

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

**PULPAL DENTAL KÖK HÜCRE
KAYNAĞININ KRİTİK BOYUTTAKİ RAT
KALVARYAL DEFEKT MODELİ
ÜZERİNDEKİ KEMİK REJENERASYON
ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Fatih ASUTAY

**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ VE GAZİ ÜNİVERSİTESİ
AĞIZ DIŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM
DALI**

ORTAK DOKTORA PROGRAMI

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Serkan POLAT**

MALATYA – 2014

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

**PULPAL DENTAL KÖK HÜCRE
KAYNAĞININ KRİTİK BOYUTTAKİ RAT
KALVARYAL DEFEKT MODELİ
ÜZERİNDEKİ KEMİK REJENERASYON
ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Fatih ASUTAY

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Serkan Polat




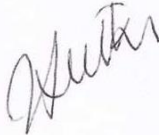

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2012/127 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA – 2014

Annem Hayriye Hanım ve babam Mahsum Bey'e

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

		İmza
Jüri Başkanı	Doç. Dr. Hasan Hüseyin KÖŞGER Cumhuriyet Üniversitesi	
Danışman	Prof.Dr. Serkan POLAT İnönü Üniversitesi	
Ortak Tez Danışmanı	Doç.Dr. Sevil KAHRAMAN Gazi Üniversitesi	
Üye:	Yrd. Doç. Dr. Hilal ALAN İnönü Üniversitesi	
Üye:	Yrd. Doç. Dr. Mustafa KIRTAY İnönü Üniversitesi	

ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu/...../ 20.... tarih ve 20.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yaşar BAYINDIR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Özellikle kök hücre konusundaki teşvikleriyle bilgi birikimimi arttırmamı ve tezimi tamamlamamı sağlayan danışmanım Sayın Prof. Dr. Serkan POLAT hocama teşekkür ederim.

Beraber çalışma imkânı bulduğum için kendimi şanslı hissettiğim değerli hocam Sayın Doç. Dr. Sevil KAHRAMAN'a teşekkür ederim.

Çalışmamın histolojik analizlerinde çok değerli katkılarından ötürü Doç. Dr. Mehmet GÜL'e teşekkür ederim.

Tezimin istatistik kısmında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Saim YOLOĞLU'na teşekkür ederim.

Radyografik inceleme ve değerlendirme aşamasındaki değerli katkılarından ötürü Prof. Dr. Sıddık MALKOÇ'a teşekkür ederim.

Tüm doktora eğitimim boyunca maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen çalışma arkadaşlarıma ve özellikle ilk günümünden itibaren yanımda olan değerli dostum Ahmet Hüseyin ACAR'a teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman dualarıyla, varlıklarıyla yanımda olan ve beni destekleyen anneme, babama, kardeşlerime ve müstakbel eşim Hilal Hanım'a teşekkür ederim.

ÖZET

Kök hücre tedavileri tıbbın her alanında umut verici sonuçlar vermektedir. Maksillofasiyal cerrahi, kemik doku mühendisliğinin çalışıldığı alanlardan birisidir. Bu çalışma ile pulpa kaynaklı dental kök hücrelerin kemik rejenerasyonuna etkisi ve geleneksel yöntemlere göre üstün olup olmadığı araştırıldı.

Wistar albino cinsi 15 sıçan 3 gruba ayrıldı. Her deneğin kalvaryal kemiğine standart bilateral defektler açıldı. 1.gruptaki defektler (10 adet) boş bırakıldı. 2. gruptaki defektler (10 adet) Hidroksi-apatit-tri-kalsiyum-fosfat (HA-TCP) ile dolduruldu. 3.gruptaki defektlere (10 adet) ise insan dental pulpasından elde edilen mezenkimal kök hücrelerin HA-TCP greft malzemesine ekilmesi ile elde edilen materyal yerleştirildi. 8 hafta sonra denekler sakrifiye edilip mikro-BT ve histomorfometri incelemeleri yapıldı.

Deneklerden elde edilen 30 numunenin istatistiksel analizleri yapıldı. Buna göre; hem mikro-BT hem de histomorfometri sonuçları, kök hücre grubunun kemik yoğunluğu ve kalsifiye alanları diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha fazla artırdığını gösterdi. Greft ve kontrol grupları arasında histolojik olarak bir fark bulunmamasına rağmen mikro-BT sonuçlarına göre greft grubu lehine anlamlı bir fark vardı. Bu durum greft materyalinin densiteye etkisinin bir sonucu olarak yorumlandı.

Elde edilen sonuçlara göre pulpal kaynaklı dental kök hücrelerin, geleneksel yöntemlere göre daha etkili olduğu ve kemik doku mühendisliği çalışmaları için uygun bir kaynak olabileceği söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Dental pulpa kaynaklı kök hücre, Doku mühendisliği, Kemik rejenerasyonu, Kritik boyutta kemik defekt modeli, Hidroksiapatit-tri-kalsiyum-fosfat

ABSTRACT

Bone regeneration efficacy of dental pulp stem cell source in rat calvarial critical size defect model

Stem cell therapy approaches give hope in every field of medicine. Maxillofacial surgery is the one of these fields. This study aimed to evaluate the effects of dental stem cells on bone regeneration and discuss the superiorities with regard to traditional techniques.

15 Wistar albino rats are divided into 3 groups. Bilateral 4 mm diameter trephine bur was used to drill a standardized, round, segmental defect near the sagittal suture. First group was the control (n=10). In the second group, hydroxyapatite-tri-calcium-phosphate (HA-TCP) was implanted into each defect (n=10). In the last group, human dental pulp stem cells (DPSC) mixed with HA-TCP paste was implanted into each defect (n=10). The animals were sacrificed 8 weeks after surgery and samples are sent to laboratory for micro-CT and histomorphometry analysis.

30 samples were evaluated statistically after analysis. The results showed that the calcification rate and bone mineral density (BMD) values in group 3 were apparently higher than the other two groups. Radiographically, group 2 can increase bone regeneration more than group 1. Interestingly, there was no significant difference between group 1 and 2 in histological analysis. Density of the graft material was held to account for this result.

According to the results, dental pulp stem cells have the potential to provide regeneration and that approaches are promising for bone tissue engineering.

Keywords: Dental pulp stem cells, tissue engineering, bone regeneration, bone defect model, hydroxyapatite-tri-calcium-phosphate

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Doku Mühendisliği	3
2.1.1. Kemik Doku Mühendisliği	5
2.1.2. Dental Pulpa Dokusu Geliştirilmesi.....	5
2.2. Biyomateryaller ve Klinik Kullanımları	6
2.2.1. Biyopolimerler	8
2.2.1.1.Doğal Polimerler	8
2.2.1.1.1.Kitozan.....	8
2.2.1.1.2. Kollajen.....	9
2.2.1.2. Sentetik Polimerler.....	9
2.2.1.2.1. Poli-Glikolik Asit (PGA)	9
2.2.1.2.2. Poli-Laktik Asit (PLA)	9

2.2.1.2.3. Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA).....	9
2.2.2. Biyoseramikler	10
2.2.2.1. Tri-Kalsiyum Fosfat (TCP).....	10
2.2.2.2. Hidroksiapatit (HA)	10
2.2.3. Kompozit Malzemeler	10
2.2.3.1. Hidroksiapatit tri-kalsiyum fosfat (HA-TCP).....	10
2.3. Kök Hücre Kavramları.....	11
2.3.1. Embriyonik Kök Hücreler.....	12
2.3.2. Mezenkimal Kök Hücreler.....	13
2.3.3. Dental Kök Hücre Kaynakları	14
2.3.3.1. Dental Folikül Kaynaklı Kök Hücreler.....	15
2.3.3.2. Eksfoliyeye Süt Dişlerinden Elde Edilen Kök Hücreler.....	16
2.3.3.3. Periodontal Ligament Kök Hücreleri.....	16
2.3.3.4. Apikal Papilla Kök Hücreleri.....	17
2.3.3.5. Dental Pulpa Kök Hücreleri.....	17
2.4. Kemik Doku.....	18
2.4.1. Kemik formları.....	19
2.4.1.1. Kompakt Kemik.....	19
2.4.1.2. Süngerimsi Kemik	19
2.4.2. Primer ve Sekonder Kemik	19
2.4.3. Kemik Hücresel Yapısı.....	20
2.4.3.1. Kemik Doku Hücreleri.....	20

2.4.3.1.1. Osteositler	20
2.4.3.1.2. Osteoprojenitör Hücreler	20
2.4.3.1.3. Osteoblastlar	20
2.4.3.1.4. Osteoklastlar	20
2.4.3.2. Kemiğin Organik ve İnorganik İçeriği.....	21
2.4.3.2.1. Organik İçerik	21
2.4.3.2.2. İnorganik İçerik.....	21
2.4.3.3. Periosteum.....	21
2.4.3.4. Endosteum.....	22
2.4.4. Kemik Oluşumu (Osteogenezis).....	22
2.4.4.1. İntramembranöz Kemikleşme.....	23
2.4.4.2. Endrokondral Kemikleşme	23
2.4.5. Kemiğin Tamiri / İyileşmesi	23
2.4.6. Kemik Dokunun İnceleme Yöntemleri	24
2.4.6.1. Testereleme ve Bileme Yöntemleri	24
2.4.6.2. Dekalsifikasyon.....	24
2.5. Rat Kalvaryum Anatomisi	24
2.6. Kemik Defekt Modeli	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Çalışma Grupları.....	27
3.2. Kök Hücre Temini ve Uygulaması	28
3.2.1. Hücrelerin GFP (yeşil floresan protein) ile işaretlenmesi.....	29

3.2.2. Kök Hücrelerin Taşıyıcı Greft Materyaline Ekilmesi.....	29
3.3. Cerrahi Teknik	33
3.4. Radyolojik Değerlendirme.....	39
3.5. Histomorfometrik Değerlendirme.....	40
4.BULGULAR	42
4.1. Genel Bulgular	42
4.2. Radyolojik Bulgular.....	42
4.3. Histolojik Bulgular.....	45
5.TARTIŞMA	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR	70
EK: Deney Hayvanları Etik Kurul Kararı	83
ÖZGEÇMİŞ	84

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

[Ca₃(PO₄)₂]	: Kalsiyum Fosfat
HA-TCP	: Hidroksiapatit-tri-kalsiyum-fosfat
DPSC	: Dental Pulp Stem Cells
DNA	: Deoksiribonükleik asit
PGA	: Poli-glikolik asit
PLA	: Poli-laktik asit
PLGA	: Poli laktik-ko-glikolik asit
TCP	: Tri-kalsiyum-fosfat
HA	: Hidroksi-apatit
iPS	: Induced pluripotent stem cells
DFPC	: Dental follicle progenitor cells
SHED	: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth
PDLSC	: Periodontal ligament stem cells
SCAP	: Stem cell from Apical Papilla
ANOVA	: Analysis of Variance
HCL	: Hidroklorit
iDP	: İnsan dental pulpası
MKH	: Mezenkimal kök hücre
BMD	: Bone mineral density
H-E	: Hematoksilen Eozin
BMP	: Bone morphogenetic protein

ESM	: Ekstraselüler matriks
Micro-CT	: Micro computed tomography
cm	: Santimetre
mm	: Milimetre
gr	: Gram
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
cm²	: Santimetre kare
mA	: Miliamper
kVp	: Kilovolt peak
rpm	: Revolution per minute
°C	: Santigrad derece
CO₂	: Karbondioksit
Ca	: Kalsiyum
Mg	: Magnezyum

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Kök Hücrelerin temin edilip uygulanması döngüsü.....	4
Şekil 2.2: Greftlerin fiziksel yapıları ve pöröziteleri üretim aşamasında planlanabilmektedir.....	8
Şekil 2.3: Kök Hücrelerin karakteristik özellikleri.....	12
Şekil 2.4: Totipotent Kök Hücreler	12
Şekil 2.5: (Induced Pluripotent Stem Cells) iPS Hücreleri.....	13
Şekil 2.6: Mezenkimal Kök Hücreler	14
Şekil 2.7: Dental kök hücre kaynakları.....	15
Şekil 2.8: Eksfoliyeye süt dişinden elde edilen kök hücreler	16
Şekil 2.9: Kemik yapısı	22
Şekil 2.10: Kemik doku iyileşmesi	24
Şekil 2.11: Rat kalvaryumu	25
Şekil 3.1: Grup 1: Kontrol, Grup 2: Hidroksiapatit TCP, Grup 3: Hidroksiapatit TCP + Dental Pulpa Kaynaklı Kök Hücre (DPSC)	27
Şekil 3.2: İnsan Dental Pulpa Kök Hücrelerinin laboratuvara taşınması	30
Şekil 3.3: Greftlerin besiyerine taşınması.....	30
Şekil 3.4: 1;İnkübatör, 2; Santrifüj Cihazı, 3;Steril kabin	31
Şekil 3.5: Hücrelerin besiyerine aktarılması.....	32
Şekil 3.6: Kök Hücre taşınmış greftlerin besiyeri içerisindeki görüntüsü.....	32
Şekil 3.7: Çalışmada kullanılan anestetik malzemeler	33

Şekil 3.8: Cerrahi operasyonda kullanılan aletler ve suture materyali	34
Şekil 3.9: Cerrahi sahanın traş edilmesi	34
Şekil 3.10: İnsizyon sonrası defekt alanının açılması.....	35
Şekil 3.11: Trefin frez yardımıyla defektin açılması	35
Şekil 3.12: Defektlerin trefin frez yardımıyla oluşturulduktan sonra cerrahi sahanın görüntüsü.....	36
Şekil 3.13: Çalışmada kullanılan taşıyıcı greft materyali (Hidroksiapatit TCP) ...	37
Şekil 3.14: 2.grupta defekt alanlarının HA-TCP greft materyali ile doldurulduktan sonraki görüntüsü	37
Şekil 3.15: 3.grupta defekt alanlarının insan kaynaklı Dental Pulpa Kök Hücre ekilmiş HA-TCP ile doldurulduktan sonraki görüntüsü	38
Şekil 3.16: Cerrahi işlem tamamlandıktan sonra flebin dikişli görüntüsü	38
Şekil 3.17: Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Micro-CT) cihazı.....	39
Şekil 3.18: Yeni kemik oluşum alanının tayini için kesitlerin belirlenmesi.....	40
Şekil 3.19: Defekt bölgesi için çalışma alanının belirlenmesi.....	40
Şekil 3.20: Alan ölçümünün yapılacağı histolojik fotoğraf örneği	41
Şekil 4.1: Grup 1'e ait mineral yoğunluğunun ölçülmesi.....	42
Şekil 4.2: Grup 2'ye ait mineral yoğunluğunun ölçülmesi.....	43
Şekil 4.3: Grup 3'e ait mineral yoğunluğunun ölçülmesi.....	43
Şekil 4.4: Osteokondüktif alanlar (ok başları) arasında uzanan fibröz bağ dokusu (oklar), Grup 1, (H-E, Skala=1000 µm).....	45
Şekil 4.5: Fibröz bağ dokusu (yıldızlar), Grup 1, (H-E, Skala: 100 µm)	46
Şekil 4.6: Fibröz bağ dokusu (yıldız), osteokondüktif uçta kemik doku (oklar), Grup 1, (H-E,Skala: 100 µm)	46

- Şekil 4.7:** Osteokondüktif kemik ucu (ok başları), osteoid doku (oklar) ve fibröz bağ dokusu (yıldızlar), Grup 1, (H-E, Skala:100 µm)47
- Şekil 4.8:** Grup 1'e ait birleştirilmiş defekt alanı görüntüsü 47
- Şekil 4.9:** Grup 1'e ait birleştirilmiş defekt alanı görüntüsü 47
- Şekil 4.10:** Fibröz bağ dokusu (yıldız), kalsifiye kemik doku (ok), osteoid doku (ok başı), Grup 1, (H-E, Skala:100 µm).....48
- Şekil 4.11:** Grup 2'ye ait birleştirilmiş defekt alanı görüntüsü48
- Şekil 4.12:** Osteokondüktif kemik uçları (oklar), fibröz bağ dokusu (yıldızlar), greft materyali içeren vakuoller (+), Grup 2, (H-E,Skala:1000 µm).....49
- Şekil 4.13:** Osteokondüktif kemik ucu (ok), fibröz bağ dokusu (yıldız), greft materyali içeren vakuoller (+), Grup 2, (H-E, Skala: 1000 µm).....49
- Şekil 4.14:** Fibröz bağ dokusu (yıldızlar), greft materyali içeren vakuoller (+), Grup 2, (H-E, Skala: 100 µm)50
- Şekil 4.15:** Osteokondüktif kemik ucu (ok başları), fibröz bağ dokusu (yıldız), greft materyali içeren vakuoller (+).....50
- Şekil 4.16:** Osteokondüktif kemik ucu (ok başı), fibröz bağ dokusu (yıldız), greft materyali içeren vakuoller (+), Grup 2, (H-E, Skala: 1000 µm)51
- Şekil 4.17:** Osteokondüktif kemik uçları (ok başları) Greft materyali içeren vakuoller (+), Osteoid doku (yıldızlar), greft içeren vakuoller çevresinde osteoblastik hücre grupları (oklar), kalsifiye kemik trabekülü (çift başlı ok), Grup 2.....51
- Şekil 4.18:** Greft içeren vakuoller çevresinde osteoblast hücre grupları (oklar) ve osteoklastlar (ok başları), Grup 2, (H-E,Skala: 100 µm)52
- Şekil 4.19:** Greft materyali içeren vakuoller (+), fibröz bağ doku alanları (yıldızlar), kalsifiye kemik doku (oklar), Grup 2, (H-E, Skala:1000 µm)52

- Şekil 4.20:** Osteokondüktif kemik ucu, greft materyali içeren vakuoller (+), Greft materyali içerisinde mezenşimal hücre infiltrasyonu (oklar), kalsifiye kemik doku (çift başlı ok), Grup 3, (H-E, Skala: 1000 µm)53
- Şekil 4.21:** Grup 3'e ait birleştirilmiş defekt alanı görüntüsü53
- Şekil 4.22:** Osteokondüktif kemik uçları arasında uzanan kalsifiye kemik doku alanlar (oklar), fibröz bağ dokusu (yıldızlar), greft materyali içeren vakuoller (+), Grup 3, (H-E, Skala: 1000 µm).....54
- Şekil 4.23:** Osteokondüktif kemik ucu (ok başları), kalsifiye kemik doku alanlar (oklar), fibröz bağ dokusu (yıldız), Grup 3, (H-E, Skala: 1000 µm)54
- Şekil 4.24:** Greft materyali içeren vakuoller (+) içinde mezenşimal hücre infiltrasyon alanları (oklar), fibröz bağ dokusu (yıldız), kalsifiye kemik doku (çift başlı oklar), Grup 3, (H-E, Skala: 100 µm).....55
- Şekil 4.25:** Greft materyali içeren vakuoller (+) osteoid doku alanları (oklar), fibröz bağ dokusu (yıldızlar), kalsifiye kemik doku (çift başlı oklar), Grup 3, (H-E, Skala: 100 µm).....55
- Şekil 4.26:** Greft materyali içeren vakuoller (+), greft materyali çevresinde osteoklastlar (ok başları), osteoblastik aktivite alanları (oklar), fibröz bağ dokusu (yıldızlar), kalsifiye kemik doku (çift başlı ok), Grup 3, (H-E, Skala: 100 µm) ...56
- Şekil 4.27:** Greft materyali içeren vakuoller (+), greft materyali çevresinde osteoklastlar (ok başları), osteoblastik aktivite alanları (oklar), Grup 3, (H-E, Skala: 100 µm).....56
- Şekil 4.28:** Greft materyali içeren vakuoller (+), greft materyali içinde ve çevresinde osteoid doku alanları (oklar), kalsifiye kemik doku (çift başlı ok), Grup 3, (H-E, Skala: 100 µm).....57

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1: Radyolojik ve Histomorfometrik sonuçların ortalama ve standart sapma değerleri (\bar{x} : ortalama, s: Standart sapma)	58
Grafik 4.1: Mikro-BT sonuçlarının dağılımı	44
Grafik 4.2: Histomorfometrik sonuçlarının dağılımı	57

1. GİRİŞ

Kemik rejenerasyonu, ağız, diş ve çene cerrahisinin en temel çalışma alanlarından biridir. Travma, kronik enfeksiyon, kist ve tümör rezeksiyonları gibi durumlarda kemikte defekt oluşmakta ve çoğu vakada kemik greftlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Kemik greftleri; otojen, allojen, ksenojen veya alloplastik greft materyallerinden temin edilebilmektedirler. Ancak, her birinin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Otojen kemik greftleri biyouyumluluk ve maliyet açısından olumlu iken ikinci bir donör saha ve uzun fiksasyon sürelerine ihtiyaç duyması olumsuz özellikleri arasındadır. Bu dezavantajları elimine etmek için sentetik greftler geliştirilmiştir. Biyouyumlu ve biyoeriyebilir olan bu materyallerin çene cerrahisinde kullanımı her geçen gün artmaktadır.

Hidroksi-apatit-tri-kalsiyum-fosfat (HA-TCP) bu amaçla üretilen sentetik bir kemik greftidir. 1970'li yılların sonundan itibaren kullanılmaya başlanmış ve halen özellikleri geliştirilerek hem kullanımı yaygınlaşmış hem de literatürdeki popülaritesini arttırmıştır.

Doku mühendisliği, yeni doku ve organları oluşturmak/onarmak için pek çok disiplinin beraber çalıştığı ve özellikle son yıllarda daha fazla olmak üzere hayli ilgi uyandıran bir alandır. Genel olarak taşıyıcı ve uyarıcı ajanların uygun biçimde kullanılarak dokunun teminini sağlamaktadır.

Hücre kullanmadan (cell-free) tatbik edilen çalışmalar da mevcuttur. Ancak mevcut çalışmamızdaki gibi hem taşıyıcı hem de uyarıcı hücrelerin beraber kullanıldığı vakalarda sonuçların daha başarılı olduğu gösterilmiştir.

Uygun taşıyıcı üretimi ve klinik kullanıma hazır hale getirilmesi de doku mühendisliği için önemli bir çalışma alanıdır. Bu amaçla pek çok sentetik materyal

özellikleri geliştirilerek kullanılmaya devam edilmektedir. Uygulanacak biyomateryalin biyoeriyebilir, biyouyumlu, osteokondüktif ve osteoindüktif özelliklerinin yeterli düzeyde olması hedeflenmektedir.

Güvenilir bir taşıyıcı teminiyle beraber sağlıklı ve kaliteli bir doku oluşumu için uyarıcı hücreler de kullanılmaktadır. Mezenşimal kök hücreler bahsedilen bu tedavi yaklaşımlarında önemli rol üstlenmekte ve umut vaat etmektedir. Kök hücrelerin keşfi ve potansiyellerinin anlaşılması üzerine bu alana yönelik ayrılan fonlar ve çalışma sayıları da artmıştır. Ülkemizde de bu alanda artan bir ilgi bulunmaktadır.

Kök hücreler, kendini yenileme kapasiteleri ve başka hücre tiplerine farklılaşabilme özellikleri ile ön plana çıkmaktadırlar. Vücutta, kordon kanı, plasenta, kemik iliği, yağ dokusu gibi pek çok dokudan elde edilebildiği gibi dental kaynaklardan da temin edilebilmektedirler. Periodontal ligament, dental folikül, apikal papilla, süt dişi ve dental pulpadan kök hücre izolasyonu yapılabilmektedir. Kolay elde edilebilmeleri ve yüksek farklılaşma potansiyelleri dental kök hücre kaynaklarını ön plana çıkarmaktadır.

Dental pulpadan elde edilen kök hücreler (DPSC) de hem yöntem olarak kolay elde edilebilirliği hem de osteojenik farklılaşma kapasitesinin yeterli olduğu pek çok kez gösterilmiş olmasından dolayı önemli bir kaynak olarak görülmektedir.

Rutin olarak kliniklerimizde çekildikten sonra değerlendirilmeden atılan dişlerin kök hücre kaynağı olarak kullanılabilmesi umudu diş bankaları fikrini de doğurmuştur. Yapılan çalışmaların artması ve sonuç alınması ile beraber, diş bankalarının yaygınlaşması, maliyetlerinin ucuzlaması mümkün olabilecektir.

Bu çalışmada, sıçan kalvaryumunda oluşturulan standart defektlerin hücreli ve hücresiz yaklaşımlar kullanılarak rejenerasyonu karşılaştırıldı. Doku mühendisliğinin kemik rejenerasyonunda etkinliğinin gösterilmesi ve klinik kullanım için potansiyelinin gösterilmesi hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Doku mühendisliği, yeni doku ve organ oluşturmak hedefi ile biyoloji, mühendislik ve klinik bilimlerin kombine edildiği multidisipliner bir alandır (1). Bu bilim, doku veya organ oluşumunu uyaran hücrelere ihtiyaç duyan iskelet ve morfojenik sinyallerin gelişimi ve uygun hücre tanımlamasını içeren temel prensiplere dayalıdır (2). Doku mühendisliği ,genel olarak her disipline özgü olarak karşılaşılan sağlıklı dokunun yeniden temini problemine bağlı olarak ortaya çıkmıştır. Bu yaklaşım temelde hücre tutunması ve fonksiyonunu koruyup destekleyen bir taşıyıcı, hedef dokuya uygun olarak seçilen zengin bir hücre kaynağı ve bu hücrelerin davranışını istenen şekilde etkileyen büyüme faktörlerini içermektedir (3). Maksillofasiyal cerrahi kliniğine kırık, tümör rezeksiyonu veya kronik enfeksiyona bağlı kemik hasarı gibi problemlerle başvuran hasta sayısı her geçen gün artmaktadır ve bu vakaların çoğu kemik greftlerine ihtiyaç duymaktadır (4,5). Ancak kullanılacak greft kaynağı ve miktarı sınırlıdır. Özellikle, otojen greft elde etmek için ek bir cerrahiye de ihtiyaç duyulmaktadır ve morbidite riski vardır (6,7). İkinci bir cerrahi saha oluşumunu elimine etmek için, iskelet-rehberliğinde (scaffold-guided) kemik doku mühendisliği, çoğu iskeletsel defektin tedavisinde umut vaat eden bir strateji olarak tarif edilmektedir (8).

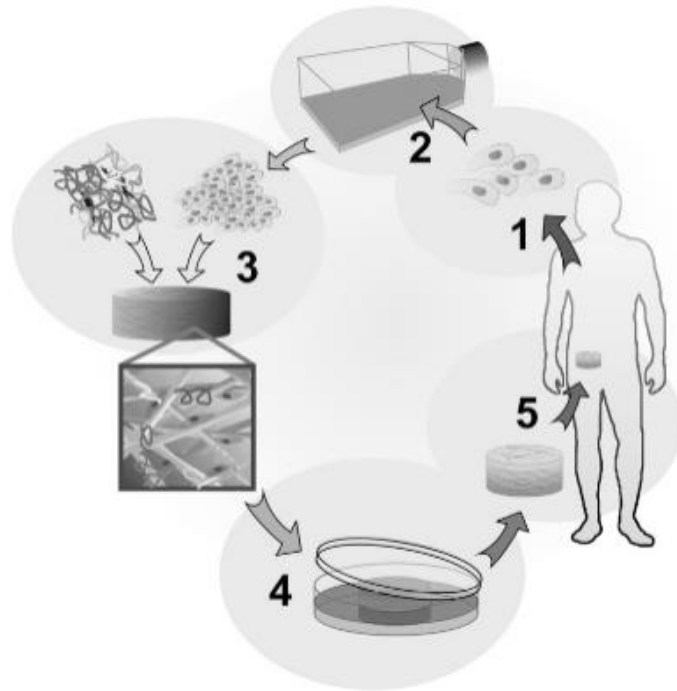
Dokular, onarım ya da rejenerasyon yoluyla iyileşebilirler. Onarım, doku hasarı meydana geldikten sonra mevcut duruma uyum sağlama durumudur. Kaybedilen doku ile işlev ve yapı olarak farklılık gösterebilmektedir. Rejenerasyon ise kaybedilen dokunun aynı yerde yeniden oluşturulmasıdır. Bu yeni doku, kaybedilen dokunun bire bir aynısıdır (9).

Doku mühendisliği, organ ve yapıları oluşturmak için uyarılabilir işlevsel hücreleri ve bu hücrelerin tutunabilmesi ve taşınabilmesi için doku ile uyumlu taşıyıcı iskeleleri kullanmaktadır. Bu hedefine in vitro olarak hazırlanan parçaların

canlı dokuya transferi ya da doğrudan in vivo uygulama yoluyla ulaşmaya çalışır (10).

Kaydedilen gelişmelerle beraber beklentiler de paralel olarak artış göstermektedir. Hasarlı ve işlevselliğini yitirmiş organların yenisi ile değiştirilmesi fikri doku mühendisliği çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadır. Ancak büyük organların oluşturulması şu aşamada pek çok zorluğu da beraberinde getirmektedir. Çünkü büyük yapıların, oluşturulan iskeleler içinde beslenmesi ciddi bir sorundur. Ayrıca kemik dokuda olduğu gibi mekanik ihtiyaçların da bulunması, durumu daha da zorlaştırmaktadır. Neovaskülarizasyonun sağlanması ile ilgili teknikler gelişmektedir. Organların erken aşamalarda kültür ortamında meydana getirilip daha sonra canlı vücudunda bekletilerek oluşturulması yöntemi de kabul gören ve umut vaat eden bir yaklaşımdır (1).

Doku mühendisliği, artan ilgi, kaynak ve beklentilere rağmen hala gerçek manada klinik pratiğe girememiştir. Bir yandan kullanılan hücre türleri ve miktarları ile ilgili çalışmalar sürerken diğer yandan kullanılan biyomalzemeler ve uygulama teknikleri araştırılmaktadır (10).



Şekil 2.1: Kök Hücrelerin temin edilip uygulanması döngüsü

2.1.1. Kemik doku mühendisliği

Kemik doku mühendisliğinin geçmişi yaklaşık 30 yıl öncesine dayanır. 80’li yılların ortalarından itibaren başlayan bu ilgi ve birikim giderek büyümekte ve yayımlanan derleme ve özgün çalışma sayıları da artarak devam etmektedir.

Kemik doku mühendisliği alanı, halen uygulanmakta olan geleneksel klinik tedavilerde karşılaşılan donör alan morbiditesi, sınırlı miktar, immün uyumsuzluk ve patojen transferi gibi durumları bertaraf eden alternatif çözümler oluşturmak üzerine yoğunlaşmaktadır. Kemiğin onarımı veya rejenerasyonunu temin edecek uygun kemik greftlerinin elde edilmesi hedeflerine ulaşmak için bilim insanları, mühendisler ve cerrahların ortak çabasına ihtiyaç vardır (11). Klasik kemik doku mühendisliği birkaç kilit nokta üzerine kuruludur. Bunlar: doğal kemik hücreler arası matriksini taklit eden biyouyumlu bir taşıyıcı, kemik doku matriksini oluşturabilecek hücreler, hücrelerin istenilen yönelimi göstermelerini sağlayacak morfojenik sinyaller ve dokunun gelişimi için yeterli kanlanmanın sağlanmasıdır. Özellikle oluşturulacak yapı canlı dokuya taşındıktan sonra dokuda osteojenik ve anjiojenik büyüme faktörlerini uyarabilmeli ya da zaten muhtevasında olan büyüme faktörleri bu etkileri gösterebilmeli (12). Kaydedilen gelişmelere ve yararlı laboratuvar çalışmalara rağmen halen klinik kullanıma girememiş olması bu alandaki umutları azaltmamıştır.

Kemik doku mühendisliği ile yeni işlevsel kemik dokularını oluşturmak için kemiğin doğasını, gelişimini, iskeletini, şeklini ve mekaniğini iyi anlamak son derece önemlidir.

2.1.2. Dental pulpa dokusu geliştirilmesi

Diş hekimliği de doku mühendisliğinin ilgi alanlarından biridir. Endodontik problemler diş hekimliği kliniğinin en önemli sorunlarından biri olması nedeniyle ilgi uyandırmaktadır. Bu nedenle pulpa dokusunun doku mühendisliği yaklaşımlarıyla tedavi edilmesi ile ilgili çalışmalar da yapılmaktadır. Bu alışmalar faz 3 aşamasına gelmiş bulunmaktadır (1).

2.2. BİYOMATERYALLER VE KLİNİK KULLANIMLARI

Kemik doku mühendisliğinde beklenen sonuç, arzu edilen alanda iyileşmenin temin edilebilmesidir. Bu amaçla ilgili bölgede dokuyu taklit edebilen greft materyallerine ihtiyaç duyulmaktadır. Doku mühendisliğinin temelinde de var olan bu yaklaşımda greft malzemesi; hem çatı görevi görür hem de istenilen projenitör hücrelerin taşınmasına yardımcı olur (13). Greft destekli kemik iyileşmesini anlayabilmek için bazı kavramları bilmek gerekir;

Osteointegrasyon: Greft ile kemiğin doğrudan tutunmasıdır.

Osteokondüksiyon: Greftin çatı vazifesi görerek vasküler ve perivasküler yapıların greft içine nüfuzuna izin vererek yeni kemik oluşumunu uyarabilmesidir.

Osteoindüksiyon: Osteoblastik aktivitenin uyarılabilesidir.

Osteogenezis: Greft materyalinin ihtiva ettiği hücreler ve projenitörler sayesinde tedavi sahasında yeni kemik oluşumuna denir.

Greft materyalleri bu özelliklerin en az birine ya da daha fazlasına sahiptirler. Bunun yanında 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 ta isimlendirilir.

Xenogreft: Farklı türler arasında yapılan doku naklidir.

Alloplastlar: Sentetik olarak üretilen biyoyumlu materyallerdir.

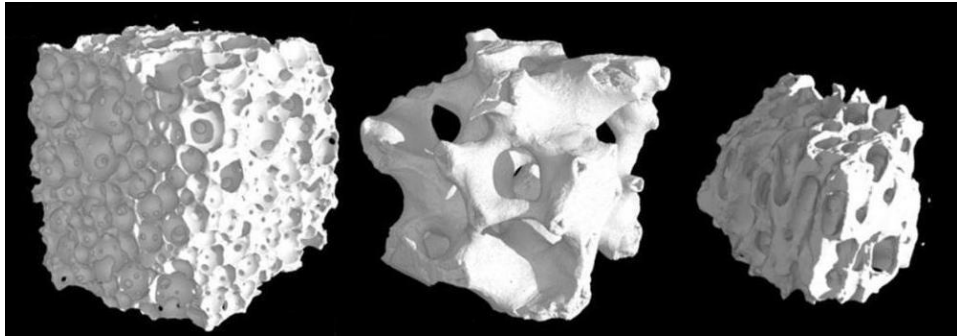
Greftlerin kullanım alanları ve duyulan ihtiyaç artmakla beraber özelliklerini geliştirmeye yönelik çalışmalar ve yatırımlar da bu doğrultuda artış göstermektedir. Bu malzemelerin daha kullanışlı ve tatmin edici olması için uygun materyal ve malzeme arayışları devam etmektedir. Yaygın olarak kullanılan bu destek

malzemeler polimerik yapıda olup sentetik polimerler ve doğal polimerler olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadırlar (14).

Sentetik polimerlerin; çözünme zamanı, fiziksel yapısı ve geçirgenliği gibi özelliklerinin değiştirilebilir ve üretimi esnasında planlanabilir olması en önemli artılarıdır. Doğal polimerler ise hücre adezyonu ve dolayısıyla çoğalmasını daha iyi temin ederler.

Doku mühendisliğinde kullanılan malzemelerin şu özelliklere sahip olması beklenir;

- 1) Hücrelerin tutunmasına imkan vermeli,
- 2) Hücrelerin büyümesine imkan vermeli,
- 3) Biyouyumlu olmalı,
- 4) Biyoçözünür olmalı. Ancak uygun zamanda çözünmeli ve çözünürken toksik etki oluşturmamalı,
- 5) Hücre göçüne izin verecek şekilde gözenekli olmalı,
- 6) Gözenekler birbiriyle bağlantılı olmalı,
- 7) Mikro gözenekleri ile yüzey alanı geniş olmalı,
- 8) Doku tamirine kadar mekanik özelliklerini korumalı,
- 9) Talep edilen şekilde üretilebilmeli.



Şekil 2.2: Greftlerin fiziksel yapıları ve pöröziteleri üretim aşamasında planlanabilmektedir.

2.2.1. Biyopolimerler

Klinik kullanımları her geçen gün artmakta olup doğal ve sentetik olmak üzere ikiye ayrılırlar.

2.2.1.1. Doğal polimerler

Çeşitli canlılardan elde edilen ve doğada fazla miktarda bulunan protein, polisakkarit ve polinükleotid (DNA) yapıdaki biyomalzemelerdir. Doğal olduklarından dolayı biyolojik olarak uyumlu, çözünebilir ve hücrel aktivite özellikleri bir hayli iyidir. Ancak mekanik özellikleri zayıftır (15). Bazı doğal polimerler;

2.2.1.1.1. Kitosan

Kabuklu deniz hayvanlarının kabuklarındaki kitinin kimyasal işlemlerden geçirilmesiyle elde edilir. Klinik kullanımdaki başarısı bilimsel literatür tarafından da desteklenmektedir. Osteojenik hücrelerin yüzeyine tutunabilmesi ve kemik gelişimini uyarabilmesinden dolayı kemik doku mühendisliğinde halen ilgiyle çalışılmaktadır (16). Enjekte edilebilir formlarının olması klinik olarak kullanım kolaylığı sağlamaktadır.

2.2.1.1.2. Kollajen

Özellikle kemik, kırık gibi sert dokularda ve bağ dokusunda bolca bulunan proteinlerdir. Kemik ve kırık doku mühendisliğinde de yapı iskelesi olarak kullanılmaktadır (17).

2.2.1.2. Sentetik polimerler

Laboratuvar ortamında kimyasal sentezler yapılarak elde edilen malzemelerdir. Alloplastik materyaller olarak da isimlendirilirler. Fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değiştirilebilir olması en büyük avantajlarıdır. Bazı sentetik polimerler;

2.2.1.2.1. Poli(glikolik asit) (PGA)

Uzun yıllardır suture materyali olarak kullanılmaktadır. Doku mühendisliğinde 3 boyutlu taşıyıcı iskele olarak kullanılır. Doku içinde 3 ay içinde tamamen eriyebilir. Kitosan gibi diğer polimerlerle kompozit materyal üretiminde kullanılmaktadır (18).

2.2.1.2.2. Poli(L-laktik asit) (PLA)

En geniş alanı diğer sentetik polimerlerin de olduğu gibi cerrahi suture olan bu malzemenin tıbbi malzeme olmasının yanı sıra otomotiv, ambalaj, tekstil ve savunma sanayisinde de kullanılmaktadır. Laktik asitin zaten vücudumuzda bulunmasından dolayı kolay bir şekilde çözünebilir bu yapı aynı zamanda stent yapımında da kullanılmaktadır (19).

2.2.1.2.3. Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

Laktik ve glikolik asitin kimyasal olarak birleştirilerek sentezlenmesi ile oluşan ve hayli geniş kullanım alanı olan bir malzemedir. İlaç üretiminde ve çalışmalarında kullanılmaktadır. Kontrollü salınımına çok uygun olması ve doku uyumundan dolayı hem ilaç sektörü hem de doku mühendisliği çalışmaları için önemli bir yer teşkil etmektedir (20).

2.2.2. Biyoseramikler :

2.2.2.1. Trikalsiyum Fosfat (TCP)

Diş minesinin yapısında da bulunan ve vücutta hidroksiapatite dönüştürülebilir bir bileşiktir. Osteokondüktif özellikleri tatmin edici iken osteoindüktif etkisi için aynı şey söylenemez. Pörözite özelliklerinin hücre infiltrasyonunu kısıtlamasından dolayı partikül formu daha çok kullanılır. Biyouyumluluğu son derece iyi olup kemik rejenerasyon çalışmalarında en çok kullanılan malzemelerden biridir (21).

2.2.2.2. Hidroksiapatit (HA)

Kemiğin doğal bileşeni olduğundan biyouyumluluğu fevkalade iyidir. Fakat biyoçözünürlüğü olumsuz özellikleri arasındadır. Diş ve kemik dokusuna benzerliği ilgi çekici bir malzeme olmasını sağlamaktadır (22). Kemik defektlerinin tamirinde kısa sürede yüksek kemikleşme gösteren çalışmalar mevcuttur. Sığır kaynaklı olarak piyasada bulunan ürünler rağbet görmektedir.

2.2.3. Kompozit malzemeler

Doku mühendisliğinde çok çeşitli türde ve şekilde malzeme kullanılmaktadır. Ancak her malzemenin kendine göre bazı olumsuz özellikleri mevcuttur. İşte bu olumsuz özellikleri gidermek ya da en aza indirmek ve malzemelerin olumlu özelliklerini bir araya toplamak için yapılan kombinasyonlarla oluşturulan malzemelere “kompozit malzeme” adı verilir.

2.2.3.1. Hidroksiapatit Trikalsiyum Fosfat (HA-TCP)

Çalışmamızda da kullandığımız bu malzemenin, biyoaktivite ve osteokondüktivite özelliklerinin iyi ve umut verici olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (23,24). Hazırlanan bu kombinasyonun çeşitli oranlarda birleştirilmesi ve etkinliğinin incelenmesi üzerine de halen çalışmalar yapılmaktadır. Bu birleşim ile hidroksiapatitin çözünmeme ve kalsiyum fosfatın çok çabuk çözünme ve dağılma sorunlarının önüne geçilebilmektedir. Böylece hem çatı vazifesini istenilen şekilde yerine getirmesi hem de çözünmenin gereken zamanda gerektiği kadar olması sağlanarak hücre nüfuzuna izin vermesi temin edilmiş olmaktadır (25). Şu an piyasada çeşitli formlarda HA-TCP içerikli greft materyali bulunmaktadır.

2.3. KÖK HÜCRE KAVRAMLARI

İlk kez 1800'lerin ortalarında hücrelerin başka hücreleri doğurabileceği fikri bu tür hücrelerin varlığına işaret etmiş bulunuyordu. 1978'de insan kordon kanında kök hücreler keşfedildi. Bu keşiften sonra kök hücre araştırmaları artan bir ilgi ve umutla devam etti. Bugün en önemli kısmını kanser araştırmaları oluşturmakla beraber, kök hücreler vücudumuzdaki her türlü problem için en büyük umut kaynağıdır (26).

Kök hücre, temel olarak kendini yenileme ve uygun şartlar altında başka hücrelere farklılaşabilen sınırsız bölünme kapasitesine sahip hücrelerdir. Yumurta ve spermin birleşip fertilizasyonun gerçekleşmesinden bu yana canlıyla beraber olan bu hücrelerin biyolojisini anlamak için bazı terimlerin bilinmesi gerekmektedir;

Totipotent kök hücreler: Her yönde farklılaşabilen ve canlıyı oluşturabilme yetisine sahip kaynak hücrelerdir.

Pluripotent kök hücreler: Çok yönlü farklılaşabilen ve birçok dokuya kaynaklık eden hücrelerdir.

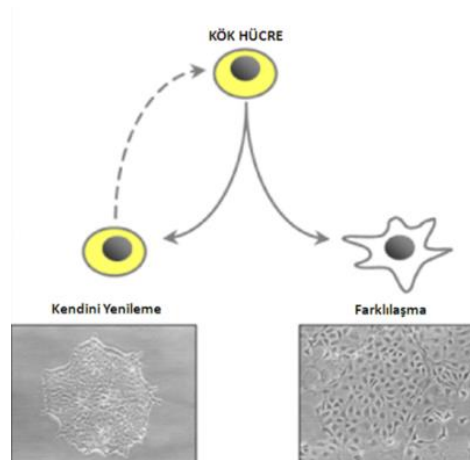
Multipotent kök hücreler: Birkaç farklı hücreye dönüşebilen kök hücreler.

Kendini yenileme (self-renewal): Kök hücrelerin belli bir hücre tipine farklılaşmadan aynı genetik yapıda kendini yenilemesidir.

Farklılaşma (diferansiyasyon): Hücrelerin farklı görev ve işlevler için başka bir hücre tipine dönüşmesine denir. Her hücrenin farklılaşma kapasitesi farklı olabilir.

Embriyonik kök hücreler: embriyonun erken evrelerinde bulunan totipotent özellikte olan hücrelerdir. İn-vitro gebeliklerde ihtiyaç fazlasının alınması ile temin edilmektedir.

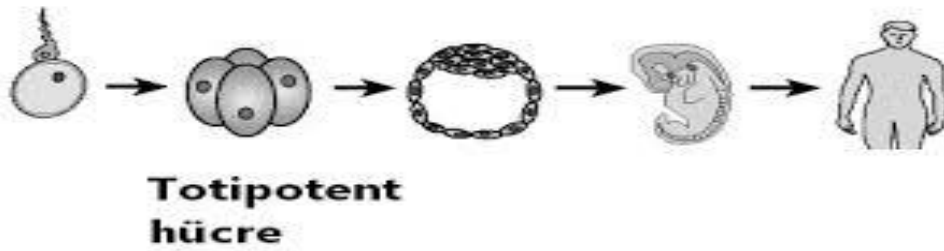
Somatik (yetişkin) kök hücreler: Doku ve organları gelişmiş bireylerden elde edilen kök hücrelerdir.



Şekil 2.3: Kök Hücrelerin karakteristik özellikleri

2.3.1. EMBRİYONİK KÖK HÜCRELER

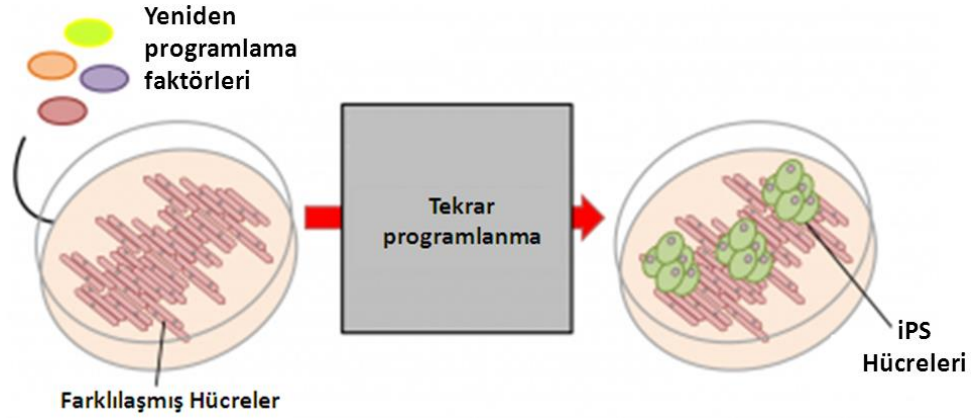
Blastokist evresindeki insan embriyosunun iç hücre kitlesinden elde edilen, her üç embriyonik germ tabakasına da farklılaşabilen ve potansiyeli çok yüksek olan kök hücrelerdir. Kök hücre araştırmalarının en tartışmalı başlıklarının başında gelmektedir. Zira klonlama çalışmalarının temelini oluşturan kısım buradan başlamaktadır.



Şekil 2.4: Totipotent Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler, halk arasında “tüp bebek yöntemi” olarak da bilinen in vitro döllenen sonra arta kalan dölleniş hücre kitlelerinin hastanın onayının da alınmasıyla elde edilir. Fakat bu bazı problemleri de beraberinde getirmektedir. Halen embriyonik kök hücre çalışmaları bazı ülkelerde yasak iken bazı ülkelerde de sınırlı izin verilmektedir. Zira bu çalışmaların etik yönünün yanı sıra dini boyutu da bulunmaktadır (27).

Ancak 2007 yılında Takahashi ve ark. yetişkin somatik kök hücrelerini uyatarak tekrar embriyonik kök hücre benzeri hücreleri elde etmeyi başardı ve bu hücrelere “induced pluripotent stem cells (iPS)” adını verdi (28). Bu hücreler antijen yüzeyleri, gen ekspresyonları, morfoloji ve telomeraz aktivitesi olarak embriyonik kök hücrelere benziyorlardı. Kök hücre araştırmalarında çok heyecan uyandıran bu gelişme embriyonik kök hücre kullanımına da alternatif oluşturmaktadır (28).



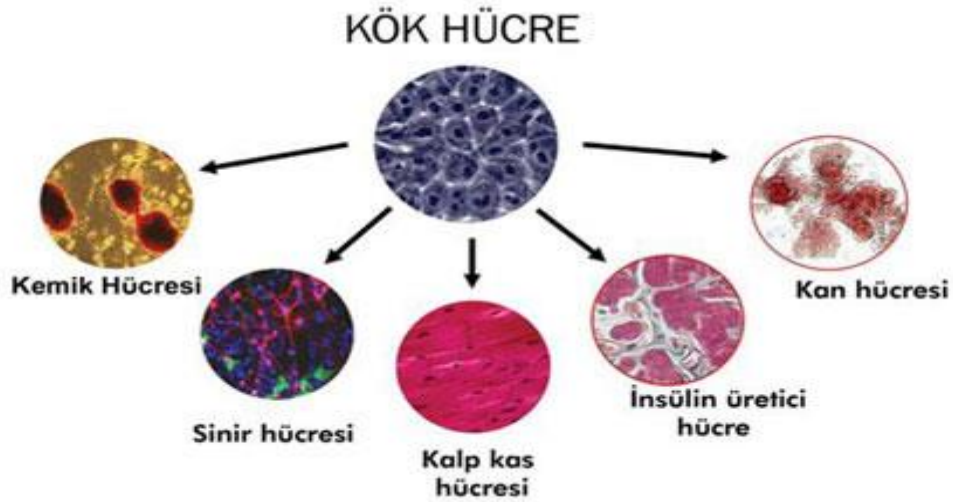
Şekil 2.5: Induced pluripotent stem cells (iPS Hücreleri)

Embriyonik kök hücreler yüksek bölünebilme ve farklılaşma kapasitelerinden dolayı teratoma denilen üç germ tabakasını da içeren tümöral kitle oluşumuna da neden olabilir. Bu sebeple embriyonik ya da diğer kök hücre kaynaklarının kontrolü ve mekanizmalarının anlaşılması üzerine çok gayret sarfedilmektedir.

2.3.2. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER

Stromal kökenli, erişkin dokusunda bulunan ve 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 altında osteojenik, kondrojenik, adipojenik ve nörojenik farklılaşabildiği gösterilmiştir (29).

Teratoma oluşturmadıkları ve her dokudan temin edilebilmeleri avantajları arasında olmasına rağmen embriyonik kök hücrelere göre daha sınırlı kapasiteleri vardır. Çünkü sayılarının az olması ve çoğaltılmaları için laboratuvar ortamında defalarca kültüre edilmelerinden dolayı telomeraz aktiviteleri ve farklılaşma kapasiteleri daha zayıftır. Daha çok buldukları dokuya farklılaşma eğilimindedirler. Ancak yine de çok geniş kullanım alanları vardır (30).



Şekil 2.6: Mezenkimal Kök Hücreler

Hematopietik Kök Hücreler: Mezenkimal kök hücrelerin ilk kez kordon kanından izole edilmiş olması ve bu kaynakların kök hücre açısından hayli zengin olması sebebiyle hematopietik kök hücreler önemli ve üzerinde en çok çalışılan kök hücre kaynaklarının başında gelmektedir. Tüm olgun kan hücrelerine farklılaşabilirler. Kordon kanı, periferik kan ve kemik iliği başlıca temin kaynaklarıdır (31).

2.3.3. DENTAL KÖK HÜCRE KAYNAKLARI

Kök hücrenin keşfi, hücrel ve moleküler biyolojideki ilerlemeler yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine sebep olmuştur. Dental kök hücre kaynakları doku mühendisliği uygulamaları için uygun adaylar olarak tanımlanmaktadır. Multipotent farklılaşabilme kapasitelerinden dolayı sadece dental dokulara değil aynı zamanda kemik ve sinir doku gibi diğer doku türlerine de farklılaşabildiğinden dolayı rejeneratif tıpta önemli bir alternatif olarak kabul edilmektedirler (32). Klinik araştırmalar neticesinde çok sayıda dental kaynaklı mezenkimal kök hücre izole edilebilmiştir. Bunlar; dental pulpa hücreleri, apikal papilla kök hücreleri, periodontal ligament kök hücreleri, eksfoliyeye süt dişlerinden elde edilen kök hücreler ve dental folikül kök hücreleridir (33).

Dental Kök Hücreler



Şekil 2.7: Dental kök hücre kaynakları

2.3.3.1. DENTAL FOLİKÜL KÖK HÜCRELERİ (DFPCs)

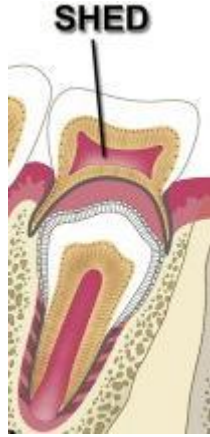
Literatürde ‘‘Dental folikül prekürsör hücreleri (DFPCs)’’ Şeklinde de bahsedilir. Dental folikül, nöral krestten köken alan ektomezenşimal hücreleri içerir. Diş gelişimi için hayati bir rol oynamasının yanısıra periodonsiyum için de nc hücreleri ihtiva eder. Periodontal Ligament (PDL), osteoblast ve sementoblasta dönüşebilir. Uygun koşullar altında kemik iliği kök hücreleri gibi koloni oluşturup yapışabilme özelliğine de sahiptirler (34).

2.3.3.2. EKSFOLİYE SÜT DİŞLERİNDEN ELDE EDİLEN KÖK HÜCRELER (SHED)

İngilizce literatürde ‘‘Stem cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED)’’ olarak taranır. Yakın zamanda izole edilmiş olmasına rağmen hayli ilgi çeken ve sahip olabileceği potansiyellerden dolayı geniş bir çalışma imkânı sunmaktadır. Bu kaynak kolay ulaşılabilirliği ile dikkat çekmektedir. Zira diş hekimliğinde süt dişi çekimi en rutin işlemlerden biri olması ve bu kaynağın doğrudan biyolojik atık olarak değerlendirilmesi çalışmanın etik boyutunu çok

rahatlatmaktadır. Ayrıca yüksek proliferasyon oranları ve zengin temin kaynakları olması nedeniyle son yıllarda bir “SHED Bank” fikrini bile doğurmuştur (35).

Bu avantajlara sahip olan ve ileriye dönük potansiyel vaat eden bu kaynakla ve mekanizmaları ile ilgili henüz yeterince bilgi bulunmamaktadır.



Şekil 2.8 : Eksfoliye süt dişinden elde edilen kök hücreler

2.3.3.3. PERİODONTAL LİGAMENT KÖK HÜCRELERİ (PDLSC)

Periodontal ligament, diş kökü ile alveoler kemik arasında bulunup lifler yardımıyla bu iki doku arasındaki bağlantıyı sağlar. Sahip olduğu kök hücreler, diğer kök hücreler gibi kendini yenileme ve farklılaşma özelliklerine sahiptirler. Örneğin ihtiyaç duyulduğunda, sement ya da kemik yapımında rol alabilirler (36).

Diş çekiminden sonra kök yüzeyinden izole edilebilir. Yapılan in-vitro çalışmalarda yağ, kıkırdak ve kemik hücrelerine dönüşebildiği gösterilmiştir (37,38). Ayrıca domuzlarda yapılan bir çalışmada bütün diş oluşumunda da katkı sağlayabileceği gösterilmiştir (39).

Periodontal ligament kök hücreleri, dental doku mühendisliği ve lezyon tamirinde başvurulacak hücresel tedavi yöntemlerinde alternatif ve önemli bir kaynak olarak görülmektedir.

2.3.3.4. APİKAL PAPİLLA KÖK HÜCRELERİ (SCAP)

“Stem Cell from Apical Papilla (SCAP)” olarak isimlendirilen bu kaynak bir diğer önemli ve umut verici kök hücre kaynağıdır. İlk kez 2006’da yüzey işaretleyicileri tespit edilerek izole edilen bu kaynak kök hücre özellikleri göstermektedir. Bununla beraber odontoblast benzeri doku ve adipositlere farklılaşabildiği ve dentin benzeri dokuları hem in vitro hem de in vivo olarak üretebildiği gösterilmiştir (39).

Kök gelişimi devam eden dişin apikal bölgesinden izole edilen bu kök hücre kaynağı ayrıca nörojenik yüzey işaretleyicilerini de içermektedir (40). Yüksek proliferasyon ve farklılaşma potansiyeli nedeniyle önemli bir kaynaktır (41).

2.3.3.5. DENTAL PULPA KÖK HÜCRELERİ (DPSC)

Dental pulpa muhtevasında %1’den dahi az sayıda bulunan bu kök hücreler ilk kez 2000 yılında Gronthos, S ve ark. tarafından izole edilmiştir (42). En fazla çalışılan dental kök hücre kaynaklarından. Bu özelliği hem ilk izole edilen dental kaynak olması, hem kolay elde edilebilir olması hem de canlı doku veya laboratuvar koşullarında çoğalma ve farklılaşma yönünden tatmin edici sonuçlar vermesinden ileri gelmektedir (43).

Pulpa dokusu dentin tarafından örtülmekle beraber birbiriyle bağlantılı dokulardır. Dentin pulpanın üzerini kapatarak onu korurken, pulpa da dentini hem rejenere eder hem de beslenmesi sağlar (32). Yapılan çalışmalarda dentin harabiyetinde pulpanın hemen tamir refleksi gösterdiğini ve o bölgedeki kök hücrelerin aktive olduğunu gösteriyor (44). Almushayt ve ark. (45) açığa çıkmış pulpa dokusunun üzerinde dental pulpa kök hücrelerinin odontoblastik aktiviteleri sonucunda tamir dentini oluşturduğunu göstermişlerdir.

Dental pulpadan elde edilen kök hücrelerin hem iPS hücrelerine hem de odontoblast, miyosit, osteoblast, kondrosit, adiposit, nörosit ve kornea epitel hücresine dönüşebildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (46,47). Uygun şartlar altında dental pulpadan elde edilen kök hücrelerin immüdüzenleyici bir karakter

sergilediği ve immün cevap oluşturmadığı da rapor edilmiştir (48). Buna ek olarak son dönemdeki çalışmalarda kemik iliği kök hücreleriyle karşılaştırıldığında dental pulpa kök hücrelerinin daha fazla bölünme ve nöral ve epitelyal hücrelere farklılaşma özelliği gösterdiği bildirilmiştir (49,50).

Doku mühendisliği çalışmalarında başarı için anjiyojenik potansiyel de bir başka önemli konudur. Yapılan çalışmalar dental pulpa kök hücresinin anjiyojenik özellik sergilediğini göstermiştir. Ratlarda oluşturulan myokardiyal enfarktüs alanına uygulanan DPSC'nin kontrol grubuna göre kardiyak fonksiyonu geliştirdiğini, enfarkt alanını küçülttüğünü ve yeni damarlanmayı sağladığı rapor edilmiştir (51).

2.4. KEMİK DOKU

Kemik doku, vücudumuzda diş minesi ve dentininden sonra en sert dokudur. İskelet sisteminin temelini oluşturur. Organizmaya iskeletsel olarak mekanik desteğinin yanısıra, kaburga yapısıyla kalp ve akciğeri, omurga ile omuriliği, kafatasıyla da beyin gibi önemli organ ve yapıları korumakla da görevlidir. Ayrıca tüm kalsiyumun %99'unu depolamasıyla hem kalsiyum hem de fosfor deposudur. Kan ile kemik arasında sürekli bir kalsiyum alış-verişi bulunmaktadır. Kemik dokunun, kan hücrelerinin yapıldığı kemik iliğini içermesi de önemli vasıflarından biridir (52).

Kemik doku da diğer bağ dokuları gibi hücreler, lifler ve hücrelerarası matriksten oluşmuştur. Ancak bunlardan farklı olarak kemik dokunun hücrelerarası matriksi mineralizedir. Hem organik hem de inorganik muhtevaya sahiptir. İnorganik içeriğini, greft malzemesi olarak ta çok kullanılan kalsiyum fosfat oluşturmaktadır. Kalsiyum ve fosfor kristalize olarak yine greft olarak kullanılan hidroksiapatiti oluştururlar. Bu inorganik yapılar kemiğe sertliğini verir. Organik içeriğinin temel kısmını ise Tip 1 kollajen ağları oluşturur. Çok sert olmasına rağmen dayanıklılığını arttıran ve kolay kırılmasını önleyen bu yapılardır. Bunların dışında proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar ve glikoproteinler hücrelerarası matriksi meydana getiren diğer proteinlerdir (53).

Kemik yapı itibariyle kompakt (kortikal) ve süngerimsi (spongiyoz) olmak üzere iki şekilde görülür;

2.4.1. Kemik formları

2.4.1.1. Kompakt Kemik

Esas itibariyle havers kanalları ve etrafında onu çevreleyen lamellerin oluşturduğu osteon adı verilen yapılardan oluşur. Bu kanal sistemi tüm kompakt kemiği kaplamış olup pek boşluk içermez. Havers kanalları, Volkman kanalları ile birbirlerine bağlanırlar. Çok sert ve boşluksuz bir yapı olduğundan difüzyonla beslenemez. İçinde bulunan çok sayıdaki kanaliküller bu görevi yerine getirirler (52).

2.4.1.2. Süngerimsi Kemik

Kortikal dokuya göre daha fazla boşluk içeren ve düzenli lamel ağı bulunmayan peteksi bir yapıya sahiptir. Beslenmesini içindeki kemik iliğinin zengin damarlarından difüzyonla sağlar. Kemik iliği kırmızı ve sarı olarak görülebilir. İhtiyaç halinde sarı kemik iliği kırmızı kemik iliğine dönebilir (54).

2.4.2. Primer ve Sekonder Kemik

İntrauterin hayatta ilk olarak oluşan olgunlaşmamış kemiğe ‘primer kemik’ denir. Daha sonra yerini olgunlaşmış ‘sekonder kemiğe’ bırakır. Primer kemik dokusunda mineralizasyon daha zayıf, hücre sayısı daha fazla ve kollajen dağılım daha düzensizdir. Sekonder kemikte kollajen dağılım ve kemik lamelleri daha düzenlidir (52).

2.4.3. Kemiğin Hücresel Yapısı

2.4.3.1. Kemik Doku Hücreleri

Kemik dokuyu oluşturan hücreler: osteositler, osteoprojenitör hücreler, osteoblastlar ve osteoklastlardır.

2.4.3.1.1. Osteositler

Kemiğin esas hücreleri olup olgunlaşmış hücrelerdir. Dentrik uzantıları sayesinde birbirleriyle bağlantı kurarlar ancak bölünemezler. Kan ile kemik

arasındaki kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesinde görev alır. Kemiğin canlılığı bu hücrelere bağlı olup ölmeleri durumunda rezorpsiyon olur. Kemik matriksinin mineralizasyondan dolayı madde alış-verişi osteositler yardımıyla yapılır (52,53,54).

2.4.3.1.2. Osteoprojenitör Hücreler

Mezenkimal kaynaklı olan ve mitozla osteoblasta dönüşebilen hücrelerdir. Kemik yapımının daha aktif olduğu büyüme, kırık ve hasar durumlarında sayıları artar.

2.4.3.1.3. Osteoblastlar

Yapım işlerinden sorumlu olan osteosit öncülü hücrelerdir. Projenitör hücrelerden farklılaşırlar. Golgi ve endoplazmik retikulumları gelişmiştir, bölünmezler. Kemik matriksini sentezlerler.

Osteoblastların stoplazmaları alkalın fosfataz açısından zengindir. Kemikte yapım aktivitesinin artması klinik olarak alkalın fosfataz seviyesi ile yorumlanır.

2.4.3.1.4. Osteoklastlar

Kemik yıkımından / rezorpsiyonundan sorumlu olan bu hücreler bir nevi makrofaj sayılırlar. Çok çekidekli olup lizozom, mitokondri ve golgi aygıtları gelişkin büyük hücrelerdir. Osteoblastlarla uyum içinde çalışırlar. Ayrıca hormonal değişimlere hassastırlar. Paratroid hormonu osteoklast aktivasyonunu arttırarak kana kalsiyum geçişini arttırır.

2.4.3.2. Kemiğin Organik ve İnorganik İçeriği

2.4.3.2.1. Organik İçerik

Ekseriyetle tip 1 kollajen ve glikozaminoglikanların oluşturduğu temel maddeden oluşur. Olgunlaşmış kemik dokuda kollajen lifler aralarında boşluklar bırakacak şekilde ve düzenli yerleşirler. Kemiğin vücuttaki fonksiyonalarını sağlıklı bir şekilde gerçekleştirmesi, içeriğindeki tüm bileşiklerin dengesine bağlıdır (54).

2.4.3.2. İnorganik İçerik

Kalsiyum, fosfat, magnezyum ve sitrat, inorganik içeriğin temelini oluştururlar. Bu elementlerden kalsiyum ve fosfat minerde olduğu gibi kemiğe de hidroksiapatit kristallerini oluşturarak sertliğini verir (54).

2.4.3.3. Periosteum

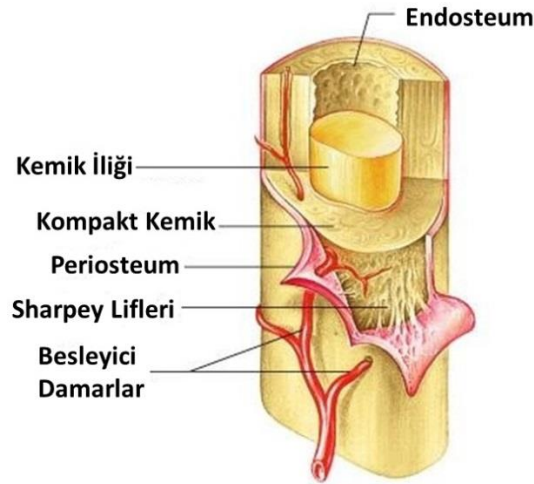
Eklem yüzeyleri hariç tüm kemik yüzeylerini örten bağ dokusudur. Kemiğin gelişimi, beslenmesi ve tamirinde son derece önemlidir. Damarlanması çok zengin olup, kemik dokuya uzanan dallar da mevcuttur. Hücre açısından da çok zengindir. Osteoprojenitör ve osteoblast hücreleri yoğun olarak bulunur.

Kemiğe ‘Sharpey iplikleri’ denilen kollajen lifler yardımıyla bağlanır. Bu lifler kasların, tendon ve ligamentlerin kemiğe bağlandıkları bölgelerde daha yoğun olarak bulunurlar.

2.4.3.4. Endosteum

Kortikal kemiğin kanal sistemlerini ve kemik iliği kavitesini örten dokudur. Periosteumdan daha ince yapıda olup damar bakımından zengindir.

Endosteum ve periosteum kemiğin beslenmesi, tamir ve gelişimi için hem besin hem de hücre temininde önemli vazifeler görmekte ve bu dokuların sağlığı kemiğin fonksiyonları için son derece önemlidir (54).



Şekil 2.9: Kemik yapısı

2.4.4. Kemik Oluşumu (Osteogenesis)

Ossifikasyon adı da verilen kemik yapımı, iki şekilde meydana gelir. Bunlardan intramembranöz kemikleşme, bağ dokusundan doğrudan oluşurken endokondral kemikleşme, kıkırdak yapının kemikleşmesiyle oluşur. Her durumda önce primer kemik oluşur daha sonra olgunlaşır.

2.4.4.1. İntramembranöz Kemikleşme

Mezenkimal hücrelerin kemik oluşacak alanda kümelenmesi ve osteoprojenitör hücreleri oluşturması, devamında osteoblastların oluşması ve osteoid dokuların meydana gelmesiyle devam eder. Kemik öncülü odakların arasında damarlanma olur ve bu damarlar vasıtasıyla taşınan kalsiyum, fosfat gibi mineraller bölgeye taşınır. Oluşan yapıların mineralizasyonu artar ve son şeklini alarak olgunlaşırlar.

2.4.4.2. Endokondral Kemikleşme

Mevcut kıkırdak iskeletonin kemikleşmesi olarak da tarif edilebilir. Kemikleşecek olan alanlarda öncelikle kıkırdak hücreleri büyümeye ve uzun diziler yapmaya başlar. Daha sonra bozunan kondrositlerin yerini osteoblastlar ve daha sonra osteositler alır. Damarlanma ve kalsifikasyonla beraber kemik doku oturmaya başlar.

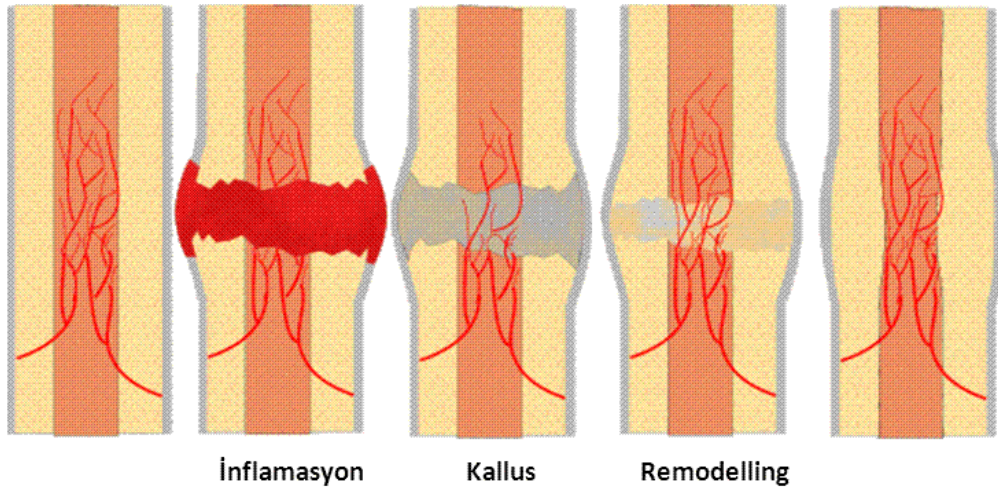
2.4.5. Kemiğin Tamiri / İyileşmesi

Kemik dokunun kendine has ve organize bir iyileşme mekanizması vardır. Hasar gören alanda doku parçalanır ve damarsal yapıların zarar görmesiyle kanama olur. İlgili bölgeye sızan kan ile bir yandan parçalanmış doku artıkları nötrofil ve makrofajlarla ortadan kaldırılırken bir yandan yeni damar yapımı devam eder. Hasar bölgesine komşu bağ dokularından fibroblastlar ulaşır hızla çoğalarak granülasyon dokusunu meydana getirirler. Böylece osteoblast, kondroblast ve kollajenden zengin

bir bağ dokusu yapısı oluşur. Bu yapı daha sonra mineralize olarak kıkırdak benzeri bir yapı meydana getirir. Bu yapıya *kallus* adı verilir (52,53,54).

Periosteum ve endosteumdan osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönüşerek kemik yapıyı oluşturmaya başlarlar. Bir tarafta kemik yapımı devam ederken bir tarafta da kıkırdak yıkımı olur.

Tamir süresince hem intramembranöz hem de endokondral kemikleşme meydana gelir. Başlangıçta oluşan primer olgunlaşmamış ve düzensiz yapılı olan kemik daha sonra yıkım-yapım sürecinin devam etmesiyle sekonder kemik halini alır.



Şekil 2.10: Kemik doku iyileşmesi

2.4.6. Kemik Dokunun İncelenme Yöntemleri

2.4.6.1. Testereleme ve Bileme Yöntemi (Maserasyon) :

Sert dokulardaki inorganik içeriği incelemek için kullanılır. Kemik doku örneği yıkandıktan sonra kurutulur. Kuru doku örneği zımpara ya da bilenerek inceltir. Elde edilen numune boyanmadan lam ve lamel arasında yerleştirilerek incelenir. Bu yöntemle kemiğin laküna ve kanalikül gibi inorganik içerikleri net bir şekilde incelenebilir (55).

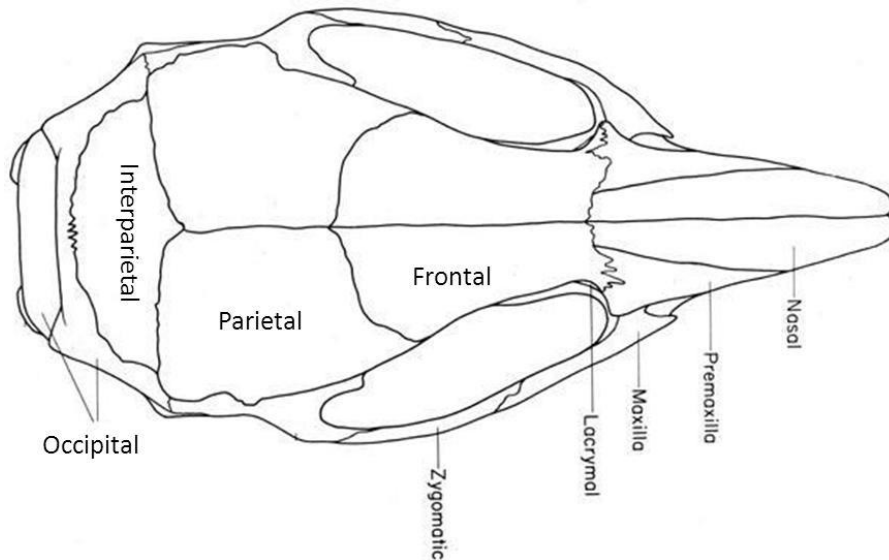
2.4.6.2. Dekalsifikasyon Yöntemi :

Kalsifiye içeriğin ortamdan uzaklaştırılması işlemidir. Alınan doku örneği tespit edildikten sonra asitli çözeltiler yardımıyla kalsiyum içeriği çözülür. Numune istenilen yumuşaklığa ulaşıncaya, geleneksel histolojik tekniklerle parafine gömülüp kesilerek boyanır ve inceleme için hazır hale gelir. Bu yöntemle kemik dokunun hücre, kollajen lifler gibi organik içerikleri incelenebilir (55).

2.5. Rat Kalvaryum Anatomisi

Laboratuvar ratları *ratus norveticus*'tan köken almaktadır. Daha saldırgan olan siyah türlerine göre albino cinsleri çalışmalar için tercih edilmektedir. Boyları kuyruk dahil yaklaşık 20-25 cm kadardır. Kromozom sayısı 42 olup yaşam süresi 3-4 yıldır. Gebelik süresi 20-23 gündür. Batında 6-12 yavru taşıyabilir. Yetişkin ağırlığı erkeklerde 450-520 gram, dişilerde 250-300 gramdır. Temel tıp, ilaç, gıda, davranış ve toksisite çalışmalarında kullanılmaktadır.

Rat kafatası çok sayıda kemikten meydana gelir. Bu kemikler yine çok sayıda suture ile birbirinden ayrılmışlardır. Kafatasları dar ve uzun yapılıdır. Kemik rejenerasyon çalışmalarında daha çok parietal kemik üzerinde çalışılır.



Şekil 2.11: Rat kalvaryumu

2.6. Kemik Defekt Modeli:

Kemik rejenerasyonu ile ilgili çalışmalar, geliştirilen yeni materyal ya da hücre terapileriyle birlikte artmaktadır. Bu çalışmaların daha iyi anlaşılması ve insanda uygulanabilirliğinin gösterilmesi için hayvan çalışmalarına ihtiyaç vardır. Ağız diş ve çene cerrahisi alanındaki kemik rejenerasyonu çalışmalarında kalvaryal defekt kullanımı çok sıktır. Bu çalışmalarda tam kalınlıklı, standart, kritik defekt modelleri uygulanmaktadır. Üzerinde tam olarak fikir birliği olmamasına rağmen yapılan çalışmalarda kritik defekt boyutu ratlar için yaklaşık olarak 5 mm olarak bildirilmiştir (56). Kritik boyutta kemik defekti seçilmesinin sebebi, bu defektlerin bağ dokusu ile dolarak iyileşmesidir. Kemik iyileşmesi için osteoindüktif etkiye ihtiyaç vardır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'nın 22.06.2012 tarih ve 2012/A-72 araştırma protokol numarası ile İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Çalışmada ortalama 200-250 g ağırlığında, 15 adet Wistar Albino türü dişi rat kullanıldı. Ratlar operasyondan sonra 20-24°C sıcaklık, % 30-40 nem oranı ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlıkta bırakılarak ve sıkıştırılmış pelit yemi ile beslenerek 2 ay bakıldı.

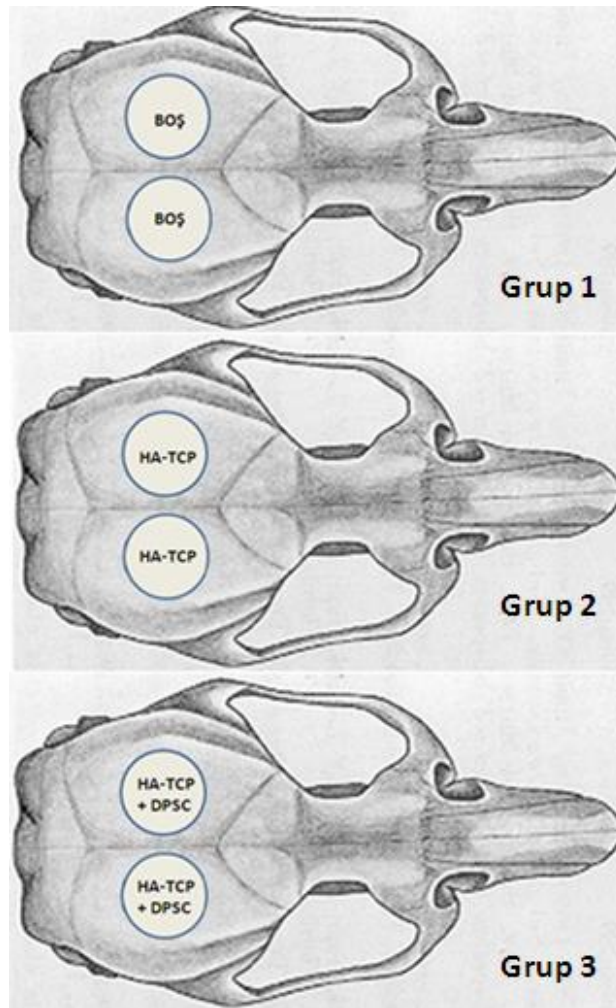
Çalışmada kullanılan cerrahi aletler, tıbbi malzemeler ve kök hücre temini İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'nden sağlanan 2012/127 no'lu proje desteği ile temin edildi. Çalışmada kullanılan dental pulpa kaynaklı kök hücreler (DPSC) Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Araştırmaları Merkezi (KÖGEM) tarafından temin edildi. Taşıyıcı greft materyaline ekim işlemi İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Cerrahi işlemler her grup için ayrı bir gün ayrılarak yapıldı. Tüm cerrahi işlemler aynı cerrah tarafından gerçekleştirildi. Cerrahi işlem sonrası denekler her grup için ayrılmış olan özel bakım kutularına alındı. Uzman veteriner gözetiminde, filtrelenmiş havalandırılması olan odalarında takipleri yapıldı.

Anesteziye bağlı komplikasyonlardan kontrol grubunda iki rat kaybı yaşandı. Bu nedenle deneylere 2 yeni rat eklendi.

3.1. Çalışma Grupları

Çalışmada toplam 15 adet Wistar Albino cinsi rat kullanıldı ve her grupta 5 rat olmak üzere 3 grup oluşturuldu. Her bir ratın kalvaryumunda paryetal kemiğe bilateral olarak 4 mm çapında defektler açıldı. Toplamda her grupta 10 olmak üzere 30 defekt oluşturulmuş oldu. Uygulanacak kök hücrelerin komşu defekti etkileme ihtimali yüksek olduğundan, aynı hayvanda oluşturulan her iki defekte de aynı işlem uygulandı. Tüm hayvanlar 8 hafta sonra sakrifiye edilerek micro-CT ve histomorfometri incelemeleri için laboratuvara gönderildi.



Şekil 3.1: Grup 1: Kontrol, Grup 2: Hidroksiapatit TCP, Grup 3: Hidroksiapatit TCP + Dental Pulpa Kaynaklı Kök Hücre (DPSC)

3.2. Kök Hücre Temini ve Uygulaması

İnsan Dental Pulpası (iDP)'ndan elde edilen Mezenkimal Kök Hücre (MKH)'lerin İzolasyonu

Mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu için insan diş pulpasından elde edilen pulpa dokusu, 2 mg/ml'lik tip 1 kollajenaz solüsyonu içerisine koyulup 37°C'lik su banyosunda yaklaşık 1 saat bekletildi. Daha sonra çıkarılan tüpler vortekslenerek, hücrelerin diğer doku parçacıklarından ayrılması sağlandı ve tek hücre süspansiyonu elde edildi. Sindirilmiş pulpa dokusu ihtiva eden süspansiyon 70 µm'lik gözenekleri olan hücre süzgecinden geçirilerek hücrelerin ayrıştırılması sağlandı. Ayrıışan hücreler 15 ml'lik konik tabanlı tüplere alınarak içine Hank's dengeleyici tampon çözeltisinden (HBSS) 5 ml eklendi ve 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak, 5 ml HBSS eklendi ve tekrar 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücrelerin son yıkama işlemini takiben %15 oranında FBS ve %1 oranında penisilin-streptomisin içeren DMEM besiyerinde (T-25 kültür kaplarında) 37°C, %5 CO₂ ve nemli ortamda (CO₂ inkübatöründe) kültüre edilmeleri sağlandı.

Kültüre alınmalarından 48 saat sonra kültür kabının tabanına tutunmayan hücreler ortamdan arındırıldı ve besiyeri değiştirildi. Takip eden günlerde haftada 2 kez besiyerleri değiştirildi ve düzenli olarak inverted mikroskopla kontrolleri yapıldı.

Yaklaşık olarak 16-18 gün sonra incelenen kültür kabının tabanının hücrelerce doldurulduğu izlendiğinde alt-kültür işlemine geçildi. İlk kültür sıfırını pasaj (P0) olarak belirlenerek, sonraki her alt-kültür işleminde pasajlar P1, P2, P3, P4 şeklinde isimlendirildi.

Steril kabin içinde yapılan kültür işleminde, ortamdaki tabana tutunmayan hücreler tekrar uzaklaştırılarak kültür kabı 3-4 ml Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen PBS ile yıkandı. Ortama 1.5-2 ml %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve inkübasyon için 4-5 dakika CO₂ inkübatörüne alındı. Mikroskopta incelenen hücrelerin tamamen yüzeyden ayrıldığı izlenerek tripsin inaktivasyonu için 4 ml'lik besi ortamı flasklara eklendi. Akabinde 15 ml'lik konik tabanlı tüplerde tekrar 1300 rpm'de 5 dakika santrifüje edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pelete 1 ml besi ortamı eklendi ve pipetlenerek homojenizasyon sağlandıktan sonra eppendorf tüpüne mikropipetle

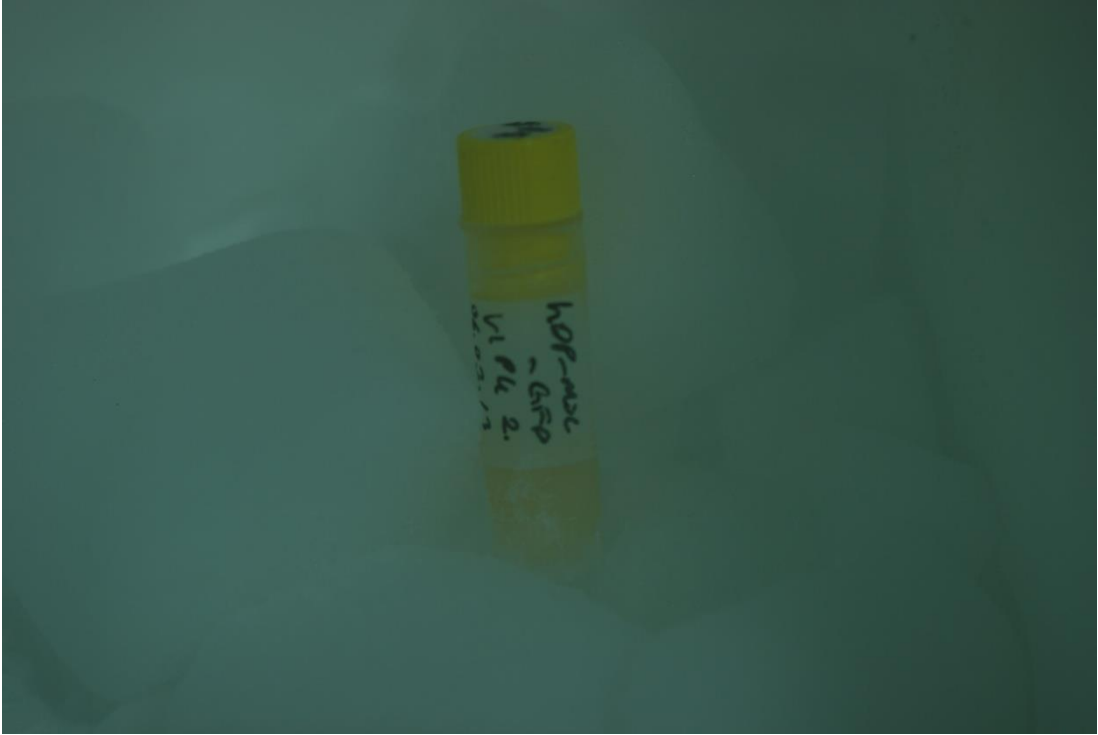
100µl'lik hücre süspansiyonu alınarak hücre sayımı için hazırlandı. Sayımdan sonra hücreler gerekli ölçülerde besi ortamları seyreltilerek 1×10^6 hücre yoğunluğunda 75 cm²'lik hücre kültür flasklarına (T-75 kültür kaplarına) ekilerek 3 günde bir besi ortamları değiştirildi ve kültür işlemine devam edildi.

3.2.1. Hücrelerin GFP (yeşil floresan protein) ile işaretlenmesi

Çalışmada kullanılacak kök hücrelerin GFP (yeşil floresan protein) ile işaretlenmesi Neon Transfection Sistemi (Kat. No. MPK5000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ve 10 µl Neon Kiti (Kat. No. MPK1096) kullanılarak yapıldı. EndoFree Plazmid Maxi Kiti (Kat. No. 12362, Qiagen, Valencia, CA, USA) kullanılarak saflaştırılmış, GFP genini ve hücre içi ekspresyonu için gerekli tüm yapısal öğeleri taşıyan, yüksek kalitede, endotoksin içermeyen plazmid DNA 'sı 5 µg/µl konsantrasyonunda deiyonize su içerisinde hazırlandı. Kültür kabındaki hücrelerin tripsin (%0,25) ile kaldırılması sağlandı, Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen fosfat salin tamponu ile yıkandı ve "Resuspension Buffer R" tampon çözeltisi yardımı ile nihai hücre yoğunluğu 10⁷ /1 ml hücre olacak şekilde süspansiyon hazırlandı. Transfeksiyon değerleri daha önceden belirlenen değerlere göre ayarlandı (990 V, 40 ms). Steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisinde her transfeksiyonda 2- 4 µg plazmid DNA 'sı ve 10 µl hücre karıştırıldı. Belirlenen ayarlarda sistem elektrik akımı tatbik edildi. Gen aktarımı yapılan hücreler ısıtılmış serum ihtiva eden besi ortamına alındı. Hücrelerin olağan şartlarda çoğalması sağlandı. Transformasyon yapıldıktan 3 gün sonra besi ortamı yenilendi. Daha sonra seçici antibiyotik (G418) eklenmiş ve 1 ay boyunca hücreler antibiyotik direncine göre seçildiler.

3.2.2. Kök Hücrelerin Taşıyıcı Greft Materyaline Ekilmesi

Mezenkimal Kök Hücre'ler uygun koşullar altında dondurularak, greft üzerine ekim işleminin yapılacağı laboratuvara ulaştırıldı. Daha sonra 37°C su banyosunda çalkalanarak çözüldü. Medium ile bir kez yıkandıktan sonra yine medium içerisinde 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Önceden Walkmann küret ile eşit olarak ayrılmış uygun besiyeri içindeki greft üzerine eklenen kök hücreler eklendi. Hücrelerin taşıyıcı grefte tutunması için 3-4 saat inkübatöre alındı. Hücreler grefte tutunduktan sonra implantasyon gerçekleştirildi.



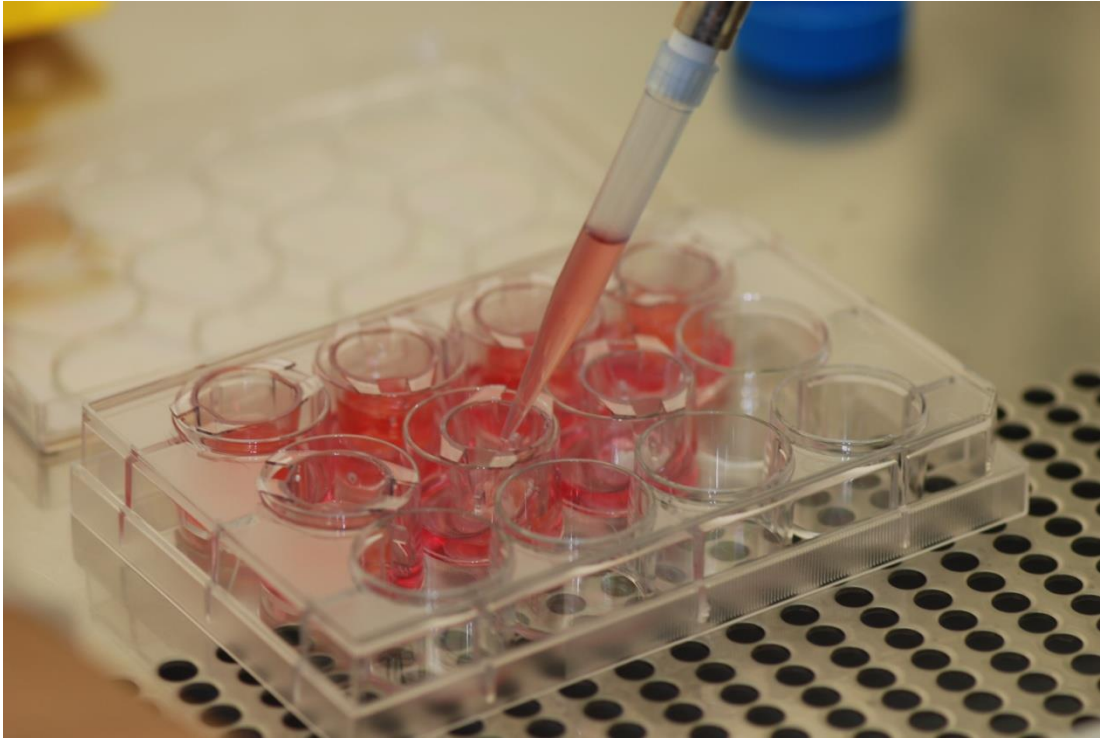
Şekil 3.2: İnsan Dental Pulpa Kök Hücrelerinin laboratuvara taşınması



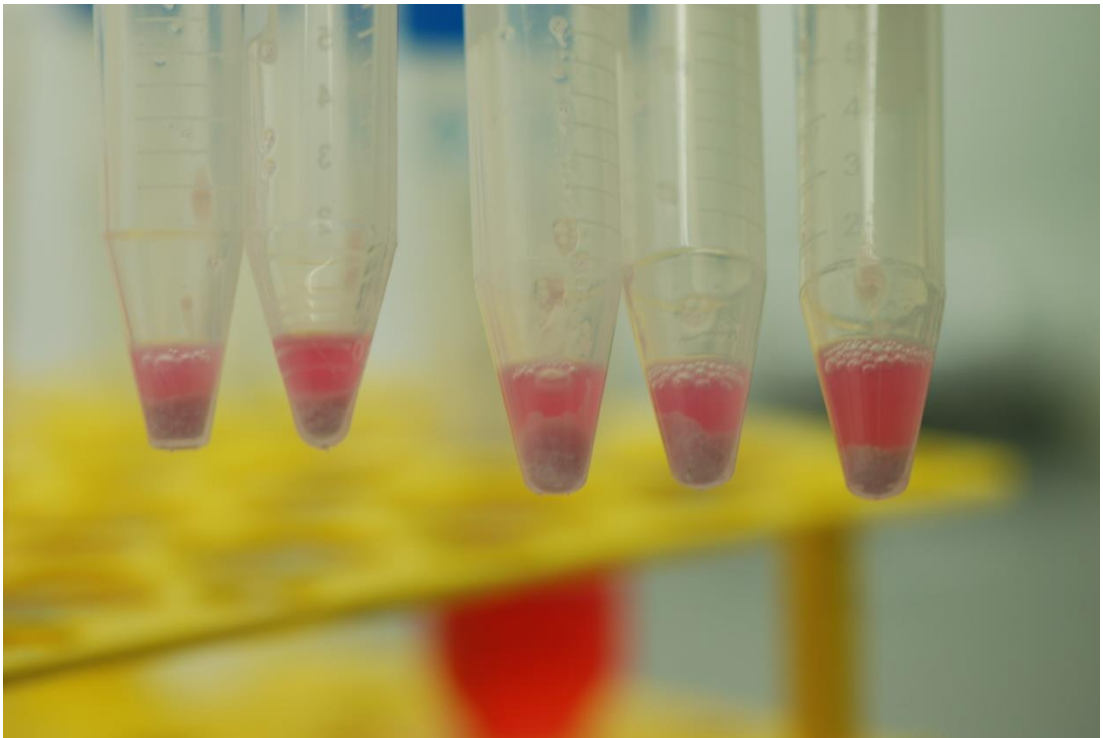
Şekil 3.3: Greftlerin besiyerine taşınması



Şekil 3.4: 1;İnkübatör, 2; Santrifüj Cihazı, 3;Steril kabin



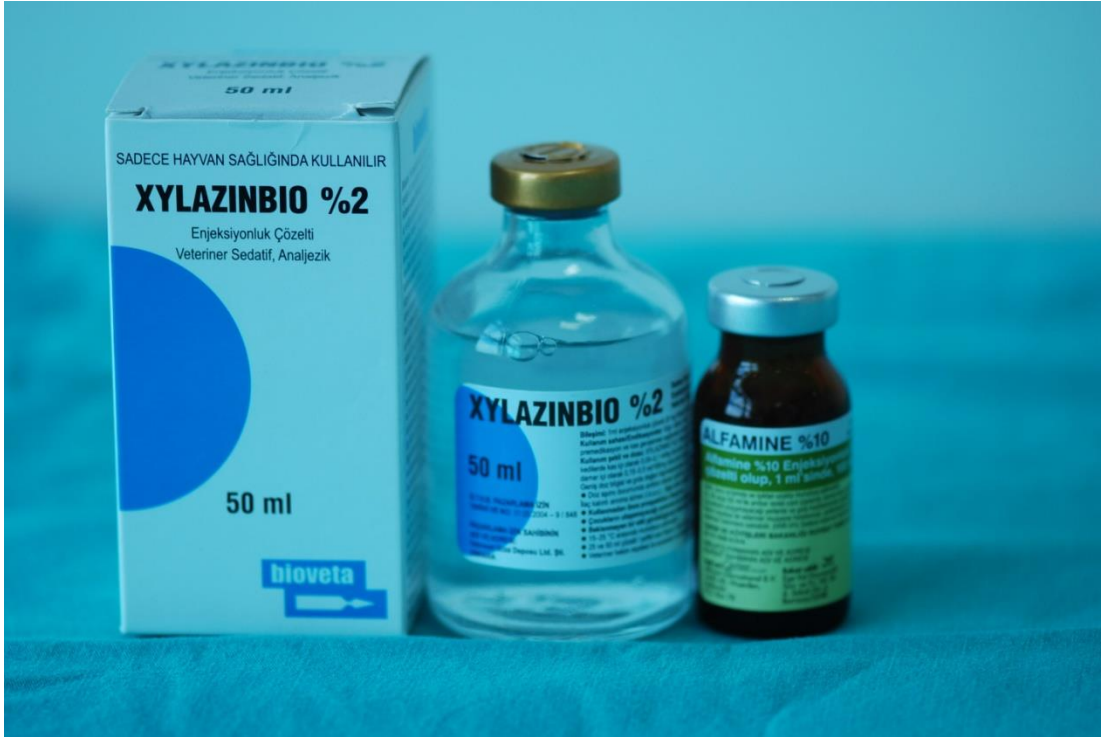
Şekil 3.5: Hücrelerin besiyerine aktarılması



Şekil 3.6: Kök Hücre taşınmış greftlerin besiyeri içerisindeki görüntüsü

3.3. Cerrahi Teknik

Yapılan tüm cerrahi işlemler İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (İNÜDEHÜM) müdahale odasında yapıldı. İşlemler boyunca cerrahi işlem kuralları gereği asepsi, antisepsi ve sterilizasyon kurallarına uyarak operasyonlar gerçekleştirildi. Anestezi için tüm deneklere %10'luk Ketamin HCL (Alfamine®) ve Ksilazin HCL (Xylazinbio®) İM yolla verilerek genel anestezi sağlandı (Şekil 3.7). İnsizyonun yapılacağı alan povidon iyot ile boyandı. Denekler steril örtüler ile yalnızca cerrahi saha açıkta kalacak şekilde örtüldü (Şekil 3.9).



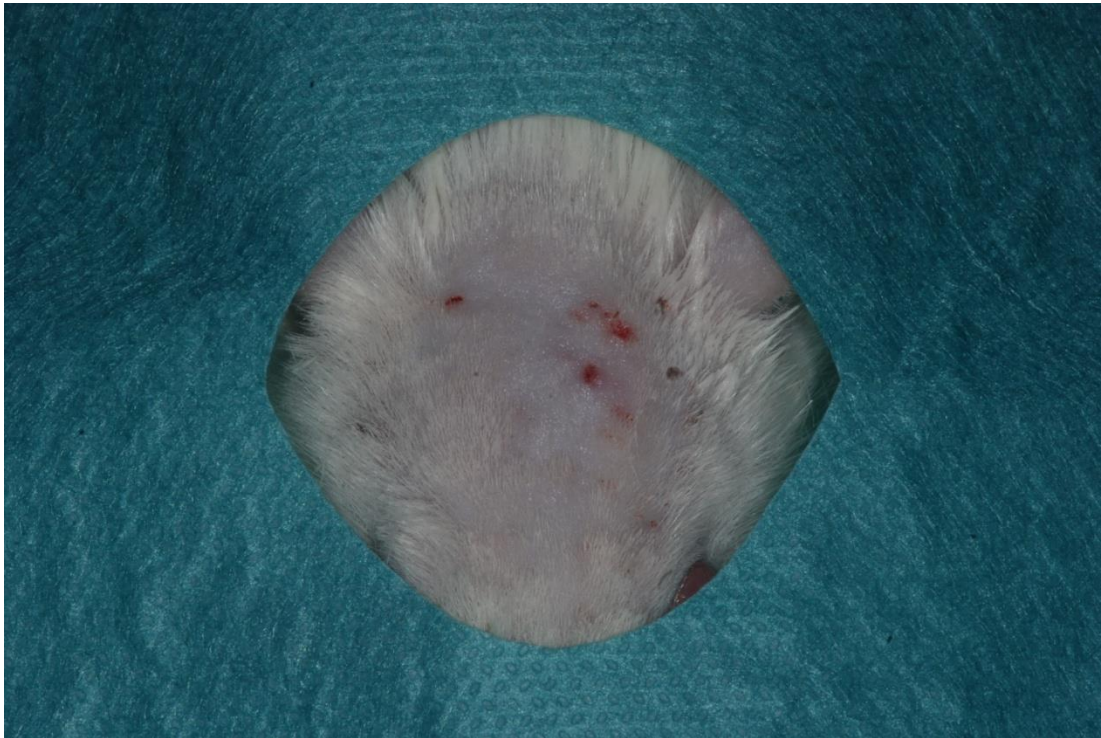
Şekil 3.7: Çalışmada kullanılan anestetik malzemeler

Rat kalvaryumunda orta hat boyunca parietal bölgeyi açığa çıkaracak şekilde 15 no'lu bistüri ile antero-posterior insizyon yapıldı ve tam kalınlık flep kaldırıldı. Defekt oluşturulacak alana ulaşıldı. Ekartörler kullanılarak cerrahi alanda yeterli görüş sahası oluşturuldu (Şekil 3.10-3.11).

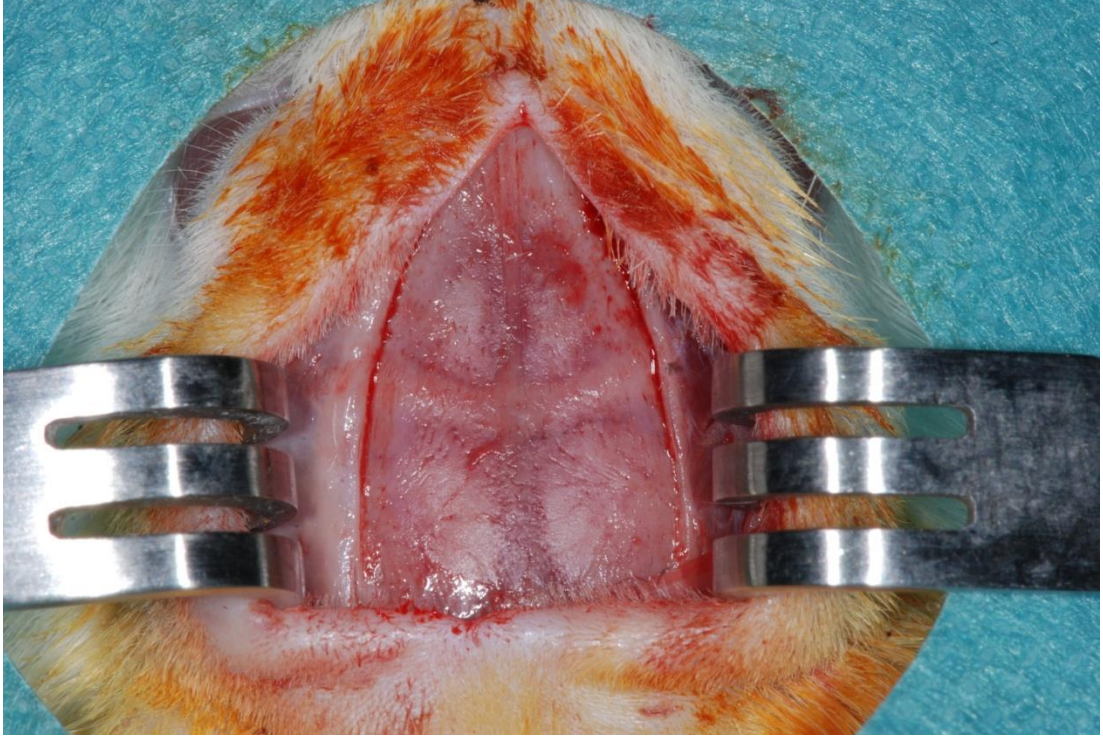
Dış çapı 4 mm olan trefin frez yardımıyla ve serum fizyolojik yıkaması altında defektler açıldı. Defektler oluşturulurken 'dura mater'e zarar vermemek için azami dikkat gösterildi. Her denekte bilateral olarak iki defekt açılıp ameliyat sahası artıkların uzaklaştırılması için iyice irrigate edildi.



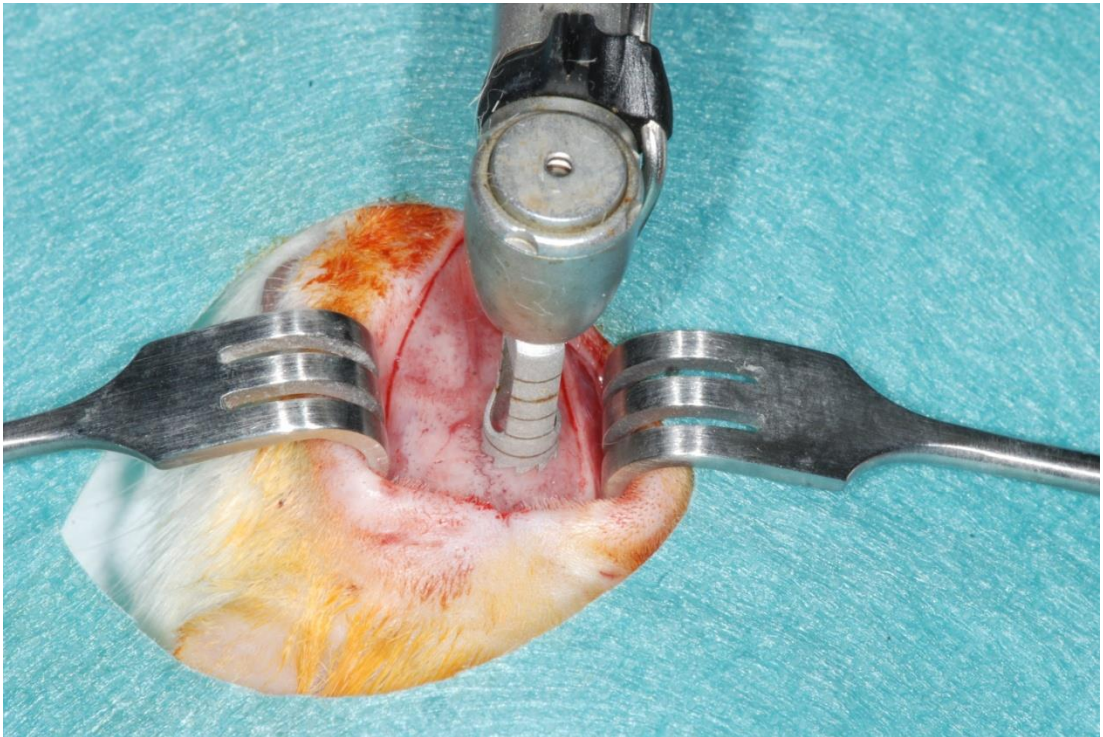
Şekil 3.8: Cerrahi operasyonda kullanılan aletler ve suture materyali



Şekil 3.9: Cerrahi sahanın traş edilmesi



Şekil 3.10: İnsizyon sonrası defekt alanının açılması



Şekil 3.11: Trefin frez yardımıyla defektin açılması



Şekil 3.12: Defektlerin trefin frez yardımıyla oluşturulduktan sonra cerrahi sahanın görüntüsü

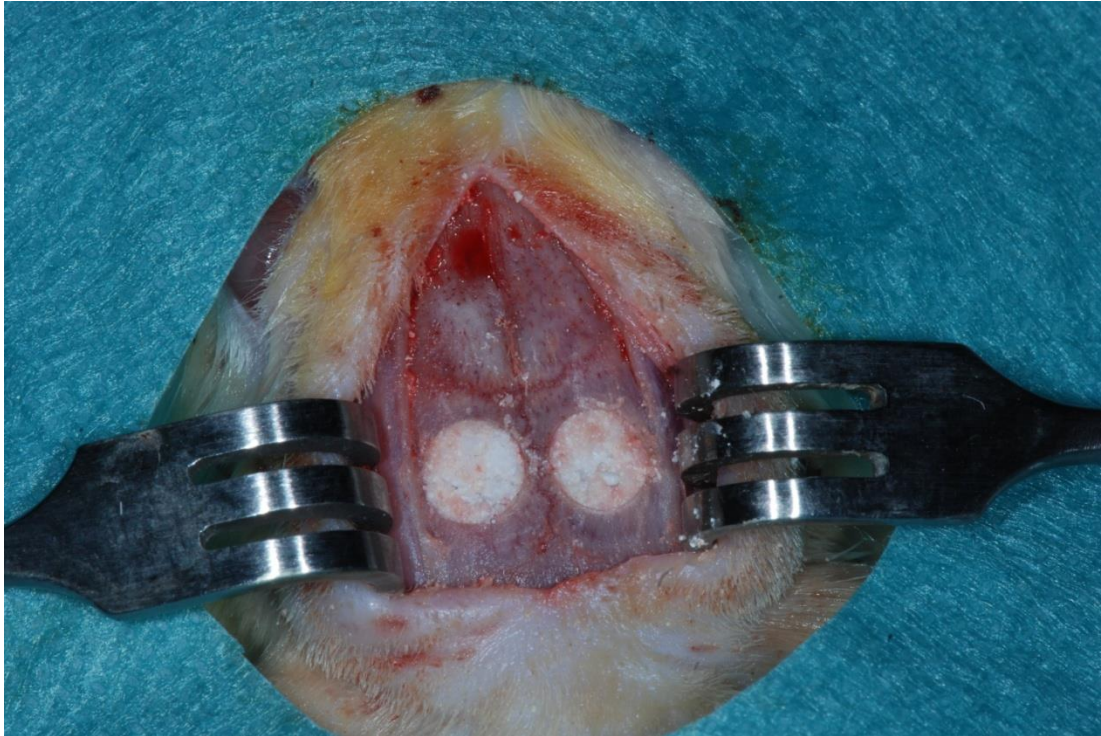
Çalışmada 1 kontrol ve 2 çalışma grubu oluşturuldu. 1.gruptaki deneklerin defektleri boş bırakıldı. İrrigasyondan sonra 4/0 vicryl suture ile dikilerek flep primer kapatıldı (Şekil 3.12-3.16). 2.gruptaki deneklerin defektlerine standart hacimde Hidroksiapatit-Tri-Kalsiyum-Fosfat (HA-TCP) konularak flepler primer kapatıldı (3.14). 3.gruptaki deneklerin defektlerine ise standart hacimde HA-TCP içine ekilmiş insan kaynaklı Dental Pulpa Kök Hücreler'i konularak flepler primer kapatıldı (3.15). Tüm işlemlerde periost dokusuna azami dikkat gösterildi.

Cerrahi işlemler tamamlandıktan sonra ratlar gruplarına ait şeffaf takip kutularına alındı ve olağan bakım şartlarında takip edildi. 8 haftalık bir takibin ardından denekler yüksek doz Ketamin HCL (Alfamine®) enjeksiyonu ile sakrifiye edildiler. İncelenecek defekt alanınınından yaklaşık 5 mm uzaklıktan geçecek şekilde kafatası kemiği frezler yardımıyla kesilerek numuneler alındı.

Numuneler ayrı ayrı kutulara %10'luk tamponlanmış formaldehit içinde alınarak radyolojik inceleme için mikro-BT laboratuvarına götürüldü. Daha sonra histomorfometrik incelemeler için histoloji laboratuvarına teslim edildiler.



Şekil 3.13: Çalışmada kullanılan taşıyıcı greft materyali (Hidroksiapatit TCP)



Şekil 3.14: 2.grupta defekt alanlarının HA-TCP greft materyali ile doldurulduktan sonraki görüntüsü



Şekil 3.15: 3.grupta defekt alanlarının insan kaynaklı Dental Pulpa Kök Hücre ekilmiş HA-TCP ile doldurulduktan sonraki görüntüsü



Şekil 3.16: Cerrahi işlem tamamlandıktan sonra flebin dikişli görüntüsü

3.4. Radyolojik Değerlendirme

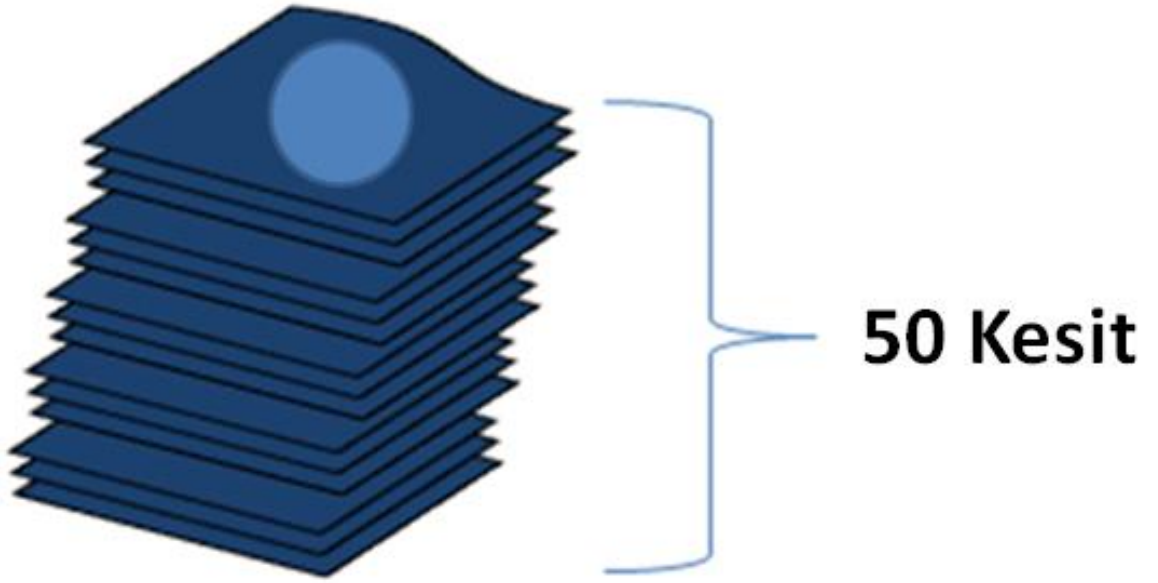
Oluşan yeni kemik alanlarının değerlendirilmesi için, çıkarılan kemik numunelerinin mikro bilgisayarlı tomografi (SkyScan-1172, Micro Photonics Inc, Allentown, Pennsylvania, ABD) görüntüleri İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'nde çekildi (Şekil 3.17).



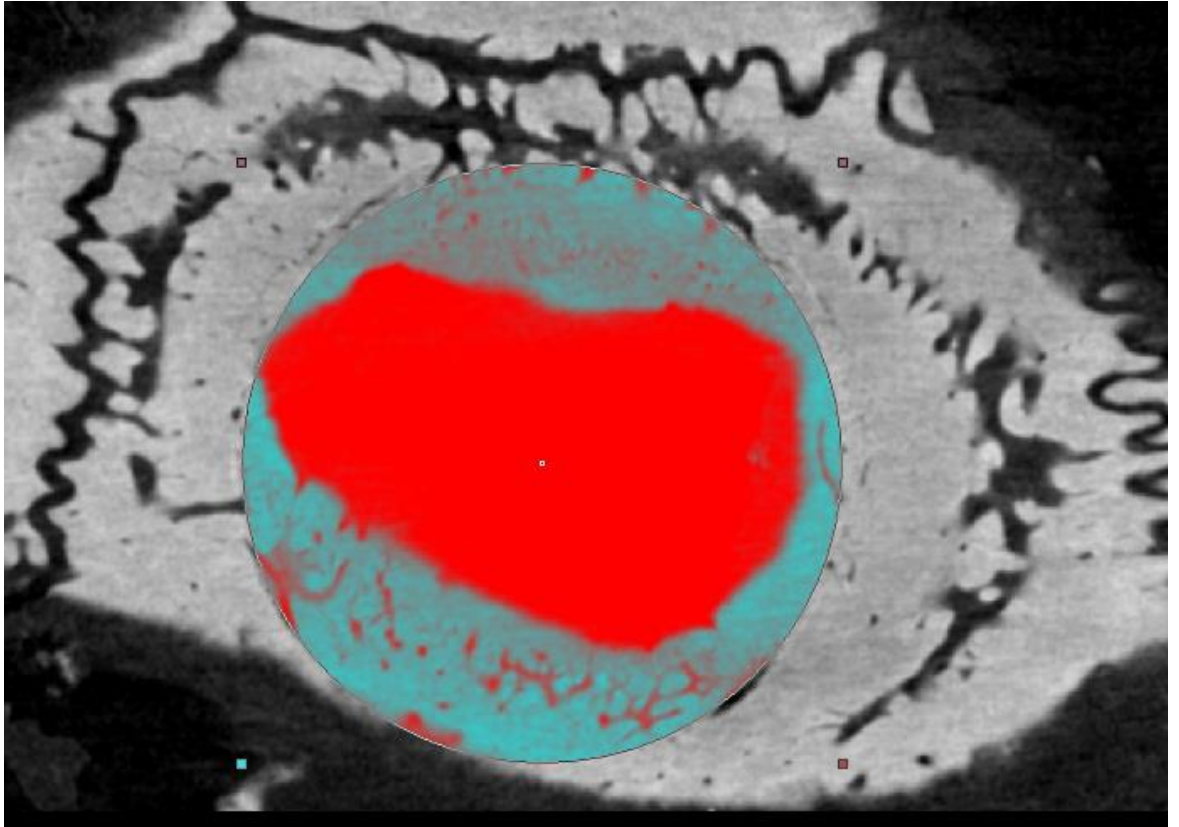
Şekil 3.17: Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-BT) cihazı

Deneklerin sakrifiye edilmesinden sonra alınan 30 numune taşıma kaplarından alınarak nemli bir beze sarılıp çekim tüpünün içine sabitlendiler. 70 kVp, 141 mA ve 10 μ m'lik piksel boyutları ayarlanarak her numune için birer saatlik tarama gerçekleştirildi.

Elde edilen veriler NRecon (SkyScan) yazılımı kullanılarak birleştirildi. Kemik mineral yoğunluğu DataWiever (SkyScan) yazılımı ile ölçüldü. Hata payını azaltmak, kemik oluşumunu daha güvenilir ölçebilmek için, numunelerin en iyi görülebildiği kesitlerden artarda 50 tarama kesiti alınarak ortalaması hesaplandı. Her gruptan alınan kesit örnekleri ve çalışma modeli aşağıda görülmektedir (Şekil 3.18). Elde edilen veriler SPSS 15.0 yazılımı ile 0.05 güven aralığında istatistiksel olarak değerlendirildi.



Şekil 3.18: Yeni kemik oluşum alanının tayini için kesitlerin belirlenmesi



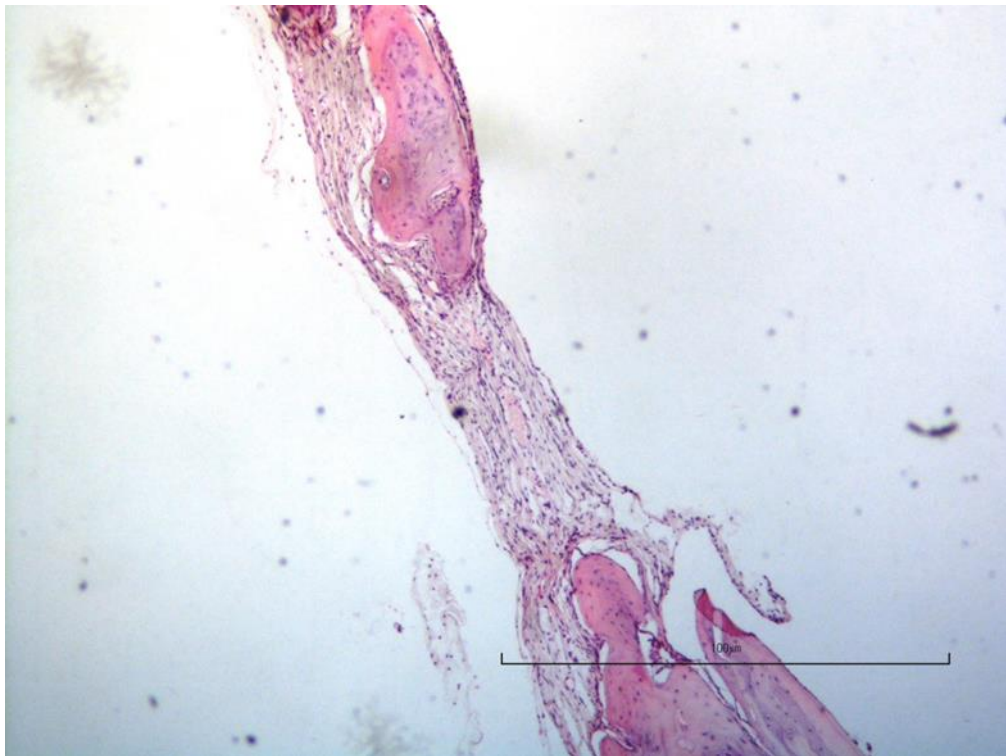
Şekil 3.19: Defekt bölgesi için çalışma alanının belirlenmesi

3.5. Histolojik Değerlendirme

%10'luk formaldehit içerisinde 5 gün boyunca fikse edilmiş kemik doku numuneleri daha sonra dekalsifikasyon işlemi için %10'luk (distile su ile seyreltilmiş) formik asit (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) içinde oda ısısında bekletildi. Işık mikroskobu altında incelemek için olağan doku hazırlığı yapıldı. Defekt alanını ekvator kısmından ikiye ayırdıktan sonra numuneler parafin bloğa dik olarak gömüldüler. Her numuneden üçer kez olmak üzere dokular 6 µm kalınlığında kesilerek lam üzerine yerleştirildi ve hematoxilen-eozin ile boyandı.

Numuneler Leica DFC280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win görüntü analiz sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd.; Cambridge, U.K) ile incelendi. Bu incelemelerde tüm defekt alanı tek seferde görülemeyeceğinden parça parça fotoğraflandı. Olgun kemik ile defekt alanı ayrılarak çalışma alanının başlangıç noktaları belirlendi. Belirlenen çalışma alanının tamamını görüntüleyecek şekilde fotoğraf çekildi. Alınan fotoğraflarda yeni kemik trabekülasyonları belirlenerek tüm doku içerisindeki oranları kaydedildi. Tüm görüntüler için ayrı ayrı kaydedilen bu oranlar daha sonra ortalamaları alınarak tek bir numune için tek veri elde edildi. Bu işlem 30 numune için de tekrar edildi.

$$\text{YENİ OLUŞAN KEMİK ORANI} = \frac{\text{DEFEKT ALANI İÇİNDEKİ YENİ KEMİK TRABEKÜLASYON ALANI}}{\text{TOPLAM DOKU ALANI}}$$



Şekil 3.20: Alan ölçümünün yapılacağı histolojik fotoğraf örneği

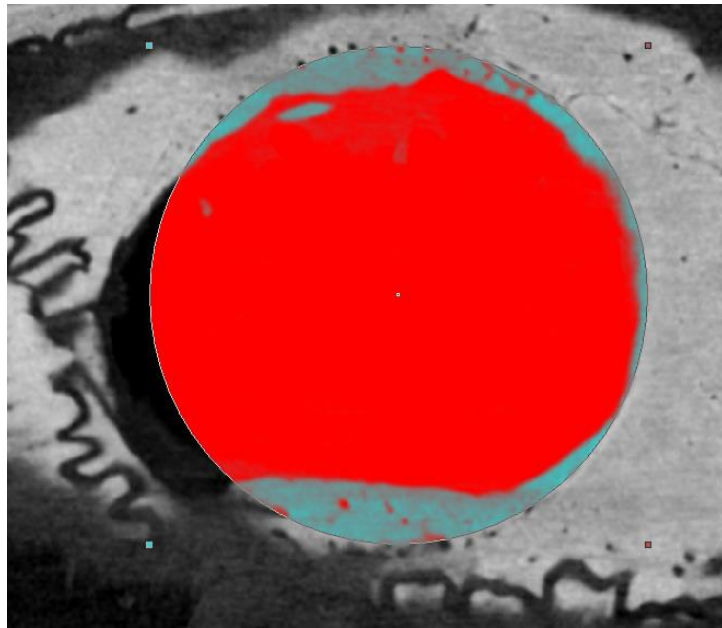
4.BULGULAR

4.1. Genel Bulgular

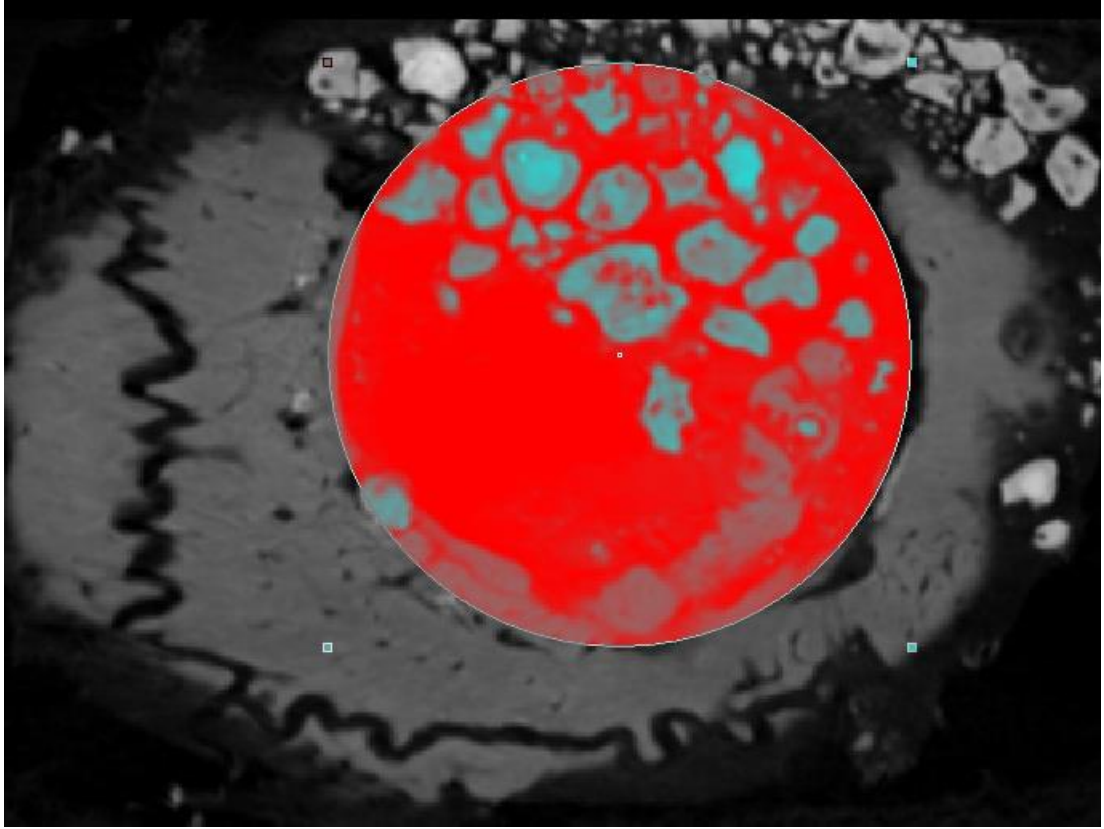
Operasyona başlamadan önce uyandırılmayan 2 rat dışındaki tüm denekler sakrifiye edildikleri güne kadar herhangi bir sorun yaşanmadan korundular. Hiçbir denekte enfeksiyon, skar ya da açık yara gibi herhangi bir komplikasyonla karşılaşılmadı. Shapiro-Wilk anormallik testine göre hem mikro-BT hem de histoloji inceleme sonuçlarında tüm grupların normal dağılım gösterdiği saptandı. Bu nedenle istatistiksel değerlendirmede tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı.

4.2. Radyolojik Bulgular

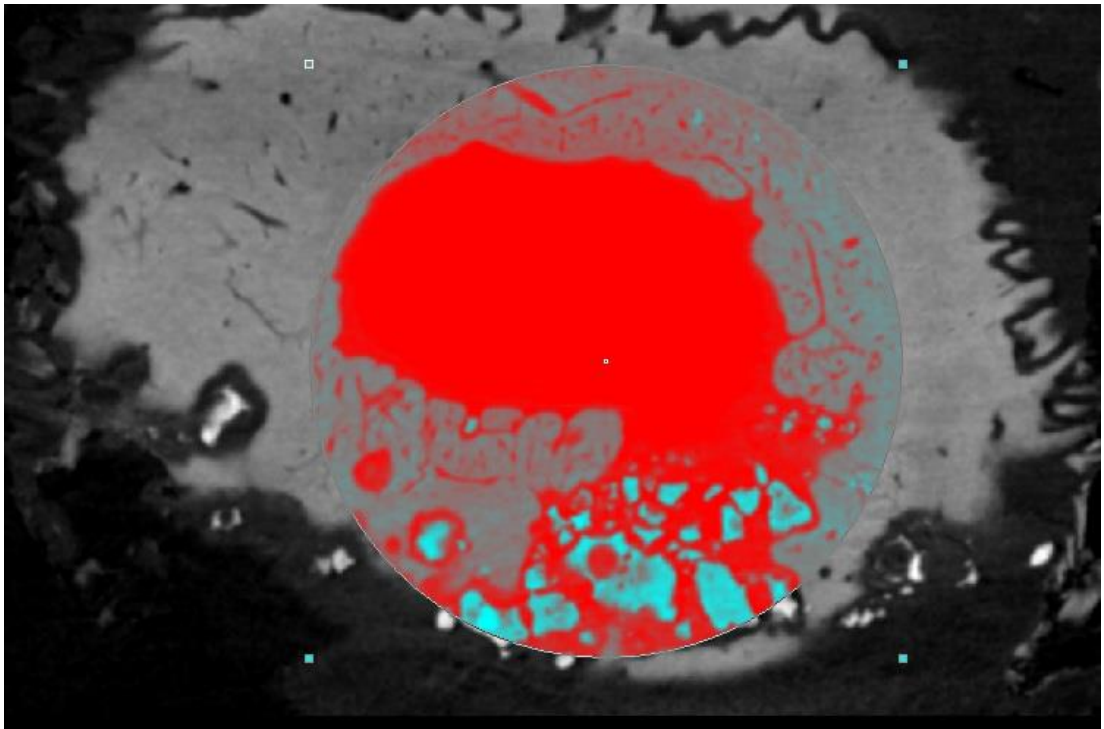
Alınan kesitlerin birleştirilmesiyle üç boyutlu defekt görüntüleri elde edildi. Bu görüntülerde defekt alanı halka içine alınıp var olan kemik dokudan ayrıldı (Şekil 4.1, 4.2, 4.3). Defekt alanını en iyi yansıtan 50 görüntünün birleştirildi ve defekt alanları içindeki kemik mineral yoğunlukları (bone mineral density-BMD) ölçüldü.



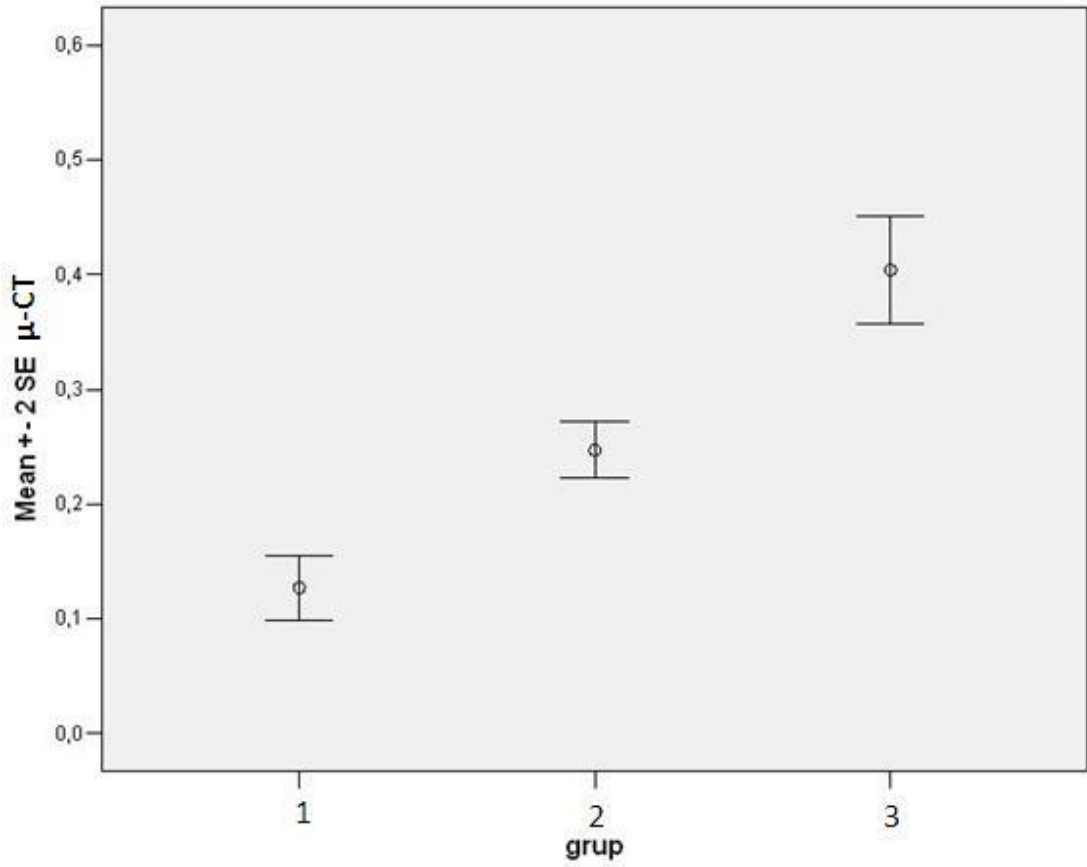
Şekil 4.1: Grup 1'e ait mineral yoğunluğunun ölçülmesi



Şekil 4.2: Grup 2'ye ait mineral yoğunluğunun ölçülmesi



Şekil 4.3: Grup 3'e ait mineral yoğunluğunun ölçülmesi



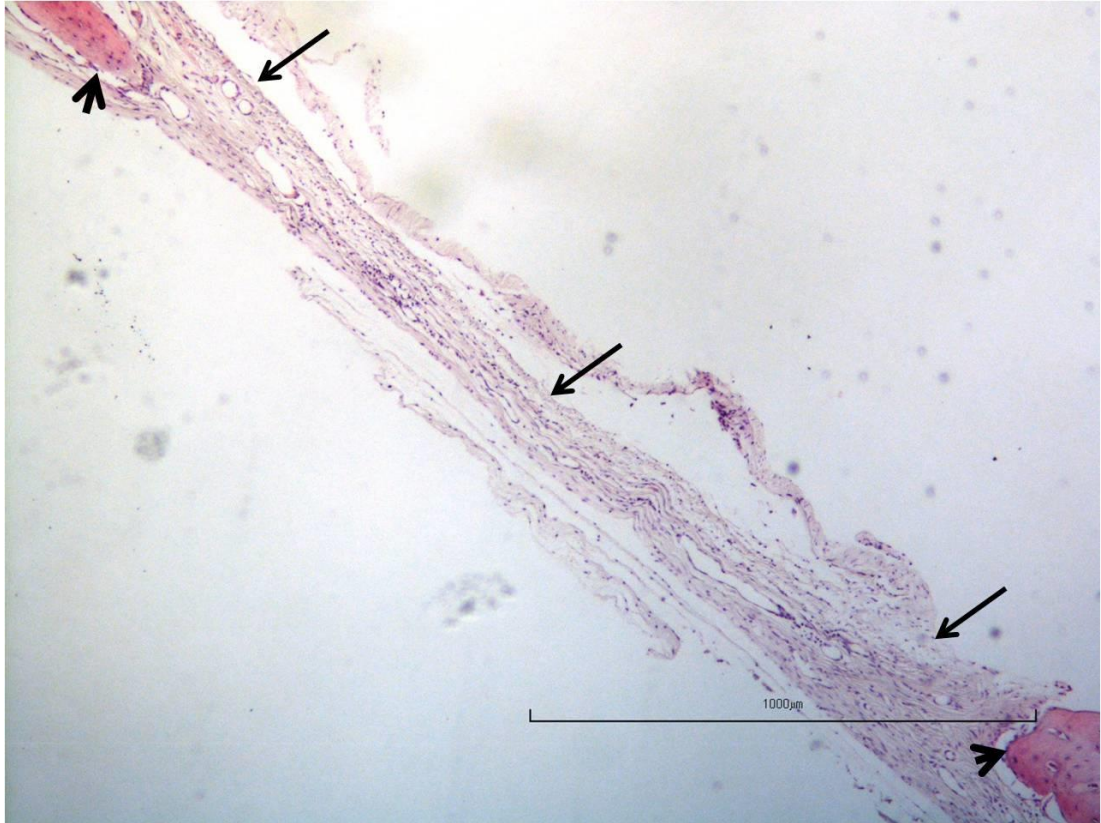
Grafik 4.1: Mikro-BT sonuçlarının dağılımı

Kemik defekt alanında seçilen görüntü aralığındaki kemik mineral yoğunluğu (BMD) ölçümlerine göre veriler alınıp istatistiksel olarak değerlendirildi (Grafik 4.1). Grup 3'e ait verilerin hem grup 2 hem de grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görüldü ($p < 0.05$). Grup 2'ye ait değerlerin de grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). Bu verilere göre grup 3 (DPSC+HA-TCP) mineral yoğunluğu bakımından diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulundu.

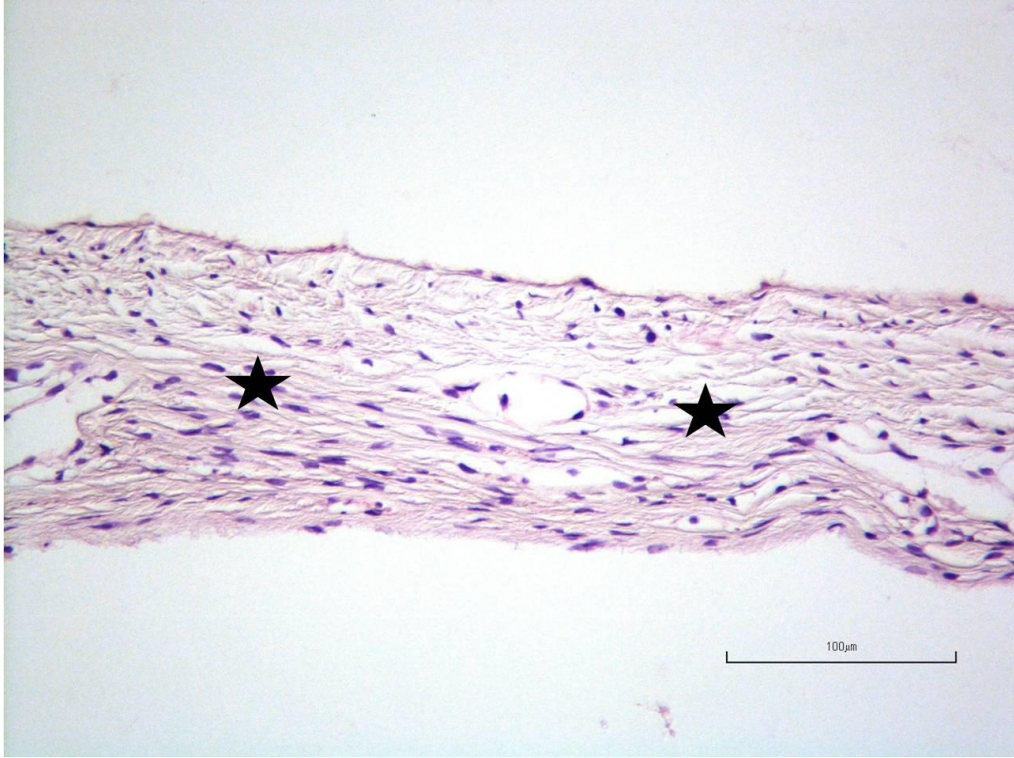
4.3. Histomorfometrik Bulgular

Alınan kesitlerde, yeni kemik trabekülasyon alanları belirlenerek toplam alan içindeki oranları belirlendi.

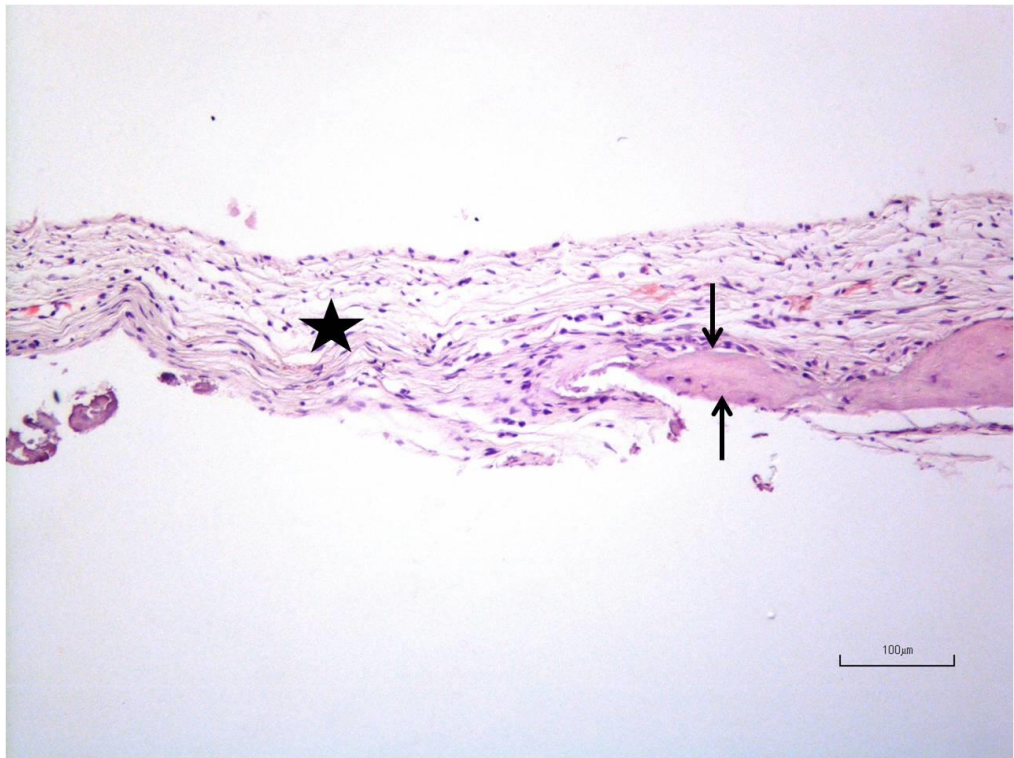
Grup 1'e ait kesitlerde genel olarak kemik doku sınırları arasındaki alanların ince fibröz bağ dokusu ile dolmuş olduğu ve mevcut kemik dokusunun kenarlarından ince-kısa lameller şeklinde uzadığı izlendi. Bu gruba ait kesitlerde kemik doku sınırına yakın bölgede küçük osteoid doku alanları tespit edildi (Şekil 4.4-4.10). Ayrıca az sayıda kesitte fibröz bağ dokusu içinde küçük kalsifiye kemik dokusu alanlarına rastlandı.



Şekil 4.4: Osteokondüktif alanlar (ok başları) arasında uzanan fibröz bağ dokusu (oklar), Grup 1, (H-E, Skala=1000 µm)



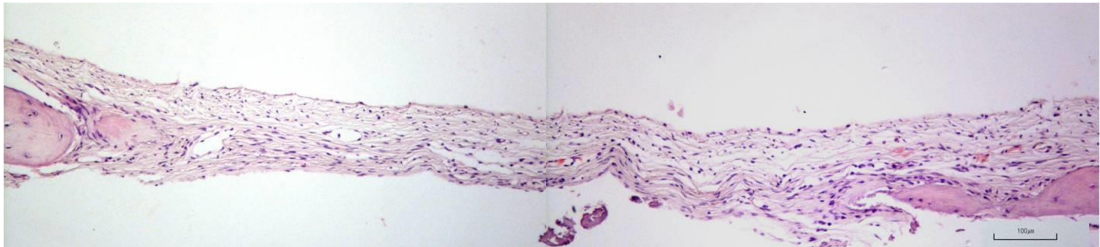
Şekil 4.5: Fibröz bağ dokusu (yıldızlar), Grup 1, (H-E, Skala: 100 μm)



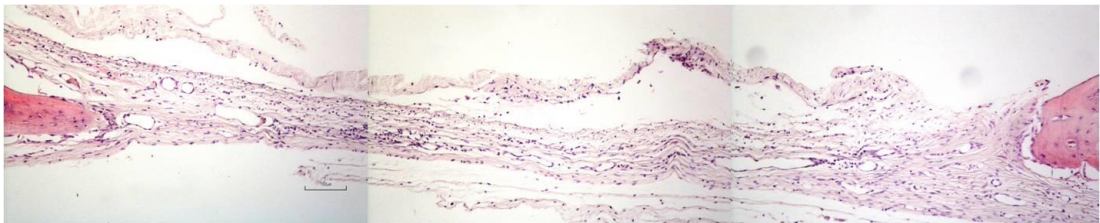
Şekil 4.6: Fibröz bağ dokusu (yıldız), osteokondüktif uçta kemik doku (oklar), Grup 1, (H-E,Skala: 100 μm)



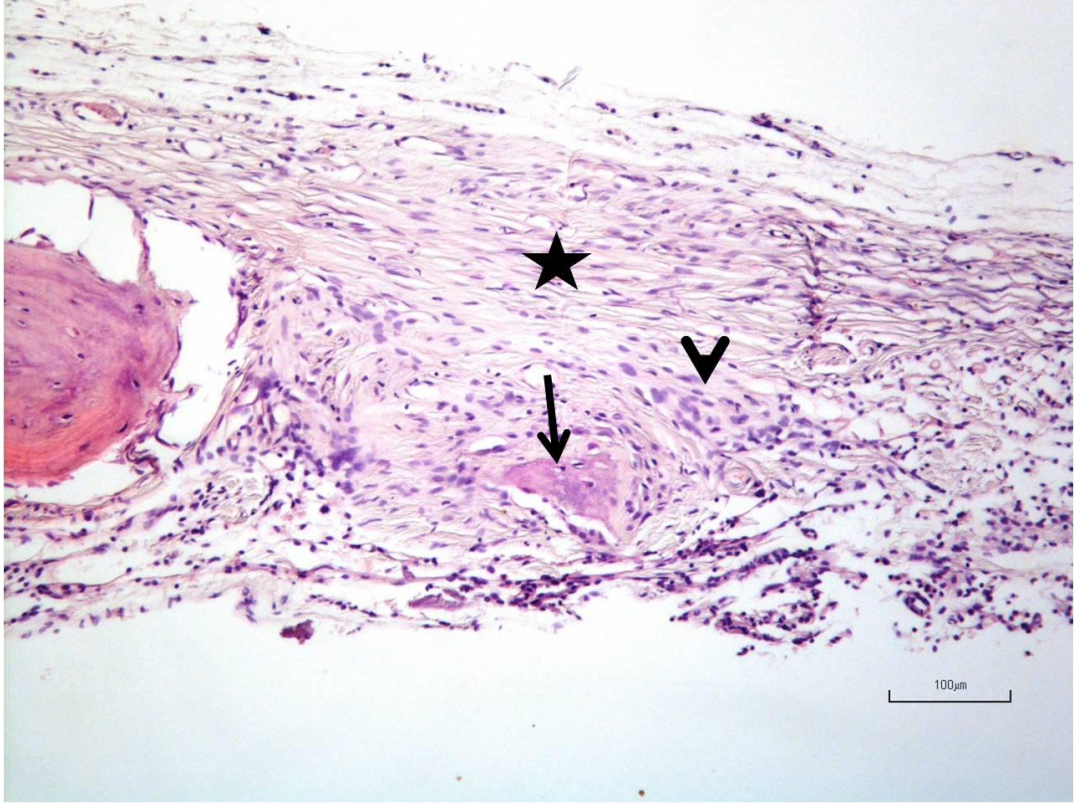
Şekil 4.7: Osteokondüktif kemik ucu (ok başları), osteoid doku (oklar) ve fibröz bağ dokusu (yıldızlar), Grup 1, (H-E, Skala:100 μ m)



Şekil 4.8: Grup 1'e ait birleştirilmiş defekt alanı görüntüsü

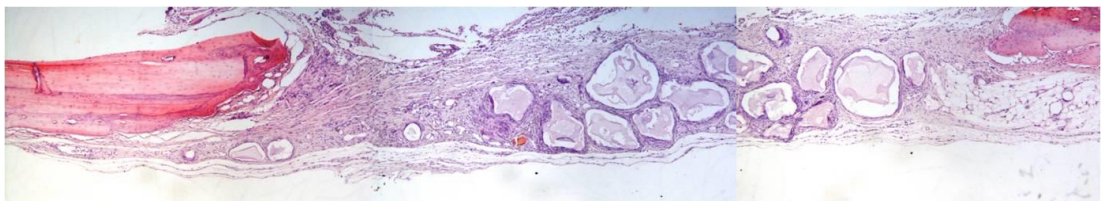


Şekil 4.9: Grup 1'e ait birleştirilmiş defekt alanı görüntüsü

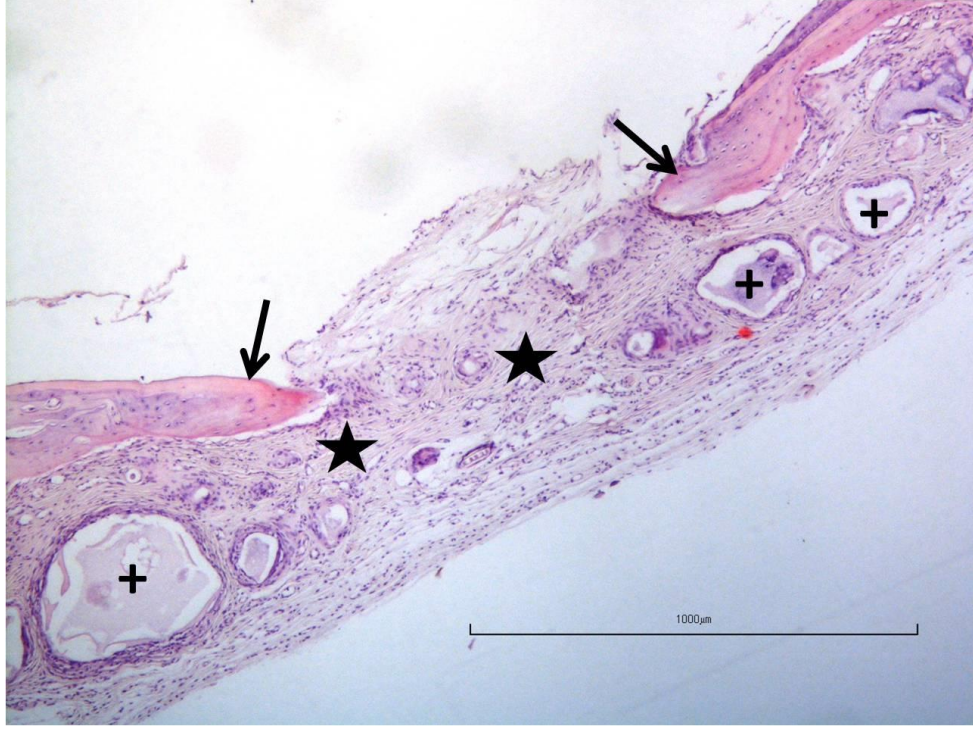


Şekil 4.10: Fibröz bağ dokusu (yıldız), kalsifiye kemik doku (ok), osteoid doku (ok başı), Grup 1, (H-E, Skala:100 μm)

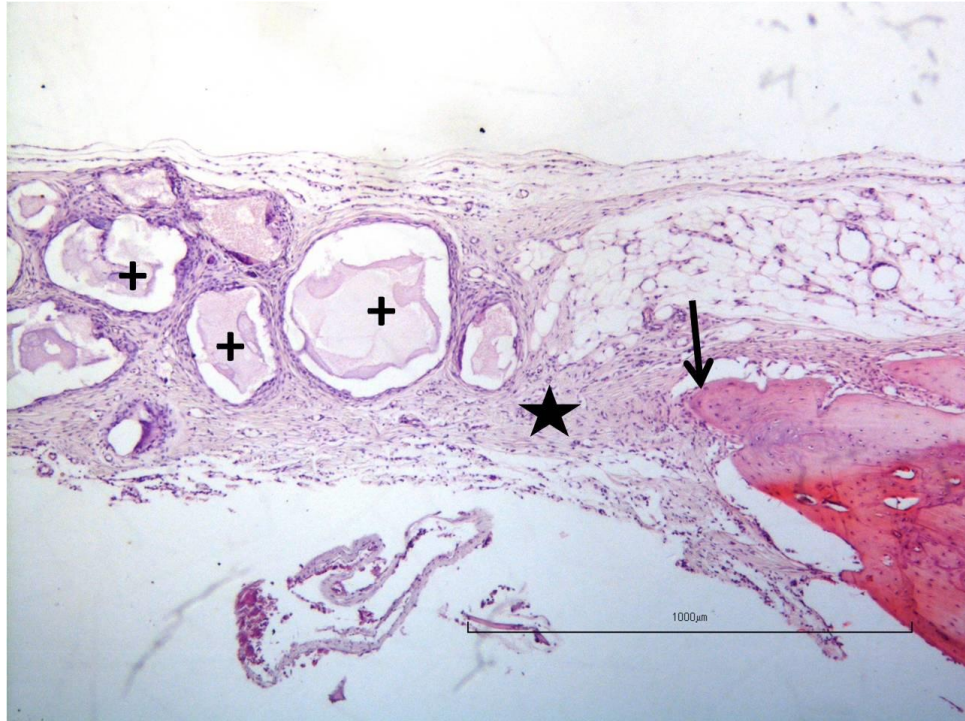
Grup 2'ye ait kesitlerde kemik doku sınırları arasındaki alanın greft materyali içeren değişik çaplarda, çok sayıda vakuoller içeren fibröz bağ dokusu ile dolu olduğu saptandı. Mevcut kemik doku kenarlarında osteokondüktif aktivite ile kemik dokusunun lameller şeklinde uzadığı tespit edildi. Graft materyali içeren vakuoller etrafında ökromatik iri nukleuslu osteoblastik hücre grupları ve eozinofilik sitoplazmalı multinuklear osteoklastlar tespit edildi. Graft vakuolleri arasındaki fibröz bağ dokusu alanları içinde yaygın şekilde osteoid doku mevcuttu. Ayrıca yer yer mevcut kemik kenarına yakın bölgelerde küçük, kalsifiye kemik doku alanlarına rastlandı (Şekil 4.11-4.19).



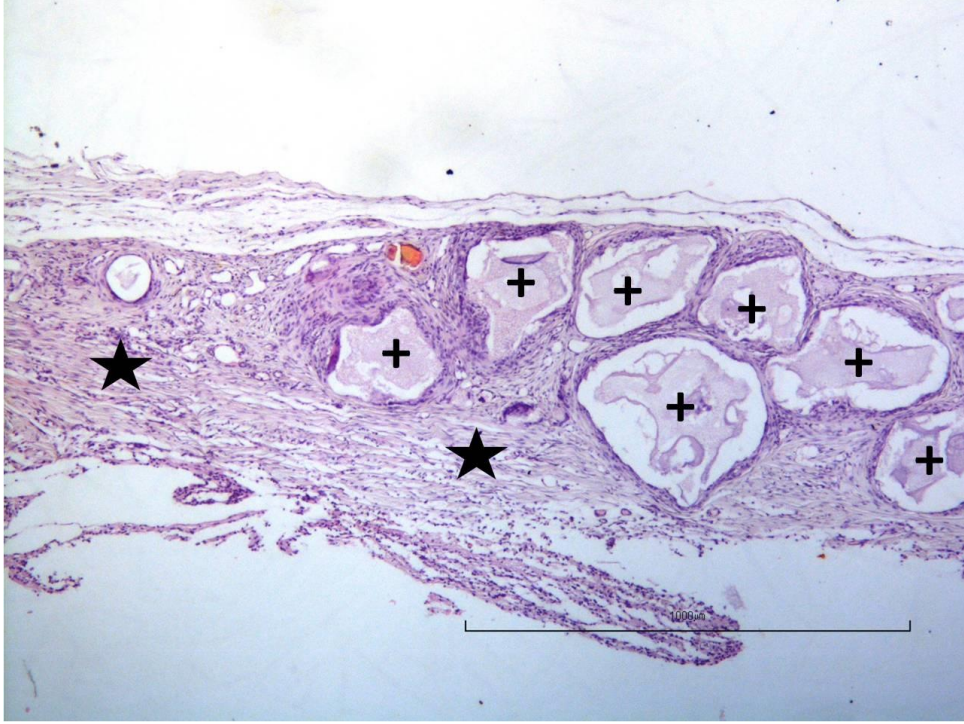
Şekil 4.11: Grup 2'ye ait birleştirilmiş defekt alanı görüntüsü



Şekil 4.12: Osteokondüktif kemik uçları (oklar), fibröz bağ dokusu (yıldızlar), greft materyali içeren vakuoller (+), Grup 2, (H-E,Skala:1000 µm)



Şekil 4.13: Osteokondüktif kemik ucu (ok), fibröz bağ dokusu (yıldız), greft materyali içeren vakuoller (+), Grup 2, (H-E, Skala: 1000 µm)



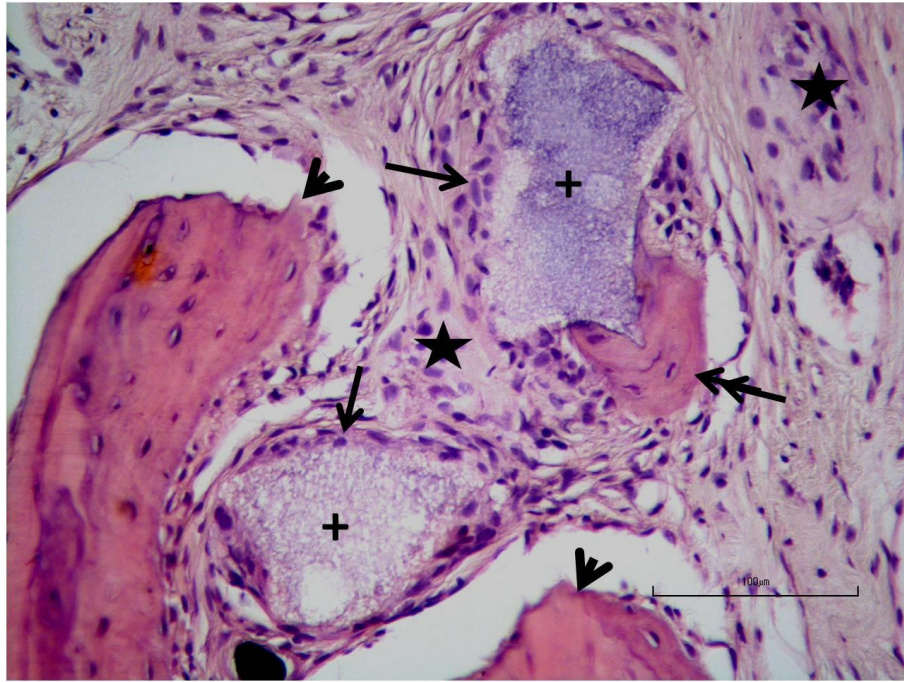
Şekil 4.14: Fibröz bağ dokusu (yıldızlar), greft materyali içeren vakuoller (+), Grup 2, (H-E, Skala: 100 μm)



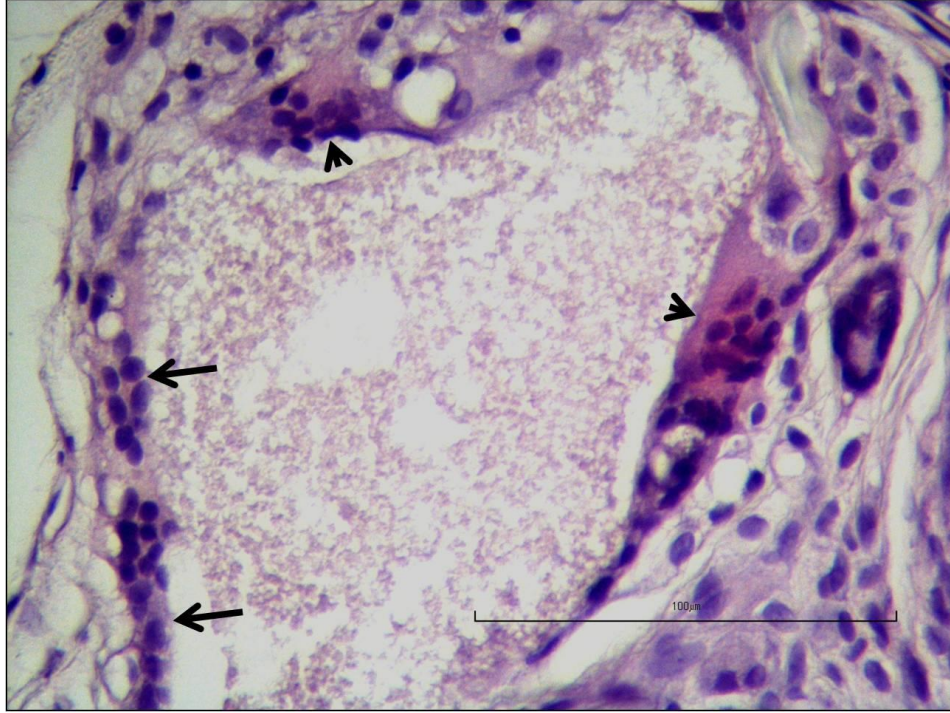
Şekil 4.15: Osteokondüktif kemik ucu (ok başları), fibröz bağ dokusu (yıldız), greft materyali içeren vakuoller (+)



Şekil 4.16: Osteokondüktif kemik ucu (ok başı), fibröz bağ dokusu (yıldız), greft materyali içeren vakuoller (+), Grup 2, (H-E, Skala: 1000 μm)



Şekil 4.17: Osteokondüktif kemik uçları (ok başları) Greft materyali içeren vakuoller (+), Osteoid doku (yıldızlar), greft içeren vakuoller çevresinde osteoblastik hücre grupları (oklar), kalsifiye kemik trabekülü (çift başlı ok), Grup 2, (H-E, Skala: 100 μm)

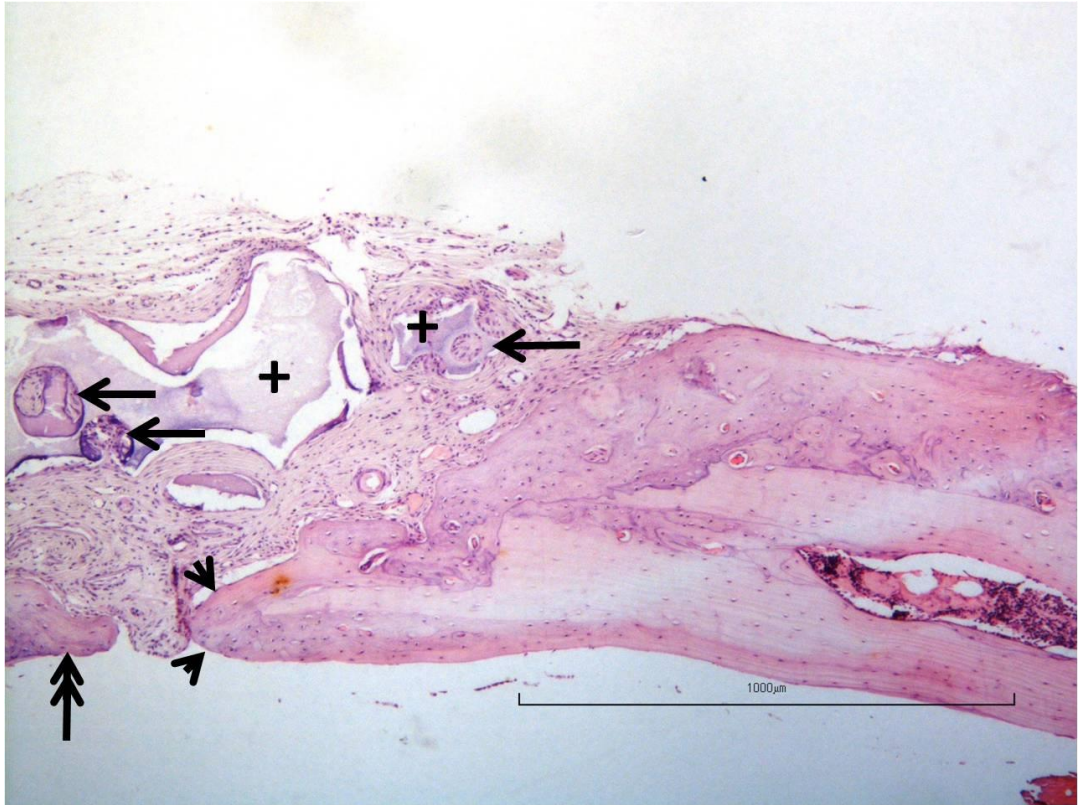


Şekil 4.18: Greft içeren vakuoller çevresinde osteoblast hücre grupları (oklar) ve osteoklastlar (ok başları), Grup 2, (H-E,Skala: 100 μm)

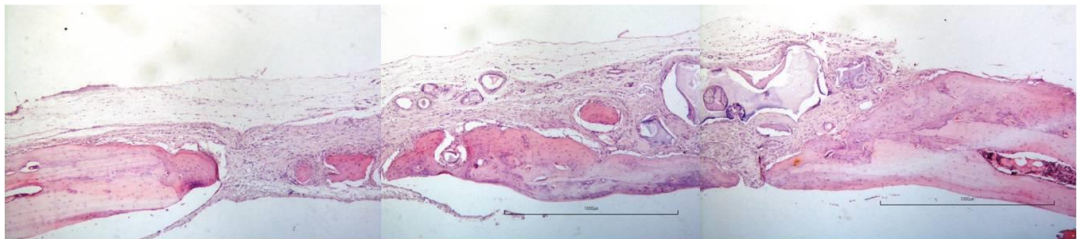


Şekil 4.19: Greft materyali içeren vakuoller (+), fibröz bağ doku alanları (yıldızlar), kalsifiye kemik doku (oklar), Grup 2, (H-E, Skala:1000 μm)

Grup 3'e ait kesitlerde mevcut kemik doku uç bölgelerinde osteokondüktif büyüme ve kemik uçlar arasındaki alan boyunca düzensiz sınırlı, farklı büyüklüklerde matür kalsifiye kemik alanları ile birlikte greft materyali içeren vakuoller, fibröz bağ dokusu alanları ve osteoid doku alanları izlendi. Graft materyali içerisinde ve çevresinde mezenşimal-osteojenik hücre infiltrasyonu yaygın olarak görüldü. Ayrıca greft materyali çevresine yerleşik eozinofilik sitoplazmalı multinuklear osteoklastlar saptandı (4.20-4.28).



Şekil 4.20: Osteokondüktif kemik ucu, greft materyali içeren vakuoller (+), Graft materyali içerisinde mezenşimal hücre infiltrasyonu (oklar), kalsifiye kemik doku (çift başlı ok), Grup 3, (H-E, Skala: 1000 µm)



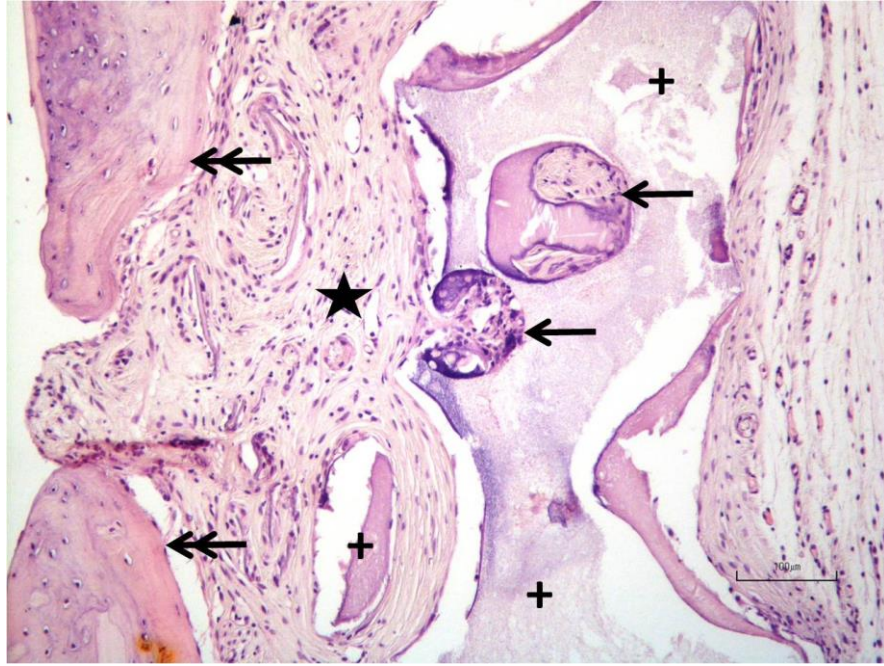
Şekil 4.21: Grup 3'e ait birleştirilmiş defekt alanı görüntüsü



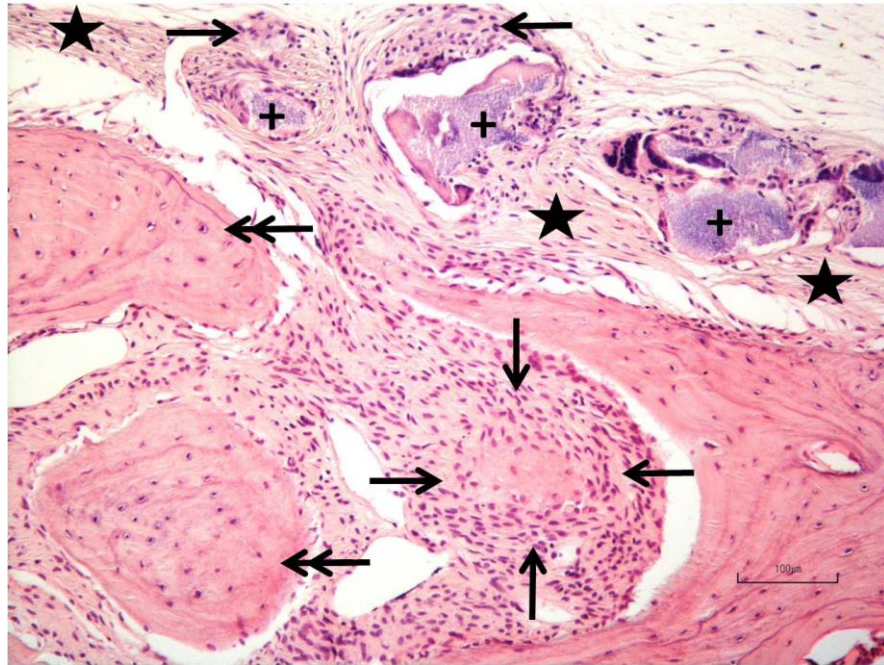
Şekil 4.22: Osteokondüktif kemik uçları arasında uzanan kalsifiye kemik doku alanlar (oklar), fibröz bağ dokusu (yıldızlar), greft materyali içeren vakuoller (+), Grup 3, (H-E, Skala: 1000 µm)



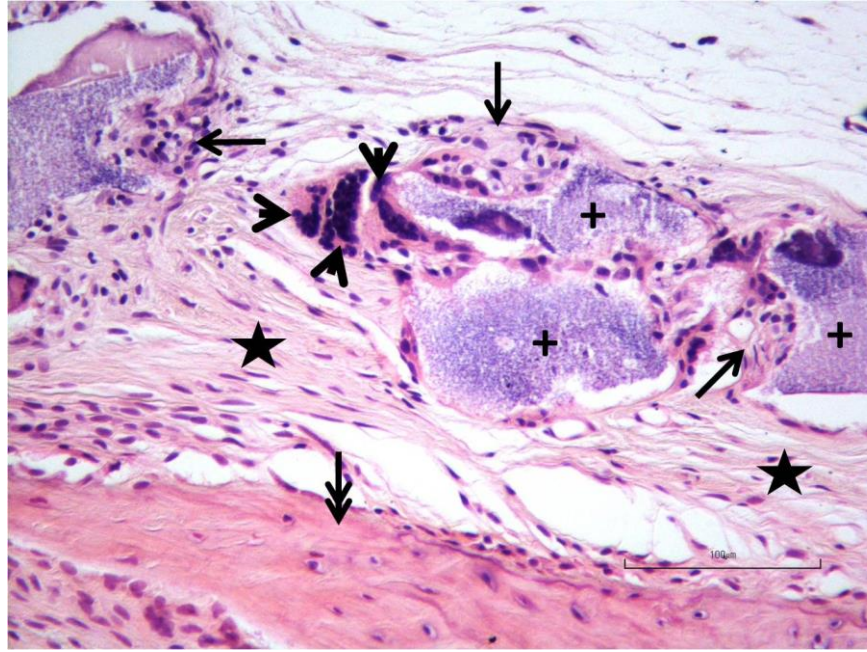
Şekil 4.23: Osteokondüktif kemik ucu (ok başları), kalsifiye kemik doku alanlar (oklar), fibröz bağ dokusu (yıldız), Grup 3, (H-E, Skala: 1000 µm)



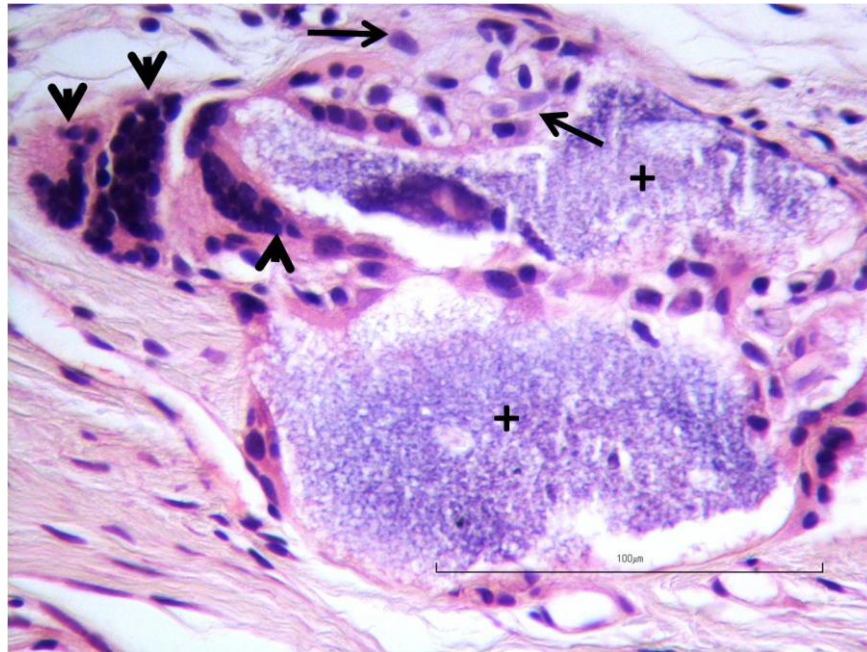
Şekil 4.24: Greft materyali içeren vakuoller (+) içinde mezenşimal hücre infiltrasyon alanları (oklar), fibröz bağ dokusu (yıldız), kalsifiye kemik doku (çift başlı oklar), Grup 3, (H-E, Skala: 100 µm)



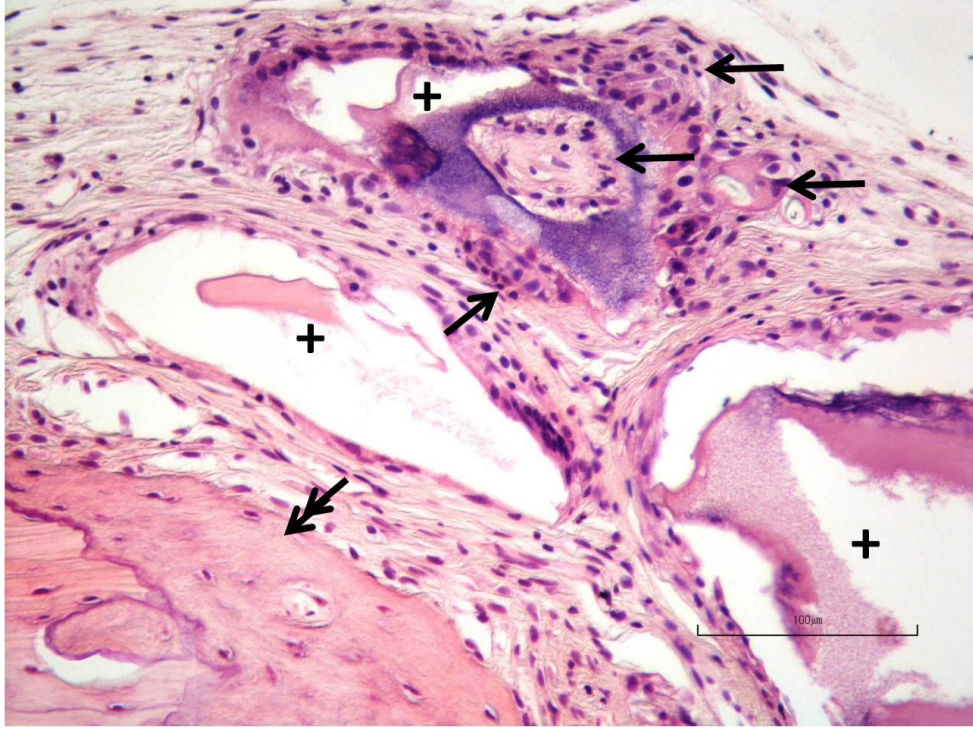
Şekil 4.25: Greft materyali içeren vakuoller (+) osteoid doku alanları (oklar), fibröz bağ dokusu (yıldızlar), kalsifiye kemik doku (çift başlı oklar), Grup 3, (H-E, Skala: 100 µm)



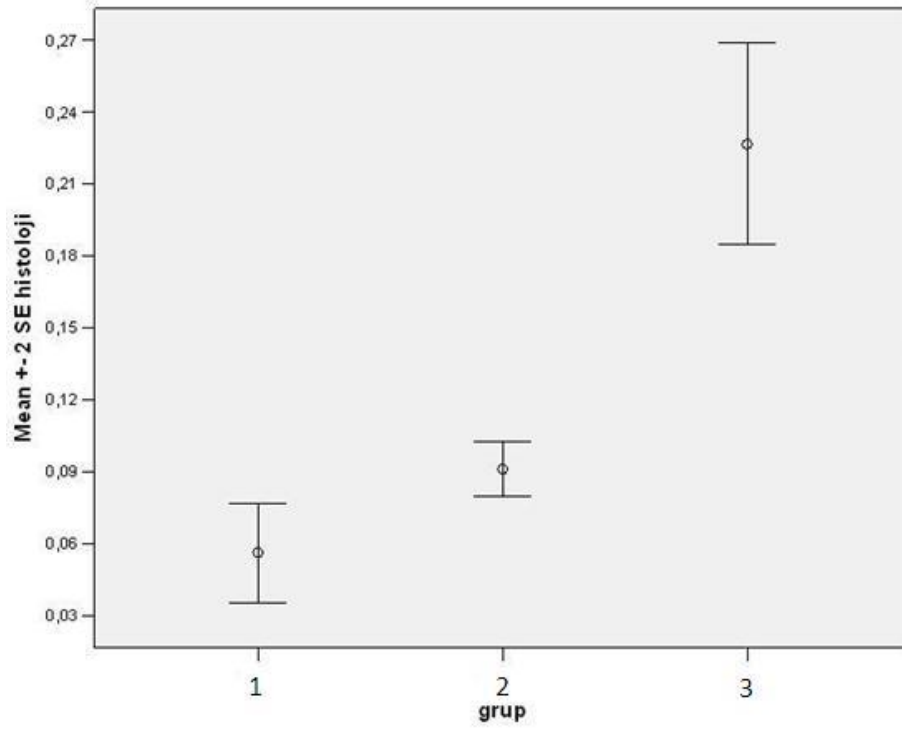
Şekil 4.26: Greft materyali içeren vakuoller (+), greft materyali çevresinde osteoklastlar (ok başları), osteoblastik aktivite alanları (oklar), fibröz bağ dokusu (yıldızlar), kalsifiye kemik doku (çift başlı ok), Grup 3, (H-E, Skala: 100 μ m)



Şekil 4.27: Greft materyali içeren vakuoller (+), greft materyali çevresinde osteoklastlar (ok başları), osteoblastik aktivite alanları (oklar), Grup 3, (H-E, Skala: 100 μ m)



Şekil 4.28: Greft materyali içeren vakuoller (+), greft materyali içinde ve çevresinde osteoid doku alanları (oklar), kalsifiye kemik doku (çift başlı ok), Grup 3, (H-E, Skala: 100 μ m)



Grafik 4.2: Histomorfometri sonuçlarının dağılımı

Histomorfometrik değerlendirme sonuçlarına göre; grup 3'ün radyolojik bulgularında olduğu gibi diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu gözlemlendi (Grafik 4.2)($p<0.05$). Grup 2 ve Grup 1 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Radyolojik ve Histomorfometrik sonuçların ortalama ve standart sapma değerleri (\bar{x} : ortalama, s: Standart sapma)

Değişkenler	Grup 1 (n=10)	Grup 2 (n=10)	Grup 3 (n=10)	p değeri
Micro-CT (mg/cm ³) [$\bar{x}\pm s$]	0.12±0.04 ^a	0.24±0.03 ^b	0.40±0.07 ^c	0.0001
Histomorfometri (µm ² /µm ²) [$\bar{x}\pm s$]	0.05±0.03 ^d	0.09±0.01 ^e	0.22±0.06 ^f	0.0001

c: b'ye göre farklı ($p<0.05$); c:a'ya göre farklı ($p<0.05$); b:a'ya göre farklı ($p<0.05$)
f: e'ye göre farklı ($p<0.05$); f: d'ye göre farklı ($p<0.05$)

TARTIŞMA

Ağız Diş ve Çene Cerrahisi, dentoalveoler bölgedeki çeşitli kist ve tümör cerrahileri ile travma, kronik enfeksiyon ya da ileri implant cerrahisi girişimlerinde kemik doku ile ilgili yeni yaklaşımlara ihtiyaç duymaktadır. Bu ihtiyaç kemik dokunun istenilen bölgede ve şekilde oluşmasını temin etmek şeklindedir.

Geçtiğimiz 30 yıl boyunca kemik doku mühendisliği yaklaşımları, cerrahların/klinisyenlerin bu ihtiyacına cevap verebilmek ve etkili tedavi yöntemleri geliştirebilmek için birçok disiplin tarafından ortak çalışmalar yürütülerek geliştirilmektedir. 1980'lerin ortalarından itibaren hem ilginin hem de çalışma sayısının hızla arttığı bir alan olan doku mühendisliği, tıbbın hemen hemen her dalıyla ilgilidir. Temel olarak kemik doku mühendisliği halen kliniklerde kullanılmakta olan tedavi yöntemlerinin dezavantajlarını ortadan kaldırmak ve klinisyenlerin işini kolaylaştırmak için çözümler aranmaktadır (57).

Günümüzde çeşitli nedenlerle oluşan kemik defektleri genellikle otojen kemik greftleri ile tedavi edilmektedir. Ancak ikinci bir cerrahi saha oluşturulması, verici alan morbiditesi, hematoma, iltihaplanma, ağrı gibi dezavantajlar bu teknikleri kısıtlamaktadır (58). Doku mühendisliği yaklaşımları, kemik doku fonksiyonunun yeniden temini, idamesi ve şekillenmesi için biyolojik malzeme ve çözümler üreterek bu konuda umut vaat etmektedir. Bu yaklaşımın nihai hedefi, doğal kemik dokusunun fiziksel ve biyolojik özellikleri ile uyuşan yapılar oluşturmaktır (59). Sonoyama W ve ark. (60) 2006 yılında doku mühendisliği yaklaşımlarıyla domuzlar üzerinde yaptıkları çalışmada, Hidroksiapatit-tri-kalsiyum Fosfat (HA-TCP) içeriğiyle oluşturdukları yapay diş, çekilen diş soketine yerleştirerek gerçek diş dokusunun oluşturulabildiğini göstermişlerdir. Bu gibi çalışmalar doku mühendisliğinin diş hekimliği dâhil olmak üzere pek çok tıp alanında ilgi çekmesine ve heyecan verici neticeler beklenmesine sebep olmaktadır.

Yapılan umut verici çalışmalar, artan ilgi ve fonlara rağmen preklinik çalışmalar halen uygulamaya geçememekte ve hayal kırıklıklarına yol açabilmektedir (61). Kemik doku mühendisliği ile ilgili çalışmalarda hâlen aşılması gereken pek çok sınırlama ve zorluk mevcuttur. Uygun hücre tipi, fiziksel ve biyolojik olarak tatmin edici taşıyıcı, etkili büyüme faktörü ya da faktörlerinin seçimi, üzerinde çalışılması gereken konu başlıklarından bazılarıdır. Bunun yanında uygulanacak doku mühendisliği ürününe karşı konakta meydana gelebilecek doku cevabı, reaksiyonlar ve yan etkilerin de tespit edilip yönetilebilmesi de önemli bir konulardandır. Yeterli kanlanmayı sağlamak, bunun çalışılması için uygun modeller oluşturmak ve uygun maliyetiyle ulaşılabilir bir ürün sağlamak da klinik kullanım için önemlidir. Birçok ciddi çalışma ve araştırma yapılmış olmasına rağmen henüz sadece birkaç onaylı ürün piyasaya sürülebilmektedir. Bunlar da çoğunlukla hücre, faktör ya da greft materyalleridir (62).

Biyoreyebilir materyallerin üretilmesi, bu materyaller aracılığı ile hücrelerin taşınması, yapışması, büyümesi, çoğalması ve farklılaşmayı temin etmesi hedeflenen en önemli hedeflerdendir. Herhangi bir tedavi yönteminde kullanılan greft malzemesi, geçici ama başarı için hayati bir görev üstlenmektedir. Hücre ve kültür metodolojileri kemik doku mühendisliğinde çok kritik konulardır. Hedeflenen nihai sonuçlara ulaşmak için bu faktörler arasındaki mekanizmaları daha iyi anlamak ve bu mekanizmaları yönetebilmek gerekmektedir (63).

Kemik greftleri, onarılması ya da kemik oluşturulması gereken yerlerde klinik olarak geniş bir kullanım alanına sahip malzemelerdir. Amerika Birleşik Devleti'nde yıllık ortalama yarım milyon insana kemik defektlerinden dolayı greft uygulaması yapılmaktadır. Bunun yaklaşık maliyetin 2.5 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (64).

Birçok çalışmada da belirtildiği gibi kemik rejenerasyonu ya da onarımı için kullanılan otojenik ve allojenik greftlerin komplikasyon ve sınırlılık açısından problemleri bulunmaktadır. Bugüne kadar otolog greftler, biyouyumlulukları ve immünojenik cevap açısından avantajlı olmalarından dolayı altın standart olarak kabul ediliyorlardı. Özellikle, osteoindüksiyon, osteokondüksiyon ve osteogenezisi sağlayacak olan 'bone morphogenetic protein (BMP)'ler ve osteoprojenitör hücreleri

ihativa etmesi ve sahip olduğu üç boyutlu yapıdan dolayı avantajlı olduğu düşünölmekteydi. Ancak greft ihtiyacının fazla olduğu durumlarda ikinci bir cerrahi sahaya ihtiyaç duyulması ve bu prosedürler sırasında verici sahada morbidite, skar formasyonu, kanama, iltihaplanma ve kronik ağrı gibi komplikasyon riskleri dezavantaj teşkil etmektedir. İleriki dönemlerde muhtemelen geniş greft ihtiyacı olan prosedürlerde otolog kemik grefti kullanılmayan bir teknik olacaktır (65). Allogreft ve ksenogreftler de otolog greftlerin ardından tercih edilmekte ve piyasada çeşitli şekil ve boyutlarda ürünler bulunmaktadır. Allogreftler immün reaksiyon ve enfeksiyon taşıma riskini de bulundurmaktadır. Ayrıca dondurma ve sterilizasyon aşamalarından dolayı devitalize olmakta ve osteoindüktif etkilerini yitirmektedirler (66).

Uygun greft materyalini bulmak için çalışmalar artarken bir diğeri önemli ve üzerinde çok çalışılan greft grubu olarak biyoseramikler karşımıza çıkmaktadır. Kemığın mineral iskeleti ile benzerlik göstermesi ve kemik depozisyonuna doğrudan izin vermesi nedeniyle tercih edilen malzemelerdir (67). Greft materyali olarak kullanılan hidroksiapatit (HA) de çok iyi uyum ve osteokondüktif etki göstermesine rağmen biyoeriyebilirliğı tatmin edici sonuçlar vermemektedir (68).

Kalsiyum fosfat seramiklerinin kemik rejenerasyon fazında mekanik dayanıklılığa katkıda bulunduğı ve önemli bir greft materyali olduğı bilinmektedir. Ayrıca biyoaktif oluşu da popülerliğini arttırmaktadır (69). Hidroksiapatit ve onun kristalize şekli olan kalsiyum fosfat, kemiğinin %60-70'ni oluşturmakta ve kemiğe dayanıklılık sağlamaktadır. Bu bilgiden yola çıkarak bu yapıların doğal ya da sentetik olarak birleştirilmesi ile doğal kemik yapısına çok benzeyen bir malzeme ortaya konmuş olmaktadır. Ayrıca kalsiyum fosfat'ın $[Ca_3(PO_4)_2]$ içeriğindeki kalsiyum ve fosfat tuzlarından dolayı biyoeriyebilirliğı de kontrol edilebilmektedir (70).

Seramik taşıyıcılar içerisindeki porlar hücrelerin daha iyi bağlanması ve çoğalmasını sağlar. Bifazik kalsiyum fosfat, hidroksiapatit ve β -trikalsiyum fosfatın (β -TCP) karışımıdır. β -TCP dokuya yerleştirildikten 6 ile 24 ay arasında tamamen eriyebilmektedir (71). HA-TCP'in kemik doku mühendisliğinde uygun bir taşıyıcı ve matriks sentezinde önemli bir malzeme olduğı görölmektedir (72).

Taşıyıcılar, kemik doku mühendisliğinde; geçici kemik iskeleti, büyüme faktörü ve diğer uyarıcıların aktarılma aracı, hücrelerin yapışıp çoğalıp farklılaşabileceği bir platform olabilmesi gibi çok önemli görevler üstlenirler. Çoğu uygulama da kemik öncülü olarak kullanılan taşıyıcıların biyoeriyebilir özelliği ile yerini yeni kemik doku oluşumuna terk etmesi prensibine dayanır. Ancak hâlen tüm taşıyıcıların tatmin edici şekilde bu özelliği gösterebildiği söylenemez. Daha geniş alanda fonksiyon gösteren taşıyıcılara gerek duyulmaktadır. Hala geliştirilmeyi bekleyen ve aranan özellikler; kemik rejenerasyonu için yeterli mekanik özelliklere sahip olması, ilaç taşıma sistemlerini (Drug Delivery System-DDS) taşıyabilmesi, doğal kemiğin ekstraselüler matriksini (ESM) taklit eden ve vaskularizasyonu geliştiren üç boyutlu bir yapıya sahip olmasıdır. Kompozit taşıyıcıların, doğal ekstraselüler matriksi taklit eden iskeletinin geliştirilmesi en az hücre kültürleme teknolojilerindeki ilerleme kadar önemlidir. Bu konudaki ilerlemeler kısıtlı olduğundan dolayı kraniyomaksillofasiyal kemiklerin hücre-bazlı klinik uygulamaları çok sınırlıdır. Bu teknolojinin ilerlemesi ve beklenen performansı gösterebilmesi nanoteknolojideki gelişmelere bağlıdır (73).

Kök hücreler vücudun herhangi bir bölgesinde bulunabilir. Bununla beraber dental kök hücreler zengin içerik ve kolay erişilebilirlik gibi avantajlarıyla da giderek ilgi çeken ve üzerine çalışma yapılan kaynaklardır. Dental kaynaklardan izole edilen kök hücreler; Dental Pulpa kaynaklı Kök Hücreler (DPKH), Eksfoliye süt dişinden elde edilen kök hücreler (Stem cells from Human Esfoliated Decicuous teeth - SHED), Periodontal Ligament Kök Hücreleri (PDLKH), Apikal Papilla Kök Hücreleri (APKH) ve Dental Folikül Prekürsör Hücreleri (DFPH)'dir (74).

Çalışmalar uygun uyarılar altında dental pulpadan alınan ve karakterize edilen kök hücrelerin yüksek proliferasyon ve farklılaşma potansiyelleri nedeniyle bu amaca hizmet edebileceğini göstermektedir (75). Çünkü dental pulpa kök hücreleri; kas, yağ, kıkırdak, sinir ve diş dokusunu oluşturan odontoblast hücrelerine dönüşebilirler. Dental doku mühendisliği çalışmalarında da kullanılan DPKH, uygun uyarılar altında dentin ve pulpa dokusuna da dönüşerek diş dokusunun elde edilmesinde de umut vermektedir (76).

Uygun şartlarda 2 yıl bekletilen DPKH'lerin bile HA-TCP kullanılarak kemik oluşturabildiği farelerde yapılan bir çalışmayla gösterilmiştir (77). Bu DPKH hücrelerinin uzun zaman sonra bile yüksek özellikler sergileyebildiklerini göstermektedir (78).

DPKH hücrelerinin üç boyutlu kollajen sünger, pöröz seramik ve fibröz titanyum meş ile birlikte farelere nakledilmesi ile yapılan çalışmada da bu hücrelerin önemli bir kaynak olduğu ifade edilmektedir (79).

Dental pulpa'dan elde edilen kök hücreler klinik olarak ilk defa 2009 yılında d'Aquino R ve ark. tarafından 17 hastaya uygulanmıştır. Çift taraflı gömülü alt yirmi yaş dişi çekilecek hastaların üst yirmi yaş dişlerinden elde edilen Dental Pulpa Kök Hücreleri çekim bölgesine kollajen sünger ile birlikte tatbik edilmiş. Kontrol grubunda çekim sonrası sokete sadece kollajen sünger konulurken çalışma grubuna kollajen süngere emdirilmiş kök hücre ile birlikte konulmuş. Hastalar üç ay sonra radyografik ve histolojik olarak incelenmiş. Alınan sonuçlara göre hastanın kendisinden alınan kök hücrelerin konulduğu tarafta oluşan yeni kemik yüksekliği ve doku organizasyonu açısından daha tatmin edici olduğu izlenmiş (80).

Dental pulpadan elde edilen kök hücrelerin uyarılma ile in-vitro şartlarda osteoblastlara dönüşebildiği birçok çalışma ile gösterilmiştir (81-83). Hatta DPKH hücrelerinin kök hücre araştırmalarında standart olarak kabul edilen kemik iliği kök hücrelerinden bile in-vitro şartlarda daha fazla farklılaşma kabiliyetine sahip olduğunu savunan makaleler mevcuttur (84).

LI Jing-hui ve ark. yaptıkları çalışmada jelatin süngere ekilmiş kök hücrelerin farelerde ektopik yerleşimde dahi osteojenik farklılaşma gösterebildiğini ve DPKH hücrelerinin kemik doku mühendisliği çalışmalarında uygun ve etkili bir kaynak olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir (85).

DPKH yalnızca diş hekimliği alanı için değil tıbbın diğer kolları için de iyi sonuçlar elde edilen zengin bir kaynaktır. Yapılan çalışmalarda myokard enfarktüs (86), sinir doku rejenerasyonu, kas distrofi (87), serebral iskemi (88), anjiyogenetik özelliklerin geliştirilmesi (89) ve korneal rejenerasyon tedavisinde (90) de başarıyla kullanılabileceği gösterilmiştir.

Kemik doku mühendisliği, yeni fonksiyonel kemik dokularının temini için kemik iskeleti, mekaniği ve doku formasyonunun iyi anlaşılmasına dayalıdır. Başka bir deyişle, kemik tamiri ya da rejenerasyonunu başarılı bir şekilde sağlamak kemik biyolojisi ve gelişimini iyi anlamaktan geçer.

Kemik %60'ı mineral %10'u su ve %30'u kollajen matriksten oluşan bir dokudur. Makroskopik olarak olgun kemiğin ortalama %80'i kortikal kemikten oluşurken %20'si kansellöz kemikten oluşur.

Kemik, çeşitli metabolik, fiziksel ve endokrin uyarıya duyarlı ve bir çok fonksiyona sahip dinamik bir dokudur. Kemiklerimiz, iskelet sistemine destek olması, dolayısıyla vücut hareketlerinin kaynağı olması, kalsiyum, fosfat gibi önemli elementlere ev sahipliği yapması ve kan hücrelerinin üretilmesi gibi çok önemli fonksiyonlara sahiptir.

Kemik doku büyüme, rejenerasyon ve remodelling için muazzam bir kapasiteye sahiptir. Bu gelişim ya da dönüşümün sağlanması için mekanik çevre en önemli faktörlerden birisidir. Aksi halde dokuda atrofi ve kemik kaybı görülebilir (91). Kemiğin tamir ya da rejenerasyonu, granülasyon dokusunun infiltrasyonu, osteojenik hücrelerin proliferasyon ve farklılaşması ile iyileşme ve remodelizasyonu takip eden akut enflamatuvar cevap ile başlayan bir hücresel aktivite organizasyonudur. Bu süreç biyolojik ve mekanik sinyallerin içeriği ile meydana gelir. Biyolojik olarak tamir ya da rejenerasyon süreci, doğrudan hücre göçü, proliferasyon, farklılaşma ve hücre sentezini sağlayan büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinlerin kademeli olarak salgılanması ile meydana gelir. Çevresel ve mekanik koşullar da ekstraselüler matriks aracılığı ile bu koşulların oluşmasını sağlarlar. Hiyerarşik açıdan bu tamir ve iyileşmenin sağlıklı bir şekilde meydana gelmesi gerekli moleküler sinyallerin kademeli olarak salgılanması, progenitör hücrelerin ortamda bulunması, besin desteği ve uygun mekanik çevre şartlarının bir araya gelmesi ile olur (92, 93).

Kemik gelişimi ya da tamir mekanizmaların anlaşılması kemik doku mühendisliğinin geleceği açısından da yararlı olacaktır. Ancak cevap bekleyen pek çok soru halen bulunmaktadır. Bunlardan biri, kemik doku mühendisliğinin kemik

gelişim süreçlerine mi yoksa kemik defektlerinin tamirine mi odaklanması gerektiğidir. Yazarların genel görüşü her iki sürecin de çok iyi anlaşılması ve üzerinde durulması gerektiği yönündedir.

Gelişen biyolojik görüşler ve kanıtlar doku mühendisliğinin geleceğini önemli ölçüde değiştirecektir. Dahası, muhtemel gelecekteki yaklaşımlar, uygun ekstraselüler matriks molekülleri ya da projenitör hücreler yardımıyla kök hücrelerin doku remodelasyonu ya da rejenerasyonunun erken evrelerinin etkilemesi üzerine kurulabilir (94).

Anjiyogenezisin geliştirilmesi de yine vasküler gelişime izin veren ve uygun pöröziteye sahip taşıyıcılar yardımıyla yapılabilir (95). Bundan dolayı, doğrudan hücre sel yapışma, yayılma ve proliferasyona izin verecek yüzeylere sahip taşıyıcıların geliştirilmesi önemli bir çalışma alanını teşkil etmektedir. Geniş bir perspektif ile bakıldığında, ileride dokunun yeniden temin edilmesi için dokunun son halini yansıtan modeller yerine doğal gelişme biyolojisi ve sürecini temel alan bir model kullanmak daha önemli ve yararlı olabilir. Kemik doku mühendisliğinin hedefi vücudun doğal iyileşme kabiliyetlerinden faydalanmaktır. Bu stratejiler ile uygun bölgede kemik dokuların temini ve etrafında oluşturulacak çevresel koşullar ile fiziksel olarak da yeterli bir organizasyon oluşturmaktır (96,97).

Kemik dokuda oluşturulan defekt modelleri, kemik doku mühendisliği araştırmaları için en fazla tercih edilen yöntemlerden birisidir. Oluşturulan kritik boyuttaki kemik defektleri araştırılan materyal ya da hücrelerle onarılmaya çalışılmaktadır.

Kemik defekti çalışmalarında pek çok denek tür kullanılmıştır. Fare, sıçan, köpek, domuz, koyun ve keçi bunlardan bazılarıdır. Ancak daha fazla kemirgenlere yoğunlaşılmasının sebebi; üreme sayılarının daha fazla olması, daha fazla temin edilebilir olmaları ve ekonomik olmalarıdır. Anatomik olarak kemik defekti çalışmaları için kemirgenlerin femur, omurga, mandibula ve kalvaryumu kullanılmaktadır (98).

“Kritik boyuttaki kemik defekti” terimi ile ilgili bir çok tanım bulunmaktadır. Bunlardan biri; oluşturulduktan sonra herhangi bir müdahale olmaksızın iyileşme

görülmeyen defektler için kullanılan bir terimdir (99). Bu tanıma göre her tür için “kritik boyuttaki kemik defekti” ölçüleri farklı olabilmektedir. Ancak az sayıda da olsa bu konu ile ilgili çalışmalar olmasına rağmen her tür için kesin olarak bu ölçünün ne olduğu bilinmemektedir. Bu tanımı karşılayacak en küçük boyuttaki kemik defektini belirlemek için çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir (100). Diğer bir tanım ise; çalışmalar için belirlenen bitiş zamanına göre yapılan değerlendirmedir. Bu tanıma göre çalışma bitiminde kendiliğinden iyileşmemiş defektler bu kapsama girmektedir ve doğal yaşam süresi ile ilişkisi kurulmamaktadır. Ayrıca bu defektlerin yıllar sonra tamamen kapandığı ya da kapanmayan veya tamamen dolmamış defektler olarak kalıp kalmadığı ile ilgili de veri bulunmamaktadır (101). Dolayısıyla Notodihardjo ve ark.’ın (102) çalışmalarında olduğu gibi ve ikinci tanımla paralel olarak çalışmamızda kullandığımız defekt modeli “kritik boyutta kemik defekti” tanımı ile uyumludur.

Kalvaryal defektlerin oluşturulması için en çok tercih edilen yöntem trefin frezlerle yapılan tekniktir. Flep kaldırıldıktan sonra kemiğe tamamen penetre olmadan ve ‘dura’ya zarar vermeden kesi yapılır. Çünkü dura kemiğin iyileşmesi ve rejenerasyonu için önemli bir görev üstlenmektedir (103). Kemik doku sınırlar dâhilinde inceltildikten sonra künt aletlerle çıkarılmalı ve uygulamalar yapıldıktan sonra üstündeki periost ile beraber dokular kapatılarak suture atılmalıdır. Klinik değerlendirmelerde standart olarak boş defekt bırakılarak karşılaştırma imkânı sağlanmaya çalışılır.

Sıçan kalvaryal defektlerinde kemik rejenerasyonunu değerlendirmek için birkaç yöntem mevcuttur. Histolojik teknikler radyografik ya da mekanik tekniklere göre defekt alanında görülen dokuları izlememizi ve yeni oluşan dokuları daha temel ve fonksiyonel olarak değerlendirmemizi sağlarlar. Ayrıca floresan molekülleri kullanarak işaretleme yapıp detaylı değerlendirmeler yapma imkânı da mevcuttur (104).

Klasik radyografi teknikleri iki boyutlu olarak defekt alanını görmemizi sağlayarak boşluğun kapanması ile ilgili bilgi edinmemize yardımcı olurlar. Radyografik analiz tekniklerindeki gelişmelerle beraber, mikro-BT (micro-CT, “microcomputed tomography”) uygulamaları numunenin üç boyutlu görüntüsü

üzerinde çalışma imkânı sunmaktadır. Bu teknikle defekt alanının hacim, alan ve yoğunluk değerlerini ölçmek mümkündür (104). Ancak, çalışılan numunenin konkav şekilde olması hacim çalışmalarının standart olmasını güçleştirmektedir. Bu nedenle bu çalışmada kemik mineral yoğunluğunun ölçülmesi tercih edildi.

Çalışma modellerinin değerlendirilmesi ve sağlıklı sonuçlar alınması için deney grubuyla beraber kontrol grubunu da ihtiyaç vardır. Boş bırakılan kemik defektleri çoğunlukla defekt kenarlarında hafifçe olmak üzere %5 ile %15 arasında kemikleşme göstermekte ve daha çok fibröz bağ dokusu ile dolmaktadır. Çalışmamızdaki kontrol grubunun sonuçları da bu ifade ile paralellik göstermektedir (105).

Sıçan çalışmalarında daha çok Fisher 344, Sprague-Dawley ve Wistar albino cinsi deney hayvanları kullanılmaktadır. Çalışmamızda da İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden temin edilen Wistar albino cinsi ratlar kullanılmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız deney modeli literatürde kemik rejenerasyonlarının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan ve kabul gören bir tekniktir. Benzer olarak 2008'de Mendonça Costa ve ark. (106) 8 adet immün sistemi baskılanmamış sıçanın kalvaryumuna açtıkları bilateral defektlerde insan kaynaklı dental pulpa kök hücrelerinin iyileştirme potansiyellerini kollajen membran kullanarak değerlendirmişlerdir. Bu çalışma ile insan kaynaklı kök hücrelerin ratlarda herhangi bir reaksiyon göstermediği ve büyük defektlerin dental kaynaklı kök hücreler yardımıyla başarılı bir şekilde tedavi edilebildiği gösterilmiştir (106).

Maraldi ve ark. (107) 2013 yılında 30 sıçan kalvaryumuna açtıkları bilateral defektler ile amniyon sıvısından ve dental pulpadan elde edilen kök hücrelerin neovaskülarizasyona etkisini incelemişlerdir. Yaptıkları histolojik ve immünofloresan incelemeler neticesinde yeni damarsal yapılanma açısından kök hücre gruplarının kontrol gruplarına göre açık ve anlamlı bir şekilde daha iyi sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir (107).

Literatürde kritik boyuttaki kemik defekt modelleri kullanılarak dental pulpa ve diğer kök hücre kaynaklarının etkinliğinin araştırıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır (108-109).

Annibali S. ve ark. (110) yaptıkları çalışmada kök hücre uygulamalarının kemikleşmeyi, üç farklı greft kaynağı kullanılarak yapılan klasik yöntemle göre anlamlı şekilde arttırmadığını rapor etmişlerdir. Ancak açtıkları bilateral defektlerin birine kök hücre uygulanırken diğerine uygulanmamış olması çalışmamı ile farklılık arz etmektedir. Tek defekte uygulanan kök hücrelerin diğer defekte de etkilemiş olma ihtimaline değinilmemiştir. Çalışmanın sonuç kısmında; bu alanda daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu da belirtilmiştir.

Genel görüşün dental pulpa kaynaklı kök hücrelerin osteojenik aktiviteyi ve neovaskülarizasyonu arttırdığı söylenebilir. Ancak hâlen kök hücre kaynaklarının ve taşıma sistemlerinin etkili ve uygulanabilir bir konsepte kavuşturulabilmesi gerekmektedir.

Doku mühendisliğinin Diş Hekimliği alanındaki geleceği heyecan vericidir. Malzeme, genetik, moleküler ve hücre biyolojisindeki gelişmeler yumuşak ve sert doku rejenerasyonları, periodontal hastalıkların tedavisi, mine, dentin ve pulpanın restoratif tedavileri için yeni tedavi yaklaşımları sunacaktır. Ancak yine de tedavi maliyetleri tüm prosedürler için çözülmesi ve tartışılması gereken bir konu olarak kalmaktadır. Çünkü bu teknolojileri klinik kullanıma sokmak için kabul edilebilir maliyetlerle daha ulaşılabilir ve pratik kullanım çözümleri geliştirilmelidir. Geçmiş yıllardaki teknoloji devrimleri de bize satın alınabilir ve hesaplı ürünlerin daha popüler ve yaygın kullanıldığını göstermektedir. Şu anda doku mühendisliğinin ilerde diş hekimliği uygulamalarını nasıl etkileyeceğini tahmin etmek zor olsa da umut verici olduğunu söylemek daha doğru bir tespit olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu deneysel çalışmanın sınırları dâhilinde kemik rejenerasyonunun hızlandırılması ve kalitesinin artırılmasında pulpa kaynaklı kök hücre kullanımının etkili olduğu söylenebilir.

Gelecekte diş bankalarının yaygınlaşması ve maliyetlerinin ucuzlaması, pulpa kaynaklı kök hücre elde edilmesini kolaylaştırabilir. Ayrıca farklı kişilerden elde edilen kök hücrelerin kullanımının mümkün olması, kaynak yaşanmamasını sağlayabilir. Kullanılan yöntemlerin yaygınlaşması ve ucuzlaması ile kemik rejenerasyonunda kök hücre uygulamalarının rutin uygulamaya girebileceği öngörülmektedir.

Bu gibi çalışmaların ülkemizde yapılması ve ileriye dönük klinik yaklaşımlar açısından yeni bilgi ve yöntemler üretilmesi, hızla gelişen bu alanda söz sahibi olunması açısından büyük önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Türkiye Bilimler Akademisi. (2009). *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar*. Ankara: TÜBA
2. Arien-Zakay, H., Lazarovici, P., Nagler, A.. (2010). Tissue regeneration potential in human umbilical cord blood. *Best Pract Res Clin Haematol*, 23, 291-303.
3. Huri, P.Y., Hasırcı, N., Hasırcı, V.. (2010). Bone Tissue Engineering. *Archives Medical Review Journal*, 19(4), 206-219.
4. Lane, J.M., Tomin, E., Bostrom, M.P.. (1999). Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop*, 367, S107-S117.
5. Burchardt, H.. The biology of bone graft repair. (1983). *Clin Orthop Relat Res. Apr*, 174, 28-42.
6. Nkenke, E., Schultze-Mosgau, S., Radespiel-Tröger, M., Kloss, F., Neukam, F.W.. (2001). Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res*, 12(5), 495-502.
7. Nkenke, E., Radespiel-Troger, M., Wiltfang, J., Schultze-Mosgau, S., Winkler, G., Neukam, F.W.. (2002). Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res*, 13(5), 514-21.
8. Wan, D.C., Siedhoff, M.T., Kwan, M.D., Nacamuli, R.P., Wu, B.M., Longaker, M.T.. (2007). Refining retinoic acid stimulation for osteogenic differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Tissue Eng*, 13, 1623–1631
9. Şenköylü, A., Korkusuz, F.. (2004). Kıkırdak Onarımında Doku Mühendisliği Uygulamaları. *TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi*, 3, 3-4.

10. Büyükakyüz, N., KURU, E.İ. (2013). Doku Mühendisliği ve Oral-Maksillofasiyal Bölgede Uygulamaları. *İDO Dergisi, Mart/Nisan*.
11. O'Keefe, R.J., Mao, J.. (2011). Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic-An overview. *Tissue Eng Part B Rev*, 17(6), 389–392.
12. Amini, A.R., Laurencin, C.T., Nukavarapu, S.P.. (2012). Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng*, 40(5), 363–408.
13. Şimşek, A., Çakmak, G., Cila, E.. (2004). Kemik Greftleri ve Kemik Greftlerinin Yerini Tutabilecek Maddeler. *TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi*, Cilt: 3, Sayı: 3-4.
14. Horst, O.V., Chavez, M.G., Jheon, A.H., Desai, T., Klein, O.D.. (2012). Stem cell and biomaterials research in dental tissue engineering and regeneration. *Dent Clin North Am*, Jul;56(3), 495-520.
15. Zhu, J., Marchant, R.E.. (2011). Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices*, Sep;8(5), 607-26.
16. Uslu, B., Arbak, S.. (2010). Doku Mühendisliğinde Kitozanın Kullanım Alanları. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, Cilt: 1, Sayı: 3 Temmuz.
17. Cen, L., Liu, W., Cui, L., Zhang, W., Cao, Y.. (2008). Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatr Res*, May;63(5), 492-6.
18. Bozkurt, M., Kapı, E., Külahçı, Y.. (2009). Periferik Sinir Onarımlarında Konduit Uygulamaları, Temel ve Güncel Yaklaşımlar: Literatürün Gözden Geçirilmesi. *Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi*, 17, 2.
19. Üner, İ., Koçak, E.D. (2012). Poli(Laktik Asit)'in Kullanım Alanları ve Nano Lif Üretimdeki Uygulamaları. *İstanbul Ticaret Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, Yıl: 11 Sayı: 22, 79-88.

20. Kerimoğlu, O., ALARÇİN, E.. (2012) Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Based Drug Delivery Devices For Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *ANKEM Derg*, 26(2), 86-98.
21. Wu, W., Chen, X., Mao, T., Chen, F., Feng, X.. (2006). Bone marrow-derived osteoblasts seeded into porous beta-tricalcium phosphate to repair segmental defect in canine's mandibula. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, Oct;12(4), 268-76.
22. Chua, K.T., Ou, S.F., Chen, S.Y., Chiou, S.Y., Choua, H.H., Ou, K.L.. (2013) Research of phase transformation induced biodegradable properties on hydroxyapatite and tricalcium phosphate based bioceramic. *Ceramics International*, 39(2), 1455–1462.
23. Ducheyne, P., Qiu Q.. (1999). Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on boneformation and bone cell function. *Biomaterials*, 20(2), 287–303.
24. Kannan, S., Vieira, S.I., Olhero, S.M., Torres, P.M.C., Pina S., da Cruz e Silva O.A.B., Ferreira J.M.F.. (2011). Synthesis, mechanical and biological characterization of ionic doped carbonated hydroxyapatite/b-tricalcium phosphate mixtures. *Acta Biomaterialia*, 7, 1835–1843.
25. Sulaiman, S.B., Keong, T.K., Cheng, C.H., Siam, A.B., Idrus, R.B.. (2013) Tricalcium phosphate/hydroxyapatite (TCP-HA) bone scaffold as potential candidate for the formation of tissue engineering bone. *Indian J Med Res*, 137(6), 1093-101.
26. TÜBA Kök Hücre Araştırmaları Çalışma Grubu. (2004) *Kök Hücre Araştırmalarında Güncel Kavramlar – Türkiye Bilimler Akademisi Raporları* Ankara: Türkiye Bilimler Akademisi.
27. Yamanaka, S.. (2007). Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 7;1(1), 39-49.
28. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S.. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872.

29. Ding, D.C., Shyu, W.C., Lin, S.Z.. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*, 20(1), 5-14.
30. İnan, S., Özbilgin, K.. (2009). Kök Hücre Biyolojisi. *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1(5), 11-23.
31. Ural, A.U.. (2012). *Hematopoetik Kök Hücre*. (T. SOYSAL) 7. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi 08-10 Mart 2012, Antalya (s.1-4).
32. Estrela, C., de Alencar, A. H. G., Kitten, G. T., Vencio, E. F., Gava, E.. (2011). Mesenchymal Stem Cells in the Dental Tissues: Perspectives for Tissue Regeneration. *Braz Dent J*, 22(2), 91-98.
33. Büyükakyüz, N., KURU, E.İ.. (2013). Diş ve Diş Çevre Dokuları Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler. *İDO Dergisi* Kasım/Aralık.
34. Morszeck, C., Petersen, J., Völlner, F., Driemel, O., Reichert, T. and Beck, H. C. (2009), Proteomic analysis of osteogenic differentiation of dental follicle precursor cells. *Electrophoresis*, 30, 1175–1184.
35. Alipour, R., Adib, M., Karimi, M.M., Hashemi-Beni, B., Sereshki, N.. (2013). Comparing the Immunoregulatory Effects of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth and Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 28;12(4), 331-44.
36. Lymperi, S., Ligoudistianou, C., Taraslia, V., Kontakiotis, E., Anastasiadou, E.. (2013). Dental Stem Cells and their Applications in Dental Tissue Engineering. *The Open Dentistry Journal*, 7, 76-81.
37. Gay, I.C., Chen, S., MacDougall, M.. (2007). Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res*, 10(3), 149-60.
38. Liu, Y., Zheng, Y., Ding, G., Fang, D., Zhang, C., Bartold, P.M., Gronthos, S., Shi, S., Wang, S.. (2008). Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells*, 26(4), 1065-73.

39. Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B.M., Zhang, C., Liu, H., Gronthos, S., Wang, C.Y., Shi, S., Wang, S.. (2006) Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*, 20(1), 79.
40. Giordano, G., La Monaca, G., Annibali, S., Cicconetti, A., Ottolenghi, L.. (2011). Stem cells from oral niches: a review. *Annali di Stomatologia*, II (1-2), 3-8.
41. Abe, S., Hamada, K., Yamaguchi, S., Amagasa, T., Miura, M.. (2011). Characterization of the radioresponse of human apical papilla-derived cells. *Stem Cell Res Ther*, 20;2(1), 2.
42. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G., Shi, S.. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 5;97(25), 13625-30.
43. Bronckaers, A., Hilkens, P., Fanton, Y., Struys, T., Gervois, P., Politis, C., Martens, W., Lambrechts, I.. (2013). Angiogenic properties of human dental pulp stem cells. *PLoS One*, 8(8), 71104.
44. Waddington, R.J., Youde, S.J., Chi, P.L., Sloan, A.J.. (2009). Isolation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp. *Cells Tissues Organs*, 189, 268-274.
45. Almushayt, A., Narayanan, K., Zaki, A.E., George, A.. (2006). Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther*, 13, 611-620.
46. Stevens, A., Zuliani, T., Olejnik, C., LeRoy, H., Obriot, H., Kerr-Conte, J.. (2008). Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells Dev*, 17, 1175-1184.
47. Yan, X., Qin, H., Qu, C., Tuan, R.S., Shi, S., Huang, G.T.. (2010). iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev*, 19, 469-480.

48. Pierdomenico, L., Bonsi, L., Calvitti, M., Rondelli, D., Arpinati, M., Chirumbolo, G., Becchetti, E., Marchionni, C., Alviano, F., Fossati, V., Staffolani, N., Franchina, M., Grossi, A., Bagnara, G.P.. (2005). Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*, 80, 836–842.
49. Alge D.L., Zhou D., Adams L.L., Wyss B.K., Shadday M.D.. (2010) Donor matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *J Tissue Eng Regen Med*, 4: 73–81.
50. Karaoz E., Demircan P.C., Saglam O., Aksoy A., Kaymaz F.. (2011). Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol*, 136, 455–473.
51. Gandía C., Armiñan A., García-Verdugo J.M., Lledó E., Ruiz A., Miñana M.D., Sanchez-Torrijos .J, Payá R., Mirabet V., Carbonell-Uberos .F, Llop M., Montero J.A., Sepúlveda P.. (2008). Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells*, 26(3), 638-45.
52. Sağlam, M. (1987). *Genel Histoloji*. Ankara : Emel Matbaacılık.
53. Eşrefoğlu, M. (2004). *Genel ve Özel Histoloji*. İstanbul : Pelikan Yayınları.
54. Açıkalin, A.E., Bayçu C., Gürer F., Aral E. *Histoloji*. Eskişehir : T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No: 894 Açıköğretim Fakültesi Yayınları No: 480.
55. Bancroft, J. D. (2008). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Philadelphia: Elsevier Health Sciences.
56. Aybar Odstrcil A., Territoriale E., Missana L.. (2005). An experimental model in calvaria to evaluate bone therapies. *Acta Odontol Latinoam*, 18(2), 63-7.
57. Amini A.R., Laurencin C.T., Nukavarapu S.P. (2012). Bone tissue engineering: Recent advances and challenges. *Critical reviews in biomedical engineering*, 40, 363-408.

58. Lin N.H., Gronthos S., Bartold P.M. (2008). Stem cells and periodontal regeneration. *Aust Dent J*, 53, 108-21.
59. Moshaverinia A., Chen C., Akiyama K., Xu X., Chee W.W., Schricker S.R., Shi S. (2013). Encapsulated dental-derived mesenchymal stem cells in an injectable and biodegradable scaffold for applications in bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, 101(11), 3285-94.
60. Sonoyama W., Liu Y., Fang D., Yamaza T., Seo B.M., Zhang C., Liu H., Gronthos S., Wang C.Y., Wang S., Shi S. (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*, 20(1), 79.
61. Fakhry M., Hamade E., Badran B., Buchet R., Magne D. (2013). Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World journal of stem cells*, 5, 136-48.
62. Hollister S.J., Murphy W.L. (2011). Scaffold translation: Barriers between concept and clinic. *Tissue engineering Part B, Reviews*, 17, 459-74.
63. Murphy C.M., O'Brien F.J., Little D.G., Schindeler A. (2013). Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *European cells & materials*, 26, 120-32.
64. Baroli B. (2009). From natural bone grafts to tissue engineering therapeutics: Brainstorming on pharmaceutical formulative requirements and challenges. *Journal of pharmaceutical sciences*, 98, 1317-75.
65. St John T.A., Vaccaro A.R., Sah A.P., Schaefer M., Berta S.C, Albert T., Hilibrand A. (2003). Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*, 32(1), 18-23.
66. Delloye C., Cornu O., Druetz V., Barbier O. (2007). Bone allografts: What they can offer and what they cannot. *The Journal of bone and joint surgery British*, 89, 574-9.

67. Hench L.L., Paschall H.A. (1973). Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *Journal of biomedical materials research*, 7, 25-42.
68. Porter, A.E., Botelho, C.M., Lopes, M.A., Santos, J.D., Best, S.M., Bonfield, W. (2004). Ultrastructural comparison of dissolution and apatite precipitation on hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A*, 69, 670-9.
69. Wongwitwichot, P., Kaewsrichan, J, Chua, K.H., Ruszymah, B.H. (2010). Comparison of tcp and tcp/ha hybrid scaffolds for osteoconductive activity. *Open Biomed Eng J*, 4, 279-85.
70. Hing, K.A., Best, S.M., Tanner, K.E., Bonfield, W., Revell, P.A. (2004). Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res A*, 68, 187-200.
71. Artzi, Z., Weinreb, M., Givol, N., Rohrer, M.D., Nemcovsky, C.E., Prasad, H.S., Tal, H. (2004). Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: A 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 19, 357-68.
72. Sulaiman, S.B., Keong, T.K., Cheng, C.H., Saim, A.B., Idrus, R.B. (2013). Tricalcium phosphate/hydroxyapatite (tcp-ha) bone scaffold as potential candidate for the formation of tissue engineered bone. *The Indian journal of medical research*, 137, 1093-101.
73. Kinoshita, Y., Maeda, H. (2013). Recent developments of functional scaffolds for craniomaxillofacial bone tissue engineering applications. *TheScientificWorldJournal*, 2013, 863157.
74. Giordano, G., La Monaca, G., Annibaldi, S., Cicconetti, A., Ottolenghi L. (2011). Stem cells from oral niches: A review. *Annali di stomatologia*, 2, 3-8.

75. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G., Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (dpscs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 13625-30.
76. Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, L.W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P.G., Shi, S.. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of dental research*, 81, 531-5.
77. Otaki, S., Ueshima, S., Shiraishi, K., Sugiyama, K., Hamada, S., Yorimoto, M., Matsuo, O. (2007). Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. *Cell biology international*, 31, 1191-7.
78. Papaccio, G., Graziano, A., d'Aquino, R., Graziano, M.F., Pirozzi, G., Menditti, D., De Rosa, A., Carinci, F., Laino, G. (2006). Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (sbp-dpscs) and their differentiated osteoblasts: *A cell source for tissue repair*. *Journal of cellular physiology*, 208, 319-25.
79. Koyama, N., Okubo, Y., Nakao, K., Bessho, K. (2009). Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 67, 501-6.
80. d'Aquino, R., De Rosa, A., Lanza, V., Tirino, V., Laino, L., Graziano, A., Desiderio, V., Laino, G., Papaccio, G. (2009). Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *European cells & materials*, 18, 75-83.
81. Zhang, W., Walboomers, X.F., Shi, S., Fan, M., Jansen, J.A. (2006). Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue engineering*, 12, 2813-23.

82. Laino, G., d'Aquino, R., Graziano, A., Lanza, V., Carinci, F., Naro, F., Pirozzi, G., Papaccio, G. (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: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 20, 1394-402.
83. d'Aquino, R., Graziano, A., Sampaolesi, M., Laino, G., Pirozzi, G., De Rosa, A., Papaccio, G. (2007). Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: A pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell death and differentiation*, 14, 1162-71.
84. Huang, G.T., Gronthos, S., Shi, S. (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, 792-806.
85. Li, J.H., Liu, D.Y., Zhang, F.M., Wang, F., Zhang, W.K., Zhang, Z.T. (2011). Human dental pulp stem cell is a promising autologous seed cell for bone tissue engineering. *Chinese medical journal*, 124, 4022-8.
86. Gandia, C., Arminan, A., Garcia-Verdugo, J.M., Lledo, E, Ruiz, A., Minana, M.D., Sanchez-Torrijos, J., Payá, R., Mirabet, V., Carbonell-Uberos, F., Llop, M., Montero, J.A., Sepúlveda, P. (2008). Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem cells*, 26, 638-45.
87. Kerkis, I., Ambrosio, C.E., Kerkis, A., Martins, D.S., Zucconi, E., Fonseca, S.A., Cabral, R.M., Maranduba, C.M., Gaiad, T.P., Morini, A.C., Vieira, N.M., Brolio, M.P., Sant'Anna, O.A., Miglino, M.A., Zatz, M. (2008). Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (grmd) dogs: Local or systemic?. *Journal of translational medicine*, 6, 35.
88. Nakashima, M., Iohara, K., Sugiyama, M. (2009). Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytokine & growth factor reviews*, 20, 435-40.

89. Monteiro, B.G., Serafim, R.C., Melo, G.B., Silva, M.C., Lizier, N.F., Maranduba, C.M., Smith, R.L., Kerkis, A., Cerruti, H., Gomes, J.A., Kerkis, I. (2009). Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features with limbal stem cells. *Cell proliferation*, 42, 587-94.
90. Gomes, J.A., Gerales Monteiro, B., Melo, G.B., Smith, R.L., Cavenaghi Pereira da Silva, M., Lizier, N.F., Kerkis, A., Cerruti, H., Kerkis, I. (2010). Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51, 1408-14.
91. Huey, D.J., Hu, J.C., Athanasiou, K.A. (2012). Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science*, 338, 917-21.
92. Goldstein, S.A., Patil, P.V., Moalli, M.R. (1999). Perspectives on tissue engineering of bone. *Clinical orthopaedics and related research*, 419-23.
93. Caplan, A.I., Elyaderani, M., Mochizuki, Y., Wakitani, S., Goldberg, V.M. (1997). Principles of cartilage repair and regeneration. *Clinical orthopaedics and related research*, 254-69.
94. Place, E.S., Evans, N.D., Stevens, M.M. (2009). Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature materials*, 8, 457-70.
95. Karageorgiou, V., Kaplan, D. (2005). Porosity of 3d biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26, 5474-91.
96. Yaszemski, M.J., Payne, R.G., Hayes, W.C., Langer, R., Mikos, A.G. (1996). Evolution of bone transplantation: Molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials*, 17, 175-85.
97. Sharma, B., Elisseeff, J.H. (2004). Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. *Annals of biomedical engineering*, 32, 148-59.
98. Schmitz, J.P., Hollinger, J.O. (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical orthopaedics and related research*, 299-308.

99. Takagi, K., Urist, M.R. (1982). The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (bmp) in repair of skull defects. *Annals of surgery*, 196, 100-9.
100. Cooper, G.M., Mooney, M.P., Gosain, A.K., Campbell, P.G., Losee, J.E., Huard, J. (2010). Testing the critical size in calvarial bone defects: Revisiting the concept of a critical-size defect. *Plastic and reconstructive surgery*, 125, 1685-92.
101. Einhorn, T.A. (1999). Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clinical orthopaedics and related research*, 59-67.
102. Notodihardjo FZ, Kakudo N, Kushida S, Suzuki K, Kusumoto K.. (2012). Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 40(3), 287-91.
103. Hobar, P.C., Schreiber, J.S., McCarthy, J.G., Thomas, P.A. (1993). The role of the dura in cranial bone regeneration in the immature animal. *Plastic and reconstructive surgery*, 92, 405-10.
104. Spicer, P.P., Kretlow, J.D., Young, S., Jansen, J.A., Kasper, F.K., Mikos, A.G. (2012). Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature protocols*, 7, 1918-29.
105. Chesmel, K.D., Branger, J., Wertheim, H., Scarborough, N. (1998). Healing response to various forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 56, 857-63.
106. de Mendonca Costa, A., Bueno, D.F., Martins, M.T., Kerkis, I., Kerkis, A., Fanganiello, R.D., Cerruti, H., Alonso, N., Passos-Bueno, M.R. (2008). Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *The Journal of craniofacial surgery*, 19, 204-10.

107. Maraldi, T., Riccio, M., Pisciotta, A., Zavatti, M., Carnevale, G., Beretti, F., La Sala, G.B., Motta, A., De Pol, A. (2013). Human amniotic fluid-derived and dental pulp-derived stem cells seeded into collagen scaffold repair critical-size bone defects promoting vascularization. *Stem cell research & therapy*, 4, 53.
108. Pisciotta, A., Riccio, M., Carnevale, G., Beretti, F., Gibellini, L., Maraldi, T., Cavallini, G.M., Ferrari, A., Bruzzesi, G., De Pol, A. (2012). Human serum promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *PLoS one*, 7, 50542.
109. Riccio, M., Maraldi, T., Pisciotta, A., La Sala, G.B., Ferrari, A., Bruzzesi, G., Motta, A., Migliaresi, C., De Pol, A. (2012). Fibroin scaffold repairs critical-size bone defects in vivo supported by human amniotic fluid and dental pulp stem cells. *Tissue engineering Part A*, 18, 1006-13.
110. Annibali, S., Cicconetti, A., Cristalli, M.P., Giordano, G., Trisi, P., Pilloni, A., Ottolenghi, L. A.. (2013). A comparative morphometric analysis of biodegradable scaffolds as carriers for dental pulp and periosteal stem cells in a model of bone regeneration. *The Journal of craniofacial surgery*, 24, 866-71.



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 17-12-2013
 Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
 Araştırma Protokol no.su : 2013/A-88
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Türü : *Ratus norvegicus*
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Soyü : *Wistar albino*
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 15 Adet
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırığı : Ort. 150-200 gr

Diş Hekimliği Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Serkan Polat'ın yürüttüğü olduğu "PULPAL DENTAL KÖK HÜCRE KAYNAĞININ KRİTİK BOYUTTAKİ RAT KALVARYAL DEFEKT MODELİ ÜZERİNDEKİ KEMİK REJENERASYON ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ" isimli 2013/A-88 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneide Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılar a ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ
Başkan

Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ
Üye

Katılmadı
Salih AVCI
Sivil Üye

Prof. Dr. Nigar VARDI
Üye

Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ
Üye

Katılmadı
Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU
Sivil Üye

Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ
Üye

Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN
Üye
Katılmadı

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Bingöl'de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Bingöl ve Diyarbakır'da bitirdim. 2004 yılında Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nde başladığım yüksek öğrenimimi 2009 yılında tamamladım. 2010 yılında İnönü Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nde Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nda doktora programına dâhil oldum.