

**KİTOSAN/BİYOMİMETİK BOR NANO HİDROKSİAPATİT
DOKU İSKELESİNİN DİŞ PULPA-DENTİN KOMPLEKSİNİN
REJENERASYONUNDA KULLANILMASI**

**Pulp–Dentin Complex Regeneration by Boron Doped
Biomimetic Nano Hydroxyapatite Coated Chitosan
Scaffolds**

FARZİN ASGHARİ SANA

PROF. DR. ARLİN S. KİREMİTÇİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2016

FARZİN ASGHARİ SANA'nin hazırladığı “**Kitosan/Biyomimetik Bor Nano Hidroksiapatit Doku İskelesinin Diş Pulpa-Dentin Kompleksinin Rejenerasyonunda Kullanılması**” adlı çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı**’nda DOKTORA TEZİ olarak Kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Başkan

.....

Prof. Dr. Arlin S. KİREMITÇİ

Danışman

.....

Doç. Dr. Emel OLGA ÖNAY

Üye

.....

Doç. Dr. Zeliha YILMAZ

Üye

.....

Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof.Dr.Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

25/12/2015

FARZİN ASGHARİ SANA

ÖZET

KİTOSAN/BİYOMİMETİK BOR NANO HİDROKSİAPATİT DOKU İSKELESİNİN DİŞ PULPA-DENTİN KOMPLEKSİNİN REJENERASYONUNDA KULLANILMASI

FARZİN ASGHARİ SANA

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. ARLİN S. KİREMİTÇİ

Ocak 2016, 130 sayfa

Sunulan tez çalışmasının amacı, odontoinduktif özelliğe sahip bor katkılı nano hidroksiapatit kaplı kitosan (B-nHAp/kitosan) doku iskeleleri üzerinde insan 20 yaş gömülü dişlerden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin *in-vitro* odontojenik farklılaşma potansiyellerinin incelenmesidir.

Tez çalışmasının ilk aşamasında dondurarak-kurutma yöntemiyle 100 µm gözenek çapına sahip kitosan doku iskeleleri hazırlanmıştır. Ardından hazırlanan doku iskeleleri, mekanik ve biyoaktif özelliklerini iyileştirmek amacı ile mikrodalga enerjisi yardımı ile yapay vücut sıvısı (10xSBF) ve bor katkılı yapay vücut sıvısı (B-SBF) kullanılarak sırasıyla nano hidroksiapatit (n-HAp) ve bor katkılı nano hidroksiapatit (B-nHAp) ile kaplanmıştır. Çalışmanın sonraki aşamasında, insan diş pulpasından mezenkimal kök hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) analizi ile, hücre morfolojisi F-aktin/DAPI ve kristal viyole boyamaları ile incelenmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin multipotensi özelliklerini incelemek için çalışmalar, büyüme ve farklılaşma ortamı olmak üzere iki farklı koşulda yürütülmüştür. Oil Red O boyaması ile hücrelerde yağ doku farklılaşmasını gösteren hücre içi yağ damlacıkları belirlenmiştir. Osteojenik farklılaşmanın göstergesi olan matris mineralizasyonu alkalın fosfataz-von Kossa (ALP/VK) boyaması ile gösterilmiş ve zamanla mineralize nodüllerin çoğaldığı tespit edilmiştir. Kondrojenik farklılaşma, Safranin O/Fast Green boyaması ile gösterilmiştir. Diş pulpası mezenkimal kök hücrelere özgü yüzey belirteçleri akış sitometrisi analizi ile belirlenmiştir. Böylece, çalışmada kullanılacak insan diş pulpası kök hücrelerinin (iDPKH) karakterizasyonu tamamlanmıştır.

Tez çalışmasının son aşamasında, izole edilen mezenkimal kök hücrelerin B-nHAp/kitosan doku iskeleleri üzerindeki üreme ve osteojenik farklılaşmasının incelenmesi için durgun koşullarda *in-vitro* hücre kültür çalışmaları yürütülmüştür. Doku iskeleleri üzerinde hücre canlılığı ve üremesi Presto Blue analizi, hücrelerin morfolojik özellikleri ise taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile değerlendirilmiştir. Hücrelerin odontojenik farklılaşma belirteçleri olan alkalen fosfataz (ALP), runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (RunX2), kollajen-I, osteokalsin (OCN), osteopontin (OP) ve dentin siyalofosfoprotein (DSPP) gen ifadeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile tespit edilmiştir. iDPKH'ler ile elde edilen sonuçlar bor katkılı nano hidroksiapatit kaplı kitosan doku iskelesinin bu hücrelerin yapışmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklediği yönündedir.

Sonuç olarak sunulan tez çalışmasında bor katkılı nHAp'in iDPKH'lerin doku iskeleleri üzerinde üreme ve odontojenik farklılaşma potansiyelini önemli derecede etkilediği ve bor katkılı kitosan doku iskelesinin diş doku mühendisliği uygulamaları için alternatif bir yapı olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler : Bor; Nano HAp; kitosan; insan diş pulpası kök hücreleri; diş doku mühendisliği.

ABSTRACT

Pulp–Dentin Complex Regeneration by Boron Doped Biomimetic Nano Hydroxyapatite Coated Chitosan Scaffolds

FARZİN ASGHARİ SANA

**Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology and
Nanomedicine**

Supervisor: Prof. Dr. ARLİN S. KİREMİTÇİ

January 2016, 130 pages

The aim of the presented study is to investigate *in-vitro* odontogenic potential of mesenchymal stem cells, isolated from dental pulp of the human third molar, on boron doped nano hydroxyapatite coated chitosan (B-nHAp/chitosan) scaffolds with odonto-inductive properties.

In the first part of the study, chitosan scaffolds, which have approximately 100 µm pore diameter, were prepared by freeze-drying technique. In order to enhance the mechanical and bioactive properties of the scaffolds, they were coated with nano hydroxy apatite (nHAp) and boron doped nano hydroxy apatite (B-nHAp) through the aid of microwave energy by using 10xSBF (simulated body fluid) and boron containing 10xSBF (B-SBF). In the following part of the study, mesenchymal stem cells were isolated from human third molar dental pulp. The cell viability was evaluated by MTT (3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, cell morphology was investigated by F-actin/DAPI and crystal violet staining. Intracellular fat droplets which show adipogenic differentiation was assessed using Oil Red O staining. Matrix mineralization which shows osteogenic differentiation was visualized by alkaline phosphatase-von Kossa (ALP-VK) staining and it was detected that mineralized nodules were getting increased by time. Differentiation into the chondrogenic lineage was demonstrated by Safranin O/Fast Green staining. In order to further characterize the population, the specific surface markers of human dental pulp stem cells (hDPSCs) were demonstrated by flow cytometry analysis. Thus, isolation and characterization studies of hDPSCs used in this study were completed.

In the last part of this study, the proliferation and odonto-inductive differentiation of hDPSCs on chitosan, nHAp/chitosan and B-nHAp/chitosan scaffolds were investigated by *in-vitro* cell culture studies, under static conditions. Cell viability and proliferation were analyzed by Presto Blue assay and morphological examination

was done with scanning electron microscopy (SEM). Odontogenic differentiation markers, alkaline phosphatase, collagen type I, runt related transcription factor 2 (RunX2), osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) expression levels of the cells were determined using real time polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that boron doped nano HAp coated chitosan scaffolds supported adhesion, proliferation and differentiation of hDPSCs.

Keywords: Boron, chitosan, nano hydroxyapatite, human dental pulp stem cells, dental tissue engineering.

TEŞEKKÜR

Engin bilgi birikimi ve tecrübesiyle çalışmalarımın titizlikle yürütülmesini ve sonuçlandırılmasını sağlayan, değerli Hocam **Prof. Dr. ARLİN S. KİREMİTÇİ'ye**, bu süreçte hep yanımda olduğu ve sağladığı olanaklar için sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda 114S755 no'lu proje kapsamında maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Beni grubuna kabul ederek tez çalışmalarımın yürütülmesi için gerekli tüm desteği bana sağlayan, beni yetiştiren, her zaman örnek alacağım sevgili ve çok değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU'na** bu zor ve yoğun dönemde sevgi ve desteğini benden esirgemediği için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımda bana kapılarını sonuna kadar açan sevgili hocalarım **Prof. Dr. Nuran DIRİL** ve **Prof. Dr. Jülide SEDEF GÖÇMEN'e** dostluklarının yanı sıra bana yardımcı olan **Fatma Zilifdar** ve **Egemen Foto'ya** teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca her an yanımda olarak çalışmamın yürütülmesinde, ihtiyacım olan her bilgiye ulaşmamda bana yardımcı olan sevgili arkadaşım **Gökçe Kaynak Bayrak'a**, teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam boyunca bana hep destek olan, özveri ve disipliniyle **Arş. Gör. Merve Çapkın Yurtsever'e**, doktora dönemimin ilk gününden beri hiçbir sorumu yanıtızsız bırakmayan **Özge Ekin Tunçay'a**, teşekkürlerimi sunarım.

Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Laboratuvarında, sevgili arkadaşlarım **Dr. Murat Şimşek, Dr. Işıl Gerçek Beşkardeş, Dr. Anıl Sera Çakmak, Dr. Soner Çakmak, Tuğrul Tolga Demirtaş, Damla Çetin Altındal, Gülseren Irmak, Tuğçe Gültan, Meryem Sümeyye Akdemir, Şeyma Bektaş, Derya Kalelioğlu, Bedriye Topal, Elvan Konuk, Ebru Tamahkar, Sahar Shahirdavarpanah, İnci Shikhaliyeva** ve tüm diğer değerli laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürlerimi borç bilirim.

Beni bugünlere getiren, destekleyen, kendi ayaklarım üzerinde durmayı öğreten, canım babam **Yahya Asghari Sana 'ya**, sadece annem değil hayattaki en yakın arkadaşım olan **Monireh Zabiollahi'ye**, abilerime, ve kısaca **Asghari Sana** ailesine en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Onlarsız hayatı düşünemediğim, hayattaki en vazgeçilmezlerim, sonsuz sevdiğim güzel kızım **Anil** ve yakışıklım, **Artin'e**, eşimin anne ve babasına, hayatımın neşesi, varlığıyla beni çok mutlu eden, her zaman desteğim, bu tezin ve ailemizin inşasında çok büyük emekleri olan, **Dr. Azade Mohammadalizade**, seni çok seviyorum ve geçirdiğimiz her an için sana çok çok teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa numarası

| | |
|--|-----|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | iii |
| TEŞEKKÜR | v |
| ÇİZELGELER | x |
| ŞEKİLLER | xi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | xiv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. İnsan Dişinin Yapısı | 4 |
| 2.1.1. Tamir Dentini Oluşumu | 5 |
| 2.1.2. Diş Hekimliğinde Doku Mühendisliği ve Rejenerasyon | 6 |
| 2.2. Diş Hekimliğinde Kök Hücreler ve Dental Pulpa Kök Hücreleri | 8 |
| 2.2.1. Kök Hücre Çeşitleri | 8 |
| 2.2.1.1. Totipotent Hücreler | 9 |
| 2.2.1.2. Pluripotent Kök Hücreler | 9 |
| 2.2.1.3. Multipotent Hücreler | 9 |
| 2.2.2. Diş Gelişimi Evresinde Rol Alan Kök Hücreler | 9 |
| 2.2.2.1. Dental Epitelial Kök Hücreler | 10 |
| 2.2.2.2. Diş Pulpası Kök Hücreleri | 10 |
| 2.2.2.3. Süt Diş Pulpası Kök Hücreleri | 11 |
| 2.2.2.4. Apikal Papilladan Elde Edilen Kök Hücreler | 11 |
| 2.2.2.5. Periodontal Ligament Kök Hücreleri | 11 |
| 2.2.2.6. Diş Folikülü Öncül Hücreleri | 12 |
| 2.2.3. Morfojenler ve Büyüme Faktörleri | 12 |
| 2.2.4. Diş Hekimliğinde Rejeneratif Uygulamalar | 16 |
| 2.2.4.1. Rejeneratif Endodontik Uygulamalar | 17 |
| 2.2.4.2. Kök Kanalının Revaskülarizasyonu | 17 |
| 2.2.4.2.1. Üçlü Antibiyotik Patının İçeriği (3 Mix-MP) | 18 |
| 2.2.4.2.2. Üçlü Antibiyotik Patının Hazırlanışı | 18 |
| 2.2.4.3. Erişkin (Postnatal) Kök Hücre Tedavisi | 19 |

| | |
|---|----|
| 2.2.4.4. Pulpa İmplantasyonu | 19 |
| 2.2.4.5. Doku İskelesi İmplantı | 20 |
| 2.2.4.6. Enjekte Edilebilir Doku İskelesi Uygulamaları..... | 21 |
| 2.2.4.7. Üç Boyutlu (3D) Hücre Yazılımı..... | 21 |
| 2.2.4.8. Gen Tedavisi | 21 |
| 2.3. Kemik ve Diş Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyosinyaller..... | 22 |
| 2.4. Kitin ve Kitosan..... | 25 |
| 2.4.1. Doku Mühendisliğinde Kitosan | 28 |
| 2.5. Hidroksiapatit..... | 31 |
| 2.6. Bor..... | 35 |
| 2.6.1. Bor ve Kemik Metabolizması | 35 |
| 2.6.2. Periodontolojide Bor Kullanımı | 36 |
| 2.6.3. Antimikrobiyal Etkileri | 36 |
| 2.6.4. Kemik Rejenerasyonu | 37 |
| 2.6.5. Antiinflamatuvar Etki..... | 37 |
| 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR..... | 39 |
| 3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler | 39 |
| 3.2. Doku İskelelerinin Üretimi..... | 40 |
| 3.2.1. Kitosan Doku İskelelerinin Hazırlanması | 41 |
| 3.2.2. nHAp/kitosan ve B-nHAp/kitosan NanoKompozit Doku İskelelerinin Hazırlanması..... | 42 |
| 3.3. Hücre Kültür Çalışmaları | 43 |
| 3.3.1. iDPKH'lerin İzolasyonu | 43 |
| 3.4. Hücre Karakterizasyonu | 44 |
| 3.4.1. MTT analizi..... | 45 |
| 3.4.2. F-aktin/DAPI Boyaması | 45 |
| 3.4.3. Kristal-Viyole Boyanması..... | 46 |
| 3.4.4. Akış Sitometrisi Yöntemi ile iDPKH'lerin Karakterizasyonu | 46 |
| 3.5. iDPKH'lerin Farklılaşma Kapasitelerinin İncelenmesi | 46 |
| 3.5.1. Osteojenik Farklılaşmanın Belirlenmesi..... | 47 |
| 3.5.2. Kondrojenik Farklılaşmanın Belirlenmesi..... | 48 |
| 3.5.3. Adipojenik Farklılaşmanın Belirlenmesi | 49 |
| 3.6. nHAp/kitosan ve B-nHAp/kitosan Nanokompozit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu..... | 50 |

| | |
|--|----|
| 3.6.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi | 50 |
| 3.6.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizi | 50 |
| 3.6.3. X Işını Kırınımı (XRD) Analizi | 50 |
| 3.6.4. Şişme Deneyleri | 50 |
| 3.6.5. Gözenekliliğin Belirlenmesi..... | 51 |
| 3.7. Doku İskeleleri ile Yapılan Hücre Kültürü Çalışmaları | 51 |
| 3.7.1. Doku İskelelerinin Fibronektin İmmobilizasyonu Öncesi Hazırlanması..... | 51 |
| 3.7.2. Fibronektin İmmobilizasyonu | 51 |
| 3.7.3. Doku İskelesi Yüzeyine Bağlanan Amino Gruplarının Ninhidrin Yöntemi ile Tayini..... | 53 |
| 3.7.4. Hücrelerin Doku İskelelerine Ekilmesi | 54 |
| 3.7.5. Presto Blue Analizi | 54 |
| 3.7.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi | 55 |
| 3.7.7. RT-PCR Analizi | 56 |
| 3.8. İstatistiksel Analiz | 58 |
| 4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA..... | 59 |
| 4.1. Doku İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu | 60 |
| 4.1.1. Kitosan Doku İskelelerinin Üretimi..... | 60 |
| 4.1.2. nHAp ve B-nHAp Üretimi ve Karakterizasyonu | 62 |
| 4.1.3. Nanokompozit Doku İskelelerinin Üretimi..... | 66 |
| 4.1.4. nHAp/kitosan ve B-nHAp/kitosan Doku İskelelerinin Karakterizasyonu..... | 68 |
| 4.2. Hücre Kültür Çalışmaları | 70 |
| 4.2.1. iDPKH İzolasyonu..... | 71 |
| 4.2.2. iDPKH'lerin Karakterizasyonu | 74 |
| 4.2.2.1. MTT Analizi | 74 |
| 4.2.2.2. F-aktin/DAPI Boyaması | 75 |
| 4.2.2.3. Kristal Viyole Boyaması..... | 76 |
| 4.2.2.4. Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi..... | 76 |
| 4.2.2.5. Akış Sitometrisi Analizi | 81 |
| 4.2.3. Hücre Ekimi ve Odontojenik Farklılaşma..... | 83 |
| 4.2.3.1. Doku İskelesi Yüzeyine Bağlanan Amino Gruplarının Ninhidrin Yöntemi ile Tayini..... | 83 |
| 4.2.3.2. Presto Blue Analiz sonuçları..... | 85 |
| 4.2.3.3. SEM Analizi | 88 |

| | |
|----------------------------------|-----|
| 4.2.3.4. RT-PCR Analizleri | 102 |
| 5. GENEL SONUÇLAR | 110 |
| KAYNAKLAR..... | 115 |
| ÖZGEÇMİŞ | 127 |

ÇİZELGELER

| | |
|--|----|
| Çizelge 2. 1. Diş gelişimindeki etkin büyüme faktörleri..... | 13 |
| Çizelge 2. 2. Diş dokularından elde edilen kök hücrelerin diş rejenerasyonunda kullanımı..... | 24 |
| Çizelge 3. 1. 10xSBF benzeri çözelti reçetesi (toplam hacim 1L)..... | 42 |
| Çizelge 3. 2. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri..... | 57 |
| Çizelge 4. 1. Dentin, mine, kemik, nHAp ve B-nHAp örneklerinde bulunan bileşenlerin oranları..... | 66 |
| Çizelge 4. 2. Doku iskelelerinin yüzde gözeneklilik ve şişme değerleri..... | 70 |

ŞEKİLLER

| | |
|---|----|
| Şekil 2. 1. Diş yapısının şematik görünümü..... | 5 |
| Şekil 2. 2. Doku mühendisliğinin üç temel elemanının şematik görünümü..... | 7 |
| Şekil 2. 3. İnsan diş pulpa kök hücrelerin kaynağı ve yaşla değişimi..... | 10 |
| Şekil 2. 4. İnsan diş pulpasından elde edilen kök hücrelerin uygulama potansiyeli. | 15 |
| Şekil 2. 5. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları..... | 26 |
| Şekil 2. 6. Kitosanın fiziksel özellikleri..... | 27 |
| Şekil 2. 7. HAp'nın şematik olarak gösterimi..... | 32 |
| Şekil 3. 1. Dondurarak-kurutma yöntemi ile kitosan doku iskelelerin hazırlanışı..... | 41 |
| Şekil 3. 2. İnsan ağızındaki farklı konumlardaki 20 yaş gömülü azı dişleri..... | 44 |
| Şekil 3. 3. Fibronektin yapısı ve bağlanma bölgelerinin şematik görünümü..... | 52 |
| Şekil 3. 4. Presto Blue analizi ile iDPK hücrelerinin canlılığının belirlenmesi..... | 55 |
| Şekil 4. 1. iDPKH'ler ile hedeflenen çalışmaların şematik göstergesi..... | 59 |
| Şekil 4. 2. Dondurarak-kurutma yöntemi ile elde edilen kitosan doku iskelelerinin üretim metodunun şematik gösterimi..... | 61 |
| Şekil 4. 3. Mikrodalga desteği ile üretilen nHAp örneklerine ait SEM görüntüleri: (a) 5,000X, (b) 30,000X..... | 64 |
| Şekil 4. 4. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan doku iskelelerinin SEM görüntüleri: (a) Kitosan 100X, (b) Kitosan 500X, (c) nHAp/kitosan 250X , (d) nHAp/kitosan 500X, (e) B-nHAp/kitosan 250X, (f) B-HAp/kitosan 500X..... | 69 |
| Şekil 4. 5. İzole edilen iDPKH'lerin flasklarda kültüre edilmesi (a) ve besi ortamından kök hücrelerin toplanması (b), kök hücrelerin optik mikroskop görüntüleri; (c) iDPKH P0 20X, (d) iDPKH P3 20X, (e) iDPKH P5 20X, (f) iDPKH P5 20X..... | 73 |
| Şekil 4. 6. iDPKH'lerin büyüme eğrisi..... | 74 |
| Şekil 4. 7. iDPKH'lere ait F-aktin/DAPI boyamaları (a) DAPI 20X (b) F-aktin 20X, çakışık görüntüler (c)20X, (d)20X. Ok hücrelerin yönelmelerine işaret etmektedir.. | 75 |
| Şekil 4. 8. Kristal viyole ile boyanmış iDPKH'lerin optik mikroskop görüntüleri (a) 10X, (b) 20X..... | 76 |
| Şekil 4. 9. iDPKH'lere ait ALP-VK boyamaları: 14.gün - kontrol grubu (a) 20X, osteojenik farklılaşma grubu (b) 20X; 28.gün - kontrol grubu, (c) 20X osteojenik farklılaşma grubu, (d) 20X..... | 78 |
| Şekil 4. 10. iDPKH'lerin ALP enzim aktivitesi ölçüm sonuçları..... | 79 |
| Şekil 4. 11. Safranin O/Fast Green boyaması; (a) iDPKH kontrol grubu, (b) iDPKH kondrojenik farklılaşma grubu..... | 80 |

| | |
|---|-----|
| Şekil 4. 12. Adipojenik (Oil Red O) boyaması; (a) iDPKH kontrol grubu, (b) iDPKH adipojenik farklılaşma grubu..... | 81 |
| Şekil 4. 13. iDPKH'lerin akış sitometrisi ile belirlenen yüzey antijenleri..... | 82 |
| Şekil 4.14. Doku iskelelerinde ninhidrin analiz sonuçlarını gösteren fotoğraflar..... | 84 |
| Şekil 4.15. Ninhidrin analizi sonuçlarına ait absorbands değerleri..... | 84 |
| Şekil 4.16. Kitosan, kitosan+Fn, nHAp/kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn doku iskeleleri üzerinde çoğalan iDPKH'lere ait Presto Blue grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu kitosan+Fn için + p<0.05, ++ p<0.01, +++ p<0.001; kontrol grubu nHAp/kitosan için # p<0.05, ## p<0.01,### p<0.001)..... | 86 |
| Şekil 4.17. Kitosan doku iskelelerin üzerinde çoğalan iDPKH'lere ait 4,7 ve 14.gün SEM görüntüleri. Sırasıyla 500x (a,d,g), 2500x (b,e,h) ve 5000x (c,f,i) büyütme verilmştir..... | 90 |
| Şekil 4.18. Kitosan+Fn doku iskelesi üzerinde çoğalan iDPKH'lere ait 4. ,7. ve 14. gün SEM görüntüleri. Sırasıyla 500x (a,d,g), 2500x (b,e,h) ve 5000x (c,f,i) büyütme verilmştir..... | 92 |
| Şekil 4.19. nHAp/Kitosan+Fn doku iskelelerin üzerinde çoğalan iDPKH'lere ait 4,7 ve 14.gün SEM görüntüleri. Sırasıyla 500x (a,d,g), 2500x (b,e,h) ve 5000x (c,f,i) büyütme verilmştir..... | 94 |
| Şekil 4.20. B-nHAp/Kitosan+Fn doku iskelelerin üzerinde çoğalan iDPKH'lere ait 4,7 ve 14.gün SEM görüntüleri. Sırasıyla 500x (a,d,g), 2500x (b,e,h) ve 5000x (c,f,i) büyütme verilmştir..... | 97 |
| Şekil 4.21. Kitosan, kitosan+Fn, nHAp/Kitosan+Fn ve B-nHAp/Kitosan+Fn doku iskelelerin üzerinde çoğalan iDPKH'lere ait 14.gün SEM görüntüleri verilmştir. Sırasıyla 250x (a,d,g,i), 2500x (b,e,h,j) ve 5000x (c,f,i,k) büyütme verilmştir..... | 99 |
| Şekil 4.22. NHAp/Kitosan+Fn (a,b,c ve d) ve B-nHAp/Kitosan+Fn (e,f,g ve h) doku iskelelerin üzerinde çoğalan iDPKH'lere ait 7.gün SEM görüntüleri. Sırasıyla 500x (a,e),1000 (b,f), 2500x (c,g) ve 5000x (d,h) büyütme verilmştir..... | 100 |
| Şekil 4.23. NHAp/Kitosan+Fn (a,b,c ve d) ve B-nHAp/Kitosan+Fn (e,f,g ve h) doku iskelelerin üzerinde çoğalan iDPKH'lere ait 14.gün SEM görüntüleri. Sırasıyla 500x (a,e),1000 (b,f), 2500x (c,g) ve 5000x (d,h) büyütme verilmştir..... | 101 |
| Şekil 4.24. Kitosan+Fn, nHAp/Kitosan+Fn ve B-nHAp/Kitosan+Fn üzerinde çoğalan iDPKH'lerine ait bağıl ALP gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3), kontrol grubu kitosan+Fn için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu nHAp/Kitosan+Fn için + p<0.05, ++ p<0.01,+++ p<0.001)..... | 102 |
| Şekil 4.25. Kitosan+Fn, nHAp/Kitosan+Fn ve B-nHAp/Kitosan+Fn üzerinde çoğalan iDPKH'lerine ait bağıl RunX 2 gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3), kontrol grubu kitosan+Fn için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu nHAp/Kitosan+Fn için + p<0.05, ++ p<0.01,+++ p<0.001)..... | 103 |

Şekil 4.26. Kitosan+Fn, nHAp/Kitosan+Fn ve B-nHAp/Kitosan+Fn üzerinde çoğalan iDPKH'lerine ait bağıl KOL 1 gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3), kontrol grubu kitosan+Fn için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu nHAp/Kitosan+Fn için + p<0.05, ++ p<0.01,+++ p<0.001)..... 105

Şekil 4.27. Kitosan+Fn, nHAp/Kitosan+Fn ve B-nHAp/Kitosan+Fn üzerinde çoğalan iDPKH'lerine ait bağıl OPN gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3), kontrol grubu kitosan+Fn için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu nHAp/Kitosan+Fn için + p<0.05, ++ p<0.01,+++ p<0.001)..... 106

Şekil 4.28. Kitosan+Fn, nHAp/Kitosan+Fn ve B-nHAp/Kitosan+Fn üzerinde çoğalan iDPKH'lerine ait bağıl OCN gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3), kontrol grubu kitosan+Fn için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu nHAp/Kitosan+Fn için + p<0.05, ++ p<0.01,+++ p<0.001)..... 107

Şekil 4.29. Kitosan+Fn, nHAp/Kitosan+Fn ve B-nHAp/Kitosan+Fn üzerinde çoğalan iDPKH'lerine ait bağıl DSPP gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3), kontrol grubu kitosan+Fn için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu nHAp/Kitosan+Fn için + p<0.05, ++ p<0.01,+++ p<0.001)..... 108

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

| | |
|--|-------------------------------------|
| AgNO ₃ | Gümüş Nitrat |
| CaCl ₂ •2H ₂ O | Kalsiyum Klorür Dihidrat |
| CO ₂ | Karbon Dioksit |
| H ₃ BO ₃ | Borik Asit |
| HCl | Hidroklorik Asit |
| KCl | Potasyum Klorür |
| MgCl ₂ •6H ₂ O | Magnezyum Klorür Hekzadhidrat |
| Na ₂ HPO ₄ | Disodyum Hidrojen Fosfat |
| NaCl | Sodyum Klorür |
| NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O | Sodyum Dihidrojen Fosfat Monohidrat |
| NaHCO ₃ | Sodyum Bikarbonat |
| NaOH | Sodyum Hidroksit |

Kısaltmalar

| | |
|--------|---------------------------------|
| AKH | Adipoz Kökenli Kök Hücreler |
| APKH | Apikal Papilla kök hücreler |
| ALP | Alkalin Fosfataz |
| B-nHAp | Bor Katkılı Nano Hidroksiapatit |
| BNYT | Bor Nötron Yakalama Tedavi |
| BMP | Kemik Morfojenik Proteini |

| | |
|----------|--|
| BSA | Sığır Serum Albumini |
| CD | Cluster of differentiation |
| cDNA | Komplementer Deoksi Ribonükleik Asit |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-fenilindol |
| DEKH | Dental Epitelial Kök Hücreler |
| DFÖH | Dental Folikül Öncü Hücreler |
| DMP-1 | Diş Matriks Protein 1 |
| DPKH | Diş Pulpası Kök Hücreleri |
| DSPP | Dentin Siyalofosfoprotein |
| ECM | Hücre Dışı Matris |
| EDC | N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etil Karbodiimid Hidroklorür |
| EKH | Embriyonik Kök Hücre |
| FBS | Fötal Sığır Serumumu |
| Fn | Fibronektin |
| nHAp | Nano Hidroksiapatit |
| HKH | Hematopoetik Kök Hücreler |
| HMDS | Hekzametildisilazan |
| IBMX | 3-İzobutil-1metilksantin |
| IgG | İmmünoglobulin G |
| KiMKH | Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler |
| KOL-I | Kollajen Tip I |
| MC3T3-E1 | Fare Osteoblastik Hücre Hattı |
| MES | 2-(N-Morfolin)ethansülfonik Asit Hemisodyum |

| | |
|---------------|--|
| MKH | Mezenkimal Kök Hücre |
| MTT | 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-Difeniltetrazolyum Bromür |
| NHS | N-hidroksi Süksinimid |
| OCN | Osteokalsin |
| ON | Osteonektin |
| OPN | Osteopontin |
| P/S | Penisilin/Streptomisin |
| PLKH | Periodontal Ligament Kök Hücreleri |
| PBS | Fosfat Tamponu Çözeltisi |
| RNA | Ribonükleik Asit |
| RT-PCR | Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| RunX2 | Runt-ilişkili Transkripsiyon Faktörü 2 |
| SBF | Yapay Vücut Sıvısı |
| SEM | Taramalı Elektron Mikroskopu |
| SDKH | Süt Diş Pulpası Kök Hücreleri |
| SVF | Stromal Vasküler Fraksiyon |
| TCPS | Tissue Culture Polystyrene (Hücre Kültür Kabı) |
| TGF- β | Transformik Büyüme Faktörü |
| uPK | Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler |
| VK | von Kossa |
| YKH | Yetişkin Kök Hücreler |
| α –MEM | Minimum Essential Medium Alpha Modification |

1. GİRİŞ

Kaybedilen ya da hasar gören doku ve organların tedavi edilmesinde doku mühendisliği yaklaşımı giderek önem kazanmaktadır. Rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinin son yıllardaki hızlı gelişimi; tıbbın bütün dallarında olduğu gibi, diş hekimliğinde de rejeneratif uygulamaların gündeme gelmesini sağlamıştır. İstenen dokuyu oluşturacak işlevsel hücrelerin, hazırlanan doku iskeleleri ile hibrit sistemler oluşturularak rejenerasyonda kullanım potansiyelleri araştırılmaktadır. Doku iskeleleri yapay bir hücre dışı matris (ECM) olarak görev alarak hücreler için yapışma yüzeyi ve mekanik dayanım sağlarlar. Ayrıca çevre doku ile iletişim kurmaya ve yeni ECM oluşumuna yardımcı olurlar. Bu nedenle oluşturulmak istenen dokuya göre doku iskelesi üretiminde kullanılacak malzemelerin seçimi çok önemlidir [1]. Ayrıca kullanılacak iskelelerin vücut tarafından yabancı olarak nitelendirilmemesi için biyouyumlu; hücre büyümesini, infiltrasyonunu ve dokudaki besin alışverişini desteklemesi için gözenekli; iyileşme boyunca doku iskelesinin vücuttan kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi için biyobozunur özelliklere sahip olması gerekmektedir [2].

Modern restoratif diş hekimliğinin ana hedefi zarar gören ya da kaybedilen dişin işlevsel ve estetik açıdan yeniden yapılandırılmasıdır. Bu amaçla genellikle metal ya da polimer bazlı malzemeler, örneğin gümüş amalgam, rezin-bazlı kompozitler ve porselen malzemeler kullanılmaktadır. Fakat bu konvansiyonel dolgu malzemeleri diş korumada etkili olsalar da kullanım ömürleri kısadır ve sıklıkla değiştirilmeleri gerekmektedir. Daha da önemlisi tedavi edilen bu dişlerin önemli bir kısmı pulpal nekroza uğramaktadır. Bu nedenle rejenerasyon için yeni tekniklerin geliştirilmesi gerekmektedir [3]. Diş hekimliğinde, doğal diş dokularının yerine geçebilecek malzemelerin geliştirilmesi dental doku mühendisliğinin ana hedefidir. Dental doku mühendisliği üç temel elemana ihtiyaç duyar; uygun bir hücre kaynağı, biyolojik olarak parçalanabilen ve geçici bir ekstrasellüler matris oluşturan doku iskelesi ve hücre fonksiyonu için uygun sinyal moleküller [4, 5].

Dişin sert dokusunda iki temel hücre mevcuttur, dentin yapısının oluşmasından sorumlu mezenkim-türevli odontoblastlar ve mine tabakasını oluşturan ektoderm-türevli ameoblastlar. Yetişkin insanlarda ameoblastlar diş sürdükten sonra ortadan kaybolurlar. Epitelyal türevli bu hücreler henüz izole edilememiştir [6]. İnsan diş

pulpası kaynaklı kök hücreleri (DPKH) ise pulpadaki kan damarları etrafından, diş folikülünden ve periodontal ligament bölgesinden izole edilebilmektedir. Bu dokulara özgü bir mezenkimal kök hücre nişinin varlığı ise henüz gösterilememiştir [6]. İnsan DPKH'leri kemik iliği türevli kök hücrelere göre %30 oranında daha yüksek bir çoğalma kapasitesine sahiptirler [7] ki bu da hücre çoğaltma süresini oldukça kısaltmaktadır.

Diş pulpası, zengin kök hücre içeriği ile önemli stromal kaynaklardandır. Diş pulpasından izole edilen kök hücreler kolay elde edilmeleri, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerine göre daha hızlı üremeleri, etik problem oluşturmamaları ve odontoblast benzeri hücreleri sentezlemeleri nedeniyle önem taşımaktadırlar. Bu nedenle DPKH'leri odontojenik farklılaşma ve dentin oluşturma potansiyeline sahiptirler [8].

Dental doku mühendisliğinin doku iskelesi temelli yaklaşımında in vitro olarak hücrelerin izolasyonu, çoğaltılması ve farklılaştırılması, bu hücrelerin doku iskelelerine ekilmesi ve in vivo olarak bu yapının implantasyonu gerçekleştirilmektedir. Hücre ekilmiş olan doku iskeleleri (eksplantlar), bazı araştırmalarda omentum (bağırsak zarı) ve böbrek altı kapsülü gibi vücudun ektopik bölgelerine transplante edilmiş, bazı araştırmalarda ise diş çekim soketine veya çeneye implante edilmiştir [9].

Rejeneratif endodontik uygulamalarda amaç; pulpa-dentin kompleksinin, çürük veya diğer nedenlerle açığa çıkmış dentin dokusunun, rezorbe olmuş apikal kök dentininin ya da servikal dentinin yenilenmesidir. Rejeneratif endodontide geliştirilmekte olan yöntemler; kök kanalının revaskülarizasyonu, kök hücre tedavisi, pulpa implantı, iskele implantı, enjekte edilebilir iskele uygulamaları, üç boyutlu hücre yazılımı ve gen terapisi şeklinde sıralanabilir. Erişkin kök hücre tedavisinin dezavantajı ise, hücrelerin hayatta kalma süresinin düşük olmasıdır. Hücrelerin, vücudun farklı bölgelerine göç edebileceği ve anormal mineralizasyonlara neden olabileceği gösterilmiştir. Bu durum, hücrelerin doku iskelesi ile birlikte uygulanmasıyla çözümlenebilir [10].

Sunulan tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen in-vitro çalışmalar iki kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısımda, kitosan/biyomimetik bor nano hidroksiapatit (B-nHAp) doku iskeleleri dentin-pulpa kompleksinin rejenerasyonunda pulpa kaplama

materyali olarak üretilmiştir. Çalışmanın ana hedefi, kitosan/biyomimetik bor nano HAp doku iskelelerinin farklı biyoaktif ajanlar (fibronektin) ile modifiye edilmiş/edilmemiş olduğu durumlarda insan diş pulpa kök hücrelerinin (iDPKH) odontoblast-benzeri farklılaşmasını indükleme aktivitesinin in-vitro olarak değerlendirilmesidir. Çalışmanın ikinci kısmında ise Hacettepe Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan GO13/250 karar numarası ile alınan izin çerçevesinde, çekilen 20 yaş dişlerinden, diş pulpaları elde edilmiştir. Pulpalardan kök hücre izolasyonu yapılarak elde edilen hücreler çoğaltılıp dondurulmuş ve çalışma stoğu oluşturulmuştur. Hücrelerin kök hücre olduğu; yüzeye tutunma, farklılaşma özellikleri ve pozitif/negatif yüzey antijenleri ile belirlenmiştir. Doku iskelelerine ekilen iDPKH'lerin canlılığı, tutunma ve çoğalma özellikleri ve odontoblast benzeri hücrelere farklılaşmaları ve dentin dokusunu oluşturmaları Presto Blue, taramalı elektron mikroskopu (SEM), konfokal görüntüleme, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve immunolojik analizlerle incelenmiştir. Bu çalışma kapsamında istatistiksel değerlendirmeler sonucunda dentin rejenerasyonunu destekleyen doku iskelesi bileşimi gösterilmiş olup, biyosinyaller ve hücre ekim yöntemi/hücre inokülasyon yoğunluğu önemi vurgulanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsan Dişinin Yapısı

Dişler üç mineralize dokudan oluşur; mine, dentin ve sement. Bu dokular diş pulpası adı verilen gevşek bağ dokusunu çevreler. Mine ektodermal kökenlidir, dentin, sement ve diş pulpası ise ektomezenşimal kökenlidir [11].

İnsan vücudunun en sert dokusu olan diş minesi kütlice % 96-97 hidroksiapatit formunda inorganik maddeden, % 12 den daha az organik maddeden ve geri kalan kısmı ise sudan oluşur [12]. Dişin ağız içinde görünen kısmı mine ile kaplıdır.

Dentin diş kütlesinin esas kısmını oluşturan sert dokudur. Normalde ağız ortamına açık olmayan canlı bir dokudur. Kök dentini sement ile kron dentini mine ile kaplıdır. Dentin hacimce %45 inorganik, % 38 organik materyal ve % 22 sudan oluşur. İnorganik kısım mine ve kemikte olduğu gibi esas olarak hidroksiapatittir. Dentinin organik kısmı büyük oranda tip I kollajen geri kalan ise çok az miktarda tipV kollajen ile kollajen dışı proteinler olan fosfoproteinler, proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar ve glikoproteinler ile bazı plazma proteinleridir [13, 14]. Mineralizasyon dentinin kollajen lifleri boyunca oluştuğundan, kollajen altyapının dentinin fizyolojisinde önemli etkisi olduğu kabul edilmektedir [14].

Pulpa-dentin kompleksi

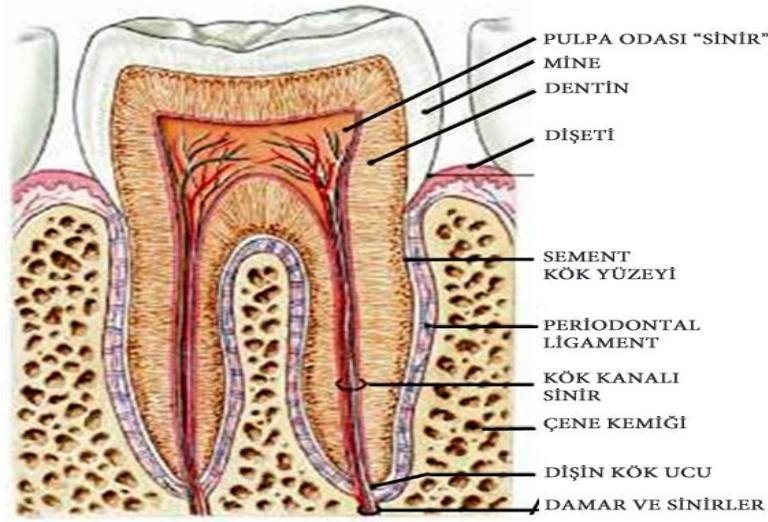
Dentin ve pulpa , diş tomurcuğunun dental papillasından köken alan özel bağ dokularıdır. Pek çok araştırmacı bu iki dokuyu pulpa-dentin kompleksi adı altında tek bir doku olarak değerlendirir. Mineralize dentin hücre farklılaşma ve matürasyonunun son ürünü olarak kabul edilir.

Dentin **odontoblast** adı verilen hücreler tarafından oluşturulur. Odontoblastların hücre gövdeleri pulpa çevresinde tek sıra halinde yer alırken ince uzun sitoplazmik uzantıları (Tomes fibrilleri) mineralize dentin dokusunda bulunan kanallar (tübüller) içinde uzanırlar. Bu odontoblastik hücre uzantıları nedeniyle dentin canlı bir doku olarak kabul edilir , fizyolojik ve patolojik uyarılara reaksiyon gösterebilir.

Odontoblastlar dentin formasyonuna başladıktan hemen sonra ameloblastlar mine formasyonuna başlarlar. Dentinin oluşum süreci **dentinogenezis** olarak adlandırılır. Odontoblastlar ilk olarak mine-dentin birleşiminden pulpaya doğru kollajen matriksi yığarlar. Kollajen matriks, sekresyonundan sonra giderek artan şekilde mineralize

olur. En yeni oluşmuş dentin pulpa çevresindedir. Odontoblastların hücre gövdelerinin hemen bitişiğindeki mineralize olmamış dentin tabakası pre-dentin olarak adlandırılır. Minenin aksine dentin formasyonu diş sürmesinden sonra ve pulpa canlılığını koruduğu sürece devam eder.

Dişin şeklini oluşturan ve sürmesinden sonra üç yıl boyunca oluşan dentine **primer dentin** adı verilir. Primer dentin oluşuktan sonra dentin birikimi azalan bir oranda herhangi bir dış uyaran olmasa dahi pulpa canlılığını koruduğu sürece devam eder. Bu fizyolojik dentine **sekonder dentin** adı verilir. Sekonder dentin pulpa boşluğunun iç duvarlarında birikerek yaş ilerledikçe pulpa odasını küçültür [15]. Şekil 2.1'de şematik olarak dişin yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2. 1. Diş yapısının şematik görünümü. <http://www.dentus.info/faydalibilgiler.php>

2.1.1. Tamir Dentini Oluşumu

Bir dış etki karşısında pulpa çevresindeki odontoblastlar dentin matriks sekresyonunu artırır ve **tersiyer dentin** oluştururlar. Tersiyer dentin dişe gelen yaralanmanın derecesine göre iki tiptedir. Başlangıç aşamasındaki çürük, diş aşınması gibi hafif etkiler karşısında oluşan dentine **reaksiyoner dentin** adı verilir. Bu durumda primer odontoblastlar tersiyer dentin oluşumunu gerçekleştirirler. Böylece diş pulpası korunmuş olur. Eğer diş yaralanma ciddi derecede ise örneğin operatif işlemler sırasında pulpanın ekspoz olması (açılması) durumunda o bölgedeki odontoblast hücreleri ölür. **Tamir dentini (reperatif dentin)** oluşması için pulpadaki kök/projenitör hücrelerin odontoblast benzeri hücrelere farklılaşması

gereklidir. Odontoblast benzeri hücreler inflamasyon ve mikrobiyal açıdan elverişli çevresel koşullarda reperatif dentin oluşumunu sağlarlar [16]. Diş hekimliğinde klinik uygulamalarda direkt pulpa kaplaması adı verilen teknikte oluşan reperatif dentine, dentin köprüsü adı verilir. Diş pulpasının operatif işlemler sırasında yaralanarak açılması durumunda en eski ve yaygın kullanımı olan ajan kalsiyum hidrokstittir. Bu ajanın olası etki mekanizması dentin yüzeyinde sınırlı bir çözünmeye yol açarak büyüme faktörleri gibi biyoaktif yapıların salınmasıdır [17]. Benzer şekilde etki mekanizması olduğu düşünülen Mineral Tiroksit Agregat (MTA) [18] ve biodentine gibi ticari preparatlar son yıllarda klinik kullanıma sunulmuştur.

2.1.2. Diş Hekimliğinde Doku Mühendisliği ve Rejenerasyon

Rejeneratif (Yenileyici) Tıp

Rejeneratif tedavilerdeki temel kavramlardan biri olan "rejeneratif (yenileyici) tıp "; travma, kanser, hastalık ya da konjenital nedenlerle hasara uğramış doku ve organların yeniden oluşumunu hedeflemektedir [19, 20]. Rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinin son yıllardaki hızlı gelişimi, tıbbın bütün dallarında olduğu gibi, diş hekimliğinde de rejeneratif uygulamaların gündeme gelmesini sağlamıştır. Yenileyici endodontik prosedürler, pulpa-dentin kompleksindeki hücrelere ek olarak dentin ve kök yapısını da içeren zarar görmüş yapıların yenisi ile yer değiştirmesini sağlayan biyolojik temelli işlemler olarak tanımlanır [21]. Endodontide rejeneratif prensiplerin uygulamaya aktarılabilmesi için doku mühendisliği uygulamalarına gereksinim vardır.

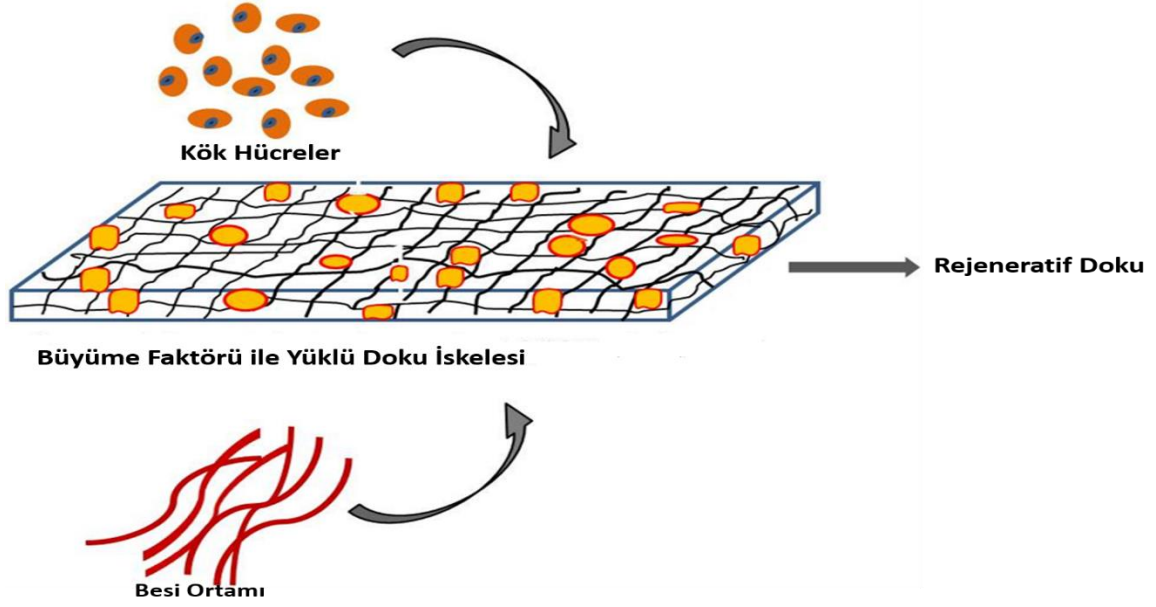
Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği; sentetik veya biyolojik matrisler içinde canlı hücrelerin, biyolojik aracı moleküllerin ve büyüme faktörlerinin birlikte bulunduğu yapıların hastalara yerleştirilmesi ile hastalık ya da travma sonucu kaybedilen veya hasar görmüş dokuları yeniden oluşturabilmeyi hedeflemektedir [22].

Dental doku mühendisliği üç temel elemana ihtiyaç duyar:

- Uygun bir hücre kaynağı,
- Biyolojik olarak bozunabilen ve geçici bir ekstrasellüler matris oluşturan doku iskelesi ve
- Hücre fonksiyonu için en uygun sinyal molekülleri.

Doku mühendisliği en basit şekilde laboratuvar koşullarında, biyomalzeme, hücre ve biyosinyal moleküllerinin tek başlarına ya da birlikte kullanılması ile doku ya da organların oluşturulması olarak tanımlanabilir [23]. Şekil 2.2'de doku mühendisliğinin üç temel elemanı şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2. 2. Doku mühendisliğinin üç temel elemanının şematik görünümü.
<http://www.jcdr.net/ReadXMLFile.aspx?id=3937>

Doku mühendisliğinin ticari ürünlerinden olan deri dokusu, ABD ve İngiltere gibi pek çok ülkede kullanılmaktadır. Kemik, kıkırdak, karaciğer, pankreas, kornea, sinir, kalp kapakçıkları, boşaltım sistemi, damarlar ve diğer birçok doku ile ilgili çalışmalar ise yoğun olarak sürdürülmektedir. İstenen dokuyu oluşturacak işlevsel hücreler, hazırlanan doku iskeleleri ile hibrit sistemler oluşturur. Doku iskeleleri yapay bir hücre dışı matris (ECM) olarak görev alır ve hücreler için yapışma yüzeyi ile mekanik dayanım sağlarlar. Ayrıca çevre doku ile iletişim kurmaya ve yeni ECM oluşumuna yardımcı olurlar. Bu nedenle oluşturulmak istenen dokuya göre doku iskelesi üretiminde kullanılacak malzemelerin seçimi çok önemlidir [24].

Sunulan tez çalışmasında klasik biyomateryal uygulamalarından farklı olarak sadece kaybedilen dokulara ait boşlukların doldurulması değil, dokunun oluşum ve rejenerasyon mekanizmalarını destekleyerek fonksiyon görebilen dokuların elde edilebilmesi hedeflenmektedir.

2.2. Diş Hekimliğinde Kök Hücreler ve Dental Pulpa Kök Hücreleri

Rejeneratif tıp alanında biyolojik olarak güvenli ve etik sorun oluşturmayan hücre kaynaklarının bulunması büyük önem taşımaktadır. Diğer kök hücre elde etme yöntemlerine göre daha az invaziv olması ve etik sorunlar taşımaması nedeniyle diş pulpası kök hücreleri, son zamanlarda üzerinde önemle durulan bir araştırma konusu haline gelmiştir. Klinik diş hekimliği ve temel biyoloji bilimini birleştirerek diş hekimliği pratiğine doku rejenerasyonunu bir tedavi seçeneği olarak sunacak olan diş pulpası kök hücre çalışmaları, özellikle dentin, pulpa, sement ve periodontal ligament gibi dokuların oluşturulması ve bu sayede hasarlı dokunun tamiri üzerine odaklanmıştır [25, 26].

Hasara uğramış bir organın fonksiyonlarını düzeltmek için yerine yenisini koymaktan daha iyi bir seçenek yoktur. Buradan hareketle birçok kaynaktan elde edilebilen, vücudun çeşitli doku ve hücre tiplerine dönüşebilen, hasarlı bölgeleri tamir ederek pek çok sağlık sorununun tedavisine ışık tutabilecek olan kök hücreler, rejeneratif tıp uygulamalarının temelini oluşturmaktadır. Kök hücre tedavisinin esası; hastanın kendi kök hücrelerinin uyarılıp aktif hale getirilerek, zayıf ya da işlevselliğini yitirmiş bölgelere enjekte edilmesine dayanır. **Kök hücreler**, vücut içinde veya laboratuvar ortamında uygun koşullar sağlandığında uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme, kendini yenileyebilme ve özelleşmiş birçok değişik hücrelere kaynaklık etme (plastisite-farklılaşma) niteliklerine sahip özelleşmemiş hücrelerdir [21]. Kök hücreler, elde edildikleri kaynağa göre embriyonal (fetal) veya erişkin (postnatal) kök hücreler olarak sınıflandırılabilir [27]. Embriyonik kök hücreler, embriyodan köken almaktadır ve bütün dokuları oluşturabilme yeteneğine sahiptirler [28, 29]. Erişkin kök hücreleri ise kemik iliği [30], göbek kordon kanı [21], periferik kan [31], amniyotik sıvı [32], plasenta membranı [33], nazal mukoza [34], iç kulak [35], diş pulpası [4], santral sinir sistemi [36], deri epidermisi [37], sindirim kanalı [38], iskelet kası [39] kornea [40], retina [41], pankreas [42], karaciğer [43], kalp [44], yağ dokusu [45] ve akciğer [46] gibi çeşitli dokulardan izole edilebilmektedir.

2.2.1. Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücreler, somatik üç germ yaprağına doğru gösterdikleri farklılaşma yetenekleri açısından 'totipotent', 'pluripotent' ve 'multipotent' olarak üç farklı tipte sınıflandırılmaktadır [47].

2.2.1.1. Totipotent Hücreler

Totipotent hücreler, zigot evresindeki sekiz hücrelik blastomerdeki sınırsız farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir. Totipotent özelliği bilinen tek kök hücre tipi, embriyonun gelişim sürecinde organizmayı oluşturan tüm doku ve hücre çeşitlerine farklılaşma kapasitesine sahip, fertilize yumurta hücresidir [48].

2.2.1.2. Pluripotent Kök Hücreler

Pluripotent kök hücreler, gelişen bir embriyonun erken safhalarında var olan, mezodermal (kemik, kas, kıkırdak, kan vb.), ektodermal (nöron, deri, saç vb.) ve endodermal (hepatositler, pankreatik beta hücreleri, sindirim sistemi hücreleri vb.) kökenli olmak üzere, vücuttaki farklılaşmış tüm hücre tiplerini oluşturabilme potansiyeline sahip hücreleridir.

2.2.1.3. Multipotent Hücreler

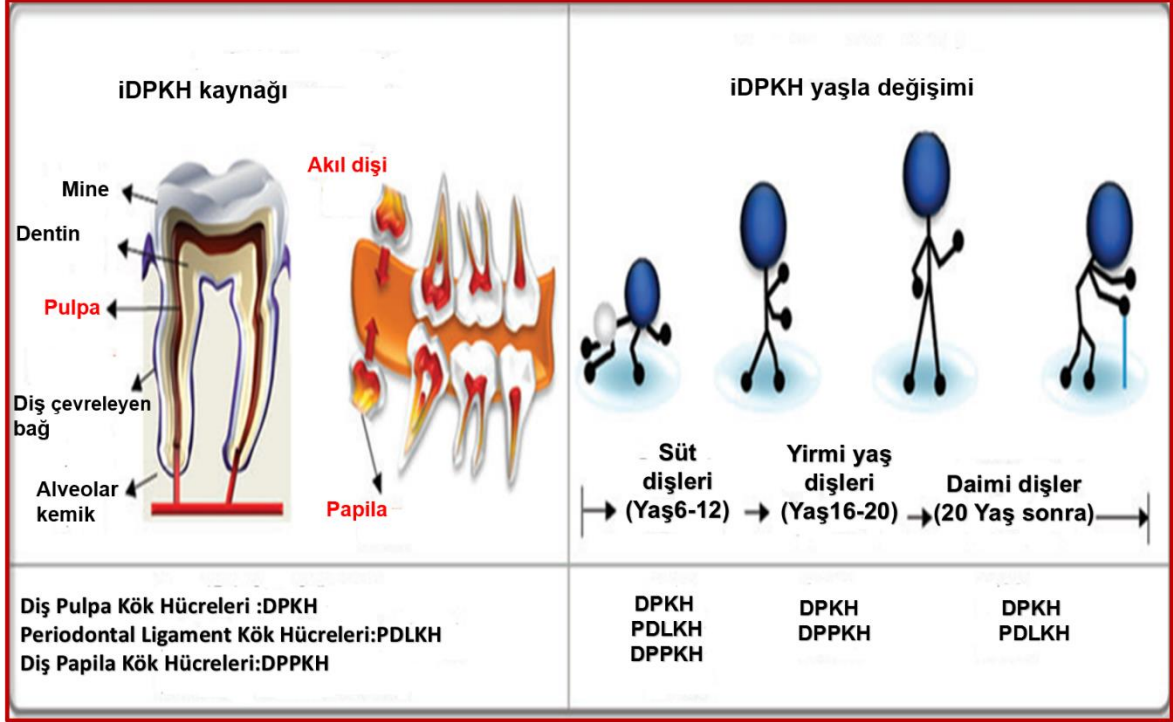
Multipotent kök hücreler çocuklarda ve yetişkinlerde daha fazla bulunabilmektedir ve tek bir germ yaprağına ait hücrelere farklılaşabilen hücrelerdir. Embriyonik kök hücrelerin farklılaşma yeteneğinin erişkin kök hücrelerinden daha fazla olması, bu hücreleri daha değerli kılmaktadır [49]. Ancak embriyonik kök hücrelerin elde edilmesinde süregelen etik ve yasal tartışmalar [47] ve teratom oluşturma riski [50] nedeniyle araştırmacılar multipotent kök hücreler üzerine odaklanmıştır.

2.2.2. Diş Gelişimi Evresinde Rol Alan Kök Hücreler

Dişin oluşumu epitelyal-mezenkimal tabakalarının etkileşimi ile gerçekleşir ve ameloblastlar dışındaki diğer hücreler; odontoblastlar, sementoblastlar, osteoblastlar ve fibroblastlar mezenkim tabakası türevli hücrelerdir. Kemirgenlerin ön kesici dişleri yaşam süreleri boyunca uzamaya devam eder ve mine tabakası oluşumu süreklidir. Bu da servikal bölgedeki epitelyal kökenli kök hücrelerin sıçan ön dişlerinden izole edilerek çalışılmasına olanak tanır. Yetişkin insanlarda ameloblastlar diş sürdükten sonra ortadan kaybolurlar ve epitelyal türevli hücreler henüz izole edilememiştir [6].

Embriyonik dönemde diş gelişimi ektodermden kaynaklanmaktadır. Ektodermal yapı diş germelerini oluştururken, nöral krest hücreleri dental papil ve dental foliküle farklılaşmaktadır. Bu nedenle dental dokular ektodermal kaynaklı nöral krest hücrelerini de kapsayan mezenkimal bileşenler içermektedir. Diş gelişimi evresinde pek çok kök hücre ve öncül hücre rol almaktadır. Bunlar; dental epitelyal kök

hücreler, dental pulpa ile ilişkili olan diş pulpa kök hücreleri (DPKH), süt diş pulpası kök hücreleri (SDKH), apikal papilladan elde edilen kök hücreler (APKH), periodonsiyum ile ilişkili olan periodontal ligament kök hücreleri (PLKH) ve dental folikül öncü hücreleridir (DFÖH) [51]. Şekil 2.3'de insan diş pulpa kök hücrelerinin yaşla değişimi şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2. 3. İnsan diş pulpa kök hücrelerin kaynağı ve yaşla değişimi.

2.2.2.1. Dental Epiteliyal Kök Hücreler

DEKH'leri, dental epiteliyal dokular içinde bulunan, kemirgenlerin keser dişlerinde sürekli rejenerasyonu ve uzamayı sağlayan, insan dişlerinde ise sürme sonrası dönemde ortadan kalkan farklılaşmamış hücrelerdir [51].

2.2.2.2. Diş Pulpası Kök Hücreleri

DPKH'leri, yüksek proliferasyon gösterebilen, klonlanabilen, yüksek plastisite yeteneğine sahip, sürme sonrası dönemde yok olmayan multipotent özellikteki mezenkimal kök hücrelerdir [4, 52].

Pulpa kök hücre kaynakları arasında, çekilmiş tam ya da yarım gömülü 20 yaş dişleri (akıl dişleri), çekilmiş/sürmüştür süt dişleri ve ortodontik tedavi veya travma, periodontal hastalık nedeniyle çekilen dişler bulunmaktadır [53]. İnsan 20 yaş dişleri (3. molar) 5-6 yaşlarda gelişimlerine başlarlar, 7-10 yaşları arasında kalsifiye olurlar

ve 18-25 yaşlarında kökleri gelişimlerini tamamlar. Bu dişler kök gelişimine devam ettiklerinden DPKH'leri, PDLKH'leri ve SDKH'leri içeren dental kök hücrelerine mükemmel kaynak sağlarlar [53].

Diş pulpası kök hücreleri ilk olarak 2000 yılında Gronthos ve arkadaşları tarafından yetişkin pulpadan, süt dişlerinden ise 2003 yılında Miura ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir [4, 54]. Diş kök hücreleri düşen süt dişlerinin pulpa kısmının apikal bölgesinden de izole edilebilmektedir. Bu hücrelerin, kondrosit, adiposit, miyosit, osteoblast ve nöral hücrelere farklılaştıkları gösterilmiştir. Ayrıca, insan DPKH'leri çoklu yetkin kök hücreye indüklenen diğer hücreler içerisinde en fazla indüklenme oranına sahip hücrelerdir [8].

2.2.2.3. Süt Diş Pulpası Kök Hücreleri

SDKH'lerin yetişkin diş pulpasına oranla daha çok hücre popülasyonuna ve yüksek proliferasyon kapasitesine sahip olduğu, daha immatür özellikteki multipotent hücrelerden oluştuğu, ancak diş pulpası kök hücreleri (DPKH) gibi kompleks pulpa-dentin yapısı oluşturamadığı bildirilmiştir [54-56].

2.2.2.4. Apikal Papilladan Elde Edilen Kök Hücreler

APKH'ler keser dişlerin oldukça erken evrelerindeki dental papillalardan elde edilirler ve daimi dişlerin apeksinde bulunan kök ucuna zayıf bir şekilde bağlıdır. Apikal papilla ile dental pulpa arasında apikal hücrelerden zengin bir doku bulunmaktadır ve bu dokudan izole edilen kök hücreler apikal papilla kök hücreleri olarak adlandırılır.

APKH'leri diş pulpası kök hücreleri ile karşılaştırıldığında, daha fazla kök hücre içerir ve yüksek proliferasyon potansiyeline sahiptir. Rejenerasyon kapasitesi bu nedenle fazladır, ancak elde edilmesi çoğunlukla gelişimin erken evresindeki gömük dişlerde çekim endikasyonu bulunmaması nedeniyle zordur [51, 57].

2.2.2.5. Periodontal Ligament Kök Hücreleri

PLKH'leri, çekilmiş dişlerin kök yüzeylerinden elde edilirler ve periodonsiyum benzeri doku ve hücrelere farklılaşabilirler. Bu hücrelerin koloni oluşturabildikleri, ancak *in-vitro* osteojenik farklılaşma potansiyellerinin düşük olduğu, buna karşın farelere transplante edildiklerinde doku rejenerasyonu ve periodontal tamir sağladıkları bildirilmiştir [58, 59].

2.2.2.6. Diş Folikülü Öncül Hücreleri

DFÖH'leri, gelişmekte olan diş germini çevreleyen mezenkimal dokudur ve dental folikülün, gelişim sürecinde olan yirmi yaş dişinin çekiminden sonra kolaylıkla ulaşılabilir ve izole edilebilir. Diş kök gelişimi süresince osteoblast, alveol kemik, periodontal ligament fibroblast veya sementoblast dental folikül öncül hücreleri tarafından oluşturulur [60].

2.2.3. Morfojenler ve Büyüme Faktörleri

Bir tek hücrenin ürettiği büyüme faktörü molekülleri yakındaki çok sayıda hücre tarafından algılanır ve bu hücreler eşzamanlı olarak bu moleküllere karşı cevap oluşturur. Büyüme faktörleri hücre dışına salgılanan sinyallerdir ve morfogenezi/organogenezi epitelyal-mezenkimal etkileşimleri sırasında kontrol ederler [61]. Kök hücreler farklılaşmış hücreleri üretirken; kök hücrelerden 'öncül' hücrelere ve daha sonra 'prekürsör' hücrelere tek yönlü bir geçiş yaparlar. Kök hücreler proliferasyon için ilk uyarıyı aldıklarında, öncül ve prekürsör geçiş aşamasına ilerleyebilmekte ve yeni uyarı zamanına kadar durgun pozisyonlarına geri dönebilmektedirler. Ancak, öncül ve prekürsör hücrelerin tekrar kök hücre konumuna dönmesi imkansızdır. Kök hücreden prekürsör hücreye doğru geçişte ilkel kök hücre en yüksek çoğalma ve en düşük farklılaşma potansiyeline sahip iken, prekürsör hücreler düşük çoğalma potansiyeline sahiptirler ve kolay bir şekilde farklılaşabilirler [62]. Bu nedenle, öncül özellik taşıyan diş folikül hücrelerinin daha az çoğalma yeteneğine karşın, diş dokularına daha kolay farklılaşabilecekleri bilinmektedir. Çizelge 2.1'de diş gelişimindeki etkin büyüme faktörleri ve etkinlikleri gösterilmiştir.

Çizelge 2. 1. Diş gelişimindeki etkin büyüme faktörleri.

| Büyüme Faktörü | Etkinlik |
|--|--|
| Kemik morfogenetik proteinleri (BMP) | BMP4 mezenkimal hücrelerin odontojenik farklılaşmasını indükler. BMP2, BMP4, BMP6, BMP7 ve BMP11 odontoblast farklılaşması sırasında ifade edilir. BMP4 ve BMP5 ameloblast farklılaşması sırasında ifade edilir. |
| Fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), insülin-benzeri büyüme faktörü-I ya da II (IGF), koloni uyarıcı faktör (CSF), epidermal büyüme faktörü (EGF) | Kök hücre çoğalmasını indükler. |
| İnterlökinler IL 1 -13 | Hümorale ve hücresele bağışıklık tepkilerini ayarlar. |
| Dönüştürücü büyüme faktörü alfa (TGF- α) | Epitel doku yapısı gelişimini indüklemektedir. |
| Dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) | Pulpa dokusunun mineralizasyonunu destekler. |
| Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) | Anjiyogenezi düzenler |

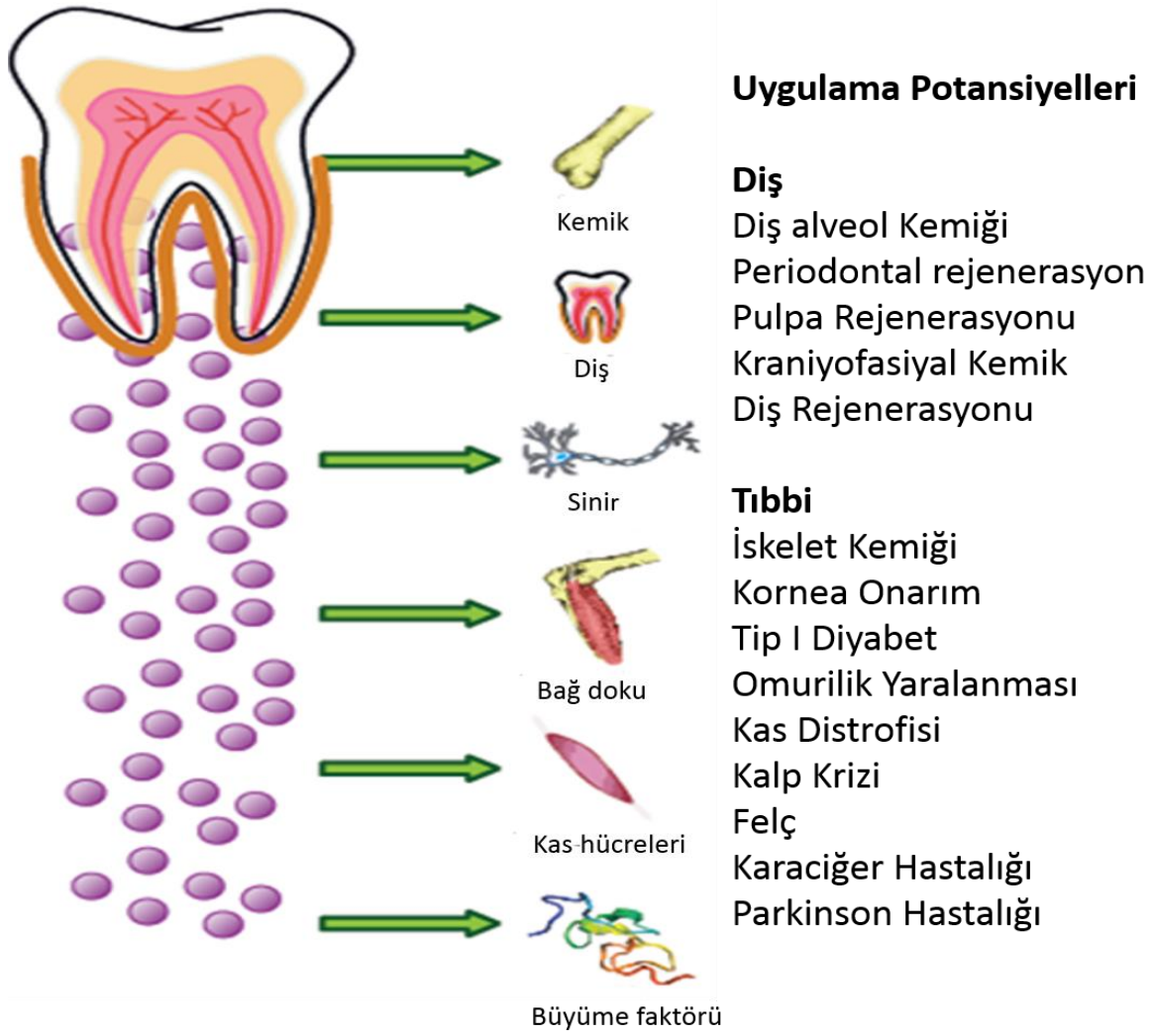
Son zamanlarda diş pulpası kök hücreleri önemli bir kök hücre kaynağı olarak görülmektedir ve üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır.

Diş pulpası kök hücrelerinin çekilen dişlerden elde edilmesinin oldukça kolay olması ve etik olarak sorun taşımaması, elde edilen DPKH'lerin izolasyonunun yüksek etkinlik sergilemesi, yüksek farklılaşma ve yüksek hücre çoğalma özelliğine sahip olması, biyomateryallerle gerçekleştirilen deneylerde dokuların yeniden yapılandırılması için etkin bir şekilde kullanımlarının olanaklı olması, yaşam sürelerinin uzun olması ve güvenli olarak dondurularak saklanabilmelerinin mümkün olması gibi özellikleri, bu hücrelerin tedavi amaçlı uygulamalar açısından gerekli birçok nitelikleri taşımasını sağlamıştır [4, 52, 56, 63-65].

Sağlıklı insan dişinden elde edilen DPKH'lerin dondurularak saklandıktan sonra çözdürülmesiyle elde edilen yüksek canlılık oranları, bu hücrelerin gerektiğinde kullanılmak üzere örnek saklama bankalarında da saklanabileceğini ortaya koymuştur [66].

Üçüncü büyük azı (20 yaş dişi) dişlerinden elde edilen insan DPKH'lerin odontoblastlara, [63] osteoblastlara, [67] iskelet ve düz kas hücrelerine, [68] yağ hücrelerine, [57, 63] kıkırdak hücrelerine, [66] endotel [68] ve sinir hücrelerine [66] farklılaşabilme yetenekleri gösterilmiştir. Diş pulpası kök hücrelerinin mezenkimal ve mezenkimal olmayan doku hücrelerinin çoğuna farklılaşabilme potansiyeline sahip olduğu ve bu özelliğinden dolayı dentin, periodontal doku, kemiksi kıkırdak dokuların onarılmasında, kas hastalıkları, bağışıklık sistemi ve bağ doku hasarlarının tedavisine yönelik klinik uygulamalarda önemli bir kullanım alanına sahip olduğu belirlenmiştir [69]. Diş hekimliği alanındaki kök hücre çalışmalarının hedefi; dişeti ve periodontal ligament rejenerasyonu, rejenerasyon yöntemi ile kraniyofasiyal anomali olarak tanımlanan dudak-damak yarıklarının tedavisi ile dentin ve pulpa rejenerasyonudur.

Hem Türkiye'de hem de dünyada kök hücre çalışmalarıyla ilişkili olarak olumlu gelişmeler vardır. Günümüzde izolasyonu ve dondurularak saklanabilmesi mümkün hale gelmiş olan DPKH'lerin, karakterizasyonlarının sağlanarak fenotipik özelliklerinin belirlenmesi, bu kök hücrelerin diğer hücre ve doku tiplerine farklılaşabilme yeteneği ve bu farklılaşmada rol oynayan önemli mekanizmaların açıklanması bu hücrelere ilişkin tasarlanan uygulamalar için geniş bir kullanım alanı oluşturmuştur. Şekil 2.4'de insan diş pulpasından elde edilen kök hücrelere ilişkin uygulama potansiyeli gösterilmiştir.



Şekil 2. 4 . İnsan diş pulpasından elde edilen kök hücrelerin uygulama potansiyeli.
<https://www.pinterest.com/suzeecq/stem-cell/>

Halihazırda diş hekimliği uygulamalarında hasarlı diş dokusu çeşitli sentetik materyaller ile restore edilmektedir. Ancak son dönemde diş pulpası kök hücre çalışmaları ve doku mühendisliği yöntemleri kullanılarak bu alanda rejeneratif pulpa tedavisi uygulamaları ile yeni bir tedavi kapsamının oluşturulabileceği umudu doğmuştur. Bu kapsamda, diş pulpası kök hücresi, büyüme faktörü ve taşıyıcı doku iskelesi üçlüsünden oluşan rejeneratif diş hekimliğini hedefleyen diş doku mühendisliği yaklaşımı, üzerinde çalışılması gereken önemli ve umut verici bir konu haline gelmiştir.

Son yapılan bilimsel çalışmalarda hastanın kendi kök hücresinden diş dokusuna benzer bir yapı oluşturulması hedeflenmektedir [19, 70-74]. Daha uzun dönemde

araştırmacılar tarafından hedeflenen konu ise tamamen canlı bir diş organının oluşturulmasıdır [70, 71, 73, 74].

Huang ve ark. [72] tarafından diş pulpası kök hücrelerinin üzerine yapılmış çalışmalar sonucunda, diş pulpası kök hücreleri deksametazon veya deksametazon + 1.25-dihidroksi vitamin D3 ile uyarıldıktan sonra mineral nodüller oluşmuştur. Aynı çalışmanın devamında ise DPKH'lerinin dentin üzerine ekimleri yapıldığında, odontoblast benzeri hücrelere farklılaştıkları ve dentin kanallarına uzantılar oluşturdukları bildirilmiştir [72]. İmmün sistemi baskılanmış farenin sırtına transplante edilen DPKH'lerinin dentin-pulpa kompleksine benzer bir yapı oluşturduğu belirtilmiştir[4, 19, 63, 75]. Kök hücre, büyüme faktörleri ve taşıyıcı (doku iskelesi) lsnden oluşan diş doku mühendisliği yaklaşımı, pulpa kuafaj ve kanal tedavisi uygulamaları için alternatif oluşturabilir. Hüresel pulpa tedavisi için, DPKH'lerin izolasyonu, manipülasyonu, farklılaştırılması ve üç boyutlu doku oluşumunu indkleyecek yöntemlerin geliştirilmesi gereklidir [76]. Günümüzde *in-vivo* hayvan modelleri ile bir dişin bütünüyle oluşturulması mümkün olsa da [70, 71, 73] dişin Şekli, boyutu, büyümesi ve sürmesi ile ilişkili problemler halen çözülememiştir [77].

Diş pulpası kök hücrelerinin *in-vivo* olarak dentin/pulpa ve kemik dokusundaki rejenerasyon potansiyeli kanıtlanmış olmakla birlikte, *in-vivo* ortamda uygun doku rejenerasyonunu inceleyen kapsamlı çalışmalar yeterli değildir.

2.2.4. Diş Hekimliğinde Rejeneratif Uygulamalar

1952 yılında Hermann'ın [47], kalsiyum hidroksit (Ca(OH)₂) materyali uygulayarak yaptığı vital amputasyon tedavisi, diş hekimliğinde uygulanan rejenerasyon işlemlerine bir başlangıç olarak kabul edilmektedir. Sonrasında geliştirilen rejeneratif dental işlemler ise; yönlendirilmiş doku ve kemik rejenerasyonları, distraksiyon osteogenezi, kemik ogmentasyonu için platelet yönünden zenginleştirilmiş plazma tedavisi (platelet rich plasma (PRP)) ve rekombinant insan kemik morfojenik proteini (rhBMP) uygulamaları ile periodontal doku rejenerasyonu için Emdogain ve fibroblast büyüme faktörü (FGF2) kullanılmalarını içermektedir [76]. Doku mühendisliğinin diş hekimliği alanındaki amacı; embriyonik hücrelerin kullanılmasıyla, herhangi bir nedenle kaybedilmiş dişlerin yerine tüm dokularını kapsayan yeni bir diş yapısını üretmektir. Ohazama ve ark. [73] tarafından yapılan

çalışmada, diş, kemik ve yumuşak dokuların ektopik olarak başarılı şekilde üretildiği bildirilmiştir.

2.2.4.1. Rejeneratif Endodontik Uygulamalar

Rejenerasyon-temelli yaklaşımlarda hedef; pulpa-dentin kompleksinin, çürük veya açığa çıkmış olan koronal dentin dokusunun, rezorbe olmuş apikal kök dentininin ya da servikal dentinin sağlıklı pulpa dokusu ile yenilenmesidir. Rejeneratif endodontik yöntemler hem pulpa hem de dental sert dokuların rejenerasyonunda önemli bir tedavi seçeneği olarak görülmektedir. Diş kliniklerinde rejeneratif yaklaşım uygulamalarının hastaların yaşam kalitesini artırmada önemli bir rolü vardır. Rejeneratif endodontide geliştirilmekte olan yöntemler;

- Kök kanalının revaskülarizasyonu,
- Kök hücre tedavisi,
- Pulpa implantı,
- Doku iskelesi implantı,
- Enjekte edilebilir doku iskelesi uygulamaları,
- Üç boyutlu hücre yazılımı ve
- Gen tedavisi

şeklinde sıralanabilir [76].

2.2.4.2. Kök Kanalının Revaskülarizasyonu

Revaskülarizasyon yönteminin hedefi, travmatik yaralanmalardan sonra pulpa boşluğunun damarlanmasının yeniden sağlanmasıdır. Kök gelişimini tamamlamamış apikal periodontitisli dişler için en ideal tedavi şekli, dişe canlılığını tekrar kazandırmak ve revaskülarizasyonu sağlamaktır [78, 79].

Revaskülarizasyon durumunda dikkat edilmesi gereken önemli kurallar; endodontik tedavinin ilk aşamasında kök kanalında şekillendirme yapılmaması, kök kanalının sodyum hipoklorit (NaOCl) ve klorheksidin çözeltileri kullanılarak sadece etkin olarak yıkanması ve kök kanalına belirli sürelerde üçlü antibiyotik patı (siproflaksasin, metranidazol ve minosiklin karışımı) uygulanmasıdır [27, 78-82].

Kök kanalı revaskülarizasyonunun avantajları; teknik olarak basit bir yöntem olması, pahalı teknolojilere gerek olmadan mevcut kanal aletleri ve medikamentler ile uygulanabilmesi, kök kanalında yeni doku oluşturmak için kişinin kendi kan

hücrelerinin yeni dokunun kaynağı olarak kullanılması, immun yanıtların azalması ve diğer tekniklerde oluşabilecek enfeksiyon gelişiminin önlenmesi şeklinde sıralanabilir [47].

Kök kanalı revaskülarizasyonunun dezavantajı ise; birçok araştırmacı tarafından kan pıhtısının diş pulpa dokusunun rejenerasyonunu sağladığı bildirilmesine rağmen; bu rejenere dokunun kaynağının hala tanımlanamamış olmasıdır. Bu yöntemin rutin klinik uygulamada kullanılması için, daha fazla hayvan deneylerine ve klinik çalışma bulgularına ihtiyaç duyulmaktadır.

Üçlü Antibiyotik Patının İçeriği (3 Mix-MP)

- Antibiyotikler (3Mix): 200 mg siprofloksasin, 500 mg metronidazol ve 100 mg minosiklin
- Taşıyıcı olarak (MP): makrogol merhem ve propilen glikol kullanılmaktadır [83].

Üçlü Antibiyotik Patının Hazırlanışı

Endodontik tedavinin başarısında kök kanallarından bakterilerin uzaklaştırılması en önemli konudur. Kök kanal sistemindeki bakteriyel enfeksiyonlar hem aerobik hem de anaerobik suşlar nedeniyle meydana gelebildiği için tek bir antibiyotikle dezenfekte edilmesi mümkün olmayabilir. Bundan dolayı birden çok antibiyotığın kombine bir şekilde kullanılması uygun görülmüştür. Bu konudaki en çok kullanılan antibiyotik kombinasyonu metronidazol, siprofloksasin ve minosiklin (3 Mix) karışımıdır. Antibiyotik karışımının hazırlanması için öncelikle, neşter yardımıyla antibiyotiklerin dış kapsülleri kesilir ve açılarak, içerikleri ayrı havanlara boşaltılır. Her havadaki antibiyotik içeriği, toz haline gelinceye kadar dövülür ve daha sonra her antibiyotikden eşit oranda alınarak (1/1/1) karıştırılır [83].

Açıklanan revaskülarizasyon vakalarının birçoğu, apikal kök gelişimini bitirmemiş dişler olmasına karşın; apikal genişliği yaklaşık 1x1 mm olan ve reimplante edilen avülse dişlerin (dişin alveol soketinden tamamen yer değiştirmesi) de, benzer şekilde revaskülarizasyon gösterdiği bildirilmiştir [84]. Rejenere olan dokunun fenotipinin diş pulpasına benzeme konusu henüz tamamen belirlenmemiş; ancak şimdiye kadar yayımlanmış çalışma sonuçlarında, kök gelişiminin devam ettiği ve elektrik pulpa testinde (EPT), pozitif yanıt alındığı bildirilmiştir [85].

2.2.4.3. Erişkin (Postnatal) Kök Hücre Tedavisi

Rejenerasyon potansiyeli olan hücrelerin elde edilmesi için en kolay yol, dezenfekte edilen kök kanal sistemine apeks açıldıktan sonra erişkin kök hücrelerinin enjeksiyonudur. Erişkin kök hücreleri kemik iliği, amniyotik sıvı, periferik kan, göbek kordon kanı, plasenta membranı, nazal mukozası, iç kulak, diş pulpası, santral sinir sistemi, sindirim kanalı, deri epidermisi, iskelet kası, kornea, retina, yağ dokusu, pankreas, kalp, karaciğer ve akciğer gibi bir çok dokudan elde edilebilir [86]. Araştırmacılar için önemli sorun, yetişkin pulpada olan fibroblast ve odontoblast gibi çeşitlilik gösteren hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip, erişkin kök hücre kaynağının belirlenmesidir. Olası bir yöntem de; pulpa kök hücrelerinin, kişinin kendi hücrelerinden (dondurularak saklanmış kordon bağı veya yanak mukozası) ya da laboratuvar ortamında geliştirilen hayvan pulpa hücrelerinden izole edilmesidir.

Erişkin kök hücre tedavisinin avantajlarından biri de bu hücrelerin otojenik potansiyelinin bulunması ve yeni pulpa rejenerasyonu için uyarıcı özelliğe sahip olmasıdır [47].

Kök hücrelerin hayatta kalma süresinin az olması erişkin kök hücreler ile tedavi yapılmasının dezavantajlarından birisidir [47]. Diğer taraftan Brazelton ve arkadaşları erişkin kök hücrelerin, vücudun farklı bölgelerine göç edebileceğini ve anormal mineralizasyonlara neden olabileceğini göstermişlerdir. Bu problemin, kök hücrelerin fibrin pıhtı veya doku iskelesi ile bir arada uygulanmasıyla çözümlenebileceği önerilmektedir [87]. Genelde doku iskeleleri, hücreler ve biyoaktif sinyal molekülleri ile birlikte kullanılırlar. Doku iskelesi ile büyüme faktörleri/moleküler sinyaller olmadan, sadece kök hücrelerin pulpa boşluğuna enjeksiyonu ile yeni ve fonksiyonel bir pulpa dokusunun oluşturulma olasılığı düşüktür [88].

2.2.4.4. Pulpa İmplantasyonu

Diş pulpası doku mühendisliği yaklaşımı, ilk olarak Mooney grubu tarafından kullanılmıştır [89]. Bohl ve ark.[90] tarafından yapılan çalışmada pulpa hücreleri *in-vitro* ortamda poliglikolik asit (PGA) iskele üzerinde kültüre edilmişler ve sonuçta yüksek yoğunluklu doğal pulpa benzeri bir yapı elde etmişlerdir.

Pulpa implantasyonu için *in-vitro* ortamda hazırlanmış pulpa dokusu, önceden biçimlendirilmiş ve dezenfekte edilmiş kök kanal sisteminin içine transplante

edilebilir. Pulpa dokusunu elde etmek için, arıtılmış, hastalık ve patojen içermeyen pulpa kök hücre dizisi veya biyopsi yöntemi ile alınan ve *in-vitro* ortamda geliştirilen hücreler de kullanılabilir [47].

Kullanılan pulpa implantasyon yönteminin avantajı, bir araya toplanmış kök hücre tabakalarının büyütülmesinin birbirinden bağımsız hücrelerin enjeksiyonuna göre daha stabil ve daha kolay olmasıdır [47].

Diğer taraftan pulpa implantasyonunun dezavantajı ise, teknik olarak oldukça ince ve kırılabilir yapıda olan kök hücre tabakalarının implantasyonunun zor olmasıdır ve bu nedenle daha gerçekçi implantasyon tekniklerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Hücre tabakalarının, kök kanal duvarına bağlanabilmesi için yeni yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Apikal bölgede damarlanma sağlandığı için kök hücreler bu bölgeye tabakalar halinde implante edilebilirler fakat koronal bölgede yeterli damarlanma bulunmadığı için hücrelerin doku iskelesi ile desteklenmesi gerekmektedir [47]. Helmlinger ve ark.[91] yaptıkları çalışmada kapiller kan desteği için, oksijen difüzyon mesafesini maksimum 200 µm olarak belirtmişler ve bu mesafeden daha uzakta bulunan hücrelerin, anoksi ve nekroz riski altında olduklarını bildirmişlerdir.

2.2.4.5. Doku İskelesi İmplantı

Pulpa kök hücreleri hücre organizasyonunu ve damarlanmasını destekleyecek, üç boyutlu, biyouyumlu, poröz polimer yapıda bir doku iskelesi ile desteklenmelidir [88]. Doku iskelesi, hücre farklılaşmasının ve büyümesinin sağlanması, hücre adezyonunun artırılması ve migrasyonu için uygun, üç boyutlu biyolojik ve fiziko kimyasal bir ortam sağlamaktadır. Doku iskelesinin içeriği; kök hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını ve hızlı doku oluşumunu sağlayan büyüme faktörleri, hücrenin hayatta kalmasını ve büyümesini sağlayan faktörler ve kök kanalı içerisinde bakteri gelişimini engelleyen antibiyotik karışımından oluşmalıdır [47].

Doku iskelesinin, biyouyumlu ve vücuttaki yapım oranıyla uyumlu bir biyobozunurluk oranına sahip olması gerekmektedir ve yeni bir cerrahi uygulamaya gerek olmadan çevre dokular tarafından rezorbe edilebilmelidir. Ayrıca hücre beslenmesine ve difüzyona izin verebilecek uygunlukta yüksek gözenekliliğe ve yeterli gözenek genişliğine sahip olmalıdır [92, 93]. Bottino ve ark.[94] yaptıkları çalışmada elektroçizme yöntemi ile üretilen ve biyolojik olarak güvenli, antibiyotik içeren

polimer bazlı doku iskelelerinin ilaç salım sistemi olarak rejeneratif endodontide işlevsel olabileceğini öne sürmüşlerdir.

2.2.4.6. Enjekte Edilebilir Doku İskelesi Uygulamaları

Sert doku iskele yapıları, kemik gibi fiziksel destek gerektiren dokuların tedavisi için önerilmektedir. Ancak, kök kanal sisteminde doku mühendisliği ürünü olan pulpa bünyesel destek gerektirmedikinden polimer hidrojel, üç boyutlu yumuşak doku iskelesi olarak kullanılabilir [95]. Hidrojeller; enjektör ile kolaylıkla uygulanabilen ve invazif olmayan doku iskelesi olarak kullanılabilirler [96]. Araştırmacılar, hidrojellerin pulpa kök hücrelerinin rejenerasyonunu arttırdığını ve düzenli bir dokuya dönüşümünü kolaylaştırdığı için ideal olduklarını belirtmişlerdir [97]. Ancak, bu konudaki araştırmalar çok yenidir ve etkinliğinin *in-vivo* deneyler ile kanıtlanması gerekmektedir.

2.2.4.7. Üç Boyutlu (3D) Hücre Yazılımı

Üç boyutlu baskı teknolojisinde ink-jet-şeklinde bir cihaz, dişin pulpa dokusunun yapısını yeniden oluşturmak için kullanılmaktadır ve hücre tabakaları doku iskelesi olarak hidrojel içine süspansiyon halinde dağıtılmaktadır. Daha sonra elde edilen yapı, cerrahi işlem ile diş dokusuna implante edilmektedir [98]. Bu yöntemin avantajı, doğal diş pulpa yapısını taklit eden doku yapıları oluşturma potansiyeline sahip olması ve farklı hücrelerin tam olarak yerinde konumlanabilir olmasıdır. Fakat, etkinliği *in-vivo* olarak henüz gösterilememiştir.

2.2.4.8. Gen Tedavisi

Endodontide gen tedavisinin temel amacı mineralizasyonu teşvik etmek için terapötik genleri bir taşıyıcı yardımı ile pulpa dokusu içine nakletmektir.

Bu yöntemde bir taşıyıcı (vektör), tedavi edici geni hastanın hedef hücrelerine taşımak için kullanılır. Vektör damardan ya da vücut içindeki belirli bir dokuya doğrudan enjekte edilebilir ve söz konusu genler hedef hücrelerin içine alınır. Ayrıca hastanın hedef hücreleri çıkarılabilir ve laboratuvar ortamında vektör uygulamasından sonra vektörü içeren hücreler hastaya yeniden verilir. Gen terapisinde *retrovirüsler*, *adenovirüsler*, *adeno bağlantılı virüsler (AAV)*, *lentivirüsler* ve *herpes simplex virüs tip 1 (HSV-1)* viral vektörler olarak çeşitli araştırmacılar tarafından kullanılmıştır [61].

Gen tedavisinde çözülmesi gereken esas sorunlar ise transgenin yeterli ve uzun süreli ekspresyonu, hücresel transdüksiyon oranı ve bağışıklık sistemi tarafından reddedilmesi riskinin bulunmasıdır. Gen tedavilerinin rejeneratif endodontide kullanımının sağlık açısından riskinin yüksek olması nedeniyle yakın bir zamanda mümkün görülmediği belirtilmiştir.

2.3. Kemik ve Diş Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyosinyaller

Sentetik yapıli bir glukokortikoid olan deksametazon (Dex) sistemik kullanımda kemik üzerinde katabolik etki göstermektedir. Dex, *in-vitro* uygulamalarda seçici olarak osteoprogenitör hücrelerin çoğalmasını ve osteoblastik hücrelere farklılaşmasını sağlamaktadır [99]. Shinshuke ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada [100], sıçan mezenkimal kök hücrelerinin 10^{-7} M Dex ile muamele edildiğinde RunX2, kemik sialoprotein ve osteokalsin mRNA ekspresyonlarını artırdığını göstermişlerdir. Dex, β -gliserofosfat ve askorbik asitle birlikte kullanıldığında periodontal ligament hücrelerinin ve sıçan kemik iliği stroma hücrelerinin mineralize nodül oluşturmalarını artırmıştır [101, 102]. Ayrıca deksametazon ortamdaki uzaklaştırıldığında mineralize nodül oluşumunun etkilenmediği, ancak nitelik olarak farklı bir doku oluştuğu belirtilmiştir [101]. Rutherford ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise [103] Dex, kollajen taşıyıcı ve trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) ile birlikte deneysel periodontal defektlerin tedavisinde kullanıldığında, sement ve periodontal ligament oluşumunu beş kat, kemik oluşumunu ise yedi kat artırdığı belirtilmiştir.

Fareler üzerinde steril koşullar altında yürütölen deneylerde dental pulpa dokusunun benzer bağ dokuları onarmak için yeterli kapasiteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu dentin-pulpa kompleksinin rejenerasyon süresince bol kan temini gibi özel koşullar altında enfeksiyondan uzak tutulması gerekmektedir [104].

Suja ve ark.[105] tarafından yapılan çalışmada sürekli salım gösteren Dex yüklü kitosan nanopartikülleri APKH'lerin kültür ortamına eklenmişler ve 4 hafta boyunca hücreler üzerinde Dex etkisi incelenmiştir. Alkalen fosfataz (ALP) gen ifadesi 2 hafta sonra, odontojenik farklılaşmanın özel markırı olan dentin matriks protein 1 (DMP-1) ifadesi 3 hafta sonra belirli şekilde artış göstermiştir. Sonuç olarak biyoaktif molekül olan Dex kontrollü salımı APKH'lerin odontojenik farklılaşmasını doğrudan etkilemiştir.

İDPKH'ler farklı hücelere indüklenme potansiyeli göstermesine karşın, orijinal özelliklerini korumaktadır. Fakat iDPKH'ler diş pulpa kompleksi oluşturma yeteneğine sahip olmasına rağmen dentin-benzeri dokuda dentin tübüleri üretmemektedir [4]. Buna ek olarak, iDPKH'ler sadece diş sert doku benzeri doku oluşumu değil, aynı zamanda kemik benzeri dokuları da oluşturabilmektedirler.

iDPKH'lerin temel özelliklerinden birisi odontoblast farklılaşması olan mineralize dokuları oluşturmalarıdır. Ancak bu farklılaşma sağlıklı dentin varlığı gibi özel koşullar altında yapılmaktadır [106, 107].

DPKH'ler CD (cluster of differentiation) 45, CD34, CD14 gibi hematopoetik antijenlerin negatif ekspresyonu ve CD106, CD146, Stro-1[7], CD29, CD73, CD105 ve CD44 gibi stroma antijenlerinin pozitif ekspresyonu ile karakterize edilebilirler [56]. Notch reseptörleri (Notch1, Notch2, Notch3 ve Notch4) evrimsel olarak korunan transmembran proteinlerdir. Notch reseptör-ligand kompleksinin oluşması ile hücrelerin farklılaşmadan çoğalmalarını sağlayan transkripsiyon faktörleri aktifleşir. Erişkin sıçan dişlerinde Notch reseptörlerinin sentezine rastlanmasa da hasar sonrası sub-odontoblastik hücrelerde, hasarlı bölge etrafındaki pulpa fibroblastlarında, kökün uç kısmında varlığı gösterilmiştir. Bunun yanında, Notch pozitif hücrelerin odontoblast benzeri hücelere farklılaştığı henüz net olarak gösterilememiştir [8].

İnsan DPKH'leri kemik iliği türevli kök hücelere göre %30 oranında daha yüksek bir çoğalma kapasitesine sahiptirler [42] ki bu da hücre çoğaltma süresini oldukça kısaltmaktadır. Yang ve arkadaşları tarafından 2007 yılında izole edilen DPKH'ler ile yapılan çalışmalarda Stro-1 pozitif hücrelerin nörojenik, adipojenik, miyojenik ve kondrojenik farklılaşma eğiliminde olduğu, Stro-1 negatif hücrelerin ise odontoblastlara farklılaşamadığı gösterilmiştir [108, 109]. Çizelge 2.2.'de diş Kökenli kök hücrelerinin dentin/pulpa ve kemik dokusundaki rejenerasyon çalışmaları verilmiştir.

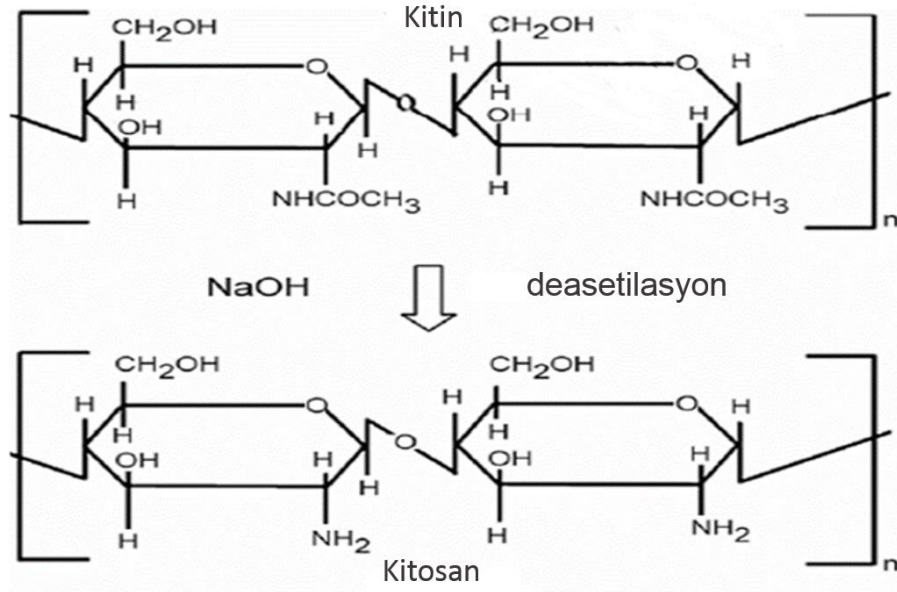
Çizelge 2. 2. Diş dokularından elde edilen kök hücrelerin diş rejenerasyonunda kullanımı.

| Türler | Hücre Kaynağı | Besi Ortamı | Transplantasyon Konakçı | Doku iskelesi /Taşıyıcı | Hücre Sayısı | Zaman | Transplantasyon Sonuçları ve Klinik Uygulama | Referans |
|-------------------|-----------------------------------|--|--|---|-----------------------------------|-------------------|--|----------|
| İnsan | Diş folikül hücreleri | Alfa MEM + 10% FBS | Bağışıklık yetersizliği olan fareler | Aritilmiş diş matrisi | - | 8 Hafta | Sement ve diş-pulpası gibi dokuların oluşumu | [110] |
| İnsan | Diş pulpa dokusu | Alfa MEM + 20% FBS + Askorbik asit | Bağışıklık sistemi bastırılmış fareler | HAp/TCP | 5 x10 ⁶ | 6 Hafta | Diş benzeri yapı oluşumu, odontoblast benzeri hücreler, pulpa benzeri doku | [4] |
| İnsan (19-29 yaş) | Gömülü diş pulpa dokusu | Alfa MEM + 15% FBS + Askorbik asit | Bağışıklık sistemi bastırılmış fareler | HAp /TCP | 4 x10 ⁶ | 2,4,6 ve 16 Hafta | Odontoblast benzeri hücrelere farklılaşma | [19] |
| İnsan (12-25 yaş) | Gömülü diş pulpa dokusu | Mezenkimal Kök Hücre besi ortamı (MSCGM) | Ağır kombine bağışıklık yetmezliği olan (SCID) fareler | kalsiyum fosfat doku iskelesi | 1 x10 ⁶ | 8-15 Hafta | Diş / pulpa benzeri hücrelere farklılaşma | [75] |
| İnsan (16-24 yaş) | Gömülü diş pulpa ve apikal dokusu | Alfa MEM + 15-20% FBS + Askorbik asit | Ağır kombine bağışıklık yetmezliği olan (SCID) fareler | Poli-D,L-laktid glikolid (PLG) | 1 x10 ⁷ hücre/mL | 3-4 Ay | Tübül ve osteodentin Oluşumu | [111] |
| İnsan | Diş pulpa kök hücresi | Alfa MEM + 10% FBS | Bağışıklık sistemi kapatılmış fareler | Nanofibröz (NF) Poli Laktik Asit (PLLA) | 1 x10 ⁶ /doku iskelesi | 8 Hafta | Odontoblast benzeri hücrelere farklılaşma | [112] |
| İnsan (24-40 yaş) | Diş pulpa kök hücresi | Alfa MEM + 20% FBS | İnsan alt çene kemiği | Kolajen doku iskelesi | - | 1 Yıl | Kemik oluşumu ve periodontal doku restorasyonu | [113] |

2.4. Kitin ve Kitosan

1811 yılında, Henri Braconnot tarafından yapılan çalışmada biyopolimerik kitosan mantar hücre duvarlarından izole edilmiş ve “fungin” olarak adlandırılmıştır. Daha sonra Odier fungine ‘kitin’ ismini vermiştir. Kitinin keşfedilmesinden sonra ‘kitosan’ ismi ortaya çıkmıştır. Kitosan 1859 yılında Rouget tarafından yapılan birçok deneme ile potasyum hidroksit çözeltisinde kitini ısıtması ve deasetilasyonu sonucu elde edilmiştir. Rammelberg 1930’daki çalışması ile kitosanın yengeç kabuklarında bulunduğunu ispatlamıştır. 1950’lerde X-ışını analizleri ile mantarlardaki kitin ve kitosanın oluşumu incelenmiştir. Braconnot’un ilk gözlemlerinden sonra, kitosan üzerine ilk kitap Muzarelli tarafından 1951 yılında yayınlanmıştır. 1960’lerde kitosanın kırmızı kan hücrelerini bağlama yeteneği üzerinde durulmuş ve hemostatik bir ajan olarak da incelemeler yapılmıştır. Sonraki otuz senede ise, kitosan su arıtma tesislerinde suyun zehir etkisini giderici olarak kullanılmıştır. Kitosan sahip olduğu birçok önemli özelliğinden dolayı son 20 yılda, üzerine bir çok araştırma da yer almıştır. Günümüzde kitosan birçok endüstriyel uygulamaya sahiptir ve ortaya konan yararlarından dolayı kitosana duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır [114].

Kitosan, β -(1→4) bağlı D-glukozamin ünitelerinden oluşan bir lineer amino polisakkarittir [115, 116]. Polikatyonik bir biyopolimer olan kitosan genellikle yengeç, karides, midye gibi bazı deniz kabuklularının ve çekirge, örümcek gibi bazı böceklerin kabuklarında yer alan kitinin (Şekil 2.5) deasetilasyonu sonucunda elde edilir [116]. Deasetilasyonun ilk basamağında hammadde olan kabukların seyreltik sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisinde deproteinizasyonu yapılır. Deproteinizasyon için NaOH, Na_2CO_3 , NaHCO_3 ve Na_2S gibi çeşitli kimyasal maddeler denenmiştir. Ancak en uygun olan maddenin NaOH olduğu görülmüştür. Kitosan ikinci karbon pozisyonunda bulunan $-\text{NH}_2$ gruplarının protonlanması sonucu çözünür ve asidik ortamlarda polielektrolite dönüşür. Kitosan fosforik, sitrik ve sülfürik asit gibi asidik çözeltilerde iyi çözünmez, ancak; formik, sitrik ve asetik asitin seyreltik çözeltilerinde iyi çözünür ve standart bir çözücü olarak genellikle asetik asit çözeltisi dekalsifikasyon için kullanılır ve dekalsifikasyon işleminin ardından saflaştırma işlemine tabi tutulur ve kitosan elde edilir [117].



Şekil 2. 5. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları.

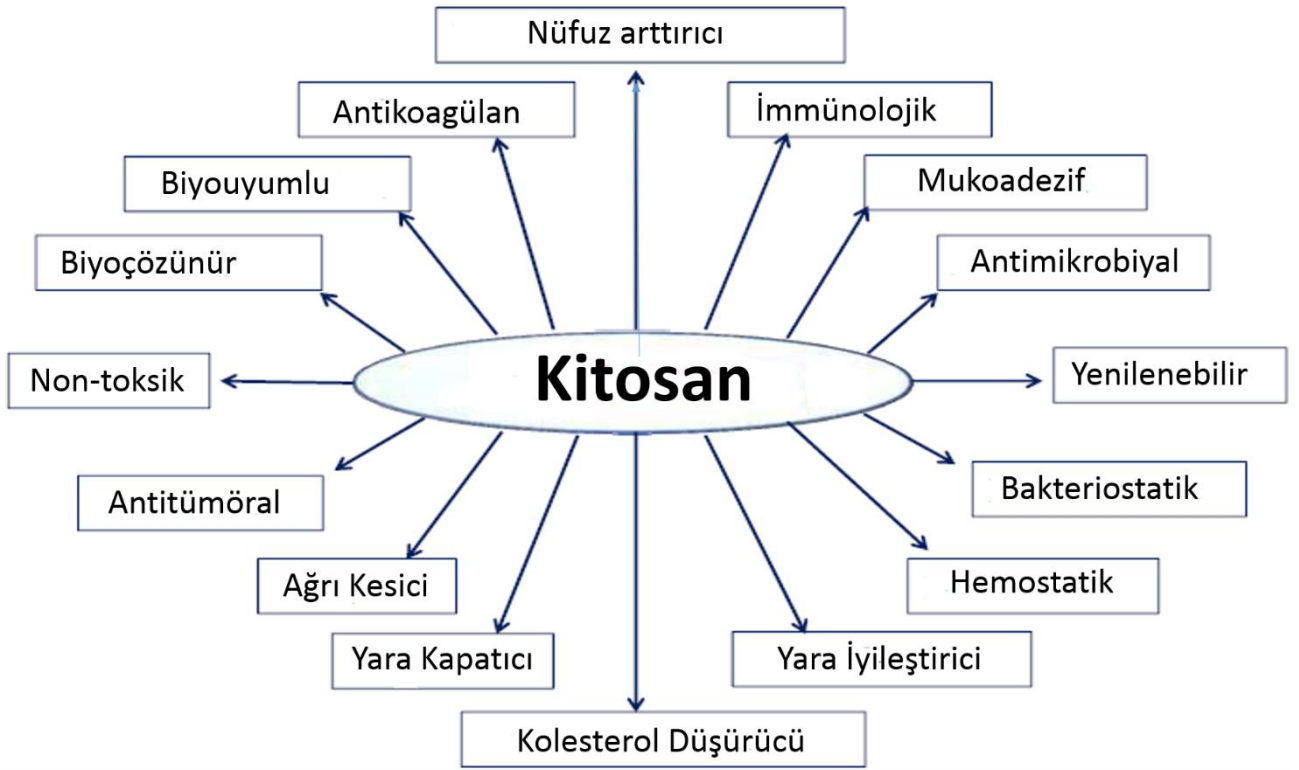
Kitosan sahip olduğu bu özelliklerden dolayı, negatif yüklü polimerlerle, makromoleküllerle, polianyonlarla vs. etkileşme yeteneğine sahiptir.

Kitosan;

- Lipitler, proteinler ve birçok biyoaktif madde ile bağlanabilir,
- Negatif yüklü polimerlerle (alginat gibi) ağ veya matris oluşumu gerçekleştirebilir ve
- Vücuttaki önemli fonksiyonel karbohidratlarla (hiyalüronik asit, mukopolisakkaritler) uyumludur **[118]**.

Bu özelliklerinin yanında su ve yağ bağlama kapasitesi oldukça fazla olup çok iyi film oluşturma özelliklerine de sahiptir. Şekil 2.7'de kitosanın bazı işlevsel özellikleri verilmiştir. Genel olarak bakıldığında kitosan aşağıda belirtilen özelliklerden dolayı birçok endüstriyel uygulamada kullanıma sahiptir;

- Yenilenebilir özeliğindedir, bol miktarda bulunmaktadır,
- Toksik değildir, biyoyumlu ve biyobozunurdur,
- Asit giderici, antiülser, antitümör, antimikrobiyal, antioksidan, antibakteriyel ve antifungal etkilere sahiptir,
- Çözünmesi için zararlı organik çözücülere gerek duyulmaz,
- Katyonik bir polimer olup negatif yüklü yüzeyler ile kolayca etkileşir ve
- Kitosan mikro ve nanoparçacıklarını hazırlamak oldukça kolaydır.



Şekil 2. 6. Kitosanın işlevsel özellikleri.

2.4.1. Doku Mühendisliğinde Kitosan

Kitosan sert ve yumuşak dokulardaki yara iyileşme sürecinde olumlu etkiler göstermektedir. Ayrıca, farklı yöntemlerle üretilerek çeşitli ihtiyaçlara yanıt verebilecek doku iskeleleri üretimi için uygun bir biyomateryaldir. Aynı zamanda kitosan, yara iyileşmesi prosesinde polimorfonükleer hücrelerin (PMN), makrofajların ve fibroblastların aktivasyonu, sitokin üretimi, tip IV kollajen sentezinin stimülasyonu gibi aşamalarda önemli rol oynar, deride sinir ve kan damarı rejenerasyonunu hızlandırır, deri hasarları, yanık tedavisinde örtü materyali olarak kullanılabilir. *In-vitro* kültür ortamlarında büyüme faktörlerini uyaran ve dokuların büyüme hızı üzerine etkisi olan kitosan, hücre sayısını ve dokuda tabaka sayılarının artışını hızlandırır. Çeşitli farmakolojik ajanlar ve biyolojik aracı moleküller için uygun bir taşıyıcı olarak kullanılabilmesi kitosanın bir diğer üstün özelliğidir. Yapılmış olan *in-vivo* çalışmalarda kitosanın deri fibroblastlarında çoğalmayı indüklediği belirtilmektedir [119]. Bu özellikleri ile kitosan doku iskeleleri, periodontal ve kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanım için yüksek potansiyele sahiptir. Ancak, kitosan doku iskelelerinin, literatürde özellikle rejeneratif periodontal tedavilerde kullanımı konusundaki bilgiler yeterli düzeyde değildir.

Muzzarelli ve ark.[120] yaptıkları çalışmada, kitosanın bağ dokusu elemanlarından glukozaminoglikan (GAG) benzeri yapısıyla, yara iyileşmesi sırasında dokunun stabilitesini ve yapısını desteklediğini, üç boyutlu bir iskele oluşturduğunu ve kitosana maruz bırakılan bakterilerde belirgin morfolojik değişimlerin gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Lahiji ve ark.[121] tarafından yapılan çalışmada kitosan kaplı plastik yüzeylerde osteoblastların canlılıklarını %90 oranında korudukları, osteoblastik hücre morfolojilerini ve fonksiyonlarını sürdürdükleri gösterilmiştir. Huang ve ark.[122] tarafından yapılan çalışmada STRO-1 ve CD146 çift pozitif DPKH'leri olarak tanımlanmış ve STRO-1 ve CD146 çift negatif olanlar DPH'leri olarak tanımlanmış ve DPKH'lerine göre daha üstün klonogenik potansiyel ve osteojenik farklılaşma yeteneğine sahip oldukları gözlemlenmiştir. Ayrıca, ekzojen glukozaminin (glcN) düşük bir konsantrasyonda (0.005 mg/mL) erken osteojenik farklılaşmayı desteklemekte olduğu gösterilmiştir [122].

Araştırmacılar bu bulgularla, osteoblastik hücrelerin kullanıldığı doku mühendisliği çalışmalarında kitosanın uygun bir taşıyıcı olduğu sonucuna varmışlardır. Kitosanın katyonik yapısı, hücre yapışması için önemli bir faktör olup deasetilasyon derecesi de hücre yapışma mekanizmasını etkilemektedir.

Kolkkevold ve ark.[123] yaptıkları çalışmada, farelerden elde edilen mezankimal kök hücre kültürlerine asetik asitte çözülerek uygulanan 2 mg/mL'lik kitosanın, kontrol grubuna göre iki kat daha fazla mineralize nodül oluşumunu sağladığını ve kitosanın osteoprogenitör farklılaşmasını ve kemik oluşumunu desteklediğini göstermişlerdir.

Gözenekli kitosan doku iskeleleri çok farklı yöntemlerle üretilebilmektedir. Bu yöntemler arasında "dondurarak kurutma" yöntemi pek çok araştırmacı tarafından başarıyla uygulanmış ve 100-300 µm aralığında gözenek boyutu elde edilmiştir [124]. Söz konusu yöntemde, oluşan buz kristalleri donmuş kitosan çözeltisinden liyofilizasyon sonucu uzaklaştırılarak gözenekli ve gözenekler arası içsel bağlantıları olan matris yapı elde edilmesi mümkün olmaktadır.

Lee ve ark.[125] tarafından yapılan çalışmada kemik rejenerasyonu için dondurarak kurutma yöntemiyle elde edilen kitosan iskelelerden PDGF-BB (platelet-derived growth factor) büyüme faktörü salım kinetiği incelenmiş ve kullanılan modifiye edilmiş kitosan iskeleden büyüme faktör salımının 21 güne kadar devam ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, kraniyal defektlere yerleştirilen PDGF-BB yüklü kitosan sünger uygulamasının kemik rejenerasyonunu artırdığını da göstermişlerdir.

Seol ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada [126], dondurarak kurutma yöntemiyle üretilmiş kitosan doku iskelesinin kemik oluşumu üzerine etkisi incelenerek, 100-200 µm aralığında elde edilen gözenek boyutunun hücre çoğalmasına olanak sağladığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla *in vitro* ortamda kemik oluşumu için, kitosan doku iskelesinin etkin bir şekilde kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Ho ve ark.[127] tarafından yapılan çalışmada, dondurarak kurutma yöntemiyle, hücre tutunmasını artırmak için RGD immobilize edilmiş kitosan doku iskelelerinin üretimi amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda, RGD ile immobilize edilmiş kitosan doku

iskelelerinin osteoblast kültür çalışmalarında ve kemik doku rejenerasyonunda etkili olduğu saptanmıştır.

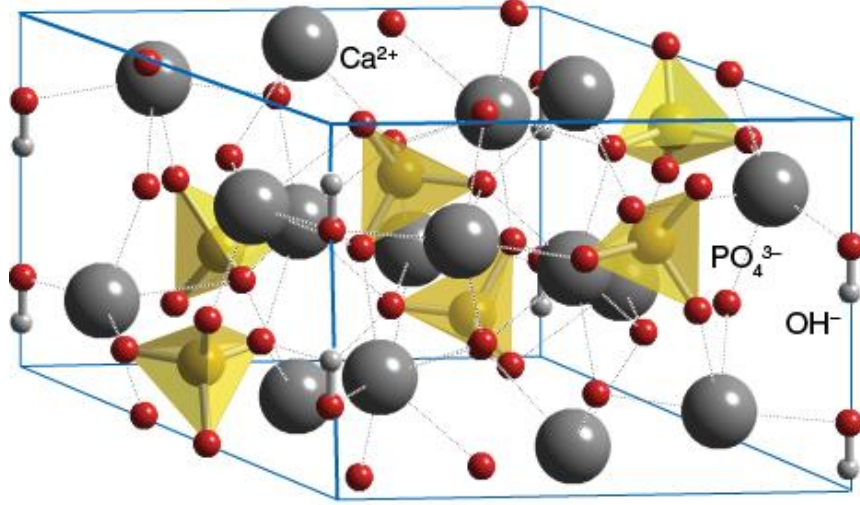
Kitosanın yara iyileşme süreci üzerindeki olumlu önemli etkilerinden biri antibakteriyel ve antifungal özelliğinin olmasıdır. Kitosanın antibakteriyel etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir ve bu konuda; pozitif yüzey yüklü kitosan moleküllerinin negatif yüklü bakteri membranına bağlanarak bakterilerin fonksiyonunu bozmasına neden olması; besin elementlerinin taşınmasını inhibe ederek bakteri içeriğinin dışarı sızmasını teşvik etmesi; şelat yapıcı bir ajan olarak iz elementlere bağlanması; mikrobiyal gelişimi ve toksin üretimini inhibe etmesi; DNA ile bağlanması ve mRNA sentezini engelleyerek bakteri üremesini durdurması gibi çeşitli teoriler ileri sürülmüştür. Kitosanın patojen bakteriler üzerine etkisi çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Wang tarafından [128] yapılan *in-vitro* çalışmada kitosanın %1-1.5 konsantrasyonlarda *Staphylococcus aureus*, %0.5-1 konsantrasyonlarda *E. coli* üzerinde inhibisyon oluşturduğunu ve kitosanın antibakteriyel aktivitesinin pH 5.5 da PH 6.5'ten daha güçlü olduğu bildirilmiştir. Kitosanın; *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans* ve *S. aureus* gibi önemli periodontopatojenler, üzerinde inhibe edici etkileri olduğu bilinmektedir [129-131]. Antibakteriyel özellikleri kitosanın *in-vivo* kullanımlar için uygunluğunu desteklemektedir. Lian ve ark.[132] yaptıkları çalışmada, farklı molekül ağırlıklı (MW), kitosanın antimikrobiyal etkisini incelemek için *E. Coli* ve *S. Aureus* kullanmışlardır. Kitosan konsantrasyonu ve molekül ağırlığının sırasıyla antimikrobiyal mekanizma üzerine etkisi incelenmiştir. Molekül ağırlığı arttıkça, *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal etki güçlenmiştir ancak, *E. coli* üzerindeki etkisi zayıflamıştır. Omura ve ark.[133] tarafından yapılan çalışmada Gram pozitif bakteriler için kitosanın minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin Gram negatif bakterilerden daha düşük olduğu bildirilmiştir. Jeon ve ark.[134] yaptıkları benzer çalışmada *E. coli*, *E. coli O 157*, *Salmonella typhi*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* gibi çoğu bakteriler için MİK değerlerini % 0.1'in altında ve *Pseudomonas aeruginosa* için ise % 0.25 olarak belirlemişlerdir. No ve ark.[135] farklı molekül ağırlıklı kitosanların antimikrobiyal etkinliğini Gram negatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium* ve *Vibrio parahaemolyticus*) ve Gram pozitif (*Listeria monocytogenes*,

Bacillus megaterium, *B. cereus*, *S. aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* ve *L. bulgaricus*) bakteriler için araştırmışlardır. Sonuç olarak kitosanın % 0.1 konsantrasyonunda Gram pozitif olanlara daha güçlü bakterisidal etki gösterdiği ve üremelerini engellediği rapor edilmiştir.

Kitosanın biyomateryal olarak kullanıldığında başarısını etkileyen diğer bir faktör, biyouyumlu yani 'vücutla uyuşabilir' olması ve kendisini çevreleyen dokularda iltihaplanma, pıhtı oluşumu vb gibi istenmeyen tepkiler meydana getirmemesidir. Kitosan bozunum hızının, deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığı gibi faktörlerle kontrol edilebilir olması, doku iskele materyali olarak kullanılması açısından önemli bir avantajdır. Bunun yanı sıra, doku rejenerasyonunu hızlandırıcı olması nedeniyle kitosan ve türevleri kemik ve kırıkta iyileşmesinde kullanım yeri bulmuştur. Kitosan türevlerinin *in-vitro* hücre kültüründe ve *in-vivo* olarak hayvan modellerinde oluşturulan kemik defektlerinde osteojenik aktivitesi gösterilmiştir [136].

2.5. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit (HAp), kalsiyum fosfat bazlı seramikler sınıfındandır. Kalsiyum fosfat bazlı seramik mazlemeler biyoaktif ve biyouyumlu özelliklerinden dolayı önem taşımaktadırlar. Kalsiyum fosfat seramikleri, HAp, ortakalsiyum fosfat (OCP, $Ca_8H_2(PO_4)_6$), trikalsiyum fosfat (TCP, $Ca_3(PO_4)_2$), dikalsiyum fosfat dihidrat (DCDP, $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$) ve dikalsiyum fosfat (DCP, $Ca_2P_2O_7$) oluşturmaktadır. Kemik destek malzemesi olarak en fazla HAp ve TCP kullanılmaktadır [137]. HAp hegzagonal kristal yapıya sahip ve doğal kemik mineraline kimyasal ve yapısal benzerliğinden dolayı kemik aşısı malzemesi olarak kullanılmaktadır. Kimyasal formülü $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ve Ca/P oranı 1.67'dir [138]. HAp yapısı şematik olarak Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 7. HAp'nın şematik olarak gösterimi.

<http://www.chemtube3d.com/solidstate/SShydroxyapatite.htm>

HAp tümör cerrahisinde kemikte oluşan boşlukta dolgu materyali olarak, kırık kemik onarımında kemikteki defekti kapmak için köprü olarak, diş hekimliğinde diş kökünü beslemede ve implant kaplamalarında kullanılmaktadır. Yumuşak doku biyoaktif davranış gösteren HAp ile bağlanarak yapışır ve implantın kaymasını engeller. Aynı zamanda vücut implantı yabancı madde olarak algılamaz. HAp kemik dolgu materyali olarak toz ya da gözenekli blok şeklinde kullanılır. HAp aynı zamanda kemikteki boşluğu doldurarak boşlukta ödem oluşumunu ve yumuşak dokunun boşluğa girmesini engeller. Bir başka önemli görevi ise kalsiyum ve fosfat kaynağı olmasıdır. HAp'nın yüksek osteoiletkenliği (yüzeyinde kemik oluşumuna izin verme) ve düşük bozunma hızı vardır.

Hidroksiapatit, kemiğin temel inorganik bileşenidir ve iskelet yeniden yapılanması için bir implant maddesidir. HAp biyoimplant maddesi olarak tek başına ya da bir kompozit parçası olarak ilgi çekmektedir [139]. HAp mükemmel hücresel uygunluk, kemik iletkenliği, düşük biyobozunma, biyouyumluluk ve biyoaktifliği nedeni ile kaplama şeklinde bir çok biyotıbbi uygulamada kullanılarak polimerin yapışmasını ve kemik oluşumunu artırmaktadır. HAp sadece biyoaktif değil aynı zamanda toksik olmayan, osteokondüktif bir maddedir [138].

HAp'nın kemik destek ya da onarım malzemesi olarak kullanımını için birçok yöntem geliştirilmiştir [140]. HAp ilk kez Hayek ve Newesly [141] tarafından kimyasal çöktürme yöntemi kullanılarak sentezlenmiş olup, daha sonra, su-bazlı kalsiyum ve fosfat tuzları içeren çözeltilerden kimyasal çöktürme veya asit-baz titrasyonu gibi yöntemlerle elde edilebilmektedir [142]. HAp elde etme yöntemlerinden bazıları,

- Hidrotermal yöntem (HAp tanecikler iğnemsisi (en: 15-25 nm, boy: 130-170 nm)),
- Yanma sentezi (tanecik aralığı < 0.45 µm),
- Sulu çözeltilerden çöktürme (tanecik büyüklüğü; en: 20-30 nm boy: 50-60 nm),
- Sol-jel yöntemi (tanecik büyüklüğü; 10-15 nm),
- Ultrasonik ışımaya (tanecik büyüklüğü; 20 nm),
- Yapay vücut sıvısından çöktürme (183.2±33.89 nm),
- Ses ötesi dalga (29.56 nm),
- Mikrodalga – hidrotermal yöntem iğnemsisi yapı (en: 4-15 nm, boy: 20-50 nm) ve
- Ters misel yöntemidir.

Sürekli yayınlardan seçilmiş çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Lim ve ark.[143] yaptıkları çalışmada sürekli mikremülsiyon, ters mikroemülsiyon ve emülsiyon sistemlerinde CaCl₂ ve (NH₄)₂HPO₄'ün tepkimesiyle 100–4000 nm boyut aralığına sahip nHAp sentezlemişlerdir.

Tas ve ark .[144] yaptıkları çalışmada hidroksiapatit ve tri-kalsiyum fosfat biyoseramiklerini SBF (düşük Fe, Cu ve Zn içeren) kullanarak kendiliğinden yanma yöntemiyle sentezlemişlerdir ve bu yöntemin 0.45 µm altında kalsiyum fosfat biyoseramikleri elde etmek için alternatif bir yol olabileceğini belirlemişlerdir.

Chen ve ark .[145] çalışmalarında nHAp, Ca(NO₃)₂ ve NH₄H₂PO₄ çözeltileri ile pH>10 değerlerinde ve Ca/P = 1.67 stokiyometrik oranında sentezlemişlerdir. Elde edilen nano taneciklerinin eni 20-30 nm,boyu ise 50-60 nm olarak belirtilmiştir.

Cao ve ark.[146] çalışmalarında ultrasonik ışımaya yardımı ile Ca (NO₃)₂, Na₂H₂PO₄ kullanarak ve çöktürücü olarak karbamid (NH₂CONH₂) ile 20 nm boyutunda HAp nano

tanecikleri elde etmişlerdir. Elde edilen HAp içeriğinin sıcaklık ve ışımaya süresi ile arttığı saptanmıştır.

Feng ve ark.[147] yaptıkları çalışmada sol-gel tekniğiyle fosfor pentaoksit (P_2O_5) ve kalsiyum nitrat tetrahidrat ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) kullanarak 600 ve 700°C'de tek faz, 10–15 nm boyutunda HAp nanotozları elde etmişlerdir.

Guo ve ark.[148] çalışmalarında nHAp parçacıklarını oda sıcaklığında ters mikroemülsiyon yöntemi ile sentezlemişler ve farklı hidrofil-lipofil dengesi değerlerinin nanopartikül büyüklüğü üzerine etkisini incelemişlerdir. Sonuç olarak hidrofil-lipofil dengesi değerinin artmasıyla parçacık çapı ile uzunluğunun arttığını gözlemişlerdir. Sentezlenen nHAp'in 20–100 nm büyüklükte olduğunu belirtmişlerdir.

Xiao ve ark .[140] yaptıkları çalışmada ultrasonikasyon ve polimer dağıtıcı (polietilen glikol, PEG) kullanarak aglomere olmamış nHAp parçacıklarını sentezlemişlerdir. Bu çalışmada ultrasonun tek başına aglomerasyonu engellemede yeterli olmadığını ancak ultrason ve polimer dağıtıcı birlikte kullanıldığında aglomerasyonun büyük ölçüde azaltılmış olduğu sonucuna varmışlardır.

Feng ve ark .[149] çalışmalarında 37°C'ta yapay vücut sıvısı (SBF; Simulated Body Fluid) kullanarak HAp nano fiberleri sentezlemişlerdir. Hazırlanan SBF çözeltisine $CaCl_2$ ve $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ eklenerek Ca/P oranı 1.67 olacak şekilde süspansiyon hazırlanmış ve farklı sürelerde 37°C'lık su banyosunda bekletilmiştir. Elde edilen HAp nano fiberlerin 3-5 nm çapında, 60-100 nm uzunluğunda olduğunu gösterilmiştir.

HAp'nın biyouygunluğu Bajpai [150] ve Piattelli [151] tarafından yapılan deneylerle kanıtlanmıştır. Bu deneylere dayanarak HAp 1983 yılından itibaren kullanılmaktadır. HAp'nın en önemli özellikleri arasında mükemmel biyolojik uyumluluğu önde gelir. HAp, sert dokularla direk kimyasal bağ kurar. HAp partiküllerinin ya da gözenekli blokların kemiğe yerleştirilmesinde; yeni doku, 4–8 haftada şekillenir [152]. Yapılan deneylerde HAp implantların, öncelikle fibrovasküler doku ile kaplandığı ve zamanla bu dokudaki olgun lamellerin, kemiğe dönüştüğü tespit edilmiştir [153]. HAp'nın osteokondüktif özellikleri de implantların kemiğe sıkı yapışmasına ortam ve olanak sağlar. Ayrıca HAp'ın lokal büyüme faktörlerine, özellikle kemik proteinlerine karşı kuvvetli kimyasal

bağlanma eğilimi olduğu saptanmıştır [150]. HAp'ın non-toksik (zehir etkisi olmayan) [154] özelliğe sahip olması sayesinde meydana gelebilecek vücut reaksiyonları da minimumdur.

2.6. Bor

Geçmiş yüzyıl içinde, borun tıbbi kullanımı, sadece bir antiseptik olarak sınırlıydı ama son on yıl içinde bor, antibiyotik ve antikanser ilaçların üretiminde kullanılmaktadır. Yapılan diğer çalışmalarda borun metabolizmanın düzenlenmesinde ve iltihabik hastalıkların tedavisi için önemli rolü olabileceği gösterilmiştir. Doğal borun iki sabit (^{10}B , ^{11}B) izotoptan oluştuğu gösterilmiştir ve (^{10}B) izotopu araştırmacılar tarafından bir nötron yakalama ajanı olarak kullanılmaktadır.

Son çalışmalarda, bor içeren bileşikler etiketleme ve hedefleme biyomolekül aracı olarak araştırılmıştır ve bor nötron yakalama tedavi (BNYT) yöntemi, kanser tedavisi için kullanılmaktadır. BNYT bir çok araştırmada gözden geçirilmiştir ve bor içeren bileşikler en popüler uygulamalarından birisidir [155-157].

2.6.1. Bor ve Kemik Metabolizması

Alveolar kemik; dişler için primer destek yapı oluşturan, mandibula ve maksillanın özel bir parçasıdır. Araştırmacılar kemik oluşumu ve tamirinde borun özellikle trabeküler ve alveolar kemik üzerine faydalı etkileri olduğundan bahsetmişlerdir [158, 159]. Bordan yoksun diyetle (0.1 mg/kg diyet) beslenen erkek sıçanlarla bor destekli diyetle (3mg/ kg diyet) beslenen sıçanlar bilgisayarlı mikro tomografi (Mikro-CT) ile karşılaştırıldığında bor yoksunluğunun kemik hacmi fraksiyonunu, trabeküler kalınlığı azalttığı, trabeküler boşlukları ise arttırdığı görülmüştür. Mikro-CT bulguları borun kemik dayanıklılığını düzenleyen trabeküler mikroyapısı için gerekli olmasa da, bu yapı için faydalı olduğunu göstermiştir [158]. Bor yoksunluğunun aynı zamanda diş çekimi sonrası hemen başlayan alveolar kemik tamirini de bozduğu gösterilmiştir. Bor içeren diyetle beslenen fareler (3mg/kg) daha az bor içeren diyetle beslenen farelerle (0.07mg/kg) karşılaştırıldığında, diş çekildikten 14 gün sonra kemik oluşumundaki farkedilir azalmadan dolayı alveolar kemik iyileşmesinde bozulma görülmüştür [159].

2.6.2. Periodontolojide Bor Kullanımı

Borun, antibakteriyel özelliği, kemik ve immun cevap üzerine bilinen etkileri periodontoloji alanındaki araştırmacıların da ilgisini çekmiştir. Borik asit bileşiklerinin, genel tıpta antibakteriyel [160] ve antienflamatuvar etkisi [158] rapor edilmiştir.

2.6.3. Borun Antimikrobiyal Etkileri

β -laktam antibiyotiklere karşı gelişmekte olan direnç yirmi birinci yüzyılda insan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmuştur. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) enfeksiyonları, yalnız ABD'de bir yılda yaklaşık 18,000 ölüme neden olmaktadır [161].

Bakteriler penisilinler ve sefalosporin antibiyotiklere karşı β -laktamaz enzimleri üreterek direnç kazanırlar. β -laktamaz, serin-amidaz sınıfında bir enzimdir ve bu enzim antibiyotiğin β -laktam halkasının açılmasına neden olur. β -laktam halkasının açılması ilacın etkinliğinin durdurulmasına yol açmaktadır.

Bakterilerin antibiyotiklere karşı direncini bertaraf etmek için iki strateji bulunmaktadır; birincisi enzimatik hidrolize dayanıklı yeni β -laktam antibiyotik sentezi, ikinci strateji ise β -laktamaz enzimini devre dışı bırakmak için mevcut antibiyotiklerin geliştirilmiş β -laktamaz inhibitörlerle birlikte kullanılmasıdır. İkinci stratejide, boronik asitin etkili tersinir β -laktamaz inhibitörü olarak etkinliği kanıtlanmıştır ve fosfonat inhibitörüne göre daha büyük bir hücre içi verimlilik sergilediği gösterilmiştir. Tersinir inhibitörler non-kovalent olarak enzime, enzim-substrat kompleksine ve ya ikisine birden bağlanır ve farklı tip inhibisyonlar uygular.

Bor atomu, bir elektrofil olarak β -laktam halkasının karbonil işlevselliğini taklit eder ve katalitik serin ile tetrahedral geometri oluşturur. Bu şekilde, bir ilacın β -laktam halkasının aktif sitesine β -laktamaz enzimlerinin erişimini engeller [162].

Boromisin, antibiyotik özellik taşıyan bir bor içerikli doğal biyomoleküldür ve *Streptomyces antibioticus*'un suşundan elde edilir. Boromisinin, Gram pozitif, belirli bazı mantarlar ve protozoalara karşı etkili olduğu ancak Gram negatif bakterilere karşı etkisiz olduğu belirtilmiştir [163]. Borik asit esterlerinin, klinikte kullanılan eritromisin, gentamisin ve streptomisin gibi antibiyotikler ile kıyaslanabilir olduğu rapor edilmiştir [164].

2.6.4. Kemik Rejenerasyonu

Periodontal rejenerasyon, periodontal tedavinin esas amacıdır. Periodontal defektlerde periodontal rejenerasyonu arttırmak için kemik greftleri kullanılmaktadır [165]. Biyoaktif materyaller, kaybedilen kemik dokusunu yerine koymak ya da kemik dokusunun iyileşmesine yardımcı olmak için kullanılır. Zayıf osteoporotik kemikleri desteklemek ve kemik defektlerini doldurmak için bu materyallere gereksinim duyulur [166, 167]. Borun kemik oluşumu ve tamirindeki bilinen faydalı etkileri, bor içerikli bir biyoaktif camın geliştirilmesine öncülük etmiştir. Biyoaktif cam, kemik doku mühendisliği ve doğal kemik rejenerasyonu için bir doku iskelesi olarak kullanılır. 45S5 biyocam, bor eklenerek modifiye edildiğinde kemik oluşumunu artırdığı görülmüştür [168]. Pan ve ark.[166] Stronsiyum borat camın yeni kemik oluşumunu uyarmasından dolayı, kemik rejenerasyonunda yeni nesil bir biyomateryal olduğunu belirtmişlerdir.

2.6.5. Antienflamatuvar Etki

Periodontal dokuların yapısal olarak ana elemanlarından biri protein olduğu için, periodontal doku yıkımında proteinazlar anahtar enzimlerdir. Doku matris makromoleküllerinin yıkımında etkili metallo proteinazlar (MMP), serin, sistein, aspartik proteinazlar olmak üzere dört temel sınıfta toplanmaktadır. Periodontal hastalıklarda MMP'ler ve bir grup serin proteinaz en fazla etkinliğe sahip proteolitik enzimler olarak bilinmektedir. Serin proteazlar (elastaz, kimaz, katepsin G) active olmuş lökositlerden salınan, yapısal proteinleri parçalayan etkin proteolitik enzimlerdir [169, 170]. Borik asit bileşiklerinin serin proteazların aktivitelerini etkilediği ve bu enzimleri inhibe ettiği belirtilmiştir [163]. Sağlam ve ark.[171], kronik periodontitisli hastalarda yaptıkları çalışmada cerrahi olmayan periodontal tedaviye ek olarak uygulanan subgingival % 0.75'lik borik asit uygulamasının, serum fizyolojik uygulanan kontrol grubuna göre, dişeti oluşu sıvısındaki matriks metalloproteinaz-8 (MMP-8) miktarını anlamlı şekilde azalttığını rapor etmiştir.

Son yıllarda borun biyolojik önemi ve metabolizma üzerine etkilerini araştıran çalışmalar devam etmektedir. Bor ve bor türevli bileşiklerin sağlık sektöründeki kullanımı her geçen gün artmaktadır. Periodontoloji alanında bor ile yapılan çalışmalar çok azdır. Borun antibakteriyel özelliği, kemik ve immun cevap üzerine bilinen etkileri

yapılacak olan daha fazla çalışma ile desteklenirse, yakın zamanda bor içerikli greft materyalleri, antibakteriyel ajanlar ve bor kaplamalı implant yüzeyleri geliştirilebilir ve borun periodontoloji kliniklerine girmesi sağlanabilir.

Sunulan tez kapsamında, etik olarak problem oluşturmayan ve yetişkin dokusundan kolaylıkla izole edilebilen diş pulpası kök hücrelerinin diş pulpa-dentin kompleksinin rejenerasyonunda kullanılabilirlikleri araştırılacaktır. Bu hücrelerin halen gündemde olan hücre kaynaklarına alternatif bir hücre kaynağı oluşturması amacıyla farklı ajanlar varlığında odontoblast hücrelere farklılaşma özellikleri ve bu süreç üzerinde dondurarak kurutma yöntemiyle üretilmiş kitosan doku iskelesinin etkisi incelenecektir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez çalışması kapsamında deneysel çalışmalar 4 aşamada gerçekleştirilmiştir. Öncelikle diş doku rejenerasyonunda kullanılmak üzere dondurarak-kurutma yöntemi ile kitosan doku iskeleleri üretilmiş ve daha sonra kitosan doku iskeleleri, nanohidroksiapatit (nHAp) ve bor katkılı nanohidroksiapatit (B-nHAp) ile kaplanarak nanokompozit doku iskeleleri elde edilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında diş pulpa kök hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bir sonraki aşamada doku iskelelerinin diş doku mühendisliğindeki kullanım potansiyellerini araştırmak ve kök hücreler ile doku iskelesi etkileşimlerini gözlemlemek amacıyla *in-vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Son aşamada karakterizasyonları tamamlanmış olan insan diş pulpa kök hücreleri (iDPKH) ile durgun koşullarda hücre kültür çalışmaları yürütülmüş ve *in-vitro* diş doku oluşumuna yönelik bulgular elde edilmiştir. Bu bölümde tüm deneysel çalışmalara ait ayrıntılı bilgilere yer verilmiştir.

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Kitosan doku iskelesi üretiminde kullanılan %75-85 deasetilasyon derecesine sahip orta molekül ağırlıklı kitosan Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Kitosani çözmek için kullanılan asetik asit Riedel de Haen (A.B.D.) firmasından ve üretilen doku iskelelerinin stabilizasyonu için kullanılan etanol (%96) Colony Sugar Mills (Pakistan) firmasından temin edilmiştir. Yapay vücut sıvısı (SBF) hazırlanmasında kullanılan tuzlardan sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), kalsiyum klorür dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), magnezyum klorür heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ve sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) Merck (Almanya) firmasından, borik asit (H_3BO_3) BDH Chemicals Ltd (İngiltere) firmasından, sodyum hidroksit (NaOH), sodyum bikarbonat (NaHCO_3) ve 2,2-dihidroksi indan-1,3-dion (Ninhidrin) Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Hücrelerin çoğaltılması ve kültüründe kullanılan Minimum Essential Medium Alpha Modification (α -MEM) Biochrom (Almanya), Dulbecco fosfat tampon çözeltisi (DPBS) ve gentamisin Lonza (İsviçre), Tripsin/EDTA (%0.01 tripsin/10 nM EDTA), fetal sığır serumu (FBS) ve penisilin-streptomisin (P/S) Sigma (Almanya), amfoterisin-B ise

Hyclone (A.B.D.) firmalarından satın alınmıştır. Kullanılan 12-gözlü ve 6-gözlü polistiren hücre kültür kapları Nunclon Delta Surface (Danimarka) firmasından; 25 ve 75 cm²'lik hücre kültür kapları ise Orange Scientific'ten (Belçika) temin edilmiştir. Pulpayı parçalamak için kullanılan Tip 1 kollajenaz enzimi Biochrom (Almanya) firmasından; hücreleri tek tek ayırmak için kullanılan 70 µm çaplı gözenekleri olan hücre filtresi BD Biosciences (ABD) firmasından alınmıştır. İnsan diş pulpası kök hücrelerinin (iDPKH) kemik hücrelerine farklılaştırılmasında kullanılan L-askorbik asit, β-gliseroil fosfat ve deksametazon; kıkırdak hücrelerine farklılaştırılmasında deksametazon ve L-askorbik asite ek olarak kullanılan transforme büyüme faktörü (TGF) 1, 3 ve ITS (İnsulin-Transferrin-Selenium); yağ hücrelerine farklılaştırılmasında deksametazona ek olarak kullanılan insülin, indometazin ve izobütilmetilksantin (IBMX) ise Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hücre canlılığının takibinde kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenilterazolyum bromür (MTT), Presto Blue, isopropanol ve HCl (%37) Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hücre karakterizasyonu çalışmaları için kullanılan kristal viyole BDH Chemicals Ltd. (İngiltere), fast green, safranin O, aseton, metanol ve glutaraldehit Sigma firmasından (Almanya), hekzametildisilazan (HMDS) ve formalin Merck'den (Almanya) temin edilmiştir. Hücre morfolojilerini göstermek amacıyla kullanılan 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ve Alexa Fluor 488 Phalloidin konjuge F-aktin antikoru ve hücrelerden RNA izolasyonunda kullanılan Trizol Invitrogen (A.B.D.) firmasından satın alınmıştır. Fibronektin Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Doku İskelelerinin Üretimi

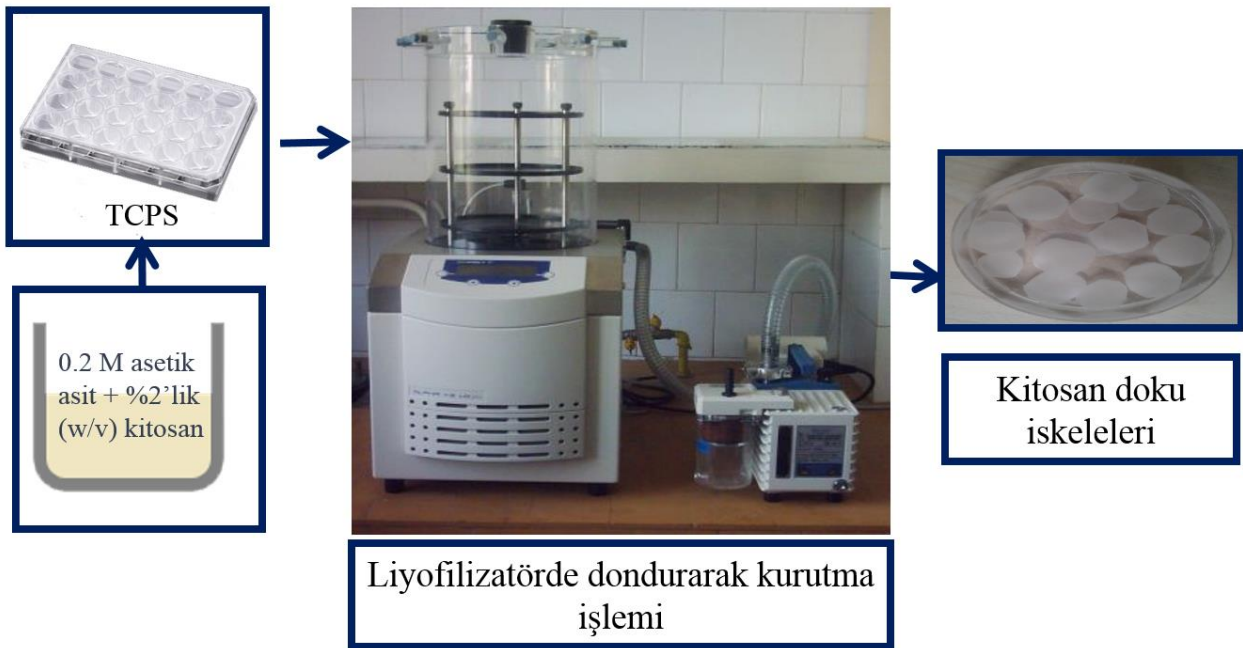
Kitosan doku iskeleleri dondurarak-kurutma yöntemi ile hazırlandıktan sonra, üzerine nanohidroksiapatit (nHAp) ve aynı koşullarda bor katkılı nanohidroksiapatit (B-nHAp) kaplama yapılarak iki tür nanokompozit iskele elde edilmiştir. Çalışmada 3 farklı doku iskelesi hazırlanmıştır. Bunlar:

- Kitosan
- nHAp/kitosan
- B-nHAp/kitosan

doku iskeleleri olup aşağıda üretimleri konusunda ayrıntılı bilgi verilmiştir.

3.2.1. Kitosan Doku İskelelerinin Hazırlanması

0.2 M asetik asit çözeltisinde %75-85lik deasetilasyon derecesine sahip kitosan çözünenene kadar karıştırılıp, % 2 (w/v) konsantrasyonuna sahip kitosan jel karışımları hazırlanmıştır. Elde edilen jel karışımları, safsızlıklardan arındırılmak amacıyla 100 µm elek filtreden geçirilmiş ve 24-gözlü polistiren Petri kaplarına (TCPS) dökülerek -20°C'de 2 gün boyunca dondurulmuştur. Bu işlemi takiben gözenekli kitosan doku iskeleleri, liyofilizatör (Christ, Almanya) kullanılarak -80°C'de 5 gün süreyle "dondurarak-kurutma" işlemine tabi tutulmuştur. Böylece iskeleler içerisindeki buz kristalleri süblimleşerek, içsel bağlantılara sahip gözenekli bir yapı elde edilmiştir. Elde edilen kitosan doku iskelelerinin stabilizasyonu için iskeleler, %96'lık (v/v) etanol çözeltisi içerisinde 2 gün, %70'lik (v/v) etanol çözeltisi içerisinde ise 1 saat süreyle bekletilmiştir. İskeleler hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere 2 mm x 9 mm boyutlarında kesilmiştir. Şekil 3.1'de kitosan doku iskelelerinin üretimindeki aşamalar şematik olarak gösterilmiştir



Şekil 3. 1. Dondurarak-kurutma yöntemi ile kitosan doku iskelelerin hazırlanışı.

3.2.2. nHAp/kitosan ve B-nHAp/kitosan NanoKompozit Doku İskelelerinin Hazırlanması

Çalışma kapsamında biyomimetik yöntemle nHAp/kitosan ve B-nHAp/kitosan nanokompozit doku iskeleleri hazırlanmıştır. Bu doku iskelelerinin üretilmesi için sırayla 10xSBF ve bor katkılı 10xSBF (B-SBF) çözeltileri hazırlanmış ve kitosan doku iskelelerinin kaplanması mikrodalga enerjisi yardımı ile sağlanmıştır. Çizelge 3.1'de çalışma kapsamında hazırlanan 10xSBF çözelti reçetesi verilmiştir.

Çizelge 3. 1. 10xSBF benzeri çözelti reçetesi (toplam hacim 1L).

| Bileşenler | Eklenme Sırası | Miktar (g) | Konsantrasyon (mM) |
|--|----------------|------------|--------------------|
| NaCl | 1 | 58.443 | 1000.00 |
| KCl | 2 | 0.373 | 5.00 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 3 | 3.675 | 25.00 |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 4 | 1.016 | 5.00 |
| NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O | 5 | 0.250 | 3.62 |
| NaHCO ₃ | 6 | 0.084 | 10.00 |

10xSBF çözeltisinin hazırlanması için Maviş ve ark.[172] tarafından belirlenen Çizelge 3.1'deki ilk beş tuz 800 mL ultra saf su içinde çözüldükten sonra hacim 200 mL ultra saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözelti çöktürme öncesine kadar cam saklama kabı içerisinde 4°C'de saklanabilir.

B-SBF çözeltisinin hazırlanması için 1 L ultra saf suda 10 g borik asit çözülmüştür. B-SBF pH'sının çökeltme pH aralığında olması için 10 M NaOH eklenmiştir. Daha sonra Çizelge 3.1.'de belirtilen ilk beş tuz bu çözelti içerisinde sırasıyla çözülmüştür. Hazırlanan bu stok çözelti kaplama öncesine kadar 4°C'de cam saklama kabı içerisinde saklanabilir.

Kitosan doku iskeleleri kaplamadan önce seçilmiş olan SBF stok çözeltisi içerisinde vakum etüvünde (Thermo Scientific, Lindberg Blue, ABD) çöktürülmüştür. Daha sonra 100 mL SBF içerisine NaHCO₃ ilave edilmiş ve 7 iskele/100 mL SBF olacak şekilde doku iskeleleri SBF çözeltisine konulmuştur.

Grubumuzda daha önce yapılan çalışmalar kapsamında kitosan doku iskelelerinin, nHAp ve B-nHAp ile kaplanması için uygun koşullar belirlenmiştir [173, 174]. İki tür SBF ile yapılan kaplamada da mikrodalga (Milestone, İtalya) uygulaması aynı koşullarda

gerçekleştirilmiştir. Kitosan doku iskelelerini nHAp ve B-nHAp ile kaplamak için 600 W enerji ve her biri 30 saniyelik 9 tekrar (30s x 9) olarak uygulanmış ve bu işlem 4 defa tekrarlanarak kaplama işlemi tamamlanmıştır. Her bir kaplama sonrasında istenmeyen fazlar, 3 dk %96 (v/v) etanol, 2x3 dk ultra saf su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır ve doku iskeleleri tekrar taze SBF ortamına alınarak kaplamaya devam edilmiştir. Son kaplamadan sonra 15 dk etanol ve 2x15 dk ultra saf su ile yıkama yapılarak tüm doku iskeleleri -20°C'de dondurulmuş ve liyofilizatörde -80°C'de kurutulmuştur.

3.3. Hücre Kültür Çalışmaları

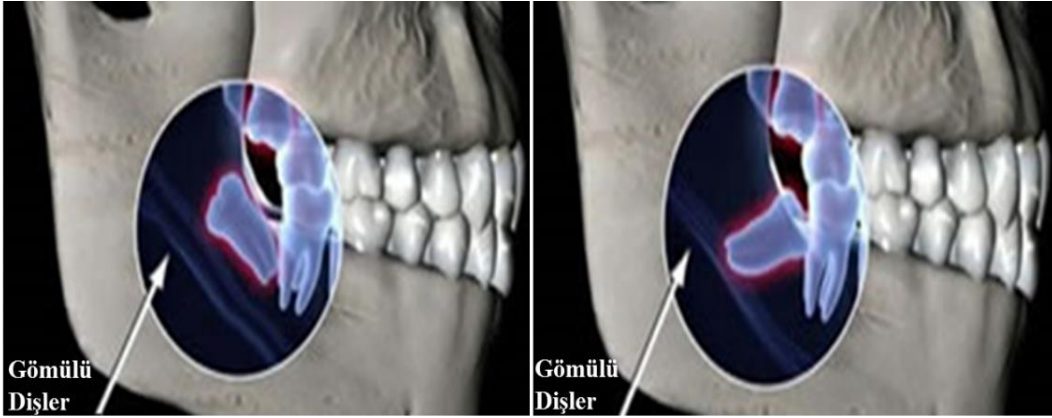
Hücre kültür çalışmalarında, insan diş pulpası kök hücreleri (iDPKH) kullanılmıştır. Çalışmada Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'ndan GO 13/250 karar numarası ile alınan izin doğrultusunda (**EK1**) 20 yaş gömülü dişlerini çektiren 4 kadın hastadan gönüllü onam alındıktan sonra cerrahi kliniği tarafından çekilen dişler serum fizyolojik içerisine alınmıştır. Çekilen dişlerin dış yüzeyi %70 alkol ile dezenfekte edildikten sonra 4X antibiyotik çözeltisi içeren fosfat tamponu (PBS) içerisine alınmıştır.

Dişler "Restoratif Diş Tedavisi" Anabilim Dalı klinik laboratuvarına getirilmiştir. Dişin sert dokularının kesilip pulpanın çıkarılabilmesi için gerekli tüm alet ve cihazlar laboratuvardan sağlanmıştır.

3.3.1. iDPKH'lerin İzolasyonu

Diş, bukkolingual yönde dentin dokusunun orta üçlüsüne kadar, çift taraflı elmas disk ile düşük devirde dönen aletle, ara ara serum fizyolojik ile nemlendirilerek, ortadan kesilerek bir el aletiyle iki parçaya ayrılmıştır. Kırılan dişin orta kısmındaki pulpa dokusu steril ekskavatör ve presel yardımıyla pulpa odası ve kök kanalından çıkartılarak steril 4X antibiyotik karışımı içeren PBS içerisine alınmış ve Beytepe Kampüsü, Kimya Mühendisliği Bölümü, Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'nun sorumluluğundaki hücre kültürü laboratuvarına taşınmıştır. İşlemlere steril laminar akışlı kabin içerisinde devam edilmiştir. Pulpanın enzimatik olarak parçalanması için %0.075'lik kollajenaz Tip I enzimi PBS içerisinde çözülerek 0.22 µm filtreden süzümüştür. Pulpa enzime muamele edilmeden önce bir kez steril 4X antibiyotikli PBS ile yıkanmış ve daha sonra 2 mL kollajenaz Tip I enzimi içeren PBS'te 37°C'de 1-1.5 saat süreyle parçalanıncaya

kadar bekletilmiştir. Her 15 dk'de bir parçalanmayı kolaylaştırmak için 20 saniye süreyle vortekslenmiştir. Enzimatik parçalama sonunda hücreler 70 µm'lik steril süzgeçten geçirilerek tek tek ayrılmaları sağlanmıştır. Filtre üstünde kalan pulpa parçaları ve filtre altına geçen hücreler iki ayrı grup olacak şekilde farklı santrifüj tüplerine toplanmış ve PBS ile 1,000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek iki kez yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra süpernatant atılarak geriye kalan pellet üzerine hücre kültür ortamı (α -minimum essential medium: α -MEM + %10 fetal serum + %0.1 antibiyotik çözeltisi) eklenmiş ve elde edilen süspansiyon 10 cm²'lik 6 gözlü doku kültür kaplarının bir gözüne aktarılmıştır. Hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 3 – 4 hafta boyunca kültüre edilmiştir. Hücreler kültür ortamına alındıktan 5 gün sonra kullanılan ortam yenisi ile değiştirilmiş ve yüzey tamamen hücrelerle kaplandığında tripsin enzimi kullanılarak pasajlama yapılmıştır. Hücrelerden stok oluşturabilmek için her pasajda hücreler %90 fetal serum ve %10 dimetil sulfoksit (DMSO) ile oluşturulan dondurma ortamında dondurularak -80°C'ye kaldırılmıştır. Şekil 3.2'de 20 yaş gömülü azı dişleri gösterilmiştir.



Şekil 3. 2. İnsan ağızındaki farklı konumlardaki 20 yaş gömülü azı dişleri.

3.4. Hücre Karakterizasyonu

Hücrelerin canlılığının ve metabolik aktivitelerinin belirlenmesi için MTT analizi kullanılmıştır. Hücre canlılığının yanı sıra hücre morfolojisinin takibi için kristal viyole ve F-aktin/DAPI boyamaları yapılmıştır ve akış sitometrisi ile pozitif ve negatif yüzey antijenleri belirlenmiştir.

3.4.1. MTT analizi

İzole edilen iDPKH'lerin canlılığı ve mitokondriyal aktiviteleri kültür süresinde farklı zamanlarda yapılan MTT analizi ile belirlenmiştir. Bu analiz MTT tuzunun mitokondriyal enzimler tarafından suda çözünmez mor renkli formazan kristallerine indirgenmesi prensibine dayanmaktadır. Sarı renkli MTT çözeltisi hücre mitokondrisinde, mitokondriyal dehidrogenaz enzimi ile formazan kristallerine dönüştürülmektedir. Buna bağlı olarak oluşan mor formazan kristallerinin yoğunluğu, ortamda bulunan hücrelerin canlılığı ve hücreysel aktivitesi hakkında bilgi vermektedir.

Bu amaçla kültürün 1, 3, 5, 7, 9, 14 ve 21. günlerinde kültür ortamı uzaklaştırılmış ve her bir göze 600 µL serumsuz besi ortamı ve 60 µL MTT çözeltisi (2.5 mg/mL PBS) eklenmiştir. Daha sonra 37°C'de 3 sa boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiş ve kültür ortamı tekrar çekilerek her bir göze 400 µL 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenmiştir. Böylece formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmış ve elde edilen çözeltilerden 200 µL alınarak, 96-gözlü kültür kaplarında, 570 nm'de spektrofotometrik (Asys UVM 340, Avusturya) olarak ölçüm yapılmış ve çözeltilerin optik yoğunlukları belirlenmiştir.

3.4.2. F-aktin/DAPI Boyaması

F-aktin/DAPI boyaması için 4-gözlü kültür kaplarına beşinci pasajdaki hücreler ekilmiştir. Hücreler yüzeyi kapladıktan sonra üzerlerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve PBS ile 2x5 dk yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrası %4 (v/v) formalin (PBS içerisinde) ile 20 dk fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fiksasyon sonrası 3x5 dk PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkamadan sonra %0.1 (v/v) Triton X-100 (PBS hazırlanmıştır) ile 10 dk muamele sonucunda hücre membran geçirgenliği arttırılmıştır. Ardından hücreler %1 (w/v) sığır serum albümin içeren (PBS-A) çözeltisi içerisinde hazırlanmış Alexa Fluor 488 Phalloidin konjuge F-aktin antikoru (%1'lik v/v) ve 1/1000 oranında DAPI ile 30 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. İşlemi takiben 3 kez PBS-A ile yıkama yapılmıştır ve floresan mikroskobu (Olympus IX71, A.B.D) kullanılarak hücreler görüntülenmiştir. Hücre morfolojisi kristal viyole ve immunofloresan boyama (aktin filamentler AlexaFluor 488 konjuge anti-Faktin antikoru ile yeşil; hücre çekirdeği ise DAPI ile mavi boyanmıştır) yöntemleri ile incelenmiştir.

3.4.3. Kristal-Viyole Boyanması

Hücre morfolojisi kristal viyole boyanması ile incelenmiştir. Kristal viyole boyanması için, kültürün belirlenen günlerinde örnekler üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve PBS ile iki kez yıkama yapılmıştır. Hücreler 4°C'de 20 dk, aseton-metanol (1:1) çözeltisine tabi tutularak fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fiksasyondan sonra hücreler üzerine kristal viyole çözeltisi (%0.5'lik w/v, %20'lik metanol çözeltisi içinde) damlatılarak 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda boyanan yüzey su ile yıkanarak invert mikroskop altında hücre morfolojisi incelenmiştir.

3.4.4. Akış Sitometrisi Yöntemi ile iDPKH'lerin Karakterizasyonu

iDPKH'lerin kök hücre özelliklerini belirlemek için CD44, CD90, CD106, CD73, CD34 ve HLA-DR gibi pozitif ve negatif yüzey antijenleri akış sitometrisi yöntemi ile incelenmiştir.

Pasaj 2-4 arasındaki iDPKH'ler tripsin/EDTA ile yüzeyden kaldırıldıktan sonra sayılmış ve PBS içerisinde süspansiyon edilmiştir. 1,500 rpm'de 5 dk santrifüj yapılarak hücreler çöktürülmüş ve üzerlerine 100 µL'sinde 1×10^5 - 2×10^5 arası hücre olacak şekilde %0.05 NaN_3 ve %0.5 insan serum albümin içeren PBS eklenmiştir. Florokromları bağlı her bir antikordan 5'er µL önceden işaretlenen tüplerin diplerine bırakılıp her bir tüpe hücre süspansiyonundan 100'er µL ekeklendi. +4°C'de 30 dk karanlıkta inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonunda 1,500 rpm'de 5 dk süreyle hücreler çöktürülüp süpernatant atılmış ve PBS ile yine 1,500 rpm'de 5 dk boyunca iki kez yıkama yapılmıştır. Yıkamalardan sonra hücreler 200 µL PBS çözeltisi içerisinde süspansiyon edilerek BD FACSAriaII Cell Sorter cihazı ile analiz edilmiştir.

3.5. iDPKH'lerin Farklılaşma Kapasitelerinin İncelenmesi

iDPKH'lerin farklı hücre tiplerine farklılaşma özelliklerinin belirlenmesi için kemik, kıkırdak ve yağ hücrelerine farklılaştırma ortamlarında kültürasyonları yapılmıştır. Osteojenik ve adipojenik farklılaşmaların incelenmesi için Pasaj 4'teki iDPKH'ler 3,500 hücre/cm² yoğunlukta 12 gözlü kültür kaplarına ekilmiştir. Kıkırdak farklılaşmasının incelenmesi için ise pellet kültür yöntemi kullanılmıştır. 250,000 hücre 15 mL'lik santrifüj tüplerinde 1,000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek çöktürülmüştür ve süpernatant dökülerek üzerine çöken hücre topluluğu bozulmayacak şekilde ortam ilave edilmiştir. İlerleyen

günlerde santrifüj tüpü dibinde hücreler pellet oluşturmuştur. Hücre farklılaşmasının serum varlığından minimum düzeyde etkilenmesi için serum oranı ekimden önce çoğaltma aşamasında %15 iken ekim sırasında %10'a düşürülmüştür. İlerleyen günlerde ortam değişimlerinde serum oranı kademeli olarak %7.5, %5, %3.5 ve %2.5'e düşürülmüştür. Hücreler pasaj1'den itibaren antibiyotiksiz ortamda kültüre edilmiş, 12 gözlü kültür kaplarına da antibiyotiksiz ortamda ekilmiştir, ancak ekimden yaklaşık 2 hafta sonra bakteriyel kontaminasyonla karşılaştığı için %1 penisilin/streptomisin ile kültüre devam edilmiştir. Ekimden 6 gün sonra, hücrelerin yüzeyi yaklaşık olarak kapladığı görüldükten sonra farklılaşma gözlerine farklılaştırma ortamları, kontrol gözlerine de kontrol ortamı eklenerek kültüre devam edilmiştir. Farklılaşma ortamlarının eklendiği gün serum oranı %2.5'e düşürülmüştür ve bu aşamadan sonraki kültür süresince %2.5'te tutulmuştur. Belirlenen günlerde örnekler alınarak analizler yapılmıştır. Farklılaştırma ve kontrol gözleri iki paralel olacak şekilde çalışılmıştır.

3.5.1. Osteojenik Farklılaşmanın Belirlenmesi

iDPKH'lerin osteojenik farklılaşma özelliklerinin belirlenmesi için hücreler 6 gözlü kültür kaplarına ekilmiş ve 21 gün boyunca osteojenik farklılaştırma ortamında kültüre edilmiştir. Kontrol grubuna %10 fetal serum içeren α -MEM kültür ortamı eklenirken farklılaştırma grubuna, ek olarak, 50 μ g/mL askorbik asit, 10 μ M β -gliserol fosfat ve 10^{-8} M deksametazon ilave edilmiştir. Hücre üremesine bağlı olarak 2-3 günde bir kültür ortamı yeni kültür ortamı ile değiştirilmiştir.

Osteojenik olarak farklılaşan hücrelerde görülen alkalın fosfataz aktivitesi (ALP) ve kalsiyum birikimleri alkalın fosfataz-von Kossa boyaması ile belirlenmiştir. Hücreler üzerindeki kullanılmış ortam uzaklaştırılmış ve soğuk PBS ile iki kez yıkanmıştır. Ardından %10'luk soğuk nötral formalin çözeltisinde 10 dk bekletilerek hücrelerin yüzeye fiksasyonu sağlanmıştır. Tampon çözelti uzaklaştırılmış ve bir kez distile su ile yıkandıktan sonra 15 dk distile su içerisinde bekletilmiştir. Bekleme sürecinde taze substrat (0.005 g naftol, 200 μ L N,N-dimetilformamid, 25 mL 0.2 M Tris-HCl, 0.03 g Red Violet LB salt, 25 mL distile su) hazırlanarak 0.2 μ m filtreden geçirilmiş, kullanılmadan önce oda sıcaklığında 20 dk bekletilmiştir. Distile su uzaklaştırıldıktan sonra hazırlanan taze substrat eklenmiş ve 45 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası 4 kez distile su ile yıkanarak ve distile su uzaklaştırıldıktan sonra % 2.5'lük gümüş nitrat çözeltisi ile 30 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda gümüş nitrat çözeltisi uzaklaştırılarak 3 kez distile su ile yıkanmıştır. Boyanmış hücreler distile su içerisinde 5 dk bekletilmiştir. Hücreler, son bir kez distile su ile yıkanarak gümüş nitrat tamamen uzaklaştırılmış ve mikroskop altında incelenmiştir.

ALP ölçümü için kültürün 7, 14 ve 28 inci günlerinde örnekler üzerindeki kültür ortamı çekildikten sonra PBS ile bir kez yıkama yapıp -80 °C'ye kaldırılmıştır. Ölçüm yapıncaya kadar tüm örnekler -80 °C'de bekletilmiştir. Tüm örnekler aynı anda analiz edilmiştir. -80°C'den çıkarılan örnekler üzerine 500 µL lizis çözeltisi (%0.01'lik Triton-X-100 PBS içerisinde) eklenmiştir ve 4°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Gözlerdeki lizis çözeltisi iyice homojenize edildikten sonra 1.5 mL'lik tüplere toplanmıştır. Daha sonra 12,000 rpm'de, 4°C'de 10 dk santrifüjleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifügasyondan sonra 96-gözlü kültür kaplarına 50 µL süpernatant ve 125 µL ALP çözeltisi (1 mM MgCl₂ ve 56 mM 2-amino-2-metil-1-propanol içeren 10 mL p-nitrofenil fosfat sıvı substrat) eklenmiştir. Kaplar alüminyum folyo ile kaplanıp 37°C'de 30 dk çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. 30 dk sonunda her bir göze 50 µL 2.5 M NaOH eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. 405 nm'de mikroplate okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) ile spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır.

3.5.2. Kondrojenik Farklılaşmanın Belirlenmesi

iDPKH'lerin kondrojenik farklılaşma özelliklerinin belirlenmesi için hücreler 6 gözlü kültür kaplarına ekilmiş ve 21 gün boyunca kondrojenik farklılaştırma ortamında kültüre edilmiştir. Kontrol grubuna %10 fetal serum içeren α-MEM kültür ortamı eklenirken farklılaştırma grubuna, ek olarak, %1 ITS (10 mg/mL insülin, 5.5 mg/mL transferin, 5 ng/mL selenyum, 0.5 mg/mL sığır serum albumin, 4.7 mg/mL linoleik asit), 0.1 mM askorbik asit 2-fosfat, 10⁻⁷ M deksametazon, 10 ng/mL TGFβ-1 eklenmiştir. Hücre üremesine bağlı olarak 2-3 günde bir kültür ortamı yeni kültür ortamı ile değiştirilmiştir.

Safranin O/Fast Green Boyaması

iDPKH'lerin kıkırdak hücrelerine farklılaştıklarını göstermek için Safranin O boyaması yapılmıştır. Safranin O, kıkırdak dokusunun ekstraselüler matris yapısında bulunan glikozaminoglikan ve proteoglikanları boyamaktadır. Boyama sonunda sitoplazma

grimsi yeşil, çekirdek siyah ve kıkırdak yapısı kırmızı renge boyanmaktadır. Kültür sonrası hücre yüzeyi PBS ile yıkanıp fiksasyon için %0.1'lik glutaraldehit çözeltisi kültür kabına eklenmiş, 20 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Fiksasyon sonunda hücreler 3 kez PBS ile yıkanmıştır. PBS dökülüp üzerlerine %1 asetik asit eklenerek 10 s bekletilmiştir. Süre sonunda % 0.1 safranin O çözeltisi ile hücreler 5 dk muamele edilmiştir. Safranin O çözeltisi dökülüp hücreler PBS ile iki kez yıkandıktan sonra optik mikroskopta görüntülenmiştir.

3.5.3. Adipojenik Farklılaşmanın Belirlenmesi

iDPKH'lerin adipojenik farklılaşma özelliklerinin belirlenmesi için hücreler 6 gözlü kültür kaplarına ekilmiş ve 21 gün boyunca adipojenik farklılaştırma ortamında kültüre edilmiştir. Kontrol grubuna %10 fetal serum içeren α -MEM kültür ortamı eklenirken farklılaştırma grubuna, ek olarak, 0.5 mM izobütil metil ksantin, 10^{-6} M deksametazon, 10 μ g/mL insülin, 200 μ M indometazin ilave edilmiştir. Hücre üremesine bağlı olarak 2-3 günde bir kültür ortamı yeni kültür ortamı ile değiştirilmiştir.

Oil Red O boyama

iDPKH'lerin yağ hücrelerine farklılaştıklarını göstermek için Oil Red O boyama yapılmıştır. Oil Red O, trigliseridleri boyamak için kullanılan, yağda çözünen bir boya olan lizokromdur. Oil Red O ile boyanan yağ damlacıkları kırmızı renkte görülmektedir. Stok çözelti, 200 mL isopropanol içinde 0.7 g Oil Red O, 1 gece karıştırıcıda bekletilerek hazırlanmıştır. Boya tamamen çözüldükten sonra 0.2 μ m filtreden geçirilerek $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırılmıştır. Kültürasyon sonunda, hücreler üzerindeki kullanılmış ortam uzaklaştırılarak hücre yüzeyi PBS ile yıkanmıştır. Ardından hücreler %10 formalin çözeltisi (PBS içinde) eklenerek, 5-10 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve böylelikle fikse edilmiştir. %10'luk formalin çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra taze formalin eklenmiş ve 1 sa oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süre sonunda formalin uzaklaştırılmış ve %60'luk izopropanol (distile su içinde) ile hücre yüzeyi yıkanmış ve tamamen kuruyana kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Kuruma işleminden sonra Oil Red O çalışma çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda Oil Red O çözeltisi alınıp hücreler 4 kez distile su ile yıkanmış ve böylece görüntüler elde edilmiştir.

3.6. nHAp/kitosan ve B-nHAp/kitosan Nanokompozit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında üretilen kitosan, nHAp/kitosan ve B-nHAp/kitosan doku iskelelerin kimyasal ve fiziksel analizleri aşağıdaki yöntemlerle gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Dondurarak-kurutma yöntemi ile elde edilen kitosan doku iskelelerinin yüzey ve kesit morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (Zeiss Evo 50, Almanya) ile incelenmiştir. Örnekler yüksek vakum altında plazma ortamında altın-paladyum ile kaplandıktan sonra incelemeye alınmıştır.

3.6.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizi

Kitosan, nHAp/kitosan ve B-nHAp/kitosan doku iskelelerinde kitosana ait amid 1 ve 2 ile hidroksiapatite ait OH⁻, CO₃⁻² ve PO₄⁻³ fonksiyonel grupların varlıkları 400–4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında ATR-FTIR (Thermo Scientific Nicolet iS10, ABD) ile gösterilmiştir.

3.6.3. X Işını Kırınımı (XRD) Analizi

Kitosan, nHAp/kitosan ve B-nHAp/kitosan doku iskelelerinin yarı kristalin yapıya sahip kitosan ve kemik benzeri nHAp yapıları XRD (PANanalytical X'Pert Pro MPD, 45 kv-40 mA Cu source) ile incelenmiştir. Sonuçlar 5-80° (2θ) arasında, 0.039°'lik adımlarla (adım başına 46.41 s süre) tarama yapılarak elde edilmiştir.

3.6.4. Şişme Deneyleri

Üretilen kitosan doku iskelelerinin şişme oranlarını tayin etmek amacıyla örnekler 37°C'de PBS'e, (pH=7.4) konulmuştur. Daha sonra şişmesi tamamlanan örnekler PBS içerisinden alınarak üzerlerindeki fazla çözelti süzgeç kağıdı ile uzaklaştırılmıştır. İskelelerin şişme oranları (Q) gravimetrik olarak Eşitlik 3.1 kullanılarak kuru temelde belirlenmiştir.

$$\text{Şişme oranı} = (W - W_0)/W_0 \quad (3.1)$$

Eşitlikteki W₀ kitosan doku iskelesinin kuru ağırlığını, W ise yaş ağırlığını göstermektedir.

3.6.5. Gözenekliliğin Belirlenmesi

Hazırlanan kitosan doku iskelelerinin % gözenekliliği gravimetrik olarak belirlenmiş ve Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Gözeneklilik (\%)} = 1 - [\rho_{\text{doku iskelesi}}/\rho_{\text{gerçek}}] \times 100 \quad (3.2)$$

Verilen eşitlikte $\rho_{\text{doku iskelesi}}$, doku iskelesinin ağırlığının hacmine bölünmesi ile elde edilen yoğunluğunu, $\rho_{\text{gerçek}}$ (0.50g/cm^3) ise doku iskelesinin yapıldığı malzemenin yoğunluğunu göstermektedir.

3.7. Doku İskeleleri ile Yapılan Hücre Kültürü Çalışmaları

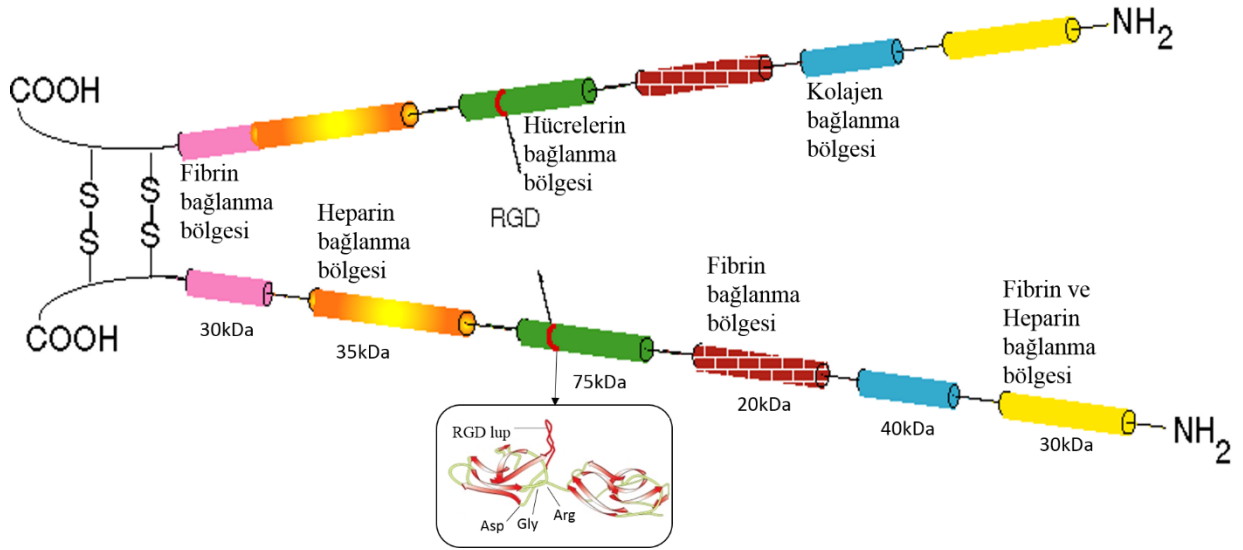
3.7.1. Doku İskelelerinin Fibronektin İmmobilizasyonu Öncesi Hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan 3 grup doku iskelesinin (kitosan, nHAp/kitosan ve B-nHAp/kitosan) her biri ultra saf su ile yıkanmış ve daha sonra %70'lik (v/v) etanol içerisinde vakum etüvünde çöktürülerek 2 saat oda sıcaklığında kapalı kapta bekletilmiştir. Ardından doku iskeleleri, yapıdaki etanolü uzaklaştırmak amacıyla steril PBS ile yaklaşık 3x5 dk yıkanmıştır. Yıkama sonrası doku iskeleleri steril kültür kaplarına yerleştirilerek her iki yüzeyi 45 dk UV ışığına maruz bırakarak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Hücre ekiminden önce steril edilen iskeleler %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren α -MEM şartlandırma ortamı içerisinde serum proteinleri ile etkileşmeleri için 1 gece %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde tutulmuştur.

3.7.2. Fibronektin İmmobilizasyonu

Tez kapsamında hazırlanan kitosan doku iskelelerinin kök hücre tutunmasını arttırmak amacı ile fibronektin (Fn) immobilizasyonu yapılmıştır. İmmobilizasyon için karbodiimid kimyası yaklaşımı kullanılmıştır. Şekil 3.3'de fibronektinin bağlanma bölgeleri gösterilmiştir.

Hücre kültürü çalışmaları dört grup iskele (kitosan, kitosan+Fn, nHAp/kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn iskele) ile gerçekleştirilmiştir.

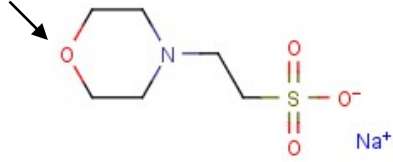


Şekil 3. 3. Fibronektin yapısı ve bağlanma bölgelerinin şematik görünümü.

İmmobilizasyon işleminde kullanılan çözeltiler aşağıda sıralanmıştır.

0.1 M MES çözeltisi

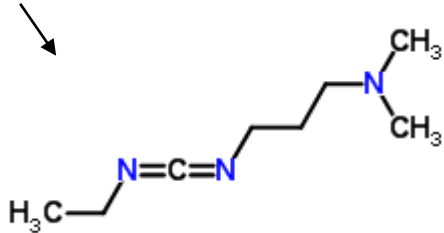
- MES (4-Morpholin ethan sulfonik asit sodyum tuzu) 0.65 g.



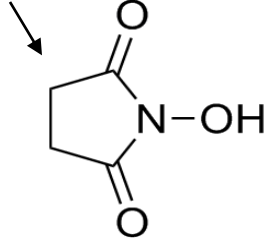
- Ultra saf su 30 mL.

2 mM EDC ve 5mM NHS çözeltisi

- EDC (1-Etil-3-(3 dimetil amino propil) karbodiimid 0.00767 g.



- NHS (N-hidroksi suksinimid ester) 0.0115 g.



- MES çözeltisi 20 mL.

EDC ve NHS, proteinlerin karboksil grupları ile reaksiyona girerek onları aktive etmektedir. MES çözeltisi ultra saf suda hazırlandıktan sonra EDC/NHS bu çözelti içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan çözelti laminar akışlı kabin içerisinde 0.20 µm filtreden geçirilerek sterillemiştir. 100 µg/mL Fn, EDC/NHS içeren steril MES çözeltisine eklenmiş ve 20 dk oda sıcaklığında çalkalamalı inkübatörde karıştırılmıştır. Ardından hazırlanmış olan protein çözeltisi, kitosan doku iskelesi yüzeyinde bulunan amino grupları ile reaksiyonu gerçekleştirmek üzere iskele başına 100 µL olacak şekilde, sterilizasyonu tamamlanmış doku iskelelerine ilave edilmiştir. Fn bağlanması için doku iskeleleri 4 sa oda sıcaklığında laminar akışlı kabin içerisinde bekletilmiştir. 4 sa sonunda 8x5 dk steril PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrası Fn bağlanmış doku iskeleleri %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren α-MEM şartlandırma ortamı içerisinde serum proteinleri ile etkileşmeleri için 24 saat %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiştir.

3.7.3. Doku İskelesi Yüzeyine Bağlanan Amino Gruplarının Ninhidrin Yöntemi ile Tayini

Fibronektin immobilizasyonunun başarılı bir şekilde yapıldığını belirlemek için ninhidrin yöntemi kullanılmıştır.

Ninhidrin yöntemi ile doku iskele yüzeylerine bağlanan amino grupları tayin edilmektedir [175]. Bu işlemi uygulamak için etanol (%100) içerisinde 1 mol/L derişiminde ninhidrin çözeltisi (w/v) hazırlanmıştır. Fibronektin immobilize edilen ve edilmeyen doku iskeleleri ninhidrin çözeltisi ile 1 dk süreyle muamele edilmiştir. Ardından iskeleler koyu cam şişelere konularak 70°C'deki su banyosunda 10 dk süreyle bekletilmiştir. Daha sonra, her bir örneğin üzerine 2 mL THF ve 2 mL izopropanol

eklenerek ultrasonik karıştırıcı yardımı ile örneklerin iyice çözünmesi sağlanmıştır. Her bir örneğin, UV-VIS Double Beam PC (Labomed, Inc. ABD) ile 560 nm dalga boyunda absorban değerleri ölçülmüştür.

3.7.4. Hücrelerin Doku İskelelerine Ekilmesi

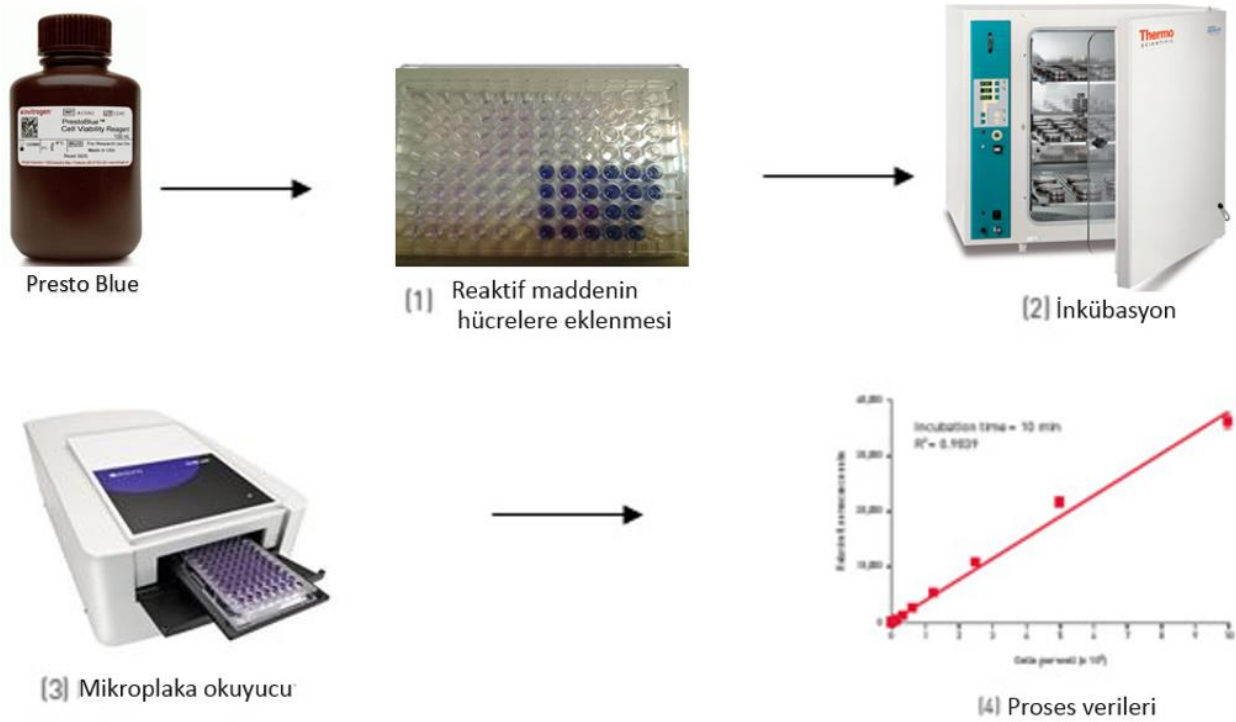
Karakterizasyonları tamamlanan doku iskelelerinin dış doku mühendisliğindeki kullanım potansiyellerini araştırmak amacıyla hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yapılan *in-vitro* çalışmalarda iDPKH'leri kullanılmıştır. Hücreler önce flasklarda çoğaltılmış, kültür ortamı olarak %15 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren α -MEM besi ortamı kullanılmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında 3-5 pasajdaki hücreler kullanılmış ve kitosan, kitosan+Fn nHAp/kitosan+Fn ve, B-nHAp/kitosan+Fn olmak üzere 4 farklı grup oluşturulmuştur. Doku iskeleleri %70'lik etanol içerisinde vakum etüvünde çöktürülmüş ve 2 sa sonunda kültür kaplarına yerleştirilerek 45 dk UV'ye maruz bırakılmış ve böylece sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Doku iskeleleri, yapıdaki etanolü uzaklaştırmak amacıyla steril PBS ile yıkanmış ve %10 FBS, %0.1 penisilin-streptomisin içeren α -MEM ortamı içerisine alınmıştır. Doku iskelelerinin serum proteinleri ile etkileşmeleri için 24 sa beklenmiş ve hücre ekimine geçilmiştir. Hücreler, 30 μ L besi ortamı içerisinde, 1×10^5 hücre/mL hücre yoğunluğu olacak şekilde doku iskelelerine ekilmiştir. Kültüre edilen hücreler, %95 nem ve %5CO₂ içeren inkübatörde (Heraus Instruments, Almanya) tutulmuştur. Hücre ekiminden 24 sa sonra doku iskelelerinin üzerinde bulunan ortam çekilmiş ve yerine 10 mM β -gliserol fosfat 0.50 μ g/mL askorbik asit ve 10^{-8} μ g/mL deksametazon içeren odontojenik farklılaşma ortamı konulmuştur. Kültür süresi boyunca hücrelerin içerisinde bulunduğu ortam 2-3 günde bir yarı yarıya değiştirilerek tazelenmiştir. Steril ortam gerektiren tüm işlemler laminar akış kabini (Bioair, Type II Laminar Akış Kabini, İtalya) gerçekleştirilmiştir.

3.7.5. Presto Blue Analizi

Doku iskeleleri üzerindeki iDPK hücrelerinin canlılığı ve mitokondriyal aktiviteleri Presto Blue analizi ile kültür süresinin farklı zamanlarında belirlenmiştir. Bu amaçla kültürün 1, 3, 5, 7, 9, 14 ve 21. günlerinde doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve her bir göze 50 μ L Presto Blue ve 450 μ L besi ortamı eklenmiştir. Hücreler 2 sa

37°C'de inkübe edildikten sonra renk değiştiren ortamdan 200 µL alınıp 96-gözlü kültür kaplarına aktarılmış, optik yoğunluk 600 nm referans olmak üzere 570 nm'de mikrolaka okuyucu (Asys UVM 340) ile belirlenmiştir (Şekil 3.4.).



Şekil 3. 4. Presto Blue analizi ile iDPK hücrelerinin canlılığının belirlenmesi.

Hücreler üzerinde kalan Presto Blue çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra 1 kez steril PBS ile yıkama yapılmış, hücreler üzerine taze besi ortamı eklenerek kültüre devam edilmiştir.

3.7.6.Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Hücrelerin doku iskelelerindeki morfolojilerini ve hücre-doku iskelesi, hücre-hücre etkileşimlerini belirlemek için, kültürün 4, 7 ve 14'üncü günlerinde, SEM (ZeissEvo 50, Almanya) görüntüleri alınmıştır. Örneklerin hazırlanması için öncelikle doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış, iskeleler iki kez PBS (pH=7.4) ile yıkanmıştır. Daha sonra doku iskeleleri % 2.5'lük (v/v) glutaraldehit çözeltisi ile 30 dk boyunca muamele edilmiş ve böylece hücrelerin fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler analize kadar PBS içerisinde 4°C'de saklanmıştır. SEM analizinden önce, doku iskeleleri PBS ile yıkanmış ve iskeleler sırasıyla %30, %50, %70, %90 ve %100'lük

(v/v) etanol çözeltilerinde 2 şer dk bekletilerek dehidrasyon (kurutma) işlemi gerçekleştirilmiştir. İskeleler daha sonra hekzametildisilazan (HMDS) içerisinde 5 dk bekletilmiştir. Oda sıcaklığında kurutulan örnekler, görüntülenebilmesi için elektron yansıtıcı/elektron saptırıcı bir madde olan altın-paladyum tabakası ile kaplanmış ve SEM görüntüleri alınmıştır.

3.7.7. RT-PCR Analizi

Hazırlanan doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen iDPK hücrelerinin odontojenik farklılaşmasını gen ifadesi düzeyinde belirlemek için alkalin fosfataz (ALP), runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (RunX2) , kollajenaz1 (KOL-I), β -aktin, osteopontin (OPN) ve osteokalsin (OCN) ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) (Roche, Almanya) ile incelenmiştir.

Kültürün 14. ve 21. günlerinde doku iskeleleri kültür ortamından alınarak steril Eppendorf tüplerine (1.5 mL) yerleştirilmiş, her bir örneğin üzerine 1 mL Trizol eklenerek mikromakas yardımı ile örnekler parçalanmış, 25-30 s vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 30 dk bekletildikten sonra -80°C 'ye alınmıştır. RNA izolasyonu gerçekleştirileceği zaman örnekler çözünmesi için yaklaşık 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve bu süre içinde iki kere vortekslenmiştir. Daha sonra örneklerin üzerlerine 200 μL kloroform eklenmiş, çalkalanmış ve oda sıcaklığında 3 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında, örnekler 4°C 'de 10 dk 13,000 rpm'de santrifüjlenmiş ve üstteki sulu faz yeni bir Eppendorf tüpüne aktarılmıştır.

Üzerinden toplanan sıvı faza eşit olacak şekilde %70'lik etanol eklenmiş ve hafifçe vortekslelendikten sonra RNeasy spin kolonlara aktarılmıştır. 4°C 'de 15s 13,000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra RNeasy mini kit kullanılarak gerekli basamaklar tamamlanmış ve spin kolona 30 μL RNase-free su eklenerek santrifüjlenmiş ve RNA yeni bir Eppendorf tüpünde toplanmıştır. cDNA sentezi öncesi RNA konsantrasyonları NanoDrop2000c (Thermo Scientific) ile ölçülmüştür.

cDNA sentezi için Applied Biosystems Kit cDNA (ABD) kiti kullanılmıştır. RT-PCR analizi, SolisBioDyne 5xHot FirePol® EvaGreen®qPCRMix Plus (Estonya) kiti kullanılarak LightCycler®NanoInstrument (Roche, Almanya) cihazında yapılmıştır.

cDNA sentezi reverse transkripsiyon ile 40°C'de 120 dk'da gerçekleştirilmiştir. Ardından, PCR analizi, aktivasyon basamağı 95°C'de 15 dk'da, uzatma basamağı 95°C'de 15 s, 60°C'de 20s, 72°C'de 20 s ve ayrılma basamağı 60°C'de 4s ve 95°C'de 20 s olmak üzere 45 döngüde gerçekleştirilmiştir.

“Housekeeping gen” olarak β -aktin kullanılmıştır. Yapılan analizin sonuçları bağıl gen ekspresyonu olarak verilmiştir. Tüm veriler $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre hesaplanmış, nHAp/kitosan doku iskelesi üzerindeki hücrelerin ilgili gen ekspresyon seviyeleri temel alınarak, B-nHAp/kitosan grubu ise bunun katları şeklinde değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan genlerin primer dizileri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri.

| | |
|---|---|
| <i>β-aktin</i> | Forward primer 5'-GAAGCATTTGCGGTGGACGAT-3' |
| | Reverse primer 5'-TCCTGTGGCATCCACGAAACT-3' |
| <i>ALP</i> | Forward primer 5'-CACCTGCCTTACTAACTCC-3' |
| | Reverse primer 5'-CGTTGGTTGAGCTTCTG-3' |
| <i>RunX2</i> | Forward primer 5'-TCCCTGAACTCTGCACCA -3' |
| | Reverse primer 5'-ATGCGCCCTAAATCACGTAG -3' |
| <i>Kollajen1A1 (KOL1)</i> | Forward primer 5'-AAGTCTTCTGCAACATGGAG-3' |
| | Reverse primer 5'-TACTCGAACTGGAATCCATC-3' |
| <i>Osteokalsin (OCN)</i> | Forward primer 5'-CAGCCTTTGTGTCCAAGC-3' |
| | Reverse primer 5'-CACAGTCCGGATTGAGCT-3' |
| <i>Osteopontin (OPN)</i> | Forward primer 5'-GAAGCAGAATCTCCTAGCCC-3' |
| | Reverse primer 5'-ATGTGGTCATGGCTTTCGT-3' |
| <i>Dentin siyalo phosfoprotein (DSSP)</i> | Forward primer 5'-ACATGCTGTTGGGAAGAG-3' |
| | Reverse primer 5'-TACCTTCGTTGCCTTTCC-3' |

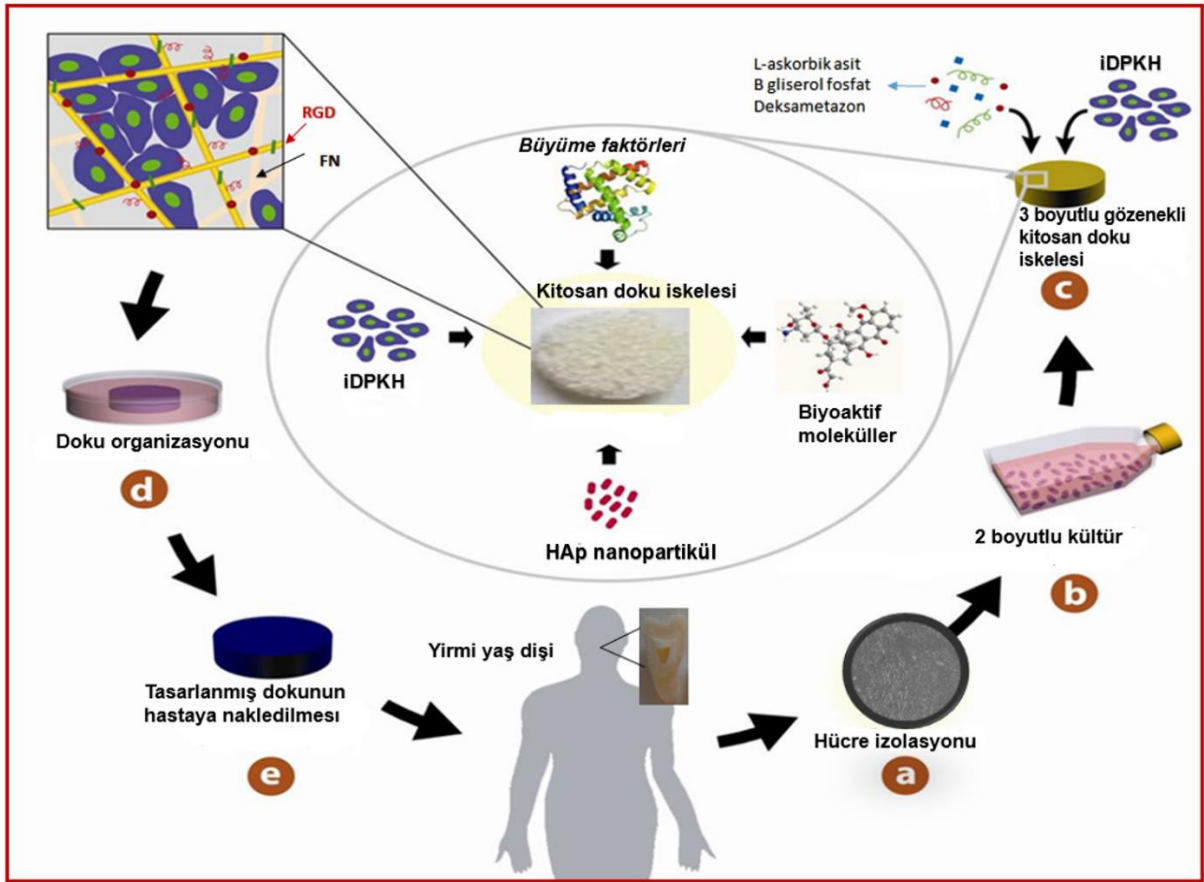
3.8. İstatistiksel Analiz

Çalışma kapsamında elde edilen veriler GraphPad Software InStat programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Veriler üç deney için ortalama \pm standart sapma değerleri ile birlikte sunulmuştur. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için Tek Yönlü ANOVA yöntemi Tukey–Kramer post hoc testiyle birlikte kullanılmış ve p-değerinin 0.05'den az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, sunulan tez kapsamında, yapılan çalışmalardan elde edilen deneysel sonuçlar sunulmuş ve bulgular üzerinde tartışmalar yapılmıştır. Öncelikle, diş doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere dondurarak-kurutma yöntemi ile elde edilen kitosan doku iskelelerinin ve mikrodalga desteği ile üretilen nHAp/kitosan ve B-nHAp/kitosan nanokompozit doku iskelelerinin yapımı ve karakterizasyonu için yapılan çalışmaların sonuçları sunulmuştur.

Çalışmanın ikinci aşamasında, hücre kültür çalışmalarında kullanılacak olan insan diş pulpası kök hücrelerinin (iDPKH) izolasyonu ve karakterizasyonu ile ilgili sonuçlara yer verilmiştir. Karakterizasyon aşamasının ardından iDPKH'leri ile durgun koşullarda *in-vitro* ortamda yürütülen hücre kültür çalışmalarına yer verilmiştir. Tez kapsamında yapılan çalışmalar Şekil 4.1.'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.1. iDPKH'ler ile hedeflenen çalışmaların şematik göstergesi.

4.1. Doku İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

Sunulan tez kapsamında öncelikle kitosan doku iskeleleri ve nHAp/kitosan, B-nHAp/kitosan nanokompozit doku iskeleleri hazırlanmıştır. Bu bölümde doku iskelelerinin hazırlama yöntemi ve karakterizasyon çalışmalarının sonuçlarından bahsedilmiştir.

4.1.1. Kitosan Doku İskelelerinin Üretimi

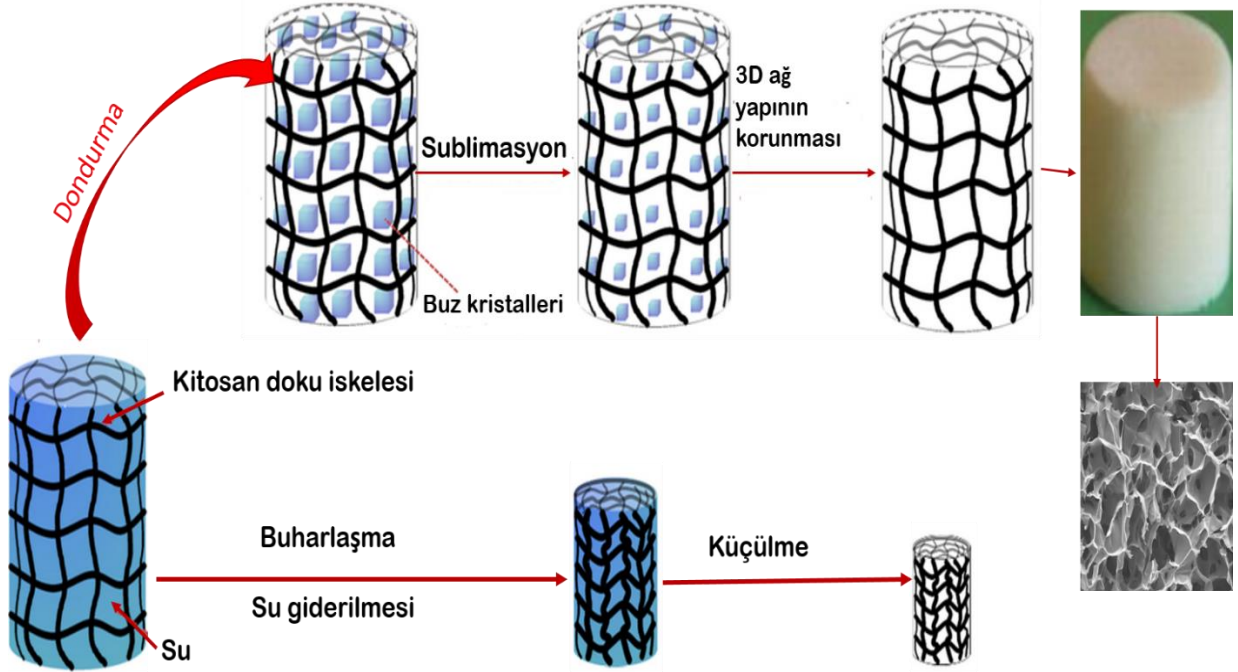
Kitosan; yengeç, karides, istakoz gibi eklem bacaklıların kabuklarında, bazı bakteri ve mantarların hücre duvarlarında bulunan ve kitinin deasetilasyonu ile elde edilen bir polimerdir. Kitosanın molekül ağırlığı 25-2000 kilo Dalton (kDa) arasında değişebilmektedir ve molekül ağırlığına göre düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı kitosan olarak sınıflandırılır. Kitinin deasetillenmesi sonucu deasetilasyon derecesi üretim koşullarına bağlı olarak % 40-100 aralığında değişkenlik göstermektedir.

Kitosan sert ve yumuşak dokulardaki yara iyileşme sürecinde olumlu etkiler göstermektedir. Ayrıca, farklı yöntemlerle üretilerek çeşitli ihtiyaçlara yanıt verebilecek doku iskeleleri üretimi için uygun bir biyomateryaldir. Bu özellikleri ile kitosan doku iskeleleri, periodontal ve kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanım için yüksek potansiyele sahiptir. Çeşitli farmakolojik ajanlar ve biyolojik aracı moleküller için uygun bir taşıyıcı olarak kullanılabilmesi kitosanın bir diğer üstün özelliğidir. Ancak, kitosan doku iskelelerinin, literatürde özellikle rejeneratif periodontal tedavilerde kullanımı konusundaki bilgiler yeterli düzeyde değildir [176]. Kitosanın sahip olduğu özellikler göz önüne alınarak, sunulan tez çalışmasında doku iskelelerinin üretilmesinde %75-85 deasetilasyon derecesine sahip kitosan kullanılmıştır.

Kitosan doku iskeleleri dondurarak-kurutma, gaz köpükleştirme, faz ayırımı ve çözücü dökümü-parçacık uzaklaştırma gibi çeşitli yöntemlerle hazırlanabilmektedir. Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan gözenekli kitosan doku iskeleleri dondurarak-kurutma yöntemi ile hazırlanmıştır.

Dondurarak-kurutma yöntemi ile elde edilen doku iskeleleri, yüksek gözeneklilik, homojen gözenek yapısı, kolay ve ucuz üretim koşulları olması gibi avantajlara ve küçük gözenek çapı gibi dezavantajlara sahiptir. Dondurarak-kurutma yönteminde, dondurma basamağında, hazırlanan kitosan çözeltisi içerisinde oluşmakta olan buz

kristalleri, liyofilizasyon ile uzaklaştırılır ve ardından içsel bağlantılara sahip gözenekli kitosan doku iskelesi elde edilir. Grubumuz tarafından daha önce yapılan bir tez çalışmasında doku iskelelerinin dondurarak-kurutma ile üretim yöntemi belirlenmiştir ve üretim Bölüm 3.2.1’de açıklanan koşullarda gerçekleştirilmiştir [124]. Dondurarak-kurutma yöntemi ile elde edilen kitosan doku iskelelerinin üretim metodunun şematik gösterimi Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4. 2. Dondurarak-kurutma yöntemi ile elde edilen kitosan doku iskelelerinin üretim metodunun şematik gösterimi.

Yang ve ark.[177] yaptıkları çalışmada, dondurarak-kurutma yöntemi ile kitosan/kollajen doku iskelesi üretmişler ve insan kemik morfogenetik protein-7 (BMP-7) geni kodlayan plasmid vektörü taşıyan gözenekli kitosan/kollajen doku iskelelerinin iDPKH'ler için mikroçevre oluşumu üzerine etkisini ve 3-boyutlu doku gelişimini *in-vitro* ve *in-vivo* olarak incelemişlerdir. Kitosan-jelatin kompozitinin iDPKH tutunmasını ve 3-boyutlu gözenekli iskelelerde çoğalmalarını desteklediği belirtilmiştir. Üretilen kompozit doku iskeleleri üzerinde üreyen iDPKH'lerin odontojenik farklılaşma kapasitelerinin ve bu hücrelere özgü olan siyalo fosfoprotein ekspresyonlarının boş doku iskelelerine göre arttığı gözlenmiştir.

4.1.2. nHAp ve B-nHAp Üretimi ve Karakterizasyonu

Hidroksiapatit (HAp) kemiğin temel ve doğal inorganik bileşenidir ve iskeletin yeniden yapılanması için implant malzemesi olarak da kullanılmaktadır. HAp biyoimplant malzemesi olarak tek başına ya da bir nanokompozit parçası olarak ilgi çekmektedir [139]. Son yıllarda birçok çalışmada hidroksiapatit çimentosunun kusursuz biyouygunluğu ve biyoaktifliği kanıtlanmıştır ve bu özelliğinden dolayı bir çok biyotıbbi üründe kaplama şeklinde kullanılarak polimerin yapışmasını ve kemik oluşumunu desteklediği gösterilmiştir.

Osteointegrasyon süreci doku iskelesinin yerleştirildiği bölgedeki hücre ve doku türlerinin ortaklaşa uyumunu ve doku kaybı olan bölgede iyileşmeyi gerektirir. Doku iskelesine uygulanan HAp kaplamalar kemik ve diş dokusu ile benzer özelliklere sahip olmaları nedeniyle doku ile etkileşimini artırmakta ve osteointegrasyonu hızlandırmaktadır.

Zhang ve ark. [178] yaptıkları çalışmada diş macunları ve ağız gargaralarına eklenen biyouyumlu ve biyoaktivitesi yüksek nano-hidroksiapatitin çürük lezyonlarında remineralizasyon potansiyeli olduğunu tespit etmişlerdir. Roveri ve ark. [179] yaptıkları çalışmada sentetik nanohidroksiapatit partiküllerin dişin mine apatit kristal bünyesine; morfolojik, yapısal ve kristalinite açısından benzemesinden dolayı diş hekimliğinde oral bakım ürünlerinde ve implant cerrahisinde kullanılan kemik defektlerinin doldurulmasında biyomateryal olarak kullanılır olduğunu göstermişlerdir. Yine aynı araştırma grubu tarafından yapılan bir diğer çalışmada iDPKH'lerinin, HAp/TCP diskler üzerinde kemik hücrelerine farklılaştıkları gösterilmiştir [180].

Tez kapsamında kullanılan doku iskelerinin nHAp ve B-nHAp ile kaplanması için mikrodalga enerjisinden faydalanarak biyomimetik özellik taşıyan yapay vücut sıvısından (SBF) çöktürme yöntemi uygulanmıştır.

İnsan kan plazması taklit edilerek hazırlanan eşit miktarda iyon konsantrasyonuna sahip, süper doygun yarı kararlı sulu çözeltiler SBF olarak adlandırılmıştır. SBF'ler, uygun polimerik malzemelerin yüzeylerinde HAp mineralini "biyomimetik" olarak oluşturma yeteneğine sahiptirler. Yapay vücut sıvısının doygunluk düzeyine bağlı

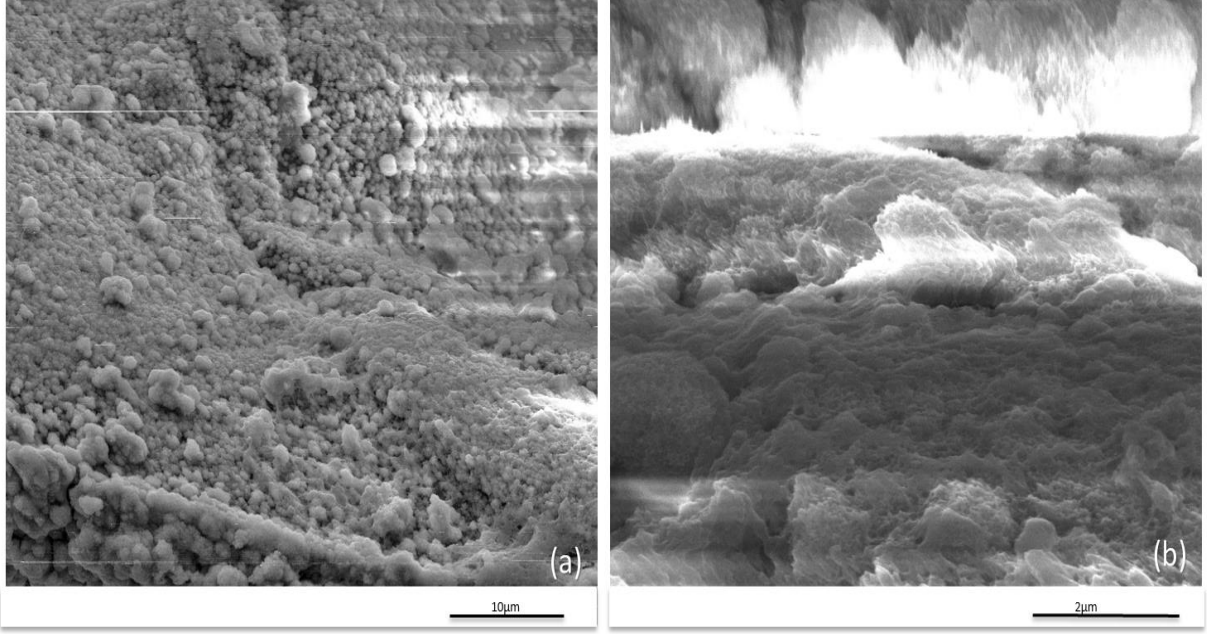
olarak kalsiyum fosfat (Ca/P) çekirdeklenme ve çökme süresi değişiklik göstermektedir [181].

Literatüre ek olarak, grubumuzda yapılan çalışmalar ışığında, sunulan tez çalışmasında insan kan plazmasına göre daha yüksek doygunluk derecesine sahip ve daha fazla kalsiyum ve fosfat konsantrasyonu içeren 10xSBF benzeri çözeltinin kullanılması kararlaştırılmıştır. 10xSBF insan kan plazmasındaki kalsiyum ve fosfat iyon derişimlerinin 10 katına sahiptir ve böylece Ca/P çekirdeklenmesi daha hızlı gerçekleşmektedir. 10xSBF çözeltisinin bileşimi Bölüm 3.2.2'de verilmiştir ve Maviş ve ark. [172] tarafından belirlenen reçeteye göre hazırlanmıştır.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, 10xSBF'nin doygunluk derecesine bağlı olarak 2-6 sa sürede gerçekleşen çökme işlemi, mikrodalga ile dışarıdan verilen enerjinin etkisi ile saatler mertebesinde dakikalara düşürülmüştür.

HAp sentezi için uygulanacak mikrodalga koşulları grubumuz tarafından daha önce yapılan çalışmalarla belirlenmiştir [173]. Mikrodalga enerjisinin SBF içerisindeki iyonlar ile etkileşimi sonucu nHAp üretimi sırasında istenmeyen fazlar oluşmaz ve hızlı, kolay ve etkin bir biçimde yüksek miktarlarda biyouyumlu kemik benzeri hidroksiapatitin daha kısa bir zaman içerisinde elde edilmesi sağlanır [173]. SEM görüntüleri (Şekil 4.3), nHAp çöktürme sırasında ara fazların oluşmadığını ve fazla tuz kristallerinin yıkamalar sırasında ortamdan uzaklaştığını göstermektedir. Şekil 4.3a'da görüldüğü gibi nHAp nanopartikülleri mükemmel yapıda homojen olarak bir araya gelerek kümeler oluşturmuşlardır ve yapıları arasında morfolojik farklılıklar bulunmaktadır.

Hidroksiapatit nanopartikülleri kemik/diş oluşumu ve yenilenmesi için önemlidir ve bu özelliğinin desteklenmesi için HAp kafesindeki $[Ca]^{2+}$, $[PO_4]^{3-}$ veya $[OH]^-$ iyonları birçok değişik anyon ve katyon ile yer değiştirilebilmektedir.



Şekil 4. 3. Mikrodalga desteği ile üretilen nHAp örneklerine ait SEM görüntüleri: (a) 5,000X, (b) 30,000X.

Bor (B) bitkiler için gerekli bir elementtir ve insan metabolizmasındaki rolü ve etki mekanizması iyi anlaşılmış değildir. Yapılan çalışmalarda borun sıçanlarda optimal sağlık için gerekli olduğu ve aynı zamanda embriyogenez, kemik büyümesi ve bağışıklık sistemi fonksiyonları için hayati bir önemi olduğu gösterilmiştir [182, 183]. Diğer taraftan borun osteoindüktif etkilere sahip olduğu ve kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını desteklediği bilinmektedir [184].

Taşlı ve ark.[185] tarafından yapılan çalışmada sodyum pentaborat pentahidrat (NaB) ile muamele edilen insan diş germ kaynaklı MKH'lerinin (iDGKH), osteojenik ve odontojenik gen ve protein ekspresyonlarının diğer gruplarla karşılaştırıldığında arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, NaB (20 µg/mL) ile muamele edilen iDGK hücrelerinin ALP aktivitesi ve KOL1A, dentin siyalofosfoprotein (DSPP) ve DMP-1 odontojenik gen ekspresyonlarının yükseltildiği ve hücre dışı matris mineralizasyonundan sorumlu kalsiyum birikiminin artırıldığı belirtilmiştir.

Akman ve ark. [176] tarafından yapılan çalışmada, ilk olarak dondurarak- kurutma yöntemiyle % 2 ve 3 (wt/v) kitosan jel kullanarak, HAp partiküllerinin varlığında ya da yokluğunda doku iskeleleri hazırlanmıştır. Daha sonra kitosan-HAp iskeleler

periodontal doku mühendisliği uygulamaları için bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ile desteklenmiştir. Hücre kültür çalışmaları sementoblastlar ve periodontal ligament (PL) hücreleri ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar bFGF yüklü kitosan-HAp iskelelerin hücre çoğalması ve mineralizasyonunu destekleyen uygun bir üç boyutlu iskele olduğunu göstermiştir.

Nakamura ve ark. [186] ise bir ultrasonik püskürtme piroliz (USSP) tekniği ile Ca / (P + B) ve bor katkılı HAp sentezlemişler ve hazırlanan biyomalzemenin kanser tedavisinde kullanabileceğini belirtmişlerdir.

Sunulan tez kapsamında bor katkılı nHAp üretiminde, nHAp üretiminde olduğu gibi mikrodalga enerjisi ile biyomimetik olarak 10xSBF'den çöktürme yöntemi kullanılmıştır. Mikrodalga desteği ile üretilen nHAp ve B-nHAp örneklerinin karakterizasyonları grubumuzca daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda yapılmıştır [173, 174].

Tez kapsamında üretilen B-nHAp'ın yapısındaki B, Ca ve P, nHAp'ın yapısındaki Ca ve P oranları endüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) ile incelenmiştir ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda B-nHAp kaplı her doku iskelesinin yaklaşık 20 µg bor içerdiği hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1'de tez çalışmasında kullanılan nHAp ve B-nHAp yapısında bulunan bileşenlerin mine, dentin ve kemikteki oranlarla karşılaştırılmasına ait veriler belirtilmiştir. Doğal dişin ağırlıkça %35.1'i Ca iyonundan, %16.9'si ise P iyonundan oluşmaktadır ve Ca/P molar oranı yaklaşık 1.61 civarındadır [187]. Karşılaştırma yapıldığında, mikrodalga ile üretilen nanohidroksiapatit yapısının Ca/P molar oranı açısından diş yapısı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge4.1).

B-nHAp nanokompozitin yapısında bulunan karbonat içeriğinin diğer örneklerden düşük olmasının nedeni, bor ilave edildiğinde, kısmi olarak fosfat ve hidroksil gruplarının ortamda bulunan BO_3^{3-} iyonları ile yer değiştirmesi ve yeni kalsiyum bor katkılı HAp $Ca_{10}\{(PO_4)_{6-x}(BO_3)\}_x\{(BO_3)_y(BO_2)_z(OH)_{2-3y-z}\}$ yapısı oluşturmasıdır [188].

Çizelge 4. 1. Dentin, mine, kemik, nHAp ve B-nHAp örneklerinde bulunan bileşenlerin oranları.

| Bileşenler | Ca (%) (w/w) | P (%) (w/w) | B (%) (w/w) | CO₃²⁻ (%) (w/w) | Ca/P (Molar oran) |
|-------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|--|------------------------------|
| Mine | 36.5 | 17.7 | - | 3.5 | 1.63 |
| Dentin | 35.1 | 16.9 | - | 5.6 | 1.61 |
| Kemik | 34.8 | 15.2 | - | 7.4 | 1.71 |
| nHAp | 31.50±0.4 | 15.10±0.30 | - | 7.15±0.28 | 1.61 |
| B-nHAp | 28.10±0.3 | 15.55±0.40 | 1.15±0.10 | 4.30±0.10 | 1.40 |

4.1.3. Nanokompozit Doku İskelelerinin Üretimi

Tez kapsamında sentezlenen kitosan doku iskelelerinin sınırlı biyoaktivitelerini artırmak için doğal kemik, dentin ve diş minesi dokusunun inorganik yapısını oluşturan kalsiyum fosfat esaslı biyoaktif hidroksiapatit ile nanokompozit oluşturma yöntemi kullanılmıştır. Nano-HAp insanın kemik ve diş gibi sert dokularının inorganik bir bileşenidir ve bu nedenle doku mühendisliğinde ideal bir nanomalzeme olduğu kabul edilmiştir.

Hidroksiapatitin, gözenekli kitosan yapısı içerisine katılması doku iskelesinin yüzeyinin pürüzlü olmasına ve alan/hacim oranının artışına neden olmakta ve böylece biyoaktivitenin artışını sağlamaktadır [189]. Doğal kemik ve diş dokusu ile nHAp'ın yapısı arasındaki benzerlik nHAp/kitosan kompozitlerinin geliştirilmesini sağlamıştır ve bu konuda çeşitli çalışmalar yapılmıştır [173, 189].

SBF kullanılarak yapılan biyomimetik kaplama yöntemi, iyon destekli çökeltme ve plazma spreyi gibi diğer yöntemlere kıyasla özel ekipmanlar ya da yüksek işlem sıcaklıklarına ihtiyacının olmaması gibi pekçok üstünlüğe sahiptir. HAp/kitosan kompozitleri çoğunlukla polimer çözeltisi içerisine HAp tozlarının karıştırılması, doku iskele üretimi sırasında nHAp kristallerinin oluşturulması ya da HAp ile kaplama şeklinde üretilmektedir [190].

Kitosan doku iskelesinin, polikasyonik yapısında bulunan amino grupları bağlanmamış 2 elektronu ile pozitif yük taşıyan merkezler için çekirdeklenme noktası pozisyonundadır ve mineral birikimi çekirdeklenme mekanizması ile gerçekleşmektedir. Hidroksil (OH⁻) grubu kalsiyumu bağlayarak ve katyonik amin grubu fosfat iyonunun

adsorbsiyonunu sağlayarak, mineralizasyon için çekirdeklenme başlatmaktadır. Ayrıca kitosan doku iskelesinin hidrofilik yapısı da apatit oluşumuna yardımcı olmaktadır.

Doku iskelelerin kaplanması için kullanılan yapay vücut sıvısından homojen apatit çekirdeklenmesi elde etmek için gerekli enerji bariyeri çok yüksektir ve heterojen şekilde çekirdeklenme için tetikleyecek bir uyarı gereklidir. Bu nedenle SBF ile yapılan kaplama çalışmalarının çoğunda kaplamanın etkinliğinin artırılması için tetraetil ortosilikat (TEOS) gibi çekirdeklendirici ajanlar kullanılarak ek işlemler gerçekleştirilmektedir.

Kaplama miktarını artırmak için yapılan bir çalışmada nHAp/kitosan nanokompozit iskele hazırlanmış ve eklenen nanokristaller çekirdeklenme bölgeleri olarak kullanılmıştır. HAp eklenen nanokompozit doku iskelede boş kitosan doku iskeleye göre daha fazla kaplama oluşturulmuştur [191].

Mikrodalga enerjisi kitosan doku iskelesi yapısında ve yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupları (OH^- ve NH_2^+) uyararak dielektrik ısınmaya neden olmakta, bu gruplar üzerinden kalsiyum ve fosfat iyonlarının bağlanmasını sağlamaktadır. Hidroksil grubu, amin grubu ile karşılaştırıldığında hidroksil grubu daha polar olduğu için hidroksil grubunun bulunduğu bölgede çekirdeklenmenin daha fazla olacağı düşünülmektedir.

Kitosan mikrodalga kaynaklı yüksek enerjiyi depolayamayacağından, bu enerji hızla SBF içerisindeki komşu molekül olan su ve iyonlara aktarılmakta ve bu enerji aktarımı da çekirdeklenmeyi uyarmaktadır.

Kullanılan yöntem ile mikrodalga'nın reaksiyon için gerekli Gibbs serbest enerjisini düşürmesi, SBF içerisinde ve kitosanın aktive olmuş bölgelerinde çekirdeklenmeyi artırması sağlanmıştır. Bu sayede kitosan doku iskelesinin nHAp ile kaplama süresi kısaltılmıştır. Sonuç olarak mikrodalga enerjisi ile kısa bir sürede etkin bir şekilde nanohidroksiapatit ya da bor katkılı nanohidroksiapatit kaplama elde etmek mümkündür. Bu yöntemde kaplama doku iskelesinin hem üst yüzeyine ve hem gözeneklerin iç bölgelerine de homojen bir şekilde dağılmaktadır [173].

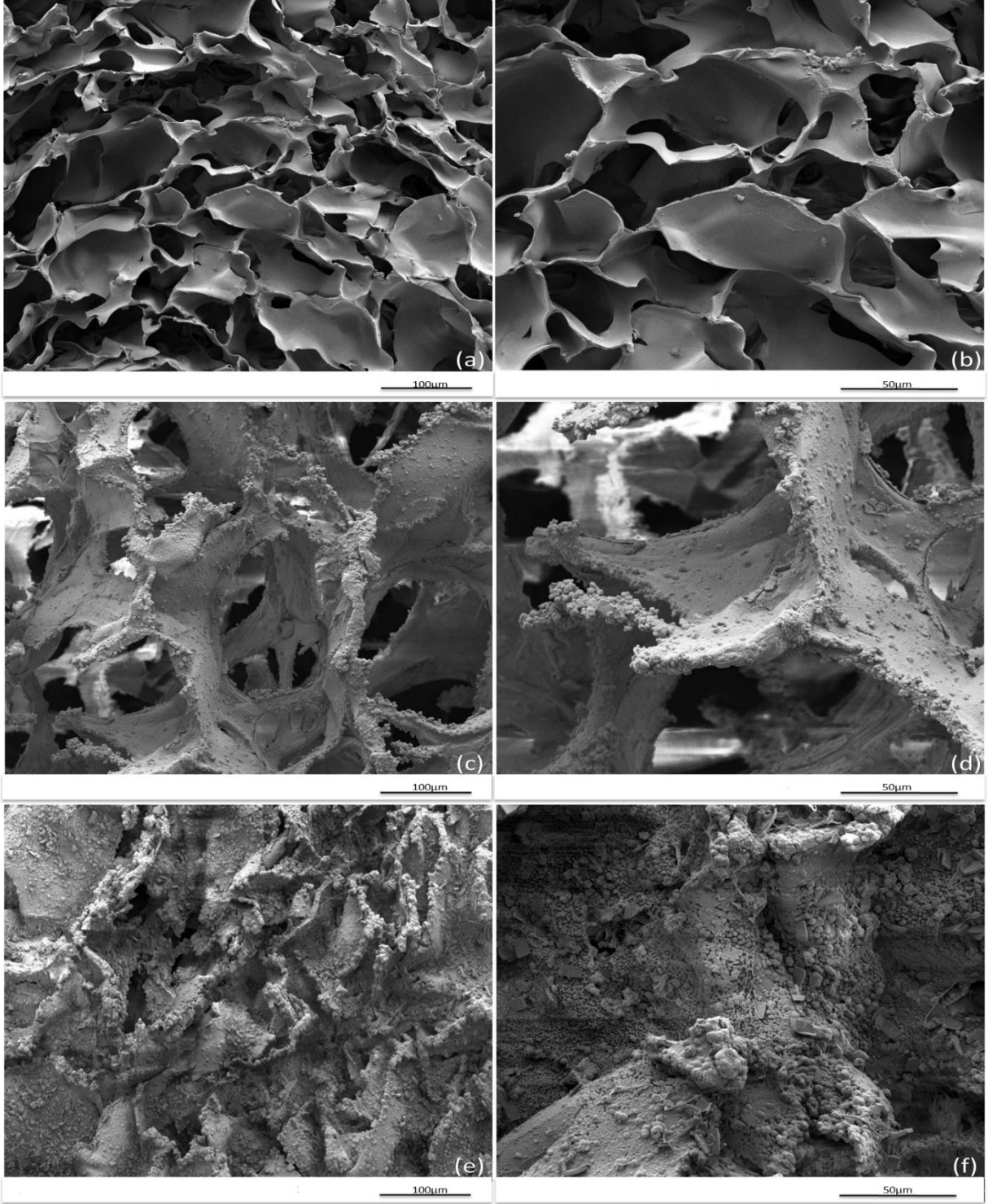
Nielsen ve ark. [192] yaptıkları çalışmada diyetlerinde dokuz hafta boyunca bordan (borik asit) yoksun diyetle beslenen ve bor eklenmiş (3 mg/kg) diyetle beslenen fareleri karşılaştırdıklarında kemik hacminde belirgin bir azalma olduğunu rapor etmişlerdir [192]. Yine aynı araştırma grubu tarafından yapılan bir diğer çalışmada [193] bor beslenme miktarlarının, kemikteki kalsiyum ve fosfor miktarını belirgin şekilde etkilemediği fakat osteoblast ve osteoklast aktivitesini, farklılaşma ve kemik formasyonunu etkilediği bildirilmiştir.

Odontogenez ve osteogenezde önemli bir rol oynayan bor konusunda literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Grubumuz tarafından daha önce belirlenen ve sunulan tez çalışmasında Bölüm 3.2.2'de bahsedilen koşullarda nHAp'in osteokondüktif ve borun osteoindüktif etkileri birleştirilerek biyomimetik yöntemle kitosan doku iskeleleri kaplanmış ve bor katkılı nanokompozit doku iskeleleri (B-nHAp/kitosan) üretilmiştir [174].

4.1.4. nHAp/kitosan ve B-nHAp/kitosan Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

Hücre kültür çalışmaları için hazırlanan nanokompozit doku iskeleleri 2 mm kalınlığa ve 9 mm çapa sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Şekil 4.4'te kullanılan doku iskelelerine ait SEM görüntüleri verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde (Şekil 4.4a ve b) üretilen kitosan doku iskelelerinin içsel bağlantılara sahip gözenekli yapıda olduğu belirlenmiştir. Doku iskelesinde oluşturulan gözenekler sayesinde hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin besi ortamından daha etkin bir şekilde yararlanması ve besin/atık maddelerinin difüzyonunun artması sağlanarak hücrelerin doku iskelesi yüzeyine tutunması desteklenmektedir. Ayrıca hem nHAp/kitosan (Şekil 4.4c ve d), hem de B-nHAp/kitosan (Şekil 4.4 e ve f) doku iskelelerinin yüzeyinin çap ve kalınlık boyunca oldukça homojen bir şekilde tamamen apatit ile kaplandığı belirlenmiştir. Yapılan nHAp kaplama sayesinde üretilen kitosan doku iskelelerinin gözeneklerinin korunması sağlamakta ve gözenek kararlılığı arttırılmaktadır.



Şekil 4. 4. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan doku iskelelerinin SEM görüntüleri: (a) Kitosan 100X, (b) Kitosan 500X, (c) nHAp/kitosan 250X , (d) nHAp/kitosan 500X, (e) B-nHAp/kitosan 250X, (f) B-HAp/kitosan 500X.

Hazırlanan doku iskelelerinin gözeneklilik değerleri Çizelge 4.2’de belirtilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde kitosan doku iskelelerinin en büyük gözenek boyutuna sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca B-nHAp/kitosan iskele, nHAp/kitosan ile karşılaştırıldığında daha fazla gözenekliliğe sahip olduğu görülmüştür. İki nanokompozitin gözeneklilik farkının, B-nHAp/kitosan doku iskelesinin kaplamadaki apatitin daha küçük kristallerden oluşmasından dolayı olabileceği düşünülmektedir. Böylece doku iskelesinde gözenekler daha az miktarda kapanmış ve gözeneklilik daha az etkilenmiştir.

İskelelerin denge şişme oranları incelendiğinde, 40-50 nm boyutunda kristallere sahip nHAp/kitosan doku iskelesinin şişme oranının kitosan doku iskelesine benzer olduğu ancak 20-30 nm boyutunda kristallere sahip B-nHAp/kitosan doku iskelesinin şişme oranının kitosan doku iskelesine göre yaklaşık olarak %20 daha az olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Denge şişme oranının azalmasında, nHAp kristallerine göre daha küçük çaplarda oluşan bor katkılı hidroksiapatit kristalleriyle, kitosan doku iskelesinde daha homojen ve sıkı bir kaplama yapılabilmesinin etkisi olduğu düşünülmüştür. Doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmalarının sonuçları sentezlenen iskelelerin diş doku mühendisliği açısından uygun olduğunu göstermektedir [174].

Çizelge 4. 2. Doku iskelelerinin yüzde gözeneklilik ve şişme değerleri.

| Doku İskelesi | Gözeneklilik (%) | Denge Şişme Oranı |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------|
| Kitosan | 89.50±1.03 | 34.90±1.90 |
| nHAp/kitosan | 81.90±0.76 | 33.19±1.73 |
| B-nHAp/kitosan | 85.70±2.57 | 28.91±1.41 |

4.2. Hücre Kültür Çalışmaları

Sunulan tez çalışmasında, mezenkimal kök hücre olarak seçilen iDPKH’lerin izolasyonu yapılmış ve bu hücrelerin karakterizasyonları tamamlanmıştır. Tez kapsamında sentezlenen kitosan, nHAp/kitosan ve B-nHAp/kitosan doku iskelesi sisteminin diş doku mühendisliğinde kullanım potansiyelinin araştırılması amacıyla iDPKH’leri kullanılarak *in-vitro* koşullarda 21 gün boyunca hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

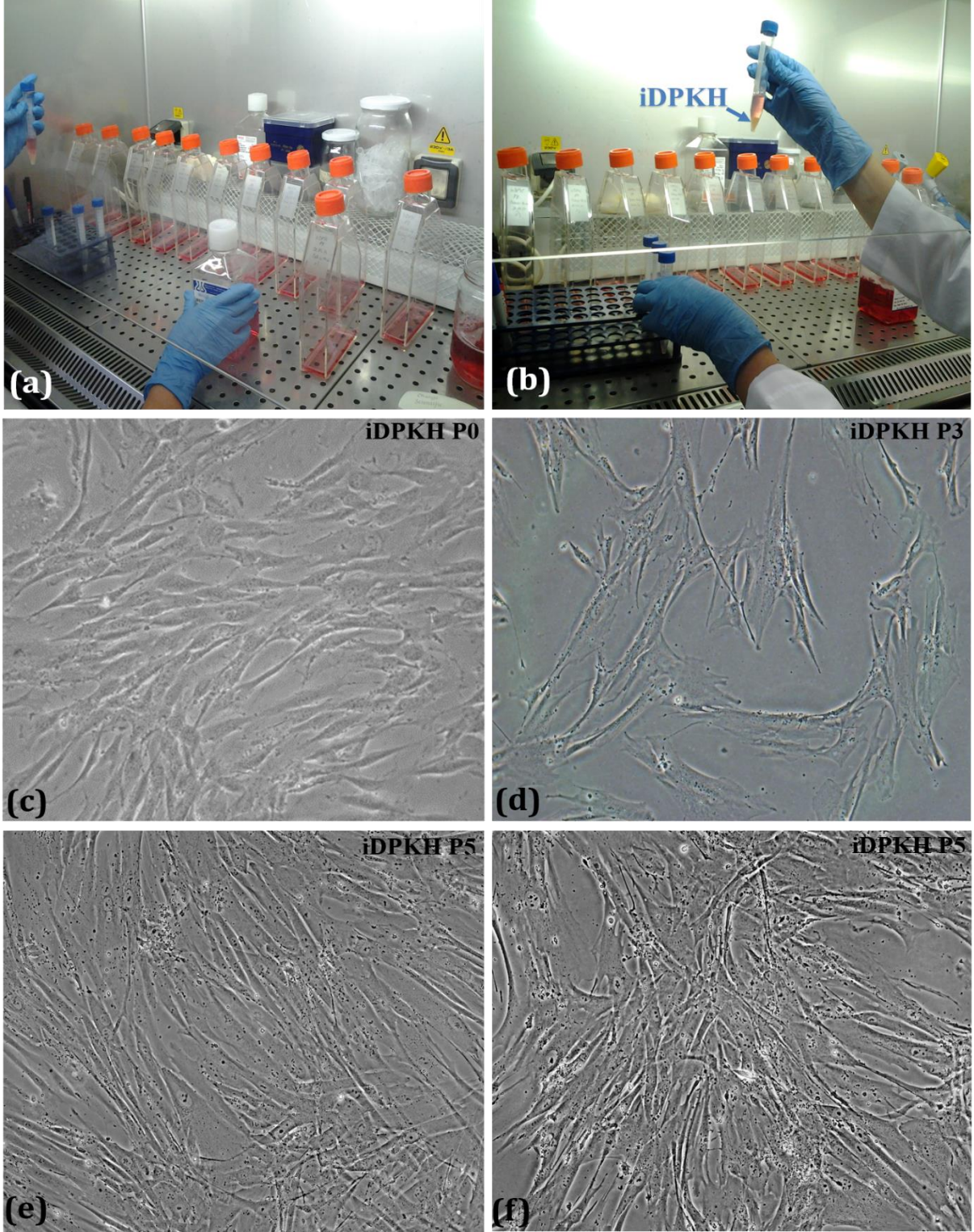
Kültür süresince yapılan analizler ile mezenkimal hücrelerin hazırlanan doku iskeleleri üzerindeki canlılıkları, morfolojileri ve odontoblastik farklılaşmaları incelenmiştir. Bor katkılı nanohidroksiapatit kaplı kitosan doku iskelenin kök hücre farklılaşmasına etkisi diğer iskeleler ile karşılaştırılarak incelenmiştir.

4.2.1. iDPKH İzolasyonu

Çalışma kapsamında kullanılacak olan diş pulpası kökenli mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ve karakterizasyonu şimdiye kadar yapılan açıklamaların ışığında gerçekleştirilmiştir. 20 yaş gömülü dişlerin orta kısmındaki pulpa dokusundan izole edilen iDPKH'ler Lonza firmasından satın alınan flasklarda kültüre edilmiş ve kök hücrelerin seçici olarak plastik yüzeylere yapışması, yayılması ve çoğalması özelliğinden yararlanılmıştır. Böylece, mezenkimal kök hücreler yüzeye tutunma özellikleri ile süspansiyon olarak üreyen hematopoetik kök hücrelerden ayrılmıştır. Plastik kültür kaplarının yüzeyine bağımlı olmayan hematopoietik hücreler, besi ortamının alınmasıyla ortamdaki uzaklaştırılmıştır. iDPKH'ler %80-90 oranında kültür kabını kapladıklarında pasajlanmış ya da çalışma için belirlenen sayıda olacak şekilde 1/3 veya 1/2 oranında uygun ortamda süspansiyon edilmiştir. 1/3 pasaj oranında yaklaşık olarak 3 gün içerisinde yüzeyi kapladıkları gözlenmiştir. Şekil 4.5'te gösterilen optik mikroskop görüntülerinde hücrelerin kültür kabının yüzeyine tutunup yayıldıkları ve fibroblast benzeri iğsi bir morfoloji sergiledikleri belirlenmiştir. iDPKH'ler pasaj 0'da (P0) iğsi ve mekik yapı sergilerken pasaj oranı ilerledikçe hücreler ince iğsi şeklinde daha fazla yayılmıştır (Şekil 4.5c,d).

iDPKH kültüründe morfolojik açıdan heterojen yapı gözlenmiş, biri iğsi diğeri ise daha küresel şekilde olmak üzere iki farklı morfolojide hücre ayırt edilmiştir. iDPKH'lerin primer kültürüne ait morfolojik bulgularımızda saptadığımız iki farklı hücre tipinin Aanismaa ve ark.[194] tarafından gömülü üçüncü büyük azı dişi pulpasından izole edilen hücreler ile benzer özellikler gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda pasaj 0'a (P0) ait bu bulgumuz Carinci ve ark.[195] tarafından yapılan çalışmayı desteklemektedir. iDPKH'lerin subkültürleri yapıldıkça heterojen yapı homojen hale gelmiş ve hücrelerin kültür süresi ilerledikçe tipik morfolojisi sergilemeye başladığı görülmüştür. Kök hücrelerin çoğalması ve idamesi için kullandığımız besi ortamının

ortamda bulunan farklı hücrelerin kültür kaplarının yüzeyine tutunmalarını engelleyerek değişkenliği azaltıp kök hücreleri daha homojen hale getirdiği düşünölmüştür. Şekil 4.5'te izole edilen iDPKH'lerin optik mikroskop fotoğraflarına yer verilmiştir.



Şekil 4. 5. İzole edilen iDPKH'lerin flasklarda kültüre edilmesi (a) ve besi ortamından kök hücrelerin toplanması (b), kök hücrelerin optik mikroskop görüntüleri; (c) iDPKH P0 20X, (d) iDPKH P3 20X, (e) iDPKH P5 20X, (f) iDPKH P5 20X.

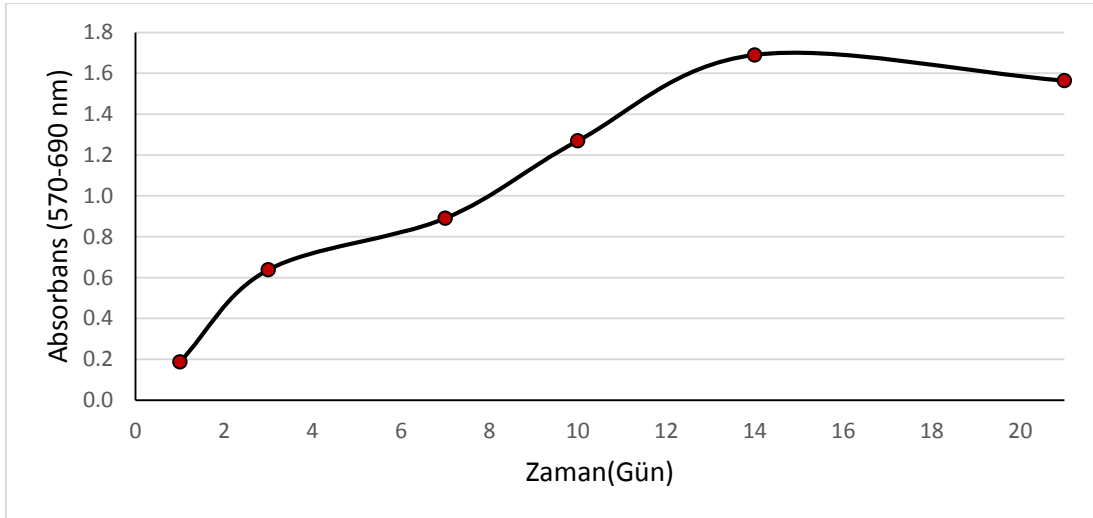
4.2.2. iDPKH'lerin Karakterizasyonu

20 yaş gömülü dişlerinden izole edilen mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon çalışmaları pasaj 5'te gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla,

- MTT analizi ile hücrelerin kültür kaplarındaki üreme davranışları,
- F-aktin/DAPI ve kristal viyole boyamaları ile hücrelerin morfolojileri ve iskelet organizasyonu,
- ALP-von Kossa boyamaları ile hücrelerin osteojenik farklılaşması,
- Oil Red O boyaması ile yağ farklılaşması,
- Safranin O/ Fast Green boyaları ile kıkırdak farklılaşması ve
- Akış sitometrisi analizi ile iDPKH'lere özgü fenotipik karakterleri belirlenmiştir.

4.2.2.1. MTT Analizi

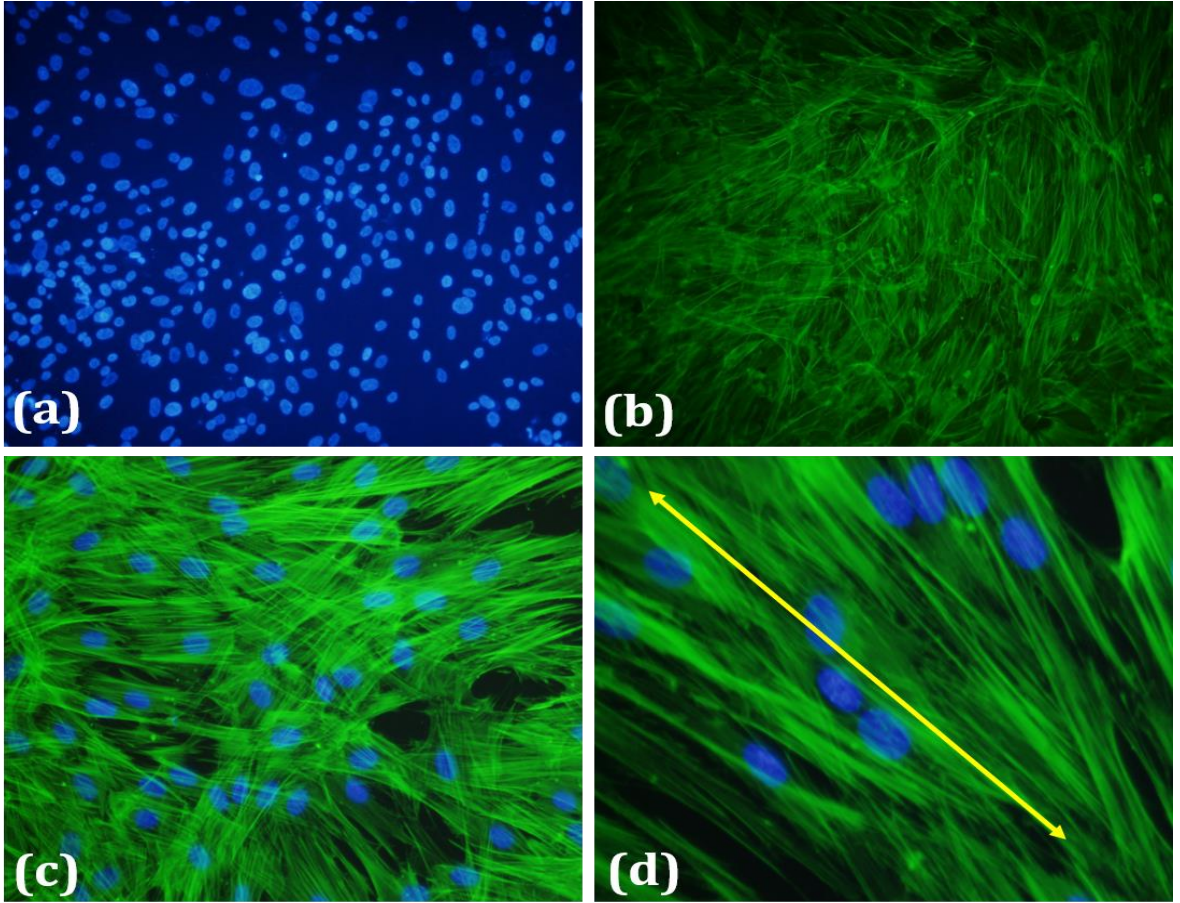
20 yaş gömülü dişlerin diş pulpasından izole edilen mezenkimal kök hücrelerin kültür kaplarında proliferasyonu ve metabolik aktiviteleri 21 gün boyunca MTT analizi ile takip edilmiştir. Şekil 4.6'te iDPKH'lerin 21 gün boyunca büyüme eğrisi gösterilmiştir. iDPKH'lerin ikilenme süresi 33 sa olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 6. iDPKH'lerin büyüme eğrisi.

4.2.2.2. F-aktin/DAPI Boyaması

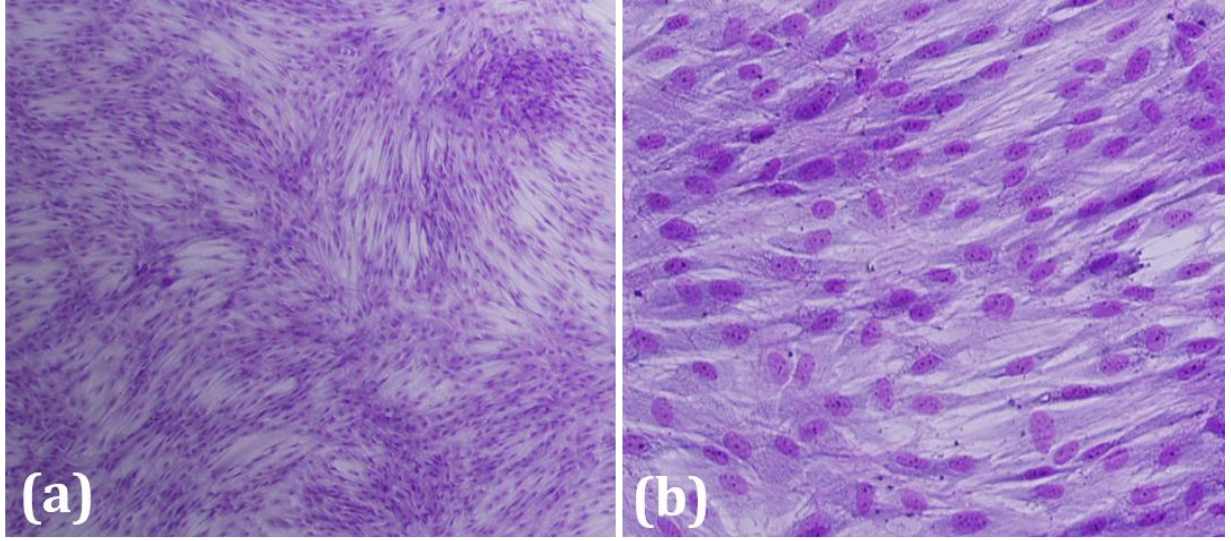
Hücre morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla, immunositolojik analizler yapılmıştır. Aktin filamentler, hücre yüzey şeklinin oluşumunda görev alan hücre iskeletindeki önemli yapılardır. Bu boyama tekniğinde kullanılan Alexa Fluor 488 Phalloidin, plazma zarı ilişkili F-aktin (yeşil) işaretleyicidir ve floresan mikroskobu altında hücre iskeletinin yeşil renkte görünmesine neden olmaktadır. Çekirdek boyaması olan DAPI hücrelerin çekirdeklerinin görünür hale gelmesi için bir ajandır ve hücre çekirdeklerinin, floresan mikroskop altında mavi renkte görünmesini sağlar. iDPKH'lere yapılan ikili boyama sonucunda çekilen floresan mikroskobu fotoğrafları Şekil 4.7'da görülmektedir (Şekil 4.7c ve d). Hücreler içsi bir görünüm sergilemiş ve tipik fibroblastik morfoloji gözlenmiştir (Şekil 4.7d). Ayrıca, bütün hücrelerin çekirdek bütünlüklerini korudukları da görülmüştür (Şekil 4.7a).



Şekil 4. 7. iDPKH'lere ait F-aktin/DAPI boyamaları (a) DAPI 20X (b) F-aktin 20X, çakışık görüntüler (c)20X, (d)20X. Ok hücrelerin yönelmelerine işaret etmektedir.

4.2.2.3. Kristal Viyole Boyaması

Çalışma kapsamında F-aktin/DAPI boyamalarına ek olarak hücre morfolojisinin belirlenmesi için kristal viyole boyamaları da gerçekleştirilmiştir. Kristal viyole boyamasında hücre iskeletleri açık mora, hücre çekirdekleri ise koyu mora boyanmıştır. Görüntüler optik mikroskop kullanılarak alınmıştır. Şekil 4.8'de de görüldüğü gibi iDPKH'ler fibroblastik morfoloji sergilemişlerdir. Böylece, kristal viyole boyamasının F-aktin/DAPI ile boyanmış hücre fotoğraflarını doğrular nitelikte olduğu görülmüştür.



Şekil 4. 8. Kristal viyole ile boyanmış iDPKH'lerin optik mikroskop görüntüleri (a) 10X, (b) 20X.

4.2.2.4. Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği'nin Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi tarafından belirlenen insan MKH'lerine ait minimal kriterlere göre mezenkimal kök hücrelerin sahip olması gereken 3 temel özellik bulunmaktadır:

1. Standart kültür ortamında plastik yüzeylere tutunabilme,
2. Uygun yüzey antijenlerinin ifadesi (CD73, CD90, ve CD105),
3. Multipotent (osteoblast, yağ hücresi ve kondroblast) farklılaşma yeteneği [196].

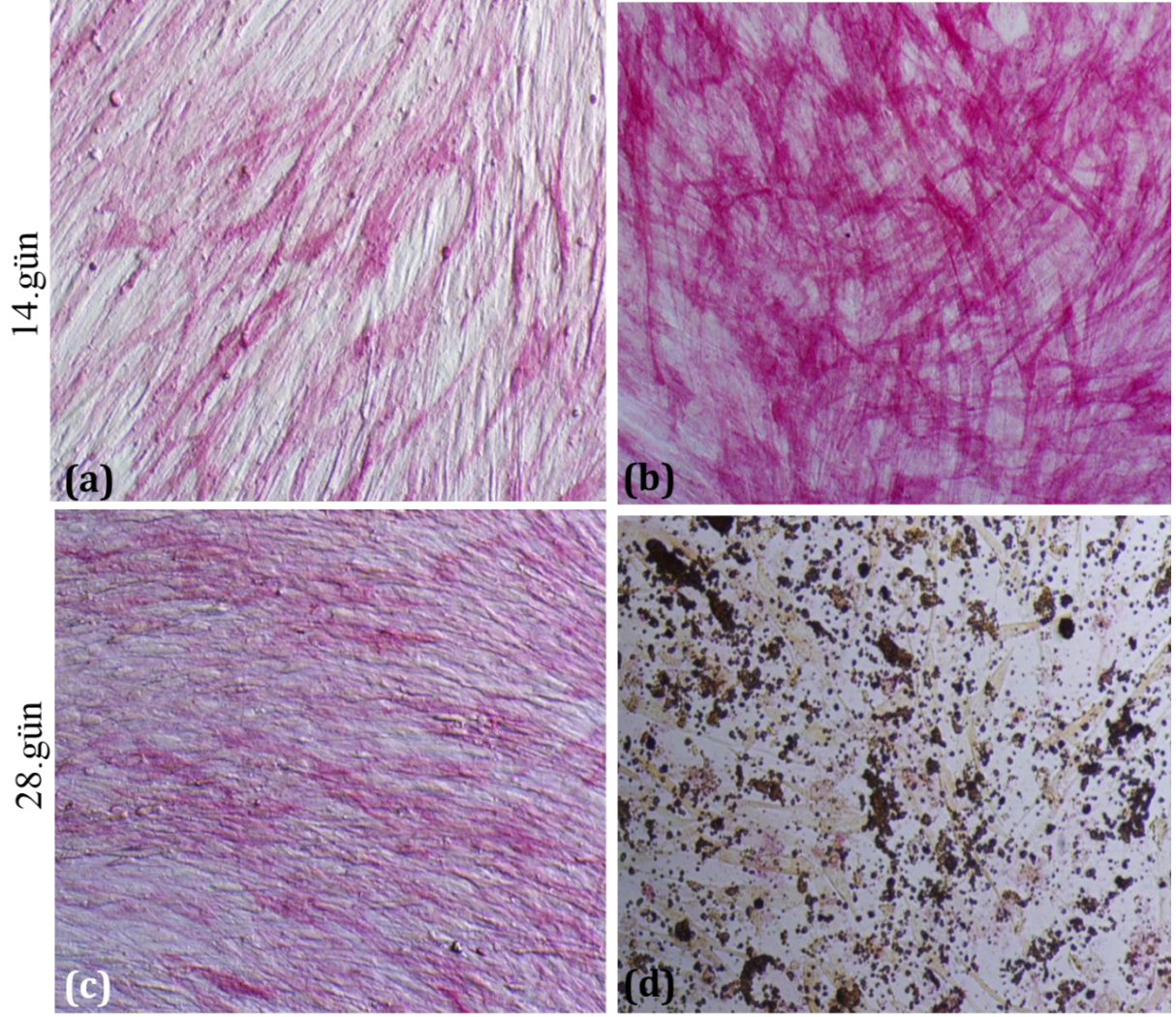
Diş pulpasından izole edilen MKH'ler adipojenik, osteojenik ve kondrojenik ortamlarda kültüre edilmiş ve çeşitli boyamalar ile bu hücrelerin farklılaşma potansiyelleri ortaya koyulmuştur.

Osteojenik Farklılaşma

Durgun koşullar altında, osteojenik indüksiyona yol açan, askorbik asit, β -gliserol fosfat ve dekzametazon yardımıyla, hücreler uyarılmıştır. Osteojenik farklılaşmanın gösterilmesi amacıyla yapılan ALP-von Kossa boyamasında kırmızımsı alanlar ALP enzim aktivitesini, kahverengi alanlar ise mineralize bölgeleri göstermektedir. Kültürün ilk haftasından sonra ilerleyen günlerinde, kalsiyum birikimine özel olarak nodül benzeri yapılar oluşmaya başlamış ve oluşan nodüllerin miktarı zaman ilerledikçe artış göstermiştir. Kök hücrelerin osteojenik farklılaşma yeteneğinin diğer belirteçlerinden biri de matris mineralizasyonudur. Matris mineralizasyonunu tespit etmek için kullanılan boyalar, hücre içi mineralize kristallere bağlanır ve hücreler tarafından oluşturulan kalsiyum fosfat yapılarının varlığını ortaya koyar.

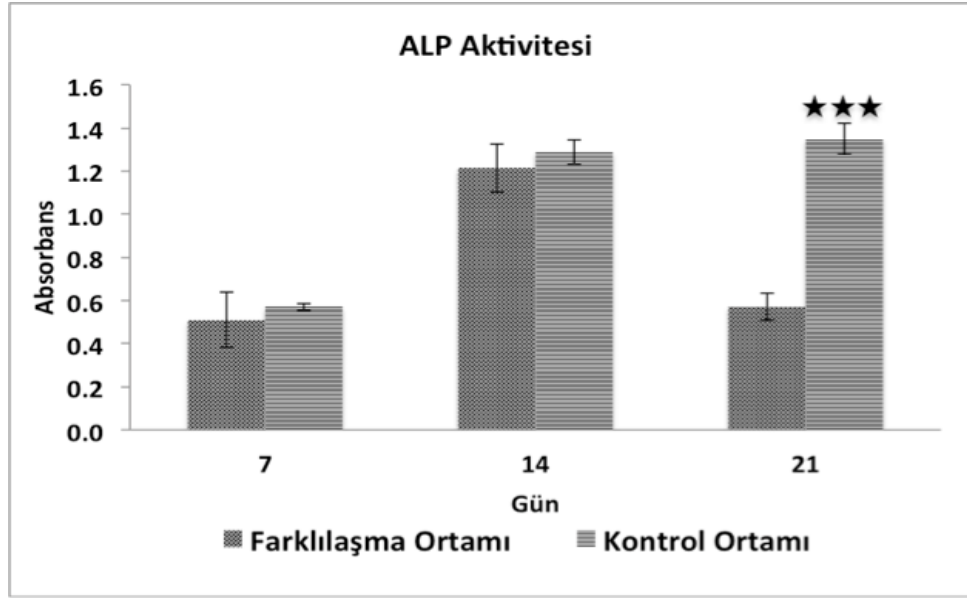
iDPKH'lerin matris mineralizasyonunu belirlemek için kültürün 14. ve 28. günlerinde ALP-von Kossa (ALP-VK) boyamaları yapılmış, boyamalar optik mikroskop altında görüntülenmiş ve sonuçlar Şekil 4.9'de sunulmuştur. Hücrelerin osteojenik farklılaşma özellikleri incelediğinde 14. günde farklılaşma grubunda ALP aktivitesi yüksek iken (Şekil 4.9b) 28. günde ALP aktivitesi beklendiği gibi kontrol grubuna göre azalmıştır (Şekil 4.9d). ALP aktivitesi, kemik farklılaşmasının erken bir göstergesi olduğu için, kültürün başında daha yüksek olması, ilerleyen günlerde ise azalması ve kalsiyum birikimlerinin ortaya çıkması beklenilmektedir [197].

Kontrol grubunda iDPKH'lerin boyanma sonrası (Şekil 4.9b) mineralizasyonunu işaret eden herhangi bir boyanma görülmezken, osteojenik farklılaşma ortamı varlığında, hücreler arasında nodüller ve siyah-kahverengi mineralizasyon bölgeleri tespit edilmiştir (Şekil 4.9d).



Şekil 4. 9. iDPKH'lere ait ALP-VK boyamaları: 14.gün - kontrol grubu (a) 20X, osteojenik farklılaşma grubu (b) 20X; 28.gün - kontrol grubu, (c) 20X osteojenik farklılaşma grubu, (d) 20X.

ALP enzim aktivitesi ölçüldüğünde ise 7. ve 14. günlerde gruplar arasında anlamlı bir fark yok iken 21. günde farklılaşma grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık iki kat daha az aktivite elde edilmiştir. Hücrelerin ALP enzim aktivitesi azalırken mineralizasyonun artması beklenmektedir. Enzim aktivite ölçümünden elde edilen değerler de boyama sonuçlarına benzerlik göstermiştir (Şekil 4.10).

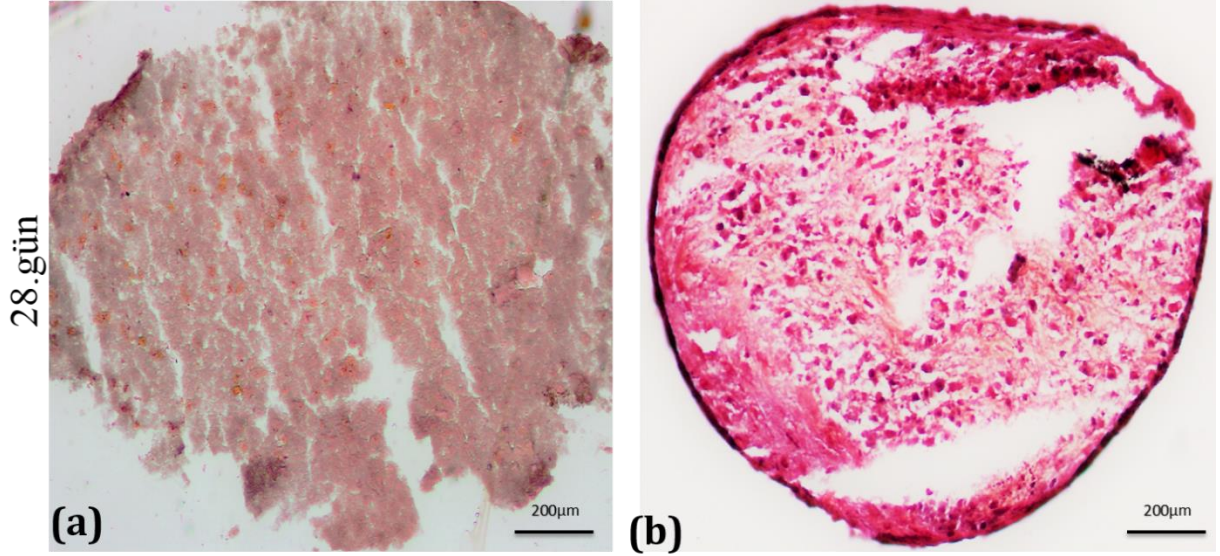


Şekil 4. 10. iDPKH'lerin ALP enzim aktivitesi ölçüm sonuçları

Kondrojenik Farklılaşma

iDPKH'lerin kondrojenik farklılaşmasının sağlanması için hücreler ITS (İnsulin-Transferrin-Selenyum), deksametazon, L-askorbik asit ve TGF- β 1 içeren farklılaşma ortamında kültüre edilmiştir. Kültürün 28. gününde yapılan Safranin O/Fast Green boyamaları ile iDPKH'lerin kondrojenik farklılaşması gösterilmiştir (Şekil 4.11). Safranin O boyaması, kondrojenik farklılaşmada matrisin proteoglikan sentezinin derecesini değerlendirmek üzere yapılmaktadır. Boyama sonucu glikozaminoglikanların (GAG) birikim bölgeleri kırmızıya boyanmaktadır.

Kondrojenik farklılaşma için 14. ve 28. günlerde örnek alınmıştır. 28. gün örneklerinde farklılaşma daha belirgin olduğu için bu örneklerden elde edilen sonuçlara yer verilmiştir. iDPKH'lerin boyama görüntüleri incelendiğinde hücreler arasındaki ekstraselüler matris oluşumu kondrojenik farklılaşma ortamındaki hücrelerde belirgin iken kontrol grubunda böyle bir oluşuma rastlanmamıştır. Bu nedenle, farklılaşma ortamındaki pellet bütünlüğü kontrol ortamında kültüre edilen pellete göre hücrelerin sağlıklı olduğunu ve hücre dışı matrisin sentezlendiğini göstermektedir. Kıkırdak dokusunda olduğu gibi glikozaminoglikanların turuncu renk ile boyandığı farklılaşma grubunda açıkça görülmektedir (Şekil 4.11).

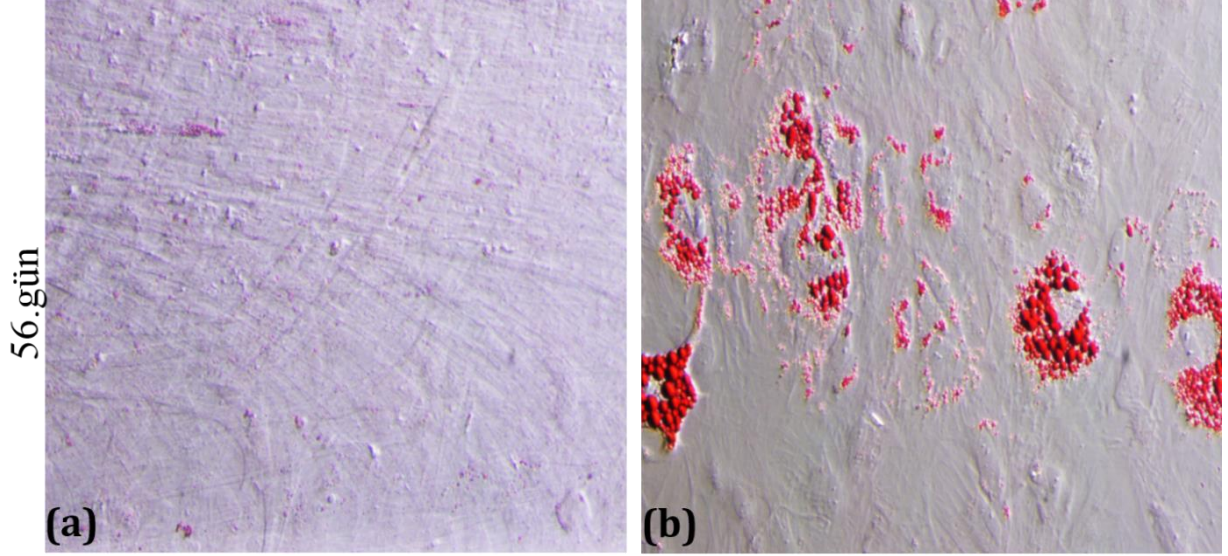


Şekil 4. 11. Safranin O/Fast Green boyaması; (a) iDPKH kontrol grubu, (b) iDPKH kondrojenik farklılaşma grubu.

Choi ve ark. [198] insan 20 yaş gömülü dişlerinden izole edilen periodontal ligament kök hücreleri (PLKH) ile yaptıkları çalışmada, 10 µg/L TGF-β3 ve 100 µg/L BMP-6'yı tek başına ve kombine şekilde kondrojenik farklılaşmayı uyarmak için kullanmışlardır. Sonuç olarak TGF-β3 ve BMP-6 kombine şekilde kullanıldığında SOX9, agrekan ve kollajen II ifadesinin tek başlarına kullanıldığı duruma göre artış gösterdiğini belirtmişlerdir.

Adipojenik Farklılaşma

iDPKH'lerin adipojenik farklılaşması için, hücreler yüzeyi kapladıktan sonra besi ortamı %10 fetal serum, 10 µM insulin, 0.5 mM 3-izobutil-1-metilksantin (İBMX), deksametazon, insulin ve indometazin içeren adipojenik farklılaşma ortamı ile değiştirilmiştir. Adipojenik farklılaşma için kültüre 56 gün devam edilmiştir. Hücreler içerisinde lipidce zengin yağ damlacıkları ilk olarak indüksiyondan 30 gün sonra görülmeye başlanmıştır. Kültürün ilerleyen günlerinde lipid vakuelleri büyümeye devam etmiş ve hücrelerin içerisini doldurmuştur. Kültürün 56. gününde gerçekleştirilen boyamalarda, kontrol grubunda herhangi bir kırmızı boyanma görülmezken (Şekil 4.12a), adipojenik ortamda kültüre edilen hücreler Oil Red O ile boyanmış ve kırmızı yağ damlacıkları görüntülenmiştir (Şekil 4.12b).



Şekil 4. 12. Adipojenik (Oil Red O) boyaması; (a) iDPKH kontrol grubu, (b) iDPKH adipojenik farklılaşma grubu.

4.2.2.5. Akış Sitometrisi Analizi

Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonunda, çalışmaların tutarlılığının sağlanması için belirli kriterler üzerinde durulmuştur. Bu kriterlerden bir tanesi Dominici ve arkadaşlarının [16] belirttiği gibi yüzey antijenlerinden en az 2 adet fenotip negatif ve en az 2 adet fenotip pozitif antijenin varlığının hücrelerde gösterilmiş olmasıdır. Fenotip pozitif antijenler; ($\geq 95\%$): CD (cluster of differentiation, farklılaşma kümeleri) 105, CD73, CD90 ve fenotip negatif antijenler ($\leq 2\%$): CD45, CD34, CD14 ya da CD11b, CD79 α ya da CD19 olarak belirlenmiştir [199].

Attari ve ark. [200] yaptıkları çalışmada diş pulpası pluripotent kök hücrelerin (DPPKH) SSEA4⁺, OCT3/4⁺, NANOG⁺, SOX2⁺, LIN28⁺, CD13⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD90⁺, CD29⁺, CD73⁺, STRO1⁺ and CD146⁻ olduğunu rapor etmişler.

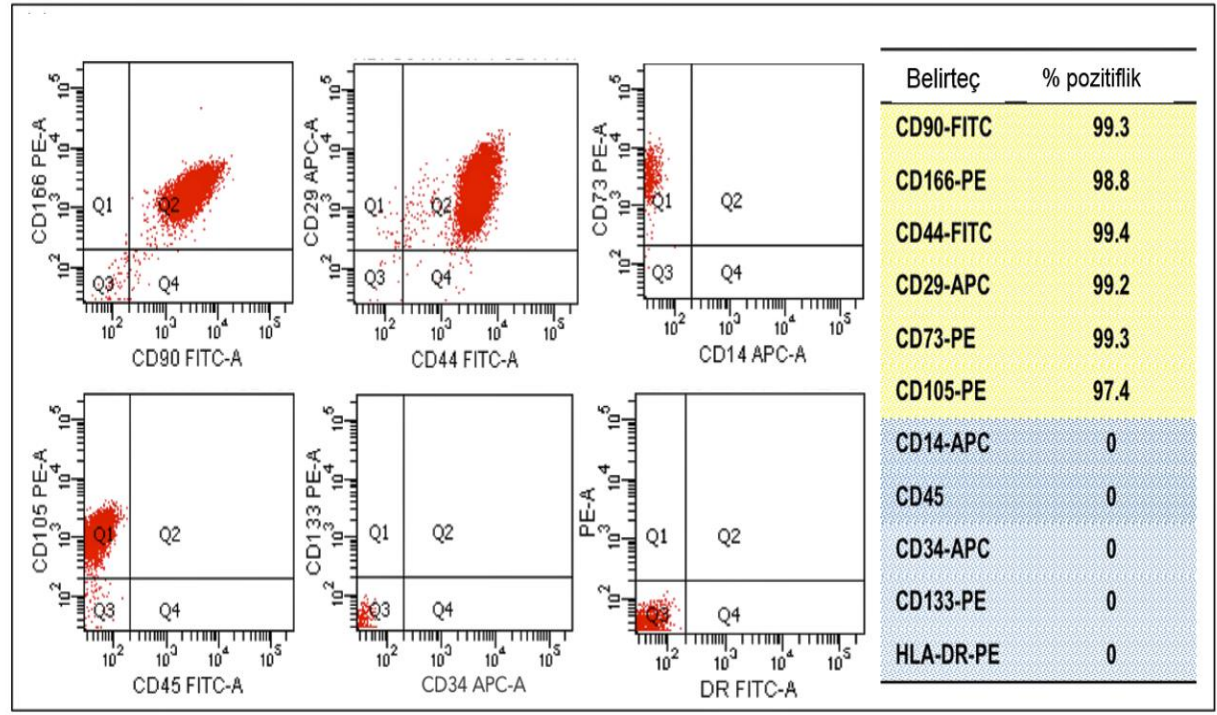
iDPKH'lerde bulunması ve bulunmaması gereken yüzey antijenlerinden bazıları şu şekilde belirlenmiştir: fenotip pozitif antijenler ($\geq 95\%$): CD106, CD146, Stro-1, CD29, CD73, CD105, CD44 ve fenotip negatif antijenler ($\leq 2\%$): CD45, CD34 ve CD14 [7, 56].

CD90 (Thy-1) immunoglobulin ailesine aittir ve MKH'ler için en iyi bilinen yüzey antijenlerindedir. CD166 immunoglobulin ailesine aittir ve aktif lökosit adezyon molekülü ve transmembran glikoproteindir. CD44 hiyaluronik asit reseptörü olup, aynı

zamanda osteopontin, kollajen, ve matris metaloproteinaz gibi başka ligandlar ile etkileşime girebilir. CD29 (integrin- β 1) MKH yüzeyinde varlığı kanıtlanmış hücre-matris reseptörlerindedir. CD73 (5'-nükleotidaz) adenozin monofosfatı adenozine dönüştürmek için hizmet vermektedir. CD105 (Endoglin) hücre yüzeylerinde bulunan bir glikoproteindir ve TGF beta reseptör kompleksinin bir parçasıdır.

CD14 geni, tarafından kodlanan protein yüzey antijenidir ve tercihen monositler/makrofajlar üzerinde ifade edilir. CD34 bir hücre yüzey glikoproteini olarak hücre-hücre tutunmasını ve kök hücrelerin kemik iliği hücre dışı matrisine veya doğrudan stromal hücrelere tutunmasını destekler. CD45 (protein tirozin fosfataz, reseptör) hematopoetik ve endotel hücrelere özgü bir antijendir.

Tez kapsamında kullanılan insan kökenli DPKH'lere ait akış sitometri analiz sonuçları Şekil 4.13.'de verilmiştir. Hücrelerin CD90, CD166, CD44, CD29, CD73, CD105 (≥%95) işaretleyicileri için pozitif ve CD14, CD34, CD45, CD133, HLA-DR için fenotip negatif olduğu görülmüştür. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde hücrelerin yüksek saflıkta olduğunu söylemek mümkündür.



Şekil 4. 13. iDPKH'lerin akış sitometrisi ile belirlenen yüzey antijenleri.

4.2.3. Hücre Ekimi ve Odontojenik Farklılaşma

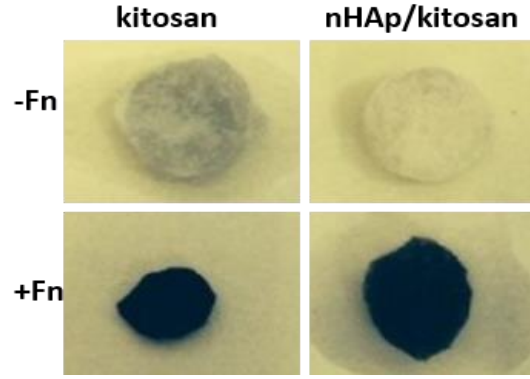
Hücre kültür çalışmaları fibronektin (Fn) immobilize edilen 3 grup doku iskelesi ve iDPKH'ler ile yürütülmüştür. Kontrol olarak Fn immobilize edilmeyen doku iskelesi kullanılmıştır. Dolayısıyla çalışmada kullanılan doku iskeleleri

1. Kitosan,
2. Kitosan+Fn,
3. nHAp/kitosan+Fn ve
4. B-nHAp/kitosan+Fn

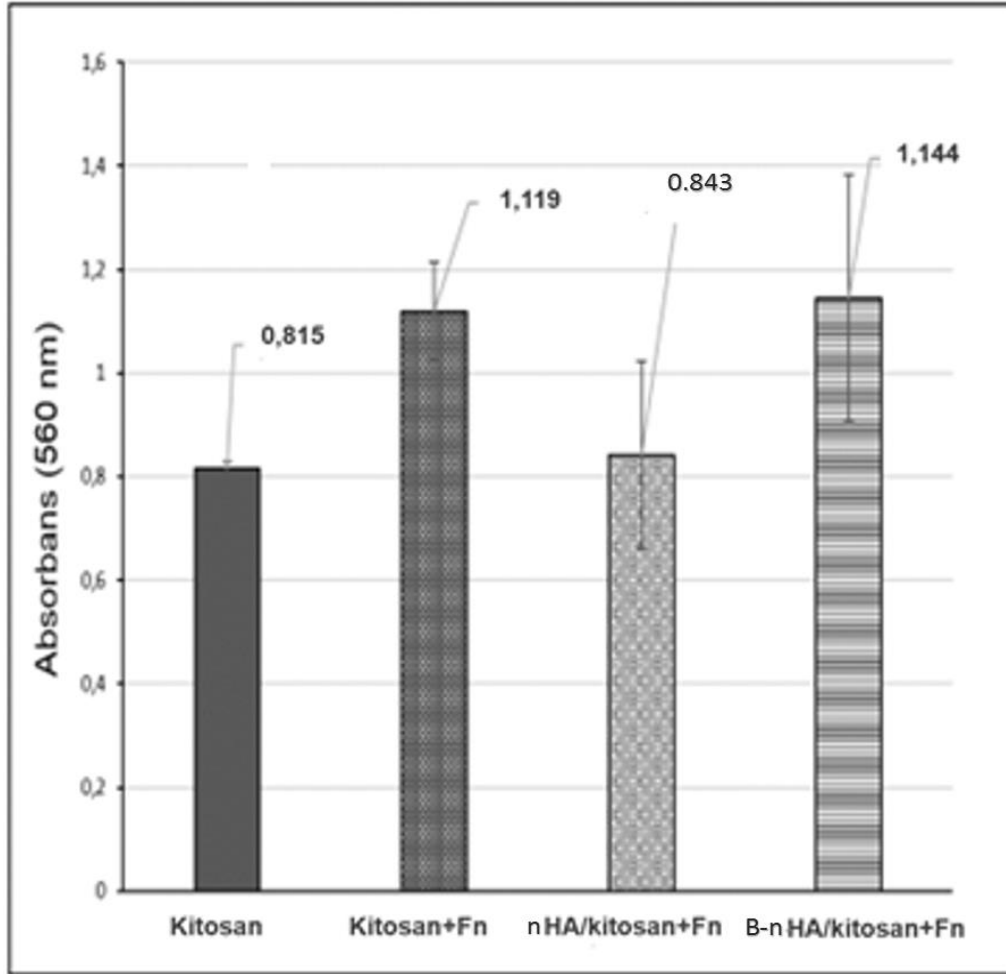
olarak sıralanmıştır.

4.2.3.1. Doku İskelesi Yüzeyine Bağlanan Amino Gruplarının Ninhidrin Yöntemi ile Tayini

Tez kapsamında hazırlanan kitosan ve nanokompozit doku iskeleleri, hücre tutunmasını arttırdığı bilinen Fn ile modifiye edilerek doku iskelelerinin biyoaktivitesinin artırılması hedeflenmiştir. Doku iskelelerine fibronektin immobilizasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği, α -amino grubunun en karakteristik reaksiyonu olan ninhidrin yöntemi ile belirlenmiştir. Bütün α -amino asitler ve peptidler bu renk reaksiyonunu verirler. Fn ile modifiye edilen kitosan+Fn, nHAp/kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn doku iskeleleri ninhidrin ile etkileştirildiği zaman mor renk almışlardır. Aminoliz işlemi uygulanmayan doku iskeleleri ise, renk değişimi göstermemişlerdir (Şekil 4.14). Renk değişimlerinin absorbans değerleri ise UV-vis spektrofotometre (Labomed, Inc., ABD) ile ölçülmüştür. İskelelerden okunan absorbans değerlerinin boş kitosan doku iskelesinin absorbans değerinden daha yüksek oluşu aminoliz işleminin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.15).



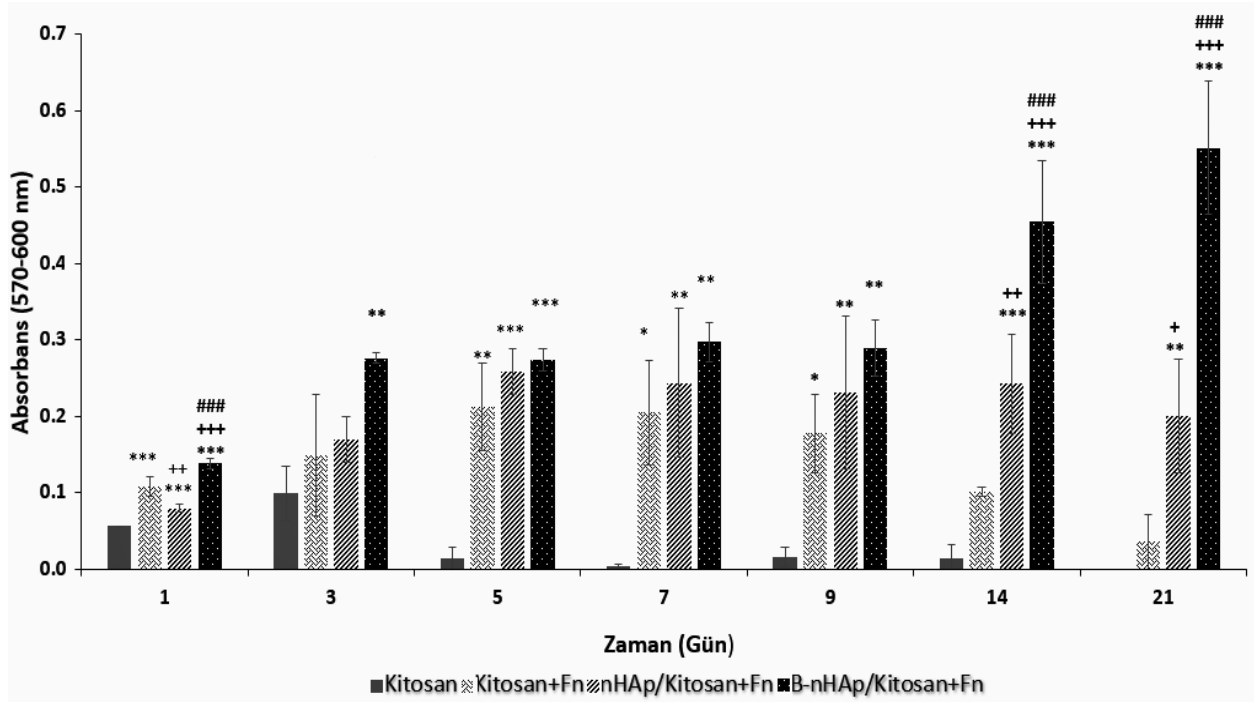
Şekil 4.14. Doku iskelelerinde ninhidrin analiz sonuçlarını gösteren fotoğraflar.



Şekil 4.15. Ninhidrin analizi sonuçlarına ait absorbans değerleri.

4.2.3.2. Presto Blue Analiz sonuçları

Kitosan, kitosan+Fn, nHAp/kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn doku iskelelerinde kültüre edilen iDPKH'lerin üreme davranışları ve mitokondriyal aktiviteleri 21 günlük inkübasyon süresince kültürün belirli günlerinde (1,3,5,7,9,14 ve 21inci günlerinde) yapılan Presto Blue analizi ile belirlenmiştir. Presto Blue analizi sonucu elde edilen veriler 570 nm'de belirlenen optik yoğunluk değerleri olarak verilmiştir. Hücre ekiminden 24 saat sonra hücre besi ortamı odontojenik ortam ile değiştirilmiştir ve iDPKH'ler tüm doku iskelelerine tutunmuş ve çoğalmaya devam etmişlerdir. Odontojenik ortam ilavesinden sonra kültürün 1. gününde kontrol grubu olan kitosan iskele ile diğer iskeleler arasında hücre canlılığında anlamlı farklılık gözlenmiştir. Şekil 4.16'da kültürün birinci gününde tutunmayı en az destekleyen grubun kitosan ve en çok destekleyen grubun B-nHAp/kitosan+Fn olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). İlk günde kitosan+Fn ve nHAp/kitosan+Fn iskelelerinde hücre canlılığında artış devam ederken en yüksek hücre canlılığına B-nHAp/kitosan+Fn iskelede ulaşılmıştır ($p<0.001$). Ayrıca nHAp/kitosan+Fn iskeledeki hücre canlılığı kitosan+Fn iskeleden daha yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). B-nHAp/kitosan+Fn iskelede hücre canlılığının nHAp/kitosan+Fn iskeleden istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.001$).



Şekil 4.16. Kitosan, kitosan+Fn, nHAp/kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn doku iskeleleri üzerinde çoğalan iDPKH'lere ait Presto Blue grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu kitosan için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu kitosan+Fn için + p<0.05, ++ p<0.01, +++ p<0.001; kontrol grubu nHAp/kitosan için # p<0.05, ## p<0.01,### p<0.001).

Şekil 4.16'da hücre ekiminden sonraki 3. gün bütün iskelelerdeki hücre canlılığında artış görülmüştür. İskelelerin üzerindeki hücrelerin canlılığı açısından kitosan ile B-nHAp/kitosan+Fn arasında anlamlı fark gözlenmiştir (p<0.01).

Kültürün 5. gününde kitosan doku iskelesinde hücre canlılığı 3 üncü güne göre azalmış ve kitosan ile kitosan+Fn (p<0.01), nHAp/kitosan+Fn (p<0.001) ve B-nHAp/kitosan+Fn (p<0.001) arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı fark gözlenmiştir. Ancak kitosan+Fn ile nHAp/kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn iskeleleri arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0.05). Ayrıca nHAp/kitosan+Fn ile B-nHAp/kitosan+Fn doku iskelesi arasında da hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0.05).

Kültürün 7. gününde kitosan doku iskelesinde hücre canlılığı 5 inci güne göre biraz daha azalmış ve kitosan ile kitosan+Fn ($p<0.05$), nHAp/kitosan+Fn ($p<0.01$) ve B-nHAp/kitosan+Fn ($p<0.01$) arasında anlamlı fark gözlenmiştir. Ancak kitosan+Fn ile nHAp/kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn iskeleleri arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Ayrıca nHAp/kitosan+Fn ile B-nHAp/kitosan+Fn doku iskelesi arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Kültürün 9. gününde kitosan doku iskelesindeki hücre canlılığında hafif bir artış görülürken, kitosan ile kitosan+Fn ($p<0.05$), nHAp/kitosan+Fn ($p<0.01$) ve B-nHAp/kitosan+Fn ($p<0.01$) arasında anlamlı fark gözlenmiştir. Ancak kitosan+Fn ile nHAp/kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn iskeleleri arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Ayrıca nHAp/kitosan+Fn ile B-nHAp/kitosan+Fn doku iskelesi arasında da hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Kültürün 14. gününde kitosan doku iskelesinde hücre canlılığı 9. güne göre çok az miktarda azalmış ve kitosan ile kitosan+Fn arasında anlamlı bir fark gözükmezken, kitosan ile nHAp/kitosan+Fn ($p<0.001$) ve B-nHAp/kitosan+Fn ($p<0.001$) arasında hücre canlılığı açısından oldukça anlamlı fark gözlenmiştir. Kitosan+Fn ile nHAp/kitosan+Fn ($p<0.01$) ve B-nHAp/kitosan+Fn ($p<0.001$) iskeleleri arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmiştir. Ayrıca nHAp/kitosan+Fn ile B-nHAp/kitosan+Fn doku iskelesi arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak oldukça anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0.001$).

Kültürün 21. gününde kitosan doku iskelesinde hücre canlılığı azalmıştır. Ayrıca kitosan+Fn doku iskelesinde hücre canlılığı 14 üncü güne göre azalmış ve kitosan doku iskelesi ile nHAp/kitosan+Fn ($p<0.01$) ve B-nHAp/kitosan+Fn ($p<0.001$) arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir. Kitosan+Fn ile nHAp/kitosan+Fn ($p<0.05$) ve B-nHAp/kitosan+Fn ($p<0.001$) iskeleleri arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmiştir. Ayrıca nHAp/kitosan+Fn ile

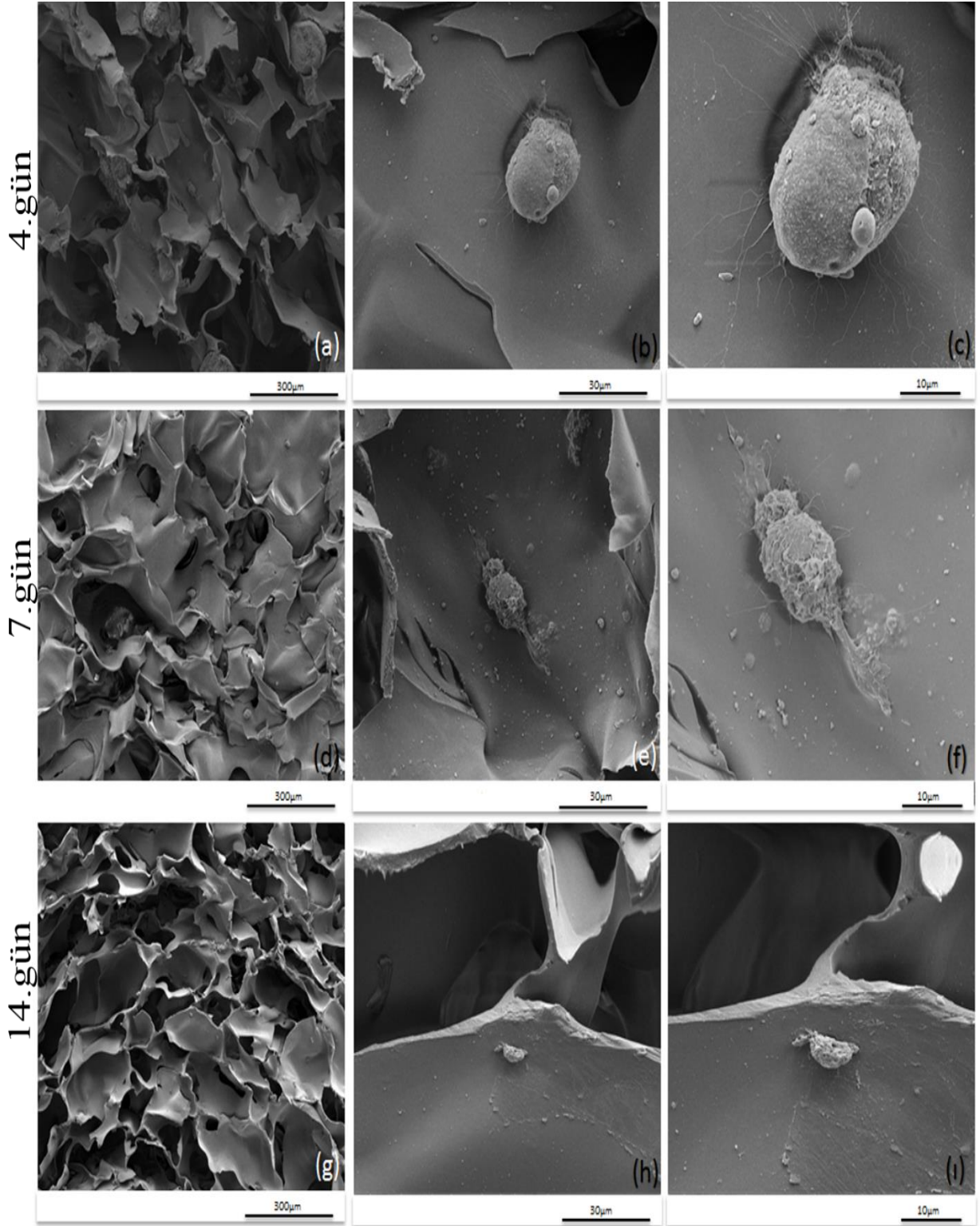
B-nHAp/kitosan+Fn doku iskelesi arasında da hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p < 0.001$).

Sonuç olarak dört grup doku iskelesinde de hücrelerin tutunduğu, fakat kitosan doku iskelesinde üremedikleri belirlenmiştir. Ayrıca B-nHAp/kitosan+Fn ve nHAp/kitosan+Fn iskelelerinde hücrelerin oldukça iyi çoğaldıkları belirlenmiş ve en yüksek üreme hızına B-nHAp/kitosan+Fn iskelede ulaşmıştır. Genel olarak kitosan+Fn grubunda hücrelerin aktivitenin kültürün ilerleyen günlerinde özellikle 9. günden sonra azaldığı ve doku iskelesinde Fn varlığına rağmen kitosanın hücre tutunmasını ve çoğalmasını desteklemediği gözlemlenmiştir. Nano HAp/kitosan+Fn ve özellikle B-nHAp/kitosan+Fn doku iskelelerinde 21 günlük kültür süresi boyunca hücrelerin optik yoğunluklarının artış göstermesi hücrelerin logaritmik fazda olduklarının göstergesidir. 21. güne kadar kitosan doku iskelesinde absorbans düşmeye devam ederken, B-HAp/kitosan+Fn doku iskelelerine ekilen hücrelerin Presto Blue değerleri 21. güne kadar artmakta ve 21. günde kültürdeki en yüksek değere ulaşmaktadır. Bu da hücrelerin odontojenik farklılaşmaya doğru giderken mitokondriyal aktivitelerini ve hücre canlılıklarını koruduklarının göstergesidir.

4.2.3.3. SEM Analizi

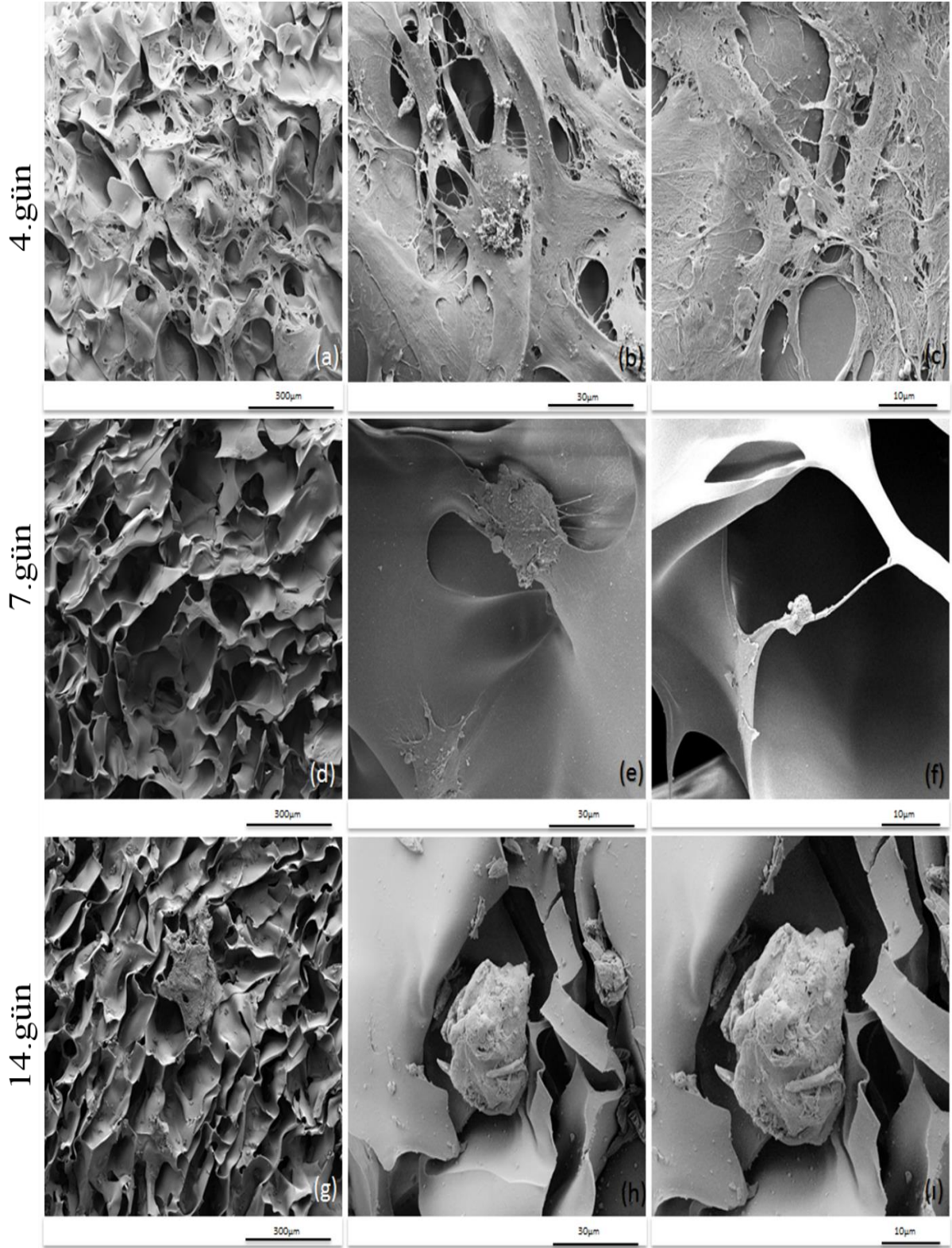
Hücrelerin doku iskelesinin üzerine yapışması ve yayılması, hücre çoğalması ve farklılaşması açısından önemlidir. Bu nedenle hazırlanan kitosan, kitosan+Fn, nHAp/kitosan+Fn, B-nHAp/kitosan+Fn doku iskelelerin yüzeylerinde bulunan iDPKH'lerinin morfolojileri ve doku iskeleleri ile hücreler arasındaki etkileşim SEM görüntüleri ile incelenmiştir. Kitosan iskelelerinin sırasıyla kültürün 4. (Şekil 4.17 a, b, c), 7. (Şekil 4.17 d, e, f) ve 14. (Şekil 4.17 g, h ve ı) gününe ait SEM görüntüleri incelendiğinde hücrelerin kitosan doku iskelelerine az sayıda tutundukları, ve bu hücrelerin küresel morfoloji oluşturdukları açıkça görülmektedir (Şekil 4.17). Ayrıca 7 ve 14'üncü günlere ait SEM görüntüleri karşılaştırıldığında, doku iskelesinde bulunan kümelenmiş hücrelerin sayısının azaldığı ve sferoidlerin boyutlarının küçüldüğü görülmektedir (Şekil 4.17). Kitosan doku iskelelerine ait SEM görüntülerinden, Presto Blue analiz sonuçları ile paralel bir şekilde kültürün 14. gününde hücre yoğunluğunun, 4. ve 7. gününe oranla azaldığı anlaşılmaktadır. Literatür incelendiğinde kitosan doku

iskelesinin kök hücre yapışmasını desteklemediğini belirten çalışmalara rastlanmıştır [194, 201, 202].



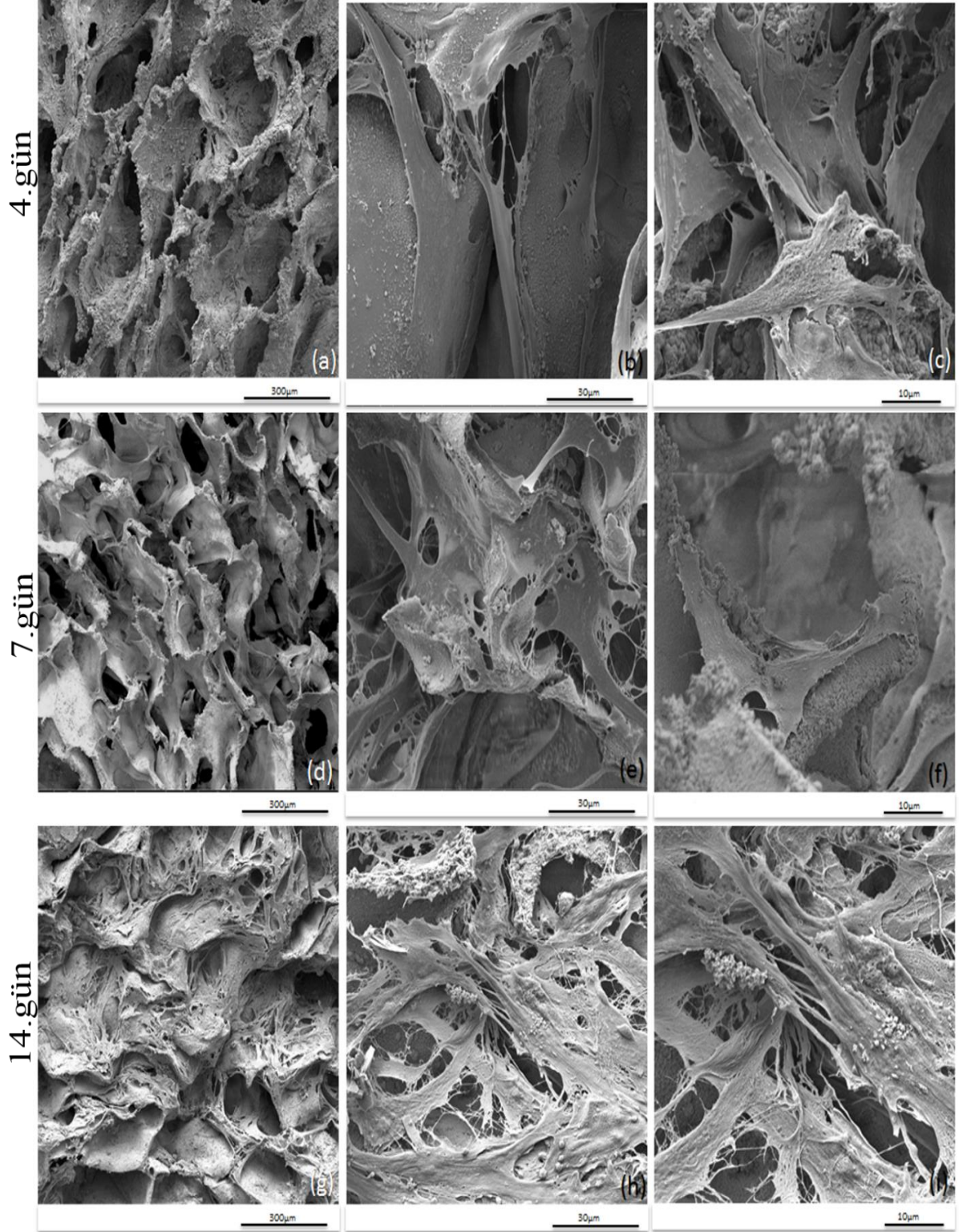
Şekil 4.17. Kitosan doku iskelelerin üzerinde çoğalan iDPKH'lere ait 4, 7 ve 14. gün SEM görüntüleri. Sırasıyla 500x (a,d,g), 2500x (b,e,h) ve 5000x (c,f,i) büyütme verilmektedir.

İnsan DPKH'leri kitosan doku iskelelerine az sayıda sferoid morfolojide tutundukları için, bu sorunu çözebilmek amacıyla kitosan doku iskelelerine Fn immobilizasyonu yapılmıştır. Fn immobilizasyonu yapılmış kitosan doku iskeleleri ile hücreler arası etkileşim ve hücrelerin morfolojileri kültürün 4., 7. ve 14. gününde SEM analizi ile incelenmiştir. Kitosan+Fn üzerinde kültüre edilen iDPKH'lerin görüntüleri Şekil 4.18'de verilmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde kitosan iskelelerde olduğu gibi kitosan+Fn doku iskelelerinin de iDPKH'lerin yapışmasını az miktarda desteklediği görülmüştür. Kültürün 4 üncü gününde iDPKH'lerin doku iskelelerine tutundukları ve iskelenin gözenekleri boyunca yayıldıkları Şekil 4.18'de (a,b ve c) görülmektedir. Ancak 7 inci gün SEM görüntüleri incelendiğinde hücrelerin daha az miktarda ve küçük boyutlarda doku iskelesi üzerine tutundukları, fakat tam yayılamadıkları görülmektedir (Şekil 4.18 d ve e). Kültürün 14 üncü gününde iDPKH'lerin çok az sayıda tutundukları, yayılamadıkları ve MKH'ler için tipik olan içsi morfoloji yerine küresel morfoloji sergiledikleri dikkat çekmektedir (Şekil 4.18 g, h ve ı). Fibronektin immobilizasyonu yapılmamış kitosan doku iskeleleri üzerinde üreyen iDPKH'lerin 14. gününde SEM analiz görüntüleri (Şekil 4.17 g, h, ve ı) fibronektin immobilizasyonu yapılmış kitosan doku iskeleleri ile karşılaştırıldığı zaman, Fn'siz kitosan doku iskelesine çok az sayıda ve daha küçük boyuta sahip küresel morfolojide hücrelerin tutundukları görülmektedir. Ayrıca 4. gün SEM analiz görüntüleri karşılaştırıldığı zaman iDPKH'lerin kitosan doku iskelesi üzerinde kitosan+Fn doku iskelelerine göre daha hızlı bir şekilde sferoid oluşturdukları görülmüştür.



Şekil 4.18. Kitosan+Fn doku iskelesi üzerinde çoğalan iDPKH'lere ait 4. ,7. ve 14. gün SEM görüntüleri. Sırasıyla 500x (a,d,g), 2500x (b,e,h) ve 5000x (c,f,i) büyütme verilmektedir.

Şekil 4.19'da yer alan SEM görüntüleri incelendiğinde nHAp/kitosan+Fn doku iskelerinin iDPKH'lerin tutunmasını ve çoğalmasını desteklediği açıkça görülmektedir. Hücrelerin nHAp/kitosan+Fn doku iskelerinin yüzeyine tutundukları, yayıldıkları ve nano boyutlardaki uzantıları ile doku iskele gözenek duvarları boyunca köprüler oluşturarak üç boyutlu şekilde çoğaldıkları ve sitoplazmik uzantıları ile birbirleri ile temas kurdukları Şekil 4.19'da (b, c, ve f) görülmektedir. Ayrıca iDPKH'ler sadece iskele yüzeyinde kalmamış, hücre ekimi sonrasında birbirleriyle etkileşmek üzere nHAp partiküllere dayanak olarak kullanarak bu pariküller üzerinde ve arasında hücrel köprüler oluşturmuş ve içsel bağlantılı gözeneklerden iskelenin iç bölgelerine doğru yayılmaya devam etmişlerdir (Şekil 4.19 e ve f). SEM görüntülerinden, Presto Blue sonuçları ile uyumlu bir şekilde kültürün 14. gününde hücre yoğunluğunun, 4. ve 7. gününe oranla arttığı anlaşılmaktadır. Ayrıca, 14. günde iDPKH'lerin salgıladıkları hücre dışı matris miktarının artması nedeniyle iskele yüzeyini tamamen kapladıkları ve odontojenik farklılaşmaya işaret olarak, hücre membranlarında mineral birikimleri gözlenmiştir (Şekil 4.19 h ve i).

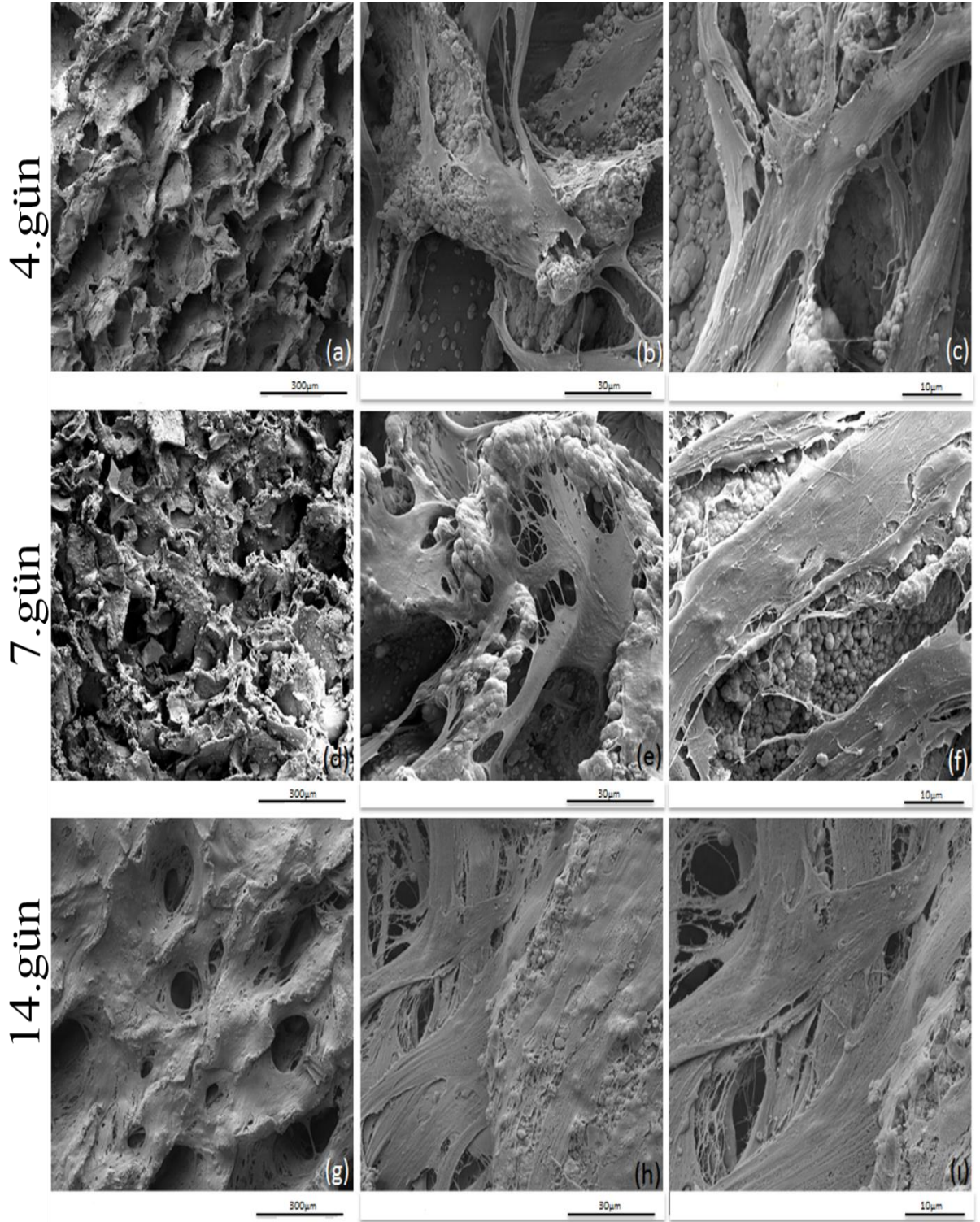


Şekil 4.19. nHAp/Kitosan+Fn doku iskelelerin üzerinde çoğalan iDPKH'lere ait 4,7 ve 14.gün SEM görüntüleri. Sırasıyla 500x (a,d,g), 2500x (b,e,h) ve 5000x (c,f,i) büyütme vermiştir.

B-nHAp/kitosan+Fn iskelelerinin sırasıyla 4., 7. ve 14. günlere ait SEM görüntüleri incelendiğinde, doku iskelesinde hücre yoğunluğunun arttığı ve B-nHAp/kitosan+Fn grubunda hücre yoğunluğunun diğer gruplara göre daha fazla olduğu belirgin şekilde görülmektedir (Şekil 4.20 a, d, ve g). Kültürün 14. gününde hücreler kendi ekstraselüler matrislerini üretmişler ve hücrelerin oluşturduğu hücre dışı matris yapısıyla doku iskelesinin yüzeyini ve gözeneklerini kapatmışlardır (Şekil 4.20 g, h ve ı). Hücrelerin nano boyutta kollajen fiberleri ürettikleri Şekil 4.20'de (h ve ı) belirgin bir şekilde görülmektedir. İnsan DPKH'ler sitoplazmik uzantıları ile bor içeren HAp nanotaneçiklere yönelmekte ve onlara tutunmaktadırlar. HAp nanotaneçiklerinin osteoindüktif yapısı ve borun odontoindüktif özelliği nedeniyle hücre farklılaşmasına katkısı olmaktadır. B-nHAp/kitosan+Fn grubunda hücrelerin nanopartiküllerin yoğun olduğu bölgelerde yüzeye tutunarak yayıldıkları görülmektedir (Şekil 4.20 c,e ve f). Ayrıca, 14. günde hücrelerin odontoblastik farklılaşmaya işaret olarak hücre membranlarında mineralizasyon kümelerinin oluşumu gözlenmiştir. (Şekil 4.20 g,h ve ı). Bu durum, hücrelerin B-nHAp'ın etkisi ile gelişen farklı sinyal yolları ile sadece üremeye değil de farklılaşmaya yönelmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Presto Blue analizi sonuçları ve SEM görüntüleri değerlendirildiğinde, biyomimetik yöntem ile üretilmiş bor katkılı nanohidroksiapatit doku iskelelerinde iDPKH'ler için herhangi bir toksik etkileri gözlenmezken, diğer doku iskelelerine göre hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşmasının daha fazla desteklendiği görülmektedir. Bu etkinin nedeninin, nHAp'ın yapısına ilave edilen borun ya da borat iyonlarının, apatitin kafes yapısını değiştirmesi olabileceği gibi, asıl etkinin kemik ve diş benzeri apatitten gerçekleşen bor iyonları salımından kaynaklanan odontoindüktif etkiye bağlı olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak hem nHAp/kitosan+Fn ve hem daha etkin bir şekilde B-nHAp/kitosan+Fn doku iskelelerinin iDPKH'lerin tutunmasını, yayılmasını, çoğalmasını desteklediği ve odontoblastik farklılaşma sürecini hızlandırdığı belirlenmiştir. Literatür bilgileri incelendiğinde iDPKH'lerin uygun farklılaşma besi ortamı sağlandığında HAp yüzeyler üzerinde odontoblast benzeri morfolojiye dönüştükleri görülmüştür [4, 19]. Literatür bilgileri, çalışma kapsamında incelenen SEM

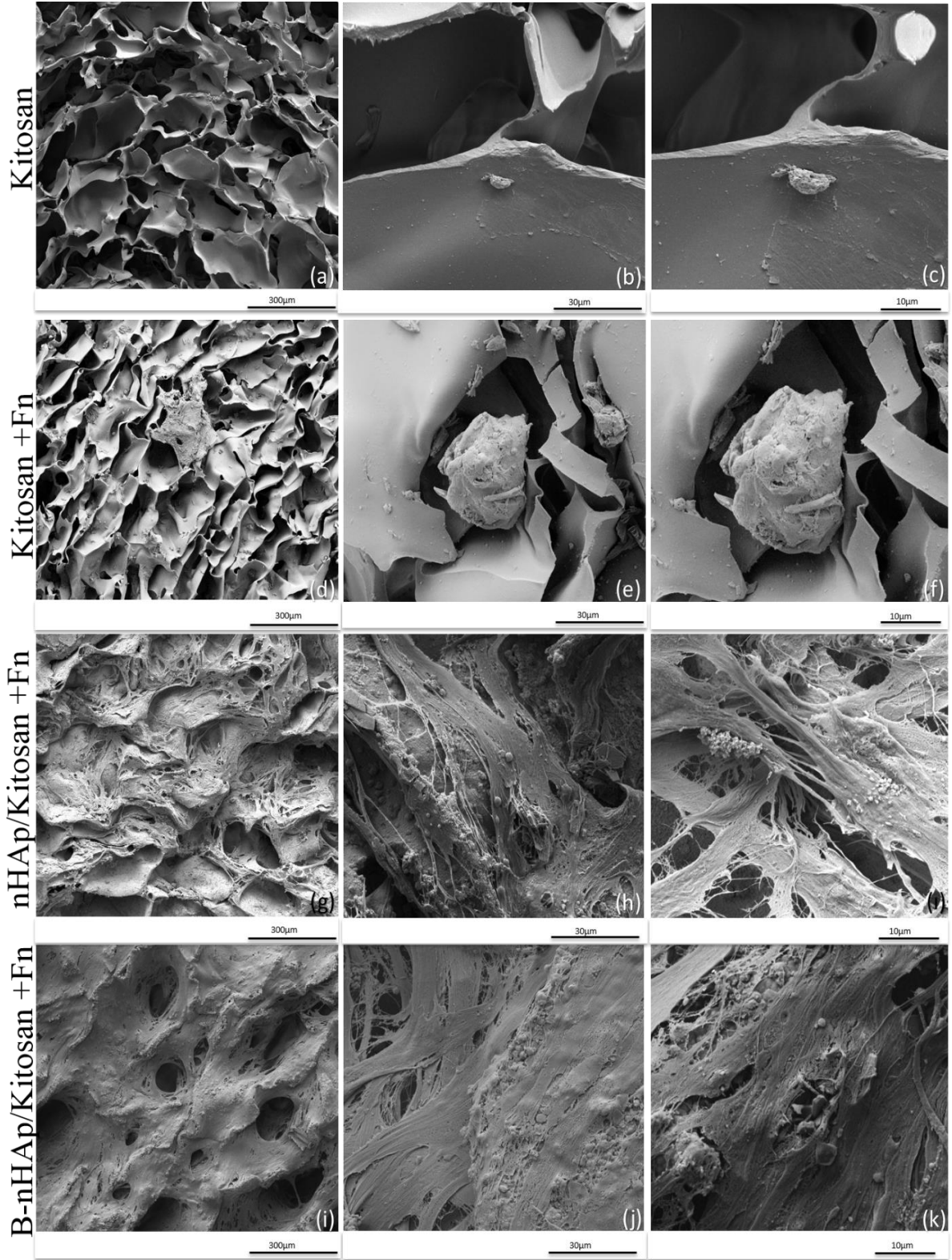
görüntülerini desteklemekte olup, iDPKH'lerin odontojenik farklılaşmaya gittiklerini vurgulamaktadır.



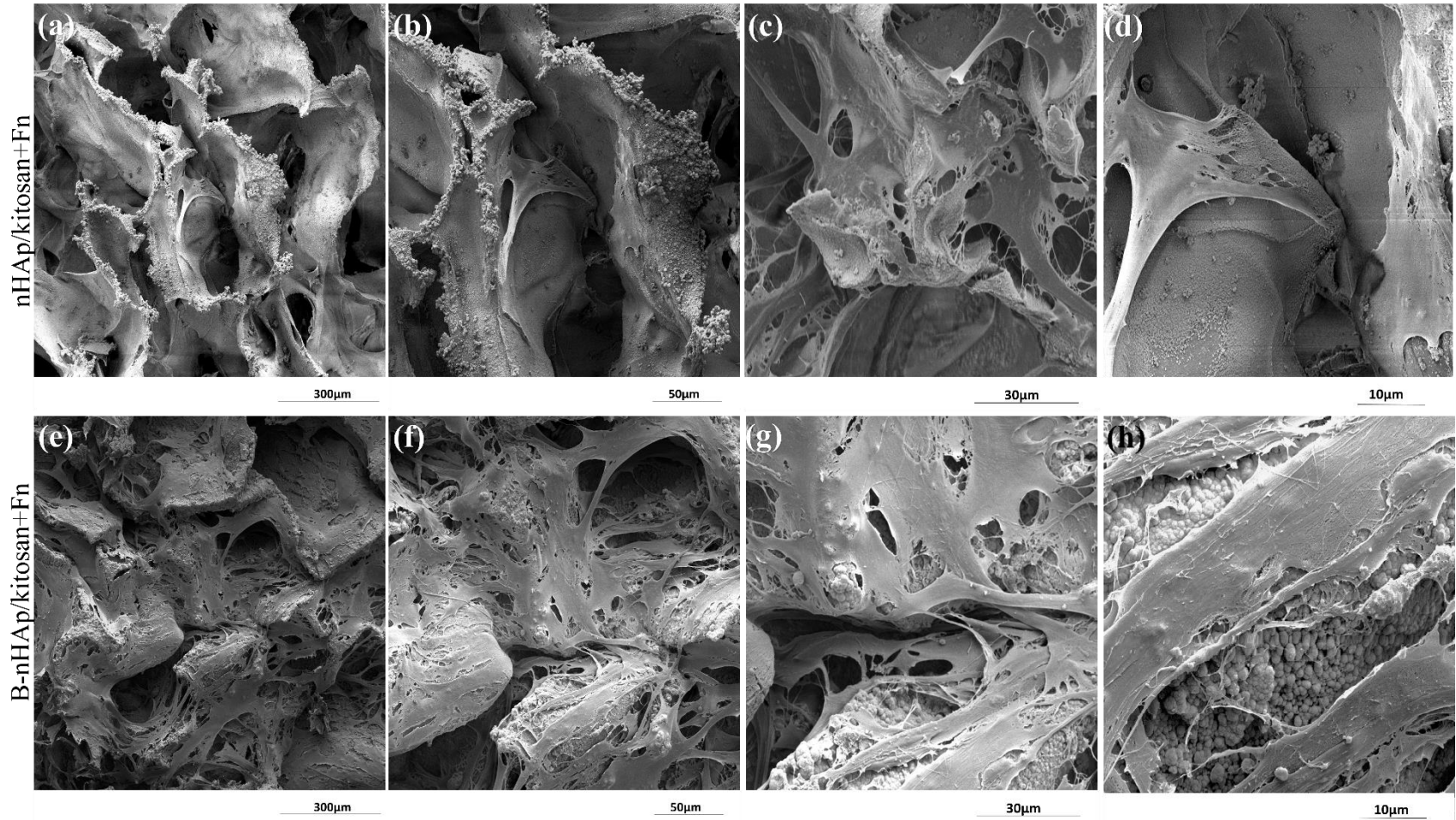
Şekil 4.20. B-nHAp/Kitosan+Fn doku iskelelerin üzerinde çoğalan iDPKH'lere ait 4,7 ve 14.gün SEM görüntüleri. Sırasıyla 500x (a,d,g), 2500x (b,e,h) ve 5000x (c,f,i) büyütme vermiştir.

Daha rahat karşılaştırmak için Şekil 4.21, 4.22 ve 4.23'de sırasıyla 4 farklı doku iskelesindeki 14. Güne ait iDPKH SEM görüntüleri nHAp ve B-nHAp içeren doku iskelelerindeki 7. gün (Şekil 4.22) ve 14. gün (Şekil 4.23) SEM görüntüleri verilmiştir.

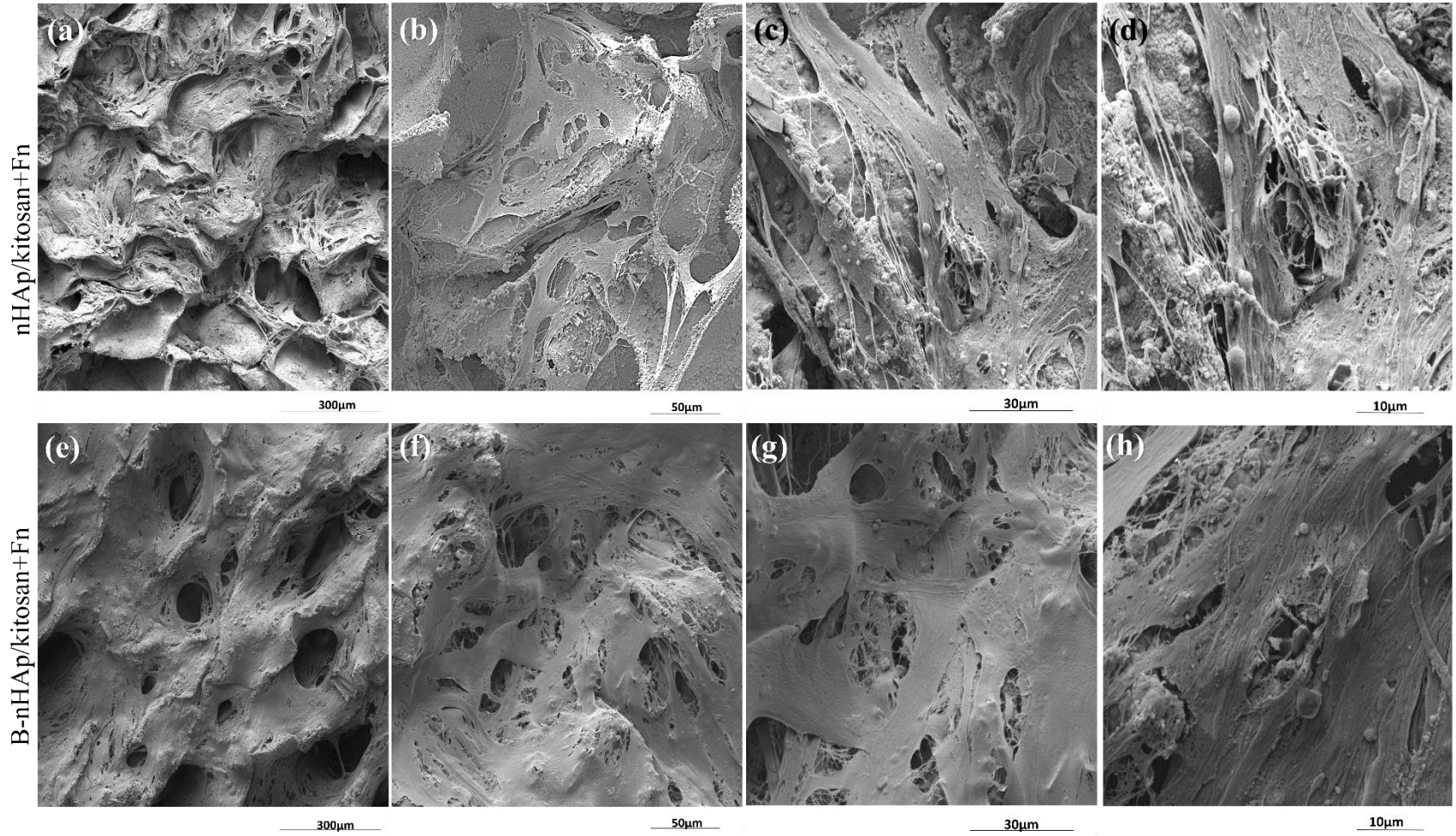
Sonuç olarak, iDPKH'lerin 2 farklı nHAp/kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn doku iskelesine de yapıştığı ve çoğaldığı ancak, hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin en yüksek olduğu örneklerin, bor içeren örnekler olduğu görülmektedir. Bu durum borun iDPKH'lerin üremesini arttırdığını kanıtlamaktadır.



Şekil 4.21. Kitosan, kitosan+Fn, nHAp/Kitosan+Fn ve B-nHAp/Kitosan+Fn doku iskelelerin üzerinde çoğalan iDPKH'lere ait 14.gün SEM görüntüleri. Sırasıyla 250x (a,d,g,i), 2500x (b,e,h,j) ve 5000x (c,f,i,k) büyütme verilmektedir.



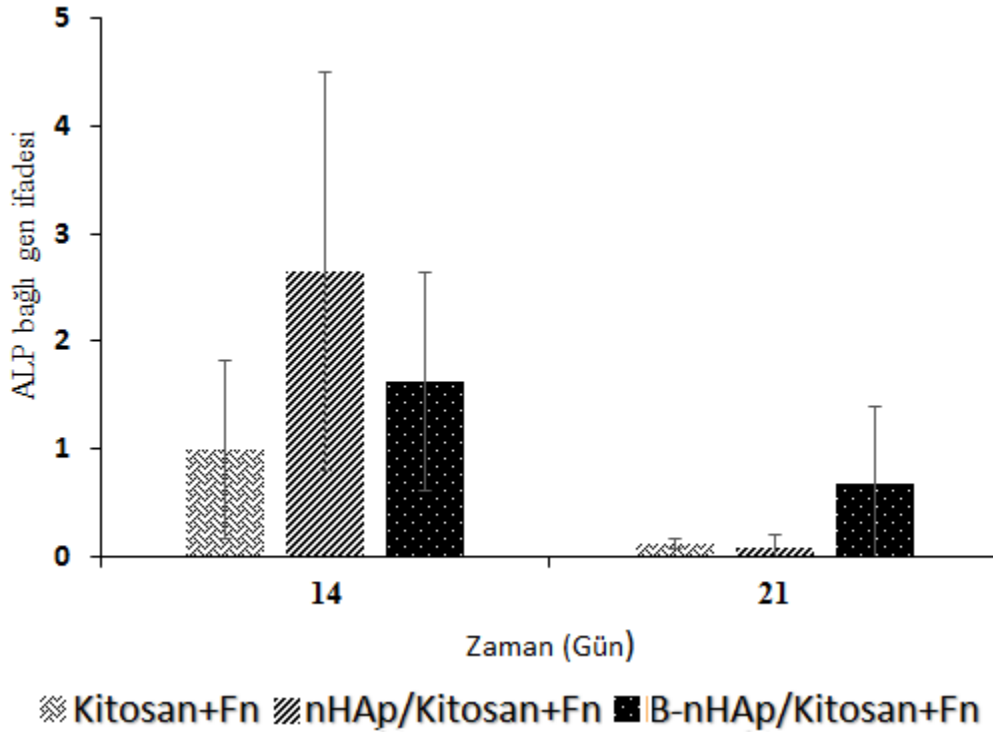
Şekil 4.22. Nano HAp/Kitosan+Fn (a,b,c ve d) ve B-nHAp/Kitosan+Fn (e,f,g ve h) doku iskelelerin üzerinde çoğalan iDPKH'lere ait 7.gün SEM görüntüleri. Sırasıyla 500x (a,e),1000 (b,f), 2500x (c,g) ve 5000x (d,h) büyütme vermiştir.



Şekil 4.23. Nano HAp/Kitosan+Fn (a,b,c ve d) ve B-nHAp/Kitosan+Fn (e,f,g ve h) doku iskelelerin üzerinde çoğalan iDPKH'lere ait 14.gün SEM görüntüleri. Sırasıyla 500x (a,e),1000 (b,f), 2500x (c,g) ve 5000x (d,h) büyütme vermiştir.

4.2.3.4. RT-PCR Analizleri

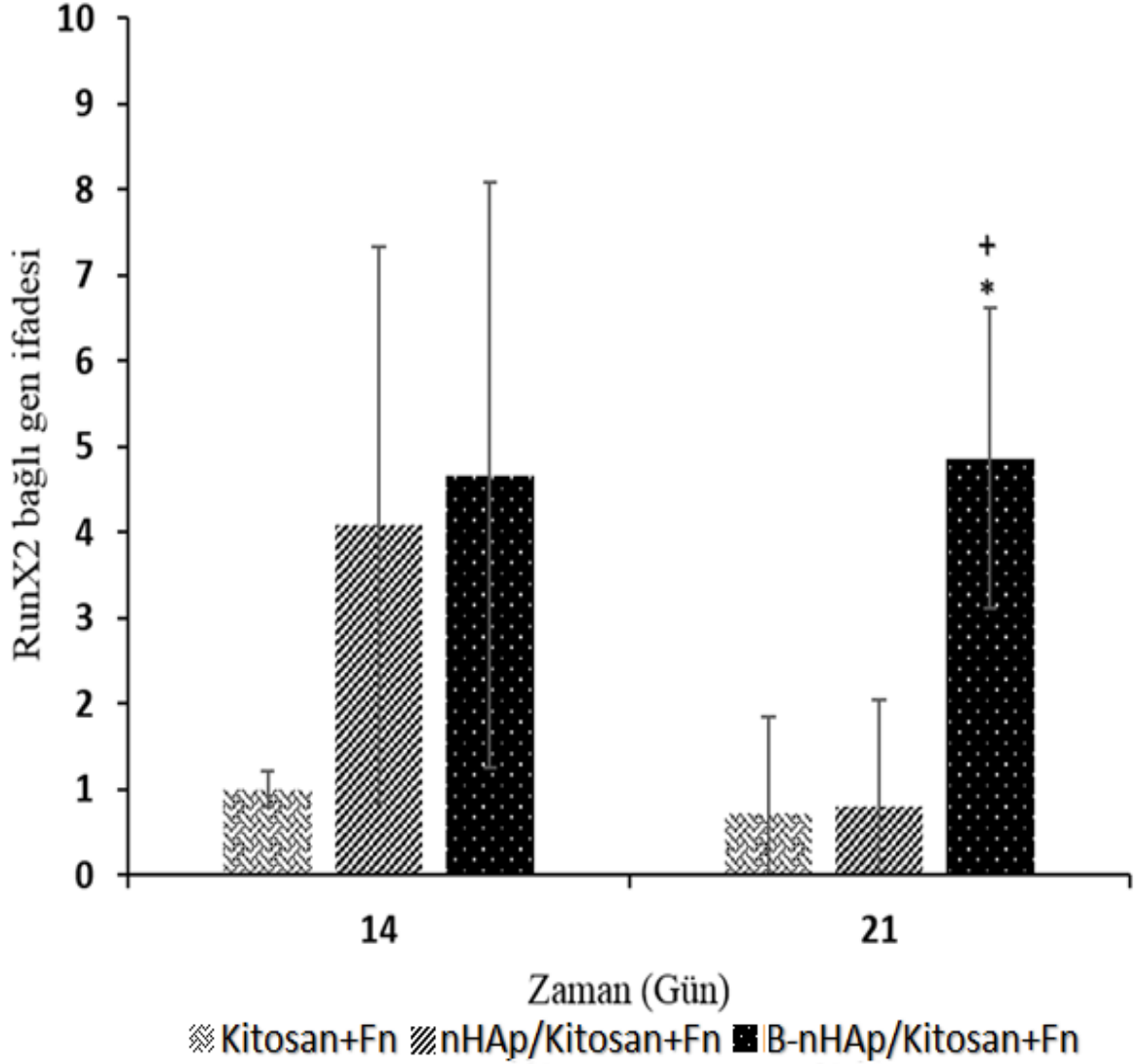
Odontojenik farklılaşma sırasında, alkalin fosfataz (ALP), runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (RunX2), kollajen-I (KOL-I), osteokalsin (OCN), osteopontin (OPN) ve dentin siyalofosfoprotein (DSPP) gibi osteoblastik/odontoblastik belirteçlerin ifadelerinde artış gözlenmektedir [4]. Sunulan tez çalışması kapsamında iskeleler üzerine ekilen hücrelerin odontoblastik farklılaşmasının belirlenmesi amacıyla hücrelerdeki ALP, KOL-I, β -aktin, RunX2, OCN, OPN ve DSPP gen ifadeleri RT-PCR analizi ile belirlenmiştir. RT-PCR sonuçları mRNA ekspresyonunda nHAp/kitosan grubundaki değerlerin kat artışı olarak gösterilmiştir. Kitosan iskelelerin RT-PCR analizleri ise hücre tutunması yeterli olmadığı için yapılmamıştır.



Şekil 4.24. Kitosan+Fn, nHAp/Kitosan+Fn ve B-nHAp/Kitosan+Fn üzerinde çoğalan iDPKH'lerine ait bağı ALP gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3), kontrol grubu kitosan+Fn için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu nHAp/Kitosan+Fn için + p<0.05, ++ p<0.01,+++ p<0.001).

Hücrelerin odontojenik farklılaşma özellikleri incelediğinde 14. günde nHAp/kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn doku iskelesinde ALP aktivitesi yüksek iken (Şekil 4.24) 21. günde ALP aktivitesi beklendiği gibi 14. güne göre azalmıştır (Şekil 4.24). Ayrıca 21. günde ALP aktivitesi B-nHAp/kitosan+Fn grubunda diğer gruplara göre daha yüksektir. ALP aktivitesi mineralizasyon başlamadan önce dentin ve kemikte matriks oluşumu ile ilişkilidir [203]. Bundan dolayı ALP aktivitesi,

odontoblast/osteoblast farklılaşmasının erken bir göstergesi olduğu için, kültürün başında daha yüksek olması, ilerleyen günlerde ise azalması ve kalsiyum birikimlerinin ortaya çıkması beklenmektedir [197].



Şekil 4.25. Kitosan+Fn, nHAp/Kitosan+Fn ve B-nHAp/Kitosan+Fn üzerinde çoğalan iDPKH'lerine ait bağıl RunX 2 gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3), kontrol grubu kitosan+Fn için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu nHAp/Kitosan+Fn için + p<0.05, ++ p<0.01,+++ p<0.001).

RunX2 osteoblast farklılaşması ile ilişkili önemli bir transkripsiyon faktörüdür ve mezenkimal kök hücrelerin olgunlaşmamış osteoblastlara farklılaşmasını indüklemekte. Normal olarak, RunX2 osteoblastların olgunlaşmasını engeller ve kemik gelişiminin ilerleyen aşamalarında RunX2 gen ifadesi azalır.

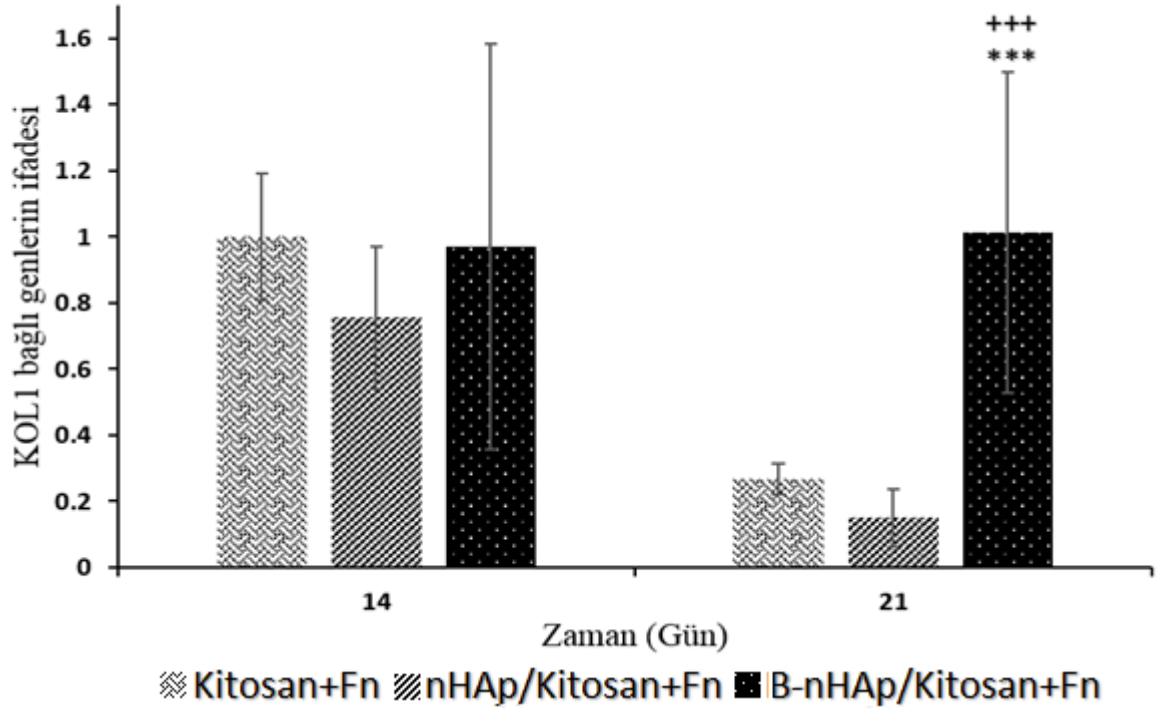
Komori [204] tarafından yapılan çalışmada endojen RunX2 proteini olgunlaşmamış odontoblast çekirdeklerinde ve 3 günlük fare diş kesesi içinde mezenkimal

hücrelerde tespit edilmiştir. Çalışmanın devamında RunX2 gen ifadesinin odontoblastların osteoblastlara trans farklılaşmasını uyarabildiği ve RunX2 ve DSPP geninin ifadesi odontoblastların diş hücrelerine yönelik farklılaşmasına neden olduğunu göstermiştir.

Şekil 4.25 incelendiğinde doku iskelelerindeki hücrelerin RunX2 gen ekspresyonun kültürün ilerleyen günlerinde nHAp/kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn gruplarında arttığı görülmektedir. Grupların 21. gündeki değerleri karşılaştırıldığında nHAp/kitosan+Fn iskelede azalma görülürken, B-nHAp/kitosan+Fn iskelede belirgin bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca 21. günde nHAp/kitosan+Fn iskele ile B-HAp/kitosan+Fn iskele arasında anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ($p<0.05$). RunX2 ifadesinin her iki günde de B-nHAp/kitosan+Fn iskelede daha yüksek olduğu görülmektedir.

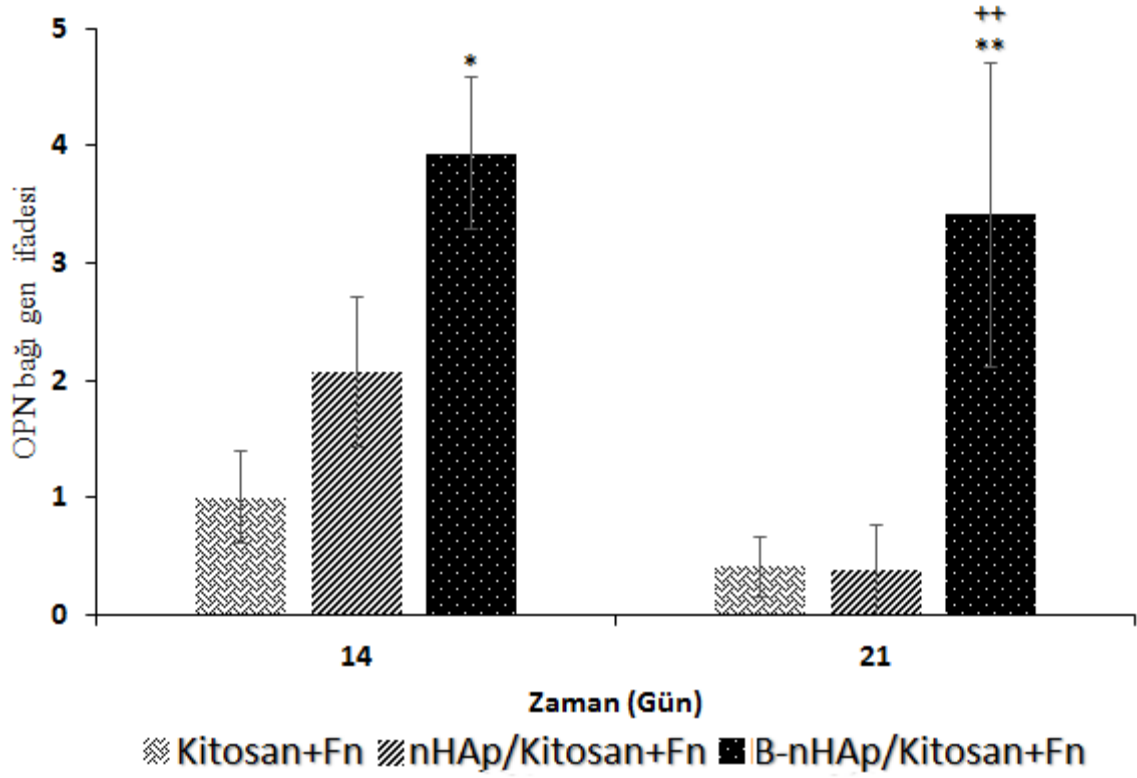
Hakkı ve ark.[205] 1 ya da 10 ng/mL bor takviyesinin bor konsantrasyonları ile karşılaştırıldığında 0 ve 0.1 ng/mL mineralize nodül oluşumu ve kültürlenmiş osteoblast hücre tarafından tip 1 kolajen, osteopontin, kemik sialoprotein, osteokalsin ve RunX ve mineralize dokuya ilişkili mRNA ifadelerin arttırdığını tespit etmiştir. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar doğrultusunda B-HAp/kitosan+Fn doku iskelesindeki hücrelerde RunX2 gen ifadesinin artışının nedeninin bordan kaynaklandığı söylenebilir.

Kollajen kemiğin temel yapılarından biridir ve kemik hücre dışı matrisinin yaklaşık % 90'nı KOL-I'den oluşmaktadır. Diş dentin dokusunun organik matriksini de KOL-I oluşturmaktadır [206].



Şekil 4.26. Kitosan+Fn, nHAp/Kitosan+Fn ve B-nHAp/Kitosan+Fn üzerinde çoğalan iDPKH'lerine ait bağıl KOL-I gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3), kontrol grubu kitosan+Fn için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu nHAp/Kitosan+Fn için + p<0.05, ++ p<0.01,+++ p<0.001).

Doku iskeleleri üzerindeki hücrelerin KOL-I gen ifadeleri incelendiğinde (Şekil 4.26) 14. günde kitosan+Fn, nHAp/kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn iskeleler arasında anlamlı bir fark olmadığı ve grupların hepsinde gen ifadesinin fazla olduğu görülmektedir. Yirmibirinci gün değerleri kendi içinde değerlendirildiğinde gen ifade seviyesi B-nHAp/kitosan+Fn grubunda nHAp/kitosan+Fn grubunun yaklaşık olarak 4 katına çıktığı görülmüştür ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p<0.001). Ayrıca gen ifade seviyesi B-nHAp/kitosan+Fn grubunda kitosan+Fn grubunun yaklaşık olarak 5 katına çıkmış ve iki grup arasında gen ifadesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p<0.001).

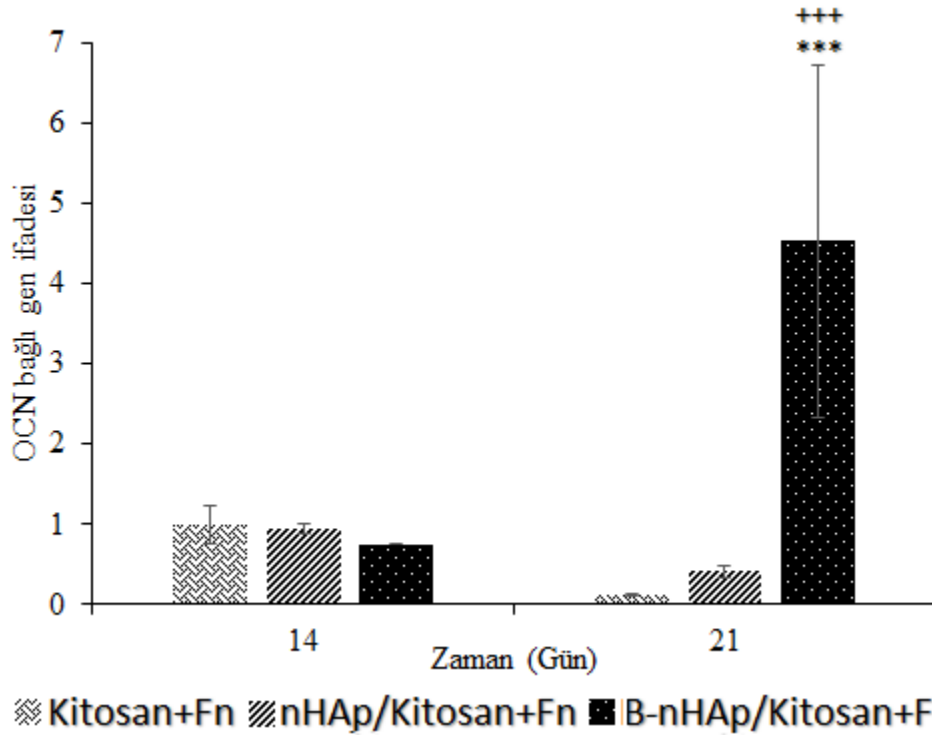


Şekil 4.27. Kitosan+Fn, nHAp/Kitosan+Fn ve B-nHAp/Kitosan+Fn üzerinde çoğalan iDPKH'lerine ait bağıl OPN gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3), kontrol grubu kitosan+Fn için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu nHAp/Kitosan+Fn için + p<0.05, ++ p<0.01,+++ p<0.001).

Olgun sementten ekstrakte edilen kemik sialoproteini, osteopontin ve osteonektin proteinin gingival fibroblastlar ile periodontal ligament hücrelerindeki sentezini uyarır ve hücre göçünü ve tutunmasını destekler. Sialoprotein ve osteopontin dışın sürmesi sırasında kök yüzeyi boyunca yerleşmiş hücreler tarafından eksprese edilir ve sementoblast progenitör hücrelerini sementoblastlara farklılaştırdığı düşünülmektedir. Ayrıca osteopontin, osteojenik farklılaşmanın geç dönemlerinde mineral kristallerinin büyümesini inhibe ederek negatif düzenleyici olarak görev yapar [207].

Doku iskeleleri üzerindeki hücrelerin OPN gen ifadeleri incelendiğinde (Şekil 4.27) 14. günde kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn iskeleler arasında gen ifadesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p<0.05). Yirmibirinci gün değerleri kendi içinde değerlendirildiğinde gen ifade seviyesinin B-nHAp/kitosan+Fn grubunda nHAp/kitosan+Fn ve kitosan+Fn grubundan yaklaşık olarak 5 kat arttığı

ve gruplar arasında gen ifadesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu gözlenmiştir ($p<0.01$).

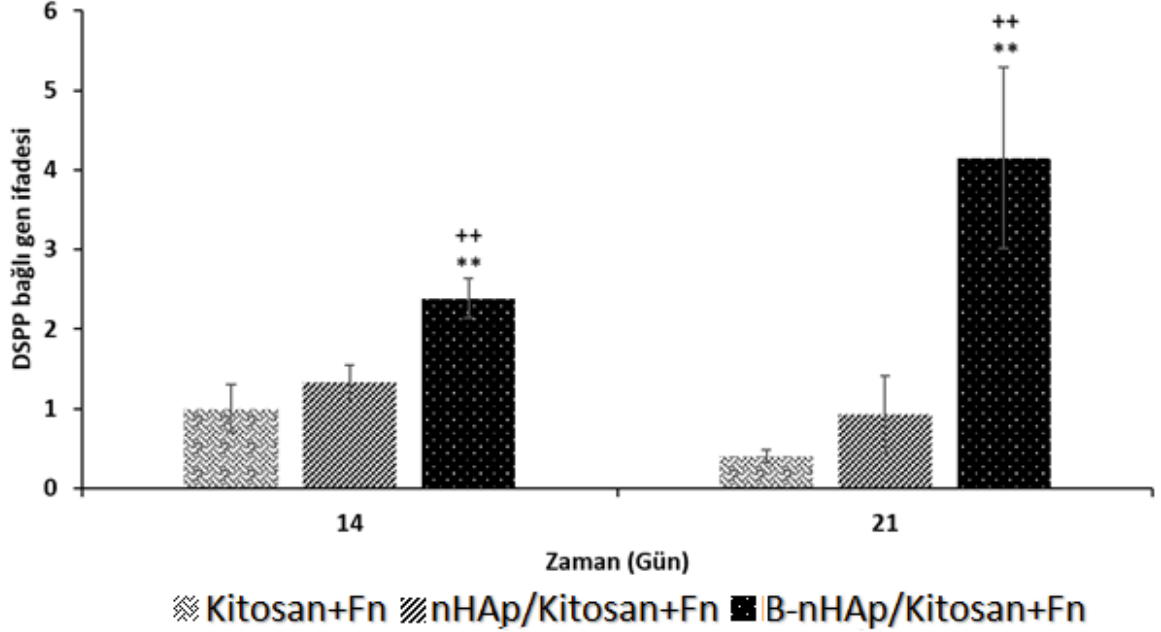


Şekil 4.28. Kitosan+Fn, nHAp/Kitosan+Fn ve B-nHAp/Kitosan+Fn üzerinde çoğalan iDPKH'lerine ait bağıtlı OCN gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, $n=3$), kontrol grubu kitosan+Fn için * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; kontrol grubu nHAp/Kitosan+Fn için + $p<0.05$, ++ $p<0.01$,+++ $p<0.001$).

Osteokalsin, kemik, dentin ve muhtemelen diğer mineralize dokuların organik matrikslerinde bulunan kalsiyum bağlayan proteindir [208]. Doku iskeleleri üzerindeki hücrelerin OCN gen ifadeleri incelendiğinde (Şekil 4.28) 14. günde kitosan+Fn, nHAp/kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn iskeleler arasında anlamlı bir fark olmadığı ve grupların hepsinde gen ifadesinin düşük olduğu görülmektedir. Yirmibirinci gün değerleri kendi içinde değerlendirildiğinde gen ifade seviyesinin B-nHAp/kitosan+Fn grubunda nHAp/kitosan+Fn grubuna göre yaklaşık 4 katına çıktığı ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu gözlenmiştir ($p<0.001$). Ayrıca gen ifade seviyesi B-nHAp/kitosan+Fn grubunda kitosan+Fn grubundan yaklaşık olarak 5 kat artmış ve iki grup arasında gen ifadesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0.001$).

Wei ve ark.[209] tarafından yapılan çalışmada iDPKH'lerin mineralizasyon kapasitesi ve odontoblast farklılaşmasına ait belirteçler incelenmiştir. Sonuç olarak

iDPKH'lerin *in-vitro* da 21 günlük odontojenik indükleyici varlığında ALP aktivitesinde artış gözleendiği saptanmıştır. Ayrıca RT-PCR ile OCN ve DSPP ekspresyonlarının zamana bağlı olarak indüksiyon ortamlarına göre arttığı saptanmıştır. Gronthos ve ark.[4] tarafından yapılan çalışmada iDPKH'ler için OCN ait ekspresyon miktarı yüksek olarak belirtilmiştir.



Şekil 4.29. Kitosan+Fn, nHAp/Kitosan+Fn ve B-nHAp/Kitosan+Fn üzerinde çoğalan iDPKH'lerine ait bağıl DSPP gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3), kontrol grubu kitosan+Fn için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; kontrol grubu nHAp/Kitosan+Fn için + p<0.05, ++ p<0.01,+++ p<0.001).

Dentinin oluşumunda önemli rol oynayan DSPP tek bir protein açığa çıkarır. Ancak bu protein, dentin sialoprotein (DSP) ve dentin phospho protein (DPP) adı verilen farklı işlevlere sahip iki proteine bölünür. DPP kollajen ve kalsiyuma bol miktarda bağlanarak ilk mineralleşmeyi gerçekleştirir. DSP dentin mineralizasyon başlamasını düzenler [210].

Qin ve ark.[211] tarafından yapılan çalışmada kemik yapısında 1/400 arasında DSPP izole edilmiştir. Ancak DSPP kemikte sentezlenmesine rağmen, odontojenik farklılaşma için oldukça spesifik bir belirteç olarak kabul edilir ve dentinogenez sırasında önemli bir rolü vardır.

Doku iskeleleri üzerindeki hücrelerin DSPP gen ifadeleri incelendiğinde (Şekil 4.29) 14. günde kitosan+Fn, nHAp/kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn iskeleler arasında gen ifadesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0.05$). Yirmibirinci gün değerleri kendi içinde değerlendirildiğinde gen ifade seviyesi B-nHAp/kitosan+Fn grubunda nHAp/kitosan+Fn grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p<0.01$). Ayrıca gen ifade seviyesi B-nHAp/kitosan+Fn grubunda kitosan+Fn grubundan istatistiksel olarak daha yüksektir ($p<0.01$).

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında, diş doku mühendisliği için mikrodalga yardımı ile hazırlanmış bor katkılı kitosan-nHAp nano kompozit doku iskeleleri geliştirilmiş ve bu matrislerin etkinliği in-vitro hücre kültürü çalışmalarıyla incelenmiştir. Bu amaçla, 20 yaş gömülü azı dişlerden elde edilen iDPK hücreleri nanokompozit doku iskeleler içerisinde kültüre edilerek bu hücrelerin odontojenik farklılaşmaları, incelenmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen önemli bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- Çalışmanın birinci aşamasında kitosan doku iskeleleri gözenekli ve içsel bağlantıları olan şekilde dondurarak-kurutma yöntemi ile hazırlanmıştır.
- Kitosan doku iskelelerinin odontoindüktif özelliğini artırarak diş doku oluşumunu desteklemesi amacıyla doku iskelelere yüzeylerine yapılacak olan nHAp ve B-nHAp kaplamalar için grubumuzca yapılan çalışmalarda belirlenen koşullarda ve sürelerde (600 W güç; 30sx9 tekrar) mikrodalga destekli biyomimetik yöntemi uygulanarak kemik benzeri nHAp ve B-nHAp ile kaplanmıştır.
- Kitosan bazlı doku iskelelerinin yüzey ve kesit morfolojileri SEM analizi ile incelenmiş ve iskelelerin yüzeyindeki nHAp ve B-nHAp kaplamanın varlığı gösterilmiştir.
- Doku iskelelerin yüzeyindeki nHAp ve B-nHAp kaplamanın varlığı yüzey alanı/hacim oranı nano-boyutta artırılmasına neden olmuştur.
- 20 yaş gömülü azı dişlerden elde edilen iDPK hücreleri mezenkimal kök hücre izolasyonu yapılmıştır. Hücrelerin morfolojileri F-Aktin/DAPI ve kristal viyole boyamaları ile incelenmiştir. Hücre proliferasyonu ve metabolik aktiviteleri MTT analizi ile takip edilmiştir.
- Gömülü üçüncü azı dişi pulpasından elde edilen mezenkimal kök hücrelerin multipotensi özellikleri osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmalar ile belirlenmiştir. Osteojenik farklılaşma ALP/vonKossa, kondrojenik farklılaşma Safranin O/Fast Green, adipojenik farklılaşma ise Oil Red O boyaması ile görüntülenmiştir.
- Osteojenik farklılaşmanın belirteçleri olan ALP aktivitesi ve mineralize nodüller ALP/vonKossa boyaması ile görüntülenmiştir. Boyamalar, osteojenik kültürün 14. Ve 28. günlerinde gerçekleştirilmiştir. Osteojenik

farklılaşmanın erken göstergelerinden olan ALP aktivitesi 14. günde iDPKH'lerinde yüksek iken 28. Günde beklendiği gibi azalmıştır. Ayrıca kontrol grubunda iDPKH'lerin boyanma sonrası mineralizasyonunu işaret eden herhangi bir boyanma görülmezken, osteojenik farklılaşma ortamı varlığında, hücreler arasında nodüller ve siyah-kahverengi mineralizasyon bölgeleri tespit edilmiştir.

- Safranin O/Fast Green boyaması ile kondrojenik farklılaşmanın belirteci olan glikozaminoglikanların varlığı tespit edilmiştir. Kültürün 28. gününde yapılan boyamalarda hücreler arasındaki ekstraselüler matris oluşumu kondrojenik farklılaşma ortamındaki hücrelerde belirgin iken kontrol grubunda böyle bir oluşuma rastlanmamıştır.
- Adipojenik farklılaşmanın belirlenmesi için Oil Red O boyaması yapılmıştır. Kültürün 56. gününde gerçekleştirilen boyamalarda, kontrol grubunda herhangi bir kırmızı boyanma görülmezken, adipojenik ortamda kültüre edilen hücreler Oil Red O ile boyanmış ve kırmızı yağ damlacıkları görüntülenmiştir.
- Hücrelerin kök hücrelere özgü yüzey antijenlerini taşıyıp taşımadığını kontrol etmek için beşinci pasajdaki iDPKH'lere akış sitometrisi analizi yapılmıştır. Hücrelerin CD90, CD166, CD44, CD29, CD73, CD105 işaretleyicileri için pozitif ve CD14, CD34, CD45, CD133, HLA-DR için fenotip negatif olduğu tespit edilmiştir.
- Tez kapsamında hazırlanan kitosan ve nanokompozit doku iskeleleri, hücre tutunmasını arttırdığı bilinen Fn ile modifiye edilerek doku iskelelerinin biyoaktivitesinin artırılması hedeflenmiştir. Doku iskelelerine fibronektin immobilizasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği, α -amino grubunun en karakteristik reaksiyonu olan ninhidrin yöntemi ile doku iskele yüzeylerine bağlanan amino grupların varlığı belirlenmiştir. Hücre kültürü çalışmaları fibronektin immobilize edilen ve edilmeyen olmak üzere dört farklı iskeleler ile gerçekleştirilmiştir.
- iDPKH'ler ile gerçekleştiren hücre kültür çalışmaları kapsamında yapılan Presto Blue ve SEM analizlerinde hücrelerin dört farklı iskele yüzeyine de tutunduğu, ancak kitosan iskele yüzeyinde tutunup, üremedikleri ve kitosan+Fn grubunda hücresel aktivitenin kültürün ilerleyen günlerinde azaldığı ve doku iskelesinde Fn varlığına rağmen kitosanın hücre

tutunmasını ve çoğalmasını desteklemediği belirlenmiştir. Ayrıca nHAp/kitosan+Fn ve özellikle B-nHAp/kitosan+Fn doku iskelelerinde doku iskelelerine ekilen hücrelerin Presto Blue değerleri 21. güne kadar artmakta ve 21. günde kültürdeki en yüksek değere ulaşmaktadır. Bu da iDPKH'lerin odontojenik farklılaşmaya doğru giderken mitokondriyal aktivitelerini ve hücre canlılıklarını koruduklarının göstergesidir.

- SEM analiz görüntüleri fibronektin immobilizasyonu yapılmış kitosan doku iskeleleri ile karşılaştırıldığı zaman, Fn'siz kitosan doku iskelesine çok az sayıda ve daha küçük boyuta sferoid oluşturdukları göstermiştir. Ayrıca iDPKH'lerin 2 farklı nHAp/kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn doku iskelesine de yapıştığı ve çoğaldığı ancak, hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin en yüksek olduğu örneklerin, bor içeren örnekler olduğu belirlenmiştir. SEM görüntülerinden, Presto Blue sonuçları ile paralel bir şekilde kültürün ikinci haftasında hücre yoğunluğunun B-nHAp/kitosan+Fn iskelelerinde nHAp/kitosan+Fn oldukça yüksek olduğunu göstermiştir. Bu durum borün iDPKH'lerin üremesini arttırdığını kanıtlamaktadır.
- iDPKH'lerin odontoblastik farklılaşması RT-PCR analizi ile incelenmiştir. Bu amaçla 14. ve 21. günlerde Odontojenik farklılaşma sırasında, alkalen fosfataz (ALP), runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (RunX2), kollajen-I (KOL-I), osteokalsin (OCN), osteopontin (OPN) ve dentin siyalofosfoprotein (DSPP) gibi osteoblastik/odontoblastik belirteçlerin ifadelerinde artış gözlenmektedir.
- Hücrelerin odontojenik farklılaşma özellikleri incelediğinde 14. günde nHAp/kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn doku iskelesinde ALP aktivitesi yüksek iken 21. günde ALP aktivitesi beklendiği gibi 14. güne göre azalmıştır. Ayrıca 21. günde ALP aktivitesi B-nHAp/kitosan+Fn grubunda diğer gruplara göre daha yüksektir. ALP aktivitesi, odontoblast/osteoblast farklılaşmasının erken bir göstergesi olduğu için, kültürün başında daha yüksek olması, ilerleyen günlerde ise azalması ve kalsiyum birikimlerinin ortaya çıkması beklenmektedir.
- Erken dönem farklılaşma belirteci olan Runx2 gen ifadelerinin, 14. günde nHAp/kitosan+Fn ve B-nHAp/kitosan+Fn gruplarında arttığı görülmektedir. Ancak 21. günde B-nHAp/kitosan+Fn iskelede Runx2 gen ifadesinde belirgin bir artış gözlenmiştir.

- Doku iskeleleri üzerindeki hücrelerin KOL-1 gen ifadeleri incelendiğinde 14. günde tüm gruplarda gen ifadesinin fazla olduğu görülmektedir. Ancak 21 . gün gen ifade seviyesi B-nHAp/kitosan+Fn grubunda yüksek olarak gözlenmiştir.
- Farklılaşmanın son dönemlerinde matrisin olgunlaşması süresince ifade olan OPN gen ifadeleri, B-nHAp/kitosan+Fn gruplarında 14. günde belirgin bir şekilde yükselmiş ve 21. günde en yüksek seviye ulaşmış. Geç dönem osteoblastik ve odontoblastik farklılaşma belirteci olan OCN gen ifadesi, en yüksek seviyesi B-nHAp/kitosan+Fn grubunda 21. gününde gözlenmiştir.
- Dentinin oluşumunda önemli rol oynayan DSPP gen ifadeleri incelendiğinde 14. günde B-nHAp/kitosan+Fn grubunda gen ifadesinin fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca 21 . gününde gen ifade seviyesi B-nHAp/kitosan+Fn grubunda en yüksek seviyeye ulaştığı gözlenmektedir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, B-nHAp/kitosan+Fn doku iskelelerinin iDPKH'lerin tutunmasını, yayılmasını, çoğalmasını desteklediği ve odontoblastik farklılaşma sürecini hızlandırdığı belirlenmiştir. Ayrıca bor katkılı nano hidroksiapatitin mezenkimal kök hücrelerin canlılığı ve odontojenik farklılaşması üzerine önemli derecede etkisinin olduğu gösterilmiştir. Hidroksiapatitin osteokondüktif etkisinin borun odontoindüktif etkisi ile güçlendirilmesinin diş kökenli mezenkimal kök hücrelerin odontojenik farklılaşmasını uyarabileceği belirlenmiştir.



21 Mayıs 2013

Sayı: 16969557 -569

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 24.04.2013 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2013/08
Proje No : GO 13/250 (Değerlendirme Tarihi (10.04.2013))
Karar No : GO 13/250 - 42

Üniversitemiz Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Arlin Kiremitçi'nin sorumlu araştırmacı olduğu Prof. Dr. Menemşe Gümüşdereliolu, Farzin Asghari Sana, Merve Çapkın Yurtsever, Gökçe Kaynak ve Tuğrul Tolga Demirtaş ile birlikte çalışacakları GO 13/250 kayıt numaralı ve "**Kitosan/Biyomimetik Nano Hidroksiapatit Doku İskelesi Kullanarak Diş Pulpa-Dentin Kompleksinin Rejenerasyonu**" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|---|--|
| 1. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan) | 9 Prof. Dr. Melahat Görduysus (Üye) |
| İZİNLİ | |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye) | 10. Prof. Dr. Cansın Saçkesen (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım Sara (Üye) | 11. Doç. Dr. R. Köksal Özgül (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Seyda F. Müftüoğlu (Üye) | 12. Doç. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmenster (Üye) | 13 Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) | İZİNLİ |
| İZİNLİ | 14. Prof. Dr Leyla Dinç (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Songül Vaizoğlu (Üye) | 14. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye) | 15. Av. Meltem Onurlu (Üye) |

KAYNAKLAR

- [1] Ozak ST, Ozkan P. Nanotechnology and dentistry, *European journal of dentistry*, 7, 145, **2013**.
- [2] Beşkardeş IG, Gümüşderelioğlu M. Biomimetic apatite-coated PCL scaffolds: effect of surface nanotopography on cellular functions, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 24, 507-24, **2009**.
- [3] Narvekar A, Sivakumar A, Ramamoorthi M. CYTOTOXIC EFFECTS OF RESTORATIVE BIOMATERIALS ON DENTAL PULP—A SYSTEMATIZED REVIEW, **2015**.
- [4] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 13625-30, **2000**.
- [5] Yu J, Deng Z, Shi J, Zhai H, Nie X, Zhuang H, et al. Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium, *Tissue engineering*, 12, 3097-105, **2006**.
- [6] Bluteau G, Luder H, De Bari C, Mitsiadis T. Stem cells for tooth engineering, *Eur Cell Mater*, 16, 1-9, **2008**.
- [7] Sloan AJ, Waddington RJ. Dental pulp stem cells: what, where, how?, *International Journal of Paediatric Dentistry*, 19, 61-70, **2009**.
- [8] Mitsiadis T, Feki A, Papaccio G, Catón J. Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury, *Advances in dental research*, 23, 275-9, **2011**.
- [9] Hacking S, Khademhosseini A. Applications of microscale technologies for regenerative dentistry, *Journal of dental research*, 88, 409-21, **2009**.
- [10] Yılmaz A. REJENERATİF ENDODONTİ,
- [11] Berkovitz BK, Holland GR, Moxham BJ. Oral anatomy, histology and embryology: Mosby; **2009**.
- [12] Nakabayashi N, Pashley DH. Hybridization of dental hard tissues: Quintessence Publishing (IL); **1998**.
- [13] Ten Cate A, Nanci A. Embryology of the head, face, and oral cavity, *Oral histology: development, structure, and function* (ed Ten Cate, AR), 16-43, **1989**.
- [14] Butler W. Dentin extracellular matrix and dentinogenesis, *Operative dentistry*, 18-23, **1991**.
- [15] Parameswaran A. Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry, *Journal of Conservative Dentistry*, 16, 480, **2013**.
- [16] Smith AJ, Smith JG, Shelton RM, Cooper PR. Harnessing the natural regenerative potential of the dental pulp, *Dental clinics of North America*, 56, 589-601, **2012**.
- [17] Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components, *Biomaterials*, 27, 2865-73, **2006**.
- [18] Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate, *Journal of dentistry*, 35, 636-42, **2007**.
- [19] Batouli S, Miura M, Brahimi J, Tsutsui T, Fisher L, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis, *Journal of Dental Research*, 82, 976-81, **2003**.
- [20] Collart-Dutilleul P-Y, Secret E, Panayotov I, Deville de Périère D, Martín-Palma RIJ, Torres-Costa V, et al. Adhesion and proliferation of human mesenchymal stem

cells from dental pulp on porous silicon scaffolds, *ACS applied materials & interfaces*, 6, 1719-28, **2014**.

[21] Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, et al., Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 3828-32, **1989**.

[22] Lynch SE. Tissue engineering: applications in oral and maxillofacial surgery and periodontics: Quintessence Publishing Company; **2008**.

[23] RE LSGRM. Tissue Engineering Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics, *Quintessence (xi) China*, **1999**.

[24] Gümüşderelioğlu M. MB, Karakeçili A., Kahraman A.S., Çakmak S., Tıgılı S., Demirtaş T.T. Doku mühendisliğinde nanoteknoloji, *Bilim ve Teknik*, 479 sayısının eki, **2007**.

[25] Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends, *Macromolecular bioscience*, 4, 743-65, **2004**.

[26] Heng BC, Cao T, Stanton LW, Robson P, Olsen B. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro, *Journal of Bone and Mineral Research*, 19, 1379-94, **2004**.

[27] Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications, *Veterinary Surgery*, 34, 415-23, **2005**.

[28] Maria O, Khosravi R, Mezey E, Tran S. Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications, *Oral diseases*, 13, 11-6, **2007**.

[29] Potten CS. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 353, 821-30, **1998**.

[30] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al., Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow, *Nature*, 418, 41-9, **2002**.

[31] Ford RNM. Using Pluripotent Germ Cells in Regenerative Medicine: An Ethical Alternative, *The national Catholic bioethics quarterly*, 3, 697-705, **2003**.

[32] Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschläger M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research?, *Human reproduction*, 18, 1489-93, **2003**.

[33] Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells, *Stem cells*, 23, 1549-59, **2005**.

[34] Murrell W, Féron F, Wetzig A, Cameron N, Splatt K, Bellette B, et al., Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa, *Developmental Dynamics*, 233, 496-515, **2005**.

[35] Li H, Liu H, Heller S. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear, *Nature medicine*, 9, 1293-9, **2003**.

[36] Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay R. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system, *Genes & development*, 10, 3129-40, **1996**.

[37] Niemann C, Watt FM. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis, *Trends in cell biology*, 12, 185-92, **2002**.

[38] Booth C, Potten CS. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells, *Journal of Clinical Investigation*, 105, 1493, **2000**.

[39] Zammit PS, Beauchamp JR. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell?, *Differentiation*, 68, 193-204, **2001**.

- [40] Chen Z, de Paiva CS, Luo L, Kretzer FL, Pflugfelder SC, Li DQ.Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia, *Stem Cells*, 22, 355-66, **2004**.
- [41] Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, et al.,Retinal stem cells in the adult mammalian eye, *Science*, 287, 2032-6, **2000**.
- [42] Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song K-H, Sharma A, et al.,In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 7999-8004, **2000**.
- [43] Lemire J, Shiojiri N, Fausto N.Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine, *The American journal of pathology*, 139, 535, **1991**.
- [44] Laugwitz K-L, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, et al.,Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages, *Nature*, 446, 934, **2007**.
- [45] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al.,Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue engineering*, 7, 211-28, **2001**.
- [46] Wu M, Wei Y-Q.Development of respiratory stem cells and progenitor cells, *Stem cells and development*, 13, 607-13, **2004**.
- [47] Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM.Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action, *Journal of endodontics*, 33, 377-90, **2007**.
- [48] Blau HM, Brazelton T, Weimann J.The evolving concept of a stem cell: entity or function?, *Cell*, 105, 829-41, **2001**.
- [49] Gardner R.Stem cells: potency, plasticity and public perception*, *Journal of Anatomy*, 200, 277-82, **2002**.
- [50] Weissman IL.Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution, *Cell*, 100, 157-68, **2000**.
- [51] Morscbeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O.Somatic stem cells for regenerative dentistry, *Clinical oral investigations*, 12, 113-8, **2008**.
- [52] Vishwanath VR, Nadig RR, Nadig R, Prasanna JS, Karthik J, Pai VS.Differentiation of isolated and characterized human dental pulp stem cells and stem cells from human exfoliated deciduous teeth: An in vitro study, *Journal of conservative dentistry: JCD*, 16, 423, **2013**.
- [53] d'Aquino R, Papaccio G, Laino G, Graziano A.Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration, *Stem cell reviews*, 4, 21-6, **2008**.
- [54] Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al.,SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 5807-12, **2003**.
- [55] Shi S, Bartold P, Miura M, Seo B, Robey P, Gronthos S.The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures, *Orthodontics & craniofacial research*, 8, 191-9, **2005**.
- [56] Karaöz E, Doğan BN, Aksoy A, Gacar G, Akyüz S, Ayhan S, et al.,Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth, *Histochemistry and cell biology*, 133, 95-112, **2010**.
- [57] Jo Y-Y, Lee H-J, Kook S-Y, Choung H-W, Park J-Y, Chung J-H, et al.,Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues, *Tissue engineering*, 13, 767-73, **2007**.

- [58] Gronthos S, Mrozik K, Shi S, Bartold P. Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential, *Calcified tissue international*, 79, 310-7, **2006**.
- [59] Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al., Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament, *The Lancet*, 364, 149-55, **2004**.
- [60] Handa K, Saito M, Yamauchi M, Kiyono T, Sato S, Teranaka T, et al., Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells, *Bone*, 31, 606-11, **2002**.
- [61] Mammen B, Ramakrishnan T, Sudhakar U. Principles of gene therapy, *Indian Journal of Dental Research*, 18, 196, **2007**.
- [62] Lemischka IR. Microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells, *Stem cells*, 15, 63-8, **1997**.
- [63] Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher L, Cherman N, Boyde A, et al., Stem cell properties of human dental pulp stem cells, *Journal of dental research*, 81, 531-5, **2002**.
- [64] Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2, *Journal of dental research*, 83, 590-5, **2004**.
- [65] Kim J-J, Bae W-J, Kim J-M, Kim J-J, Lee E-J, Kim H-W, et al., Mineralized polycaprolactone nanofibrous matrix for odontogenesis of human dental pulp cells, *Journal of biomaterials applications*, 0885328213495903, **2013**.
- [66] Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation, *Tissue engineering*, 12, 2813-23, **2006**.
- [67] Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, et al., A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB), *Journal of bone and mineral research*, 20, 1394-402, **2005**.
- [68] d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, et al., Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation, *Cell Death & Differentiation*, 14, 1162-71, **2007**.
- [69] Todorović V, Marković D, Milošević-Jovčić N, Petakov M, Balint B, Čolić M, et al., Dental pulp stem cells: Potential significance in regenerative medicine, *Stomatoloski glasnik Srbije*, 55, 170-9, **2008**.
- [70] Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells, *Journal of Dental Research*, 83, 523-8, **2004**.
- [71] Duailibi S, Duailibi M, Zhang W, Asrican R, Vacanti J, Yelick P. Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw, *Journal of dental research*, 87, 745-50, **2008**.
- [72] Huang GT-J, Shagramanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro, *Journal of endodontics*, 32, 1066-73, **2006**.
- [73] Ohazama A, Modino S, Miletich I, Sharpe P. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth, *Journal of dental research*, 83, 518-22, **2004**.
- [74] Sartaj R, Sharpe P. Biological tooth replacement, *Journal of anatomy*, 209, 503-9, **2006**.
- [75] Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Iida K, Hatakeyama D, et al., Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs, *Journal of dental research*, 87, 676-81, **2008**.

- [76] Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering, *Nature biotechnology*, 21, 1025-32, **2003**.
- [77] Yu J, Shi J, Jin Y. Current approaches and challenges in making a bio-tooth, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14, 307-19, **2008**.
- [78] Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men, *Annual review of cell and developmental biology*, 17, 435-62, **2001**.
- [79] Rao MS. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells, *Stem cells and development*, 13, 452-5, **2004**.
- [80] Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential, *Cytotherapy*, 5, 362-9, **2003**.
- [81] Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y, et al. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts, *Archives of oral biology*, 37, 1045-55, **1992**.
- [82] Martin-Rendon E, Watt S. Exploitation of stem cell plasticity, *Transfusion Medicine*, 13, 325-49, **2003**.
- [83] Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline, *International endodontic journal*, 29, 125-30, **1996**.
- [84] Kling M, Cvek M, Mejàre I. Rate and predictability of pulp revascularization in therapeutically reimplanted permanent incisors, *Dental Traumatology*, 2, 83-9, **1986**.
- [85] Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol?, *Journal of endodontics*, 30, 196-200, **2004**.
- [86] Kindler V. Postnatal stem cell survival: does the niche, a rare harbor where to resist the ebb tide of differentiation, also provide lineage-specific instructions?, *Journal of leukocyte biology*, 78, 836-44, **2005**.
- [87] Brazelton TR, Blau HM. Optimizing techniques for tracking transplanted stem cells in vivo, *Stem cells*, 23, 1251-65, **2005**.
- [88] Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy, *Cytokine & growth factor reviews*, 16, 369-76, **2005**.
- [89] Mooney DJ, Powell C, Piana J, Rutherford B. Engineering Dental Pulp-like Tissue in Vitro, *Biotechnology progress*, 12, 865-8, **1996**.
- [90] Bohl KS, Shon J, Rutherford B, Mooney DJ. Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 9, 749-64, **1998**.
- [91] Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation, *Nature medicine*, 3, 177-82, **1997**.
- [92] Beşkardeş IG, Demirtaş TT, Durukan MD, Gümüşderelioğlu M. Microwave-assisted fabrication of chitosan–hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, **2012**.
- [93] Dutta PK, Dutta J, Tripathi V. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63, 20-31, **2004**.
- [94] Bottino M, Kamocki K, Yassen G, Platt J, Vail M, Ehrlich Y, et al. Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics, *Journal of dental research*, 92, 963-9, **2013**.
- [95] Elisseeff J, Puleo C, Yang F, Sharma B. Advances in skeletal tissue engineering with hydrogels, *Orthodontics & craniofacial research*, 8, 150-61, **2005**.

- [96] Trojani C, Weiss P, Michiels J-F, Vinatier C, Guicheux J, Daculsi G, et al., Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel, *Biomaterials*, 26, 5509-17, **2005**.
- [97] Alhadlaq A, Mao JJ. Tissue-engineered osteochondral constructs in the shape of an articular condyle, *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 87, 936-44, **2005**.
- [98] Sanjana NE, Fuller SB. A fast flexible ink-jet printing method for patterning dissociated neurons in culture, *Journal of neuroscience methods*, 136, 151-63, **2004**.
- [99] Bellows C, Aubin J, Heersche J. Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro, *Endocrinology*, 121, 1985-92, **1987**.
- [100] Ito S, Suzuki N, Kato S, Takahashi T, Takagi M. Glucocorticoids induce the differentiation of a mesenchymal progenitor cell line, ROB-C26 into adipocytes and osteoblasts, but fail to induce terminal osteoblast differentiation, *Bone*, 40, 84-92, **2007**.
- [101] Nohutcu RM, McCauley LK, Koh AJ, Somerman MJ. Expression of extracellular matrix proteins in human periodontal ligament cells during mineralization in vitro, *Journal of periodontology*, 68, 320-7, **1997**.
- [102] Cheng S-L, Yang JW, Rifas L, Zhang S-F, Avioli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone, *Endocrinology*, 134, 277-86, **1994**.
- [103] Rutherford RB, Ryan ME, Kennedy JE, Tucker MM, Charette MF. Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys, *Journal of clinical periodontology*, 20, 537-44, **1993**.
- [104] Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study, *Journal of Endodontics*, 22, 311-6, **1996**.
- [105] Shrestha S, Diogenes A, Kishen A. Temporal-controlled Dexamethasone Releasing Chitosan Nanoparticle System Enhances Odontogenic Differentiation of Stem Cells from Apical Papilla, *Journal of endodontics*, **2015**.
- [106] Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry, *Odontology*, 99, 1-7, **2011**.
- [107] Smith A, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair?, *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 12, 425-37, **2001**.
- [108] Yang X, van den Dolder J, Walboomers XF, Zhang W, Bian Z, Fan M, et al., The odontogenic potential of STRO-1 sorted rat dental pulp stem cells in vitro, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 1, 66-73, **2007**.
- [109] Yang X, Zhang W, van den Dolder J, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, et al., Multilineage potential of STRO-1+ rat dental pulp cells in vitro, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 1, 128-35, **2007**.
- [110] Yang B, Chen G, Li J, Zou Q, Xie D, Chen Y, et al., Tooth root regeneration using dental follicle cell sheets in combination with a dentin matrix-based scaffold, *Biomaterials*, 33, 2449-61, **2012**.
- [111] Huang GT-J, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al., Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model, *Tissue Engineering Part A*, 16, 605-15, **2009**.

- [112] Wang J, Liu X, Jin X, Ma H, Hu J, Ni L, et al., The odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells on nanofibrous poly (L-lactic acid) scaffolds in vitro and in vivo, *Acta biomaterialia*, 6, 3856-63, **2010**.
- [113] d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, et al., Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes, *Eur Cell Mater*, 18, **2009**.
- [114] Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications, *Progress in polymer science*, 31, 603-32, **2006**.
- [115] Francis Suh J-K, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, *Biomaterials*, 21, 2589-98, **2000**.
- [116] Wise DL. Biomaterials and bioengineering handbook: Marcel Dekker New York, NY.; **2000**.
- [117] López-León T, Carvalho E, Seijo B, Ortega-Vinuesa J, Bastos-González D. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior, *Journal of Colloid and Interface Science*, 283, 344-51, **2005**.
- [118] Janes K, Calvo P, Alonso M. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules, *Advanced drug delivery reviews*, 47, 83-97, **2001**.
- [119] Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan, *Advanced drug delivery reviews*, 52, 105-15, **2001**.
- [120] Muzzarelli R, Baldassarre V, Conti F, Ferrara P, Biagini G, Gazzanelli G, et al., Biological activity of chitosan: ultrastructural study, *Biomaterials*, 9, 247-52, **1988**.
- [121] Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes, *Journal of biomedical materials research*, 51, 586-95, **2000**.
- [122] Huang CH, Tseng WY, Yao CC, Jeng JH, Young TH, Chen YJ. Glucosamine promotes osteogenic differentiation of dental pulp stem cells through modulating the level of the transforming growth factor- β type I receptor, *Journal of cellular physiology*, 225, 140-51, **2010**.
- [123] Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, Bernard GW. Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro, *Journal of periodontology*, 67, 1170-5, **1996**.
- [124] Tıǧlı RS, Karakeçili A, Gümüşderelioǧlu M. In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 1665-74, **2007**.
- [125] Lee Y-M, Park Y-J, Lee S-J, Ku Y, Han S-B, Klokkevold PR, et al., The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier, *Journal of periodontology*, 71, 418-24, **2000**.
- [126] Seol Y-J, Lee J-Y, Park Y-J, Lee Y-M, Rhyu I-C, Lee S-J, et al., Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation, *Biotechnology letters*, 26, 1037-41, **2004**.
- [127] Ho M-H, Wang D-M, Hsieh H-J, Liu H-C, Hsien T-Y, Lai J-Y, et al., Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds, *Biomaterials*, 26, 3197-206, **2005**.
- [128] Wang G-H. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan, *Journal of Food Protection*®, 55, 916-9, **1992**.

- [129] İkinci G, Şenel S, Akıncıbay H, Kaş S, Erciş S, Wilson C, et al., Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*, *International journal of pharmaceutics*, 235, 121-7, **2002**.
- [130] Singla A, Chawla M. Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects-an update, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 1047-67, **2001**.
- [131] Choi B-K, Kim K-Y, Yoo Y-J, Oh S-J, Choi J-H, Kim C-Y. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus* and *actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*, *International journal of antimicrobial agents*, 18, 553-7, **2001**.
- [132] Zheng L-Y, Zhu J-F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights, *Carbohydrate Polymers*, 54, 527-30, **2003**.
- [133] Omura Y, Shigemoto M, Akiyama T, Saimoto H, Shigemasa Y, Nakamura I, et al., Antimicrobial activity of chitosan with different degrees of acetylation and molecular weights, *Biocontrol science*, 8, 25-30, **2003**.
- [134] Jeon Y-J, Park P-J, Kim S-K. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor, *Carbohydrate Polymers*, 44, 71-6, **2001**.
- [135] No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *International journal of food microbiology*, 74, 65-72, **2002**.
- [136] Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering, *Biomaterials*, 26, 5983-90, **2005**.
- [137] Parhi P, Ramanan A, Ray AR. A convenient route for the synthesis of hydroxyapatite through a novel microwave-mediated metathesis reaction, *Materials letters*, 58, 3610-2, **2004**.
- [138] Murugan R, Ramakrishna S. Development of nanocomposites for bone grafting, *Composites Science and Technology*, 65, 2385-406, **2005**.
- [139] Hoepfner T, Case E. Physical characteristics of sintered hydroxyapatite, *Ceram Trans Vol 110*, 53-66, **1999**.
- [140] Xiao F, Ye J, Wang Y, Rao P. Deagglomeration of HA during the precipitation synthesis, *Journal of materials science*, 40, 5439-42, **2005**.
- [141] Newsley EHH. *Inorg Syn*, 7, 63, **1963**.
- [142] Cüneyt Tas A. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37 C in synthetic body fluids, *Biomaterials*, 21, 1429-38, **2000**.
- [143] Lim G, Wang J, Ng S, Chew C, Gan L. Processing of hydroxyapatite via microemulsion and emulsion routes, *Biomaterials*, 18, 1433-9, **1997**.
- [144] Tas AC. Combustion synthesis of calcium phosphate bioceramic powders, *Journal of the European ceramic society*, 20, 2389-94, **2000**.
- [145] Chen F, Wang Z-C, Lin C-J. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials, *Materials Letters*, 57, 858-61, **2002**.
- [146] Cao L-y, Zhang C-b, Huang J-f. Synthesis of hydroxyapatite nanoparticles in ultrasonic precipitation, *Ceramics International*, 31, 1041-4, **2005**.
- [147] Feng W, Mu-Sen L, Yu-Peng L, Yong-Xin Q. A simple sol-gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders, *Materials Letters*, 59, 916-9, **2005**.
- [148] Guo G, Sun Y, Wang Z, Guo H. Preparation of hydroxyapatite nanoparticles by reverse microemulsion, *Ceramics international*, 31, 869-72, **2005**.
- [149] Wang F, Li M-S, Lu Y-P, Qi Y-X, Liu Y-X. Synthesis and microstructure of hydroxyapatite nanofibers synthesized at 37 C, *Materials chemistry and physics*, 95, 145-9, **2006**.

- [150] Bajpai P, Fuchs C. Development of a hydroxyapatite bone grout, *Proceedings of the First Annual Scientific Session of the Academy of Surgical Research*, 50-4, **1985**.
- [151] Piattelli A, Trisi P, Passi P, Piattelli M, Cordioli G. Histochemical and confocal laser scanning microscopy study of the bone—titanium interface: an experimental study in rabbits, *Biomaterials*, 15, 194-200, **1994**.
- [152] Pasinli A. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler, *Makine teknolojileri elektronik dergisi*, 4, 25-34, **2004**.
- [153] PASĐNLD A, AKSOY RS. Yapay Kemik Uygulamaları İçin Hidroksiapatit, *Electronic Journal of BioTechnology*, 1, 41-51, **2010**.
- [154] Capello WN, D'ANTONIO JA, Feinberg JR, Manley MT. Hydroxyapatite-Coated Total Hip Femoral Components in Patients Less Than Fifty Years Old. Clinical and Radiographic Results after Five to Eight Years of Follow-up*, *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 79, 1023-9, **1997**.
- [155] Moss RL. Critical review, with an optimistic outlook, on Boron Neutron Capture Therapy (BNCT), *Applied Radiation and Isotopes*, 88, 2-11, **2014**.
- [156] Baker SJ, Ding CZ, Akama T, Zhang Y-K, Hernandez V, Xia Y. Therapeutic potential of boron-containing compounds, *Future medicinal chemistry*, 1, 1275-88, **2009**.
- [157] Barth RF, Coderre JA, Vicente MGH, Blue TE. Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects, *Clinical Cancer Research*, 11, 3987-4002, **2005**.
- [158] Nielsen FH. Biochemical and physiologic consequences of boron deprivation in humans, *Environmental health perspectives*, 102, 59, **1994**.
- [159] Gorustovich AA, Steimetz T, Nielsen FH, Guglielmotti MB. A histomorphometric study of alveolar bone modelling and remodelling in mice fed a boron-deficient diet, *Archives of oral biology*, 53, 677-82, **2008**.
- [160] Bailey P, Cousins G, Snow G, White A. Boron-containing antibacterial agents: effects on growth and morphology of bacteria under various culture conditions, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 17, 549-53, **1980**.
- [161] Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States, *Jama*, 298, 1763-71, **2007**.
- [162] Powers RA, Caselli E, Focia PJ, Prati F, Shoichet BK. Structures of ceftazidime and its transition-state analogue in complex with AmpC β -lactamase: implications for resistance mutations and inhibitor design, *Biochemistry*, 40, 9207-14, **2001**.
- [163] Hunt CD. Dietary boron: an overview of the evidence for its role in immune function, *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 16, 291-306, **2003**.
- [164] Benkovic SJ, Baker SJ, Alley M, Woo Y-H, Zhang Y-K, Akama T, et al. Identification of borinic esters as inhibitors of bacterial cell growth and bacterial methyltransferases, CcrM and MenH, *Journal of medicinal chemistry*, 48, 7468-76, **2005**.
- [165] Shirakata Y, Oda S, Kinoshita A, Kikuchi S, Tsuchioka H, Ishikawa I. Histocompatible healing of periodontal defects after application of an injectable calcium phosphate bone cement. A preliminary study in dogs, *Journal of periodontology*, 73, 1043-53, **2002**.
- [166] Pan H, Zhao X, Zhang X, Zhang K, Li L, Li Z, et al. Strontium borate glass: potential biomaterial for bone regeneration, *Journal of The Royal Society Interface*, 7, 1025-31, **2010**.

- [167] KOŞAY MC.Osteoporotik Omurga Kırıklarında Kullanılan Güçlendirici Materyaller, *Türkiye Klinikleri Journal of Orthopaedics and Traumatology Special Topics*, 1, 79-82, **2008**.
- [168] Gorustovich AA, López JMP, Guglielmotti MB, Cabrini RL.Biological performance of boron-modified bioactive glass particles implanted in rat tibia bone marrow, *Biomedical Materials*, 1, 100, **2006**.
- [169] Buket R.Matriks Metalloproteinaz Enzimleri ve Ateroskleroz, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 26, 527-37, **2006**.
- [170] Reynolds JJ, Meikle MC.Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis, *Periodontology 2000*, 14, 144-57, **1997**.
- [171] Sağlam M, Köşeoğlu S, Enhoş Ş.PERİODONTOLOJİDE BOR, *Journal of Health Sciences* 22(1), 70-5, **2013**.
- [172] Mavis B, Demirtaş TT, Gümüşderelioğlu M, Gündüz G, Çolak Ü.Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate, *Acta biomaterialia*, 5, 3098-111, **2009**.
- [173] Kaynak G. Mikroalga destekli çapraz bağlanma/çökeltme reaksiyonları ile Kitosan-HA doku iskelelerinin hazırlanması ve kemik doku mühendisliğinde kullanımının araştırılması, Hacettepe Üniversitesi,Ankara, **2012**.
- [174] Ekin. TÖ. Biyomimetik yöntemle bor katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi ve kemik doku mühendisliğindeki etkinliklerinin araştırılması Hacettepe Üniversitesi,Ankara, **2013**.
- [175] Tıgılı RS, Kazaroğlu NM, Maviş B, Gümüşderelioğlu M.Cellular behavior on epidermal growth factor (EGF)-immobilized PCL/gelatin nanofibrous scaffolds, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 22, 207-23, **2011**.
- [176] Akman AC, Tıgılı RS, Gümüşderelioğlu M, Nohutcu RM.bFGF-loaded HA-chitosan: A promising scaffold for periodontal tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92, 953-62, **2010**.
- [177] Yang X, Han G, Pang X, Fan M.Chitosan/collagen scaffold containing bone morphogenetic protein-7 DNA supports dental pulp stem cell differentiation in vitro and in vivo, *Journal of biomedical materials research Part A*, **2012**.
- [178] Lv KL, Zhang JX, Meng XC, Li XY. Remineralization effect of the nano-HA toothpaste on artificial caries. *Key Engineering Materials: Trans Tech Publ.* p. 267-70,2007.
- [179] Roveri N, Foresti E, Lelli M, Lesci IG.Recent advancements in preventing teeth health hazard: the daily use of hydroxyapatite instead of fluoride, *Recent Patents on Biomedical Engineering*, 2, 197-215, **2009**.
- [180] Yang X, Van der Kraan P, Bian Z, Fan M, Walboomers X, Jansen J.Mineralized tissue formation by BMP2-transfected pulp stem cells, *Journal of dental research*, 88, 1020-5, **2009**.
- [181] Tas AC, Bhaduri SB.Rapid coating of Ti6Al4V at room temperature with a calcium phosphate solution similar to 10x simulated body fluid, *Journal of materials research*, 19, 2742-9, **2004**.
- [182] Nielsen FH.The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle, *Nutrition*, 16, 512-4, **2000**.
- [183] Pan H, Zhao X, Zhang X, Zhang K, Li L, Li Z, et al.,Strontium borate glass: potential biomaterial for bone regeneration, *Journal of the Royal Society Interface*, rsif20090504, **2009**.
- [184] Gümüşderelioğlu M, Tunçay EÖ, Kaynak G, Demirtaş TT, Aydın ST, Hakkı SS.Encapsulated boron as an osteoinductive agent for bone scaffolds, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31, 120-8, **2015**.

- [185] Taşlı PN, Doğan A, Demirci S, Şahin F. Boron enhances odontogenic and osteogenic differentiation of human tooth germ stem cells (hTGSCs) in vitro, *Biological trace element research*, 153, 419-27, **2013**.
- [186] Nakamura M, Zhuang Z, Aizawa M. Fabrications of Boron-Containing Apatite Ceramics via Ultrasonic Spray-Pyrolysis Route and their Surface Properties. *Key Engineering Materials: Trans Tech Publ.* p. 109-13, 2013.
- [187] Kokubo T. *Bioceramics and their clinical applications*: Elsevier; **2008**.
- [188] Ternane R, Cohen-Adad MT, Panczer G, Goutaudier C, Kbir-Arigoib N, Trabelsi-Ayedi M, et al., Introduction of boron in hydroxyapatite: synthesis and structural characterization, *Journal of alloys and compounds*, 333, 62-71, **2002**.
- [189] Thein-Han W, Misra R. Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 5, 1182-97, **2009**.
- [190] Aday S, Gümüşderelioğlu M. Bone-like apatite-coated chitosan scaffolds: Characterization and osteoblastic activity, *Polymer Composites*, 31, 1418-26, **2010**.
- [191] Kong L, Gao Y, Lu G, Gong Y, Zhao N, Zhang X. A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *European Polymer Journal*, 42, 3171-9, **2006**.
- [192] Nielsen FH. Dietary fat composition modifies the effect of boron on bone characteristics and plasma lipids in rats, *Biofactors*, 20, 161-71, **2004**.
- [193] Nielsen FH, Stoecker BJ, Penland JG. Boron as a dietary factor for bone microarchitecture and central nervous system function. *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition*: Springer; 2007. p. 277-90.
- [194] Aanismaa R, Hautala J, Vuorinen A, Miettinen S, Narkilahti S. Human dental pulp stem cells differentiate into neural precursors but not into mature functional neurons, **2012**.
- [195] Carinci F, Papaccio G, Laino G, Palmieri A, Brunelli G, D'Aquino R, et al., Comparison between genetic portraits of osteoblasts derived from primary cultures and osteoblasts obtained from human pulpar stem cells, *Journal of Craniofacial Surgery*, 19, 616-25, **2008**.
- [196] Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al., Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT), *Cytotherapy*, 15, 641-8, **2013**.
- [197] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *science*, 284, 143-7, **1999**.
- [198] Choi S, Cho T-J, Kwon S-K, Lee G, Cho J. Chondrogenesis of periodontal ligament stem cells by transforming growth factor- β 3 and bone morphogenetic protein-6 in a normal healthy impacted third molar, *International journal of oral science*, 5, 7-13, **2013**.
- [199] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 8, 315-7, **2006**.
- [200] Atari M, Gil-Recio C, Fabregat M, García-Fernández D, Barajas M, Carrasco MA, et al., Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells, *Journal of cell science*, 125, 3343-56, **2012**.

- [201] Cheng N-C, Wang S, Young T-H. The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities, *Biomaterials*, 33, 1748-58, **2012**.
- [202] Yeh H-Y, Liu B-H, Sieber M, Hsu S-h. Substrate-dependent gene regulation of self-assembled human MSC spheroids on chitosan membranes, *BMC genomics*, 15, 10, **2014**.
- [203] Serigano K, Sakai D, Hiyama A, Tamura F, Tanaka M, Mochida J. Effect of cell number on mesenchymal stem cell transplantation in a canine disc degeneration model, *Journal of Orthopaedic Research*, 28, 1267-75, **2010**.
- [204] Komori T. Regulation of osteoblast and odontoblast differentiation by Runx2, *Journal of Oral Biosciences*, 52, 22-5, **2010**.
- [205] Hakki SS, Bozkurt BS, Hakki EE. Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1), *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24, 243-50, **2010**.
- [206] Avery JK, Steele PF. Essentials of oral histology and embryology: a clinical approach: Mosby; **2006**.
- [207] Huang JI, Kazmi N, Durbhakula MM, Hering TM, Yoo JU, Johnstone B. Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: A patient-matched comparison, *Journal of Orthopaedic Research*, 23, 1383-9, **2005**.
- [208] Hauschka PV, Lian JB, Cole D, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone, *Physiol Rev*, 69, 990-1047, **1989**.
- [209] Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells, *Journal of endodontics*, 33, 703-8, **2007**.
- [210] Gu K, Chang S, Ritchie HH, Clarkson BH, Rutherford RB. Molecular cloning of a human dentin sialophosphoprotein gene, *European journal of oral sciences*, 108, 35-42, **2000**.
- [211] Qin C, Brunn J, Cadena E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, et al., The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone, *Journal of Dental Research*, 81, 392-4, **2002**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Farzin Asghari Sana
Doğum Yeri : Urmia/İran
Medeni Hali : Evli
E-posta : farzin_sana@yahoo.com
Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara

Eğitim

Lise : İbn Sina Lisesi (1998)
Lisans : Tonekabon Azad Üniversitesi, Biyoloji Bölümü (2002)
Yüksek Lisans : İlahijan azad Üniversitesi, mikrobiyoloji Anabilim Dalı.(2005)
Doktora : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı (2016)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce – ileri derece
Farsça – ileri derece
Azerice – ileri derece
Türkçe – ileri derece

İş Deneyimi

- Araştırma Görevlisi – Payam noor Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biology Anabilim Dalı, Urmia, İRAN (ekim 2006 – 2008).

Deneyim Alanları

- Doku mühendisliği uygulamaları için kitosan doku iskelelerin üretimi ve kök hücrelerinin iskelelere tutunmasını incelemek
- Çocuk kan enfeksiyonlarının nedenleri
- Çocuk kan enfeksiyonlarının bakteri suşlarının tür ayrımı
- Antibiogram testleri

- Nanomateryallerin antibakteriyel özelliklerini analiz etmek

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

TÜBİTAK PROJESİ, Proje No: 114S755, Kitosan/biyomimetik bor nano hidroksiapatit doku iskelesinin diş pulpa-dentin kompleksinin rejenerasyonunda kullanılması, 200,000 TL.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

- Nano-Scale Interactions of Human Dental Pulp Stem Cells on Fibronectin Immobilized Chitosan Scaffolds (Yayına Hazırlanıyor).
- Pulp–Dentin Complex Regeneration by Boron Doped Biomimetic Nano Hydroxyapatite Coated Chitosan Scaffolds (Yayına Hazırlanıyor).

Diğer Yayınlar

- **Asgharisana, Farzin**, and Shahsanam Gaibi. "study of the role of common bacterial etiology in neonatal sepsis in Urumiah Shahid." New Cellular and Molecular Biotechnology Journal 1, no. 3 (2011): 17-21.
- Relevance between Helicobacter Pylory Infection and Therombocytopenia. Panahi O, **Asghari Sana F**, Derakhshan F. www.arpapress.com. 01/2011; vol2, Number 3.
- Helicobacter Pylory & Oral Cavity Inflammation. Panahi O, Rezaei S, Marzi.M, **Asgharisana F**. www.arpapress.com 01/2011; vol2.
- Gheibi, Shahsanam, Mohammad Karamyyar, Behrooz Ilkhanizadeh, **Farzin Asghari-Sana**, Hashem Mahmoodzadeh, and Amir Human Majlesi. "Coagulase negative Staphylococcus; the most common cause of neonatal septicemia in Urmia, Iran." Iranian journal of Pediatrics 18, no. 3 (2008): 237-243.
- Bacterial Etiology And Antibiotic Resistance Of Neonatal Sepsis . Mozafari NA, **Asghari Sana F**, Hoseyni Z, Med J Tabriz Uni Med Sci.2005;27(4):107-110.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- **Asghari Sana, F.**, Kaynak, G., Capkin Yurtsever, M., Ekin Tuncay, O., Kiremitci, Arlin, Gümüşderelioğlu, M., "Human Dental Pulp Stem Cell Attachment on Chitosan And Fibronectin Immobilized Chitosan Scaffolds" 10 th Nano Tr Conference, Istanbul, Turkey, 17-21 jun 2014 (Poster sunumu).
- **Asghari Sana, F.**, Kaynak, G., Capkin Yurtsever, M., Ekin Tuncay, O., Kiremitci, Arlin, Gümüşderelioğlu, M., "Pulp–Dentin Complex Regeneration by Boron Doped Biomimetic Nano Hydroxyapatite Coated Chitosan

Scaffolds” European Conference on Biomaterials, Krakow, Polonya, 30 August-3 Sep 2015 (Poster sunumu).

- **Asghari Sana, F.**, Kaynak, G., Capkin Yurtsever, M., Kiremitci, Arlin., Gümüşderelioğlu, M., “Applications of Nanoscale Technologies for Regenerative Dentistry” Asian Nano Forum Conference, Kish Island Iran, 8-11 Mart 2015 (Sözlü sunum).

Diğer Sunumlar

- Oyar, P., Durkan, r., Ozkır, S. E., **Asghari Sana,F.** The effect of silver nanoparticles (AgNps) on the flexural strength of polymethyl methacrylate acrylic resin. 47thMeeting of CED-IADR 15-17 October, Antalya, Turkey 2015 (Poster sunumu).
- Gheibi.SH, Fakoor.z, Karamyyar.M, Khashabi.J, Ilkhanzadeh.B, **Asgharisana.F**, Mahmoodzadeh.H, Majlesi.AH, Neonatal Septicemia In Oromieh .Iran: Bacterial Pathogens And Antibiotic SensitivityPattern.25th International Congress Of Pediatrics. agust 25-30,2007, Athens-Greece (Poster sunumu).
- **Asghari Sana.F.** Amir Mozafari,N. Gheybi ,S.Determination Of The Role Of The Coagulase Negative Staphylocococi In Neonatal Sepsis. 9st Iranian Congress of Microbiology Kerman Medical University. March5-7,2007, Kerman, Iran (Poster sunumu).
- **Asghari Sana.F.** Gheybi ,S. determination of the most common bacterial etiology in neonatal sepsis . the1st scientific congress of biology of payamenoor university .Tehran, Iran .18-19novamner, 2007, (Poster sunumu).
- **Asghari Sana.F.** Gheybi ,S.determination of the most common bacterial etiology in neonatal sepsis and antibiotic resistance. the1st scientific congress of biology of payamenoor university. Tehran,Iran .18-19novamner(2007) (Poster sunumu).
- **Asghari Sana.F.** reza rezaei, M.meybodi ,m. Heat resistance of listeria monocytogenes in diary products as efected by growth medium. the1st scientific congress of biology of payamenoor university. Tehran, Iran .18-19 novamner (2007) (Poster sunumu).
- Elahi mohamad,M. **Asghari Sana,F.** protease and amylase production of sreptomyces rimosus in submerged and solid state cultatinations. the1st scientific congress of biology of payamenoor university. Tehran,Iran .18-19novamner, 2007. (Poster sunumu).
- Elahi mohamad,M. **Asghari Sana,F.** survey important feature of ilmenite ore (FeTiO₃) Bioleaching with native thiobacillus ferooxidans strain. the1st

scientific congress of biology of payamenoor university. Tehran, Iran .18-19novamber, 2007. (Poster sunumu).

- Mohammadalizadeh,A. **Asghari Sana,F**.comparison measures plasma lipid between preeclampsia and normal pregnant womans. the1st scientific congress of biology of payamenoor university.Tehran, Iran.18-19novamber, 2007. (Poster sunumu).

Kurslar

- Workshop on "HACCP", Urmia Drug and Food Administration, 9-10 June 2006, Urmia, İRAN.
- Workshop on Spiral Plate, 9st Iranian Congress of Microbiology Kerman Medical University. March5-7, 2007, Kerman, İRAN.
- Workshop on Real time PCR, 9st Iranian Congress of Microbiology Kerman Medical University. March5-7, 2007, Kerman, İRAN.
- Workshop on "DUAL BEAM", 6-7 May 2010, Bilkent UNAM, Ankara, TÜRKİYE.
- Workshop on Nanocarriers, Asian Nano Forum Conference, 8-11 March 2015, Kish Island, İRAN.