

K.K.T.C
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİ LAKTİK ASİT BAZLI YAPI İSKELELERİNİN SÜT DİŞİ KÖK
HÜCRELERİNDEKİ OSTEOJENİK İNDÜKSİYONLARININ ÜÇ
BOYUTLU DEĞERLENDİRİLMESİ

DİŞ. HEK. AYLİN İSLAM

PEDODONTİ PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Serap ÇETİNER

LEFKOŞA
2017

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü' ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından Pedodonti Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri başkanı: Prof. Dr. Alev Alaçam
Gazi Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Serap Çetiner
Yakın Doğu Üniversitesi

Jüri: Prof. Dr. H. Seda Vatansever
Celal bayar Üniversitesi / Yakın Doğu Üniversitesi

Jüri: Prof. Dr. Sibel Yıldırım
Selçuk Üniversitesi

Jüri: Yrd. Doç. Dr. Emil Mammadov
Yakın Doğu Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Yakın Doğu Üniversitesi Lisanüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliği' nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İhsan Çalış
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yakın Doğu Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı' nı ikinci ailem olarak görmemi sağlayan, huzur dolu bir ortam yaratan, bana bu yolda benden fazla güvenerek, her zaman ve her koşulda yanımda bulunan, tez çalışma sürecim boyunca benimle birlikte koşuşturma çabası içerisinde olan, gece geç saatlere kadar benimle birlikte okulda kalarak tezimi çok büyük bir titizlikle okuyan, gerek diş hekimliği mesleği gerekse de hayat tecrübelerinden birçok şey öğrendiğim ve öğrenmeye devam edeceğim, öğretmenim olmasından büyük şans ve gurur duyduğum canım öğretmenim (ikinci annem) ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Serap Çetiner' e,

Kıbrıs' a ve Yakın Doğu Üniversitesi' ne gelişini hem kendim hem de bu alanda olan herkes için büyük bir şans olarak gördüğüm, ' akademik hayatta etik işleyişini', 'hem hayat hem de mesleki alanda bilgi aktarımı cömertliğini' ve 'iyi niyetliliğini' birebir öğrenerek hissettiğim, mesafe farkı olmaksızın bana güvenerek, yeri geldiğinde telefon yazışmaları ile 'Kök Hücre Kültürü' nü öğreten canım hocam Sayın Prof. Dr. H. Seda Vatansever' e,

Her koşulda kapısı her an herkese açık olan, sorunlarımı her zaman dinleyerek, geçiştirmeden, doğru yolu gösteren, elini her zaman omzunda hissettiğim ve hissedeceğim Sayın Prof. Dr. Tamer Şanlıdağ' a,

Değerli bilgilerini bizimle paylaşarak; hem tez sürecim boyunca hem de yayın aşamasında, uzun saatler boyunca bana zaman ayırarak ilgilenen, yeri geldiği zaman benimle birlikte sorunlara çare arayan çok değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Emil Mammadov' a,

Tez izleme jürimde bulunmayı kabul ederek beni onurlandıran, araştırmalarının tezime ışık tuttuğu, değerli hocalarım; Sayın Prof. Dr. Alev Alaçam ve Prof. Dr. Sibel Yıldırım' a,

Pedodonti Anabilim Dalı' na girerek doğru bir seçim yaptığımı, paylaşmayı, arkadaşlığı, huzur ve mutluluğu yaşadığım, hem iyi hem de kötü günlerimi benimle birlikte yaşayan, uzakta olsalar bile arayıp soran sevgili bölüm ve kat arkadaşlarım; Yrd. Doç. Dr. Leman Mut (Leman ablam), Yrd. Doç. Dr. Nermin Yönel (Nerminko), Dr. Sıla Korun (Sılakom), Dr. Özkem Azmi Öge (The Bestiem), Dr. Hamit Tunç, Dr. Serenad Genç ve Dr. Tolga Şakar' a,

Bu hayatta beraber kahkahalar atmayı sevdiğim ve özlediğim değerli insanlardan biri olan, sınırsız vergililiği ve içten gülüşleriyle her zaman koşulsuz yanımda olan canım bölüm arkadaşım Dr. Ferdiye Küçük' e,

Tez çalışmam süresince benimle birlikte uğraşan ve çalışma saatleri dışında olması halinde, benim için kalarak; fazla mesai yapan, çok güzel bir disiplin ve işleyişin olduğu bir laboratuvar sağlayan DESAM Doku ve Hücre Kültür Laboratuvar' ı sorumlusu Yrd. Doç. Dr. Eda Becer' e ve her zaman güleryüzü ile beni karşılayan, becerikli laboratuvar asistanımız Nadire Kıyak' a,

Hayatımda her zaman 'İYİ Kİ' olarak hatırladığım ve hatırlayacağım, kötü günlerimde hep yanımda olarak, koşulsuz sevgilerini bana hissettiren olmazsa olmazlarım Cansu Kızılyürek, Kemal Yazgın ve Salih Uluşan' a,

Her zaman görüşmesek bile aramızdaki kuvvetli bağlılıkla hep kaldığımız yerden devam edebildiğimiz, kahkahalar attığımız, beraber güldüğümüz, beraber ağladığımız, mutluluklarımızda hep birbirimizin yanında olduğumuz ve olacağımız değerlilerim Derya Büyükhoca, Hazal Terzioğlu ve Ülviye Arıtman' a,

Değerli ve güleryüzlü çalışanlarımız Dilek Tüfekçi, Sultan Mevlüt (Sultan ablam) ve Ayşe Kışmir' e (Ayşe ablam),

Bu zorlu ve bir o kadar da yoğun olan tez sürecinde , zaman zaman kızgınlıkları olsa bile her zaman destek veren yol arkadaşım, hayatımın hep var olacak olan parçası Orkem Yazgın' a,

Ve en son olarak; bugünlere gelmemde gerek maddi gerekse de manevi olarak yardımlarını benden esirgemeyen, iyi veya kötü, hatalı veya haklı her koşulda yanımda bulunarak bana doğru yola gitmem için ışık tutan, böyle bir aileye sahip olduğum için her zaman gurur duyduğum, zorlu hayat koşullarında en güvenli sığındığım liman olan canım ailem, canım annem Ayşe İslam'a, canım babam Salih İslam'a, canım ablam Ayşin İslam Boğaç'a ve varlığı ile hayatımıza neşe getiren, bir sarılması ile bütün stresimi alan minik hayat ışığım Arelikkom' a, bütüm kalbimle teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

İslam, A. Poli Laktik Asit Bazlı Yapı İskelelerinin Süt Dişi Kök Hücrelerindeki Osteojenik İndüksiyonlarının Üç Boyutlu Değerlendirilmesi. Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Pedodonti Programı, Doktora Tezi, Lefkoşa, 2017.

Çalışmamızın amacı; iki boyutlu standart kültür ortamı ve PLA bazlı yapı iskelelerinin yer aldığı üç boyutlu kültür ortamına konan hSHEDs' in bu ortamlardaki; osteojenik farklılaşmalarını karşılaştırmak ve PLA bazlı yapı iskelelerinin hücrelerin osteojenik farklılaşmasını destekleyip desteklemediğini araştırmaktır. 6 ve 11 yaş aralığındaki on adet sağlıklı çocuktan alınan süt dişlerinin pulpal dokusu ekstrakte edilmiştir. Sonrasında, izole edilen hSHEDs 4 adet deney grubuna bölünmüşlerdir. İlk grup, sadece standart kültür ortamında kültüre edilen hSHEDs' in oluşturduğu Kontrol grubu, ikinci grup osteojenik farklılaşma ortamına konularak indüklenen hSHEDs' den meydana gelen grup, üçüncü grup farklılaşmamış hSHEDs' in aktarıldığı üç boyutlu PLA bazlı yapı iskelelerinin yer aldığı grup ve dördüncü grup ise üç boyutlu PLA bazlı yapı iskeleleri ile osteojenik farklılaşma ortamı altında kültüre edilen hSHEDs' den oluşturulmuş gruptur. Tüm deney grupları immünohistokimyasal olarak analiz edilmiş ve HSCORE yöntemi kullanılarak immünoreaksiyon yoğunlukları ölçülmüştür. PLA bazlı yapı iskeleleri üzerindeki 14 gün ve 21 gün kültür periyotları ile kültüre edilen hSHEDs' in osteojenik farklılaşmaları, histokimyasal ve immünohistokimyasal analizlerle belirlenmiştir. Çalışma bulgularında, genel olarak, OCN immünreaksiyonları ON' e göre daha yüksek bulunmuştur. OCN immünreaksiyonlarının, ON' e göre daha yoğun olmasına rağmen; 14 gün ve 21 gün kültür periyotları arasında grup 4' te ($497,3 \pm 0,57$ and $486,7 \pm 5,77$, sırası ile) ölçülen değerler

arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). 14 günlük kültür periyodu sonrasında Grup 4'te ölçülen ON yoğunluğunun $280, 0 \pm 10$ olmasına rağmen, bu değer Grup 2' de $206, 7 \pm 5, 77$ olarak ölçülmüş ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). Araştırmamızda; ekfoliasyon zamanı gelmiş süt dişlerinden başarılı bir şekilde hSHEDs izole edilmiş ve PLA bazlı yapı iskelelerinde artmış değerlerde ölçülen ON ve OCN ekspresyonları ile birlikte PLA' nın hSHEDs' in osteojenik indüksiyonu için uygun bir yapı iskelesi materyali olduğu gösterilmiştir. 14 günlük ve 21 günlük kültür periyotlarında meydana gelen ekspresyon paternleri izlendiğinde, 14 günlük kültivasyon periyodunun, PLA veya PLA' sız ortamda bulunan hSHEDs' in osteoblastlara farklılaşabilmeleri için yeterli bir süre olduğu saptanmıştır. Bulgularımız ışığında; PLA bazlı yapı iskelelerinin hasar görmüş dokularda doğal bir rejenerasyon için gerekli mikroçevreyi yaratabileceği ve sahip oldukları biyomekanik özellikleri ile diş hekimliği alanında uygulanacak doku mühendisliği için uygun bir alternatif tedavi seçeneği olabilecekleri düşünülmüştür. Özetle; hSHEDs – PLA bazlı yapı iskele kombinasyonlarının, yakın gelecekte rejeneratif diş hekimliği için iyi bir osteojenik dolgu materyali olabilecekleri sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: osteojenik farklılaşma, poli (laktik asit) bazlı yapı iskeleleri, rejeneratif diş hekimliği, ekfoliye olmuş insan süt dişlerinden elde edilen kök hücreler, doku mühendisliği.

Destekleyen Kurum: Yakın Doğu Üniversitesi (Proje no.: YDÜ/CE101- 2016).

ABSTRACT

İslam, A. Three Dimensional Evolution of Poly Lactic Acid Scaffolds' Osteogenic Induction on Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth. Near East University, Institute of Health Sciences, PhD Thesis in Paediatric Dentistry, Nicosia, 2017.

The aim of this study was to investigate the osteogenic induction ability of PLA scaffolds and compare the osteogenic differentiation behavior of hSHEDs in standard culture medium and on PLA scaffolds. The pulp tissues of deciduous teeth used in this study were taken from ten healthy children between 6 and 11 years old. Isolated hSHEDs were divided to 4 groups. First group was control group where the cells were only cultivated in standard culture medium (Group 1), second group was differentiated into osteogenic lineage using osteogenic differentiation medium (Group 2), third group was non-differentiated group which was transferred into 3D printed PLA scaffolds (Group 3) and the fourth group was differentiated into osteogenic lineage and was transferred into 3D printed PLA scaffolds (Group 4). All groups were analyzed by immunohistochemically and immunolabeling was evaluated semi-quantitatively using the HSCORE. Cultivation of hSHEDs on PLA scaffolds for 14 and 21 days, osteogenic differentiation was detected both histochemically and immunohistochemically. Generally, OCN immunoreactivities were found higher than ON immunoreactions in all groups. Although the higher OCN immunoreactivities, the intensities of OCN between 14 days and 21 days in group 4 ($497, 3 \pm 0,57$ and $486,7 \pm 5,77$, respectively) were detected as similar ($p > 0.05$). While the intensity of ON was $280, 0 \pm 10$ in group 4, in group 2 intensity of ON was $206, 7 \pm 5, 77$ at 14 days and these results were statistically significant ($p < 0.0001$). In the current study, we successfully

managed to isolate stem cells from human exfoliated deciduous teeth and the expressions of ON and OCN were found to be increased in PLA scaffolds which shows that PLA is a suitable scaffold material for the osteogenic induction of the hSHEDs. The expression patterns of both markers at 14 and 21 days show that 14 day cultivation period is adequate for hSHEDs with/without PLA scaffolds to differentiate into osteoblasts. It can be suggested that PLA scaffolds can generate '*remodeling*' in destroyed tissues and their biomechanical properties can be a suitable alternative for dental tissue engineering. Summing up, the hSHEDs – PLA scaffold combination seems to be a potentially good osteogenic filling material for regenerative dentistry in the near future.

Keywords: osteogenic differentiation, poly (lactic acid) (PLA) scaffold, regenerative dentistry, stem cells from human exfoliated deciduous teeth, tissue engineering.

Supported by Near East University (Grant no: NEU / CE101 – 2016).

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Doku Mühendisliği Prensiplerinin Temel Yapısı: Kök Hücreler	5
2.2 ‘Kök Hücre’ Teriminin İlk Kez Kullanımı ve Günümüze Kadar Gelen Tarihsel Gelişim Süreci	6
2.3 Kök Hücrelerin Çeşitli Özelliklerine Göre Sınıflandırılmaları	12
2.3.1 Kök Hücrelerin Genel Sınıflandırmaları (Gelişimsel Sınıflandırma).....	12
2.3.2 Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerine Göre Sınıflandırılmaları	14
2.3.3 Kök Hücrelerin Köken Aldıkları Dokulara Göre Sınıflandırılmaları	16
2.4 Kraniyofasiyal ve Dental Embriyolojik Gelişim Süreçleri ile Dental Dokuların Genel Yapıları ve Kök Hücre Varlıkları	17
2.5 Dental Dokulardan Elde Edilen Kök Hücreler	22
2.5.1 Dental Pulpa Kök Hücreleri (DPSCs).....	22
2.5.2 Eksfoliye Olmuş İnsan Süt Dişlerinden Elde Edilen Kök Hücreler (hSHEDs)	26
2.5.3 Apikal Papilla Kaynaklı Kök Hücreler (SCAPs).....	31
2.5.4 Periodontal Ligament Kaynaklı Kök Hücreler (PDLSCs)	32
2.5.5 Dental Foliküllerin Progenitör Hücreleri (DFPCs).....	33
2.6 Dental Kaynaklı Kök Hücrelerin (DSCs) Alternatif ve Talep Edilir Kök Hücre Kaynakları Olarak Kabul Edilmelerinin Nedenleri.....	35

2.7 Dental Pulpa Kaynaklı Kök Hücrelerin Terapötik Amaçlı Klinik Kullanımları	35
2.7.1 Korneal Rejenerasyon.....	36
2.7.2 Miyokard Enfarktüs Tedavisi	36
2.7.3İskemi Tedavisi	36
2.7.4Musküler Distrofi.....	37
2.7.5Nörodejeneratif Hastalıklar (Alzheimer, Parkinson vb.).....	37
2.7.6 Karaciğer Rahatsızlıklarında Hepatositlerin Rejenerasyonu	37
2.7.7 Kraniyofasiyal Doku Rejenerasyonları.....	38
2.7.8İnfertilite Tedavisi.....	38
2.7.9Tip 1 Diabet Tedavisi.....	39
2.8 Kök Hücre Bazlı Tedavilerin Diş Hekimliğinde İnterdisipliner Kullanımları ve ‘Rejeneratif Diş Hekimliği’	39
2.8.1Dentin- Pulpa Kompleksinin Rejenerasyonu	39
2.8.2 Endodontik Rejenerasyon.....	40
2.8.3 Periodontal Rejenerasyon	41
2.8.4 Tüm Diş (Biyomühendislikle elde edilmiş) Rejenerasyonu	41
2.8.5 Tükürük Bezlerinin Rejenerasyonu.....	42
2.8.6 Temporomandibular Eklem (TME) Rahatsızlıklarının Tedavisi	42
2.9 Doku Mühendisliği ve Kök Hücre Bazlı Tedavilerde Yapı İskeleleri ve Üç Boyutlu Baskı Yöntemleri.....	43
2.9.1 Üç Boyutlu Baskı Yöntemi.....	43
2.9.2 Üç Boyutlu Baskı Yönteminin Çalışma Prensibi	43

2.9.3 Baskı Yöneminin Keşfi ve Üç Boyutlu Yöntemlerin Gelişimi	44
2.9.4 Üç Boyutlu Baskı Yönteminin Kullanım Alanları.....	45
2.9.5 Üç Boyutlu Baskı Yönteminin Rejeneratif Diş Hekimliği ve Diş Hekimliğinde Kullanım Alanları.....	45
2.9.6 Üç Boyutlu Baskı Yöntemi İle Elde Edilen Yapı İskeleleri.....	46
2.9.7 İdeal Bir Yapı İskelesinin Taşınması Gereken Özellikler	48
2.9.8Yapı İskelelerinin Sınıflandırılması.....	49
2.9.9Yapı İskelelerini Oluşturan Biyomateryallerin Taşıdığı Temel Özellikler	50
2.9.10 Yapı İskelelerinin Fabrikasyon Metotları ve İskelelerin Dizaynında Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar.....	51
2.9.11 3D Yöntemler ile Dizayn Edilen Yapı İskelelerinin Avantajları ve Hücre Kültivasyon Sistemleri için Yarattıkları Çevre	55
3.GEREÇ VE YÖNTEM	57
3.1Araştırmaya Dahil Edilecek Hasta ve Diş Seçim Kriterleri.....	57
3.2 Araştırma için Oluşturulan Hipotezler	57
3.3hSHEDs' in İzolasyonları ve Primer Kültivasyonları.....	58
3.3.1 Pulpal Yapıların Enzimatik Ayrışımalarının Yapılması	60
3.3.2 Enzimatik Olarak Ayrıştırılmış Pulpal Yapıların Primer Kültür Ortamına Alınmaları	61
3.4hSHEDs' in Pasajlanma Prosedürü	65
3.5 Araştırmada Kapsamında Oluşturulan Kontrol ve Deney Grupları.....	65
3.6 Polilaktik Asit Bazlı Yapı İskelelerinin Fabrikasyonları ve Morfolojik Karakterizasyonları	66

3.7 hSHEDs' in İmmünohistokimyasal Deneyler ile Moleküler Karakterizasyon Analizleri	68
3.8hSHEDs' inIn Vitro Kültür Ortamında Osteojenik İndüksiyonları	70
3.9Farklılaştırma Yapılmış veya Yapılmamış hSHEDs – Üç Boyutlu Pla Bazlı İskelelerin Işık Mikroskobu Analizleri	71
3.10 İstatistiksel Analiz	74
4.BULGULAR	75
4.1 hSHEDs' in Kültivasyonu	75
4.2 hSHEDs' in Osteojenik Farklılaşmaları	79
4.2.1 hSHEDs' in Osteojenik Analizleri	79
4.2.2Üç Boyutlu PLA Bazlı Yapı İskelelerine Aktarılmış ve Osteojenik Olarak İndüklenmiş hSHEDs' inAnalizleri	83
4.3 Araştırma İçerisinde Yer Alan Deney Gruplarında Saptanan HSCORE Değerleri ve İstatistiksel Analiz Bulguları	89
4.4 PLA Bazlı Yapı İskelelerinde Gözlemlenen Kültür Sonrası Değişiklikler	97
5.TARTIŞMA.....	98
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	114
KAYNAKLAR	119
EKLER	
Ek-1 Etik Kurul Onayı	
YAYINLAR	

SİMGELER VE KISALTMALAR

MÖ	Milattan önce
yy	Yüzyıl
hSHEDs	Eksfoliye olmuş insan süt dişlerinden elde edilen kök hücreler
SHEDs	Eksfoliye olmuş süt dişlerinden elde edilen kök hücreler
3D	Üç boyutlu
PLA	Poli laktik asit
HSCs	Hematopoietik Kök Hücreler
MSCs	Mezenkimal Kaynaklı Kök Hücreler
BMMSCs	Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler
WHO	Dünya sağlık Enstitüsü (<i>Who Health Organisation</i>)
DPSCs	Dental Pulpa Kaynaklı Kök Hücreler
PDLSCs	Periodontal Ligament Kök Hücreler,
DFSCs	Dental Folikül Kök Hücreleri
SCAPs	Apikal Papilla Kök Hücreleri
GMSCs	Dişeti Kaynaklı Kök Hücreler
ESCs	Embriyonik Kök Hücreler
ASCs	Yetişkin Kök Hücreler
NSCs	Nöral Kök Hücreler
TSCs	Totipotent Kök Hücreler
PSCs	Pluripotent Kök Hücreler
iPSs	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler
DFs	Dermal Fibroblastlar
FSSC	<i>Feline Spermatogonial Stem Cells</i>
USSC	<i>Unrestricted Somatic stem Cells</i>
DP	Dental Papilla
IDE	İç Dental Epitel

HERS	<i>Hertwig</i> Epitelyal Kök Kını
PDL	Periodontal Ligament
ECM	Ekstrasellüler Matriks
VPT	Vital Pulpa Tedavileri
GINGSCs	Dişeti Bağ Dokusu Kaynaklı Kök Hücreler
OPSCs	Oral Periosteum Kaynaklı Kök Hücreler
NCSCs	Nöral Krista Kök Hücreleri
ALS	Amyotrofik Lateral Sklerozis
DFPCs	Dental Foliküllerin Progenitör Hücreleri
DSCs	Dental kaynaklı Kök Hücreler
MI	Miyokard enfarktüsü
KH	Kalsiyum Hidroksit
MTA	Mineral Trioksit Agregat
TME	Temporomandibular Eklem
3D	Üç Boyutlu
CT	Bilgisayarlı tomografi (<i>computerized tomography</i>)
MR	Manyetik Rezonans
RP	Hızlı Prototip (<i>Rapid prototyping</i>)
2D	İki boyutlu
PLGA	Poli-glikolik Asit
GAG	Glikozaminoglikan
PRP	Trombositten Zengin Plazma (<i>Platelet Rich Plasma</i>)
PLA	Polilaktik Asit
PCL	Polikaprolakton
PLG	Poliglikolid
PLGA	Polilaktik- Ko- Glikolik Asit
PU	Poliüretan

TPU	Termoplastik Poliüretan
TCP	Trikalsiyum Fosfat
HA	Hidroksiapatit
CNT	Karbon nanotüp (<i>Carbone nanotube</i>)
SFF	Katı serbest Form Fabrikasyon (<i>Solid Free Form</i>)
SLA	Stereolitografi (<i>Stereolithography</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDM	Füzyona Uğramış Filament Fabrikasyon (<i>Fused Deposition Modeling</i>)
3D Printing	Üç Boyutlu Baskı Yöntemi
FBS	Fetal Bovin Serum (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
mm	milimetre
mg	miligram
ml	mililitre
μm	mikrometre
cm ³	santimetreküp
mm ³	milimetreküp
°C	santigrat derece
%	yüzde
FBS	Fetal Bovin Serum
RPM	<i>Revolution Per Minute</i>
P3	Üçüncü Pasaj
IHC	İmmünohistokimyasal
ABC	Avidin-Biotin Kompleksi (<i>Avidin-Biotin Complex</i>)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
DAB	<i>Diaminobenzidine</i>

h	Hafta
M	Molarite
μ	Mikron
OCN	Osteokalsin (<i>Osteocalcin</i>)
ON	Osteonektin (<i>Osteonectin</i>)
P1	Birinci pasaj
P2	İkinci Pasaj
PEG	Polietilen Glikol
PLLA	Poli L- Laktik Asit
TEM	<i>Transmission Electron Microscope</i>
CaP	Kalsiyum Fosfataz
BG	<i>Bioglass</i>
NS	Fark Yok / <i>No Significance</i>

ŞEKİLLER

Şekil 2.2.1: Ağız ve Dental Dokularda Yer Alan Çeşitli Kök Hücre Kaynakları

Şekil 3.3.1: Bukkal ve Lingual Yüzeylerinde Yivler Açılmış Süt Dişi

Şekil 3.3.2 : Ekstirpe Edilmiş Kronal Dental Pulpa

Şekil 3.3.3: Ultraviyole Cihazı

Şekil 3.3.4: Su Banyosu

Şekil 3.3.1.1 : Kollejenaz

Şekil 3.3.1.2: Mavi Filtre

Şekil 3.3.1.3: İnkübatör

Şekil 3.3.2.1: Fetal Bovin Serum

Şekil 3.3.2.2: L-Glutamin

Şekil 3.3.2.3 : Penisilin + Streptomisin Karışımı

Şekil 3.3.2.3: Gentamisin

Şekil 3.3.2.4: *Amphotericin – B*

Şekil 3.3.2.5: α – MEM

Şekil 3.3.2.6 : Kültür Vasatı Karışımının Filtrelenmesi

Şekil 3.3.2.7 : Santrifüj Makinesi

Şekil 3.3.2.8 : Altı Gözlü Ekim Kapları

Şekil 3.6.1: PLA Bazlı Yapı İskelelerinin Ölçü Değerleri

Şekil 3.6.2: Üç Boyutlu – V. Jenerasyon Basım Cihazı

Şekil 3.6.3: Buharlı Hidrojen Peroksit Sterilizatörü

Şekil 3.8.1: Thoma Lamı

Şekil 3.8.2 : Thoma Lamında Gözlemlenen Hücre Sayım Görüntüsü

Şekil 3.8.3: Osteojenik Farklılaştırma Kiti

Şekil 3.9.1: Kesit Alınmış PLA Bazlı Yapı iskelesi

Şekil 4.1.1: Primer Kültür - hSHEDs' in 1. Gün Görüntüsü

Şekil 4.1.2: hSHEDs' in 7. Gün – Fibroblast Benzeri / İgşi Görüntüleri

Şekil 4.1.3: hSHEDs' in 1. Pasaj (A), 2. Pasaj (B) ve 3. Pasaj (C) Görüntüleri

Şekil 4.1.4: 10 günlük kültür periyodu sonrası, hSHEDs' in CD 90 ve CD 45 immünreaksiyonları

Şekil 4.2.1.1: Osteojenik Gruplarda Yer Alan Hücrelerin 9. Gün (A), 14. Gün (B) ve 21. Gün (C) Görüntüleri

Şekil 4.2.1.2: 14 günlük kültür periyodu sonrası Kontrol ve Osteojenik gruplarda yapılan immünohistokimyasal analiz sonuçları

Şekil 4.2.1.3: 21 günlük kültür periyodu sonrasında Kontrol ve Osteojenik gruplarda yapılan immünohistokimyasal analiz sonuçları

Şekil 4.2.2.1: PLA Bazlı Yapı İskelelerine Aktarılmış Hücrelerin 21. Gün Kontrol Grubu (A) ve Osteojenik Grubuna (B) Ait Mikroskopik Görüntüleri

Şekil 4.2.2.2: PLA bazlı yapı iskelelerine aktarılmış olan hSHEDs' in 14 günlük kültür periyodu sonrasında, Kontrol Grupları (A,C) ve Osteojenik Gruplarından (B,D) Alınmış olan Mayer' s Hematoksilen Eozin Boyaması

Şekil 4.2.2.3: PLA bazlı yapı iskelelerine aktarılmış olan hSHEDs' in, 14 günlük kültür periyodu sonrası, Kontrol Grubu (A,B) ve Osteojenik Gruptan (C,D) ON İmmünohistokimyasal Boyamaları

Şekil 4.2.2.4: PLA bazlı yapı iskelelerine aktarılmış olan hSHEDs' in, 21 günlük kültür periyodu sonrası, Kontrol Grubu (A,B) ve Osteojenik Gruptan (C,D) ON İmmünohistokimyasal Boyamaları

Şekil 4.2.2.5: PLA bazlı yapı iskelelerine aktarılmış olan hSHEDs' in, 14 günlük kültür periyodu sonrası, Kontrol Grubu (A,B) ve Osteojenik Gruptan (C,D) OCN İmmünohistokimyasal Boyamaları

Şekil 4.2.2.6: PLA bazlı yapı iskelelerine aktarılmış olan hSHEDs' in, 21 günlük kültür periyodu sonrası, Kontrol Grubu (A,B) ve Osteojenik Gruptan (C,D) OCN İmmünohistokimyasal Boyamaları

Şekil 4.4.1: Kùltivasyon Sonrası PLA bazlı Yapı İskelelerinin Azalmış Sütun Genişlikleri ve Sütunlar Arası Artmış Mesafeler

TABLÖLAR

Tablo 4.3.1: Anti- ON ve Anti- OCN Değerlerinin Deney Gruplarına Göre HSCORE Dağılımları

Tablo 4.3.2 : Deney Grupları ile Karşılaştırılmalı Anti-ON Bulguları

Tablo 4.3.3: Her bir deney grubunun Osteonektin (ON) gen ekspresyonları

Tablo 4.3.4: Deney Grupları ile Karşılaştırılmalı Anti-OCN Bulguları

Tablo 4.3.5: Her bir deney grubuna ait Osteokalsin (OCN) gen ekspresyonları

1. GİRİŞ

Travma, hastalık ya da konjenital anomaliler sebebiyle meydana gelen doku kayıpları, dünya genelindeki sağlık problemlerinin esas kaynağını oluşturmaktadır (Neel *et al.*, 2014).

Doku mühendisliği; zarar görmüş dokuların rejenerasyonuna izin veren uygun koşulların yaratılması üzerine odaklanılmış, bilimin gelişmekte olan bir alanıdır. Birbirleri ile ilişki içerisinde olan yapı iskeleleri, sinyal molekülleri ve kök hücrelerden oluşan üçlü grup bu alanın temel bileşenlerini oluşturmaktadır. Grup içerisinde yer alan yapı iskeleleri; kaybedilen dokunun ekstrasellüler matriksini taklit eden üç boyutlu bir kalıp, sinyal molekülleri hücrelerin migrasyonlarını, proliferasyonlarını ve farklılaşmalarını indükleyerek hücrenin aktiviteyi harekete geçiren bir ara eleman, kök hücreler ise doku rejenerasyonunu oluşturan cevaplayıcı elemanlar olarak çalışmaktadırlar (Scheller *et al.*, 2009; Chandki *et al.*, 2012 ve Saito *et al.*, 2015).

Rejeneratif Tıp; doku mühendisliği ile benzer şekillerde; rejenerasyon, tamir veya zarar görmüş dokular ile doğal yollarla yer değişim amacı taşıyan, hızla gelişim kaydeden sağlıkta ayrı bir çatı altında kendisine yer bulmayı başarmış bir alan olarak tanımlanabilmektedir. Bu amaçlar doğrultusunda; doku mühendisliği, materyal bilimi, hücre ve moleküler biyolojisi gibi tıbbın çeşitli alanları, biyoteknolojiyle birlikte, rejenerasyon yaratabilmek adına, birbirleri ile harmanlanmaktadırlar (Tatullo *et al.*, 2015).

Hastaların yaşam kalitelerini arttırabilmek maksadı ile, canlı dokuların hücresel elemanları biyomateryaller ile kombinlenerek, yeterli büyüklük ve fonksiyona sahip canlı dokular üretmek; 'Doku Mühendisliği'

ve ‘Rejeneratif Tıp’ dallarının ortak olarak uyguladıkları stratejileridir (Kelleher ve Vacanti, 2010).

Vücut parçalarının rejenere olabileceğinin farkındalığı; ilk olarak milattan önce (MÖ) 330 yılında, Aristoteles’ in, kuyruğunun bir kısmını kaybeden kertenkelenin, kuyruğunun yeniden uzadığını gözlemlemesi ile birlikte doğmuştur (Roopa, 2009).

Aristoteles’ in keşfinden itibaren, rejeneratif tıp ve diş hekimliği alanında yeni uygulamalar bulabilmek amacıyla rejenerasyon adına yapılan çalışmalar yoğunlaştırılmıştır. Bu bağlamda, Herman 1952 yılında yaptığı vital kalsiyum hidroksit amputasyonu ile ilk kez reperatif endodontik tedavi prosedürünü tanımlamıştır (Hermann, 1952).

Hasar görmüş bir dokunun orijinal durumuna dönmesini sağlayan ‘Rejenerasyon’ birçok disiplinin, uzun yıllar boyunca bir arayış içine girmelerine neden olmuştur. İlk zamanlarda rejenerasyonu güçlendirebilmek amacıyla, doku tamirine yardım eden ve büyüme faktörleri yönünden zengin olan kan pıhtısı kullanılmaktaydı. Günümüzde de cerrahi alan içerisinde kanama yaratmak rutinde kullanılan bir pratiktir. Bu fikir ilk olarak 1960’ lı yıllarda Ostby tarafından, 1970’ li yıllarda ise Myers ve Fountain tarafından endodonti alanında test edilmiştir (Ostby, 1961; Myers ve Fountain, 1974).

‘Doku Mühendisliği’ disiplininin ilk temelleri, 1980’ li yılların orta dönemlerinde Dr. Robert Langer ve Dr. Joseph Vacanti’ nin, fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip (manipüle edilemeyen) doğal bir yapı üzerinde, hücre ekimine zıt olarak hücre dağılımını destekleyen yapı iskelelerini tasarlamaları ile atılmıştır (Vacanti, 1988).

Langer ve Vacanti tarafından gerçekleştirilen bu ilk çalışmada istenilen sonuçlar elde edilemeyince; Dr. Vacanti, laboratuvar ortamında

genişletilen hücre topluluklarının, daha gelişmiş biouyumlu ve vücut tarafından emilebilen sentetik polimer yapısındaki yapı iskeleleri üzerine ekilmelerini göstererek, daha modern bir konsept oluşturmuştur (Vacanti, 2006).

1993 yılına gelindiğinde doku mühendisliğinin amacı; Langer ve Vacanti tarafından, doku fonksiyonlarını geliştiren, tamir eden ve bu yapıların devamlılığını sağlayan canlı bir araç yaratmak, olarak belirtilmiştir (Langer ve Vacanti, 1993).

21. yüzyıla (yy) gelindiği zaman, sağlık bilimlerinin temel amacı; klinik olarak ihtiyaca uygun doku rejenerasyonunu gerçekleştirmek olmuştur. Bu amaç, en geniş kapsamda, transplantasyon ve rejenerasyon prosedürleri ile gerçekleştirilebilmektedir. Transplantasyon bazlı tedavi stratejileri, yirmi yılı aşkın bir süredir başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Ne yazık ki; organ- doku rejeksiyonunu engellemek maksadı ile bu prosedürde kullanılan uzun dönem immün sistemi baskılayıcı ilaçlar, hastalar için büyük bir tehdit oluşturmaktadırlar. Buna karşın, doku rejenerasyonu prosedürleri, hastalar üzerinde önemli bir tehdit sahası yaratmamaktadırlar. Rejeneratif tedavi yaklaşımlarında; kök hücre izolasyonu, bu hücrelerin prolifer ve farklı hücre tiplerine farklılaşabilir karakterde olmaları, fonksiyonel bir organ veya doku haline gelebilmelerine ortam sağlayan uygun bir mikroçevre meydana getirilebilmektedir (Piva *et al.*, 2014).

Araştırmamızdaki öncelikli amacımız; eksfoliye olmuş insan süt dişlerinden izolasyonlarını sağlayacağımız kök hücrelerin (hSHEDs), laboratuvar ortamında primer kültürasyonlarını gerçekleştirerek; bu hücreleri osteojenik olarak farklılaştırmaktır.

Araştırmamızın ana hedefi; izolasyonlarını sağladığımız hSHEDs' in, üç boyutlu (3D) olarak fabrike edilmiş poli laktik asit (PLA) bazlı yapı iskeleleri üzerine aktarımlarını sağlayarak; bu yapı iskelelerinin hücreler üzerindeki osteojenik indükleme ve sitotoksik aktivitelerini araştırmak; hSHEDs' in ise , bu ortamdaki davranışlarını ve PLA bazlı yapı iskeleleri ile oluşturdukları komplekslerin, klinik kullanılabilirliklerini değerlendirmektir.

Araştırmamızda genel olarak irdelemek istediğimiz hipotez; 'Eksfoliasyon zamanı gelmiş insan süt dişlerinden elde edilen kök hücrelerin (hSHEDs) normal kültür ortamında ve üç boyutlu ortamda, proliferasyonları ve farklılaşma potansiyelleri arasında fark vardır ' olarak belirlenmiştir.

Kök hücrelerin rejeneratif ve terapötik değer taşımaları, canlı dokuların mekanik ve moleküler farklılaşmaları için gerekli iskeleti kurabilmeleri, kendi alanımız adına (diş hekimliği); bu hücrelerin, diş yapısına benzer dokulara farklılaşarak doku canlılığını kaybettiğimiz diş yapılarında, bu dokuların geri kazanımının doğal yollardan elde edinimini mümkün kılınabilecek ve günümüzde doku mühendisliği ile harmanlanmış olan ' Rejeneratif Diş Hekimliği' alanında önemli katkılar sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Doku Mühendisliği Prensiplerinin Temel Yapısı: Kök Hücreler

Travmalar ya da çeşitli hastalıkları takiben insan vücudu; hayatta kalmak ve sağlıklı varlığını devam ettirebilmek için, dokuların yenilenebilme veya rejenere olabilme kabiliyetleri sayesinde, temel olan bazı fonksiyonlar sergiler. Dokuların bu yenilenebilme ya da rejenere olabilme fiilleri, özelleşmemiş bir hücre topluluğunun yani kök hücrelerin varlığı ile mümkün olabilmektedir (Ranganathan ve Lakshminarayanan, 2012).

Kök hücre terimi, birden fazla ve farklı şekilde, özünde aynı manayı ifade edebilecek biçimde tarif edilebilmektedir.

‘Kök hücreler’ , insan vücudunda her dokuyu inşa edebilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Bu özellikleri sayesinde, doku rejenerasyonu ve tamirinde terapötik amaçlarla kullanılma potansiyelleri oldukça yüksektir. Bir hücrenin kök hücre sıfatını taşıyabilmesi için iki önemli özelliğe sahip olması gerekmektedir. Bunlar;

1. Orijinal hücre ile tam olarak aynı bir soy üretmek için, sınırsızca, kendi kendini yenileyebilme yetisi, (Bu sınırsızca bölünebilme özelliği kanser hücrelerinde görünmesine karşın; kök hücrelerdeki bölünme oldukça düzenli bir biçimde seyretmektedir)
2. Özelleşmiş bir hücre tipine farklılaşabilme olarak ifade edilmektedir (Biehi ve Russell, 2014).

‘Kök Hücreler’ ; proliferasyon, kendini yenileyebilme ve birden fazla hücre kökenine farklılaşabilme gibi üç temel özellik ile karakterize farklılaşmamış hücreler olarak tarif edilebilmektedirler (Piscioatta *et al.*, 2015).

‘Kök hücreler’ ; kolonize olmaya eğilimli, kendini yenileyebilen, bir veya daha fazla özelleşmiş hücre tipini oluşturabilen öncü hücreler ve doku mühendisliğinin üçlü komponentinin anahtar elemanlarıdır.

Kök hücreler;

- 1.Uzun hücre bölünme periyotları için yenilenebilme potansiyeline sahip olup,
2. Fizyolojik ya da deneysel durumlar altında, özelleşmiş fonksiyona sahip hücrelere dönüşebilmek için, indüklenirler (Verma *et al.*, 2014).

‘Kök hücreler’ ; çok hücreli organizmaların bütün yaşamları boyunca var olan, hemen hemen her hücre ve doku tipinde saptanabilen özel hücre tipleridir. Temel görevleri; doku gelişimini sağlamak, vücut dengesini korumak ve doku hasarı olgularında tamir olayını meydana getirmektir (Suchanek *et al.*, 2007).

2.2‘Kök Hücre’ Teriminin İlk Kez Kullanımı ve Günümüze Kadar Gelen Tarihsel Gelişim Süreci

‘Kök Hücre’ terimine, bilimsel makalelerde, ilk kez 19. yy’ da rastlanmıştır. Darwin’ in evrim teorisinin en büyük destekçilerinden biri olan, alman biyolog Ernst Haeckel’in 1868 yılında yapmış olduğu bir çalışmada bu terime yer verilmiştir. Haeckel yaptığı çalışmalarında, türün genetiği ile ilgili olarak ortak atalardan gelen organizmaların soy gelişimini bir ağaç ile göstermiştir. Bu ağacı da ‘Kök Ağacı (*Stem tree*) ’ olarak adlandırması ile birlikte bu terim literatürlerde yer almaya başlamıştır (Santos *et al.*, 2007).

Üreme hücrelerinin sürekliliği ve hematopoietik sistemin oluşumu gibi iki ana mekanizmanın sorgulanması, kök hücreler üzerindeki çalışmaların yoğunlaşmasını sağlamıştır. 1892 yılında Theodor Boveri ve Valentin Hacker, bu iki ana mekanizmayı çözmek için yaptıkları

çalışmalarında, daha önceden tanımlanan kök hücreleri, üreme hücrelerinin öncül hücreleri olarak tanımlamışlardır (Extavour *et al.*, 2003).

Boveri ve Hacker' ın çalışmalarına paralel olarak; Arthur Pappenheim, Alexander Maximov ve Ernst Neumann, kök hücre terimini literatürde; kan hücrelerinin öncül hücreleri olarak açıklamışlardır. 1909 yılında Alexander Maximov yapmış olduğu çalışmasında; hematopoietik kök hücrelerin (HSCs) bir lenfosit morfolojisine sahip olduklarını ve kan döngüsü içerisinde, proliferere olabilecekleri ve farklılaşabilecekleri mikro ekolojik ortamlara göç ettiklerini bildirmiştir (Friedner, 1998; Ramalho-Santos ve Willenbring, 2007; Kabir *et al.*, 2014).

Cohnheim ise; 19. yy' ın sonlarına doğru, temel doku hücrelerinin (stromal hücreler) kemik iliği kaynaklarını tespit etmiş ve yara iyileşme bölgesine gönderdiği fibroblastların kemik iliği orijinli olduklarını varsaymıştır. 20. yy' ın erken dönemlerinde Maximov, embriyogenez boyunca mezoderm ve oluşmakta olan kan elemanları arasındaki temel ilişkiyi açıklamıştır. Cohnheim ve Maximov tarafından bulgulanan bu veriler; doğal iyileşme cevabı ve hematopoez aşamalarında yer alan kemik iliğinin bir stromal hücre rezervuarı olduğunun ilk göstergeleri olarak kabul edilmişlerdir (Parekkadanet *et al.*, 2010).

1970 yılına gelindiğinde; Friedenstein ve arkadaşları ; kemik iliği elemanlarını, in vivo ortama transplante ederek; bu hücrelerin iskeletsel doku hücrelerinin oluşumunda birer öncül hücre olduklarını göstermişlerdir (Friedenstein *et al.*, 1970) .

Friedenstein ve arkadaşlarının bu çalışmada kullandıkları, doku kültürü kabına adezyonun temel alındığı metot, günümüzde de mezenkimal kaynaklı kök hücrelerin (MSCs) izolasyonu için kullanılmaktadır (Bab *et al.*, 1986).

1970' li yılların son dönemlerinde; Friedenstein ve arkadaşları, yaptıkları kemik iliği kültürasyonunda, bu alana komşu daha farklı hücreler de izole etmişler ve ilk kez kemik iliğinden mezenkimal kök hücreleri (BMMSCs) izole etmeyi başarmışlardır. MSCs ilk olarak; bağlanan, koloni oluşturabilen, kendi kendini yenileyebilen fibroblast benzeri hücreler olarak açıklanmışlardır (Friedenstein *et al.*, 1978) .

Friedenstein ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaları takiben; Owen, Caplan ve arkadaşları daha detaylı araştırmalar gerçekleştirerek, 1980' li yılların sonları ve 1990' lı yılların ilk dönemlerinde; MSCs' in izolasyon metotlarını daha sağlam bir zemine oturtmuşlardır. (Owen, 1988 ve Caplan, 1991).

1990' lı yılların sonlarına doğru, doku mühendisliği ve rejeneratif tıbbın ortaya çıkışı; bu alanlarda Kök Hücre Biyolojisi' nin daha farkedilebilir ve daha iyi anlaşılabilir bir konum kazanmasının sağlanması ile; tıbbi ve dental tedavi alanlarında kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler, özellikle yetişkin doku kaynaklı MSCs, üzerindeki araştırmaları yoğunlaştırmıştır (Lazarus *et al.*, 1995 ve Rivera *et al.*, 2012).

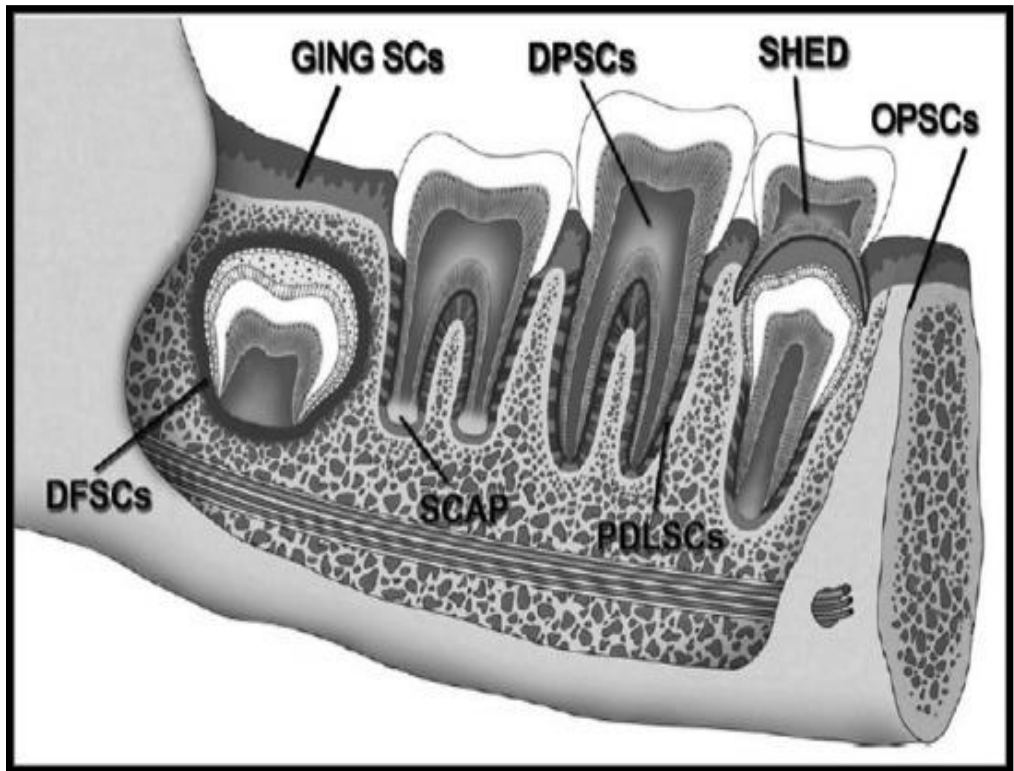
2000 yılında , Dünya Sağlık Enstitüsü (WHO / *Who Health Organisation*) dergisinde, gömülü kalmış üçüncü büyük azı dişlerinde ve daha dirençli olan süt dişlerinde yer alan kök hücrelerden bahsedilmiştir (Mao *et al.*, 2011).

Gronthos, Huang ve arkadaşları yaptıkları seri araştırmalar sonucu; 2000' li yıllarda kök hücre alanının giderek merak uyandırıcı bir hal almasıyla birlikte; insan dişlerinin pulpal yapılarında yeni bir mezenkimal kaynaklı kök hücre tipi tanımlamışlardır (Gronthos *et al.*, 2000; Gronthos *et al.*, 2002 ve Huang, 2011).

Günümüzde; ağız ve diş yapısının birden fazla bölgesinden kök hücre izolasyonunu sağlayabilmek mümkündür.

Bu bölgeler;

- Süt ve daimi dişlerin pulpal alanları,
- Periodontal ligamentler,
- Oral periostium,
- Dişeti bağ dokusu,
- Apikal papilla ve
- Diş folikülleri olarak belirlenmiştir (Eslaminejad *et al.*, 2010; Ponnaiyan, 2014).



Şekil 2.2.1: Ağız ve Dental Dokularda Yer Alan Çeşitli Kök Hücre Kaynakları

Dişlerin pulpal yapılarından elde edilen dental pulpa kaynaklı kök hücreler (DPSCs); ilk olarak 2000 yılında Gronthos ve arkadaşlarının, daimi üçüncü büyük azı dişlerinin pulpal dokusundan izole edilmeleri ile ortaya çıkmıştır. DPSCs, in vitro ortamda osteoblastik ve kondroblastik hücreler; in vivo ortamda ise odontoblastik hücreler üretebilme kapasitesi olan kolojenik hücreler olarak ifade edilmişlerdir (Gronthos *et al.*, 2000).

Çocuk dişhekimi Dr. Songtao Shi, altı yaşındaki bir kız hastanın süt dişlerinin pulpal yapılarını kullanarak, 2003 yılında bu dişlerden kök hücre elde etmeyi başarmıştır. Elde edilen kök hücreler, eksfoliye olmuş insan süt dişlerinden sağlanan kök hücreler (hSHEDs) olarak adlandırılmışlardır (Shi *et al.*, 2003).

Dental alanlarda kök hücre arayışlarına devam eden Shi ve arkadaşları, 2004 yılına gelindiğinde; cerrahi operasyonla çekilmiş üçüncü büyük azı dişlerinin kök yüzeylerinden elde ettikleri hücrelerin ya da dokuların periodonsiyuma benzer özelliklere sahip olduklarını, in vitro ortamda yaptıkları deneylerle göstermişlerdir. Bu hücreleri de periodontal ligament kök hücreleri (PDLSCs) olarak isimlendirmişlerdir (Shi *et al.*, 2004).

Periodonsiyum alanındaki zengin hücre içeriği ve periodontal ligament kök hücrelerinin ortaya çıkartılmasını takiben; 2005 yılında, Morsczeck ve arkadaşları; 2008 yılında ise Yao ve arkadaşları tarafından, gelişmekte olan dişlerin germini çevreleyen ektomezenkimal bir doku yapısına sahip olan dental foliküllerin, kök hücre içeriğine sahip olduklarını ve bu hücrelerin çeşitli hücrelere farklılaşabildiklerini göstererek; dental folikül kök hücrelerinin (DFSCs) varlığını saptamışlardır (Morsczeck *et al.*, 2005 ve Yao *et al.*, 2008).

2006 yılına gelindiğinde; giderek artan mezenkimal kök hücre bazlı doku rejenerasyonu terapilerinin, rejeneratif tıp alanındaki öneminin artması

ve bu alanda kullanılabilirliğinin benimsenmesiyle beraber; Sonoyama ve arkadaşları, henüz gelişimlerini tamamlamamış olan dişlerin apikal papillerinden yeni bir kök hücre (SCAPs) popülasyonu elde etmişlerdir (Sonoyama *et al.*, 2006).

Dental dokularda ve ağız bölgesinde devam eden proliferasyon ve farklılaşabilme kapasitesi yüksek hücre arayışında; 2009 yılında, bu bölgede rapor edilen diğer kök hücre tiplerine ek olarak, Zhang ve arkadaşları dişeti bölgesinden kök hücre (GMSCs) izolasyonunu sağlayarak popülasyona yeni bir kök hücre tipi daha kazandırmışlardır (Zhang *et al.*, 2009).

Yetişkin kök hücre tarihine genel bir pencereden bakılacak olursa; yetişkin kök hücre araştırmaları yaklaşık olarak kırk beş yıl öncesinde başlamıştır. 1960' lı yıllarda; araştırmacılar kemik iliğinde iki çeşit kök hücre ortaya çıkarmışlardır. İlk popülasyon, vücuttaki kan hücre tiplerinin tümünü oluşturabilen 'Hematopoietik Kök Hücreler'; ikinci popülasyon ise, birkaç yıl sonra bulunan 'Kemik İliği Stromal Hücreler' şeklinde adlandırılmışlardır. Stromal hücreler; kemik, kıkırdak, yağ ve fibröz bağ dokusu üretebilen öncül hücrelerin tümünün yarattığı bir hücre topluluğu biçiminde tanımlanmışlardır. Günümüzde 'Kök Hücre Biyolojisi', bilimin en etkileyici ve merak edilen dallarından biri olarak ifade edilmektedir; ancak bilimin gelişmekte olan diğer alanlarında olduğu gibi, kök hücreler üzerindeki sorgulamalar ve araştırmalar yeni soruların oluşmasına, yeni keşiflerin sergilenmesine zemin hazırlamaktadırlar (Telles *et al.*, 2011).

2.3 Kök Hücrelerin Çeşitli Özelliklerine Göre Sınıflandırılmaları

Kök hücreler; farklılaşma kapasitelerine ve köken aldıkları dokulara göre çeşitlilik gösterebilmektedirler. Bu çeşitlilik, hücrelerin bölünme fazlarından ve embriyonik gelişim boyunca meydana gelen değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Rosa, 2013).

2.3.1 Kök Hücrelerin Genel Sınıflandırmaları (Gelişimsel Sınıflandırma)

En genel sınıflamaya göre kök hücreler, doku tamiri ve rejenerasyonda yararlanımları olan iki ana grup altında sınıflandırılmaktadırlar.

1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler (ESCs), embriyonik gelişim süresince, blastositlerin iç hücre kütlelerinden meydana gelen hücrelerdir. Yaklaşık 50-150 adet hücre topluluğundan oluşan ve embriyonun erken dönem fazı olan blastositlerden köken alan, pluripotent yapıdaki hücrelerdir. ESCs; üç adet primer germ tabakasını (ektoderm, endoderm ve mezoderm) meydana getirmektedirler. Belirli bir hücre tipi için, yeterli ve gerekli stimülasyon verildiği zaman, ESCs' in yetişkin vücudunda iki yüzden fazla hücre türüne değişim gösterebildikleri belirtilmiştir. ESCs' in klinik pratiğinde kullanımları; blastositlerin tüketimi ile ilgili olarak bazı sorunlar yarattığından, etik ve teknik olarak engeller ortaya çıkmaktadır (Telles *et al.*, 2011 ve Rai *et al.*, 2013).

2. Yetişkin Kök Hücreler (Postnatal/ Somatik/ Mezenkimal Kök Hücreler)

Yetişkin kök hücreler (ASCs), sınırlı bir proliferasyon kabiliyetleri olan ve teorik olarak her doku tipinde bulunabilen hücrelerdir. Bu özelliklerinden dolayı; ASCs multipotent bir karakter sergilemektedirler (Shilpa *et al.*, 2013).

ASCs çeşitli yetişkin organ ve dokulardan elde edilebilmektedirler (Raiet *al.*, 2013 ve Pesciottaet *al.*, 2015) .

Başlıca ASCs kaynaklarını şu şekilde sıralayabilmek mümkündür:

- Kemik iliği
- Göbek bağı kordonu
- Göbek bağı kordon kanı
- Periferik kan
- Adipojenik dokular
- İndüklenmiş pluripotent hücreler
- Amniyotik sıvı
- Dental kaynaklı kök hücreler
- Deri
- İskelet kası
- Kalp
- Karaciğer
- Ovaryum epitelleri
- Testisler

ASCs, birçok farklı yetişkin dokulardan izole edilebilmeleri ve çeşitli hücresel yapılara farklılaşabilme potansiyelleri sebebiyle oldukça önemli bir noktada yer almaktadırlar. En belirgin multipotent özellikli ASCs; 'Nöral kök hücreler (NSCs)' , 'Hematopoietik Kök Hücreler (HSCs)' ve 'Mezenkimal Kök Hücreler (MSCs)' veya 'Hematopoietik Olmayan Kök Hücreler' dir (Li *et al.*, 2014).

Kemik iliğinden, kordon kanından ya da periferik kandan kaynak alan ASCs 'Hematopoietik Kök Hücreler (HSCs)' olarak isimlendirilmişlerdir. HSCs; kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri ve trombosit gibi kan hücrelerine farklılaşabilmektedirler. Kökenlerini adipojenik dokular, hepatik

kök hücreler, dermal kök hücreler ya da dişlerden alınmış olan ASCs, 'Mezenkimal Kök Hücreler (MSCs) ' veya 'Hematopoietik Olmayan Kök Hücreler ' olarak adlandırılmaktadır (Shilpa *et al.*, 2013).

ASCs' in çatısı altında yer alan bir diğer önemli hücre yapısına sahip 'Nöral kök hücreler (NSCs), hipokampal girusun subventriküler ve subgranüler bölgelerinde yer alarak; nöron, astrosit ve oligodendrosit gibi üç farklı beyin hücrelerini üretebilme kabiliyetine sahip olan hücrelerdir (Liet *al.*, 2014).

2.3.2 Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerine Göre Sınıflandırılmaları

1.Totipotent Kök Hücreler

Zigot ile başlayan gelişimsel süreçte, bir yumurta ve sperm hücresinin döllenmesini takiben ilk saatler içerisinde totipotent yapıda bir hücre aynı yapıda birden fazla totipotent hücelere bölünerek embriyonik gelişimde önemli rol üstlenmektedir. Totipotent kök hücreler (TSCs), embriyonik ve ekstra - embriyonik dokular yaratabilen mükemmel bir farklılaşma potansiyeline sahip olan kök hücrelerdir. TSCs' in her biri yetişkin vücudunda iki yüzden fazla hücre tipine farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler (Polejaeva *et al.*, 2013).

2.Pluripotent Kök Hücreler

Embriyonik membran hücreleri hariç, tüm vücut hücre tiplerine farklılaşabilen hücrelerdir. Doğal gelişim sürecinde, pluripotent kök hücreler (PSCs), embriyonun çok kısa bir döneminde bulunmaktadırlar. Bu dönem, embriyonik yapının, daha özelleşmiş dokulara farklılaşacağı multipotent değişimi öncesindeki zaman aralığıdır. Diğer bir anlatımla, PSCs, 'Seri bölünmeler sonucu daha sınırlı ve özelleşmiş karakterde olan multipotent

kök hücrelere farklılaşarak; vücudun her hücre tipi olabilen hücreler' şeklinde ifade edilebilmektedirler (Biehl *et al.*, 2014).

3.Multipotent Kök Hücreler

Sınırlı sayıda hücreye veya hücreyel kökene sahip başka hücrelere farklılaşabilme becerisi ' Multipotent ' terimi ile ifade edilmektedir (Kabir *et al.*, 2014). Multipotent kök hücreler; genellikle aynı germ tabakasından ayrılmış, farklı kökenlere sahip hücrelere farklılaşabilme potansiyeline sahip hücrelerdir. Örneğin; multipotent yapıda olan bir HSCs, nötrofil ve lenfosit gibi birkaç çeşit kan hücrelerine farklılaşabilmekte; ancak beyin, kan yada diğer çeşit kan hücrelerine farklılaşamamaktadırlar (Rosa, 2013).

4.Unipotent Kök Hücreler

Farklılaşma hiyerarşisinin en alt tabakalarında yer alan bu hücreler, sadece bir tip hücreye değişim gösterebilme kabiliyetine sahiptirler (Chandki *et al.*, 2012).

5.İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler

Pluripotent yapıdaki ESCs, rejeneratif tıp başlığı altında yer alan hücre bazlı tedavilerde, en çok umut vaat eden hücre kaynakları arasında yer bulmaktadırlar. Son zamanlarda uygulanmaya başlayan; c-Myc, Klf4, Oct4 ve Sox2 veya Lin28, Nanog, Oct4 ve Sox2 gibi farklı dörütlü gen grupların retroviral transkripsiyonu ile; multipotent kök hücrelerden veya yetişkin somatik hücrelerden 'İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPSs) ' in üretimi, otolog pluripotent embriyonik benzeri kök hücrelerin elde edilebilmesine ışık tutmuştur. iPSs, pluripotent hücreler ile benzer özelliklere sahiptirler. İnsan iPSs ile ilgili ilk kurulum çalışmaları; dermal fibroblastların (DFs) yeniden programlandırılmasıyla gerçekleştirilmiştir (Yan *et al.*, 2010) .

Hücre fenotiplerinin sahip oldukları transkripsiyon faktörlerinin tanımlanması adına yapılan yoğun çalışmalar sürecinde; bu faktörlerin

oldukça az bir kısmının, hücrelerin yeniden programlandırılmasını ve farklılaşmasını içeren hücre kontrol mekanizmalarını kontrol edebildiği fikri ortaya atılmıştır (Young, 2011).

Yıldırım, 2012 yılında yayınlamış olduğu kitabında, yeniden programlandırma yönteminin; embriyo toplanması ve ESCs' in kültüre edilmesi gerekliliğini bertaraf ederek; greftleme tekniklerinde ortaya çıkabilen immünolojik problemlerin (transplantasyon yapılan dokuda rejeksiyon, greft kaynaklı konak doku rahatsızlıkları) engellenmesinde faydalı olduğunu belirtmiştir (Yıldırım, 2012 s.2).

6.Oligopotent Kök Hücreler

Lenfoid ve miyeloid hücrelerde olduğu üzere, sadece birkaç hücre grubunu oluşturabilen kök hücrelerdir (Yan *et al.*, 2010) .

2.3.3Kök Hücrelerin Köken Aldıkları Dokulara Göre Sınıflandırılmaları

Kök hücreleri, köken aldıkları dokulara bağlı kalarak kategorize etmek mümkündür. Bu sınıflama şu şekilde sıralanabilir (Can, 2008, Han *et al.*, 2014):

1.Endodermal Kökenli Hücreler

- Pulmoner Kaynaklı Epitelyal Kök Hücreler
- Gastrointestinal Yolak Kaynaklı Kök Hücreler
- Pankreatik Kök Hücreler
- Hepatik Kök Hücreler
- Meme ve Prostat Bez Kaynaklı Kök Hücreler
- Yumurtalık ve Testis Kaynaklı Kök Hücreler

2.Mezodermal Kökenli Hücreler

- Hematopoietik Kök Hücreler
- Mezenkimal Stromal Kök Hücreler
- Mezenkimal Kök Hücreler
- Miyojenik Progenitör Hücreler
- Multipotent Yetişkin Progenitör Hücreler
- Kemik İliği Kök Hücreleri
- FSSC(*Feline Spermatogonial Stem Cells*)
- USSC (*Unrestricted Somatic Stem Cells*)
- Kardiyak Kök Hücreleri
- Kasların uydu hücreleri

3.Ektodermal Kökenli Hücreler

- Nöral Kök Hücreler
- Deri Kök Hücreleri
- Oküler Kök Hücreler

2.4 Kraniyofasiyal ve Dental Embriyolojik Gelişim Süreçleri ile Dental Dokuların Genel Yapıları ve Kök Hücre Varlıkları

Kraniyofasiyal gelişim, kök hücre toplulukları ile değişken gelişimsel başlangıçların kombinasyonunu içeren kompleks bir dönemdir. Dişsel gelişimin en az iki adet embriyolojik kökeni vardır. Ağız epiteli kaynaklı ektoderm, diş minesi gelişimini meydana getirmektedir. Nöral krista ise geriye kalan dental yapıları (pulpa, dentin ve sement) oluşturmaktadır (Thesleff *et al.*, 2009).

Odontogenezis, bu embriyolojik gelişimin beşinci haftasında başlamakta ve daimi dentisyon sürecinin sonuna kadar devam etmektedir. Gebeliğin beşinci haftasından sonra, ilerde gelişecek olan alt ve üst çene dental arklarında primer epitelyal bandlar oluşup, daha sonraları kalınlaşma

gösterirler. Bu bandlar etrafındaki ağız epitelinin her iki arkta da içe doğru hareketi, vestibuler laminanın ve dental papillanın (DP) gelişimi ile sonlanır. Dental lamina altında başlayan odontogenezis, dişsel gelişimin üç safhasına da öncülük etmektedir (Feng *et al.*, 2012) .

Bu safhalar:

1.Tomurcuk Evresi: Epitelyal hücreler, ektomezenkimal alana hareket ederler ve ektomezenkimal hücreler tomurcuk etrafında kümelenmeye başlarlar.

2. Takke Evresi: Bu evrede proliferasyon sonucu, diş tomurcukları takke şeklini alırlar. Epitelyal yapı mine organını oluşturur ve ektomezenkimal hücreler mine organı etrafında, DP' yı meydana getirmek için toplanırlar. Dental foliküller, papilla etrafında bir kese görüntüsü oluştururlar.

3. Çan Evresi: Bu safhada mine organının alt yüzeyi derinleşerek, farklılaşmaya başlar. İç dental epitelyal (IDE) hücreleri ve DP, bazal membran (BM) boyunca birbirleri ile bağlantıya geçerler.

İleri çan evresinde; IDE ve DP hücreleri proliferasyonlarını durdururlar ve hücrel yapıları BM' ın zıt yönüne doğru hareket ederek, uzarlar. Daha sonra IDE hücreleri preameloblastlara dönüşerek, DP hücrelerine sinyal gönderip odontoblastlara dönüşüm gösterirler. Oluşan odontoblastlar ise IDE' nin alt kısımlarındaki alan etrafında, predentin yapısında bir organik matriks sentezlerler. Hidroksiapatit sentezi ve mineralizasyon olayları, oluşan bu predentinin, dentine dönüşümünü sağlarlar (Klein *et al.*, 2006) .

Dişlerin kök yapıları, kuronal gelişimden ayrı olarak meydana gelmektedir. İç ve dış dental epitelyal hücre tabakaları, Hertwig epitelyal kök kınını (HERS) oluşturmak üzere, servikal düğümünden aşağıya doğru gelişim

gösterirler. Oluşan HERS hücreleri, DP hücrelerinin odontoblastlara farklılaşma süreçlerini, kök dentinini sentezleyebilmeleri için indüklerler. Sentezlenen sementoblastlar, periodontal ligament (PDL) fibroblastları ve alveolar kemik osteoblast hücreleri; dişleri destekleyerek, soketleri içerisinde stabilize kalmalarını sağlayan hücrelerdir. Bu hücreler, dental foliküllerden meydana gelerek, hep birlikte periodonsiyum yapısı olarak adlandırılırlar (Feng *et al.*, 2012) .

Tatullo ve arkadaşları, son dönemde yaptıkları çalışmaları ile dişlerin gelişimsel süreçlerini; hem ağız epitel ve ektomezenkimal hücreler arasında oluşan indükleyici sinyal mekanizması, hem de nöral krista hücrelerinin migrasyonları ile şekillenen bir periyot olarak ifade etmişlerdir. Vücudun en sert iki dokusu olan mine ve dentin yapılarının da bu etkileşimlerin birer sonucu olarak, meydana geldiklerini bildirmişlerdir (Tatullo *et al.*, 2015).

MİNE: Dişlerin kuronal yapılarını çevreleyen, ağız kavitesi içerisinde görülebilen diş sert dokusu olarak ifade edilmektedir. Mine yapısı; ameloblastlardan kaynaklanan epitelyal hücreler tarafından sentez edilmektedir.

SEMENT: Dişlerin kök yüzeylerini çevreleyen , kemik benzeri ince bir tabaka şeklinde açıklanmaktadır.

DENTİN: Mine ve sement dokuları altında yer alan vital ve mineralize bir iç tabakadır. Odontoblastlar tarafından sentezlenen bir yapıdır.

DENTAL PULPA: Pulpal yapı; her bir dişin merkez boşluğunda lokalize olmuş, farklı özelleşmiş hücreler, kan damarları ve sinirlerden meydana gelen, gevşek yapıda kompleks bir bağ dokudur. Bu yapı 4 tabakadan meydana gelmektedir (Ferroni *et al.*, 2015) .

Bu tabakalar:

1. Eksternal odontoblastik tabaka
2. Hücresiz tabaka
3. Hücreden zengin tabaka
4. İnternal parietal pleksus alanı

Pulpal alanın içerdiği diğer hücre ve yapılar şu şekilde listelenebilir (Ferroni *et al.*, 2015) :

- En iç alanda yer alan, çok sayıda fibroblast ve ekstrasellüler matriks (ECM)
- Farklılaşmamış mezenkimal hücreler
- Fibrositler
- Makrofajlar
- Lenfositler ve
- Apikal foramen aracılığı ile pulpa kavitesine giren kan damarları ve sinirleri

Diş pulpasının ana fonksiyonu; dentin üretimi yapmak, dentinin biyolojik ve fizyolojik canlılığının devamlılığını sağlamaktır. Bu görevlerin yanı sıra diş pulpasının; mekanik travma, kimyasal iritasyon veya mikrobiyal invazyondan kaynaklı diş ağrılarında sorumlu olan duyu sinir sistemine karşı yüksek cevap oluşturma yeteneği de bulunmaktadır (Huang *et al.*, 2012) .

Günümüzde Uygulanan Vital ve Vital Olmayan Geleneksel Pulpal Tedavi Yaklaşımları ve Sınırlamaları:

Kök Kanal Tedavisi: Enfekte ve nekrotik hale gelmiş pulpal yapının iyileştirilmesi adına, en sık uygulanan tedavi prosedürüdür. Enfekte olmuş pulpal dokunun uzaklaştırılarak; pulpal boşluğun dezenfeksiyonu ve bu alanın güta perka gibi canlı doku rejenerasyonunu indüklemeye potansiyelinden yoksun sentetik bir madde ile doldurulmasını içerir. Sonuç olarak kanal tedavisi uygulanan dişler; hassasiyet ve canlılıklarını kaybederler, enfeksiyonlara immünolojik olarak cevap verme kabiliyetlerini yitirirler. Bu dezavantajların yanı sıra; immünolojik cevapsızlığa bağlı olarak ikincil enfeksiyonların oluşumu sonucu komşu dokulara enfeksiyon yayılımı gelişebilmekte ve sepsis durumu ortaya çıkabilmektedir (Ravindran *et al.*, 2015) .

Direkt Pulpa Tedavisi: Dış ortama açılmış canlı pulpa dokusunun; biouyumlu, biorejeneratif dental materyaller kullanılarak örtülmesiyle birlikte, pulpal dokunun canlılığını ve tersiyer dentin köprüsü oluşumunu amaçlayan bir tedavi şeklidir (Poggio *et al.*, 2015) .

Direkt pulpa kapaklamasını takiben, primer odontoblastlar uyarılarak reaktif bir dentin oluşturmaya başlarlar. Hasarın şiddetine bağlı olarak, odontoblastlar canlılıklarını kaybetmişler, pulpal yapı içerisinde yer alan DPSCs' lerin farklılaşması ile ortaya çıkan ikincil odontoblast benzeri hücreler ile yer değiştirerek reaktif cevap süreci devam ettirilebilir (Jaberiansari *et al.*, 2014) .

Pulpotomi: Vital pulpal tedavilerinin (VPT) bir alt basamağı olarak kabul edilen bir tedavi seçeneğidir. Direkt pulpa kapaklamasından farklı olarak; özellikle hasar görmüş odontoblast hücrelerinin bulunduğu bölgedeki enfekte dentin atıkları/ zarar görmüş pulpal dokular (1 mm' yi

aşmayacak pulpal açılımlarda) uzaklaştırılmaktadırlar. Bu tedavi prosedüründeki temel amaç; temiz bir yara bölgesi oluşturarak, pulpayı çevreleyen ajan ile henüz farklılaşmamış olan MSCs arasında bir bağlantı kurulmasını sağlamaktır (Asgary *et al.*, 2014).

Çocuk ve yetişkinlerde uygulanan geleneksel pulpal tedavilerin yarattığı dezavantajların üstesinden gelebilmek amacı ile; klinik olarak, fonksiyonel bir pulpal doku rejenere etme fikri 'Diş Hekimliğinde Dental Dokulardan İzole Edilen Kök Hücrelere Yönelimi ve Doku Mühendisliğine Eğilim' i meydana getirerek, araştırmacılar geleneksel tedaviler yerine, rejenenerasyon odaklı tedaviler üzerine araştırmalara yönelmişlerdir (Ravindran *et al.*, 2015) .

2.5 Dental Dokulardan Elde Edilen Kök Hücreler

Günümüze kadar dental dokulardan izole edilmiş olan kök hücreler şu şekilde sıralanabilir (Eleuterio *et al.*, 2013) :

- 1.Dental Pulpa Kök Hücreleri (DPSCs)
- 2.Eksfoliye Olmuş İnsan Süt Dişlerinden Elde Edilen Kök Hücreler (hSHEDs)
- 3.Periodontal Ligament Kök Hücreleri (PDLSCs)
- 4.Apikal Papilla Kök Hücreleri (SCAPs)
- 5.Dental Folikül Kök Hücreleri (DFSCs)
- 6.Diş eti Bağ Dokusu Kaynaklı Kök Hücreler (GING SCs)
- 7.Oral Periosteum Kaynaklı Kök Hücreler (OPSCs)

2.5.1 Dental Pulpa Kök Hücreleri (DPSCs)

Pulpal doku içerisinde yer alan kök hücrelerdir. MSCs' in bir popülasyonu olarak tarif edilen bu hücreler, 'Uluslararası Hücresel Tedavi Topluluğu' nun Mezenkimal ve Doku - Kök Hücre Komitesi' tarafından da tanımlanmışlardır. Bu tanımda; DPSCs standart kültür koşullarında

varlıklarını sürdürebilen, in vitro ortamda osteoblastik, adipojenik ve kondroblastik farklılaşma sergileyebilen hücreler olarak ifade edilmişlerdir. Bu özelliklere ek olarak; BMMSCs ile karşılaştırılarak açıklanan DPSCs' lerin, proliferasyon aktivitelerinin ve hücre sayılarının BMMSCs' lere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Dutilleul *et al.*, 2015) .

DPSCs' lerin İlk Keşfi

Gronthos ve arkadaşları ilk kez 2000 yılında; gömülü yirmi yaş dişlerinin pulpal yapılarından elde ettikleri doku ile, DPSCs' i tanımlamışlar ve bu hücrelerle de pulpal rejenerasyonun ilk in vivo örneğini çalışmalarında göstermişlerdir (Gronthos *et al.*, 2000) .

DPSCs' lerin Kökenleri, Kaynakları ve Genel Özellikleri

Mezenkimal bir kökene sahip olan bu hücreler, nöral tübün nöral krista hücrelerinden meydana gelmişlerdir. ASCs özelliğine sahip oldukları düşünülen, multipotent karakterindeki hücrelerdir (Vianna *et al.*, 2013) .

Karmaşık bir süreç olan odontogenez süresince; diş germi, nöral kristanın ektomezenkimal tabakası ve dental laminanın ektodermal tabakası olmak üzere iki tabakadan köken alırlar. Dolayısıyla, bu dönem içerisinde, dental pulpada yer alan DPSCs' in de iki farklı türü olduğu düşünülmektedir (Suchanek *et al.*, 2007) .

Bu popülasyonlar:

- Nöral krista mezenkiminden kaynaklanan DPSCs
- Ektodermal dental laminadan kaynaklanan DPSCs

DPSCs' in kaybedilmiş dental dokuların geri kazanımında ve kök-kanal sisteminin yeniden inşa edilmesinde, ideal bir araç oldukları düşünülmektedir. Uygun indükleyici ortamlar altında, bu hücrelerin birçok

farklılaşma kapasitesine sahip olmaları bu düşüncayı ortaya çıkarmıştır(Boyle *et al.*, 2014).

Bu farklılaşma potansiyelleri şu şekilde sıralanabilir (Boyle *et al.*, 2014):

- Osteoblastik
- Odontoblastik
- Adipojenik
- Nörojenik
- Kondrojenik
- MSCs
- Endotelyal hücreler

DPSCs' in İzolasyon Alanları, İdentifikasyonları, Morfolojik ve Antijenik Karakterizasyonları

DPSCs; insan, fare, koyun, şempanze, domuz gibi farklı organizmalardan izole edilebilmektedirler. DPSCs' indental dokulardan elde edilen başlıca izolasyon alanları (Noce *et al.*, 2014) :

- Süt ve daimi dişlerin pulpal yapıları
- Yirmi yaş dişlerinin pulpal yapıları
- Eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişlerinin pulpal yapıları
- Süpernumerer dişlerin pulpal yapıları
- Apikal papilla alanı

DPSCs, MSCs ile benzer yapıda; CD29, CD44, CD59, CD90, CD106 ve CD146 yüzey antijenleri için pozitifekspresyon; CD45, CD34 ve CD11b antijenleri için ise negatif ekspresyon karakterizasyonu göstermektedirler (Martens *et al.*, 2013) .

DPSCs eksprese ettikleri yüzey antijenlerinin yanı sıra, fibroblast benzeri morfolojik yapıları, plastik yüzeylere adezyon ve in vitro ortamda koloni oluşturabilme özellikleri sayesinde, MSCs ile benzer bir yapıya sahiptirler (Fawzy El- Sayed *et al.*, 2012) .

DPSCs' in Rejeneratif Potansiyelleri ve Doku Mühendisliği ile Rejeneratif Tıp' taki Yerleri

Rejeneratif tıp biyolojik fonksiyonu geliştirmek veya kaybedilmiş dokunun yerine geçmek amacıyla; hücreler ve mühendislik ile düzenlenmiş materyallerin uygun biyokimyasal faktörlerinin kombinasyonlarının kullanımı olarak tarif edilmektedir. Bu yüzden rejeneratif tıp tedavilerinin, hasar görmüş dokuları ve organları tamir edebilme potansiyelleri vardır. DPSCs' in rejeneratif potansiyelleri, çeşitli dental kaynaklı olmayan dokularda çalışılmıştır. İn vivo çalışmalar, bu hücrelerin; kemik, kan damarı,odontoblast, sinir, deri ve miyokard formasyonu yapabildiklerini göstermişlerdir (Dalton *et al.*, 2014; Atalayin *et al.*, 2016 ve Chamieh *et al.*, 2016) .

DPSCs; multipotent yapıları, yüksek proliferasyon kapasiteleri ve kolay izolasyon gibi biyolojik özellikleri sebebiyle,oral bölge ve oral olmayan bölgelerde rejeneratif tıpta önemli rol oynamaktadırlar (Ferroni *et al.*, 2015) .

DPSCs' in dentin rejenerasyonu potansiyelleri deneysel hayvan çalışmaları ile gösterilmeleri, diş rejenerasyonu için ise (yapı iskeleleri ile uygun bir mikroçevrenin yaratıldığı ortamda) orodontoblast progenitörü olarak görev yapmaları; bu hücrelerin ' Rejeneratif Diş Hekimliği ' nin temel kaynakları olduklarını kanıtlamaktadır (Didilescu *et al.*, 2013 ve Kawamura *et al.*, 2016) .

2.5.2Eksfoliye Olmuş İnsan Süt Dişlerinden Elde Edilen Kök Hücreler (hSHEDs)

Süt dişleri; gelişimsel kökenleri, doku yapıları ve sağladıkları fonksiyonları gibi birçok özellik yönünden, daimi dişlerden farklılık göstermektedirler. Süt dişlerinin kök rezorpsiyonları ve daimi dişlerin erüpsiyonları arasında, karmaşık dişlenme döneminin yaşandığı süreçte, geçici bir kaotik durum ortaya çıkmaktadır. Bu dinamik periyot;yedi yaş civarı başlayarak, sırayla yirmi adet süt dişinin tamamen değişimine kadar devam etmektedir (Kerkis *et al.*, 2012) .

Süt dentisyondan daimi dentisyona geçiş döneminde eksfoliye olmuş süt dişlerinden elde edilen; birden fazla hücreye farklılaşabilme potansiyelleri ile birlikte, olağanüstü bir ASCs popülasyonu olarak davranan kök hücre toplulukları hSHEDs olarak tanımlanmaktadırlar (Wang *et al.*, 2010).

hSHEDs' in İlk Keşfi

İlk olarak 2003 yılında, Miura ve arkadaşlarının, 7-8 yaş aralığındaki çocukların düşme zamanı gelmiş süt dişlerinin çekimini takiben; bu dişlerde kalan artık pulpal dokunun, multipotent yapıda birer kök hücre yapısında olduklarını göstermeleriyle birlikte; 'hSHEDs' terimi ortaya çıkmıştır (Miura *et al.*, 2003) .

hSHEDs' in Kökenleri, Kaynakları ve Genel Özellikleri

Kök hücreler farklı kaynaklardan izole edilmelerine rağmen, in vivo ortamdaki davranışları; gelişimsel ve terapötik potansiyelleri ile benzer özellikler sergilemeleri, embriyonik kökenleri ve anatomik lokasyonları ile bağlantılıdır. Genel diş yapısı oral ektoderm ve nöral kristadan (geçici embriyonik doku) gelişmekte olup; nöral krsta daha sonradan nöral krsta kök hücrelerine (NCSCs) farklılaşım göstermektedir. NCSCs, çeşitli hücre

tiplerine farklılaşabilen pluripotent hücre toplulukları olan ESCs gelişiminde rol oynarlar. hSHEDs; embriyonik kökenleri, kendi kendilerini yenileyebilme, proliferasyon kapasiteleri, spesifik olarak eksprese ettikleri markırları ve multipotent yapıları ile birlikte NCSCs ile eşdeğer özellikler göstermektedirler (Douarin *et al.*, 2008).

hSHEDs yüksek proliferasyon kabiliyetine sahip multipotent hücrelerin oluşturduğu bir popülasyon olup; bu karakterlerini başlıca, in vitro ve in vivo ortamlarda, şu fonksiyonel hücresel farklılaşmaları gerçekleştirerek göstermektedir (Nourbakhsh *et al.*, 2011) :

- Osteoblastlar
- Odontoblastlar
- Endotelyal hücreler
- Nöral hücreler
- Adiposit hücreler

hSHEDs' in proliferasyon derecelerinin diğer kök hücre türleri ile kıyaslandığı çeşitli çalışmalarda, özellikle DPSCs ve BMMSCs ile aralarında farklar bulunmuş ve hSHEDs' in proliferasyon hızları ile popülasyon ikileme zamanlamalarında daha yüksek sonuçlar gözlemlenmiştir. Bu pozitif özelliklerine rağmen, süt dişlerinde meydana gelen fizyolojik rezorpsiyona bağlı olarak, kalan pulpal doku miktarı oldukça az oranlarda seyretmektedir (Yu *et al.*, 2014 ve Luddin *et al.*, 2016) .

hSHEDs' in İzolasyon Alanları, İdentifikasyonları, Morfolojik ve Antijenik Karakterizasyonları

hSHEDs' in, eksfoliye olmuş süt dişlerinin kalan pulpal yapılarından izolasyonları kolaylıkla sağlanabilmekte ve hızlı kültür ortamı yayılımları gözlemlenebilmektedir (Behnia *et al.*, 2014) .

hSHEDs' in ilk keşfinde Miura ve arkadaşları yapmış oldukları kültür ortamında; küre biçimli hücre kümeleri gözlemlemiş ve bu kümelerin ayrımından sonra ise her bir hücrenin fibroblast benzeri hücreler şeklinde gelişimlerine devam ettiklerini saptamışlardır (Miura *et al.*, 2003) .

Freshney ve arkadaşları, 2007 yılında, DPSCs ile hSHEDs' i karşılaştırmış oldukları araştırmalarında; DPSCs ve hSHEDs arasında morfolojik olarak bazı farklılıklar gözlemlemişlerdir. DPSCs' in büyük bir bölümünün fibroblast benzeri; hSHEDs' in ise epitel benzeri hücreler olarak görüldüğünü bildirmişlerdir (Freshney *et al.*, 2007) .

hSHEDs, DPSCs ve BMMSCs ile benzer yapıda, MSCs markırlarında pozitif ekspresyon (CD105, CD90, CD73) ; ancak hematopoietik markırlarında (CD45, CD34, CD11b) negatif ekspresyon göstermektedirler (Sakai *et al.*, 2012) .

hSHEDs, DPSCs ve BMMSCs' den farklı olarak; CD105 ve CD146 markırlarını daha yüksek oranlarda ekprese etmektedirler. Bu markırların yüksek ekspresyonu da hSHEDs' in daha yüksek proliferasyon ve diferansiyasyon kabiliyetlerini açıklamaktadır (Li *et al.*, 2014) .

Yapılmış olan başka çalışmalarda ise hSHEDs' in ekprese ettikleri yüzey markırları şu şekilde toparlanmıştır (Wang *et al.*, 2012 ve Behnia *et al.*, 2014):

Pozitif markırlar:

- CD29
- CD105
- STRO-1 (Erken MSCs markırı)
- CD146 (Erken MSCs markırı)

Negatif Markırlar:

- CD31
- CD34

hSHEDs' in Rejeneratif Potansiyelleri ve Doku Mühendisliği ile Rejeneratif Tıp' taki Yerleri

Süt dişlerinin pulpal dokusunda yer alan hSHEDs'in keşfi ve MSCs karakterizasyonlarının tespit edilmesinden itibaren; hSHEDs, gelecek vaat eden birer kök hücre kaynağı olarak düşünülmüştür. Bu hücrelerin; in vitro ve in vivo ortamlarda; dentin – kemik üretimi yapan hücreler, endotelial hücreler, nöral hücreler ve miyosit hücre gruplarına farklılaşabildikleri ve hayvan modellerinde doku mühendisliği adına çeşitli defektleri (Kemik defektleri, musküler distrofi, omurilik yaralanmaları) rejenere edebildikleri gösterilmiştir (Kürkçü, 2010; Ma *et al.*, 2012; Bento *et al.*, 2013 ve Jeoni *et al.* 2014) .

hSHEDs' in, DPSCs ile benzer özelliklerde nöron, adiposit, osteoblast, kondroblast ve odontoblast hücrelerine farklılaşabilme potansiyelleri in vivo çalışmalarda test edilmiştir. İnsan diş kesitlerine ekimi yapılan hSHEDs' in, daha sonrasında immün sistemi baskılanmış farelere aktarımı sonucunda; bu hücrelerin dentin benzeri dokular oluşturdukları tespit edilmiştir (Cordeiro *et al.*, 2008 ve Chen *et al.*, 2014) .

Bazı araştırmacılar hSHEDs' in in vivo ortamda osteoblastlara farklılaşabilme potansiyellerinin olduğunu iddia etse de; Miura ve arkadaşları bu hücrelerin kemik oluşumunda, osteoindüktif faktör olarak rol aldıklarını savunmaktadırlar (Miura *et al.*, 2003 ve Wang *et al.*, 2012) .

Sonuç olarak; zarar görmüş diş dokularının tamirinde, kemik rejenerasyonun indüklenmesinde, kırık dokuların doku mühendisliğinde ve dejenere olmuş ya da yaralanma meydana gelmiş nöral dokuların tamir edilmesi amacıyla kullanılan kök hücre terapilerinde; süt dişleri umut verici birer rejeneratif tıp kaynağı olarak düşünülmeye başlanmıştır (Kashyap, 2015) .

hSHEDs' in Terapötik Amaçlı Rejeneratif Terapi Araştırmalarında Kullanım Alanları

Eksfoliye olmuş süt dişlerinin pulpal yapıları; kondrosit, osteoblast, adiposit ve mezenkimal kök hücreler içermektedir. Tüm bu hücreler birçok hastalığın tedavisinde, büyük oranda terapötik potansiyeller içermektedirler(Goomer *et al.*, 2014).

hSHEDs' in terapötik amaçlı araştırmalarda kullanıldıkları başlıca hastalıklar (Goomer *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2014; Mita *et al.*, 2015; Yamaguchi *et al.*, 2015 ve Monteiro *et al.*, 2016) :

- Nörodejeneratif Hastalıklar (Alzheimer, Parkinson, Amyotrofik Lateral Sklerozis (ALS))
- Kronik Kalp Rahatsızlıkları (Konjestif Kalp Yetmezliği, Kronik İskemik Kalp Yetmezliği)
- Periodontal Hastalıklar
- Dişlerin ve kemiklerin yeniden inşası

hSHEDs' in Terapötik Amaçlı Diğer Kullanım Alanları:

- Ortofasial Kemik Defektleri Tedavisinde (Zheng *et al.*, 2009)
- Osteonekröz Meydana Gelmiş Vakaların Tedavisinde (Feritosa *et al.*, 2010)
- Korneal Yüzey Rekonstrüksiyonunda (Gomes *et al.*, 2010)
- Lupus Eritematöz Tedavisinde (Yamaza *et al.*, 2010)
- Nöral Yaralanmalarda (Rossi *et al.*, 2007)
- Renal Disfonksiyon Tedavisinde (Yamaza *et al.*, 2010)
- Kranial Kemik Defektleri Tedavisinde (Kerkiset *et al.*, 2012)
- Omurilik Yaralanmaları- Nörörejeneratif Terapilerde (Sakai *et al.*, 2012)
- Serebral İskemi Tedavisinde (Inoue *et al.*, 2013)

2.5.3 Apikal Papilla Kaynaklı Kök Hücreler (SCAPs)

Apikal papilla; gelişmekte olan dişlerin kök yapılarının uç kısımlarında lokalize olmuş, histolojik olarak pulpal yapıdan farklılık gösteren bir dokudur. Kök gelişimi ile alakalı olarak bu doku; MSCs' in potansiyel bir kaynağını oluşturmaktadır (Sedgley *et al.*, 2012 ve Shiehazadeh *et al.*, 2014) .

SCAPs ilk olarak; Sonoyama ve arkadaşları tarafından 2006 yılında, DSCs' in yeni bir popülasyonu olarak yirmi yaş dişlerinin apikal papilla alanlarından izole edilmişler ve papillanın apikal alanından elde edilen kök hücreler olarak adlandırılmışlardır (Sonoyama *et al.*, 2006) .

SCAPs, henüz gelişimini tamamlamamış olan dişlerin apikal papilla alanındaki dokulardan izole edilen ve MSCs karakteristiğine sahip olan hücrelerdir (Wu *et al.*, 2012) .

Dişsel gelişimin erken safhalarında oluşmaya başlayan apikal papilla; diş köklerinin uç kısımlarına doğru hareket ederek, radiküler dentin ve pulpal dokunun gelişimlerinin devamlılığında önemli bir rol oynamaktadır. Bu sebeple SCAPs, pulpa- dentin kompleksinin rejenerasyonu için mükemmel bir kaynak olarak görülmektedirler (Schneider *et al.*, 2014) .

Diğer DSCs ile benzer özelliklerde SCAPs, STRO-1 ve CD146 gibi erken mezenkimal hücre yüzey antijenlerini ve kendilerine özgü CD24 antijenini eksprese etmektedirler (Zhang *et al.*, 2014) .

Uygun kültür koşulları altında SCAPs, kolojenik fibroblast benzeri hücre toplulukları şeklinde prolifer olmakta; bunun yanı sıra; odontojenik, osteoblastik ve adiposit benzeri hücrelere farklılaşma göstermektedirler (Huang *et al.*, 2009) .

SCAPs ve DPSCs karşılaştırıldığı zaman SCAPs , DPSCs' e kıyasla (Sonoyama *et al.*, 2006; Sonoyama *et al.*, 2008 ve Friedlander *et al.*, 2009) :

- Daha yüksek oranlarda STRO-1 ekspresyonu
- Daha yüksek popülasyon proliferasyonu
- Daha yüksek in vivo dentin rejenerasyonu kapasitesi
- Daha yüksek mineralizasyon kapasitesi
- Daha yüksek telomeraz aktivitesi
- Daha yüksek migrasyon kapasitesi gibi üstünlükler göstermektedirler.

Yapılan in vivo çalışmalarla desteklenmiş olan; SCAPs' in dentin rejenerasyon kabiliyetleri, çeşitli farklılaşma potansiyelleri, bio-kök oluşturabilme kapasiteleri bu hücrelerin doku rejenerasyonlarında ve doku mühendisliğinde kullanılabileceklerini göstermiştir (Wang *et al.*, 2014 ve Yu, *et al.*, 2016).

Bu bulgular temelinde SCAPs' in, kök dentin formasyonundan sorumlu olan primer odontoblastların bir kaynağı olduğu ve bu özelliklerinin, apikal periodontitis veya apse gelişmiş henüz gelişimini tamamlamamış dişlerin klinik olarak apeksogenezis fenomeni ile reparatif dentin oluşumunu açıklayabilecek yapılar oldukları düşünülmektedir (Chueh *et al.*, 2006 ve Huang, 2008).

2.5.4 Periodontal Ligament Kaynaklı Kök Hücreler (PDLSCs)

Periodonsiyum bölgesi; epitel ve mineralize bağ doku yapılarını içeren , kompleks bir anatomik yapıdır. PDL ise; sement ve alveolar soketin iç duvarı arasında seyreden, dental foliküllerden ayrılmış, yumuşak bağ dokularıdır (Li *et al.*, 2014 ve Roozgear *et al.*, 2015) .

PDL bölgesinin, çeşitli hasarlara cevap niteliğinde sementoblastik veya osteoblastik farklılaşım gösterebilen progenitör hücreler içeren heterojen bir yapı oluşu; bu alandaki kök hücre varlığının sorgulanmasına neden olmuştur (Rimondini *et al.*, 2009). Bu amaçla; PDLSCs' in izolasyonu

ilk kez, Seo ve arkadaşlarının 2004 yılında yapmış oldukları araştırma ile rapor edilmiştir (Seo *et al.*, 2004).

PDLSCs, BMMSCs' e kıyasla; daha uzun ömürlü yapıları ile birlikte, daha fazla proliferasyon ve kolojenik yapılanma göstermektedirler. Farklılaşma kapasiteleri değerlendirmelerinde ise; bu hücrelerin uygun kültür koşulları altında; sementoblastik, osteoblastik, adipojenik, kondrojenik, nörojenik ve kolajen üreten hücrelerin özelliklerini sergilediyebildikleri gözlemlenmiştir. Bu farklılaşma kapasiteleri sayesinde PDLSCs' in in vivo ortamda, sement ve periodontal ligament karakteristiğinde yapılar üretebildiği saptanmıştır (Seo *et al.*, 2004 ve Nagatomo *et al.*, 2006) .

PDLSCs, BMMSCs' e ve DPSCs' e benzer şekillerde; STRO-1 ve CD146 gibi erken MSCs markırlarını eksprese etmektedirler. Bu markırların yanı sıra; sklerotik ve tendon- spesifik transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını da göstermektedirler. Bu özelliklerinden farklı olarak PDLSCs, sementoblastik/ osteoblastik markırlar eksprese etmelerine rağmen; hematopoietik komponentleri sebebiyle, in vivo ortamda, dentin formasyonu kabiliyetleri yoktur (Park *et al.*, 2011 ve Saito *et al.*, 2015) .

Periodontitis gibi, dişler çevresinde yumuşak ve sert doku hasarlarına sebep olan periodontal hastalıklarda; PDLSCs, bu yapıların rejenerasyonu adına uygulanan doku mühendisliği ve hücre bazlı tedavilerde uygun birer hücresel kaynak olarak başarıyla kullanılmaktadırlar (Li *et al.*, 2014) .

2.5.5Dental Foliküllerin Progenitör Hücreleri (DFPCs)

Dental folikül, diş germi etrafını çepeçevre saran ektomezenkimal kaynaklı bir hücre yoğunlaşmasıdır. Diş germi çevresindeki foliküler yapılar, dişsel gelişimin erken safhalarında meydana gelmekte ve periodonsiyum, periodontal ligament, sement ve alveolar kemiğin

oluşumuna katkıda bulunan hücreler içermektedirler (Morsczeck *et al.*, 2005 ve Luan *et al.*, 2006) .

Dental foliküllerin ektomezenkimal yapılı fibröz dokulardan; sement, kemik ve PDL oluşturabilmeleri nedeniyle, bu yapılar multipotent dokular olarak düşünülmektedirler. Bu düşünce ışığında; ilk kez gömülü üçüncü büyük azı dişlerinin foliküler yapılarının analiz edilmesiyle, DFPCs' in izolasyonları başarıyla gerçekleştirilmiştir (Morsczeck *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2012 ve Nemoto *et al.*, 2016) .

Gömülü üçüncü büyük azı dişlerinin foliküler alanlarından kolaylıkla izole edilebilen DFPCs; STRO-1, CD13, CD44, CD73, Notch1 ve Nestin gibi MSCsbelirteçleri ile birlikte GoPro49 ve Golgi proteini gibi kendilerine özgü belirteçleri de eksprese etmektedirler (Takatalo *et al.*, 2009 ve Drees *et al.*, 2013).

Uygun kültür koşulları altında DFPCs' in; osteoblast, sementoblast, kondrosit, adiposit ve nöron benzeri hücrelere farklılaşabilme potansiyelleri mevcuttur. Son yıllarda yapılan çalışmalarla, 38 °Cve 40 °C aralığında kültüre edilen DFPCs' in, ısı stresine bağlı olarak daha etkili bir ostojenik farklılaşma gösterebilecekleri de bildirilmiştir (Jamal *et al.*, 2011 ; Aonuma *et al.*, 2012 ve Rad *et al.*, 2013) .

DFPCs in vivo ortamda; dentin, sement veya kemik formasyonu sağlayamamalarına rağmen; yapılan bazı çalışmalarda bu hücrelerin, sement benzeri matriksler ve kemik yapıları sentezleyebildikleri gözlemlenmiştir. Ne yazık ki; periodontal hastalıkların hücresel tedavileri süresince, bu hücrelerin potansiyel kabiliyetleri henüz net olarak açıklanamamıştır (Li *et al.*, 2014; Sowmya *et al.*, 2015 ve Nemoto *et al.*, 2016) .

2.6 Dental Kaynaklı Kök Hücrelerin (DSCs) Alternatif ve Talep Edilir Kök Hücre Kaynakları Olarak Kabul Edilmelerinin Nedenleri

- Daimi veya çocukların eksfoliye olmuş süt dişlerinin pulpal yapılarının ekstirpasyon işlemi, invaziv olmayan bir protokoldür
- İzole edilebilen kök hücrelerin büyük bir oranı pulpal doku içerisinde yer almaktadır
- DSCs; kemik, dentin kırkırdak, yağ, sinir ve kas gibi çeşitli hücre tipine farklılaşabilme ve dönüşebilme kapasitesine sahiptirler
- DSCs, çeşitli biyomateriyallere uyumluluk ve adezyon gösterebilme özelliklerine sahiptirler
- Pulpal yapıda yer alan kök hücre popülasyonları, günümüz kök hücre popülasyonlarının (özellikle kordon kanı kök hücrelerinin dondurulması gibi) hareket kısıtlılığı ve doku kaybı yaratması sebebiyle; bu popülasyonlara en iyi alternatiflerden biri olarak düşünülmeye ve çeşitli hücrelere farklılaşabilme özellikleri sayesinde talep edilir kök hücre kaynakları olarak görülmeye başlamışlardır (Gronthos *et al.*, 2002 ; Graziano *et al.*, 2008 ve Aziz-Aly *et al.*, 2015) .

2.7 Dental Pulpa Kaynaklı Kök Hücrelerin Terapötik Amaçlı Klinik Kullanımları

Dental pulpada yer alan kök hücrelerin keşfi üzerine DPSCs; doğal diş yapısında gözlemlenen benzer yapıları içeren, mineralize olmuş odontoblast matriksi ve bağ dokusundan oluşan bir kompleksi rejenere edebilme yetenekleri ile; medikal alanda terapötik potansiyele sahip birer araç olarak kullanılabilecekleri konusunda gündeme gelmişlerdir (Dutilleul *et al.*, 2015) .

Bazı çalışmalarda DPSCs' in, altın standart olarak kabul edilen MSCs ve BMMSCs' den daha iyi bir terapötik potansiyele sahip oldukları bildirilmiştir (Alge *et al.*, 2010 ve Davies *et al.*, 2015).

Başlıca klinik kullanım alanları:

2.7.1 Korneal Rejenerasyon

Gomes ve arkadaşlarının yapmış oldukları hayvan çalışmasında; doku mühendisliği ile geliştirilmiş DPSCs içeren kılıflar; korneal alana yerleştirilerek, insan amniyotik membranı ile çevrelenmişlerdir. Araştırmacılar üç ay sonrasında yapılan histolojik analizlerde, sağlıklı bir korneal epitel formasyonu gözlemlemişlerdir. Çalışma sonucunda; doku mühendisliği ile harmanlanmış olan DPSCs' in, korneal epitelin rejenerasyonunda başarılı kabul edildikleri bildirilmiştir (Gomes *et al.*, 2010) .

2.7.2 Miyokard Enfarktüs Tedavisi

Miyokard Enfarktüsü (MI), tedavisi ve engellenmesi adına yapılan yenilikçi tedavi yaklaşımlarına rağmen, dünya genelinde ölüm oranı üst sıralarda yer alan hastalıklar arasında yer almaktadır (Faust *et al.*, 2016). Bu perspektiften bakılacak olursa, DPSCs' in kardiyak fenotipleri ilk olarak Arminan ve çalışma arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Arminan *et al.*, 2009) .

2.7.3 İskemi Tedavisi

Iohara ve arkadaşları, 2008 yılında dental pulpada yer alan endotelial progenitor hücrelerle benzer yapıda, yüksek vasküler karakterizasyona sahip DPSCs izole etmeyi başarmışlardır. DPSCs' in terapötik potansiyelleri ise; arka bacağına iskemi problemi olan bir fare modelinde, yüksek yoğunluklu kapiller formasyonu ile bu alanda başarılı bir kan akışı sağlanmasıyla gösterilmiştir (Iohara *et al.*, 2008) .

2.7.4Musküler Distrofi

Literatürde, DPSCs' in miyojenik potansiyellerini değerlendirmiş çeşitli çalışmalar yer almaktadır (Zhang *et al.*, 2008; Ranganathan *et al.*, 2012 ve Li *et al.*, 2015).

Yang ve arkadaşları, musküler distrofi bulunan *golden* türü bir köpekte insan DPSCs' i kullanarak, bu alanda çalışmalar yapan ilk araştırmacılar arasında yer almaktadırlar. DPSCs' in arterial ve musküler enjeksiyon yöntemi ile transferini takiben alınan biopsi örneklerinin immünohistokimya yöntemi ile değerlendirilmesi sonucunda; DPSCs' in önemli derecede köpek kaslarına iletildiği gösterilmiştir. DPSCs' in terapötik potansiyelleri; musküler distrofi gibi rahatsızlıklarda distrofin üreten çok çekirdekli kas hücrelerine farklılaşmaları ile açıklanmıştır (Yang *et al.*, 2010).

2.7.5Nörodejeneratif Hastalıklar (Alzheimer, Parkinson vb.)

Omuriliğin hasar gördüğü yaralanma olgularında, DPSCs' in sinirlerde uzun dönem rejenerasyonunu sağlayan bir kabiliyete sahip oldukları birkaç çalışmada gösterilmiştir (Leong *et al.*, 2012 ve Zhang *et al.*, 2016) .

Apel ve arkadaşları ise; Parkinson ve Alzheimer hastalıklarını içeren in vitro modellerde DPSCs' in sinirleri koruyucu ve tamir edici etkileri olduğunu gözlemlemişlerdir (Apel *et al.*, 2009 ve Nuti *et al.*, 2016) .

2.7.6 Karaciğer Rahatsızlıklarında Hepatositlerin Rejenerasyonu

Hepatosit, karaciğerin sitoplazmik kütlelerinin % 70-80' ini oluşturan ana doku hücresine verilen isimdir. Ishkitiev ve arkadaşları ; DPSCs' in morfolojik, fenotipik ve fonksiyonel olarak hepatositlere benzer hücrelere farklılaşabildiklerini göstermişlerdir (Ishkitiev *et al.*, 2012) .

2.7.7 Kraniyofasiyal Doku Rejenerasyonları

Kraniyofasiyal bölgenin; kemik, kıkırdak, ligamentöz doku, yumuşak doku ve nöromusküler liflerden oluşan kompleks bir yapıya sahip olması, bu bölgede meydana gelen doku hasarlarının tamiri ve yeniden yapılandırılmasında zorlayıcı durumlar oluşturmaktadır. Dental kaynaklı kök hücrelerinin yüksek proliferasyon oranları ve özelleşmiş doku formasyonu kapasitelerine sahip oluşlarına bağlı olarak; bu hücrelerin, hayvan çalışmalarıyla kraniyofasiyal doku ve organlarda uygulanabilirliği ispatlanmıştır (Mao *et al.*, 2017).

Temel olarak ektomezenkimal tabakadan köken alan DPSCs, osteojenik ve odontojenik farklılaşmayı indükleyebilen osteojenik markırlar içermektedirler. Bu tarz, nöral kristadan oluşum gösteren MSCsözelliği dental hücrelerin; kraniyofasiyal yapılara (kas, ligament, kıkırdak, kemik, periodontal membran ve dişler) morfolojik ve fonksiyonel olarak farklılaşarak, bu dokuların rejenerasyon ve tamir mekanizmalarında başarılı olmaktadır (Mao *et al.*, 2006) .

Aquino ve arkadaşları, 2009 yılında, yapmış oldukları çalışmalarında; üç aylık bir dönem içerisinde, kolajen yapı iskeleleri kullanarak oluşturulan klinik ve radyografik, DPSCs tarafından oluşturulan kemik rejenerasyonunu, klinik ve radyografik olarak gözlemlemişlerdir (Aquino *et al.*, 2009) .

2.7.8İnfertilite Tedavisi

DPSCs diğer tedavi uygulamalarının yanı sıra, infertilite tedavilerinde de kullanılmaktadır. Kerkis ve arkadaşları, başarı ile izole ettikleri DPSCs' ini erkek bir farenin testislerine enjekte etmişler ve çeşitli aralıklarla kontrol ettiklerifareleri, enjeksiyon prosedüründen sonra değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda, testislere enjekte edilen kök hücrelerin bu aralıklar

boyunca canlılıklarını koruduğu ve sperm üretebilen hücrelere farklılaşabildikleri rapor edilmiştir (Kerkis *et al.*, 2008) .

2.7.9Tip 1 Diabet Tedavisi

Diabet, sıklıkla gözlemlenen ve pankreasta yer alan adacıklardaki hücreler ile ilişkili, kronik dejeneratif endokrinal bir hastalıktır. ESCs ve ASCs; amniyotik sıvı, kemik iliği ve yağ dokusundan kaynaklanan hücreleri sentezleyen insülinin üretiminde kullanılmaktadırlar (Lumelsky *et al.*, 2001).

DPSCs' in, adacık benzeri topluluklara farklılaşmaları; Govindasamy ve arkadaşları tarafından gözlemlenmiştir (Govindasamy *et al.*, 2011) .Chen ve arkadaşları, yaptıkları çalışmalarında, monoklonal ve poliklonal yapıdaki DPSCs' den insülin üreten hücrelerin (IPCs) sentezlenebildiğini göstermişlerdir (Chen *et al.*, 2013).

2.8 Kök Hücre Bazlı Tedavilerin Diş Hekimliğinde İnterdisipliner Kullanımları ve 'Rejeneratif Diş Hekimliği'

Diş Hekimliği alanında yapılan güncel çalışmalarda; kök hücrelerin kullanılarak, dentin dokusunun, orofasiyal kemik ve kıkırdakların, temporomandibular eklemi içeren kraniyofasiyal dokuların, periodonsiyumun ve sement dokusunun rejenerasyonuna yönelik olan 'Rejeneratif Diş Hekimliği' ne odaklanılmıştır (Shekar *et al.*, 2012) .

2.8.1Dentin- Pulpa Kompleksinin Rejenerasyonu

Dentin – pulpa kompleksinin rejenerasyonu; pulpa kapaklayıcı materyallerin (KH / Kalsiyum Hidroksit, MTA / Mineral Trioksit Agregat, Biodentin) kullanımı ile birlikte, pulpada yer alan pulpal progenitör hücrelerin odontoblast benzeri hücrelere farklılaşmasının indüklenmesi ya da anjiyogeneziste önemli rol oynayan faktörlerin salınımı, progenitör hücrelerin güçlendirilmesi, hücrelerin farklılaşması ve sonuç olarak hasar

görmüş alanın remineralizasyonu ile ilişkilendirilmektedir (Tecles *et al.*, 2008).

Kök hücre kaynağı bakımından zengin olan dental dokulardan izolasyonu sağlanan kök hücre bazlı terapileri içeren çalışmalar mevcuttur. Yapılan bu çalışmalarla birlikte, parsiyel olarak kaybedilmiş pulpa ve dentin dokularının; DPSCs ve hSHEDs' in odontoblastik farklılaşma potansiyelleri ile birlikte rejenere edilebildikleri gösterilmiştir (Huang *et al.*, 2006; Tatullo *et al.*, 2014 ve Luddin *et al.*, 2016).

Pulpa odasının tavanında direkt pulpa ekspozürü oluşturulan domuz modelinde; otolog domuz SHEDs' nin yapı iskeleleri ile birlikte kombine kullanılarak transfer edilmeleri sonucu; dentin dokusunun in vivo ortamda da başarılı bir şekilde rejenerasyonunun gösterildiği çalışma, bu hücrelerin odontoblastik farklılaşmalarının güzel örneklerinden biridir (Zheng *et al.*, 2012) .

2.8.2 Endodontik Rejenerasyon

Son yıllarda, henüz olgunlaşmamış nekrotik dişlerin başarılı klinik raporlarının artması ile birlikte, ' Rejeneratif Endodonti ' alanına yönelim ve ilgi artmaya başlamıştır (Lovelace *et al.*, 2011) .

Rejeneratif endodontinin genel alanı; kök hücreler, büyüme faktörleri, doku mühendisliği materyalleri ve hücre-doku-organ kültüründen meydana gelmektedir. Günümüz teknolojisinde, postnatal kök hücre terapileri ışığında (rejeneratif endodonti uygulamalarının bir türü) , henüz apikal kapanımı tamamlanmamış dişlere otolog kök hücrelerin enjeksiyonu ile; bu hücrelerin farklılaşma kabiliyetlerinden faydalanılarak pulpal rejenerasyon yaratılabilmektedir (Murray *et al.*, 2007) .

Apikal papilla ve pulpal dokudan elde edilen kök hücrelerin, kök-kanal boşluğuna gönderildiği bir in vivo çalışmada, bu hücrelerin

odontoblast benzeri hücrelere farklılaşarak, dentin duvarlarında dentin benzeri, kanal boşluğunda ise pulpa benzeri bir doku oluşturdukları rapor edilmiştir (George *et al.*, 2010) .

2.8.3 Periodontal Rejenerasyon

Periodontal hastalıklar; dünya geneli popülasyonun %90' lık gibi büyük bir kesimini etkileyen, prevalansı oldukça yüksek olan hastalıklar arasında yer almaktadırlar. Çeşitli formları olan bu hastalıklar, gingivitisten periodontitise kadar uzanan ve bağ dokusu ile destek kemik dokusunda kayıplara neden olup; yetişkinlerde diş kayıpları ile sonuçlanabilen çeşitli sorunlar oluşturmaktadır. Periodontal hastalıkların tedavisinde; kemik greftleri, dişeti greftleri ve büyüme faktörleri gibi uygulanan rejeneratif yaklaşımlar, kimi zaman istenmeyen durumlar ile sonuçlanabilmektedirler (Pihlstrom *et al.*, 2005) .

İn vitro ortamda, DPSCsve hSHEDs' in osteoblastik ve sementoblastik farklılaşma potansiyellerinden faydalanılarak uygulanan kök hücre bazlı tedavi yaklaşımlarında; periodontal lezyonlarda iyileşmelerin gerçekleştiği, periodontal ligamentlerin ve sement tabakasının rejenere olduğu sonucuna varılmıştır (Flores *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2015 ve Farea *et al.*, 2016) .

2.8.4 Tüm Diş (Biyomühendislikle elde edilmiş) Rejenerasyonu

Diş gelişimi; odontogenezis, epitelyal ve mezenkimal dokuların karşılıklı ilişkilerini ve kron-kök- periodonsiyum arasındaki koordinasyonu kapsayan bir seri aşamayı içermektedir (Hu *et al.*, 2006) .

Tamamen fonksiyonel bir diş yaratabilmek amacıyla uygulanan; 'Diş Replasmanı ile Rejeneratif Tedavi' gelecekte gerçekleştirilmesi planlanan biyomühendislikle elde edilmiş organ transplantasyonlarının; uygulanabilir bir ön modeli olarak düşünülmektedir. (Ikeda *et al.*, 2009) .

Araştırmacılar, dental dokulardan kaynaklanan kök/ progenitör hücreler farklı dental hücre türlerine farklılaşabildikleri için; bu özelliklerinin, hasar görmüş dental dokuların ve diş kayıplarının rejenerasyonunda terapötik amaçlı kullanılması konusunda çalışmaktadırlar. Bu alandaki araştırmalar; in vitro ortamda, diş germi kaynaklı kök hücrelerin kullanılarak, biyomühendislik teknolojileri ile hazırlanmış yapay diş germinin tranplantasyonunu içeren, tüm diş rejenerasyonunun sağlanması, konusuna odaklanmıştır. (Nakao *et al.*, 2008 ve Yadav *et al.*, 2016) .

2.8.5 Tükürük Bezlerinin Rejenerasyonu

Baş ve boyun bölgesi kanserlerinin tedavilerinde uygulanan radyasyon kaynaklı hiposalivasyon oldukça sık karşılaşılan bir problemdir. Tükürük bezlerinde lokalize olmuş ve izole edilmiş kök hücre popülasyonlarının; atrofi sonrası tükürük bezlerinde rejenerasyon sağlayabildikleri bilinmektedir. Kök hücre bazlı tedavilerin; kserestomi şikayeti bulunan hastalarda da, diğer tedavilere kıyasla, en iyi alternatif tedavi yaklaşımı olacağı düşünülmektedir (Coppes *et al.*, 2011) .

2.8.6 Temporomandibular Eklem (TME) Rahatsızlıklarının Tedavisi

TME, sınırlı vaskülarizasyonu sebebiyle tedavi edilmesi en zor dokulardan biridir. TME problemi bulunan hastalar genellikle, yemek ve konuşma gibi normal aktivitelerde ağrıdan yakınmaktadırlar. TME' e ait artikular kıkırdak rejenerasyonunun başında; kök hücre bazlı tedaviler ve bu hücrelerin transferini sağlayabilen, enjekte edilebilir hidrojel iskeleler gelmektedir (Vinatier *et al.*, 2009) .

2.9 Doku Mühendisliği ve Kök Hücre Bazlı Tedavilerde Yapı İskeleleri ve Üç Boyutlu Baskı Yöntemleri

2.9.1 Üç Boyutlu Baskı Yöntemi

Bilim ve teknoloji alanlarında gerçekleştirilen günümüz gelişmelerinden; bu ilerleyişlerin sağlık alanlarında önemli değişiklikler yarattığı izlenmektedir. ‘ Üç Boyutlu (3D) Baskı Yöntemleri’ de, bu tarz gelişimlerin en güzel örneklerinden biri olup; farklı endüstriyel alanlarda, güçlü bir tekniksel gelişim olarak kullanılabilirlikleri düşünülmektedir (Yun, 2015) .

3D baskı yöntemi; gelişmiş üretim sistemine bağlı olarak, materyallerin tabaka tabaka eklenmesi ile üç boyutlu hacimsel yapıların fabrikasyonu prensibine dayanan bir teknolojidir (Derby, 2012) .

Sağlık alanında kullanımları oldukça yaygınlaşan 3D baskı yöntemlerini; uygulama yerleri ile teşhis ve tedavi edici alanlar açısından olmak üzere sınıflayabilmek mümkündür. Aynı zamanda, 3D yöntemler; doku ve organların gerçek ölçütlerinde baskılarının yapılmasını sağlayarak; temel tıp alanında daha kaliteli araştırmaların yapılmasına izin vermektedirler. Bu teknoloji ile birlikte sağlık alanında, alışılmış tekniklerin dışına çıkılarak, çok daha efektif uygulamalar oluşturulacağına inanılmaktadır (Chia *et al.*, 2015) .

2.9.2 Üç Boyutlu Baskı Yönteminin Çalışma Prensibi

Üç boyutlu yöntem ile hazırlanan yapıların dizaynları; bilgisayar yazılım programları , bilgisayarlı tomografi (CT) ile alınmış görüntüler, manyetik rezonans (MR) görüntüleme veya X- ray yöntemleri kullanılarak hazırlanmaktadır. Farklı isimlerde 3D baskı yapabilen cihazların ortak çalışma prensibi; X, Y ve Z düzlemlerinde, koordine hareketlere dayanmaktadır. 3D yapıların gelişiminde kullanılan günümüz yöntemi, 3D

yapılandırma olarak da adlandırılan ‘ Hızlı Prototip / *Rapid Prototyping* (RP)’ metodudur. Bu yöntem ile birlikte, paralel kesitlere ayrıştırılan objelerin şekillerinden 3D formatında kompleks objeler üretilmekte, nesne şekli ise kesitlerin tabaka –tabaka eklenmesiyle fabrike edilmektedir (Serra *et al.*, 2013 ve Obregon *et al.*, 2015).

2.9.3 Baskı Yönerinin Keşfi ve Üç Boyutlu Yöntemlerin Gelişimi

15. yy’ da tahta kalıpların basımının keşfi ve endüstriyel ölçeklendirme ile basım sağlanabilmesinin gelişimi, yazı ve görüntülerin çoğaltılmasını ve bilginin yaygınlaştırılmasını hızlandırmıştır. Baskı alabilmenin ortaya çıkması ile birlikte; toplum, eğitim, politika, dil ve din üzerinde devrimsel bir etki yaratılmıştır. Geçtiğimiz 15-20 yıllık süreç içerisinde; baskı teknolojisi iki boyutlu (2D) yöntemlerden, materyallerin art arda gelen tabakalarının birleştirilmesi ile 3D şekillerinin elde edilebilmesinin sağlandığı hızlı bir ilerleyiş elde edilmiştir (Kruth 1991 ve Murphy *et al.*, 2014) .

3D baskı ilk olarak 1986 yılında Charles W. Hull tarafından ifade edilmiştir. Hull’ un ‘Stereolithografi’ olarak isimlendirdiği metoduna göre 3D katı yapıların oluşumu; ultraviyole ışınları ile ışınlanan materyallerin ince tabakalarının, ardışık olarak tabakalar halinde basılmaları şeklinde açıklanmıştır (Hull, 1986) .

Stereolithografi metodu daha sonra, rezin kalıplar elde etmek amacıyla, biyolojik materyaller kullanılarak 3D yapı iskelelerinin formasyonunda uygulanmaya başlanmıştır. İlerleyen dönemlerde, çözücü içermeyen, aköz yapıdaki sistemlerin gelişimi ile birlikte; biyolojik materyallerin, hücre ekilmiş veya ekilmemiş 3D yapı iskelelerine dönüşmüş formlarının eldesi başarıyla gerçekleştirilmiştir (Nakamura *et al.*, 2010) .

Günümüze gelindiğinde, 3D baskı yöntemi teknolojisinde, hücre biyolojisinde ve materyal biliminde ulaşılmış olan son aşamada; direkt doku ve organların üretiminin sağlanabileceği ya da klinik uygulamalara yönelik medikal araçların (stent, splint vb.) üretimi gibi doku mühendisliğinin bir formu haline getirmek çabası içerisine girilmiştir (Zopf *et al.*, 2013) .

2.9.4 Üç Boyutlu Baskı Yönteminin Kullanım Alanları

3D baskı yönteminin kullanışlı yapısı, bu yöntemin çeşitli alanlarda kullanımını yaygınlaştırmış ve uygulama yelpazesini genişletmiştir. Yöntemin başlıca kullanım sahaları (Flügge *et al.*, 2013 ve Shqaidef *et al.*, 2014):

- Oral ve maksillofasiyal cerrahi (Oral kanserler ve ortognatik cerrahi öncesi tedavi planı oluşturmak amacıyla modelleme yapılması)
- Cerrahi stentlerin uygulanması
- Anatomik defektlerin üç boyutlu restorasyonları
- Kompleks organların yeniden oluşturulması
- Konjenital, kanser veya travma sebebiyle meydana gelmiş kraniyofasiyal defektlerde anatomik yapıların birebir oluşturulması

2.9.5 Üç Boyutlu Baskı Yönteminin Rejeneratif Diş Hekimliği ve Diş Hekimliğinde Kullanım Alanları

Kraniyofasiyal yapıların kompleks anatomisi sebebiyle; travma, rezektif cerrahiler veya konjenital malformasyonlar sonucu bu dokularda meydana gelen hasarların tamamıyla geri dönüşümlerinin sağlanması oldukça zordur. Son dönemlerde geliştirilen önemli rejeneratif stratejilere rağmen; bu yapıların doğal üç boyutlu kompleksliği ve hücreler arası iletişimleri sağlanamadığından, tam anlamıyla bir rejenerasyon sağlamak pek mümkün olamamıştır (Obregon *et al.*, 2015) .

Bu zorlukların üstesinden gelmek amacıyla; 3D baskı yöntemi ile elde edilen yapı iskeleleri, doku analogları ve organların, rejeneratif tıp ve rejeneratif diş hekimliği alanlarında, konvansiyonel tedavilere birer alternatif olmaları ümit edilmektedir. 3D baskı yöntemi ile elde edilen yapı iskeleleri ve doku-organ analogları, rejenerasyon için gerekli hücreler ve biomateryaller için katı, serbest hareketlerin sağlanabildiği bir alan yaratmaktadırlar (Murphy *et al.*, 2014 ve Obregon *et al.*, 2015) .

Hedeflenen başlıca amaçlar şu şekilde sıralanabilmektedir:

- Hastalarda bireysel oklüzyonun belirlenmesi ve üç boyutlu yöntemler ile fabrike edilmiş, döküm ölçü gerektirmeyen tek splint yöntemi ile tedavi sağlamak
- Değişik morfolojilere sahip diş yüzeylerine özgü bireysel apareyler hazırlamak
- İmplant yerleşimine rehberlik edebilecek, metal yuvalı ve fenestrasyon alanları belirlenmiş özel ağız içi apareyler hazırlamak
- Ortognatik cerrahi öncesi, tedavi planlaması için, gerçek anatomik yapı ile uyumlu modellerin elde edilmesini sağlamak
- Ortodontik tedavi öncesi ve sonrasında; diş ve iskeletsel yapı ilişkilerinin, yüz estetiğinin değerlendirilmesi amacıyla modelleme yapılması
- Ortodontik tedavi sonrası, yeniden şekillenecek olan yumuşak ve sert doku ilişkilerinin önceden hesaplanabilmesi amacıyla modelleme yapılması (Hajeer *et al.*, 2004 ve Yun *et al.*, 2015) .

2.9.6 Üç Boyutlu Baskı Yöntemi İle Elde Edilen Yapı İskeleleri

Gelişmekte olan bilim dünyasında, yapı iskelesi odaklı doku mühendisliği, son birkaç yıl içerisinde yapı iskelelerinin dizaynında yapılan gelişimlerle gelecek vaat etmeye başlamıştır (Guarino *et al.*, 2012) .

Yapı iskeleleri; genel anlamda doku mühendisliği için geçici bir kalıp olarak görev alan, yapay ekstrasellüler matriks yapılarıdır (Tiejun *et al.*, 2014).

Daha geniş bir tanımla yapı iskelelerini, poröz ve katı yapıda bir biyomateryal ile dizayn edilmiş;

- Sınırları belirli ve 3D boşluklu bir alanda; hücre lokasyonlarını doğru şekilde pozisyonlandıran,
- ECM işlevi gören, hücre adezyonu ve hücre-biyomateryal ilişkilerini destekleyen,
- Hücre canlılığına, proliferasyonuna ve farklılaşmasına izin veren; gazlar, besinler ve düzenleyici faktörlerin yeterli derecede hücrelere taşınmasına izin veren,
- Hasar görmüş dokunun, doğal rejenerasyon derecesine yakın, kontrollü bir bioçözünürlüğü olması beklenen,
- İn vivo kullanımlarda; uygulandıkları alanlarda, çok az veya hiç enflamasyon ya da toksik etkinin görülmediği yapılar olarak açıklanabilmektedirler (Kim *et al.*, 2012 ve Kinjal *et al.*, 2016) .

Fonksiyonel yapı iskelelerinin başlıca görevleri;

- Kök hücrelerin kontrollü bir şekilde farklılaşmalarına olanak sağlayan bir mikroçevre ortamı sunmak,
- Hücrelerin bağlanabileceği, proliferasyon gösterebileceği bir yüzey alanı olarak davranmak,
- Canlı dokuların canlılıklarını devam ettirmek için gereksinim duyulan yapısal ve fonksiyonel protein ve sakkaridleri içeren bir ekstrasellüler alan yaratmak,
- Fiziksel yapıları sayesinde, yapı iskeleleri üzerine ekimleri yapılmış olan hücrelerin davranışlarını kontrol edebilmektir (Derby, 2012 ve Piva *et al.*, 2014) .

2.9.7 İdeal Bir Yapı İskelesinin Taşınması Gereken Özellikler

İdeal bir yapı iskelesinin başlıca sahip olması gereken özellikler (Lavik *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2008; Yıldırım *et al.*, 2011; Zavan *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2012; Guarino *et al.*, 2012 ve Hossein *et al.*, 2015):

- Hücrelerin yerleşimine – dağılımına - proliferasyonuna; büyüme faktörleri, besin, oksijen ve hücresel atıkların etkili bir şekilde difüzyonuna izin veren poröz bir yapıya sahip olmalı
- Yerleştirildiği doku ile uyum içerisinde olmalı (Biyouyumlu)
- Kayıp dokuların rejenerasyonuna izin verecek bir şekle sahip olmalı
- Doku içerisinde zamanla çözünmeli (Biyobozunur)
- Fabrike edildiği materyal toksik etki yaratmamalı
- Fabrikasyonları kolay olmalı
- İn vivo ortamda kültüre edilebilmeli
- Hücrelere, doğal yaşamsal işlevleri için, gerekli optimum biyokimyasal çevreyi sağlamalı
- Hücrelerin birbirleri ile olan ilişkilerini ve doku tamirini indüklemeli
- Materyal içerikleri; hasarlı dokuların iyileşme süreci boyunca kayıp dokunun üç boyutlu bütünlüğünü sağlayabilecek şekilde, yeterli fiziksel ve mekanik güce sahip olmalı
- Kök hücrelerin, birden farklı hücre tipine farklılaşmalarına rehberlik etmeli (Örneğin; tüm diş rejenerasyonunun amaçlandığı bir çalışmada kullanılabilecek olan yapı iskeleleri hücrelerin; odontoblastlara, sementoblastlara, pulpal fibroblastlara, vasküler hücrelere ve / veya nöral sonlanmalara ve potansiyel olarak ameloblastlara farklılaşmalarını desteklemelidir.)
- Hücreler ve büyüme faktörleri ile kombine olarak, osteogenezisi meydana getirmeli

2.9.8Yapı İskelelerinin Sınıflandırılması

Yapı iskeleleri en geniş sınıflama ile iki bölüme ayrılabilirler.

1.Döküm İskeleler : Oldukça rijit olup; kişiye özel üretilen yapı iskeleleridir.

2.Enjekte Edilebilir İskeleler : Doku rejenerasyonu gerekli olan alanlar için kalıp şeklinde hazır olan, akışkanlığı az jel formundaki iskelelerdir.

Her iki yapı iskelesi tipi de; kısa yarılanma ömrüne sahip proteinler olan morfojenik sinyaller aracılığı ile fonksiyonel olabilmektedir. Morfojenik sinyaller; poli- glikolik asit (PLGA) gibi polimerlerin kullanıldığı döküm iskeleler ve kolajen, hidrojel gibi materyallerle elde edilen enjekte edilebilir iskelelerle kombine edilebilmektedirler (Golub *et al.*, 2010 ve Piva *et al.*, 2014).

Yapı iskeleleri, 'Kullanılan Biyouyumlu ve Biyobozunur Biyomateriyallerin Yapısına Göre' de sınıflara ayrılabilirler (Chandki *et al.*, 2012; Mi *et al.*, 2013; Gathani ve Raghavendra, 2016) .

Bunlar:

1.Doğal/ BiyouyumluYapı İskeleleri

- Kolajen iskeleler (Protein yapıda)
- Glikozaminoglikan (GAG) İskeleler
- Demineralize / Doğal Dentin Matriksi İskeleleri
- Fibrin İskeleleri
- Trombositten Zengin Plazma (PRP) İskeleleri
- Emdogain İskeleler

2.Sentetik/ Yapay Yapı İskeleleri

- Polilaktik Asit (PLA) Bazlı İskeleler
- Polikaprolakton (PCL) Bazlı İskeleler
- Poliglikolid (PLG) Bazlı İskeleler
- Polilaktik- Ko- Glikolik Asit (PLGA) Bazlı İskeleler

- Poliüretan (PU) Bazlı İskeleler
- Termoplastik Poliüretan (TPU) İskeleler
- Sitozan iskeleler (Polisakkarid yapıda)
- Arjinin İskeleler
- Agaroza İskeleler
- Hidrojel İskeleler
- Titanyum İskeleler
- Biyoseramik İskeleler
- Poliepsilon İskeleler
- Trikalsiyum Fosfat (TCP) İskeleler

3.Kombine Yapı İskeleleri

- PLA/ PCL İskeleler
- PLA/ Kolajen İskeleler
- PLA/ Sitozan İskeleler
- PLA/ PLGA İskeleler
- Polimer Kompozit İskeleler
 - PLA/ Hidroksiapatit (HA) İskeleler
 - PLA/ Karbon nanotüp (CNT) İskeleler

2.9.9Yapı İskelelerini Oluşturan Biyomateryallerin Taşıdığı Temel Özellikler

Biyomateryallerin sahip oldukları bazı temel özellikleri, özellikle kemik rejenerasyonu açısından oldukça önemli etkiler yaratmaktadırlar. Biyomateryallerin taşınması gereken en temel özellikler (Maraldi *et al.*, 2013 ve Amrollahi *et al.*, 2016):

- Osteojenik hücre cevabını destekleyen bir biyokimyasal birleşime sahip olmaları (osteoindüktif)

- Toksik ürünlerin salınmadığı; biyobozunurluğu sağlayan kinetik bir yapıları olmalı
- Doku içerisinde düzgün bir gelişime izin veren yüksek bir poröz ağsal yapı bağlantıları olmalı
- Sentetik yapıda olan yapı iskelelerinin polimer içerikleri; hidrolitik bir çözünmeye izin vermeli ve doku üretim oranı ile eşdeğer zamanlarda çözünümüne uğramalıdır
- Hücrelerin hayatta kalmaları için gerekli besin ve oksijen, hücre metabolizmasından salınan atık ürünlerin uzaklaştırılmasını indükleyen, doku nekrozunu engelleyen ve sonuç olarak doku iyileşmesini meydana getiren bir vaskülarizasyon yaratabilme gücü

2.9.10 Yapı İskelelerinin Fabrikasyon Metotları ve İskelelerin Dizaynında Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar

Doku mühendisliği alanında yapı iskelelerinin fabrikasyonunda çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Mi *et al.*, 2013) ;

- Çözücü kullanılarak, biyomateryalin tamamen çözündürülerek uygulanan döküm metodu / partiküler olarak çözme metodu
- Termal indükleme ile bölümsel olarak seperasyon metodu
- Bir sıvı içerisinde yayılmış gaz kabarcıkları metodu ile fabrikasyon (*Batch Foaming*)
- Mikrosellüler enjeksiyon ile biçimlendirme prensibi

Bu metotların sıklıkla kullanılanları şu şekilde sıralanabilmektedir:

- **Elektrospining Metodu**

Elektrospining metodu, çeşitli polimer ve kompozit materyalleri kullanılarak; mikro ve nano düzeylerinde polimer lifleri üretilen oldukça basit ve çok yönlü bir tekniktir. Bu yöntem ile; sensörler, fotovoltajik hücreler, kimyasal- biyolojik olarak dirençli kılıflar, ilaçların dolaşım sisteminde

ulaşımını sağlayan taşıyıcılar, adezyonu önleyici bariyerler, yara örtülmesi için substratlar ve özellikle doku mühendisliği alanı için yapı iskelelerinin fabrikasyonu yapılabilmektedir (Ni *et al.*, 2011) .

Doku mühendisliği, kompozit materyaller, gaz sensörleri, kendiliğinden iyileşme gösterebilen membranlar veya ilgili alana ilaç ulaşımı gibi önemli uygulamalarda; yaratılan yapı iskelelerinin yüzey inceliklerinin oldukça önemli olmasına rağmen, geniş alanlarda organik moleküllerin (özellikle polimerler) biraraya gelerek bu tarz membranlar oluşturmaları oldukça zordur. Elektrospining metodu ise; ince membranların yaratılmasını amaçlayan çeşitli yöntemler arasında; polimer, seramik ve kompozitlerin kullanılarak bu amacın başarı ile geręekleřtirildięi en basit yöntemlerden biridir (Li *et al.*, 2016) .

- **Katı Serbest Form Fabrikasyon / *Solid Free Form* (SFF) Metodu**

RP metodunun bir formu olan SFF, hastaya özel, kompleks 3D yapıların dizayn ve fabrikasyonuna izin veren bir yöntemdir. Biyomedikal araçların hem mikro hem de makromimarilerinde kontrol sunabilen bir metottur (Winder ve Bibb, 2005) .

SFF teknolojilerinin birçoğu; 3D biyomedikal araçları, tabaka- tabaka ekleme prosedürü ile çalışmaktadır. Genel SFF tekniği (Chia *et al.*, 2015) :

- ✓ 3D bir bilgisayar modeli yaratmak (CT, X- ray, MR vb. görüntüleri kullanılarak)
- ✓ 3D bilgisayar modelinin kesitlere ayrılarak, 2D görüntülere çevrilmesi
- ✓ Bilgisayar kontrollü tabakalama yapılarak üretilecek yapının belirlenmesi
- ✓ Yüzey modifikasyonu gibi nanomimari işlemlerin yapılarak, bitirilmesi

- **Stereolitografi / Stereolithography (SLA)**

RP metotları arasında yer alan stereolitografi yöntemi ile, çözünürlüğü yüksek yapılar üretilmektedir. Avantaj gösteren özelliklerinin olmasına rağmen; SLA yönteminde kullanılan ve ışık ile sertleşebilen rezin materyallerinin klinik kullanımları hakkında soru işaretleri olduğundan *Food and Drug Administration (FDA)* tarafından onaylamayan, bu tekniğin klinik kullanımı yaygın değildir (Korpela *et al.*, 2013).

- **Füzyona Uğramış Filament Fabrikasyon (Fused Filament Fabrication/ Fused Deposition Modeling- FDM) Metodu**

FDM tekniği günümüz teknolojisinde; uygun maliyet ve etkili bir üretim şekli açısından, sıklıkla tercih edilir bir yöntem haline almıştır. Temel prosedür; kullanılan biyomateryali eritmek amacıyla ısıtılmış kalıpların kullanılarak, dizayn edilmiş yapı iskelesini tabakalar halinde inşa etmeye dayanmaktadır (Rosenzweig *et al.*, 2015).

FDM tekniğinin, orta dereceli çalışma hızı ile yüksek oranda tekrarlanabilir olma özelliği sayesinde; dizayn edilecek olan yapı iskelelerinin en temel fiziksel özellikleri (mekanik özellikler, porozite, por şekli vb.) kontrol edilebilmektedir (Hutmacher, 2013 s.118).

FDM metodunun çalışma mekanizması şu şekilde ilerlemektedir:

FDM tekniği; dar bir kanal açıklığı ile birlikte iki adet ısıtılmış ekstrüzyon başlığı boyunca, eritilmiş termoplastik materyallerin deposisyonu şeklinde de açıklanabilmektedir. Birinci püskürtücü başlık, termoplastik materyali depolamakta; ikinci püskürtücü başlık ise geçici olarak materyal depolayarak destek görevi üstlenmektedir. Bu teknikte, termoplastik materyaller yarı akışkan fazlara dönüştürülüp; püskürtücü başlıklar tarafından, yapı platformu üzerine püskürtülmektedirler. Bu

platformda tabaka tabaka kesilen yapılar, yeniden biraraya getirilerek kaynaştırılmaktadır (Noort, 2012) .

FDM tekniğinin sağladığı en önemli avantaj; iyi bir mekanik dayanıklılık ve depolama paterni kaynaklı yüksek porozite yaratabilmesidir. Bu teknik için zorlayıcı faktörler arasında; yüksek sıcaklık süresince sıcaklığa hassas biyolojik ajanların veya canlı hücrelerin zarar görmesi, bir diğer noktada ise ekstrüzyon için yeterli viskoziteye sahip olamayan biyolojik yapı iskelesi materyallerinin kompleks şekillerin elde edilmesinde sınırlı olmalarıdır (Chia ve Benjamin, 2015) .

Termoplastik polimerlerin kullanıldığı, basit bir RP yöntemi olan FDM tekniğinin ve aletin kendisinin maliyetinin düşük oluşu, daha az komplike bir süreç işleyişine sahip olması bu yöntemi diğer RP teknikleri arasından seçilir hale getirmektedir (Drummer *et al.*, 2012) .

- **Yeni Hibrit Teknolojiler**

Yeni uygulanmaya başlanan hibrit teknolojileri; iki boyutlu (2D / nano baskılar) ve 3D baskı yöntemlerinin kombinlenmesini temel alan yöntemlerdir. Bilinen metotlardan farklı olarak bu teknoloji ile birlikte, çeşitli şekil ve özelliklerde nano yapıdaki iskeleler hızlı olarak üretilebilmekte ve yüksek bir üretim kapasitesi sağlanabilmektedir. Geliştirilmiş olan bu teknoloji ile 3D, kemik iskelesi kalıp örnekleri elde edilmiştir. Yeni geliştirilmiş olan bu teknoloji ile; mikro ve nano yüzey oluşumlarının gereksinim duyulduğu alanlarda, mikro ve nano boyutlardaki şekillendirmelerin kombinlenerek daha özelleşmiş olan yapı iskeleleri elde edilebilmektedir (Seleznov ve Prinz, 2016) .

Kullanışlı bir yapı iskelesi dizayn edebilmek amacıyla; hasar görmüş dokunun mekanik özelliklerini ve şeklini taklit edebilmek gerekmektedir. Faydalı polimerik bir yapı iskelesi yaratabilmek için (Rosenzweig *et al.*, 2015);

- ✓ İskelenin parçalanma derecesi
- ✓ İskelenin biyouyumluluğu
- ✓ İskelenin aktarıldığı doku ile entegrasyonu
- ✓ İskelenin mekanik dayanıklılığı
- ✓ İskelenin optimum por büyüklüğü
- ✓ İskele porozitesi
- ✓ İskelenin yüzey alanı
- ✓ İskelenin protein kılıfı
- ✓ İskelenin difüzyon özelliklerini içeren parametreler dikkatli bir şekilde hesaplanmalıdır.

2.9.11 3D Yöntemler ile Dizayn Edilen Yapı İskelelerinin Avantajları ve Hücre Kültivasyon Sistemleri için Yarattıkları Çevre

Özel amaçlara uygun olarak tasarlanmış 3D yapıların başarıları; doğru dizayn, doğru fabrikasyon tekniği ve durumları ile uygun materyallerin kombinasyonuna bağlıdır. Günümüz fabrikasyon araçları, istekler yönünde gelişen kompleks mimari ve yüzey özellikli 3D yapıların gelişimine izin vermektedirler. Bu doğrultuda, malign karakter sergileyen hastalıklarda terapötik etkiyi ve doku/ organ mühendisliği alanında kaliteli bir rejenerasyonu amaçlayan çeşitli kütle ve yüzey özellikleri ile birleşmiş özel yapı iskelelerin oluşum olasılığı da kuvvetlenmektedir (Fong *et al.*, 2013) .

3D yapı iskelelerinin temel avantajları;

- Hücrelere, geleneksel 2D in vitro hücre kültür ortamlarından farklı olarak in vivo hücresel ortamları taklit edebilen; 3D kalıp formları halinde ve sentetik ECM içeren bir mikroçevre ortamı sağlayabilmek (Serra *et al.*, 2013)

- Yapı iskelelerinin bu fiziksel içerikleri; hücrelerin yapışabilmeleri, proliferasyon gösterebilmeleri, farklılaşabilmeleri ve yeni doku üretimi yapabilmelerine olanak tanımak (Ma, 2008)
- Hasar görmüş doku ile fiziksel bağlantılar sağlanarak; bu alandaki hücresel davranışların biyokimyasını taklit edebilmeye yardımcı olmak (Chia ve Wu, 2015) .

Rejeneratif Diş hekimliği ve doku mühendisliği alanlarında; hSHEDs in vivo çalışmalarda kullanılarak; rejeneratif etkileri ve diş hekimliği açısından tedavi yöntemi olarak kullanılabilirlikleri değerlendirilmiştir. Bu araştırmalar ile birlikte hSHEDs' in diş pulpası benzeri doku, tübüler dentin, endotelyum ve periodontal rejenerasyonları başarıyla gerçekleştirdikleri gösterilmiştir (Cordeiro *et al.* 2008; Sakai *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2014 ve Gong *et al.*, 2016) .

Bu çalışmada; üç boyutlu PLA bazlı yapı iskeletleri oluşturularak, hSHEDs' in proliferasyon ve farklılaşma potansiyellerinin artırılması hedeflenmektedir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

‘ Poli Laktik Asit Bazlı Yapı İskelelerinin Süt Dişi Kök Hücrelerindeki Osteojenik İndüksiyonlarının Üç Boyutlu Değerlendirilmesi ’ isimli araştırmamız Yakın Doğu Üniveritesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Kliniği ve Yakın Doğu Üniversitesi Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvar’ ında gerçekleştirilmiştir. Araştırmada yer almış olan tüm hastaların anamnezleri alınarak; ebeveynleri, çalışmanın temel amacı ve işleyiş prosedürü hakkında ayrıntılı bir şekilde bilgilendirilmiş ve yazılı onam onayları alınmıştır (Bkz. EK 1. Araştırma Amaçlı Çalışma İçin Aydınlatılmış Onam Formu) . Araştırmaya başlanmadan önce, ‘ Yakın Doğu Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Etik Kurulu Başkanlığı’ ndan gerekli onay alınmıştır (Bkz. EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi, onay tarihi : 17.12.2015 ve onay belgesi no: 2015/34/243) .

3.1Araştırmaya Dahil Edilecek Hasta ve Diş Seçim Kriterleri

Araştırmanın hasta ve diş seçim kriterlerinde; herhangi bir sistemik ve genetik hastalığa sahip olmayan, iyi bir kooperasyon gösteren çocuk hastalar ile çekimi yapılacak dişte; enfeksiyon varlığı, apse veya fistül gelişimi, patolojik rezorpsiyon, mine veya dentin çürüğü gibi durumlar sergilemeyen, fiziksel rezorpsiyon göstererek, eksfoliasyon zamanı gelmiş dişlere; çalışma kapsamında yer verilmiştir.

3.2 Araştırma için Oluşturulan Hipotezler

Araştırma genelinde dört adet hipotez oluşturularak, deneysel çalışmalara başlanmıştır. Bu hipotezler:

1. İzolasyonu sağlanan hSHEDs’ in in vitro kültür ortamındaki karakteristik davranışları ile PLA bazlı yapı iskelelerindeki karakteristik davranışları farklılık göstermektedir.

2. PLA bazlı yapı iskeleleri, izolasyonları sağlanmış olan hSHEDs üzerinde osteojenik indükleyici bir etki yaratmışlardır.
3. İki hafta ve üç hafta olarak osteojenik farklılaşma ortamında bırakılan hSHEDs grupları arasında, karakterizasyonları ve osteojenik farklılaşmalarının tespiti için uygulanan immünohistokimyasal analizleri arasında, fark vardır.
4. PLA bazlı yapı iskelelerinin hSHEDs ile kombine kullanımları, hücreler üzerinde yapısal bütünlük sağlayıcı; toksik olmayan bir mikroçevre yaratmaktadırlar.

3.3hSHEDs' in İzolasyonları ve Primer Kültivasyonları

Eksfoliasyon zamanı gelmiş olan süt dişlerinin çekimleri, Yakın Doğu Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Kliniği' nde, hasta seçim kriterlerine uygun olarak 6 ve 11 yaş aralığında yer alan çocuk hastalarda, düşme zamanı gelmiş ön bölge süt dişleri çekilerek; bu dişlerin kuronal pulpalarından kök hücre izolasyonları yapılmıştır.

İzolasyon aşamasında çekimi gerçekleştirilen dişlerin öncelikle, bukkal ve lingual yüzeylerinde, su soğutmalı ve yüksek devirli aletler kullanılarak, vertikal yönde 1' er mm' lik derinliklerde yivler açılarak (Şekil 3.3.1); steril bir spatül yardımı ile dişlerin kuronal parçaları iki parçaya bölünüp, pulpa odasında yer alan kuronal pulpalar steril bir ekskavatör ile ekstirpe edilmişlerdir (Şekil 3.3.2) .

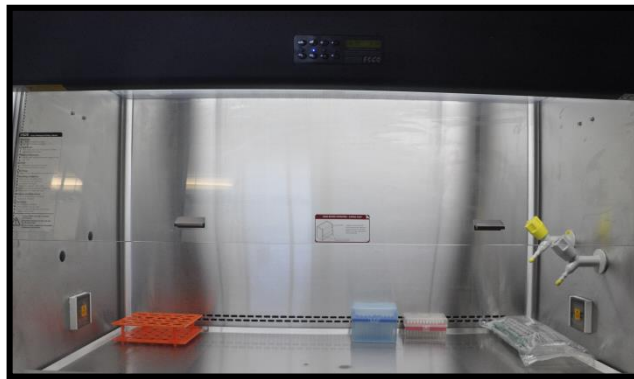


Şekil 3.3.1: Bukkal ve Lingual Yüzeylerinde Yivler Açılmış Süt Dişi



Şekil 3.3.2 : Ekstirpe Edilmiş Kural Dental Pulpa

Ekstirpe edilen pulpal yapılar; içlerinde vasat ortamının yer aldığı, her bir diş için farklı bir saklama ortamı olacak şekilde, tüplere yerleştirildikten sonra Hücre ve Doku Kültür Laboratuvar' ına transfer edilerek; burada hazırlanmış ortamda gerekli işlemler yapılmıştır (Şekil 3.3.3 ve Şekil 3.3.4).



Şekil 3.3.3: Ultraviyole Cihazı



Şekil 3.3.4: Su Banyosu

3.3.1 Pulpal Yapıların Enzimatik Ayrışmalarının Yapılması

Kollejenaz Hazırlığı: Toplam içerik içerisinde birim olarak 3 mg / ml oranında kollejenaz(*Sigma- Aldrich, 500 mg*)yoğunluğu olacak şekilde; kollejenaz hazırlığı yapılarak (Şekil 3.3.1.1); kontaminasyonu önlemek amacı ile; mavi filtreler(*Minisart Plus, 0.20 µm*) kullanılarak filtreleme işlemi yapılmıştır (Şekil 3.3.1.2).

Filtreleme işlemi sonrasında, eskitirpe edilmiş pulpal yapılar, kollejenaz ortamına konularak (25 cm³' lük ekim kapları); bistüriler yardımı ile 1 mm³ hacimlerde parçalara ayrılmışlardır. Enzimatik ayrışım için kollejenaz ortamında parçalanmış olan pulpal yapılar; inkübatöre alınarak 37 °C' lik % 5 CO₂ hava ortamında bir saat boyunca inkübe edilmişlerdir (Şekil 3.3.1.3).



Şekil 3.3.1.1 : Kollejenaz



Şekil 3.3.1.2: Mavi Filtre



Şekil 3.3.1.3: İnkübatör

3.3.2 Enzimatik Olarak Ayrıştırılmış Pulpal Yapıların Primer Kültür Ortamına Alınmaları

Primer kültürasyon için hazırlanan vasat içeriği;

- % 15 Fetal Bovin Serum (FBS) (*EUR_x*)



Şekil 3.3.2.1: Fetal Bovin Serum

- % 1 L- Glutamin(*Capricorn Scientific GmbH, 200 Mm*)



Şekil 3.3.2.2: L-Glutamin

- % 1 Penisilin + Streptomisin Karışımı (antibakteriyal etki amaçlı)
(*Capricorn Scientific GmbH, 100 ml*)



Şekil 3.3.2.3 : Penisilin + Streptomisin Karışımı

- % 1 Gentamisin (Antibakteriyal etki amaçlı / *Gibco by Life Technologies*)



Şekil 3.3.2.3: Gentamisin

- *Amphotericin – B* (Antifungal etki amaçlı)(Gibco by Life Technologies, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)



Şekil 3.3.2.4: *Amphotericin – B*

- α – MEM (BIOCHROM)



Şekil 3.3.2.5: α – MEM

Primer vasat ortamı hazırlandıktan sonra; sterilizasyon açısından yeniden filtreleme işlemi uygulanmıştır (Şekil 3.3.2.6).



Şekil 3.3.2.6 : Kültür Vasatı Karışımının Filtrelenmesi

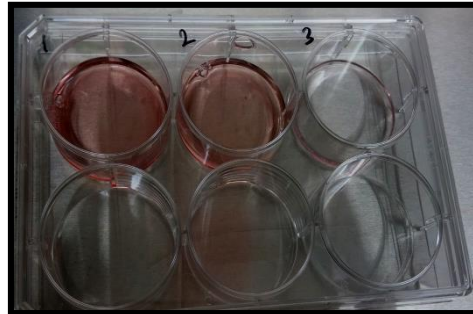
Bir saatlik inkübasyon süresi sonrasında, enzimatik ayrışımı tamamlanmış olan pulpal yapıların yer aldığı ortam,taze olarak hazırlanmış kültür vasatı ile dilüe edilerek; 15 ml' lik falkon tüplerine aktarılmıştır. 15 ml' lik falkon tüpleri; 5 dakika boyunca, 37 °C' de ve 1000 RPM devirde - tek bir süspansiyon yaratmak amacıyla- santrifüj edilmişlerdir (Şekil 3.3.2.7).



Şekil 3.3.2.7 : Santrifüj Makinesi

Santrifüj işlemi sonrasında enzimatik olarak ayrıştırılmış olan pulpal yapılar kültür vasatı içerisinde; altı gözlü ekim kaplarına aktarılarak, kültivasyon için yeniden inkübasyon ortamına (37 °C, % 5 CO₂) konulmuşlardır (Şekil 3.3.2.8).

Kültür ortamında yer alan hSHEDs' in , düzenli olarak her iki günde bir vasat ortamları değiştirilerek yenilenmiştir.



Şekil 3.3.2.8 : Altı Gözlü Ekim Kapları

3.4hSHEDs' in Pasajlanma Prosedürü

İzolasyonları gerçekleştirilen ve kültür ortamında takip edilen hSHEDs; % 80 ' lik yoğunluk oranına ulaştıkları zaman, hücreler arası kontak inhibisyonunu engellemek ve hücrelere yeni bir proliferasyon hızı kazandırmak amacıyla, hücreler pasajlanmışlardır.hSHEDs' in pasajlanma prosedürü süresince; hücreler, 37 °C % 5 CO₂ hava ortamında, 10 dakika boyunca Trypsin-EDTA (*Capricorn Scientific*) kullanılarak tripsinize edilmişlerdir.

Araştırmamız kapsamında, hSHEDs üç kez pasajlanarak; üçüncü pasajda (P3) yer alan hücreler çalışma dahilinde kullanılmışlardır.

3.5 Araştırmada Kapsamında Oluşturulan Kontrol ve Deney Grupları

Araştırmamız kapsamında; hSHEDs izole edildikten sonra; bir adet Kontrol Grubu olmak üzere, toplam 4 adet grup oluşturulmuştur. Bu grup içerikleri şu şekilde belirlenmiştir:

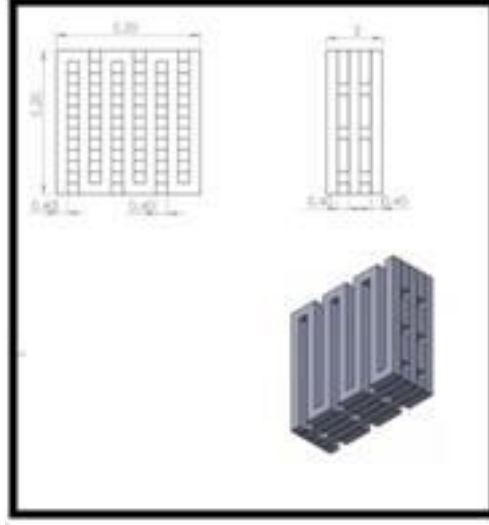
- 1.Grup: Kontrol grubu** - Farklılaştırılmamış, in vitro standart kültür ortamında yer alan hSHEDs
- 2.Grup:**Osteojenik farklılaştırma ortamı kullanılarak osteojenik olarak indüklenmiş, in vitro kültür ortamında yer alan hSHEDs
- 3.Grup:** Farklılaştırılmamış hSHEDs' in üç boyutlu PLA bazlı yapı iskelelerine aktarılması ile oluşturulan grup
- 4.Grup:** Üç boyutlu PLA bazlı yapı iskelelerine aktararak, osteojenik farklılaştırma ortamı altında osteojenik olarak indüklenmiş hSHEDs ile oluşturulan grup

3.6 Polilaktik Asit Bazlı Yapı İskelelerinin Fabrikasyonları ve Morfolojik Karakterizasyonları

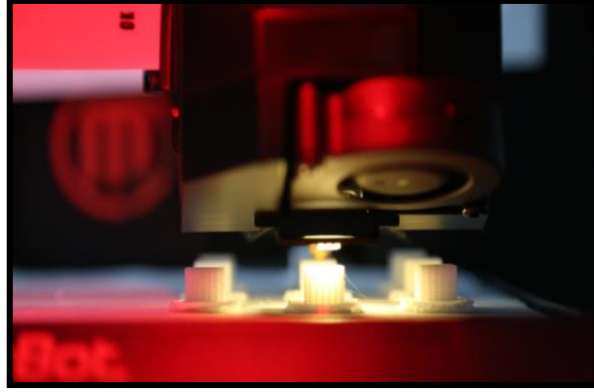
Araştırma dahilinde kullanılacak olan PLA bazlı yapı iskelelerinin dizayn ve üç boyutlu basımları Yakın Doğu Üniversitesi 'NEU3D Laboratuvarları' nda (*Near East University, 3D Design and Printing Facility*) gerçekleştirilmiştir. Yapı iskelelerinin dizaynları için; '*Solidworks Software (Dassault Systems)*' sistemleri kullanılmıştır.

PLA bazlı yapı iskeleleri; poröz yapıya sahip, dikey doğrultuda birbirleriyle kesişen sütunlardan meydana gelen bir morfolojiye sahiptirler. Her bir yapı iskelesinin genişliği 5 mm, yüksekliği 2 mm olacak şekilde 5x5x2 mm boyutlarında ve her bir sütun kalınlığı 0.4 mm ile bu sütunlar arası boşluk mesafesi 0.4 mm olarak dizayn edilerek; üç boyutlu basımı yapılmıştır (Şekil 3.6.1).

PLA bazlı yapı iskelelerinin basımı için kullanılan üç boyutlu yazıcı; 5. Jenerasyon yazıcılardan (*Makerbot Replicator MakerBot Industries LLC*) olup; fabrikasyon tekniği olarak, '*Fused Deposition Modeling (FDM)*' uygulanıp (Drummer, *et al.*, 2012 ve Rosenzweig *et al.*, 2015); 1.75 mm' lik kalınlığında PLA lifleri kullanılmıştır (Şekil 3.6.2). FDM tekniğinin çalışma mekanizmasına uygun olarak; eritilmiş termoplastik yapıdaki biyomateryaller, cihazın ısıtılmış püskürtücü başlıklarından altta yer alan geniş alana doğru tabaka tabaka püskürtülerek, bu alanların yeniden füzyon olması ile birlikte yapı iskelelerinin fabrikasyonları gerçekleştirilmiştir. Üç boyutlu PLA bazlı yapı iskeleleri, kültivasyon öncesinde, *buharlı hidrojen peroksit* tekniği ile sterilize edilmişlerdir (Şekil 3.6.3).



Şekil 3.6.1: PLA Bazlı Yapı İskelelerinin Ölçü Değerleri



Şekil 3.6.2: Üç Boyutlu – V. Jenerasyon Basım Cihazı



Şekil 3.6.3: Buharlı Hidrojen Peroksit Sterilizatörü

3.7 hSHEDs' in İmmünohistokimyasal Deneyler ile Moleküler Karakterizasyon Analizleri

Laboratuvar ortamımızda, hSHEDs' in immunohistokimyasal (IHC) analizleri; '*ABC (Avidin-Biotin Complex) ' Yöntemi'* ne uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Thermo Scientific, 2009).

hSHEDs' in IHC deneyler ile karakterizasyon analizlerinin öncesinde; hücreler salinle tamponlanmış olan fosfat (*Phosphate Buffered Saline - PBS, Ph:7.3, Medicago*) çözeltisi içerisinde eritilerek elde edilmiş % 4' lük paraformaldehit (*ThermoFisher Scientific*) solüsyonu ile, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca fikse edilmişlerdir.

Fiksasyon işlemi sonrasında; hücreler üç kez 5' er dakikalık sürelerle PBS ile yıkanmış ve hücre membranlarında permeabilizasyonu sağlamak amacıyla PBS içerisinde dilüe edilmiş % 0.1' lik Tween - 20 (*Sigma/Life Technologies*) oda sıcaklığında, buz üzerinde, 15 dakika boyunca uygulanmıştır.

Permeabilizasyon işlemini takiben, hücreler yeniden üç kez 5' er dakikalık sürelerle PBS ile yıkanmış ve sonrasında hücre içinde meydana gelen hücre içi (endojen) peroksidazı inhibe etmek amacıyla; % 3' lük hidrojen peroksit (H_2O_2) oda sıcaklığında 5 dakika boyunca hücrelere uygulanmıştır.

H_2O_2 uygulamanının sonrasında, hücreler yeniden aynı miktar ve sürelerde PBS ile yıkanmışlardır. Ortamda bulunan diğer proteinleri bloklama ve uygulayacağımız antikoru sadece istediğimiz antijene bağlanmasını sağlamak maksadı ile hücrelere, oda sıcaklığında bir saat boyunca özel bir bloklama solüsyonu (*Invitrogen*) uygulanmıştır.

Bloklama işlemi sonrasında, PBS yıkaması yapılmadan, hücreler anti - CD90 (1:50, *Abcam*) ve anti - CD45 (1:50, *Abcam*) primer antikoru ile bir gece

boyunca + 4 °C' de inkübe edilmişlerdir. Ertesi gün inkübasyon ortamından alınan hücreler; yeniden üç kez 5' er dakika boyunca PBS solüsyonu ile yıkanmışlar ve bu işleme ek olarak, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca – üretici firmanın kullanım şartlarına uygun olarak- Biotinlenmiş geniş spektrumlu sekonder antikor (*Invitrogen*) ortamına bırakılmışlardır.

Sekonder antikor uygulaması ardından; yeniden aynı PBS yıkamaları yapılarak, hücrelere HRP- Streptavidin enzimi (*Invitrogen*), oda sıcaklığında 30 dakika boyunca uygulanmıştır.

Yarım saatlik süre sonrasında; aynı PBS yıkaması üç kez tekrarlanarak; oluşturulan antijen – antikor kompleksinin görünürlüğünü arttırmak ve hücrelerin meydana getirdiği immünoaktivitelerin yoğunluklarını belirleyebilmek amacıyla, hücrelerin DAB kromojemi (*Diaminobenzidine / ScyTEK*)ve Mayer' s Hematoksilen ile (*Sigma Aldrich*) boyamaları yapılmıştır.

Boyanmış olan hücreler optik mikroskop (*Olympus IX53*) altında incelenmişlerdir. Meydana gelen immün reaksiyonların işaretlemeleri; yarı-sayısal bir yöntem olan *HSCORE* metodu kullanılarak değerlendirilmiştir (Younes *et al.*, 2016). *HSCORE* analizinde $\sum P_i (i+1)$ formülü kullanılarak, formül içerisinde belirtilen 'i' alanı; immünohistokimyasal analizler üzerinde boyamaların yoğunluklarını ifade etmektedir. Boyama yoğunlukları ise kendi aralarında 1, 2 ve 3 olarak belirlenmiştir. 1 değeri, hafif; 2 değeri, orta ve 3 değeri, şiddetli boyanmayı ifade etmektedir. Formülde yer alan bir diğer alan olan 'p' bölümü ise yukarıda belirtilen yoğunluklar ile pozitif boyanmış olan hücrelerin yüzdeliklerini belirtmekte olup; % 0 – 100 değerleri arasında seyretmektedir.

3.8hSHEDs' in In Vitro Kültür Ortamında Osteojenik İndüksiyonları

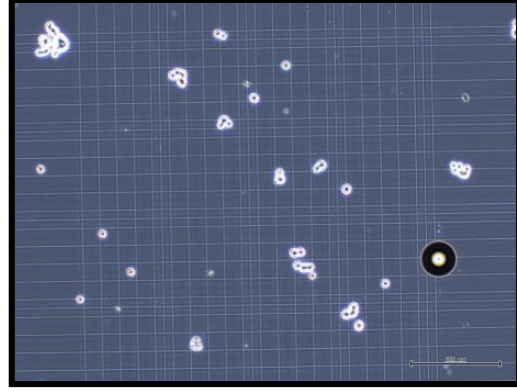
Kültivasyon prosedürüne uygun olarak, her iki günde bir osteojenik İzolasyonları gerçekleştirilen hSHEDs' in osteojenik farklılaştırılmaları ve morfolojik analizleri öncesinde; üç boyutlu PLA bazlı yapı iskeleleri 24 gözlü ekim kaplarına yerleştirilerek, bir gece boyunca, kültür vasatı içerisinde inkübe edilmişlerdir.

P3 ' te yer alan hSHEDs,% 80-90 yoğunluk oranına ulaştıktan sonra; tripsinize edilerek, 3.75×10^5 hücre/ ml konsantrasyonunda hücre toplanarak – önceden belirlenmiş grup düzenine uygun olarak- 24 gözlü ekim kaplarına ve PLA bazlı yapı iskeleleri üzerlerine transfer edilmişlerdir (Şekil 3.8.1 ve Şekil 3.8.2). Osteojenik grupta yer alacak olan hücelere, '*osteojenik farklılaştırma kiti*'(Gibco, StemPRO) uygulanarak, osteojenik olarak indüklenmişlerdir (Şekil 3.8.3).

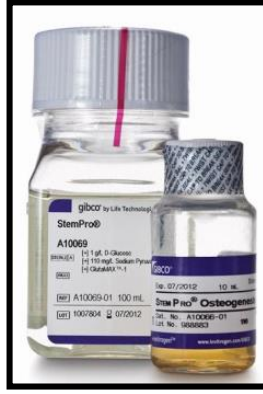
Araştırmamız kapsamında; osteojenik indüksiyon periyotları, 14 gün (2 hafta – 2h) ve 21 gün (3 hafta – 3 h) olarak uygulanmıştır. Her iki osteojenik indüksiyon süresi içinde yer alan hücrelerin, normal indüksiyon ortamları yenilenmiştir.



Şekil 3.8.1: Thoma Lamı



Şekil 3.8.2 : Thoma Lamında Gözlemlenen Hücre Sayım Görüntüsü



Şekil 3.8.3: Osteojenik Farklılaştırma Kiti

3.9 Farklılaştırma Yapılmış veya Yapılmamış hSHEDs – Üç Boyutlu PLA Bazlı İskelelerin Işık Mikroskobu Analizleri

14 ve 21 günlük osteojenik farklılaştırma periyotları sonrasında; kültür ortamından alınan üç boyutlu PLA bazlı yapı iskeleleri; kesitsel görüntüler alınarak analiz edilebilmeleri için farklı bir işleminden geçirilmişlerdir.

Kültür ortamından alınan PLA bazlı iskeleler, ilk olarak 2010 yılında Xiong ve Li tarafından tanıtılan yöntemine uygun olarak (Xiong ve Li, 2010); hızlı bir yumuşatmayı indükleyebilmek adına, sodyum karbonat ile tamponlanmış – **BORAX** (0.01 M Na₂CO₃ and 0.3 mm Na₂B₄O₇, pH:11) - isimli bazik bir solüsyon içerisinde 14 gün boyunca bekletilmişlerdir.

14 günlük süre sonunda, bu ortamdan alınan PLA bazlı yapı iskeleleri parafin içerisine gömülmüşler ve sonrasında 5 μ ' luk kesitsel görüntüler alınmıştır (Şekil 3.9.1).



Şekil 3.9.1: Kesit Alınmış PLA Bazlı Yapı iskelesi

PLA bazlı yapı iskeleleri üzerinde kesitler alındıktan sonra; PLA bazlı yapı iskeleleri üzerinde osteojenik farklılaştırma analizleri için yeniden immünohistokimyasal analizler uygulanmıştır.

Fiksasyon işlemi sonrasında; PLA bazlı yapı iskeleleri üç kez 5' er dakikalık sürelerle PBS ile yıkanmış ve hücre membranlarında permeabilizasyonu sağlamak amacıyla PBS içerisinde dilüe edilmiş % 0.1' lik Tween - 20 (*Sigma/Life Technologies*) oda sıcaklığında, buz üzerinde, 15 dakika boyunca uygulanmıştır.

Permeabilizasyon işlemi takiben, PLA bazlı yapı iskeleleri yeniden üç kez 5' er dakikalık sürelerle PBS ile yıkanmış ve sonrasında hücre içinde

meydana gelen hücre içi (endojen) peroksidazı inhibe etmek amacıyla; %3 ' lük H_2O_2 oda sıcaklığında 5 dakika boyunca hücrelere uygulanmıştır.

H_2O_2 uygulamanının sonrasında, PLA bazlı yapı iskeleleri yeniden aynı miktar ve sürelerde PBS ile yıkanmışlardır. Ortamda bulunan diğer proteinleri bloklama ve uygulayacağımız antikorun sadece istediğimiz antijene bağlanmasını sağlamak maksadı ile hücrelere, oda sıcaklığında bir saat boyunca özel bir bloklama solüsyonu (*Invitrogen*) uygulanmıştır.

Bloklama işlemi sonrasında, osteojenik farklılaştırmanın tespiti için, PLA bazlı yapı iskeleleri , osteojenik markırlar olan : osteokalsin (*osteocalcin* - OCN) (1:50, *Abcam*) ve osteonektin (*osteonectin* – ON)(1:50, *Abcam*) primer antikorları ile bir gece boyunca + 4 °C' de inkübe edilmişlerdir. Ertesi gün inkübasyon ortamından alınan hücreler; yeniden üç kez 5' er dakika boyunca PBS solüsyonu ile yıkanmışlar ve bu işleme ek olarak, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca – üretici firmanın kullanım şartlarına uygun olarak- Biotinlenmiş geniş spektrumlu sekonder antikor (*Invitrogen*) ortamına bırakılmışlardır.

Sekonder antikor uygulaması ardından; yeniden aynı PBS yıkamaları yapılarak, hücrelere HRP- Streptavidin enzimi (*Invitrogen*), oda sıcaklığında 30 dakika boyunca uygulanmıştır.

Yarım saatlik süre sonrasında; aynı PBS yıkaması üç kez tekrarlanarak; oluşturulan antijen – antikor kompleksinin görünürlüğünü arttırmak ve hücrelerin meydana getirdiği immünoreaktivitelerin yoğunluklarını belirleyebilmek amacıyla, hücrelere DAB kromojemi (*ScyTEK*) ve Mayer' s Hematoksilen ile (*Sigma Aldrich*) boyamaları yapılmıştır.

Özetle belirtecek olursak; kesitler halinde elde edilmiş olan PLA bazlı yapı iskeleleri; histokimyasal analizler için hematoksilen eozin ile boyanmış;

immünohistokimyasal analizler için ise, OCN(1:50, *Abcam*) ve ON(1:50, *Abcam*) primer antikorlarının dağılımları, yukarıda bahsedilen -standart indirekt immünoperoksidaz boyama – yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Boyanmış olan hücreler optik mikroskop (*Olympus IX53*) altında incelenmişlerdir. Meydana gelen immün reaksiyonların işaretlemeleri; yarı-sayısal bir yöntem olan *HSCORE* metodu kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.10 İstatistiksel Analiz

Araştırmamız kapsamında tüm deneyler üçer kez tekrarlanmışlardır. Karşılaştırılabilir veri grupları, One – Way ANOVA testi kullanılarak değerlendirilmişlerdir. İstatistiksel analizlerimizde; $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Araştırmamızın analizleri için; '*Graphpad Prism Software*' sistemi kullanılmıştır.

4.BULGULAR

Bu çalışmada eksfoliye olmuş insan süt dişlerinden izolasyonları sağlanarak elde edilen kök hücrelerin (hSHEDs), laboratuvar ortamında primer kültürasyonları gerçekleştirilmiş ve hücreler osteojenik olarak farklılaştırılmıştır. Daha sonra izolasyonları sağlanan hSHEDs , üç boyutlu (3D) olarak fabrike edilmiş polilaktik asit (PLA) bazlı yapı iskeleleri üzerine aktarılarak bu ortamda da osteojenik olarak farklılaştırılmış ve yapı iskelelerinin hücreler üzerindeki osteojenik indüklemeye ve sitotoksik aktiviteleri immünohistokimyasal analizlerle araştırılmıştır.

Araştırmada, yaşları 6 ile 11 arasında değişen on adet çocuk hastanın, düşme zamanı gelmiş ön bölge süt dişleri çekilerek; bu dişlerin kural pulpalarından kök hücre izolasyonları yapılmıştır. Bulgular kısmında yer alan mikroskopik görüntüler bir hastaya ait verilerden çekilmiştir.

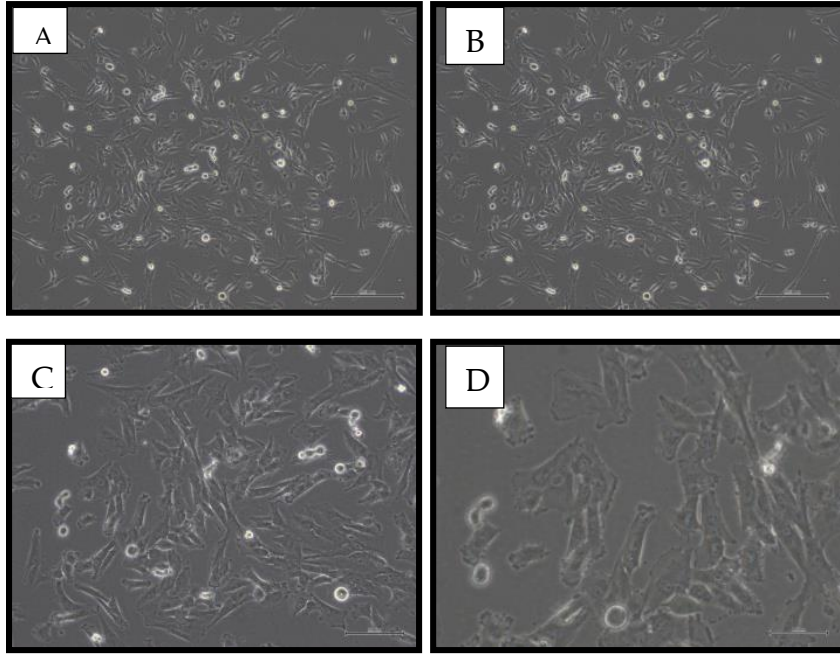
4.1 hSHEDs' in Kültürasyonu

hSHEDs enzimatik ayrışım sonrasında; kültür kabına aktarıldı. Hücrelerin, kültür kabında, yuvarlak yapıda oldukları gözlemlendi (Şekil 4.1.1).

Kültüre devam edildiğinde, kültürün üçüncü gününden itibaren kültür kabına yapışan hücrelerin varlığı gözlemlendi ve yedinci günden itibaren hücrelerin; fibroblast benzeri ve iğsi yapıda bir morfoloji sergileyerek çoğaldıkları saptandı (Şekil 4.1.2) .

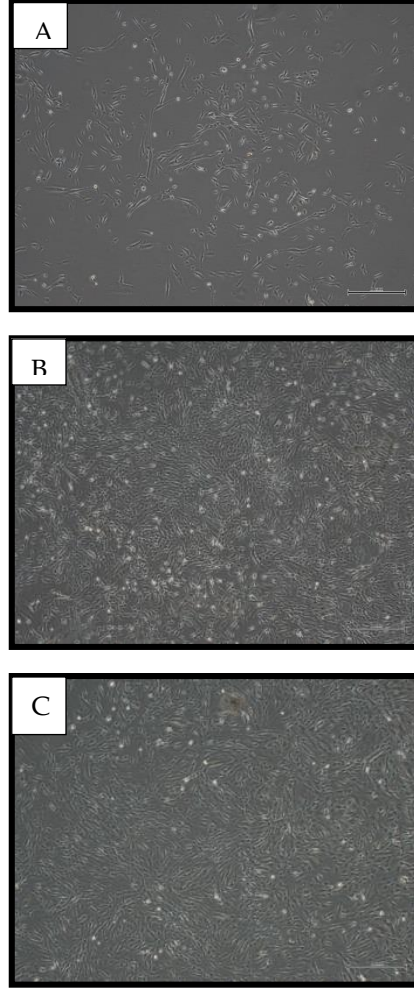


Şekil 4.1.1: Primer Kültür - hSHEDs' in 1. Gün Görüntüsü
Magnifikasyon: 40X



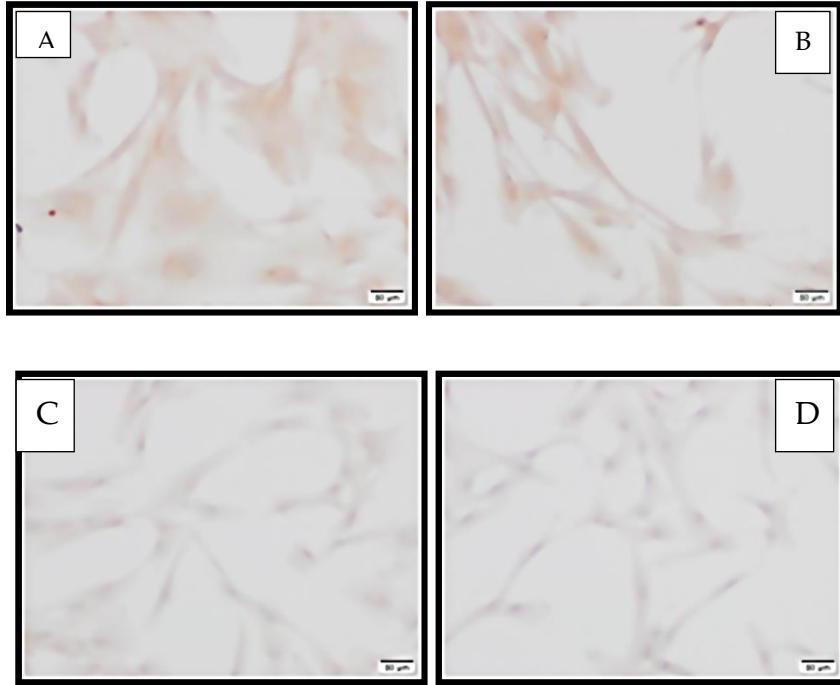
Şekil 4.1.2: hSHEDs' in 7. Gün – Fibroblast Benzeri / İğsi
Görüntüleri (A-D) Magnifikasyonlar sırası ile; 40X (A), 100X (B), 200X (C),
400X (D)

Hücrelerin, primer kültivasyonu takiben 7. günde, %80 yoğunluğa ulaştıklarının gözlenmesi üzerine pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1.3A).Çalışmada ikinci pasajlama (P2) ve üçüncü pasajlama (P3) işlemleri de yapılarak; P1 ve P2 pasajlardaki hücreler dondurularak saklanmış, P3' de yer alan hücreler osteojenik farklılaşma için kullanılmıştır (Şekil 4.1.3).



Şekil 4.1.3: hSHEDs' in 1. Pasaj (A), 2. Pasaj (B) ve 3. Pasaj (C)
Görüntüleri / Tüm magnifikasyonlar: 40X

P3' de yer alan hSHEDs in karakterizasyonu; CD90 ve CD45 immün doğrulamaları ile yapıldı. İmmünohistokimyasal analiz sonuçlarına göre; izolasyonları gerçekleştirilen hSHEDs örneklerinde, CD90 (+) belirteci için pozitif ekspresyon (Şekil 4.1.4 A, B), CD45 (-) (hematopoietik belirteç) belirteci için ise negatif ekspresyon (Şekil 4.1.4 C) gözlemlendi. Ayrıca yapılan kontrol immün boyamasında da sonuçlar negatif olarak saptanmıştır (Şekil 4.1.4 D).



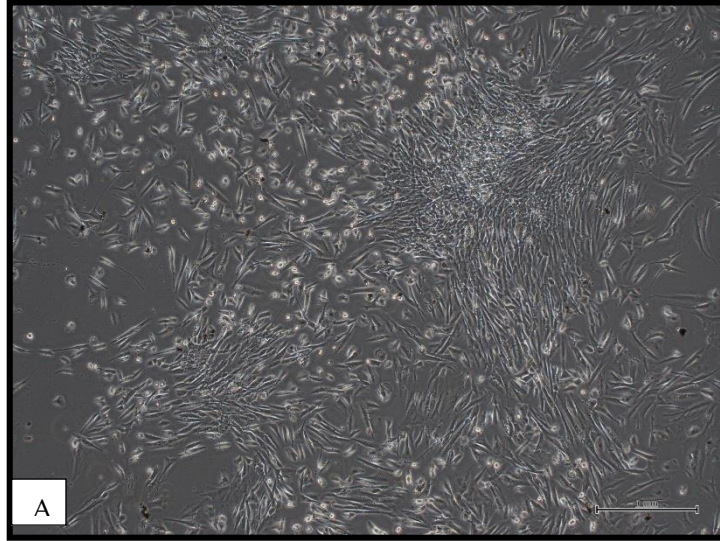
Şekil 4.1.4: 10 günlük kültür periyodu sonrası, hSHEDs' in CD 90 ve CD 45 immünreaksiyonları / Pozitif CD 90 (+)yüzey antijeni ekspresyonu (A,B) , negatif CD 45 (-) yüzey antijeniekspresyonu (C), negatif kontrol immün boyama (D). Ölçek: 50 µm

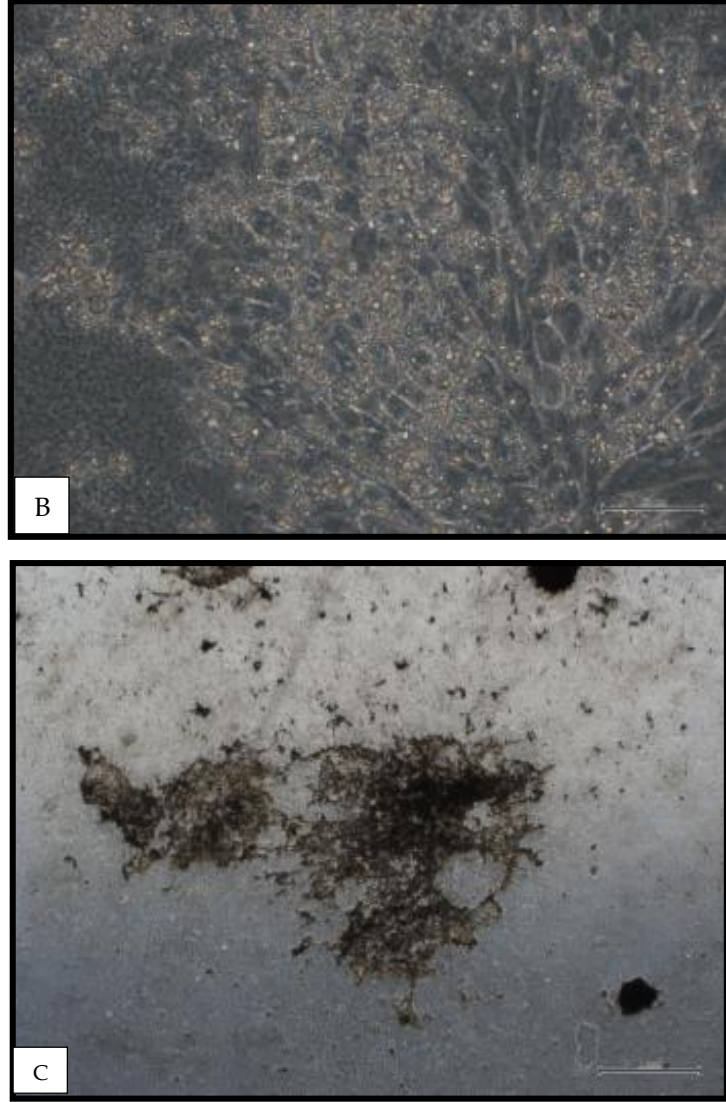
4.2 hSHEDs' in Osteojenik Farklılaşmaları

4.2.1 hSHEDs' in Osteojenik Analizleri

P3' deki hücrelerin, altı gözlü kültür kapları içerisinde osteojenik farklılaşma kiti kullanılarak farklılaşmaları sağlandı. Farklılaşmanın üçüncü gününde fibroblastik yapıdaki hücrelerin, epiteloid karakterde olmaya başladığı ve kültürün dokuzuncu gününden itibaren ise çoğalarak farklılaştığı gözlemlendi (Şekil 4.2.1.1).

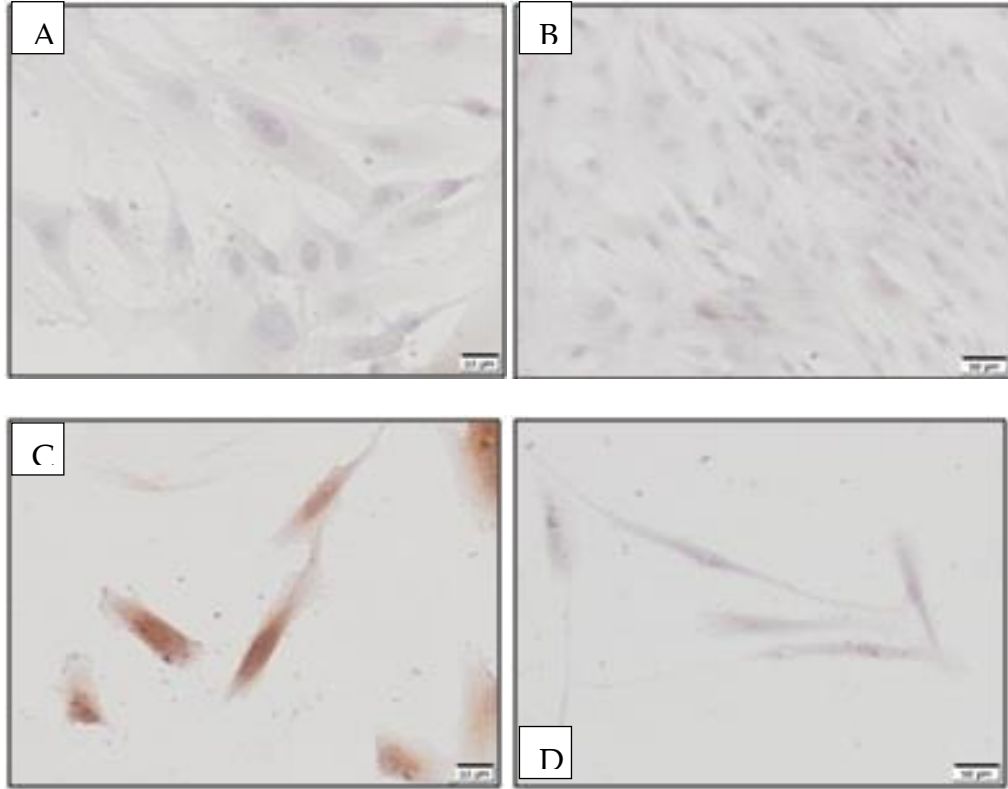
14. ve 21. günlerdeki kültürde hücreler arasında yer yer depozitlerin olduğu (Şekil 4.2.1.1 B) ve özellikle 21. günde belirginleştiği izlendi (Şekil 4.2.1.1 C).



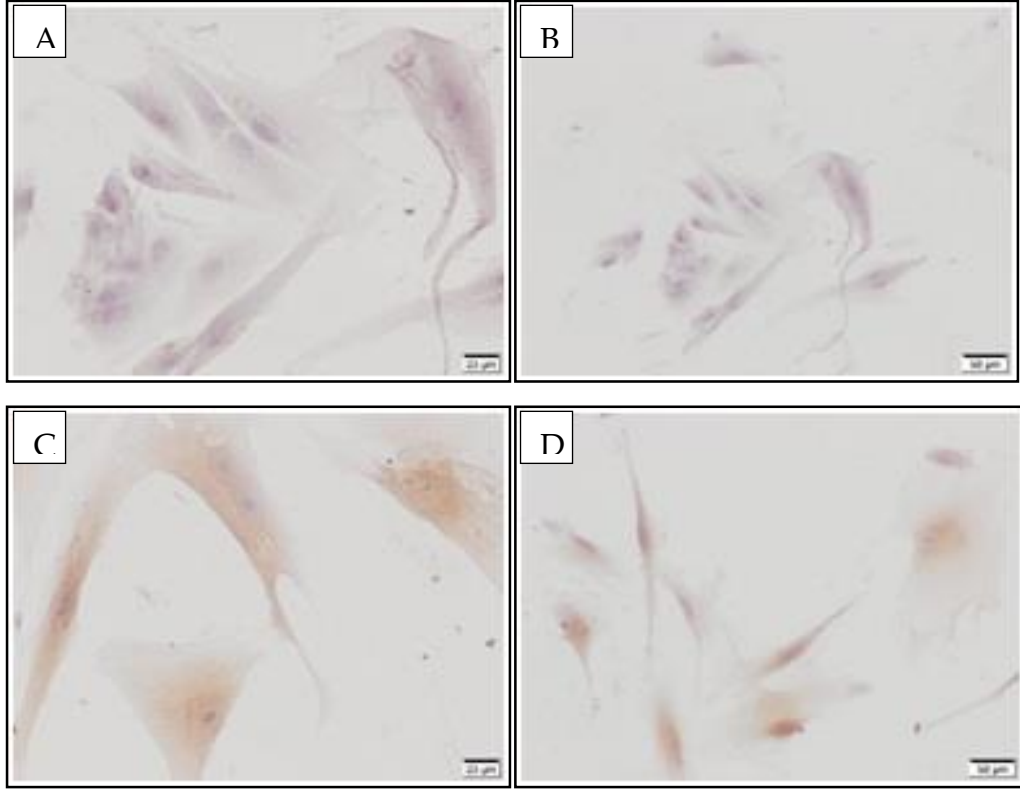


Şekil 4.2.1.1: Osteojenik Gruplarda Yer Alan Hücrelerin 9. Gün (A), 14. Gün (B) ve 21. Gün (C) Görüntüleri / Magnifikasyonlar : 40X

Farklılaştırma sürecinin kontrolü amacıyla karakterizasyon, immünohistokimyasal analiz ile yapılmıştır. 14 ve 21 günlük osteojenik farklılaştırma periyodunda yer alan osteojenik örneklerin (Grup 2) kontrol grubu örnekleri (Grup 1) ile karşılaştırılan immünohistokimyasal analizleri sonucunda; Grup 2 ' de, geç dönem osteojenik farklılaşma belirteçleri olan; osteonektin (ON) ve osteokalsin (OCN) antikorlarının pozitif ekspresyonları izlenirken, kontrol grubunda ON ve OCN immünoreaktivitelerinin negatif olduğu saptandı (Şekil 4.2.1.2 ve Şekil 4.2.1.3).



Şekil 4.2.1.2:14 günlük kültür periyodu sonrası Kontrol ve Osteojenik gruplarda yapılan immünohistokimyasal analiz sonuçları. 14 Günlük Kültür Periyodu Sonrasında Kontrol grubu (A,B) ve Osteojenik grupta (C,D) yer alan hSHEDs Görüntüleri. İmmünohistokimyasal analiz sonrası, Osteokalsin (A,C) ve Osteonektin (B,D) immünreaksiyonları / Ölçek: 20 µm

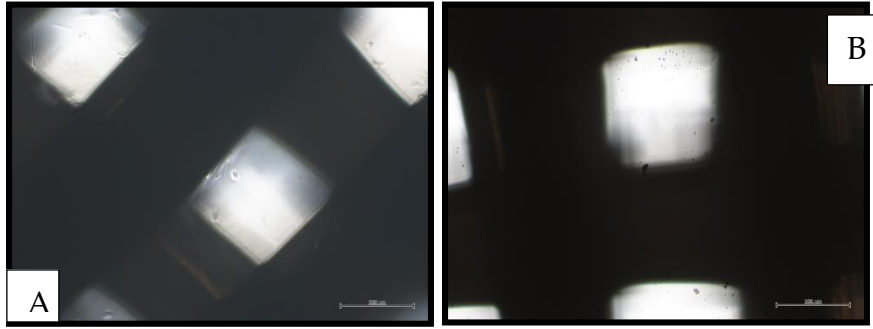


Şekil 4.2.1.3:21 günlük kültür periyodu sonrasında Kontrol ve Osteojenik gruplarda yapılan immünohistokimyasal analiz sonuçları. 21 Günlük Kültür Periyodu Sonrasında Kontrol grubu (A,B) ve Osteojenik örneklerde (C,D) yer alan hSHEDs Görüntüleri. İmmünohistokimyasal analiz sonrası, Osteokalsin (A,C) ve Osteonektin (B,D) immünreaksiyonları / Ölçek: 20 µm

Deney grubu 2' deki hücre örneklerine osteojenik farklılaşmanın belirlenmesi amacıyla yapılan immünohistokimyasal analiz sonuçları değerlendirildiğinde, PLA bazlı yapı iskeleleri üzerine aktarılan hSHEDs' in; 14. ve 21. güne kadar kültüre edilmelerine karar verildi.

4.2.2Üç Boyutlu PLA Bazlı Yapı İskelelerine Aktarılmış ve Osteojenik Olarak İndüklenmiş hSHEDs' inAnalizleri

P3' de yer alan hücrelerin karakterizasyon analizleri yapıldıktan sonra, hücreler PLA bazlı yapı iskelelerine aktarılarak, osteojenik farklılaştırma ortamında kültüre edildiler. Belirlenen kültür periyotları sırasında hücrelerin mikroskopik görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.2.2.1).



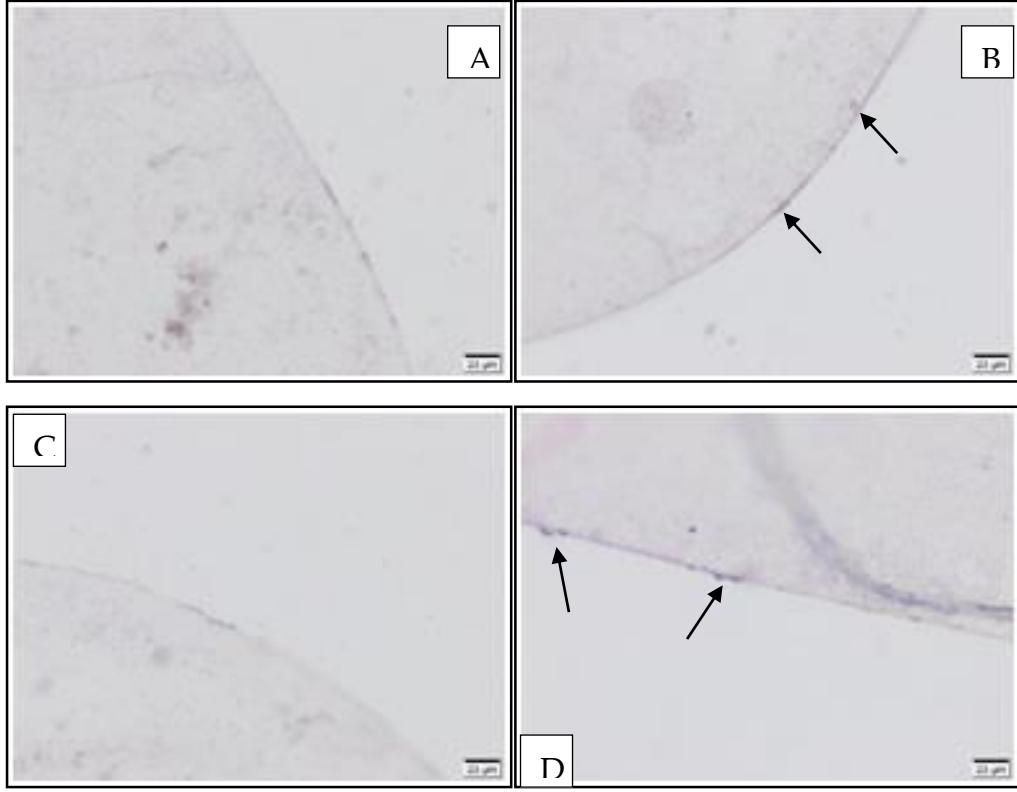
Şekil 4.2.2.1: PLA Bazlı Yapı İskelelerine Aktarılmış Hücrelerin 21. Gün Kontrol Grubu (A) ve Osteojenik Grubuna (B) Ait Mikroskopik Görüntüleri. Magnifikasyonlar: 40X

Üç boyutlu PLA bazlı yapı iskeleleri üzerine aktarılarak , 14 ve 21 günlük kültür periyotları ile osteojenik olarakindüklenen hSHEDs' in osteojenik farklılaşmaları, histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak analiz edildi.

Histokimyasal analiz sonucunda; PLA bazlı yapı iskelelerine aktarılmış olan hücrelerin yer yer tutunduğu ve hem dış hem de iç yapıda yer alan PLA bazlı iskelelerin yüzeylerinde hücrelerin varlığı saptandı. Sadece PLA bazlı yapı iskelelerin yer aldığı grupta, yapının dış ve iç katman yüzeylerinde herhangi bir hücre varlığının saptanmaması; PLA bazlı yapı iskeleleri ile kültüre edilen hücrelerin PLA yüzeyine tutunmalarında bir sorun olmadığını düşündürdü.

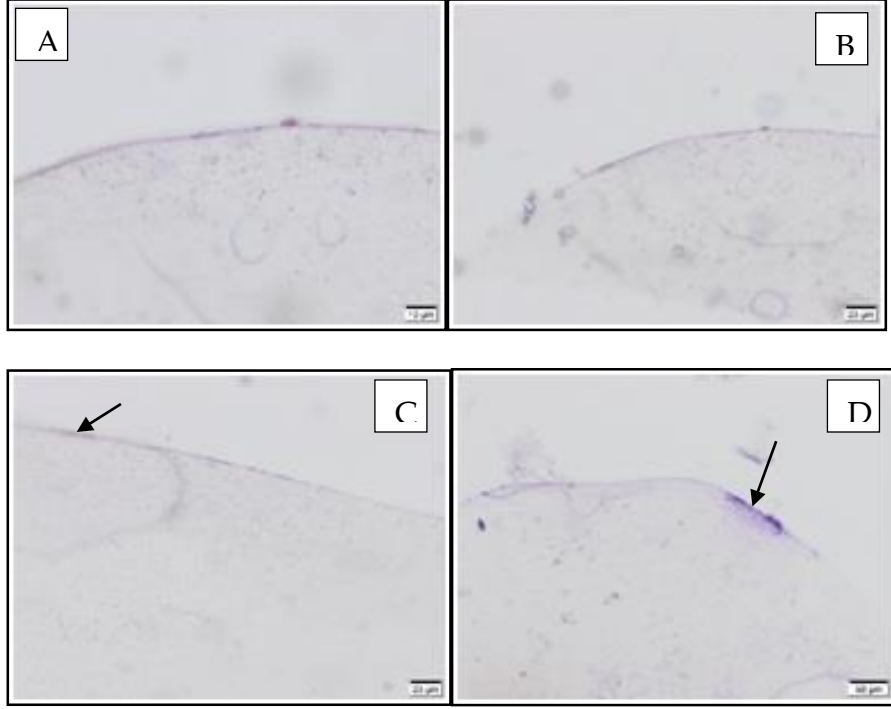
PLA bazlı iskelelerin, osteojenik farklılaşan hücreler ile kültürü sonrasında; yüzeye tutunan hücrelerin ON immünoreaktivitelerinin pozitif

olduğu ve bu hücrelerin sadece Grup 4' e ait hücreler oldukları ve bu hücrelerin; 3D PLA bazlı yapı iskelelerinin iç katmanları ve yüzeylerine adezyonları gözlenmiştir (Şekil 4.2.2.2) .

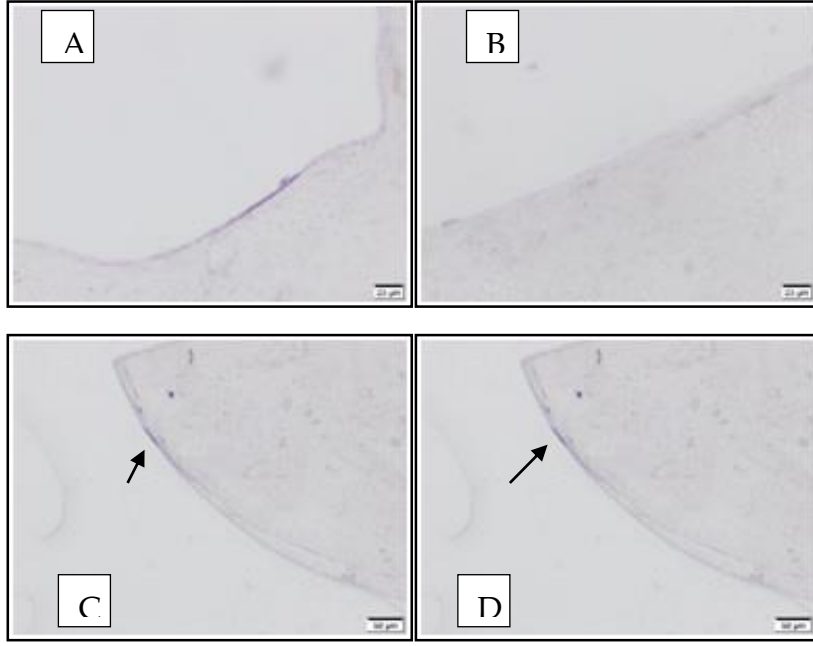


Şekil 4.2.2.2: PLA bazlı yapı iskelelerine aktarılmış olan hSHEDs' in 14 günlük kültür periyodu sonrasında, Kontrol Grupları (A,C) ve Osteojenik Gruplarından (B,D) Alınmış olan Mayer' s Hematoksilen Eozin Boyaması/Tüm Magnifikasyonlar: 20 μ m

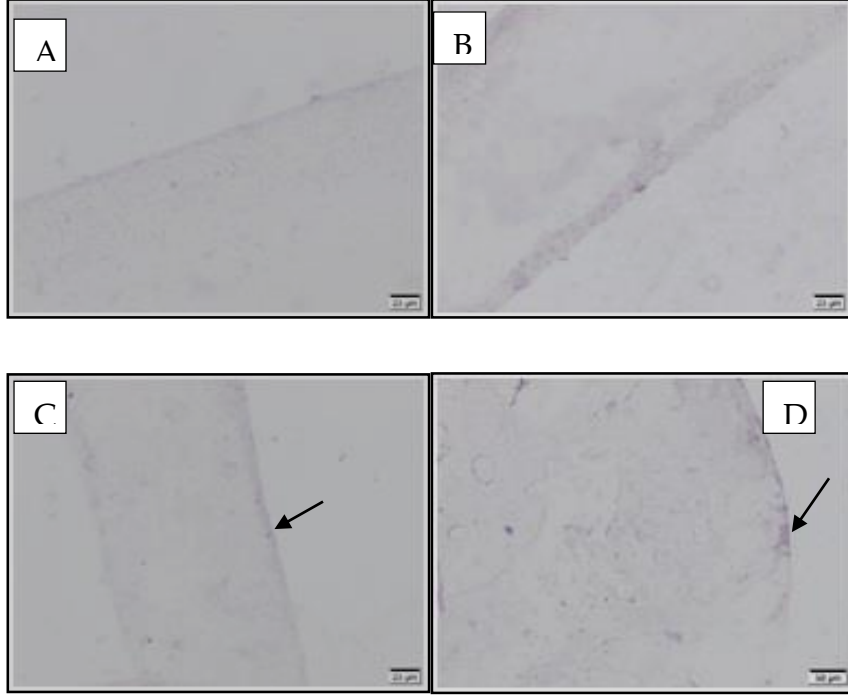
Grup 4' teki hücre örneklerine uygulanan immünohistokimyasal analizler sonucunda; ON ve OCN immünoaktiviteleri 14 gün ve 21 gün periyotlarında yer alan hücreler için tespit edilmiştir (Şekil 4.2.2.3, Şekil 4.2.2.4, Şekil 4.2.2.5 ve Şekil 4.2.2.6).



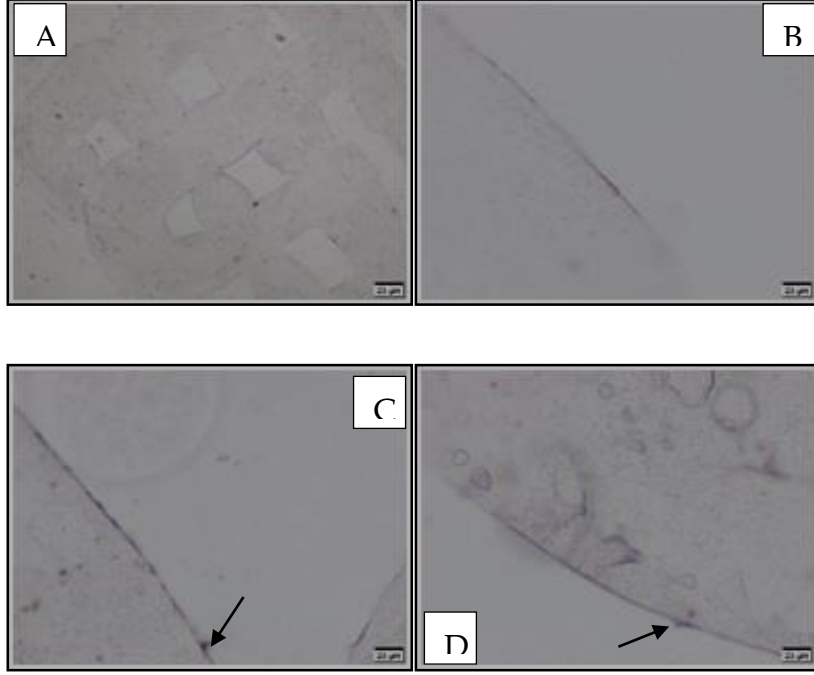
Şekil 4.2.2.3: PLA bazlı yapı iskelelerine aktarılmış olan hSHEDs' in, 14 günlük kültür periyodu sonrası, Kontrol Grubu (A,B) ve Osteojenik Gruptan (C,D) ON İmmünohistokimyasal Boyamaları / Magnifikasyonlar: 10 μ m(A), 20 μ m (B,C) ve 50 μ m (D)



Şekil 4.2.2.4: PLA bazlı yapı iskelelerine aktarılmış olan hSHEDs' in, 21 günlük kültür periyodu sonrası, Kontrol Grubu (A,B) ve Osteojenik Gruptan (C,D) ON İmmünohistokimyasal Boyamaları / Magnifikasyonlar: 20 μ m (A,B,C) ve 50 μ m (D)



Şekil 4.2.2.5: PLA bazlı yapı iskelelerine aktarılmış olan hSHEDs' in, 14 günlük kültür periyodu sonrası, Kontrol Grubu (A,B) ve Osteojenik Gruptan (C,D) OCN İmmünohistokimyasal Boyamaları / Magnifikasyonlar: 20 μ m (A,B,C) ve 50 μ m (D)



Şekil 4.2.2.6: PLA bazlı yapı iskelelerine aktarılmış olan hSHEDs' in, 21 günlük kültür periyodu sonrası, Kontrol Grubu (A,B) ve Osteojenik Gruptan (C,D) OCN İmmünohistokimyasal Boyamaları / Tüm Magnifikasyonlar: 20 μ m

4.3 Araştırma İçerisinde Yer Alan Deney Gruplarında Saptanan HSCORE Değerleri ve İstatistiksel Analiz Bulguları

Anti- ON ve Anti- OCN değerlerinin deney gruplarına göre HSCORE dağılımları Tablo 4.3.1' te gösterilmiştir.

HSCORE (%) mean±SD	PLA-C-2h	PLA-hSHEDs-2h	PLA-C-3h	PLA-hSHEDs-3h	C-2h	hSHEDs-2h	C-3h	hSHEDs-3h
ON	292,7 ±2,08	280,0 ±10	286,7 ±5,77	213,3 ±5,77	265,7 ±9,29	206,7 ±5,77	273,3 ±11,55	263,3 ±15,28
OCN	211,0± 3,61	497,3 ±0,57	340,0 ± 10	486,7 ±5,77	480,7 ±2,08	497,7 ±1,16	393,3 ±15,28	493,3 ±5,77

Tablo 4.3.1: Anti- ON ve Anti- OCN Değerlerinin Deney Gruplarına Göre HSCORE Dağılımları

İmmünohistokimyasal analizler sonucunda; ON immünoreaktivitesi her iki periyotta da yer alan (14 gün ve 21 gün) osteojenik gruplarda tespit edilmiştir.

14 günlük kültür periyodu sonrasında; ON HSCORE değerleri, Grup 4' te ($280,0 \pm 10$) , Grup 2' ye göre ($206,7 \pm 5,774$) daha yoğun olarak saptanmış ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($**p < 0.0001$) , (Tablo 4.3.2 ve Tablo 4.3.3).

14 günlük kültür periyodu sonrasında; Grup 3' te yer alan hücrelerin immünoreaksiyonları ($292,7 \pm 2,08$), Grup 1 ($265,7 \pm 9,29$) ile karşılaştırıldığında, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($*p < 0.05$) , (Tablo 4.3.2 ve Tablo 4.3.3) .

14 günlük kültür periyodu sonrasında; Grup 4' teki ON immünoreaktivitesinin ($280,0 \pm 10$), 21 günlük kültür periyodu sonundaki immünoreaktivite ($213,3 \pm 5,77$) ile karşılaştırması yapıldığında; değerlerin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir ($**p < 0.0001$), (Tablo 4.3.2 ve Tablo 4.3.3).

14 günlük kültür periyodu sonrasında; Grup 2' deki ON immünoreaktivitesinin ($206,7 \pm 5,77$), 21 günlük kültür periyodu sonrası değerlerle ($263,3 \pm 15,28$) kıyaslandığı zaman; ON immünoreaktivitesinin 21 gün sonunda daha fazla olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($**p < 0.0001$), (Tablo 4.3.2 ve Tablo 4.3.3).

21 günlük kültür periyodu sonrasında, Grup 2' de meydana gelen ON yoğunluğu ($263,3 \pm 15,28$); aynı kültür periyodu sonrasında Grup 4' te ($213,3 \pm 5,77$) daha az olarak tespit edilmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($**p < 0.0001$), (Tablo 4.3.2 ve Tablo 4.3.3).

Tüm deney gruplarında elde edilen Anti-ON sonuçlarının; istatistiksel analiz bulguları Tablo 4.3.1 ve Tablo 4.3.2’ de gösterilmiştir.

Anti-ON BULGULARI			
DENEY GRUPLARI	FARK	FARK	‘p’ değeri
PLA-C-2h vs. PLA-hSHEDs-2h	Yok	NS	0,6809
PLA-C-2h vs. PLA-C-3 h	Yok	NS	0,9899
PLA-C-2h vs. C-2h	Var	*	0,0352
PLA-hSHEDs-2h vs. PLA-hSHEDs-3h	Var	**	<0,0001
PLA-hSHEDs-2h vs. hSHEDs-2h	Var	**	<0,0001
PLA-C-3h vs. PLA-hSHEDs-3h	Var	**	<0,0001
PLA-C-3h vs. C-3h	Yok	NS	0,6279
PLA-hSHEDs-3h vs. C-3h	Var	**	<0,0001
PLA-hSHEDs-3h vs. hSHEDs-3h	Var	**	<0,0001
C-2h vs. hSHEDs-2h	Var	**	<0,0001
C-2h vs. C-3h	Yok	NS	0,9613
hSHEDs-2h vs. hSHEDs-3h	Var	**	<0,0001
C-3h vs. hSHEDs-3h	Yok	NS	0,8658

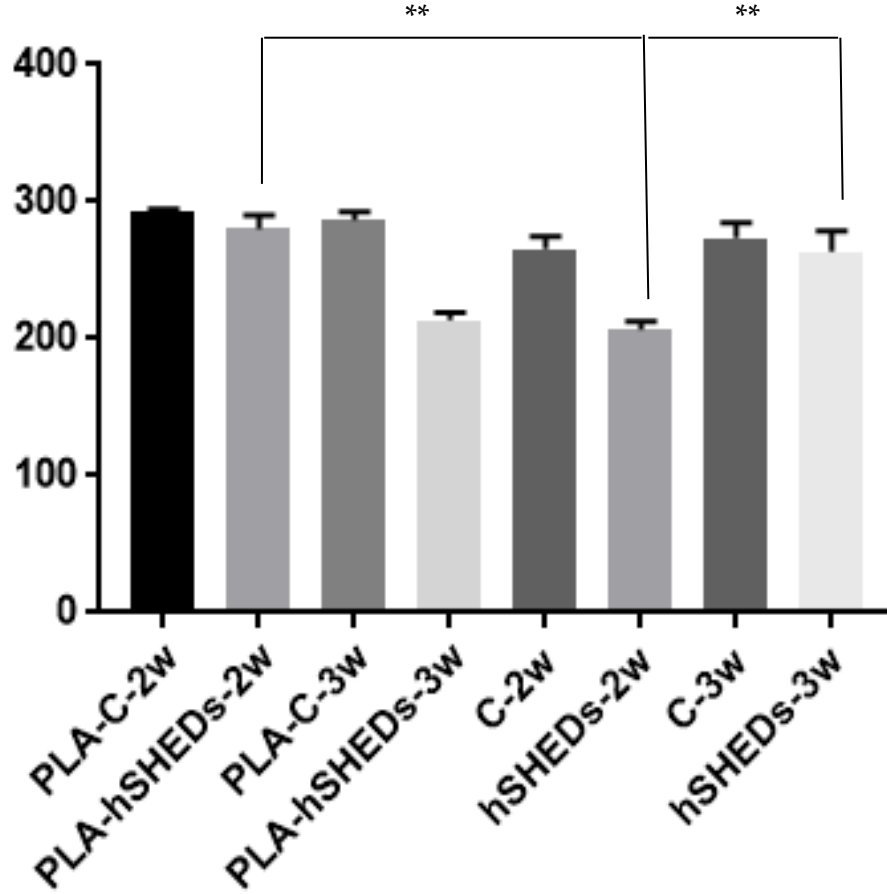
Tablo 4.3.2 : Deney Grupları ile Karşılaştırılmalı Anti-ON Bulguları

******: $p < 0.0001$

*****: $p < 0.05$

NS: Fark Yok / *No Significance*

**ONE – WAY ANOVA TESTİ Anti-
OSTEONEKTİN BULGULARI**



DENEY GRUPLARI

Tablo4.3.3: Her bir deney grubunun Osteonektin (ON) gen ekspresyonları. Grup 4' teki ON yoğunluğu, 14 günlük kültür periyodu sonrasında $280,0 \pm 10$ iken; aynı kültür periyodu sonrasında, Grup 2' deki ON yoğunluğu $206,7 \pm 5,77$ olarak ölçülmüş ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu bulguya ek olarak; 14 günlük kültür periyodu sonrası Grup 2' deki ON yoğunluğu ilk başta $206,7 \pm 5,77$ iken, 21 günlük kültür periyodu sonrasında ON yoğunluğunun $263,3 \pm 15,28$ ' lük bir değere artış gösterdiği tespit edilmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (** $p < 0,0001$).

İmmünohistokimyasal analizler sonucunda; OCN immünoreaktivitesi her iki periyotta da yer alan (14 gün ve 21 gün) osteojenik gruplarda tespit edilmiştir.

14 günlük kültür periyodu sonrası; Grup 4 ' teki OCN yoğunluğunun ($497,3 \pm 0,57$), 21 günlük kültür periyodu sonrasında ölçülen OCN yoğunluğuna ($486,7 \pm 5,77$) göre daha fazla olduğu görülmüş ancak; bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$) , (Tablo 4.3.4 ve Tablo 4.3.5).

14 günlük kültür periyodu sonrasında; Grup 3 ' te yer alan hücrelerin OCN immünoreaksiyonları ($211,0 \pm 3,61$), Grup 1 ($480,7 \pm 2,08$) ile karşılaştırıldığında, daha az olarak değerlendirilmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0001$), (Tablo 4.3.4 ve Tablo 4.3.5).

14 günlük kültür periyodu sonrasında, Grup 2 ' de belirlenen OCN HSCORE değerinin ($497,7 \pm 1,16$); 21 günlük kültür periyodu sonrasında ($493,3 \pm 5,77$) azaldığı görülmüş; ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$), (Tablo 4.3.4 ve Tablo 4.3.5).

21 günlük kültür periyodu sonrasında, Grup 2 ' de meydana gelen OCN HSCORE değeri ($493,3 \pm 5,77$); aynı kültür periyodu sonrasında Grup 4 ' te ($486,7 \pm 5,77$) daha az olarak tespit edilmiş; ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$), (Tablo 4.3.4 ve Tablo 4.3.5).

14 günlük kültür periyodu sonrasında, Grup 2 ' de ölçülen OCN HSCORE değeri ($497,7 \pm 1,16$); Grup 1 ' deki OCN HSCORE değerine ($480,7 \pm 2,08$) göre daha yüksek olarak değerlendirilmiş, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$), (Tablo 4.3.4 ve Tablo 4.3.5).

21 günlük kültür sonrasında Grup 3' te ölçülen OCN HSCORE değeri $(340,0 \pm 10)$, aynı kültür periyodu sonrasında Grup 4' te $(486,7 \pm 5,77)$ ölçülen değerden daha az olarak saptanmış ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($**p < 0.0001$) , (Tablo 4.3.4 ve Tablo 4.3.5).

Tüm deney gruplarında elde edilen Anti-OCN sonuçlarının; istatistiksel analiz bulguları Tablo 4.3.3 ve Tablo 4.3.4' te gösterilmiştir.

Anti-OCN BULGULARI			
DENEY GRUPLARI	FARK	FARK	'p' değeri
PLA-C-2h vs. PLA-hSHEDs-2h	Var	**	<0,0001
PLA-C-2h vs. PLA-C-3h	Var	**	<0,0001
PLA-C-2h vs. C-2h	Var	**	<0,0001
PLA-C-2h vs. hSHEDs-2h	Var	**	<0,0001
PLA-hSHEDs-2h vs. PLA-hSHEDs-3h	Yok	NS	0,6257
PLA-hSHEDs-2h vs. C-2h	Yok	NS	0,1573
PLA-hSHEDs-2h vs. hSHEDs-2h	Yok	NS	>0,9999
PLA-C-3h vs. PLA-hSHEDs-3h	Var	**	<0,0001
PLA-C-3h vs. C-3h	Var	**	<0,0001
PLA-hSHEDs-3h vs. C-3h	Var	**	<0,0001
PLA-hSHEDs-3h vs. hSHEDs-3h	Yok	NS	0,9407
C-2h vs. hSHEDs-2h	Yok	NS	0,143
C-2h vs. C-3h	Var	**	<0,0001
hSHEDs-2h vs. hSHEDs-3h	Yok	NS	0,9944
PLA-C-3h vs. hSHEDs-3h	Var	**	<0,0001

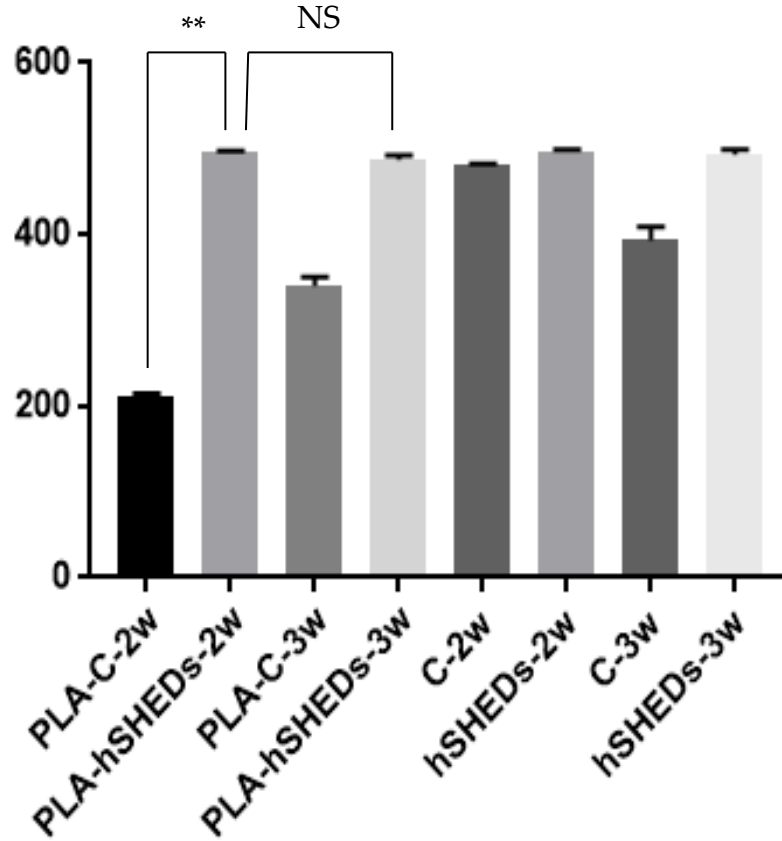
Tablo 4.3.4: Deney Grupları ile Karşılaştırılmalı Anti-OCN Bulguları

**.: $p < 0.0001$

*.: $p < 0.05$

NS: Fark Yok / No Significance

**ONE – WAY ANOVA TESTİ ANTI-
OSTEOKALSİN BULGULARI**



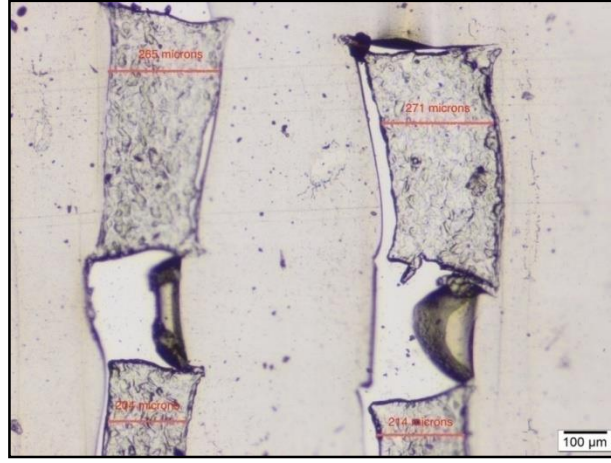
DENEY GRUPLARI

Tablo 4.3.5: Her bir deney grubuna ait Osteokalsin (OCN) gen ekspresyonları. 14 günlük kültür periyodu sonrasında, Grup 4' teki OCN yoğunluğu $497,3 \pm 0,57$ iken, bu yoğunluk 21 günlük kültür periyodu sonrasında $486,7 \pm 5,77$ değerine düşüş göstermiş ancak; bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu bulguya ek olarak; 14 günlük kültür periyodu sonrasında, Grup 4' teki OCN yoğunluğu $497,3 \pm 0,57$ olarak ölçülüp; Grup 3 ' teki $211,0 \pm 3,61$ OCN yoğunluğundan daha fazla olarak değerlendirilmiş ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (** $p < 0,0001$, NS: *no significance* / fark yok) .

4.4 PLA Bazlı Yapı İskelelerinde Gözlemlenen Kültür Sonrası Değişiklikler

Kültivasyon sonrası, kesitler alınarak yeniden değerlendirilen PLA bazlı yapı iskelelerinde, boyutsal değişimler gözlenmiştir.

Kültivasyon sonrası, PLA bazlı yapı iskelelerinin sütun kalınlıklarının azalmış olduğu ve buna bağlı olarak da sütunlar arası mesafenin arttığı saptanmıştır. Sütun kalınlıklarındaki azalma; %12.5 - %30 değerleri arasında seyretmiştir.



Şekil 4.4.1: Kültivasyon Sonrası PLA bazlı Yapı İskelelerinin Azalmış Sütun Genişlikleri ve Sütunlar Arası Artmış Mesafeler

5.TARTIŞMA

Oral kavitenin multi-organik ve kompleks yapısı ile;oral doku ve organların birçok noktada, birbirleri arasında bağlantılı oluşları; herhangi bir yapının hasarı durumunda, diğer alanların da etkilenmesine ve geri dönüşümsüz malfonksiyonların meydana gelmesine sebebiyet vermektedir. Diş çürükleri, periodontal hastalıklar, alveolar kemik rezorpsiyonları, ortodontik problemler, orofasiyal bölgedeki nöropatik ağrılar, tükürük bezlerinde meydana gelen fonksiyon bozuklukları gibi çeşitli durumlar dünya genelindeki ağız sağlığı sorunlarının büyük bir bölümünü oluşturmaktadırlar (Aurrekoetxea *et al.*, 2015) .

Ağız sağlığı sorunlarının dünya genelinde yayılımı ve bu duruma cevap niteliğinde;insan vücudunun doku hasarları karşısında, embriyonik gelişim ve morfogenez sürecinin tekrarlanarak hasarlı dokularda rejenerasyonun sağlanabileceği biyolojik mekanizmalara ilgi artmış ve diş hekimliğinde de rejenerasyon eğilimli tedavi arayışları başlamıştır (Bakopoulou ve About, 2016).

Dental dokuların sınırlı rejenerasyon potansiyelleri olmasına rağmen, dental doku kaynaklı kök hücrelerin keşfi ve bu hücrelerin doku mühendisliğiyle birlikte kombine kullanımları;‘*rejeneratif diş hekimliği*’ alanında yeni ve etkili tedavi yaklaşımlarının gelişimine kapı açmıştır. Günümüz teknolojisiyle birlikte; ‘*kök hücreler*’ hastalıklara karşı savaşlarda en önemli silah olarak düşünülmektedirler(Aziz-Aly, 2015) .

Genel tıp ve rejeneratif diş hekimliği uygulamalarında; doku mühendisliği ve rejenerasyon evrelerinde, rejenerasyonun temelini oluşturan ve kurulması en zorlayıcı olan faktör; kök hücreler, sinyal molekülleri ve ekstrasellüler matriks (örneğin: yapı iskeleleri / mikroçevre) üçlüsünün sağlıklı kombinasyonlarının oluşturulabilmesidir (Kawamura, et al., 2016) .

Bu bağlamda çalışmamızda; hSHEDs için, PLA bazlı yapı iskeleleri kullanarak oluşturduğumuz mikroçevre ortamında, bu hücreleri osteojenik olarak farklılaştırarak; kök hücre - ekstrasellüler matriks kombinasyonunu oluşturmak ve PLA bazlı yapı iskelelerinin hSHEDs üzerindeki osteojenik indüksiyonu desteklediğini göstermeyi amaçladık.

Eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişlerinin pulpal dokusundan elde edilen kök hücreler (hSHEDs) ilk olarak 2003 yılında, Miura ve arkadaşları tarafından izole edilerek; çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda; bu hücrelerin yüksek proliferasyon ve kolojenik multipotent yapılarının, osteoblastik, odontoblastik, kondroblastik, adipojenik, nöral ve endotelial hücrelere farklılaşma potansiyelleri başarılı bir şekilde gösterilmiştir (Miura *et al.*, 2003; Chadipiralla *et al.*, 2010; Kürkcü, 2010; Eslaminejad *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Telles *et al.*, 2011; Estrela, *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2014 ve Kashyap *et al.*, 2015).

Nakamura ve arkadaşlarının, 2009 yılında, yapmış oldukları çalışmalarında, DPSCs' in kendi kendilerini yenileyebilme ve birçok yönlü farklılaşabilme kapasitelerinin olmasına rağmen; hSHEDs' in DPSCs' e kıyasla, daha farklı ekprese ettikleri çeşitli yüzey belirteçlerinin bulunduğu ve daha yüksek/ hızlı oranlarda proliferasyon sergiledikleri belirtilmiştir. Araştırma sonuçlarında hSHEDs' e ait bu özelliklerden dolayı; bu hücrelerin *in vitro* ortamda, osteojenik ve adipojenik farklılaşmaları yönünden daha tercih edilir olduklarının (DPSCs' e kıyasla) altı çizilmiştir (Nakamura *et al.*, 2009).

Fu ve arkadaşları (2014), hayvan modellerinde meydana getirdikleri periodontitis olgularında; allojenik SHEDs' i ve allojenik PDLSCs' i, kalsiyum fosfat içerikli biyomateryallerle kombine olarak veya biyomateryalleri allojenik kök hücreler kullanmadan, klinik olarak dişeti çekilmesi ve ataçman

kaybı yaratılan bölgelere uygulamışlardır. 12 haftalık süreç sonrasında yapılan CT değerlendirmelerinde; allojenik kök hücrelerin yer aldığı her iki grupta da; kök hücre içermeyen, sadece biyomateryallerin yer aldığı gruplara (% 25) kıyasla, %75 oranında bir sert doku rejenerasyonu olduğu gözlemlenmiştir. Histolojik deneyler ışığında ise; allojenik SHEDs' in, periodontitis varlığında, etkili bir sert ve yumuşak doku tamiri meydana getirdikleri belirtilmiştir (Fu *et al.*, 2014) .

Bizim de çalışmamızda; geniş diferansiyasyon, proliferasyon ve rejenerasyon kabiliyetleri göz önünde bulundurularak, kök hücre kaynağı olarak hSHEDs tercih edilmiştir.

Yıldırım ve arkadaşları 2007 yılında yapmış oldukları çalışmalarında; farklı kalsiyum fosfat içerikli biyomateryal kombinasyonlarını (trikalsiyum fosfat / TCP, hidroksiapatit (HA), 1:1 oranlarında TCP + HA kombinasyonu, Kontrol Grup: Kalsiyum Hidroksit (CH)) köpek dişinde yaratılan pulpal perforasyon alanı üzerinde, reperatif dentin oluşturabilmeleri ve iyileştirme potansiyelleri açısından incelemişlerdir. Araştırmacılar çalışma sonuçlarında; TCP + HA kombinasyonunda ve kontrol grubunda, reperatif dentin oluşumunu açıkça gözlemlemiş; ancak yavaş rezorbe olabilen ve reperatif dentin ile yer değiştirebilen ideal kalsiyum fosfat içerikli biyomateryalin yanı sıra, biyolojik olarak aktif olan moleküllerin hasar görmüş ve enflame olmuş pulpal doku alanına taşınmasında bir araç görevi gören yapı iskelelerinin önemli bir rol üstlendiklerini belirtmişlerdir (Yıldırım *et al.*, 2007).

Günümüzde doku mühendisliği inşası; kök hücreler, üç boyutlu yapı iskele materyalleri ve biyokimyasal moleküller arasındaki bağlantılar üzerine kurulmuştur. İdeal bir yapı iskelesi; bioçözünür olma özelliği ile birlikte hücrel infiltrasyonu, vaskülarizasyonu, hücre farklılaşmasını

hızlandırabilen ve uygun dokular ile yer değiştirebilen bir yapıda olmalıdır (Langer ve Vacanti, 1993 ve Galler *et al.*, 2011).

3D yazıcılarda kullanılan teknolojiler ile yaratılan günümüz olanakları; hızlı bir şekilde rejeneratif diş hekimliği alanına adapte edilerek, oral ve maksillofasiyal rejenerasyonlar için gerekli doku mühendisliği alanında kullanıma geçirilmiştir (Yun, 2015) .

3D yazıcılarla elde edilen yapı iskeleleri; doku mühendisliği teknolojilerinin esas aldığı üç komponentten birini oluşturmaktadırlar. Fonksiyonel olarak yapı iskeleleri; hücre ekimi, hücre adezyonu ve hücre proliferasyonuna olanak sağlayarak; endojen hücrelerin sentezleyecekleri yeni bir matriksin, hasar görmüş boşluk alan ile tamamiyle yer değişimi gerçekleşene kadar, ilgili alanda geçici olarak yapıcı bir iskelet görevini üstlenmektedirler (Murray *et al.* 2007 ve Galler *et al.*, 2011).

3D ile üretilen ideal bir yapı iskelesi, hücresel dağılıma izin veren biouyumlu bir araç olarak hizmet vermenin yanı sıra; hücresel aktiviteleri ve hücre içi haberleşmeyi sağlayarak, hücrelerin doğal fizyolojik mikroçevrelerini taklit edebilen bioaktif bir platform olarak da rol oynamaktadırlar (Gong *et al.*, 2016) .

Polilaktik asit (PLA), poliglolikolik asit (PGLA), polikaprolaktan (PCL) ve polietilen glikol (PEG) gibi biyomateryaller; 3D yapı iskelesi üretiminde en sıklıkla kullanılan materyaller arasında yer almaktadırlar (Gupta *et al.*, 2016).

Cordeiro ve arkadaşlarının, 2008 yılında, in vivo koşullarda yaptıkları hayvan çalışmasında; üçüncü büyük azı dişlerinden alınan kuronal kesitlerin pulpal boşluk alanına PLLA biyomateryali enjekte edilerek polimerizasyonları yapılmıştır. Daha sonrasında; hSHEDs' in izolasyon ve kültivasyonları yapılarak, hücreler önceden hazırlanmış olan diş kesitli /

PLLA bazlı yapı iskelelerine aktararak çalışmada kullanılan immün sistemi baskılanmış farelere implante edilmişlerdir. Bu çalışmada; esas olarak bioçözünür yapı iskeleleri üzerine aktarılan hSHEDs' in morfolojik doku oluşturma karakterizasyonları incelenmiştir. TEM (*Transmission Electron Microscope*) ve immünohistokimya ile değerlendirilen örneklerde; hSHEDs' in deney ortamında, odontoblast ve endotelyal benzeri hücrelere farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Araştırmacılar bu bulgular ışığında elde edilen yeni dokunun; morfolojik ve hücresel açıdan fizyolojik dental pulpa dokusuna benzediğini; hSHEDs' in dental pulpa alanında doku mühendisliği ile yaratılacak rejenerasyonda kullanımlarının uygun olabileceğini raporlamışlardır (Cordeiro *et al.*, 2008).

Sakai ve arkadaşları tarafından, 2010 yılında, gerçekleştirilen bir başka çalışmada; Corderio ve arkadaşlarının hazırlamış oldukları, diş kesitleri ve PLLA biyomateryalinden oluşan yapı iskeleleri oluşturularak, hSHEDs' in bu alandaki odontogenezis potansiyelleri bu kez in vitro ortamda incelenmiştir. Araştırma bulgularında; hSHEDs' in fonksiyonel odontoblastlara ve vasküler endotelyal hücrelere farklılaşarak tübüler dentin oluşturabildikleri sonucuna varılmıştır (Sakai *et al.*, 2010).

Hücreler için bir biomatriks görevi gören yapı iskeleleri; dentin-pulpa kompleksini içeren dokuların rejenerasyon ve tamirinde başarılı sonuçlar ortaya çıkararak, diş hekimliği alanında terapötik amaçlı kullanımlarının da olabileceğini göstermişlerdir (Sharma *et al.*, 2010) . Bu bağlamda biz de çalışmamızda PLA bazlı yapı iskeleleri kullanarak; bu iskelelerin, hSHEDs üzerindeki osteojenik etkilerini araştırarak; ilerleyen dönemlerdeki terapötik kullanımlarını değerlendirdik. Çalışmamızda hSHEDs' in osteojenik indüklemeye ile iki boyutlu (2D) standart kültür ortamı ve üç boyutlu (3D)

PLA bazlı yapı iskelelerinin yer aldığı kültür ortamlarında osteoblastik farklılaşmaları ayrı ayrı incelenmiştir.

PLA biyomateryali; sıklıkla, poliglikolik asit veya polimandelik asit içeren α – hidroksiasitlerden elde edilen, alifatik polyester ailesi altında yer alan bir biyomateryaldir. PLA; alifatik termoplastik yapısından köken alan, endüstriyel paketlenme ya da bioçözünümlü / biyumlu medikal cihazlar için kullanılabilen, şeker, mısır, patates ve şeker kamışı gibi yenilenebilen kaynaklardan üretilen; yüksek bir mekanik katsayıya sahip, oldukça iyi dayanıklılık gösterebilen bir biyopolimer yapısına sahiptir (Armentano *et al.*, 2013) .

PLA yapısının insan vücudu tarafından absorbe edilmesi ve bioçözünürlüğü sonrasında herhangi bir toksik ürün ortaya çıkarmaması; bu materyalin yükselen ve umut verici biyomateryaller arasında yer almasını sağlamıştır (Gao *et al.*, 2015).

PLA biyomateryali; FDA tarafından onaylı, sentetik ve biyoçözünüm gösterebilen sayılı polimerler arasında yer almaktadır. Bu özellikler; yüksek moleküler ağırlıklı, şekilsiz ya da kristalimsi yapıdaki polimerleri elde etmek için meydana gelen PLA yapısındaki L- ve D- izomerlerinin kontrollü polimerizasyonu aşamasından etkilenecek, değişime uğrayabilirler (Tim *et al.*, 2008) .

Rejenerasyon ve tamir aşamalarında kullanılan yapı iskelesi biyomateryali ve iskelenin dizaynı; rejenerasyon ve tamir aşaması için kullanılan kök hücrelerin farklılaşarak ilgili dokuda etkili bir sonuç elde edilmesi için yüksek derecede önem teşkil etmektedir (Lim *et al.*, 2016). Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda poli laktik asit bazlı 3D yapı iskeleleri kullanılmıştır.

Yapı iskelelerinin türlerini belirleyen doğal ve sentetik polimer içerikleri, hücrelerin fizyolojik mikroçevrelerini etkileyen önemli unsurlar arasındadır. Doğal polimer içerikli yapı iskelelerinde genellikle, saflık ve immün cevabın indüklenmesi konuları ile ilgili sorunlar yaşanabilmektedir. Dolayısı ile; doku mühendisliğinde kullanacağınız yapı iskelelerinin sentetik polimer içerikli olmaları; potansiyel bir immünreaksiyon riskini engellemelerine rağmen, klinik uygulamalara daha uygun oluşları ve kişiye özel olarak tasarlanabilen fizikokimyasal özellikleri, araştırmamızda PLA bazlı yapı iskelelerini tercih etmemizde önemli bir etken olmuştur (Chan ve Mooney, 2008 ve Gong *et al.*, 2016) .

Çalışmamızda PLA biyomateryali tercihi yapılmasının başlıca sebeplerini:

- Yüksek biyolojik dayanım,
- Geri dönüştürülebilirlik,
- Düşük immünojenik ve toksik atık üretimi,
- Bioçözünür alifatik polyester yapısının, medikal ve biyolojik uygulamalar açısından ciddi ölçüde avantaj oluşturması gibi özellikler oluşturmuştur.

Mezenkimal kök hücrelerle benzer özellikler gösteren dental kaynaklı kök hücreler; MSCs ile benzer şekillerde; CD90, CD73, CD105, CD146, STRO-1 belirteçleri için pozitif, CD34, CD45, CD11b/c ve HLA-DR belirteçleri için negatif ekspresyon sergilemektedirler (Parekkadan ve Milwid, 2010 ve Penny *et al.*, 2012). Bizim de çalışmamızda izole edilen kök hücrelerin mezenkimal kaynaklı olduklarını göstermek amacıyla; CD90 ve CD45 MSCs yüzey antijenleri kullanılmıştır. Çalışmamız için kullandığımız üçüncü pasajda (P3) yer alan hücreler, MSCs paternine uygun şekilde; immünohistokimyasal analizler ile uyguladığımız CD90 yüzey antijeni için pozitif (+), CD45

hematopoietik yüzey antijenleri için ise negatif ekspresyon (-) göstermişlerdir. Bulgularımız çalışmada kullandığımız hücrelerin mezenkimal kaynaklı hSHEDs olduklarını desteklemektedir.

Miura ve arkadaşlarının ilk kez 2003 yılında; süt dişlerinde gelişen fizyolojik kök rezorpsiyonlarına rağmen, bu mekanizmanın süt dişi pulpal yapılarında histolojik bir farklılık yaratmadığı görüşleri ile yola çıktıkları; fizyolojik rezorpsiyona uğramış ve çekim zamanı gelmiş dişlerin kalan kuronal pulpal dokusundan kök hücre elde ettikleri çalışmalarından destek alınarak (Miura *et al.*, 2003); çalışmamızda klinik ve radyolojik olarak fizyolojik kök rezorpsiyonu dışında, herhangi bir semptom göstermemiş olan, 6-11 yaş aralığındaki çocuk hastaların ön bölge süt dişlerinden elde edilen pulpal yapılar, kök hücre kaynağı olarak kullanılmıştır.

Araştırmamızda; eksfoliye olmuş süt dişlerinin kuronal bölgelerinden elde ettiğimiz kuronal pulpa dokusu ile başarılı bir şekilde hSHEDs izole edilmiş ve bu hücrelerin standart kültür ortamı (2D) ile PLA bazlı yapı iskeleleri üzerlerindeki (3D) osteojenik farklılaşmaları karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalara ek olarak; çalışmamız için en önemli nokta olan, PLA bazlı yapı iskelelerinin osteojenik indüksiyon kabiliyetleri, incelenmiştir.

Araştırmamızda iki boyutlu kültür ortamında, osteojenik olarak indüklenmiş hSHEDs' in 14 ve 21 günlük kültür periyotları sonrasındaki ON immünoreaktiviteleri değerlendirilerek; 21 gün sonunda ON immünoreaktivitesinin, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu sonuç; osteojenik farklılaşmanın 21. güne kadar artarak devam ettiğini göstermektedir.

Çalışmada iki boyutlu ve üç boyutlu PLA bazlı yapı iskelelerinin yer aldığı kültür ortamlarında bulunan hSHEDs' in 14 günlük kültür periyodu sonrasındaki ON immünoreaktiviteleri değerlendirilerek; bu periyot

sonrasında; üç boyutlu PLA bazlı yapı iskelelerinin yer aldığı kültür ortamlarında bulunan hSHEDs' in ON yoğunluklarının, iki boyutlu kültür ortamına göre daha fazla olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu saptanmıştır. Bu sonuç; PLA bazlı yapı iskelelerinin, osteojenik olarak indüklenmiş hSHEDs' in farklılaşmalarını desteklediklerini göstermiştir.

Çalışmada iki boyutlu kültür ortamında, osteojenik olarak indüklenmiş hSHEDs' in 14 ve 21 günlük kültür periyotları sonrasındaki OCN immünoreaktiviteleri değerlendirilerek; 21 günlük kültür periyodu sonrasında azalmış olarak saptanan OCN yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuç; osteojenik farklılaşmanın 21. güne kadar devam ettiğini; ancak 14 günlük kültür periyodundan farklı olmadığını göstermiştir.

Çalışmada üç boyutlu kültür ortamında, PLA bazlı yapı iskeleleri üzerine aktararak, osteojenik olarak indüklenmiş hSHEDs' in 14 ve 21 günlük kültür periyotları sonrasındaki OCN immünoreaktiviteleri değerlendirilerek; 21 günlük kültür periyodu sonrasında ölçülen OCN yoğunluğunun azalmış olduğu; ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Bu sonuç; hSHEDs' in PLA bazlı yapı iskeleleri üzerinde osteojenik farklılaşmalarını 21. güne kadar devam ettirdiğini; ancak 14 günlük kültür periyodundan farklı olmadığını göstermiştir.

Çalışmada üç boyutlu kültür ortamında, PLA bazlı yapı iskeleleri üzerine aktararak, osteojenik olarak indüklenmiş hSHEDs' in 14 ve 21 günlük kültür periyotları sonrasındaki ON immünoreaktiviteleri değerlendirilerek; 21 günlük kültür periyodu sonrasında azalmış olarak saptanan ON yoğunluğu, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmuştur. Bu sonuç; ilk başta PLA bazlı yapı iskelelerinin hücreler üzerinde toksik bir

etki yarattığını düşündürmüştü; ancak Grup 2' de yer alan hücrelerin 14 ve 21 günlük kültür periyotları arasında OCN ekspresyonu açısından herhangi bir fark görülmemesi ve 14 günlük kültür periyodu sonrasında, PLA bazlı yapı iskelelerinin yer aldığı üç boyutlu kültür ortamında bulunan hücrelerin (Grup 4) iki boyutlu ortamda yer alan hücrelere (Grup 2) göre daha yoğun bir ON ekspresyonu sergilemeleri bu düşüncüyü değiştirmiştir. Bu bağlamda; immünohistokimyasal analiz sonuçlarımıza göre; PLA bazlı yapı iskelelerinin hücreler üzerinde kendi kendine toksik bir etki yaratmadığı; sadece üç haftalık kültür periyodu sonunda hücrelerin bazı moleküllerin salınımınlarını desteklemediği düşünülmüştür.

Ta-Su ve arkadaşları tarafından 2014 yılında *in vitro* ortamda gerçekleştirilen bir çalışmada; hSHEDs' in osteojenik farklılaşmaları ve mineralizasyonları araştırılarak; bu hücrelerin modifiye edilmiş kitozan bazlı yapı iskeleleri üzerindeki 21 günlük kültür periyodu sonucunda; yapı iskelelerinin hSHEDs üzerinde osteojenik indüksiyon yarattığı ve hücrelerin ON ile OCN gen ekspresyonlarında artış gözlemlendiği rapor edilmiştir (Ta – Su *et al.*, 2014). Bizim çalışma bulgularımızda da; bu çalışma ile benzer sonuçlar elde edilerek, Ta-Su ve arkadaşlarının çalışma sonuçları desteklenmiştir.

Çalışma sonuçlarımız, osteojenik farklılaşma için gerekli kültür periyodu açısından değerlendirildiğinde; 14 günlük ve 21 günlük kültür periyotlarından elde edilen her iki osteojenik belirteç ekspresyonları da göz önünde bulundurularak; 14 günlük kültür periyodunun, PLA bazlı yapı iskeleleri üzerine aktararak kombinlenmiş veya sadece iki boyutlu kültür ortamında yer alan hSHEDs' in osteoblastlara farklılaşabilmeleri için yeterli bir kültivasyon süresi olduğu yönünde değerlendirilmiştir.

Çalışma bulgularımızda; PLA bazlı yapı iskeleleri üzerinde gözlemlediğimiz artmış ONve OCN osteojenik belirteçlerinin ekspresyonları; çalışmamız adına, PLA bazlı yapı iskelelerinin hSHEDs ' in osteojenik indüksiyonları için uygun kullanılabilirliği olan bir yapı iskelesi biyomateryali olduğu yönünde destekleyici bir bulgu oluşturmuştur.

Guarino ve arkadaşları (2012) hücre ve yapı iskelesi kombinasyonlarını araştırdıkları çalışmalarında; hMSCs' in PCL/ PLA bazlı yapı iskeleleri üzerindeki osteojenik farklılaşmaları ve mineralizasyon karakterizasyonlarını inceleyerek; PLA/PCL bazlı yapı iskelelerinin matriks görevi sağlayan özelliklerinin, hMSCs üzerinde farklılaşma ve mineralizasyon derecelerini pozitif yönde etkileyen sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bir diğer anlatımla, bu durumu, yapı iskeleleri ile yaratılan dinamik kültür boyunca oluşturulan matriks görevindeki mikroçevrenin hidrodinamik özelliğinin; osteojenik farklılaşmayı ve perfüzyonu indükleyebileceği şeklinde açıklamışlardır (Guarino *et al.*, 2012) . PLA bazlı yapı iskelelerini kullandığımız çalışmamızda sonuçlarımız; PLA bazlı yapı iskeleleri ortamında oluşan dinamik kültürün, osteojenik farklılaşmayı ve perfüzyonu indükleyebileceğini ileri süren Guarino ve arkadaşlarının sonuçlarını destekler niteliktedir.

Khojasteh ve arkadaşlarının, 2015 yılında yapmış oldukları çalışmalarında; çekilmiş yirmi yaş dişlerinden elde ettikleri hDPSCs' in, 7 ve 14 günlük osteojenik farklılaştırma aşamaları; *SureOSS* (Allogreft), *Cerabone* (Ksenogreft), *PLLA* (sentetik) ve *Osteon II Kollajen* (Kompozit) bazlı yapı iskeleleri üzerinde incelenmiştir. Araştırmacılar çalışma kapsamında; hücrelerin adezyonlarını, morfolojik değişimlerini ve osteojenik farklılaşmalarını değerlendirmişlerdir. Araştırma sonucunda; diğer yapı iskelelerine kıyasla, PLLA bazlı iskelelerin daha yüksek oranlarda, hDPSCs'

in adezyon, proliferasyon ve osteojenik farklılaşmalarını desteklediklerini rapor etmişlerdir (Khojasteh *et al.*, 2015). Bizim de çalışmamızda; Khojasteh ve arkadaşlarının gerçekleştirmiş oldukları çalışmalarından esas alınan kültivasyon periyotlarına benzer zamanlarda, hücrelerin PLA bazlı yapı iskelelerine aktarımları sonrasında, 14 günlük kültür periyodu sonucunda; hSHEDs ' in yapı iskelelerinin hem yüzey alanlarında hem de iç kesitlerindeki adezyonlarını, proliferasyonlarını ve osteojenik farklılaşmalarını destekledikleri yaptığımız immünohistokimyasal boyama ile saptanmıştır. Araştırma sonuçlarımız, Khojasteh ve arkadaşlarının bulgularını, destekler niteliktedir.

Rosenzweig ve arkadaşları 2015 yılında yapmış oldukları araştırmalarında; PLA bazlı yapı iskelelerinin, hücrelerin gelişimleri ve proliferasyonları açısından, iyi bir mekanik bütünlük sağladıklarını belirtmişlerdir (Rosenzweig *et al.*, 2015). Çalışmamızda yaptığımız histokimyasal analizler sonucunda; PLA bazlı yapı iskelelerine aktarılmış olan hücrelerin yer yer tutunduğu ve hem dış hem de iç yapıda yer alan PLA bazlı iskelelerin yüzeylerinde, hücrelerin varlığı saptanmıştır. Ayrıca; sadece PLA bazlı yapı iskelelerin yer aldığı grupta, yapının dış ve iç katman yüzeylerinde herhangi bir hücre varlığının saptanmaması; PLA bazlı yapı iskeleleri ile kültüre edilen hücrelerin, PLA yüzeyine tutunma sağladıklarını göstermiştir. PLA bazlı yapı iskelelerinin, hSHEDs için iyi bir mekanik alan sağlayarak bu hücreler için bir mikroçevre alanı yarattığını düşündürten bulgularımız; Rosenzweig ve arkadaşlarının araştırma bulgularını destekler niteliktedir.

Üç boyutlu yapı iskeleleri, kök hücreler ve büyüme faktörlerinin kullanıldığı rejeneratif teknolojilerde geline en son noktadaki ana mekanizma; bu üçlünün kombine kullanımlarının konak dokudaki

rejenerasyon cevabını stimüle ederek güçlendirdiği ve kemiksel rejenerasyonun gerekli olduğu alanlarda osteointegrasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirdikleri yönünde açıklanmıştır (Mitsiadiset *al.*, 2015, Naddeoet *al.*, 2015 ve Pilipchuket *al.*, 2015) .

Güncel rejeneratif teknolojilerin dış hekimliği alanında, geçtiğimiz yıllar içerisinde uygulanan klinik denemelerinde; özelleşmiş yapı iskeleleri üzerine ekilmiş olan kök hücre kombinasyonları kullanılarak, primer implant stabilitesini başarabilmek adına, in vivo ortamda, yeterli miktarda kemik üretiminin sağlıklı bir şekilde elde edilebildiği bildirilmiştir (Kitamura, et al. 2011 ve Windisch, et al. 2012) .

PLA bazlı yapı iskelelerinin; hSHEDs üzerindeki osteojenik indüktif etkilerinin yanısıra, erken dönem biyoçözünürlükleri de çalışmamız içerisinde araştırdığımız noktalardan birisi olmuştur. Kültivasyon sonrasında, PLA bazlı yapı iskelelerinin sütun kalınlıklarında% 12,5 ve %30 değerleri arasında seyreden değişimler gözlemlenmiştir. Bu değişimleri PLA bazlı yapı iskelelerinin üç haftalık gibi kısa bir kültivasyon periyodu sonrasında biyoçözünürlüğe uğrayabilecekleri şeklinde yorumlamak pek mümkün değildir.; çünkü elde edilen ölçüm değişiklikleri PLA bazlı yapı iskelelerinin histolojik değerlendirme öncesi yumuşamaları amacıyla bekletildikleri boraks-sodyum karbonat solüsyonuna maruz kaldıktan sonra alınmıştır. Dolayısıyla sütun kalınlıklarında meydana gelen azalmanın bu solüsyon kaynaklı olabileceği düşünülmüştür.

İlk kez 2010 yılında Xiong ve Li tarafından tanıtılan yüksek alkalın yapıda olan boraks-sodyum karbonat tampon solüsyonu ile saf PLA biyomateryalinin, 10 günlük kısa bir zaman içerisinde ortalama % 50' lik bir çözünüme ulaşabildiği rapor edilmiştir (Xiong ve Li, 2010). Ancak çalışmamızda kullandığımız PLA biyomateryalimiz saf olmayıp; üç boyutlu

baskı aşamasında, saf PLA liflerinden farklı olarak daha katı (camsal geçiş) bir yapıda oluşturulmuştur. Dolayısıyla bu katı ve kompakt yapının; belirli bir dereceye kadar PLA bazlı yapı iskelelerinin biyoçözünürlüklerini azaltmış olabileceği düşünülmüştür.

Chou ve arkadaşlarının (2016), PLA bazlı yapı iskelelerinin biyoçözünürlüğü üzerine yapmış oldukları *in vivo* araştırma sonuçları doğrultusunda; bu tarz bir polimer yapısında kısa bir periyot içerisinde çözünürlük yaşanmadığı ve *in vivo* ortamda PLA yapısının yaklaşık olarak altı ay içerisinde hidrolizyon mekanizması ile dayanıklılığını kaybettiği; ancak kütleli değişimlerin daha uzun bir zaman aldığı belirtilmiştir (Chou *et al.*, 2016). Bizim de çalışmamızda, 14 günlük ve 21 günlük kültür periyotları sonrasında, bu kadar kısa bir süre içerisinde PLA bazlı yapı iskeleleri üzerinde meydana gelen boyutsal değişimler; yapı iskelelerinin erken dönem biyoçözünürlükleri ile değil de, yapı iskelelerinin immünohistokimyasal analizler öncesinde yumuşatılmaları için konulduğu boraks ortamından kaynaklı olabileceği fikri ile ilişkilendirilmiştir. Bu sebeple, çalışma bulgularımız, Chou ve arkadaşlarının çalışma bulgularına paralel nitelikte olup; PLA bazlı yapı iskelelerinin kısa dönem içerisinde biyoçözünürlüğe uğramadıkları yönünde olmuştur.

Polimer içerikli yapı iskelelerinin biyoçözünürlük dereceleri; kullanılan polimerin kimyasal yapısı, stabil olmayan hidrolitik bağların varlığı, hidrofilik/ hidrofobik oranları, kristalize/ amorfoz morfolojiler, camsal geçiş sıcaklıkları, kopolimer derecesi ve moleküler ağırlığı gibi polimerin iç yapı özelliklerine bağlı olarak değişiklik gösterebilir (Dhandayuthapani *et al.*, 2011).

PLA bazlı yapı iskelelerinin kimyasal yapıları üzerine yapılan güncel bir literatürde; bu yapı iskelelerinin düşük (uzun zamanlı) biyoçözünüm

göstermelerinin (10 ay – 4 yıl); kimyasal yapıda bulunan metil gruplarından kaynaklanabileceği üzerinde durulmuştur. Çözümün ise PLA' nın biyoçözünümü sırasında oluşan ürünlerin (laktik asit) meydana getirdiği lokalize pH azalmasını, PLA matriks yapısına bioaktif doldurucuların eklenerek, bu azalışın tamponlanabileceği bildirilmiştir (Tajbakhsh ve Hajiali, 2016) .

PLA bazlı yapı iskeleleri kısa dönem içerisinde biyoçözünürlük sergileyememelerine rağmen; uzun süreli mekanik bir bütünlük göstermeleri, çalışmamızdaki gibi osteojenik ortam içerisinde bulunan ve osteojenik olarak hasar meydana gelen dokularda rejenerasyon yaratmak amacıyla kullanılan yapı iskeleleri için bir avantaj oluşturacağı düşünülmüştür. Rejeneratif diş hekimliği bağlamında değerlendirildiğinde; diş çekimleri, agresif periodontal hastalıklar, oral bölgede meydana gelen kist ve tümör oluşumları sonrası uygulanan cerrahi girişimler, radyoterapi tedavileri ile çene kemiklerinde gelişen osteonekrotik alanlar gibi çeşitli sebepler ile kaybedilmiş sert doku bütünlüklerinde; kök hücre – PLA bazlı yapı iskelesi kombinasyonlarının bu alanlarda uzun süre biyoçözünürlüğe uğramadan kalabilmelerinin sert doku kayıplarında, iyi bir mekanik destek sağlayabileceğini ileri sürmek kanımızca hatalı olmayacaktır.

Araştırmamızda kullandığımız PLA bazlı yapı iskelelerinin ; hSHEDs için mekanik destek sağlayarak hücreler açısından yapısal bir bütünlük oluşturdukları, hSHEDs' in kolay hareketliliği ve gelişimine izin verebilecek – uygun koşullar dahilinde - hacim kontrollü- üç boyutlu fiziksel bir ekstrasellüler mikroçevre mimarisini yaratabildikleri görülmüştür.

Sonuç olarak; PLA bazlı yapı iskelelerinin osteoindüktif özelliklerinin gösterildiği bu çalışmamızda; 'Rejeneratif Doku Mühendisliği' yaklaşımlarında; rejenere olması istenen hasar görmüş dokularda, PLA bazlı

yapı iskelelerinin doğal bir ekstrasellüler matriks sağlayacak, biyomekanik özellikleri sahip olduklarını söyleyebiliriz. Çalışma sonuçlarımız genel olarak değerlendirildiğinde; izolasyonları sağlanan hSHEDs' in, 3D PLA bazlı yapı iskelelerinde, hayatta kalabilme, iskele yüzeylerine adezyon sağlayabilme, proliferasyon ve osteojenik olarak farklılaşabilme, bu farklılaşmalarını devam ettirebilme kabiliyetlerine sahip olduklarını; hSHEDs - PLA bazlı yapı iskeleleri kombinasyonlarının kullanımının, yakın gelecekte 'Doku Mühendisliği ' ve 'Rejeneratif Diş Hekimliği' alanlarında terapötik açıdan, önemli bir terapi olarak kabul göreceği düşüncesindeyiz.

Amerikan Çocuk Diş Hekimliği Akademisi gelecekte planlanan otolog rejeneratif klinik uygulamalar kapsamında, dental kaynaklı kök hücrelerin kullanımları, canlılıkları, depolanmaları ve toplanmaları konularında dişhekimlerinin, çocuk dişhekimlerinin, sağlık personellerinin ve ailelerin bilgilendirilmelerini ve eğitim gerekliliklerini vurgulamaktadırlar (Goomer *et al.*, 2014) .

Bu çalışma ile birlikte; Yakın doğu Üniversitesi' nde Doku ve Hücre Kültürü Laboratuvar' ı kurularak, ilk kök hücre izolasyonları yapılmıştır. Eksfoliye olmuş süt dişlerinden izole edilen hSHEDs doku mühendisliği alanı ile kombine olarak kullanılarak; yakın gelecekte hayata geçirilmesi planlanan Süt Dişi Kök Hücre Bankası' nın da ilk temelleri atılmıştır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

hSHEDs için, PLA bazlı yapı iskeleleri kullanarak oluşturulan üç boyutlu mikroçevre ortamında, bu hücrelerin osteojenik olarak farklılaştırılarak; kök hücre - ekstrasellüler matriks kombinasyonunun oluşturulmasının ve PLA bazlı yapı iskelelerinin hSHEDs üzerindeki osteojenik indüksiyon desteğinin gösterilmesinin amaçlanıp; araştırıldığı bu tez çalışmasının sınırları dahilinde;

Hücresel karakterizasyonun belirlenmesi amacıyla uygulanan immünohistokimyasal deneylerimizin sonuçlarına dayanarak:

Eksfoliye olmuş süt dişlerinin kuronal pulpal yapılarından izolasyonlarını sağlamayı başardığımız kök hücreler; uygulanan immüno histokimyasal analizler sonucunda; pozitif CD 90 (+) yüzey antijeni ekspresyonu (A,B) ve negatif CD 45 (-) yüzey antijeni ekspresyonu göstermişler. Bu bulgu ışığında; elde ettiğimiz kök hücrelerin nezenkimal kök hücre karakterine sahip hSHEDs olduklarını söyleyebilmek mümkündür.

Üç boyutlu (Grup 4) ve iki boyutlu (Grup 2) kültür ortamlarındaki hücrelere uygulanan osteojenik indüksiyonun belirlenmesi amacıyla yapılan immünohistokimyasal deneylerimizin sonuçlarına dayanarak:

Her iki kültür periyodu içerisinde; hem PLA bazlı yapı iskelelerinin olduğu üç boyutlu ortamda (Grup 4) hem de iki boyutlu ortamda osteojenik olarak indüklenen hSHEDs' in pozitif ON immünoreaktivitesi sergilemeleri; bu hücrelerin her iki kültür ortamında da osteojenik farklılaşma gösterebildiklerini ve ek olarak; PLA bazlı yapı iskelelerinin bu farklılaşmayı desteklediğini söyleyebiliriz.

14 günlük kültür periyodu sonrasında; Grup 4 ' te, Grup 2' ye göre daha yoğun olarak saptanan ON immünoreaktivitesi; bu kültür periyodu içerisinde PLA bazlı yapı iskelelerinin, hücreler üzerindeki osteojenik indüksiyonu desteklediği sonucunu göstermiştir.

14 günlük kültür periyodu sonrasında; Grup 4' teki ON immünoreaktivitesinin, 21 günlük kültür periyodu sonundaki immünoreaktivite ile karşılaştırması yapıldığında, değerlerin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığının saptanması; 14 günlük kültür periyodu sonrasında hSHEDs' in ON ekspresyonlarının anlamlı bir şekilde azaldığını göstermiştir.

14 günlük kültür periyodu sonrasında; Grup 2' deki ON immünoreaktivitesinin, 21 günlük kültür periyodu sonrası değerlerle karşılaştırıldığında; ON immünoreaktivitesinin 21 gün sonunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla olduğunun saptanması; 14 günlük kültür periyodunun, hem hSHEDs' in osteojenik farklılaşması hem de PLA bazlı yapı iskelelerinin bu farklılaşmayı desteklemesi için yeterli bir kültivasyon süresi olduğu sonucuna varılmıştır.

21 günlük kültür periyodu sonrasında, Grup 2' de meydana gelen ON yoğunluğunun, aynı kültür periyodu sonrasında Grup 4' te daha az olarak tespit edilmiş olması ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunması; kültivasyon süresi için; 14 günlük kültür periyodunun osteojenik farklılaşma için yeterli olabileceği bulgusunu desteklemiştir.

14 günlük kültür periyodu sonrası; Grup 4 ' teki OCN yoğunluğunun, 21 günlük kültür periyodu sonrasında ölçülen OCN yoğunluğuna göre daha fazla olduğu görülmüş ancak; bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmaması,

PLA bazlı yapı iskelelerinin, her iki kültür periyodunda da benzer osteojenik indüksiyon desteği verdiği belirlenmiştir.

14 günlük kültür periyodu sonrasında, Grup 2' de belirlenen OCN yoğunluğunun; 21 günlük kültür periyodu sonrasında azaldığı görülmüş; ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması, iki boyutlu ortamda kültüre edilip; osteojenik olarak indüklenen hücrelerin, her iki kültivasyon periyodunda da benzer karakterizasyon sergilediği gözlenmiştir.

21 günlük kültür periyodu sonrasında, Grup 2' de iki boyutlu kültür ortamında yer alan hücrelerin OCN ekspresyon değerlerinin; aynı kültür periyodu sonrasında Grup 4' te üç boyutlu ortamda kültüre edilmiş olan hücrelerden daha az olarak tespit edilmesi; ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması, PLA bazlı yapı iskelelerinin; 14 günlük kültür periyodu sonrasında, herhangi bir artış gözlenmeden, osteojenik indüklemeyi aynı seviyede desteklediklerini göstermiştir.

Araştırmamız içerisinde elde ettiğimiz bulgular ışığında; konuyla ilgili önerilerimiz:

- ✓ hSHEDs- PLA bazlı yapı iskelesi kombinasyonlarını; dişhekimliği alanında alternatif bir osteojenik dolgu materyali olarak kullanabilmek mümkündür. Bu bağlamda; çeşitli kraniyofasiyal kemik defektlerinde, geniş periodontal veya periapikal lezyonlarla birlikte yaşanan geniş alanlı kemik dokusu kayıplarında; hasar görmüş alanda rejenerasyonu indükleyici ve ilgili dokuya destek sağlayıcı alternatif bir tedavi seçeneği olarak bu kombinasyonların kullanımları için in vivo ortamda yeni çalışmalar yapılmalıdır.
- ✓ Üç boyutlu yapı iskelelerinin hücreler açısından yaratmış oldukları dinamik kültür ortamı, in vitro ortamlarda gerçekleştirilmesi planlanan üç boyutlu kemik dokusu üretiminde; iki boyutlu standart kültür ortamlarına alternatif olarak önerilebilir.
- ✓ İn vitro ortamda yaptığımız araştırma bulgularımızın; konak yapıda hücre – yapı iskelesi kombinasyonlarına karşı gösterilen cevabın değerlendirilebilmesi amacıyla, in vivo ortamda yeni çalışmaların yapılması doğru olacaktır.
- ✓ Kök hücreler, yapı iskeleleri ve büyüme faktörleri üzerinde uygulanan çok önemli araştırmalar olmasına rağmen; bu üçlü arasındaki bağlantıların daha iyi anlaşılması amacıyla, yeni hayvan modellerinin kullanılacağı klinik ön çalışmalar yapılmalıdır.

- ✓ Hücre izolasyonu, in vitro ortamda hücre manipülasyonu ve diğer kök hücre çalışmaları adına temel bir havuz oluşturma olasılığı yaratacak kök hücre bankaları ile birlikte; dental implantlar veya konvansiyonel kanal tedavileri gibi maliyetli ve uzun zaman alan dental işlemlere alternatif, rejeneratif terapileri hayata geçirilebilmenin olası olduğu düşünülmüştür.
- ✓ Tez çalışmamızdan çıkardığımız sonuçlar içerisinde; hastaların kendilerinden elde ettiğimiz kök hücrelerin; doku mühendisliği ile kombine kullanımlarının, yakın gelecekte kliniklerde uygulanacak tedavi seçenekleri arasında olabileceği inancındayız.
- ✓ Diş hekimliği alanında, özellikle osteojenik rejenerasyon istediğimiz bölgelerde, tezimizde kullandığımız PLA bazlı yapı iskelelerinin içeriğine; hidroksiapatit (HA), kalsiyum fosfataz (CaP) ve *Bioglass* (BG) gibi nano / bioaktif doldurucu materyallerin eklenmesi ile kemik dokusu oluşumunda bu yapıların iskelenin osteoindüktif etkisini arttıracğını düşünmekteyiz.
- ✓ Hücreler ile birlikte kombine bir şekilde biobaskı yöntemi ile basımları yapılmış yapı iskeleleri ile enjekte edilebilir formda üretilecek yapı iskelelerinin; özellikle rejeneratif diş hekimliği açısından önerilebilecek yapı iskelesi formları arasında in vivo ortamlarda yapılacak çalışmalarda kullanılmaları uygun olacaktır.

Sonuç olarak; rejeneratif diş hekimliği alanında araştırmacıların ilgilerini yönelttikleri nanoteknoloji, görüntüleme sistemleri ve matematiksel modelleme gibi teknolojiler; hem izolasyonları sağlanmış kök hücreler hem de uygulanacağı alan ve kişiye özgü tasarlanmış üç boyutlu yapı iskeleleri ile birleştirilerek hayata geçirilmelidirler. Böylelikle; rejeneratif diş hekimliği uygulamalarında; daha hızlı, daha güvenilir ve daha kaliteli sonuçların elde edilebileceği inancındayız.

KAYNAKLAR

Alge, D.L., Zhou, D., Adams, L.L., Wyss, B.K., Shadday, M.D., Woods, E.J. ve diğerleri. (2010). Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 4(1), 73-81.

Amrollahi, P., Shah, B., Seifi, A. ve Tayebi, L. (2016). Recent advancements in regenerative dentistry: A review. *Materials Science and Engineering C*, doi: 10.1016/j.msec.2016.08.045.

Anonuma, H., Ogura, N., Takahashi, K., Fujimoto, Y., Iwai, S., Hashimoto, H. ve diğerleri (2012). Characteristics and osteogenic differentiation of stem/ progenitor cells in the human dental follicle analyzed by gene expression profiling. *Cell and Tissue Research*, 350(2), 317-331.

Apel, C., Forlenza, O.V., Paula, V.J., Talib, L.L., Denecke, B., Eduardo, C.P. ve diğerleri (2009). The neuroprotective effect of dental pulp cells in models of Alzheimer' s and Parkinson' s disease. *Journal of Neural Transmisson*, 116 (1), 71-78.

Armentano, I., Bitinis, E., Fortunati, S., Mattioli, N., Rescignano, R., Verdejo, M.A. (2013). Multifunctional nanostructured PLA materials for packaging and tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.05.010.

Aquino, R., Rosa, A., Lanza, V., Tirino, V., Laino, L., Graziona, A. ve diğerleri (2009). Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp/ progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *European Cells and Materials*, 18, 75-83.

Arminan, A., Gandia, C., Bartual, M., Garcia, J.M., Lledo, E., Mirabet, V. ve diğerleri (2009). Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and

GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 18(6), 907-917.

Asgary, S. ve Fazlyab, M. (2014). Management of Complicated Crown Fracture with Miniature Pulpotomy: A Case Report. *Iranian Endodontic Journal*, 9(3), 233-234.

Atalayin, C., Tezel, H., Dağcı, T., Karabay Yavasoglu, N.U., Oktem, G. ve Köse, T. (2016). In vivo performance of different scaffolds for dental pulp stem cells induced for odontogenic differentiation. *Brazilian Oral Research*, 30(1), doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0120.

Aurrekoetxea, M., Gallastegui, P.G., Irastorza, I., Luzuriaga, J., Etxebarria, V.U., Unda, F. ve Ibarretxe, G. (2015). Dental pulp stem cells as a multifaceted tool for bioengineering and the regeneration of craniomaxillofacial tissues. *Frontiers in Physiology*, 6(289), doi:10.3389 / fphys.2015.00289.

Aziz-Aly, L.A. (2015). Stem cells: Sources and regenerative therapies in dental search and practice. *World Journal of Stem Cells*, 7(7), 1047-1053.

Bab, I., Ashton, B.A., Gazit, D., Marx, G., Williamson, M.C. ve Owen, M.E. (1986). Kinetics and Differentiation of Marrow Stromal Cells in Diffusion Chambers In Vivo. *Journal of Cell Science*, 84, 139-151.

Bakopoulou, A. ve About, I. (2016). Stem Cells of Dental Origin: Current Research Trends and key Milestones towards Clinical Application. *Stem Cells international*, doi: 10.1155/2016/4209891.

Behnia, A., Haghighat, A., Talebi, A., Nourbakhsh, N. ve Heidari, F. (2014). Transplantation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth for bone regeneration in the dog mandibular defect. *World Journal of Stem Cells*, 6(4), 505-510.

Bento, L.W., Zhang, Z., Imai, A., Nör, F., Dong, Z., Shi, S. ve diğerleri (2013). Endothelial differentiation of SHED requires MEK1/ ERK signaling. *Journal of Dental Research*, 92(1), 51-57.

Biehl, J.K. ve Russell, B. (2014). Introduction to Stem Cell Therapy. *The Journal of Cardiovascular Nursing*, 24(2), 98-105.

Boyle, M., Chun, C., Stronjy, C., Narayanan, R., Bartholomew, A., Sundivakkam, P. ve diğerleri (2014). Chronic inflammation ad Angiogenic Signaling Axis Impairs Differentiation of Dental- Pulp Stem Cells. *PLOS One*, 9(11), e113419.

Can, A. (2008). A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turkish Journal of Hematology*, 25, 57-9.

Cao, L., Duan, P.G., Wang, H.R., Li, X.L., Yuan, F.L., Fan, Z.Y. ve diğerleri (2012). Degradation and osteogenic potential of a novel poly(lactic acid)/ nano- sized β - tricalcium phosphate scaffold. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5881-5888.

Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9(5), 641-650.

Chadipiralla, K., Yochim, J.M., Bahuleyan, B., Huang, C.Y., Garcia-Godoy, F., Murray, P.E. ve diğerleri (2010). Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments and pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Cell and Tissue Research*, 340: 323-333.

Chamieh, F., Collignon, A.M., Coyac, B.R., Lesieur, J., Ribes, S., Sadoine, J. ve diğerleri (2016). Accelerated craniofacial bone regeneration through dense collagen gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells. *Scientific Reports*, 9(6), doi: 10.1038/srep38814.

Chan, G. ve Mooney, D.J. (2008). 'New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response '. *Trends in Biotechnology*, 26 (7), 382-392.

Chen, M., Lee, C.H., Li, A., Huang, M., shen, T., Yang, R., Lal, S., Mao, J.J. ve diğerleri (2013). Insulin- producing cells (IPCS) from dental- pulp stem/ progenitor cells. Erişim: 23 Aralık 2015, *Stem save Saving Cells for Life*: <http://www.stemsave.com/Diabetes.aspx>.

Chen, K., Xiong, H., Xu, N., Shen, Y., Huang, Y. ve Liu, C. (2014). Chondrogenic potential of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in vitro and in vivo. *Acta Odontologica Scandinavica*, 72(8), 664-672.

Chia, H.N. ve Wu, B.M. (2015). Recent advances in 3D printing og biomaterials. *Journal of Biological Engineering*, 9(4), doi: 10.1186/s13036-015-0001-4.

Chou, Y.C., Yeh, W.L., Chao, C.L., Hsu, Y.H., Yu, Y.H., Chen, J.K et al. (2016). Enhacement of tendon-bone healing via the combination of biodegradable collagen-loaded nanofibrous membranes and a three-dimensional printed bone-anchoring bolt. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4173-4186.

Chueh, L.H. ve Huang, G.T. (2006). Immature Teeth with Periradicular Periodontitis or Abscess Undergoing Apexogenesis: A Paradigm Shift. *Journal of Endodontics*, 32(12), 1205-1213.

Coppes, R.P. ve Stokman, M.A. (2011). Stem cells and the repair of radiation-induced salivary gland damage. *Oral Diseases*, 17(2), 143-153.

Cordeiro, M.M., Dong, Z., Kaneko, T., Zhang, Z., Miyazawa, M., Shi, S. ve diğerleri (2008). Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Journal of Endodontics*, 34(8), 962-969.

Dalton, F.P., Mendonça, P.P., Mantesso, A. ve Deboni, M.C.Z. (2014). Can SHED or DPSCs be used to repair/ regenerate non-dental tissues? A systematic review of in vivo studies. *Brazilian Oral Research*, 28(1), 1-7.

Davies, O.G., Cooper, P.R., Shelton, R.M., Smith, A.J. ve Scheven, B.A. (2015). A comparison of the in vitro mineralisation and dentinogenic potential of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, bone marrow and dental pulp. *Journal of the Bone and Mineral Metabolism*, 33(4), 371-382.

Derby, B. (2012). Printing and Prototyping of Tissues and Scaffolds. *Science*, 338(6109), 921-926.

Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T. ve Kumar, D.S. (2011). Polymeric Scaffolds in Tissue engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*, doi: 10.1155/2011/290602.

Didilescu, A.C., Rusu, M.C. ve Nini, G. (2013). Dental pulp as a stem cell reservoir. *Romanian Journal of Morphology and Embriology*, 54(3), 473-478.

Douarin, L., Calloni, G.W. ve Dupin, E. (2008). The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle*, 7(8), 1013-1019.

Drees, J., Felthaus, O., Gosau, M. ve Morsczeck, C. (2013). Butyrate stimulates the early process of the osteogenic differentiation but inhibits the biomineralization in dental follicle cells (DFCs). *Odontology*, 102(2), 154-159.

Drummer, D., Cifuentes, S.C. ve Rietzel, D. (2012). Suitability of PLA/TCP for fused deposition modeling. *Rapid Prototyping Journal*, 18(6), 500-507.

Duttilleul, P.C., Chaubron, F., Vos, J.D. ve Cuisiner, F.J. (2015). Allogenic banking of dental pulp stem cells for innovative therapeutics. *World Journal of Stem Cells*, 7(7), 1010-1021.

Eleuterio, E., Trubiani, O., Sulpizio, M., Giuseppe, F.D., Pierdomenico, L., Marchisio, M. ve diğerleri (2013). Proteome of Human Stem Cells from Periodontal Ligament and Dental Pulp. *PLOS ONE*, 8(8), e71101.

Eslaminejad, B., Vahabi, S., Shariati, M. ve Nazarian, H. (2010). In vitro Growth and Characterization of Stem Cells from Human Dental Pulp of Deciduous Versus Permanent Teeth. *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences*, 7(4), 185-195.

Estrela, C., Alencar, A.H., Kitten, G.T., Vencio, E.F. ve Gava, E. (2011). Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Brazilian Dental Journal*, 22(2), 91-98.

Extavour, C. G. ve Akam, M. (2003). Mechanism of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*, 130(24), 5869-5884.

Farea, M., Husein, A., Halim, A.S., Berahim, Z., Nurul, A.A, Mokhtar, K.I. ve diğerleri (2016). Cementoblastic lineage formation in the cross-talk between stem cells of human exfoliated deciduous teeth and epithelial rests of Malassez cells. *Clinical Oral Investigations*, 20(6), 1181-1191.

Faust, O., Acharya, U.R., Sudarshan, V.K., Tan, R.S, Yeong, C.H., Molinari, F. ve diğerleri (2016). Computer aided diagnosis of Coronary Artery Disease, Myocardial Infarction and carotid atherosclerosis using ultrasound images: A review. *Physica Medica*, doi: 10.1016/j.ejmp.2016.12.005.

Fawzy El- Sayed, K.M., Dörfer, C., Fandrich, F., Gieseler, F., Moustafa, M.H. ve Ungefroren, H. (2012). Adult Mesenchymal Stem Cells Explored in the Dental Field. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 130, 89-103.

Feitosa, M.L., Fadel, L., Beltrao-Braga, P.C., Wenceslau, C.V., Kerkis, I., Kerkis, A. ve diğerleri (2010). Successfull transplant of mesenchymal stem

cells in induced osteonecrosis of the ovine femoral head. Preliminary results. *ACTA Cirurgica Brasileira*, 25(5), 416-422.

Feng, R. ve Lengner, C. (2012). Application of Stem Cell Technology in dental Regenerative Medicine. *Wound Healing Society*, 2(6), 296-305.

Ferroni, L., Gardin, C., Sivoilella, S., Brunello, G., Berengo, M., Piattelli, A. ve diğerleri. (2015). A Hyaluronan-Based Scaffold for the in Vitro Construction of Dental Pulp-Like Tissue. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 4666-4681.

Fliedner, T.M. (1998). Prologue to Characteristics and Potentials of Blood Stem Cells. *Stem Cells*, 16(1), 357-360.

Flores, M.G., Hasegawa, M., Yamato, M., Takagi, R., Okano, T. ve Ishikawa, I. (2008). Cementum-periodontal ligament complex regeneration using the cell sheet technique. *Journal of Periodontal Research*, 43, 364-371.

Flügge, T.V., Nelson, K., Schmelzeisen, R. ve Metzger, M.C. (2013). Three-Dimesional Plotting and Printing of an Implant Drilling Guide: Simplifying Guided Implant Surgery. *Journal of The Ameican Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 71(8), 1340-1306.

Fong, E.L., Lamhamedi-Cherradi, S.E., Burdett, E., Ramamoorthy, V., Lazar, A.J., Kasper, F.K. ve diğerleri (2013). Modeling Ewing sarcoma tumors in vitro with 3D sacffolds. *PNAS*, 110(16), 6500-6505.

Freshney, I.R., Stacy, G.N. ve Auerbach, J. M. (2007). *Culture of Human Stem Cells*. New Jersey: John Wiley & Sons Yayıncılık.

Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K. ve Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer culture of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*, 3, 393-403.

Friedenstein, A.J., Ivanov-Smolenski, A.A., Chajlakjan, R.K., Gorskaya, U.F., Kuralesova, A.I., Latzinik, N.W. ve diğerleri (1978). Origin of bone

marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants. *Experimental Hematology*, 6(5), 440-444.

Friedlander, L.T., Cullinan, M.P. ve Love, R.M. (2009). Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. *International Endodontic Journal*, 42, 955-962.

Fu, X., Jin, L., Ma, P., Fan, Z., Wang, S. (2014). Allogenic Stem Cells From Deciduous Teeth Mediated Treatment for Priodontitis in Miniature Swine. *Journal of Periodontology*, 85:845-851.

Galler, K.M., D' Souza, R.N., Hartgerink, J.D. ve Schmalz, G. (2011). Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Advances in Dental research*, 23(3), 333-339.

Gao, C., Meng, L., Yu, L., Simom, G.P., Liu, H., Chen, L. ve diğerleri (2015). Preparation and characterization of uniaxial poly (lactic acid) – based self – reinforced composites. *Composites in Science and Technology*, doi: 10.1016/j.compscitech.2015.07.006.

Gathani, K.M. ve Raghavendra, S.S. (2016). Scaffolds in regenerative endodontics: A review. *Dental Research Journal*, 13(5), 379-386.

George, T. ve Huang, J. (2012). Dental Pulp and Dentin Tissue Engineering and Regeneration- Advancement and Challenge. *National Institutes of Health*, 3, 788-800.

George, T., Yamaza, T., Shea, L.D., Djouad, F., Kuhn, N.Z., Tuan, R.S. ve diğerleri (2010). 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(2), 605-615.

Golub, J.S., Kim, Y.T., Duvall, C.L., Bellamkonda, R.V., Gupta, D., Lin, A.S. ve diğerleri (2010). Sustained VEGF delivery via PLGA nanoparticles

promotes vascular growth. *American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology*, 298(6), 1959-1965.

Gomes, J.A., Geraldes, M.B., Melo, G.B., Smith, R.L., Cavenaghi, S.M., Lizier, N.F. ve diğerleri. (2010). Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered Cell Sheets Composed of Human Immature Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(3), 1408-1414.

Gong, T., Heng, B.C., Man Lo, E.C., Zhang, C. (2016). Current Advance and Future prospects of Tissue Engineering Approach to Dentin / Pulp Regenerative Therapy. *Stem Cells International*, doi: 10.1155/2016/9204574.

Goomer, P., Sidhu, A.K., Tuli, P., Kansal, S., Bansal, K. ve Thakre, G.R. (2014). Awareness o Stem cells and Health Implications of SHED found in Padiatric Dentition among Indian Population. *Journal of International Oral Health*, 6(1), 44-47.

Govindasamy, V., Ronald, V.S., Abdullah, A.N., Nathan, K.R., Aziz, Z.A., Abdullah, M. ve diğerleri (2011). Differentiation of dental pulp stem cells into islet-like aggregates. *Journal of Dental Research*, 90(5), 646-652.

Graziano, A., Aquino, R., Laino, G. ve Papaccio, G. (2008). Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool for Bone Regeneration. *Stem Cell Reviews*, 4(1), 21-26.

Graziano, A., Aquino, R., Angelis, M.G., Francesco, F., Giordano, A., Laino, G. ve diğerleri (2008). Scaffold' s surface geometry significantly affects human stem cell bone tissue engineering. *Journal of Cellular Physiology*, 214, 166-172.

Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G. ve Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo.

Gronthos, S., Brahim, J., Fisher, L.W., Cheman, N., Boyde, A., Robey, P.G. ve diğerleri (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research*, 81(8), 531-535.

Proceedings of National Academy of Science of the United States of America (PNAS), 97(25), 13625-13630.

Guarino, V., Urciuolo, F., Alvarez-Perez, M.A., Mele, B., Netti, P.A. ve Ambrosio, L. (2012). Osteogenic differentiation and mineralization in fibre-reinforced tubular scaffolds: theoretical study and experimental evidences. *Journal of The Royal Society Interface*, 9(74), 2201-2212.

Gupta, B., Revagade, N. ve Hilborn, J. (2016). Poly (lactic acid) fiber: an overview. *Polymer Science* 32(4), 455-482.

Hajeer, M.Y., Millett, D.T., Ayoub, F. ve Siebert, J.P. (2004). Applications of 3D imaging in orthodontics: Part 1. *Journal of Orthodontics*, 31(1), 62-70.

Hattori, Y., Kim, H., Tsuobi, N., Yamamoto, A., Akiyama, S., Shi, S. ve diğerleri (2015). Therapeutic Potential of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth in Models of Acute Kidney Injury. *Plos ONE*, 10(10), e0140121.

Hermann, B.W. (1952). On the reaction of the dental pulp to vital amputation and calyx capping. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 7(24), 1446-1447 in Chandki, R., Kala, M., Banthia, P. ve Banthia, R. (2012). From stem to roots: Tissue engineering in endodontics. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 4(1), e66-71.

Hu, B., Nadiri, A., Bopp, S.K., Schmit, P.F., Peters, H. ve Lesot, H. (2006). Tissue Engineering of Tooth Crown, Root and Periodontium. *Tissue Engineering*, 12(8), 2069-2075.

Huang, G.T., Shagramanova, K. ve Chan, S.W. (2016). Formation of odontoblast – like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vivo. *Journal of Endodontics*, 32(11), 1066-1073.

Huang, G.T. (2008). A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: Conservation of stem cells for regeneration. *Journal of Dentistry*, 36, 379-386.

Huang, G.T. (2011). Dental Pulp and Dentin Tissue Engineering and Regeneration - Advancement and Challenge. *Frontiers in Bioscience*, 1(3), 788-800.

Huang, G.T., Gronthos, S. ve Shi, S. (2009) . Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *Journal of Dental Research*, 88(9), 792-806.

Hull, C.W. (1986) . Apparatus for Production of Three-Dimensional Objects by Stereolithography. *United States Patent* (4575330).

Hutmacher, D.W. (2013) . *Journal of Biomaterial Science*. Singapur: Polmer Yayıncılık.

Ikeda, E., Morita, R., Nakao, K., Ishida, K., Nakamura, T., Yamamoto, T.T. ve diğerleri (2009). Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *PNAS One*, 106(32), 13475-13480.

Inoue, T., Sugiyama, M., Hattri, H., Wakita, H., Wakabayashi, T. ve Ueda, M. (2013). Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Tooth-Derived Conditioned Medium Enhance recovery of Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Tissue Engineering: Part A*, 19 (1 ve 2), 24-29.

Iohara, K., Zheng, L., Wake, H., Ito, M., Nabekura, J., Wakita, H. ve diğerleri. (2008). A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: Subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells*, 26, 2408-2418.

Ishkitiev, N., Yaegaki, K., Imai, T., Tanaka, T., Nakahara, T., Ishikawa, H. ve diğeri (2012). High- purity hepatic lineage differentiated from dental pulp stem cells in serum- free media. *Journal of Endodontics*, 38(4), 475-480.

Jaberiansari, Z., Naderi, S. ve Tabatabaei, F.S. (2014). Cytotoxic Effects of Various Mineral Trioxide Aggregate Formulations, Calcium-Enriched Mixture and a New Cement on Human Pulp Stem Cells. *Iranian Endodontic Journal*, 9(4), 271-276.

Jamal, M., Chogle, S., Goodis, H. ve Karam, S.M. (2011). Dental Stem Cells and Their Potential Role in Regenerative Medicine. *Journal of Medical Sciences*, 4(2), 53-61.

Jeon, M., Song, J.S., Choi, B.J., Choi, H.J., Shin, D.M., Jung, H.S. ve diğeri (2014). In vitro and in vivo characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth obtained by enzymatic disaggregation and outgrowth. *Archives of Oral Biology*, 59, 1013-1023.

Jones, T.D., Kefi, A., Sun, S., Cho, M. ve Alapati, S.B. (2016). An Optimized Injectable Hydrogel Scaffold Supports Human Dental Pulp Stem Cell Viability and Spreading. *Advances in Medicine*, 2016, doi: 10.1155/2016/7363579.

Kabir, R., Gupta, M. ve Kola, M.Z. (2014). Imperative Role of Dental Pulp Stem Cells in Regenerative Therapies: A Systematic Review. *Nigerian Journal of Surgery*, 20(1), 1 – 8.

Kashyap, R. (2015). SHED- Basic Structure for Stem Cell Research. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(3), 7-9.

Kawamura, R., Hayashi, Y., Murakami, H. ve Nakashima, M. (2016). EDTA soluble chemical somponents and the conditioned medium from mobilized dental pulp stem cells contain an inductive microenviroment,

promoting cell proliferation, migration, and odontolastic differentiation. *Stem Cell Research and Therapy*, 7(77), doi:10.1186/s13287-016-0334-z.

Kelleher, C.M. ve Vacanti, J.P. (2010). Engineering extracellular matrix through nanotechnology. *Journal of The Royal Society, Interface*, 7, 717-729.

Kerkis, I. ve Caplan, A.I. (2012). Stem Cells in Dental Pulp of Deciduous Teeth. *Tissue Engineering: Part B Reviews*, 18(2), 129-138.

Kerkis, I., Ambrosio, C.E., Kerkis, A., Martins, D.S., Zucconi, E., Fonseca, S.A. ve diğerleri (2008). Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs : Local or systemic?. *Journal of Translational Medicine*, 6(35), 1-13.

Khojasteh, A., Motamedian, S.R., Rad, M.R., Shahriari, M.H. ve Nadjimi, N. (2015). Polymeric vs. hydroxiapatite- based scaffolds on dental pulp stem cell proliferation and differentiation. *World Journal of Stem Cells*, 7(10), 1215-1221.

Kim, S.G., Zhou, J., Solomon, C., Zheng Y., Suzuki, T., Chen, M. ve diğerleri (2012). Effects of growth factors on dental stem/ progenitor cells. *Dental Clinics of North America*, 56(3), 563-575.

Kitamura, M., Akamatsu, M., Machigashira, M., Hara, Y., Sakagami, R., Hirofuji, T. ve arkadaşları (2011). FGF – 2 stimulates periodontal regeneration: results of a multicenter randomized clinical trial. *Journal of Dental Research*, 90, 35-40.

Klein, O.D., Minowada, G., Peterkova, R., Kangas, A., Yu, B.D., Lesot, H. ve arkadaşları. (2006). Sprouty Genes Control Diastema Tooth Development via Bidirectional Antagonism of Epithelial-Mesenchymal FGF Signaling. *Developmental Cell*, 11(2), 181-90.

Korpela, J., Kokkari, A., Korhonen, H., Malin, M., Narhi, T. ve Seppela, J. (2013). Biodegradable and bioactive porous scaffold structures prepared using fusing deposition technique. *Journal of Biomedical Materials research B: Applied Biomaterials*, 101B(4), 610-619.

Kruth, J.P. (1991) . Material Inccress Manufacturing by Rapid Prototyping Technique. *Annals of the CIRP*, 40 (2), 603-614.

Kürkçü, B. (2010). Eksfoliye Süt Ve Gömülü Üçüncü Büyük Azı Dişlerinden İzole Edilen Kök HücrelerinKültivasyonu ve Karakterizasyonu. Doktora Tez Sunumu.

Langer, R. ve Vacanti, J.P. (1993). Tissue Engineering. *Science*, 260, 920-926.

Lavik, E. ve Langer, R. (2004). Tissue engineering: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechonology*, 65(1), 1-8.

Lazarus, H., Haynesworth, S., Gerson, S., Rosenthal, N. ve Caplan, I. (1992). Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplantation*, 16(4), 557-564.

Leong, W.K., Henshall, T.L., Arthur, A., Kremer, K.L., Lewis, M.D., Helps, S.C. ve diğerleri (2012). Human adult dental pulp stem cells enhance poststroke functional recovery through non-neural replacement mechanisms. *Stem Cells Translational Medicine*, 1(3), 177-187.

Li, D., Deng, T., Li, H. ve Li, Y. (2015). MiR-143 and miR-135 inhibitors treatment induces skeletal myogenic differentiation of human adult dental pulp stem cells. *Archives of Oral Biology*, 60(11), 1613-1617.

Li, H., Chen, S., Peng, X., Sun, J., Shu, C., Jiang, L. ve diğerleri (2016). Fabrication of C₆₀ Tri-Diethyl Malonate Membrane via an Electrospinning

Method and Its Antibacterial Property. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(3), 2504-2508.

Li, Y., Shu, L.Y., Yan, M., Dai, W.Y., Li, J.J., Zhang, G.D. ve diğerleri. (2014). Adult stem cell-based apexogenesis. *World Journal of Methodology*, 4(2), 99-108.

Lim, H.C., Nam, O.H., Kim, M.J., El-fiqi, A., Yun, H.M., Lee, Y.M. ve diğerleri (2016). Delivery of dexamethasone from bioactive nanofiber matrices stimulates odontogenesis of human dental pulp cells through integrin/BMP/mTOR signaling pathways. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 2557-2567.

Lovelace, T.W., Henry, M.A., Hargreaves, K.M. ve Diogenes, A. (2011). Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *Journal of Endodontics*, 37(2), 133-138.

Luan, X., Ito, Y., Dangaria, S. ve Diekwisch, T.G. (2006) . Dental Follicle Progenitor Cell Heterogeneity in The Developing Mouse Periodontium. *Stem Cells and Development*, 15, 595-608.

Luddin, N., Ching, H.S., Ponnuraj, K.T. ve Rahman, A.I. (2016). Expression of Odontogenic and Osteogenic Markers in DPSCs and SHED: A Review. *Current Stem Cell Research and Therapy*, 12(1), 71-79.

Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R., McKay, R. ve diğerleri (2001). Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*, 292, 1389-1394.

Ma, L., Makino, Y., Yamaza, H., Akiyama, K., Hoshino, Y., Song, G. ve diğerleri (2012). Cryopreserved Dental Pulp Tissues of Exfoliated Deciduous Teeth Is a Feasible Stem Cell Resource for Regenerative Medicine. *PLOS One*, 7(12), e51777.

Ma, P.X. (2008). Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(2), 184-198.

Mao, J.J. ve Collins, F.M. (2011). *Stem Cells: Sources, therapies and dental professional*. New Jersey: Pennwell Yayıncılık.

Mao, J.J., Giannobile, W.V., Helms, J.A., Hollister, S.J., Krebsbach, P.H., Longaker, M.T. ve diğerleri (2006). Craniofacial tissue engineering of stem cells. *Journal of Dental Research*, 85(11), 966-979.

Mao, X., Liu, Y., Chen, C. ve Shi, S. (2017). Mesenchymal Stem Cells and Their Role in Dental Medicine. *Dental Clinics of North America*, 61(1), 161-172.

Maraldi, T., Riccio, M., Pisciotto, A., Zavatti, M., Carnevale, G., Beretti, F. ve diğerleri (2013). Human amniotic fluid- derived and dental pulp-derived repair critical- size bone defects promoting vascularization. *Stem Cell Research and Therapy*, 4(3): 53, doi: 10.1186/scrt203.

Martens, W., Bronckaers, A., Politis, C., Jacobs, R. ve Lambrichts, I. (2013). Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: an update. *Clinical Oral Investigations*, 17(9), 1969-1983.

Mi, H.Y., Salick, M.R., Jing, X., Jacques, B.R., Crone, W.C., Peng, F. ve diğerleri (2013). Characterization of thermoplastic polyurethane/ polylactic acid (TPU/ PLA) tissue engineering scaffolds fabricated by microcellular injection molding. *Materials Science and Engineering- C, Materials for Biological Applications*, 33(8), 4767-4776.

Mita, T., Furukawa-Hibi, Y., Takeuchi, H., Hattori, H., Yamada, K., Hibi, H. ve diğerleri (2015). Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer' s disease. *Behavioural Brain Research*, 293, 189 -197.

Mitsiadis, T.A., Orsini, G. ve Jimenez – Rojo, L. (2015). Stem cell-based approaches in dentistry. *European Cells and Materials*, 30, 248-257.

Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G. ve diğerleri (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS*, 100(10), 5807-5812.

Monteiro, N. ve Yelick, P.M. (2016). Advances and perspectives in tooth tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, doi: 10.1002/term.2134.

Morsczeck, C., Moehl, C., Götz, W., Heredia, A., Schaffer, T.E., Eckstein, N. ve diğerleri (2005). In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biology International*, 29 (7), 567-575.

Morsczeck, C., Götz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kühn, U., Möhl, C. ve diğerleri (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biology*, 24, 155-165.

Murphy, S.V. ve Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 32(8), 773-785.

Murray, P.E., Godoy, F.G. ve Hargreaves, K.M. (2007). Regenerative endodontics: A review of current status and a call for action. *Regenerative Endodontics*, 33(4), 377-390.

Myers, W.C. ve Fountain, S.B. (1974). Dental pulp regeneration aided by blood and blood substitutes after experimentally induced periapical infection. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, 37, 441-450.

Naddeo, P., Laino, L., La - Noce, M., Piattelli, A., De - Rosa, A., Lezzi, g. et al. (2015). Surface biocompatibility of differently textured titanium implants with mesenchymal stem cells. *Dental Materials*, 31(3), 235-243.

Nagatomo, K., Komaki, M., Sekiya, I., Sakaguchi, Y., Noguchi, K., Oda, S. (2006) . Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research*, 41, 303-310.

Nakamura, S., Yamada, Y., Katagiri, W., Sugito, T., Ito, K. ve Ueda, M. (2009). "Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp". *Journal of Endodontics*, 35(11), 1536-1542.

Nakamura, M., Iwanaga, S., Henmi, C., Arai, K. ve Nishiyama, Y. (2010) . Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication. *IOP Science Biofabrication* 2, 2 (1), 014110 (1-6).

Nakao, K. ve Tsuji, T. (2008). Dental regenerative therapy: Stem cell transplantation and bioengineered tooth replacement. *Japanese Dental Science Review*, 44, 70-75.

Neel, E.A.A., Wojciech, C., Salih,V.M., Kim, H.W. ve Knowles, J.C.(2014). Tissue engineering in dentistry. *Journal of Dentistry*, 42, 915-928.

Nemoto, E., Sakisaka, Y., Tsuchiya, M., Tamura, M., Nakamura, T., Kanaya, S. ve diğerleri (2016). Wnt3a signaling induces murine dental follicle cells to differentiate into cementoblastic/osteoblastic cells via an osterix-dependent pathway. *Journal of Periodontal Research*, 51(2), 164-174.

Ni, P.Y., Fu, S.Z., Fan, M., Guo, G., Shi, S., Peng, J.R. ve diğerleri (2011). Preparation of polu (ethylene glycol) / polylactide hybrid fibrous scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 3065-3075.

Noce, M.L., Paino, F., Spina, A., Naddeo, P., Montella, R., Desidero, V. ve diğerleri. (2014). Dental pulp stem cells: State of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *Journal of Dentistry*, 42, 761-768.

Noort, R.V. (2012). The future of dental device is digital. *Dental Materials*, 28(1), 3-12.

Nourbakhsh, N., Soleimani, M., Taghipour, Z., Karbalaie, K., Mousavi, S.B., Talebi, A. ve diğerleri (2011). Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth- derived stem cells. *The International Journal of Developmental Biology*, 55, 189-195.

Nuti, N., Corallo, C., Chan, B.M., Ferrari, M. ve Gerami-Naini, B. (2016). Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Reviews*, 12(5), 511-523.

Obregon, F., Vaquette, C., Ivanoski, S., Hutmacher, D.W. ve Bertassoni, L. E. (2015). Three-Dimensional Bioprinting for Regenerative Dentistry and Craniofacial Tissue Engineering. *Journal of Dental Research*, 94(9), 143s-152s.

Ostby, B.N. (1961) . The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontologica Scandinavica*, 19,324-353.

Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. *Journal of Cell Science*, 10, 63-76.

Parekkadan, B. ve Milwid, J.M. (2010). Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 15(12), 87-117.

Park, B.W., Kang, E.J., Byun, J.H., Song, M.G., Kim, H.J., Hah, Y.S. ve diğerleri (2012). In vitro and in vivo osteogenesis of human mesenchymal stem cells derived from skin, bone marrow and dental follicle tissues. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 83(5), 249-259.

Park, J.C., Kim, J.M., Jung, I.H., Kim, J.C., Choi,, S.H., Cho, K.S. ve diğerleri (2011). Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *Journal of Clinical Periodontology*, 38, 721-731.

Pihlstrom, B.L., Michalowicz, B.S. ve Johnson, N.W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet*, 366(19), 1809-1820.

Pilipchuk, S.P., Plonka, A.B., Monje, A., Taut, A.D., Lanis, A., Kang, B. et al. (2015). Tissue engineering for bone regeneration and osteointegration in the oral cavity. *Dental Materials*, 31, 317-338.

Pisciotta, A., Carnevale, G., Meloni, S., Riccio, M., Biasi, S.D., Gibellini, L. ve diğeri. (2015). Human Dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. *BMC Developmental Biology*, 15(14), 12861-015-0065-x.

Piva, E., Silva, A.F. ve Nör, J.E. (2014). Functionalized scaffolds to control dental pulp stem cell fate. *Journal of Endodontics*, 40(40), 33-40.

Poggio, C., Beltrami, R., Colombo, M., Ceci, M., Dagna, A. ve Chlesa, M. (2015). In vitro antibacterial activity of different pulp capping materials. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 7(5), 584-8.

Polejaeva, I. ve Mitalipov, S. (2013). Stem cell potency and the ability to contribute to chimeric organisms. *The Journal of the Society for Reproduction and Fertility*, 145(3), 81-88.

Ponnaiyan, D. (2014). Do dental stem cells depict distinct characteristics? — Establishing their “phenotypic fingerprint”. *Dental Research Journal*, 11(2), 163-172.

Prescott, R.S., Alsanea, R., Fayad, M.I., Johnson, B.R. ve Wenckus, C.S. (2008). In- vivo Generation of Dental Pulp- Like Tissue Using Human Pulpal Stem Cells, a Collagen Scaffold and Dentin Matrix Protein 1 Following Subcutaneous Transplantation in Mice. *Journal of Endodontics*, 34(4), 421-426.

Rad, R.M., Wise, G.E., Brooks, H., Flanagan, M.B. ve Yao, S. (2013). Activation of proliferation and differentiation of dental follicle stem cells (DFSCs) by heat stress. *Cell Proliferation*, 46, 58-66.

Rai, S., Kaur, M. ve Kaur, S. (2013). Applications of Stem Cells in interdisciplinary Dentistry and Beyond: An Overview. *Annals of Medical and Health Sciences Research*, 3(2), 245-254.

Ramalho-Santos, M. ve Willenbring, H. (2007). On the origin of the term ' stem cell '. *Cell Stem Cell*, 1(1), 35-38.

Ranganathan, K. ve Lakshminarayanan, V. (2012). Stem Cells of The Dental Pulp. *Indian Journal of Dental Research*, 23, 558.

Ravindran, S. ve George, A. (2015). Biomimetic extracellular matrix mediated somatic stem cell differentiation: applications in dental pulp tissue regeneration. *Frontiers in Physiology*, 6 (118), 1-9.

Ravindran, S., Huang, C.C. ve George, A. (2014). Exrtacellular matrix of dental pulp stem cells: applications in pulp tissue engineering using somatic MSCs. *Frontiers in Physiology*, 6(4), 1-11.

Rimondi, L. ve Mele, S. (2009) . Stem cell technologies for tissue regeneration in dentistry. *Minerva Stomatologica*, 58(10), 483-499.

Rivera, F.J. ve Aigner, L. (2012). Adult mesenchymal stem cell therapy for myelin repair in Multiple Sclerosis. *Biological Research*, 45(3), 257-268.

Roopa, N.R. (2009). Stem cell therapy- Hype or Hope? A review. *Journal of Conservative Dentistry*, 12(4), 131-8.

Roosgear, M.A., Mohammadi, T.M., Havasian, M.R., Panahi, J., Hashemian, A., Amraei, M. ve diğ erleri (2015) . In vitro Osteogenic impulse effect of Dexamethasone on peridodontal ligament stem cells. *Biomedical Informatics*, 11(2), 96-100.

Rosa, V. (2013). What and where are the stem cells for Dentistry?. *Singapore Dental Journal*, 34, 13-18.

Rosa, V., Dubey, N., Islam, I., Min, K.S. ve Nör, J.E. (2013). Pluripotency of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth for Tissue Engineering. *Stem Cells International*, 2016, doi: [10.1155/2016/5957806](https://doi.org/10.1155/2016/5957806).

Rosenzweig, D.H., Carelli, E., Steffen, T., Jarzem, P. ve Haglund, L. (2015). 3D-Printed ABS and PLA Scaffolds for Cartilage and Nucleus Pulposus Tissue Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15118-15135.

Rossi, D.J., Bryder, D., Seita, J., Nussenzweig, A., Hoeijmakers, J. ve Weissman, I.L. (2007). Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*, 447, 725-730.

Saito, M.T., Silverio, K.G., Casati, M.Z., Enilson, A.S. ve Nociti, F.H. (2015). Tooth- derived stem cells: Update and perspectives. *World Journal of Stem Cells*, 7(2), 399-407.

Sakai, K., Yamamoto, A., Matsubara, K., Nakamura, S., Naruse, M., Yamagata, M. ve diğerleri (2012). Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(1), 80-90.

Sakai, V.T., Zhang, Z., Dong, Z., Neiva, K.G., Machado, M.A.A.M, Shi, S., Santos, C.F., Nör, J.E. (2010). SHED Differentiate into Functional Odontoblasts and Endothelium. *Journal of Dental Research*, 89(8): 791-796.

Santos, M.R. ve Willenbring, H. (2007). On the Origin of the Term 'Stem Cell'. *Cell Stem Cell*, 1, 35-38.

Scheller, E.L., Krebsbachs, P.H. ve Kohn, D.H. (2009). Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *Journal of Oral Rehabilitation*, 36 (5), 368-389.

Schneider, R., Holland, R.G., Chiego, D., Hu- Jan, C.C., Nör, J.E. ve Botero, T.M. (2014). White Mineral Trioxide Aggregate Induces Migration and Proliferation of Stem Cells from the Apical Papilla. *Journal of Endodontics*, 40(7), 931-936.

Sedgley, C.M. ve Botero, T.M. (2012). Dental Stem Cells and Their Sources. *Dental Clinics of North America*, 56(3), 549-561.

Seleznev, V.A. ve Prinz, V.Y. (2016). Hybrid 3D-2D printing methods for bone scaffolds fabrication. *Nanotechnology*, doi: 10.1088/1361-6528/aa536f.

Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahimi, J. ve diğeri (2004) . Investigations of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364, 149-155.

Serra, T., Mateos-Timoneda, M.A., Planell, J.A. ve Navarro, M. (2013) . 3D printed PLA- based scaffolds. *Landes Bioscience*, 9(4), 239-244.

Sharma, S., Sikri, V., Sharma, N.K. ve Sharma, V.M. (2010). Regeneration of tooth pulp and dentin: trends and advances. *Annals of Neuroscience*, 17(1), 31-43.

Shekar, R. ve Ranganathan, K. (2012). Phenotypic and growth characterization of human mesenchymal stem cells cultured from permanent and deciduous teeth. *Indian Journal of Dental Research*, 23(6), 838-839.

Shi, S., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G. ve arkadaşları. (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America (PNAS)*, 100(10), 5807-5812.

Shi, S., Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S. ve arkadaşları. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429), 149-155.

Shiehzhadeh, V., Aghmasheh, F., Shiehzhadeh, F., Joulae, M., Kosarieh, E. ve Shiehzhadeh, F. (2014) . Healing of large periapical lesions following delivery of dental stem cells with an injectable scaffold: New method and three case reports. *Indian Journal of Dental Research*, 25(2), 248-253.

Shilpa, P.S., Kaul, R., Sultana, N. ve Bhat, S. (2013). Stem cells: Boon to dentistry and medicine. *Dental Research Journal*, 10(2), 149-154.

Shqaidef, A., Ayoub, A.F. ve Khambay, B.S. (2014). How accurate are rapid prototyped (RP) final orthognathic surgical wafers? A pilot study. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 52, 609-614.

Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B.M., Zhang, C., ve arkadaşları. (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLOS One*, 20(1), e79.

Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R.S., Wang, S., Shi, S. ve diğerleri (2008). Characterization of The Apical papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study. *Journal of Endodontics*, 34 (2), 166-171.

Sowmya, S., Chennazhi, K.P., Arzate, H., Jayachandran, P., Nair, S.V. ve Jayakumar, R. (2015). Periodontal Specific Differentiation of Dental Follicle Stem Cells into Osteoblast, Fibroblast, and Cementoblast. *Tissue Engineering: Part C, Methods*, 21(10), 1044-1058.

Su, W.T., Wu, P.S., Ko, C.S. ve Huang, T.Y. (2014). Osteogenic differentiation and mineralization of human exfoliated deciduous teeth stem cells on modified chitosan scaffold. *Materials Science and Engineering C*, 1(41), 152-160.

Su, W.T., Chou, W.L. ve Chou, C.M. (2015). Osteoblastic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth induced

by thermosensitive hydrogels with strontium phosphate. *Material Science and Engineering C, Materials for Biological Applications*, 52, 46-53.

Suchanek, J., Soukup, T., Ivancakova, R., Karbanova, J., Hubkova, V., Pytlik, R. ve diğ erleri. (2007). Human Dental Pulp Stem Cells – Isolation and Long Term Cultivation. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 50(3), 195-201.

Tajbakhsh, S. ve Hajiali, F. (2016). A comprehensive study on the fabrication and properties of biocomposites of poly (lactic acid) / ceramics for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering*, 1(70), 897-912.

Takatalo, M.S., Tummers, M., Thesleff, I. ve Rönholm, R. (2009). Novel Golgi protein, GoPro49, is a specific dental follicle marker. *Journal of Dental Research*, 88(6), 534-538.

Tatullo, M., Marrelli, M. ve Paduano, F. (2015). The Regenerative medicine in Oral and Maxillofacial Surgery: The Most Important Innovations in the Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Medical sciences*, 12(1), 72-77.

Tatullo, M., Marrelli, M., Shakesheff, K.M. ve White, L.J. (2015). Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(11), 1205-16.

Tecles, O., Laurent, P., Aubut, V. ve Abaut, I. (2008). Human tooth culture: a study model for reparative dentinogenesis and direct pulp capping materials biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 85, 180-187.

Telles, P.D., Machado, M.A., Sakai, V.T. ve Nör, J.E. (2011). Pulp tissue from primary teeth: new source of stem cells. *Journal of Applied Oral Science*, 19(3), 189-194.

Thermo Scientific (2009). *Avidin-Biotin Technical Handbook*. United States: Thermo Scientific Yayıncılık.

Thesleff, I. ve Tummers, M. (2009). Tooth organogenesis and regeneration. Cambridge: Harvard Stem Cell Institute.

Tiejun, Q., Jing, J., Jiang, Y., Taylor, R.J., Feng, J.Q., Geiger, B. ve diğerleri (2014). Magnesium-Containing Nanostructured Hybrid Scaffolds for Enhanced Dentin Regeneration. *Tissue Engineering: Part A*, 20(17), 2422-2432.

Tim, L.T., Auras, R. ve Rubino, M. (2008). Processing technologies for poly (lactic acid). *Progress in Polymer Science*, 33, 820-852.

Vacanti, J.P. (1988). Beyond transplantation. Third annual Samuel Jason Mixter lecture. *Archives of Surgery*, 123(5), 545-549.

Vacanti, C.A. (2006). The history of tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(3), 569- 576.

Verma, K., Bains, R., Bains, V.K., Rawtiya, M., Loomba, K. ve Srivastava, S.C. (2014). Therapeutic potential of dental pulp stem cells in regenerative medicine: An overview. *Dental Research Journal*, 11(3), 302-8.

Vianna, P., Alves, F.B.T., Ayub, C.L.S., Soares, M.A.M. ve Gomes, J.R. (2013). Human Immature Dental Pulp Stem Cells (hIDPSCs), Their Application to Cell Therapy and Bioengineering: An Analysis by Systematic Revision of the Last Decade of Literature. *The Anatomical Record*, 296(12), 1923-1928.

Vinatier, C., Gauthier, O., Fatimi, A., Merceron, C., Masson, M., Moreau, A. ve diğerleri (2009). An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(4), 1259-1267.

Wang, J., Wang, X., Sun, Z., Wang, S., Yang, H., Shi, S. ve diğerleri (2010). Stem Cells from Human-Exfoliated Deciduous Teeth Can

Differentiate into Dopaminergic Neuron-Like Cells. *Stem Cells and Development*, 19(9), 1375-1383.

Wang, J., Wang, X., Sun, Z., Wang, S., Yang, H., Shi, S. ve diğerleri (2010). Stem Cells from Human-Exfoliated Deciduous Teeth Can Differentiate into Dopaminergic Neuron-Like Cells. *Stem Cells and Development*, 19(9): 1375-1383.

Wang, J., Zhang, W., Zhang, W., Huang, E., Wang, N., Wu, N. ve diğerleri (2014). Vone morphogenetic protein-9 effectively induces osteo/odontoblastic differentiation of the reversibly immortalized stem cells of dental apical papilla. *Stem Cells and Development*, 23(12), 1405-1416.

Wang, X., Sha X.J., Li, G.H., Yang, F.S., Ji, K., Wen, L.Y. ve diğerleri (2012). Comparative characterization of stem cells from human exfoliated teeth and dental pulp stem cells. *Archives of Oral Biology*, 57, 1231-1240.

Winder, J. ve Bibb, R. (2005). Medical Rapid Prototyping Technologies: State of The Art and Current Limitations for Application in Oral and Maxillofacial Surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 63(7), 1006-1015.

Windisch, P., Stavropoulos, A., Molnar, B., Szendroi – Kiss, D., Szilagyi, E., Rosta, P. ve arkadaşları (2012). A phase IIa randomized controlled pilot study evaluating the safety and clinical outcomes following the use of rhGDF – 5/ beta – TCP in regenerative periodontal therapy. *Clinical Oral Investigations*, 16, 1181-1189.

Wu, J., Huang, G.T., He, W., Wang, P., Tong, Z., Jia, Q. ve diğerleri (2012). Basic Fibroblast Growth Factor Enhancesstemness of Human Stem Cells from the Apical Papilla. *Journal of Endodontics*, 38(5), 614-622.

Xiao, L. ve Nasu, M. (2014). From regenerative dentistry to regenerative medicine: progress, challenges, and potential applications of oral stem cells. *Stem Cells and Cloning*, 4(7), 89-99.

Yadav, P., Tahir, M., Yadav, H., Sureka, R. ve Garg, A. (2016). Test Tube Tooth: The Next Big Thing. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(6), ZE01-ZE03.

Yamaguchi, S., Shibata, R., Yamamoto, N., Nishikawa, M., Hibi, H., Tanigawa, T. ve diğeri (2015). Dental-pulp derives stem cell conditioned medium reduces cardiac injury following ischemia-reperfusion. *Scientific Reports*, 5, doi: 10.1038/srep16295.

Yamaza, T., Akiyama, K., Chen, C., Liu, Y., Shi, Y., Gronthos, S. ve diğeri (2010). Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cells Research and Therapy*, 1(5), DOI: 10.1186/scrt5.

Yan, X., Qin, H., Qu, C., Tuan, R.s., Shi, S. ve Huang, J. (2010). iPS Cells Reprogrammed From Human Mesenchymal-Like Stem/ Progenitor Cells of Dental Tissue Origin. *Stem Cells and Development*, 19(4), 469-480.

Yang, R., Chen, M., Lee, C.H., Yoon, R., Lal, S., Mao, J.J. ve diğeri. (2010). Clones of ectopic stem cells in the regeneration of muscle defects in vivo. *PLOS One*, 5(10), e13547.

Yao, S., Pan, F., Prpic, V. ve Wise, G.E. (2008). Differentiation of stem cells in the dental follicle. *Journal of Dental Research*, 87(8), 767-771.

Yıldırım, S., Alaçam, A., Sarıtaş, Z.K. ve Oygür, T. (2007). In vivo Effect of Calcium Phosphate Biomaterials on Dog dental Pulp. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 21(2), 198-204.

Yıldırım, S., Fu, S.Y., Kim, K., Zhou, H., Lee, C.H., Li, A. ve diğerleri (2011). Tooth regeneration: a revolution in stomatology and evolution in regenerative medicine. *International Journal of Oral Science*, 3, 107-116.

Yıldırım, S. (2012). *Induced Pluripotent Stem Cells*. USA: Springer.

Yong, R.A. (2011). Control the embryonic stem cell state. *Cell*, 144(6), 940-954.

Younes, S.F. ve Bakry, O.A. (2016). Immunohistochemical Evaluation of Role of Serotonin in Pathogenesis of Psoriasis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(10), EC05-EC09.

Yu, G., Wang, J., Lin, X., Diao, S., Cao, Y., Dong, R. ve diğerleri (2016). Demethylation of SFRP2 by histone demethylase KDM2A regulated osteo-/dentinogenic differentiation of stem cells of the apical papilla. *Cell Proliferation*, 49(3), 330-340.

Yu, S., Diao, S., Wang, J., Ding, G., Yang, D. ve Fan, Z. (2014). Comparative Analysis of Proliferation and Differentiation Potentials of Stem Cells from Inflamed Pulp of Deciduous Teeth and Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth. *BioMed Research International*, 2014, 1-12.

Yun, P.Y. (2015). The application of three dimensional printing techniques in the field of oral and maxillofacial surgery. *Journal of Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 41 (4), 169-170.

Zakir Hossain, K.M., Zhu, C., Felfel, R.M., Sharmin, N. ve Ahmed, I. (2015). Tubular Scaffold with Shape Recovery Effect for Cell Guide Applications. *Journal of Functional Biomaterials*, 6(3), 564-584.

Zavan, B., Inamoto, K., Nagamatsu, K., Hara, A., Nakata, K., Morita, I. ve diğerleri (2011). *Dental pulp stem cells and tissue engineering strategies for clinical application on odontoiatric field*. İtalya: Intech Yayıncılık.

Zhang, J., Lu, X., Feng, G., Gu, Z., Sun, Y., Bao, G. (2016). Chitosan scaffolds induce human dental pulp stem cells to neural differentiation: potential roles for spinal cord injury therapy. *Cell and Tissue Research*, 366(1), 129-142.

Zhang, N., Chen, B., Wang, W., Chen, C., Kang, J., Deng, S.Q. ve diğerleri (2016). Isolation, characterization and multi-lineage differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Molecular Medicine Reports*, 14(1): 95-102.

Zhang, Q., Shi, S., Liu, Y., Uyanne, J., Shi, Y., Shi, S. ve diğerleri (2009). Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *Journal of Immunology*, 183(12), 7787-7798.

Zhang, W., Walboomers, X.F., Shi, S., Fan, M. ve Jansen, J.A. (2006). Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Engineering*, 12(10):2813-23.

Zhang, W., Walboomers, X.F., Van Kuppevelt, T.H., Daamen, W.F., Van Damme, P.A., Bian, Z. ve diğerleri (2008). In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(2-3), 117-125.

Zhang, W., Zhang, X., Ling, J., Liu, W., Zhang, X., Ma, J. ve diğerleri (2014). Proliferation and odontogenic differentiation of BMP2 gene-transfected stem cells from human tooth apical papilla: An in vitro study. *International Journal of Molecular Medicine*, 34, 1004-1012.

Zheng, Y., Liu, Y., Zhang, C.M., Zhang, H.Y., Li, W.H., Shi, A.D. ve diğerleri (2009). Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defects in swine. *Journal of Dental Research*, 88(3), 249-254.

Zheng, Y., Wang, X.Y., Wang, Y.M., Liu, X.Y., Zhang, C.M., Hou, X.B. ve diğeri (2012). Dentin regeneration using deciduous pulp stem/progenitor cells. *Journal of Dental Research*, 91, 676-682.

Zopf, D.A., Hollister, S.J., Nelson, M.E., Ohye, R.G. ve Green, G.E. (2013). Bioresorbable Airway Splint Created with a Three- Dimensional Printer. *The New England Journal of Medicine*, 368(21), 2043-2045.

EKLER

Ek 1 - Etik kurul Kararı



Ek: 344-2015

YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME ETİK KURULU

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 17.12.2015
Toplantı No : 2015/34
Proje No : 243

Yakın Doğu Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Serap Çetiner'in sorumlu araştırmacısı olduğu, YDU/2015/34-243 proje numaralı ve "Eksfoliasyon Zamanı Gelmiş Süt Dişlerinden Elde Edilen Kök Hücrelerin; Kültivasyonu, Karakterizasyonu, Osteojenik Diferansiyasyonu ve Üç boyutlu Baskı Yöntemi (3D Printing) ile sağlanan Poli Laktik Asit (PLA) İskelelerinde Karşılaştırılmalı Analizleri" başlıklı proje önerisi kurulumuzca değerlendirilmiş olup, etik olarak uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Rüştü Onur

(BAŞKAN)

2. Prof. Dr. Tümay Sözen

(ÜYE)

3. Prof. Dr. Nerin Bahçeciler Önder

(ÜYE)

4. Prof. Dr. Tamer Yılmaz

(ÜYE)

5. Prof. Dr. Hasan Besim

(ÜYE)

6. Prof. Dr. Şahan Saygı

(ÜYE)

7. Prof. Dr. Şanda Çalı

(ÜYE)

8. Doç. Dr. Ümran Dal

(ÜYE)

9. Doç. Dr. Çetin Lütfi Baydar

(ÜYE)

10. Yrd. Doç. Dr. Emil Mammadov

(ÜYE)

YAYINLAR

1.Uluslararası hakemli dergilerdeki (SSCI/SCI/SCI-Expanded ve Google Scholar) yayınlar

İslam, A., Güvenir, M., Süer, K., Çetiner, S. ve Şanlıdağ, T. (2016). Comparing efficiency between a conventional and a molecular method for the detection of *Legionella pneumophila* in dental unit waterline systems. *Polish Journal of Enviromental Studies* (Article in Press).

İslam, A., Mammadov, E., Kendirci, R., Aytaç, E., Vatansever, H.S., Çetiner, S., (2017). In vitro cultivation, characterization and osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduoud teeth on 3D pribted polylactic acid scaffolds. *Biotechnic and Histochemistry* (2nd Revision).

İslam, A.,Korun, S., Tunç, H. and Çetiner, S. (2015) Bleaching of Traumatized, Discolored Anterior Tooth Using Walking Bleach Technique. 25th Congress of the *International Association of Paediatric Dentistry*, Glasgow, UK .

2.Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Korun, S., Ozkan, L., **İslam, A.**, Oge, O. ve Sakar, T. (2014). Oral Health Survey of 5 and 12 years old School Children in Northern Cyprus. 12th Congress of The European Academy of Paediatric Dentistry, Sopot , Poland.

Özkem, A.Ö, Özkan, L., Korun, S., **İslam,A.**, Tunç, H. ve Çetiner, S. (2015). Prevalence of dental developmental anomalies: a radiographic study. 25th Congress of the International Association of Paediatric Dentistry, Glasgow, UK.

KORUN,S., **İSLAM, A.**, SAVTEKİN,G., ÖGE,Ö.ve ÇETİNER, S.(2015).Delayed Permanent Tooth Eruption due to the Previous Trauma and Treatment Procedure. 25th Congress of the International Association of Paediatric Dentistry, Glasgow, UK.

3. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

İslam, A., Güvenir, M., Süer, K., Çetiner, S. ve Şanlıdağ, T. (2016). Comparing efficiency between a conventional and a molecular method for the detection of Legionella pneumophila in dental unit waterline systems. 23. Türk Pedodonti Derneği Kongresi. Yunanistan. (Sözlü Sunum)

İslam, A., Korun, S. ve Çetiner, S.(2015). Pulpa Nekrozu Gelişmiş ve Olgunlaşmamış Daimi Dişin Revaskülarizasyonu. 22. Türk Pedodonti Derneği Kongresi, Girne, KKTC.

Korun, S., **İslam, A.**, Güldüren, K. ve Çetiner S. (2015). Meziodens kaynaklı diş sürmesinde gecikme ve tedavi yaklaşımı. 22. Türk Pedodonti Derneği Kongresi. Girne, KKTC .

Özkan, L., Korun, S., **İslam, A.**, Öge, Ö. Ve Tunç, H. (2015). Kıbrıslı Türk Hastalarda Hipodonti Görülme Sıklığı ve Paterni. 22. Türk Pedodonti Derneği Kongresi. Girne, KKTC.