

MAKSİLLOFASİYAL DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMLARI:

KEMİK REJENERASYONUNDA
DENTAL FOLİKÜL VE PULPA KÖK
HÜCRELERİNİN POLİKAPROLAKTON
İSKELELERDEKİ PERFORMANSI

Yazar
ELİF ÖZCAN



BİDGE Yayınları

MAKSİLLOFASİYAL DOKU MÜHENDİSLİĞİ
YAKLAŞIMLARI: KEMİK REJENERASYONUNDA DENTAL
FOLİKÜL VE PULPA KÖK HÜCRELERİNİN
POLİKAPROLAKTON İSKELELERDEKİ PERFORMANSI

Yazar: ELİF ÖZCAN

ISBN: 978-625-372-842-7

1. Baskı

Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL

Yayınlama Tarihi: 18.11.2025

BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374

Yayın hakları © BİDGE Yayınları

www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com

Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.

Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya /
Ankara



İçindekiler

Giriş.....	4
Genel Bilgiler.....	13
Kemik Dokusunun Yapısal Özellikleri.....	13
Kemik Doku Defektlerinde Tedavi Yaklaşımları	21
Doku Mühendisliğinde Kullanılan Polimerler	25
Polikaprolakton (PCL)	26
Kollajen ve Biyolojik Önemi	29
Doku İskeleleri ve Fabrikasyon Metodları.....	31
Kök Hücreler.....	35
Dental Folikül Kaynaklı Kök Hücreler (DFSC)	42
Dental Pulpa Kaynaklı Kök Hücreler (DPSC).....	46
Pcl Doku İskeleleri İle Kültüre Edilen Dental Folikül Kök Hücreleri Ve Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Osteojenik Etkilerinin Translasyonel Kemik Doku Mühendisliği Protokolü İle Karşılaştırılması	51
Gereç Ve Yöntem	51
Bulgular.....	60
Tartışma Ve Sonuç.....	70
Bilgilendirme	83
REFERANSLAR	84

Giriş

Günümüzde kemik dokusu defektlerinin onarılması için otolog, allojenik, ksenojenik, alloplastik ve sentetik birçok farklı malzeme kullanılmaktadır. Bu alandaki araştırmaların temel sorularından biri, kemik dokusunun en iyi kalitede onarımını ve vaskülarizasyonunu sağlayabilmektir. Otolog kemik greftleri kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda altın standart olarak kabul edilse de, literatürde büyük defektlerin rekonstrüksiyonunda başarısızlık örnekleri yer almaktadır. Maksillofasiyal kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu her zaman klinik bir zorluk teşkil eder. Yatay ve dikey boyutlarda alveolar kemik eksikliklerinin en yaygın nedeni, diş kaybına bağlı olarak meydana gelen kret remodelasyonudur. Diğer bir sorun ise, maksiller sinüslerin pnömatizasyonu nedeniyle komplike hale gelen maksiller alveolar kemiğin posterior bölgesidir. Ayrıca, travma, radyasyon veya farmakolojik ajanlarla ilişkili osteonekroz, veya tümör rezeksiyonu sonucu ortaya çıkan daha zorlu ve komplike defektler de vardır. Alveolar defektleri rekonstrükte etmek veya önlemek için birçok cerrahi rejeneratif prosedür geliştirilmiştir, bunlar arasında diş çekimi sonrası alveolar kret veya soket koruma, maksiller sinüs tabanı augmentasyonu ve splitting tekniği kullanılarak mandibular kret genişletme sayılabilir. Tüm bu teknikler, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu ilkesine dayanır ve çoğunlukla bariyer membranlarla birlikte otojen kemik greftleri ve diğer greftlerin kullanımını içerir. Daha büyük defektlerde, nonvaskülerize sekonder saha kemik greftleri veya vaskülerize doku flepleri gereklidir.

Otojen kemik transplantasyonu, osteokondüktivitesi, osteoindüktivitesi ve osteojenik özellikleri nedeniyle hala altın standart olarak kabul edilmektedir. Çoğu durumda, lokal olarak yeterli miktarda otojen kemik dokusu bulunmadığından, mandibular ramus veya anterior mandibula gibi intraoral bir ikinci cerrahi bölgeden kemik dokusu alınması gerekmektedir. İliak bölge, otojen

kemik doku elde etmek için en sık kullanılan ekstraoral donör bölgedir. Bu işlem için genel anestezi, hastanede yatış, daha uzun iyileşme süresi ve önemli ölçüde daha yüksek maliyetler gereklidir. Ayrıca, otojen kemik doku elde etme işlemi, donör bölgede morbidite riski, enfeksiyonlar, ameliyat sonrası ağrı ve uzun iyileşme süresi ile ilişkilidir. Diğer dezavantajlar arasında, kemik kalitesi ve miktarının öngörülemez olması ve ameliyat sonrası aşırı remodeling sayılabilir. Alternatifler arasında çeşitli allojenik, ksenojenik ve alloplastik muadiller bulunur. Bunların avantajları arasında ameliyat travması ve kan kaybının azalması, sınırsız tedarik imkanı, donör bölgesi morbiditesinin olmaması ve son derece düşük antijenik potansiyel sayılabilir.

Otolog greftlerin donör alandan kaynaklanan sorunları ve diğer malzemelerin osteojenik özelliklere sahip olmaması nedeniyle, konvansiyonel greftleme yöntemlerinin yerine geçebilecek bir doku mühendisliği yöntemi geliştirilmesi gerekmektedir. Doku mühendisliği uygulamalarında, doku iskeleleri üzerinde yapılan çalışmalar son yıllarda daha fazla ilgi görmeye başlamıştır.

Doku mühendisliğinin amacı, mühendislik ve biyolojik ilkelerin uygulanmasıyla hasarlı ve hastalıklı dokuları replase etmek veya bu dokuların işlevlerini geri kazandırmaktır. Bu ilkeler arasında hücrelerin seçimi ve uygulaması, iskele tasarımı ve biyolojik sinyal moleküllerinin tanımlanması ve kullanımı yer almaktadır. Bu yöntemle üretilen dokunun, hedef dokuya yapısal ve işlevsel olarak benzer olması beklenmektedir. Halen, oral ve maksillofasial doku mühendisliği alanında birçok çalışma yürütülmektedir.

Kök hücrelerin keşfi, moleküler ve hücresel biyolojideki güncel gelişmelerle birleşerek, hastalık nedeniyle hasar görmüş çeşitli organların rejenerasyonunu hedefleyen yenilikçi tedavi tekniklerinin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Genel olarak kök hücreler, iki önemli özelliğe sahiptir; kendilerini yenileyebilirler ve bölünme sırasında farklılaşma kapasitesi olan hücreler üretebilirler.

Doku mühendisliği ise, yeni organ ve dokular oluşturmak için mühendislik, biyoloji ve tıp araştırmalarını bir araya getiren disiplinler arası bir bilim dalıdır. Bu bilim dalı, temel olarak uygun hücrelerin seçimini, iskelelerin (scaffold) tasarımını ve hücreleri organ veya dokuyu yeniden oluşturmak için harekete geçiren morfojenik sinyallerin kullanımını içeren sağlam bir temele dayanır. Tıp dünyası, doku mühendisliği ve kök hücrelerin vücut parçalarının yeniden geliştirilmesindeki potansiyel uygulamalarını araştırmanın henüz başındadır. Rejeneratif tıp olarak adlandırılan bu teorik tedavi yaklaşımının, zamanla klinik pratikteki yerini bulacağı giderek daha belirgin hale gelmektedir. Kök hücrelerin, geleceğin tıbbi tedavilerinde kritik bir rol oynayacağı gösterilmiştir. Bu hücreler kolayca kültüre edilebilir ve kültür ortamında belirli hücre tiplerine farklılaşmaları teşvik edilebilir.

Kök hücreler, mitoz yoluyla çeşitli özelleşmiş hücrelere dönüşebilen kendini yenileyen hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler (EKH'ler), vücuttaki hemen hemen her tür hücreye dönüşebilen farklılaşmamış hücrelerdir. Mikroçevre, bir kök hücre durumunu sürdürmek için kritik öneme sahiptir ve kendi kendini yenileme ve farklılaşma dengesini kontrol eder. Stromal hücreler ile embriyonik tümör hücreleri arasındaki bu hücreler arası bağlantı tanımlanmış olup, her iki biyolojik kompartmanın gen ekspresyon modellerini yansıtır.

Araştırmacılar bu hücreleri kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya teşvik edebilir. Öte yandan, EKH'lerin kullanımı tartışmalıdır ve yasal ve etik sorunları içerir; bu da onların yeni ilaçların geliştirilmesinde kullanımını kısıtlamaktadır.

Kök hücrelerin bir diğer kaynağı göbek kordonudur. Göbek kordonu kanındaki kök hücreler, yeni doğan bir bebekte bulunanlarla aynıdır. Bu hücreler çoğalabilir ve bir dizi farklı hücre formuna gelişebilir. Doğumdan sonra, göbek kordonu kök hücreleri, gelecekteki klinik tedavi için kriyotik olarak dondurulabilir.

Mezenkimal kök hücreler (MSC'ler), başlangıçta olgun kemik iliğinden elde edilen ve daha sonra yetişkin ve fetal gelişim boyunca çeşitli dokuları oluşturan pluripotent hücrelerdir. İnsan kök hücreleri genellikle bulundukları dokuda yer alan hücre tiplerine farklılaşır. Bununla birlikte, araştırmalar tek bir dokudan gelen kök hücrelerin tamamen farklı başka bir dokuya ait hücreleri oluşturabileceğini göstermiştir.

Embriyonik kök hücrelerin aksine, yetişkin kök hücrelerin rejeneratif hastalıklar, kalp iskemisi, kemik ve diş kaybını tedavi etmek için kullanıma potansiyeli vardır. Yetişkin kök hücreleri, bir embriyoya zarar vermeden elde edilebildikleri için araştırma ve tıbbi kullanımlar açısından daha az tartışmalıdır. Yenidoğan kök hücreleri, dental dokular da dahil olmak üzere hemen hemen her vücut dokusunda keşfedilmiştir. Doku mühendisliği kapasitesi dental kök hücrelerde çalışılmış ve literatüre girmiştir. Pluripotent farklılaşma kapasiteleri nedeniyle kök hücre tedavisinde kullanım potansiyeli sunarlar; böylece sinir ve kemik gibi dental olmayan dokuların rejenerasyonunu teşvik etmek için kullanılabilirler.

İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPS hücreleri), insan somatik hücrelerinden türetilen yeni bir kök hücre türüdür. iPS hücreleri, insan EKH'lerine benzer ve üç ana germ katmanının tümünün türevlerine dönüşebilir. EKH'lerin aksine, iPS hücreleri, hastaya özgü kök hücreler yaratmak için kullanılabilir; bu da temel araştırmalar, hastalık modelleri ve rejeneratif ilaçlar için dokuya uyumlu farklılaşmış donör hücreler elde edilmesini sağlayabilir. Bu yenilik, kişiselleştirilmiş tıp açısından önemli bir gelişmedir.

Dental yapılardan birkaç farklı kök hücre popülasyonu elde edilmiştir. Dental pulpa, dental folikül, apikal papilladan elde edilen kök hücreler, diş germelerinden elde edilen mezenkimal kök hücreler ve periodontal ligamentten elde edilen kök hücreler, süt dişi kaynaklı kök hücreler gibi birkaç dental kök hücre formu tanımlanmıştır. Bu kök hücrelerin, sınırsız kendini yenileme, koloni geliştirme ve çeşitli

formlara gelişme potansiyeline sahip oral dokularda bulunan olgunlaşmamış mezenkimal hücreler olduğu varsayılmaktadır. Bu dental kök hücrelerin (DKH) çeşitli özellikleri, kemik iliğinden türetilmiş stromal kök hücreler ile karşılaştırılmıştır. DKH türleri, adipojenik, nörojenik ve odontojenik gibi çeşitli hücre türlerine çoklu farklılaşma potansiyeline sahiptir. Sonuç olarak, bu hücreler, preklinik çalışmalara biyomühendislik araştırmalarına tabi tutulmuştur.

Çeşitli diş dokusu kaynaklı MSC'ler bazı özellikleri paylaşmasının yanı sıra, aynı zamanda farklı fonksiyonel özellikleri temsil eden önemli fenotipik farklılıklar ile görüldüğü gibi, önemli ölçüde değişkenlik gösterir. Diş pulpasından üretilen tek koloni kaynaklı popülasyonların odontojenik gücünde, protein ekspresyonu ve genotipik kalıplardaki heterojenlik nedeniyle önemli bir çeşitlilik olduğu kanıtlanmıştır. Ek olarak, bu değişkenlik, doku mikroçevresi nedeniyle büyük ölçüde artabilir. Araştırmacılar, dental MSC'leri çeşitli yollarla izole edip kültüre ettikten sonra farklılaşma kapasitelerini değerlendirdiklerinden, bu standardizasyon daha da zorlaşmaktadır.

Farklılaşma potansiyelinin yanı sıra, MSC'lerin diğer hücrelerin işlevini düzenleme ve hücre-hücre etkileşimi veya parakrin mekanizma yoluyla sistemik inflamatuvar durumu modüle etme yeteneği de terapötik etkinliklerine katkıda bulunur. Mezenkimal kök hücre temelli kemik ve diş rejenerasyonunda, endojen hücrelerin mobilizasyonu ve ekzojen hücrelerin sitoterapi veya doku mühendisliğinde kullanımı olmak üzere iki ana strateji mevcuttur. Bununla birlikte, büyük ilerlemelere rağmen, kemik ve diş onarımı ve rejenerasyonu için güvenli, etkili ve basit kök hücre tabanlı yaklaşımlar geliştirmek, özellikle sağlıklı mikroçevrenin olumsuz etkileri göz önüne alındığında, hala büyük bir zorluktur.

Son yıllarda, mikro ortamın fiziksel fonksiyonlar ve patolojik değişiklikler ile kök hücrelerin terapötik etkileri üzerinde muazzam

bir etkiye sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Fizyolojik olarak, MSC'lerin bulunduğu niş, MSC'lerin davranışlarını sıkı bir şekilde düzenleyen çeşitli doku bileşenleri, hücre popülasyonları ve çözünür faktörlerden oluşur. Osteoporoz ve periodontitis gibi patolojik koşullarda, MSC'lerin vitalitesi ve farklılaşması ciddi şekilde bozulur, bu da durumun ağırlaşmasına ve doku iyileşmesinin bozulmasına yol açar. Ayrıca, sitoterapi ve doku mühendisliğinde, donörlerin ve alıcıların mikro ortamları, nakledilen MSC'lerin rejeneratif etkinliğini belirlemede çok önemli bir rol oynar, bu da MSC aracılı kemik ve diş rejenerasyonunda hücre-mikro ortam etkileşimlerinin kritik rolünü gösterir.

MSC bazlı rejeneratif tedavilerde mikro çevrenin önemini ortaya koyan kanıtların artmasına ek olarak, endojen MSC fonksiyonunu geri kazanmak için mikro çevrenin iyileştirilmesi, MSC'lerin bozulan mikro çevreye karşı direncinin artırılması ve transplante edilen MSC'lere fayda sağlamak için alıcı mikro çevrenin iyileştirilmesi gibi çözümler geliştirilmiştir. Özellikle, alıcılara nakledildikten sonra, MSC'ler hem doku mühendisliğinde hem de sitoterapide güçlü mikroçevre modlatrleri olarak işlev grrleri. Ayrıca, MSC kaynaklı ekstraselüler veziküllerin (EV'ler) uygulanmasıyla temsil edilen hücresiz tedaviler, tüm hücreli tedavinin umut verici bir alternatifi haline gelmiştir.

Kemik rejenerasyonunun etkinliği, kök hücreler ve biyomalzemeler arasındaki etkileşime bağlıdır; iskeleler, mekanik destek sağlamak, kök hücreleri stabilize etmek ve önemli büyüme faktörlerinin bağlanmasıı kolaylaştırmak için kritik bir rol oynar. Kök hücre aracılı kemik rejenerasyonunu geliştirmedeki etkinlikleri açısından çeşitli organik ve inorganik iskeleler araştırılmıştır ve sonuçlar, iskelenin bileşimi ve hücresel etkileşimlere göre değişiklik göstermektedir.

İskeleler, ekstraselüler matrisi simüle eden üç boyutlu bir ereve sağlayarak kök hücrelerin bağlanmasıı, oğalmasıı ve

osteojenik dizilere farklılaşmasını kolaylaştırır. Bu etkileşim, yeni oluşan dokunun fiziksel stabilitesini desteklemekle kalmaz, aynı zamanda kök hücre davranışını düzenleyen biyokimyasal sinyal yollarını da etkiler. Biyoaktif moleküller ekleyerek ve iskele özelliklerini optimize ederek, araştırmacılar etkili kemik iyileşmesini ve rejenerasyonunu destekleyen bir ortam yaratabilirler, bu da sonuçta kemik onarım uygulamalarında daha iyi klinik sonuçlara yol açar.

Kemik doku mühendisliği, kemik onarımı ve rejenerasyonu için stratejiler geliştirmeyi amaçlayan umut verici bir alandır. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan malzemelerin temel özellikleri arasında biyouyumluluk, biyobozunurluk, osteoindüktiflik, osteokonduktivite, kontrollü ilaç salımı, fizyolojik koşullara duyarlılık ve iyileşme sırasında kemik fonksiyonunu desteklemek için yeterli mekanik mukavemet sayılabilir. Yaygın olarak kullanılan malzemeler arasında polikaprolakton (PCL), β -trikalsiyum fosfat (β -TCP), kalsiyum sülfat (CS) ve bikalsiyum fosfat (BCP) bulunur. Bu malzemeler, kemik dokusunun iyileşmesine yardımcı olma, mekanik özellikleri restore etme ve kemik rejenerasyonu ve iyileşmesinin doğal süreçlerini destekleme özellikleri nedeniyle seçilir. İdeal bir iskele, in vivo olarak implante edildiğinde yeni kemik dokusunun oluşumuna uygun bir hızda bozunmalıdır. Bu senkronizasyon, iskelenin geçici destek sağlamasını ve yükü yavaş yavaş rejenere olan kemiğe aktarmasını sağlar. Özellikle poröz iskeleler, yenilikçi terapötik potansiyelleriyle dikkat çekmektedir. Geçirgen por yapısı, etkili kemik rejenerasyonu için çok önemli olan hücre tutunmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını kolaylaştırır. Ek olarak, bu iskeleler besin ve atık alışverişine izin vererek genel iyileşme sürecini iyileştirir. Kemik doku mühendisliği alanındaki son gelişmeler, iskele tasarımı ve malzeme özelliklerinin iyileştirilmesine odaklanmıştır. Örneğin, iskele matrisine büyüme faktörleri ve sinyal molekülleri dahil etmek, osteoindüktifliği artırabilir ve kemik

dokusu oluşumunu daha fazla teşvik edebilir. Ayrıca, farklı biyopolimerlerin ve seramiklerin yararlı özelliklerini birleştiren kompozit malzemelerin geliştirilmesi, üstün mekanik ve biyolojik performansa sahip iskeleler oluşturma konusunda umut vericidir. Genel olarak, kemik doku mühendisliği kemik onarımı için daha sofistike ve klinik olarak uygulanabilir çözümler yönünde ilerlemektedir. Biyomalzemelerin doğal özelliklerinden yararlanarak ve biyoaktif bileşenleri dahil ederek, araştırmacılar sadece kemik iyileşmesini desteklemekle kalmayıp, aynı zamanda rejeneratif sürece aktif olarak katılan iskeleler geliştirmeyi ve sonuçta kemik defektleri olan hastalar için daha iyi klinik sonuçlar elde etmeyi amaçlamaktadır. İskele teknolojisi ve malzeme bilimindeki sürekli yenilikler, kemik doku mühendisliğinin geleceğini dönüştürme potansiyeline sahiptir.

Kemik doku mühendisliğinde polikaprolakton (PCL), sentetik, biyouyumlu ve biyolojik olarak absorbe olabilen bir maddedir. PCL, kemik rejenerasyonunu içeren doku mühendisliği çalışmalarında osteojenik farklılaşmaya uygun kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip bir materyal olarak tanımlanmıştır (X. Yang et al., 2010). Son yıllarda, kemik rejenerasyonu için allojenik, ksenojenik ve otolog kök hücre transplantasyonu üzerinde çalışmalar yürütülmüştür. Transplante edilen kök hücrelerin kaynağı ve tipi, kullanılan doku iskelesinin özellikleri ve kullanılan doku iskelesinin özellikleri, uygulanan tedavilerin başarısını belirler. Kök hücre kolonilerinin osteojenik farklılaşma ve rejenerasyon kapasitesinin değerlendirilmesi, kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu için önemli bir bileşendir (Matsubara et al., 2005).

Kemik defekti rekonstrüksiyonu araştırmalarında incelenen kök hücre tipleri arasında, mezenkimal kök hücrelerin osteoblastik aktiviteye sahip olduğu ve kemik rejenerasyonuna katkıda bulunduğu literatürde rapor edilmiştir. Özellikle kemik iliği kaynaklı MSC'lerin kemik rejenerasyon kapasitesi ve profili oldukça belirgin

olarak raporlanmıştır(Goel, Sangwan, Siwach, & Ali, 2005; Kwan, Slater, Wan, & Longaker, 2008; Panetta, Gupta, Quarto, & Longaker, 2009).

Son yıllarda, dental pulpa ve dental folikül kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kemik iyileşmesi üzerindeki etkileri de araştırılmaya başlanmış ve bu çalışmalardan başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu hücre kaynaklarının en önemli avantajları, donör bölge morbiditesi oluşturmamaları ve güçlü osteojenik etki potansiyelleridir(Laino et al., 2006; Mori et al., 2012; Pisciotta et al., 2012; Todorovic et al., 2008; Yao et al., 2013). Söz konusu mezenkimal kök hücre grupları, tamamen tıbbi atık statüsündeki dokulardan elde edilebilmektedir. Bu tedavi yönteminin başarılı sonuçları klinik pratiğe aktarıldığında, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre eldesinde önemli bir sorun teşkil eden donör bölge morbiditesi ortadan kalkacak; buna bağlı olarak komplikasyon oranları azalacak, hasta konforu artacak, iyileşme döneminin kısalması nedeniyle tedavi süresi kısaldığı gibi, kapsamlı defektlerde de daha başarılı tedavi sonuçları elde edilebilecektir.

Bu bulgular ışığında, tekniğin klinik uygulamaya aktarılabilmesi için, kullanılan doku kaynağına bağlı olarak değişen spesifik farklılaşma potansiyelinin dikkatle değerlendirilmesi gerektiği açıktır. Ancak, bu amaca yönelik olarak farklı mezenkimal kök hücre gruplarının transplantasyonunu doğrudan karşılaştıran çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır.

Genel Bilgiler

Kemik Dokusunun Yapısal Özellikleri

Kemik, mineralize olmuş ve yüksek derecede özelleşmiş bir bağ dokusu formudur. Kalsiyum oranı yüksek bir ara madde içine gömülü çeşitli hücre tipleri, fibriller ve vasküler yapılardan oluşan bu doku, tamir ve rejenerasyon kapasitesine sahiptir. Dokunun yaklaşık %33'lük kısmını organik matriks oluşturur. Organik matriksin %28'ini Tip I kollajen oluştururken, kalan %5'lik kısım osteokalsin, osteonektin, proteoglikanlar, kemik morfojenik proteinleri ve kemik sialoproteinleri gibi non-kollajen proteinlerden oluşmaktadır. Organik matriks yapısı, kristalize hidroksiapatit materyali ile çevrelenmiş durumdadır. Hidroksiapatit ise kemik kompozisyonunun yaklaşık %67'sini oluşturmaktadır.

Kemik dokusu, destek, koruma ve hareket gibi iskeletsel fonksiyonların yanı sıra, hormonal faktörlerin kontrolü altında bir kalsiyum ve fosfor iyonları rezervi olarak da görev yapar.

Makroskopik düzeyde, lamellar kemiğin yapısal organizasyonuna göre kemik dokusunda substantia compacta (kompakt kemik) ve substantia spongiosa (süngerimsi kemik) olarak adlandırılan iki ana bölüm gözlemlenir.

Uzun kemiklerin uç kısımları hyalin kıkırdak ile kaplıdır. Sinovyal eklem yüzeyleri, intraosseöz zarlar ile tendon ve ligament bağlantı bölgeleri hariç, kemik yüzeyleri periost adı verilen bir zar ile çevrelenmiştir. Periostun dış tabakası fibröz bir yapıya sahipken, iç tabaka kambiyum tabakası olarak adlandırılır ve zengin bir mikrovasküler ve hücrel organizasyon içerir. Periosteal hücreler osteoblastlara dönüşebilir, kallus oluşturabilir ve belirli koşullarda hyalin kıkırdak üretebilirler. Periostun korunması veya kemik greftleri ile birlikte başka bir bölgeye taşınması, alıcı bölgenin daha hızlı revaskülarize olmasını sağlar. Kompakt kemiğin iç yüzü ise tek

tabakalı bir katman olan endosteum ile örtülüdür ve endosteumun da osteojenik kapasitesi bulunmaktadır.

Doğumdan itibaren dördüncü yılın sonuna kadar, olgunlaşmamış kemiğin yerini lameller kemik alır. Lameller kemik matriksleri 3-5 mikrometre kalınlığında tabakalar halinde düzenlenmiştir. Kemik lamelleri içindeki lakuna adı verilen boşluklarda osteositler yer alır. Lakunalarından çıkarak matriks içinde tüm yönlerde uzanan kanaliküller ise diffüzyon özelliği olmayan mineralize dokunun beslenmesinde kritik rol oynar.

Kompakt veya süngerimsi kemiğin mikroskopik düzeyde üç temel yapıdan oluştuğu görülür:

1. Dış trabeküler lameller kemiğin yüzeysel tabakasını oluşturur.

2. Konsantrik lameller (osteonlar), genellikle kemiğin uzun eksenine paralel seyreder. Her osteon yapısının merkezinden Havers kanalları geçer ve bu kanallar birbirine Volkmann kanalları ile bağlanır. Volkmann kanalları kemiğin vasküler ağını barındırır.

3. İnterstisyel lameller ise konsantrik lameller arasına dağılmış durumdadır.

Kemik Hücreleri

Kemik dokusunda spesifik fonksiyonel özelliklere sahip dört temel hücre tipi bulunmaktadır:

1. Osteositler
2. Osteoblastlar
3. Kemik örtü hücreleri (bone lining cells)
4. Osteoklastlar

Kemik hücreleri arasında hematopoetik kökenli osteoklast hücreleri hariç, diğer tüm kemik hücreleri mezenkimal kök hücrelerden köken almaktadır. Osteositler, osteoblastlar ve kemik örtü hücreleri mezenkimal kaynaklıyken, osteoklastlar monosit-makrofaj hücre serisine ait hematopoetik kökenli hücrelerdir.

Bu hücrelerin her biri kemik dokusunun yapımı, yıkımı, remodeling süreçleri ve mineral homeostazının düzenlenmesinde farklı roller üstlenmektedir.

Osteositler

Osteositler, lakün adı verilen boşlukların içinde mineralize kemik matriksi ile çevrili halde yerleşmiş hücrelerdir. Bu hücreler çevrelerindeki matriksi sınırlı derecede rezorbe ederek osteositik lakünlerin oluşumuna katkıda bulunurlar. Kemik formasyon hızı arttıkça osteositlere dönüşen osteoblast sayısında da artış gözlenir.

Osteositler, uzantıları aracılığıyla hem osteoblastlarla hem de komşu osteositlerle sürekli iletişim halindedir. Bu hücrelerin oluşturduğu kompleks ağ yapısının en önemli işlevlerinden biri, kalsiyum iyon dengesini düzenleyerek kemik dokusunun aşırı mineralizasyonunu önlemektir. Ayrıca osteositler, mekanik uyarıyı algılayarak kemik remodeling sürecini düzenlemede ve fosfat metabolizmasında kritik roller üstlenirler. Kemik dokusunun mekanosensörleri olarak işlev gören osteositler, kemik yapımı ve yıkımı arasındaki dengeyi sağlamada hayati öneme sahiptir.

Osteoblastlar

Aktif osteoblastlar, ışık mikroskobu incelemelerinde bazofilik boyanma özelliği gösterirler. Bu hücrelerin temel işlevi organik kemik matriksini (osteoid) sentezlemek ve salgılamaktır. Osteoblastlar plazma membranlarının dış yüzeyinde yüksek düzeyde alkalen fosfataz enzimi bulundurmanın yanı sıra, Tip I ve Tip V kollajen, çeşitli sitokinler ve non-kollajen proteinleri de salgırlar.

Osteoblastlar ayrıca kemik oluşumu ve tamir mekanizmalarında kritik rol oynayan çeşitli büyüme faktörlerinin salgılanmasından da sorumludur. Bu faktörler arasında BMP-2, BMP-7, TGF- β , IGF-1, IGF-2, PDGF ve FGF- β yer almaktadır.

Kemik metabolizması, çeşitli hormonlar tarafından düzenlenmektedir. Bu hormonal düzenleyiciler arasında paratiroid hormon, 1,25-dihidroksivitamin D, kalsitonin, östrojen ve

glukokortikoidler sayılabilir. Bu hormonlar kemik yapım ve yıkım süreçleri arasındaki dengeyi kontrol ederek kemik homeostazını sağlarlar.

Kemik Örtü Hücreleri

Kemik örtü hücreleri, inaktif duruma geçmiş yüzey osteoblastlarıdır ve yassı bir morfoloji sergilerler. Bu hücrelerde metabolik aktivite, sitoplazmik organel yoğunluğu ve protein sentez kapasitesi belirgin şekilde azalmıştır.

Kemik örtü hücreleri, kemik remodeling sürecinde önemli bir düzenleyici role sahiptir. Osteoklast aktivasyonunu tetikleyen faktörlerin salgılanması yoluyla kemik rezorpsiyon sürecinin başlatılmasında görev alırlar. Aynı zamanda kemik yüzeyini kaplayarak mineralize kemik matirksi ile ekstraselüler sıvı arasında bariyer oluştururlar.

Bu hücreler gerektiğinde tekrar aktif osteoblastlara dönüşebilme kapasitesine sahiptir. Kemik örtü hücreleri, endosteum ve periosteumda yerleşim göstererek kemik yüzeyinin korunmasını ve kemik remodeling döngüsünün düzenlenmesini sağlarlar. Kemik homeostazının sürdürülmesinde osteoprogenitör hücreler ile osteoblastlar/osteoklastlar arasında köprü görevi görürler.

Osteoklastlar

Osteoklastlar, kemik iliğinin hematopoietik kök hücrelerinden köken alan ve monosit/makrofaj hücre serisine ait olan özelleşmiş hücrelerdir. Bu hücreler büyük boyutları ve çok çekirdekli yapıları ile karakterize edilirler. Kemik yüzeyinde, rezorpsiyon aktiviteleri sonucu oluşan Howship lakunaları içinde yerleşim gösterirler.

Osteoklastlar, hem fizyolojik kemik remodelingi hem de patolojik süreçlerde kemik matriksinin yıkımından sorumludurlar. Kemik rezorpsiyonu sırasında, hücre membranının kemik yüzeyine komşu olan kısmı "kırımlı kenar" (ruffled border) adı verilen özelleşmiş bir yapı oluşturur. Bu yapı sayesinde temas yüzey alanını

genişleterek, asit ve proteolitik enzim salgısı için uygun bir ortam oluştururlar.

Salgılanan hidrojen iyonları kemik mineralizasyonunu çözerek kalsiyum ve fosfat iyonlarının serbest kalmasını sağlarken, katepsin K gibi proteazlar ise organik matriksin yıkımından sorumludur. Osteoklast aktivitesi, RANKL/RANK/OPG sistemi başta olmak üzere çeşitli sistemik ve lokal faktörler tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Bu düzenleme mekanizmaları, kemik yıkım ve yapım süreçleri arasındaki dengenin korunmasında kritik öneme sahiptir. Osteoklast fonksiyonundaki bozukluklar osteoporoz, osteopetroz gibi çeşitli kemik hastalıklarına yol açabilmektedir.

Kemik Matriksi

Kemik matriksinin oluşumu ve bileşimi şu şekildedir:

Kemik matriksinin organik kısmı olan osteoid, osteoblastlar tarafından sentezlenen makromoleküllerden oluşur. Bu organik matriks, mineralizasyon süreci sonucunda mineralize kemik dokusuna dönüşür.

Kemik matriksinin bileşimi temel olarak üç ana komponentten oluşur:

1. Kollajen lifler (başlıca Tip I ve Tip V kollajen)
2. İnorganik mineral içerik
3. Non-kollajen proteinler

Kollajen kompozisyonu bölgesel farklılıklar gösterebilmektedir. Alveoler kemikte Tip III ve Tip XII kollajen içeriği de bildirilmiştir.

Non-kollajen proteinler arasında:

- Osteokalsin
- Kemik sialoprotein
- Osteonektin
- Osteopontin
- Proteoglikanlar
- Albumin

- α 2HS-glikoprotein
- Immunglobulinler

yer almakta olup, bu proteinlerin kompozisyondaki miktarları yaşa bağılı olarak değişkenlik göstermektedir.

Mineralizasyon sürecinde osteoblastlar tarafından salgılanan alkalen fosfataz enzimi önemli bir rol oynar. Olgun kemik dokusunda organik/inorganik oranı yaklaşık %35/%65 şeklindedir ve bu kompozisyon kemiğe hem esneklik hem de sertlik sağlar.

Osteogenesis

Kemik yapım süreci, yaşam boyu devam eden dinamik bir döngüdür. Bu süreç, preosteoblastların veya farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin osteoblastlara dönüşümüyle başlar. Oluşan osteoblastlar, ekstraselüler organik matriks (osteoid) sentezler ve bu matriksin mineralizasyonu sonucu kemik dokusu oluşur. Kemik dokunun oluşumu, endokondral ve intramembranöz olmak üzere iki şekilde izlenir.

Endokondral Kemik Oluşumu

Endokondral kemikleşme sürecinde mezenkimal hücreler öncelikle kondrositlere farklılaşarak kıkırdak bir model oluşturur. İntramembranöz kemikleşmeden farklı olarak, bu hyalin kıkırdak şablon primer kemikleşme odağından başlayarak kemik dokusuyla yer değiştirir.

Süreç şu aşamaları izler:

-Kıkırdak Model Oluşumu ve Hipertrofi:

Kıkırdak şablon merkezindeki kondrositler hipertrofiye uğrar Salgılanan anjiyojenik faktörler vasküler yapıların oluşumunu başlatır

Matriksin kollajen içeriği sentezlenmeye başlanır.

-Vasküler İnvazyon ve Primer Kemikleşme:

Hematopoietik ve osteoprogenitör hücre göçü gerçekleşir

Primer kemikleşme odakları oluşmaya başlar

Matriks kalsifikasyonunu takiben kondrositlerde apoptotik süreç başlar.

-Kemik Dokusu Formasyonu:

Hematopoietik kök hücreler ve osteoprogenitör hücreler kalsifiye kıkırdaka ilerler

Osteoblastik farklılaşma ile kemik matriksinin kalsifikasyonu başlar

Uzun kemiklerde primer kemikleşme merkezi diafizde oluşur

-Sekonder Kemikleşme Merkezleri:

İkincil kemikleşme merkezleri daha sonra epifizlerde gelişir

Bu merkezler epifizyal plakların oluşumunu sağlar

Endokondral kemikleşme, uzun kemiklerin büyümesi ve gelişmesinde temel mekanizmadır ve doğum sonrası büyüme sürecinde epifizyal plaklar aracılığıyla devam eder.

İntramembranöz Kemik Oluşumu

İntramembranöz kemikleşme mekanizmasında, mezenkimal hücreler doğrudan osteoblastlara farklılaşır ve kıkırdak aşaması olmaksızın mineralize kemik dokusu oluşumu gerçekleşir.

Hücrel Farklılaşma: Embriyonik mezenkimal hücreler ekstraselüler matriks içinde yoğunlaşarak doğrudan osteoblastlara dönüşür ve kemik matriksi salgılamaya başlar.

Trabeküler Ağ Oluşumu: Çok sayıda kemikleşme merkezi aracılığıyla birbirine bağlı trabeküler kemik ağı oluşur.

Matriks Olgunlaşması: Yeni oluşmuş trabeküler kemikte kollajen fibriller düzensiz organizasyon gösterir. Ekstraselüler matrikse kalsiyum fosfat depolanması başlar. Osteoblastlar osteositlere dönüşerek lakuna sistemini oluşturur.

Olgun Kemik Formasyonu: Düzensiz fibril yapısına sahip kemik, zamanla organize lameller kemik yapısına dönüşür.

Bu kemikleşme tipi, kemik onarım süreçlerinde ve rejeneratif tıp uygulamalarında önemli bir model oluşturmaktadır.

Kemik Doku İyileşmesi

Kemik dokusu, kortikal ve trabeküler yapısını yeniden kazanabilen özel bir rejeneratif kapasiteye sahiptir. Kemik iyileşmesi, doku kaybının karakterine bağlı olarak onarım veya rejenerasyon şeklinde gerçekleşebilir. Rejeneratif iyileşme için yeterli mekanik stabilite ve vasküler destek gereklidir.

Primer Kemik Rejenerasyon Tipleri:

- Primer temas iyileşmesi
- Primer boşluklu iyileşme

Kemik Rejenerasyon Evreleri:

1. İnflamatuvar Evre:

Defekt bölgesinde trombosit agregasyonu ve fibrin ağı oluşumu

Pıhtı matriksinin organizasyonu

Mezenkimal kök hücre göçünü ve inflamatuvar mediatör salınımını başlatan faktörlerin açığa çıkması

Makrofaj, monosit ve polimorf nüveli lökositlerin defekt alanına toplanması

2. Tamir Evresi:

Endotel hücreleri, çevre yumuşak dokular ve periosttan kaynaklanan fibroblast, osteoprogenitör hücre ve mezenkimal hücre göçü

Kemik fragmanları arasında 200 mikrometreden küçük boşluklarda direkt lameller kemik oluşumu

Daha büyük defektlerde immatür kemik oluşumu ve remodeling süreci

3. Remodeling Evresi:

Sekonder osteon sistemlerinin gelişimi

Kemik matriksinin olgunlaşması ve mekanik direncin artması

Kritik Faktörler:

Yetersiz mekanik stabilite veya vasküler destek durumunda fibröz doku gelişimi

İnce yüz kemiklerinin iyileşmesinde osseöz iyileşme yerine fibröz doku formasyonu riski

Bu karmaşık biyolojik süreç, kemik kaybının boyutu, lokal faktörler ve sistemik durum gibi parametrelerden önemli ölçüde etkilenmektedir.

Kemik Doku Defektlerinde Tedavi Yaklaşımları

Kemik Greftleri

Kemik dokusunun hastalıkları, yaralanmaları ve konjenital malformasyonlarının tedavisinde greftleme yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. En sık başvurulanan kemik grefti tipleri otolog ve allojenik greftlerdir.

Otolog Greftler:

- Hastanın kendi dokusundan elde edilir
- İmmünojenik reaksiyon riski taşımaz
- Rejeneratif otolog hücreleri implantasyon bölgesine taşır
- Kemik defekt rekonstrüksiyonunda altın standart kabul edilir

Sınırlamaları:

- Elde edilebilecek greft miktarı sınırlıdır
- Donör bölge morbiditesi riski taşır
- Geniş defektlerde yetersiz kalabilir

Allojenik Greftler:

- Doku bankalarından temin edilir
- Donör bölge morbiditesi sorununu ortadan kaldırır
- İstenilen miktarda greft temini mümkündür

Dezavantajları:

- İmmünojenik reaksiyon olasılığı

- Patojen eliminasyonu için uygulanan sterilizasyon işlemleri (radyasyon, liyofilizasyon) hücresel komponenti yok eder
- Rejenerasyon kapasitesi sınırlıdır

Bu sınırlamalar, konvansiyonel greftleme yöntemlerine alternatif oluşturacak doku mühendisliği yaklaşımlarının geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Doku mühendisliği stratejileri, biyomateryaller, büyüme faktörleri ve hücrelerin kombinasyonu ile optimal kemik rejenerasyonu sağlamayı hedeflemektedir.

Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, hasar görmüş organ ve dokuların rejenerasyonu için hücre biyolojisi yöntemleri ile mühendislik prensiplerini birleştirerek hücresel organizasyonlar oluşturmayı hedefleyen disiplinler arası bir alandır.

Geleneksel Transplantasyon Sorunları:

- Donör uyumsuzluğu ve immün yanıt gelişimi
- Alıcıda immün sistem baskılanması ve tümör riskinde artış
- Transplant edilen dokunun fonksiyonel kalma süresinin belirsizliği
- Donör bulmada yaşanan güçlükler

Doku Mühendisliği Yaklaşımları:

Bu sorunların çözümü için in vitro koşullarda üretilen yapay organ ve dokuların hastalıklı bölgeye transplantasyonu önem kazanmıştır. Araştırmalar üç temel strateji ile yürütülmektedir:

1. Yalnızca hücreler kullanılarak
2. Hücreler ve iskeleler kombinasyonu ile
3. Hücreler, sinyal molekülleri ve iskelelerin birlikte kullanımı ile

İskelelerin Rolü:

İskeleler implant materyali olarak kullanıldığında:

- Hasta hücreleri bu yapılar üzerine göç edebilmekte

- Hedef doku oluşumu teşvik edilebilmekte
- Hasar onarımı gerçekleştirilebilmektedir

Uygulama Alanları:

Hücre kültürü ve rejeneratif tıp teknikleri kullanılarak iskeleler üzerine hedef dokuyu oluşturacak hücrelerin inkübasyonu sonucu yapay organ ve dokuların oluşturulması mümkün hale gelmektedir. Bu yaklaşım, rejeneratif tıp alanında kaybolan doku ve organ fonksiyonlarının iadesi için umut verici bir strateji sunmaktadır.

Kemik Doku Mühendisliği

Kemik defektlerinin tamiri ve rejenerasyonu, maksillofasiyal cerrahinin yanı sıra birçok tıp disiplininin temel araştırma konularındandır. Maksillofasiyal bölgedeki doku hasarlarının başlıca nedenleri arasında ablatif kanser cerrahisi, enfeksiyon, travma, iskeletsel hastalıklar ve konjenital malformasyonlar yer almaktadır.

Maksillofasiyal Rejenerasyon Temel Bileşenleri:

Maksillofasiyal kompleksin rejeneratif tedavi potansiyelini anlayabilmek için üç temel bileşenin kesişimi gereklidir:

- a) Kök hücreler
- b) Sinyalizasyon molekülleri
- c) Hücre dışı matriks yapısını sağlayan doku iskeleleri(Nakashima, 2005; Nakashima & Reddi, 2003).

Embriyolojik Benzerlik:

Kraniyofasiyal dokuların rejenerasyonu sırasında, embriyolojik gelişim ve morfojeniz mekanizmalarının bir kısmının tekrarlandığı gözlemlenmektedir(Nakashima & Reddi, 2003).

Doku İskeleleri ve Materyal Gelişimi:

Doku mühendisliği araştırmalarının önemli bir kısmı, doku oluşumunun nitelik ve miktarını iyileştirecek yeni materyallerin geliştirilmesine odaklanmıştır. Planlanan dokunun onarımı veya üretimi için dokuyu oluşturan sağlıklı hücreler veya elde edilen kök

hücre gruplarının rehber iskeleler üzerinde kültüre edilmektedir. Uygulama için izole edilmiş belirli miktarda hücre grubunun kültüre edilmesiyle ileri pasajlarda geniş hücre grupları elde edilebilmektedir. Kök hücrelerin iskeleler üzerinde tutunma, farklılaşma ve hedef doku organizasyonu oluşturmada, iskele materyalinin yönlendirici etkisi birçok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır(Discher, Janmey, & Wang, 2005; Engler, Sen, Sweeney, & Discher, 2006; X. Yang et al., 2010).

İskele Tipleri:

Kraniofasial doku rejenerasyonunda iki temel iskele tipi üzerinde çalışılmaktadır:

Doğal Kaynaklı İskeleler:

- Kalsifiye ve dekalsifiye dondurularak kurutulmuş kemik
- Sığır mineral matriksi
- Sığır kaynaklı hidroksiapatit

Sentetik Biyomimetik İskeleler:

- Hidroksiapatit (masif, porlu, rezorbe olabilen)
- Trikalsiyum fosfat
- Biyoaktif camlar (SiO_2 , CaO , Na_2O)
- Kalsiyum karbonat
- Poli(laktik-ko-glikolik asit)
- Metil selüloz
- Kitosan ve mine matriks türevleri

Biyouyumluluk ve Fonksiyonel Gereksinimler:

Doku mühendisliği uygulamaları için tasarlanan kompleksler, hücre ve biyomateryal kombinasyonlarından meydana gelmekte ve dokunun bazı kısımlarının fonksiyonlarında bir takım düzenlemeler yapmaktadır. Bu yapılırken de düzeneklerin doğru ve eksiksiz olarak çalışarak konak doku ile olan uyumunun sağlanması gerekmektedir. Doku mühendisliği uygulamaları için tasarlanan komplekslerin başarısı için:

- Hedef dokunun uygun fonksiyonu ve hücresel fenotipik ifadelerinin korunması
- Yabancı cisim reaksiyonlarının ve immün yanıtın önlenmesi
- Skar veya kapsül oluşumunun engellenmesi
- Konak doku ile uyumlu entegrasyonun sağlanması gerekmektedir.

Doku Mühendisliğinde Kullanılan Polimerler

Doku mühendisliği alanında hücre iskelesi olarak kullanılan polimerik malzemeler, temel olarak doğal ve sentetik kaynaklı polimerlerden üretilmekte olup, hücrelerin adhezyonunu, proliferasyonunu ve farklılaşmasını destekleyerek rejeneratif süreçleri yönlendirmede kritik rol oynamaktadır. Bu polimerik yapılar, hedef dokuya özgü hücre dışı matriks bileşenlerini doğrudan oluşturan biyopolimerler veya bu yapıları taklit edebilen sentetik polimerler şeklinde sınıflandırılabilir.

Günümüzde ileri üretim teknolojileri kullanılarak, bu polimerik materyallerden hem iki boyutlu hem de üç boyutlu hücre kültür platformları geliştirilebilmektedir. Doğal polimerler arasında kollajen, fibronektin, laminin, aljinat, kitosan ve hyaluronik asit gibi biyolojik kaynaklı malzemeler sayılabilirken, sentetik polimerler arasında polilaktik asit (PLA), poliglaktolik asit (PGA), polikaprolakton (PCL) ve bunların kopolimerleri öne çıkmaktadır.

Her iki polimer grubunun da kendine özgü avantajları bulunmaktadır. Doğal polimerler genellikle üstün biyouyumluluk ve biyolojik tanınma özellikleri sergilerken, sentetik polimerler ise mekanik dayanım, bozunma kinetiği ve yüzey özellikleri açısından daha kontrollü modifikasyon imkanı sunmaktadır. Son yıllarda, doğal ve sentetik polimerlerin kombinasyonundan oluşan hibrit yapılar ise her iki grubun avantajlarını birleştiren çözümler olarak dikkat çekmektedir.

Bu polimerik iskeleler, elektroğirme, 3B baskı, dondurarak kurutma ve faz ayrımı gibi çeşitli imalat yöntemleri ile üretilebilmekte ve hedef dokuya özgü mekanik, kimyasal ve topografik özelliklerle donatılabilmektedir(Batorsky, Liao, Lund, Plopper, & Stegemann, 2005; Dhariwala, Hunt, & Boland, 2004; Hollister, 2005; Hutmacher, Sitter, & Risbud, 2004; Ifkovits & Burdick, 2007).

Sentetik polimerler

Sentetik polimerik malzemeler, doku mühendisliği ürünlerinde, tıbbi malzemelerde ve implant uygulamalarında önemli bir yer tutmaktadır. Bu polimerik biyomateryallerin yaygınlaşmasındaki temel faktör, istenen mekanik ve fiziksel özelliklere sahip malzemelerin ekonomik üretim yöntemleriyle ve tercih edilen formlarda üretilebilmesidir.

Doku mühendisliği alanında yaygın olarak kullanılan sentetik polimerler arasında polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), polietilen (PE), polietilen glikol (PEG), polipropilen fumarat (PPF), polietilenteraftalat (PET) ve polikaprolakton (PCL) sayılabilir. Özellikle poliglikolik asit ve polilaktik asit ile bunların kopolimerleri, hidrolitik ortamda ester bağlarının yıkımı sonucu kütleli bozunma göstermeleri nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Bozunma ürünleri metabolik yollarla vücuttan uzaklaştırılabilmektedir. Ayrıca, akrilik asit iyon içeren akrilatlar ve hidrojenlerin sentezi kök hücre kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır(Nerurkar, Elliott, & Mauck, 2007; Richardson, Peters, Ennett, & Mooney, 2001; Wan, Feng, Shen, Laurencin, & Li, 2008).

Polikaprolakton (PCL)

PCL, kemik doku mühendisliği çalışmalarında yoğun şekilde araştırılan ve kullanılan alifatik bir poliesterdir. Molekül ağırlığı 10.000-80.000 Da aralığında değişen PCL'nin erime noktası kristalin yapısına bağlı olarak 59-64°C'dir. Yarı kristalin bir polimer olan

PCL, -60°C civarındaki oldukça düşük camsı geçiş sıcaklığı nedeniyle oda sıcaklığında kauçuk benzeri özellikler sergiler.

PCL'ın diğer alifatik poliestерlerle karşılaştırıldığında dikkat çeken özellikleri arasında terapötik ajanlara karşı yüksek geçirgenlik ve üstün termal kararlılık bulunmaktadır. Diğer poliestерlerin bozunma sıcaklıkları 235-255°C aralığındayken, PCL'ın bozunma sıcaklığı yaklaşık 350°C'dir.

PCL, ε-kaprolaktonun 170°C'de azot atmosferi altında dibutil kalay oksit katalizörlüğünde halka açılma polimerizasyonu ile sentezlenir. ε-kaprolaktonun etilen oksit, stiren, metil metakrilat, vinil asetat gibi çeşitli monomerlerle kopolimerizasyonu da mümkündür(Pachence JM & Kohn J, 2000; Sinha, Bansal, Kaushik, Kumria, & Trehan, 2004).

PCL'ın önemli bir avantajı da birçok polimerle uyumlu karışımlar oluşturabilmesidir. Bu özellik, PCL'ın doku mühendisliği çalışmalarında hem tek başına hem de diğer polimerlerle kombinasyon halinde yaygın kullanımını sağlamıştır(Guarino et al., 2008).

Çözünürlük özellikleri açısından PCL, tetrahidrofur (THF), kloroform, toluen, diklorometan ve benzen gibi çözücülerde çözünebilirken; aseton, asetonitril, dimetilformamid ve etil asetat oldukça düşük çözünürlük gösterir. Alkol bileşikleri, petrol eteri ve dietil eterde ise çözünmemektedir(Sinha et al., 2004). Polimerin çözünürlük özellikleri, hedeflenen özelliklere sahip doku iskelelerinin üretimi için kritik öneme sahiptir. Yüzey morfolojisi, yüzey enerjisi ve su teması açısı gibi hücre-polimer etkileşimini etkileyen parametreler, kullanılan çözücünün özelliklerinden önemli ölçüde etkilenmektedir(Tang et al., 2004).

PCL'ın biyobozunurluk özelliği ilk kez 1973'te rapor edilmiştir(Gross & Kalra, 2002). Fizyolojik koşullarda ester bağlarının hidrolizi ile bozulan PCL, hidrofobik yapısı ve yüksek kristalinitesi nedeniyle PGA ve diğer polimerlere kıyasla daha yavaş

bozunur ve fiziksel özelliklerini daha uzun süre koruyabilir. Bu özelliği nedeniyle implant yapımında ve uzun süreli (en az 6 ay) ilaç salım sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır(Agrawal & Ray, 2001; Hou, Wang, & Bartolo, 2022; Kweon et al., 2003).

PCL'ın bozunma mekanizması iki aşamalıdır ve zincir kopmasına bağlı molekül ağırlığında azalma ve kütle kaybının başlaması ile ilerler. Su içeren ortamlardaki bozunma otokatalitik bir reaksiyondur ve serbest kalan karboksilik asit uç grupları hidrolizi katalize eder. Bozunma reaksiyonu polimerin amorf bölgelerinde gerçekleştiğinden, kristalinite ile bozunma hızı ters orantılıdır (Sinha ve ark., 2004). Biyolojik bozunma ürünleri trikarboksilik asit döngüsü veya renal yol ile metabolize edilir(Kweon et al., 2003).

PCL, yapısındaki ester grupları nedeniyle biyolojik olarak bozunabilen bir polimer olmakla birlikte, düşük bozunma hızı (hücre kültüründe yaklaşık 2 yıl) nedeniyle genellikle biyopolimerlerle kopolimer oluşturularak kullanılmaktadır(X. Yang et al., 2010). Doku ortamında parçalanmayı takiben düşük moleküler ağırlıklı PCL birimleri makrofajlar tarafından fagosite edilerek hücre içinde tamamen degrade olurlar. Biyopolimer kopolimerlerinin kemik doku mühendisliğinde kullanımı oldukça yaygındır ve doku oluşumunu desteklediği birçok çalışmada gösterilmiştir(Endres et al., 2003; Guarino et al., 2008; Martins et al., 2010; X. Yang et al., 2010).

Sentetik polimerler, hücre kültürü ve doku mühendisliği disiplinlerinde, farklı kimyasal ve mekanik yöntemlerle kolayca modifiye edilebilmeleri nedeniyle iki veya üç boyutlu hücre dışı matriks benzeri yapıların oluşturulmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak, düşük biyoaktivite ve asidik ortam oluşturma gibi dezavantajları nedeniyle, istenen hücre yanıtının elde edilebilmesi için uygun biyopolimerlerle kopolimer oluşturulması ve modifikasyonu kritik öneme sahiptir(Dawson, Mapili, Erickson, Taqvi, & Roy, 2008).

PCL polimerlerinin çeşitli medikal ve ilaç salım sistemlerinde kullanımı, kapsamlı in vitro ve in vivo çalışmalar sonucunda FDA tarafından onaylanmıştır. PCL, yumuşak ve sert doku uyumluluğu nedeniyle sütür materyali, adhezyon bariyeri, ilaç salım sistemi, kemik ve deri örtü materyali olarak kullanılmakta ve çeşitli doku rejenerasyonu çalışmalarında doku iskelesi olarak yaygın şekilde araştırılmaktadır.

Doğal polimerler

Doğal polimerler, biyolojik dokulardan çeşitli izolasyon yöntemleri ile elde edilen biyopolimerlerdir. Bu polimerler, kimyasal yapılarının istenen özelliklere göre modifiye edilebilmesi ve düşük immün yanıt oluşturmaları nedeniyle biyomedikal uygulamalar için oldukça uygun materyaller olarak öne çıkmaktadır. Bununla birlikte, işlem basamaklarındaki teknik zorluklar gibi bazı sınırlamalara da sahiptirler(Lee & Shin, 2007).

Kollajen, laminin, fibronectin, glikozaminoglikan, kitosan, dekstran ve jelatin gibi doğal polimerler, omurilik yaralanmalarının tedavisinde üç boyutlu iskele ve hidrojel formüllerinde başarıyla uygulanmış olup, çeşitli araştırma alanlarında da etkinlikleri rapor edilmiştir(Salgado et al., 2009).

Kollajen ve Biyolojik Önemi

Kollajen, insan vücudunda en bol bulunan bağ dokusu bileşenidir. Hayvansal proteinlerin yaklaşık %30'unu oluşturan kollajenin şu ana kadar 29 farklı yapısal formu tanımlanmıştır. Tip I kollajen, kemik, tendon ve derinin temel bileşeni olup, en yaygın bulunan fibriler kollajen tipidir. Hücre soylarının çoğalması, farklılaşması ve metabolik süreçlerini sürdürebilmesi için uygun bir yüzeye tutunma gereksinimi bulunmaktadır. Kollajenin hücre adhezyonunda kritik rol oynayan integrin proteinine bağlanma bölgeleri, yüzeye bağlı hücrelerin ilk tutunma aşamasında ve kültürde canlılığının devamlılığında büyük öneme sahiptir(Gelse, Pöschl, & Aigner, 2003).

Hücre dışı matriks proteinlerinden türeyen kollajen ve laminin gibi proteinler, reseptör aracılı hücre tutunmasını başlatarak bölgesel adhezyonun yapısını düzenlemektedir(S. S. Rao & Winter, 2009). Bu mekanizma, hücrelerin biyomateriyallere olan başarılı entegrasyonu için temel oluşturmakta ve doku rejenerasyon süreçlerinin verimliliğini artırmaktadır. Doğal polimerlerin bu biyolojik tanınma özellikleri, onları sentetik alternatiflerine kıyasla doku mühendisliği uygulamalarında özellikle değerli kılmaktadır.

Polimer sentezleri

Polimerlerin karıştırılmasındaki temel amaç, sentetik ve biyolojik polimerlerin avantajlı özelliklerini birleştirerek, hücre kültürü için optimize edilmiş yapılar elde etmektir. Farklı polimerlerin birlikte çözündürülmesiyle, orijinal polimerlerden farklı fiziksel özellikler ve yüzey karakteristikleri sergileyen yeni polimer karışımları tasarlanabilmektedir.

Sentetik polimerlerin bozunma mekanizması genellikle hidrolitik reaksiyonlar ile sınırlı olup, enzimatik parçalanmaya direnç göstermektedir. Bu durum, polimerin bozunma hızının farklı fizyolojik sistemler ve bireyler arasında değişkenlik göstermesini minimize etmektedir. Sentetik ve biyolojik polimerlerin kombinasyonundan oluşturulan kopolimerler ise, her iki polimer grubunun farklı özelliklerini bir arada taşıyabilme kapasitesi açısından önemli avantajlar sunmaktadır.

Bu hibrit yaklaşım sayesinde, oluşturulan polimer karışımlarına hedeflenen mekanik özellikler ve kontrollü biyodegradasyon profilleri kazandırılabilir(X. Yang et al., 2010). Özellikle, doğal polimerlerin biyolojik tanınma özellikleri ile sentetik polimerlerin mekanik dayanım ve kontrollü bozunma karakteristiklerini birleştiren hibrit sistemler, rejeneratif tıp alanında umut verici çözümler sunmaktadır.

Doku İskeleleri ve Fabrikasyon Metodları

Doku mühendisliğinde in vitro ve in vivo uygulamalar için iskele yapılarının tasarımı ve üretimi, çok sayıda parametrenin dikkatle değerlendirilmesini gerektiren kritik bir süreçtir. İskele üretiminde dikkate alınması gereken temel kriterler şunlardır:

İskele Tasarım Kriterleri:

- Hedef dokuya uygun mekanik özellikler ve ayarlanabilirlik
- Rejenere edilecek doku boyutuyla uyum
- Biyouyumluluk ve kontrollü degradasyon
- 100-400 µm aralığında optimal gözenek boyutları
- Besin difüzyonu ve metabolik atık uzaklaşımına izin verme
- Hücre adhezyonunu artırıcı yüzey modifikasyonları
- Tekrarlanabilirlik ve sterilizasyon kolaylığı
- Yüzey yükü ve hidrofilik/hidrofobik dengenin kontrolü(Burg, Porter, & Kellam, 2000; Schmidt & Leach, 2003).

Biouyumluluk ve Entegrasyon:

İskele materyalinin immün reaksiyon oluşturmaması ve sitotoksik etki göstermemesi esastır. Bu özellikler, vaskülarizasyon ve hücre infiltrasyonu için gereklidir(Rezwan, Chen, Blaker, & Boccaccini, 2006).

Mekanik Özellikler ve Degradasyon:

Kemik dokusu için kortikal kemik (100-230 MPa) ve süngerimsi kemik (2-12 MPa) basınç dayanımı değerlerine uyum gösterilmelidir(Lee & Shin, 2007). İdeal degradasyon profili, 4 aylık hücre kültürü ve 2 aylık implantasyon sonrasında 12-18 ay içinde tamamlanmalıdır(Hutmacher, 2000).

Fabrikasyon Yöntemleri:

Konvansiyonel Yöntemler:

- Fiber bağlama: Fiberlerin polimer kaplanması ve bağlantıların güçlendirilmesi
- Döküm parçacık uzaklaştırma: Tuz parçacıkları ile poröz yapı oluşturma
- Gaz köpüklendirme: Yüksek basınç altında gaz doyurma ile 100-500 µm gözenek oluşumu
- Dondurarak kurutma: Çözücü kristalizasyonu ile poröz yapı eldesi
- Faz ayrımı: Polimer/solvent sistemlerinde faz ayrışması
- Elektro-eğirme: Nanometreden mikron seviyesine fiber üretimi(Sachlos, Czernuszka, Gogolewski, & Dalby, 2003).

Elektro-eğirme Tekniği:

- Düşük maliyet ve sürekli fiber üretimi
- 3 nm'den mikron seviyesine kadar fiber boyut aralığı
- Geniş yüzey alanı ve yüksek porozite(G. H. Kim, 2008; Ndreu, Nikkola, Ylikauppilar, Ashammakhi, & Hasirci, 2008).

İleri Üretim Teknolojileri:

Hızlı prototipleme ve serbest katı hal teknikleri, geleneksel yöntemlerin sınırlamalarını aşmak için geliştirilmiştir:

CAD/CT Tabanlı Yöntemler:

- Bilgisayar destekli tasarım ve bilgisayarlı tomografi verileriyle 3B modelleme
- Katmanlı üretim ile hassas geometrik kontrol
- 20'den fazla serbest katı hal üretim yöntemi(Liu, Xia, & Czernuszka, 2007).
- Özel Üretim Teknikleri:
- Isı tabanlı: Eriterek birikim modellemesi (FDM), lazerle kalıplama (SLS)
- Yapıştırıcı tabanlı: Üç boyutlu modelleme (3DP)

- Işık tabanlı: Stereolitografi (SLA)(Liu Tsang & Bhatia, 2004; Yeong, Chua, Leong, & Chandrasekaran, 2004)
- Kalıp tabanlı: Mikrokürelerin ısırl yöntemle birleştirilmesi(Malafaya et al., 2005).

Bu yöntemler, doku iskelelerinin yapısal, tasarımsal ve gözenek özelliklerinin hassas kontrolüne olanak sağlayarak, hedef dokuya özgül optimize edilmiş yapıların üretilmesini mümkün kılmaktadır.

Doku İskelesi Üretim Yöntemi ve Yüzey Topografisinin Hücre Adhezyonu ve Farklılaşmasına Etkisi

Doku ve organ gelişimi ile rejenerasyon süreçlerinde, hücreler arası iletişim, hücre-hücre dışı matriks etkileşimleri ve sinyal molekülleri-çevre ilişkilerinden oluşan kompleks bir ağ yapısı rol oynamaktadır. Bu faktörlerin her biri, doku ve organ morfogenezini düzenleyen kritik sinyal yollarını oluşturmaktadır(Nisbet, Forsythe, Shen, Finkelstein, & Horne, 2009). Hücrelerin içinde bulunduğu mikroçevrenin yapısal özellikleri, biyokimyasal moleküllerin kompozisyonu, yüzey gerilimi, topografik yapı, elektriksel yük dağılımı ve manyetik alan gibi fizikokimyasal parametreler, hücre adhezyonu, proliferasyonu ve yönlendirilmesinde belirleyici rol oynamaktadır(Xie et al., 2009).

Geleneksel iki boyutlu hücre kültür sistemleri ile karşılaştırıldığında, hücre dışı matriksin doğal üç boyutlu mimarisini taklit eden sistemlerin, büyüme faktörlerini tutabilme kapasitesi, hücre adhezyonunu, çoğalmasını ve farklılaşmasını destekleyecek geometrik özelliklere sahip olduğu deneysel çalışmalarla gösterilmiştir(Dawson et al., 2008).

Hücre dışı matriksin primer işlevleri arasında, hücre adhezyonu ve proliferasyonu için mekanik destek sağlamanın yanı sıra, çeşitli biyokimyasal moleküllerin hücrelerle etkileşimine aracılık etmek bulunmaktadır. Doğal hücre dışı matriksin kollajen fibril kompozisyonunun yapısal ve üç boyutlu organizasyonunun

taklit edilmesinde, elektro-eğirme yöntemiyle üretilen nanofiberler etkili bir platform oluşturmakta ve fonksiyonel doku iskeleleri elde edilebilmektedir(Lim & Mao, 2009).

Hücrelerin yerleştirildiği çevresel yapının bileşenleri ile mikro ve makro topografik özellikleri, hücre tutunması, proliferasyonu ve göç mekanizmaları üzerinde önemli etkiye sahiptir. Lim ve meslektaşlarının adipoz dokudan izole edilmiş mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması üzerine yaptıkları çalışmada, elektro-eğrilmiş kollajen nanoyüzeyler üzerinde, iki boyutlu kollajen yapılara kıyasla iki kat daha yüksek osteojenik gen ekspresyonu tespit edilmiştir. Kollajen nanofiberlerin mekanik dayanım değerlerinin dokuzuncu günde azalma göstermesine rağmen, başlangıçtaki iskele-hücre etkileşim farklılıklarının gen ekspresyon profilindeki değişiklikleri açıkladığı öne sürülmüştür(Lim & Mao, 2009).

Doku mühendisliği uygulamalarında, hedeflenen hücre tipinin yönelimini etkileyen diğer bir faktör de fiberlerin çapı ve konsantrasyonudur. Bu parametreler hücre adhezyonu ve yönelimini doğrudan belirleyici niteliktedir. Fiber konsantrasyonunun artmasıyla hücre proliferasyonu fiber doğrultusunda gerçekleşirken, fiberler arası boşlukların artmasıyla hücreler farklı organizasyonlar oluşturabilmekte ve değişken morfolojik özellikler geliştirebilmektedir. Christopherson ve ekibinin yetişkin sıçan hipokampusundan elde edilen nöral kök hücrelerle yaptıkları çalışmada, farklı çaplarda fiberlerle kaplanmış iki polietersülfon-laminin yüzey kullanılmıştır. Küçük çaplı fiberler üzerindeki hücrelerin fiber matrisine yayılarak glia benzeri hücrelere farklılaşabildiği, buna karşılık geniş çaplı fiberler üzerinde kültüre edilen hücrelerin fiberler boyunca uzadığı ve farklılaşma göstermediği gözlemlenmiştir(Christopherson, Song, & Mao, 2009).

Kullanılan doku iskelesinin, hücre yüklenmesini takiben uzun süreli kültüre imkan tanınması ve hücre-iskele kompleksinin

yerini doğal doku alana kadar hücreleri destekleyici yapısal bütünlüğü koruması gerekmektedir. Bu amaçla kültürde kullanılmak üzere kararlı yapıda iskelelerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Lim ve çalışma arkadaşları, insan mezenkimal kök hücreleri ve kondrositlerle yürüttükleri araştırmada, hücre iskelesinin stabilitesi ile hücre proliferasyon etkinliği arasında doğru orantı olduğunu göstermişlerdir. Yüksek bozunma hızına sahip iskelelerde proliferasyon etkinliğinin azaldığı belirlenmiştir(Lim & Mao, 2009).

Kök Hücreler

Kök hücreler, kendilerini yenileme ve yeni kök hücre popülasyonları oluşturma kapasitesinin yanı sıra, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeline sahip klonojenik hücreler olarak tanımlanmaktadır(Rimondini & Mele, 2009).

Genel hücresel fonksiyonları yerine getirme, hücre ultra yapısı, bölünme ve kendini yenileme gibi temel özellikler açısından diğer hücrelerle benzerlik göstermekle birlikte, kök hücreler üç temel karakteristik özellik ile onlardan ayrılırlar.

- İlk olarak, kök hücreler, herhangi bir dokuya özgü yapısal morfolojiye sahip değildir ve belirli bir dokuya ait uzmanlaşmış işlevleri yerine getirmezler.
- İkinci olarak, "plastisite" olarak adlandırılan bir özellik sayesinde, özelleşmiş hücre serilerine dönüşebilirler (diferansiyasyon). Bu farklılaşma süreci, hücrenin gen ekspresyonundan kaynaklanan içsel sinyaller ve komşu hücreler ile mikroçevreden gelen büyüme faktörleri ve sinyalizasyon molekülleri gibi dışsal sinyaller tarafından düzenlenir.
- Üçüncü ve son olarak, kök hücreler yaşam süreleri boyunca defalarca bölünerek kendilerini yenileyebilir ve

bu sayede herhangi bir dokunun rejenerasyon sürecine katkıda bulunma potansiyeli taşırlar.

Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler, sahip oldukları diferansiyasyon potansiyeli temelinde kategorize edildiklerinde; bir bireyin tüm hücre tipleri ile ekstraembriyonik dokularını oluşturabilme kapasitesine sahip totipotent hücreler, üç germ tabakasından köken alan tüm hücre çeşitlerine dönüşebilen pluripotent hücreler, sınırlı sayıda ancak belirli bir hücre ailesi içindeki birden fazla hücre tipine farklılaşabilen multipotent hücreler ve yalnızca tek bir hücre tipini meydana getirebilen unipotent hücreler şeklinde sınıflandırılır. Kökenlerine dayalı sınıflandırmada ise, blastosist evresindeki iç hücre kütesinden elde edilen embriyonik kök hücreler ile postnatal dönemden itibaren çeşitli dokularda bulunan ve somatik kök hücreler olarak da adlandırılan erişkin kök hücreler olmak üzere iki ana grupta incelenmektedir(Fortier, 2005; M. S. Rao, 2004).

Mezenkimal Kök Hücreler (MSC)

Mezenkimal kök hücreler, bağ dokunun temelini oluşturan ve çok yönlü diferansiyasyon kapasiteleri ile dikkat çeken hücrelerdir. Bu hücreler, laboratuvar koşullarında özelliklerini kaybetmeden çoğalabilmekte ve sahip oldukları immünomodülatör etkiler sayesinde transplantasyon sonrasında doku reaksiyonuna yol açmamaktadır. Bu nitelikleri, onları klinik uygulamalar için son derece değerli bir kaynak haline getirmektedir. Mezenkimal kök hücreler, çok sayıda farklı hücre tipine farklılaşarak doku rejenerasyonunu sağlamaktadır(Barry & Murphy, 2004).

Bu hücreler, çeşitli fetal ve erişkin dokularından izole edilebilen, multipotent özellikteki stromal hücrelerdir. İmmünomodülasyon kabiliyetleri ve hücre bazlı tedavilerde sergiledikleri olumlu sonuçlar, onları bu alan için ideal bir seçenek konumuna getirmiştir. Kolay izole edilebilmeleri, çok sayıda fonksiyonel hücre tipine farklılaşabilmeleri, diferansiyasyon

kapasitelerini kaybetmeden kültür ortamında çoğaltılabilmeleri, hasarlı dokuya göç edebilmeleri ve immünsupresif ve anti-inflamatuar etkiler göstermeleri temel özellikleri arasında yer almaktadır. Ayrıca, doğal öldürücü hücreler, dendritik hücreler ile T ve B lenfositleri gibi bağışıklık sistemi hücreleri üzerinde düzenleyici bir role sahip oldukları bildirilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin, gen terapisi ve ilaç taşıyıcı sistemler için de uygun bir araç olduğu ifade edilmektedir (Barry & Murphy, 2004; Porada & Almeida-Porada, 2010).

Mezenkimal kök hücrelerin varlığına ilişkin ilk bulgular kemik iliğine dayanmaktadır. Friedenstein, kemik iliği kültüründe tespit ettiği ve yapışkanlık özelliği gösteren bu hücrelerin adiposit, kondrosit ve osteoblast gibi hücrelere dönüşebilme potansiyelini ortaya koymuştur. Başlangıçta fibroblast benzeri morfolojileri nedeniyle "kemik iliği stromal fibroblastları" olarak adlandırılan bu hücreler, sonrasında "mezenkimal kök hücre" terimi ile tanımlanmıştır.

Günümüzde kemik iliğinin yanı sıra iskelet kası, perikondriyum, dental pulpa, trabeküler kemik, dermis, kan, sinovyal membran, periodontal ligament ve süt dişi gibi çok çeşitli dokulardan mezenkimal kök hücre izolasyonu mümkün hale gelmiştir. Yapılan araştırmalar, multipotent erişkin kök hücrelerin yalnızca yüksek hücre yenilenme hızına sahip organ ve dokularda değil, aynı zamanda yağ dokusu ve periost gibi düşük turnover hızı gösteren dokularda da bulunduğunu göstermiştir (Hayashi, Katsube, Hirose, Ohgushi, & Ito, 2008; Shanti, Li, Nesti, Wang, & Tuan, 2007; Zuk et al., 2002).

Mezenkimal kök hücreler, kondrosit, osteoblast, adipozit, miyoblast, kardiyomiyosit, hepatosit, astrosit, fibroblast, nöron, tendon hücreleri ile endotelyal ve stromal hücrelere farklılaşma kapasitesine sahiptir. Günümüzde, geliştirilmiş spesifik protokoller sayesinde bu hücrelerin kültürlenmesi ve osteoprogenitör hücrelere

farklılaştırılması kolaylıkla sağlanabilmektedir(Hattori et al., 2004; Shanti et al., 2007).

İn vitro ve in vivo diferansiyasyon özelliği sergileyen mezenkimal kök hücreler, tedavide otojenik, allojenik ve ksenojenik formlarda, lokal ya da sistemik infüzyon yoluyla uygulanabilmektedir. İmmünkompetan hayvan modellerinde allojenik ve ksenojenik mezenkimal kök hücre transplantasyonunun uygunluğu ve başarısına dair çeşitli bilimsel raporlar bulunmaktadır(Arinzeh et al., 2003; Niemeyer, Szalay, Luginbühl, Südkamp, & Kasten, 2010; Planka et al., 2008).

Kemik iliğinde hematopoietik olmayan kök hücrelerin varlığı ilk olarak Alman patolog Cohnheim tarafından tespit edilmiştir. Daha sonra Friedenstein, Piatetzky-Shapiro ve Petrakova, yaptıkları çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin kemik rejenerasyon sürecini hızlandığını bildirmişlerdir. Çeşitli deneysel kemik defekt modellerinde mezenkimal kök hücrelerin iyileşme üzerindeki olumlu etkileri literatürde yer almaktadır.

Goel ve meslektaşları, tibial nonunion vakalarında kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin etkinliğini araştırdıkları prospektif çalışmada, hazırlanan kemik iliği aspiratının perkütan enjeksiyonunu takiben 20 hastanın 15'inde kırık bölgesinde iyileşme gözlemlenmiştir. Ortalama iyileşme süresi enjeksiyon sonrası 14 hafta olarak tespit edilmiştir(Goel et al., 2005). Benzer şekilde, Siwach ve çalışma arkadaşları, kırık veya distraksiyon sonrası kötü iyileşme veya nonunion problemi yaşayan 72 hastanın 69'unda, bölgeye otojen kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin perkütan uygulaması ile rejenerasyon gözlemlendiğini bildirmişlerdir(Goel et al., 2005; Kon et al., 2023) (Kon ve diğerleri, 2000).

Polimerik taşıyıcılar kullanılarak defekt bölgesine mezenkimal kök hücre implantasyonu da yaygın olarak kullanılan bir diğer yöntemdir. Bu taşıyıcıların büyüme faktörlerinin salınımını

sağlayacak özellikte olmasının, rejeneratif potansiyeli anlamlı derecede artırdığı tespit edilmiştir(Borden, Attawia, Khan, El-Amin, & Laurencin, 2004; Y. Takahashi, Yamamoto, & Tabata, 2005). Örneğin, Borden ve arkadaşları (2004) tavşan tibiasında oluşturdukları defekte polimerik bir matriks materyali ile birlikte mezenkimal kök hücre implante etmiş ve uygulamada kullanılan BMP-7'nin osteojenik aktiviteyi belirgin şekilde artırdığını göstermişlerdir(Borden et al., 2004).

Kemik doku mühendisliği çalışmalarında, kök hücrelerin defekt bölgesine transferi; otolog veya allojenik kaynaklı kök hücre kültürleri oluşturularak veya kaynak dokunun konsantre edilmesi yoluyla, hücre izolasyonu ve kültürü işlemine gerek duyulmaksızın gerçekleştirilebilmektedir. Otojen mezenkimal kök hücre kaynağından izole edilen hücre hatlarının kültürü, köpek vertebral iyileşme modelinde ve köpek ile koyunlarda tibia ve femurdaki segmental defekt modellerinde kullanılmıştır. Köpek femurunda oluşturulan segmental bir defektin iyileşmesinde, otojen kök hücre kültürünün hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat içeren seramik bir taşıyıcı ile birlikte uygulanmasının 12. haftada daha yüksek bir iyileşme etkinliği gösterdiği bildirilmiştir(Muschler et al., 2005).

Mezenkimal kök hücrelerin allojenik transferi sonrasında konakçıda immün bir reaksiyona neden olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum, rejeneratif tedavilerde kullanılmak üzere bu hücrelere ait hatların elde edilebileceği, çoğaltılabileceği ve kök hücre bankalarında saklanabileceği anlamına gelmektedir(Bartholomew et al., 2002; Damme, Driessche, Collen, & Chuah, 2002; Devine, Peter, Martin, Barry, & McIntosh, 2001; Meisel et al., 2004). Arinze ve çalışma arkadaşları, köpek femurunda oluşturdukları kritik boyuttaki bir defektin iyileşmesinde allojenik mezenkimal kök hücre kullanımını araştırmışlardır. Çeşitli gözenekli taşıyıcı tipleri ile implante edilen hücrelerin kemik rejenerasyonu sağladığı ve çalışma süresince herhangi bir immün reaksiyon veya antikör oluşumu

gözlemlenmediği bildirilmiştir. Araştırmacılar, allojenik kök hücrelerin kemik iyileşmesinde otojen kök hücreler kadar etkili bir şekilde kullanılabileceğini ve cerrahi tedavilerde uygulanmasının immünolojik açıdan güvenli olduğunu ifade etmişlerdir(Arinzeh et al., 2003).

Mezenkimal kök hücreler, tedavi edilmek istenen defekte, otolog hücre kaynağının konsantre edilmesi yoluyla da aktarılabilir. Bu yöntemde, kemik iliği aspiratı veya yağ dokusu gibi kaynaklar çeşitli seçici hücre tutulum teknikleri ile konsantre edilmekte ve hücre kültürü işlemi gerçekleştirilmeksizin intraoperatif olarak doğrudan transplante edilmektedir(Zuk et al., 2002). Ancak bu metod ile hücre kültürü yoluyla elde edilebilecek hücre yoğunluğuna ulaşamamaktadır.

Akita ve arkadaşları, nude-sıçanlarda oluşturdukları kranial kemik defektinin iyileşmesinde, insan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin etkinliğinin, insan rekombinant BMP-2 ve rekombinant bazik FGF ile arttığını gözlemlemişlerdir. Chang ve meslektaşları ise, insan BMP-2 genini kültür ortamındaki domuz kaynaklı mezenkimal kök hücrelere transfer etmişlerdir. Bu hücre kolonilerinin, tip I kollajen içerikli bir taşıyıcı ile domuz kraniumunda oluşturulan kemik defektine implantasyonu sonrasında, rejenerasyonun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde iyileştiğini bildirmişlerdir(Zuk et al., 2002).

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society for Cellular Therapy - ISCT), mezenkimal kök hücreler için elde edildikleri doku kaynağından bağımsız olarak geçerli üç temel tanımlayıcı kriter belirlemiştir. Bu kriterler şunlardır: birincisi, uygun kültür koşullarında plastik yüzeylere adhere olabilmek kapasitesi; ikincisi, akım sitometri analizleri ile değerlendirildiğinde hücre popülasyonunun %95'inden fazlasının CD105, CD73 ve CD90 gibi yüzey belirteçlerini pozitif olarak ifade etmesi, buna karşılık CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19 ve HLA-II gibi

hematopoietik köken belirteçlerini eksprese etmemesi; ve üçüncüsü, in vitro koşullarda osteojenik, adipojenik ve kondrojenik soy hatlarına farklılaşma potansiyelinin deneysel olarak gösterilebilmesidir.

Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması Von Kossa veya Alizarin Red boyamaları ile, kondrojenik farklılaşması Alcian blue ile, adipojenik farklılaşması ise Oil Red O boyaması ile tespit edilebilmektedir(Dominici et al., 2006; Spitkovsky & Hescheler, 2008).

Kültürdeki mezenkimal kök hücrelerin eksprese ettikleri yüzey molekülleri detaylı bir şekilde karakterize edilmiş olmakla birlikte, bu hücrelere özgü tek ve benzersiz bir antijen henüz tanımlanamamıştır(Docheva, Popov, Mutschler, & Schieker, 2007). Farklı dokulardan izole edilen mezenkimal kök hücre hatlarının antijenik profilleri incelendiğinde, kaynağa bağlı farklılıklar olduğu gözlemlenmektedir. Örneğin, Dominici ve meslektaşları kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin CD106 pozitif ve CD49d negatif olduğunu, buna karşın adipoz doku kaynaklı olanların ise CD49d pozitif ve CD106 negatif ekspresyon profili sergilediğini rapor etmişlerdir(Dominici et al., 2006).

Mezenkimal kök hücrelerin hasarlı doku onarımını ve rejenerasyonunu sağlama mekanizmaları çok yönlüdür. Bu mekanizmalar arasında, doğrudan özelleşmiş hücre tiplerine (osteoblast, kondrosit vb.) farklılaşmaları, hasarlı hücreler ile füzyon yaparak onların fonksiyonlarını yeniden kazanmalarını sağlamaları ve parakrin etkiyle çözünebilir faktörler (büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler), enzimler ve hücre dışı matriks bileşenleri salgılayarak hücreler arası iletişimi ve mikroçevreyi düzenlemeleri sayılabilir. Araştırmacılar, özellikle bu parakrin sinyallerin ve hücre-matriks etkileşimlerinin rejeneratif süreçteki kritik rolünün altını çizmektedir(Stappenbeck & Miyoshi, 2009).

Mezenkimal kök hücrelerin bulundukları niş içinde geniş bir yelpazedeki sitokin, kemokin, enzim ve diğer biyoaktif molekülleri aktif olarak sentezlediği bilinmektedir. Fox ve arkadaşları (2007), kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15 gibi çeşitli interlökinlerin yanı sıra, M-CSF, Flt-ligand, Kök Hücre Faktörü (SCF), SDF-1-alfa ve MCP-1 gibi önemli kemokinleri de ürettiğini göstermişlerdir (Fox, Chamberlain, Ashton, & Middleton, 2007).

İnsan ve hayvan modellerinde, mezenkimal kök hücrelerin immünomodulator ve anti-inflamatuvar etkilerini; B lenfosit aktivitesinin inhibisyonu, düzenleyici T hücrelerinin (Treg) stimülasyonu ve T lenfosit aktivasyonunun baskılanması yoluyla gösterdiği anlaşılmıştır. Bunlara ek olarak, bu hücrelerin antiapoptotik (hücre ölümünü engelleyici), antifibrotik ve anjiyojenik (damar oluşumunu teşvik edici) özelliklere de sahip olduğu tanımlanmıştır (Jaquet et al., 2005; Nauta, Kruisselbrink, Lurvink, Willemze, & Fibbe, 2006). Tüm bu işlevler, mezenkimal kök hücrelerin hasarlı dokulardaki onarıcı rollerini açıklayan temel mekanizmaları oluşturmaktadır.

Mezenkimal kök hücrelerin bir diğer önemli özelliği de, bulundukları orijin dokudan ayrılarak kan dolaşımı yoluyla hasarlı bölgeye göç edebilmeleridir (homing). Bu migrasyon sürecini başlatan temel uyarının, hasarlı doku tarafından salınan SDF-1, MCP-1 ve kompleman sisteminin bir bileşeni olan C3a gibi kemotaktik faktörler olduğu tespit edilmiştir (Xu et al., 2010).

Dental Folikül Kaynaklı Kök Hücreler (DFSC)

Dental folikül kaynaklı kök hücreler (DFSC), diş germini saran ektomezenkimal orijinli bir yapı olan dental folikül dokusundan izole edilmektedir (C. Morscheck et al., 2005). Bu hücrelerin karakterizasyonu, mezenkimal kök hücre belirteçlerini (CD105, CD44, CD29, CD73, CD90, CD146, STRO-1, Notch 1 ve HLA-ABC) ifade ettiklerini, buna karşılık hematopoietik kök hücre

belirteçlerini (CD34, CD31, CD45, CD117 ve CD14) eksprese etmediklerini göstermiştir. Ayrıca DFSC'ler, nöral kök hücre belirteçleri (Nestin ve β -III-tubulin), nöral krest kök hücre belirteçleri (P75 ve HnK1) ve glial hücre belirteci (GFAP) de dâhil olmak üzere çok çeşitli bir marker profili sergilemektedir. Bunlara ek olarak, pluripotentlik belirteçleri (OCT4, NANOG ve SOX2) ve immünolojik faktörler (IL-6 ve TLR4) de bu hücrelerde ifade edilmektedir(Lima et al., 2017). Bu hücrelerin izolasyonuna ilişkin ilk çalışma, Handa ve meslektaşları (2002) tarafından sıgır dokusu kullanılarak gerçekleştirilmiştir(Handa et al., 2002). Dental folikülün, diş sürme sürecinde osteoblastik ve osteoklastik aktiviteyi düzenleyerek kemik remodelasyonunda kritik bir rol oynadığı bilinmektedir.

Yapılan araştırmalar, DFSC'lerin periodontal ligament fibroblastları, adipositler, nöronlar ve alveolar kemik osteoblastları gibi çeşitli hücre tiplerine farklılaşabildiğini ve belirgin bir osteojenik ve proliferatif potansiyel sergilediğini ortaya koymuştur(Felthaus et al., 2010; Kémoun et al., 2007; Mori et al., 2012; Yao et al., 2013). Ayrıca bu hücrelerin nestin, Notch-1, STRO-1, Runx-2 gibi önemli hücre içi proteinlerinin yanı sıra, tip I kollajen ve osteokalsin gibi kemik matriks proteinlerini de eksprese ettiği bildirilmiştir(C. Morszeck, 2006).

İnsan kaynaklı DFSC'lerin in vitro koşullarda osteojenik farklılaşma kapasitesi birçok çalışma ile doğrulanmıştır. DFSC'ler, deksametazon, β -gliserofosfat ve askorbik asit içeren bir ortamda osteoblastlara farklılaşabilmektedir. Osteojenik farklılaşma sürecinde, runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (RUNX-2), alkalin fosfataz (ALP), kemik sialoproteini (BSP), osteokalsin (OCN), osterix ve Distal-less homeobox-5 (DLX-5) gibi osteojenik belirteçlerin ekspresyonunda artış gözlemlenmektedir(Felthaus, Gosau, & Morszeck, 2014; K. Takahashi et al., 2013; Zhao et al., 2002). Bu belirteçlerden RUNX-2 ve ALP erken dönem markerları

olup, osterix ise RUNX-2'nin yolağında yer alan ve osteopontin (OPN) gibi hücre dışı matriks proteinlerinin ekspresyonunu düzenleyerek osteoblastların nihai farklılaşmasında rol oynayan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. DFSC'lerin osteojenik farklılaşma mekanizması karmaşık olup, sitokinler, hücre-hücre etkileşimleri ve çoklu sinyal yolları gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Sitokinlerin etkisi bağlamında, BMP2'nin DFSC'lerde Distal-less homeobox 3 (DLX3) ekspresyonunu indüklediği ve DLX3 susturulmasının neden olduğu osteojenik farklılaşma inhibisyonunu geri çevirdiği gösterilmiştir(Viale-Bouroncle et al., 2012). Benzer şekilde, DFC'lerin osteojenik indüksiyonu sırasında BMP6 ekspresyonunun arttığı ve eksojen BMP6 uygulamasının osteoblast ilişkili faktörlerin (DLX-5, RUNX2, osterix) ekspresyonunu artırdığı rapor edilmiştir(K. Takahashi et al., 2013). DFSC'lerde BMP6'nın RNA ile susturulması osteogenezi zayıflatmış, ancak insan rekombinant BMP6'nın bu etkiyi tersine çevirebildiği gözlemlenmiştir(Yao et al., 2013). EGR1 ifadesinin DFSC'lerin osteojenik farklılaşması sırasında arttığı ve bu süreci teşvik ettiği bilinmektedir. Dentin matriks proteini 1 (DMP1) ifadesinin DFSC'lerde arttığı ve osteojenik farklılaşmayı desteklediği tespit edilmiştir. Deksametazonun, ZBTB16 transkripsiyon faktörünün üretimini indükleyerek DFSC'lerin osteojenik farklılaşmasını teşvik ettiği bildirilmiştir. Buna karşılık, paratiroid hormonu ilişkili peptidin (PTHrP) ise DFC'lerin osteojenik farklılaşmasını inhibe edici bir rol oynadığı anlaşılmıştır(Klingelhöffer, Reck, Ettl, & Morsczeck, 2016; Christian Morsczeck & Reichert, 2017; Rezai Rad et al., 2015). Kültür koşullarının etkisine gelince, Xi ve ark. hipoksinin DFSC'lerde osteojenik farklılaşmayı teşvik ettiğini, pluripotensi koruduğunu ve göç ile proliferasyonu artırdığını göstermiştir(Xi, Guoqing, & Weidong, 2017). Apikal papilla kök hücreleri (SCAP'lar) ile ko-kültürün ise DFSC'lerin osteogenezini ve

fibroblast farklılaşmasını inhibe ettiği, bu durumun kök gelişiminden önce DFSC'lerin farklılaşmamış durumunu koruyabildiğine işaret ettiği düşünülmektedir(Wu et al., 2018).

DFSC'lerin osteojenik farklılaşmasında çoklu sinyal yolları rol oynamaktadır. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı, bu süreçte üzerinde en fazla çalışılan yollardan biridir ve DFSC'lerin osteogenezinde ve sementojenik farklılaşmasında aktif bir role sahiptir. Hedgehog sinyal yolağının dış gelişimi için gerekli olmasına rağmen, Morsczeck ve ark. BMP2 ile indüklenen osteogenez sırasında bu yolağın inhibe edildiğini gözlemlemiştir(C. Morsczeck, Reck, & Beck, 2017). Viale-Bouroncle ve ark. NOTCH1 sinyal yolağının DLX3 tarafından aktive edilebildiğini ve aktive olmuş NOTCH1 sinyal yolağının DFSC'lerin osteojenik farklılaşmasını inhibe ettiğini tespit etmiştir(Viale-Bouroncle, Gosau, & Morsczeck, 2014).

Fare modellerine yapılan transplantasyon sonucunda, bu hücrelerin osteokalsin ve kemik sialoproteini ekspresyonu ile karakterize edilen, fibröz ve rijit dokuların oluşumunu indüklediği gözlemlenmiştir(C. Morsczeck et al., 2005; Christian Morsczeck et al., 2008) Honda ve çalışma arkadaşları (2011) tarafından yapılan bir araştırmada ise, DFSC'lerin sıçanlarda oluşturulan kritik boyuttaki kalvarial kemik defektlerine transplante edildiğinde, yeni kemik oluşumunu anlamlı derecede indüklediği deneysel olarak gösterilmiştir(Honda et al., 2011). Rezai-rad ve ark. tarafından yapılan çalışmada, polikaprolakton ve DFSC kombinasyonunun immüno kompetan sıçanlardaki kafatası defektlerine implantasyonu sonucunda, 8 hafta sonunda belirgin yeni kemik oluşumu gözlemlenmiştir(Rezai-Rad et al., 2015). Ancak, DFSC'lerin osteojenik farklılaşmasının moleküller veya büyüme faktörleri gibi mikroçevresel uyaranlar tarafından indüklenmesi gerekmektedir. İndüksiyon olmadan, DFSC'lerin mineralize doku veya kemik oluşturma yeteneği sınırlı kalmaktadır. Ayrıca, pasaj sayısı arttıkça,

DFSC'lerin in vivo şartlarda sert doku oluşturma yeteneğini kaybederek bağ dokusu oluşturduğu gözlemlenmiştir. Dental implantlar ve kemik onarımında kullanılan başlıca malzemeler titanyum ve seramiklerdir. Lucaciu ve ark. farklı biyoaktif kaplamalarla muamele edilmiş titanyum implant yüzeylerinde yapılan çalışmalarda, DFSC'lerin kemik rejenerasyonunu iyileştirdiğini ve hidroksiapatit ile muamele edilmiş titanyum yüzeyinin hücre adezyonu ve proliferasyonu için daha uygun olduğunu belirtmiştir(Lucaciu et al., 2015).

Dental Pulpa Kaynaklı Kök Hücreler (DPSC)

Yirmi yaş dişlerinden izole edilen dental pulpa kök hücrelerinin, kıkırdak hücreleri, nöronal doku, endotel, iskelet kası ve düz kas hücreleri, adipozit ve osteoblastlar gibi çok çeşitli hücre soylarına farklılaşabildiği literatürde rapor edilmiştir(d'Aquino et al., 2007; Jo et al., 2007; Laino et al., 2005; Zhang, Walboomers, Shi, Fan, & Jansen, 2006). Uygun indüksiyon ortamında mineralize doku oluşturma kapasitesi sayesinde, DPSC'ler kemik rejenerasyonunu hedefleyen doku mühendisliği araştırmaları için son derece uygun bir hücre kaynağı olarak değerlendirilmektedir(Wei, Ling, Wu, Liu, & Xiao, 2007). DPSC'lerin dondurularak saklanması ve sonrasında çözülmesi işlemlerinin ardından dahi yüksek canlılık oranına sahip hücre populasyonları elde edilebilmektedir. Bu özellikleriyle DPSC'ler, doku bankacılığı uygulamalarında kullanılabilecek, görece kolay erişilebilir kaynaklar olarak öne çıkmaktadır.

DPSC'ler, sahip oldukları immünomodülatör ve anti-inflamatuar etkiler nedeniyle, allojenik transplantasyon sonrasında immün bir reaksiyon oluşturma eğilimi göstermemektedir. Bu baskılayıcı etkinin, T lenfositlerinin proliferasyonunun engellenmesi mekanizması üzerinden gerçekleştiği belirtilmektedir(D'Aquino, Papaccio, Laino, & Graziano, 2008).

Laino ve meslektaşlarının, yetişkin bireylerden elde edilmiş gömülü yirmi yaş dişi kaynaklı DPSC'leri kullandıkları çalışmada,

bu hücrelerin birçok doku tipine farklılaşabilmesinin yanı sıra özellikle osteoblastik farklılaşma kapasitesinin oldukça yüksek olduğu vurgulanmıştır. Araştırmacılar, bu hücrelerin rejeneratif cerrahi uygulamalarda önemli bir yer tutan otolog kemik greftlerine alternatif bir kaynak olabileceğini ifade etmişlerdir(Laino et al., 2006).

Gronthos ve çalışma arkadaşları, yirmi yaş dışından elde edilen DPSC'leri kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile karşılaştırdıkları araştırmalarında, DPSC'lerin daha yüksek bir proliferasyon yeteneğine sahip olduğunu ortaya koymuş ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden farklı plastisite özellikleri sergilediklerini rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada, DPSC'lerin fibroblast (tip III kollajen ve fibroblast büyüme faktörü 2), kemik (alkalen fosfataz, tip 1 kollajen, osteonektin, osteopontin, osteokalsin), düz kas (alfa-SM aktin) ve endotel (VCAM-1 ve MUC-18) hücrelerine özgü yüzey antijenlerini eksprese ettiği ve tüm kültür popülasyonunun heterojen bir karakter taşıdığı bildirilmiştir(Gronthos, Mankani, Brahim, Robey, & Shi, 2000).

Todorović ve meslektaşları ise yaptıkları çalışmada, DPSC'ler ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin gen ekspresyon profillerindeki farklılıkları incelemiş ve DPSC'lerin sahip olduğu yüksek proliferasyon oranını, artmış siklin-bağımlı kinaz-6 (CDK6) ekspresyonuna bağlamışlardır(Todorovic et al., 2008).

Tüm bu özellikleri göz önüne alındığında, DPSC'lerin periodontal doku, kemik ve kıkırdak rekonstrüksiyonunun yanı sıra, kas dokusu ve nöronal dokunun onarımında da önemli bir tedavi potansiyeli taşıdığı sonucuna varılmaktadır.

Doku mühendisliğinin temel prensibi, canlı sistemlerin karmaşık yapı taşlarını taklit ederek rejeneratif bir tedavi stratejisi geliştirmektir. Bu üçlü sistem; uygun hücre kaynağı, bu hücrelere üç boyutlu bir büyüme ve organizasyon ortamı sağlayan bir iskele

(scaffold) yapısı ve hücre davranışını yönlendiren biyoaktif sinyallerden oluşur. Dental kaynaklı kök hücreler, özellikle de Dental Pulpa Kök Hücreleri (DPSC) ve Dental Folikül Kök Hücreleri (DFSC), bir önceki bölümde etraflıca incelendiği üzere, bu üçlü sistemin "hücre" ayağı için son derece güçlü adaylardır. Sahip oldukları çoklu diferansiyasyon kapasitesi, yüksek proliferatif aktivite ve özellikle mineralize doku oluşturma yönündeki belirgin eğilimleri, onları kemik rejenerasyonu hedefli araştırmaların odağına yerleştirmiştir.

Ancak, bu biyolojik potansiyelin başarılı bir şekilde mobilize edilmesi ve klinik uygulamaya aktarılabilmesi, kritik olarak "mühendislik" boyutuna bağlıdır. Hücreler, doğal ortamlarında asla izole bir şekilde bulunmaz; aksine, hücre dışı matriks (ECM) adı verilen, hücreler tarafından salgılanan ve onları çevreleyen üç boyutlu, dinamik ve biyoaktif bir ağ içinde yaşarlar. Bu matriks, hücrelere sadece mekanik bir destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda adhezyon, migrasyon, proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi temel hücresel süreçleri doğrudan düzenleyen biyokimyasal ve biyofiziksel sinyallerin ileticisidir. Dolayısıyla, rejeneratif tıp uygulamalarında başarı, bu doğal mikroçevrenin mümkün olduğunca aslına yakın taklit edilebilmesiyle doğru orantılıdır.

Sentetik bir biyopolimer olan **Polikaprolakton (PCL)**, doku iskelesi tasarımında öne çıkan bir malzemedir. PCL'nin bu denli yaygın kabul görmesinin ardında yatan temel özellikleri şu şekilde sıralamak mümkündür:

- **Mükemmel Biyouyumluluk:** PCL, vücut içinde zararlı bir enflamatuar yanıtı tetiklemez ve çevre dokularla uyum içinde bulunur.
- **Kontrollü Biyobozunurluk:** Hidroliz yoluyla, yavaş ve kontrollü bir şekilde bozunur. Bu özellik, yeni dokunun oluşum hızı ile iskelenin absorbe olma hızının senkronize

olmasını sağlayarak, uzun vadede mekanik destek sunar. Bozunma ürünleri vücut tarafından metabolize edilebilir.

- **İşlenebilirlik:** Ergimiş halde elektroegirme, 3D baskı gibi çeşitli ileri imalat teknikleri ile işlenebilmesi, iskelenin mimarisinin (gözenek boyutu, gözeneklilik, por bağlantıları) hassasiyetle kontrol edilebilmesine olanak tanır.
- **Mekanik Dayanım:** Diğer birçok biyobozunur polimere kıyasla daha üstün mekanik özelliklere sahiptir, bu da yük taşıyan kemik dokularının rejenerasyonu için büyük bir avantaj teşkil eder.
- **FDA Onayı ve Ekonomiklik:** Klinik kullanım için onaylı olması ve nispeten düşük maliyeti, araştırma ve geliştirme süreçlerini kolaylaştırır.

Özellikle **elektroegirme tekniği** ile üretilen PCL nano-lifli iskeleler, doğal ECM'nin fibröz nano yapısını taklit etme konusunda başarıya sahiptir. Yüksek yüzey alanı ve hacim oranı, hücre adhezyonu ve yayılımı için ideal bir saha oluştururken, birbirine bağlı gözenek ağı, besin ve metabolik atıkların difüzyonuna, damar oluşumuna ve hücre göçüne imkan verir.

Literatür incelendiğinde, PCL iskelelerin kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ve adipoz doku kaynaklı kök hücreler ile kemik rejenerasyonu amacıyla kullanıldığına dair çalışmalar mevcuttur. Ancak, dental kaynaklı kök hücrelerin, özellikle de DPSC ve DFSC'nin PCL iskeleler üzerindeki davranışlarını, canlılıklarını ve en nihayetinde osteojenik fenotiplerini sistematik ve karşılaştırmalı bir şekilde inceleyen çalışmalar, literatürde önemli bir boşluğu işaret etmektedir. Bu boşluk, aşağıdaki temel soruların yanıtlanmasını akademik bir gereklilik haline getirmektedir:

- **Hücre-İskele Etkileşimleri:** DPSC ve DFSC'ler, PCL'nin nano lifli topografisine nasıl bir morfolojik ve proliferatif yanıt vermektedir? Hücre yayılımı,

morfolojisi ve populasyon dinamikleri, bu iki farklı hücre tipi arasında anlamlı farklılıklar göstermekte midir? Hücreler, iskele yüzeyinde nasıl bir adhezyon ve ekspresyon profili sergilemektedir?

- **Osteojenik Diferansiyasyonun Kinetiği ve Kalitesi:** PCL iskele üzerinde osteojenik indüksiyona maruz bırakıldıklarında, DPSC ve DFSC'lerin farklılaşma kinetiği nasıldır? Hangi hücre tipi daha etkili ve verimli bir osteojenik yanıt oluşturmaktadır?
- **Mikroçevresel Faktörlerin Rolü:** İskele mimarisinin (gözenek boyutu, lif çapı) ve mekanik özelliklerinin, her iki hücre tipinin osteojenik profili üzerindeki etkisi nedir? PCL iskele, optimal bir osteojenik mikroçevre sağlamak için gerekli olan mekano transdüksiyon sinyallerini iletebilmekte midir?
- **Mineralize Matriks Sentezi ve Organizasyonu:** Nihai hedef olan mineralize doku veya öncülünün oluşumu, üç boyutlu PCL iskele yapısı içinde ne ölçüde gerçekleşmektedir? Oluşan matriksin içeriği ve özellikleri, immatür kemiğe ne derece yakındır?

Bu bölümün devamında sunulan çalışma, yukarıda ortaya konan teorik ve pratik gereksinimler ışığında şekillenmiştir. Bu bölüm, dental kök hücre biyolojisi ile biyomateryal mühendisliğini bir araya getiren kapsamlı bir deneysel yaklaşımın ürünüdür. Takip eden kısımlarda, öncelikle DPSC ve DFSC'lerin izolasyon, kültür ve karakterizasyon protokolleri detaylandırılacak; ardından PCL nanolifli iskelelerin morfolojik karakterizasyonu sunulacaktır. Sonrasında, hücre-iskele komplekslerinin oluşturulma süreci ve bu yapılar üzerinde gerçekleştirilen ileri hücresel analizlerin (canlılık, proliferasyon, adhezyon morfolojisi) ve osteojenik farklılaşmanın bulguları, karşılaştırmalı bir perspektifle rapor edilecektir.

Bu kapsamlı analizlerin nihai hedefi, yalnızca bu iki değerli hücre kaynağının PCL ile uyumluluğunu belgelemek değil, aynı zamanda kemik doku mühendisliği için hangi hücre-iskele kombinasyonunun daha üstün bir rejeneratif strateji vaat ettiğine dair kanıta dayalı bir değerlendirme sunmaktır. Bu çaba, temel bilim ile uygulamalı tıp arasında bir köprü kurmayı ve nihayetinde dental kök hücrelerin klinik potansiyelini en üst düzeye çıkaracak optimizasyon stratejilerine ışık tutmayı amaçlamaktadır.

Pcl Doku İskeleleri İle Kültüre Edilen Dental Folikül Kök Hücreleri Ve Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Osteojenik Etkilerinin Translasyonel Kemik Doku Mühendisliği Protokolü İle Karşılaştırılması

Gereç Ve Yöntem

Bu in vitro çalışma, Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu' nun 27.06.2014 tarih ve 10840098 - 153 sayılı raporu ile onaylanmıştır.

Çalışmada, kemik doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak tasarlanmış iki farklı morfolojideki polikaprolakton (PCL) tabanlı doku iskelesi kullanılmıştır. Bu iskeleler, üç boyutlu, ağsı ve gözenekli bir yapıya sahip olup, gamma ışınlaması yöntemi ile sterilize edilmiştir. İskelelerin temel tasarımı, 96'lık kültür kuyularıyla uyumlu olacak şekilde 5 mm çapında ve 1.5 mm kalınlığında standart diskler formundadır.

Kullanılan iskele tipleri şu şekildedir:

Polikaprolakton Mesh (PCLm): Tamamen birbirine 90° açıyla yerleştirilmiş, 300 mikrometre çapındaki PCL fiberlerden oluşan üç boyutlu bir ağ yapısından ibarettir. Fiberler arasında kalan ve yaklaşık 500 mikrometre boyutundaki boşluklar, hücre infiltrasyonu ve besiyeri difüzyonu için uygun bir gözenekli yapı oluşturmaktadır.

Polikaprolakton Nanomesh (PCLnm): PCLm yapısının temelini oluşturduğu, ancak buna ek olarak alt kısmında elektroegirme (electrospinning) tekniği ile üretilmiş bir bazal membran tabakası bulunan kompozit bir iskeledir. Bu nano-yapılı katman, hücrelerin başlangıçtaki adhezyonu ve yayılımı için doğal ekstraselüler matrikse benzer bir yapı görevi görmektedir.

Bu çalışmada kullanılan her iki iskele tipinin geometrik ve yapısal parametreleri, Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (National Institute of Standards and Technology-NIST) tarafından üç boyutlu doku iskeleleri için bir referans model olarak tanımlanmıştır. Bu durum, çalışmanın standardizasyonu ve sonuçların literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırılabilirliği açısından büyük önem taşımaktadır.

Mezenkimal kök hücre izolasyonu ve kültüre edilmesi

DPSC ve DFSC izolasyonu

Kök hücre izolasyonu için, tamamen gömülü durumda olan ve çekim endikasyonu bulunan, aksi takdirde tıbbi atık statüsünde değerlendirilecek olan yirmi yaş dişleri kullanılmıştır. Çekimi takiben, dişler steril koşullarda kırılarak pulpa ve dental folikül dokuları alınmıştır. Elde edilen bu dokular, steril bir bistüri kullanılarak birkaç küçük parçaya ayrılmıştır.

Doku parçaları steril bir 15 ml'lik tüpe aktarılmış ve üzerlerine 2 ml Tip I kollajenaz enzim çözeltisi ilave edilmiştir. Enzimatik sindirim işlemi için tüp, 37°C'deki bir etüvde 1 saat süreyle inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında hücre süspansiyonu, sindirilmemiş doku parçacıklarından arındırmak amacıyla 70 µm'lik bir hücre süzgecinden geçirilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu, enzim kalıntılarını uzaklaştırmak için ardışık iki kez fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmıştır. İşlem sonrasında supernatant atılmış ve kalan hücre peletine 1 ml kültür besiyeri ilave edilerek pipetaj ile homojen

bir süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyon son olarak bir T25 flaska ekilmiştir.

Flasklar, 37°C ve %5 CO₂ koşullarında muhafaza edilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlamak amacıyla, ilk ekim sonrasında kültürler 72 saat süreyle besiyeri değiştirilmeden bırakılmıştır. Bu sürenin ardından, her üç günde bir düzenli besiyeri değişimi yapılmıştır. Hücreler flask yüzeyinde %80'in üzerinde konfluense ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

İzole edilen hücrelerin pasajlanması

T-25 cm²'lik flasklar içerisinde inkübatöre konulan hücrelerin her 3 günde bir kültür medyumunu değiştirilerek hücrelerin flask yüzeyine yayılmasının takibi yapıldı. Yaklaşık 10-15 gün sonrasında hücreler flask yüzeyinde yaklaşık %70 yoğunluk gösterdiğinde pasaj işlemi yapılarak, birinci kültür sıfıncı pasaj (P0) kabul edilerek, birinci kültürü takip eden her kültür işlemi sonrası pasaj sayıları P1, P2, P3 şeklinde belirtilmiştir.

Steril kabin içerisinde flasklardaki hücre medyumunu uzaklaştırılıp, flasklara 5 ml DPBS konularak hücreler DPBS ile yıkanmıştır. DPBS hücrelerden uzaklaştırıldıktan sonra flasklara 500 µl Tripsin-EDTA eklenerek inkübatörde 4 dakika bekletilmiştir. 4 dakikanın sonunda flask içerisindeki tripsinin inaktivasyonu için 4 ml kültür medyumunu eklenip flask içerisindeki sıvı 15 ml'lik konik kapaklı tüplere aktarılmıştır. 1200 rpm' de 5 dk santrifüj yapıp, santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve hücreler tekrar kültür medyumunu ile yıkayıp, santrifüj yapılmıştır. Sonrasında süpernatant uzaklaştırılıp, 1 ml kültür medyumunu eklenerek pipetaj yapıp, homojenizasyon sağlandıktan sonra hücre sayımı yapılmıştır.

Hücre sayımı işlemi için, 1 ml kültür medyumunu içerisinde homojenize edilen hücrelerden 10 µl Eppendorf tüpüne aktarılacak üzerine 10 µl tripan mavisi solüsyonu eklenmiştir. Sayım için kullanılan Thoma lamı düz bir zemin üzerine alınarak sayım

yapılacak alan üzerine lamel kapatılmıştır. Hazırlanıp Eppendorf tüpüne konulan süspansiyondan 10 µl alınarak Thoma lamında sayım yapılacak alanda lam ile lamelin birleştiği noktaya pipet ile yavaşça hücre süspansiyonu pipetlenerek, hücreler ışık mikroskopunda, 40X objektifte sayılmıştır.

Sayım sonucunda sayılan hücre sayısı, seyreltme oranı (2) ve sabit olan 10^4 (0,1 mm³ deki sayım) birbirleri ile çarpılarak elde edilen sonuç 1 ml’ deki hücre sayısını belirlemiştir.

Hücre sayımı yapıldıktan sonra uygun oranda (5×10^5 hücre) hücre 10 ml hücre kültür solüsyonu ile sulandırılarak homojenize edilmiş ve T-75 cm², lik flasklara ekilip inkübatöre kaldırılmıştır. Her iki günde bir hücre medyumu değiştirilerek kültür işlemine devam edilmiştir.

MSC’lerin Karakterizasyonu

Akım Sitometrik Analiz

Analizler, her alt-kültür işlemi sonrasında (P1’den P5’e kadar) ve akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp, hücre sayımı yapılarak hücre sayısı belirlendikten sonra (yaklaşık olarak 1×10^6 hücre) PBS içinde homojenize edilip belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel fluoresan izotiyosiyonat (FITC)- ve fikoeritrin (PE)-konjuge monoklonal antikorlar (CD45, CD90, CD29, CD11b, CD44, CD71, CD106, CD73) ve uygun izotip kontrollerinden 10µl eklenerek inkübe edilmiştir (oda ısısında-karanlıkta-45 dk.). İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (%0.1 sodyum azid içeren PBS) eklenerek santrifüj edilerek (5dk. 1200rpm) 400µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edilecek ve hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akım sitometri cihazında okutulmuş ve BD Cell Quest TM Software programı ile analiz gerçekleştirilmiştir. Apoptoza AnnexinV FITC ve Propodium iodide PI ile bakılmıştır.

MSC’lerin Karakterizasyonu

Osteojenik farklılaştırılması

Osteojenik farklılaşma için, P3'deki hücreler 6 kuyucuklu plaklarda her kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde tip I kollajen kaplı lamellere ekildi. Hücrelerin üzerlerine 2 ml osteojenik farklılaştırma besiyeri eklendi (β -glycerophosphate içermeyen) ve inkübatöre kaldırılıp 2 gün arayla besiyerleri değiştirildi. Hücreler yaklaşık 5 gün sonra kofluent olunca osteojenik farklılaştırma besiyerine β -glycerophosphate eklenip ve kültüre devam edildi.

50 ml' lik osteojenik farklılaştırma besiyeri içerisine 7,5 ml osteogenic supplements, 5 μ l dexamethasone, 250 μ l ascorbic acid, 175 μ l 1M β - glycerophosphate ve 42,5 ml complete mesencult osteogenic medyum eklendi. 6 kuyucuklu plaklara ekilen hücrelerin her 3 günde üzerlerindeki eski besiyeri alınıp yeni osteojenik farklılaştırma besiyeri eklendi. Kültürün 4. haftasının sonrasında lameller hücre dışı kalsifikasyonun gösterilmesi amacıyla alizarin kırmızısı ile boyandı.

Alizarin kırmızısı boyaması için kuyucuklardaki besiyeri alındı ve kuyulara 2 ml DPBS eklenip 1 dakika kadar bekletildikten sonra DPBS uzaklaştırıldı. Sonrasında kuyulara 2 ml formalin eklendi ve 45 dakika boyunca karanlıkta oda ısısında bekletildi. 45 dakika sonrasında formalin uzaklaştırıldı ve distile su ile 2 kez yıkandı. Distile sudan sonra 2 ml alizarin kırmızısı solüsyonu eklendi ve 45 dakika boyunca oda ısısında bekletildi. 45 dakika sonrasında boya alındı ve distile su ile iki kez yıkandı. Lamel lam üzerine kapatılarak mikroskopta incelendi.

Adipojenik farklılaştırılması

Adipojenik farklılaşma için, P3'deki hücreler 6 kuyucuklu plaklarda her kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde tip I kollajen kaplı lamellere ekildi. Hücrelerin üzerlerine 2 ml kültür medyumunu eklendi, inkübatöre kaldırıldı ve 2 gün arayla besiyerleri yenilendi. Yaklaşık 5 gün sonrasında hücreler kofluent olduklarında kuyucuklardaki

kültür medyumunu alınıp adipojenik farklılaştırma besiyeri eklendi ve kültüre devam edildi.

50 ml' lik adipojenik farklılaştırma besiyeri içersine 45 ml Adipocyte Differentiation Basal Medium, 5 ml Adipogenesis Supplement ve 25 µl Penicillin streptomycin eklendi. Adipojenik olarak farklılaştırmaya alınan hücrelerin her 3 günde eski besiyerleri alındı ve yeni adipojenik farklılaştırma besiyerleri eklendi. Kültürün 2. haftasının sonunda adipojenik farklılaşmayı gösteren intrasellüler yağ damlacıklarının varlığının belirlenmesi için Oil red o boyaması gerçekleştirildi.

Oil red o boyaması için kuyucuklardaki besiyeri alındı ve kuyulara 2 ml DPBS eklenip 1 dakika kadar bekletildikten sonra DPBS uzaklaştırıldı. Kuyulara 2 ml formalin eklendi ve 45 dakika boyunca karanlıkta oda ısısında bekletildi. 45 dakika sonrasında formalin uzaklaştırıldı ve distile su ile 2 kez yıkandı. Sonrasında kuyulara 2 ml %60' lık izopropanol eklendi ve 5 dakika boyunca inkübe edildi. İzopropanol kuyulardan alındı ve kuyulara 2 ml oil red o solüsyonu eklendi. Karanlıkta oda ısısında 45 dakika boyunca inkübe edildikten sonra oil red o çekildi ve kuyular distile su ile 2 defa yıkandı. Kuyucuklara hemotoxyciline konuldu ve 1 dakika inkübe edildikten sonra kuyular 2 defa distile su ile yıkandı. Kuyulardaki lameller lamlar üzerine kapatılarak mikroskopta incelendi.

Kondrojenik farklılaştırılması

Kondrojenik farklılaşma için, P3'deki hücreler 6 kuyucuklu plaklarda her kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde tip I kollajen kaplı lamellere ekildi. Hücrelerin üzerlerine 2 ml kültür besiyeri eklendi, inkübatöre kaldırıldı ve 2 gün arayla kuyulardaki besiyerleri yenilendi. Yaklaşık 5 gün sonrasında hücreler kofluent olduklarında kuyucuklardaki hücre kültür besiyeri alınıp kondrojenik farklılaştırma besiyeri eklendi ve kültüre devam edildi.

50 ml' lik kondrojenik farklılaştırma besiyeri içerisine 45 ml Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium, 5 ml Chondrogenesis Supplement ve 25 µl Penicillin streptomycin eklendi. Kondrojenik olarak farklılaştırmaya alınan hücrelerin her 3 günde eski besiyerleri alındı ve yeni kondrojenik farklılaştırma besiyerleri eklendi. Kùltürün 2. haftasının sonunda kondrojenik farklılaşmayı gösteren, kondrositler tarafından üretilen proteoglikanların varlığının belirlenmesi için alcian blue boyaması gerçekleştirildi.

Alcian blue boyaması için kuyucuklardaki besiyeri alındı ve kuyulara 2 ml DPBS eklenip 1 dakika kadar bekletildikten sonra DPBS uzaklaştırıldı. Kuyulara 2 ml formalin eklendi ve 45 dakika boyunca karanlıkta oda ısısında bekletildi. 45 dakika sonrasında formalin uzaklaştırıldı ve distile su ile 2 kez yıkandı. Kuyucuklara 3 ml alcian blue solüsyonu eklendi ve 45 dakika boyunca karanlıkta oda ısısında inkübe edildi ve 45 dakika sonrasında kuyulardaki boya alındı. Kuyulara 1,2 ml etil alkol, 800 µl asetik asit eklendi, 15 dakika boyunca bekletildi ve 15 dakikanın sonunda kuyular 2 defa DPBS ile yıkandı. Kuyulardaki lameller lamalar üzerine kapatılarak mikroskopta incelendi.

Kök hücrelerin RealTime PCR ile gen ekspresyonlarına bakılması

İzole edilen kök hücrelerin Realtime PCR ile gene ekspresyonlarına bakıldı. İlk olarak RNA izolasyonu yapıldı, RNA' dan cDNA izolasyonu yapıldı ve sonrasında GAPDH, ALPL, RUNX2, NANOG, NESTİN, NOTCH, DSPP genlerinin ekspresyonlarına RealTime ile bakıldı.

İzole edilen kök hücrelerin her birinden ilk olarak High Pure RNA Isolation Kitinin protokolüne göre RNA izolasyonu yapıldı. 1×10^6 hücre alındı ve 200 µl PBS ile sulandırıldı. 400 µl liziz solüsyonu eklendi, 15 saniye vorteks yapıldı, filtreli tüpe aktarıldı ve toplama tüpünün üzerine konuldu. 8000 g de 1 dakika santrifüj

yapıldı ve toplama tüpü atılıp filtreli tüp yeni toplama tüpüne konuldu. Üzerine 90 µl DNase incubation buffer ve 10 µl DNase 1 eklendi 15 dakika beklendi. 500 µl yıkama solüsyonu 1 eklendi ve 8000 g' de 15 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpü boşaltıldı ve 500 µl yıkama solüsyonu 2 eklenip 13000 g' de 2 dakika santrifüj yapıldı. 100 µl elution solüsyonu eklendi 8000 g' de 5 dakika santrifüj yapıldı ve toplama tüpündeki sıvı yeni tüpe aktarıldı. İzole edilen RNA' ların RNA konstantrasyonları spektrofotometre ile ölçüldü.

İzole edilen RNA' lardan cDNA izolasyonu yapıldı. cDNA izolasyonu Transcriptor first strand cDNA synthesis kitin protokolüne göre yapıldı. İlk olarak konsantrasyonları ölçülen RNA' ların nanogram (ng) değerleri eşitlendi hepsi 50 ng olacak şekilde ayarlandı. Her hücre için tüpler alındı ve kitin içeriğindeki sudan tüplere konuldu, üzerine kit içeriğinde bulunan iki adet primerin her ikisindende 1 µl konuldu ve üzerine izole edilen RNA' lar konuldu toplamda 13 µl' lik bir sıvı oldu. 65°C' de 10 dk boyunca bekletildi. 10 dk' lık bekleme sürecinde yeni tüpe 4 µl transkriptör reverse transcriptase reaction solüsyonundan eklendi, 2 µl deoxynucleotide eklendi, 0,5 µl transkriptör reverse transcriptase eklendi ve 0,5 µl Protectör RNase inhibitör eklendi. 10 dakika sonrasında hazırlanan yeni tüplere aktarıldı. 55°C' de 30 dakika, 85°C' de 15 dakika bekletildi.

cDNA izolasyonundan sonra RealTime ile gen ekspresyonlarına bakıldı. LightCycler 480 probes master kitindeki protokole göre hazırlandı. Kit içeriğindeki sudan 4 µl eklendi, 10 µl LightCycler eklendi ve 1 µl RealTime ready assay konuldu üzerine her bir genden (GADPH, ALPL, RUNX2, NANOG, NESTİN, NOTCH, DSPP) 1 µl olacak şekilde eklendi. LightCycler 480 multiwell plate' e eklendi ve üzerine cDNA konuldu. 2 dakika 1500 g' de santrifüj yapıldı ve plate LightCycler 480 RealTime PCR cihazına konuldu ve 1.5 saat kadar sonra sonuçlar alındı ve analiz yapıldı.

Hücre Kültürü

Elde edilmiş kök hücre kültürleri, steril polikaprolakton doku iskeleleri üzerine ekilmiştir. Ekim işleminden önce, hücreler PBS (phosphate buffer saline) ile yıkanmış, alfa-MEM ile %10 fetal calf serum içerisinde inkübe edilmiştir. Ardından, 96'lık kuyucuklarda bulunan 5x1.5 mm boyutlarındaki iskelelere, DPSC ve DFSC süspansiyonlarının ekimi yapılmıştır (Şekil 6). PCL mesh doku iskelelerinden 10 tanesi DPSC, 10 tanesi DFSC, 2 adedi DFSC negatif kontrol, 2 adedi DPSC negatif kontrol grubu olarak, nanomesh doku iskelelerinden 10 tanesi DPSC (nmDPSC), 10 tanesi DFSC (nmDFSC), 2 adedi DFSC negatif kontrol, 2 adedi DPSC negatif kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Her kuyuya 25 mikrolitre hacminde, (2.0×10^5) hücre) gönderilmiştir. Yüksek ekim etkinliği için, pipetin kuyuların kenarlarına değmemesine dikkat edilmiştir. Üç saatlik %5 CO₂'de ve 37o C'de inkübasyonun ardından, 175 mikrolitre hacminde %10 FCS ve %1 PSt içeren medyum eklenmiştir. Morfolojik yapı mikroskopta kontrol edildikten sonra inkübatöre alınmıştır. Hücrelerin doku iskelelerine adhezyonunun ardından, osteojenik farklılaştırma için hücre-doku iskelesi kompleksleri, 50 µg/ml askorbik asit (Sigma, ABD), 10 µM β-gliserofosfat (Sigma, ABD) 10-8 deksametazon (Sigma, Germany) içeren α-MEM, %15 FBS ve gentamisin (50 lg/mL) içerisinde kültüre edilmiştir. Kültür medyumunu 2 veya 3 günlük aralıklarla yenilenmiştir. Hücreler, CO₂'de ve 37o C'de inkübasyona bırakılmış, 14. günde kültürden alınarak hücre-doku iskelesi kompleksi immünofloresan yöntem ile incelenmiştir.

İmmünofloresan Boyama

İmmünofloresan boyama işleminde tavşan anti-kollajen I (1:500, ab 34710; Abcam, Cambridge, UK) kiti kullanıldı. Örnekler %0.05'lik PFA ile +4o C'de inkübe edildi, ardından 2 dakika PBS ile yıkandı. 15 dakika süreyle %70 lik soğuk etanol ile inkübe edildikten sonra, %0.1'lik PBS Tween ile tekrar 15 dakika

inkübasyon yapıldı. 1 saat sonra %10'luk keçi serumu ile bloklama yapıldı. 1:500 oranında anti-kollajen I eklendi ve 3 defa PBS tween ile yıkandı. Sekonder antibody ile 1 saat inkübasyon yapıldıktan sonra 3 defa PBS Tween yıkama yapıldı. Bir gece bırakıldıktan sonra immünofloresan boyama protokolü tamamlandı. Örnekler inceleninceye kadar +4o C'de muhafaza edilmiştir.

Floresan mikroskop ile çekilen 20X ve 40X büyütmelelerdeki fotoğraflarda hücre sayımı ve hücrelerin tip I kollajen ekspresyonu oranına göre analiz yapıldı. Boyama işlemi tamamlanan PCL doku iskeleleri konfokal lazer taramalı mikroskobu (CLSM, Leica, Almanya, DETAM) ile incelenmiştir.

Her bir örnek için doku iskelelerinden yedişer konfokal mikroskop kesiti ve 20X ve 40X büyütmelelerde immünfloresan mikroskop fotoğrafı alındı ve ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) yazılımı kullanılarak hücre sayımı yapıldı. Hücrelerin tip I kollajen ekspresyonu, konfokal mikroskop kesitlerdeki boyanma oranına göre ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) kullanılarak değerlendirildi ve analizi yapıldı.

İstatistiksel analiz

Elde edilen veriler GraphPad Prism 5 programı (GraphPad Software, Inc., CA, USA) kullanılarak analiz edildi. İki den fazla grup verilerinin bir arada karşılaştırılması ANOVA testi (tek yönlü varyans analizi) ile yapıldı. İki grup arasındaki karşılaştırma için unpaired Student t testi kullanıldı.

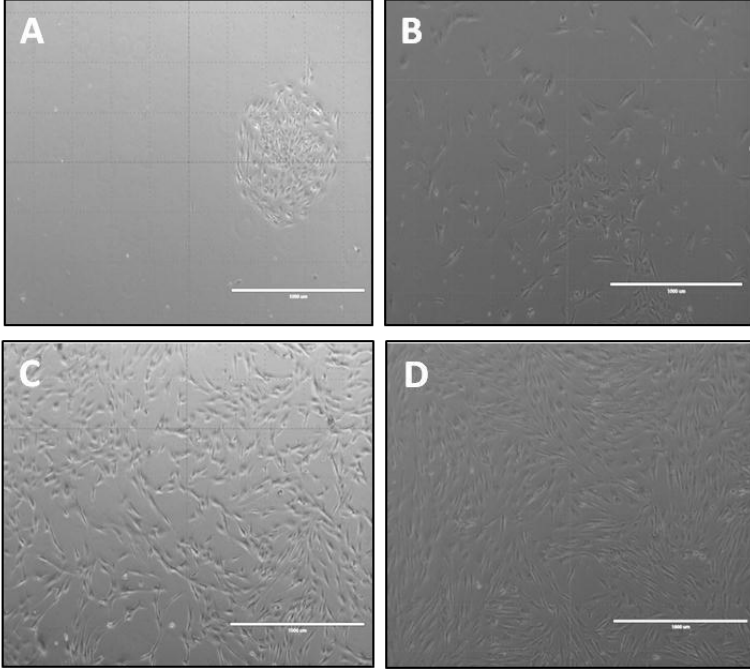
P-değeri 0.05'den küçük değerler anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

DPSC İzolasyonu

Tam gömülü yirmi yaş dişi pulpasından kök hücre izolasyonu yapıldıktan sonra, hücreler T-25 cm², lik flasklara ekildi ve morfolojik özellikler invert mikroskop ile incelendi. Birinci kültürde

hücrelerin hızla proliferasyon olarak kolonizasyon gösterdikleri izlendi (Resim 6.1.A). Hücre kolonileri yaklaşık %70 yoğunluk gösterdikten sonra birinci pasajlama yapıldı ve hücreler T-75 cm², lik flasklara aktarıldı. Pasajlama işleminden sonra hücrelerin yaklaşık 9 gün içerisinde flask yüzeyini kapladığı görüldü ve bir sonraki pasajlama yapıldı (Resim 1).

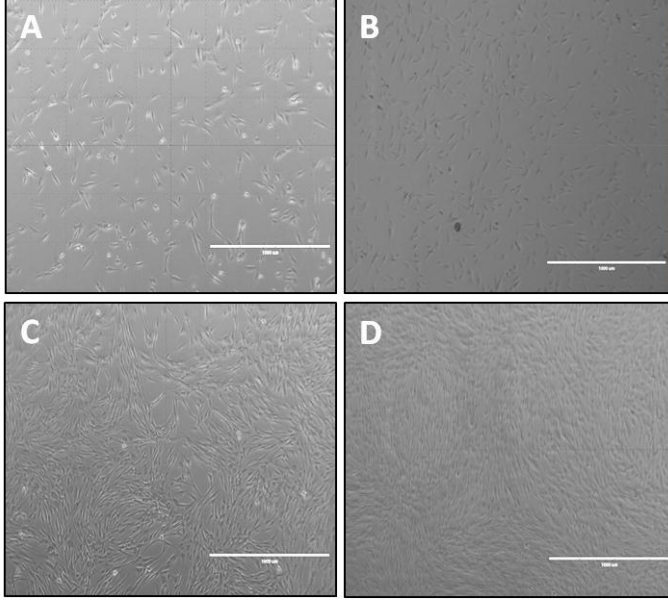


Resim 1. DPSC hücrelerinin morfolojik görüntüsü. A) İlk kültür (P0, 3. gün), B) Birinci pasaj (P1), (C-D) sonraki kültürlerinin (C: P2 D: P3) invert mikroskop görüntülerinde, hücrelerin iğsi morfolojiye sahip oldukları izlenmektedir. (X10).

DFSC İzolasyonu

Folikül dokusundan, kök hücrelerin izole edilmesinin ardından T-25 cm², lik flasklara ekim yapıldı ve hücrelerin morfolojik özellikleri invert mikroskop ile incelendi. Birinci kültürde hücrelerin hızla proliferasyon olup flask yüzeyini kapladıkları

izlendi (Resim 2.A). Hücreler yaklaşık %70 yoğunluk gösterdikten sonra birinci pasaja alınarak T-75 cm², lik flasklara aktarıldı. Pasajlama işleminden sonra hücrelerin 5-6 gün içerisinde flask yüzeyini kapladığı görüldü ve bir sonraki pasajlama yapıldı (Resim 2.).



Resim 2. DFSC hücrelerinin morfolojik görüntüsü. A) İlk kültür (P0, 3. gün), B) Birinci pasaj (P1), (C-D) sonraki kültürlerinin (C: P2 D: P3) invert mikroskop görüntülerinde, hücrelerin iğsi morfolojiye sahip oldukları izlenmektedir. (AX20, B- C-DX10).

DPSC Karakterizasyonu

DPSC'lerin akım sitometri analizi

DPSC hücrelerinin üçüncü pasaja alınmasından yaklaşık 9 gün sonra hücrelerin konflüent olduğu izlendi ve karakterizasyon analizleri yapıldı. Hücrelerin akım sitometrik analizleri sonucunda hematopoetik kök hücre belirteci olan CD45, CD34, CD25, CD28 ve CD14 işaretlerini yüzeylerinde ifade etmedikleri izlendi. Aynı zamanda bu hücrelerin kök hücre belirteci olan CD73, CD90,

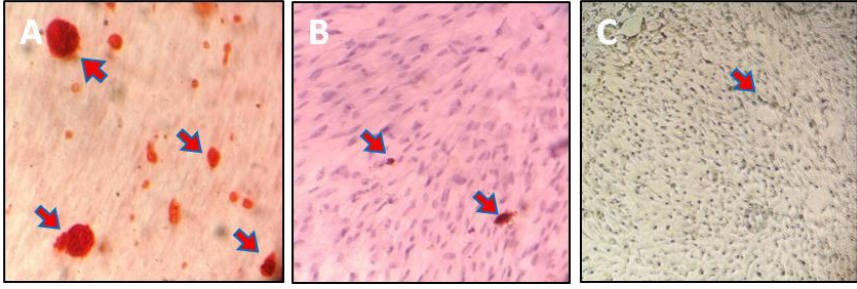
CD105, CD146 ve CD29' u yüzeylerinde ifade ettikleri görüldü. CD45 (%1,59), CD14 (%6,93), CD34 (%7,58), CD25 (%11,36) ve CD28 (%25,35) için negatif ekspresyon; CD105 (%99,78), CD146 (%99,90), CD90 (%94,99), CD73 (%99,26) ve CD29 (%99,98) için pozitif ekspresyon izlendi.

DPSC'lerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik yönde farklılaştırılması

Osteojenik farklılaştırma için indüklenen DPSC hücrelerinin osteoblast benzeri hücrelere diferansiyasyonu gözlemlendi. Osteojenik farklılaştırma medyumuna ile kültüre edilen DPSC hücreleri kültürün 4. haftasında alizarin kırmızısı ile boyandı ve mineralize nodül yapıları izlendi (Resim 3.A).

Adipojenik diferansiyasyon için hücreler adipojenik medyum içerisinde 2 hafta süre ile kültüre edildi ve DPSC hücrelerinin adiposit benzeri hücrelere farklılaştıkları izlendi. Kültürün ikinci haftasında Oil red O ile yapılan boyama sonrasında kırmızı renkte hücre içi yağ damlacıkları görüldü (Resim 3.B).

Kondrojenik diferansiyasyon için DPSC hücreleri 2 hafta kondrojenik medyum ile kültüre edildi ve hücrelerin kondrosit benzeri hücrelere farklılaştıkları görüldü. Kültürün 2. haftasında alcian blue ile boyanan hücrelerde kondrositler tarafından üretilen proteoglikanların mavi renkte boyandığı izlendi (Resim 3.C).



Resim 3. DPSC hücrelerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma özellikleri. A) Osteojenik farklılaştırma medyumuna ile kültüre edilen ve alizarin kırmızısı ile boyanan DPSC hücrelerinde parlak kırmızı renkte nodüller izlenmektedir. B) Adipojenik farklılaştırma medyumuna ile kültüre edilen ve Oil red o ile boyanan DPSC hücrelerinde kırmızı renkte yağ damlacıkları izlendi. C) Kondrojenik farklılaştırma medyumuna ile kültüre edilen ve Alcian blue ile boyanan DPSC hücrelerinde mavi renkli proteoglikanlar izlendi.

DFSC'lerin Karakterizasyonu

DFSC'lerin akım sitometri analizi

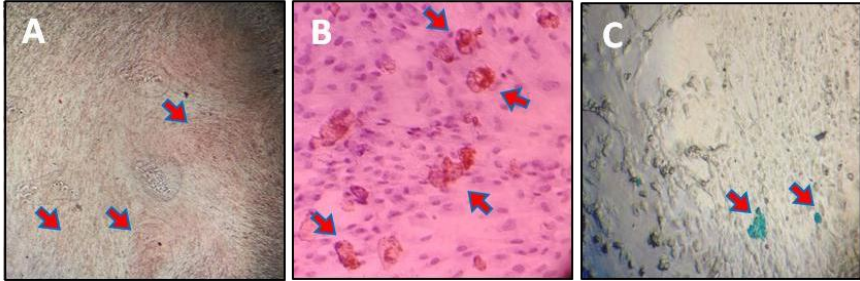
DFSC hücreleri üçüncü pasaja alındıktan yaklaşık 5 gün sonrasında hücrelerin konflüent olduğu izlendi ve karakterizasyon analizleri yapıldı. Hücrelerin akım sitometrik analizleri sonucunda hematopoetik kök hücre belirteci olan CD45, CD34, CD25, CD28 ve CD14 işaretlerini yüzeylerinde ifade etmedikleri izlendi. Aynı zamanda bu hücrelerin kök hücre belirteci olan CD73, CD90, CD105, CD146 ve CD29' u yüzeylerinde ifade ettikleri görüldü. DFSC hücrelerinin immunofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları. CD45 (%0,0), CD14 (%0,01), CD34 (%11,72), CD25 (%0,27) ve CD28 (%1,14) için negatif ekspresyon, CD105 (%80,58), CD146 (%97,43), CD90 (%97,78), CD73 (%98,54) ve CD29 (%96,50) pozitif ekspresyon izlendi.

DFSC'lerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik yönde farklılaştırılması

Osteojenik diferansiyasyon için indüklenen DFSC hücrelerinin osteoblast benzeri hücrelere farklılaştıkları izlendi. Osteojenik farklılaştırma besiyerine alınan DFSC hücreleri kültürün 4. haftasında alizarin kırmızısı ile boyandı ve mineralize nodüller görüldü (Resim 4.A).

Adipojenik diferansiyasyon için hücreler adipojenik besiyerinde 2 hafta süre ile kültüre edildi ve DFSC hücrelerinin adiposit benzeri hücrelere farklılaştıkları izlendi. Kültürün ikinci haftasında Oil red O ile yapılan boyama sonrasında kırmızı renkte hücre içi yağ damlacıkları görüldü (Resim 4.B).

Kondrojenik diferansiyasyon için DFSC hücreleri 2 hafta kondrojenik medyum ile kültüre edildi ve kondrosit benzeri hücrelere farklılaştıkları görüldü. Kültürün 2. haftasında alcian blue ile boyanan hücrelerde kondrositler tarafından üretilen proteoglikanların mavi renkte boyandığı görüldü (Resim 4.C).



Resim 4. DFSC hücrelerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma özellikleri. DFSC hücrelerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma özellikleri. A) Osteojenik farklılaştırma medyumu ile kültüre edilen ve alizarin kırmızısı ile boyanan DFSC hücrelerinde parlak kırmızı renkte nodüller izlenmektedir. B) Adipojenik farklılaştırma medyumu ile kültüre edilen ve Oil red o ile boyanan DFSC hücrelerinde kırmızı renkte yağ damlacıkları izlendi. C) Kondrojenik farklılaştırma medyumu ile kültüre edilen ve Alcian blue ile boyanan DFSC hücrelerinde mavi renkli proteoglikanlar izlendi.

Hücre Sayısı ve Hücrelerin Doku İskelesine Adhezyonu

Kültür süresinin sonunda doku iskelelerinin hiçbirinde deformasyon veya şekil bozukluğu gözlenmedi. Doku iskelelerinde kültüre edilen hücreler 14 günlük sürenin sonunda faz kontrast ışık mikroskobu, konfokal ve floresan mikroskoplar ile incelendi. Hücre ekiminin hemen ardından hücrelerin yuvarlak geometriye yakın bir morfoloji gösterdiği, kültürün ilerleyen günlerinde hücre yayılımının başladığı ve iskeleye tutunan hücrelerin iç benzeri morfoloji kazandığı izlendi.

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ile nukleus boyamaları yapılan MSC'ler doku iskeleleri üzerine ekilerek tutunmaları ve çoğalmaları sağlandı. Örnekler floresan mikroskop ile incelenerek hücre sayımları yapıldı.

Ortalama hücre sayısı, PCL doku iskelelerinde 30.8 hücre/ 0.0915 mm^2 (DPSC),

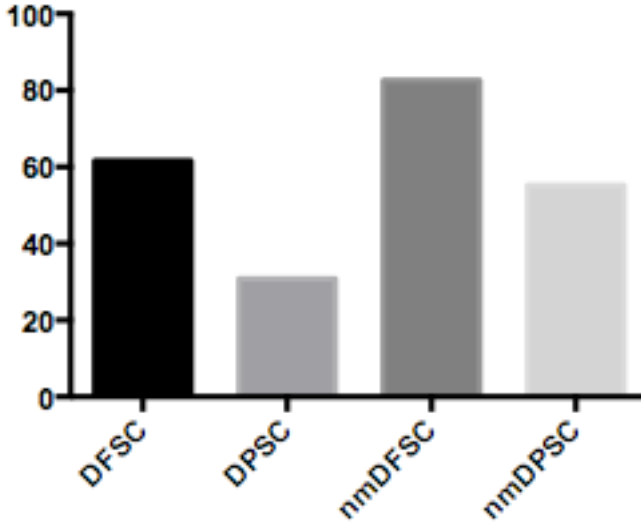
61.6 hücre/ 0.0915 mm^2 (DFSC),

Nanomesh PCL doku iskelelerinin ortalama hücre sayısı, 55.2 hücre/ 0.0915 mm^2 (DPSC),

82.6 hücre/ 0.0915 mm^2 (DFSC),

olarak belirlendi (Resim 5).

Yapılan analizde, DFSC ekimi yapılan nanomesh doku iskelelerinde, hücre sayısının iki ölçüm için de anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p < .001$). Bununla beraber, DAPI boyama ile yapılan incelemede, hücre organizasyonu ve doku köprüleri oluşma oranının DFSC ekilen doku iskelesi gruplarında DPSC gruplarına göre, nmPCL gruplarında PCL gruplarına göre daha yüksek olduğu izlendi.



Resim 5. nmDFSC grubunda hücre sayısı diğer gruplara göre belirgin derecede yüksek izlenmiştir.

Tip I Kollajen Formasyonu Oranı

Tip I kollajen oluşumunun incelenmesi için, örneklerle immünfloresan teknikle boyama yapılmış, ve doku iskelesindeki dağılım paterni ile yüzdesi incelenmiştir. Konfokal mikroskop ile alınan kesitsel görüntüler bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Bu amaçla her örnekten rastgele alınan 7 kesit kantitatif olarak incelenmiş ve ortalamaları esas alınmıştır.

Doku iskelelerinde ortalama kollajen formasyon oranları,
DPSC grubunda %2,79

DFSC grubunda %3,93

nmDPSC grubunda %12,7

nmDFSC grubunda %17,9 olarak belirlendi.

nmDFSC grubunda ortalama kollajen formasyonu oranı, diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. ($p < 0,001$)

DPSC grubu

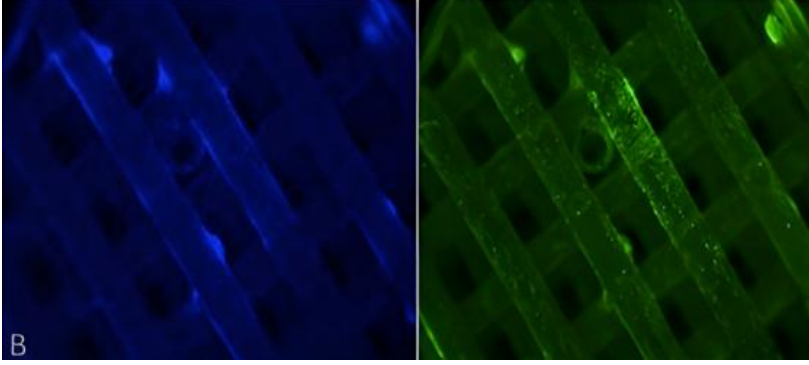
Floresan mikroskop ile yapılan incelemede, hücrelerin iskele yüzeyine yayılım ve proliferasyon oranının düşük olduğu gözlenmiştir. Hücre dışı matriks bileşenlerinin ve doku köprülerinin oluşumu doku iskelesinde bölgesel, heterojen bir patternde izlenmiştir. Konfokal mikroskop ile yapılan incelemelerde, tip I kollajenin homojen bir dağılım göstermediği ve tüm doku iskelesine yayılmadığı görülmüştür (Resim 6).



Resim 6. DPSC grubunun DAPI ve tip I kollajen boyama görüntüleri.

DFSC grubu

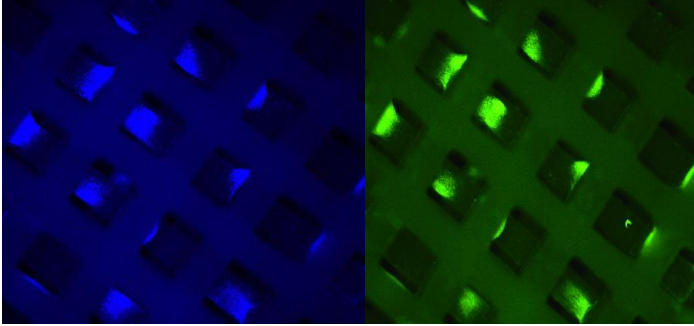
Kültür süresinin sonunda, dental folikül kaynaklı kök hücrelerin ekildiği PCL doku iskelelerindeki hücre organizasyonu, yoğun ve uniform olarak izlenmiştir. Hücrelerin çok katmanlı doku benzeri organizasyonlar oluşturma eğilimleri, dental pulpa kaynaklı hücrelere göre belirgin şekilde artmış olarak izlenmiştir (Resim 7).



Resim 7. DFSC grubunun DAPI ve tip I kollajen boyama görüntüleri.

nmDPSC grubu

Tabanında elektro-eğrilmiş bir nano bazal membran bulunan doku iskelelerine (nmPCL) ekilen DPSC'lerin organizasyonu, nano-ağ bazal membran bulundurmayan doku iskelelerinde gözlenene kıyasla daha yoğun ve uniform olarak izlenmiştir. Hücre köprülerinin, bu tip doku iskelelerinde taban bölgesine kadar bir organizasyon eğilimi gösterdiği de izlenmiştir (Resim 8).

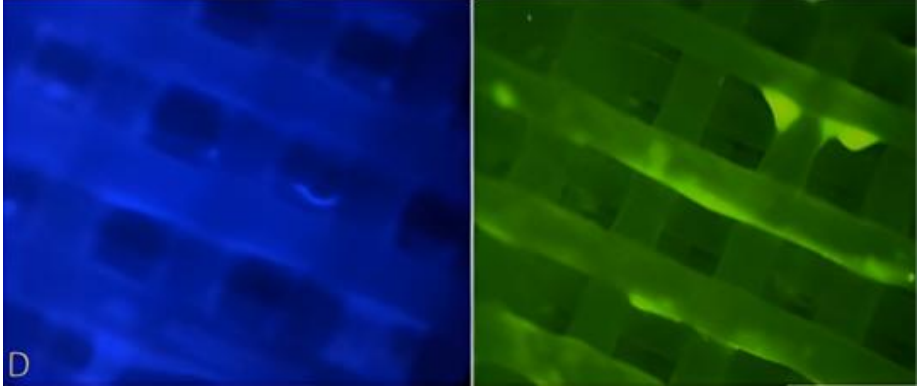


Resim 8. nmDPSC grubunun DAPI ve tip I kollajen boyama görüntüleri.

nmDFSC grubu

DFSC ekimi yapılan nanomesh özellikli doku iskelelerinde, tüm gruplara göre yüksek hücre yoğunluğu ve doku köprüleri oluşumu gözlenmiştir. Yüzey ile taban arasındaki tüm katmanlarda

oluşan fibriller arası hücre topluluğu bağlantıları yoğun olarak izlenmiştir. Kültür periyodunun sonunda yoğun bir hücre – matriks kütlesinin içinde yer alan çok katlı hücre organizasyonları görülmüştür (Resim 9).



Resim 9. nmDFSC grubunun DAPI ve tip I kollajen boyama görüntüleri.

Analizler sonucu, PCL ve nmPCL doku iskeleleri karşılaştırıldığında, nmPCL iskeleler üzerinde osteojenik farklılaşmanın daha etkili ve DFSC lerin tip I kollajen matriks sentezinin anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, nmPCL doku iskelelerinin osteojenik farklılaşmayı ve hücre proliferasyon oranını indüklediği sonucuna varılmıştır.

Tartışma Ve Sonuç

Doku mühendisliği, doku ve organ hasarı sonucu ortaya çıkan fonksiyon kayıplarının giderilmesi ve dokuların yeniden yapılandırılmasını hedefleyen bir araştırma alanıdır. Bu hedefe ulaşmak amacıyla, farklı disiplinlerden elde edilen bilgiler ışığında hücresel bileşenler, doğal veya yapay malzemeler ve gerekli biyolojik sinyaller bir arada değerlendirilmektedir. Doku mühendisliği uygulamaları, geleneksel tedavi yöntemlerine kıyasla yenilikçi alternatifler sunmaktadır. Mevcut rekonstrüksiyon

uygulamalarında sentetik malzemeler veya sınırlı miktarda otojen doku kullanılabilmektedir. Ancak, otojen greft alımı işlemleri, donör bölgede kanama, sinir hasarı, kozmetik sorunlar, ağrı, enfeksiyon ve fonksiyon kaybı gibi istenmeyen durum riskleri barındırmaktadır(Shanti et al., 2007). Doku mühendisliği stratejilerinde ise, hastadan izole edilen hücre toplulukları, laboratuvar koşullarında ve hasar görmüş dokuya uygun şekilde hazırlanmış yapı iskeleleri üzerinde kontrollü bir biçimde çoğaltılmakta ve bu oluşturulan yapının hasarlı alana implantasyonu ile doku rejenerasyonu amaçlanmaktadır.

Günümüzde, çok sayıda doku ve organ sistemine yönelik doku mühendisliği araştırmaları aktif olarak sürdürülmektedir. Literatürde, çeşitli tıp disiplinlerine ait in vitro ve prelinik çalışmaların yanı sıra, olumlu sonuçlar alınmış klinik çalışmalar da mevcuttur. Zhou ve meslektaşları (2014), elektro-eğirme yöntemiyle üretilmiş kitosan/polikaprolakton karışımı doku iskeleleri kullanarak, küçük çaplı damar greftleri geliştirmeye odaklanmışlardır. Köpek periferik kanından elde edilen ve laboratuvar ortamında çoğaltılan endotel hücrelerini, bu melez doku iskelesi üzerinde kültüre almışlardır. Ardından bu oluşturdukları yapıları, altı köpek donörün karotid arterine yerleştirmişlerdir. İmplantasyondan üç ay sonra, hücre ekilmiş altı greftin beşinin patent kaldığı gözlemlenirken, hücre ekilmeden yerleştirilen altı greftten yalnızca birinin patent kaldığı tespit edilmiştir. Üç aylık örnekler üzerinde yapılan immünboyama ve floresan mikroskopi incelemeleri, endotel tabakasının yenilendiğini, kollajen ve elastin oluşumunu ortaya koymuştur. Ayrıca, örneklerin biyomekanik test sonuçları, bu greftlerin alıcının kendi damarlarına benzer işlevsel özelliklere sahip olduğunu göstermiştir(M. Zhou et al., 2014).

Miyazaki ve Maruyama, sıçanda infertilite modeli çalıştıkları araştırmalarında, hücreden arındırılmış sıçan uterusu ile çalışmışlardır. Bu aselüler matriksi perfüze olabilir bir doku iskelesi

olarak kullanarak, yetişkin ve neonatal sıçan uterus hücreleri, ve sıçan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ekiminin ardından, 10 gün süreyle biyoreaktörde aortik perfüzyon ile kültüre etmişlerdir. Kültürden alınan kompleksin parsiyel olarak eksize edilmiş sıçan uterusuna transplantasyonunun ardından, konak uterus dokularının rejenerasyonu ve hamileliğin gerçekleştiği rapor edilmiştir(Miyazaki & Maruyama, 2014).

Doku mühendisliği çalışmalarında, hücreden arındırılmış doku matriksleri, karaciğer dokusu, kalp dokusu, akciğer dokusu, üretral dokular ve menisküs gibi pek çok dokunun rejenerasyonunda kullanılmış, başarılı in vitro ve preklinik sonuçlar elde edilmiştir(De Kemp, De Graaf, Fledderus, Bosch, & De Kort, 2015; Moran, Busilacchi, Lee, Athanasiou, & Verdonk, 2015; Suki, 2014; Q. Zhou, Li, & Li, 2015; Zia et al., 2016).

Maksillofasiyal doku mühendisliği, doku mühendisliğinin bir alt dalı olarak, biyoloji, mühendislik ve rejeneratif tıp prensiplerini entegre ederek, deformitelerin, çeşitli hastalıkların veya travmaların neden olduğu doku kayıplarının onarımını veya yeniden inşasını, işlevsel greftlerin üretilmesini ve nihayetinde normal doku işlevinin hastaya kazandırılmasını hedeflemektedir(Mao et al., 2006; Nakashima & Reddi, 2003). Maksillofasiyal bölge rekonstrüksiyonunda ele alınan hücre temelli doku mühendisliği uygulamalarında mezenkimal kök hücreler, kolay ulaşılabilir olmaları, kapsamlı kendini yenileme ve çoğalma kapasiteleri, maksillofasiyal bölgedeki çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme becerileri ve düşük bağışıklık uyarıcı potansiyelleri nedeniyle ideal hücre kaynakları konumundadır. Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda çalışılan kök hücre tipleri içinde mezenkimal kök hücrelerin, özellikle kemik iliği kaynaklı hücrelerin osteoblastik aktivitesi ve kemik formasyonuna katkısı literatürde rapor edilmiştir(Kwan et al., 2008; Panetta et al., 2009). Bununla beraber, en önemli avantajları olan kök hücre eldesinde donör saha

morbiditesinin ekartasyonu ve potansiyel osteojenik etkileri nedeniyle dental pulpa ve folikül kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kemik iyileşmesi üzerine etkileri son yıllarda araştırma konusu olmuş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir(C. Morsceck et al., 2005; Pisciotta et al., 2012).

DPSC ve DFSC'lerin in vivo uygulamalarını araştıran çalışmaların çoğu, hayvan modelinde yapılmıştır. Klinik çalışmalar literatürde nadirdir. D'Aquino ve arkadaşları, klinik çalışmalarında, gömülü üçüncü molar dişlerden elde ettikleri DPSC'leri kollajen doku iskelelerine ekmiş ve kompleksi vertikal defekt oluşturulmuş yirmi yaş çekim bölgesine yerleştirmişlerdir. Kontrol grubu olarak sadece biyomateryal yerleştirilmiş olan kontralateral defekt alanı kullanılmıştır. Üç ay sonra yapılan histolojik ve radyolojik incelemelerde, kontrol grubunun anlamlı derecede düşük bir rejenerasyon oranına sahip olduğu belirlenmiştir(D'Aquino et al., 2009).

Giuliani ve arkadaşları, hasta grubunu üç yıl sonra değerlendirdikleri çalışmalarında, kemik rejenerasyonu ve vasküler yapıların oluşumunu holotomografik yöntemle analiz etmişlerdir. MSC ile greftlenen bölgenin, kontrol tarafına göre yüksek oranda kompakt kemik ile iyileşmiş olduğu, yüksek bir matriks yoğunluğuna sahip olduğu, ve rekonstrüksiyon amacıyla kullanılabilir bir yapıda olduğu sonucuna varmışlardır(Giuliani et al., 2013).

Kemik dokusu ile ilgili doku mühendisliği çalışmalarında, kemik dokusunun kalitatif ve kantitatif yönden başarılı organizasyonunu sağlamak için hücreler ve sentezlenen hücre dışı matriksin yapı iskeleleri ile desteklenmesi gerekmektedir. Aynı zamanda bu materyaller, doku büyümesinin şekline de rehberlik edebilmektedir. Yapı iskelesi olarak kullanılacak materyalin en önemli görevi, kültüre edilmiş hücrelere ya da transplante edilecek hücrelere geçici olarak destek görevi görerek, aynı zamanda uygun

biyolojik yönelimi oluşturacak bir ortam sağlayarak dokunun işlevini yerine getirmesine yardım etmektedir(Batorsky et al., 2005; Nakashima & Reddi, 2003; X. Yang et al., 2010).

İn vitro ortamda kültüre edilmiş bir doku iskelesinin defekt bölgesine implantasyonundan sonra, canlılık ve başarılı füzyon ilk 48 saatteki anjiyogenesis faaliyetine bağlıdır. Neo-anjiyogenesisi hedefleyen pek çok doku mühendisliği uygulaması literatürde rapor edilmiştir. Bu amaçla, kemik dokusu ve vasküler dokuların aynı doku iskelesinde kültüre edilmesi, yüzeyine anjiyojenik faktörler yüklenmiş biyobozunur doku iskelesi yapıları, endotelial hücrelerin eş zamanlı kültüre edilmesi, ve implantasyon esnasında iskelelere entegre etmek üzere vasküler yapıların ayrı bir ortamda kültüre edilmesi gibi uygulamalar yapılmıştır(Chue et al., 2004; Khademhosseini, Langer, Borenstein, & Vacanti, 2006; Richardson et al., 2001; Shin et al., 2004).

Literatürde rapor edilmiş kemik doku mühendisliği çalışmalarında, doku iskelelerinin genel olarak in vitro farklılaşmanın dördüncü haftasından sonra, ekstraselüler matriks formasyonunun mineralizasyon gösterdiği aşamada implante edildiği bildirilmiştir. Bununla beraber, çalışmamızda hücre dışı matriks yoğunluğunun ve mineralizasyonunun artmasının, alıcı bölgedeki iskeleye oksijen ve besin difüzyonunu, dolayısıyla düzenli kemik dokusu ve vasküler yapıların oluşumunu engelleyebileceği görüşüne varılmıştır. Çalışmada ayrıca, kapiller penetrasyona elverişlilik açısından gözenekli ağ yapısındaki doku iskeleleri seçilmiştir. Çalışmamızda, hem DPSC hem de DFSC'lerin her iki iskele tipinde de canlılığını koruduğu ve proliferasyon gösterdiği gözlemlenmiştir. Ancak, DFSC'lerin her iki iskele tipinde de DPSC'lere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek hücre sayısına ulaşması, DFSC'lerin doğuştan gelen daha yüksek proliferatif kapasitesi ile açıklanabilir. Bu bulgu, Gronthos ve ark. (2000) ile Todorović ve ark. (2008)'ın, DPSC'lerin kemik iliği

mezenkimal kök hücrelerine (BM-MSC) kıyasla daha yüksek proliferasyon hızına sahip olduğunu belirten önceki çalışmalarını destekler niteliktedir. Bizim çalışmamız, bu üstünlüğün DFSC'ler için de geçerli olduğunu ve hatta DPSC'lerden daha belirgin olabileceğini göstermiştir(Gronthos et al., 2000; Todorovic et al., 2008).

Başka bir dikkat çekici bulgu da, nanomesh yapıya sahip iskelelerdeki hücre sayısının, standart PCL iskelelere göre her iki hücre tipinde de belirgin şekilde artmış olmasıdır. Bu durum, elektroegirme tekniği ile oluşturulan nanomesh yapıdaki bazal membranın, doğal hücre dışı matrikse benzer topografik özellikleri sayesinde hücre adhezyonu ve yayılımı için daha elverişli bir ortam sağladığının bir göstergesidir. Nano yapıların, hücre reseptörleri için daha fazla bağlanma bölgesi sunarak ve hücre iskeleti reorganizasyonunu teşvik ederek hücresel davranışı olumlu yönde etkilediği literatürde yaygın olarak kabul görmektedir. Sonuç olarak, nmPCL yüzeylerde gözlemlenen daha yoğun ve uniform hücre organizasyonu, bu biyomimetik yaklaşımın başarısını destekler niteliktedir. Çalışmamızın bulgularından biri, Tip I kollajen sentezinde gözlemlenen ve hem hücre tipine hem de iskele yapısına bağlı olarak değişkenlik gösteren belirgin farklardır. Tip I kollajen, kemik matriksinin ana organik bileşeni olup, osteojenik farklılaşmanın ve ileri düzeyde doku olgunlaşmasının güvenilir bir göstergesidir. DFSC'lerin, standart PCL iskelelerde dahi DPSC'lere kıyasla daha yüksek kollajen formasyonu göstermesi, bu hücrelerin doğal osteojenik eğilimleriyle uyumludur. Dental folikülün embriyolojik olarak alveolar kemik, sementum ve periodontal ligamentin gelişiminden sorumlu olması, DFSC'lerin bu dokuların yeniden yapılandırılmasında daha programlı ve etkin bir şekilde çalıştığını düşündürmektedir(Kémoun et al., 2007; C. Morsczeck et al., 2005). DFSC'lerde gözlemlenen çok katmanlı, doku benzeri yoğun organizasyonlar ve daha fazla doku köprüsü oluşumu, bu

hücrelerin üç boyutlu bir yapı inşa etmedeki embriyolojik kapasitesinin bir yansımasıdır.

nmDFSC grubunda gözlemlenen yüksek kollajen formasyon oranı, hücre tipi ile iskele yapısı arasındaki sinerjik etkiyi vurgulamaktadır. Nanomesh yapı, sadece mekanik bir destek olmanın ötesinde, hücreler için biyomekanik ve biyokimyasal sinyaller sağlayan dinamik bir mikroçevre sunar. Bu yapı, muhtemelen adhezyonu güçlendirerek ve mekanotransdüksiyon sinyallerini aktararak, hücreleri daha yoğun bir matriks sentezine ve organize bir doku morfolojisi oluşturmaya teşvik etmektedir. Borden ve ark. (2004) ve Rezai-rad ve ark. (2015) gibi araştırmacıların da benzer şekilde, nano yapıları iskelelerin osteojenik farklılaşmayı artırdığını bildirdikleri göz önüne alındığında, bulgularımız bu literatürü dental kök hücreler özelinde desteklemektedir(Borden et al., 2004; Rezai-Rad et al., 2015).

Hücre-doku iskelesi komplekslerini hücre dağılımı ve penetrasyonunun en yüksek olduğu ikinci haftada implante etmenin bir diğer avantajının da, in vitro osteoblastların vasküler endotelial factor (VEGF) ekspresyonlarını gösterdikleri zaman aralığını kullanmak olabileceği rapor edilmiştir(Tokuda, Kato, Oiso, & Kozawa, 2003). Doku iskelesinin birbirine bağlantılı poröz yapıda olması, dolayısıyla geniş bir yüzey alanına sahip olmasının yapının iç kısımlarına doğru doku büyümesini arttırdığı gösterilmiştir(Liang et al., 2024; S. Yang, Leong, Du, & Chua, 2001).

Scaglione ve arkadaşları, raporlarında doku iskelesinin kimyasal kompozisyonu, total porözitesi, ve tamamen bağlantılı iç por yapısının önemine değinmiş ve “açık- yapı” yeni bir doku iskelesi mimarisi önermişlerdir. Bu amaçla tasarladıkları ağısı yapıdaki, hidroksiapatit küreler ile birleştirilmiş polimer liflerden oluşan, kalsiyum fosfat kaplı doku iskelesi yapısını, in vitro in vivo deneylerde doku oluşumu ve vasküler infiltrasyon açısından başarılı bulmuşlardır(Scaglione, Ilengo, Fato, & Quarto, 2009).

Polikaprolakton (PCL), kemik doku mühendisliğindeki etkinliği son yıllarda gösterilmiş olan sentetik, biyouyumlu ve biyolojik olarak absorbe olabilen bir materyaldir. PCL, kemik rejenereasyonunu ilgilendiren doku mühendisliği çalışmalarında osteojenik farklılaşmaya uygun kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip bir materyal olarak bildirilmiştir(Ebrahimi, Irani, Ardeshirylajimi, & Seyedjafari, 2022; Liang et al., 2024; Özdemir, Familiari, Huri, Firat, & Huri, 2023; Ramírez-Ruiz et al., 2025; Raoufinia et al., 2025).

Polikaprolakton, üç boyutlu üretim teknolojileriyle çözücü kimyasal materyallerin etkisine maruz kalmadan üretilen bir materyaldir. Porter ve arkadaşları, bu teknikle PCL nano ağlar üretmiş ve sıçan kaynaklı kemik iliği kök hücreleri ile kültüre ederek kısa dönem biyo uyumluluk ve uzun dönem biyoaktivite değerlendirmelerini yapmışlardır. Kısa dönemde, nano ağ yüzeylerde kontrol grubuna göre artmış hücre adhezyonu ve canlılığı; birinci, ikinci ve üçüncü haftada artmış kemik doku biyokimyasal belirteçleri tespit etmişlerdir. Üç boyutlu, çözücü kimyasal kullanılmadan üretilmiş PCL nano ağ yapıdaki iskelelerin, MSC'lerin biyolojik performansına katkı sağladığını ve kemik dokusu rejenerasyonu için başarılı bir doku iskelesi formu olduğunu belirtmişlerdir(Porter, Henson, & Papat, 2009).

Binulal ve arkadaşları, insan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin tutunma ve yayılma potansiyellerini, nanofibröz ve mikrofibröz elektro-eğrilmiş polikaprolakton iskeleler üzerinde değerlendirmiştir. Çalışmanın sonucunda hücrelerin nano fiberler üzerinde tutunma, yayılma ve proliferasyon özelliklerinin daha iyi olduğu gözlenmiştir. Nanofibröz PCL yapılar üzerindeki hücrelerin osteoblastik farklılaşma profilinin mikrofibröz yüzeydeki hücrelere göre daha iyi olduğu gözlenmiştir(Binulal et al., 2010).

Makro poröz yapı, iskelenin iç kısımlarına doku infiltrasyonu ve neovaskülarizasyon açısından önem taşımakla beraber,

mikroporöziteler hücre tutunması, proliferasyonu ve farklılaşması üzerinde etkilidir(Dellinger, Cesarano, & Jamison, 2007; Liang et al., 2024). Bu bilgilere dayanarak, çalışmamızda çok katmanlı ağ yapısına sahip, tüm boşlukları birbiriyle bağlantılı doku iskeleleri seçilmiştir.

Mezenkimal kök hücreler, literatürde çoğunlukla kemik iliği aspiratlarından izole edilmiştir. Bu prosedürün genellikle genel anestezi gerektirmesi, invazif ve ağırlı bir işlem olması ve elde edilen aspiratlardaki kök hücre fraksiyonunun düşük olması, kemik iliğine alternatif kaynakların araştırılmasının yaygınlaşmasına sebep olmuştur.

Çalışmamızda, çekim endikasyonu bulunan ve tıbbi atık olarak uzaklaştırılacak olan gömülü yirmi yaş dişi kaynaklı dental pulpa ve folikül kök hücreleri kullanılmıştır. Gömülü yirmi yaş dişlerinin germeleri, 6 yaş civarında gelişmeye başlamakta ve olgunlaşma safhasına çok uzun süre ulaşmayarak farklılaşmamış yapılarını korumaktadırlar. Bu durumda, embriyolojik gelişim açısından bulunduğu safha ve elde edilebilen doku miktarının fazlalığı nedeniyle gömülü yirmi yaş dişleri, ideal birer mezenkimal kök hücre kaynağı olarak değerlendirilebilir.

Yirmi yaş dişi folikül dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler, Morsczeck ve arkadaşları tarafından izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Araştırmacılar, 4 ve 5 haftalık kültürlerde farklılaşma potansiyelini değerlendirmek amacıyla 6 ve 17. pasajdaki hücre hatlarını kullanmıştır. 6. pasajdaki hücrelerin indüksiyonundan 5 hafta sonra, doku kültürü flaskına adhezyon gösteren transparan bir membran yapısı görülmüştür. Pasaj 17'deki hücrelerin indüksiyonundan 4 hafta sonra ise, kompakt kalsifiye nodüller izlenmiştir. Kültürlerdeki kalsifikasyon Von Kossa boyası ile değerlendirildiğinde, kompakt nodüller yapılarda membranöz yapılara göre daha yoğun olarak izlenmiştir. Alsiyan mavisi ile yapılan bağ dokusu boyamasında ise, altıncı pasajdaki kültürlerde

çok az veya negatif, nodüler kalsifiye yapıların görüldüğü 17. pasajda ise pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir(C. Morsczech et al., 2005).

Park ve arkadaşları, insan deri, kemik iliği ve dental folikül kaynaklı kök hücrelerin osteojenik potansiyelini karşılaştırdıkları çalışmalarında, hücreleri demineralize kemik matriksi üzerinde kültüre etmişlerdir. Kültür süresinin sonunda, kompleksler atimik farelere subkutan olarak implante edilmiştir. Dört haftalık sürenin sonunda, tüm gruplarda osteokalsin ekspresyonu ve radyoopasite gösteren kemik dokusu formasyonu izlenmiştir. Bununla beraber, en yüksek osteokalsin ekspresyonunun dental folikül kaynaklı kök hücre grubunda gözlemlendiği belirtilmiş, ve dental folikülün kemik rejenerasyonunda kuvvetli bir otolog kaynak olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır(Park et al., 2012).

İnsan kaynaklı DPSC'lerin osteojenik potansiyelinin PCL iskeleler üzerinde değerlendirildiği bir çalışma, Jensen ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Üzerinde DPSC kültüre edilen üç doku iskelesi modeli karşılaştırılmış, osteojenik diferansiyasyon 1, 7, 14 ve 21. günlerde değerlendirilmiştir. Yüzeyi nano-yapı oluşturularak ve hyaluronik asit/TCP ile fonksiyonalize edilen iskelelerde, osteoblastik aktivite ve kalsiyum depozisyonu 21. günde kontrol grubuna göre artmış olarak izlenmiştir. Bununla beraber, hyaluronik asit/TCP grubu hücre çoğalması, migrasyonu ve osteojenik diferansiyasyon bakımından diğer gruplara göre daha başarılı sonuçlar vermiştir. Çalışmanın sonucunda, fonksiyonalize edilmiş PCL iskeleler üzerinde DPSC kültürasyonunun, in vivo çalışmalarda kullanılabilecek bir doku mühendisliği kompleksi olduğu sonucuna varılmıştır(Jensen et al., 2015).

DPSC ve DFSC'lerin direkt karşılaştırılmasının yapıldığı çalışmalar literatürde nadirdir. Shoi ve arkadaşları, süpernumerer kesici dişlerden elde ettikleri DPSC ve DFSC'lerin karakterizasyonunu yaptıkları çalışmada, hücre proliferasyonu,

koloni oluşturma kapasiteleri, gen ekspresyonları, hücre yüzey belirteçleri ve farklılaşma kapasitelerini değerlendirmişlerdir. Elde edilebilen folikül dokusunun miktarının fazlalığı nedeniyle daha elverişli bir kaynak olduğuna değinmişlerdir. Hücrelerin proliferasyon oranı ve koloni oluşturma kapasiteleri, DFSC'lerde DPSC'lere oranla belirgin derecede yüksek bulunmuştur. Uygun kültür ortamında, hücre hatlarının osteojenik farklılaşması gösterilmiştir. DPSC ve DFSC'lerin benzer kök hücre karakteristiklerine sahip olmakla beraber, DFSC'lerin daha kolay erişim ve daha yüksek proliferasyon oranı sebebiyle rejeneratif uygulamalarda daha elverişli bir kök hücre kaynağı olduğunu belirtmişlerdir(Shoi, Aoki, Ohya, Takagi, & Shimokawa, n.d.).

Jo ve arkadaşları çalışmalarında, mandibular kemik iliği, ve dental kaynaklı kök hücreleri karşılaştırmış ve optimum kültür koşullarını sağlamak amacıyla üç farklı kültür medyumu kullanmışlardır. Çoğalma kapasitesi pasaj 3'teki hücre kolonileriyle yapılmış, ve folikül dokusunun proliferasyon oranı bakımından diğer kök hücre gruplarına göre üstün olduğu gözlenmiştir. Folikül dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin, koloni oluşturan hücre popülasyonu sayısının diğer grupların iki katı olduğu raporlanmıştır. Hücre kolonileri farklılaştırma medyumunda 21 gün boyunca inkübe edildikten sonra, boyama işlemi yapılmıştır. Mandibular kemik iliği ve periodontal ligament kaynaklı kök hücrelerin ALP aktiviteleri ve Alizarin kırmızısı ile boyanma miktarları diğer gruplara göre yüksek bulunmuştur. DPSC grubu DFSC grubundan daha yüksek ALP aktivitesi göstermesine rağmen, kalsiyum miktarının DFSC grubunda daha yüksek olduğu izlenmiştir(Jo et al., 2007).

Lindroos ve arkadaşları, insan periodontal ligament, dental pulpa, folikül kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve bukkal mukozadan izole edilmiş fibroblastların karakterizasyon çalışmaları yapmışlardır. Bukkal mukoza fibroblastları için dört ve altı, diğer kök hücre grupları için iki ve beşinci pasajlar arasındaki hücreler

kullanılmıştır. Koloniler, 14 gün boyunca farklılaşma medyumunda inkübe edilmiştir. Kültür süresinin sonunda, pulpa, folikül ve periodontal ligament kaynaklı kök hücrelerin yüksek ALP aktivitesi ve osteojenik farklılaşma gösterdiği, bukkal mukozal fibroblastlarının ise osteojenik farklılaşmaya uğramadığı ve ALP aktivitesinin ihmal edilebilecek düzeyde düşük olduğu gözlenmiştir. Çalışmada ayrıca, pulpa ve periodontal ligament kök hücrelerinin benzer morfolojiye sahip olduğu, folikül kaynaklı kök hücrelerin ise daha küçük boyutlara sahip olduğu bildirilmiştir(Lindroos et al., 2008). Çalışmamızın bulguları, Lindroos ve arkadaşlarının rapor ettiği bulguları destekler niteliktedir.

14 günlük kültür periyodunda, hücrelerin başlangıçta yuvarlak morfolojiye sahip olduğu, ilerleyen günlerde iğsi yapıya doğru farklılaşarak multi katmanlı organizasyonlar oluşturdıkları, ve fibriller boyunca yayılmış oldukları gözlenmiştir. MSC'lerin yüzey topografisine göre morfolojilerini değiştirdikleri, literatürde rapor edilmiş bir bilgidir(Baker, Nathan, Gee, & Mauck, 2010; Vaquette et al., 2010). Bu süreç, hücrenin mikroçevresi ile ilgili hücre-hücre, hücre-hücreler arası matriks, ve hücre- biyomateriyal etkileşimleriyle meydana gelen sinyalizasyon mekanizmaları ile gerçekleşmektedir(Potier et al., 2007). Bu etkinin, elektro eğrilmiş poly-l-lactide, polilaktik asit (PLA)/demineralize kemik materyali, ve fibrin jeller ile gözlenmediği rapor edilmiştir(Martins et al., 2010). Osteojenik diferansiyasyonun, örülmüş fibril komponenti bulunan yapılarda daha etkili olduğu literatürde yaygın olarak bildirilmiştir(D. Kim et al., 2024; Martins et al., 2010; Sowmya, Hemavathi, & Panda, 2021; Xue et al., 2017).

Çalışmamızda nmDFSC grubunda en yüksek hücre sayısı ve kollajen formasyon oranı gözlenmiştir. Doku iskelesinin tabanındaki elektro-eğrilmiş nanomesh bazal membran yapısının, hücre yayılımı, tutunması ve çoğalması üzerine olumlu etkileri olduğu görülmüştür. DPSC ve DFSC grupları arasında görülen morfolojik

farklar ile hücre sayısı ve kollajen formasyonu arasındaki farkların, hücre hatlarının spesifik diferansiyasyon potansiyelinin yanı sıra, asenkron farklılaşmasının da sonucu olabileceği düşünülmüştür.

Tüm bu bilgilere dayanarak, hücrelerin mikroçevre koşulları ile etkileşiminin kritik olduğu, kullanılan kültür, doku iskelesi ve hücre tipinin farklı sonuçlara yol açtığı sonucuna varılabilir. Çalışmamızda aynı kültür koşullarında aynı süre ile kültüre edilen iki hücre grubunun, ve iki doku iskelesi grubunun karşılaştırılması ile elde edilmiş çıktıların objektif bir değerlendirme sağladığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak,

-DPSC ve DFSC'ler, rejeneratif tedavi çalışmaları için elde edilmesi oldukça kolay, ve kriyoprezervasyonu mümkün kaynaklardır.

-Gömülü yirmi yaş dişi kaynaklı dental pulpa ve folikül dokusundan elde edilen kök hücre hatları, kemik iliği kaynaklı kolonilere göre daha yüksek proliferatif etkinlik göstermektedir.

-DPSC ve DFSC'ler, osteojenik farklılaşma potansiyeline sahiptir. Çalışmamızda DFSC'lerin daha yüksek proliferasyon ve tip I kollajen formasyon oranına sahip olduğu görüldü.

-Kemik doku mühendisliği uygulamalarında, nmPCL yapıların defektli dokuların yeniden yapılandırılması için etkin olarak kullanımı mümkündür.

Nanomesh PCL iskele materyalleri ve hücre kaynağı olarak dental folikül kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile kemik doku mühendisliğinde başarılı uygulamalar yapılabileceği öngörülmektedir. Kök hücre-doku iskelesi komplekslerinin in vitro ortamda gösterdiği özelliklerin, in vivo kemik iyileşmesi paternlerini araştıran çalışmalar ile korelasyonunun sağlanması gerekmektedir. Bu sonuçlara dayanarak, çalışmanın devamının, ortotopik kritik boyuttaki deneysel defektlerde gerçekleştirilmesi gerektiği görüşüne varılmıştır.

Bilgilendirme

Bu yazın, Elif M. Özcan'ın M. Kamil Göker'ın tez danışmanlığı ve Tunc Akkoç'un eş danışmanlığında yürütülen, 388594 kayıt numaralı 'Mezenkimal Kök Hücre Türlerinin Kemik Rejenerasyonuna Olan Etkisinin Deneysel Modelde İncelenmesi' başlıklı doktora tezinden türetilmiştir.

REFERANSLAR

Agrawal, C. M., & Ray, R. B. (2001). Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 55(2), 141–150.

Arinzeh, T. L., Peter, S. J., Archambault, M. P., van den Bos, C., Gordon, S., Kraus, K., ... Kadiyala, S. (2003). Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 85-A(10), 1927–1935. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14563800>

Baker, B. M., Nathan, A. S., Gee, A. O., & Mauck, R. L. (2010). The influence of an aligned nanofibrous topography on human mesenchymal stem cell fibrochondrogenesis. *Biomaterials*, 31(24), 6190–6200. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.04.036>

Barry, F. P., & Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(4), 568–584. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.11.001>

Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., ... Hoffman, R. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology*, 30(1), 42–48. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(01\)00769-X](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(01)00769-X)

Batorsky, A., Liao, J., Lund, A. W., Plopper, G. E., & Stegemann, J. P. (2005). Encapsulation of adult human mesenchymal stem cells within collagen-agarose microenvironments. *Biotechnology and Bioengineering*, 92(4), 492–500. <https://doi.org/10.1002/bit.20614>

Binulal, N. S., Deepthy, M., Selvamurugan, N., Shalumon, K. T., Suja, S., Mony, U., ... Nair, S. V. (2010). Role of nanofibrous poly(caprolactone) scaffolds in human mesenchymal stem cell

attachment and spreading for in vitro bone tissue engineering--response to osteogenic regulators. *Tissue Engineering. Part A*, 16(2), 393–404. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0242>

Borden, M., Attawia, M., Khan, Y., El-Amin, S. F., & Laurencin, C. T. (2004). Tissue-engineered bone formation in vivo using a novel sintered polymeric microsphere matrix. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 86(8), 1200–1208. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.86B8.14267>

Burg, K. J. L., Porter, S., & Kellam, J. F. (2000). Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 21(23), 2347–2359. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00102-2)

Christopherson, G. T., Song, H., & Mao, H. Q. (2009). The influence of fiber diameter of electrospun substrates on neural stem cell differentiation and proliferation. *Biomaterials*, 30(4), 556–564. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.10.004>

Chue, W. L., Campbell, G. R., Caplice, N., Muhammed, A., Berry, C. L., Thomas, A. C., ... Campbell, J. H. (2004). Dog peritoneal and pleural cavities as bioreactors to grow autologous vascular grafts. *Journal of Vascular Surgery*, 39(4), 859–867. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2003.03.003>

Damme, A., Driessche, T., Collen, D., & Chuah, M. (2002). Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy. *Current Gene Therapy*, 2(2), 195–209. <https://doi.org/10.2174/1566523024605645>

D'Aquino, R., De Rosa, A., Lanza, V., Tirino, V., Laino, L., Graziano, A., ... Papaccio, G. (2009). Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *European Cells & Materials*, 18, 75–83. <https://doi.org/10.22203/ECM.V018A07>

d'Aquino, R., Graziano, A., Sampaolesi, M., Laino, G., Pirozzi, G., De Rosa, A., & Papaccio, G. (2007). Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and

endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death and Differentiation*, 14(6), 1162–1171. <https://doi.org/10.1038/SJ.CDD.4402121>

D'Aquino, R., Papaccio, G., Laino, G., & Graziano, A. (2008). Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Reviews*, 4(1), 21–26. <https://doi.org/10.1007/S12015-008-9013-5>

Dawson, E., Mapili, G., Erickson, K., Taqvi, S., & Roy, K. (2008). Biomaterials for stem cell differentiation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(2), 215–228. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2007.08.037>

De Kemp, V., De Graaf, P., Fledderus, J. O., Bosch, J. L. H. R., & De Kort, L. M. O. (2015). Tissue engineering for human urethral reconstruction: systematic review of recent literature. *PloS One*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0118653>

Dellinger, J. G., Cesarano, J., & Jamison, R. D. (2007). Robotic deposition of model hydroxyapatite scaffolds with multiple architectures and multiscale porosity for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 82(2), 383–394. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.31072>

Devine, S. M., Peter, S., Martin, B. J., Barry, F., & McIntosh, K. R. (2001). Mesenchymal stem cells: stealth and suppression. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 7 Suppl 2, S76-82. Retrieved from <https://research.universityofgalway.ie/en/publications/mesenchymal-stem-cells-stealth-and-suppression-5/>

Dhariwala, B., Hunt, E., & Boland, T. (2004). Rapid prototyping of tissue-engineering constructs, using photopolymerizable hydrogels and stereolithography. *Tissue Engineering*, 10(9–10), 1316–1322. <https://doi.org/10.1089/TEN.2004.10.1316>

Discher, D. E., Janmey, P., & Wang, Y. L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science (New York*,

N.Y.), 310(5751), 1139–1143.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1116995>

Docheva, D., Popov, C., Mutschler, W., & Schieker, M. (2007). Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11(1), 21–38.
<https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2007.00001.X>

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.
<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

Ebrahimi, Z., Irani, S., Ardeshirylajimi, A., & Seyedjafari, E. (2022). Enhanced osteogenic differentiation of stem cells by 3D printed PCL scaffolds coated with collagen and hydroxyapatite. *Scientific Reports* 2022 12:1, 12(1), 12359-.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-15602-y>

Endres, M., Hutmacher, D. W., Salgado, A. J., Kaps, C., Ringe, J., Reis, R. L., ... Schantz, J. T. (2003). Osteogenic induction of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells in novel synthetic polymer-hydrogel matrices. *Tissue Engineering*, 9(4), 689–702. <https://doi.org/10.1089/107632703768247386>

Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, 126(4), 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>

Felthaus, O., Ernst, W., Driemel, O., Reichert, T. E., Schmalz, G., & Morsczeck, C. (2010). TGF- β stimulates glial-like differentiation in murine dental follicle precursor cells (mDFPCs). *Neuroscience Letters*, 471(3), 179–184.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.01.037>

Felthaus, O., Gosau, M., & Morsczeck, C. (2014). ZBTB16 induces osteogenic differentiation marker genes in dental follicle cells independent from RUNX2. *Journal of Periodontology*, 85(5). <https://doi.org/10.1902/JOP.2013.130445>

Fortier, L. A. (2005). Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery: VS*, 34(5), 415–423. <https://doi.org/10.1111/J.1532-950X.2005.00063.X>

Fox, J. M., Chamberlain, G., Ashton, B. A., & Middleton, J. (2007). Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *British Journal of Haematology*, 137(6), 491–502. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.2007.06610.X>

Gelse, K., Pöschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12), 1531–1546. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>

Giuliani, A., Manescu, A., Langer, M., Rustichelli, F., Desiderio, V., Paino, F., ... Papaccio, G. (2013). Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line holotomography revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: biological and clinical implications. *Stem Cells Translational Medicine*, 2(4), 316–324. <https://doi.org/10.5966/SCTM.2012-0136>

Goel, A., Sangwan, S. S., Siwach, R. C., & Ali, A. M. (2005). Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. *Injury*, 36(1), 203–206. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2004.01.009>

Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–13630. <https://doi.org/10.1073/PNAS.240309797>

Gross, R. A., & Kalra, B. (2002). Biodegradable polymers for the environment. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5582), 803–807. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.297.5582.803>

Guarino, V., Causa, F., Taddei, P., di Foggia, M., Ciapetti, G., Martini, D., ... Ambrosio, L. (2008). Polylactic acid fibre-reinforced polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 29(27), 3662–3670. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.05.024>

Handa, K., Saito, M., Tsunoda, A., Yamauchi, M., Hattori, S., Sato, S., ... Narayanan, A. S. (2002). Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo. *Connective Tissue Research*, 43(2–3), 406–408. <https://doi.org/10.1080/03008200290001023>

Hattori, H., Sato, M., Masuoka, K., Ishihara, M., Kikuchi, T., Matsui, T., ... Ishihara, M. (2004). Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells, Tissues, Organs*, 178(1), 2–12. <https://doi.org/10.1159/000081088>

Hayashi, O., Katsube, Y., Hirose, M., Ohgushi, H., & Ito, H. (2008). Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcified Tissue International*, 82(3), 238–247. <https://doi.org/10.1007/s00223-008-9112-y>

Hollister, S. J. (2005). Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*, 4(7), 518–524. <https://doi.org/10.1038/NMAT1421>

Honda, M. J., Imaizumi, M., Suzuki, H., Ohshima, S., Tsuchiya, S., & Satomura, K. (2011). Stem cells isolated from human dental follicles have osteogenic potential. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 111(6), 700–708. <https://doi.org/10.1016/J.TRIPLEO.2010.08.004>

Hou, Y., Wang, W., & Bartolo, P. (2022). Investigation of polycaprolactone for bone tissue engineering scaffolds: In vitro degradation and biological studies. *Materials & Design*, 216, 110582. <https://doi.org/10.1016/J.MATDES.2022.110582>

Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21(24), 2529–2543. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00121-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00121-6)

Hutmacher, D. W., Sitter, M., & Risbud, M. V. (2004). Scaffold-based tissue engineering: Rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends in Biotechnology*, 22(7), 354–362. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.05.005>

Ifkovits, J. L., & Burdick, J. A. (2007). Review: photopolymerizable and degradable biomaterials for tissue engineering applications. *Tissue Engineering*, 13(10), 2369–2385. <https://doi.org/10.1089/TEN.2007.0093>

Jaquet, K., Krause, K. T., Denschel, J., Faessler, P., Nauerz, M., Geidel, S., ... Kuck, K. H. (2005). Reduction of myocardial scar size after implantation of mesenchymal stem cells in rats: what is the mechanism? *Stem Cells and Development*, 14(3), 299–309. <https://doi.org/10.1089/SCD.2005.14.299>

Jensen, J., Kraft, D. C. E., Lysdahl, H., Foldager, C. B., Chen, M., Kristiansen, A. A., ... Bünger, C. E. (2015). Functionalization of polycaprolactone scaffolds with hyaluronic acid and β -TCP facilitates migration and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Tissue Engineering. Part A*, 21(3–4), 729–739. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2014.0177>

Jo, Y. Y., Lee, H. J., Kook, S. Y., Choung, H. W., Park, J. Y., Chung, J. H., ... Choung, P. H. (2007). Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Engineering*, 13(4), 767–773. <https://doi.org/10.1089/TEN.2006.0192>

Kémoun, P., Laurencin-Dalicieux, S., Rue, J., Farges, J. C., Gennero, I., Conte-Auriol, F., ... Salles, J. P. (2007). Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell and Tissue Research*, 329(2), 283–294. <https://doi.org/10.1007/S00441-007-0397-3>

Khademhosseini, A., Langer, R., Borenstein, J., & Vacanti, J. P. (2006). Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2480–2487. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0507681102>

Kim, D., Choi, H., Lee, M. J., Cho, W. J., Lee, G. W., Seo, Y. K., ... Lee, S. H. (2024). Oxygen plasma-modified polycaprolactone nanofiber membrane activates the biological function in cell adhesion, proliferation, and migration through the phosphorylation of FAK and ERK1/2, enhancing bone regeneration. *Chemical Engineering Journal*, 499, 156003. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2024.156003>

Kim, G. H. (2008). Electrospun PCL nanofibers with anisotropic mechanical properties as a biomedical scaffold. *Biomedical Materials (Bristol, England)*, 3(2), 25010. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/3/2/025010>

Klingelhöffer, C., Reck, A., Ettl, T., & Morsczeck, C. (2016). The parathyroid hormone-related protein is secreted during the osteogenic differentiation of human dental follicle cells and inhibits the alkaline phosphatase activity and the expression of DLX3. *Tissue and Cell*, 48(4), 334–339. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.05.007>

Kon, E., Muraglia, A., Corsi, A., Bianco, P., Marcacci, M., Martin, I., ... Quarto, R. (2023). Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *JOURNAL OF*

BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, 49, 328–337. Retrieved from <https://unige.iris.cineca.it/handle/11567/286544>

Kwan, M. D., Slater, B. J., Wan, D. C., & Longaker, M. T. (2008). Cell-based therapies for skeletal regenerative medicine. *Human Molecular Genetics*, 17(R1), R93-8. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn071>

Kweon, H. Y., Yoo, M. K., Park, I. K., Kim, T. H., Lee, H. C., Lee, H. S., ... Cho, C. S. (2003). A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials*, 24(5), 801–808. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00370-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00370-8)

Laino, G., Carinci, F., Graziano, A., D'Aquino, R., Lanza, V., De Rosa, A., ... Papaccio, G. (2006). In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 17(3), 511–515. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16770190>

Laino, G., D'Aquino, R., Graziano, A., Lanza, V., Carinci, F., Naro, F., ... Papaccio, G. (2005). A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 20(8), 1394–1402. <https://doi.org/10.1359/JBMR.050325>

Lee, S. H., & Shin, H. (2007). Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(4–5), 339–359. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.016>

Liang, H. Y., Lee, W. K., Hsu, J. T., Shih, J. Y., Ma, T. L., Vo, T. T. T., ... Lee, I. T. (2024). Polycaprolactone in Bone Tissue Engineering: A Comprehensive Review of Innovations in Scaffold Fabrication and Surface Modifications. *Journal of Functional Biomaterials*, 15(9), 243. <https://doi.org/10.3390/JFB15090243>

Lim, S. H., & Mao, H. Q. (2009). Electrospun scaffolds for stem cell engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(12), 1084–1096. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2009.07.011>

Lima, R. L. de, Holanda Afonso, R. C. de, Neto, V. M., Bolognese, A. M., dos Santos, M. F. H., & Souza, M. M. G. de. (2017). Human dental follicle cells express embryonic, mesenchymal and neural stem cells markers. *Archives of Oral Biology*, 73, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.10.003>

Lindroos, B., Mäenpää, K., Ylikomi, T., Oja, H., Suuronen, R., & Miettinen, S. (2008). Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(2), 329–335. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2008.01.081>

Liu, C., Xia, Z., & Czernuszka, J. T. (2007). Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chemical Engineering Research and Design*, 85(7 A), 1051–1064. <https://doi.org/10.1205/CHERD06196>

Liu Tsang, V., & Bhatia, S. N. (2004). Three-dimensional tissue fabrication. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(11), 1635–1647. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.05.001>

Lucaciu, O., Sorițău, O., Gheban, D., Ciuca, D. R., Virtic, O., Vulpoi, A., ... Crisan, B. (2015). Dental follicle stem cells in bone regeneration on titanium implants. *BMC Biotechnology*, 15(1), 114. <https://doi.org/10.1186/S12896-015-0229-6>

Malafaya, P. B., Pedro, A. J., Peterbauer, A., Gabriel, C., Redl, H., & Reis, R. L. (2005). Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 16(12), 1077–1085. <https://doi.org/10.1007/S10856-005-4709-4>

Mao, J. J., Giannobile, W. V., Helms, J. A., Hollister, S. J., Krebsbach, P. H., Longaker, M. T., & Shi, S. (2006). Craniofacial tissue engineering by stem cells. *Journal of Dental Research*, 85(11), 966–979. <https://doi.org/10.1177/154405910608501101>

Martins, A., Duarte, A. R. C., Faria, S., Marques, A. P., Reis, R. L., & Neves, N. M. (2010). Osteogenic induction of hBMSCs by electrospun scaffolds with dexamethasone release functionality. *Biomaterials*, 31(22), 5875–5885. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.04.010>

Matsubara, T., Suardita, K., Ishii, M., Sugiyama, M., Igarashi, A., Oda, R., ... Kato, Y. (2005). Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 20(3), 399–409. <https://doi.org/10.1359/JBMR.041117>

Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., & Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*, 103(12), 4619–4621. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-11-3909>

Miyazaki, K., & Maruyama, T. (2014). Partial regeneration and reconstruction of the rat uterus through recellularization of a decellularized uterine matrix. *Biomaterials*, 35(31), 8791–8800. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2014.06.052>

Moran, C. J., Busilacchi, A., Lee, C. A., Athanasiou, K. A., & Verdonk, P. C. (2015). Biological augmentation and tissue engineering approaches in meniscus surgery. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, 31(5), 944–955. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2014.11.044>

Mori, G., Ballini, A., Carbone, C., Oranger, A., Brunetti, G., Di Benedetto, A., ... Grassi, F. R. (2012). Osteogenic differentiation

of dental follicle stem cells. *International Journal of Medical Sciences*, 9(6), 480–487. <https://doi.org/10.7150/ijms.4583>

Morsczeck, C. (2006). Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. *Calcified Tissue International*, 78(2), 98–102. <https://doi.org/10.1007/S00223-005-0146-0>

Morsczeck, C., Moehl, C., Götz, W., Heredia, A., Schäffer, T. E., Eckstein, N., ... Hoffmann, K. H. (2005). In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biology International*, 29(7), 567–575. <https://doi.org/10.1016/J.CELLBI.2005.03.020>

Morsczeck, C., Reck, A., & Beck, H. C. (2017). The hedgehog-signaling pathway is repressed during the osteogenic differentiation of dental follicle cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 428(1–2), 79–86. <https://doi.org/10.1007/S11010-016-2918-4>

Morsczeck, Christian, & Reichert, T. E. (2017). The dexamethasone induced osteogenic differentiation of dental follicle cells. *Histology and Histopathology*, 32(12), 1223–1229. <https://doi.org/10.14670/HH-11-907>

Morsczeck, Christian, Schmalz, G., Reichert, T. E., Völlner, F., Galler, K., & Driemel, O. (2008). Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clinical Oral Investigations*, 12(2), 113–118. <https://doi.org/10.1007/S00784-007-0170-8>

Muschler, G. F., Matsukura, Y., Nitto, H., Boehm, C. A., Valdevit, A. D., Kambic, H. E., ... Powell, K. A. (2005). Selective retention of bone marrow-derived cells to enhance spinal fusion. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 432(432), 242–251. <https://doi.org/10.1097/01.BLO.0000149812.32857.8B>

Nakashima, M. (2005). Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine*

and Growth Factor Reviews, 16(3 SPEC. ISS.), 369–376.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.02.011>

Nakashima, M., & Reddi, A. H. (2003). The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nature Biotechnology*, 21(9), 1025–1032. <https://doi.org/10.1038/nbt864>

Nauta, A. J., Kruisselbrink, A. B., Lurvink, E., Willemze, R., & Fibbe, W. E. (2006). Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(4), 2080–2087.
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.177.4.2080>

Ndreu, A., Nikkola, L., Ylikaupilar, H., Ashammakhi, N., & Hasirci, V. (2008). Electrospun biodegradable nanofibrous mats for tissue engineering. *Nanomedicine (London, England)*, 3(1), 45–60.
<https://doi.org/10.2217/17435889.3.1.45>

Nerurkar, N. L., Elliott, D. M., & Mauck, R. L. (2007). Mechanics of oriented electrospun nanofibrous scaffolds for annulus fibrosus tissue engineering. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 25(8), 1018–1028. <https://doi.org/10.1002/JOR.20384>

Niemeyer, P., Szalay, K., Luginbühl, R., Südkamp, N. P., & Kasten, P. (2010). Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. *Acta Biomaterialia*, 6(3), 900–908.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.09.007>

Nisbet, D. R., Forsythe, J. S., Shen, W., Finkelstein, D. I., & Horne, M. K. (2009). Review paper: a review of the cellular response on electrospun nanofibers for tissue engineering. *Journal of Biomaterials Applications*, 24(1), 7–29.
<https://doi.org/10.1177/0885328208099086>

Özdemir, E., Familiari, F., Huri, P. Y., Firat, A., & Huri, G. (2023). Use of 3D-printed polycaprolactone + hyaluronic acid-based

scaffold in orthopedic practice: Report of two cases. *Journal of 3D Printing in Medicine*, 7(1), 3–4. <https://doi.org/10.2217/3DP-2022-0020>;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER

Pachence JM, & Kohn J. (2000). Biodegradable polymers. In Lanza RP Langer R Vacanti J (Ed.), *Principles of Tissue Engineering* (2nd ed., pp. 251–262). California: Academic Press.

Panetta, N. J., Gupta, D. M., Quarto, N., & Longaker, M. T. (2009). Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Panminerva Medica*, 51(1), 25–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19352307>

Park, B. W., Kang, E. J., Byun, J. H., Son, M. G., Kim, H. J., Hah, Y. S., ... Rho, G. J. (2012). In vitro and in vivo osteogenesis of human mesenchymal stem cells derived from skin, bone marrow and dental follicle tissues. *Differentiation*, 83(5), 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2012.02.008>

Pisciotta, A., Riccio, M., Carnevale, G., Beretti, F., Gibellini, L., Maraldi, T., ... De Pol, A. (2012). Human serum promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *PloS One*, 7(11), e50542. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050542>

Planka, L., Gal, P., Kecova, H., Klima, J., Hlucilova, J., Filova, E., ... Necas, A. (2008). Allogeneic and autogenous transplantations of MSCs in treatment of the physeal bone bridge in rabbits. *BMC Biotechnology* 2008 8:1, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-70>

Porada, C. D., & Almeida-Porada, G. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(12), 1156–1166. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.08.010>

Porter, J. R., Henson, A., & Popat, K. C. (2009). Biodegradable poly(epsilon-caprolactone) nanowires for bone tissue

engineering applications. *Biomaterials*, 30(5), 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.022>

Potier, E., Ferreira, E., Andriamanalijaona, R., Pujol, J.-P., Oudina, K., Logeart-Avramoglou, D., & Petite, H. (2007). Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone*, 40(4), 1078–1087. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.11.024>

Ramírez-Ruiz, F., Núñez-Tapia, I., Piña-Barba, M. C., Alvarez-Pérez, M. A., Guarino, V., & Serrano-Bello, J. (2025). Polycaprolactone for Hard Tissue Regeneration: Scaffold Design and In Vivo Implications. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING12010046>

Rao, M. S. (2004). Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells and Development*, 13(5), 452–455. <https://doi.org/10.1089/SCD.2004.13.452>

Rao, S. S., & Winter, J. O. (2009). Adhesion molecule-modified biomaterials for neural tissue engineering. *Frontiers in Neuroengineering*, 2(JUN). <https://doi.org/10.3389/NEURO.16.006.2009>

Raoufinia, R., Hashemi, S., Arabi, K., Naghipoor, K., Fakoor, F., & Saburi, E. (2025). Poly ϵ -Caprolactone Scaffolds: Advancements in Bone Regeneration and Grafting. *OBM Transplantation* 2025, Vol. 9, 245, 9(2), 1–8. <https://doi.org/10.21926/OBM.TRANSPLANT.2502245>

Rezai Rad, M., Liu, D., He, H., Brooks, H., Xiao, M., Wise, G. E., & Yao, S. (2015). The role of dentin matrix protein 1 (DMP1) in regulation of osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells (DFSCs). *Archives of Oral Biology*, 60(4), 546–556. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.12.013>

Rezai-Rad, M., Bova, J. F., Orooji, M., Pepping, J., Qureshi, A., Del Piero, F., ... Yao, S. (2015). Evaluation of bone regeneration potential of dental follicle stem cells for treatment of craniofacial

defects. *Cytotherapy*, 17(11), 1572–1581.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.07.013>

Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., & Boccaccini, A. R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(18), 3413–3431.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.01.039>

Richardson, T. P., Peters, M. C., Ennett, A. B., & Mooney, D. J. (2001). Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nature Biotechnology*, 19(11), 1029–1034.
<https://doi.org/10.1038/NBT1101-1029>

Rimondini, L., & Mele, S. (2009). Stem cell technologies for tissue regeneration in dentistry. *Minerva Stomatologica*, 58(10), 483–500. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19893474>

Sachlos, E., Czernuszka, J. T., Gogolewski, S., & Dalby, M. (2003). Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European Cells & Materials*, 5, 29–40. <https://doi.org/10.22203/ECM.V005A03>

Salgado, A. J., Sousa, R. A., Fraga, J. S., Pego, J. M., Silva, B. A., Malva, J. O., ... Sousa, N. (2009). Effects of Starch/Polycaprolactone-based Blends for Spinal Cord Injury Regeneration in Neurons/Glial Cells Viability and Proliferation. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 24(3), 235–248.
<https://doi.org/10.1177/0883911509104081>;ISSUE:ISSUE:DOI

Scaglione, S., Ilengo, C., Fato, M., & Quarto, R. (2009). Hydroxyapatite-coated polycaprolacton wide mesh as a model of open structure for bone regeneration. *Tissue Engineering. Part A*, 15(1), 155–163. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0410>

Schmidt, C. E., & Leach, J. B. (2003). Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annual Review of*

Biomedical Engineering, 5, 293–347.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOENG.5.011303.120731>

Shanti, R. M., Li, W. J., Nesti, L. J., Wang, X., & Tuan, R. S. (2007). Adult mesenchymal stem cells: biological properties, characteristics, and applications in maxillofacial surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery : Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 65(8), 1640–1647.
<https://doi.org/10.1016/J.JOMS.2007.04.008>

Shin, M., Matsuda, K., Ishii, O., Terai, H., Kaazempur-Mofrad, M., Borenstein, J., ... Vacanti, J. P. (2004). Endothelialized networks with a vascular geometry in microfabricated poly(dimethyl siloxane). *Biomedical Microdevices*, 6(4), 269–278.
<https://doi.org/10.1023/B:BMMD.0000048559.29932.27/METRIC>
S

Shoi, K., Aoki, K., Ohya, K., Takagi, Y., & Shimokawa, H. (n.d.). Characterization of pulp and follicle stem cells from impacted supernumerary maxillary incisors. *Pediatric Dentistry*, 36(3), 79–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24960375>

Sinha, V. R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., & Trehan, A. (2004). Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 278(1), 1–23.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.01.044>

Sowmya, B., Hemavathi, A. B., & Panda, P. K. (2021). Poly (ϵ -caprolactone)-based electrospun nano-featured substrate for tissue engineering applications: a review. *Progress in Biomaterials*, 10(2), 91–117. <https://doi.org/10.1007/S40204-021-00157-4>

Spitkovsky, D., & Hescheler, J. (2008). Adult mesenchymal stromal stem cells for therapeutic applications. *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies : MITAT : Official Journal of the Society for Minimally Invasive Therapy*, 17(2), 79–90.
<https://doi.org/10.1080/13645700801969758>

Stappenbeck, T. S., & Miyoshi, H. (2009). The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5935), 1666–1669. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1172687>

Suki, B. (2014). Assessing the functional mechanical properties of bioengineered organs with emphasis on the lung. *Journal of Cellular Physiology*, 229(9), 1134–1140. <https://doi.org/10.1002/JCP.24600>

Takahashi, K., Ogura, N., Aonuma, H., Ito, K., Ishigami, D., Kamino, Y., & Kondoh, T. (2013). Bone morphogenetic protein 6 stimulates mineralization in human dental follicle cells without dexamethasone. *Archives of Oral Biology*, 58(6), 690–698. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2012.10.018>

Takahashi, Y., Yamamoto, M., & Tabata, Y. (2005). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials*, 26(17), 3587–3596. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2004.09.046>

Tang, Z. G., Black, R. A., Curran, J. M., Hunt, J. A., Rhodes, N. P., & Williams, D. F. (2004). Surface properties and biocompatibility of solvent-cast poly[ϵ -caprolactone] films. *Biomaterials*, 25(19), 4741–4748. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2003.12.003>

Todorovic, V., Markovic, D., Milosevic-Jovcic, N., Petakov, M., Balint, B., Colic, M., ... Nikolic, N. (2008). Dental pulp stem cells: Potential significance in regenerative medicine. *Stomatoloski Glasnik Srbije*, 55(3), 170–179. <https://doi.org/10.2298/SGS0803170T>

Tokuda, H., Kato, K., Oiso, Y., & Kozawa, O. (2003). Contrasting effects of triiodothyronine on heat shock protein 27 induction and vascular endothelial growth factor synthesis stimulated by TGF- β in osteoblasts. *Molecular and Cellular*

Endocrinology, 201(1–2), 33–38. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(03\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(03)00004-2)

Vaquette, C., Kahn, C., Frochot, C., Nouvel, C., Six, J. L., De Isla, N., ... Wang, X. (2010). Aligned poly(L-lactic-co-ε-caprolactone) electrospun microfibers and knitted structure: a novel composite scaffold for ligament tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 94(4), 1270–1282. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.32801>

Viale-Bouroncle, S., Felthaus, O., Schmalz, G., Brockhoff, G., Reichert, T. E., & Morsczeck, C. (2012). The transcription factor DLX3 regulates the osteogenic differentiation of human dental follicle precursor cells. *Stem Cells and Development*, 21(11), 1936–1947. <https://doi.org/10.1089/SCD.2011.0422>

Viale-Bouroncle, S., Gosau, M., & Morsczeck, C. (2014). NOTCH1 signaling regulates the BMP2/DLX-3 directed osteogenic differentiation of dental follicle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(2), 500–504. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2013.11.120>

Wan, Y., Feng, G., Shen, F. H., Laurencin, C. T., & Li, X. (2008). Biphasic scaffold for annulus fibrosus tissue regeneration. *Biomaterials*, 29(6), 643–652. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.10.031>

Wei, X., Ling, J., Wu, L., Liu, L., & Xiao, Y. (2007). Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *Journal of Endodontics*, 33(6), 703–708. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2007.02.009>

Wu, X., Hu, L., Li, Y., Li, Y., Wang, F., Ma, P., ... Wang, S. (2018). SCAPs Regulate Differentiation of DFSCs During Tooth Root Development in Swine. *International Journal of Medical Sciences*, 15(4), 291. <https://doi.org/10.7150/IJMS.22495>

Xi, L., Guoqing, C., & Weidong, T. (2017). [Effect of hypoxia on the biological characteristics of human dental follicle

cells]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi = Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi = West China Journal of Stomatology*, 35(3), 245–252. <https://doi.org/10.7518/HXKQ.2017.03.004>

Xie, J., Willerth, S. M., Li, X., Macewan, M. R., Rader, A., Sakiyama-Elbert, S. E., & Xia, Y. (2009). The differentiation of embryonic stem cells seeded on electrospun nanofibers into neural lineages. *Biomaterials*, 30(3), 354–362. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.046>

Xu, F., Shi, J., Yu, B., Ni, W., Wu, X., & Gu, Z. (2010). Chemokines mediate mesenchymal stem cell migration toward gliomas in vitro. *Oncology Reports*, 23(6), 1561–1567. https://doi.org/10.3892/OR_00000796

Xue, R., Qian, Y., Li, L., Yao, G., Yang, L., & Sun, Y. (2017). Polycaprolactone nanofiber scaffold enhances the osteogenic differentiation potency of various human tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy* 2017 8:1, 8(1), 148-. <https://doi.org/10.1186/S13287-017-0588-0>

Yang, S., Leong, K. F., Du, Z., & Chua, C. K. (2001). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Engineering*, 7(6), 679–689. <https://doi.org/10.1089/107632701753337645>

Yang, X., Yang, F., Walboomers, X. F., Bian, Z., Fan, M., & Jansen, J. A. (2010). The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 93(1), 247–257. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.32535>

Yao, S., He, H., Gutierrez, D. L., Rad, M. R., Liu, D., Li, C., ... Wise, G. E. (2013). Expression of bone morphogenetic protein-6 in dental follicle stem cells and its effect on osteogenic differentiation. *Cells, Tissues, Organs*, 198(6), 438–447. <https://doi.org/10.1159/000360275>

Yeong, W. Y., Chua, C. K., Leong, K. F., & Chandrasekaran, M. (2004). Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends in Biotechnology*, 22(12), 643–652. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2004.10.004>

Zhang, W., Walboomers, X. F., Shi, S., Fan, M., & Jansen, J. A. (2006). Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Engineering*, 12(10), 2813–2823. <https://doi.org/10.1089/TEN.2006.12.2813>

Zhao, M., Xiao, G., Berry, J. E., Franceschi, R. T., Reddi, A., & Somerman, M. J. (2002). Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 17(8), 1441–1451. <https://doi.org/10.1359/JBMR.2002.17.8.1441>

Zhou, M., Qiao, W., Liu, Z., Shang, T., Qiao, T., Mao, C., & Liu, C. (2014). Development and in vivo evaluation of small-diameter vascular grafts engineered by outgrowth endothelial cells and electrospun chitosan/poly(ϵ -caprolactone) nanofibrous scaffolds. *Tissue Engineering. Part A*, 20(1–2), 79–91. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEA.2013.0020>

Zhou, Q., Li, L., & Li, J. (2015). Stem cells with decellularized liver scaffolds in liver regeneration and their potential clinical applications. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 35(3), 687–694. <https://doi.org/10.1111/LIV.12581>

Zia, S., Mozafari, M., Natasha, G., Tan, A., Cui, Z., & Seifalian, A. M. (2016). Hearts beating through decellularized scaffolds: whole-organ engineering for cardiac regeneration and transplantation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(4), 705–715. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1007495>

Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., ... Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279–4295. <https://doi.org/10.1091/MBC.E02-02-0105>

MAKSİLLOFASİYAL DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMLARI:

KEMİK REJENERASYONUNDA
DENTAL FOLİKÜL VE PULPA KÖK
HÜCRELERİNİN POLİKAPROLAKTON
İSKELELERDEKİ PERFORMANSI

