

← Adınızı soyadınızı giriniz

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

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

İNDÜKLENMİŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRELERİN
OSTEOJENİK POTANSİYELİNİN SIÇAN KALVARYA
DEFEKTLERİNDE HİSTOLOJİK OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

KADİR AKIN KAYGUN

DANIŞMAN
PROF. DR. OSMAN ZEKİ GÜMRÜ

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

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Doktora Programında Doktora öğrencisi Kadir Akın KAYĞUN tarafından Prof. Dr. Osman Zeki GÜMRÜ'nün danışmanlığında hazırlanan "İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücrelerin Osteojenik Potansiyelinin Sıçan Kalvaryası Defektlerinde Histolojik Olarak Değerlendirilmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 28/08//2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı/Danışman

Prof. Dr. Osman Zeki GÜMRÜ
İstanbul Üniversitesi-Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Mustafa Sami YILDIRIM
İstanbul Üniversitesi-Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

Jüri

Doç. Dr. Mustafa RAMAZANOĞLU
İstanbul Üniversitesi-Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Gamze TORUN KÖSE
Yeditepe Üniversitesi-Mühendislik Fakültesi
Genetik ve Biyomühendislik

Jüri

Doç. Dr. Ünal USLU
İstanbul Medeniyet Üniversitesi- Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

BEYAN

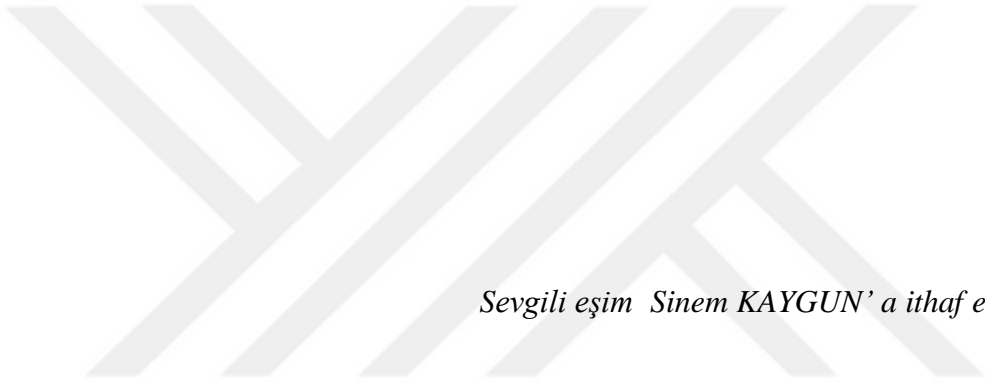
Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları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

Kadir Akın KAYGUN

İMZA



İTHAF



Sevgili eşim Sinem KAYGUN' a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince üstün bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, hayatın her alanında bana yol gösteren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Osman Zeki GÜMRÜ'ye,

Akademik hayatta beni her zaman destekleyen ve mesleki tecrübelerini sınırsızca aktaran Doç. Dr. Mustafa RAMAZANOĞLU' na,

Tez çalışmamın laboratuvar aşamalarını gerçekleştirme imkanı tanıyan, yardım ve tecrübesini esirgemeyen Prof. Dr. Gamze Torun KÖSE'ye,

Tez deneylerimin histolojik incelemesinde yardımcı olan Doç. Dr. Ünal USLU ve güler yüzüyle çalışma azmi veren sevgili hocam Dr. Alev CUMBUL'a

Tez çalışmam boyunca hep yanımda olan, sorularımı bıkmadan cevaplayan ve pozitifliği ile tüm zorlukları kolaylaştıran Dr. Görke GÜREL'e

Doktora sürecim boyunca örnek aldığım sevgili abim Dr. Osman Ertuğ ERÇAL ve sevgili ablam Dr. Pınar ŞİRANECİ ERÇAL'a

Eğitim hayatım boyunca tüm zorlukları beraber aştığımız sevgili çalışma arkadaşlarım Dt. Osman Nihat ÖZER, Dt. Erdem YAZICI, Dt. Hüsna AKTÜRK ve yol arkadaşım Dt. Kutluhan KANDAŞ 'a

Çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Dr. Esin İlkem KURU BUYAN ve Dt. Bertan BUYAN'a

Hayatıma girdiği günden beri sevgisi ve anlayışı ile yanımda olan eşim Dr. Sinem KURU KAYGUN'a

Destek ve fedakarlıkları ile bugüne gelmemi sağlayan canım aileme

teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 20664

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İ
BEYAN	İİ
İTHAF	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET.....	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri ve Tipleri.....	2
2.1.1. Farklılaşma Kapasitelerine Göre Kök Hücreler	3
2.1.1.1. Totipotent Kök Hücreler.....	3
2.1.1.2. Pluripotent Kök Hücreler	3
2.1.1.3. Multipotent Kök Hücreler	3
2.1.1.4. Oligopotent Kök Hücreler	4
2.1.1.5. Unipotent Kök Hücreler	4
2.1.2. Kökenlerine Göre Kök Hücreler	4
2.1.2.1. Embriyonik Kök Hücreler	4
2.1.2.2. Embriyonik Germ Hücreler	5
2.1.2.3. Erişkin Kök Hücreler	5
2.1.2.4. Fetal Kök Hücreler	6
2.1.2.5. Kordon Kanı Kök Hücreleri	7
2.1.2.6. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler	7
a. İPKH Elde Etmede Kullanılan Kaynaklar.....	9
b. İPKH'lerin Oluşturulmasında Seçilen Genler	9
c. İPKH'de Gen Aktarım Yöntemleri	11
d. İPKH'lerin Osteojenik Farklılaşma Potansiyeli	12

e. İPKH'lerin Osteojenik Farklılaşması için Kullanılan Yapı İskeleleri	14
f. İPKH'lerin Kullanım Alanları.....	15
2.2. Kemik Dokusu.....	17
2.2.1. Kemik Dokusu Tipleri.....	19
2.2.1.1. Primer Kemik	19
2.2.1.2. Sekonder Kemik.....	19
2.2.2. Kemik Dokusu Oluşumu (Osteogenezis)	20
2.2.2.1. İntramembranöz Kemikleşme	20
2.2.2.2. Endokondral Kemikleşme	20
2.2.3. Kemik İyileşmesi	21
2.2.3.1. İnflamatuar Faz	22
2.2.3.2. Reparatif Faz (Tamir Fazı)	23
2.2.3.3. Remodelasyon Fazı	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Gereç	24
3.2. Yöntem	26
3.2.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması.....	26
3.2.2. Deney Grupları ve Uygulanan Cerrahi İşlemler.....	28
3.2.3. Histolojik İnceleme.....	33
3.2.3.1. Fiksasyon ve Doku Takip Aşamaları	33
3.2.3.2. Histomorfolojik Değerlendirme	35
3.2.4. İstatistiksel Değerlendirme.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Stereolojik Analiz Bulguları.....	37
4.1.1. Kemik Hacmi (mm ³)	37
4.1.2. Yumuşak Doku Hacmi (mm ³).....	40
4.1.3. Kemik Hacmi Yüzdesi (%).....	42
4.2. Stereoinvestigator Görüntü Analiz Programından Elde Edilen Görüntüler	45
4.2.1. Kontrol (Boş defekt) Grubu.....	45
4.2.2. Defekt ve Biyomateryal Grubu	47
4.2.3. Defekt, Biyomateryal ve MKH-İPKH Grubu	49
4.2.4. Defekt, Biyomateryal ve Osteojenik İPKH Grubu.....	51
5. TARTIŞMA	53

6. SONUÇLAR.....	66
KAYNAKLAR	67
HAM VERİLER.....	84
ETİK KURUL KARARI.....	85
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	86
ÖZGEÇMİŞ	87



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2 - 1: Kemik doku hücreleri.....	18
Tablo 3 - 1: Doku takip aşamaları.....	33
Tablo 3 - 2: Masson Trikrom boyama aşamaları	34
Tablo 4 - 1: Tüm deney gruplarında saptanan ortalama kemik hacmi miktarının karşılaştırılması ($p<0.05$).....	37
Tablo 4 - 2: Tüm deney gruplarında saptanan ortalama yumuşak doku hacmi miktarının karşılaştırılması ($p<0.05$).....	40
Tablo 4 - 3: Tüm deney gruplarında saptanan ortalama kemik hacmi yüzdesinin karşılaştırılması ($p<0.05$).....	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2 - 1: İPKH eldesi ve uygulamalarının şematizasyonu (Bayart ve Cohen-Haguenauer 2013)	8
Şekil 3- 1: İPKH'lerin hazırlanması.....	27
Şekil 3- 2: İPKH'lerine osteojenik besiyeri eklendikten 10 gün sonra von Kossa boyaması ile incelenmesi. Mavi ok: Nuclear fast red ile boyanan İPKH'leri, Yeşil ok: Kalsiyum fosfat depozisyonları.	28
Şekil 3- 3: Deney hayvanlarının steril örtü ile örtülmesi ve operasyon alanının traş edilmesi.....	29
Şekil 3- 4: Cerrahi alanda flep kaldırılması ve kalvaryal defektin hazırlanması	30
Şekil 3- 5: 4mm çapındaki kalvaryal defekt	30
Şekil 3- 6: İPKH'lerin biyomateryal ile defekt alanına uygulanması	31
Şekil 3- 7: Defekt alanının süturla primer kapatılması.....	32
Şekil 3- 8: Deney hayvanının sakrifikasyonu sonrası parietal kemiğin çıkarılması	32
Şekil 4 - 1: Tüm deney gruplarında saptanan ortalama kemik hacmi miktarı.....	38
Şekil 4 - 2:Tüm deney gruplarında saptanan ortalama yumuşak doku hacmi miktarı....	41
Şekil 4 - 3: Tüm deney gruplarında saptanan ortalama kemik hacmi yüzdesi	43
Şekil 4 - 4: Kontrol (Boş Defekt) grubuna ait histolojik kesit görünümü. Sarı yıldız: kemik dokusunu ve sarı ok başı: kan damarlarını temsil eder. Boyama Masson-Trikrom ile yapılmıştır. Bar: 200 µm, resimler x10'lik büyütmededir.	45
Şekil 4 - 5:Kontrol (Boş Defekt) grubuna ait histolojik kesit görünümü. Sarı yıldız: kemik dokusunu ve sarı ok başı: kan damarlarını temsil eder. Boyama Masson-Trikrom ile yapılmıştır. Bar: 100 µm, resimler x20'lik büyütmededir.	46
Şekil 4 - 6: Defekt + biyomateryal grubuna ait histolojik kesit görünümü. Sarı yıldız: kemik dokusunu, sarı ok başı: kan damarlarını ve sarı ok: yumuşak bağ dokusunu temsil eder. Boyama Masson-Trikrom ile yapılmıştır. Bar: 200 µm, resimler x10'lik büyütmededir.	47
Şekil 4 - 7: Defekt + biyomateryal grubuna ait histolojik kesit görünümü. Sarı yıldız: kemik dokusunu, sarı ok başı: kan damarlarını ve sarı ok: yumuşak bağ dokusunu temsil eder. Boyama Masson-Trikrom ile yapılmıştır. Bar: 100 µm, resimler x20'lik büyütmededir.	48
Şekil 4 - 8: Defekt + biyomateryal + MKH-İPKH grubuna ait histolojik kesit görünümü. Sarı yıldız: kemik dokusunu ve sarı ok başı: kan damarlarını temsil eder. Beyaz ok başı	

- ise yeni kemikleşen dokuyu göstermektedir. Boyama Masson-Trikrom ile yapılmıştır. Bar: 200 μm , resimler x10'lik büyütmededir.49
- Şekil 4 - 9: Defekt + biyomateryal + MKH-İPKH grubuna ait histolojik kesit görünümü. Sarı yıldız: kemik dokusunu ve sarı ok başı: kan damarlarını temsil eder. Beyaz ok başı ise yeni kemikleşen dokuyu göstermektedir. Boyama Masson-Trikrom ile yapılmıştır. Bar: 100 μm , resimler x20'lik büyütmededir.50
- Şekil 4 - 10: Defekt + biyomateryal + osteojenik İPKH grubuna ait histolojik kesit görünümü. Sarı yıldız: kemik dokusunu, sarı ok başı: kan damarlarını ve sarı ok: yumuşak bağ dokusunu temsil eder. Beyaz ok başı ise yeni kemikleşen dokuları göstermektedir. Boyama Masson-Trikrom ile yapılmıştır. Bar: 200 μm , resimler x10'lik büyütmededir.51
- Şekil 4 - 11: Defekt + biyomateryal + osteojenik İPKH grubuna ait histolojik kesit görünümü. Sarı yıldız: kemik dokusunu, sarı ok başı: kan damarlarını ve sarı ok: yumuşak bağ dokusunu temsil eder. Beyaz ok başı ise yeni kemikleşen dokuları göstermektedir. Boyama Masson-Trikrom ile yapılmıştır. Bar: 100 μm , resimler x20'lik büyütmededir.52

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

μm : Mikrometre

2D: İki Boyut

3D: Üç Boyut

AdKH: Adipoz Türevli Mezenkimal Kök Hücre

ALP: Alkalen Fosfataz

ATCC: American Type Culture Collection

BMP: Kemik Morfogenetik Protein

Ca^{+2} : Kalsiyum

CG: Kitosan Jelatin

cm^2 : santimetre kare

CO_2 : Karbondioksit

Col: Kollajen

CPC: Kalsiyum Fosfat Simanı

CTS: Kitosan

DF: Dermal Fibroblast

dk: dakika

DMEM: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu

EC: Embriyoid Cisim

EDTA: Etilendiamin Tetra Asetik Asit

EKH: Embriyonik Kök Hücre

FBF: Fibroblast Büyüme Faktörü

FEPP: Fibronektin Benzeri Tasarlanmış Polimer Proteini

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

Fn: Fibronektin

FTS: Fosfat Tamponlu Salin- Phosphate Buffered Saline

H_2O : Su

HA: Hidroksiapatit

IGF-1: İnsülin Büyüme Faktörü-1

İPKH: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
KDB: Kritik Defekt Boyutu
KDM: Kemik Doku Mühendisliği
Klf4: Krüppel Benzeri Faktör 4
KSP: Kemik Sialoprotein
Mg⁺²: Magnezyum
miRNA: Mikro Ribo Nükleik asit
miRNA: MikroRNA
MKH: Mezenkimal Kök Hücre
ml: Mililitre
mm: Milimetre
MMLV: Moloney Murin Lösemi Retrovirusu
mRNA: messenger Ribo Nükleik asit
nHA: nano-hidroksiapatit
°C: Santigrat
OCN: Osteokalsin
Oct3/4: Oktamer
OM: Osteojenik Ortam (Medium)
OPN: Osteopontin
OSX: Osterix
PBS: Poli bütilen süksinat
PCL: Polikaprolakton
PDL: Periodontal ligament
PES: Polietersülfon
PLGA: Poli Laktik-ko-Glikolik Asit
PLLA: poli-L-laktik asit
RNA: Ribo Nükleik asit
rpm: Revolution Per Minute
Runx-2: Runt ile İlişkili Transkripsiyon Faktörü 2
SHED: Düşen Süt Dişi Kök Hücreleri

Sox-2: Sex-Determining Region Y-Box 2

SPP1: Salgılanan Fosfoprotein 1

SRY: Sex Determining Region Y

TGF: Transforme Edici Büyüme Faktörü

TNAP: Spesifik Olmayan Alkalın Fosfataz



ÖZET

Kaygun, K.A. (2019). İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücrelerin Osteojenik Potansiyelinin Sıçan Kalvaryaya Defektlerinde Histolojik Olarak Değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Ana Bilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Kök hücre tedavileri kemik rejenerasyonu ve onarımı için umut verici bir yaklaşımdır. Bu çalışmanın amacı; İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücrelerin (İPKH) kemik dokusunun rejenerasyonunda kullanılma potansiyelinin histolojik olarak değerlendirilmesidir.

Çalışmamızda 28 adet Sprague Dawley türü erkek sıçan kullanıldı. Sıçanların kranyumlarında 4 mm genişliğinde kalvaryal defekt açıldı. Kontrol grubundaki defekt boş bırakıldı, diğer defektlere biyomateryal, mezenkimal kök hücreye (MKH) farklılaştırılan İPKH'ler ve osteojenik farklılaştırılan İPKH'ler uygulandı. 4 hafta sonunda histolojik ve histomorfometrik inceleme gerçekleştirildi. Bulgular, Statistical Package For The Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı 20,0 sürümü kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

Kontrol ve MKH'ye farklılaştırılan İPKH grupları arasında ortalama kemik hacmi miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0,05$). Kontrol ve osteojenik olarak farklılaştırılan İPKH grupları arasında ortalama kemik hacmi miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p = 0.01$). MKH'ye farklılaştırılan İPKH ve osteojenik farklılaştırılan İPKH grupları arasında ortalama kemik hacmi miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p = 0,73$).

Sonuç olarak İPKH'lerin kemik iyileşmesinde osteojenik potansiyeli olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: indüklenmiş pluripotent kök hücreler, mezenkimal kök hücre kemik dokusu, kemik rejenerasyonu, doku mühendisliği

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 20664

ABSTRACT

Kaygun, K.A. (2019). Histological evaluation of osteogenic potential of Induced Pluripotent Stem Cells in rat calvarial defects. İstanbul University, Institute of Health Science, Institute of Health Science, Department of Oral Surgery, PhD thesis, İstanbul.

Stem cell treatments are a promising approach for bone regeneration and repair. The aim of this study is histological evaluation of bone regeneration using Induced Pluripotent Stem Cells (IPSC)

In our study, 28 Sprague Dawley male rats were used. A 4 mm wide calvarial defect was opened in the rats. Biomaterial, mesenchymal stem cell (MSC) induced IPSC and osteogenic induced IPSC were applied to the defects. Histological and histomorphometric examination was performed at the end of 4 weeks. The results were analyzed using IBM SPSS Statistics 20.0 computer program.

There was a statistically significant difference between control group and MSC induced IPSC groups in terms of mean bone volume ($p = 0.05$). A statistically significant difference was found between control group and osteogenic-induced IPSC groups in terms of mean bone volume ($p = 0.01$). There was no statistically significant difference in the mean volume of bone volume between MSC induced IPSC and osteogenic-induced IPSC groups ($p = 0.73$).

As a result, it has been shown that IPSC have osteogenic potential in bone healing.

Key Words: stem cell, induced pluripotent stem cells, bone tissue, bone regeneration, tissue engineering

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 20664

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kemik doku mühendisliği (KDM); diş hekimliği ve oral-maksillofasiyal cerrahiye ilgilendiren doku mühendisliği uygulamaları arasında önemli bir yere sahiptir ve kemik grefti uygulamalarının sınırlı donör kaynakları ve olası komplikasyonları gibi olumsuzluklarını önlemek için gelecek vaat eden bir araştırma konusudur (Liao ve Chen, 2014).

Kök hücreler; kendini yenileme ve çeşitli hücrelere farklılaşma yetenekleri sebebiyle KDM'nin önemli araştırma alanlarından biridir (Liao ve Chen, 2014). Hücre replasman tedavileri kemik mühendisliği için umut vericidir ve çeşitli dokulardan izole edilen insan mezenkimal kök hücreleri (MKH), kemik rejeneratif tedavileri için potansiyel bir hücre kaynağı olarak incelenmiştir (Ishiy ve ark. 2015).

Kemik iliği MKH'leri; KDM'de kullanılmak üzere ilk keşfedilen ve en iyi bilinen kök hücre kaynağı olmakla birlikte, sınırlı miktarda elde edilmesinin büyük ölçekli uygulamalarda yetersiz kalması, oldukça heterojen olması, uzun dönemdeki in vitro genişlemesinin yaşlanma ve spontan farklılaşmaya sebep olması ve kaynak dokuya bağlı olarak farklılaşma potansiyelinin değişmesi gibi olumsuzluklara sahiptir (Ishiy ve ark. 2015). Bu sebeple KDM'de yeni kök hücre araştırmalarına yön verilmiştir.

İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (İPKH); farklı doku hücrelerinden üretilebilirler. İPKH'ler embriyonik kök hücrelere (EKH) benzer morfolojiye ve farklı germ tabakalarının hücrelerine farklılaşma yeteneklerine sahiptirler (Okita ve ark. 2007). Bu hücreler farklı dokulardan elde edilen yetişkin kök hücrelerin, dört farklı pluripotent gen (Oct3/4, Sox2, cMyc, and Klf4) ile tekrar proglanması sonucunda elde edilmektedir (Zhou ve ark. 2009). İPKH'ler EKH benzeri özelliklerinden dolayı birçok dokunun rejeneratif mühendisliği için ümit vadeden bir hücre kaynağı olarak görülmektedir. Bu çalışmamızın amacı İPKH'lerin kemik dokunun rejenerasyonunda kullanılma potansiyelinin histolojik olarak değerlendirilmesidir.

Çalışmamızın sonucunda İPKH'lerin kemik oluşturma potansiyeli değerlendirilirken, transplantasyon öncesi in vitro kültür koşullarında İPKH'lerin bu potansiyelini arttırmaya yönelik yollar belirlenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri ve Tipleri

Kök hücreler; fonksiyonel olarak farklılaşmamış, kendini yenileyebilme ve yeni kök hücreler oluşturabilme özelliğine sahip, değişik doku ve organ türlerine farklılaşma gösterebilen, klonojenik hücreler olarak tanımlanmaktadır (Fuchs ve Serge, 2000; Blau ve ark. 2001; NIH 2001; Bishop ve ark. 2002; Gronthos ve ark. 2002; Verfaillie ve ark. 2002; Fortier 2005; Rimondini ve Mele 2009;).

Kök hücreleri diğer tüm hücrelerden ayıran üç temel özellik vardır (Kelly 2007; NIH 2009a);

Kök hücrelerin yaşamları boyunca bölünme ve kendilerini yenilemesi: Kök hücrelerin erken dönemde bölünme ve kendini yenileme kapasiteleri çok yüksektir. Bu hücreler aynı bölünme potansiyelini kendinden sonra gelen hücrelere aktarırlar ve onların da bölünme kapasiteleri oldukça yüksektir. Geç dönemdeki hücreler de ise bölünme kapasitesi azalmaya başlar (Karasahin 2012).

Özelleşmemiş Hücre: Kök hücrelerin önemli özelliklerinden birisi özelleşmiş fonksiyonları yerine getirememeleri ve farklı doku hücrelerine özgü karaktere sahip olmamalarıdır (Kelly 2007; NIH 2009a). Kök hücreler özelleşmiş hücrelere ve dokulara dönüşmek üzere kaynak oluştururlar (Karasahin 2012).

Farklılaşabilme (Plastisite): Kök hücreler farklılaşarak birçok özelleşmiş hücreyi oluşturabilirler. Kök hücre farklılaşmasını içsel ve dışsal sinyaller tetiklemektedir. İçsel sinyaller hücrelerin genleri ile kontrol edilir. Dışsal sinyaller ise komşu hücrelerden salgılanan kimyasallar, komşu hücrelerle fiziksel temas ve mikro çevredeki büyüme faktörleridir (Kelly 2007; NIH 2009a).

Kök hücreler farklı tip hücelere dönüşebilme kapasitelerine ve kökenlerine göre sınıflandırılabilir(Kelly 2007; Can 2008; NIH 2009a).

2.1.1. Farklılaşma Kapasitelerine Göre Kök Hücreler

Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre beş grupta incelenir (Alison ve ark. 2002; Şahin ve ark. 2005; Majo ve ark. 2008).

2.1.1.1. Totipotent Kök Hücreler

Döllenmiş yumurta hücresi ya da zigot tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Vücuttaki tüm hücelere farklılaşma potansiyeline sahip bu ilk embriyonel hücreye “totipotent” hücre denir. Zigot evresinden sekiz hücreli blastomer yapısına kadar oluşan hücreler totipotent hücrelerdir ve sınırsız farklılaşma potansiyeline sahiptirler (Blau ve ark. 2001; Alison ve ark. 2002; Fortier 2005; Rimondini ve Mele 2009).

2.1.1.2. Pluripotent Kök Hücreler

Döllenmenin yaklaşık 5. gününden sonra meydana gelen hücreler “blastokist” adı verilen küresel bir hücre topluluğuna dönüşürler (Kolios ve Moodley 2013). Blastokistin dış yüzeyindeki hücreler plasenta ve göbek kordonunu oluştururken, iç yüzeyindeki hücreler endoderm, ektoderm ve mezodermden köken alan hücre çeşitlerine farklılaşabilirler (De Miguel ve ark. 2010). Sınırsız çoğalma ve vücuttaki farklılaşmış tüm hücre tiplerini oluşturabilme potansiyeline sahip bu hücelere “pluripotent” hücreler denir. İnsan EKH’leri blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilirler ve pluripotenttirler (Graves ve Moreadith 1993; Alison ve ark. 2002). Pluripotent kök hücreler rejeneratif tıp için çok önemlidir.

2.1.1.3. Multipotent Kök Hücreler

Embriyo gelişiminin ileri dönemlerinde özel görevlere sahip, tek bir germ tabakasından farklılaşmaya programlanmış ve kendini yenileyebilen erişkin tip kök hücelere multipotent kök hücre denilmektedir. Multipotent kök hücreler çoğu dokuda bulunur ve izole edildikleri dokunun özelliklerini koruyarak bir ya da daha fazla farklı hücre tipine farklılaşabilirler. Kemik iliği hücreleri ve MKH’ler multipotent kök hücelere en iyi örnektir (Moore ve ark. 1997; Alison ve ark. 2002; Verfaillie ve ark. 2002; Rao 2004) .

2.1.1.4. Oligopotent Kök Hücreler

Oligopotent kök hücreler, kendi kendini yenileyebilen ve özel bir doku veya organda, iki veya daha fazla hücreye farklılaşabilen kök hücrelerdir. Hematopoetik kök hücreler hem miyeloid hem de lenfoid hücrelere farklılaşabildiklerinden tipik bir oligopotent kök hücre örneğidir (Marone ve ark. 2002; Kolios ve Moodley 2013).

2.1.1.5. Unipotent Kök Hücreler

Yalnızca tek bir hücre tipine farklılaşabilen ve kendi kendini yenileyebilen hücreler unipotent kök hücre olarak adlandırılır. Kas kök hücreleri buna örnek olup sadece olgun kas hücrelerine farklılaşabilirler (Kolios ve Moodley 2013, Avcılar ve ark. 2017).

2.1.2. Kökenlerine Göre Kök Hücreler

Kök hücreler elde edildiği kaynağa göre embriyonik, embriyonik germ, erişkin, fetal, kordon kanı ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler olarak sınıflandırılabilir. (Maria ve ark. 2007, Özel ve ark. 2008).

2.1.2.1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler (EKH), anne karnında gelişmekte olan embriyonun 5.-6. günlerinde, iki katmanlı olarak oluşan blastokistin iç tabaka hücrelerinden elde edilen, kendi kendini yenileyebilen, farklılaşma göstermeyen ve pluripotent özellikteki hücrelerdir (Jiang ve ark. 2002; Panno 2005; NIH 2009b). Blastokistin trofoblast olarak bilinen dış hücre katmanını plasentayı ve amnion zarını oluştururken, iç hücre kitlesi ektoderm, endoderm ve mezoderm doku hücrelerini oluşturur (Avcılar ve ark. 2017).

EKH'lerin kendini yenileyebilme yeteneği çok fazladır ancak erişkin dokularda bulunan kök hücrelerin kendi kendini yenileyebilmeleri sınırlı olmakla birlikte, sadece dokuya özgü hücrelere farklılaşabilirler (Kolios ve Moodley 2013). EKH'ler embriyodan köken alır ve bütün dokuları oluşturma yeteneğine sahiptirler (Maria ve ark. 2007; Özel ve ark. 2008). Bu nedenle pluripotenttirler (Winkel ve Pedersen 1988).

EKH'ler ilk defa iki farklı araştırmacı grubu tarafından fare embriyolarından elde edilmiştir (Evans ve Kaufman 1981; Martin 1981). Kendini yenileyebilme ve pluripotent özelliğe sahip olan ilk insan EKH'si ise Thomson ve ark. tarafından 1998 yılında elde edilmiştir (Thomson ve ark. 1998).

Günümüzde EKH'ler; in vitro fertilizasyon ünitelerinde kullanılmayan embriyolardan, somatik nükleer transfer metodu ve döllenmemiş yumurta hücrelerinden partenogenez ile elde edilmektedirler (Tachibanave ve ark. 2013; Daughtry ve Mitalipov 2014). EKH'ler elde edildikten sonra büyüme faktörü içeren özel besi yerlerinde dondurularak saklanır. EKH'lerin kültür ortamları değiştirilir ya da bazı büyüme faktörleri eklenir veya çıkarılırsa farklılaşma meydana gelir ve genellikle üç germ tabakasını içeren yapılar oluştururlar (Vatansever 2009).

EKH'ler ile yapılan çalışmalarda blastokiste müdahale edilmesi gerektiği için insan kaynaklı çalışmalar yapılmasında etik problemler bulunmaktadır (Kutlay ve ark. 2009).

2.1.2.2. Embriyonik Germ Hücreler

Embriyonik germ hücreleri, 5-9 haftalık fetusteki primordial germ hücrelerinin izole edilip in vitro olarak çoğaltılmasıyla elde edilmektedir (Bongso ve Lee 2005). Erişkin kök hücreleri ile benzer özelliktedirler ancak teratom oluşturmazlar (Hui ve ark. 2011).

2.1.2.3. Erişkin Kök Hücreler

Erişkin kök hücreler, farklılaşmamış hücreler olup, genellikle içinde buldukları dokuya ait olan hücre tiplerini üretirler. Bu hücreler aynı zamanda kendilerini yenileyerek ait oldukları dokunun devamlılığını ve onarımını sağlarlar. Erişkin kök hücreleri en çok kemik iliği olmakla birlikte beyin, kordon kanı, kan, iskelet kası, deri, sindirim sistemi, diş, göz ve pankreasta saptanmıştır (Casagrande ve ark. 2006; Hui ve ark. 2011).

Yetişkin kök hücreler, embriyonik kök hücrelerle ilişkilendirilen etik tartışmalara tabi değildir. Hücrelerin genellikle alıcıdan izole edilmesi (otogreft) nedeniyle doku reddinin olmaması erişkin kök hücrelerinin avantajlarından (Hui ve ark. 2011).

Mezenkimal Kök Hücreler: İlk kez Fridenstein ve ark. 1976 yılında, fetal buzağı serumu kullanarak, kemik iliği kültüründe morfolojik yapıları fibroblastlara benzeyen, adezyon yeteneği gösteren hücre kolonilerinin kemik ve yağ hücrelerine farklılaşabildiklerini göstermiştir (Fridenstein ve ark. 1976). Bu hücrelerin daha sonra gerçekleştirilen çalışmalarla non-hematopoetik pluripotent kök hücreler olduğu

belirlenmiş ve mezenkimal kök hücre (MKH) olarak adlandırılmışlardır (Andrades ve ark. 2011).

MKH'ler kemik, kıkırdak, yağ dokusu, tendon ve kas gibi bağ dokusu hücrelerini oluşturur ve birçok kraniofasiyal yapının oluşumuna katılırlar. MKH'ler ayrıca kondrositler, osteoblastlar, miyoblastlar ve adipositler dahil olmak üzere birçok hücre tipine farklılaşabilirler (Mao ve Collins 2008). Bu hücreler elde edildikleri dokularda sayıca çok az oldukları için, kültür ortamında pasajlanarak sayıca çoğaltılmaktadır. Bu işlem esnasında MKH'lerin fenotipik, immunolojik ve biyolojik özelliklerinde birtakım değişiklikler olması bu hücrelerle çalışmanın dezavantajını oluşturmaktadır (Friedenstein ve ark. 1976).

MKH'ler polistiren yüzeye bağlanma, pasajlama işleminde kendiliğinden replikasyon, stromal karakterde yüzey antijenlerinin ekspresyonu ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşma gibi birçok önemli özelliğe sahiptir (Mao ve Collins 2008; Andrades ve ark. 2011).

MKH'ler tedaviye ihtiyaç duyan hastadan izole edilebilir ve immünojenik red endişesi olmadan kullanılabilir. MKH'lerin ayrıca allojenik olarak kullanıldığı ve büyük kemik defektlerini iyileştirdiği gösterilmiştir (Mao ve Collins 2008).

2.1.2.4. Fetal Kök Hücreler

Fetal kök hücreler, fetüste bulunan ilkel hücre tipleri olup pluripotent kök hücreler ve hematopoetik kök hücrelere farklılaşabilmektedir (Hui ve ark. 2011). Düşük veya çeşitli sebeplerden dolayı sonlandırılan gebeliklerden alınan fetusların kan, böbrek, karaciğer ve kemik iliği gibi dokularından elde edilen fetal kök hücreler; hematopoetik kök hücreden zengin, sınırsız sayıda bölünme ve yenilenme özelliğine sahip hücrelerdir (O'Donoghue ve Fisk 2004).

Pluripotent yapıda olan fetal kök hücreler karaciğer, kas, sinir gibi farklı hücre türlerine ve kromozom sayıları yarıya indirilerek yumurta veya sperm hücrelerine dönüştürülebilir (Campagnoli ve ark. 2001). Etik sorunlar nedeniyle çalışma alanları kısıtlanmıştır (Mudda ve Bajaj 2011).

2.1.2.5. Kordon Kanı Kök Hücreleri

Kordon kanı, hematopoetik kök hücrelerin nakledilmesi için bir kaynak olarak kabul edilmektedir (Gluckman ve ark. 1989). Hem intrauterin dönemde hem de doğumda hematopoetik kök hücreler fetal dolaşımında bulunur, fakat doğumdan birkaç saat sonra eritrosit, lökosit ve trombosit gibi tüm kan hücrelerinin öncüllerini sağlayan kemik iliğine göç ederler (Rogers ve Casper 2003). Fetal dolaşıma ek olarak hematopoetik kök hücreler plasenta ve göbek kordonu içinde bulunan kanda da bulunurlar. Kordon kanının doğum esnasında fetüsü ve anneyi etkilemeden alınabilmesi oldukça avantajlıdır (Mao ve Collins 2008).

Kordon kanı kök hücreleri; karaciğer hücrelerine, iskelet kasına, sinir dokusuna, pankreas hücrelerine, immün hücrelere ve MKH'lere farklılaşabilmektedir. İleride bir kan hastalığı durumunda kullanılabilmesi açısından, kordon kanının dondurularak saklanması günümüzde yaygınlaşmaya başlamıştır. (Mao ve Collins 2008).

Kordon kanı kök hücrelerinin en büyük dezavantajı, elde etmek için tek yolun doğum sırasında olmasıdır. Benzer şekilde, amniyotik kök hücreler sadece amniyon sıvısından elde edilebilir ve bu nedenle zaman kısıtlamasına tabidir (Mao ve Collins 2008).

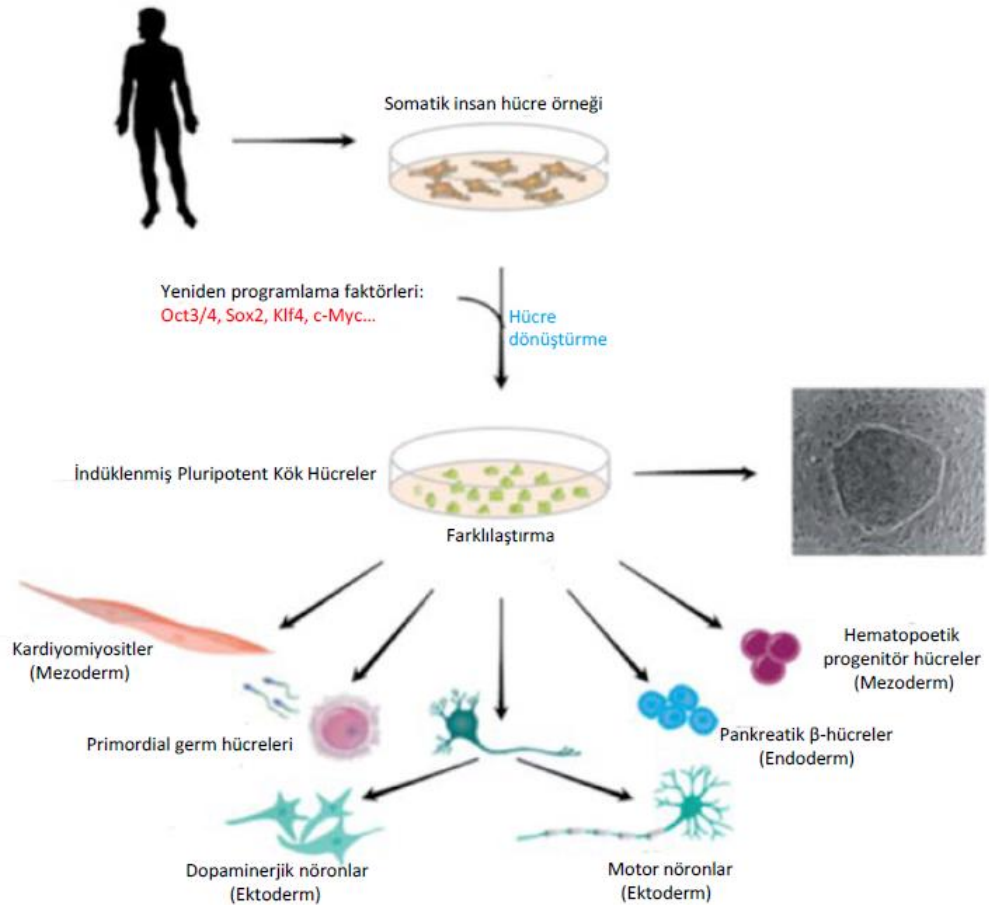
2.1.2.6. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler

İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (İPKH), ektopik ekspresyon için tanımlanmış transkripsiyon faktörleri kullanılarak (Oct3/4, Sox2, Klf4 ve c-Myc) embriyonik veya erişkin fibroblastların yeniden programlanmasıyla pluripotent özellik kazanmış somatik hücrelerdir (Takahashi ve Yamanaka 2006).

İlk olarak 2006 yılında Takahashi ve Yamanaka, sadece başka fibroblastlara farklılaşma yeteneğine sahip fare fibroblastlarından transkripsiyon faktörlerini kullanarak İPKH'leri ürettiler (Takahashi ve Yamanaka 2006). 2007 yılında ise Yamanaka ve ark. yetişkin insan dermal fibroblastları üzerinde çalışarak İPKH'ler ürettiler ve bu çalışmalarlarıyla 2012 yılında Nobel Tıp ve Fizyoloji Ödülünü kazandılar (Takahashi ve ark. 2007).

İnsan EKH'leri; blastokist aşamasındaki embriyoların iç hücre kitlesinden elde edilirler ve kendi kendilerini sınırsız yenileyebilme potansiyellerinin yanında hücre kültürlerinde uygun koşullarda üretildiklerinde vücuttaki bütün hücreleri oluşturabilme

yeteneğine sahiptirler (Keller 1995; Gardner ve Brook 1997; Thomson ve ark. 1998). EKH'lerin, bilimsel çalışmalar için gereken hücre tipinin üretilmesinde ve ağır hücre hasarların olduğu hastalıklarda tedavi amaçlı kullanılmaları oldukça önemlidir (Özel ve ark. 2008). EKH'lerin elde edilmesindeki etik sorunlar ve hücrelerin tedavi amacıyla kullanılmaları sırasında meydana gelebilecek immün yanıt nedeniyle bu alandaki çalışmalar olumsuz yönde etkilenmiştir (Condic ve Rao 2010). Bu nedenle blastokiste müdahale edilmeden elde edilebilen İPKH'ler, EKH'ler için tasarlanan bilimsel çalışmaların gerçekleştirilmesine yönelik yeni bir fırsat oluşturmuştur (Sevim ve Gürpınar 2012). İPKH'ler; EKH'lerin karakteristik özelliği olan kendini yenileme ve 3 farklı germ tabakasına farklılaşmayı sağlayan pluripotansiyalite özelliklerine sahiptir (Takahashi ve Yamanaka 2013).



Şekil 2 - 1: İPKH eldesi ve uygulamalarının şematizasyonu (Bayart ve Cohen-Haguenaer 2013)

Başarılı bir şekilde İPKH elde edilebilmesi; hücre kültür ortam şartları, kullanılan olgun hücre tipi ve karakteri (fibroblast, lenfosit gibi), gen aktarım metodunun tipi (viral, nonviral) ve kullanılan hücrenin bulunduğu farklılaşma basamağı gibi birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörlere göre İPKH elde süresi ve elde edilen İPKH oranı değişebilmektedir (Horii ve Hatada 2011).

a. İPKH Elde Etmede Kullanılan Kaynaklar

İPKH'lerin eldesinde somatik hücrenin yeniden programlanarak pluripotent özellikte bir hücreye dönüşmesi söz konusudur (Takahashi ve Yamanaka 2006; Wernig ve ark. 2007). Genellikle fibroblast kökenli hücrelerden seçilen hücreler somatik hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır (Takahashi ve ark. 2007).

İlk İPKH elde edilmesi Takahashi ve ark. tarafından fare embriyonik fibroblastları ve erişkin fare kuyruk fibroblastlarında transkripsiyon faktörleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Takahashi ve Yamanaka 2006). Araştırmacılar bugüne kadar insan, fare, domuz, tavşan, maymun gibi birçok farklı canlı hücrelerini transkripsiyon faktörleri ile yeniden programlayarak İPKH elde etmişlerdir (Sevim ve Gürpınar 2012).

Fare hücrelerinden İPKH üretilmesinde; dermal fibroblastlar, pankreas β hücreleri, dermal papilla hücreleri, kuyruk kökü fibroblastları, ince bağırsak epitelyum hücreleri, nöral kök hücreler, B lenfositler, kemik iliği kök hücreleri ve mononükleer hücreler kaynak olarak kullanılmıştır. İnsan çalışmalarında; amniyotik sıvıdan elde edilen hücreler, dermal fibroblastlar, hematopoetik oldukları saptanmış CD34+ kan hücreleri, embriyo kökenli fibroblastlar, mezenkimal kök hücreler, oral mukoza hücreleri ve yağ doku kök hücrelerinden İPKH'ler üretilmiştir (Sevim ve Gürpınar 2012).

b. İPKH'lerin Oluşturulmasında Seçilen Genler

İPKH elde edilmesi için seçilen hücrelerin yeniden programlanması amacıyla Takahashi ve Yamanaka tarafından yapılan çalışmada, öncelikle pluripotent özelliği sağlayan 24 adet gen tanımlanmış ve bunların içinden Oct 3/4, Sox2, c-Myc ve Klf4 genlerinin pluripotent özelliklerin sağlanmasında yeterli olduğu gösterilmiştir (Takahashi ve Yamanaka 2006). Yu ve ark. ise yaptıkları çalışmada Oct 3/4, Sox2, Nanog ve Lin28 genlerini İPKH eldesinde kullanmışlardır (Yu ve ark. 2007).

Oct 3/4; DNA'da ATTTGCAT oktomerini tanıma özelliği olan oktomer bağlanma transkripsiyon faktörüdür. İlk olarak döllenen yumurtada bulunan ve embriyonun iç hücre kitlesi hücrelerinin gelişimini sağlayan bir protein olarak tanımlanmıştır (Schöler ve ark. 1989). EKH'lerin gelişiminde düşük seviyede bulunduğu hücrelerin pluripotent özellikte kaldığı ve farklılaşma olmadığı; iki kat artış gösterdiğinde hücrelerin primitif endoderm ve mezoderm yönünde farklılaşmasına yol açtığı gözlemlenmiştir. Oct 3/4'ün baskılanması ise hücrelerin pluripotent özelliğini kaybedip tropoektoderm yönünde farklılaşmasına yol açmaktadır (Amabile ve Meissner 2009; Saigal ve Bhargava 2011).

Sox2; SRY (Sex Determining Region Y) geni ile ilişkili, DNA'da küçük oluğa bağlanan transkripsiyon faktörleri ailesindedir. EKH'lerin kendi kendini yenilemesi için gereklidir ve embriyoda erken dönemde, germ hücrelerinde ve epiblastta saptanır. Sox2 faktörünün baskılanması durumunda epiblast oluşumunda sorun olduğundan embriyolar zarar görür. Sox2'nin önemli görevlerinden birisi de Oct 3/4 faktörünün düzenlenmesidir. Yapılan araştırmalar, Sox2 ve Oct 3/4 faktörlerinin etkileşiminin kök hücrelerin pluripotent özelliğini etkilediğini göstermiştir (Rizzino 2009).

c-Myc onkogeni, hücre büyümenin düzenlenmesini sağlayan ve hücre metabolizma süreçlerinin birçok yönünü kontrol eden bir ana düzenleyicidir (Miller ve ark. 2012). c-Myc; tümörlerde yüksek aktivasyona sahip bir onkogendir. Histon asetilasyonunda rol aldığı için kromatin yapısının düzenlenmesinde etkilidir (Zeller ve ark. 2003). Ayrıca, hücre döngüsü, sinyal iletimi, apoptoz, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzenleme mekanizmaları ile kök hücre ve kanserin moleküler biyolojisinde önemli olan faktörlerdendir (Dang 1999; Köse ve Özdoğan 2010). EKH'lerde kendi kendini yenileme ve pluripotent özelliğin devamı için gerekli bir faktördür (Sevim ve Gürpınar 2012).

Krüppel benzeri faktör 4 (Klf4), hücre büyümesi, çoğalma ve farklılaşma gibi çeşitli hücre işlemleri düzenleyen çinko içeren bir transkripsiyon faktörüdür. 1996 yılında keşfedilmesinden bu yana Klf4, 2006'da İPKH'lerin uyarılması için gereken dört faktörden biri olarak gösterilmesi sonrası daha çok dikkat çekmektedir (Ghaleb ve Yang 2017). Klf4; deri, bağırsak ve böbrek gibi bir çok dokuda bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. Etkilediği bölgelerin durumuna göre transkripsiyonu aktive edebilir ya da baskılayabilir. Ayrıca yüksek seviyede bulunduğu hücre bölünmesini baskılar ve

hücrenin G1-S fazında kalmasına neden olur (Zhao ve ark. 2004). EKH'lerin kendi kendini yenileme özelliği için gerekli bir faktördür (Sevim ve Gürpınar 2012).

Nanog ve Lin-28; İPKH'lerin programlanmasında kullanılan diğer transkripsiyon faktörleridir. Nanog; EKH'lerde kök hücre olarak kalma özelliğini ve pluripotent özelliği etkileyen önemli bir faktördür. Yapılan çalışmalarda Nanog geni hasarlı EKH'lerin kendi kendini yenileme özelliğini kaybettiği görülmüştür (Chambers ve ark. 2003). Lin-28 erken embriyonik dönemde saptanan bir proteindir ve EKH'lerin işaretleyicisi olarak da kullanılmaktadır (Yu ve ark. 2007).

Bir hücrenin pluripotent özelliğe sahip olması için bütün bu transkripsiyon faktörleri yeterlidir (Takahashi ve Yamanaka 2006). Fibroblast gibi somatik bir hücrenin bu genleri ifade etmesi pluripotent hücre yönünde programlandığını göstermektedir.

c. İPKH'de Gen Aktarım Yöntemleri

İPKH elde etmek için gerçekleştirilen yeniden programlama işleminde genoma entegre olan ve olmayan gen aktarım yöntemleri uygulanabilmektedir. Bu uygulamalar kendi içinde virüslerin kullanılıp kullanılmamasına göre de iki farklı kısma ayrılmaktadır (Avcılar ve ark. 2017). Hücrelere gen aktarımı amacıyla adenovirüsler ve retrovirüsler gibi vektör sistemleri kullanılmaktadır (Takahashi ve Yamanaka 2006; Asgari ve ark. 2010). Virüsler kullanılarak yapılan gen aktarımında viral vektöre genetik materyale aktarılmak istenen gen bölgesi yerleştirilir ayrıca gen aktarımının doğruluğunu sağlayan özel bölgeler, antibiyotik direnç özelliği gibi, viral genetik materyale eklenir (Zhou ve ark. 2000).

- **Genoma Entegre Olan Gen Yöntemleri:** Retroviral ve lentiviral gen aktarım yönteminde, konak genomuna entegrasyon oluşması nedeniyle, in vitro çalışmalarda yüksek İPKH elde edilmiştir. Ancak, viral genomda meydana gelen mutasyonlar bu yöntemin kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle, in vivo çalışmalarda çeşitli hastalıkların hücre tabanlı tedavi yöntemleri araştırılacaksa genoma entegre olmayan (non-integratif) sistemler kullanılmalıdır. İlk İPKH çalışmasında moloney murin lösemi retrovirusu (MMLV) gen transferi için kullanılmıştır. MMLV sadece aktif bölünen hücreleri enfekte edebilmektedir. Lentiviral gen aktarımı ise daha yüksek oranda hücre enfekte edebilmektedir.

Lentivirüsler hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilir ve bu nedenle daha yüksek oranda İPKH eldesi sağlayabilir (Stadtfeld ve ark. 2008).

- **Genoma Entegre Olmayan (Non-integrating) Yöntemler:** Genoma entegre olmayan viral gen aktarım yöntemi olarak kullanılan virüsler Adenovirus ve Sendaivirus'tür (Stadtfeld ve ark. 2008, Fusaki ve ark. 2009). Adenovirus kullanarak yapılan çalışmalarda İPKH elde etme oranları diğer yöntemlere göre düşük bulunmuştur. Viral olmayan gen aktarım yöntemleri; elektroporasyon, RNA, protein ve küçük molekül ile gen aktarım metotlarıdır (Kim ve ark. 2009; Plews ve ark. 2010; Okita ve ark. 2011; Hou ve ark. 2013). Elektroporasyon yönteminde plasmidlere monte transkripsiyon faktörleri direkt hücreye aktarılır. Bu yöntem basit olması, kısa sürmesi ve viral partiküllerle çalışılmaması yönünden diğer yöntemlerden avantajlıdır (Okita ve ark. 2011). RNA aktarımı metodunda sentetik mRNA kullanılarak farklı insan somatik hücrelerinden İPKH elde edilmiştir. Bu yöntem ile İPKH elde etme oranları diğer yöntemlere göre hem yüksek hem de daha kısa sürelidir (Plews ve ark. 2010).

d. İPKH'lerin Osteojenik Farklılaşma Potansiyeli

İPKH'lerin in vitro olarak farklı hücre tiplerine farklılaşmasını sağlamak amacıyla, EKH'lerin farklılaşmasını sağlayan tekniklere dayanan, birçok protokol uygulanmıştır (Nelson ve ark. 2010; Iglesias-Garcia ve ark. 2013). Klinik uygulamadan önce İPKH'lerin farklı hücre soylarına farklılaşmasının yönlendirilmesinde rol oynayan faktörlerin anlaşılması da önemlidir. Çeşitli araştırmalarda İPKH'leri spesifik hücre soylarına yönlendiren yöntemlere odaklanılmış olunmasına rağmen, İPKH'leri özellikle osteojenik farklılaşmaya uyarmak için gerekli farklılaşma paternleri ve moleküler mekanizmaların tanımlanması üzerine çalışmalar devam etmektedir (Ardeshiryajimi ve Soleimani 2015; Wang ve ark. 2015).

EKH ve İPKH'lerin kemik hücrelerine farklılaşması, MKH'lerin osteojenik farklılaşması için kullanılan protokollerden uyarlanmıştır (Lavrentieva ve ark. 2013). Yaygın olarak kullanılan osteojenik ortamın temel bileşenleri; fetal bovine serumu, askorbik asit, b-gliserolfosfat ve deksametazon'dur (Kumaran ve ark. 2010, Hayashi ve ark. 2012). Ek bileşenler ise bazı kemik morfogenetik proteinlerini (BMP), kalsiyum düzenleyici hormon ve D3 vitamini içerir (zur Nieden ve ark. 2003; Quartro ve ark. 2012). Yapılan çalışmalar BMP'lerin kök hücrelerin çeşitli hücre soylarına

farklılaşmasında önemli rol oynadığını göstermiştir (Zachos ve ark. 2006; Rui ve ark. 2011; Song ve ark. 2011). BMP-2'nin, MKH'lerin spesifik şartlar altında osteojenik ve kondrojenik soylara doğru farklılaşmasının indüklenmesinde güçlü bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Rui ve ark. 2011). Ayrıca, önceki çalışmalarda BMP-2 ve 4'ün pluripotent kök hücrelerin osteoblast soyuna farklılaşmasına katıldığına dair kanıtlar da gösterilmiştir (Luu ve ark. 2007).

Kao ve ark.'ları, doğal bir polifenol antioksidan olan resveratrolün mineralleşmeyi arttırdığını ve osteojenik markırların düzenlenmesi ile hem İPKH'lerde hem de EKH'lerde osteojenik farklılaşmayı kolaylaştırdığını göstermiştir. İPKH kaynaklı osteosit benzeri hücrelerde, deksametazon kaynaklı apoptozun resveratrol ile etkili bir şekilde önlenmesi İPKH'lerin osteosit benzeri hücrelere farklılaşmasını kolaylaştırır. Resveratrol ayrıca İPKH kaynaklı osteosit benzeri hücreleri glukokortikoid kaynaklı oksidatif hasardan koruyabilir ve İPKH'lerin tümörjenitesi azaltabilir (Kao ve ark. 2010).

Transforme edici büyüme faktörü (TGF) ailesinin üyeleri in vivo olarak İPKH'lerin osteoblastlara farklılaşmasını ve kemik oluşumu potansiyelini artırmaktadır. Li ve ark., TGF-1 ve 3'ün retinoik asit ile birlikte kullanılmasının, İPKH'lerin in vitro olarak osteoblastlara doğru farklılaşabilmesinde daha etkili olduğunu göstermişlerdir (Li ve Niyibizi 2012).

Ana osteojenik transkripsiyon faktörü Runx-2'nin adenoviral transdüksiyonu fare İPKH'lerinin osteojenik farklılaşmasını arttırmaktadır. Tashiro ve ark.'larının çalışması, Runx-2 tarafından transdüksiyona tabi tutulmuş İPKH'lerin, transdüksiyon yapılmayan hücrelere kıyasla %50'den daha fazla alkalın fosfataz (ALP) aktivitesi sergilediği ve kalsiyum seviyesinin yaklaşık sekiz kat daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, İPKH'ler ve EKH'ler arasındaki osteojenik potansiyelin benzer olduğunu ve İPKH'leri içeren rejeneratif tıbbi tedavilerin geliştirilmesi için uygun olabileceğini göstermiştir.(Tashiro ve ark. 2009).

MikroRNA'lar (miRNA) osteojenik farklılaşmada gen ekspresyonunu kontrol etmek için kullanılmaktadır. Önceki çalışmalar, miRNA'ların kas, sinir, kıkırdak, adipoz ve eritrositler dahil olmak üzere çeşitli dokularda ve hücre tiplerinde hücre farklılaşmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir (Stefani ve Slack 2008). Okamoto ve ark.'ları kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasında miR-124a, miR-181a, miR-10a,

miR-10b, miR-9-3p ve miR-19b'yi içeren osteoblastla ilişkili 6 miRNA tanımladılar ve bu miRNA'ların fare İPKH'lerinin osteoblastik farklılaşmasının düzenlenmesindeki kritik rollerine dikkat çektiler (Okamoto ve ark. 2012).

e. İPKH'lerin Osteojenik Farklılaşması için Kullanılan Yapı İskeleleri

İPKH'ler kemik doku rejenenerasyonu için potansiyel bir tedavi aracı olarak kullanılmadan önce bazı sorunların çözülmesi gerekmektedir. İlk olarak, farklılaştırılmış fenotiplerin in vivo olarak kalıcılığı gösterilmelidir. Teoride, İPKH'ler spesifik bir substrat üzerinde kültürlendiğinde, ektopik mineralize doku nodüllerinin in vitro olarak görüldüğü osteoblast soyuna farklılaşabilen mezenkimal dokuları üretebilirler (Jin ve ark. 2013). Yüksek farklılaşma potansiyeline sahip İPKH'ler ile yapılan çalışmalarda karşılaşılan diğer zorluk, in vivo olarak nakledildikten sonra teratomalar oluşturmalarıdır (Yu ve ark. 2007). Kemik farklılaşmasını artırmak ve aynı zamanda teratomları önleme teknikleri geliştirmek oldukça önemlidir. İPKH'ler ile tedavinin diğer engelleri; hücre iletim sistemlerinin geliştirilmesi, optimizasyonu ve doku kültürünün iki boyutlu (2D) veya üç boyutlu (3D) yapı iskelelerine uygulanmasıdır (Jin ve ark. 2013). Ekstrasellüler matriks, hücrelerin yapısı ve biyolojik işlevi üzerinde kritik bir rol oynar ve biyolojik olarak uyumlu nanofibröz iskeleler doğal ekstrasellüler matriksi taklit etmelidir. Son zamanlarda, geçici ve yapay ekstrasellüler matriksi taklit eden doku iskeleleri hücre farklılaşmasını desteklemekte ve doku mühendisliğinde 3D doku oluşumunu yönlendirmektedir (Tashiro ve ark. 2009). Bu nedenle, doğal ekstrasellüler matriksin avantajlı özelliklerini taklit eden doku iskelesinin kullanılması yukarıda belirtilen engelleri büyük ölçüde çözenin etkili bir yolu olabilir. İnorganik malzemelerin, organik veya sentetik polimerler ve karıştırılmış malzemelerden (kompozit iskeleler) üretilen doku iskelelerinin, İPKH'lerin osteoblastlara farklılaşmasını engellediği ortaya çıkmıştır. Jin ve ark. in vitro olarak uygun osteojenik koşullar altında makrokanallı polikaprolakton (PCL) biyopolimer 3D iskelesinde kültürlenmiş insan İPKH'lerinin yüksek osteojenik potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Jin ve ark. 2013). Son çalışmalarda, İPKH'lerin osteoblasta daha belirgin farklılaşma potansiyeline sahip olduğu ve polietersülfon (PES) nanofiber iskele veya jelatin iskele üzerinde kültürlendiğinde MKH'lerde karşılaşılan problemlere sahip olmadığı gösterilmiştir. Böylece nano yapı iskelelerle beraber kullanılan İPKH'lerin, EKH'ye alternatif bir yöntem olabileceği ve kemik rejenerasyonu için faydalı

olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, İPKH türevi osteoblastlar, in vitro ve in vivo olarak iskele üzerine ekildiğinde kemik spesifik genleri ve osteojenik matriks ekspresyonlarında artış görülmüştür (Chen ve ark. 2007). Yüksek verimli osteojenik farklılaşma için, nanometre boyutlarındaki iskeleler, İPKH'lerden osteoblast oluşumunu artıracak şekilde imal edilebilir. Doğayı taklit etmek zor olsa da, son bilimsel ve teknolojik bulgular, lokal ve sistemik biyolojik fonksiyonları uyaracak kemik yapı iskelelerini elde etme potansiyelinin olduğunu göstermektedir. Uygun iskele malzemelerinin seçimi, geometrileri, gözenek ebadı ve ebat dağılımları ve biyomoleküllerin istenen oranda salınması gelecekteki kemik iskele gelişiminde kritik rol oynayacaktır (Lou 2015).

Elektrospınleme (elektro üretim) yöntemi; nano ölçekli elementlerle iskele üretmenin hızlı ve kolay bir yolunu sunar ve doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır (Holzworth ve Ma 2011). Elektrospınleme; doku mühendisinin, malzemeleri her özel uygulama ve hücre ortamına özel olarak uyarlamasını sağlar. D'Angelo ve ark.'ları elektrospınleme yöntemi ile poli L-laktik asit hidroksiapatit nanokompozit iskeleler üreterek, İPKH'lerin in vitro olarak mezenkimal ve osteoblast hücrelerine farklılaştırılmasını gerçekleştirmiş ve hem in vitro hem de in vivo olarak osteoblast fenotipinin, proliferasyonunun ve osteojenik matriks üretiminin stabilitesini göstermişlerdir. Stabil osteoblast fenotipinin İPKH kaynaklı osteoblastlar tarafından in vivo olarak sürdürülmesi ve bu hücrelerin kemik defektlerinin tedavisinde kullanılması için EKH ve MKH'ler ile kombinasyonunun uygulandığı ileri çalışmalar gerekmektedir (D'Angelo ve ark. 2012).

f. İPKH'lerin Kullanım Alanları

İPKH ile ilgili ilk çalışmalar; hasarlı dokunun, yeniden programlanan hücrelerin transplantasyonu sonrasında istenilen hücre tipine dönüşerek tamir edilebilmesi amacıyla gerçekleştirilmektedir. Hastadan elde edilecek İPKH'lerin rejeneratif tıp alanında kullanımı konak hücre genomuna entegrasyon riski taşıyan lentiviral ve retroviral vektörlerin kullanımına dayanan yeniden programlama tekniklerinden dolayı hayvan çalışmaları dışında mümkün olmamıştır (İskender ve Canatan 2013).

İPKH'lerin hücre replasman tedavisi için in vivo potansiyeli birçok hayvan modelinde saptanmıştır (Lou 2015). Kobayashi ve ark.'ları sıçan İPKH'lerinin, pankreas gelişimi için gerekli olan temel bir gende eksik olan fare blastokistlerine

enjekte etmiş ve sıçan pankreasının üretilmesini sağlamıştır (Kobayashi ve ark. 2010). Nelson ve ark.'ları farklılaşmamış İPKH'leri iskemik bir kemirgen kalbine nakletmiş ve kalp-damar hücrelerine farklılaştığını saptamışlardır (Nelson ve ark. 2009).

İPKH'lerin kemik benzeri mineralize doku oluşumuna dair yapılan çalışmalar da son yıllarda hız kazanmıştır. Kemik eksikliği bulunan hayvan modellerinde biyomühendislerin geliştirdiği 3D iskeleler içindeki kök hücre popülasyonlarının transplantasyonunun, kemik rejenerasyonunun daha iyi gelişmesine yol açtığı saptanmıştır (Lou 2015).

Fareler üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda özellikle İPKH türevli kemik dokusu kullanımından elde edilen fonksiyonel yararları önem verilmiştir. Yapılan bir çalışmada İPKH'lerin immün yetmezliği bulunan farelere nakledildiğinde hücrelerin canlılığını devam ettirdiği ve konak kemik dokularına benzeyen kemik oluşumu gerçekleştiği saptanmıştır (Lou 2015).

İPKH'lerin kök hücre tedavisinde kullanımı için henüz erken olsa da; kişiye özel ilaç tasarımı ve tedavi yönteminin geliştirilmesi için uygun hastalık modelleri oluşturulmasında kullanılmaları yaygındır. Bu amaçla İPKH'ler kullanılarak Alzheimer, Down Sendromu, β -talasemi, Huntington ve Parkinson gibi birçok hastalığın modelleri oluşturulmuş ve böylelikle hastalık etiyolojisinin in vitro takibi ve kullanılacak ilaç etkisinin tedavi öncesinde gösterilmesi sağlanmıştır (İskender ve Canatan 2013).

2.2. Kemik Dokusu

Kemik dokusu; kalsiyum ve fosfat tuzları ile mineralize olmuş, sıralı ve aynı doğrultuda kollajen matriksten oluşan özelleşmiş bir bağ dokusudur (Garg 2004; Neovius ve Engstrand 2010).

Kemik dokusunun yapısal destek ve kalsiyum depolanması olmak üzere iki ana görevi vardır. Kranyum ve toraks boşluklarındaki hayati organları korur. Yetişkin bir iskelet sistemi osteoblastlar ve osteoklastlar tarafından sürekli koordine edilen kemik yapımı ve yıkımı ile dinamik bir yapıdır. Kemik iliği sayesinde kan hücrelerini üreterek dolaşım ve bağışıklık sistemi için önem taşır. Kalsiyum depolama görevi ile de endokrin sistem içerisinde önemli bir rolü bulunmaktadır (Garg 2004; Neovius ve Engstrand 2010).

Kemik dokusu matriks adı verilen kalsifiye olmuş hücreler arası madde ile kemik hücrelerinden oluşur. Kemik dokusunun yaklaşık olarak %65'i inorganik yapı, %30'u organik matriks, %5'i ise su ve hücrelerden oluşmaktadır (Soydan 1985).

Kemiğin kuru ağırlığının %65'ini oluşturan inorganik komponentinde kalsiyum fosfat (%85), kalsiyum karbonat (%10) ve az miktarda fosfor, bikarbonat, sodyum, sitrat, potasyum ve magnezyum yer alır. Kalsiyum ve fosfor birleşerek hidroksiapatit kristallerini oluşturur (Soydan 1985).

Organik matriksini ise %80-90 oranında Tip I kollajen, kalan kısmını proteoglikan, proteinler, büyüme faktörleri ve sitokinler oluşturur. Kemik dokusunda bol miktarda hücreler arası matriks içine gömülü mezenkimal hücreler bulunur (Gartner 2001; Ashammakhi 2003; Roberts ve Hartsfield 2004).

Kemik dokusu; osteoprogenitör hücre, hücre matriksinin lakuna adı verilen kavitelerinde yerleşmiş olan osteositler, matriksin organik kısımlarını sentezleyen osteoblastlar ve kemik rezorpsiyonu ve remodellingi sağlayan çok hücreli osteoklastlar olmak üzere dört çeşit hücreye sahiptir (Ross ve Pawlina 2003; Junqueira ve Carneiro 2006).

Tablo 2 - 1: Kemik doku hücreleri

Hücre tipi	Özelliği	Kollajen tipi	Konumu
Osteoprogenitor Hücre	<ul style="list-style-type: none"> • Yassı şekilli, soluk boyanan nükleus • Mitozla olgun kemik hücrelerine farklılaşmaktadırlar. 		Periosteumun iç katında ve havers kanalları gibi bölgelerde bulunurlar.
Osteoblast	<ul style="list-style-type: none"> • Kübik veya piramidal şekilli, osteosentezde etkili, koyu bazofilik ve granüllü sitoplazma 	Tip-1 kollajenlerdir. Bu kollajen lifleri belirli aralıklarla yerleşmişlerdir. Bu aralıklarda hidroksiapatit kristalleri çökmüştür.	Sert ve yoğun matriks, yapıya kalsiyum çökmüştür. Gelişmiş kanal sistemi (Havers, Volkmann), hücre metabolizması bu kanal sistemi ile gerçekleşir
Osteosit	<ul style="list-style-type: none"> • Oval şekilli, lipid, glikojen ve pigment içerir. • Mitoz yapamazlar. 		Lakünalar içinde yerleşmişlerdir.
Osteoklast	<ul style="list-style-type: none"> • Çok sayıda nükleus içerirler, sitoplazmada bol lizozom bulunur. • Yıkım için kullanılan Kollagenaz ve proteolitik enzimleri salgırlar. 		Kemikte howship lakünası adı verilen boşluklarda yerleşirler

Bütün kemikler iç yüzeylerde endosteum ve dış yüzeylerde de periosteum adı verilen osteojenik hücrelere sahip zarlar ile örtülüdür (Junqueira ve Carneiro 2006).

2.2.1. Kemik Dokusu Tipleri

2.2.1.1. Primer Kemik

Primer kemik, (olgunlaşmamış kemik-woven kemik) fetal gelişim veya kemik iyileşmesi esnasında oluşan, çoğunlukla geçici olan bir kemik yapısıdır. Kafa tasındaki kemiklerin süturlarında, diş soketlerinde ve bazı tendonların bağlanma bölgelerinde daimi olarak bulunur. Vücudun diğer bölgelerinde yaşam boyunca sekonder kemikle yer değiştirir. Bu devamlı döngüye remodeling denir. Kollajen lifleri primer kemikte düzensiz bir yapıda bulunmaktadır. Primer kemiğin mineral içeriği sekonder kemiğe oranla daha az, içerdiği osteosit oranı daha yüksektir ve doku içinde düzensiz şekilde dağılmışlardır (Gartner 2001; Junqueira ve Carneiro 2007). 30-60 mm/gün'lük oluşma hızı ile iyileşme sırasında büyük önem taşımaktadır. Organize olmayan bir yapı olduğundan mekanik olarak güçsüzdür (Garg 2004).

2.2.1.2. Sekonder Kemik

Sekonder kemik, (lameller-olgunlaşmış kemik) genellikle yetişkinlerde bulunan, matriksi primer kemiğe göre daha kalsifiye olan bir kemik türüdür. Havers kanalları çevresinde paralel veya eş merkezli yerleşmiş 3-7 µm kalınlığındaki lamellerden oluşmaktadır (Gartner 2001; Junqueira ve Carneiro 2007).

Kan damarlarını, sinirleri ve gevşek bağ dokusunu içeren bir kanal etrafını saran, dairesel lamellerin meydana getirdiği bütünlüğe havers sistemi veya osteon denir. Osteositleri içeren lakunalar, lameller arasında ve nadiren de içinde bulunurlar. Her havers sisteminin etrafı birkaç kollojen lif ve mineralize amorf matriksten oluşan yapıştırıcı madde ile çevrelenir. Kompakt kemik lamelleri; Havers sistemi, dış dairesel lameller, iç dairesel lamelcikler ve ara lamellerden oluşmaktadır. Havers sistemi diyafizinin uzun eksenine paraleldir ve sistemin ortasında merkez kanal bulunur. Bu merkezi kanalın etrafı 4-20 arasında dairesel lamelcik ile sarılıdır. Havers kanalları kemik iliği boşluğu ve Volkman kanalları ile bağlantılıdır. Volkman kanalları Havers kanallarını birbirine bağlamaktadır. Volkman kanalları Havers kanallarında olduğu gibi dairesel lameller içermezler (Ross ve Pawlina 2003; Junqueira ve Carneiro 2007).

Sekonder kemik, iyi organize olmuş kollajen yapısı ve mineralizasyonu ile kuvvete karşı koyabilen çok güçlü bir kemik yapısıdır. Büyüme hızı 0.6-1 mm/gün ile primer kemiğe göre çok daha yavaştır (Garg 2004; Cibickova ve ark. 2007). Sekonder kemik, morfolojik olarak toplam iskeletin %20'si olan kortikal (kompakt, sıkı) ve %80'i

olan kanselöz (spongiyöz, süngerimsi) kemik olmak üzere iki şekilde bulunur (Tuncay 2013).

2.2.2. Kemik Dokusu Oluşumu (Osteogenezis)

Kemik dokusu oluşumu, intramembranöz kemikleşme ve endokondral kemikleşme olmak üzere ikiye ayrılır (Soydan 1985).

2.2.2.1. İnamembranöz Kemikleşme

İnamembranöz kemikleşme osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan doğruya mineralizasyonu ile meydana gelir (Soydan 1985).

Mezenkim hücreleri, bağ dokusunun içindeki damarlar etrafında toplanıp çoğalır ve hücreler arası madde ve lif sentezini de yaparak osteoblast ve osteositlere dönüşürler. Bu bölgelere primer kemikleşme merkezi adı verilir. Osteoblastlar osteoid madde sentezi yaparlar ve bu osteoid madde mineralize olarak osteoblastları lakünler içine hapseder. Lakünler içindeki osteoblastlar osteositlere dönüşürler. Kemikleşme merkezinin yüzeyinde bulunan osteoblastlar mitozla çoğalmaya devam eder ve kemik oluşumu artar. Bu oluşan kemik doğrusal yayılım gösterir ve komşu kemikleşme merkezleri ile birleşir. Kollajen liflerin düzensiz olduğu bu kemik dokusu, osteoklastların rezorpsiyonu ve osteoblastların kemik oluşturmasıyla kanselöz-kompakt kemiğe dönüşür. Gelişmekte olan kemik dokusu içinde kalan mezenkim dokusu kemik iliğini ve kalsifiye olmayan mezenkimal hücreler periost ve endosteumu meydana getirir. İnamembranöz kemikleşme kısa kemiklerde büyüme, uzun kemiklerde kalınlaşmada rol oynar (Soydan 1985; Jee 2001; Junqueira ve Carneiro 2007; Eroschenko 2008).

2.2.2.2. Endokondral Kemikleşme

Endokondral kemikleşmede ilk olarak kıkırdak dokusu meydana gelir ve sonra kemik dokusu ile yer değiştirir (Kume ve ark. 2012).

Endokondral kemikleşmede önce hyalin kıkırdak yapıda bir taslak oluşur, ardından apozisyonel büyüme ile uzunca bir şekil alır, perikondriumla sarılı epifiz ve diyafiz oluşur. Bu kıkırdak taslağın içindeki kondrositler büyür ve sitoplazmalarında glikojen depolayarak vakuolize hale gelirler. Etraflarındaki kıkırdağı rezorbe ederek trabeküllü bir kıkırdak matriks meydana gelir. Bu kıkırdak matriksin kalsifiye olmasıyla taslağın üzerinde yeni kemik oluşumu başlar. Kıkırdak taslakta ilkel mezenkim dokusu

ve kan damarları çoğalır. Mezenkim dokusu daha sonra osteoblastlara ve kemik iliği hücrelerine farklılaşır. İlk kırıldak taslağın ucu orta kısımdan primer kemikleşme merkezi olarak adlandırılan geniş bir alanla ayrılır. Her iki uçtan kırıldak yapı büyümeye devam eder. Uzun bir diyafiz ve her iki ucunda kırıldak dokudan oluşan yarım ay şeklinde epifizler meydana gelir. Büyüme ve gelişimin tamamlanmasıyla hormonlar daha çok kırıldak oluşumunu engelleyerek büyüme plaklarının kemikleşmesini ve diyafizler ile epifizlerin birleşmesini sağlar (Soydan 1985; Young 2000; Jee 2001; Junqueira ve Carneiro 2007; Eroschenko 2008).

2.2.3. Kemik İyileşmesi

Hücre büyüme ve yenilenmesi yani rejenerasyon yara iyileşmesinin temelini oluşturur. Yaralanan bir doku iyileşirken orjinal dokuya yapı ve işlev olarak benzemeyen bir doku oluşur. Rejenerasyon ise doku ve fonksiyonun tamamen yenilenmesini ifade eder. Rejenerasyon, hasarlı dokunun kendini oluşturan hücre tipiyle aynı tip parankimal hücrelerce yenilenmesidir (Sfeir ve ark. 2005; William ve ark. 2008).

Yumuşak doku iyileşmesinde görülen skar dokusu oluşumu kemik defekti iyileşmesinde gözlenmez. İyileşme genel olarak travmadan 6-8 hafta sonra tamamlanır ve kemik doğal anatomisine ve fonksiyonuna döner (Sfeir ve ark. 2005; William ve ark. 2008).

Kemik dokuda oluşan hasarlar primer ve sekonder olarak iki şekilde iyileşir. Primer iyileşme; kemikte meydana gelen defekt segmentlerinin tam teması ile mekanik stabilizasyonun sağlandığı durumda oluşur. İntramembranöz şekillenme ile kortikal tabakalar yeniden şekillenir. Sekonder iyileşme, meydana gelen defekt segmentleri arasında 150-200 µm den çok boşluk olduğu durumlarda görülür. Diş çekimi, kist, tümör gibi oluşumların eksizyonu sonrası görülen iyileşme sekonder kemik iyileşmesidir. Farklı özelliklerdeki hücre toplulukları çoğalır, farklılaşır ve bir hücre matriksi oluşturur. Bu süreç inflamatuvar, reparatif ve yeniden şekillenme olarak adlandırılan 3 fazda gerçekleşir (Sfeir ve ark. 2005; William ve ark. 2008).

2.2.3.1. İnflamatuvar Faz

Kemikte karşılaşılan travma sonucu periost ve kan damarlarının zarar görmesiyle iltihabi reaksiyonlar başlar. Kemik defekti ilk oluştuğunda ilgili bölgede kanlanma azalır ve defekt alanında hipoksi ve hücre ölüm meydana gelir. Periostta ve kemik iliğinde oluşan hücre ölümleri ortamda nekrotik artık birikmesine yol açar. Oluşan iltihapsal yanıt sonucu dokudaki mast hücreleri histamin salgılar ve çevresel damarlarda vazodilatasyon gerçekleşerek eksuda birikir. Ani bir ödemle bölgeye hücre göçü olur. Bu süre 1-7 gün kadar sürer (Sfeir ve ark. 2005; William ve ark. 2008).

Defekt alanında vasküler endotelial hasar sonucu oluşan platelet degranülasyonu büyüme faktörleri salınımına ve kemotaktik sinyal tetiklenmesine yol açar. Polimorf çekirdekli lökositler, monositler, doku makrofajları ve lenfositler anjiogenezisi stimule edici sitokinlerin salınımı için aktif olarak defekt sahasına hücum eder. Erken dönemde defekt sahası karakteristik olarak polimorf çekirdekli lökositlerin ve doku makrofajlarının aktivitesi için optimal olan asidik ve hipoksik bir alandır (Sfeir ve ark. 2005).

Nötrofiller ve makrofajlar yara bölgesine göç ederek bölgeyi temizler. Ayrıca makrofajlar ortama birçok büyüme hormonu ve sitokin salar. Bu maddeler mezenkimal hücrelerin migrasyon, proliferasyon ve farklılaşmasını sağlar. Debris uzaklaştırılması ve yara temizlenmesi sonrası nötrofiller hücre ölümüne uğrar. Makrofajlar ise bu nekrotik dokuları ortamdaki uzaklaştırır ve sonra yara alanında azalmaya başlarlar (Sfeir ve ark. 2005).

Damar dışına çıkan kan pıhtılaşarak periost ile defekt sahası arasında hematoma oluşturur. Bu hematoma kemik iyileşmesinde hücresel olayların başlaması için sinyal verici moleküllere kaynak sağlar ve fiziksel bir matriks gibi davranarak fibrin ağına dönüşür (Sfeir ve ark. 2005). Bu fibrin ağ değişik hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmasını tetiklemektedir. Kan pıhtısı iyileşmenin bu aşamasında çok kritiktir (William ve ark. 2008).

İnflamatuvar yanıt ve hematoma hücresel çoğalmanın başlangıcıdır. 8-12 saat içinde periostta DNA sentezi ve hücre çoğalması başlar. Bu sırada oluşan hücrelerin kondrojenik potansiyeli olan hücrelere, fibroblastlara ve osteoblastlara farklılaşma yetenekleri vardır. Kapiller oluşum ve kollajen salgılanması sonucu kapiller ağ granülasyon dokusu oluşur (Simmons 1980; Schenk 1986).

2.2.3.2. Reparatif Faz (Tamir Fazı)

Osteoklastlar nekrotik dokuları uzaklaştırırken hasar bölgesine ulaşan fibroblastlar tamir dönemini başlatır. Bu dönemde osteoprogenitor hücreler hücre proliferasyonunu başlatırlar. Kondroblastlar ve osteoblastlar hasar bölgesinde çoğalır ve kırıkta doku ve kemik doku oluşumunu sağlarlar. Osteoblastlar osteositlere dönüşür ve lakunalar içine yerleşir. İntramembranöz kemik büyümesi periostal olarak örgü kemik yapımı ile başlar. Bu örgü kemik içine yeni damar oluşumu gerçekleşir. Hasarlı bölgedeki mezenkimal hücreler ilk önce fibroblast ve kondroblastlara dönüşür ve granülasyon dokusu oluşumunu sağlarlar. Bu granülasyon dokusu endokondral kemikleşme ile woven (örgülü) kemiğe dönüşür. Bu ilk oluşan kemiktir (Ito ve Perren 2017)

2.2.3.3. Remodelasyon Fazı

Kemik iyileşmesinin son ve en uzun süren fazıdır. Örgü kemik lameller kemiğe dönüşür ve fazla kallus rezorbe olur. Örgü kemikte yeni oluşan kılcacık damarlar parmaklı yapılar şeklinde görülür. Örgü kemik trabekülü kılcacık damarları çevreler. Yeni örgü kemik yapılmasıyla trabekül kalınlaşır ve primer osteonlar oluşur. Depozisyonla beraber örgü kemik yüke dirençli bir hal alır. Bu yeni yapı paralel lifli kemik olarak adlandırılır (Sfeir ve ark. 2005).

Yeniden şekillenme sürecinde primer osteonlar sekonder osteonlara dönüşür. Örgü kemik belli bir seviyede rezorbe olur. Bu rezorpsiyon seviyesi geri dönüşüm çizgisi olarak adlandırılır. Bu seviye ayrıca sekonder osteonların yapıldığı ve yeni kemiğin oluşmaya başladığı andır (Schenk 1986; Ozaki ve ark. 2000; William ve ark. 2008)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma; İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 05.05.2015 tarihli ve 2015/57 sayılı karar ile onaylandı. Çalışmada kullanılan İPKH'ler ticari olarak elde edildi ve hücre kültürü deneyleri Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü laboratuvarlarında yürütüldü. Çalışmanın cerrahi operasyonları İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde gerçekleştirildi. Kesitlerin histolojik incelemesi Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı.

3.1. Gereç

- 28 adet Sprague Dawley türü, 250±20 gr ağırlığında ve 10-12 haftalık erkek sıçan
- İnsan indüklenmiş pluripotent kök hücreleri (BYS0112)-American Type Culture Collection (ATCC)
- Hücre Matriksi Temel Membran Jeli (ATCC®- ACS3035)- (ATCC)
- Pluripotent Kök Hücre Besiyeri (Pluripotent Stem Cell SFM XF/FF, ATCC® ACS-3002™)- (ATCC)
- Laminar hava akımlı hücre kültür kabini (Telstar, Bio-II-A, İspanya)
- CO₂ inkübatörü (Forma Series II 3110 Water Jacketed CO₂ Incubator, Thermo Scientific ABD)
- Işık mikroskobu (Leica DM 4000B, Wetzlar, Germany)
- CCD dijital kamera (Optronics Microfire 1600x1200P, Goleta, CA, USA)
- Görüntü kartı (ATI FireGL Advance Micro Device, Camberly, UK)
- Bilgisayar kontrollü motorize düzenek (Bioprecision, Howtrone, NY, USA)
- Mikrokatör (Heidenhein, Traunreut, Germany)
- DMEM- Dulbecco'nun modifiye eagle medyumu
- FTS (fosfat tamponlu salin)
- Sodyum sitrat dihidrat (Molekula)

- Parafin (PatoLab)
- Pato-Cassette Doku Takip Kaseti (PatoLab)
- Polilizin Lam (Menzel)
- Lamel 24x60 (PatoLab)
- Light green S.F. Yellowish (Sigma)
- Lityum karbonat (Atom Scientific)
- DPX Mounting Medium/ Entellan (Atom Scientific)
- Formik asit (Sigma)
- Trisodyum sitrat (Merck)
- Absolute alkol (Merck)
- Etil alkol
- Fuksin asit (Merck)
- Formaldehit (Merck)
- Xylene (Sigma)
- Asetik asit (Merck)
- EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit)
- Ketamin hidroklorür(Ketalar, Parke Davis)
- Xylazin HCL(Rompun, Bayer)
- Mikrotom bıçağı (PatoLab)
- %10 Povidon İyodür
- Steril cerrahi set
- Piyasemen
- Trefan frez
- Steril örtü

- Traş bıçağı
- Bistüri
- Serum fizyolojik
- Steril pipet seti
- Steril hücre kültür kabı
- Hücre kültür flaskı
- Santrifüj tüpü
- Dikiş ipi

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak olan insan İPKH'leri ticari olarak ATCC firmasından temin edildi. Bu kök hücreler; beyaz ırka mensup, sağlıklı, erkek donörlerin kemik iliğinden elde edildi ve -80 °C muhafaza edilerek tarafımıza ulaştırıldı.

Donmuş halde elde edilen hücreler kuru buz ambalajından çıkartılarak 37 °C su banyosunda çözüldü. En yüksek düzeyde canlılığı sağlamak amacıyla flakon çözüldükten hemen sonra hücre kültürü çalışmalarına başlandı. Bütün in vitro çalışmalar, laminar hava akımlı hücre kültür kabininde (Telstar, Bio-II-A, İspanya) sterilizasyon şartlarına uyularak yürütüldü. 5ml'lik pipetler kullanılarak hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. İPKH için Pluripotent Kök Hücre Besiyeri (Pluripotent Stem Cell SFM XF/FF, ATCC® ACS-3002™) seçildi ve hücre süspansiyonu üstüne 5 ml hücre mediumu eklendi. 5 dk boyunca 2000 rpm de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Hücre süspansiyonu hücre kültür kaplarına alınarak sıcaklığı 37 °C, iç ortamı %5 CO₂, %95 nem olan inkübatör ortamında bekletildi. Hücre kültürü mediumu pasajlama işlemine kadar her gün değiştirildi.

Pasajlama işleminden 1 saat önce hücre kültür kapları Hücre Matriksi Temel Membran Jeli (ATCC®- ACS3035) ile kaplandı. 25 cm² lik hücre kültür kapları Ca⁺²-Mg⁺² içermeyen FTS (fosfat tamponlu salin- phosphate buffered saline) ile yıkandı ve EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit) içeren FTS solüsyonunda bekletildi. Hücre

kolonilerinin flasktan ayrılması sonrasında süspansiyon alınarak bir flakonda toplandı ve 5 dk boyunca 2000 rpm de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan solüsyon döküldü, altta kalan hücre çökeltisi 2 ml taze Pluripotent Kök Hücre Besiyeri ile çözüldü. Çözülme işlemi sırasında hücreler yavaşça pipetlenerek kolonilerin bütünlüğünün bozulmaması ve hücrelerin tek tek ayrılmaması sağlandı. Daha sonra 2 ml hücre süspansiyonu 25 cm²'lik flasklara alındı ve üzerine 2 ml hücre kültür mediyumu eklenerek inkübatöre yerleştirildi.

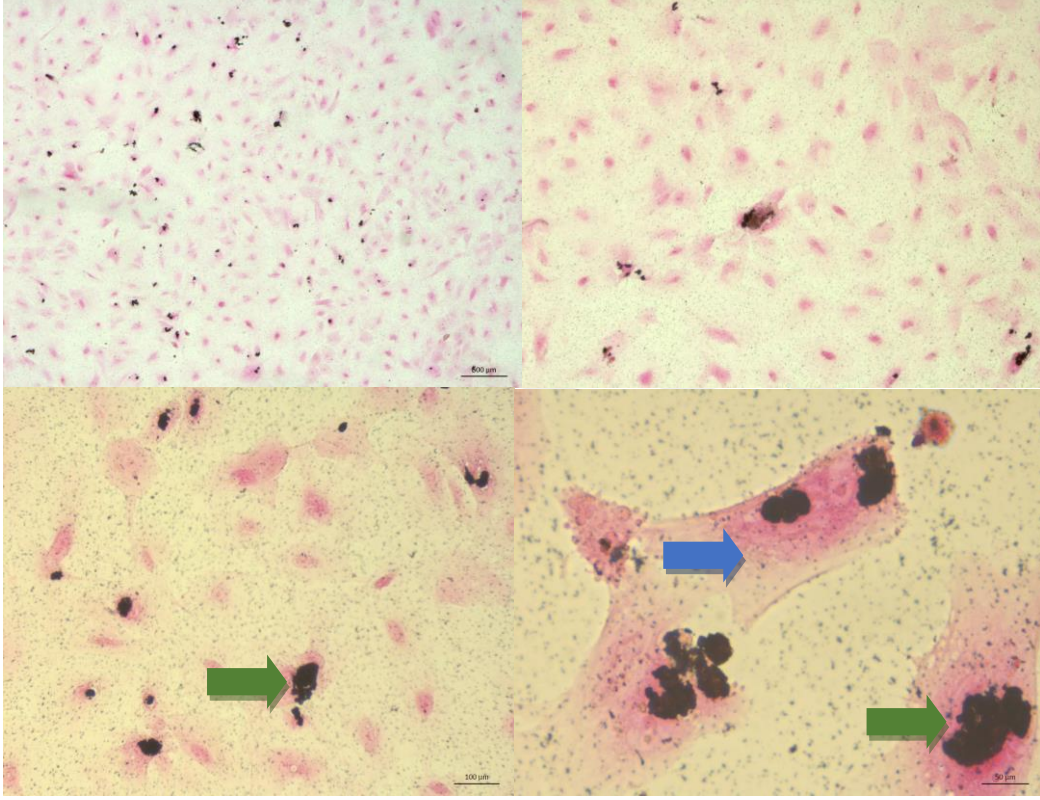


Şekil 3- 1: İPKH'lerin hazırlanması

Deneylerde 3. pasaj hücreleri MKH'lere ve osteojenik olarak farklılaştırılarak kullanıldı. MKH'lere farklılaştırmak için İPKH'ler pasajlanırken flakona toplanıp santrifüj edildikten sonra mezenkimal kök hücre besiyeri (%10 Fetal Bovin Serum ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren yüksek glukozlu DMEM- Dulbecco'nun modifiye eagle mediyumu) ile çözüldü ve pipetlenerek kolonilerin dağılarak hücrelerin tek tek ayrılması sağlandı. Hücreler matrix ile kaplanmış 175 cm² yüzey alanına sahip hücre kültürü kaplarına alınarak çoğaltıldı. Hücrelerin besiyeri haftada 2 kez mezenkimal kök hücre besiyeri ile değiştirildi ve hücreler kabın tabanını kapladığında pasajlandı.

Osteojenik farklılaştırma için ise İPKH'ler pasajlanırken flakona toplanıp santrifüj edildikten sonra osteojenik farklılaşma besiyeri (%10 Fetal Bovin Serum, %1 Penisilin ve Streptomisin, 50 µm askorbik asit, 100 nm dekzametazon and 10 mm β-gliserofosfat içeren düşük glukozlu DMEM) ile çözüldü ve pipetlenerek kolonilerin dağılarak hücrelerin tek tek ayrılması sağlandı. Hücreler matriks ile kaplanmış 175 cm²

yüzey alanına sahip hücre kültürü kaplarına alınarak çoğaltıldı. Hücrelerin besiyeri haftada 2 kez osteojenik farklılaşma besiyeri ile değiştirildi ve hücreler kabın tabanını kapladığında pasajlandı.



Şekil 3- 2: İPKH'lerine osteojenik besiyeri eklendikten 10 gün sonra von Kossa boyaması ile incelenmesi. Mavi ok: Nuclear fast red ile boyanan İPKH'leri, Yeşil ok: Kalsiyum fosfat depozisyonları.

3.2.2. Deney Grupları ve Uygulanan Cerrahi İşlemler

Çalışmamızda 28 adet Sprague Dawley türü, 250±20 gr ağırlığında ve 10-12 haftalık erkek sıçan kullanıldı. Deney hayvanları, 22±1 C° sıcaklıkta, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamı sağlayacak şekilde otomatize edilmiş odada tek bireylik metal kafeslerde saklandı. Denekler, deney süresince standart laboratuvar yemi ve çeşme suyu ile beslendi.

Denekler; 1 kontrol grubu ve 3 adet deney grubu olacak şekilde 4 ana gruba ayrıldı. 4 hafta sonunda tüm denekler sakrifiye edildi. İşlemler süresince asepsi, antisepsi ve sterilizasyon kurallarına uyuldu.

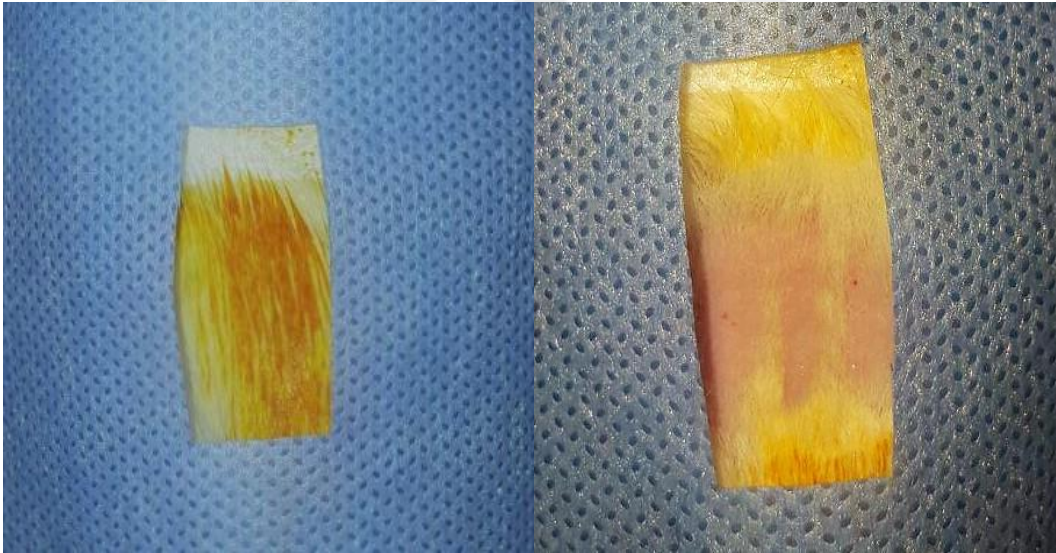
1.grup: Boş defekt (n=4)

2.grup: Defekt+biyomateryal (n=8)

3.grup: Defekt+biyomateryal+MKH'ye farklılaştırılmış İPKH (n=8)

4.grup: Defekt+biyomateryal+osteojenik farklılaştırılmış İPKH (n=8)

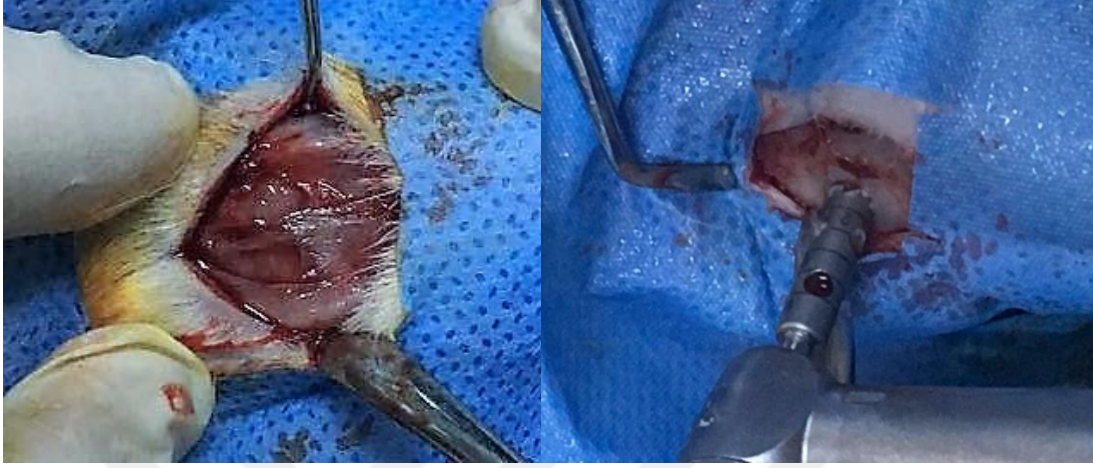
Uygulanacak cerrahi işlem öncesinde kullanılacak tüm aletler steril hale getirildi. Sıçanlara 50-90 mg/kg İ.M. ketamin HCl (50 mg/ml Ketalar®, Parke Davis) ve 5 mg/kg İ.M. Xylazin HCL (Rompun®, Bayer) karışımı ile genel anestezi uygulandı. Operasyon alanını açıkta bırakacak şekilde tüm sıçanların üzeri steril örtüler ile örtüldü. % 10 luk povidon iyodür kullanılarak operasyon sahasında antisepsi sağlandı.



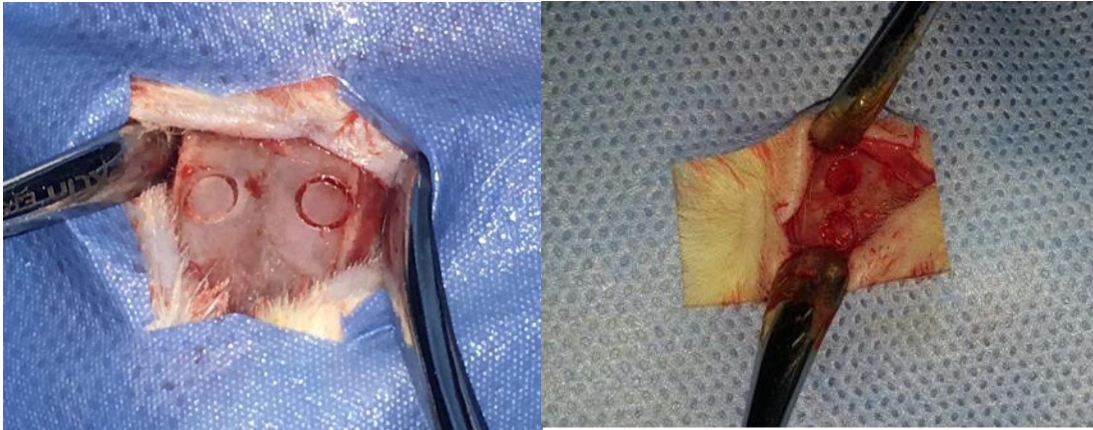
Şekil 3- 3: Deney hayvanlarının steril örtü ile örtülmesi ve operasyon alanının traş edilmesi

Tüm deneklerin kafa derileri cerrahi işlem öncesinde traş edildi. Kranyumun orta hattında, sagittal düzlemde 15 numaralı bistüri kullanılarak yapılan insizyonun ardından tam kalınlıklı flep kaldırıldı; trefan frez ile çift taraflı 4 mm çapında kemik

defekti, dura matere zarar vermeyecek şekilde ve devamlı serum irrigasyonu altında hazırlandı.



Şekil 3- 4: Cerrahi alanda flep kaldırılması ve kalvaryal defektin hazırlanması



Şekil 3- 5: 4mm çapındaki kalvaryal defekt

Poli bütülen süksinat (PBS) ve poli-L-laktik asit (PLLA) polimerlerinin diklorometan çözücüsündeki %4'lük (ağırlık/hacim) 1:1 (PBS:PLLA) çözeltisiyle 300-500 mikrometre arasında çapları olan, gözenekli porlara sahip, sünger formunda doku iskeleleri oluşturuldu (Kanneci ve ark. 2017). Hazırlanan sünger formundaki biyomateryaller standart formda 4 mm çaplı yuvarlaklar şeklinde kesildi ve 24 kuyucuklu hücre kültür tabakalarına alındı. %70 lik alkol çözeltisinde 2 saat bekletilerek steril hale getirildi ve FTS ile yıkandı. Biyomateryallerin üzerine her birine

106 hücre olacak şekilde ekildi ve biyomateryallerin yarısına her kuyucuğa 1 ml olacak şekilde mezenkimal kök hücre besiyeri diğer yarısına ise osteojenik farklılaşma besiyeri eklendi.

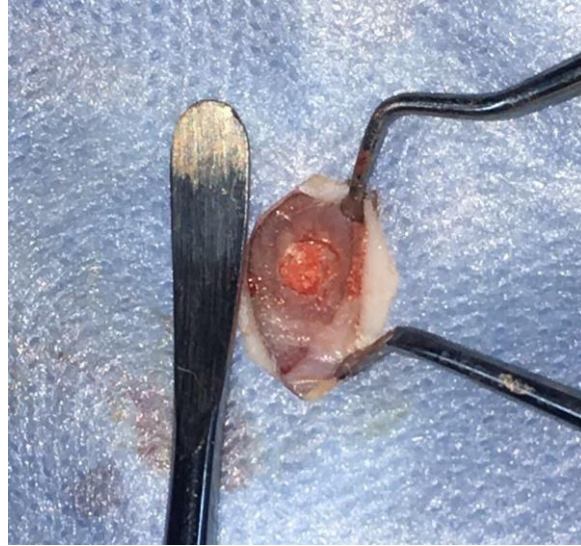
Kontrol grubu: Deneklerin defektleri boş bırakılarak 4/0 vicryl suturele primer kapatıldı.

2. grup: Defektlere standart hacimde biyomateryal yerleştirildi ve 4/0 vicryl suturele primer kapatıldı.

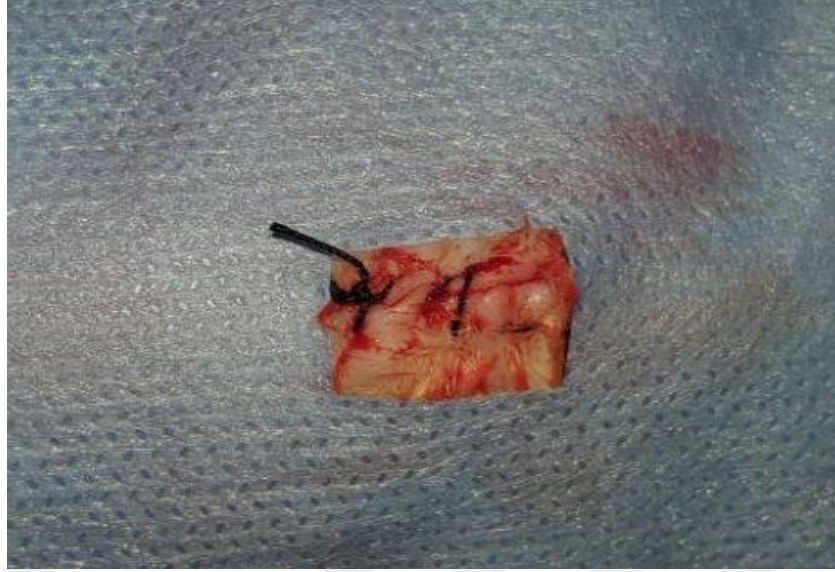
3. grup: Defektlere; mezenkimal kök hücrelere farklılaştırılmış indüklenmiş pluripotent kök hücreler ekilmiş biyomateryal yerleştirildi ve 4/0 vicryl suturele primer kapatıldı.

4. grup: Defektlere osteojenik olarak farklılaştırılmış indüklenmiş pluripotent kök hücreler ekilmiş biyomateryal yerleştirildi ve 4/0 vicryl suturele primer kapatıldı.

Cerrahi işlemler sonrası denekler gruplandırılarak şeffaf takip kutularında rutin bakım şartlarında izlendi.



Şekil 3- 6: İPKH'lerin biyomateryal ile defekt alanına uygulanması



Şekil 3- 7: Defekt alanının süturla primer kapatılması

Deney hayvanları 4. hafta sonunda intramuskuler olarak yüksek doz ketamin HCL uygulanarak sakrifiye edildi. Her denek kalvaryasında yapılan insizyon sonrası parietal kemik çıkartıldı ve ayrı ayrı numaralandırıldı.



Şekil 3- 8: Deney hayvanının sakrifikasyonu sonrası parietal kemiğin çıkarılması

3.2.3. Histolojik İnceleme

Çalışmamız sonucu elde edilen örneklerin histolojik ve histomorfometrik incelemesi Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.2.3.1. Fiksasyon ve Doku Takip Aşamaları

Doku örnekleri, +4°C'de %10'luk nötral formaldehit solüsyonu olan doku kaplarına alınarak fikse edildi. Fiksasyon sonrası örnekler Morse solüsyonu (%22,5 formik asit ve %10 sodyum sitrat) içeren doku kaplarına alındı ve 5 hafta dekalsifikiye edildi. Solüsyonlar bu süre içerisinde 3 günde bir yenilendi. Dekalsifikasyon sonrasında yumuşayan parietal kemik örnekleri, operasyon bölgesinde 4 mm çapında oluşturulan kemik defektinin formunu bozmayacak şekilde, bir kenarı 5 mm olan kare formunda kesildi. Elde edilen dokular akan çeşme suyu altında bir gece yıkandı ve alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Tüm örnekler parafin bloklara 5 mm'lik kenarlarından biri tabana gelecek şekilde dikey olarak gömülerek bloklandı (Tablo 3-1).

Tablo 3 - 1: Doku takip aşamaları

Kullanılan Kimyasal	Süre
Çeşme suyunda yıkama	1 gece
%70'lik etil alkol	1 saat
%80'lik etil alkol	1 saat
%90'lık etil alkol	1 saat
%96'lık etil alkol	1 saat
%96'lık etil alkol	1,5 saat
%100'lük etil alkol	1 saat
Ksilen 1	1 saat
Ksilen 2	1 saat
Parafin 1	1 saat
Parafin 2	3 saat

Histolojik incelemede kullanılacak kesitlerin belirlenmesi amacıyla bir pilot çalışma yapıldı ve parafine gömülü doku bloklarından biri baştan sona kesildi. 10 µm kalınlığında alınan kesitler incelendi ve 1/15 sistematik rastgele örnekleme oranının yeterli olduğu belirlendi. Seri olarak alınan kesitler lamlara alındı ve stereolojik inceleme amacıyla Trikróm Masson ile boyandı (Tablo 3-2).

Tablo 3 - 2: Masson Trikróm boyama aşamaları

İstasyon	Süre	Kullanılan malzeme
Etüv	10 dk	
Fırın	3 dk	
	3 dk	Ksilen
	3 dk	Ksilen
	5 dk	Ksilen
	2 dk	%100'lük etil alkol
	2 dk	%96'lık etil alkol
	2 dk	%70'lik etil alkol
	1 dk	Distile su
	4 dk	Hematoksilen
	1 dk	%1'lik asit alkol
Yıkama	1 dk	
	5 dk	Asit Fuksin
	1 dk	Distile su
	5 dk	Fosfomolibdik asit
	6 dk	Light Green (Metilen mavisi)
	1 dk	Distile su
	2 dk	%1'lik asit alkol
	1 dk	%70'lik etil alkol
	1 dk	%80'lik etil alkol
	1 dk	%96'lık etil alkol
Çıkış	1 dk	%100'lük etil alkol
Manuel	5 dk	Ksilen 1
Manuel	5 dk	Ksilen 2

3.2.3.2. Histomorfolojik Değerlendirme

Boyanan kesitler, CCD dijital kamera (Optronics Microfire 1600x1200P, Goleta, CA, USA), görüntü kartı (ATI FireGL Advance Micro Device, Camberly, UK), bilgisayar kontrollü motorize düzenek (Bioprecision, Howtrone, NY, USA), Mikrokatör (Heidenhein, Traunreut, Germany) ve ışık mikroskobundan (Leica DM 4000B, Wetzlar, Germany) oluşan stereoloji çalışma istasyonunda incelendi. Ölçümler yukarıda belirtilen mikroskopta Sterioinvestigator 11.0 (Microbrightfield, Williston, VT, USA) programı kullanılarak yapıldı. Hacim ölçümleri için Leica C Plan X10 objektif (NA = 0.22) kullanıldı. Deney bölgesinde oluşan yeni kemiğin hacminin hesaplanmasında Sterioinvestigator görüntü analiz programının Cavalieri sondasından yararlanıldı.

Cavalieri prensibi, düzenli bir geometrik şekle sahip olmayan üç boyutlu nesnelerin hacimlerinin hesaplanmasını sağlar. Cavalieri prensibini uygulamak için, hacmi hesaplanmak istenen yapı eşit aralıklı ve birbirine paralel kesitlere ayrılır ve her kesitin aynı yöne bakan yüzeylerinin alanları uygun bir yöntemle hesaplanır. Tüm dilimlerden elde edilen toplam yüzey alanı değeri, dilimlerden kullandığımız ortalama dilim kalınlığı ile çarpılırsa, yapının toplam hacminin tarafsız bir hesaplaması elde edilir (Gundersen ve ark. 1988; Royet 1991).

Çalışmamızda her deneğin kalvaryasından çıkarılan parietal kemiğin hacmi daha önce tanımlanan stereolojik çalışma istasyonu yardımıyla Cavalieri prensibi kullanılarak ölçüldü. Histolojik takip işlemi sonrasında elde edilen parafin kesitlerden oluşan ilgili yapıya noktalı alan ölçüm cetveli uygulandı. Noktalı alan cetvelinin ölçüleri maksimum etkinlik dikkate alınarak saptandı ve $d=50 \mu\text{m}$ 'dur. Noktalı alan ölçüm cetvelinin her noktası $250000 \mu\text{m}^2$ ye karşılık gelmektedir. Noktalı alan ölçüm cetveli ilgilenilen yapıya rastgele atıldı, kemik ve yumuşak dokulara denk gelen noktalar sayıldı. Bu sayım sonuçları aşağıdaki formüldeki yerlerine konularak kemik ve yumuşak dokuların hacmi tahmin edildi.

$$\text{Kemik hacmi} = t \times a/p \times \Sigma p$$

Formülde “t” ortalama kesit kalınlığını, “a/p” noktalı alan ölçüm cetvelindeki her bir noktanın gerçekte temsil ettiği alanı ifade eder. Ölçülen her kesitin hacimleri

toplanıp, örnekleme oranı ile çarpılarak parietal bölgedeki kemiğin toplam hacmi ortaya çıkarıldı.

Kemik hacmini stereolojik olarak ölçebilmemiz için inceleyeceğimiz bölge ile ilgili olarak pilot bir çalışma yapılmıştır. Yapılan bu pilot çalışmanın amacı, istenilen histomorfometriyi değerlendirmek ve ilgilenilen doku hakkında bilgi sahip olmaktır. Ayrıca ölçümler sonrasında elde edilen sayısal veriler yardımıyla çalışmanın istatistiksel anlamlılığı hakkında kaba tahminler yapmayı sağlamaktadır. Histomorfometrik olarak ölçüm sonuçları hata katsayısının (Coefficient Error) 0,05'ten küçük olması istenmektedir (Mouton ve ark. 2005).

Sonuçlar, kemik hacim (mm^3), yumuşak bağ doku hacim (mm^3) ve kemik-total hacim oranı üzerinden değerlendirildi. Kemik/total hacim oranı; dokuda bizim belirlediğimiz sınırlar içerisinde kalan kemik hacminin diğer tüm yapıların (bağ dokusu ve boşlukları) hacmine oranlanması ile bulundu (Meh ve ark. 2011). Kemik ve yumuşak bağ doku hacimleri ve kemik/total hacim oranı sonuçları incelediğimiz bölgedeki kemik doku hakkında yorum yapabilmemizi sağladı.

3.2.4. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızın istatistiksel analizleri Statistical Package For The Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programının 20,0 sürümü kullanılarak yapıldı. Tüm gruplar için her bir parametrenin tanımlayıcı (ortalama, medyan, standart sapma, standart hata) istatistikleri hesaplandı. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Oneway Anova testi ve farklılığın olduğu grubun belirlenmesinde Tukey HDS testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Stereolojik Analiz Bulguları

4.1.1. Kemik Hacmi (mm³)

Deney grupları arasında ortalama kemik hacmi miktarının karşılaştırılması Tablo 4-1 ve Şekil 4-1’de gösterilmiştir.

K: Boş Defekt

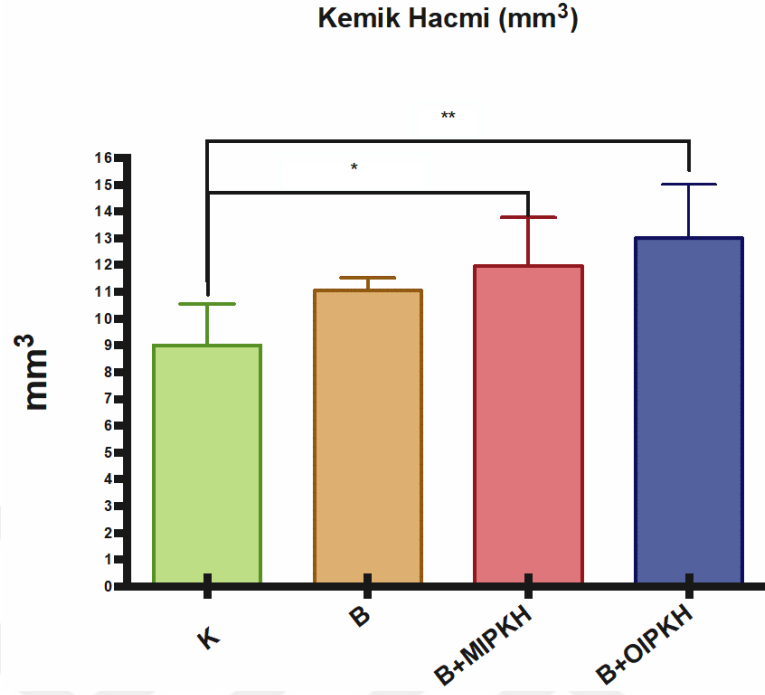
B: Defekt+Biyomateryal

B + MKH-İPKH: Defekt+Biyomateryal + Mezenkimal Kök Hücreye Farklılaştırılmış İPKH

B + O-İPKH: Defekt+Biyomateryal + Osteojenik Farklılaştırılmış İPKH

Tablo 4 - 1: Tüm deney gruplarında saptanan ortalama kemik hacmi miktarının karşılaştırılması (p<0.05)

Grup Adı	(Ortalama kemik hacmi mm ³ ±Standart Sapma) n=5	p
K & B	9,00 ± 1,55 & 11,04 ± 0,48	0,26
K & B + MKH-İPKH	9,00 ± 1,55 & 11,964 ± 1,80	0,05*
K & B + O-İPKH	9,00 ± 1,55 & 12,99 ± 2,02	0,01**
B & B + MKH-İPKH	11,04 ± 0,48 & 11,96 ± 1,80	0,80
B & B + O-İPKH	11,04 ± 0,48 & 12,99 ± 2,02	0,25
B + MKH-İPKH & B + O-İPKH	11,96 ± 1,80 & 12,99 ± 2,02	0,73



Şekil 4 - 1: Tüm deney gruplarında saptanan ortalama kemik hacmi miktarı

Deney grupları arasında ortalama kemik hacmi miktarının karşılaştırılması sonucu;

- K ve B grupları arasında ortalama kemik hacmi miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p = 0.26$).
- K ve B + MKH-İPKH grupları arasında ortalama kemik hacmi miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0,05$).

Buradaki anlamlılık bize Defekt+Biyomateryal + Mezenkimal Kök Hücreye Farklılaştırılmış İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre grubunda kemik dokusu hacminin arttığını göstermektedir. Bu sonuca da mezenkimal kök hücrelerin katkısı anlamlı şekilde görülmüştür.

- K ve B + O-İPKH grupları arasında ortalama kemik hacmi miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p = 0.01$).

Buradaki anlamlılık bize Defekt + Biyomateryal + Osteojenik Farklılaştırılmış İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre grubunda kemik dokusu hacminin arttığını göstermektedir. Yeni kemik dokusunun oluşmasında osteojenik kök hücrelerin mezenkimal hücreli gruba göre daha etkili olduğu söylenebilir.

- B ve B + MKH-İPKH grupları arasında ortalama kemik hacmi miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p = 0,80$).
- B ve B + O-İPKH grupları arasında ortalama kemik hacmi miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p = 0,25$).
- B + MKH-İPKH ve B + OİPKH grupları arasında ortalama kemik hacmi miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p = 0,73$).



4.1.2. Yumuşak Doku Hacmi (mm³)

Deney grupları arasında ortalama yumuşak doku hacmi miktarının karşılaştırılması Tablo 4-2 ve Şekil 4-2’de gösterilmiştir.

K: Boş Defekt

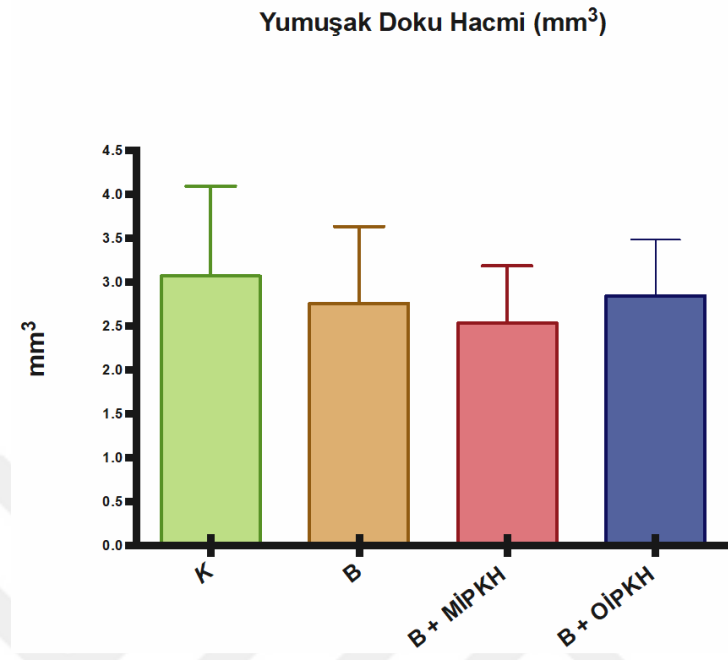
B: Defekt+Biyomateryal

B + MKH-İPKH: Defekt + Biyomateryal + Mezenkimal Kök Hücreye Farklılaştırılmış İPKH

B + O-İPKH: Defekt + Biyomateryal + Osteojenik Farklılaştırılmış İPKH

Tablo 4 - 2: Tüm deney gruplarında saptanan ortalama yumuşak doku hacmi miktarının karşılaştırılması (p<0.05)

Grup Adı	(Ortalama yumuşak doku hacmi mm ³ ±Standart Sapma) n=5	p
K & B	3,07 ± 1,03 & 2,76 ± 0,88	0,94
K & B + MKH-İPKH	3,07 ± 1,03 & 2,53 ± 0,65	0,75
K & B + O-İPKH	3,07 ± 1,03 & 2,85 ± 0,64	0,98
B & B + MKH-İPKH	2,76 ± 0,88 & 2,53 ± 0,65	0,97
B & B + O-İPKH	2,76 ± 0,88 & 2,85 ± 0,64	0,10
B + MKH-İPKH & B + O-İPKH	2,53 ± 0,65 & 2,85 ± 0,64	0,92



Şekil 4 - 2:Tüm deney gruplarında saptanan ortalama yumuşak doku hacmi miktarı

Deney grupları arasında ortalama yumuşak doku hacmi miktarının karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Yumuşak doku hacmi bize tek başına bir anlamlılık her zaman vermeyebilir. Verilere baktığımızda kontrol grubuna göre deney gruplarında yine de azalmalar olduğunu görebiliyoruz.

4.1.3. Kemik Hacmi Yüzdesi (%)

Deney grupları arasında ortalama kemik hacmi yüzdesinin karşılaştırılması Tablo 4-3 ve Şekil 4-3'de gösterilmiştir.

K: Boş Defekt

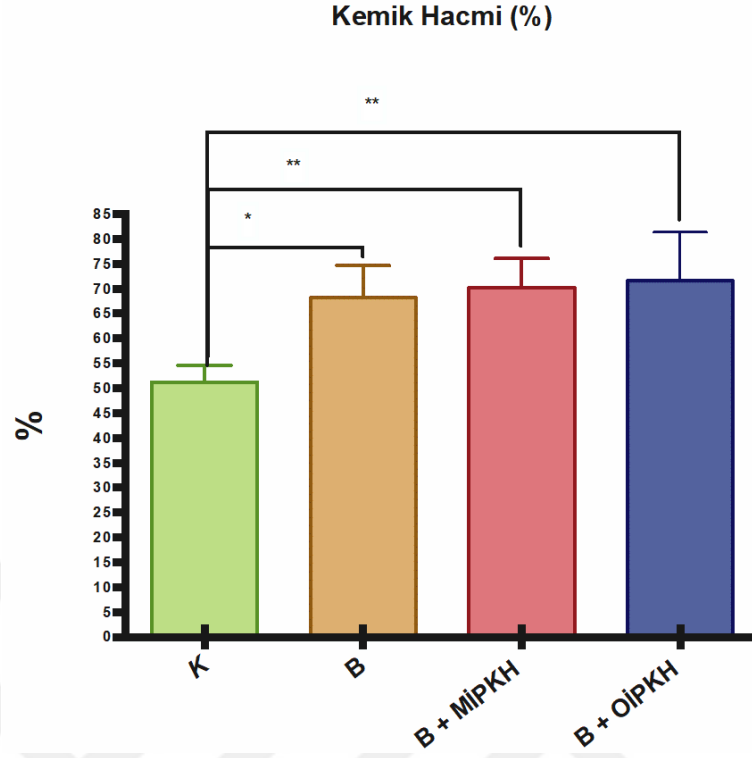
B: Defekt+Biyomateryal

B + MKH-İPKH: Defekt+Biyomateryal + Mezenkimal Kök Hücreye Farklılaştırılmış İPKH

B + O-İPKH: Defekt+Biyomateryal + Osteojenik Farklılaştırılmış İPKH

Tablo 4 - 3: Tüm deney gruplarında saptanan ortalama kemik hacmi yüzdesinin karşılaştırılması (p<0.05)

Grup Adı	(Ortalama kemik hacmi % ± Standart Sapma) n=5	p
K & B	51,23 ± 3,37 & 68,22 ± 6,47	0,05*
K & B + MKH-İPKH	51,23 ± 3,37 & 70,25 ± 5,86	0,01**
K & B + O-İPKH	51,23 ± 3,37 & 71,64 ± 9,74	0,01**
B & B + MKH-İPKH	68,22 ± 6,47 & 70,25 ± 5,86	0,97
B & B + O-İPKH	68,22 ± 6,47 & 71,64 ± 9,74	0,86
B + MKH-İPKH & B + O-İPKH	70,25 ± 5,86 & 71,64 ± 9,74	0,99



Şekil 4 - 3: Tüm deney gruplarında saptanan ortalama kemik hacmi yüzdesi

Deney grupları arasında ortalama kemik hacmi yüzdesinin karşılaştırılması sonucu;

- K ve B grupları arasında ortalama kemik hacmi yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0,05$).
- K ve B + MKH-İPKH grupları arasında ortalama kemik hacmi yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p = 0.01$).
- K ve B + O-İPKH grupları arasında ortalama kemik hacmi yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p = 0.01$).

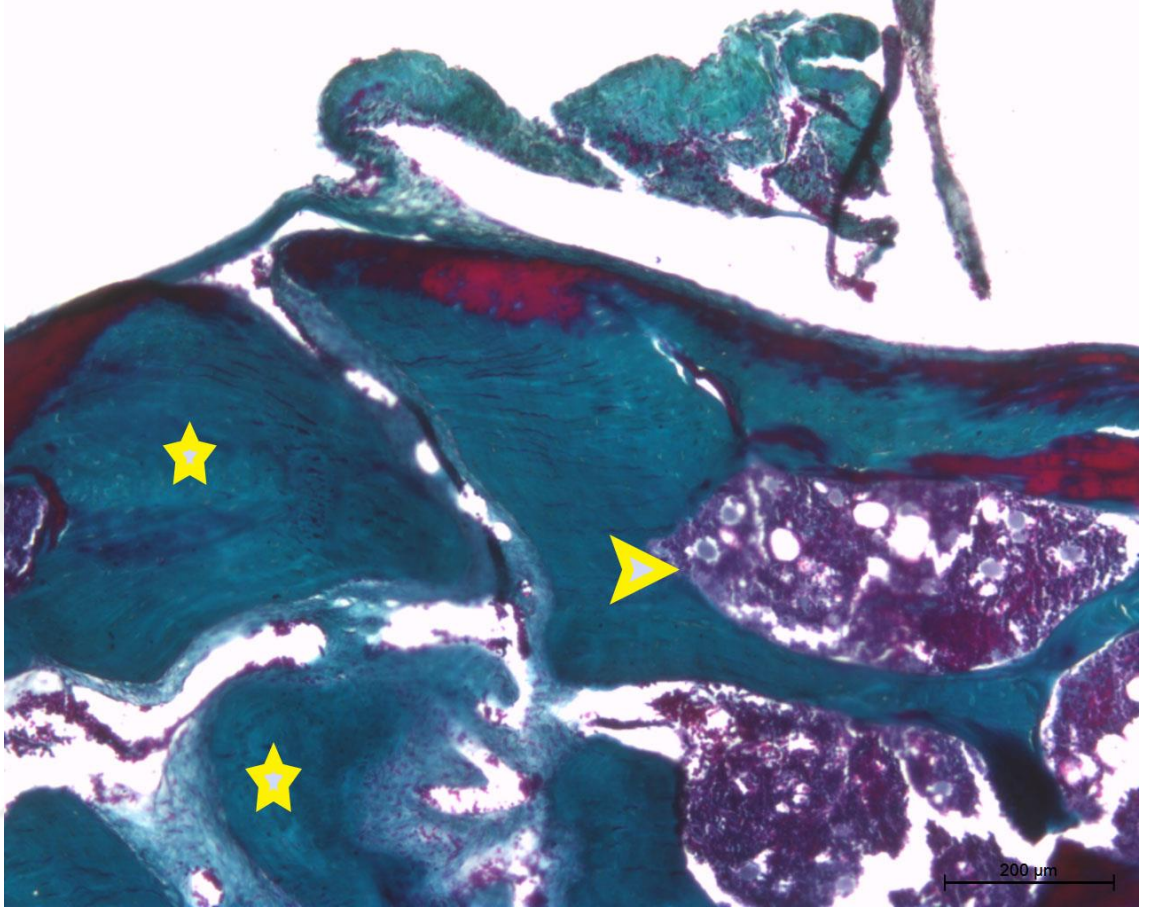
Ortalama kemik hacim yüzdesi bize burada daha çok anlamlılık vermiştir. Çünkü burada kemik hacminin yumuşak doku hacminin de olduğu tüm doku hacmine oranlanması ile bulunmaktadır. Her bir deney grubunda kontrol grubuna göre kemik oranının artması bize orantılı ve daha doğru bir sonuç vermiştir. Oluşan yeni kemik dokusunun tüm alan içindeki miktarı kök hücre uygulanan gruplarda doğru orantılı bir artış olduğunu göstermektedir.

- B ve B + MKH-İPKH grupları arasında ortalama kemik hacmi yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p = 0,97$).
- B ve B + O-İPKH grupları arasında ortalama kemik hacmi yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p = 0,86$).
- B + MKH-İPKH ve B + O-İPKH grupları arasında ortalama kemik hacmi yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p = 0,99$).



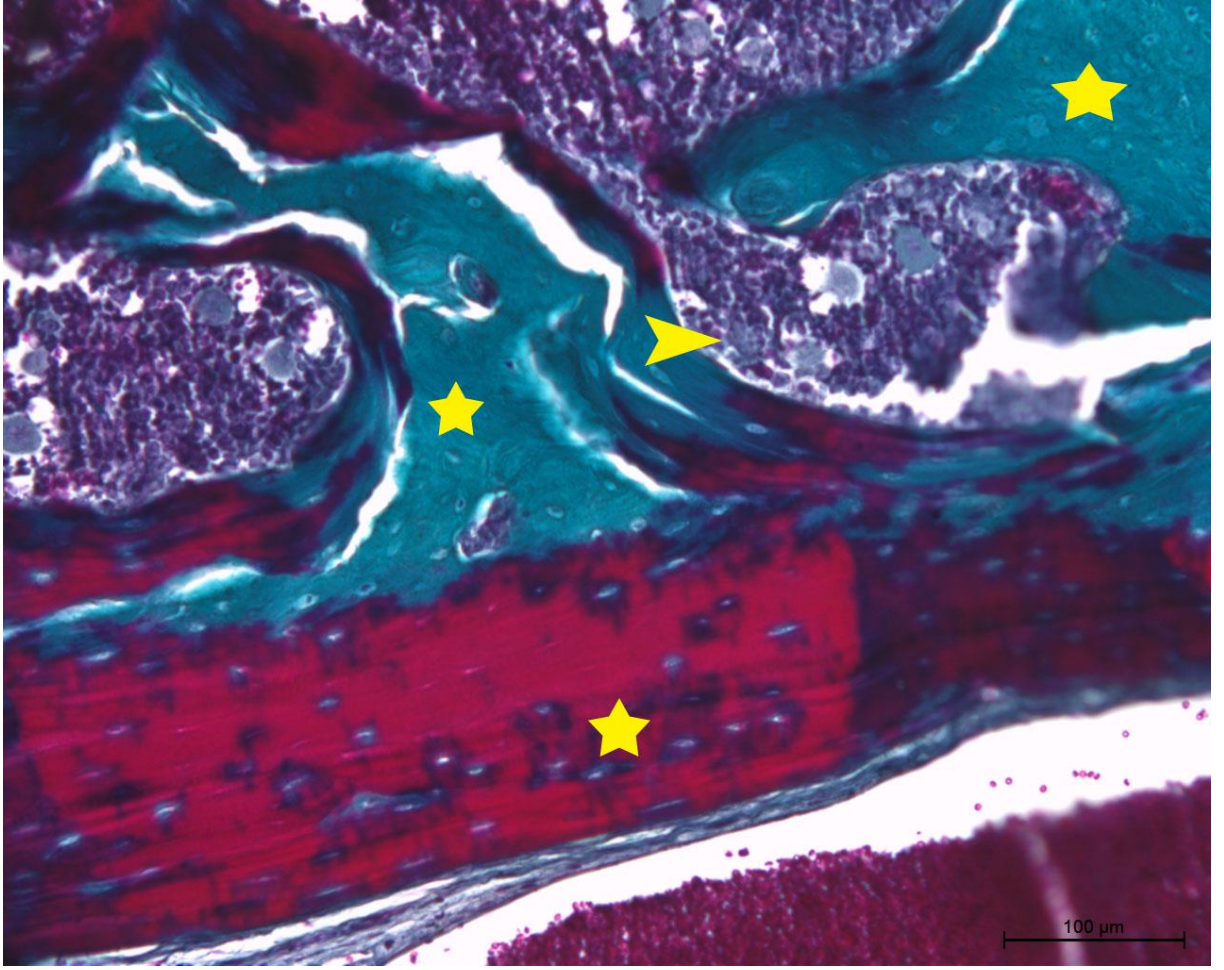
4.2. Stereoinvestigator Görüntü Analiz Programından Elde Edilen Görüntüler

4.2.1. Kontrol (Boş defekt) Grubu



Şekil 4 - 4: Kontrol (Boş Defekt) grubuna ait histolojik kesit görünümü. Sarı yıldız: kemik dokusunu ve sarı ok başı: kan damarlarını temsil eder. Boyama Masson-Trikrom ile yapılmıştır. Bar: 200 µm, resimler x10'lik büyütmededir.

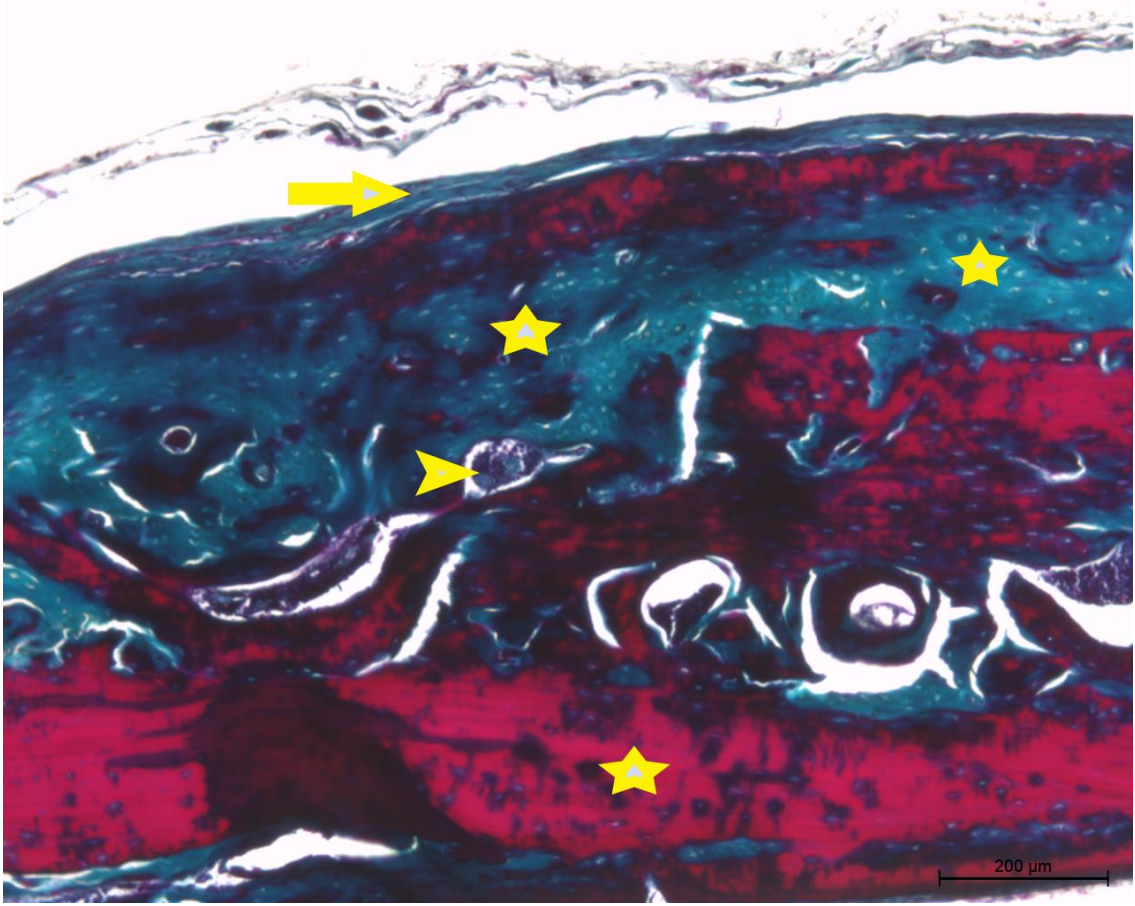
Histolojik kesitte olması gereken normal bir kemik yapısı görülmektedir.



Şekil 4 - 5: Kontrol (Boş Defekt) grubuna ait histolojik kesit görünümü. Sarı yıldız: kemik dokusunu ve sarı ok başı: kan damarlarını temsil eder. Boyama Masson-Trikrom ile yapılmıştır. Bar: 100 μ m, resimler x20'lik büyütmededir.

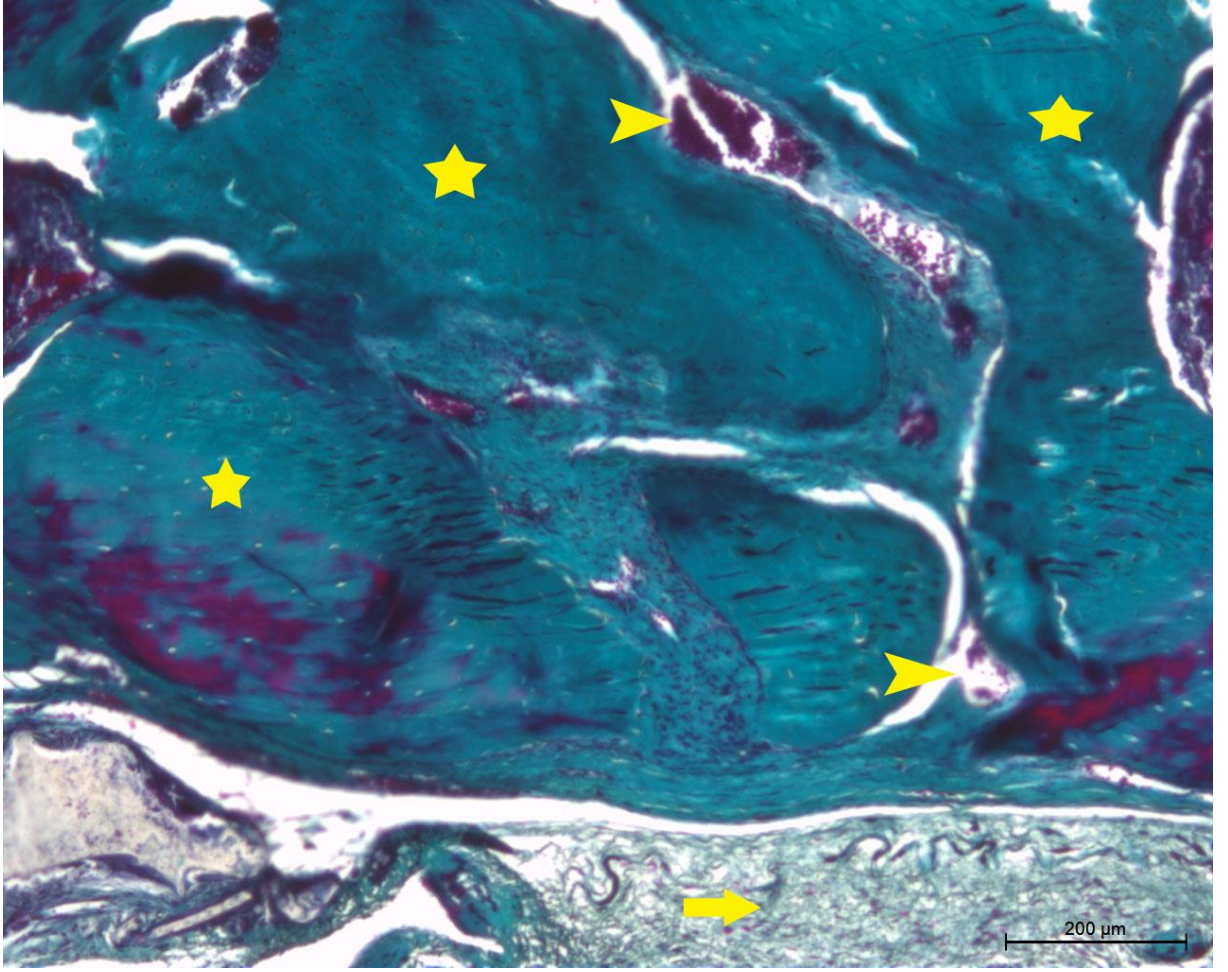
Resimde kemik dokusunun normal histolojik yapısı izlenmektedir. Kontrol grubuna ait bu resimde osteosit hücrelerini içeren sert kemik yapısı ve damarların olduğu alanlar normaldir.

4.2.2. Defekt ve Biyomateryal Grubu



Şekil 4 - 6: Defekt + biyomateryal grubuna ait histolojik kesit görünümü. Sarı yıldız: kemik dokusunu, sarı ok başı: kan damarlarını ve sarı ok: yumuşak bağ dokusunu temsil eder. Boyama Masson-Trikrom ile yapılmıştır. Bar: 200 µm, resimler x10'lik büyütmededir.

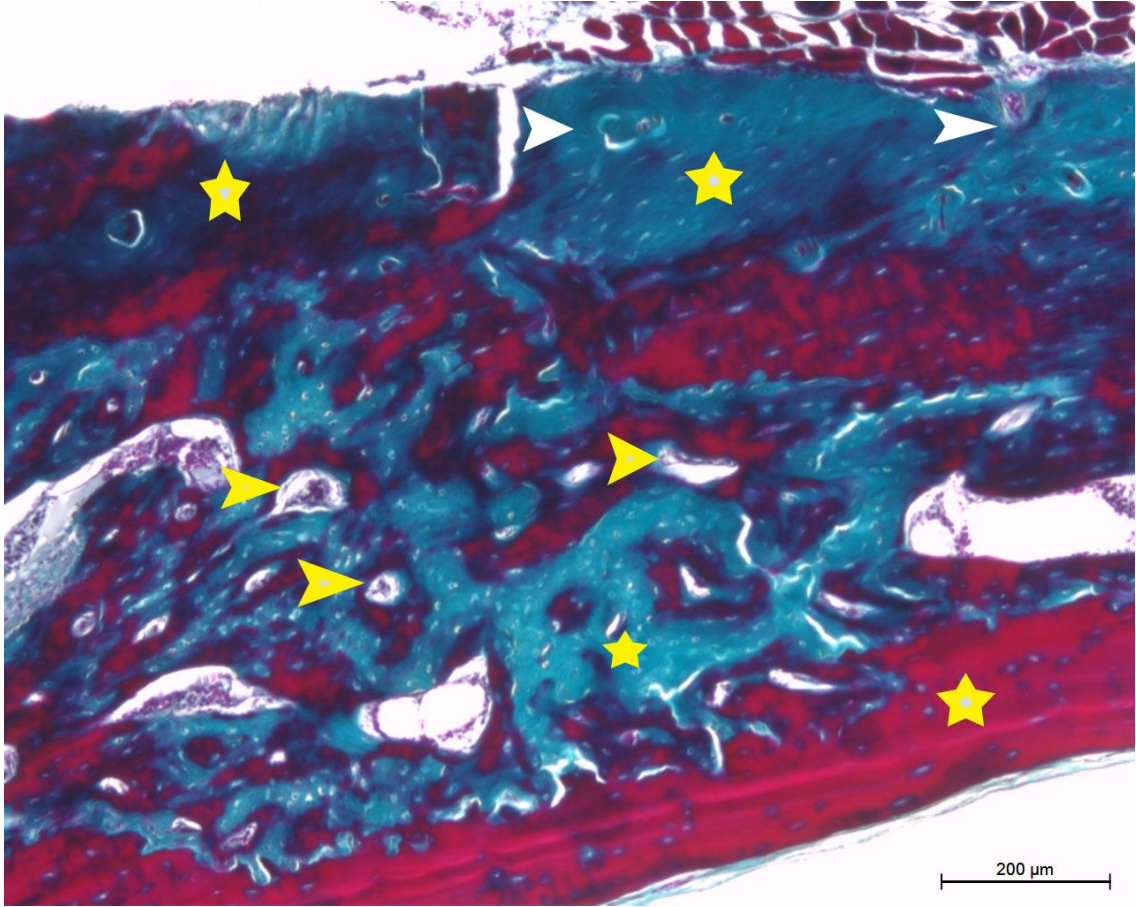
Resimdeki histolojik kesitte kontrol grubuna yakın bir doku yer almaktadır. Kan damarlarının sayısı biraz artmaya başlamıştır. Fakat henüz aktifleşen kemik oluşumu histolojik olarak gözlenmemiştir.



Şekil 4 - 7: Defekt + biyomateriyal grubuna ait histolojik kesit görünümü. Sarı yıldız: kemik dokusunu, sarı ok başı: kan damarlarını ve sarı ok: yumuşak bağ dokusunu temsil eder. Boyama Masson-Trikrom ile yapılmıştır. Bar: 100 µm, resimler x20'lik büyütmededir.

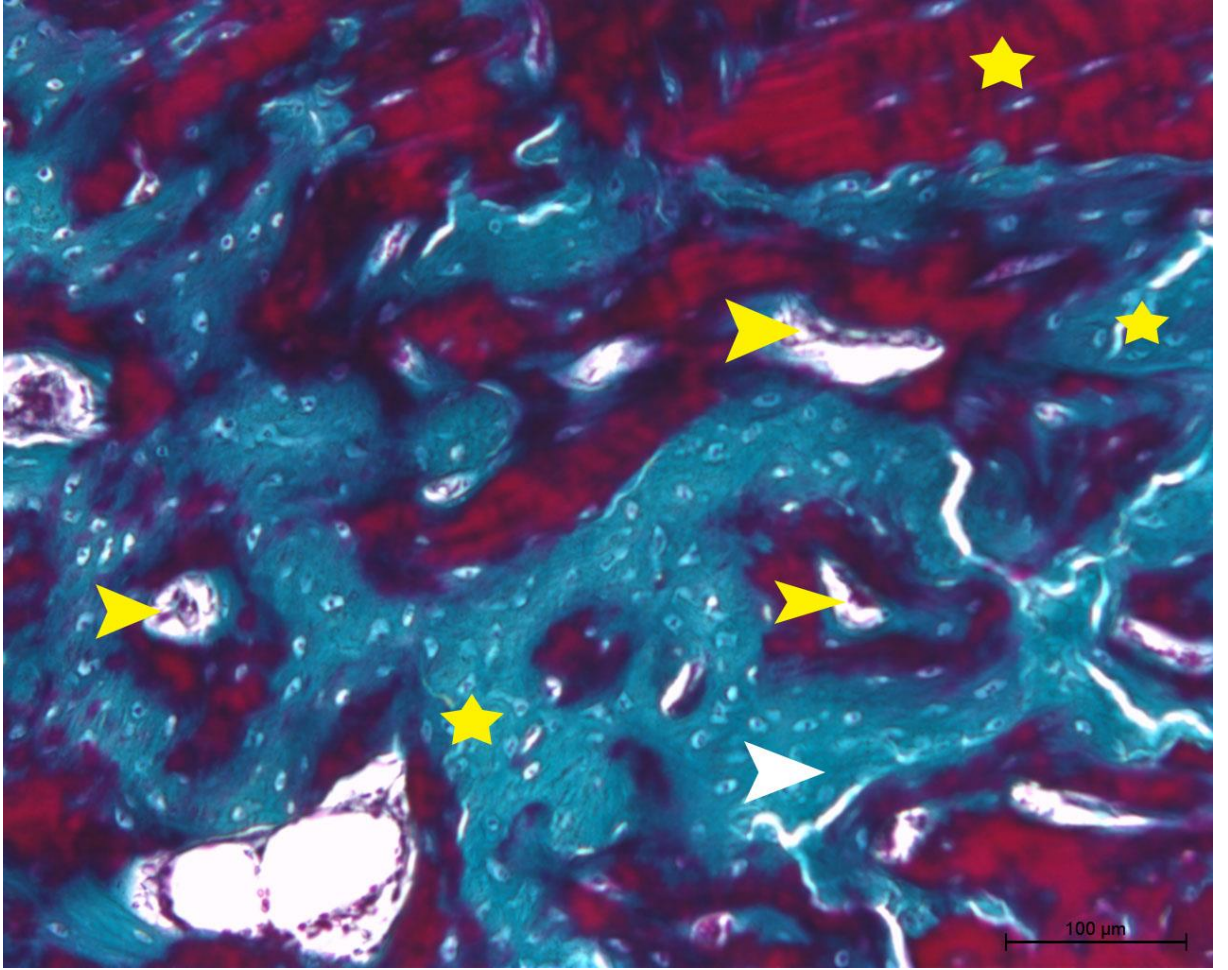
Resimde kemik dokusunun yer aldığı alanların yanısıra yumuşak bağ dokusu alanları da görülmektedir. Ayrıca damarlar da olağandır.

4.2.3. Defekt, Biyomateryal ve MKH-İPKH Grubu



Şekil 4 - 8: Defekt + biyomateryal + MKH-İPKH grubuna ait histolojik kesit görünümü. Sarı yıldız: kemik dokusunu ve sarı ok başı: kan damarlarını temsil eder. Beyaz ok başı ise yeni kemikleşen dokuyu göstermektedir. Boyama Masson-Trikrom ile yapılmıştır. Bar: 200 μ m, resimler x10'lik büyütmededir.

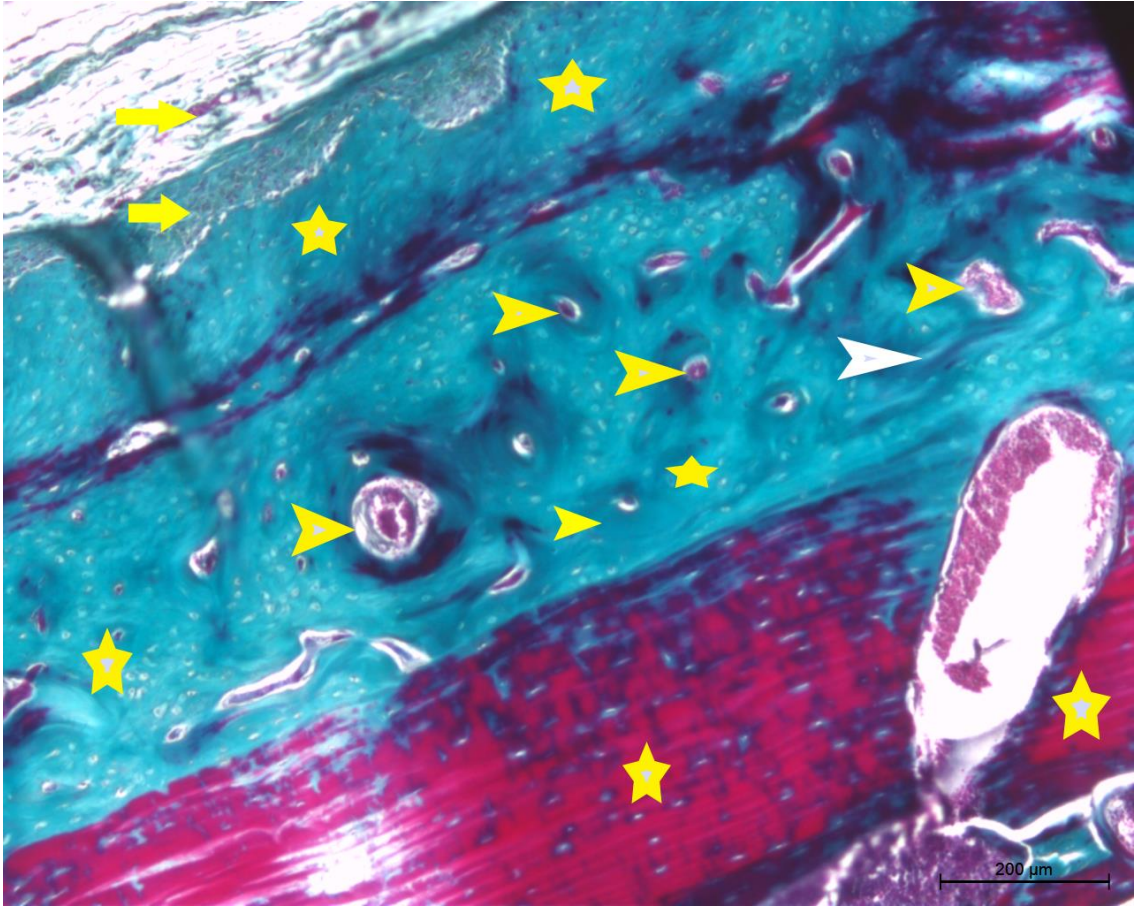
Resimdeki kemik dokusunun histolojik yapısını kontrol grubuna göre karşılaştırdığımızda küçük büyütmede parçalı alanlar görünümü dikkat çekicidir. Kemik parçalanmaları ve damarlar resimde kemik oluşumu hareketini düşündürmektedir.



Şekil 4 - 9: Defekt + biyomateryal + MKH-İPKH grubuna ait histolojik kesit görünümü. Sarı yıldız: kemik dokusunu ve sarı ok başı: kan damarlarını temsil eder. Beyaz ok başı ise yeni kemikleşen dokuyu göstermektedir. Boyama Masson-Trikrom ile yapılmıştır. Bar: 100 µm, resimler x20'lik büyütmededir.

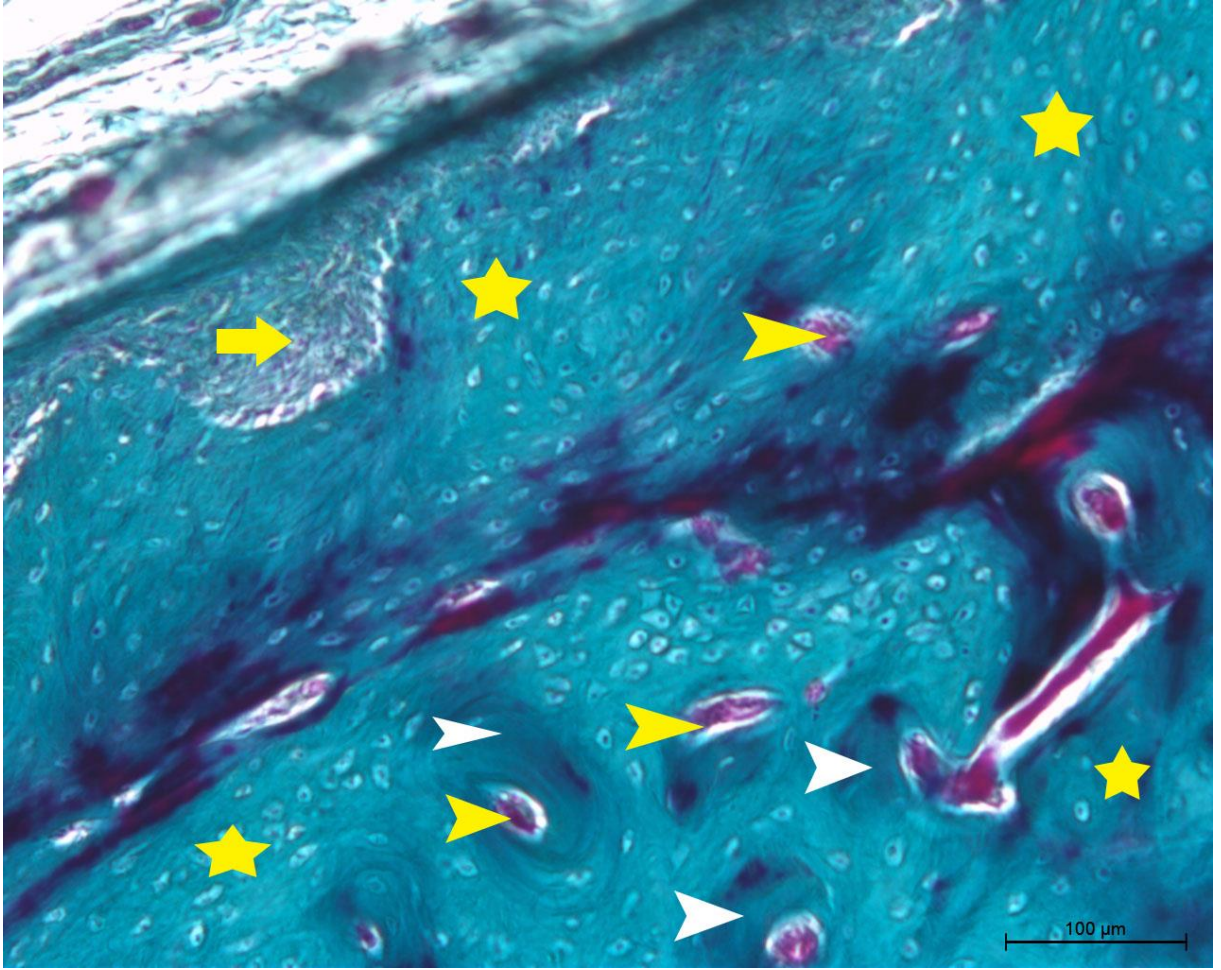
Resimde kemik dokusunun histolojik yapısını kontrol grubuna göre karşılaştırdığımızda kemik dokusunun parçalı alanlar şeklinde olduğu görülmektedir. Ayrıca sayıları artan damarlar da dikkat çekicidir. Damarların artması bize kemik oluşumu için gerekli materyallerin sağlandığını gösterir. Yeni kemik oluşumları bize kök hücrelerin kemik doku için destekleyici bir ürün olduğunu anlatmaktadır.

4.2.4. Defekt, Biyomateryal ve Osteojenik İPKH Grubu



Şekil 4 - 10: Defekt + biyomateryal + osteojenik İPKH grubuna ait histolojik kesit görünümü. Sarı yıldız: kemik dokusunu, sarı ok başı: kan damarlarını ve sarı ok: yumuşak bağ dokusunu temsil eder. Beyaz ok başı ise yeni kemikleşen dokuları göstermektedir. Boyama Masson-Trikrom ile yapılmıştır. Bar: 200 μ m, resimler x10'lik büyütmededir.

Resimde yeni oluşan kemik bölgelerini yaygın bir şekilde görmekteyiz. Resimdeki kan damarlarının da fazla oluşu bize osteojenik kök hücrelerinin aktif olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 4 - 11: Defekt + biyomaterial + osteojenik İPKH grubuna ait histolojik kesit görünümü. Sarı yıldız: kemik dokusunu, sarı ok başı: kan damarlarını ve sarı ok: yumuşak bağ dokusunu temsil eder. Beyaz ok başı ise yeni kemikleşen dokuları göstermektedir. Boyama Masson-Trikrom ile yapılmıştır. Bar: 100 μm, resimler x20'lik büyütmededir.

Resimde kemik dokusunu yaygın bir şekilde görmekteyiz. Ayrıca kan damarlarının olduğu alanlar da dikkat çekicidir. Yeni kemik oluşumları resimde izlenmektedir. Osteojenik kök hücrelerin yeni kemik materyalinin oluşmasında katkı sağladığı kontrol grubu histolojik kesitine göre karşılaştırıldığında net bir şekilde gözlenmektedir.

5. TARTIŞMA

Kemik dokusu yılda dünya çapında yaklaşık 2,2 milyon nakil işlemi uygulaması ile en fazla nakledilen dokular arasındadır (Kinaci ve ark. 2014). Maksillofasiyal bölgede, konjenital malformasyonları, ciddi yüz travmalarını veya tümörlerin rezeksiyonunu tedavi etmek için rekonstrüksiyon gerekebilir (Hall ve ark. 1991, Nkenke ve Neukam 2014). Ayrıca çoğu kez diş kaybından sonra maksilla ve mandibulada sert ve yumuşak alveoler dokularda atrofi oluşur ve hem yatay hem de dikey boyutların azalması ile sonuçlanır (Sakkas ve ark. 2017). Klinik pratikte, hastalarda ağır alveoler kret rezorpsiyonu ile ortaya çıkar ve diş implantlarının optimum uygulanması için yetersiz kemik hacmi görülür. Alveoler kreti büyütmek için çeşitli cerrahi prosedürler geliştirilmiştir (Bell ve ark. 2002).

Kemik rekonstrüksiyon prosedürlerinde, cerrahlar hastadan otolog kemiği elde ederler ve bu kemik greftini defekt bölgesine naklederler. Hastanın kendi hücrelerinin ve büyüme faktörlerinin kullanılması, ayrıca kemik rejenerasyonu için iskele oluşturması otolog kemiğin kemik rejenerasyonunda altın standart olarak kabul edilmesini sağlamıştır (Sakkas ve ark. 2017). Bununla birlikte, greft elde edilmesi için ikinci bir cerrahi işlem gerektirmesi, sınırlı miktarda doku elde edilmesi, iki aşamalı prosedürün ameliyat süresini arttırması, hastaların çoğunlukla greft alınan bölgede ağrı duyması ve sinir hasarı meydana gelebilme riski bu uygulamanın dezavantajlarıdır. Ayrıca, otolog kemik öngörülemez bir rezorpsiyon oranına sahiptir (Swan ve Goodacre 2006; Felice ve ark. 2009; Amini ve ark. 2012). Bu faktörlerin tümü tedavi maliyetlerini ve hasta rahatsızlığını artırır.

Otolog greft kullanımındaki doğal dezavantajlar nedeniyle, hayvan, insan veya sentetik kökenli kemik greftlerinin kemik rejenerasyonunda alternatif yöntemler olarak kullanılması önerilmiştir (Calori 2011; Zimmermann ve Moghaddam 2011; Hernigou 2015; Jensen ve ark. 2016). Bununla birlikte kemik greftlerinin kullanımının bakteriyel kontaminasyona ve immün red oluşumuna yol açabileceği bilinmelidir (Zimmermann ve Moghaddam 2011). Bu prosedürler küçük kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda kullanılabilirken daha büyük defektlerde daha az etkilidirler (Kneser ve ark. 2006; Calori 2011; Amini ve ark. 2012). Bu nedenle, hastayı donör bölgesi morbidite riskine maruz bırakmayan etkili ve güvenli bir yöneme ihtiyaç duyulmaktadır (Marx ve

Morales 1988; Warnke ve ark. 2004; Black ve ark. 2015; Jensen 2016; Tang ve ark. 2016).

Kök hücre tedavisi alveoler kemik yenilenmesi ve onarımı için umut verici bir yaklaşımdır (Black ve ark. 2015). Kök hücre tedavilerinin kemik dokusu yenilenmesinde potansiyel avantajları birçok çalışma tarafından bildirilmiştir (Khojasteh ve ark. 2008; Behnia ve ark. 2012; Behnia ve ark. 2013; Khojasteh ve Motamedian 2016; Khojasteh ve Sadeghi 2016). Kök hücreler; canlı organizmalara ait tüm doku ve organları oluşturan, uzun süre bölünerek kendini yenileyebilen, farklı hücre tiplerine dönüşerek hasarlı dokuya nakledildiğinde doku yenilenmesine katkıda bulunan hücrelerdir (Fuchs ve Serge 2000; Gronthos ve ark. 2000; Bishop ve ark. 2002; Gronthos ve ark. 2002). Kemik iliği, diş ve yağ dokusu gibi farklı organ ve dokulardan toplanabilirler (Xiao ve Nasu 2014; Bianco ve Robey 2015; Kolaparthi ve ark. 2015). Kök hücre popülasyonları osteojeniktir ve alveoler kemik rejenerasyonu ve tamiri için harika bir kaynak oluşturan immünomodülatör özellikleri gösterirler (Xiao ve Nasu 2014; Bianco ve Robey 2015). Yapılan çalışmalar, kök hücrelerin kemik greftleri veya allojenik iskeleler ile birlikte kullanılmasının, geliştirilmiş kemik dokusuyla kemiğin onarımı ve üretilmesinde etkin olduğunu göstermiştir (de Mendonca ve ark. 2008; Seo ve ark. 2008).

Embriyonik kök hücrelerin (EKH), her üç germ katmanına farklılaşma kabiliyetleri, yüksek proliferasyon potansiyeli ve sınırsız yenilenme kabiliyetleri nedeniyle rejeneratif tıpta kullanım için daha umut verici bir hücre kaynağı olduğu düşünülmektedir (Waese ve ark. 2008; Mahmood ve ark. 2012). Bu hücrelerin kemik yenilenmesi için uygulandığı ve kemik onarımı için ideal bir hücre kaynağı olduğu gösterilmiştir (Chen ve Xiao 2011; Gamie ve ark. 2012; Chen ve ark. 2013). Bununla birlikte, insan EKH'lerinin kullanımı ve nakil sonrası immün reddi riski ile ilişkili etik / yasal sorunlar klinik uygulamalarını engellemektedir. (Chen ve Xiao 2011).

Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin implantasyonunun kemik defekt bölgelerinde kemik oluşumunu arttırdığı yaygın olarak bildirilmiştir (Wang ve ark. 2010; An ve ark. 2012; Chen ve ark. 2013). MKH'ler osteoblastlara, kondrositlere, adipositlere ve diğer hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahiptir. Kemik iliği, yağ dokusu ve diş dokusu gibi otojen kaynaklardan türetilen yetişkin MKH'lerin, kök hücre bazlı kemik rejenerasyonu için umut verici progenitor kaynaklar olduğu düşünülmektedir

(Khojasteh ve ark. 2012; Gimble ve ark. 2013; Rezai-Rad ve ark. 2015a; 2015b; Khojasteh ve ark. 2016). Ancak otolog kemik iliği kaynaklı MKH'lerin miktarı çok sınırlıdır ve yeterli sayıda hücre elde etmek için, önce kültür ortamında pasajlanmalıdırlar. Bununla birlikte, bu hücreler in vitro olarak artışlarını sınırlayan düşük bir çoğalma hızı sergilerler. Ayrıca, osteojenik farklılaşma potansiyeli ve kemik iliği kaynaklı MKH'lerin proliferasyon hızı yaşlanma ile birlikte önemli ölçüde azalır (Stenderup ve ark. 2003; Kretlow ve ark. 2008).

MKH'ler ve EKH'ler ile ilişkili sınırlamaların üstesinden gelmek amacıyla yeni hücre türlerini keşfetmek için çalışmalar başlatılmıştır. 2006 yılında Takahashi ve Yamanaka indüklenmiş pluripotent kök hücreler (İPKH) olarak adlandırılan yeni EKH benzeri hücreler ürettiriler (Takahashi ve Yamanaka 2006). Bu hücreler tanımlanmış faktörlerin eklenmesiyle doğrudan yetişkin fibroblastlarından üretilmiştir. İPKH'ler hastaların kendi somatik hücrelerinden üretilebildiği için, etik problemleri ve nakil sonrası immün reddi gibi riskleri ortadan kaldırır. Ayrıca İPKH'ler EKH'lerin birincil özelliklerini göstermektedir ve bu özellikler göz önüne alındığında, İPKH'lerin doku yenilenmesinde EKH'lerin yerini alarak kemik yenilenmesi için en umut verici kök hücre kaynaklarından birini oluşturabileceği düşünülmektedir. (Teng ve ark. 2014; Bastami ve ark. 2017).

Yapılan çalışmalarda insan İPKH'lerinin farklılaşma potansiyellerinin türetilen hücre tipinden etkilenebileceği gösterilmiştir. Phillips ve ark. çalışmalarında, İPKH farklılaşmasında hücre orijininin in vitro farklılaşma yönteminden daha belirleyici bir rol oynadığını, ancak DF türevli İPKH'lerden in vivo kemik oluşumunun hem miktar hem de kalite açısından kemik iliği kaynaklı MKH türevli İPKH'lere benzer olduğunu öne sürmüştür (Phillips ve ark. 2014).

de Peppo ve ark. gerçekleştirdikleri çalışmalarında hem dermal fibroblastlardan (11c ve 1013A) hem de kemik iliği kaynaklı MKH'lerden (BC1) insan İPKH'leri üretmişlerdir. Hem 1013A hem de BC1'den türetilmiş osteojenik progenitörlerin, erken osteogenez belirteci olan ALP ekspresyonu ve kalsiyum birikimini yüksek derecede arttırdığı, ancak 11c'den türetilmiş osteojenik progenitörlerin zayıf osteojenik farklılaşma ve daha az mezenkimal farklılaşma potansiyeli gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca, 12 haftalık subkutan implantasyondan sonra 1013A türevli osteojenik progenitörlerin kemik benzeri bir doku sergilediği ve BC1'den türetilmiş osteojenik

progenitörlerin distrofik kalsifikasyon ve yüksek mineral içeriği alanları gösterdiği saptanmıştır (de Peppo ve ark. 2013). Bu durum farklı kökenlerden gelen İPKH'lerin farklı rejeneratif özelliklere sahip olduğunu gösterir.

Ishiy ve ark.'ları hem SHED'den (düşen süt dişi kök hücreleri) hem de insan fibroblastından türetilen İPKH'lerin ALP regülasyonunu arttırdığını bildirmiştir. Bununla birlikte, SHED türevli İPKH'lerde ALP aktivitesi ve kalsiyum mineralizasyonunun, fibroblast türevli İPKH'lerden daha fazla olduğu belirtilmiştir (Ishiy ve ark. 2015).

Hynes ve ark.'ları gerçekleştirdikleri bir çalışmada üç değişik somatik hücreden; dişeti fibroblastları, periodontal ligament (PDL) ve akciğer fibroblastlarından üretilen İPKH'lerin özelliklerini değerlendirmişlerdir. Bu hücreleri osteokondüktif bir iskele ile deri altına implante etmişler ve diğer iki hücre kaynağı ile karşılaştırıldığında PDL'den üretilen osteo-İPKH'lerin daha fazla mineralize yapı gösterdiğini saptamışlardır. Ayrıca, PDL türevli İPKH'lerden türetilen MKH'lerin, in vivo olarak kemik ve sementuma benzer şekilde Sharpey lifleri ve mineralize edilmiş doku oluşturduğu gösterilmiştir (Hynes ve ark. 2014). Bu nedenle İPKH'lerin MKH benzeri hücrelere farklılaştırılmasından sonra bile epigenetik hafızalarını koruduğu varsayılabilir.

Nasu ve ark.'ları kemik iliği kaynaklı MKH'leri ve dermal fibroblast (DF) kaynaklı olan İPKH'leri karşılaştıran osteoblast gen ekspresyon profillerinde anlamlı bir fark olmadığını göstermişlerdir (Nasu ve ark. 2013). Bu çalışmalar İPKH'lerin kökeninin osteojenik potansiyel üzerindeki etkisi üzerinde bir tartışma başlatmıştır.

Hücre kaynağı tipine ek olarak İPKH'lerin farklılaşma potansiyelinin donör yaşından etkilenmediği gösterilmiştir (Phillips ve ark. 2014).

Anguera ve ark. çalışmalarında cinsiyete özgü farklılıklar gözlemlense de kadın İPKH'lerinin epigenetik olarak daha az stabil olduklarını belirtmişlerdir (Anguera ve ark. 2012).

Bu tez çalışmasında kullanılan İPKH'ler; beyaz ırka mensup sağlıklı erkek donörlerin kemik iliği CD34+ hücrelerden sendai virus reprogramlanması ile elde edilmiştir. Kullanılan İPKH'ler MKH'ye ve osteojenik hücrelere farklılaştırılmıştır.

Kemik rejenerasyonu için İPKH'lerin uygulanmasında İPKH'lerin pluripotensitesi ile ilişkili tümörjenisiteyi sınırlandırmak için nakil öncesinde İPKH'lerin osteoprogenitör hücrelere ve MKH'lere in vitro farklılaşması gerekmektedir. (Li ve ark. 2010; Bilousova ve ark. 2011; Wang ve ark. 2015).

Kemik rejenerasyonu amacıyla İPKH'lerin osteojenik farklılaşmasını geliştirmek için üç ana yaklaşım kullanılmıştır: 1. Geleneksel bir yöntem olan deksametazon, askorbik asit ve β -gliserofosfat dahil osteojenik ortam (OM)'de indüksiyon. 2. OM'ye eklenen BMP-2 gibi büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin uygulanması. 3. mineralizasyon indüksiyonu; kalsiyum fosfat veya HA/TCP gibi mineralize bazlı doku iskelelerinin kullanılması (Bastami ve ark. 2017) .

İPKH'ler; osteoprogenitör hücreleri üretmek için osteojenik farklılaşmanın ara adımı olan embriyoid cisim (EC-üç germ tabakasından kaynaklanan çeşitli hücre tiplerine yönlendirilmiş hücrelerden, farklılaşmamış olanlara kadar değişen hücre topluluğu) oluşumuna yönlendirilirler (Li ve ark. 2010; Bilousova ve ark. 2011; Wang ve ark. 2015). Diğer çalışmalarda, İPKH'lerin osteojenik indüksiyonunda bu adımı atlamak için farklı stratejiler uygulanmış (de Peppo ve ark. 2013; Zou ve ark. 2013; Dogaki ve ark. 2014) ayrıca İPKH'lerin osteoblast soylarına doğrudan farklılaşmasını da bildirmiştir (Levi ve ark. 2012; Jin ve ark. 2013; Phillips ve ark. 2014). β -gliserol fosfattan, askorbik asitten ve deksametazondan oluşan OM, İPKH'lerin osteo indüksiyonunda yaygın olarak kullanılmıştır (Ko ve ark. 2014; Barnset ve Hsiao 2016). Bununla birlikte, besiyerine dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), insülin büyüme faktörü-1 (IGF-1), fibroblast büyüme faktörü (FGF) veya D3 vitamini eklenmesinin İPKH'lerin osteojenik kapasitesini arttırdığı bildirilmiştir (Kato ve ark. 2013; Ochiai-Shino ve ark. 2014).

Jin ve ark. tarafından yürütülen bir in vivo çalışmada OM yaklaşımı İPKH'lerin osteojenik indüksiyonu için kullanılmıştır. Histolojik değerlendirme polikaprolakton (PCL)'de kültürlenmiş osteo-İPKH'lerin farelere subkütan transplantasyonunda 4 hafta boyunca teratoma oluşumu olmadığını ortaya koymuştur. Çalışmalarında İPKH'ler gen transdüksiyonu veya büyüme faktörleri ile tedavi edilmeden OM'de tutulmuştur (Jin ve ark. 2013).

Bu tez çalışmasında İPKH'lerin osteojenik farklılaştırılması için osteojenik farklılaşma besiyeri olarak %10 Fetal Bovin Serum, %1Penisilin ve Streptomisin,

50 µm askorbik asit, 100 nm dekzametazon ve 10 mm β-gliserofosfat içeren düşük glukozlu DMEM seçildi.

İnsan İPKH-MKH özelliklerinin hem in vitro hem de in vivo olarak kemik iliği, yağ, göbek kordonu, vb. gibi yetişkin dokulardan türetilen MKH'lere benzer olduğu gösterilmiştir (Jung ve ark. 2012). İPKH-MKH'leri hücre çoğalması ve büyümesindeki avantajlarının yanı sıra yetişkin MKH'lere göre daha yüksek telomeraz aktivitesi ve daha az yaşlanma belirtisi göstermiştir (Lian ve ark. 2010; Tsuji ve ark. 2010). Yang ve ark.'ları gerçekleştirdikleri bir çalışmada; sıçan İPKH türevli MKH'lerin deneysel periodontitiste iltihabı azaltabildiğini, alveoler kemik rezorpsiyonunu önleyebildiğini ve potansiyel olarak periodontal dokuların tedavisi ve rejenerasyonunda alternatif olabileceğini göstermişlerdir (Yang ve ark. 2014).

Lian ve ark.'ları insan İPKH'lerinden türetilen fonksiyonel MKH'lerin geleneksel MKH kültüründe izole edilebildiğini, saflaştırılabildiğini ve sürdürülebildiğini göstermiştir (Lian ve ark. 2010).

İPKH-MKH'lerin üretilmesi için, İPKH kolonilerinin tek hücrelere ayrıştırılması yoluyla embriyoid cisim (EC) oluşum aşaması olan ve olmayan iki ana strateji uygulanmaktadır (Ulloa-Montoya ve ark. 2005). EC oluşumu EKH'lerin ve İPKH'lerin MKH'lere farklılaştırılmasında bir ara adım olarak kabul edilir (Lee ve ark. 2014).

İPKH'lerden EC'lerin elde edilmesi için rutin protokol, fibroblast büyüme faktörü (FBF) içermeyen EKH medyumunda İPKH'lerin kültürlenmesidir. FBF, mezodermal soya doğru hücre bağlılığını arttırdığı için ortamdan çıkarılmalıdır (Lee ve ark. 2013).

Bilousova ve ark.'ları EC'lerin retinoik asit ile muamele edilmesinin mezenkimal soy için hücre bağlılığını arttırdığını ve jelatin bir iskele üzerinde kültürlendiğinde in vitro ve in vivo kemik rejenerasyonuna yol açtığını öne sürmüştür (Bilousova ve ark. 2011). Li ve ark. yaptıkları iki ayrı çalışmada, EC'lerin TGF-β ve retinoik asit ile tedavi edilmesinin, daha yüksek osteojenik potansiyelin yanı sıra daha yüksek MKH popülasyonuna yol açtığını da ileri sürmüşlerdir (Li ve ark. 2010, Li ve Niyibizi 2012). MKH'lerin kemik morfogenetik proteini-4 (BMP4) ve TGF-β1'i kültür ortamlarına salgıladıkları ve EC'lere insan MKH türevi kültür ortamı uygulanmasının mezenkimal bağlılığı ve kalsiyum birikimini arttırdığı gösterilmiştir (Lee ve ark. 2013).

Ochiai-Shino ve ark. İPKH'lerden EC'lerin oluşumunu takiben OM'ye, TGF- β , IGF-1, FGF-P (TIF) eklemiştir. TIF tedavisinin daha fazla sayıda dokuda spesifik olmayan alkalın fosfataz (TNAP)-pozitif hücreye ve TNAP+ hücrelerinde daha fazla osterix (OSX), kemik Sialoprotein (KSP), OCN, Runx2 ve CoL1a1 ekspresyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Ochiai-Shino ve ark.2014).

Kato ve ark.'ları tarafından yapılan çalışmada OM'ye D3 vitamini eklenmiştir. Bu çalışmada, D3 vitamini eklenmesinin ardından OCN ekspresyonunda belirgin bir artış ve TNAP ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Ayrıca İPKH'lerin D3 vitamini tedavisine kemik iliği kaynaklı MKH'lerden daha fazla yanıt verdikleri ve bu tedavinin 14 gün sonra doza bağlı bir şekilde geç faz osteoblast oluşumunu sağladığı gösterilmiştir(Kato ve ark. 2013).

Hynes ve ark.'ları farklı hücrelerden türetilmiş İPKH'leri MKH'lere farklılaştırmış ve özelliklerini değerlendirmişlerdir. İPKH'den MKH'leri türetmek için kullanılan MKH mediumu olarak 10% FBS, penisilin / streptomisin, sodyum piruvat, L-askorbat-2-fosfat, L-Glutamin ve esansiyel olmayan amino asitler içeren alfa modifiye Eagle's Minimum Essential Medium'u kullanılmıştır (Hynes ve ark. 2014).

Zou ve ark.'larının çalışmasında insan İPKH türevli MKH'lerinden biyobozunur iskeleler kullanarak kemik oluşumu değerlendirilmiştir. İPKH'leri MKH'lere farklılaştırmak için 2 mM L-Glutamin,% 1 penisilin / streptomisin ve % 10 FBS içeren düşük glikozlu DMEM'den oluşan MKH mediumu kullanmışlardır (Zou ve ark. 2013). Kang ve ark.' da İPKH'leri MKH'ye farklılaştırmak için belirtilen MKH mediumunu kullanmışlardır(Kang ve ark. 2014, 2015).

Lepage ve ark.'larının İPKH'lerden türetilen MKH'lerin göbek kordon kanı gibi diğer kaynaklardan elde edilen MKH'lere benzer özellikler gösterdiğini saptamak için gerçekleştirdikleri çalışmada MKH mediumu için % 10 FBSi 0.1 mm esansiyel olmayan amino asitler, 50 U/ml penisilin/streptomisin, 10 uM anaplastik lenfoma kinaz (ALK) inhibitörü ve 5 ng / ml FGF içeren yüksek glukozlu DMEM kullanmışlardır (Lepage ve ark. 2015).

Bu tez çalışmasında İPKH'lerin MKH'lere farklılaştırılması için MKH farklılaşma besiyeri olarak %10 Fetal Bovin Serum ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren yüksek glukozlu DMEM (Dulbecco'nun modifiye eagle medyumu) seçildi.

Kemik doku mühendisliği; hücreleri, iskeleleri, büyüme faktörleri ve sitokinler gibi biyolojik aktif molekülleri birleştirerek ve kullanarak hasarlı dokuyu onarmayı ve yeniden oluşturmayı amaçlamaktadır. Doku mühendisliği stratejileri için çeşitli yaklaşımlar vardır. Bununla birlikte, biyomalzemeler alanının bakış açısından, en çok tercih edilen yaklaşımlardan biri hasarlı dokuları değiştirmek ve hücrelerin yenilerini oluşturmak için hücreleri desteklemek amacıyla defekt alanlarında biyomateryallerin kullanılmasıdır. Bu geçici iskeleler yenilenen dokular için bir şablon görevi görür ve bu iskelelere biyoaktif maddelerin eklenmesi hücrelerin farklılaşmasını ve büyümesini sağlar. İskeleleri inşa etmek için farklı biyomalzeme kaynakları kullanılabilir; ancak uygun bir platform seçimi için gerekli kriterler bulunmaktadır. Biyodegradasyon hızı; hücre çoğalmasını, büyümesini, bütünlüğünü ve konak tepkisini etkileyen önemli bir parametredir. Diğer bir faktör, üç boyutlu yapı iskelelerinin gözenekliliğidir. İskelenin birbirine bağlı gözenekli yapısı, hücresel yapışmayı ve doku yenilenmesini arttırmaktadır. Biyoyumluluk, uygun yüzey kimyası ve mekanik özellikler de kullanılan hücrenin başarı oranını etkileyen önemli parametrelerdir (Bonassar ve Vacanti 1998; Neel ve ark. 2014).

Biyoçözünür alifatik poliestерler, bu kriterleri sağlamada büyük bir potansiyele sahiptir ve bu polimerler arasında, poli-L-laktik asit (PLLA), doku mühendisliği iskelelerini inşa etmek için en yaygın olarak kullanılan termoplastiklerden biridir. PLLA, yenilenebilirlik, biyoyumluluk, işlenebilirlik ve enerji verimliliği gibi birçok avantaja sahiptir. Bununla birlikte, PLLA'nın kırılğan ve hidrofobik doğası, doku mühendisliği uygulamaları için kullanımını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle PLLA'ya başka modifikasyonlar uygulanır. PLLA'nın daha esnek bir yapıya ve hızlı kristalleşme hızına sahip başka bir poliestер ile karıştırılması, polimerin termal ve mekanik özelliklerini geliştirmek için bir stratejidir. Bu karışım, iskele yapımında kullanılmak üzere optimize edilebilecek yeni özellikler gösterecektir (Rasal ve Hirt 2010).

Polibütіlen süksinat (PBS) bu uygulama için uygun bir adaydır. Düşük bir cam geçiş sıcaklığına ve daha yüksek kristalleşme hızına ve işlenebilirliğine sahiptir. Ek olarak, PBS'nin çözünme ürünü, trikarboksilik asit döngüsünde CO₂ ve H₂O'ya dönüştürülen süksinik asittir. PLLA ve PBS'nin harmanlanması daha düşük kristalleşme sıcaklığına neden olmaktadır. Ayrıca uygun bir bileşim belirleyerek, karışım yüksek esnekliğe sahip olabilir. Esnekliğe ek olarak iskelenin gözenekli yapısı da istenen bir

özelliğidir. Bu gözenekli yapı, yapı iskelesine dahil edilen veya yapı iskelesi üzerinde kültürlenmiş hücreler tarafından salgılanan ve çevresindeki doku ve hücrelerin yenilenmesini destekleyen biyoaktif maddelerin salınımını ve geçirgenliğini sağlamaktadır (Shibata ve ark. 2006).

Hücre ortamının ve doku iskelelerinin çeşidinin İPKH'lerin osteojenik potansiyeli üzerinde etkisi bulunmaktadır. Ji ve ark. daha düzgün gözenekler ve pürüzsüz yüzeyle küre şeklindeki nano-hidroksiapatit/kitosan jelatin (nHA/CG) üzerinde çoğalan osteo-İPKH'lerin, çubuk şeklindeki nHA/CG ile karşılaştırıldığında daha fazla ALP, CoL1, Runx2, OCN ve OPN (osteopontin) ekspresyonu gösterdiğini saptamıştır. Ayrıca küre şeklindeki nHA/CG üzerinde kültürlenmiş osteo-İPKH'lerde hem in vitro hem de in vivo olarak daha yüksek mineralleşme gözlenmiştir (Ji ve ark. 2015). Ji ve ark.'larının diğer bir çalışmada, nHA/CG yapı iskelelerine farklı HA konsantrasyonları dahil edilmiştir. % 3 HA ile % 1 HA karşılaştırıldığında, %3 HA iskelede %1 HA iskeletinin daha yumuşak ve büyük gözenekli olmasına rağmen daha fazla kemik hacmi ve daha yüksek Runx2 ve OCN miktarı saptanmıştır (Ji ve ark. 2016).

İPKH'lerden türetilen osteoblastların ve osteoklastların, yüksek HA içeriğine sahip kompozit yapı iskeleleri (PLGA-PLLA-HA) üzerindeki ortak kültürünün kemik oluşumunu olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (Jean ve ark. 2016). Ardeshiryajimi ve ark. yaptığı iki çalışmada, polistirol doku iskelelerinde ekilen osteo-İPKH'lerin osteojenik potansiyeli in vitro olarak değerlendirilmiştir. Her iki çalışmada da polistirol yapı iskelelerinde osteo-İPKH'lerde yüksek düzeyde ALP aktivitesi ve Runx2, OCN ve CoL1 ekspresyonu saptanmıştır (Ardeshiryajimi ve ark. 2013a; 2013b).

Xie ve ark. hidroksiapatit / kollajen / kitosan (HA / Col / CTS) iskelelerinin hem osteoindüktif hem de osteokondüktif olduğunu ve osteo-İPKH'ler ile birlikte uygulandığında kalvariyal defektin tam onarımının gözlemlendiğini göstermiştir (Xie ve ark. 2016).

Thein-Han ve ark. osteo-İPKH'lerin osteojenik potansiyelini 5 farklı çift fonksiyonlu ajan, RGD (Arg-Gly-Asp) peptidleri, fibronektin (Fn), fibronektin benzeri tasarlanmış polimer proteini (FEPP), hücre dışı matris Geltrex ve trombosit konsantrasyonu içeren kalsiyum fosfat simanı (CPC) üzerinde değerlendirilmiştir. CPC'nin RGD, Fn ve trombosit konsantrasyonu ile modifikasyonunun, ALP, Runx2 ve CoL1 ekspresyonunu

arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca, yapılan modifikasyon ile daha fazla mineralizasyon gözlenmiştir (Thein-Han ve ark. 2013).

Levi ve ark.'ları in vitro olarak OM'a BMP2 ilave ederek İPKH'lerin osteojenik yeteneklerini incelemişlerdir. Daha sonra insan İPKH'leri ve EKH'lerini HA kaplı PLGA üzerine ekerek, farelerde 4 mm'lik bir kalvaryal defekte uygulayıp kemik rejenerasyon potansiyelerini değerlendirmişlerdir. İn vitro olarak BMP2, OM'ye eklendiğinde, sadece Oct 3/4 ekspresyonu olmadığını, Nanog ve Sox2'nin 7 gün sonra azaldığını, aynı zamanda osteojenik markırlardan Runx2 ve OCN'nin de önemli ölçüde regüle edildiğini göstermişlerdir. Ayrıca immün boyamada, BMP2 içermeyen HA-PLGA yapı iskelesine kıyasla, HA-PLGA+BMP2 üzerine ekilmiş EKH'lerde ve İPKH'lerde Runx2 ve OCN'nin daha yüksek ekspresyonu olduğunu belirtmişlerdir. İnsan İPKH'leri HA-PLGA ve HA-PLGA+BMP-2 iskelelerine ekilerek 27 deney hayvanına uygulanmış ve hiçbir teratom gözlenmemiştir. Ancak bu iskelelere ekilen insan EKH'leri uygulanan 15 deney hayvanında iki teratom vakası tespit edilmiştir (Levi ve ark. 2012).

Kang ve ark.'nın gerçekleştirdiği çalışmada; İPKH'lerin herhangi bir büyüme faktörü ve osteojenik uyarıcı küçük moleküller içermeyen bir büyüme ortamı üzerinde osteojenik farklılaşmada mineralize jelatin-metakrilat-akasilil-6-aminokaproik asit-kopolimer (etilen glikol) -diakrilat makrozöz hidrojel üzerinde çoğaldığı gösterilmiştir. Mineral matrislerin 3D kültürü, mineralleştirilmemiş matrislerle karşılaştırıldığında Runx2, OCN ve salgılanan fosfoprotein 1'in (SPP1) belirgin şekilde artış göstermiştir (Kang ve ark. 2014).

Okawa ve ark. çalışmalarında iskele kullanmak yerine hücreleri ısıya cevap veren poli-N izopropilakrilamid (pNIPAAm) jel kalıp hücre odaları ve 3D top benzeri hücre yapıları üzerinde kültürlemiş ve bu 3D iskele, serbest hücre yapılarının in vivo olarak osteoindüktif özelliklere sahip olduğunu öne sürmüştür (Okawa ve ark. 2016).

Kang ve ark. insan fibroblast türevli İPKH'lerin PCL ve PCL-nHA doku iskeleleri ile olan etkileşimlerini değerlendirmiştir. Runx2, ALP, CoL1A1 ve OC'nin her iki iskelede de yüksek miktarda olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu genlerin ekspresyonu iki iskelede farklı zaman noktalarında tespit edilmiştir. Ayrıca, OC gen ekspresyonundaki artışın PCL-nHA iskelesinde PCL iskelesine göre daha fazla olduğu saptanmıştır (Kang ve ark. 2014).

Zou ve ark. PCL ve polimer hyaluronan ve seramik TCP iskeleleri üzerindeki İPKH'lerin osteojenik potansiyelini karşılaştırdı. Çalışmalarının sonuçları polimer hyaluronanda osteo-İPKH'lerde anlamlı derecede yüksek ALP aktivite seviyeleri ve daha yüksek kalsiyum miktarını göstermiştir (Zou ve ark. 2013).

Bu tez çalışmasında; Poli bütülen süksinat (PBS) ve poli-L-laktik asit (PLLA) polimerlerinin diklorometan çözücüsündeki %4'lük (Ağırlık/Hacim) 1:1 (PBS:PLLA) çözeltisiyle 300-500 mikrometre arasında çapları olan gözenekli porlara sahip sünger formunda doku iskeleleri kullanıldı.

Hayvan deneylerinde en çok kullanılan hayvanlar sıçanlardır. Ucuz olmaları, insana benzer iyileşme süreçleri göstermeleri ve kolay bakılmaları gibi avantajları vardır. Metabolizmalarının hızlı, yaşam sürelerinin ise kısa olması nedeniyle kemik iyileşme sürelerinin değerlendirilmesi daha kolaydır (Liebschner 2004). Kemik iyileşmesinin değerlendirildiği çalışmalarda yüksek maliyetli olmaları ve insana benzerlik açısından iyileşme süreçlerinin sıçanlar kadar başarılı olmaması sebebiyle büyük hayvanlar tercih edilmezler. (Aerssens ve ark. 1998; Liebschner 2004)

Maliyetlerinin düşük olması, iyileşme sürelerinin hızlı olması ve elde edilecek veri havuzunun geniş olması gibi sebepler nedeniyle bu tez çalışmasında da sıçanlar kullanılmıştır.

Kemik greft materyallerinin en sık test edildiği bölge olan kalvaryaya, supraorbital kenardan eksternal oksipital çıkıntıya kadar uzanır; her iki parietal kemiği, oksipital ve temporal kemiğin skuamöz parçalarını, frontal kemik ve sphenoid kemiğin büyük kanadının bir kısmını içermektedir. Morfolojik ve embriyolojik olarak kalvaryaya membranöz kemikleşme ile oluşmaktadır. Bu nedenle kalvaryal yara modelleri maksillofasiyal bölgeye çok benzer. Fizyolojik olarak kalvaryadaki kortikal kemik atrofik mandibulaya benzerdir. Anatomik olarak ise kalvaryaya, mandibulaya benzer şekilde süngerimsi kemiğin arada kaldığı iki kortikal tabakadan oluşmaktadır (Schmitz ve Hollinger 1986; Bosch ve ark. 1998).

Ratların kalvaryalarında kritik defekt boyutu (KDB) ile ilgili ilk çalışma Freeman ve Turnbull tarafından yapılmıştır. Çalışmada parietal kemikte oluşturulan 2 mm çapındaki defektin 12. hafta sonunda iyileşemediği gösterilmiştir (Freeman ve Turnbull 1973). Tagaki ve Urist 6 aylık Sprague Dawley ratlarda 8 mm çapında

kalvaryal defektler oluşturmuşlar ve 4. haftada defektlerin 5 mm'ye indiğini ve 12. hafta sonunda daha fazla iyileşmenin görülmeyişini belirtmişlerdir (Tagaki ve Urist 1982).

Mulliken ve Glowacki, 28 günlük Charles River ratlarında parietal kemikte 4 mm çapında defektler oluşturmuşlar ve bu defektlerin 6. ay sonunda tamamen iyileşmediğini, buna karşılık demineralize kemik tozu konulan defektlerin 2. haftada kemik iyileşmesi bulguları gösterdiğini belirtmişler ve ratlarda 4 mm çapındaki defekt miktarını KBD olarak tanımlamışlardır (Mulliken ve Glowacki 1980).

Bu tez çalışmasında da Mulliken ve Glowacki'nin çalışması esas alınarak KBD olarak 4 mm kalvaryal defekt seçilmiştir.

Osteo-İPKH'lerin ve MKH-İPKH'lerin karşılaştırıldığı çalışmalar bu hücre çeşitlerinin eşit bir osteojenik kabiliyete sahip olduğunu göstermiştir(Bastami ve ark 2016).

Ardeshirylajimi ve ark. çalışmasında, insan fibroblastından türetilmiş İPKH'lerin osteojenik indüksiyonunu, adipoz türevli mezenkimal kök hücrelerle (AdKH'ler) karşılaştırılmıştır. Osteo-İPKH'lerin 7., 14. ve 21. günlerinde anlamlı olarak daha yüksek bir ALP aktivitesi rapor edilmiştir. Gen ekspresyonu analizi, Runx2'nin AdKH'lerde 7 ve 14 gün sonra önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, OCN İPKH'lerde önemli ölçüde daha yüksek bir oranda ifade edilmiştir (Ardeshirylajimi ve ark. 2014).

Kang ve ark.'ları mRNA (mRNA-İPKH'ler) ve lentiviral vektör (Lenti-İPKH'ler) transdüksiyonu ile İPKH'leri yeniden programlamıştır. Çalışmalarının sonucunda, osteo-Lenti-İPKH'lerde osteo-mRNA-İPKH'lerden daha homojen ve sağlam bir kalsiyum birikimi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca osteo-Lenti-iPKH'lerin osteo-kemik iliği kaynaklı MKH'lere benzer bir osteogenez yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir (Kang ve ark. 2015).

Benzer şekilde de Poppo tarafından yapılan araştırma, kemik iliği kaynaklı MKH'ler ve osteo-indüklenmiş EKH'lerden türetilmiş osteo-İPKH'lerin benzer mineralizasyon seviyeleri olduğunu göstermiştir (de Peppo ve ark. 2013).

Kang ve ark. çalışmasında insan fibroblast türevli İPKH'lerin, yetişkin kemik iliği kaynaklı MKH'lere benzer osteojenik özellikleri olduğunu göstermiştir(Kang ve ark.2014).

Bu tez çalışmasında İPKH-MKH ve osteo-İPKH hücrelerinin 4 hafta sonra meydana getirdikleri kemik hacmi miktarı karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmamıştır. İPKH-MKH ve osteo-İPKH hücrelerinin ile boş defektin karşılaştırılması sonucu kemik hacminin anlamlı derecede arttığı saptanmıştır.



6. SONUÇLAR

- Osteojenik olarak farklılaştırılmış indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin osteojenik potansiyelleri gösterilmiştir.
- Mezenkimal kök hücelere farklılaştırılmış indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin osteojenik potansiyelleri gösterilmiştir.
- Mezenkimal kök hücreye farklılaştırılmış İPKH ile osteojenik farklılaştırılmış İPKH arasında kemik rejenerasyonu açısından farklılık bulunmamıştır.
- Kök hücrelerin oral cerrahi ve implantolojide kullanılması için, daha standart çalışma tasarımları, artmış örnekler ve uzun süreli gözlemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışması kök hücre tedavisinin alveolar kemik oluşumu için etkili olduğuna dair kanıtlar sunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Aerssens, J., Boonen, S., Lowet, G. ve Dequeker, J. (1998). Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology*, **139**(2), 663-70.
- Alison, M.R., Poulson, R., Forbes, S. ve Wright, N.A. (2002). An Introduction to stem cells. *J Pathol*, **197**, 419-423.
- Amabile, G. ve Meissner, A. (2009). Induced pluripotent stem cells: current progress and potentials for regenerative medicine. *Trends Mol Med*, **15**, 59-68.
- Amini, A.R., Laurencin, C.T. ve Nukavarapu, S.P. (2012). Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*, **40**(5), 363–408.
- An, S.H., Matsumoto, T., Miyajima, H., Nakahira, A., Kim, K.H. ve Imazato, S. (2012). Porous zirconia/hydroxyapatite scaffolds for bone reconstruction. *Dent Mater*, **28**, 1221.
- Andrades, J.A., Claros, S., Palomo, P.J., Lopez-Puerta JM, Zamora-Navas P, Guerado E ve ark. (2011). Skeletal regeneration by mesenchymal stem cells: what else? Regenerative medicine and tissue engineering. *Cells and Biomaterials*, **5**, 107-144.
- Anguera, M.C., Sadreyev, R., Zhang, Z., Szanto, A., Payer, B., Sheridan, S.D. ve ark. (2012). Molecular signatures of human induced pluripotent stem cells highlight sex differences and cancer genes. *Cell Stem Cell*, **11**, 75–90.
- Ardeshirylajimi, A. ve Soleimani, M. (2015). Enhanced growth and osteogenic differentiation of induced pluripotent stem cells by extremely low-frequency electromagnetic field. *Cellular and Molecular Biology*, **61**(1), 36–41.
- Ardeshirylajimi, A., Dinarvand, P., Seyedjafari, E., Langroudi, L., Adegani, F.J. ve Soleimani, M. (2013a). Enhanced reconstruction of rat calvarial defects achieved by plasma-treated electrospun scaffolds and induced pluripotent stem cells. *Cell Tissue Res*, **354**, 849–860.
- Ardeshirylajimi, A., Hosseinkhani, S., Parivar, K., Yaghmaie, P. ve Soleimani, M. (2013b). Nanofiber-based polyethersulfone scaffold and efficient differentiation of human induced pluripotent stem cells into osteoblastic lineage. *Mol Biol Rep*, **40**, 4287-4294.
- Ardeshirylajimi, A., Soleimani, M., Hosseinkhani, S., Parivar, K. ve Yaghmaei, P. (2014). A comparative study of osteogenic differentiation human induced pluripotent stem cells and adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Cell J*, **16**, 235–244.
- Asgari, S., Pournasr, B., Salekdeh, G.H., Ghodsizadeh, A., Ott, M. ve Baharvand, H. (2010). Induced pluripotent stem cells: a new era for hepatology. *J Hepatol*, **53**, 738-51.
- Ashammakhi, N. (2003). Topics in tissue engineering. *Electronic book*. p. 1-46.

- Avcılar, H., Saraymen, B., Özturan, O.Ö. ve Köke, M.Y. (2017). Embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Asthma Allergy Immunol*, **15**, 1-6.
- Barruet, E. ve Hsiao, E.C. (2016). Using human induced pluripotent stem cells to model skeletal diseases. *Methods Mol Biol*, **1353**, 101–118.
- Bastami, F., Nazeman, P., Moslemi, H., Rezai Rad, M., Sharifi, K. ve Khojasteh, A. (2017). Induced pluripotent stem cells as a new getaway for bone tissue engineering: A systematic review. *Cell Prolif*, **50(2)**. doi: 10.1111/cpr.12321.
- Bayart, E. ve Cohen-Haguenauer, O. (2013). Technological overview of IPS induction from human adult somatic cells. *Curr Gene Ther*, **13**, 73-92.
- Behnia, H., Khojasteh, A., Kiani, MT., Khoshzaban, A., Mashhadi Abbas, F., Bashtar, M. ve ark. (2013). Bone regeneration with a combination of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel, platelet rich growth factor, and mesenchymal stem cells: a histologic study in rabbit calvaria. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, **115**, 7–15.
- Behnia, H., Khojasteh, A., Soleimani, M., Tehranchi, A. ve Atashi, A. (2012). Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: a preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg*, **40**, 2–7.
- Bell, R.B., Blakey, G.H., White, R.P., Hillebrand, D.G. ve Molina, A. (2002). Staged reconstruction of the severely atrophic mandible with autogenous bone graft and endosteal implants. *J Oral Maxillofac Surg*, **60(10)**, 1135–41.
- Bertolai, R., Catelani, C., Aversa, A., Rossi, A., Giannini, D. ve Bani, D. (2015). Bone graft and mesenchymal stem cells: clinical observations and histological analysis. *Clin Cases Miner Bone Metab*, **12**, 183–187
- Bianco, P. ve Robey, P.G. (2015). Skeletal stem cells. *Development*, **142**, 1023–1027
- Bilousova, G., Jun du, H., King, K.B., De Langhe, S., Chick, W.S., Torchia, E.C. ve ark. (2011). Osteoblasts derived from induced pluripotent stem cells form calcified structures in scaffolds both in vitro and in vivo. *Stem Cells*, **29**, 206–216.
- Bishop, A.E., Buttery, L.D. ve Polak, J.M. (2002). Embryonic stem cells. *J Pathol*, **197**, 424-429.
- Black, C.R., Goriainov, V., Gibbs, D., Kanczler, J., Tare, R.S. ve Oreffo, R.O. (2015). Bone tissue engineering. *Curr Mol Biol Rep*, **1(3)**, 132–40.
- Blau, H.M., Brazelton, T.R. ve Weimann, J.M. (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*, **105**, 829-841.
- Bonassar, L.J. ve Vacanti, C.A. (1998). Tissue engineering: the first decade and beyond. *J Cell Biochem*, **30**, 297-303.
- Bongso, A. ve Lee, E.H. (2005). *Stem cells: from bench to bedside*. Singapore: World Scientific Publishing.

- Bosch, C., Melsen, B. ve Vargervik, K. (1998). Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg*, **9(4)**, 310-6.
- Calori, G.M., Mazza, E., Colombo, M. ve Ripamonti, C. (2011). The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? *Injury*, **42(2)**, S56–63.
- Campagnoli, C., Roberts, I.A. ve Kumar, S. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, **98**, 2396-402.
- Can, A. (2008). A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turk J Hematol*, **25**, 57-59.
- Casagrande, L., Mattuella, L.G., de Araujo, F.B. ve Eduardo, J. (2006). Stem cells in dental practice: perspectives in conservative pulp therapies. *J Clin Pediatr Dent*, **31(1)**, 25-27.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., ve ark. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, **113**, 643-55.
- Chen, C. ve Xiao, S.F. (2011). Induced pluripotent stem cells and neurodegenerative diseases. *Neurosci Bull*, **27**, 107.
- Chen, K.Y., Dong, G.C., Hsu, C.Y., Chen, Y.S. ve Yao, C.H. (2013). Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous gelatin scaffolds containing *Drynaria fortunei* extract for bone repair. *J Biomed Mater Res A*, **101**, 954.
- Chen, W., Zhou, H., Weir, M.D., Tang, M., Bao, C. ve Xu, H.H. (2013). Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on calcium phosphate cement-chitosan- RGD scaffold for bone repair. *Tissue Eng Part A*, **19**, 915.
- Chen, X.D., Dusevich, V., Feng, J.Q., Manolagas, S.C. ve Jilka, R. L. (2007). Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, **22(12)**, 1943–1956.
- Cibickova, L., Palicka, V., Cibicek, N., Cermáková, E., Micuda, S., Bartosová, L. ve ark. (2007). Differential effects of statins and alendronate on cholinesterases in serum and brain of rats. *Physiol Res*. **56(6)**, 765-70.
- Colnot, C. (2011). Cell sources for bone tissue engineering: insights from basic science. *Tissue Eng*. **17**, 449.
- Condic, M.L. ve Rao, M. (2010). Alternative sources of pluripotent stem cells: ethical and scientific issues revisited. *Stem Cells Dev*, **19**, 1121-1129.
- D'Angelo, F., Armentano, I., Cacciotti, I., Tiribuzi, R., Quattrocchi, M., Del Gaudio, C., ve ark. (2012). Tuning multi/pluri-potent stem cell fate by electrospun poly(L-lactic acid)-calcium-deficient hydroxyapatite nanocomposite mats. *Biomacromolecules*, **13(5)**, 1350–1360.

Dang, C.V. (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 1–11.

Daughtry, B. ve Mitalipov, S. (2014). Concise review: Parthenote stem cells for regenerative medicine: Genetic, epigenetic, and developmental features. *Stem Cells Transl Med*, **3**, 290-8.

de Mendonça Costa, A., Bueno, D.F., Martins, M.T., Kerkis, I., Kerkis, A., Fanganiello, R.D. ve ark. (2008). Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *J Craniofacial Surg*, **19**, 204-210

De Miguel, M.P., Fuentes-Julian, S. ve Alcaina, Y. (2010). Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Rev*, **6**, 633-649.

de Peppo, G.M., Marcos-Campos, I., Kahler, D.J., Alsalman, D., Shang, L., Vunjak Novakovic, G. ve ark. (2013). Engineering bone tissue substitutes from human induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**, 8680–8685.

Dogaki, Y., Lee, S.Y., Niikura, T., Iwakura, T., Okumachi, E., Waki, T. ve ark. (2014). Efficient derivation of osteoprogenitor cells from induced pluripotent stem cells for bone regeneration. *Int Orthop*, **38**, 1779–1785.

Eroschenko, V.P. (2008). Di fiore's atlas of histology with functional correlations. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 79-91.

Evans, M.J. ve Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotent tail cells from Mouse embryos. *Nature*, **292**, 154-6.

Felice, P., Pistilli, R., Lizio, G., Pellegrino, G., Nisii, A. ve Marchetti, C. (2009). Inlay versus onlay iliac bone grafting in atrophic posterior mandible: a prospective controlled clinical trial for the comparison of two techniques. *Clin Implant Dent Relat Res*, **11(1)**, 69–82.

Fortier, L.A. (2005). Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery*, **34**, 415–423.

Freeman, E. ve Turnbull, R.S. (1973). The role of osseous coagulum as a graft material. *J Periodont Res*, **8**, 229.

Friedenstein, A.J., Gorskaja, U. ve Kalugina, N.M. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, **4**, 267-274.

Fuchs, E. ve Serge, J.A. (2000). Stem cells a new lease on life, *Cell*, **100**, 143-155.

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K. ve Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, **85**, 348-62.

- Gamie, Z., Tran, G.T., Vyzas, G., Korres, N., Heliotis, M., Mantalaris, A. ve ark. (2012). Stem cells combined with bone graft substitutes in skeletal tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther*, **12**, 713.
- Gardner, R.L. ve Brook, F.A. (1997). Reflections on the biology of embryonic stem cells. *Int J Dev Biol*, **41**, 235–43.
- Garg, A. (2004). Bone biology, harvesting and grafting for dental implants. Chigago: Quintessence Publishing Co.
- Gartner, L.P. (2001). Color textbook of Histology. Philadelphia: Saunders. Elsevier.
- Ghaleb, A.M. ve Yang, V.W. (2017) Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene*, **611**, 27-37. doi: 10.1016/j.gene.2017.02.025. Epub 2017 Feb 22.
- Gimble, J., Rad, M.R ve Yao, S. (2013). Adipose tissue–derived stem cells and their regeneration potential. In: George T.J. Huang and Irma Thesleff. Stem cells in craniofacial development and regeneration. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Gluckman, E., Broxmeyer, H.A., Auerbach, A.D., Friedman, H.S., Douglas, G.W. Devergie, A. ve ark. (1989). Hematopoetic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling, *N Eng J Med*, **321**, 1174-8.
- Graves, K.H. ve Moreadith, R.W. (1993). Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*, **36**, 424-33.
- Gronthos S., Brahim J., Li W., Fisher L.W., Cherman N., Boyde A. ve ark. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, **81**, 531-535.
- Gundersen, H.J.G., Bendtsen, T.F., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K. ve ark. (1988) Some new, simple, and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, **96**, 379-94.
- Hall, M.B., Vallerand, W.P., Thompson, D. ve Hartley, G. (1991). Comparative anatomic study of anterior and posterior iliac crests as donor sites. *J Oral Maxillofac Surg*, **49(6)**, 560–3.
- Hayashi, T., Misawa, H., Nakahara, H., Noguchi, H., Yoshida, A., Kobayashi, N. ve ark. (2012). Transplantation of osteogenically differentiated mouse iPS cells for bone repair. *Cell Transplantation*, **21(2–3)**, 591–600.
- Hernigou, P. (2015). Bone transplantation and tissue engineering. Part II: bone graft and osteogenesis in the seventeenth, eighteenth and nineteenth centuries. *Int Orthop*, **39(1)**, 193–204.
- Holzwarth, J.M., ve Ma, P.X. (2011). Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, **32(36)**, 9622– 9629.

- Horii, T. ve Hatada, I. (2011). Reprogrammed parthenogenetic ES cells - New choice for regenerative medicine. In: Atwood C (ed). *Methodological Advances in the Culture, Manipulation and Utilization of Embryonic Stem Cells for Basic and Practical Applications*. 1st ed. New York: InTech,: 221-36.
- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H. ve ark. (2013). Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, **341**, 651-4.
- Hui, H., Tang, Y., Hu, M. ve Zhao, X. (2011). Stem cells: general features and characteristics. Gholamrezanezhad (Ed.), *Stem Cells in Clinic and Research*. Erişim 23.08.2011, <http://www.intechopen.com/books/stem-cells-in-clinic-and-research/stem-cells-general-features-and-characteristics>
- Hynes, K., Menicanin, D., Mroziak, K., Gronthos, S. ve Bartold, P.M. (2014). Generation of functional mesenchymal stem cells from different induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells Dev*, **23**, 1084–1096.
- Iglesias-Garcia, O., Pelacho, B. ve Prosper, F. (2013). Induced pluripotent stem cells as a new strategy for cardiac regeneration and disease modeling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **62**, 43–50.
- Ishiy, F.A., Fanganiello, R.D., Griesi-Oliveira, K., Suzuki, A.M., Kobayashi, G.S., Morales, A.G. ve ark. (2015). Improvement of in vitro osteogenic potential through differentiation of induced pluripotent stem cells from human exfoliated dental tissue towards mesenchymal-like stem cells. *Stem Cells Int*, **2015**, 249098.
- İskender, B. ve Canatan, H. (2013). İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ve hücre tedavisi. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, doi: 10.5799/ahinjs.01.2013.04.0346
- Ito, K. ve Perren, S.M. (2007). *AO principles of fracture management*. Second expanded edition Vol. 1. Switzerland, George Thieme Verlag.
- Jee, W.S.S. (2001). *Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology*. İçinde: Cowin SC (ed). *Bone Mechanics Handbook*. 2. ed. CRC Press, Florida, 1-68.
- Jensen, A.T., Jensen, S.S. ve Worsaae, N. (2016). Complications related to bone augmentation procedures of localized defects in the alveolar ridge. A retrospective clinical study. *Oral Maxillofac Surg*, **20(2)**, 115–22.
- Jensen, S.S. (2016). *Bone grafting in bone repair: experimental studies*. Doktora tezi. Copenhagen: Copenhagen University Hospital.
- Jeon, O.H., Panicker, L.M., Lu, Q., Chae, J.J., Feldman, R.A. ve Elisseeff, J.H. (2016). Human iPSC-derived osteoblasts and osteoclasts together promote bone regeneration in 3D biomaterials. *Sci Rep*, **6**, 26761.
- Ji, J., Tong, X., Huang, X., Wang, T., Lin, Z., Cao, Y. ve ark. (2015). Sphere-shaped nano-hydroxyapatite/ chitosan/ gelatin 3D porous scaffolds increase proliferation and

osteogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells from gingival fibroblasts. *Biomed Mater*, **10**, 045005.

Ji, J., Tong, X., Huang, X., Zhang, J., Qin, H. ve Hu, Q. (2016). Patient-derived human induced pluripotent stem cells from gingival fibroblasts composited with defined nanohydroxyapatite/ chitosan/ gelatin porous scaffolds as potential bone graft substitutes. *Stem Cells Transl Med*, **5**, 95–105.

Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz Gonzalez, X.R. ve ark. (2002). Pluripotency of Mesenchymal Stem Cells Derived From Adult Marrow. *Nature*, **418**, 41-49.

Jin, G.Z., Kim, T.H., Kim, J.H., Won, J.E., Yoo, S.Y., Choi, S.J. ve ark. (2013). Bone tissue engineering of induced pluripotent stem cells cultured with macrochanneled polymer scaffold. *J Biomed Mater Res, Part A*, **101**, 1283–1291.

Jung, Y., Bauer, G. ve Nolte, J.A. (2012). Concise review: induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells: progress toward safe clinical products. *Stem Cells*, **30**, 42–47.

Junqueira, L.C. ve Carneiro, J (2007). Basic Histology Text & Atlas. Vol. Chapter 8., New York: The McGraw-Hill Co.

Junqueira, L.C. ve Carneiro, J. (2006). Temel Histoloji (Çeviri: Aytekin, Y., Solakoğlu, S.) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

Kang, H., Shih, Y.V., Hwang, Y., Wen, C., Rao, V., Seo, T. ve ark. (2014). Mineralized gelatin methacrylate-based matrices induce osteogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Acta Biomater*, **10**, 4961–4970.

Kang, R., Luo, Y., Zou, L., Xie, L., Lysdahl, H., Jiang, X. ve ark. (2014). Osteogenesis of human induced pluripotent stem cells derived mesenchymal stem cells on hydroxyapatite contained nanofibers. *RSC Adv*, **4**, 5734–5739.

Kang, R., Zhou, Y., Tan, S., Zhou, G., Aagaard, L., Xie. L. ve ark. (2015). Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells retain adequate osteogenicity and chondrogenicity but less adipogenicity. *Stem Cell Res Ther*, **6**, 144.

Kanneci, A., Kök, F.N., Yücel, D. ve Torun Kose, G. (2017). In vitro evaluation of PLLA/PBS sponges as a promising biodegradable scaffold for neural tissue engineering. DOI: 10.3906/biy-1701-6

Kao, C.L., Tai, L.K., Chiou, S.H., Chen, Y.J., Lee, K.-H., Chou, S.-J. ve ark. (2010). Resveratrol promotes osteogenic differentiation and protects against Dexamethasone damage in murine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells and Development*, **19(2)**, 247–258.

Karasahin, T. (2012). Embriyonik kök hücreler. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, **9**, 65-71.

- Kato, H., Ochiai-Shino, H., Onodera, S., Saito, A., Shibahara, T. ve Azuma, T. (2015). Promoting effect of 1, 25 (OH) 2 vitamin D3 in osteogenic differentiation from induced pluripotent stem cells to osteocyte-like cells. *Open Biol*, **5**, 140201.
- Keller, G.M. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 862–9.
- Kelly, E.B. (2007). Stem Cells. The Greenwood Publishing Group, Inc., Westport, Chapter 1.
- Khojasteh, A. ve Motamedian, S.R. (2016). Mesenchymal stem cell therapy for treatment of craniofacial bone defects: 10 years of experience. *Regeneration Reconstruction Restor*, **1**, 1–7.
- Khojasteh, A. ve Sadeghi, N. (2016). Application of buccal fat pad-derived stem cells in combination with autogenous iliac bone graft in the treatment of maxillomandibular atrophy: a preliminary human study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, **45**, 864–871.
- Khojasteh, A., Behnia, H., Dashti, S.G. ve Stevens, M. (2012). Current trends in mesenchymal stem cell application in bone augmentation: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*, **70**, 972–982.
- Khojasteh, A., Eslaminejad, M.B. ve Nazarian, H. (2008). Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelet-rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, **106**, 356–362.
- Khojasteh, A., Nazeman, P., Rezai, R.M. (2016). Dental stem cells in oral, maxillofacial and craniofacial regeneration. In: Şahin, Fikretin, Doğan, Ayşegül, Demirci, Selami Dental Stem Cells. New York city, USA: Springer.
- Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S. ve ark. (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, **4**, 472-6.
- Kinaci, A., Neuhaus, V. ve Ring, D.C. (2014). Trends in bone graft use in the United States. *Orthopedics*, **37(9)**, 783–8. PubMed PMID: 25350620
- Kleinschmidt, J.C. ve Hollinger, J.O. (1992). Animal models in bone research. In: Mutaz HB. Reddi AH. editors. Bone Grafts & Bone Substitutes. Philadelphia: WB Saunders Company. 133-46
- Kneser, U., Schaefer, D.J., Polykandriotis, E. ve Horch, R.E. (2006). Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med*, **10(1)**, 7–19.
- Ko, J.Y., Park, S. ve Im, G.I. (2014). Osteogenesis from human induced pluripotent stem cells: an in vitro and in vivo comparison with mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, **23**, 1788–1797.
- Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Hamanaka, S., Kato-Itoh, M., Yamazaki, Y., Ibata, M. ve ark. (2010). Generation of Rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell*, **142(5)**, 787–799.

- Kolaparthi, L.K., Sanivarapu, S., Moogla, S. ve Kutcham, R.S. (2015). Adipose tissue adequate, accessible regenerative material. *Int J Stem Cells*, **8**, 121–127
- Kolios, G. ve Moodley, Y. (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, **85**, 3-10.
- Köse, O. ve Özdoğan, S. (2010). Epidermal kök hücreler ve klinik kullanımları, *Türkiye Klinikleri J Dermatol*, **20**, 74-80
- Kretlow, J.D., Jin, Y. Q., Liu, W., Zhang, W.J., Hong, T.H., Zhou, G. ve ark. (2008). Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow derived stem cells. *BMC Cell Biol*, **9**, 60.
- Kumaran, S.T., Arun, K.V., Sudarsan, S., Talwar, A. ve Srinivasan, N. (2010). Osteoblast response to commercially available demineralized bone matrices—an in-vitro study. *Indian Journal of Dental Research*, **21**(1), 3–9.
- Kume, K., Satomura, K., Nishisho, S., Kitaoka, E., Yamanouchi, K., Tobiume, S. ve ark. (2012). Potential role of leptin in endochondral ossification. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **50** (2), 159–169.
- Kutlay, N., Gül, R.T.B., Güven, T., Sert, G., Gün, M. ve Erzik, C. (2009). Kök hücre araştırmalarının etik ve hukuk boyutuna ilişkin rapor. *Türkiye Biyoetik Derneği Kök Hücre Araştırmaları ve Uygulamaları Kurulu*.
- Lavrentieva, A., Hatlapatka, T., Neumann, A., Weyand, B. ve Kasper, C. (2013). Potential for osteogenic and chondrogenic differentiation of MSC. In B. Weyand, M. Dominici, R. Hass, R. Jacobs, & C. Kasper (Eds.), *Mesenchymal stem cells: Basics and clinical application I*, **129**, 73–88.
- Lee, T.J., Jang, J., Kang, S., Bhang, S.H., Jeong, G.J., Shin, H. ve ark. (2014). Mesenchymal stem cell-conditioned medium enhances osteogenic and chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells by mesodermal lineage induction. *Tissue Eng Part A*, **20**, 1306–1313.
- Lee, T.J., Jang, J., Kang, S., Jin, M., Shin, H., Kim, D.W. ve ark. (2013). Enhancement of osteogenic and chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells by mesodermal lineage induction with BMP-4 and FGF2 treatment. *Biochem Biophys Res Commun*, **430**, 793–797.
- Lepage, S.I., Nagy, K., Sung, H.K., Kandel, R., Nagy, A. ve Koch, T.G. (2015). Generation, characterization and multi-lineage potency of mesenchymal-like progenitors derived from equine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*, **25**, 80–89.
- Levi, B., Hyun, J.S., Montoro, D.T., Lo, D.D., Chan, C.K., Hu, S. ve ark. (2012). In vivo directed differentiation of pluripotent stem cells for skeletal regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**, 20379–20384.

- Li, F. ve Niyibizi, C. (2012). Cells derived from murine induced pluripotent stem cells (iPSC) by treatment with members of TGF-beta family give rise to osteoblasts differentiation and form bone in vivo. *BMC Cell Biol*, **13**, 35.
- Li, F., Bronson, S. ve Niyibizi, C. (2010). Derivation of murine induced pluripotent stem cells (iPS) and assessment of their differentiation toward osteogenic lineage. *J Cell Biochem*, **109**, 643–652.
- Lian, Q., Zhang, Y., Zhang, J., Zhang, H.K., Wu, X., Zhang, Y. ve ark. (2010). Functional mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells attenuate limb ischemia in mice. *Circulation*, **121**, 1113–1123.
- Liao, H.T. ve Chen, C.T. (2014) Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*, **26(6)**, 288-95.
- Liebschner, M.A. (2004). Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials Apr*, **25(9)**, 1697-714.
- Lou, X. (2015). Induced pluripotent stem cells as a new strategy for osteogenesis and bone regeneration. *Stem Cell Rev*, **11(4)**, 645-51. doi: 10.1007/s12015-015-9594-8.
- Luu, H.H., Song, W.X., Luo, X.J., Manning, D., Luo, J.Y., Deng, Z.L. ve ark. (2007). Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, **25(5)**, 665–677.
- Mahmood, A., Napoli, C. ve Aldahmash, A. (2011). In vitro differentiation and maturation of human embryonic stem cell into multipotent cells. *Stem Cells Int*, 735420.
- Majo, F., Rochat, A., Nicolas, M., Jaoudé, G.A. ve Barrandon, Y. (2008). Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature*, **456**, 250-254.
- Mao, J.J. ve Collins, F.M. (2008). Stem cells: sources, therapies and the dental professional a peer-reviewed publication. The academy of dental therapeutics and stomology. Pennwell.
- Maria, O.M., Khosravi, R., Mezey, E. ve Tran, S.D. (2007). Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications, *Oral Dis*, **13(1)**, 11-16
- Marone, M., De, R.D., Bonanno, G., Mozzetti, S., Rutella, S., Scambia, G. ve ark. (2002). Cell cycle regulation in human hematopoietic stem cells: from isolation to activation. *Leuk Lymphoma*, **43**, 493-501
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **78**, 7634-8.
- Marx, R.E. ve Morales, M.J. (1988). Morbidity from bone harvest in major jaw reconstruction: a randomized trial comparing the lateral anterior and posterior approaches to the ilium. *J Oral Maxillofac Surg*, **46(3)**, 196–203.

- Miller, D.M., Thomas, S.D., Islam, A., Muench, D. ve Sedoris, K. (2012). c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res*, **18(20)**, 5546–5553.
- Moore, K.A., Ema, H. ve Lemischka, I.R. (1997). In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic. *Stem Cells Blood*, **89 (12)**, 4337-47.
- Mouton, P.R., Durgavich, J. ve at Ingram, D.K. (2005). Automatic estimation of size parameters using verified computerized stereanalysis, *Image Analize Stereology*, **24**, 41-49.
- Mudda, J.A. ve Bajaj, M. (2011). Stem cell therapy: a challenge to periodontist. *IJDR*, **22**, 132-9.
- Mulliken, J.B. ve Glowacki, J. (1980). Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. *Plast Reconstr Surg*, **65**, 553-60.
- Nasu, A., Ikeya, M., Yamamoto, T., Watanabe, A., Jin, Y., Matsumoto, Y. ve ark. (2013). Genetically matched human iPS cells reveal that propensity for cartilage and bone differentiation differs with clones, not cell type of origin. *PLoS ONE*, **8**, 53771.
- Neel, E.A.A., Chrzanowski, W., Salih, V.M., Kim, H.W. ve Knowles, J.C. (2014). Tissue engineering in dentistry. *J Dent*, **42**, 915-928.
- Nelson, T. J., Martinez-Fernandez, A. ve Terzic, A. (2010). Induced pluripotent stem cells: developmental biology to regenerative medicine. *Nature Reviews Cardiology*, **7(12)**, 700–710.
- Nelson, T.J., Martinez-Fernandez, A., Yamada, S., Perez-Terzic, C., Ikeda, Y. ve Terzic, A. (2009). Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation*, **120(5)**, 408–416.
- Neovius, E. ve Engstrand, T. (2010). Craniofacial reconstruction with bone and biomaterials: review over the last 11 years. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, **63(10)**, 1615-23.
- NIH. (2001). The Stem Cell. In Stem Cells: Scientific Progress and Future Research directions. Department of Health and Human Services. June 2001. Erişim <http://stemcells.nih.gov/info/2001report/chapter1>.
- NIH. (2009a). Stem Cell Basics: What are the unique properties of all stem cells? In Stem Cell Information. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2009, Erişim: Tuesday, April 07, 2009 <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics2>.
- NIH. (2009b). Stem Cell Basics: What are embryonic stem cells? In Stem Cell Information. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2009 [cited Monday, April 13, 2009] Erişim <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics3>.

- Nkenke, E. ve Neukam, F.W. (2014). Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: morbidity, resorption and implant survival. *Eur J Oral Implantol*, **7(2)**, 203–17.
- Öber, A. ve İzzetoğlu, G. T. (2006). *Histoloji*, Ankara: Nobel Yayın.
- Ochiai-Shino, H., Kato, H., Sawada, T., Onodera, S., Saito, A., Takato, T. ve ark. (2014). A novel strategy for enrichment and isolation of osteoprogenitor cells from induced pluripotent stem cells based on surface marker combination. *PLoS ONE*, **9**, 99534.
- O'Donoghue, K. ve Fisk, N.M. (2004). Fetal stem cells: best practice and research. *Clin Obstet Gynecol*, **18**, 853-75.
- Okamoto, H., Matsumi, Y., Hoshikawa, Y., Takubo, K., Ryoke, K. ve Shiota, G. (2012). Involvement of MicroRNAs in Regulation of Osteoblastic Differentiation in Mouse Induced Pluripotent Stem Cells. *Plos One*, **7(8)**.
- Okawa, H., Kayashima, H., Sasaki, J., Miura, J., Kamano, Y., Kosaka, Y. ve ark. (2016). Scaffold-free fabrication of osteoinductive cellular constructs using mouse gingiva-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Int*, 6240794.
- Okita, K., Ichisaka, T. ve Yamanaka, S. (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, **448**, 313-7.
- Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., ve ark. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*, **8(5)**, 409-12.
- Ozaki, A., Tsunoda, M., Kinoshita, S. ve Saura, R. (2000). Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *J Orthop Sci*, **5(1)**, 64-70.
- Özel, B.H., Ozan, E. ve Dabak, D.Ö. (2008). Embryonic stem cells. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, **28(3)**, 333-341.
- Panno, J. (2005). Stem Cells Are Not Equal. In: *Stem Cell Research: Medical Applications and Ethical Controversy*. New York: Facts on File, inc., Chapter 1.
- Phillips, M.D., Kuznetsov, S.A., Cherman, N., Park, K., Chen, K.G., McClendon, B.N. ve ark. (2014). Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells toward bone and cartilage: in vitro versus in vivo assays. *Stem Cells Transl Med*, **3**, 867–878.
- Plews, J.R., Li, J., Jones, M., Moore, H.D., Mason, C., Andrews, P.W. ve ark. (2010). Activation of pluripotency genes in human fibroblast cells by a novel mRNA based approach. *PLoS One*, **5**, 14397.
- Quarto, N., Li, S., Renda, A. ve Longaker, M. T. (2012). Exogenous activation of BMP 2 signaling overcomes TGF betamediated inhibition of osteogenesis in marfan embryonic stem cells and marfan patient-specific induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, **30(12)**, 2709–2719.

- Rao, M.S. (2004). Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells Dev*, **13**, 452- 455.
- Rasal, R.M. ve Hirt, D.E. (2010). Poly (lactic acid) toughening with a better balance of properties. *Macromol Mater Eng*, **295**, 204-209.
- Rezai Rad, M., Liu, D., He, H., Brooks, H., Xiao, M., Wise, G.E. ve ark. (2015). The role of dentin matrix protein 1 (DMP1) in regulation of osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells (DFSCs). *Arch Oral Biol*, **60**, 546–556.
- Rezai-Rad, M., Bova, J.F., Orooji, M., Pepping, J., Qureshi, A., Del Piero, F. ve ark. (2015). Evaluation of bone regeneration potential of dental follicle stem cells for treatment of craniofacial defects. *Cytotherapy*, **17**, 1572–1581.
- Rimondini, L. ve Mele, S. (2009). Stem cell technologies for tissue regeneration in dentistry. *Minerva Stomatol*, **58**, 483-500.
- Rizzino, A. (2009). Sox2 and Oct-3/4: A versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, **1**, 228-36. doi:10.1002/wsbm.12
- Roberts, W.E. ve Hartsfield, J.K. (2004). Bone development and function: genetic and environmental mechanism. *Semin Orthod*, **10**, 100-122.
- Rogers, I. ve Casper, R.F. (2003). Stem cells: you can't tell a cell by its cover. *Human Reprod, Update*, **9**, 25-33.
- Ross, M.H., Pawlina W. (2003). Histology. A text and atlas. Fourth Edition, 180-213.
- Royet, J.P. (1991). Stereology: A method for analysing images. *Progress Neurobiol*, **37**, 433-74.
- Rui, Y.F., Lui, P.P.Y., Ni, M., Chan, L.S., Lee, Y.W. ve Chan, K. (2011). Mechanical loading increased BMP-2 expression which promoted osteogenic differentiation of tendon-derived stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, **29(3)**, 390–396.
- Şahin, F., Saydam, G. ve Omay, S.G. (2005). Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi, *Turk J Hematol Oncol*, 1-15.
- Saigal, S. ve Bhargava, A. (2011). Stem Cell - Is there any role in tumorigenic activity. *Turk Patoloji Derg.* **27**, 93-97. doi: 10.5146/tjpath.2011.01055.
- Sakkas, A., Wilde, F., Heufelder, M., Winter, K. ve Schramm, A. (2017). Autogenous bone grafts in oral implantology—is it still a “gold standard”? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent*, **3(1)**, 23.
- Schenk, R.K. (1986). Histophysiology of bone remodeling and bone repair. İçinde: Lin OCC, Chao EVS, editors. Perspectives on biomaterials. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 75-94.

- Schmitz, J.P. ve Hollinger, J.O. (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop*, **205**, 299-308.
- Schöler, H.R., Hatzopoulos, A.K., Balling, R., Suzuki, N. ve Gruss, P. (1989). A family octomer-specific proteins present during Mouse embryogenesis; evidence for germline specific expression of an Oct factor. *EMBO J*, **8**, 2543-50.
- Seo, B.M., Sonayama, W., Yamaza, T., Coppe, C., Kikuri, T. ve Akiyama K. (2008). SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis*, **14**, 428-434.
- Sevim H. ve Gürpınar, Ö.A. (2012). İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ve uygulamaları. *Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **25**, 5-9.
- Sfeir, C., Ho, L., Doll, B.A., Azari, K. ve Hollinger, J.O. (2005). Fracture Repair. İçinde: Lieberman JR, Friedlaender GE, editors. Bone regeneration and repair: Biology and clinical applications. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 21-43.
- Shibata, M., Inoue, Y. ve Miyoshi, M. (2006). Mechanical properties, morphology, and crystallization behavior of blends of poly(Llactide) with poly(butylene succinate-co-L-lactate) and poly(butylene succinate). *Polymer*, **47**, 3557-3564.
- Simmons, D.J. (1980). Fracture healing. İçinde: Urist MR, editor. Fundamental and Clinical Bone Physiology. Philadelphia, JB Lippincott, 283-330.
- Song, I., Kim, B.S., Kim, C.S. ve Im, G.I. (2011). Effects of BMP-2 and vitamin D-3 on the osteogenic differentiation of adipose stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **408(1)**, 126–131.
- Soydan, N. (1985). Genel Histoloji. İstanbul, İ.Ü. Basımevi ve film Merkezi.100 117
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G. ve Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, **322**, 945-9.
- Stefani, G., ve Slack, F.J. (2008). Small non-coding RNAs in animal development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9(3)**, 219–230.
- Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C. ve Kassem, M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, **33**, 919.
- Swan, M.C. ve Goodacre, T.E. (2006). Morbidity at the iliac crest donor site following bone grafting of the cleft alveolus. *Br J Oral Maxillofac Surg*, **44(2)**, 129-33.
- Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner- Hedges, R., Ma, H. ve ark. (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, **153**, 1228-38.
- Takagi, K. ve Urist, M.R. (1982). The reaction of the dura the bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg*, **196**, 100.

Takahashi, K. ve Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126(4)**, 663–676.

Takahashi, K. ve Yamanaka, S. (2013). Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development*, **140(12)**, 2457–2461.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. ve ark. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, **131**, 861–872.

Tang, D., Tare, R.S., Yang, L.Y., Williams, D.F., Ou, K.L. ve Oreffo, R.O. (2016). Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials*, **83**, 363–82.

Tashiro, K., Inamura, M., Kawabata, K., Sakurai, F., Yamanishi, K., Hayakawa, T. ve ark. (2009). Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction. *Stem Cells*, **27(8)**, 1802–1811.

Teng, S., Liu, C., Krettek, C. ve Jagodzinski, M. (2014). The application of induced pluripotent stem cells for bone regeneration: current progress and prospects. *Tissue Eng Part B Rev*, **20(4)**, 328-39. doi: 10.1089/ten.TEB.2013.0301.

TheinHan, W., Liu, J., Tang, M., Chen, W., Cheng, L. ve Xu, H.H. (2013). Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on biofunctionalized calcium phosphate cements. *Bone Res*, **4**, 371–384.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S. ve ark. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, **282**, 1145-7.

Tsuji, O., Miura, K., Okada, Y., Fujiyoshi, K., Mukaino, M., Nagoshi, N. ve ark. (2010). Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**, 12704–12709.

Tunçay Ekin, Ö. (2013) Biyomimetik yöntemle bor katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi ve kemik doku mühendisliğindeki etkinliklerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 4-7, Ankara.

Ulloa-Montoya, F., Verfaillie, C.M. ve Hu, W.S. (2005). Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng*, **100**, 12–27.

Vatansever, H.S. (2009). Embriyonik kök hücreler. *Sağlıkta Birikim*, **1**, 25-44

Verfaillie, C.M., Pera, M.F. ve Lansdorp, P.M. (2002). Stem cells: hype and reality, *Am Soc Hem Educ Program*, 369-391.

Waese, E.Y., Kandel, R.A. ve Stanford, W.L. (2008). Application of stem cells in bone repair. *Skeletal Radiol*, **37**, 601.

Wang, C., Wang, Z., Li, A., Bai, F., Lu, J., Xu, S. ve ark. (2010). Repair of segmental bone-defect of goat's tibia using a dynamic perfusion culture tissue engineering bone. *J Biomed Mater Res A*, **92**(3), 1145-53.

Wang, M., Deng, Y., Zhou, P., Luo, Z., Li, Q., Xie, B. ve ark. (2015). In vitro culture and directed osteogenic differentiation of human pluripotent stem cells on peptides decorated two-dimensional microenvironment. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **7**(8), 4560–4572.

Wang, P., Liu, X., Zhao, L., Weir, M.D., Sun, J., Chen, W. ve ark. (2015). Bone tissue engineering via human induced pluripotent, umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cells in rat cranium. *Acta Biomater*, **18**, 236–248.

Warnke, P.H., Springer, I.N., Wiltfang, J., Acil, Y., Eufinger, H., Wehmoller, M. ve ark. (2004). Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet*, **364**(9436), 766–70.

Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K. ve ark. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, **448**, 260-2.

William, V., Giannobile, W.V., Rios, H.F. ve Lang, N.P. (2008). Bone as a tissue. İçinde: Lindhe J, Karring T, Lang NP, editors. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 5thEd., Oxford: Blackwell Publishing Company, 86-98.

Winkel, G.K. ve Pedersen, R.A. (1988). Fate of the inner cell mass in mouse embryos as studied by microinjection of lineage tracers. *Dev Biol*, **127**, 143-56.

Xiao, L. ve Nasu, M. (2014). From regenerative dentistry to regenerative medicine: progress, challenges, and potential applications of oral stem cells. *Stem Cells Cloning*, **7**, 89–99.

Xie, J., Peng, C., Zhao, Q., Wang, X., Yuan, H., Yang, L. ve ark. (2016). Osteogenic differentiation and bone regeneration of iPSC-MSCs supported by a biomimetic nanofibrous scaffold. *Acta Biomater*, **29**, 365–379.

Yang, H., Apreccio, R.M., Zhou, X., Wang, Q., Zhang, W, Ding Y ve ark. (2014). Therapeutic effect of TSG-6 engineered iPSC-derived MSCs on experimental periodontitis in rats: a pilot study. *PLoS One*. **9**(6), 100285.

Young, B. ve Heath, J.W. (2000). Wheather's functional histology 4.ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, 142-151.

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S. ve ark. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, **318**(5858), 1917–1920.

Zachos, T. A., Shields, K. M., ve Bertone, A.L. (2006). Genemediated osteogenic differentiation of stem cells by bone morphogenetic proteins-2 or-6. *Journal of Orthopaedic Research*, **24**(6), 1279-91.

- Zeller, K.I., Jegga, A.G., Aronow, B.J., O'Donnell, K.A. ve Dang, C.V. (2003). An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome Biol*, **4**, Article R69.
- Zhao, W., Hisamuddin, I.M., Nandan, M.O., Babbin, B.A., Lamb, N.E. ve Yang, V.W. (2004). Identification of Kruppel like factor 4 as a potential tumor suppressorgene in colorectal cancer. *Oncogene*, **23**, 395–402.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T. ve ark. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, **4(5)**, 381-4
- Zimmermann, G. ve Moghaddam, A. (2011). Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury*, **42(2)**, 16–21.
- Zou, L., Luo, Y., Chen, M., Wang, G., Ding, M., Petersen, C.C. ve ark. (2013). A simple method for deriving functional MSCs and applied for osteogenesis in 3D scaffolds. *Sci Rep*, **3**, 2243.
- zur Nieden, N. I., Kempka, G., ve Ahr, H. J. (2003). In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation*, **71(1)**, 18–27.

HAM VERİLER

DENEY GRUP ADI	Denek No	Shape Factor	Kemik Hacim (milimetreküp)	Yumuşak Doku Hacim (milimetreküp)	Toplam Hacim (milimetreküp)	Kemik (%)	Yumuşak Bağ Dokusu (%)	Fraction		
								Kemik	Yumuşak Bağ Doku	Toplam
K	2 SAĞ	6,13	9,05	3,01	12,06	54,49	45,51	0,279	0,233	0,512
	2 SOL	6,36	11,01	4,53	15,54	49,31	50,69	0,249	0,256	0,505
	3 SAĞ	6,58	8,70	2,21	10,91	53,63	46,37	0,281	0,243	0,524
	3 SOL	7,36	7,24	2,54	9,77	47,48	52,52	0,245	0,271	0,516
B	2 SOL	6,97	11,70	3,02	14,72	73,45	26,55	0,379	0,137	0,516
	4 SOL	6,14	11,19	2,07	13,26	76,62	23,38	0,403	0,123	0,526
	3 SAĞ	6,28	11,05	1,79	12,84	62,30	37,70	0,319	0,193	0,512
	1 SOL	6,26	10,37	4,02	14,40	65,90	34,10	0,344	0,178	0,522
	2 SAĞ	8,71	10,90	2,90	13,81	62,83	37,17	0,333	0,197	0,530
B + MKH-İPKH	2 SAĞ	6,9	13,12	2,98	16,10	66,54	33,46	0,364	0,183	0,547
	4 SAĞ	6,6	11,22	3,26	14,48	74,40	25,60	0,375	0,129	0,504
	5 SAĞ	5,63	14,48	1,60	16,08	78,51	21,49	0,431	0,118	0,549
	6 SAĞ	7,02	10,01	2,22	12,23	66,16	33,84	0,346	0,177	0,523
	6 SOL	7,56	10,99	2,61	13,60	65,64	34,36	0,363	0,190	0,553
B + OİPKH	1 SAĞ	7,25	11,90	2,33	14,23	68,53	31,47	0,381	0,175	0,556
	3 SAĞ	7,26	14,87	3,21	18,08	67,27	32,73	0,372	0,181	0,553
	3 SOL	6,96	11,57	2,87	14,44	66,84	33,16	0,385	0,191	0,576
	5 SAĞ	5,75	15,48	3,70	19,18	66,55	33,45	0,382	0,192	0,574
	2 SOL	7,27	11,15	2,13	13,28	89,00	11,00	0,445	0,055	0,500

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2015/ 57

05.05.2015

Sayın: Prof. Dr. Osman Zeki GÜMRÜ
İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Karar No :2015/ 57

Baskuru :24.04.2015

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen, **Doktora Öğrencisi Dt. Kadir Akın KAYGUN**'a ait "İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücrelerin Osteojenik Potansiyelinin Sıçan Kalvaryada Defektlerinde Histolojik Olarak Değerlendirilmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sıçan
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	2 8 4 1
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		Temmuz 2015/Aralık 2016

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIKIRIK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Doç. Dr. İlhan İLKILIÇ
Üye

Yard. Doç. Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGUN
Mak. Yük. Müh.
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

İNDÜKLENMİŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRELERİN OSTEOJENİK POTANSİYELİNİN SIÇAN KALVARYA DEFEKTLERİNDE HİSTOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 17 BENZERLİK ENDEKSİ	% 12 İNTERNET KAYNAKLARI	% 8 YAYINLAR	% 11 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
----------------------------------	---------------------------------------	------------------------	---------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 3
2	mmj.dergisi.org İnternet Kaynağı	% 2
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 2
4	aai.org.tr İnternet Kaynağı	% 2
5	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
7	www.jceionline.org İnternet Kaynağı	<% 1
8	dergiler.ankara.edu.tr	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	KADİR AKIN	Soyadı	KAYĞUN
Doğ.Yeri	İSTANBUL	Doğ.Tar.	01.04.1988
Uyruğu	TC	TC Kim No	10712156148
Email	akin.kaygun@hotmail.com	Tel	05357125690

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi	
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi	2011
Lisans	İstanbul Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi	2011
Lise	Kadir Has Anadolu Lisesi	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İNGİLİZCE	İYİ	İYİ	İYİ	87	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	95	94	
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office (Word, Excel, Powerpoint)	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):