynı greft materyalinin üç boyutlu iskele modelinde de proliferasyonu destekleyici özellikleri olduğunu bildirmişlerdir (Pertici, Müller et al.).

Roato ve arkadaşları adipoz kaynaklı kök hücreleri ve bunların stromal vasküler fraksiyonunu aynı greft materyali üzerinde kültüre etmişlerdir. İki grupta da iskelenin periferinden başlayarak lakünaları dolduran hücre kolonizasyonu ve yeni kemik dokusu oluşumu bildirilmiştir (Roato, Belisario et al. 2018).

Çalışmamızda kullanılan materyalin hücre adhezyonu ve kolonizasyonu üzerindeki etkilerine paralel olarak, greft materyalleri etrafında kümelenmiş 3T3 hücrelerine rastladık. Ancak hücre ve greft materyalinin birlikte ekildiği düşünüldüğünde hücre migrasyon deney düzeneği kurulmadan bu kümelenmenin yöneme bağlı bir bulgu olmadığını söylemek mümkün değildir.

Pertici ve arkadaşlarının çalışmamızda kullanılan iskele materyalini kullanarak yaptıkları çalışmada, materyalin osteoblast hücrelerine iskele görevi görmesinin yanında stromal kök hücrelerin osteoblastik farklılaşmasını indüklediğini bildirmişlerdir (Pertici, Carinci et al. 2015).

Çalışmamızda bu bilgilerle uyumlu olarak dental pulpa ve bukkal gingiva hücrelerinde yaptığımız immunositokimyasal analiz sonucunda, belirgin Runx2 ekspresyonu gözlemledik. Literatürde, çalışmamızda kullandığımız kompozit greft ile yapılmış dental kaynaklı kök hücreler üzerindeki farklılaşmanın incelendiği çalışma bulunmadığından, pilot değerlendirmeyi yapabilmek adına bu çalışmayı gerçekleştirdik.

Klinik pratiğinde kullanılan iskele materyallerinin sınırlamaları bulunmaktadır. Bunlar; özellikle geniş defektlerde yetersiz vaskülarizasyon, yetersiz ya da kötü osseointegrasyon, belirsiz rezorpsiyon zamanı, enfeksiyon ve iskelenin yetersiz sertlik ve dayanıklılığı olarak sıralanabilir. Yetersiz neovaskülarizasyon ve oksijenlenme, yetersiz beslenmeye ve dolayısıyla hipoksi ve hücre ölümüne sebep olacağından, çalışmaların en kritik hareket noktası olarak görülmektedir (Lin, Huang et al. 2019). Bu konudaki güncel çalışmalar, iskele dizaynı ve in-vitro erken dönem vaskülarizasyonu incelemektedir.

İn-vitro prevaskülarizasyonu incelemek için Mishra ve arkadaşları, insan mezenkimal kök hücrelerini ve insan umbilikal ven endotelial hücrelerini poli (propilen fumarat)/fibrin kompozit yapı iskelesinde kültüre ettikten sonra, immün yetmezliği bulunan farelerde implantasyon sonrası vasküler ağ oluşumunun gerçekleştiğini bildirmişlerdir (Mishra, Roux et al. 2016).

Zhang ve arkadaşlarının içi boş kanallardan oluşan silikat biyoseramik yapı iskelesi imal ettikleri çalışmada üç boyutlu baskı tekniği kullanılmıştır. Bu yapı iskelesi biyoaktif iyon üretiminin yanı sıra, ko-kültür sisteminde hücre göçü ve damar oluşumu için mikrokapiller yapılar oluşturmuştur. Tavşan radius defektine implante edildiğinde ise, erken vaskülarizasyonu, kemik rejenerasyonunu ve remodelingi geliştirdiği rapor edilmiştir (Zhang, Feng et al. 2017). Bu nedenle, doğru iskele seçimi ve in-vitro prevaskülarizasyona odaklanmak, anjiyogenez ve kemik rejenerasyonunu teşvik etmek için umut verici bir yaklaşımdır.

Kök hücreler rejeneratif tıp çalışmalarının, iskele materyalleri ile birlikte, en sık kullanılan bileşenidir. Embriyonik kök hücrelerin kullanımı hakkındaki etik tartışmalar ve teratom oluşum riski dikkate alındığında, doku mühendisliği çalışmalarında

mezenkimal kök hücrelerin kullanımı tercih edilmektedir (HAKERİ 2006, Murray, Garcia-Godoy et al. 2007).

Mezenkimal kök hücrelerin osteointegrasyon üzerindeki etkilerinin incelendiği 20 hasta üzerinde yapılan çalışmada; bilateral sinus lift işlemi sırasında tek tarafta kontrol grubu olarak yalnızca kortikokansellöz kemik grefti, çalışma grubunda greftle birlikte kültüre edilmiş kemik iliği kaynaklı kök hücre konsantrasyonu kullanılmıştır. Gruplardan 3. Ayda toplanan örnekler histolojik olarak değerlendirildiğinde, çalışma grubunda daha iyi histolojik entegrasyon potansiyeli gösteren, otojen grefte benzer histolojik morfolojiye rastlanmıştır (Bertolai, Catelani et al. 2015).

Kök hücrelerin bulundukları mikro çevreye ve bölgesel gerekliliklere göre farklılaşma özelliği taşıdığı bilinmektedir. Bunun yanında kök hücrelerin izole edildikleri alana bağlı spesifik özellikler taşıdığı da gösterilmiştir (Akintoye, Lam et al. 2006). Bu bilgiler; oral bölgenin onarımı için kullanılacak kök hücrelerin yine aynı bölgeden seçilmesi düşüncesini doğurmuştur. Ağız ve çevre dokularının barındırdığı çeşitli kök hücre kaynaklarının içerisinde yetişkin insanlarda elde edilmesi en kolay olanlar ise; gingival ve dental pulpa kaynaklı kök hücrelerdir.

Jin ve arkadaşları, dental pulpa ve adipojenik kökenli kök hücrelerin kemik oluşturma kapasitelerini in-vitro ve in-vivo koşullarda karşılaştırmışlardır. Dental kaynaklı kök hücrelerin gelişmiş koloni oluşturma, proliferasyon, göç kabiliyetinin olduğu ve daha fazla vasküler endotel büyüme faktörü ve yüksek anjiyogenetik gen ekspresyonu potansiyellerinin bulunduğu bildirilmiştir (Jin, Yuan et al. 2019). Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda gingival ve dental pulpa kök hücrelerinin kullanımı tercih edilmiştir. Hücrelerin elde edilmesinden önce etik kurallar ve Helsinki Deklarasyonu dikkate alınarak etik kurul onayı ve hastalardan “Bilgilendirilmiş Onam” alınmıştır.

İnsan göbek kordonu ven endotelyal hücreleri göbek kordonu venlerinden izole edilir. Bu hücreler anjiyogeneze katılmakta, aynı zamanda çeşitli doku rejenerasyon süreçlerinde inflamatuvar yanıtta önemli bir rol oynamaktadır (Thein-Han, Liu et al. 2012).

Çalışmamızda kullanılan HUVEC’lerin in-vitro yaşam süresi primer hücrelere oranla belirgin oranda düşük olduğundan, diğer hücre gruplarına oranla düşük hücre yoğunluğu ve daha kısa pasaj aralıklarıyla çalışılmıştır.

İnsan göbek kordonu ven endotelial hücrelerinin saflaştırılmış dizilerinin elde edilebilmesi için yapılan karakterizasyon çalışmalarında CD31 belirteci kullanılmaktadır (Browning, Halligan et al. 2012).

Çalışmamızda antikorların doğru yanıtını kontrol etmek amacıyla insan göbek kordonu ven endotelial hücreleriyle CD31 antikorunun immünohistokimyasal analizi sonucu, literatürle benzer sonuçlar elde edilmiştir.

P-selektin endotel hücrelerinde Weibel-Palade cisimciklerinin membranında bulunur ve çeşitli stimulanlarla hücrenin aktive edilmesi durumunda eksprese edilir (Kameda, Morita et al. 1997).

Çalışmamızda kontrol grubu olarak kompozit greft materyali üzerinde kültüre edilen insan göbek kordonu ven hücrelerinde, 96. saatte p-selektin eksprese edildiği gözlemlenmiştir.

Böhrnsen ve H Schliephake'in; normal kültür koşullarında Runx2 ekspresyonu yapmadığı düşünülen insan göbek kordonu ven endotelial hücrelerinin monokültüründe ve kemik iliği kök hücreleriyle transwell kültüründe oldukça düşük miktarda Runx2 ekspresyonu gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada yalnız başına kullanılan insan göbek kordonu ven endotelial hücrelerinde belirgin oranda yüksek CD31 ekspresyonu bildirilmiştir (Böhrnsen and Schliephake 2016).

Çalışma grubumuzdaki insan göbek kordonu ven endotelial hücrelerinin Runx2 ekspresyonu, anlamlı sonuçlar elde edilemeyeceğinden antikorun maliyet/yarar verimliliğini koruyabilmek amacıyla, çalışılmamıştır. HUVEC'lerin osteojenik mekanizmalar üzerindeki etkileri, mezenkimal hücrelerle ko-kültürleri ya da çeşitli hücre kültür düzenekleri kullanılarak araştırılmalıdır.

Dental pulpa dokusunun nöral ve vasküler yapısının ışık levha mikroskobu ile incelendiği çalışmada, dental pulpa dokusu bir bütün halinde hidrojel içerisine işlenmiş CD31 ile boyanmıştır. Pulpa dokusunun tamamında mikrovasküler yapılar etrafında konumlanmış CD31+ hücrelere rastlanmıştır (França, Riggers et al. 2019).

Dental pulpa kaynaklı hücrelerin yan hücre popülasyonları CD31 ekspresyonuna bağlı olarak, CD31+ ve CD31- fraksiyonlarına ayrıldığında; CD31- fraksiyonunun kök hücre belirteçlerini CD31+ fraksiyona göre daha yüksek oranda eksprese ettiği, ayrıca anjiyogenez ve nöralizasyon için yüksek indüktif kapasiteye sahip olduğu bildirilmiştir (Hosoya and Nakamura 2015).

Tomaszewska ve arkadaşları, dental pulpanın immün karakterizasyonunun incelendiği çalışmalarında pulpa boynuzlarında daha yüksek olmak üzere pulpanın normal koşullarda CD31 ekspresyonu yaptığını bildirmiştir (Tomaszewska, Miskowiak et al. 2013).

Nam ve arkadaşları ise, dental pulpa kök hücrelerini izole ederek immünkarakterizasyonunu yapmışlar ve dental pulpa kök hücrelerinin tek başlarına CD31 ile boyanmadığını bildirmişlerdir (Nam, Kim et al. 2017).

Lindroos ve arkadaşlarının dental kaynaklı kök hücrelerin karakterizasyonunu yaptığı çalışmalarında normal kültür koşullarında dental pulpa hücrelerinde istatistiksel anlamlı bir CD31 ekspresyonu tespit edilemediğini ve bunun da hücrelerin hematopoietik ve anjiogenik kökenleri bulunmamasıyla ilgili olduğunun düşünüldüğünü bildirmişlerdir (Lindroos, Mäenpää et al. 2008).

Biz çalışmamızda dental pulpa dokusunun 96 saat dışındaki tüm gruplarda CD31- olduğunu gözlemledik. Bu boyanmanın izole olmayan hücre grubundaki endotel hücrelerinden kaynaklandığı düşünülebileceği gibi, gingival hücrelerde olduğu gibi geç dönem endotelial farklılaşmayı da gösterebilir. Dental pulpa hücrelerinin kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanımı için umut vadeci olduğu ancak çalışmamızda replikat yapılamadığından bu alanda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu düşünülmüştür.

Dental pulpa stromal ve STRO-1 pozitif hücrelerinin ko-kültürlerinin kontrol grubu-Dulbecco'nun modifiye minimum esansiyel medyumunu- tek katmanlı ve üç boyutlu matrigel iskele içerisinde VEGF ve endotelial büyüme medyumuna eklenmiş gruplar incelenmiştir. Üç boyutlu ve tek katmanlı matrigel iskelelerde CD31+ boyanmış gruplar görülmüştür. Tek katmanlı grubun aksine üç boyutlu matrigel iskele üzerinde VEGF kullanılan grupta 7. günde damar benzeri tubuler yapılar izlenmiştir (Al-hazaimeh, Beattie et al. 2011 ). Monokültürlere oranla ko-kültürlerin organize yapıların oluşmasında rol oynadıkları ve hücrelerel farklılaşmanın ortam şartlarının değiştirilmesiyle sağlanabileceği düşünülmüştür.

Dental pulpa dokularının p-selektin ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak incelendiği bir çalışmada; yalnızca pulpa merkezindeki kapiller yapıların düşük yoğunlukta boyandığı, inflamasyonlu pulpa dokusunda ise yoğun boyanmanın görüldüğü bildirilmiştir (Sawa, Yoshida et al. 1998).

Bağış ve arkadaşları, diş kesim ve adeziv uygulamalarının pulpa endotelyal belirteçleri üzerindeki etkilerini immünohistokimyasal olarak incelemişler. Sağlam diş pulpalarında, üzerinde işlem yapılan dişlere oranla kapiller alanlarda p-selektin ekspresyonunun %50'ye varan oranda daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (Bagis, Atilla et al. 2007).

Çalışmamızda dental pulpa hücrelerinde, yalnızca 96. saatte p-selektin antikoruyla boyanma gözlenmiştir. Aynı zamanda 72. saat elektron mikroskobu incelemelerinde endotelyal farklılaşmayı düşündüren bulgular gözlemlenmiştir. Çalışmamızda dental pulpa hücreleri izole edilmeden kullanılmıştır ancak, kültür koşullarında endotel hücrelerin yaşam süresinin kök hücrelere oranla daha kısa olması sebebiyle genel olarak p-selektin ekspresyonu yapan endotel hücrelerin kültürde bulunmadığı düşünülmüştür. Bunun yanında Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) analiziyle yapılan çalışmalara oranla immunositokimyasal yöntemlerin hassasiyetinin oldukça düşük olduğu da göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmamızda 72 saat pulpa geçirimli elektron mikroskobu incelemelerinde endotelyal farklılaşmayı işaret eden sıkı bağlantı yapılarına rastlanmıştır. Hücrelerin endotel karakteri gösterdikten sonra yüzey proteinleri eksprese edeceği düşünülebilir. 96. saatte p selektin ve CD31 ile görülen (+) boyanmalar bu mekanizmayla açıklanabilir. Bu konuda kesin sonuçlara ulaşmak için elektron mikroskobu incelemesinde söz konusu tutunma bölgelerinde kadherin benzeri endotelyal farklılaşma belirteçlerinin gösterilmesi ve ekspresyon ya da translasyonu ortaya koyan yöntemlerle çalışılması gereklidir.

Jin ve arkadaşları adipojenik ve dental pulpa kaynaklı kök hücrelerin karakteristik özelliklerini inceledikleri çalışmada, adipojenik kökenli kök hücrelerin daha yavaş büyüdüğünü, ancak daha fazla osteojenik farklılaşma potansiyeline, daha yüksek osteoblastik belirteç genlerin ekspresyonunu ve daha fazla mineral birikimi sergilediğini bildirmişlerdir. 3,5 ve 7. günde Runx2 seviyelerinin iki grupta da günle birlikte arttığı ancak 7. günde adipojenik kökenli kök hücrelerde belirgin oranda artış gösterdiği rapor edilmiştir. Aynı hücre grupları 6 hafta boyunca sıçan mandibular defektine implante edildikten sonra, adipojenik kökenli kök hücreler 1 hafta kadar erken bir zamanda görünür kemik dokusu gelişimi ve DPSC grubuna kıyasla daha hızlı ve daha fazla kemik rejenerasyonunu göstermiştir (Jin, Yuan et al. 2019).

Lindroos ve arkadaşları dental kaynaklı kök hücrelerin osteojenik farklılaşma kabiliyetlerini qRT-PCR ile inceledikleri çalışmada dental pulpa kaynaklı kök hücrelerin Runx2 ekspresyonunun, dental folikül ve pediodontal ligaman kaynaklı kök hücrelere oranla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Lindroos, Mäenpää et al. 2008).

İnsan dental pulpa kök hücrelerinin normal ve osteojenik koşullarda kültüre edilmiş formlarının karşılaştırıldığı çalışmada normal ve osteojenik koşullarda 0. günde Runx2 ekspresyonu görülmezken, 7. günde yükselmiş Runx2 ekspresyonuna rastlanmıştır. 14. günde 7. günle benzer ekspresyon düzeyleri rapor edilirken, 21. günde belirgin oranda artmış Runx2 ekspresyonu gözlemlenmiştir. Mineralizasyon ve diferansiyasyona bağlı olarak 28. günde Runx2 ekspresyonu belirgin ölçüde azalmıştır. 14. gün hariç osteojenik farklılaşma medyumunda olan hücrelerde Runx2 ekspresyon seviyelerinin normal medyuma göre yüksek olduğu bildirilmiştir (Gay, Cavender et al. 2014).

Çalışmamızda dental pulpa hücrelerinin 72. saat ve sonrasında çekirdeklerinde Runx2 ile boyanma tespit ettik. Dental pulpa hücrelerinin Runx2 ekspresyonu 24 saatte başlamasına rağmen, seviyeleri 72. saatte tepe noktasına ulaştığından 72. saatten sonra immünohistokimyasal incelemeler yapılmıştır. İmmünohistokimyasal analizler, qRT-PCR yöntemine göre hassasiyeti düşük bir yöntem olduğundan saatler arasındaki Runx2 boyanma değişimi kantitatif olarak ölçülememiştir.

Dental pulpa hücrelerinin biodentin ve mineral trioksit agregat (MTA) ile muamele edilmesi sonucunda mineralizasyon belirteçleri değişiminin izlendiği çalışmada; kontrol grubu ve çalışma grupları arasında 24 saatte anlamlı bir fark görülmezken 48. saatte biodentin ve MTA gruplarında Runx2 ekspresyonunun anlamlı biçimde arttığı bildirilmiştir (Daltoé, Paula-Silva et al. 2016).

Mayer ve arkadaşları; standart sığır ksenogreftleri ve çalışmamızda kullanılan kompozit grefti karşılaştırdıkları çalışmada, 2,20 ve 48. saatte sığır ksenogreft grubunun metabolik aktivitesinde düşüş görülürken, kompozit greft kullanılan grupta belirgin oranda artış görülmüştür (Mayer, Ginesin et al. 2018).

Doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan iskelelerin, mikro çevrenin değişimini sağlayarak farklılaşma ve mineralizasyon sürecini hızlandırdığı düşünülmüştür. Bizim çalışmamızda 72, 96 saat ve 1. haftada gingiva ve pulpa hücrelerinde belirgin Runx2 ekspresyonu gözlemledik. Bunun sebebi olarak gingiva ve

pulpa dokularındaki pluripotent hücrelerin osteoblastik farklılaşmaya yatkın hücreler olması ve ortamda bulunan kompozit greft materyalinin osteoblastik farklılaşmayı indüklediği düşünülmüştür. Pulpa hücrelerinde Runx2 hücre cevabının 72. saatte en yüksek seviyesindeyken, 1. haftaya doğru cevabın azalması beklenmektedir. Pulpa hücrelerinde 1. haftadaki boyanmanın sebebinin, in-vitro ortam koşullarına bağlı olarak hücre döngüsündeki yavaşlama sonucu bazı hücrelerin geç farklılaştığı düşünülmüştür.

Lindroos ve arkadaşları bukkal gingival dokudan alınan örneklerde fibroblastların karakteristik özelliklerini inceledikleri çalışmada, CD31 ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı olmayan ölçülerde olduğunu bildirmişlerdir. Bunun sebebi olarak da hücrelerin anjiogenik ve hematopoietik kökenlerinin olmamasını göstermişlerdir (Lindroos, Mäenpää et al. 2008).

Gingival mezenkimal kök hücreler 1 hafta boyunca endotel hücre büyüme medyumunda fibronektin kaplı lamellar üzerinde kültüre edildiğinde, CD31 ekspresyonu yaptığı ancak, normal koşullar altında hiçbir CD31+ hücre gözlenmediği bildirilmiştir (Zhang, Shi et al. 2009).

Literatürle paralel olarak bizim çalışmamızda da gingival hücreler hiçbir saatte CD31 ile boyanmamıştır. Yapılan literatür taramasında bukkal gingival hücrelerde p-selektinin immünohistokimya ya da qRT-PCR çalışmasına rastlanmamıştır. Biz çalışmamızda 72 saat ve 1 haftalık gruplarda p-selektin(+) hücrelere rastladık. Bu alanda yapılacak çalışmaların sayısının artmasıyla karşılaştırmaların yapılması mümkün olacaktır.

Oktokalsiyum fosfat seramik iskele üzerinde gingiva kaynaklı stromal hücrelerin ve kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin kıyaslandığı çalışmada bu hücrelerin aynı hücre yüzey belirteçlerini eksprese ettiği ve osteojenik hücrelere farklılaşma için aynı kapasiteye sahip olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda gingival hücrelerin elde edilmesi ve toplanması daha ucuzdur ve teknik olarak daha kolaydır (Zorin, Komlev et al. 2014).

Lindroos ve arkadaşları bukkal gingival dokudan alınan örneklerde fibroblastların karakteristik özelliklerini inceledikleri çalışmada, Runx2 ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı olmayan ölçülerde olduğunu bildirmişlerdir (Lindroos, Mäenpää et al. 2008).

Gay ve arkadaşlarının gingival kök hücreleri izole ettiği çalışmada, hücreler normal ve osteojenik kültür koşullarında incelenerek diğer dental kaynaklı kök hücrelerle karşılaştırılmıştır. 0. günde iki grupta da Runx2 ekspresyon seviyesi değişimi

gözlenmezken, 7. günden 21. güne dek artış görülmüştür. Osteojenik kültür koşullarındaki hücrelerin kontrol grubuna göre hafifçe yükselmiş Runx2 seviyeleri, 14 ve 21. günde belirgin biçimde artış göstermiştir. 28. günde mineralizasyon süreçlerinin başlamasıyla azalmış Runx2 ekspresyonu rapor edilmiştir. Gingival kök hücrelerin 7. gün haricinde Runx2 ekspresyon seviyeleri her iki grupta da dental pulpa kök hücrelerinden belirgin oranda yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Gay, Cavender et al. 2014).

Bizim çalışmamızda gingival hücrelerin içerisinde kök hücrelerin ve fibroblastların da bulunduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda 1 haftalık süre maksimum kontrol süresi olarak alınmış ve Gay ve arkadaşlarının çalışmasıyla uyumlu şekilde Runx2 ekspresyonu gözlemlenmiştir. Uzun dönem mineralizasyon ve osteoblastik aktivitenin gözlemlenebilmesi için çalışma süresinin uzatılarak Runx2 yanısıra kemik ya da dentin matris proteinlerinin de ekspresyon seviyelerinin incelenmesi gereklidir.

Deksametazonun gingival kaynaklı kök hücrelerde Runx2 ekspresyonu üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmada deksametazon uygulanmayan kontrol grubunda 2 ve 24. saatte Runx2 eksprese eden hücrelerin varlığı bildirilmiştir (Kim, Kim et al. 2017).

Bizim çalışmamızda antikorun verimli kullanımı için Runx2 ekspresyonunun tepe noktasında olacağını düşündüğümüz 72. saatten itibaren çekirdekte boyanma gözlenmiştir. Çalışmaların karşılaştırılabilmesi için erken dönem Runx2 ekspresyonunun incelendiği başka çalışmaların yapılması gereklidir.

Lee ve Park'ın dimetil sülfoksidin gingival kaynaklı kök hücrelerin Runx2 ekspresyon seviyelerini 1, 3, 5 ve 7. günde immünfloresan boyamayla kontrol etmişlerdir. Dimetil sülfoksit kullanılmayan kontrol grubunda 1, 3, 5 ve 7. günlerde giderek artan yoğunlukta Runx2(+) hücrelere rastlanmıştır (Lee and Park 2019).

Bizim çalışmamızda da bu bilgilerle uyumlu 72.saat, 96. saat ve 1. haftada Runx2(+) hücreler saptanmıştır.

Moshaverinia ve arkadaşları periodontal ligament ve gingival dokulardan izole edilen kök hücreleri RGD içerikli aljinat küreler içerisinde osteojenik medyunda kültüre etmişlerdir. qRT-PCR ile değerlendirilen Runx2 ekspresyon düzeylerinde belirgin artış bildirilmiştir. Ardından bu mikroküreler fare kalvaryal defekt modeline implante edilmiş 8 hafta sonunda kemiksi bir doku oluşturduğu gözlemlenmiştir. Gingival kaynaklı kök hücrelerin osteojenik potansiyeli periodontal ligament kaynaklı

kök hücrelere göre daha düşük bulunmuştur. RGD mikrokürelerin standart kültür koşullarına kıyasla osteoblastik farklılaşma potansiyelini arttırdığı bildirilmiştir (Moshaverinia, Chen et al. 2014).

Bizim çalışmamızda RGD içeren kollajen fragmanları ile kaplanmış ksenogreft ve poli(l-laktik-ko-ε-Kaprolakton) kompozit greft dental pulpa ve bukkal gingiva kaynaklı hücrelerle standart kültür koşullarında kullanılmıştır. 72, 96 saat ve 1. haftada yapılan Runx2 immünohistokimyasal analizinde üç hücre grubunun da Runx2 ile boyandığı ancak 3T3 fibroblast hücrelerinde 72. saatte boyanma olmadığı görülmüştür.

Çalışmamızda gingiva ve pulpa kaynaklı hücrelerinin yüksek osteojenik farklılaşma kapasitesine sahip olduğu sonucuna vardık. Greft materyaliyle yapılan önceki çalışmalar ışığında çalışmamızda kullandığımız greft materyalinin ortam koşullarını osteojenik farklılaşma için müsait hale getirdiği düşünülmektedir. Hücrelerin farklılaşma kapasiteleriyle ilgili daha ayrıntılı sonuçlar elde etmek için farklı osteojenik ve anjiyojenik belirteçlere de bakılması gerekmektedir. Tüm sonuçlarımızın kantitatif değerlendirmesinin yapılabilmesi için qRT-PCR ile antikor ekspresyon seviyelerinin incelenmesi gereklidir.

Literatürde gingiva ve pulpa kaynaklı hücrelerin endotelial potansiyelinin incelendiği yeterince çalışma bulunmamaktadır. Biz de çalışmamızda bu hücrelerin endotelial farklılaşma potansiyellerinin osteojenik farklılaşma potansiyeline göre düşük olduğu sonucuna vardık. Ancak endotelial farklılaşmayı stimüle eden faktörler bulunmamasına rağmen bazı çalışma gruplarında endotelial belirteçlerin pozitif sonuç vermesi umut vaatetmektedir. Daha kapsamlı vaskülarizasyon stratejileri geliştirmek için, in-vitro ortam koşulları değiştirilerek ya da sinyal biyomoleküller eklenerek daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Büyük kemik defektlerinde kemik doku mühendisliği çalışmalarının klinik uygulamalarda sıkça kullanılabilmesi için laboratuvar koşullarında kolaylıkla tam fonksiyonel organize kemik dokusu üretilmelidir. Çalışmamızda monolayer kültürde karakteristikleri incelenen hücrelerle organize kemik dokunun oluşturabilmesi için üç boyutlu kemik iskeleleri kullanılmalıdır. Yapılacak daha kapsamlı çalışmalarla kemik doku mühendisliği alanında dental kaynaklı hücrelerin yeriyle ilgili daha çok bilgi edinilebilecektir.

## KAYNAKLAR

tissue engineering. [Http://www.brainkart.com/article/Tissue-engineering\\_21330/](http://www.brainkart.com/article/Tissue-engineering_21330/).

Akintoye, S. O., T. Lam, S. Shi, J. Brahim, M. T. Collins and P. G. Robey (2006). "Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals." Bone **38**(6): 758-768.

Al-hazaimeh, N. I., J. Beattie, M. Duggal and X. Yang (2011 ). Revascularization of Human Dental Pulp - The clinical reality. IADR,British Division Meeting. Sheffield, England.

Alipour, R., M. Adib, M. M. Karimi, B. Hashemi-Beni and N. Sereshki (2013). "Comparing the immunoregulatory effects of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and bone marrow-derived mesenchymal stem cells." Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology **12**(4): 331-344.

Alongi, D. J., T. Yamaza, Y. Song, A. F. Fouad, E. E. Romberg, S. Shi, R. S. Tuan and G. T. Huang (2010). "Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential." Regenerative medicine **5**(4): 617-631.

Amini, A. R., C. T. Laurencin and S. P. J. C. R. i. B. E. Nukavarapu (2012). "Bone tissue engineering: recent advances and challenges." **40**(5).

Amini, A. R., C. T. Laurencin and S. P. J. J. o. O. R. Nukavarapu (2012). "Differential analysis of peripheral blood-and bone marrow-derived endothelial progenitor cells for enhanced vascularization in bone tissue engineering." **30**(9): 1507-1515.

Anselme, K. J. B. (2000). "Osteoblast adhesion on biomaterials." **21**(7): 667-681.

Augello, A., R. Tasso, S. M. Negrini, R. Cancedda, G. J. A. Pennesi and Rheumatism (2007). "Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis." **56**(4): 1175-1186.

Babuccu, C., N. Keklikoğlu, M. Baydoğan and A. Kaynar (2014). "Cumulative effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on bone repair in rats." International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery **43**(6): 769-776.

Bagis, B., P. Atilla, N. Cakar and U. Hasanreisoglu (2007). "Immunohistochemical evaluation of endothelial cell adhesion molecules in human dental pulp: effects of tooth preparation and adhesive application." Archives of oral biology **52**(8): 705-711.

Bartholomew, A., C. Sturgeon, M. Siatskas, K. Ferrer, K. McIntosh, S. Patil, W. Hardy, S. Devine, D. Ucker and R. J. E. h. Deans (2002). "Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo." **30**(1): 42-48.

Beertsen, W., C. A. McCulloch and J. Sodek (1997). "The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue." Periodontology 2000 **13**(1): 20-40.

Bertolai, R., C. Catelani, A. Aversa, A. Rossi, D. Giannini and D. Bani (2015). "Bone graft and mesenchymal stem cells: clinical observations and histological analysis." Clinical cases in mineral and Bone Metabolism **12**(2): 183.

- Bidarra, S. J., C. C. Barrias, M. A. Barbosa, R. Soares, J. Amédée and P. L. J. S. c. r. Granja (2011). "Phenotypic and proliferative modulation of human mesenchymal stem cells via crosstalk with endothelial cells." *7*(3): 186-197.
- Bongso, A. and E. H. Lee (2005). Stem cells: their definition, classification and sources. Stem Cells: from bench to bedside, World Scientific: 1-13.
- Bongso, A. and M. Richards (2004). "History and perspective of stem cell research." Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology **18**(6): 827-842.
- Bose, S., M. Roy and A. J. T. i. b. Bandyopadhyay (2012). "Recent advances in bone tissue engineering scaffolds." **30**(10): 546-554.
- Böhrnsen, F. and H. Schliephake (2016). "Supportive angiogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells and endothelial cells in monolayer and co-cultures." International journal of oral science **8**(4): 223-230.
- Braddock, M., P. Houston, C. Campbell and P. Ashcroft (2001). "Born again bone: tissue engineering for bone repair." Physiology **16**(5): 208-213.
- Brennan, M. A., J.-M. Davaine, P. J. S. c. r. Layrolle and therapy (2013). "Pre-vascularization of bone tissue-engineered constructs." **4**(4): 96.
- Browning, A. C., E. P. Halligan, E. A. Stewart, D. C. Swan, R. Dove, G. J. Samaranayake and W. M. Amoaku (2012). "Comparative gene expression profiling of human umbilical vein endothelial cells and ocular vascular endothelial cells." British journal of ophthalmology **96**(1): 128-132.
- Buschmann, J., M. Welti, S. Hemmi, P. Neuenschwander, C. Baltes, P. Giovanoli, M. Rudin and M. J. T. e. P. C. Calcagni (2011). "3D co-cultures of osteoblasts and endothelial cells in DegraPol foam: Histological and high field MRI analyses of pre-engineered capillary networks in bone grafts." **17**(3-4): 291-299.
- Byambaa, B., N. Annabi, K. Yue, G. Trujillo-de Santiago, M. M. Alvarez, W. Jia, M. Kazemzadeh-Narbat, S. R. Shin, A. Tamayol and A. J. A. h. m. Khademhosseini (2017). "Bioprinted osteogenic and vasculogenic patterns for engineering 3D bone tissue." **6**(16): 1700015.
- Calori, G. M. and P. V. Giannoudis (2011). Enhancement of fracture healing with the diamond concept: the role of the biological chamber, Elsevier.
- Can, A. (2008). "A concise review on the classification and nomenclature of stem cells." Turk J Hematol **25**(2): 57-59.
- Can, A. (2009). "Kök Hücre Tanımları." Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, Ankara, TÜBA.
- Cao, H. and N. J. B. Kuboyama (2010). "A biodegradable porous composite scaffold of PGA/β-TCP for bone tissue engineering." **46**(2): 386-395.
- Cassell, C. O., O. S. Hofer, W. A. Morrison and K. R. J. B. j. o. p. s. Knight (2002). "Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states." **55**(8): 603-610.
- Cen, L., W. Liu, L. Cui, W. Zhang and Y. Cao (2008). "Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications." Pediatric research **63**(5): 492.

- Chang, A. I. and K. Appasani (2006). "Stem cells & regenerative medicine: from molecular embryology to tissue engineering and therapeutics."
- Chang, Y.-Y., H.-L. Huang, C.-H. Lai, J.-T. Hsu, T.-M. Shieh, A. Y.-J. Wu and C.-L. J. P. o. Chen (2013). "Analyses of antibacterial activity and cell compatibility of titanium coated with a Zr–C–N film." **8**(2): e56771.
- Chen, W., W. Thein-Han, M. D. Weir, Q. Chen and H. H. Xu (2014). "Prevascularization of biofunctional calcium phosphate cement for dental and craniofacial repairs." Dental Materials **30**(5): 535-544.
- Chu, K.-T., S.-F. Ou, S.-Y. Chen, S.-Y. Chiou, H.-H. Chou and K.-L. Ou (2013). "Research of phase transformation induced biodegradable properties on hydroxyapatite and tricalcium phosphate based bioceramic." Ceramics International **39**(2): 1455-1462.
- Ciardelli, G., V. Chiono, G. Vozzi, M. Pracella, A. Ahluwalia, N. Barbani, C. Cristallini and P. Giusti (2005). "Blends of poly-( $\epsilon$ -caprolactone) and polysaccharides in tissue engineering applications." Biomacromolecules **6**(4): 1961-1976.
- Ciombor, D. M. and R. K. Aaron (2005). "The role of electrical stimulation in bone repair." Foot and ankle clinics **10**(4): 579-593.
- Clark, E. R. and E. L. J. A. j. o. a. Clark (1939). "Microscopic observations on the growth of blood capillaries in the living mammal." **64**(2): 251-301.
- Connolly, J. F., R. Guse, J. Tiedeman, R. J. C. o. Dehne and r. research (1991). "Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions." (266): 259-270.
- Cutler, S. M. and A. J. J. B. García (2003). "Engineering cell adhesive surfaces that direct integrin  $\alpha 5 \beta 1$  binding using a recombinant fragment of fibronectin." **24**(10): 1759-1770.
- Daltoé, M. O., F. W. G. Paula-Silva, L. H. Faccioli, P. M. Gatón-Hernández, A. De Rossi and L. A. B. Silva (2016). "Expression of mineralization markers during pulp response to biodentine and mineral trioxide aggregate." Journal of endodontics **42**(4): 596-603.
- Davim, J. P. (2013). Biomedical Composites: Materials, Manufacturing and Engineering, Walter de Gruyter.
- Del Buono, A., R. Papalia, V. Denaro, G. Maccauro, N. J. I. j. o. i. Maffulli and pharmacology (2011). "Platelet rich plasma and tendinopathy: state of the art." **24**(1\_suppl2): 79-83.
- Deng, M., L. S. Nair, S. P. Nukavarapu, S. G. Kumbar, T. Jiang, N. R. Krogman, A. Singh, H. R. Allcock and C. T. J. B. Laurencin (2008). "Miscibility and in vitro osteocompatibility of biodegradable blends of poly [(ethyl alanato)(p-phenyl phenoxy) phosphazene] and poly (lactic acid-glycolic acid)." **29**(3): 337-349.
- Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanese, P. D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti and A. M. J. B. Gianni, The Journal of the American Society of Hematology (2002). "Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli." **99**(10): 3838-3843.
- Ding, D.-C., W.-C. Shyu and S.-Z. Lin (2011). "Mesenchymal stem cells." Cell transplantation **20**(1): 5-14.

- Drexler, K. E. J. P. o. t. N. A. o. S. (1981). "Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation." **78**(9): 5275-5278.
- Duncan, R. and C. Turner (1995). "Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain." Calcified tissue international **57**(5): 344-358.
- Ehrbar, M., V. G. Djonov, C. Schnell, S. A. Tschanz, G. Martiny-Baron, U. Schenk, J. Wood, P. H. Burri, J. A. Hubbell and A. H. J. C. r. Zisch (2004). "Cell-demanded liberation of VEGF121 from fibrin implants induces local and controlled blood vessel growth." **94**(8): 1124-1132.
- Einhorn, T. A. J. J. (1995). "Enhancement of fracture-healing." **77**(6): 940-956.
- Elbert, D. L. J. C. o. i. b. (2011). "Bottom-up tissue engineering." **22**(5): 674-680.
- Emara, K. M., R. A. Diab and A. K. Emara (2015). "Recent biological trends in management of fracture non-union." World journal of orthopedics **6**(8): 623.
- Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney and D. E. J. C. Discher (2006). "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification." **126**(4): 677-689.
- Eşrefoğlu, M. "Genel Histoloji Geliştirilmiş 3. Baskı."
- Fedorovich, N. E., R. T. Haverslag, W. J. Dhert and J. J. T. E. P. A. Alblas (2010). "The role of endothelial progenitor cells in prevascularized bone tissue engineering: development of heterogeneous constructs." **16**(7): 2355-2367.
- Fernández, J., A. Etxeberria and J.-R. Sarasua (2012). "Synthesis, structure and properties of poly (L-lactide-co-ε-caprolactone) statistical copolymers." Journal of the Mechanical Behavior of biomedical Materials **9**: 100-112.
- Ferroni, L., C. Gardin, S. Sivoletta, G. Brunello, M. Berengo, A. Piattelli, E. Bressan and B. Zavan (2015). "A hyaluronan-based scaffold for the in vitro construction of dental pulp-like tissue." International journal of molecular sciences **16**(3): 4666-4681.
- Fibbe, W. (2002). "Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair." Annals of the rheumatic diseases **61**(suppl 2): ii29-ii31.
- França, C. M., R. Riggers, J. L. Muschler, M. Widbiller, P. M. Lococo, A. Diogenes and L. E. Bertassoni (2019). "3D-Imaging of Whole Neuronal and Vascular Networks of the Human Dental Pulp via CLARITY and Light Sheet Microscopy." Scientific reports **9**(1): 1-10.
- Friedenstein, A., R. Chailakhjan and K. Lalykina (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." Cell Proliferation **3**(4): 393-403.
- Friedenstein, A., I. Piatetzky-Shapiro and K. Petrakova (1966). "Osteogenesis in transplants of bone marrow cells." Development **16**(3): 381-390.
- Friel, R., S. Van Der Sar and P. J. Mee (2005). "Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling." Advanced drug delivery reviews **57**(13): 1894-1903.
- García, A. and C. J. J. o. d. r. Reyes (2005). "Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation." **84**(5): 407-413.
- Garkhal, K., S. Verma, K. Tikoo and N. Kumar (2007). "Surface modified poly (l-lactide-co-ε-caprolactone) microspheres as scaffold for tissue engineering." Journal of

Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials **82**(3): 747-756.

Gay, I., A. Cavender, D. Peto, Z. Sun, A. Speer, H. Cao and B. A. Amendt (2014). "Differentiation of human dental stem cells reveals a role for micro RNA-218." Journal of periodontal research **49**(1): 110-120.

Ghanbari, H. and R. J. A. T. i. B. R. Vakili-Ghartavol (2016). "Bone Regeneration: Current Status and Future Prospects." 1.

Gholamrezanezhad, A. (2011). "Stem Cells in Clinic and Research."

Giannoudis, P. V., T. A. Einhorn and D. J. i. Marsh (2007). "Fracture healing: the diamond concept." **38**: S3-S6.

Giannoudis, P. V., T. A. Einhorn, G. Schmidmaier and D. J. I. Marsh (2008). "The diamond concept—open questions." **39**: S5-S8.

Ginani, F., D. M. Soares and C. A. G. Barboza (2015). "Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review." Lasers in medical science **30**(8): 2189-2194.

Goldstein, A. S., T. M. Juarez, C. D. Helmke, M. C. Gustin and A. G. J. B. Mikos (2001). "Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds." **22**(11): 1279-1288.

Grecchi, F., G. Perale, V. Candotto, A. Busato, M. Pascali, F. J. J. o. b. r. Carinci and h. agents (2015). "Reconstruction of the zygomatic bone with smartbone®: Case report." **29**(3): 42-47.

Green Jr, W. T., R. J. J. A. Ferguson and R. O. J. o. t. A. C. o. Rheumatology (1975). "Histochemical and electron microscopic comparison of tissue produced by rabbit articular chondrocytes in vivo and in vitro." **18**(3): 273-280.

Green Jr, W. T. J. C. O. and R. Research (1971). "Behavior of articular chondrocytes in cell culture." **75**: 248-260.

Grellier, M., P. L. Granja, J.-C. Fricain, S. J. Bidarra, M. Renard, R. Bareille, C. Bourget, J. Amédée and M. A. J. B. Barbosa (2009). "The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect." **30**(19): 3271-3278.

Gronthos, S., M. Mankani, J. Brahimi, P. G. Robey and S. Shi (2000). "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(25): 13625-13630.

Haj, J., T. Haj Khalil, M. Falah, E. Zussman and S. J. B. r. i. Srouji (2017). "An ECM-mimicking, mesenchymal stem cell-embedded hybrid scaffold for bone regeneration." **2017**.

HAKERİ, H. (2006). "Kök Hücre Çalışmaları ve Hukuki Boyutu." Türkiye Klinikleri Cerrahi Tıp Bilimleri Dergisi **2**(43): 78-82.

Hakimi, M., P. Jungbluth, M. Sager, M. Betsch, M. Herten, J. Becker, J. Windolf and M. Wild (2010). "Combined use of platelet-rich plasma and autologous bone grafts in the treatment of long bone defects in mini-pigs." Injury **41**(7): 717-723.

- Hannouche, D., H. Petite and L. Sedel (2001). "Current trends in the enhancement of fracture healing." The Journal of bone and joint surgery. British volume **83**(2): 157-164.
- Harrison, R. G. (1910). "The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement." Journal of Experimental Zoology **9**(4): 787-846.
- Heath, C. A. J. T. i. b. (2000). "Cells for tissue engineering." **18**(1): 17-19.
- Hilkens, P., P. Gervois, Y. Fanton, J. Vanormelingen, W. Martens, T. Struys, C. Politis, I. Lambrichts and A. Bronckaers (2013). "Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells." Cell and tissue research **353**(1): 65-78.
- Holy, C. E., M. S. Shoichet, J. E. J. J. o. B. M. R. A. O. J. o. T. S. f. B. Davies, The Japanese Society for Biomaterials,, T. A. S. f. Biomaterials and t. K. S. f. Biomaterials (2000). "Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: Investigating initial cell-seeding density and culture period." **51**(3): 376-382.
- Hosoya, A. and H. Nakamura (2015). "Ability of stem and progenitor cells in the dental pulp to form hard tissue." Japanese Dental Science Review **51**(3): 75-83.
- Hou, Q., D. W. Grijpma, J. J. J. o. B. M. R. P. B. A. B. A. O. J. o. T. S. f. B. Feijen, The Japanese Society for Biomaterials,, T. A. S. f. Biomaterials and t. K. S. f. Biomaterials (2003). "Preparation of interconnected highly porous polymeric structures by a replication and freeze-drying process." **67**(2): 732-740.
- Huang, G.-J., S. Gronthos and S. Shi (2009). "Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine." Journal of dental research **88**(9): 792-806.
- Huang, G. T.-J., W. Sonoyama, J. Chen and S. H. Park (2006). "In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments." Cell and tissue research **324**(2): 225.
- Huang, M. H., S. Li, J. Coudane and M. Vert (2003). "Synthesis and Characterization of Block Copolymers of  $\epsilon$ -Caprolactone and dl-Lactide Initiated by Ethylene Glycol or Poly (ethylene glycol)." Macromolecular chemistry and physics **204**(16): 1994-2001.
- Huang, Y. C., D. Kaigler, K. G. Rice, P. H. Krebsbach, D. J. J. J. o. B. Mooney and M. Research (2005). "Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration." **20**(5): 848-857.
- Hubbell, J. A. J. B. t. (1995). "Biomaterials in tissue engineering." **13**(6): 565.
- Hutmacher, D. W. J. B. (2000). "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage." **21**(24): 2529-2543.
- İbrahim, Ü. and E. D. Koçak (2012). "Poli (laktik asit)'in kullanım alanları ve nano lif üretimdeki uygulamaları." İstanbul Ticaret Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi **11**(22): 79-88.
- İnan, S. and K. Özbilgin (2009). "Kök hücre biyolojisi." Sağlıkta Birikim Dergisi **1**(5): 11-23.
- Jabbarzadeh, E., T. Starnes, Y. M. Khan, T. Jiang, A. J. Wirtel, M. Deng, Q. Lv, L. S. Nair, S. B. Doty and C. T. J. P. o. t. N. A. o. S. Laurencin (2008). "Induction of angiogenesis in tissue-engineered scaffolds designed for bone repair: a combined gene therapy–cell transplantation approach." **105**(32): 11099-11104.

- Jahan, K. and M. J. B. s. Tabrizian (2016). "Composite biopolymers for bone regeneration enhancement in bony defects." **4**(1): 25-39.
- Jain, R. K., P. Au, J. Tam, D. G. Duda and D. J. N. b. Fukumura (2005). "Engineering vascularized tissue." **23**(7): 821-823.
- Jain, R. K. J. S. (2005). "Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy." **307**(5706): 58-62.
- Jeong, S. I., S. H. Kim, Y. H. Kim, Y. Jung, J. H. Kwon, B. S. Kim and Y. M. Lee (2004). "Manufacture of elastic biodegradable PLCL scaffolds for mechano-active vascular tissue engineering." J Biomater Sci Polym Ed **15**(5): 645-660.
- Jeong, S. I., A.-Y. Lee, Y. M. Lee and H. Shin (2008). "Electrospun gelatin/poly (L-lactide-co-ε-caprolactone) nanofibers for mechanically functional tissue-engineering scaffolds." Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition **19**(3): 339-357.
- Jin, Q., K. Yuan, W. Lin, C. Niu, R. Ma and Z. Huang (2019). "Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp and adipose tissue for bone regeneration potential." Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology **47**(1): 1577-1584.
- Junqueira, L., J. Carneiro and K. Temel Histoloji (2003). "Çev: Aytekin Y, Solakoğlu S, 10." Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul: 141-156.
- Junqueira, L. C., J. Carneiro, R. O. Kelley, Y. Aytekin and S. Solakoğlu (1993). Temel histoloji, Barış Kitabevi.
- Kalpan, G., V. Shalini, S. Jonnalagadda and N. Kumar (2007). "Fast degradable poly (L-lactide-co-ε-caprolactone) microspheres for tissue engineering: synthesis, characterization, and degradation behavior." J Polym Sci A1 **45**: 2755-2764.
- Kameda, H., I. Morita, M. Handa, J. Kaburaki, T. Yoshida, T. Mimori, S. I. Murota and Y. Ikeda (1997). "Re-expression of functional P-selectin molecules on the endothelial cell surface by repeated stimulation with thrombin." British journal of haematology **97**(2): 348-355.
- Kanczler, J. and R. J. E. C. M. Oreffo (2008). "Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone." **15**(2): 100-114.
- Karamzadeh, R. and M. B. Eslaminejad (2013). Dental-related stem cells and their potential in regenerative medicine. Regenerative Medicine and Tissue Engineering, IntechOpen.
- Karaöz, E., B. N. Doğan, A. Aksoy, G. Gacar, S. Akyüz, S. Ayhan, Z. S. Genç, S. Yürüker, G. Duruksu, P. Ç. J. H. Demircan and c. biology (2010). "Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth." **133**(1): 95.
- Kaynar, A., S. Civelek, Z. Kasymova, N. Keklikoglu, S. Toklu and H. Uzun (2014). "Effects of hyperbaric oxygen therapy on biochemical and histological parameters of muscle groups in proximity to the distracted rat tibia." International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery **43**(12): 1514-1521.
- Kazancioglu, H. O., S. Ezirganli and M. S. J. J. o. C. S. Aydin (2013). "Effects of laser and ozone therapies on bone healing in the calvarial defects." **24**(6): 2141-2146.

- Kazancioglu, H. O., S. Ezirganli and N. J. L. i. m. s. Demirtas (2014). "Comparison of the influence of ozone and laser therapies on pain, swelling, and trismus following impacted third-molar surgery." **29**(4): 1313-1319.
- Kim, B.-B., M. Kim, Y.-H. Park, Y. Ko and J.-B. Park (2017). "Short-term application of dexamethasone on stem cells derived from human gingiva reduces the expression of RUNX2 and  $\beta$ -catenin." Journal of International Medical Research **45**(3): 993-1006.
- Kim, H.-W., H.-E. Kim and V. J. B. Salih (2005). "Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin–hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds." **26**(25): 5221-5230.
- Kim, S.-S., M. S. Park, S.-J. Gwak, C. Y. Choi and B.-S. J. T. e. Kim (2006). "Accelerated bonelike apatite growth on porous polymer/ceramic composite scaffolds in vitro." **12**(10): 2997-3006.
- Kim, S. S., K. M. Ahn, M. S. Park, J. H. Lee, C. Y. Choi, B. S. J. J. o. B. M. R. P. A. A. O. J. o. T. S. f. B. Kim, The Japanese Society for Biomaterials,, T. A. S. f. Biomaterials and t. K. S. f. Biomaterials (2007). "A poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffold with enhanced osteoconductivity." **80**(1): 206-215.
- Kokubu, T., N. Matsui, H. Fujioka, M. Tsunoda, K. J. B. Mizuno and b. r. communications (1999). "Low Intensity Pulsed Ultrasound Exposure Increases Prostaglandin E2Production via the Induction of Cyclooxygenase-2 mRNA in Mouse Osteoblasts." **256**(2): 284-287.
- Kovacs, I. B., E. Mester, P. J. C. Görög and M. L. Sciences (1974). "Laser-induced stimulation of the vascularization of the healing wound. An ear chamber experiment." **30**(4): 341-343.
- Krogman, N. R., A. L. Weikel, K. A. Kristhart, S. P. Nukavarapu, M. Deng, L. S. Nair, C. T. Laurencin and H. R. J. B. Allcock (2009). "The influence of side group modification in polyphosphazenes on hydrolysis and cell adhesion of blends with PLGA." **30**(17): 3035-3041.
- Kyle, S., A. Aggeli, E. Ingham and M. J. J. B. McPherson (2010). "Recombinant self-assembling peptides as biomaterials for tissue engineering." **31**(36): 9395-9405.
- Laino, G., R. d'Aquino, A. Graziano, V. Lanza, F. Carinci, F. Naro, G. Pirozzi and G. Papaccio (2005). "A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB)." Journal of bone and mineral research **20**(8): 1394-1402.
- Lanza, R., R. Langer and J. P. Vacanti (2011). Principles of tissue engineering, Academic press.
- Laurencin, C. T., A. Ambrosio, M. Borden and J. J. A. r. o. b. e. Cooper Jr (1999). "Tissue engineering: orthopedic applications." **1**(1): 19-46.
- Lee, H. and J.-B. Park (2019). "Dimethyl sulfoxide leads to decreased osteogenic differentiation of stem cells derived from gingiva via Runx2 and collagen I expression." European journal of dentistry **13**(2): 131.
- Lee, J. W., W. N. Qi and S. P. J. J. o. o. r. Scully (2002). "The involvement of  $\beta$ 1 integrin in the modulation by collagen of chondrocyte-response to transforming growth factor- $\beta$ 1." **20**(1): 66-75.

- Li, D.-W., J. He, F.-L. He, Y.-L. Liu, Y.-Y. Liu, Y.-J. Ye, X. Deng and D.-C. J. J. o. b. a. Yin (2018). "Silk fibroin/chitosan thin film promotes osteogenic and adipogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells." **32**(9): 1164-1173.
- Lin, Y., S. Huang, R. Zou, X. Gao, J. Ruan, M. D. Weir, M. A. Reynolds, W. Qin, X. Chang and H. Fu (2019). "Calcium phosphate cement scaffold with stem cell co-culture and prevascularization for dental and craniofacial bone tissue engineering." Dental Materials **35**(7): 1031-1041.
- Linde, A. and M. Goldberg (1993). "Dentinogenesis." Critical Reviews in Oral Biology & Medicine **4**(5): 679-728.
- Lindroos, B., K. Mäenpää, T. Ylikomi, H. Oja, R. Suuronen and S. Miettinen (2008). "Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts." Biochemical and biophysical research communications **368**(2): 329-335.
- Ljunggren, C. (1898). "Von der Fähigkeit des Hautepithels, ausserhalb des Organismus sein Leben zu behalten, mit Berücksichtigung der Transplantation." Deutsche Zeitschrift für Chirurgie **47**(5-6): 608-615.
- Logeart-Avramoglou, D., F. Anagnostou, R. Bizios, H. J. J. o. c. Petite and m. medicine (2005). "Engineering bone: challenges and obstacles." **9**(1): 72-84.
- Lozito, T. P., C. K. Kuo, J. M. Taboas and R. S. J. J. o. c. b. Tuan (2009). "Human mesenchymal stem cells express vascular cell phenotypes upon interaction with endothelial cell matrix." **107**(4): 714-722.
- Malda, J., J. Rouwkema, D. E. Martens, E. P. le Comte, F. Kooy, J. Tramper, C. A. van Blitterswijk, J. J. B. Riesle and bioengineering (2004). "Oxygen gradients in tissue-engineered PEGT/PBT cartilaginous constructs: Measurement and modeling." **86**(1): 9-18.
- Mayer, Y., O. Ginesin, A. Khutaba, E. E. Machtei and H. Zigdon Giladi (2018). "Biocompatibility and osteoconductivity of PLCL coated and noncoated xenografts: An in vitro and preclinical trial." Clinical implant dentistry and related research **20**(3): 294-299.
- Mei-Dan, O., M. R. J. S. m. Carmont and a. review (2011). "The role of platelet-rich plasma in rotator cuff repair." **19**(3): 244-250.
- Meinel, L., V. Karageorgiou, R. Fajardo, B. Snyder, V. Shinde-Patil, L. Zichner, D. Kaplan, R. Langer and G. J. A. o. b. e. Vunjak-Novakovic (2004). "Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow." **32**(1): 112-122.
- Mercado-Pagán, Á. E., A. M. Stahl, Y. Shanjani and Y. J. A. o. b. e. Yang (2015). "Vascularization in bone tissue engineering constructs." **43**(3): 718-729.
- Mescher, A. L. (2013). Junqueira's basic histology: text and atlas, McGraw-hill.
- Mester, E., T. Spiry, B. Szende and J. G. J. T. A. J. o. S. Tota (1971). "Effect of laser rays on wound healing." **122**(4): 532-535.
- Meyer, U., T. Meyer, J. Handschel and H. P. Wiesmann (2009). Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine, Springer.

- Mishra, R., B. M. Roux, M. Posukonis, E. Bodamer, E. M. Brey, J. P. Fisher and D. Dean (2016). "Effect of prevascularization on in vivo vascularization of poly (propylene fumarate)/fibrin scaffolds." Biomaterials **77**: 255-266.
- Moroni, L., J. De Wijn and C. J. B. Van Blitterswijk (2006). "3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties." **27**(7): 974-985.
- Morsczeck, C., J. Petersen, F. Völlner, O. Driemel, T. Reichert and H. C. Beck (2009). "Proteomic analysis of osteogenic differentiation of dental follicle precursor cells." Electrophoresis **30**(7): 1175-1184.
- Moshaverinia, A., C. Chen, X. Xu, K. Akiyama, S. Ansari, H. H. Zadeh and S. Shi (2014). "Bone regeneration potential of stem cells derived from periodontal ligament or gingival tissue sources encapsulated in RGD-modified alginate scaffold." Tissue Engineering Part A **20**(3-4): 611-621.
- Murray, P. E., F. Garcia-Godoy and K. M. Hargreaves (2007). "Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action." Journal of endodontics **33**(4): 377-390.
- Muschler, G. F., C. Nakamoto and L. G. J. J. Griffith (2004). "Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering." **86**(7): 1541-1558.
- Nam, H., G.-H. Kim, Y.-K. Bae, D.-E. Jeong, K.-M. Joo, K. Lee and S.-H. Lee (2017). "Angiogenic capacity of dental pulp stem cell regulated by SDF-1 $\alpha$ -CXCR4 axis." Stem Cells International **2017**.
- Neen, D., D. Noyes, M. Shaw, S. Gwilym, N. Fairlie and N. J. S. Birch (2006). "Healos and bone marrow aspirate used for lumbar spine fusion: a case controlled study comparing healos with autograft." **31**(18): E636-E640.
- Niu, X., Y. Wang, Y. Luo, J. Xin, Y. J. J. o. m. s. Li and technology (2005). "Arg-Gly-Asp (RGD) modified biomimetic polymeric materials." **21**(4): 571-576.
- Nukavarapu, S. P. and A. R. Amini (2011). Optimal scaffold design and effective progenitor cell identification for the regeneration of vascularized bone. 2011 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, IEEE.
- O'brien, F. J. J. M. t. (2011). "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering." **14**(3): 88-95.
- O'Donoghue, K. and N. M. Fisk (2004). "Fetal stem cells." Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology **18**(6): 853-875.
- O'Keefe, R. J. and J. Mao (2011). "Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic—an overview." Tissue Engineering Part B: Reviews **17**(6): 389-392.
- Paino, F., M. La Noce, A. Giuliani, A. De Rosa, S. Mazzoni, L. Laino, E. Amler, G. Papaccio, V. Desiderio and V. J. C. s. Tirino (2017). "Human DPSCs fabricate vascularized woven bone tissue: a new tool in bone tissue engineering." **131**(8): 699-713.
- Panno, J. (2014). Stem cell research: Medical applications and ethical controversy, Infobase Publishing.

- Pertici, G., F. Carinci, G. Carusi, D. Epistatus, T. Villa, F. Crivelli, F. Rossi and G. Perale (2015). "Composite polymer-coated mineral scaffolds for bone regeneration: from material characterization to human studies." J. Biol. Regul. Homeost. Agents **29**(3 Suppl 1): 136-148.
- Pertici, G., M. Müller and G. Perale "Bioresorbable Bioactive Bone Chips: A New 3D Scaffold for Tissue Engineering in Reconstructive Maxillo-Facial Surgery."
- Pertici, G., F. Rossi, T. Casalini and G. Perale (2014). "Composite polymer-coated mineral grafts for bone regeneration: material characterisation and model study." Annals of Oral & Maxillofacial Surgery **2**(1).
- Pierschbacher, M. D. and E. J. N. Ruoslahti (1984). "Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule." **309**(5963): 30.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. J. s. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." **284**(5411): 143-147.
- Place, E. S., N. D. Evans and M. M. J. N. m. Stevens (2009). "Complexity in biomaterials for tissue engineering." **8**(6): 457-470.
- Pompe, T., K. Keller, G. Mothes, M. Nitschke, M. Teese, R. Zimmermann and C. Werner (2007). "Surface modification of poly (hydroxybutyrate) films to control cell-matrix adhesion." Biomaterials **28**(1): 28-37.
- Puwanun, S., R. M. Delaine-Smith, H. E. Colley, J. M. Yates, S. MacNeil, G. C. J. J. o. t. e. Reilly and r. medicine (2018). "A simple rocker-induced mechanical stimulus upregulates mineralization by human osteoprogenitor cells in fibrous scaffolds." **12**(2): 370-381.
- Rezai Rad, M., M. Bohloli, M. Akhavan Rahnama, A. Anbarlou, P. Nazeman and A. J. S. c. i. Khojasteh (2017). "Impact of tissue harvesting sites on the cellular behaviors of adipose-derived stem cells: implication for bone tissue engineering." **2017**.
- Rezwan, K., Q. Chen, J. J. Blaker and A. R. J. B. Boccaccini (2006). "Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering." **27**(18): 3413-3431.
- Richardson, T. P., M. C. Peters, A. B. Ennett and D. J. J. N. b. Mooney (2001). "Polymeric system for dual growth factor delivery." **19**(11): 1029-1034.
- Roato, I., D. C. Belisario, M. Compagno, L. Verderio, A. Sighinolfi, F. Mussano, T. Genova, F. Veneziano, G. Pertici and G. Perale (2018). "Adipose-derived stromal vascular fraction/xenohybrid bone scaffold: An alternative source for bone regeneration." Stem cells international **2018**.
- Robinson, S. T., A. M. Douglas, T. Chadid, K. Kuo, A. Rajabalan, H. Li, I. B. Copland, T. H. Barker, J. Galipeau and L. P. J. A. b. Brewster (2016). "A novel platelet lysate hydrogel for endothelial cell and mesenchymal stem cell-directed neovascularization." **36**: 86-98.
- Rochkind, S., M. Nissan, N. Razon, M. Schwartz and A. J. A. n. Bartal (1986). "Electrophysiological effect of HeNe laser on normal and injured sciatic nerve in the rat." **83**(3-4): 125-130.

- Rodrigues, C., P. Serricella, A. Linhares, R. Guerdes, R. Borojevic, M. Rossi, M. Duarte and M. J. B. Farina (2003). "Characterization of a bovine collagen–hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering." **24**(27): 4987-4997.
- Rouwkema, J., J. D. Boer and C. A. V. J. T. e. Blitterswijk (2006). "Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct." **12**(9): 2685-2693.
- Ruoslahti, E. and M. D. J. S. Pierschbacher (1987). "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins." **238**(4826): 491-497.
- Ruoslahti, E. J. T. J. o. c. i. (1991). "Integrins." **87**(1): 1-5.
- Salama, R., S. J. T. J. o. b. Weissman and j. s. B. volume (1978). "The clinical use of combined xenografts of bone and autologous red marrow. A preliminary report." **60**(1): 111-115.
- Salter, E., B. Goh, B. Hung, D. Hutton, N. Ghone and W. L. J. T. E. P. B. R. Grayson (2012). "Bone tissue engineering bioreactors: a role in the clinic?" **18**(1): 62-75.
- Sasaki, J.-I., M. Hashimoto, S. Yamaguchi, Y. Itoh, I. Yoshimoto, T. Matsumoto and S. J. P. O. Imazato (2015). "Fabrication of biomimetic bone tissue using mesenchymal stem cell-derived three-dimensional constructs incorporating endothelial cells." **10**(6).
- Sawa, Y., S. Yoshida, K.-I. Shibata, M. Suzuki and A. Mukaida (1998). "Vascular endothelium of human dental pulp expresses diverse adhesion molecules for leukocyte emigration." Tissue and Cell **30**(2): 281-291.
- Schaffner, P., M. J. C. Dard and M. L. S. CMLS (2003). "Structure and function of RGD peptides involved in bone biology." **60**(1): 119-132.
- Schantz, J.-T., H. Chim and M. J. T. e. Whiteman (2007). "Cell guidance in tissue engineering: SDF-1 mediates site-directed homing of mesenchymal stem cells within three-dimensional polycaprolactone scaffolds." **13**(11): 2615-2624.
- Schugens, C., V. Maquet, C. Grandfils, R. Jérôme, P. J. J. o. B. M. R. A. O. J. o. T. S. f. B. Teyssie and T. J. S. f. Biomaterials (1996). "Polylactide macroporous biodegradable implants for cell transplantation. II. Preparation of polylactide foams by liquid-liquid phase separation." **30**(4): 449-461.
- Seo, B.-M., M. Miura, S. Gronthos, P. M. Bartold, S. Batouli, J. Brahim, M. Young, P. G. Robey, C. Y. Wang and S. Shi (2004). "Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament." The Lancet **364**(9429): 149-155.
- Shanbhag, S., N. Pandis, K. Mustafa, J. R. Nyengaard and A. J. T. E. P. B. R. Stavropoulos (2017). "Cell cotransplantation strategies for vascularized craniofacial bone tissue engineering: a systematic review and meta-analysis of preclinical in vivo studies." **23**(2): 101-117.
- Shimono, M., T. Ishikawa, H. Ishikawa, H. Matsuzaki, S. Hashimoto, T. Muramatsu, K. Shima, K. I. Matsuzaka and T. Inoue (2003). "Regulatory mechanisms of periodontal regeneration." Microscopy research and technique **60**(5): 491-502.
- Shin, H., S. Jo and A. G. J. B. Mikos (2003). "Biomimetic materials for tissue engineering." **24**(24): 4353-4364.
- Shin, H., S. Jo, A. G. J. J. o. B. M. R. A. O. J. o. T. S. f. B. Mikos, The Japanese Society for Biomaterials,, T. A. S. f. Biomaterials and t. K. S. f. Biomaterials (2002).

"Modulation of marrow stromal osteoblast adhesion on biomimetic oligo [poly (ethylene glycol) fumarate] hydrogels modified with Arg-Gly-Asp peptides and a poly (ethylene glycol) spacer." **61**(2): 169-179.

Sikavitsas, V. I., G. N. Bancroft, A. G. J. J. o. B. M. R. A. O. J. o. T. S. f. B. Mikos, The Japanese Society for Biomaterials,, T. A. S. f. Biomaterials and t. K. S. f. Biomaterials (2002). "Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor." **62**(1): 136-148.

Simmons, P. J. and B. Torok-Storb (1991). "CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow."

Slaughter, B. V., S. S. Khurshid, O. Z. Fisher, A. Khademhosseini and N. A. J. A. m. Peppas (2009). "Hydrogels in regenerative medicine." **21**(32-33): 3307-3329.

Sokoloff, L., C. J. Malesud, W. T. J. A. Green Jr and R. O. J. o. t. A. C. o. Rheumatology (1970). "Sulfate incorporation by articular chondrocytes in monolayer culture." **13**(2): 118-124.

Sonoyama, W., Y. Liu, D. Fang, T. Yamaza, B.-M. Seo, C. Zhang, H. Liu, S. Gronthos, C.-Y. Wang and S. Shi (2006). "Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine." PloS one **1**(1): e79.

Sonoyama, W., Y. Liu, T. Yamaza, R. S. Tuan, S. Wang, S. Shi and G. T.-J. Huang (2008). "Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study." Journal of endodontics **34**(2): 166-171.

Staiger, M. P., A. M. Pietak, J. Huadmai and G. J. B. Dias (2006). "Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review." **27**(9): 1728-1734.

Stiehler, M., C. Bünger, A. Baatrup, M. Lind, M. Kassem, T. J. J. o. B. M. R. P. A. A. O. J. o. T. S. f. B. Mygind, The Japanese Society for Biomaterials,, T. A. S. f. Biomaterials and t. K. S. f. Biomaterials (2009). "Effect of dynamic 3-D culture on proliferation, distribution, and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells." **89**(1): 96-107.

Stockmann, P., J. Park, C. Von Wilmowsky, E. Nkenke, E. Felszeghy, J.-F. Dehner, C. Schmitt, C. Tudor and K. A. J. J. o. C.-M. S. Schlegel (2012). "Guided bone regeneration in pig calvarial bone defects using autologous mesenchymal stem/progenitor cells—a comparison of different tissue sources." **40**(4): 310-320.

Street, J., M. Bao, L. deGuzman, S. Bunting, F. V. Peale, N. Ferrara, H. Steinmetz, J. Hoeffel, J. L. Cleland and A. J. P. o. t. N. A. o. S. Daugherty (2002). "Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover." **99**(15): 9656-9661.

Suchánek, J., T. Soukup, R. Ivancáková, J. Karbanová, V. Hubková, R. Pytlík and L. Kucerová (2007). "Human dental pulp stem cells-isolation and long term cultivation." ACTA MEDICA-HRADEC KRALOVE- **50**(3): 195.

Şahin, F., G. Saydam and S. B. Omay (2005). "Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi." Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi **1**(15): 48-56.

Şimşek, A., G. Çakmak and E. Cila (2004). "Kemik greftleri ve kemik greftlerinin yerini tutabilecek maddeler." Totbid Dergisi **3**: 1-11.

- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." cell **131**(5): 861-872.
- Ten Cate, A. R. (1997). "The development of the periodontium—a largely ectomesenchymally derived unit." Periodontology 2000 **13**(1): 9-19.
- Thein-Han, W., J. Liu and H. H. Xu (2012). "Calcium phosphate cement with biofunctional agents and stem cell seeding for dental and craniofacial bone repair." Dental Materials **28**(10): 1059-1070.
- Tomar, G. B., R. K. Srivastava, N. Gupta, A. P. Barhanpurkar, S. T. Pote, H. M. Jhaveri, G. C. Mishra, M. R. J. B. Wani and b. r. communications (2010). "Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine." **393**(3): 377-383.
- Tomaszewska, J. M., B. Miskowiak, T. Matthews-Brzozowska and P. Wierzbicki (2013). "Characteristics of dental pulp in human upper first premolar teeth based on immunohistochemical and morphometric examinations." Folia histochemica et cytobiologica **51**(2): 149-155.
- Trelles, M., E. J. L. i. s. Mayayo and medicine (1987). "Bone fracture consolidates faster with low-power laser." **7**(1): 36-45.
- Ueng, S. W., S.-S. Lee, S.-S. Lin, C.-R. Wang, S.-J. Liu, H.-F. Yang, C.-L. Tai and C.-H. Shih (1998). "Bone healing of tibial lengthening is enhanced by hyperbaric oxygen therapy: a study of bone mineral density and torsional strength on rabbits." Journal of Trauma and Acute Care Surgery **44**(4): 676-681.
- Ural, A. U. (2006). "Kök hücreler." TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi **5**(3-4): 140-145.
- Uslu, B. and S. Arbak (2010). "Doku Mühendisliğinde Kitozanın Kullanım Alanları."
- Vacanti, C., W. Kim, J. Upton, M. Vacanti and D. Mooney (1993). Tissue-engineered growth of bone and cartilage. Transplantation proceedings.
- Victoria, G., B. Petrisor, B. Drew and D. Dick (2009). "Bone stimulation for fracture healing: What's all the fuss?" Indian journal of orthopaedics **43**(2): 117.
- Wang, Y., T. Uemura, J. Dong, H. Kojima, J. Tanaka and T. J. T. e. Tateishi (2003). "Application of perfusion culture system improves in vitro and in vivo osteogenesis of bone marrow-derived osteoblastic cells in porous ceramic materials." **9**(6): 1205-1214.
- Ward, B. C. and T. J. J. B. Webster (2006). "The effect of nanotopography on calcium and phosphorus deposition on metallic materials in vitro." **27**(16): 3064-3074.
- Wei, G. and P. X. J. B. Ma (2004). "Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering." **25**(19): 4749-4757.
- Williams, J. M., A. Adewunmi, R. M. Schek, C. L. Flanagan, P. H. Krebsbach, S. E. Feinberg, S. J. Hollister and S. Das (2005). "Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering." Biomaterials **26**(23): 4817-4827.

- Wise, G., S. Frazier-Bowers and R. D'souza (2002). "Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption." Critical Reviews in Oral Biology & Medicine **13**(4): 323-335.
- Witte, F. J. A. b. (2010). "The history of biodegradable magnesium implants: a review." **6**(5): 1680-1692.
- Wu, W., X. Chen, T. Mao, F. Chen and X. Feng (2006). "Bone marrow-derived osteoblasts seeded into porous beta-tricalcium phosphate to repair segmental defect in canine's mandibula." Ulus Travma Acil Cerrahi Derg **12**(4): 268-276.
- Xu, M., D. Zhai, L. Xia, H. Li, S. Chen, B. Fang, J. Chang and C. J. N. Wu (2016). "Hierarchical bioceramic scaffolds with 3D-plotted macropores and mussel-inspired surface nanolayers for stimulating osteogenesis." **8**(28): 13790-13803.
- Yamada, Y., M. Ueda, T. Naiki, M. Takahashi, K.-I. Hata and T. Nagasaka (2004). "Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration." Tissue engineering **10**(5-6): 955-964.
- Yamamura, T. (1985). "Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing." Journal of Dental Research **64**(4): 530-540.
- YÜKSEL, D. K. (2012). Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Osteoblastların Spongioz Allogreftle İnkübasyonunun Osteojenik Aktiviteye Etkisi Uzmanlık Tezi, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- Zavan, B. and E. Bressan (2016). Dental Stem Cells: Regenerative Potential, Springer.
- Zeltinger, J., J. K. Sherwood, D. A. Graham, R. Müller and L. G. J. T. e. Griffith (2001). "Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition." **7**(5): 557-572.
- Zhang, Q., S. Shi, Y. Liu, J. Uyanne, Y. Shi, S. Shi and A. D. Le (2009). "Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis." The Journal of Immunology **183**(12): 7787-7798.
- Zhang, W., C. Feng, G. Yang, G. Li, X. Ding, S. Wang, Y. Dou, Z. Zhang, J. Chang and C. Wu (2017). "3D-printed scaffolds with synergistic effect of hollow-pipe structure and bioactive ions for vascularized bone regeneration." Biomaterials **135**: 85-95.
- Zhang, Y., M. Ni, M. Zhang and B. J. T. e. Ratner (2003). "Calcium phosphate—chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering." **9**(2): 337-345.
- Zhu, J. and R. E. Marchant (2011). "Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds." Expert review of medical devices **8**(5): 607-626.
- Zisch, A. H., M. P. Lutolf, M. Ehrbar, G. P. Raebler, S. C. Rizzi, N. Davies, H. Schmokel, D. Bezuidenhout, V. Djonov and P. J. T. F. j. Zilla (2003). "Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell ingrowth matrices for vascularized tissue growth." **17**(15): 2260-2262.
- Zorin, V. L., V. S. Komlev, A. I. Zorina, N. V. Khromova, E. V. Solovieva, A. Y. Fedotov, I. I. Eremin and P. B. Kopnin (2014). "Octacalcium phosphate ceramics

combined with gingiva-derived stromal cells for engineered functional bone grafts." Biomedical materials 9(5): 055005.

Zorlu, Ü., M. Tercan, I. Özyazgan, I. Taskan, Y. Kardas, F. Balkar, F. J. A. j. o. p. m. Öztürk and rehabilitation (1998). "Comparative study of the effect of ultrasound and electrostimulation on bone healing in rats1." 77(5): 427-432.



## HAM VERİLER



## FORMLAR





**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



**Sayı :252**

**15.03.2018**

**Konu : Prof.Dr.Ayfer Kaynar**

**Sayın Prof.Dr.Ayfer Kaynar  
Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı**

**İlgi: İÜ. Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nın 23/02/2018 gün ve 73634 sayılı yazısı**

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz 2018/11 dosya nolu "Kompozit polimer greft üzerinde primer pulpa kaynaklı mezenkimal hücre farklılaşmasının TEM ve immunohistokimyasal yöntemlerle incelenmesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 15/03/2018 tarih ve 66 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

**Prof.Dr. Faruk Haznedaroğlu  
İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Klinik  
Araştırmalar Etik Kurul Başkanı**

**Eki: İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu**

## ETİK KURUL KARARI



## PATENT HAKKI İZİNİ



# KOMPOZİT POLİMER GREFT ÜZERİNDE PRİMER PULPA KAYNAKLI MEZENKİMAL HÜCRE FARKLILAŞMASININ TEM VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

## ORIJİNALLIK RAPORU

|                   |                     |            |                  |
|-------------------|---------------------|------------|------------------|
| % <b>5</b>        | % <b>4</b>          | % <b>2</b> | % <b>2</b>       |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR   | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

## BİRİNCİL KAYNAKLAR

|          |                                                                                                              |             |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>1</b> | <b>Submitted to Haliç Üniversitesi</b><br>Öğrenci Ödevi                                                      | <% <b>1</b> |
| <b>2</b> | <b>Submitted to The Scientific &amp; Technological Research Council of Turkey (TUBİTAK)</b><br>Öğrenci Ödevi | <% <b>1</b> |
| <b>3</b> | <b>tez.yok.gov.tr</b><br>İnternet Kaynağı                                                                    | <% <b>1</b> |
| <b>4</b> | <b>docs.neu.edu.tr</b><br>İnternet Kaynağı                                                                   | <% <b>1</b> |
| <b>5</b> | <b>Submitted to Balıkesir Üniversitesi</b><br>Öğrenci Ödevi                                                  | <% <b>1</b> |
| <b>6</b> | <b>www.modemedikal.com</b><br>İnternet Kaynağı                                                               | <% <b>1</b> |
| <b>7</b> | <b>www.mdpi.com</b><br>İnternet Kaynağı                                                                      | <% <b>1</b> |
| <b>8</b> | <b>onlinelibrary.wiley.com</b>                                                                               |             |

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

|          |                     |           |             |
|----------|---------------------|-----------|-------------|
| Adı      | Ece İrem            | Soyadı    | Ravalı      |
| Doğ.Yeri | Bakırköy/İstanbul   | Doğ.Tar.  | 21.11.1991  |
| Uyruğu   | TC                  | TC Kim No | 51082183648 |
| Email    | eceravali@gmail.com | Tel       | 05357076505 |

### Eğitim Düzeyi

|          | Mezun Olduğu Kurumun Adı                      | Mez. Yılı |
|----------|-----------------------------------------------|-----------|
|          |                                               |           |
| Yük.Lis. | İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi | 2014      |
| Lise     | İstek Özel Bilge Kağan Fen Lisesi (Burslu)    | 2009      |

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

|    | Görevi        | Kurum                                                         | Süre (Yıl - Yıl) |
|----|---------------|---------------------------------------------------------------|------------------|
| 1. | Öğretim Üyesi | İstanbul Aydın Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Hastanesi | 2015-Halen       |
| 2. | Diş Hekimi    | Özel AvrupaDİŞ Ağız ve Diş Sağlığı Merkezi                    | 2015-2016        |
| 3. | Diş Hekimi    | Özel Dentistanbul Diş Hastaneleri                             | 2014-2015        |

| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama* | Konuşma* | Yazma* | YDS Puanı | (Diğer) Puanı |
|-----------------|-------------------|----------|--------|-----------|---------------|
| İngilizce       | Çok İyi           | İyi      | İyi    | 90        |               |

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

|               | Sayısal  | Eşit Ağırlık | Sözel    |
|---------------|----------|--------------|----------|
| ALES Puanı    | 87,22700 | 86,81661     | 85,72652 |
| (Diğer) Puanı |          |              |          |

### Bilgisayar Bilgisi

| Program    | Kullanma becerisi |
|------------|-------------------|
| Word       | İyi               |
| Powerpoint | İyi               |
|            |                   |

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

### Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Fotoğrafçılık, Yüzme, Seramik

