

T.C.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**KÜLTÜR ORTAMINDA KEMİK REJENERASYONU
DENEYSEL MODELİNDE MEZENKİMAL
KÖK HÜCRE TEDAVİSİNE BORİK ASİTİN ETKİSİ
VE KEMİK DOKUSUNUN KATKISI**

Dt. Alper KARA
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8762-987X>
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gülten KAVAK

2020- İZMİR

T.C.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**KÜLTÜR ORTAMINDA KEMİK REJENERASYONU
DENEYSEL MODELİNDE MEZENKİMAL
KÖK HÜCRE TEDAVİSİNE BORİK ASİTİN ETKİSİ
VE KEMİK DOKUSUNUN KATKISI**

Dt. Alper KARA
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8762-987X>
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gülten KAVAK

2020- İZMİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora Programı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: / /

Tez Danışmanı:

Üye:

Üye:

Üye:

Üye:

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan doktora tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini İzmir Katip Çelebi Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

o Tezimin tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekte teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphaneye bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

o Tezimin tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını istemiyorum (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç)

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.)

o Tezimin tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

....../....../....

İmza

Ad-Soyad

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahribat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, tez danışmanım Prof. Dr. Gülten Kavak danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve İzmir Katip elebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

..../..../....

İmza Ad-Soyad

TEŞEKKÜRLER

Hayatım boyunca ve doktora eğitimim sürecinde her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyip bu başarıyı mümkün kılan, sevgili annem Fatma Kara ve babam Hasan Kara'ya;

Doktora eğitimim sürecinde benden desteğini hiç esirgemeyen, yol gösteren, tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde katkısı olan ve her zaman yanımda olan kıymetli, sevgili hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Gülten Kavak'a;

Tezimin deneysel bölümünün gerçekleştirilmesinde, histolojik ve istatistik incelemelerinin yapılmasında büyük yardımları ve emeği olan, tezimin her aşamasında desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Mehmet İbrahim Tuğlu'ya;

Doktora eğitimim süresince pratik ve teorik anlamda bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum, her zaman anlayışlı ve öğretici olan Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'ndaki hocalarım Doç. Dr. Murat Ulu ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Akçay'a;

Doktora eğitimim süresince her zaman anlayışlı ve güleryüzlü olan bölümümüzdeki hocalarım Prof. Dr. Nergiz Yılmaz, Doç. Dr. Nihat Laçın ve Dr. Öğr. Üyesi Onur Şahin'e ve teşekkür ederim.

ÖZET

Alper Kara, Kültür Ortamında Kemik Rejenerasyonu Deneysel Modelinde Mezenkimal Kök Hücre Tedavisine Borik Asitin Etkisi ve Kemik Dokusunun Katkısı, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Doktora Programı, Doktora Tezi, İzmir, 2020

Giriş-Amaç: Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide kemik kayıplarının rekonstrüksiyonu için gerekli olan ogmentasyon işlemleri sıklıkla uygulanmaktadır. Sert doku greftlemesi uygulamalarının başarısını arttırmak amacıyla yapılan çalışmalar son yıllarda belirgin bir artış göstermiştir. Bu çalışmada kemik rejenerasyonu uygulamalarındaki osteojenik ve osteoindüktif etkinin artırılması amacıyla, mezenkimal kök hücre (MKH) ve borik asit kombinasyonunun, kültür ortamındaki kemik defekti modeli üzerindeki etkileri incelendi ve kemik dokusunun iyileşmeye olan katkısı değerlendirildi.

Materyal-Metod: Çalışmada 30 adet Wistar-albino erkek sıçan kullanıldı. Sıçanların kafatasından dış çapı 9 mm, iç çapı 5 mm olan iki kemik halkası çıkarıldı, kritik boyuttaki kemik defekti modeli taklit edildi. Toplam 60 adet kemik halkası; Grup I (n=15) kontrol grubu normal ortam, Grup II (n=15) borik asit içeren ortam, Grup III (n=15) MKH içeren ortam ve Grup IV (n=15) MKH ve borik asit içeren ortam olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Kültür ortamına yerleştirilen kemik halkaları 4 hafta süre ile incelendi, MKH+borik asit kombinasyonun deneysel model üzerinde kemik rejenerasyonu ve hücre farklılaşması üzerine etkileri araştırıldı bununla birlikte kemik dokusunun rejenerasyona katkısı değerlendirildi. Osteojenik farklılaşmanın belirteçleri olarak Osteonektin, Osteokalsin, Alkalen Fosfataz ve RANKL protein ekspresyonu immunohistokimyası, kemiksi adacık oluşumu için ise Alizarin Kırmızısı ve Von Kossa histokimyası kullanıldı.

Sonuç: Çalışma sonucunda borik asitin MKH'lerin osteojenik farklılaşması üzerine bilinen etkilerine ek olarak, kemik halkası etkileşimi sayesinde bilinmeyen veriler ortaya çıkarıldı. MKH'lerin kemikten gelen progenitör sinyaller sayesinde farklılaşma yoluna gittiği ve borik asitin bu etkiyi çok daha fazla arttırdığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, Borik asit, Kültür, Kemik halkası

ABSTRACT

Alper Kara, The Effect of Boric Acid on Mesenchymal Stem Cell Therapy in Bone Regeneration Experimental Model in Culture Medium and Contribution of Bone Tissue, İzmir Katip Çelebi University Institute of Health Science, Oral and Maxillofacial Surgery Doctoral Program, Doctoral Thesis, İzmir, 2020

Aim: Augmentation procedures, which are necessary for the reconstruction of bone loss, are frequently applied in Oral and Maxillofacial Surgery. The number of studies performed to increase the success of hard tissue grafting applications has increased significantly in recent years. In this study, in order to increase the osteogenic and osteoinductive effect in bone regeneration applications, the effects of the mesenchymal stem cell (MCS) and boric acid combination on the bone defect model in the culture medium were investigated and the contribution of bone tissue to healing was evaluated.

Material-Method: 30 Wistar-albino male rats were used in the study. Two bone rings with an outer diameter of 9 mm and an inner diameter of 5 mm were removed from the skulls of the rats, and the critical size bone defect model was imitated. A total of 60 bone rings divided into 4 groups; Group I (n=15) control group normal environment, Group II (n=15) boric acid containing medium, Group III (n=15) MSC containing medium and Group IV (n=15) MSC and boric acid containing medium. Bone rings placed in the culture medium were examined for 4 weeks, the effects of MCS+boric acid combination on bone regeneration and cell differentiation on the experimental model were investigated and the contribution of bone tissue to regeneration was evaluated. Osteoectin, Osteocalcin, Alkaline Phosphatase and RANKL protein expression immunohistochemistry, Alizarin Red and Von Kossa histochemistry were used as markers of osteogenic differentiation.

Conclusion: In addition to the known effects of boric acid on the osteogenic differentiation of MCS's, unknown data were revealed by the bone ring interaction. It was seen that MCS's differentiated with the progenitor signals coming from the bone and boric acid increased this effect much more.

Keywords: Mesenchymal stem cell, Boric acid, Culture, Bone ring

İÇİNDEKİLER

Onay	i
Yayımlama ve Fikri Mülkiyet Hakları Beyanı	ii
Etik Beyan Sayfası	iii
Teşekkür	iv
Özet	v
Abstract	vi
İçindekiler	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller Dizini	xii
Tablolar Dizini	xiii
Resimler Dizini	xiv

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİ	4
2.1. Canlı Bir Doku Olarak Kemik	4
2.1.1. Kemik Hücreleri	4
2.1.2. Kemik Matriksi	8
2.1.3. Periosteum & Endosteum	9
2.1.4. Kemik İliği	11
2.1.5. Kemik Tipleri	12
2.1.6. Osteogenez	14
2.1.7. Kemik Fonksiyonu	17
2.1.8. Kemik İyileşmesi	21
2.2. Bor	26
2.2.1. Borun Tarihçesi	26
2.2.2. Borun Kimyasal Özellikleri	27
2.2.3. Doğada Bor	28
2.2.4. Bor İçeren Gıda Kaynakları	29
2.2.5. Borun Emilimi ve Vücuttan Atılması	30
2.2.6. Günlük Bor Alım Miktarı	31
2.2.7. İnsan Dokularında Bor Seviyeleri	32
2.2.8. Bor Toksisitesi	33
2.2.9. Borun Hayvanlarda ve İnsanlardaki Rolü	34
2.2.10. Enzimatik Faaliyet Üzerindeki Etkileri	34
2.2.11. Kemik Büyümesi ve Devamlılığı Üzerindeki Etkileri	35
2.2.12. Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri	36
2.2.13. Hücre Dışı Matriks Proteinlerinin İfadesine Etkisi	36
2.2.14. D Vitamini Eksikliğinin Önlenmesi Üzerine Etkisi	37
2.2.15. Magnezyum Emilimi Üzerine Etkisi	38
2.2.16. Antienflamatuar Etkileri	38
2.2.17. Beyin Aktivasyonu ve Psikolojik Fonksiyonu	39
2.2.18. Antikanser Etkileri	40
2.3. Kök Hücre Kavramı	41

2.3.1. Kök Hücre Hiyerarşisi	41
2.3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Rejenerasyon Potansiyeli	43
2.3.3. Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (YKH) ve Alt Popülasyonları	46
2.3.4. Yağ Kaynaklı Kök Hücrelerin Tanımlanması	47
2.3.5. Yağ Kaynaklı Kök Hücrelerin İzolasyonu	48
2.3.6. Yağ Kaynaklı Kök Hücrelerin Farklılaşma Yeteneği	49
2.3.7. Yağ Kaynaklı Kök Hücrelerin İn Vitro Osteojenik farklılaşması	50
2.3.8. Yağ Kaynaklı Kök Hücrelerin Klinik Uygulamaları	50
3. GEREÇ VE YÖNTEM	54
3.1. Gereç	54
3.1.1. Deney Hayvanları	54
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar	55
3.2. Yöntem	56
3.2.1. MKH'lerin Çoğaltılması	56
3.2.2. Hücre Üremesinin değerlendirilmesi	57
3.2.3. Cerrahi Yöntem	59
3.2.4. Cerrahi Uygulama	63
3.2.5. Kemik Halkalarının Kültür Ortamına Alınması ve Kültürde Gerçekleştirilen İşlemler	66
4. BULGULAR	67
4.1. MKH'lerin Eldesi, Kültürü ve Karakterizasyonu	67
4.2. Etkili Borik Asit Konsantrasyonunun Belirlenmesi	74
4.3. Kültürde Osteojenik Farklılaşma	77
4.4. Kültürde Osteojenik Farklılaşma İçin Alizarin Kırmızısı (AK) ve Von Kossa (VK) Histokimyası	80
4.5. Kültürde Osteojenik Farklılaşmaya Kemik Halkası, Borik Asit ve MKH'nin Etkisi	82
4.6. Kültürde Osteojenik Farklılaşma Sonrası Oluşturulan Yara (Çizik) Modeli ile Yara İyileşmesinde Kemik Halkası, Borik Asit ve MKH Etkisinin İncelenmesi	93
4.7. Kültürde Osteojenik Farklılaşmanın ve Kemiksi Adacık Oluşumunun İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu ve Bu Duruma Kemik Halkası, Borik Asit ve MKH'nin Etkisi	101
4.7.1. Osteokalsin (OK) İmmünohistokimyası	102
4.7.2. Osteonektin (ON) İmmünohistokimyası	105
4.7.3. Alkalen Fosfataz (ALP) İmmünohistokimyası	108
4.7.4. RANKL İmmünohistokimyası	111
4.8. Kültürde Osteojenik Farklılaşma Sonrası Oluşturulan Yara (Çizik) Modeli İle Yara İyileşmesinde Kemik Halkası, Borik Asit ve MKH Etkisinin SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ile İncelenmesi	114
5. TARTIŞMA	116
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	143

7. KAYNAKLAR	144
8. EKLER	164
EK 1	164
9. ÖZGEÇMİŞ	165



Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

AK: Alizarin Kırmızısı
ALP: Alkalın Fosfataz
Ang-1: Anjiyopoietin-1
B-HAp: Bor Katkılı Hidroksiapatit
B-nHAp: Bor İçeren Nano Hidroksiapatit
BMP: Kemik Morfojenik Proteini
BSP: Kemik Sialoprotein
CAL: Hücre Destekli Lipotransfer
COL1: Kollajen Tip 1
Col1A1: Kollajen Tip 1 Alfa 1
CSNK1G3: Kazein Kinaz 1 Gama 3
DMEM: Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle'ı
FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü
FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü
HAp: Hidroksiapatit
IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IHH: Hint kirpi yolu
IL-6: İnterlökin 6
iDGKH: İnsan Diş Germi Kök Hücreleri
iKMKH: İnsan Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreleri
İLA: İnsan Lökosit Antijeni
iPKH: İndüklenmiş Plüripotent Kök Hücre
iPKH'ler: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler
iSDKH: İnsan Süt Dişi Kök Hücreleri
KMKH: Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreleri
M-CSF: Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
MHK: Mezenkimal Kök Hücre
MMP: Matriks Metaloproteinaz
ng: nanogram
nHAp: Nano Hidroksiapatit
OK: Osteokalsin
ON: Osteonektin
OPG: Osteoprotegerin
OPN: Osteopontin
PBAT: Poli(butilen adipat-ko-tereftalat)
PBS: Fosfat Tamponlu Salın
PDGF: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PKH: Perivaküler Kök Hücreleri
PLGA: Poli-(laktit-ko-glikolid-asit)
PTH-R1: Paratiroid Hormon 1 Receptörü
PTH: Paratiroid Hormonu
RANKL: NF-Kappa B Ligandının Receptör Aktivatörü
SEMA6D: Semaphorin-6D
SVF: Stromal Vasküler Fraksiyon

TGF- β : Dönüştürücü Büyüme Faktörü β
VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VK: Von Kossa
YKH: Adipoz Türevli Mezenkimal Kök Hücreler
 μ g: migrogram



Şekiller Dizini

Şekil 1. Kemik Remodelingi	18
Şekil 2. Kalsiyum ve kemik metabolizması	21
Şekil 3. Borik asitin moleküler yapısı	27
Şekil 4. Kök hücre farklılaşmasının aşamaları	43
Şekil 5. Mezenkimal kök hücre kaynakları ve çeşitli soylara farklılaşma potansiyelleri	45
Şekil 6. Kemik halkasının şematik görüntüsü	61
Şekil 7. Kullanılan trefan frezler	61
Şekil 8. Osteotomi hatlarının anatomik oluşumlarla ilişkisinin şematik görüntüsü	62
Şekil 9. Sıçan kafatasının anatomik yapısı (enine kesit)	62

Tablolar Dizini

Tablo 1. Dünya genelinde bor rezervleri	28
Tablo 2. Dünya genelinde en çok kullanılan bor içerikli bileşikler	29
Tablo 3. Gıdalarda bulunan bor içeriği	30
Tablo 4. Organlardaki bor konsantrasyonu	33
Tablo 5. MTT analizi ile MKH çoğalması ve canlılığının değerlendirilmesi.	71
Tablo 6. İlerleyen günlerdeki MKH çoğalmasının istatistiksel değerlendirmesi.	71
Tablo 7. Yüzey belirteçlerinin immünohistokimya görüntülerinin H-skor ile değerlendirilmesi	73
Tablo 8. Yüzey belirteçlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi	74
Tablo 9. Farklı borik asit konsantrasyonlarının MKH çoğalması ve canlılığı üzerindeki etkilerinin MTT analizi ile değerlendirilmesi	76
Tablo 10. Farklı borik asit konsantrasyonlarının MKH canlılığı ve çoğalması üzerine olan etkilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi	76
Tablo 11. 2. hafta sonunda yapılan MTT analizi ile hücre çoğalması ve farklılaşması sürecinin değerlendirilmesi	84
Tablo 12. 2. hafta sonunda hücrelerin çoğalma ve farklılaşma sürecinin istatistiksel analizi	85
Tablo 13. 4. hafta sonunda yapılan MTT analizi ile hücre çoğalması ve kemiksi adacık oluşumunun değerlendirilmesi	91
Tablo 14. 4. hafta sonunda hücrelerin çoğalması ve kemiksi adacık oluşumunun istatistiksel analizi	92
Tablo 15. 6. hafta sonunda çizik alanında kapanma için yapılan ölçümlerle iyileşmenin değerlendirilmesi	99
Tablo 16. 6. hafta sonunda çizik alanında kapanmanın istatistiksel analizi	100
Tablo 17. 4. hafta sonunda H-skor ile yapılan analiz ile OK immunohistokimya görüntülerinin değerlendirilmesi	104
Tablo 18. OK immunohistokimyasının istatistiksel analizi	104
Tablo 19. 4. hafta sonunda H-skor ile yapılan analiz ile ON immunohistokimya görüntülerinin değerlendirilmesi	107
Tablo 20. ON immunohistokimyasının istatistiksel analizi	107
Tablo 21. 4. hafta sonunda H-skor ile yapılan analiz ile ALP immunohistokimya görüntülerinin değerlendirilmesi	110
Tablo 22. ALP immunohistokimyasının istatistiksel analizi	110
Tablo 23. 4. hafta sonunda H-skor ile yapılan analiz ile RANKL immunohistokimya görüntülerinin değerlendirilmesi	113
Tablo 24. RANKL immunohistokimyasının istatistiksel analizi	113

Resimler Dizini

Resim 1. Cerrahi alanın antisepsisini sağlamak amacıyla kafatası derisinin povidon-iyodin solüsyonu (Poviodex, Kimpa, Türkiye) ile yıkanması ardından steril cerrahi örtünün örtülmesi	63
Resim 2. Kraniyal yumuşak doku orta hattı üzerinde, sagittal düzlemde, yaklaşık 30 mm uzunluğunda tam kalınlıkta insizyonun yapılması	63
Resim 3. Tam kalınlıklı flep kaldırılarak frontal, parietal ve occipital kemiklerin açığa çıkarılması ve ekartörlerin yerleştirilmesi	64
Resim 4. Dış çapı 10 mm, iç çapı 9 mm olan trefan frez ile kalvaryum üzerinde derinlikleri yaklaşık 0,5 mm olan monokortikal kesilerin yapılması	64
Resim 5. Dış çapı 5 mm, iç çapı 4.2 mm olan trefan frez ile dıştaki kemik halkaları kalvaryumla ilişik durumdayken içteki kemik parçalarının yerlerinin belirlenmesi ve monokortikal kesinin yapılması	65
Resim 6. Dış çapı 5 mm iç çapı 4.2 mm olan trefan frez ile bikortikal kemik kesileri yapılarak içteki kemik parçasının kalvaryumdan ayrılması ve dıştaki kemik halkalarına zarar verilmeden kemik parçalarının çıkartılması	65
Resim 7. Dış çapı 10 mm iç, çapı 9 mm olan trefan frez ile kalvaryum üzerindeki monokortikal kesiler bikortikal hale getirilerek kemik halkalarının dikkatli bir şekilde kalvaryumdan ayrılması	66
Resim 8. 3. günde MKH'lerin tutunma, çoğalma ve göç etme davranışlarını göstermesi	67
Resim 9. 7. günde yapılan yıkamalar sonrasında MKH'lerin tutunma, çoğalma ve göç etme davranışları göstermesi ve semikonfluent olmaları	68
Resim 10. 14. günde MKH'lerin tutunma, çoğalma ve göç etme davranışlarını göstermesi ve konfluent olmaları	69
Resim 11. 28. günde MKH'lerin tutunma, çoğalma ve göç etme davranışlarını göstermesi ve konfluent olmaları	70
Resim 12. İmmunohistokimya görüntüleri (CD90+, 44+, 73+, Stro1+ ve CD45-, 34-)	72
Resim 13. Borik asitin etkisini değerlendirmek için besiyerine değişik dozlarda yapılan eklemelerde borik asitin MKH çoğalması üzerindeki etkisi.	75
Resim 14. 7. günde hücrelerin çoğalmaya başlaması	77
Resim 15. 21. günde mineralizasyon ve kalsiyum birikiminin gözlenmesi, tipik kemiksi odakların oluşumu	78
Resim 16. 28. günde osteojenik farklılaşma ile kemiksi adacıkların oluşması	79
Resim 17. AK ile osteojenik farklılaşma ve kemiksi adacık oluşumunun gözlenmesi	80
Resim 18. VK ile osteojenik farklılaşma ve kemiksi adacık oluşumunun izlenmesi	81
Resim 19. MKH ve BOR+MKH gruplarında hücrelerin çoğalma ve farklılaşma sürecine girmesi	82
Resim 20. KH ve KH+BOR gruplarında kemik kaynaklı hücre üretiminin kemik halkasının kenarından başlaması. MKH ve MKH+BOR gruplarında hücrelerin çoğalma ve farklılaşma sürecini ilerletmesi	83

Resim 21. KH ve KH+BOR gruplarına göre daha az olmakla birlikte tüm gruplarda hücrelerin boşlukları kaplayacak şekilde çoğalması, göç etmesi ve farklılaşma sürecine girmesi. MKH ve MKH+BOR gruplarında kemiksi adacıkların oluşumu ve osteoblastik farklılaşmanın başlaması	86
Resim 22. KH ve KH+BOR gruplarında kemiğin farklı yerlerinden hücre çıkışının gözlenmesi, MKH ve BOR+MKH gruplarında boş alanın ortalarında kemiksi adacıkların ve osteoblastik farklılaşmanın saptanması	87
Resim 23. Bütün gruplarda boşluğun tamamen dolması. MKH ve MKH+BOR gruplarında osteoblastik farklılaşma ve kemiksi adacık yapımının çok daha belirgin bir biçimde gerçekleşmesi	88
Resim 24. MKH ve MKH+BOR gruplarında daha belirgin olan, boşluğun ortasını da içeren kemiksi adacık formasyonu	89
Resim 25. MKH ve MKH+BOR gruplarında daha belirgin bir biçimde olmak üzere daha büyük adacıkların oluşumu	90
Resim 26. 5. haftada yara yerlerinden hücre çoğalmasının ve iyileşmenin başlaması	93
Resim 27. MKH ve MKH+BOR gruplarında çok daha belirgin bir biçimde olacak şekilde yara yerlerinde kapanma şeklindeki hücre çoğalması	94
Resim 28. MKH ve MKH+BOR gruplarında çok daha belirgin bir biçimde gerçekleşen, yara yerlerinde osteoblastik farklılaşmanın ve kemiksi adacıkların oluşmaya başlaması	95
Resim 29. MKH ve MKH+BOR gruplarında çok daha belirgin bir biçimde gerçekleşen, yara yerlerinin osteoblastik farklılaşma ve kemiksi adacıkların oluşumu ile kapatılması	96
Resim 30. KH ve KH+BOR gruplarına kıyasla MKH ve MKH+BOR gruplarında çok daha belirgin bir kemikleşme olduğunun gözlenmesi.	97
Resim 31. MKH ve MKH+BOR gruplarında kapanan yara yerlerinde çok daha belirgin bir kemikleşme olduğunun gözlenmesi	98
Resim 32. Belirteç immunohistokimyasında hücrelerin spesifik olarak boyanmaları	101
Resim 33. 4. hafta sonunda OK immunohistokimyası görüntüleri	103
Resim 34. 4. hafta sonunda ON immunohistokimyası görüntüleri	106
Resim 35. 4. hafta sonunda ALP immunohistokimyası görüntüleri	109
Resim 36. 4. hafta sonunda RANKL immunohistokimyası görüntüleri	112
Resim 37. MHK'lerde morfolojik değişiklikler olarak uzun sitoplazmik çıkıntılar ve hücreler arasında bağlantı şeklinde yapışmaların görülmesi	114
Resim 38. Borik asit ve MKH'nin birlikte kullanımlarında daha belirgin olan uzun sitoplazmik yumrular, çıkıntılar, protrusionlar ve mikrovilli ile tutunma davranışları	115

GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde sağlık sektörünün gelişmesi, insan ömrünün uzaması, gelir düzeylerinin ve erişilebilirliğin artması ile insanların hayat standartları ve beklentileri yükselmiştir. İnsan hayatının her alanında olduğu gibi sağlık alanında da bireyler en güncel ve uzun ömürlü tedavi seçeneklerini tercih etmektedirler. Gelişen teknikler ve artan hasta beklentileri sonucu ogmentasyon uygulamaları günümüz ağız, diş ve çene cerrahisi pratiğinin vazgeçilmez tedavi yöntemlerinden biri haline gelmiştir.

Oral ve sistemik hastalıklar, periodontal hastalıklar, diş çürükleri, travma, konjenital anomaliler, kist ve tümör cerrahileri, diş kaybına sebep olmakta ve beraberinde alveoler kemikte defektlere yol açmaktadır (1). Oluşan kemik defektlerinin ogmentasyonu hasta konforu ve ileride yapılacak tedavi açısından önemlidir. Alveolar kemik defektlerinin ogmentasyon ile onarılmasında yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu (YKR), distraksiyon osteogenezi (DO) onlay kemik greftleri ve interpozisyonel greftleme gibi rekonstrüktif cerrahi teknikler kullanılmaktadır (2).

Alveoler kemik defetkelerinin onarımında kullanılan tekniklerden distraksiyon osteogenezi ve interpozisyonel greflemenin teknik açıdan zor, maliyetli ve daha az öngörülebilir sonuçlara sahip prosedürler olmaları ve daha uygulanabilir teknikler geliştirilmesi bu tekniklerin günümüzde popülerliğini kaybetmelerine sebep olmuştur. Cerrahi prosedürdeki uygulama kolaylığı, diğer ogmentasyon yöntemlerine göre teknik hassasiyetin daha az oluşu, bio-materyallerin temininin kolaylaşması ve maliyetlerinin azalması ve öngörülebilir sonuçların elde edilmesi yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu uygulamalarının popülerliğinin artmasına sebep olmuştur. Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu uygulamalarında, altın standart otojen greftlerinin kullanımı olmasına rağmen, donör saha yetersizliği, morbidite ve hastaların otojen kemik elde edilmesi sırasında oluşacak ek cerrahi alanı istememeleri sebebiyle farklı greft kaynaklarına yönelilmiştir.

Altın standart olan otojen greftlerin yanı sıra allogreftler (aynı türdeki farklı bir bireyden elde edilen doku), ksenogreftler (farklı türden bir canlıdan elde edilen doku) ve alloplastik greft materyalleri (sentetik, insana özgü olmayan malzemeden oluşur) yönlendirilmiş kemik ve doku rejenerasyonu uygulamalarında sıklıkla

kullanılmaktadır. Osteokondüktif potansiyellerine rağmen, otolog bir greftin yerine kullanılan greft materyalleri düşük seviyede osteoindüktif veya osteojenik potansiyel göstermektedir. Otolog olmayan greft materyallerinin kullanılması, ogmentasyon bölgesinde hücrel açığa sebep olmakta ve osteojenik potansiyeli düşürmektedir (3).

Mezenkimal kök hücre (MKH)'lerin etkinliği temel ve klinik deneylerde yoğun bir şekilde araştırılmıştır. MHK'ler; plastik yapıda, yapışan, osteoblastlara, kondroblastlara ve adipositlere farklılaşabilen stromal hücrelerdir (4). Bu hücreler ilk olarak kemik iliğinde bulunmuş ve yaklaşık 20 yıl boyunca kemik iyileşmesini teşvik etmek amacıyla kullanılmıştır (5). Daha sonra yağ dokusu ve damarlarda da MKH'lerin bulunduğu ve indüklenmiş pluripotent hücrelerden elde edilebilecekleri anlaşılmıştır. Kaynaklarına veya özelliklerine göre, MKH'ler, kemik iliği MKH'lerine (KMKH'ler), adipoz türevli MKH'lere (YKH'ler), perivasküler kök hücrelere (PKH'ler), indüklenmiş pluripotent kök hücrelere (iPKH'ler) ve genetiği değiştirilmiş MKH'lere ayrılabilir. Bununla birlikte, farklı MKH popülasyonlarının kemik rejenerasyonu üzerine göreceli avantajları henüz saptanmamıştır (6).

Kemik doku mühendisliği alveoler kemik defektlerinin onarımında ogmentasyon prosedürlerinin başarı oranını arttırmak amacıyla günümüz klinik pratiğinde kendine yer bulmaya başlamıştır. Kök hücrelerin ve çeşitli büyüme faktörlerinin greft materyalleri ile birlikte kullanımı kemik rejenerasyon hızını ve kalitesini arttırmakta ve daha öngörülebilir sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır (7,8).

Kemik rejenerasyonunu arttırmada da etkili olan bor, 1923 yılında tüm vasküler bitkiler için temel bir besin maddesi olarak kabul edilmiştir (9). Bor mineralinin hayvanlar ve insanlar tarafından gerekli olabileceğine dair kanıtlar ortaya çıkmıştır (10). Borun çeşitli metabolik faaliyetleri de etkilediği bilinmektedir. Kemik metabolizması için önemli olan kalsiyum, D vitamini ve magnezyum ile etkileşime girerek tüketilen bor miktarına bağlı olarak kemikte birikir (11). Bor, doğada borik asit ve borat olarak bulunur, meyve, sebze ve baklagillerin tüketilmesiyle vücuda alınır (12).

Güncel literatür incelendiğinde, yapılmış çalışmalar borik asit veya MHK'nin lokal uygulamalarının kemik rejenerasyonunu hızlandırdığını göstermektedir. Son çalışmalar borun kemik büyümesine ve onarımına yardımcı olduğunu, osteoblast ve

osteoklastların aktivitelerini de etkilediğini göstermiştir (13). Borik asit lokal ve sistemik yollarla uygulandığında kemik kırıklarının iyileşmesi ve yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu; kemik iyileşme sürecinin erken döneminde yeni kemik oluşumunu hızlandırdığı bildirilmiştir (14,15).

Güncel literatüre bakıldığında borik asitin MKH üzerindeki etkilerini araştırmış az sayıdaki in vitro çalışma borik asitin hücrelerin osteojenik kabiliyetini arttırdığını, kemik matriks mineralizasyonunun erken indüksiyonuna neden olduğunu ve osteojenik farklılaşmaya dahil olan faktörlerin (örneğin, enerji üretimine katılan genler, proteinler ve metabolik enzimler gibi) normalde olması gerekenden daha erken ifade edilmesini sağlayabildiğini göstermiştir (16).

Literatürde mevcut çalışmalar bulunmasına rağmen iki materyalin kombine edilerek kullanıldığı çalışma sayısı çok azdır. İki materyalin kombine edilerek kullanımının kemik dokusu üzerindeki direkt etkilerini gösteren bir çalışma ise literatürde bulunmamaktadır. Çalışmamızda sıçan kafatasından çıkarılan kemik halkaları ile oluşturulan yara modelinde, MKH ve borik asitin erken dönem kemik iyileşmesi üzerine etkileri araştırıldı.

Bu tez çalışması 4 adet amaç üzerinde yoğunlaştı;

1. Yeni bir “Kemik Rejenerasyonu Deneysel Modeli” oluşturmak.
2. Borik asitin kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerini in vitro olarak incelemek.
3. Borik asitin MKH üzerindeki etkilerini in vitro olarak incelemek.
4. Borik asit ve MKH kombinasyonunun kemik iyileşmesi modeli üzerindeki etkilerini incelemek ve kemik dokusunun bu duruma katkısını değerlendirmek.

GENEL BİLGİLER

2.1. Canlı Bir Doku Olarak Kemik

Kemik dokusu, sinerjistik şekilde hareket eden ve birçok fonksiyona hizmet eden karmaşık bir organdır. Kemik dokusunun içeriği; dokunun yüke karşı direnç göstermesine, kraniyal ve torasik kavitelerdeki hassas hayati organların dış kuvvetlere karşı korumasına, kan hücrelerinin olduğu kemik iliğini barındırmasına ve vücudun sistemik homeostazisine katkıda bulunan bir hücre ve mineral deposu olmasına olanak sağlar. Kemik kalsiyum, fosfat ve diğer önemli iyonları depolar ve bu önemli iyonların vücut sıvılarındaki sabit konsantrasyonlarını korumak amacıyla kontrollü bir şekilde salınım yapabilen önemli bir depo görevi görür. Bunlara ek olarak kemik, iskelet kası kasılmaları sırasında oluşan kuvvetleri çoğaltan ve bunları vücut hareketlerine dönüştüren bir kaldıraç sistemi oluşturur. Bu sayede iskelete mekanik ve metabolik işlevler verir. Kemik metabolizmasında biyokimyasal, hormonal, hücresel ve biyomekanik faktörler etkilidir ve bu faktörler kemiğin özelliklerini ve kalitesini belirlemede önemli rol oynar (17-19).

Kemik özelleşmiş bir bağ dokusudur, kalsifiye edilmiş hücreler arası materyalden, kemik matriksinden ve üç farklı hücre tipinden oluşur (20):

- Osteositler: Kemik matriksi tabakası (lamelleri) arasındaki boşluklarda bulunur.
- Osteoblastlar: Matriksin organik bileşenlerini sentezler.
- Osteoklastlar: Kemik dokusunun rezorpsiyon ve remodelinginde görev alan çok çekirdekli dev hücreler.

Tüm kemikler hem iç hem de dış yüzeylerinde osteojenik hücreler içeren bağ dokusu katmanları ile kaplanır; iç yüzeyde endosteum ve dış yüzeyde periosteum bulunur (20,21).

2.1.1. Kemik Hücreleri

Kemik içinde, farklı hücresel bileşenler barındırmaktadır. Farklı hücre popülasyonlarını yani osteojenik öncü hücreleri, osteoblastları, osteoklastları, osteositleri ve kemik iliğinin hematopoetik elementlerini içerir. Bu hücrelerden üç tanesi, kemik homeostazisinde önemli rol oynar.

Osteoblastlar

Osteoblastlar kemik oluşumundan sorumlu birincil hücrelerdir; organik hücre dışı matriks bileşenlerini sentezler ve matriksin mineralleşmesini kontrol ederler. Osteoblastlar, tip 1 kolajen, proteoglikanlar ve osteonektin dahil çeşitli glikoproteinlerden oluşan kemik matriksinin organik bileşenlerinin sentezinden sorumludur. Kemikğin inorganik bileşenlerinin birikmesi de canlı osteoblastlara bağlıdır. Osteoblastlar aktif matriks birikimi sergileyen kemik yüzeylerinde, genellikle yan yana, basit bir epiteli andıran bir tabaka halinde bulunur ve iki farklı hücre tipine farklılaşabilir: kemik örtü hücreleri ve osteositler (22).

Kemik örtü hücreleri, kemik dokusu yüzeyini kaplayan ve sentetik aktivite göstermeyen uzun hücrelerdir. Osteoblastlar tamamen farklılaşmış hücrelerdir, göç ve proliferasyon kapasitesinden yoksundurlar. Böylece belirli bir bölgedeki kemik oluşumu için, önce *Indian Hedgehog* (IHH) olarak bilinen bir genin sonra runt ile ilgili transkripsiyon faktörü 2 (RUNX2) geninin ekspresyonu ile, farklılaşmamış mezenkimal progenitör hücreler ve osteoprogenitör hücreler bölgeye göç eder ve osteoblastlar olmak üzere çoğalır (23).

Belirlenen osteoprogenitör hücreler kemik iliğinde, endosteumda ve kemik yüzeyini kaplayan periosteumda bulunur. Bu tür hücreler, çoğalmaya ve osteoblastlara farklılaşmaya yönelik yapısal bir kapasiteye sahiptir. Osteoblastların osteoprogenitör hücrelerden farklılaşması ve gelişmesi, kemik morfogenetik protein (BMP)'leri, insülin benzeri büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü gibi osteoindüktif veya osteopromotif büyüme faktörlerinin salınmasına bağlıdır. Aktif olarak matriks sentezi ile meşgul olduklarında, osteoblastlar sütun veya kübik şekildedir ve bazofilik sitoplazmaya sahiptirler. Sentezleme aktiviteleri düştüğünde düzleşirler ve sitoplazmik bazofili azalır. Osteoblast aktivitesi paratiroid hormonu (PTH) ile uyarılır. Matriks sentezi sırasında, osteoblastlar, aktif olarak protein sentezleyen hücrelerin yapısına sahiptirler (24,25).

Osteoblastlar polarize hücrelerdir: matriks bileşenleri, daha eski kemik matriksi ile temas halinde olan hücre yüzeyinden salgılanır ve osteoblast katmanı ile daha önceden oluşan eski kemik arasında osteoid adı verilen yeni (ancak henüz kalsifiye olmamış) bir immatür doku tabakası oluştururlar. Bu kemik apozisyonel büyüme süreci, yeni oluşturulan matrikse daha sonra kalsiyum tuzlarının birikimi ile

tamamlanmaktadır. Osteoblastlar tarafından salgılanan kolajen olmayan proteinler arasında öne çıkan, K vitamini bağımlı küçük polipeptit osteokalsin olup, çeşitli glikoproteinlerle birlikte Ca^{2+} iyonlarını bağlar ve konsantrasyonlarını lokal olarak yükseltir. Osteoblastlar ayrıca, alkalen fosfataz ve faaliyetleri PO_4^- iyonlarının lokal konsantrasyonunu yükselten diğer enzimlerce zengin, membran kaplı vezikülleri serbest bırakır. Her iki iyonun yüksek konsantrasyonlarıyla bu matriks vezikülleri kalsifikasyonda ilk görünen adım olan hidroksiapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ kristallerinin oluşumu için odak görevi görür. Bu kristaller daha fazla mineralin birikimiyle hızla büyür ve sonunda kolajen fibrilleri ve proteoglikanları içine alan bir birleşmiş kalsifiye madde kütlesi oluşturur (26-28).

Kemik Astar Hücreleri

Kemik astar hücreleri doğrudan kemik matriksi üzerinde bulunur. Kemik matriksine nüfuz eden uzun veya düzleşmiş bir formdadır ve sitoplazmik uzantılara sahiptir. Osteositlerin sitoplazmik uzantılarıyla temas halindedir. Bazen istirahat halindeki osteoblastlar veya yüzey osteositleri olarak da adlandırılırlar. Hem astar hücreleri hem de osteositler, aktif osteoblastlardan daha az sitoplazmaya ve daha az organelere sahiptir. PTH'a maruz kaldığında, astar hücreleri kontrakte olur ve mineralize matriksi kaplayan ince osteoid tabakasını ortadan kaldıran enzimleri salgılar. Bu eylemler, osteoklastların kemiğin yüzeyine yapışmasına ve kemik rezorpsiyonunun başlamasına izin veren ilk adımlar gibi görünmektedir. Bu eylemler ve muhtemelen diğerleri yoluyla, astar hücreleri osteoklastları belirli bölgelere çekmede ve kemik rezorpsiyonunu teşvik etmede rol oynar (28,29).

Osteositler

Osteoblastlar zamanla kendi salgıları ile çevrenir ve mineralize kemik matriksi içinde kapalı kalırlar. Gömülü kaldıkları lakuna olarak bilinen alanlarda yıldız şekilli hücreler olan osteositler haline gelirler. Osteoblastlardan osteositlere dönüşüm sırasında hücreler, kalsifiye matriks tarafından sarılan, birçok sitoplazmik uzantı meydana getirir. Osteositlerin sitoplazmik uzantıları dendritler olarak bilinmektedir ve genellikle kanaliküli olarak adlandırılan silindirik kapalı bölmeler boyunca uzanırlar (30).

Dendritler farklı bölgelere uzanırlar, kan damarlarına ve diğer osteositlere temas ederler. Her bir osteosit ve onun uzantıları bir lakunayı ve onu çevreleyen

kanalikulileri işgal eder. Komşu hücrelerin uzantıları *gap junction* yoluyla temas eder ve moleküller bu yapılar yoluyla hücreden hücreye geçirilir. *Gap junction* yoluyla değişim, yaklaşık on hücreli bir zincir için besin sağlayabilir. Osteositler ve kan damarları arasındaki moleküler değişim, osteositler ve kemik matriksi arasında bulunan az miktarda hücre dışı sıvıdan da meydana gelir. Osteosit ağı bu yüzden mekanik uyaran ve kemik deformasyonu sebebiyle kanalikuli boşluğu içerisindeki sıvı akışı sonucu meydana gelen kayma gerilimine membran düzeyinde hassas bir hücre dışı ve hücre içi iletişim kanalıdır. Osteositler, mekanik sinyalleri kemik içindeki anabolik ve katabolik olayların düzenlenmesine yardımcı olacak biyokimyasal mediyatörlere çevirir. Bu düzenleme osteositlerin kan kalsiyum homeostazının düzenlenmesine katılmasına ve mekanik yüklenmeyi hissetmesine izin verir daha sonra bu bilgiyi osteoblast ve osteoklast fonksiyonunu düzenlemek için kemik içindeki diğer hücrelere iletmesini sağlar (32,33).

Osteoblastlarla karşılaştırıldığında, yassı, badem şekilli osteositler, önemli ölçüde azalmış bir granüllü endoplazmik retikulum ve golgi cisimciği fakat daha fazla yoğunlaştırılmış nükleer kromatin sergiler. Bu hücreler kemik matriksin devamlılığının sağlanmasında rol oynar ve ölümlerini bu matriksin rezorpsiyonu takip eder. Farklı kemik hastalıkları ve bozuklukları, osteosit lakuno-kanaliküler sisteminin düzenlenmesini etkiler ve bu önemli hücresel ağda önemli değişikliklere neden olur (30).

Osteoklastlar

Kemik oluşum aktivitesi, osteoklastlar tarafından başlatılan ve sürdürülen kemik rezorpsiyonuna sürekli olacak şekilde bağlıdır. Osteoklastlar, çok büyük boyutlarda, hareketli ve çok çekirdekli hücrelerdir. Osteoklastların büyük boyutlu ve çok çekirdekli olma durumları, kemik iliği kaynaklı hücrelerin füzyonundan, monosit/makrofaj hematopoetik hücre soyundan köken almalarından kaynaklanmaktadır. Bu hücreler, kemik matriksini geliştirme ve buna tutunma, kemik ve kalsifiye kıkırdakların mineral ve organik bileşenlerini bozan ve parçalayan asit ve litik enzimleri salgılama kapasitesine sahiptir. Matriks rezorpsiyonu süregelen kemik bölgelerinde osteoklastlar matriksteki enzim aktivitesi sonucu oluşan çöküntüler olarak bilinen resorpsiyon bölmeleri (Howship lakunası) içinde bulunur (28,31).

Osteoklastların farklılaşma süreçleri ilk olarak PU-1 transkripsiyon faktörünün ifadesiyle başlar. Makrofaj koloni uyarıcı faktör osteoklastları farklılaşma yoluna bağlar, NF-kappa B ligandının reseptör aktivatörü (RANKL) ekspresyonunu ve osteoklastların çoğalmasını teşvik eder. Bu aşamada, RANKL eksprese eden stromal hücreler, pre-osteoklastlarla etkileşime girerek, osteoklast soyları boyunca farklılaşmalarını sağlar. Aktif osteoklastlarda, kemik matriksine dönük olan hücre yüzeyi düzensiz yapıya sahip bir sınır oluşturan girinti ve çıkıntılar şeklinde katlanır. Kıvrımlı sınırların oluşumu osteoklastların aktivitesi ile ilgilidir. Kıvrımlı kenarların çevresi, aktin filamentleri bakımından zengin, kemik matriksine yapışma yeri olan açık bir sitoplazmik bölgedir. Bu çevresel yapışma bölgesi, osteoklast ve kemik rezorpsiyonunun meydana geldiği matriks arasında bir mikro-ortam yaratır. Osteoklast oluşturduğu hücre altı cebin içine kolajenaz ve diğer enzimleri salgılar ve protonları pompalar, hidroksiapatitin çözülmesi ve lokalize kolajenin parçalanması için bölgesel bir asidik ortam oluşturur (23,34,35).

Osteoklast aktivitesi yerel sinyal faktörleri ve hormonlarla kontrol edilir. Osteoklastlarda tiroid hormonu olan kalsitonin için reseptörler bulunur, ancak PTH için reseptörler yoktur. PTH ile aktive olan osteoblastlar, osteoklast uyarıcı faktör adı verilen bir sitokin üretir. Bu nedenle, bu iki hücrenin aktivitesi koordine edilmiştir ve her ikisi de kemik remodelinginde esastır (23,25).

2.1.2. Kemik Matriksi

Kemik dokusu, mineralize olan organik ve inorganik elementlerden oluşan ve yapısını düzenleyen yüksek oranda farklılaşmış hücreler tarafından doldurulan özel bir bağ dokudur. Kemik matriksinin organik bölümü, toplam kemik ağırlığının yaklaşık %30-35'ini oluşturur ve %90'ı tip I kolajenden, %10'u ise kolajen olmayan proteinler, proteoglikanlar, glikoproteinler, karbonhidratlar ve lipitlerden oluşur (22).

Organik matriks osteoblastlar tarafından sentezlenir ve mineralize olmamış matriks osteoid olarak bilinir. Osteoid içerisinde mineral çekirdeklenmesinin başlaması tipik olarak kalsiyum ve fosfat iyonlarının bırakılmasından birkaç gün sonra meydana gelir, ancak olgunlaşma hidroksiapatit kristallerinin birkaç ay boyunca çoğalmasıyla ve yeni matriks sentezlendiğinde tamamlanır. Kolajen lifleri arasında, kalsiyum ve fosfat iyonları çökelerek ortaya çıktıkça mineral çekirdeklenme meydana gelir ve sonuçta hidroksiapatit kristalleri oluşur. Kolajen liflerinin yüzeyi boyunca

kolajen olmayan proteinler, minerallerin yayılmasına ve matriksin tamamen mineralizasyonuna yardımcı olur. Osteoitin mineralizasyonu kemiğe yüke direnç gösterme özelliğini kazandırması, çok hassas organları korumak için dayanıklılık ve sağlamlık vermesinin yanı sıra, sistemik homeostaza katkıda bulunan minerallerin depolanması için ortam hazırlar (22,36).

İnorganik malzeme, kemik matriksinin kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini temsil eder. En fazla miktarda bulunan hidratlanmış kalsiyum ve fosfat formundaki hidroksiapatit kristalleri, osseöz matriksin başlıca inorganik bileşenidir, ancak bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum da bulunur. Olgun kemik içerisinde farklı derecelerde mineralleşme görülür. Önemli miktarlarda amorf (kristalli olmayan) CaPO_4 da mevcuttur. Hidroksiapatitin yüzey iyonları hidratlanır, bunun sonucu kristalin çevresinde bir su ve iyon tabakası oluşur. Bu katman, hidrasyon kabuğu, kristal ve vücut sıvıları arasındaki iyon değişimini kolaylaştırır (22,25,36).

Kalsifiye matriks içine gömülü organik madde, proteoglikan agregatları ve osteonektin dahil olmak üzere birçok spesifik multiadeziv glikoprotein içeren tip I kolajen ve öğütülmüş maddedir. Kalsiyum bağlayıcı glikoproteinler, özellikle osteokalsin ve matriks veziküllerinde osteoblastlar tarafından salınan fosfatazlar, matriksin kalsifikasyonunu teşvik eder. Tip I kolajen içeren diğer dokular bu glikoproteinleri veya matriks veziküllerini içermezler ve dolayısıyla kalsifiye olmazlar (37,38).

Yüksek kolajen içeriği nedeniyle, dekalsifiye kemik matriksi genellikle asidofiliktir. Minerallerin kolajen lifleri ile birleşmesi kemik dokusunun sertliğinden ve direncinden sorumludur. Bir kemik dekalsifiye olduktan sonra şeklini korur, fakat bir tendon kadar esnek olur. Matriksin organik kısımlarının, özellikle kolajen olanların, çıkarılması durumunda kemik orijinal şeklini korur; fakat ele alındığında kolayca kırılabilir ve parçalanacak hale gelir.

2.1.3. Periosteum & Endosteum

Kemiğin dış ve iç yüzeyleri, periosteum ve endosteum adı verilen, kemik oluşturan hücre katmanları ve vaskülarize bağ dokusu ile kaplıdır. Periosteum uzun kemiklerin shaftının (diyafiz) dış yüzeyini kaplayan, ancak eklemlili yüzeyleri kaplamayan, lifli bir kılıftır. Endosteum ise tüm kemiklerin iç yüzeyini örter. Kemikteki büyük iç ilik boşlukları endosteumla kaplıdır. Periosteum ve endosteumun

temel işlevleri, kemik dokusunun beslenmesi, onarımı ve büyümesi için gerekli olan sürekli osteoblast tedariğinin sağlanmasıdır (21,39).

Periost yoğun, lifli, vasküler bir dış tabakaya (fibröz tabaka) ve daha gevşek düzenlenmiş, bağ dokusu içeren iç tabakaya (osteojenik tabaka veya kambiyum tabakası) bölünmüştür. Dış yüzeyde bulunan fibröz tabakanın sinirler ve mikrovasküler ağlar ile birlikte fibroblastlar, kolajen ve elastinden oluştuğu bilinmektedir. Bu bileşenler periosteuma mekanik stabilite sağlar. İç yüzeyde bulunan kambiyum tabakası ise oldukça hücrelidir, kemik oluşumunu ve kemik onarımını etkileyen hücreleri barındırır. Kambiyum tabakası erişkin mezenkimal iskelet progenitör hücrelerine, osteoblastlara, daha küçük ve daha fazla izodimetrik fibroblastlara ve sempatik sinirlere sahiptir (39).

Osteoprogenitör hücreler kemik büyümesinde ve onarımında önemli bir rol oynar. Kemik dokusunun aksine, periosteum nosiseptif sinir uçlarına sahiptir ve manipülasyona karşı çok hassastır. Osteojenik tabakadan türetilen osteoblastlar, uzun kemiklerin genişliğini ve diğer tüm kemik tiplerinin genel hacmini arttırmaktan sorumludur. Kırık oluştuğunda, periosteumdaki progenitör hücreler, yaranın stabilizasyonu için gerekli olan osteoblastlara ve kondroblastlara farklılaşır. Bu özellikler periostun rejeneratif kapasiteye sahip bir yapı olarak kabul edilmesini sağlar (21,39).

Kemik yaşlandıkça, osteoblast sayısındaki azalma, kambiyum tabakasının atrofisine ve incelmesine yol açar. Kambiyum tabakası fetusta en kalın halinde bulunur ve yaşla birlikte gittikçe incelir. Yetişkinlerde öylesine incelir ki, üstteki lifli tabakadan ayırt edilemez. Bu atrofi ile osteoblastik potansiyelde bir azalma olur. Kambiyum, fetüste kemik büyümesi için son derece önemlidir, ancak çocukluk döneminde osteoblastik potansiyelinin çoğunu kaybeder. Damar yoğunluğu ve periost fibroblast sayısı da yaşla birlikte azalır, böylece erişkinlerde periosteum sadece kemiksi yapıları saran çok ince bir doku olarak bulunur (39).

Yüksek vaskülaritesi nedeniyle periosteumda çok sayıda endotelyal perisit de vardır. Perisitler, kılcak endotelyal hücreler ile fiziksel temas halinde olan hücrelerdir. Spesifik kültür koşulları altında, bu hücreler osteoblastlar dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilir. Bu nedenle, perisitler periosteum içinde tamamlayıcı bir osteoprogenitör hücre kaynağı olarak düşünülebilir (40,41).

Periosteum, dış çevresel ve interstisyel lamellere uzanan, Sharpey'in lifleri olarak da adlandırılan osteojenik katmandaki güçlü kolajen lifler aracılığıyla tendon ve ligamentleri kemiğe bağlar. Ayrıca, lenfatiklerin ve kan damarlarının kemiğe girip çıkarak kemiği beslemesini sağlar (39).

Endosteum, düzleşmiş osteoprogenitör hücreler ve osteoblastları barındıran, kemiğin iç boşluğunu dolduran bölümündeki küçük spikülleri ve trabekülleri kaplayan, tek parça çok ince yapıda bir bağ dokusu tabakasıdır. Endosteum bu nedenle periosteumdan oldukça incedir (39).

2.1.4. Kemik İliği

Kemik iliği, vasküler sinüslerle çevrili, trabeküler kemiğin ağısı yapısı içinde dağınık halde bulunan hematopoetik doku adacıkları, stromal hücreler ve yağ hücrelerinden meydana gelir. Kemik iliği, ana hematopoetik organdır, birincil lenfoid dokudur (eritrosit, granülosit, monosit, lenfosit ve trombosit üretiminden sorumludur) ve önemli bir kök hücre kaynağıdır (42,43).

İki tür kemik iliği vardır: Esas olarak hematopoetik dokudan oluşan kırmızı kemik iliği ve esas olarak yağ hücrelerinden oluşan sarı kemik iliği. Eritrositler, lökositler ve trombositler kırmızı kemik iliğinde köken alır. Her iki kemik iliği türü de çok sayıda kan damarı ve kılcal damar içerir. Doğum sırasında, vücuttaki tüm kemik iliği kırmızıdır. Yaş ilerledikçe, kırmızı kemik iliği azalarak sarı kemik iliğine dönüşür; yetişkin kemik iliğinin sadece yarısı kırmızıdır. Şiddetli kan kaybı durumunda, vücut kan hücresi üretimini artırmak için sarı iliği kırmızı iliğe dönüştürebilir (42,43).

Kemik iliğinin stroması, hematopoezin primer işlevine doğrudan dahil değildir. Bununla birlikte, ideal hematopoetik mikro ortamı dolaylı yoldan sağlayarak dolaylı bir rol oynar. Örneğin, hematopoez üzerinde önemli bir etkisi olan koloni uyarıcı faktörler üretir. Fibroblastlar, makrofajlar, adipositler, osteoblastlar, osteoklastlar ve endotel hücreleri kemik iliği stromasını oluşturan hücrelerdir (42).

Kemik iliği stroması, kemik iliği stromal hücreleri olarak da adlandırılan MKH'ler içerir. Bunlar, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen multipotent kök hücrelerdir. MKH'lerin in vitro veya in vivo olarak osteoblastlara, kondrositlere, miyositlere, adipositlere ve beta-pankreatik adacık hücrelerine farklılaştığı gösterilmiştir. MKH'ler ayrıca nöronal hücrelere transdiferansiye olabilir. Ek olarak

kemik iliği, kan dolaşımında bulunan üç kan hücresi sınıfı olan hücrelere (lökositler, eritrositler ve trombositlere) köken olan hematopoetik kök hücreler içerir (42,43).

2.1.5. Kemik Tipleri

Kemiğin enine kesitte makro ölçüde gözlemlenmesi, genellikle kompakt kemiğe karşılık gelen boşlukları olmayan ve trabeküler (süngerimsi) kemiğe karşılık gelen çok sayıda birbirine bağlı boşluğu olan yoğun alanları gösterir. Bununla birlikte, mikroskop altında hem kompakt kemik hem de süngerimsi kemiğin boşluklarını ayıran trabeküller aynı temel histolojik yapıya sahiptir (22,44).

Uzun kemiklerde, epifizler olarak adlandırılan bombeli uçlar, ince bir kompakt kemik tabakasıyla kaplı süngerimsi kemikten oluşur. Silindirik kısım, diyafiz, neredeyse tamamen kompakt kemikten oluşur, iç yüzeyinde kemik iliği boşluğunun etrafını saran ince bir süngerimsi kemik vardır. Kısa kemikler genellikle tamamen kompakt kemikle çevrili trabeküler kemikten meydana gelir. Kalvaryumu oluşturan düz kemiklerin, plakalar adı verilen iki kompakt kemik tabakası vardır, bunlar *diploe* adı verilen daha kalın bir süngerimsi kemik tabakası ile birbirinden ayrılır (22,44,45).

Kemiğin mikroskopik incelemesi iki tip kemik olduğunu ortaya çıkarır: Olgunlaşmamış primer kemik ve olgun sekonder kemik.

Primer Kemik Dokusu

Primer kemik, embriyonik gelişimde ve kırık onarımında ortaya çıkan ilk kemik dokusudur. İnce kolajen liflerinin rastgele yerleşimi ile karakterizedir ve bu nedenle sıklıkla *woven* (dokuma) kemik olarak adlandırılır. Primer kemik dokusu genellikle vücuttaki birkaç yer dışında (örn., Kalvaryanın sütürlerinin yakınında, alveoler soketlerde ve bazı tendonların bağlantı noktalarında) geçicidir ve yetişkinlerde sekonder kemik dokusu ile değiştirilir. Düzensiz kolajen lif dizisine ek olarak, primer kemik dokusunun diğer karakteristik özellikleri daha düşük bir mineral içeriğidir (x-ışınları tarafından daha kolay nüfuz edilir) ve sekonder kemiklerden daha yüksek bir osteosit oranına sahiptir (46,47).

Sekonder Kemik Dokusu

Sekonder kemik dokusu genellikle yetişkinlerde bulunan tiptir. Karakteristik olarak birden fazla kalsifiye matriks tabakası (her biri 3-7 µm kalınlığında) gösterir ve genellikle lameller kemik olarak adlandırılır. Lameller, birbirine paralel veya vasküler bir kanal çevresinde eş merkezli olarak oldukça organize edilir. Kan damarları, sinirler ve

gevşek bağ dokusu içeren küçük bir kanalı çevreleyen her bir konsantrik (iç içe geçmiş) kemik lameli kompleksine osteon (eski adıyla bir havers sistemi olarak bilinir) denir. Osteosit içeren lakunalar kanaliküller ile birbirine bağlı lameller arasında bulunur. Kanaliküller tüm hücrelerin osteon kanalı içindeki besin ve oksijen kaynağı ile temas etmesini sağlar. Her bir osteonun dış sınırı sement hattı adı verilen, kolajen açısından daha zengin, bir katmandır (22,27,44,47).

Her tabakada, tip I kolajen lifleri paralel olarak hizalanır ve sarmal bir yol izler. Bununla birlikte, sarmalın aralığı farklı lameller için değişkendir, böylece herhangi bir noktada bitişik lamellerden gelen lifler yaklaşık olarak doğru açılarda kesişir. Her bir osteonun ardışık lamellerindeki kolajen liflerinin spesifik organizasyonu, sekonder kemiğin yapısal gücü için son derece önemlidir (22,48).

Lameller, kompakt kemikte osteonlar oluşturmanın yanı sıra birden fazla dış çevresel lamel ve genellikle bazı iç çevresel lamellerden oluşan tipik organizasyonlar sergiler. İç çevresel lameller kemik iliği boşluğunun etrafında bulunur ve dış çevresel lameller periosteumun hemen altında bulunur (22,48).

Her bir osteon, genellikle diyafizin uzun eksenine paralel olan uzun, genellikle çatallı bir silindirdir. Osteon 4-10 eşmerkezli lamel ile çevrili merkezi bir kanaldan oluşur. Her bir endosteum kaplı kanal, kan damarları, sinirler ve gevşek bağ dokusu içerir. Merkezi kanallar kemik iliği boşluğu, periosteum ve birbirleriyle enine ya da eğik delikli kanallar (eski adıyla Volkmann'ın kanalları olarak bilinir) vasıtasıyla iletişim kurar. Enine kanallarda eşmerkezli lameller yoktur; bunun yerine lamelleri perfore ederler. Kemik dokusundaki tüm osteonik ve delici kanallar matriks önceden var olan kan damarlarının etrafına yerleştiğinde ortaya çıkar (22,27,29).

İki çevresel sistem arasındaki osteonlar arasında, interstisyel lameller adı verilen çok sayıda düzensiz şekilli paralel lamel grubu vardır. Bu yapılar, kemiğin büyümesi ve remodelingi sırasında osteoklastlar tarafından kısmen tahrip edilen osteonlardan kalan lamellerdir (27,48).

Kemik remodelingi yaşam boyunca sürekliidir. Kemik sentezi ve rezorpsiyonunun bir kombinasyonunu içerir. Kompakt kemikte remodeling sırasında, eski osteonların parçaları rezorbe olur ve yenileri üretilir. Rezorpsiyon, yeni osteonların yaklaşık çapına sahip tünel benzeri boşluklardaki eski kemiği çıkarmak için genellikle gruplar halinde çalışan osteoklastların etkilerini içerir. Bu tüneller,

endosteum veya periosteumdan türetilen birçok osteoprojenitör hücre ve filizlenen kılcal damarlar tarafından hızla işgal edilir. Osteoblastlar gelişir, tünellerin duvarını kaplar ve osteoidleri döngüsel bir şekilde salgılamaya başlar ve içinde sıkışmış osteositlerle konsantirik kemik tabakasını oluştururlar. Sağlıklı yetişkinlerde kemiğin %5-10'u yıllık olarak değişir. Remodeling aktivitesindeki değişiklikler, osteonların, osteonik kanalların ve interstisyel lamellerin boyutlarında büyük değişkenlik oluşturur. Osteonlar, periferden içe doğru hareket ederek, lamellerin ardışık olarak birikmesiyle meydana gelirken, genç osteonlar genellikle daha büyük kanallara sahiptir. Olgun osteonlarda en son oluşan lamel merkezi kanala en yakın olanıdır (29,44,49,50).

2.1.6. Osteogenez

Kemik başlangıçta iki yoldan biriyle oluşturulabilir:

- Osteoblastların doğrudan mezenkimden ayrıldığı ve osteoid salgılamaya başladığı intramembranöz kemikleşme
- Önceden var olan hiyalin kıkırdığı matriksinin aşındığı ve yerini osteoid üreten osteoblastların aldığı endokondral kemikleşme.

Her iki işlemde de ilk ortaya çıkan kemik dokusu primer veya *woven* kemiktir. Primer kemik geçicidir ve kısa zamanda sekonder lamellar kemik ile yer değiştirir. Kemik gelişimi sırasında, primer kemiğin büyüme alanları, rezorpsiyon alanları ve sekonder kemik alanlarının hepsi yan yana görünür (51).

İntramembranöz Kemikleşme

Çoğu düz kemiğin oluşumunu sağlayan intramembranöz kemikleşme (ossifikasyon), embriyonik mezenkimal dokunun yoğunlaşması yoluyla gerçekleştiği için bu ismi alır. Kafatasının frontal ve parietal kemikleri, oksipital ve temporal kemiklerin parçaları, maksilla ve mandibula intramembranöz kemikleşme ile oluşur (52).

Mezenkimal kondensasyon tabakasında veya membranda kemik oluşumunun başlangıç noktasına kemikleşme merkezi denir. Süreç, mezenkimal hücre grupları osteoblastlara farklılaştığında başlar. Osteoblastlar osteoid matriksi üretirler ve ardından kalsifikasyon gerçekleşir bu durum bazı osteoblastların enkapsülasyonuna yol açarak, osteositleri meydana getirir. Gelişmekte olan bu kemik adacıkları, kılcal damarlar, kemik iliği hücreleri ve farklılaşmamış hücreler içeren uzun boşluklara çatı

hazırlayan duvarlar oluşturur. Bu tür birkaç grup, kemikleşme merkezinde neredeyse eşzamanlı ortaya çıkar ve duvarlar arasındaki füzyonları kemiğe süngerimsi bir görünüm verir. Kemik duvarları arasında kalan bağ dokusuna, büyüyen kan damarları ve farklılaşmamış mezenkimal hücreler tarafından nüfuz edilerek kemik iliği oluşumuna zemin hazırlanır. Bir kemiğin kemikleşme merkezleri radyal olarak büyür ve son olarak orijinal bağ dokusuyla yer değiştirerek kaynaşır (53,54).

Kranial düz kemiklerde, hem iç hem de dış yüzeylerde, kemik oluşumunun kemik rezorpsiyonuna karşı belirgin bir baskısı vardır. Böylece, iki tabaka kompakt kemik (iç ve dış plakalar) ortaya çıkar ve iç kısım (*diploe*) süngerimsi doğasını korur. Yeni doğan bebeklerin kafalarındaki fontaneller (bingıldaklar) veya yumuşak noktalar kafatasındaki bağ dokusunun henüz kemikleşmemiş kısımlarına karşılık gelen bölgelerdir. Bağ dokusu tabakasının ossifikasyona girmeyen kısımları, yeni kemiğin endosteumuna ve periostuna köken oluşturur (53,54).

Endokondral Kemikleşme

Endokondral ossifikasyon, şekli oluşacak kemiğin küçük bir versiyonuna veya modeline benzeyen bir hiyalin kıkırdak parçası içinde gerçekleşir. Bu tip kemikleşme esas olarak kısa ve uzun kemiklerin oluşumundan sorumludur (52).

Başlangıçta, ilk kemik dokusu kıkırdak modelinin diyafizini çevreleyen bir halka olarak ortaya çıkar. Bu kemik halkası, çevredeki perikondrium içindeki lokal osteoblast aktivitesi ile üretilir. Halka oksijen ve besin maddelerinin altta yatan kıkırdağa difüzyonunu engeller ve orada dejeneratif değişiklikleri teşvik eder. Kondrositler alkalin fosfataz üretmeye başlayarak ve şişerek (hipertrofi) lakunalarını genişletirler. Bu değişiklikler hem matriksi daha dar trabeküllere sıkıştırır hem de bu yapılarda kalsifikasyona yol açar. Kondrositlerin ölümü, kalsifiye kıkırdak matriksinin kalıntıları tarafından oluşturulan gözenekli üç boyutlu bir yapı ile sonuçlanır. Eski perikondrium, şimdiki periosteumdan gelen kan damarları daha önce osteoklastlar tarafından delinmiş kemik halkasından içeri girerek osteoprogenitör hücreleri gözenekli merkezi bölgeye getirir. Daha sonra, osteoblastlar kalsifiye kıkırdak matriksine tutunur ve kıkırdak matriks kalıntılarını çevreleyen primer kemik katmanlarını üretir. Bu aşamada, kalsifiye kıkırdak bazofilik görünür ve primer kemik eozinofiliktir (52,55).

Diyafizdeki bu süreç primer kemikleşme merkezini oluşturur. Sekonder kemikleşme merkezleri kıkırdak modelinin epifizlerinde daha sonra ortaya çıkar ve benzer şekilde gelişir. Genişleme ve remodeling sırasında, primer ve sekonder kemikleşme merkezleri, yavaş yavaş kemik iliği ile doldurulmuş boşluklar üretir (55).

Sekonder kemikleşme merkezlerinde kıkırdak iki bölgede kalır: Yetişkin yaşamı boyunca kalıcı olan ve kemik büyümesine uzunluk bakımından katkıda bulunmayan “artiküler kıkırdak” ve her epifizi ve diyafizi bağlayan “epifizyal kıkırdak” (epifiz plağı veya büyüme plağı olarak da adlandırılır). Epifizyal kıkırdak kemik uzunluğundaki büyümeden sorumludur ve yetişkinlerde kaybolur, bu nedenle yetişkinlikte kemik büyümesi durur. Epifiz plaklarının kaybolması (epifizyal kapanma) farklı kemiklerle farklı zamanlarda meydana gelir ve tüm kemiklerde yaklaşık yirmi yaşına kadar tamamlanır. Büyüyen iskeletin X-ışını muayenesi ile, hangi epifizlerin açık ve kapalı olduğunu anlayarak, genç bir insanın kemik yaşını belirlemek mümkündür. Epifizler kapandıktan sonra, kemik genişlemesi meydana gelebilse de, kemik uzunluğunda büyüme imkansız hale gelir (56,57).

Bir epifizyal kıkırdak plakası, kıkırdağın epifiz kısmından başlayarak beş bölgeye ayrılır (52):

1. Dinlenme bölgesi tipik kondrositli hyalin kıkırdaktan oluşur.
2. Proliferatif bölgede kondrositler hızla bölünmeye başlar ve kemiğin uzun eksenine paralel olarak yığılmış hücre sütunlarını oluşturur.
3. Hipertrofik kıkırdak bölgesi, sitoplazmasında glikojen birikmiş şişmiş kondrositleri içerir. Hipertrofi, matriksi kondrositler arasındaki ince septaya sıkıştırır.
4. Kalsifiye kıkırdak bölgesinde, apoptoz ile kondrosit kaybına hidroksiapatit kristallerinin oluşumu ile kıkırdak matriksinin septasının kalsifikasyonu eşlik eder.
5. Kemikleşme bölgesinde önce kemik dokusu görülür. Periosteum kaynaklı kılcal damarlar ve osteoprogenitör hücreler kondrositlerin bıraktığı boşlukları istila eder. Bu boşlukların çoğu birleştirilecek ve kemik iliği boşluğu haline gelecektir. Osteoprogenitör hücreler, kalsifiye kıkırdak matriksinin septası üzerinde aralıklı tabakalar halinde yerleşen osteoblastlara dönüşür.

Osteoblastlar, kalsifiye kıkırdak matriksinin spikülleri (dikensi yapılar) üzerine osteoid biriktirir ve *woven* kemiği oluşturur.

Özet olarak, uzun bir kemiğin boyundaki büyüme, epifize bitişik epifizyal tabakada kondrositlerin çoğalmasıyla meydana gelir. Bu sırada, tabaka büyümesinin diyafiz tarafındaki kondrositlerin, matriksleri kalsifiye olur ve hücreler ölür. Osteoblastlar, kalsifiye kıkırdak matriksi üzerine bir katman primer kemik tabakası bırakır. Bu iki karşıt olayın (proliferasyon ve yıkım) oranları yaklaşık olarak eşit olduğundan, epifizyal tabakanın kalınlığı değişmez. Bunun yerine, diyafizin orta noktasından uzaklaşır ve kemik uzunluğunun artmasına neden olur.

2.1.7. Kemiğin Fonksiyonu

Kemiğin ana fonksiyonları vücut hareketi, organların korunması ve mineral homeostazını sağlamak olarak sıralanabilir. Mekanik gerilim, yerel çevresel faktörler ve sistemik hormonlar kemik rezorpsiyonu ve yapımı arasındaki dengeyi etkiler. Kemiğin farklı mekanik özellikleri, yapısal gücüne ve hareket kabiliyeti sağlama özelliğine katkıda bulunur. Bunlara ek olarak, kemik hücreleri, matriks ve sinyal molekülleri arasındaki karmaşık etkileşimler serisi, vücuttaki kalsiyum ve fosfor dengesini korur ve bu da kemiğin mekanik mukavemetine katkıda bulunur.

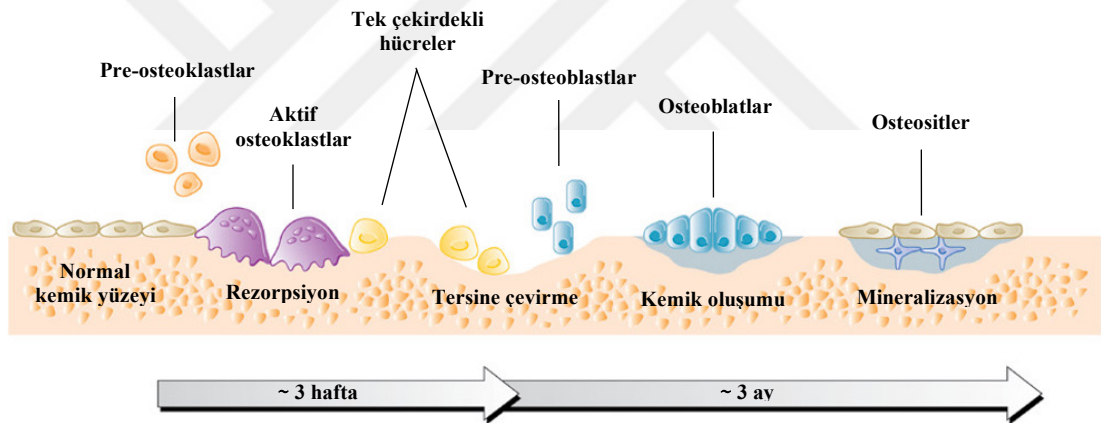
Kemiğin Mekanik Özellikleri

Kemik, fizyolojik ihtiyaçlara göre uyum sağlama kapasitesi yüksek, oldukça dinamik bir dokudur. Kemiğin mekanik özellikleri vücut tarafından metabolik ve mekanik gereksinimlere göre ayarlanır. Kalsiyum ve fosfor, kalsiyum hidroksiapatit kristalleri formunda kemiğin ana mineral bileşenlerini oluşturur. Hidroksiapatit, kemiğin esnekliğini, sertliğini hem de gerilme mukavemetini düzenler. İskeletsel uyum sağlama mekanizması, kemik remodelingi olarak da bilinen, kemik yapım ve yıkım süreci ile gerçekleştirilir. Kemik osteoklastlar tarafından yıkılır ve daha sonra osteoblastlar tarafından yeni kemik oluşumu sağlanır. Kemik remodelingi açısından bakıldığında osteoklastların mekanik bütünlüğü zayıflamış veya bozulmuş bölgeleri tanıyarak buralara tutunduğu ve mekanik olarak bileşenleri tam, sağlam yeni kemik üretimi için kemik remodelingi sürecini başlattığı düşünülür (58-61).

Kemik dokusu yükleme modellerine genellikle matriks sentezini arttırarak, bileşenlerini, organizasyonunu ve mekanik özelliklerini değiştirerek tepki verir. Kanıtlar, aynı durumun onarım altındaki kemik için de geçerli olduğunu

göstermektedir. Kemik mekanik yüke maruz kaldığında, bölgedeki kemiği yenilemek ve onarmak için kemik dönüşüm işlemini başlatan osteoklast mekanoreseptörleri doğrudan uyarılır. Ek olarak, basınç makrofaj koloni uyarıcı faktör ekspresyonunu artırarak kemik iliğinde osteoklast farklılaşmasını artırır. Ayrıca mekanik basınca yanıt olarak prostaglandinleri salgılayan osteoblastlar ve kondrositler yoluyla osteoklastlar dolaylı olarak uyarılır. Hücre dışı matriks ayrıca sinyalleme yoluyla kemik dönüşümünü teşvik edebilir. Kemik matriksinin mekanik deformasyonu, osteoklastik rezorpsiyonu uyaran elektrik potansiyelini indükler (62,63).

Kemiğin sağlamlığı, kemiğin kalitesinin, miktarının ve dönüşüm hızının birleşimi sonucu belirlenir. Kemik yoğunluğu veya miktarındaki kaybın kemik kuvvetini azalttığı ve kırık insidansının artmasına sebep olduğu iyi şekilde bilinmektedir.



Şekil 1. Kemik Remodelingi: Kemik remodeling döngüsü, yüksek oranda düzenlenmiş karmaşık bir dizi peşpeşe adım içerir. Remodelingin aktivasyon aşaması, lokal ve sistemik faktörlerin osteoblast soyunun mezenkimal hücreler üzerindeki etkilerine bağlıdır. Bu hücreler rezorpsiyon fazında osteoklastlar oluşturmak için hematopoetik öncüler ile etkileşime girer. Daha sonra, kemik yüzeyinde mononükleer hücrelerin bulunduğu bir tersine çevirme aşaması vardır. Rezorpsiyon işlemini tamamlayabilir ve kemik oluşumunu başlatan sinyalleri üretebilirler. Son olarak, ardışık mezenkimal hücre dalgaları, oluşum aşamasında matriks bırakan fonksiyonel osteoblastlara ayrılır (94).

Kemiğin Metabolik Özellikleri

Kalsiyum homeostazı, sağlığı koruyan birçok fizyolojik süreç için büyük önem taşımaktadır. Kalsiyum iyonları birçok enzim aktivitesi için gerekli olduğu gibi hücre yapışması, sitoskeletal hareketleri, ekzositoz, membran geçirgenliği ve vücuttaki hücrelerdeki diğer fonksiyonlara aracılık eden proteinler için de gereklidir. İskelet kalsiyum rezervuarı olarak hizmet eder ve hidroksiapatit kristallerinde vücudun toplam kalsiyumunun %99'unu barındırır. Kandaki ve dokulardaki kalsiyum

konsantrasyonu, kandaki kalsiyum ile kemikteki kalsiyum arasındaki sürekli değişime bağlı olarak genellikle oldukça kararlıdır. Osteoblastlar, mineral birikimi ile üretilen asidi absorbe etmek için alkalileştirme ile fosfat ve kalsiyum taşınmasını içeren mekanizmalarla kalsiyum biriktirir; kıkırdak kalsiyum mineralizasyonu pasif difüzyon ve fosfat üretimi ile gerçekleşir. Osteoklastlar tarafından gerçekleştirilen kalsiyum mobilizasyonu, asit sekresyonu ile dolaylı olarak elde edilir. Hem kemik oluşturan hem de kemik rezorbe eden hücreler, farklılaşma ve aktivite düzenleyicileri olarak kalsiyum sinyallerini kullanır. Hem osteoklast farklılaşması hem de hareketliliği kalsiyum tarafından düzenlenir (64-66).

Kemik, kalsiyumun ana deposu ve kalsiyum homeostazı için önemli bir düzenleyici organ olmasına rağmen, kalsiyum beslenme yoluyla elde edilir. Kemik, büyük ölçüde paratiroid bezlerinden ve D vitamini metabolitlerinden gelen kalsiyum bağımlı sinyallere yanıt verir, ancak paratiroid regülasyonu kaybedilirse doğrudan hücre dışı kalsiyuma yanıt verir. Serum kalsiyum homeostazı kemik rezorpsiyonunun, kalsiyumun bağırsaklardan emilimi ve sekresyonu arasındaki dengenin ve böbrekler tarafından kalsiyumun yeniden emilim ve atılımının, osteotropik hormonlar tarafından detaylı bir şekilde düzenlendiği, karmaşık bir düzenleyici süreç sonucunda elde edilir. Serum iyonize kalsiyum kan konsantrasyonlarının dengesi, PTH, D vitamini ve kalsitonin arasındaki karmaşık etkileşimden kaynaklanır. Kemik metabolizmasını etkileyen diğer osteotropik (kemiğe bağlanan) endokrin hormonlar arasında tiroid hormonları, seks hormonları ve retinoik asitler yer alır. Diyetten ve kemiklerden elde edilen kalsiyumun, gastrointestinal sistem ve idrar yoluyla atılımı sonucu kalsiyum homeostazı korunur (63,66,67).

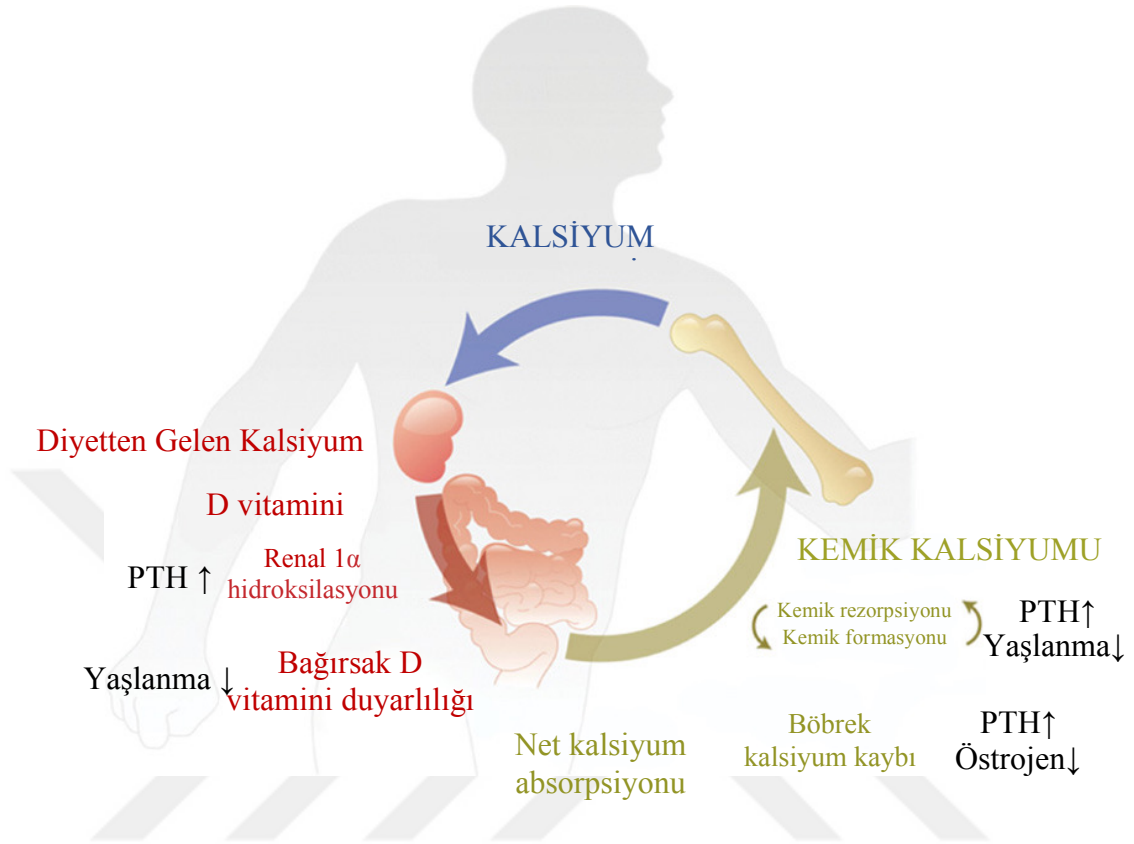
D vitamini kalsiyum emiliminde rol oynar, PTH kemikten kalsiyum salınımını uyarır, böbrekten atılmasını azaltır ve D vitamininin biyolojik olarak aktif formuna (1,25-dihidroksikolekalsiferol) dönüştürülmesine yardımcı olur. Kalsiyum ve D vitamini alımının azalması ve östrojen eksikliği de kalsiyum eksikliğine katkıda bulunabilir. Retinoidler, tiroid ve steroid hormonları gibi hormonal faktörler biyolojik zarlardan geçebilir ve kemik rezorpsiyon hızı üzerinde büyük bir etkiye sahip olmak için hücre içi reseptörlerle etkileşime girebilir. Östrojen eksikliği kemik rezorpsiyonunu arttırır ve yeni kemik oluşumunu azaltır. Östrojen eksikliği olan durumlarda osteosit apoptozunun gerçekleştiği de belgelenmiştir. Östrojene ek olarak,

kalsiyum metabolizması kemik döngüsünde önemli bir rol oynar ve kalsiyum ve D vitamini eksikliği kemik birikiminin bozulmasına yol açar (65,67,68).

Kan kalsiyum düzeylerini yükseltmek için işlev gören temel mekanizma, hidroksiapatit kristallerinden interstisyel sıvıya iyonların mobilizasyonudur. Bu temel olarak trabeküler (süngerimsi) kemikte gerçekleşir. Yetişkinlerin kemik yapısında bile var olan daha genç, daha az kalsifiye lameller (sürekli remodeling nedeniyle) kalsiyumu daha kolay alır ve kaybeder. Genç lameller, kandaki kalsiyum konsantrasyonunun korunması yönünden, asıl işlevi destek ve korunma olan yaşlı, daha yoğun kalsifiye lamellerden daha önemlidir (69,70).

İki anahtar hormonun kemikteki hücreler üzerindeki etkisi, hidroksiapatitten kalsiyum mobilizasyonu sürecini düzenler. Paratiroid bezlerinden salgılanan PTH düşük kan kalsiyum seviyelerini yükseltir. Dolaşımdaki PTH serum kalsiyumunu düzenler ve hipokalsemi durumunda salınır. PTH osteoblast reseptörlerine bağlanır, RANKL ekspresyonunu artırır ve RANKL'in osteoklastlar üzerindeki RANK'a bağlanmasını artırır. Bu sinyal, kemikten kalsiyum salınımını teşvik etmek amacıyla osteoklastları aktive ederek kemik remodelingini uyarır. PTH'nin bir diğer işlevi, böbrekten kalsiyum emilimini arttırmaktır. Düşük, bölünmüş dozlarda terapötik olarak uygulandığında, PTH kemik oluşumunu teşvik etmek için bir anabolik ajan olarak hareket edebilir (70,71).

T hücreleri, öncelikli fizyolojik işlevi kemik rezorpsiyonunun baskılanması olan 32 amino asitten oluşan bir peptid olan kalsitonini üretir. Kalsitonin reseptörleri osteoklastlar ve osteoklast öncüleri üzerinde çok sayıda bulunur. Böylece kalsitonin, mononükleer pre-osteoklastların füzyonunu önleyerek, farklılaşmayı inhibe ederek ve olgun osteoklastlar tarafından rezorpsiyonu önleyerek kemik rezorpsiyonunu azaltmak için gelişimlerinin tüm aşamalarında doğrudan osteoklast hücreleri üzerinde hareket edebilir. Kalsitonin reseptörlerinin konsantrasyonu ve fosforilasyonu kalsitonin varlığında azalır. Sonuç olarak, kalsitoninin osteoklastlar üzerindeki etkisi geçicidir ve bu nedenle klinik terapötik uygulamalar için kullanılmaz. Böylece kalsitonin gelişiminin herhangi bir evresinde olan osteoklastlara direkt etki etmek vasıtasıyla mononükleer pre-osteoklastların füzyonunu engelleyerek, farklılaşmayı inhibe ederek ve olgun osteoklastlar tarafından gerçekleştirilen rezorpsiyonu önleyerek kemik rezorpsiyonunu azaltır (63,71).



Şekil 2. Kalsiyum ve kemik metabolizması: Kalsiyum homeostazı sağlığı koruyan birçok fizyolojik süreç için büyük önem taşımaktadır. Serum iyonize kalsiyum kan konsantrasyonlarının dengesi PTH, D vitamini ve kalsitonin arasındaki karmaşık etkileşimden kaynaklanır. Şekil diyetten ve kemiklerden elde edilen kalsiyumun ve gastrointestinal sistem ve idrar yoluyla atılımının homeostazı nasıl koruduğunu yansıtır. D vitamini kalsiyum emiliminde rol oynar, PTH kemikten kalsiyum salınımını uyarır, böbrekten atılımını azaltır ve D vitamininin biyolojik olarak aktif formuna (1,25-dihidroksikolekalsiferol) dönüştürülmesine yardımcı olur. Kalsiyum ve D vitamini alımının azalması ve östrojen eksikliği de kalsiyum eksikliğine katkıda bulunabilir (94).

2.1.8. Kemik İyileşmesi

Yaralı bir dokunun iyileşmesi genellikle orijinal dokudan farklı morfolojide ve işlev bakımından yetersiz olan bir doku oluşumuna yol açar. Bu tip iyileşme doku tamiri olarak adlandırılır. Doku rejenerasyonu ise, morfoloji ve fonksiyonun tamamen restorasyonuna yol açan bir iyileşmeyi tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Kemik dokusunun iyileşmesi, yaralanmanın doğasına bağlı olarak hem rejenerasyon hem de onarım fenomenlerini içerir.

Kemik dokusundaki travma, tekrarlanan stresler veya tek ve şiddetli bir travmatik olay sonucu, büyük oranda kırık ile sonuçlanır. Kemik hasar gördüğünde,

onarımı kolaylaştırmak için anında karmaşık ve çok aşamalı bir iyileşme süreci başlatılır. Doku ve hücre proliferasyonuna büyüme faktörleri, inflamatuvar sitokinler ve sinyal molekülleri farklı aşamalarda aracılık eder. Sürekli bir süreç olmasına rağmen, kemik onarımı kabaca üç aşamaya ayrılabilir: İnflamatuvar faz, onarıcı faz ve yeniden modelleme fazı. Enflamasyon fazı doku hasarından hemen sonra başlar ve yaklaşık 2 hafta sürer. Onarım sürecindeki ilk adım kan pıhtısı oluşmasıdır. Hasarlı hücrelerden gerçekleşen sitokin salınımı, inflamatuvar hücreleri bölgeye toplar ve makrofajlar aracılığıyla hasarlı doku ve hücrelerin fagositozunu başlatır. Osteoklastlar hasarlı kemiğin rezorpsiyonu işlemini başlatarak mineral bileşenleri geri dönüştürür. Ek olarak, miyeloid ve mezenkimal hücre soylarından gelen hücreler, osteoblastlara ve kondroblastlara farklılaşmaya başladıkları bölgeye toplanır. Bu noktada, RANKL-osteoprotegerin (OPG) oranı azalır (62,72).

Onarıcı faz, yeni kemik matriksi ve kırıkta iskeletin oluşmaya başladığı yumuşak kallus oluşumu ile karakterizedir. Osteoblastlar ve kondroblastlar, kallusu oluşturmak için proteinden oluşan bir iskele oluştururlar, daha sonra bu iskele yavaşça mineralize olarak sert kallusu meydana getirir. Sert kallus olgunlaşmamış *woven* kemikten oluşur. Kırıkta ve periostal *woven* kemik oluşumunun başlamasına interlekin 6 (IL-6), OPG, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve BMP'lerin erken yukarı regülasyonu aracılık eder. Yumuşak kallustan sert kallusa geçiş süreci, kırık oluşum zamanından yaklaşık 6-12 hafta sonra gerçekleşir (72).

Kemik onarımının son aşaması olarak da bilinen remodeling fazında, kemik matriksi ve kırıkta olgun kemiğe dönüştürülür. *Woven* kemik nihayetinde osteoblast-osteoklast ikilisinin aracılık ettiği normal kemik döngüsü ile olgun lameller kemiğe dönüştürülür. Yeterli D vitamini ve kalsiyum, uygun kemik tamiri için kritik öneme sahiptir ve düzeyleri kısmen onarım oranına etki edebilir. Remodeling aşamasının süresi, bireyin kemik metabolizmasına bağlı olarak değişir, ancak genellikle yaralanma zamanından sonra aylar geçmesi gerekir (62).

Uzun Kemiklerde Oluşan Kırıklarının İyileşme Yolları

Uzun kemiklerin kırıkları hem intramembranöz hem de endokondral kemikleşme ile iyileşir. Endokondral kemik oluşumu mekanik olarak kararsız bölgelerde periost dışında ve kırık bölgesine bitişiktir. İntramembranöz kemik oluşumu kallusun proksimal ve distal kenarlarında subperiostal olarak oluşur ve sert

kallusu oluşturur (73). Sert kallusun kırık boşluğu boyunca köprülenmesi başlangıç stabilizasyonunu sağlar ve biyomekanik fonksiyonun restorasyonuna yol açar (74). Endokondral ossifikasyon uzun kemiklerin kemik oluşumu mekanizması olduğundan, aynı zamanda uzun kemiklerin onarımından öncelikle sorumlu olan mekanizmadır. İ içe geçmiş dört fazdan oluşan kırık iyileşmesinin evreleri histolojik olarak şoyledir (75):

1. Doğrudan İnflamatuvar Yanıt: Bu durum kırık sonrası ilk 24 ila 48 saat içinde ortaya çıkar ve hematoma oluşumu, hemostaz, enflamasyon ve MKH'lerin bölgeye toplaması ile karakterizedir (76).

2. Erken Endokondral Kemikleşme ve Periost Yanıtı ile Kırık Oluşumu: Bu dönemde MKH'ler kondrositlere farklılaşır. Kondrositler daha sonra kolajen ve proteoglikanlar açısından zengin bir kırıkta kallus üretir (77,78). Yumuşak kırıkta kallus kırığın stabilitesi ile ters orantılı olarak büyür ve bunu kırık içinde asimetrik olarak yapar. Örneğin, femur kırıkları daha büyük distal kalluslar ve tibial kırıklar daha büyük proksimal kalluslar üretir, bu da büyüme plaklarına en yakın kalluslar ile yenilendiğini göstermektedir (74,79). Yumuşak kallus büyümesi kırığı takip eden 7 ila 9 gün arasında zirve yapar (77). Periosteal yanıt erken intramembranöz ossifikasyon ile sonuçlanır ve hücre proliferasyonu, erken vasküler i büyüme ve neoanjiyogenezi ile ilişkilidir.

3. Kırıkta Rezorpsiyonu ve Primer Kemik Oluşumu: Bu aşamada kondrositler çoğalır, olgunlaşır, hipertrofik hale gelir ve hücre dışı matriks içinde biriken kolajen sentezini artırır. Kondrositler daha sonra apoptoza girmeye bařladıķça, mezenkimal progenitör hücreler toplanarak osteoblastlara farklılaşır. Osteoblastlar, yumuşak kallusu woven kemiği oluşturmak için bir şablon olarak kullanır ve kallus mineralizasyonuna yol ağarlar. Bu başlangıçta kallus çevresinde ince bir kemik kabuğu olarak kendini gösterir. Neo-anjiyogenezi de bu aşamada devam eder (76).

4. Sekonder Kemik Oluşumu ve Remodeling. Bu son aşamada kemik kallusu büyür ve osteoklastik rezorpsiyon ve osteoblastik kemik oluşumu ile yeniden şekillendirilir, bu da orijinal kortikal ve trabeküler yapının kemik iliğini de içeren medüller boşlukla birlikte rejenerasyonuyla sonuçlanır (76).

Kırık iyileşmesinin bu dört evresinin moleküler fizyolojisi iyi anlaşılmıştır ve endokondral kemik gelişimi ile birçok moleküler benzerliği paylaşmaktadır. Sürece dahil olan birçok sitokin ve büyüme faktörü içerisinde, proenflamatuar sitokinler, dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) süper ailesi üyeleri (BMP'ler dahil) ve anjiyojenik faktörler kemik iyileşmesinin dört aşaması sırasında karmaşık, iyi tanımlanmış örtüşen rollere sahiptir. Kemik iyileşmesinin dört fazındaki spesifik rolleri iyi tanımlanmamış olmasına rağmen, kayıpları iyileşme yeteneğinde önemli bozulmalara neden olan sinyal yolları da yer almaktadır. Bunlar IHH ve Wnt sinyal yollarını içerir (80-84).

Rijit fiksasyonun yokluğunda, apendiküler iskeletin kırık iyileşmesi, kemikle kademeli olarak yer değiştiren bir kırıkta iskelesinin oluşumu ile meydana gelir. Bu iyileşme şekli, embriyonik endokondral kemikleşmenin basamaklarına çok benzemektedir. Mezenkimal öncüler hem endokondral kemikleşme hem de kırık iyileşmesi için oluşturulacak kemiğin şeklinde ve yerinde birleşir (85,86). Her iki işlem de mezenkimal hücre çoğalmasını ve kırıkta veya osteojenik bir yolak boyunca farklılaşma ve hipertrofiyi içerir. Süreçler arasındaki bariz bir fark, MHK'lerin toplanmasını kolaylaştıran kırık iyileşmesinde enflamatuar adımın varlığıdır. Bununla birlikte, bu hücreler sürece dahil olduktan sonra IHH, VEGF ve MMP (matriks metaloproteinaz) dahil olmak üzere aynı sinyal yollarından bazıları dahil olur (87). Belki de bu embriyonik yolların birçoğunun korunması, kırık kemiğin diğer dokularda olduğu gibi skar oluşturmada, gerçekten rejeneratif bir süreçle iyileşmesine izin verir.

Kraniyofasiyal İskelet Kırıklarının İyileşme Yolları

Rijit fiksasyon yapılmadan gerçekleşen çene kemiği kırığı iyileşmesinin uzun kemik kırıkları ile bazı histolojik benzerliklere sahip olduğunu bilinmektedir (88). Kırık oluşumundan 2 hafta sonra hem kondroidleri hem de olgunlaşmamış osteoidleri içeren büyük bir subperiosteal kallus gelişir. Takip eden 2 hafta içinde bu kallus yavaş yavaş trabeküler kemik ile değiştirilir ve tamamen yeni neovasküler kanallar ve Haversian sistemleri ile köprülenir. Fare çene kemiği kırılma modelinde benzer şekilde, olgunlaşmamış kırıkta matriks oluşumu, vasküler iç büyüme, osteoblast aktivasyonu, mineralizasyon ve lamellar kemik oluşumunun varlığının birlikte sekonder endokondral kemik iyileşmesine benzediği gözlemlenmiştir. Ara kırıkta

oluşumunun çene kemiği kırılma modellerine katkısının, sadece kemik kararsızlığından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (89). Gerçekten de, uzun kemik kırıklarında stabilite eksikliğinin varlığı, kırık bölgesinde artmış hareket ile sonuçlanır, bu da primer kemik iyileşme aşamasında kırıkta kallus oluşumunu teşvik eder.

Sağlam, düz, kemik iliği boşluğunun olmaması, intramedüller stabilizasyonun kullanılmasını engeller. Buna rağmen, klinik deneyim, intramembranöz kemikleşme ile gelişen kemiklerin, genellikle kırıkta bir ara ürün yoluyla değil, aynı mekanizmalarla iyileştiğine dair çok büyük kanıtlar sağlar. Kafatası kırıkları bu esasları göstermektedir. Kafa derisi, kalvaryal kırık redüksiyonunu desteklemek için sıkı bir yumuşak doku zarfı sağlarken, kalvaryumun dış büyüklüğü, doğal rijit fiksasyon sağlayan sağlam bir kilit taşı kemeri oluşturur. Yüz iskeletinin kemiklerinin çoğu benzer şekilde stabilize edici bir periosteuma ve yumuşak doku zarfına sahiptir ve tekrarlanan kuvvetlere maruz kalmaz. Bunların aksine, mandibula çiğneme ile ilişkili döngüsel mekanik yüklemelere maruz kalır. Bununla birlikte, immobilizasyon veya rijit yük taşıyıcı veya yük paylaşımli fiksasyon ile doğrudan kemikleşme ile iyileşir (76).

Membranöz kemik iyileşmesinde kondrogenезin rolüne karşı deneysel kanıtlar sunulmuştur (90). Uzun kemiklerin kırık hematmaları içinde bir multipotent mezenkimal progenitör hücre belirlenmiş ve in vitro osteositler, adipositler ve kondrositlere farklılaşma yetenekleri gösterilmiştir. İnsan mandibula kırığı hemat hücresi kültür ortamında çoğaltılmış ve bu hücrelerin benzer mezenkimal hücre yüzeyi ekspresyon profiline sahip olmalarına ve iyi osteojenik ve adipojenik potansiyele sahip olmalarına rağmen, uzun kemik kırığı hematlarından izole edilen progenitörlere kıyasla kondrositlere farklılaşma kabiliyetlerinin belirgin derecede az olduğu keşfedilmiştir (91).

Uzun kemik kırıkları ile karşılaştırıldığında, kraniyofasiyal kırıkların iyileşmesinin moleküler fizyolojisi hakkındaki bilgilerimiz oldukça kısıtlıdır. Mandibula kırığı iyileşme modelindeki bir sıçan deneyi, TGF-B1, BMP-2, 4 ve 7 dahil olmak üzere TGF-13 süper aile üyelerinin osteoblast göçü, farklılaşması ve proliferasyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir (92,93).

2.2. Bor

Bor minerali, güncel araştırmalarla dünya üzerindeki canlı evrimini de etkilediği düşünülen, bitki, hayvan ve insan metabolizması üzerinde, çeşitli ve hayati derecede öneme sahip bir mikro besindir. Kemik gelişimi ve rejenerasyonu, yara iyileşmesi, cinsiyet hormonları, D vitamini üretimi ve metabolizması ile kalsiyum ve magnezyumun emilimi ve kullanımı dahil olmak üzere insan sağlığı üzerindeki birçok durumla yakından ilişkilidir (95).

Borun çeşitli metabolik eylemleri etkilediği bilinmektedir. Kemik metabolizmasında önemli olan kalsiyum, D vitamini ve magnezyum ile etkileşime girer. Tüketilen bor miktarına bağlı konsantrasyonlarda kemikte birikir (11). Doğada borik asit ve borat olarak bol miktarda bulunur ve meyveler, sebzeler ve baklagiller tüketilerek diyetle elde edilebilir (12). Esas olarak okyanuslarda ve toprakta inorganik borat bileşikleri şeklinde oluşur ve DNA'dan önce kendiliğinden oluşan molekül RNA'sının ana bir bileşeni olan ribozu stabilize eder (96,97). Borun fizyolojik miktarları, büyüme ve gelişmeyle ilgili çeşitli maddelerin metabolizmasını ve tüketimini değiştirebilir (98).

Ek olarak bor, artriti hafifletmeye ve beyin fonksiyonunu iyileştirmeye yardımcı olabilecek anti-enflamatuar etkilere sahiptir ve borlanmış bileşikler, şu anda çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır (95).

2.2.1. Borun Tarihçesi

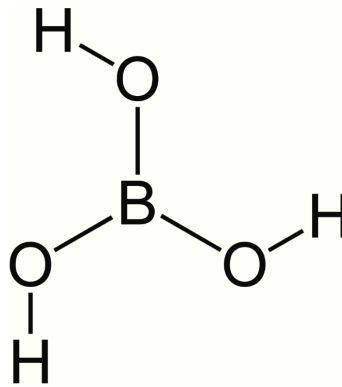
Borun tarihçesi çok eskilere dayanır, 4000 yıl önce altın üretiminde Babiller tarafından kullanılmıştır. Eski Mısırlılar mumyalama, metalurji ve tıbbi amaçlarla bor kullanımı ile tanınırlar. Bu çok eski kanıtlar doğrulanmamıştır fakat eski çağlarda bor kullanımının kesin kanıtı sekizinci yüzyılda Arap tüccarlar tarafından Çin'den Mekke ve Medine'ye borat ticareti olmuştur. On ikinci yüzyılda Avrupalı kuyumcular tarafından altını eritme işlemlerinde kullanılmıştır. İlk bilinen borat kaynağı olarak Tibet gölleri kabul edilir ve Himalayalar bölgesinden Hindistan'a taşınmıştır (99). Türkiye'deki borat üretimi 1865 yılında kalsiyum borat madenciliği ile başlamıştır. Benzer bir dönemde Nevada ve Kaliforniya'daki Ölüm Vadisi'nde bazı borat rezervleri keşfedilmiştir (100). 1960 yılında Kırka ve Anadolu'da sodyum boratlar bulunmuştur. Türkiye, Avrupalı borik asit üreticilerine uzun yıllar borat ithal etmiştir. Türkiye bugün dünyanın en büyük bor ürünleri tedarikçisi olarak bilinir (101).

2.2.2. Borun Kimyasal Özellikleri

Bor atom sayısı 5 ve moleköl ağırlığı 10.81 g/mol olan metaloid ailesine ait bir elementtir. 10B ve 11B olmak üzere iki izotopu vardır. Doğada element formunda ortaya çıkmaz, kimyası karmaşıktır ve diğér elementlerle bileşikler (boratlar) oluşturur (102).

Periyodik Tablodaki beşinci element olan Bor, IIIA grubu elementleri içerisinde metal olmayan tek elementtir, fakat metal ve ametal özelliklerinin ikisini de barındırır. Dış kabuğunda üç elektron bulunan küçük bir atom olan bor, dış kabuğunu doldurmak için kovalent bağ kullanır. Bor atomu protonları bağlayamaz, ancak hidroksil iyonlarını kabul ederek Lewis asidi görevi görür (103).

Oksijene karşı güçlü bir afinitesi vardır. Bor dört oksijen atomuna bağlandığında ortaya çıkan bileşik borat anyonudur ($B(OH)_4^-$). Bor üç oksijen atomuna bağlandığında çıkan bileşik ortoborik asittir ($B(OH)_3$). Bor bitişik hidroksil gruplarına sahip organik moleküller ile kompleksler oluşturma eğilimindedir. Bor, polisakkaritler, piridoksin, riboflavin, dehidroaskorbik asit ve piridin nükleotitler dahil olmak üzere önemli biyolojik maddelerle etkileşime girebilir (104). Borun eşsiz kimyası, diğér birçok metabolit ve enzimle reaksiyona girmesine izin verir ve böylece insanlarda ve hayvanlarda mineral ve enerji metabolizmasını değiştirebilir (105).



Şekil 3. Borik asitin moleköl yapısı.

2.2.3. Doğada Bor

Bor doğada yaygın olarak bulunur ve doğal olarak borat bileşikleri şeklinde oluşur (107). Dünyanın büyük bölümlerinde daha az bor bulunurken, ABD'nin batısında, Türkiye, Brezilya, Rusya ve Çin'de de yüksek miktarda bor rezervleri bulunmaktadır (108).

ÜLKE	Toplam Rezerv (milyon ton)	Dünya toplamındaki yüzdesi (%)
Arjantin	09	01
Bolivya	19	02
Şili	41	05
Çin	36	04
Kazakistan	15	02
Peru	22	02
Rusya	100	11
Türkiye	563	64
Amerika Birleşik Devletleri	80	09

Tablo 1. Dünya genelinde bor rezervleri (106).

Bor tortul kayaçlar, deniz suyu, kömür ve toprakta yüksek konsantrasyonlarda oluşur. Deniz suyunun küresel ortalama konsantrasyonunun yaklaşık 4.6 mg/l olduğu tahmin edilmektedir (109). Tatlı sudaki bor aralığı 0.01 ila 1.5 ppm arasında değişir, toprakta yüksek konsantrasyonlara sahip alanlarda daha fazla bor bulunmaktadır (99).

Bor ticari kullanımdan, okyanuslardan, kayaların hava koşulları sebebiyle aşınması sonucu, volkanlardan, kömürün yakılması sonucu ve orman yangınları aracılığıyla atmosfere salınır (107). Cam, seramik, deterjan ve gübre endüstrileri ticari uygulamalar için bor kullanır ve bu da borun çevreye geniş bir ölçekte salınmasına neden olur (110).

Topraklardaki mevcut bor miktarı toprak türüne, kullanılan gübrelere, pH ve sıcaklığa göre değişir. Süper fosfat ve potasyum gübrelere uygulanması borun emilimini engeller. Sıcak, nemli toprakta mikrofloranın aktivitesi nedeniyle yüksek oranda bor bulunur (96). Atmosferdeki borun %65-85'i okyanuslardan ve bor içeren sulama suyu ve gübreleri içeren büyük antropojenik kaynaklardan, %7-18'i kömürle

alışan enerji santrallerinden salınan bor içeren uçucu küllerden ve atık su arıtma tesislerinden çıkmaktadır (107). Atmosfere her yıl yaklaşık 1.8 ila 5.3 milyar kg bor salınımı olmaktadır (110).

Bileşik	Renk	Bor yüzdesi	Suda znebilirlik
Anhidrz boraks	Beyaz	21.49	2.5556 g/100 g 25 C
Boraks	Renksiz	11.34	5.92 g/100 g 25 C
Boraks pentahidrat	Beyaz	14.85	3.6 g/100 g 20 C
Borik asit	Beyaz	17.48	63.5 g/L 30 C
Bor oksit	Renksiz	31.06	Az znr
Kolemanit	Beyaz	15.78	Az znr
Sodyum perborat monohidrat	Beyaz	10.83	15 g/L 20 C
Sodyum perborat tetrahidrat	Beyaz	7.03	23 g/L 20 C
Uleksit	Beyaz	13.33	Az znr

Tablo 2. Dünya genelinde en çok kullanılan bor içerikli bileşikler (106).

2.2.4. Bor İçeren Gıda Kaynakları

Borun birincil kaynakları meyve ve sebzelerdir (111). Ayrıca, tüm ana besin maddelerinde, çinko ve bakır gibi temel eser minerallerin miktarına denk düşen önemli miktarda bor bulunduğu da açıktır (112). Turunçgiller, böğürtlen benzeri meyveler ve ananas dışında çoğu meyve, kuru meyveler ve sert kabuklu yemişler, tohum ve bitki sapları yüksek bor konsantrasyonlarına sahiptir (111). Ayrıca yapraklı bitkiler, yüksek miktarda bor içerir. Sebzelerden, yapraklı yeşillikler, özellikle kimyasal gübreler olmadan yetiştirildiğinde en yüksek bor miktarına sahiptir (96). Ayrıca meyveler, sebzeler, kök sebzeler ve baklagiller, tahıllardan (mısır, pirinç ve buğday) ok daha fazla bor içerir (105,113). Diğer önemli bor kaynakları içme suyu ve ticari gübrelerdir. Sudaki bor miktarı, bölgesel olarak değişmektedir ve ihmal edilebilir seviyeden çok yüksek miktarlara kadar değişkenlik gösterebilir (111).

Kaynak	Bor içeriği (mg)/100g	Kaynak	Bor içeriği (mg)/100g
Badem	2.82	Üzüm	2.72
Elma	2.73	Fındık	2.77
Kayısı	2.11	Bal	0.72
Avokado	1.66	Mercimek	0.74
Muz	2.06	Süt	0.23
Fasulye	1.56	Soğan	0.20
Ekmek	0.48	Portakal	0.25
Brokoli	2.19	Şeftali	0.52
Havuç	1.39	Fıstık	1.92
Kaju fıstığı	1.15	Armut	0.32
Ketçap	1.39	Patates	0.18
Kereviz	2.47	Kuru erik	1.18
Peynir	0.19	Kuru üzüm	4.51
Kiraz	1.47	Soya	2.80
Nohut	0.71	Domates	2.72
Hurma	1.08	Ceviz	1.63
Yumurta	0.37	Buğday	2.41
Un	0.28		

Tablo 3. Gıdalarda bulunan bor içeriği (106).

2.2.5. Borun Emilimi ve Vücuttan Atılması

Bor tüm bitki ve hayvanlar için ulaşılabilir bir kaynaktır. Bor, insanlarda ve hayvanlarda gastrointestinal epitelden, ağız, gözler, vajina ve anüs gibi mukoza zarlarından kolayca emilebilir (113). İnsanların ve hayvanların, ilave inorganik borun yaklaşık %100'ünün emilimini gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Borun bazı organik formları hayvanlar için erişilemezdir, çünkü bitkiler sadece mineralizasyon sonrası toprakta oluşan organik bor formlarını emebilir (114).

Bor dışkı yoluyla yaklaşık %2 oranında olmakla birlikte, esas olarak idrarla vücuttan atılır. Safra, ter ve nefes aracılığıyla daha az miktarda kaybedilir (109,115). Doku bor konsantrasyonları genellikle renal atılım yoluyla ilişkili homeostatik bir

mekanizma ile sabit tutulur ve daha yüksek seviyede bor alımları plazma seviyelerini önemli ölçüde arttırmaz (12).

2.2.6. Günlük Bor Alım Miktarı

Bor insan diyetinin bir parçasıdır, ancak günlük alım diyetteki çeşitli gıda maddelerinin oranlarına ve topraktaki bor konsantrasyonlarına bağlı olarak büyük ölçüde değişir (105). Bor alımının değerlendirilmesi zordur çünkü gıdalarda ve kişisel bakım ürünlerindeki bor miktarları için ulusal bir veri tabanı yoktur (116). Günlük bor alımı bireysel gıda seçimine, kişisel bakım ürünlerinden elde edilen miktara ve içme suyundaki bor miktarına göre değişir (111).

Ortalama toplam bor alımı için bildirilen değerler değişir; Amerika Birleşik Devletleri'nde 1,7-7,0 mg/gün; Meksika'da 1,75-2,12 mg/gün; Avrupa Birliği'nde 0.8-1.9 mg/gün; Avustralya'da 2,16-2,28 mg/gün; ve Kore'de yaklaşık 0.93 mg/gün (117,118). Farklılıklar topraktaki bölgesel değişikliklerle, lif ve protein açısından zengin bitkisel gıdaların tüketimi ile ilişkilidir. Çeşitlilik içeren, bitkisel gıda açısından zengin bir diyetin günde yaklaşık 1.5 ila 3 mg bor sağladığı tahmin edilmektedir (117,119).

Bitkisel kaynaklı gıdalar, özellikle meyveler, yapraklı sebzeler, fındık ve baklagiller, bitkisel kaynaklı fermente içecekler bor açısından zengindir. Ancak et, balık ve süt ürünleri zayıf kaynaklardır. Fıstık ve fıstık ezmesi, diğer sert kabuklu yemişler, kuru üzüm ve avokado da bor alımına en çok katkıda bulunanlardır (117,120).

Bor için önerilen günlük tüketim değeri belirlenememesine rağmen günde 20 mg maksimum alım değeri bildirilmiştir (121). İnsanların günlük en az 0.2 mg bor ihtiyacı olduğu ve günlük diyetin yaklaşık 1-2 mg bor içermesi gerektiği öne sürülmüştür. Günlük bor alımı 3 mg'dan düşük olduğunda borun kemik, cinsiyet hormonları ve D vitamini üzerindeki olumlu etkilerinden faydalanılamadığı bildirilmiştir (122-124). Dünyanın bor bakımından zengin bölgelerinde yaşayan bireyler üzerinde yapılan araştırmalar günde 3 mg bor alımının çok düşük bir yan etki riski ile fayda sağlayacak muhafazakar bir miktar olduğunu göstermiştir. Örneğin, Türkiye'de borik asit üretim tesislerinde çalışan işçiler için günlük bor alımı ortalama 12.6 mg olup hiçbir olumsuz etkisi gözlenmemiştir (125).

2.2.7. İnsan Dokularında Bor Seviyeleri

Yüksek çözünürlükleri sebebiyle hayvanlarda ve bitki dokularında boratlar bulunur fakat bitkilerde hayvan dokularındaki miktarlarından daha konsantre halde olurlar. Konsantrasyonları hayvan karaciğerlerinde ortalama 0.07 mg/kg'dan az olabilirken, belirli deniz yosunlarında 248 mg/kg'a kadar yükselebilir. Bitki ve hayvan dokularındaki ortalama bor miktarının 30 ila 50 ppm arasında değiştiği tahmin edilmektedir (110).

Bor vücut dokularında ve sıvılarda çoğunlukla borik asit (H_3BO_3) olarak bulunur. Bor insan kanında %98.4 oranında borik asit formunda bulunurken, %1.6 oranında borat anyonu ($B(OH)_4$) formunda bulunmaktadır. Kandaki toplam bor konsantrasyonları 15.3-79.5 ng/g arasındadır (12,115). Bor konsantrasyonu vücudun çeşitli organları arasında farklılık göstermektedir, bu da borun her bir organda belirli işlevleri yerine getirdiğini gösterir (126). İnsan vücudundaki toplam bor miktarının 3-20 mg arasında değiştiği ve en yüksek bor konsantrasyonlarının kemik, tırnaklar ve saçlarda (4.3-17.9ppm) bulunduğu tahmin edilmektedir (127).

50 sağlıklı insanda yapılan bir araştırma kan, serum ve idrardaki ortalama bor konsantrasyonlarının sırasıyla 0.06, 0.02 ve 0.75 ppm olduğunu göstermiştir (128). Bunlara ek olarak bor içeriği artritli ve sağlıklı kemikte farklılık göstermektedir. Artritli kemiklerde yaklaşık 3 ppm bor bulunurken, sağlıklı kemiklerde 56 ppm bor bulunmaktadır. Bor kemikte birikir ancak yumuşak dokularda birikmez (126). Yüksek bor içerikli diyet (9000 ppm/gün) uygulanan sıçanlarla yapılan çalışmalar, yumuşak doku bor konsantrasyonunun yaklaşık 15 ppm'de sabit kaldığını, kemiklerde ise duraklama evresine ulaşmadan 47 ppm'e kadar yükseldiğini göstermiştir (127).

Organ	Bor konsantrasyonu (ppm)	Analiz metodu
Kalp	28	Atomik abzorspiyon spektrometre
Kaburga	10.2	Külte spektrometresi
Karaciğer	2.31	Emisyon spektrometresi
Dalak	2.57	Emisyon spektrometresi
Akciğer	0.6	Külte spektrometresi
Böbrek	0.6	Külte spektrometresi
Kas	0.1	Külte spektrometresi
Beyin	0.06	Külte spektrometresi

Tablo 4. Organlardaki bor konsantrasyonu (96).

2.2.8. Bor Toksisitesi

Borik asit sadece aşırı miktarda tüketildiğinde toksiktir, çünkü hayvanlar ve insanlar fazla boru vücuttan dışarı atar. Yetişkinlerde 18 ila 20 mg borun ölümcül olduğu gösterilmiş olsa da bor toksisitesinden ölüm olağandışıdır ve bazı bireylerde 80 ila 297 mg arasında bor miktarının tolere edildiği görülmüştür. Tek seferde yüksek miktarda bor alımının ölümcül olması muhtemel değildir; bununla birlikte birkaç gün sonra böbrek hasarı, dolaşım çökmesi veya şok sebebiyle ölüm meydana gelebilir. Borun ölüme neden olduğu süreç belirsizliğini sürdürmektedir (129,130).

Bor, borik asit ve bor oksit maruz kalma koşulları altında primer tahrişe sebep olurlar. Bor toksisitesinin klinik semptomları pellagra semptomlarına benzer. Toksisitenin biyokimyasal semptomları, dehidrojenaz enzimlerinin inhibisyonu ile birlikte riboflavinüri ve riboflavin eksikliğini içerir. Toksik dozda bor alımı mide bulantısı, kusma ve ishale neden olabilir. Kusmuk ve dışkı mavi-yeşil renkte görünebilir ve böbrek hasarı, hipotermi, eritem, huzursuzluk ve yorgunluk semptomları oluşabilir. Kronik bor toksisitesi iştahsızlık, mide bulantısı, kilo kaybı ve azalan seminal hacim ve cinsel aktivite ile sonuçlanır. 2 yıl boyunca 1170-2000 ppm borla beslenen köpekler ve sıçanlar, bodur büyüme, daha az verimli gıda kullanımı, deri döküntüleri ve gonadal bozulma göstermiştir. Kronik maruziyetler bebeklerde ve çocuklarda yüksek ölüm oranına yol açabilmektedir (129,130).

2.2.9. Hayvanlarda ve İnsanlardaki Rolü

Borun, çeşitli reaksiyonların sentezinde ve metabolizmasında rol oynayan hidroksilasyon reaksiyonlarına katıldığı düşünülmektedir (131). Bor, artrit için etkili bir tedavi seçeneğidir, kemik, eklem ve kıkırdığa kalsiyum entegrasyonunu etkili bir şekilde arttırarak, vakaların %95'inde kemik iyileşmesinde kayda değer gelişmelere sebep olmuştur. Ayrıca testosteron ve östrojen dahil birçok hormonu etkiler (96). Borik asitin meme kanseri hücrelerinde etkili olduğu in vitro çalışmalar da mevcuttur (132).

Borun vücuttaki bazı kan pıhtılaşma faktörlerini etkileyebileceği düşünülmektedir. Bor, konjestif kalp yetmezliği durumlarının ürettiği sorunları belirgin şekilde hafifletebilir. Lipit birikimini azaltmaya yardımcı olur ve kolesterolün çeşitli yollarla atılımına izin verir, böylece kan pıhtıları ve ateroskleroz gibi durumların gelişme risklerini en aza indirir ve vücudu kalp krizi ve felçlere karşı korur (133).

Karmaşık yapı ve bağlanma özellikleri nedeniyle, boratlar aldehit dehidrojenaz, nitrik oksit sentaz, peptidaz, ksantin oksidaz ve proteazlar gibi enzimler üzerinde inhibe edici etki göstermektedir (134). Bor, testosteron, östrojen, glikoz ve insülinin metabolizmasını etkiler. Glikoproteinler, glikolipidler ve hidroksil grubuna sahip diğer moleküller borik asit ile bileşik oluşturabilir ve membran bütünlüğünü değiştirebilir (135).

Boratlar ayrıca kanser, yara iyileşmesi, hastalıkların kontrolü, genotoksisitenin azaltılması ve mitokondriyal membran aktivitesinin modüle edilmesinde antienflamatuar ve antioksidan bir ajan olarak görev almaktadırlar (136-138). Ek olarak borik asit, pestisitler tarafından bastırılan asetilkolinesterazın işini revize eder ve ayrıca vücudu CCL4 ve diğer ajanlar tarafından indüklenen oksidatif strese karşı korur (139-142).

Gerekli bor miktarları türe özgüdür ve aynı zamanda oldukça değişkendir. İnsanlar da dahil olmak üzere çoğu tür için gerekli olan bor miktarı henüz belirlenememiştir.

2.2.10. Enzimatik Faaliyet Üzerindeki Etkileri

Borun hayvan, bitki, kültür ve kimyasal reaksiyon sistemlerinde görülen en az 26 farklı enzimin aktivitesini etkilediğini bildirilmiştir. Bor, enerji substrat

metabolizmasında, insülin salınımında ve bağışıklık sisteminde yer alan yollardaki enzimatik aktivitenin düzenlenmesinde rol oynar. Bordan yoksun (<0.3 mg/g) diyetlerin yaklaşık $2 \mu\text{g/g}$ ile takviye edilmesinin, hayvan ve insan fizyolojisinin çeşitli yönlerini değiştirmek için yeterli olduğu görülmektedir. Enzimlere veya NAD^+ gibi kofaktörlere bağlandığı mekanizmalar şu anda bilinmemektedir ve daha fazla araştırılmalıdır (114). Bir hipotez, borun substrat bileşiklerine bağlanarak metabolik reaksiyonları değiştirmesidir (103).

Bor, serin proteazlar veya oksidoredüktazlar kullanan bazı yolları kontrol etmek için gerekli olabilir. Bu enzimler piridin veya flavin nükleotitleri (NAD^+ , NADP veya FAD) gerektirir ve bor, geçiş durumu analogları oluşturarak ve NAD veya FAD için rekabet ederek aktivitelerini geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Trombin gibi serin proteazlar kan ve pıhtılaşma sistemlerini düzenlemede işlev görür. Fosfoglukomutaz, k-glutamil transpeptidaz ve gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz gibi diğer enzimler de bor tarafından inhibe edilir (114).

Bor in vitro glikolitik enzim aktivitesini inhibe eder ve enerji substrat kullanımını kontrol edebilir. NADPH metabolizmasını değiştirerek insülin salınımını değiştirir. NADPH metabolizmasındaki değişiklikler hücre zarı dinamiklerinde değişikliklere neden olarak insülin sekresyonuna yol açar. Bor, pentoz fosfat yolunda iki anahtar enzim olan glikoz-6-fosfat dehidrojenaz ve gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenazın aktivitesini inhibe eder. Pentoz fosfat yolunun artan aktivitesi nedeniyle bor eksikliği koşulları sırasında insülin salınımı artırılır, bu da borun hücre zarı boyunca iyon taşınmasını değiştirdiğini göstermektedir (114).

NADPH seviyesi, borun pentoz fosfat yolundaki enzimler üzerindeki engelleyici etkisi nedeniyle modifiye edilebilir ve oksijen ihtiyacını azaltır. Bor ayrıca NADPH üretimini ve k-glutamil transpeptidaz aktivitesini azaltarak gerçekleştirilen oksidatif hasar seviyesini de düşürebilir. Bu eylem, vücuttaki glutatyon miktarını artırabilir, bu da hücrelerin toksik oksijen radikallerinden korunmasında rol oynar. (114).

2.2.11. Kemik Büyümesi ve Devamlılığı Üzerindeki Etkileri

Bor osteogenezde önemli bir role sahiptir ve eksikliğinin kemik gelişimini ve rejenerasyonunu olumsuz etkilediği gösterilmiştir (135). Bor, kalsiyum kaybının ve kemik demineralizasyonunun önlenmesinde yer alan steroid hormonlarının üretimini

ve aktivitesini etkiler. Bor takviyesinin hem kalsiyum hem de magnezyumun idrar atılımını önemli ölçüde azalttığı ve kalsiyum emilim seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (143,144). Bor ayrıca D vitamini kullanımını olumlu bir şekilde etkiler. Bor takviyesi D vitamini eksikliği olan hayvanlarda kemik büyümesini uyarır ve D vitamini eksikliğinin karakteristik özelliği olan mineral metabolizmasındaki işlev bozukluklarını azaltır (145).

Borun doku mineralizasyonu ile ilgili genlerin ekspresyonunu ve kemik büyümesi ve döngüsünde yer alan kilit hormonların (17β -estradiol [E2], testosteron ve D vitamini) eylemlerini düzenleyerek osteoblastların mineralizasyonunu indüklediği belirlenmiştir. Borun doku mineralizasyonu indüksiyonu, borun yara iyileşmesi üzerindeki yararlı etkilerinin de temelini oluşturmaktadır (146).

2.2.12. Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri

Derin yaralara %3 lük borik asit çözeltisinin uygulanması yoğun bakımda gereken süreyi üçte iki oranında azaltmaktadır (95). 2000 yılında insan fibroblastları kullanılarak yapılan in vitro araştırmalar borik asit çözeltisinin hücre dışı matriks üzerindeki etki yoluyla yara iyileşmesini geliştirdiğini göstermiştir (147). 2002 yılında yayınlanan diğer in vitro çalışmalar, borun bu yararlı etkilerinin fibroblastlarda bulunan spesifik enzimler olan elastaz, tripsin benzeri enzimler, kolajenaz ve alkalin fosfataz üzerindeki doğrudan etkilere bağlı olduğunu ortaya koymuştur. Hayvan bağ dokusundaki en yaygın hücreler olan fibroblastlar, hücre dışı matriksi ve kolajeni sentezler ve yara iyileşmesinde kritik bir rol oynar. Bor, bu anahtar enzimlerin fibroblastlardaki aktivitesini kolaylaştırır, böylece hücre dışı matriks devir hızını artırır (148).

2.2.13. Hücre Dışı Matriks Proteinlerinin İfadesine Etkisi

Borun etki mekanizmalarından yara onarımına dahil olanlar dışında aynı zamanda mineralize doku ile ilişkili proteinler olan kolajen tip 1 (COL1), osteopontin (OPN), kemik sialoprotein (BSP) ve osteokalsin (OCN) gibi çok çeşitli hücre dışı matriks proteinlerinin mRNA ekspresyonunu düzenlediği de gösterilmiştir. Bu proteinlerin birleşik etkileri kemik hücrelerinin mineralizasyonunun yanı sıra osteoblast hücresi canlılığını, proliferasyonunu ve morfolojisini de artırır (146).

İnsan kemik iliği stromal hücreleri üzerinde yapılan daha fazla araştırma, borun osteojenik farklılaşmayı arttırdığı keşfini doğrulamış ve listeye yenilerini eklemeye

devam ettirmiştir. Borun ayrıca alkalin fosfataz ve kemik morfogenetik proteinlerinin (BMP'ler) mRNA ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Borun temel BMP'lerin (BMP-4, BMP-6 ve BMP-7) protein seviyelerini ve ayrıca RUNX2'nin mRNA ekspresyonunu düzenlediği doğrulanmıştır (149).

BMP'ler, TGF- β süper familyasına ait çok işlevli büyüme faktörleridir ve bazıları yeni kıkırdak ve kemiğin oluşumuna neden olur. Bugüne kadar tanımlanmış ve karakterize edilmiş 20 BMP ailesi üyesinden BMP-2, BMP-4, BMP-6 ve BMP-7'nin bor tarafından düzenlenen transkripsiyon ve aktiviteyi gösterdiği, primer insan MKH'lerinde osteoblastik farklılaşmayı indüklemek için gerekli olduğu bulunmuştur (150-153).

Borun ayrıca çekirdek bağlayıcı faktör alt birimi α -1 olarak da bilinen RUNX2 üretimini düzenlediği belirlenmiştir. RUNX2 osteoblastik farklılaşma, kemik oluşumu ve kemik devamlılığının sağlanması için gereklidir. RUNX2, osteoblast gen ekspresyonunu ve MKH'lerin osteoblastlara farklılaşmasını uyarmak için BMP'lerle birlikte çalışan bir transkripsiyon faktörüdür ve olgun osteoblastlarda aktif kalır. Aktif RUNX2 seviyeleri düşürüldüğünde kemik sialoprotein, osteokalsin, osteopontin ve kolajen tip 1 dahil olmak üzere ana kemik matriks proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonu azalır (154-157).

2.2.14. D Vitamini Eksikliğinin Önlenmesi Üzerine Etkisi

Borun hayvan çalışmalarında 25-hidroksivitamin D₃ (25[OH]D₃) ve insan çalışmalarında D vitamini eksikliği olan bireylerin serum düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (124,158). Orta yaşlı erkeklere ve kadınlara (n=15) düşük borlu bir diyetin (0.23 mg B/2000 kcal) uygulandığı 63 günlük bir klinik çalışmada, 63 gün sonunda bor takviyesine başlanmış (3 mg/gün sodyum borat) ve 25(OH)D₃ seviyeleri 49 gün sonunda belirgin bir şekilde yükselmiştir. 25(OH)D₃ seviyeleri 63 günlük bor yoksunluğundan sonra ortalama 44.9 nM iken 49 günlük bor replasyonundan sonra %39 artışla 62.4 nM'ye yükselmiştir (159).

Benzer sonuçlar, D vitamini eksikliği (serum 25(OH)D₃<12 ng/mL) olan orta yaşlı bireylerin (n=13) bulunduğu bir pilot çalışmada da görülmüştür. 25(OH)D₃ seviyeleri, meyvelerde doğal olarak bulunan, bor içerikli bir kompleks olan kalsiyum fruktoborat (Ca [(C₆H₁₀O₆)₂B)₂-4H₂O) takviyesi kullanılarak 60 gün süreyle 6 mg/gün bor takviyesi uygulanarak incelenmiştir (124). Başka bir çalışma D vitamini

durumunun kötüleşeceği bir zaman dilimi olan sonbahar-kış geçişi sırasında gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, bor takviyesi ile 25(OH)D₃ seviyeleri önemli ölçüde artmış ve ortalama %20 artış göstermiştir. Bor hormonal etkilerini estradiol E₂ ve D vitamininin biyolojik yarılanma ömrünü ve biyoyararlanımını arttırarak göstermektedir (160).

2.2.15. Magnezyum Emilimi Üzerine Etkisi

Bor, magnezyumun emilimini ve kemikte depolanmasını önemli ölçüde arttırır ancak borun bir başka yararlı etkisi 17 β -estradiol bozunmasını inhibe etmesidir. Bu nedenle bor magnezyumun çok sayıda faydalı etkisinde bir faktördür. Magnezyumun önemi bor yetmezliğinin yaygın etkilerini göstermektedir. İnsan vücudunda kalsiyum metabolizmasını düzenleyen kilit enzimler için bir kofaktör olan magnezyumun yaklaşık %60'ı kemiklerde bulunur. Kemikteki magnezyumun çoğu apatit kristalinin yapısının ayrılmaz bir parçası olan kortikal kemik üzerinde bulunur (161).

Apatit kristallerindeki yapısal rolünün yanı sıra osteoblastlar, osteoklastlar ve canlı bütün hücreler için magnezyum gerekli bir mineraldir. Magnezyum adenosin trifosfat (ATP) üretimi için gereklidir ve lipid, protein ve nükleik asit sentezinde görev alan 300'den fazla enzimin kofaktörü konumundadır. Pozitif yükü nedeniyle magnezyum hücre zarlarını stabilize eder, kalsiyumun hareketlerini dengeler ve bir sinyal dönüştürücü olarak işlev görür (162).

2.2.16. Antiinflamatuar Etkileri

Bazı makaleler borun inflamatuvar biyobelirteç düzeylerini azalttığını göstermiştir. Sağlıklı erkek gönüllüleri (n=8) içeren yeni bir insan çalışmasında 11.6 mg bor ile takviye edildikten 6 saat sonra plazma bor konsantrasyonlarında önemli bir artış ve yüksek duyarlıklı C-reaktif protein (hs-CRP) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) seviyelerinde önemli düşüşler meydana geldiği görülmüştür. Bir hafta boyunca günde 10 mg bor takviyesi sonrası, TNF- α 'nın plazma konsantrasyonunda %20 ve hs-CRP'nin plazma konsantrasyonunda yaklaşık %50 azalma görülmüştür (123).

Yüksek hs-CRP'nin meme kanseri (163), çocuklarda obezite ve metabolik sendrom (164), ateroskleroz, kararsız angina, insülin direnci, tip 2 diyabet (165), alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (166), metastatik prostat kanseri (167), akciğer kanseri (168), erişkin depresyonu, çocuklukta depresyon ve genç erişkin yaşamında psikoz (169), koroner kalp hastalığı ve inme (170) ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

Osteoartritte Antienflamatuar Etkiler

Epidemiyolojik kanıtlar, vaka raporları, kontrollü hayvan ve insan çalışmaları osteoartrit için borun güvenli ve etkili bir tedavi olarak kullanılmasına kanıt sağlamıştır (171-173). Bor uygulaması ve dünya çapında osteoartrit prevalansı arasındaki ilişkiyi inceleyen araştırmacılar bor alımının günde 1 mg'a eşit veya daha fazla olduğu alanlarda artritis insidansının %20-70 arasında değiştiğini keşfetmiştir. Buna karşılık bor alımının genellikle günde 3-10 mg olduğu bölgelerde, artritis insidansı %0-10 arasında değiştiği rapor edilmiştir (174). Bor konsantrasyonunun osteoartritli hastaların femur başlarında, kemiklerinde ve sinovyal sıvılarında osteoartritsiz bireylere göre daha düşük seviyede olduğu bulunmuştur (175).

Borun osteoartrit hastalarının tedavisinde kullanımına ilişkin yürütülen çift-kör plasebo-kontrollü bir klinik çalışmada deneklere günde 6 mg bor (sodyum tetraborat dekahidrat) takviyesi verilmiş ve osteoartrit olan 20 kişide kayda değer sonuçlar görülmüştür; ilave bor alan deneklerin %50'si, plasebo alanların sadece %10'u iyileşme kaydetmiştir (176).

In vitro çalışmalar, kalsiyum fruktoboratın (doğal olarak oluşan, bitki bazlı, bor-karbonhidrat kompleksi) antienflamatuar etkilerini hücre kültürü üzerinde göstermiştir (177). Başka bir pilot çalışma kalsiyum fruktoboratın osteoartrit semptomları üzerine oldukça olumlu etkilere sahip olduğunu bulmuştur (124).

Hayvan çalışmalarının sonuçlarına dayanarak araştırmacılar borun antienflamatuar etkilerinin lökositlerin oksidatif patlamasının inhibisyonu, nötrofillerin aşırı aktivitesi ve dolaşım sistemi dışındaki istilacılardan kaynaklandığı hipotezine varmışlardır. Bor ayrıca kan ve hücrelerdeki süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin seviyelerini yükselterek serbest radikal temizliğini artırır (177).

2.2.17. Beyin Aktivasyonu ve Psikolojik Fonksiyonu

Hem hayvanlarda hem de insanlarda beyin elektriksel aktivitesinin değerlendirilmesi bor yoksunluğunun (diyetle borik asit olarak 0.12 µg/g) beyin elektriksel aktivitesinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Erişkin sıçanlarda bor yoksunluğu azalmış yüksek frekans ve artmış düşük frekanslı beyin elektriksel aktivitesi ile ilişkilidir, bu da borun hayvanlarda beyin aktivasyonunun korunmasında önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. İnsanlarda bor yoksunluğu (<0.3

mg/gün) motor hızı, el becerisi, dikkat ve kısa süreli hafızada yazıflama ile sonuçlanmıştır. Sağlıklı yaşlı erkeklerde ve kadınlarda yapılan bir dizi deney 42-73 gün arasında değişen süreyle sınırlı bor alımının beyin fonksiyonunu ve bilişsel performansı olumsuz etkilediğini bulmuştur. Düşük bor alımının bulguları yetersiz beslenme ve ağır metal toksisitesi sonucu gözlenen bulgular ile aynı etkidedir ve elektroensefalografi (EEG)'de düşük frekans aktivitesinin artması bulgusunu verir. Düşük frekans aktivitesinin artması zihinsel uyanıklığın azalması durumlarının karakteristiğidir, psikomotor görevleri yerine getirme yeteneğinin azalmasıyla ve hafıza performansının bozulması ile ilişkilendirilmiştir (178).

2.2.18. Antikanser Etkileri

Giderek artan çalışmalar borun antikarsinojenik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Bor bakımından zengin diyetler, toprak ve suyun bor açısından zengin olduğu bölgeler, prostat, meme, servikal ve akciğer kanserleri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin düşük riskleri ile ilişkilidir. Borla zenginleştirilmiş diyetlerin prostat ve serviks kanseri riskinde önemli derecede azalmalara sebep olduğu ve sigara içen kadınlarda akciğer kanseri riskini azalttığı bulunmuştur. Son yıllarda antikanser ajanlar olarak doğal ve sentetik bor içeren bileşiklerin kullanımı özellikle ameliyat edilemeyen ve yüksek malignitesi bulunan kanser olgularında artmıştır. Bor içeren bileşikler serin proteazların inhibisyonu, NAD-dehidrojenazlar, mRNA birleştirme ve hücre bölünmesi, reseptör bağlanma taklidi ve apoptozun indüksiyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla kanser hücrelerinin fizyolojisine ve çoğalmasına müdahale eder (179).

2.3. Kök Hücre Kavramı

Kök hücre terimi, bilimsel literatüre Ernst Haeckel tarafından 1868 yılında yapılmış bir yayın ile giriş yapmıştır. Bununla birlikte, hematopoetik sistemde kök hücrelerin varlığının kesin kanıtı 1961’de James Till ve Ernest McCulloch’un fare kemik iliğinden türetilen tek hücrelerin çoğalabileceğini ve çok sayıda farklı kan hücresi türüne dönüşebileceğini gösterdikleri deneyler sonrasında sağlanmıştır. Bu seçkin çalışmaya dayanarak kök hücrelerin iki altın standart özelliği ortaya atılmıştır; bir kök hücre uzun dönemde kendi kendini yenileme kapasitesine ve farklı soylara farklılaşma yeteneğine sahiptir. Vücudumuzda bulunan kök hücreler doku homeostazının korunmasından sorumludur (180).

Kök hücreler sınırsız çoğalabilme, kendilerini uzun süre yenileyebilme, farklı hücre soylarına farklılaşma, hasarlı dokuları onarabilme ve rejenere etme kapasitesine sahip özel hücrelerdir. Organizmanın yaşam süreci boyunca yenilenebilme ve farklı soylara ayrılabilme yeteneklerini kaybetmeyen bu hücreler farklılaşmaları için gereken biyolojik sinyallerle karşılaşmadıkları sürece işlev görmezler. Kök hücrelerin temel ve eşsiz özelliği bölündüklerinde biri kök hücre olarak kalan diğeri ise farklılaşan iki hücre üretmeleridir (181).

2.3.1. Kök Hücre Hiyerarşisi

Kök hücreler kendilerini çoğaltma (kopyalama) ve ebeveyn hücrenin karakterini korudukları halde farklı hücre tiplerine farklılaşma özellikleri gösteren hücrelerdir. Kök hücrelerin özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine potansi adı verilir. Hücre potensi spektrumunda herhangi bir embriyonik hücre tipine ve ayrıca ekstraembriyonik hücrelere bölünebilen ve farklılaşabilen hücreler totipotent olarak adlandırılır. İnsan gelişimi modelinde totipotent hücreler tek totipotent hücre olan zigot aracılığıyla ortaya çıkar. Zigot döllenmeyi takip eden günlerde bölündükçe aynı yavru hücreler blastosistin oluşumuna kadar totipotent kalır. Bu aşamada iç hücre kütleli farklılaşmaya başlar ve hücreler daha sonra pluripotent olarak kabul edilir (182).

Pluripotent hücreler üç germ katmanından (endoderm, mezoderm, ektoderm) herhangi birine ait hücrelere köken olabilir ancak ekstraembriyonik hücrelere farklılaşma yeteneğinden yoksundurlar. Daha fazla olgunlaşma ve farklılaşma üzerine kök hücreler pluripotentten multipotent'e farklılaşır. Multipotent hücreler hala az

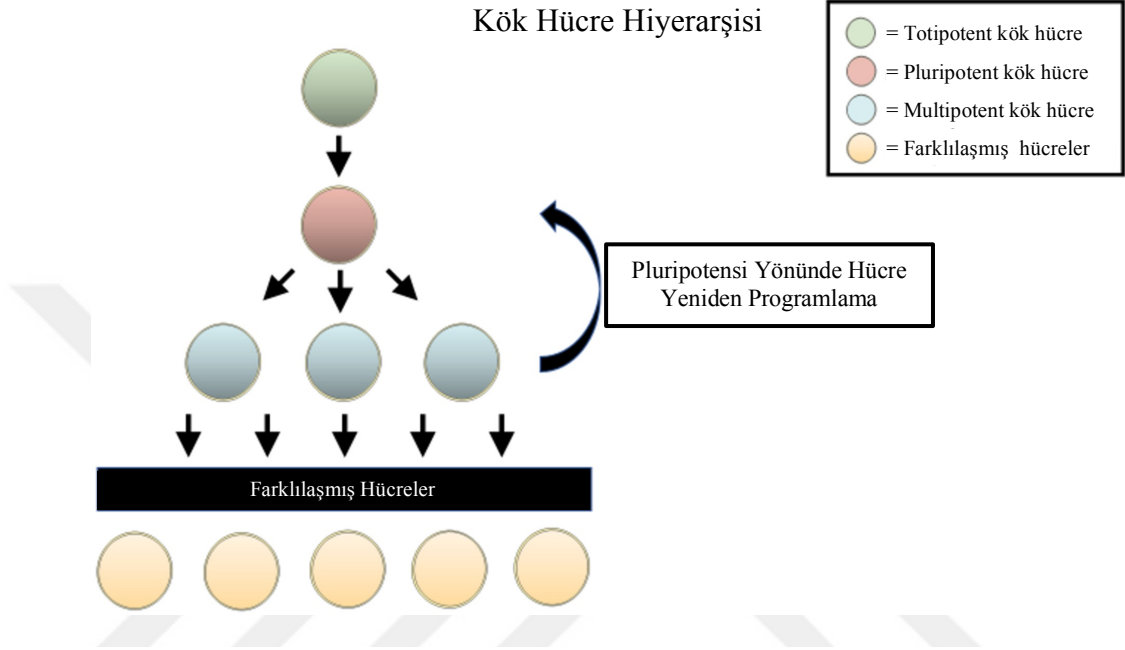
sayıda farklı hücre tipine farklılaşabilseler de bunlar birbiriyle ilişkili hücre tipleriyle (örn. nöral kök hücreler, mezenkimal kök hücreler) sınırlıdır (183).

İn vivo olarak kök hücreler kökenlerine göre embriyonik, fetal ve yetişkin kök hücreler (aralarında MKH'ler de bulunur) olmak üzere üç türe ayrılabilir. Embriyonik kök hücreler, döllenme sonrası blastosist olarak bilinen, implantasyon öncesi embriyodaki iç hücre kütesinden türetilir. Blastosistin iç hücre kütesinde bulunan bu pluripotent hücreler organizmayı oluşturan farklı hücre tiplerine farklılaşır ve çoğalır. Fetal kök hücreler, fetal dokularda yer alan multipotent hücrelerdir. Üretebildikleri dokulara bağlı olarak hematopoetik (kan, karaciğer ve kemik iliği ile ilişkili hücre tiplerine köken olur), mezenkimal (kan, karaciğer, kemik iliği, akciğer, böbrek, ve pankreatik hücreler), endotel (kemik iliği ve plasental hücrelere farklılaşabilen), epitel (karaciğer ve pankreas hücrelerine farklılaşan) ve nöral kök hücrelerine (beyin ve omurilik dokularına farklılaşan) farklılaşabilirler. Yetişkin kök hücreleri vücuttaki çeşitli dokularda bulunan multipotent hücrelerdir. Yetişkin kök hücreleri somatik kök hücreler olarak da adlandırılırlar. Embriyonik ve fetal kök hücrelerin aksine hem çocuklarda hem de yetişkin hayvanlarda ve insanlarda bulunurlar. Yetişkin kök hücreler vücuttaki çoğu dokuda bulunabilse de insanlarda en sık kullanılan otolog yetişkin kök hücre kaynakları kemik iliği ve yağ dokusudur. Yetişkin kök hücreleri farklılaşma potansiyeli bakımından soy sınırlamalı (multipotent) olma eğilimindedir ve fetal kök hücreler gibi tipik olarak köken dokuları (örn., Mezenkimal kök hücreler, hematopoetik kök hücreler, nöral kök hücreler) ile ifade edilir (183).

İnsanlardaki bir başka zengin kök hücre kaynağı göbek kordon kanıdır. Multipotent kök hücreler hem kordon kanında hem de kordon dokusunda (Wharton'un jölesi) bulunabilir ve fetal kök hücrelerle birlikte perinatal kök hücreler olarak adlandırılır. Kök hücre platformunun terapötik potansiyeli göz önüne alındığında kordon kanı bankacılığı bir kişinin hayatında daha sonra ortaya çıkabilecek bozuklukları tedavi etmek için giderek daha uygun bir seçenek olarak lanse edilmektedir. Ayrıca kordon kanı insan lökosit antijeninin uyumsuzluğunun üstesinden gelmek için transplantasyonda da kullanılmaktadır (184).

Multipotent erişkin kök hücrelerin farklılaşma kabiliyetleri sınırlı olsa da, bu engellerin üstesinden gelmek için yöntemler geliştirilmiştir. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH'ler) embriyonik kök hücreler gibi davranacak şekilde yapay olarak

yeniden programlanabilen yetişkin hücrelerdir. Belirli bir dizi transkripsiyon faktörü (Oct3/4, Sox2, Klf4 ve c-Myc) eklenerek somatik hücelere pluripotent özellikleri geri kazandırılabilir ve böylece muazzam terapötik potansiyel elde edilebilmektedir (184).



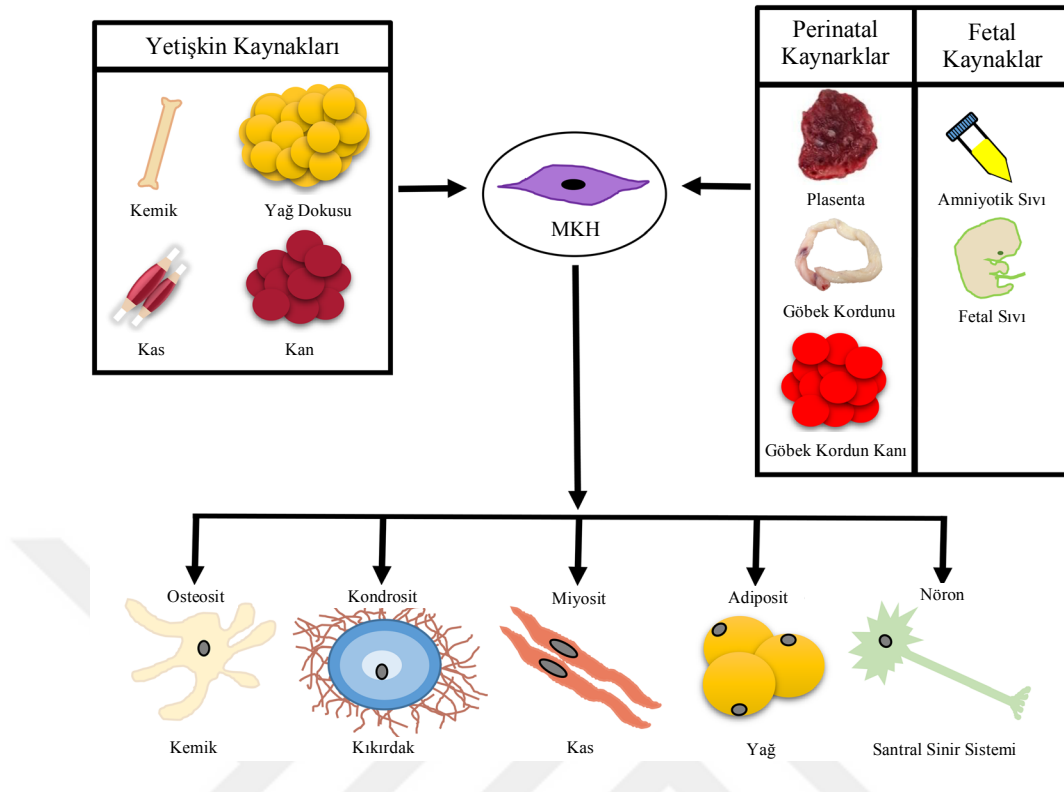
Şekil 4. Kök hücre farklılaşmasının aşamaları (184).

2.3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Rejenerasyon Potansiyeli

Sürekli kendini yenileyen ve ektoderm, mezoderm ve endoderm germ tabakalarına doğru farklılaşabilen pluripotent embriyonik kök hücrelerin keşfinden sonra etik ve teknik kaygıların yanı sıra teratom oluşumu potansiyeli olduğu bulunmuştur. Bu durum yetişkin kaynaklardan alternatif multipotent kök hücreleri araştırmaya olan ilginin artmasına neden olmuştur. Hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal/stromal kök hücreler gibi çok potansiyelli insan erişkin kök hücrelerinin embriyonik kök hücelere kıyasla ahlaki, etik veya güvenlik ikilemleri oluşturma olasılığı daha düşüktür. Hematopoetik kök hücreler, tüm kan ve bağışıklık soylarına farklılaşabilir, lösemi ve kan bozukluklarını tedavi etmek için kullanılmıştır. MKH'lerin çok çeşitli yetişkin kaynaklarından izolasyonuna ve bu hücrelerin adipojenik, kondrojenik, osteojenik ve nörojenik hücreler gibi çeşitli soylara ayrıldığına dair raporlara rağmen MKH'lerin terapötik kullanımı bir dizi engelle

karşılaşmıştır. Birincisi MKH'lerin yetişkin kaynaklarından izolasyonunun olası donör bölge morbiditesi ile invaziv ve sıklıkla ağırlı prosedürleri içermesidir. İkincisi in vitro geçişte daha da azaltılacak olan değişken çoğaltma ve farklılaşma yeteneklerine sahip olmalarıdır. Üçüncüsü ise MKH'lerin kendini yenileme ve farklılaşma potansiyellerinin donör yaşı, genetik ve çevresel strese maruziyetten ciddi şekilde etkilenmesidir (185).

Alternatif kaynaklar araştırmaya çalışmak MKH'lerin daha arzu edilen kaynaklar olarak kabul edilen göbek kordon kanı, göbek kordonu ve plasenta gibi perinatal kaynaklardan ve ayrıca fetal doku ve amniyotik sıvı gibi fetal kaynaklardan izole edilmesine yol açmıştır. Bu dokulardan türetilen hücrelerin adipojenik, kondrojenik, osteojenik ve nörojenik hücre soylarına doğru farklılaştığı bulunmuştur. Bununla birlikte erişkin kaynaklara benzer şekilde perinatal ve fetal kaynaklardan türetilen MKH'ler de kendini yenileme ve farklılaşma potansiyelinde farklılık gösterir. Son zamanlarda insan göbek kordonu ve plasantanın farklı nişlerinden izole hücreler elde edilmiştir. Nişden bağımsız olarak izole edilen hücrelerin tümü Uluslararası Hücresel Terapi Derneği'nin Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi tarafından belirlenen kriterlere göre MKH olarak tanımlanmıştır. MKH'ler, yapışkan özellik gösterir ve fibroblastoid morfolojisi sergilerler, MKH'ye özgü farklılaşma (CD) belirteçleri kümesi (CD73, CD90 ve CD105) sergilerle ve CD14, CD19, CD34 ve CD45 belirteçlerini bulundurmazlar. Ayrıca in vitro ortamda adipojenik, kondrojenik ve osteojenik soylara doğru farklılaşabilirler. Ek olarak MKH'ler immünomodülasyonun yanı sıra anti-apoptotik ve anti-oksidatif etkileri destekleyen, nöromüsküler ağrıların ve diğer birçok hastalığın tedavisinde yardımcı olabilecek bir parakrin etkisine sahiptir. MKH'ler ayrıca Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, Amyotrofik Lateral Skleroz, Multipl Skleroz, Dejeneratif Disk Hastalığı, Retinal Dejeneratif Hastalık, Miyokardiyal Enfarktüs ve Tip 1 Diyabet gibi dejeneratif hastalıkları ve bozuklukları tedavi etmek için terapötik potansiyelleri açısından araştırılmaktadır. MKH'lerden türetilen kemokinlerin ve sitokinlerin kullanımının otoimmün hastalık için tedavi etkinliğini arttırdığı da gösterilmiştir (185).



Şekil 5. Mezenkimal kök hücre kaynakları ve çeşitli soylara farklılaşma potansiyelleri (185).

Ortak morfolojik özelliklerin varlığı ve hücre yüzeyi belirteçlerinin ekspresyonu ile bile izole edilmiş hücrelerin çoğalması ve farklılaşma kapasitesindeki farklılıklar MKH olarak adlandırılma gerekçelerinin sorgulanmasına yol açmıştır. MKH'ler osteojenik kök hücreler, iskelet kök/progenitör hücreleri, mezodermal kök hücreler, mezenkimal progenitör hücreler, mezenkimal stromal hücreler, tıbbi sinyal hücreleri, multipotent stromal hücreler ve perisit MHK'ler gibi çeşitli adlarla anılmışlardır. Bu adlar genellikle kolaylık sağlamak veya araştırılan faaliyetlerin türünü belirtmek için kullanılmıştır. Çeşitli kaynaklardan izole edilen hücreler in vitro ve in vivo çoğalma ve farklılaşma potansiyellerinde bir farklılık gösterir. Bu nedenle MKH'ler 800'den fazla klinik çalışmada kullanılmış olmalarına rağmen sonuçları karşılaştırmak çoğu zaman mümkün değildir (185).

2.3.3. Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (YKH) ve Alt Popülasyonları

MKH'ler arasında YKH'ler doku mühendisliği uygulamaları için bazı avantajlar sunar. YKH'ler az donör alan morbiditesi ile daha büyük miktarlarda kolayca toplanabildikleri için tanımlanan en umut verici kök hücre popülasyonlarından biri haline gelmiştir. Subkütan yağ dokusu çeşitli yağ doku tipleri arasında klinik olarak en önemli YKH kaynağıdır. YKH'ler karın, uyluk ve kolun subkütanöz yağ dokusundan izole edilebilir. Yağ dokusu insan vücudunda nispeten bol olduğu için YKH'ler daha fazla sayıda elde edilebilir. YKH'lerin çoklu soy kapasitesi hücre terapisi ve doku mühendisliği potansiyeli sunmaktadır (186,187).

Yağ dokusunun toplanması kolaydır ve kemik dokusundan 2.500 kat daha fazla sayıda staminal öncü içerir (188). Bununla birlikte YKH'ler diğer MKH'lerle Uluslararası Hücresel Terapi Derneği'nin bir pozisyon ifadesi ile tanımlanan çeşitli özellikleri paylaşır. Üç minimal kriter kültürlenmiş MKH'leri tanımlar: (I) standart kültür koşullarında plastik yapışma; (II) CD105, CD73 ve CD90 ekspresyonu için pozitiflik ve CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 ve HLA-DR yüzey molekülleri için negatiflik; ve (III) üç soya farklılaşma (adipojenik, kondrojenik ve osteojenik) potansiyeli (4). Bununla birlikte YKH'ler arasında farklı alt popülasyonların tanımlanabileceği zamanla ortaya çıkmıştır. YKH'ler perivasküler nişin bir parçasıdır ancak CD31'in ekspresyonunun eksikliği onları endotelial hücrelerden ayırır (189).

Perivasküler YKH'ler arasında CD146, CD34 ve CD31 gibi farklı yüzey işaretleyicilerinin birleşik analizi kullanılarak iki farklı alt popülasyon tanımlanabilir: (I) CD146+, CD34-, CD31- olan (aynı zamanda perisitler olarak tanımlanan) hücreler ve (II) CD146-, CD34+, CD31- olan (aynı zamanda adventisyal hücreler olarak da tanımlanan) hücreler. Adventisyal hücreler supra-adventuar yağın bir dış tabakasında bulunurken perisitler mikrovaskülatür ile yakından ilişkilidir (190). Endotel hücreleri ile sıkı ilişkileri vardır ve etkileşimlerinin anjiyogenezin düzenlenmesinde önemli bir rolü vardır (191). Bazı hipotezler perisitleri içeriden dışarıya doğru bir farklılaşma sürecinden geçen daha staminal bir form olarak kabul etmektedir (192). Her iki hücre tipi de büyüme, morfoloji, yüzey belirteçleri ve klonal çok hatlı farklılaşma potansiyeli gibi MKH özellikleri barındırmaktadır (193). Rad ve ark. (194) göre bukkal yağ pedi,

abdominal ve kalça yağıyla karşılaştırıldığında, en yüksek miktarda CD146-pozitif hücre, daha yüksek proliferasyon oranı ve osteojenik ve anjiyojenik belirteçlerin ekspresyonunu göstermiştir.

Birçok yazar yağ dokusundan sıralanmış CD146+, CD34-, CD31- perisitlerin osteojenik kapasitesini araştırmış ve kemik dokusu mühendisliği için olası kullanımlarını değerlendirmiştir. James ve ark. ilk kez hem in vitro hem de in vivo eşleşen ayrıştırılmamış YKH'lere kıyasla insan lipoaspiratından sıralanmış perisitlerin daha yüksek osteojenik kapasitesini göstermiştir (195). Perisitler in vitro osteojenik koşullar altında işlenmemiş hücrelere kıyasla daha iyi bir osseöz farklılaşma göstermiştir. CD146+ hücreler, önceden farklılaşma yapılmasa bile in vivo ayrıştırılmamış hücrelerden daha fazla kemik oluşumu sağlamıştır. Perisitler süngerimsi kemik iskelesi üzerine ekildikleri kritik boyuttaki bir kalvaryal defekt modelinde test edildiğinde yüksek bir osteojenik kapasite göstermişlerdir (196). Sıçan omurga füzyon modelinde, insan perisitleri hem intramembranöz hem de endokondral kemik oluşumunu indükleyebildiler. Perisitler ile tedavi edilen tüm sıçanlarda tam bir lumber segment füzyonu elde edilmiş ve doza bağımlı bir şekilde kemikleşme, kemik birikimi ve kemik kuvveti artmıştır (197).

2.3.4. Yağ Kaynaklı Kök Hücrelerin Tanımlanması

YKH'ler homojen bir popülasyon değildir. Birçok yazar, akım sitometri analizi ile YKH'leri karakterize etmek için benzersiz tek bir yüzey markeri kullanma girişiminde bulunmuş fakat başarısız olmuşlardır (198). 2006 yılında Uluslararası Hücresel Terapi Derneği hücreleri YKH olarak tanımlamak için minimum bir dizi kriter önermiştir: plastiğe tutunabilme; CD73, CD90 ve CD105'in ekspresyonu ancak CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 ve HLA-DR yüzey moleküllerinin ekspresyonunun eksikliği; ve pre-adipositlere, kondrositlere ve osteoblastlara farklılaşma potansiyeli (4). 2013'te Uluslararası Hücresel Terapi Derneği YKH'lerin yüzeyinde CD13, CD29 ve CD44 yüzey belirteçlerinin %80'den fazla ifade edilmesi gerektiğini ve birincil negatif belirteçler olan CD31, CD45 ve CD235a'nın %2'den az olarak ifade edilmesi gerektiğini belirtmiştir (199). Li ve ark. (200) YKH'lerin alt popülasyonlarını kategorize etmişlerdir; en çok bulunan alt popülasyon pre-adipositlerdir (CD31-/CD34+; %67.6), ikinci sırada erken endotelial hücre popülasyonu yer almaktadır (CD31+CD34+; %5.2) ve geri kalan iki alt

popülasyon ise perisitler (CD146+/CD31-/CD34-) ve olgun endotelial hücrelerdir (CD31+/CD34-; her biri %1'den az). Tüm hücre tipleri arasında pre-adipositler en büyük proliferasyonu ve en yüksek adipojenik farklılaşmayı göstermiştir. Yağ dokusu içinde YKH'lerin lokalizasyonunu belirlemek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır, ancak kesin lokalizasyonları belirsizliğini korumaktadır (201).

2.3.5. Yağ Kaynaklı Kök Hücrelerin İzolasyonu

Farklı anatomik bölgelerden toplanan YKH'ler farklı özellikler gösterir. Örneğin, yüzeysel karın bölgelerinden toplanan YKH'ler üst kol, medial uyluk, trokanterik veya yüzeysel derin karın depolarından hasat edilen YKH'lere göre önemli ölçüde daha az apoptoz geçirir. Farklı yerlerden, hücre tiplerinden ve türlerden izole edilen YKH'ler farklı yoğunluklara sahiptir (202) ve farklı prosedürler YKH kalitesini, işlevselliğini ve plastisiteyi etkileyebilir (203). Beyaz adipoz doku ve kahverengi adipoz doku iki ana yağ dokusu tipidir. Beyaz adipoz doku fonksiyonu esas olarak fazla enerjiyi trigliserit şeklinde depolamak olan subkutan ve viseral yağ dokularında bulunur. Viseral yağ ile karşılaştırıldığında subkutan depolarda YKH verimleri daha fazladır. En yüksek YKH konsantrasyonları kol adipoz dokusu depolarında ve en büyük plastisite ise beyaz adipoz doku formundaki inguinal adipoz doku depolarında bulunur (204). Kahverengi adipoz doku beyaz adipoz dokudan çok daha azdır ve yenidoğanlarda mediasten, boyun ve interskapular alanlarda bulunabilir; ana işlevi termogenezdır. Ayrıca kahverengi yağ dokusu depolarında YKH'ler de vardır ancak bu YKH'lerin beyaz yağ dokusundan izole edilenlerden farklı özellikleri vardır ve daha kolay iskeletsel miyogenik farklılaşma geçirirler (205).

Zuk ve ark. tarafından bildirilen protokol hala YKH izolasyonu için en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde göre YKH'ler beyaz yağ dokusundan izole edilir. Yağ dokusu eşit hacimde fosfat tamponlu salin (PBS) ile birkaç kez yıkanır ve %0.075 kolajenaz tip II ile 30 dakika boyunca 37° C' de enzimatik sindirimden önce küçük parçalara kıyılır. Sindirimden sonra, elde edilen pelet birçok hücre tipinde heterojen bir popülasyon verir ve stromal vasküler fraksiyon (SVF) olarak adlandırılır. SVF YKH'ler, pre-adipositler, endotel hücreleri, fibroblastlar, endotel progenitör hücreleri, yerleşik monositler/makrofajlar, perisitler, vasküler düz kas hücreleri, lökositler, lenfositler ve eritrositler içerir. SVF'de yaklaşık 2 ila 6 milyon hücre, 1 ml lipoaspirattan elde edilebilir. %10 fetal sıgır serumu (FBS) içeren Dulbecco'nun

modifiye edilmiş Eagle'ı (DMEM) enzim aktivitesini nötralize etmek için eklenir. Hücre süspansiyonu, yüksek yoğunluklu bir SVF elde etmek üzere 10 dakika boyunca 1200xG'de santrifüjlenir. Süpernatant atılır ve SVF peleti NH_4Cl içinde yeniden süspansiyon haline getirilir ve eritrositleri uzaklaştırmak için oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir. SVF santrifüj yoluyla toplanır ve daha sonra sindirilmemiş doku fragmanlarını çıkarmak için 100 μm 'lik bir ağdan süzülür ve gece boyunca %5 CO_2 içeren ortamda 37° C' de kontrol medyumunu (DMEM, %10 FBS, 500 IU penisilin ve 500 μg streptomisin) ile inkübe edilir. YKH'ler gece boyunca kültürlendikten sonra plastik-yapışkan bir popülasyon olarak elde edilir (206).

2017 yılında Li ve ark. (207) NH_4Cl veya NaCl hipotonik çözeltileri ile eritrosit giderimi için iki yöntemi karşılaştırmış ve lipoaspirat türevi YKH'lerin fonksiyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Sonuçları hipotonik NaCl çözeltisinin YKH saflaştırma açısından NH_4Cl çözeltisinden daha etkili olduğunu ve iyi üretim uygulamaları/iyi klinik uygulama kılavuzlarının standartlarını karşıladığını göstermiştir.

Palumbo ve ark. SVF'nin verimini ve YKH sayısını, plastik yapışma kabiliyetini ve YKH'lerin farklılaşma potansiyelini analiz etmişlerdir. Sonuçları şunları göstermiştir: birincisi 20 veya 30 dakikada kendiliğinden tabakalanan YKH'ler, 90 veya 400 xg' de 3 dakika boyunca santrifüjlemeden sonra elde edilenlerle karşılaştırılabilir çünkü YKH'ler adipojenik, osteojenik ve kondrojenik soylara başarılı bir şekilde ayrılır ve bu YKH'lerin farklılaşma kabiliyetinin hiçbir işleme yönteminden etkilenmediğini düşündürür; ve ikincisi 20 dakikada spontan tabakalaşmadan ya da 400 xg'de santrifüjlemeden sonra, lipoaspirat numunelerinden elde edilen orta tabaka yeterli YKH sağlayabilir ve adiposit bütünlüğünü koruyarak iki yaklaşımın da etkili olduğunu gösterir (208).

2.3.6. Yağ Kaynaklı Kök Hücrelerin Farklılaşma Yeteneği

YKH'lerin hem in vitro hem de in vivo çoklu soylara farklılaşabileceğine dair çok sayıda kaynak vardır. YKH'lerin mezodermal orijinli olmalarına rağmen, ektodermal, endodermal ve mezodermal kaynaklı hücrelere farklılaşabildikleri gösterilmiştir (209). YKH'ler mezodermal orijinleri nedeniyle adipojenik, osteojenik, kondrojenik, miyojenik, anjiyojenik, kardiyomiyojenik, tendonojenik ve periodontojenik soylara farklılaşabileceği yaygın olarak kabul edilmektedir. İn vitro

YKH farklılaşması köken spesifik indüksiyon faktörleri içeren seçici ortam tarafından indüklenir (210).

2.3.7. Yağ Kaynaklı Kök Hücrelerin İn Vitro Osteojenik Farklılaşması

YKH'lerin osteoblastlara ayrılması için, kültür ortamı DMEM (%10 FBS ile), 10 mM β -gliserol fosfat, 40 μ g/ml gentamisin, 8 M deksametazon, 2 mM L-glutamin, 8 M dihidroksivitamin D3 ve askorbik asit içermelidir (211). Osteojenik ortam her 3 günde bir değiştirilir. Yaklaşık 14 gün boyunca hücreler osteoblast benzeri hücrelere indüklenir. %10 formalin içinde fiksasyondan sonra, osteoblast benzeri hücreler tarafından üretilen hücre dışı maktriği içindeki kalsiyum fosfat 40 mM Alizarin Kırmızısı veya von Kossa (pH 4.1) kullanılarak değerlendirilebilir. Bu süre zarfında Runx-1, BMP-2, BMP-4, tip I kolajen, osteoponin, alkalen fosfataz, osteokalsin, kemik sialoprotein ve PTH reseptörü içeren genlerin ekspresyonu artar (212).

2.3.8. Yağ Kaynaklı Kök Hücrelerin Klinik Uygulamaları

YKH'lerin klinik tıpta pratik avantajları vardır ve araştırmalar uygulamalarını daha pratik hale getirmiştir (213). YKH'ler yara iyileşmesi için kritik olan çok sayıda büyüme faktörü ve sitokin salgılayabilir. Ayrıca gelişmiş doku granülasyonu, artmış makrofaj göçü ve YKH'ler tarafından sağlanan artmış vaskülarizasyon, YKH uygulamalarını etkili yara tedavileri haline getirmektedir (214,215). Rigotti ve ark. (215) 31 ay boyunca 20 hastaya YKH içeren lipoaspirat örnekleri vermişlerdir. Hastalarda yeni damar oluşumu ile ultrastrüktüel doku özelliklerinde düzelmeler olduğu görülmüş ve bu da önemli klinik iyileşmeler olduğunu göstermiştir. YKH'lerin diyabet veya Tromboanjitis Obliterans hastalarında iskemi ile komplike olan yaraların tedavisinde de faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Bu bulgular YKH'lerin atrofi, fibroz, retraksiyon ve radyasyon tedavisi ile ortaya çıkan ülser gibi şiddetli semptomların da tedavisinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca YKH'lerin anormal skar oluşumu gibi patolojik yara iyileşmesinin tedavisinde yararlı olduğu gösterilmiştir. Hayvan modellerinde YKH enjekte edilen yara izleri kontrol grubundakilere kıyasla yüzey alanında bir azalma, renk ve esneklikte ise iyileşmeler göstermiştir (214,216,217). Bazı yazarlar YKH'lerle tedavinin skar oluşumu ile ilişkili inflamatuvar süreçleri hedefleyebileceği sonucuna varmışlardır. Çünkü YKH'lerin immünsüpresif ve antienflamatuvar etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır. İki çalışmada allojenik YKH'lerin intravenöz infüzyonunun, kronik *graft versus host* hastalığı, idiyopatik

trombositopenik purpura ve refrakter eritrositer aplazi gibi hematolojik ve immünolojik bozuklukların tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu da YKH'lerin immünomodülatör olabileceğini işaret etmektedir (218-220). YKH'lerin hasarlı dokulara ve tümör bölgelerine yönelimi onları tümörlere ve metastatik nişlere terapötik uygulama için umut verici bir vektör yapar (221).

Plastik cerrahi YKH'lerin uygulanması için benzersiz bir şekilde konumlandırılmış büyüyen bir alandır. Yağ grefti uygulamaları YKH'lerin klinik rejeneratif potansiyelini göstermektedir (222). Yağ grefti uygulamaları için lipoaspiratı yerçekimi yoluyla ayırma ve filtrasyon veya santrifüjleme (safsızlıkları gidermek ve YKH kaynağı olarak yüksek kaliteli SVF içeren nispeten saf numuneler elde etmek) gibi basit prosedürlere dayanan çeşitli standart protokoller mevcuttur. Hücre destekli lipotransfer (CAL) 2006 yılında Matsumoto ve ark. tarafından ortaya atılmıştır. Aspire edilen yağın enzimatik izolasyondan sonra elde edilen SVF ile zenginleştirilmesi uzun dönemde hacim stabilitesini arttırmış buda daha az yağ rezorpsiyonuyla nakledilen yağın sağ kalım oranını anlamlı derecede arttırmış ve yağ enjeksiyonunun yan etkileri olan kist oluşumu ve fibroziste belirgin azalmaya sebep olmuştur (223,224). Yağ greftinin meme dokusunda yağ nekrozu ve kalsifikasyon nedeniyle meme görüntülemeyi ve meme kanseri değerlendirmelerini zorlaştırabileceği bildirilmiştir. 2008 yılında Yoshimura ve ark. 40 hastada kozmetik göğüs büyütme için CAL uygulamıştır. Hiçbir majör komplikasyon gözlenmemiş ve estetik sonuçlar elde edilmiştir (225). Daha sonra CAL göğüs büyütme, yüz germe ve yüz şekillendirme ameliyatlarında yüz lipoatrofisi ve yüz büyütme için diğer uygulamaların yanında yaygın olarak kullanılmıştır (226,227). YKH'lerin meme büyütme için CAL formunda kullanılmasının meme kanseri tedavisinden sonra kullanılıp kullanılamayacağı belirsizliğini korumaktadır. Birkaç çalışma YKH'lerin meme kanseri hücrelerinin kendileriyle karıştırılıp yeniden implante edildiğinde metastatik potansiyeli artırabildiğini göstermiştir. Ancak YKH'ler ile kanser hücreleri arasındaki etkileşim tam olarak anlaşılamamıştır (228,229).

YKH'lerin osteoblastlara ve kondroblastlara farklılaşabildikleri iyi bilinmektedir ve kemik rejenerasyonu için mevcut klinik kök hücre tedavileri heyecan verici ve umut verici sonuçlar göstermektedir (230). 2004 yılında Lendeckel ve ark. bir olgu sunumunda YKH'lerin ilk klinik kullanımını tarif etmişlerdir. Şiddetli kafa

travması sonrası çok parçalı kalvaryal kırıklarla yaygın kalvaryal defekti olan 7 yaşındaki bir kız çocuğunda SVF uygun yerlere yerleştirilmiş ve rekonstrüksiyondan 3 ay sonra bilgisayarlı tomografi taramalarında yeni kemik oluşumu gözlenmiştir. Kemik iliği kaynaklı MKH'lere kıyasla YKH'lerin özellikle pediatrik hastalar için hücre verimi açısından daha avantajlı olduğu kaydedilmiştir (231). Çalışmalar YKH'lerin yeni kemik oluşturabildiğini ve büyük kalvaryal defektlerin yanı sıra maksilla ve mandibulayı içeren defektleri onarabildiğini göstermiştir (232). Kıkırdak defektlerinin klinik rekonstrüksiyonu zorlu olmaya devam etmektedir çünkü kendi kendine onarım için dokunun iç kapasitesi sınırlıdır (233). Hayvan çalışmaları umut verici sonuçlar vermesine rağmen kıkırdak kusurlarını tedavi etmek için YKH'lerin kullanımı ile ilgili klinik çalışma yapılmamıştır. Hayvan çalışmalarında YKH'ler patellofemoral eklemlerdeki ve kulak kepçesi defektlerindeki hiyalin kıkırdak hasarını tamamen onarmıştır. Bu bulgular gelecekteki klinik uygulamalar için umut vericidir (234,235). Periferik sinir yaralanmaları üzerine yapılan çalışmaların çoğu Schwann hücresi gibi konakçı destek hücrelerinin değiştirilmesine odaklanmıştır. Çünkü bunlar yenilenen aksonlar için besleyici, yapısal ve yönlü destek sağlamak için çok önemlidir (236,237). YKH'lerin nöron benzeri soylara farklılaşarak nörojenez destekleyebildiği bildirilmiştir (238). Choi ve ark. (239) terapötik genleri eksprese eden klinik olarak uygulanabilir YKH'ler geliştirmiş ve farelerde beyin sapı glioması için terapötik etkinliklerini araştırmışlardır. Beyin sapı gliomaları için klinik olarak uygulanabilir güvenli ve etkili bir kök hücre bazlı gen terapisi oluşturmuşlardır. YKH'ler ve SFRP4 proteininin şartlanmış medyumundan türetilmiş faktörler, kanonik Wnt sinyalinin inhibisyonu yoluyla gelişmiş apoptotik aktivite ile birlikte MCF-7 hücrelerinde tümör hücresi canlılığını ve migrasyon oranlarını önemli ölçüde azaltmıştır (240).

YKH'lerin bolluğu, elde edilme kolaylığı, çoklu soylara farklılaşma ve çeşitli sitokinleri salgılama yetenekleri ve bunların immünomodülatör etkileri, YKH'lerin doku rejenerasyonunda belirgin bir rol oynayabileceği anlamına gelir. Yukarıda da bahsedildiği gibi YKH'lerin biyolojisini belirlemek için çok sayıda çalışma yapılmış ve YKH'lerin rejeneratif tıp açısından uygulanabilirliğini daha iyi anlamak amacıyla klinik öncesi çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca YKH'lerin etkinliğini belirlemek için birçok klinik çalışma da yapılmıştır ancak çok az faz III klinik çalışma bildirilmiştir.

YKH'lerin uzun vadeli güvenliğini, kesin etki mekanizmalarını ve deneysel bulguları kliniğe dönüştürme yeteneğini araştırmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın deney aşaması Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DEHAM) yapıldı. Çalışmada kontrolleri veteriner hekimler tarafından yapılan ve sağlıklı oldukları belirlenen, 30 adet 12 haftalık erişkin erkek *Wistar* albino sıçan kullanıldı.

Çalışmada sıçanların kafataslarından, dış çapı 9 mm iç çapı 5 mm olan, 4 mm kalınlığında kemik halkaları çıkartıldı ve bu şekilde sıçan kafatası için kritik boyutta kemik defekti modeli oluşturulması hedeflendi. Sıçanların kafataslarından 2 adet kemik halkası çıkartıldı ve toplam 60 adet kemik halkası elde edildi. Kemik halkaları her grupta 15 adet olmak üzere 4 gruba ayrıldı ve kültür kuyucuklarına yerleştirildi. Birinci grup, kemik halkası ile osteojenik besi yeri içeren kontrol grubudur. İkinci grup kemik halkası, osteojenik besi yeri ve borik asit solüsyonu içeren gruptur. Üçüncü grup kemik halkası, osteojenik besi yeri ve sıçan karın yağı kaynaklı MKH içermektedir. Dördüncü grup kemik halkası, osteojenik besi yeri, sıçan karın yağı kaynaklı MKH ve borik asit solüsyonu içermektedir.

Örnekler 28 gün süreyle kültür ortamında incelendi, borik asitin MKH üzerine etkileri ve kemik dokusunun bu duruma katkısı değerlendirildi. 28. günde histolojik inceleme amacıyla örneklerin bir bölümü için deney sonlandırıldı. Kalan örneklerde yara modeli oluşturularak iki hafta daha iyileşme süreci gözlemlendi. 6. hafta sonunda deney sonlandırıldı.

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmada kullanılan 150–200 gr ağırlığındaki erkek *Wistar* sıçanlar Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DEHAM) temin edildi. Kemik halkalarının çıkartılması sırasında deney hayvanlarına etik kurallara uygun olarak işlem yapıldı. Deney işlemleri öncesinde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulundan (77.637.435) onay alınmıştır (Ek-1).

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

Osteojenik Besi Ortamı:

Osteojenik Besi Ortamı: Sıçanlardan elde edilen kemik halkaları için α -MEM (M4526, Sigma, A.B.D) + %15 FCS (S0113, Biochrom, Almanya) + %0,4 penisilin (A2213, Biochrom, Almanya) + %0,4 streptomisin (A2213, Biochrom, Almanya) + %0,1 amfoterisin B (A2612, Biochrom, Almanya) ve %1 gentamisin (A2612, Biochrom, Almanya) + 50 μ g/ml askorbik asit (A8960, Sigma, A.B.D), 10 mM β -gliserofosfat (G9891, Sigma, A.B.D) + 10-8M deksametazon (D2915, Sigma, A.B.D) içeren osteojenik besi ortamı hazırlandı.

MTT Solüsyonunun Hazırlanması:

MTT solüsyonu: 0,5 mg/ml olacak şekilde MTT (M5655, Sigma, A.B.D) stok solüsyonu hazırlandı. Bu stok solüsyon, hücre kültür besiyeri ile 1/9 oranında seyreltilerek kullanma solüsyonu oluşturuldu.

Von Kossa Boyaması Solüsyonları:

%10'luk nötral formalin tampon solüsyonu:

- | | | |
|---|-------|--------------------------------|
| 1. Formalin/formaldehid | 100mL | (1.04002.2500, Merck, Almanya) |
| 2. Na ₂ HPO ₄ | 16g | (0306, J. T. Baker, Hollanda) |
| 3. NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O | 4g | (5266437, Merck, Almanya) |
| 4. Distile su | 1L | |

Taze Substrat Solüsyonu:

- | | |
|-----------------------------------|------------------------------|
| 1. Naphthol AS MX-PO ₄ | (N5000, Sigma, A.B.D) |
| 2. N,N-Dimethylformamide (DMF) | (D4551, Sigma, A.B.D) |
| 3. Tris-HCl MW=157.6 pH 8.3 0.2M | (A2264.010, Applichem, Alm.) |
| 4. Red Violet LB salt | (F1625, Sigma A.B.D) |
| 5. Distile su | |

%2,5'luk Gümüş Nitrat Solüsyonu:

- | | | |
|----------------------|-------|---------------------------------|
| 1. AgNO ₃ | 2.5g | (31630, Riedel-deHaen, Almanya) |
| 2. Distile su | 100mL | |

Sodyum Karbonatlı Formaldehit Solüsyonu:

- | | | |
|------------------------------------|------|------------------|
| 1. Formalin/formaldehid | 25mL | (Merck, Almanya) |
| 2. Na ₂ CO ₃ | 5g | (Merck, Almanya) |

3. Distile su 100mL

P-Nitrofenil Fosfat (Pnpp, N 4645, Sigma, A.B.D) Solüsyonu:

Bu solüsyon ALP ELİSA ölçümü için 150 mM 2-amino-2-metil-1-propanol buffer (A9199, Sigma, A.B.D) içinde hazırlandı.

Alizarin Kırmızısı Boyaması Solüsyonu:

%1'lik stok AK'sı (05600, Fluka Sigma, Steinheim) solüsyonu distile su ile hazırlandı. Stok solüsyon 1/10 distile su ile dilüe edilerek kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. MKH'lerin Çoğaltılması

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalında bulunan, daha önceden elde edilmiş ve -80° C'de dondurulmuş durumda saklanan sıçan karın yağ dokusu kökenli MKH'ler çözündürülerek kültür kaplarında kültüre edildi ve bu hücrelerin seçici olarak plastik yüzeylere yapışma özelliğinden yararlanıldı.

MKH'ler 2,5cm²'lik hücre kültür kabında %15 FBS (S0113, Biochrom, Berlin, Almanya), 50 µgr/ml Gentamisin (A2712, Biochrom, Berlin, Almanya), 100 UI/ml Penisilin ve 100 UI/ml Streptomisin (A2213, Biochrom, Berlin, Almanya), 100 UI/ml Amfoterisin (A2612, Biochrom, Berlin, Almanya) ve 200 mM L-glutamin (K0282, Biochrom, Berlin, Almanya) içeren α-MEM (F0915, Biochrom, Berlin, Almanya) kültür kabında 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamdaki inkübatörde çoğalmaya bırakıldı. Böylece, MKH'lerin yüzeye tutunma özellikleri ile süspanse olarak üreyen hematopoetik kök hücrelerin ayrılmaları sağlandı. Hematopoetik hücreler ise PBS (fosfat tamponlu salin) ile yıkamalar sonrası ortamdan uzaklaştırıldı. MKH'lerin 1/3 pasaj oranında yaklaşık olarak 3 gün içerisinde yüzeyi kapladıkları gözlemlendi (Şekil x).

Kültür ortamında üç gün sonra yüzeye tutunmayan hücreler besi ortamının değiştirilmesi sonucu ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra hücre kültür kabına yapışan hücreler kültür kabını %70-80 oranında kaplayıncaya kadar besiyeri iki günde bir değiştirildi. Faz kontrast ataçmanlı inverted mikroskop (IX71, Olympus, Japonya) altında hücrelerin üremeleri kontrol edildi ve kültür kabının tabanı %70-80 oranında hücre ile kaplandığında (%70-80 konfluente ulaşıldığında) alt-kültür (pasaj) işlemine geçildi. Birincil kültür sıfıncı pasaj (P0) kabul edilerek, P2 kullanıldı (241).

3.2.2. Hücre Üremesinin değerlendirilmesi

Hücre Üremesinin MTT ile Değerlendirilmesi:

Osteoblastların mitokondrial fonksiyonları dolayısıyla canlı hücre yoğunluğu kolorimetrik bir test yöntemi olan MTT testi ile belirlendi. Bu test sarı, suda çözünebilen MTT boyasının aktif mitokondrilerdeki elektron akımı yoluyla mor formazan ürünlerine dönüşmesini ölçmektedir. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) deneylerinde mor renkli formazan ürünlerinin azalması hücre canlılığı ve çoğalmasında fikir verir. Hücreler MTT kullanma solüsyonu ile 4 saat inkübe edildi. Daha sonra solüsyon uzaklaştırıldı. Kültür kabının her gözüne dimetilsülfoksit (DMSO, D2650, Sigma, A.B.D) eklendi. Formazan tuzları DMSO ile çözüldü ve absorbans 570 nm’de spektrofotometre (UNICAM, Uv visible Spektrofotometre, İngiltere) de ölçüldü (241).

Von Kossa (VK) ve Alizarin Kırmızısı (AK) Boyaması ile Kalsiyum İçeriğinin Belirlenmesi:

Hücreler 48 gözlü kültür kaplarında inkübe edildi. 28. günde VK boyamaları yapılarak ALP aktivitesi ve nodüllü alanlar gözlemlendi. Kültür kaplarındaki besi ortamı uzaklaştırıldı ve soğuk PBS (fosfat tamponlu salin) ile yıkandı. Daha sonra %10’luk soğuk nötral formalin tamponda 15 dk fikse edildi. Süre sonunda tüm tampon uzaklaştırıldı ve bir kere distile su ile yıkanarak, 15 dk distile suda bırakıldı. Daha sonra taze substrat ile kültür kapları 45 dk inkübe edildi ve 4 kez distile su ile yıkandı. Son olarak %2,5’luk gümüş nitrat ile 30 dk boyandı ve bütün gümüş nitrat uzaklaştırılarak 3 kez distile su ile yıkandı. Gümüş nitrat tamamen uzaklaştırıldıktan sonra mikroskop altında incelenerek kurumaya bırakıldı. Tutunan hücrelerde ALP (alkalen fosfataz) enzim aktivitesinin olduğu alanların kırmızı, mineralize nodüllü alanların kahverengi veya siyah boyandığı görüldü.

Kalsiyum içeriğinin belirlenmesi için 28. günde AK boyaması yapıldı. AK’nın %1’lik stok solüsyonu distile su ile hazırlandı ve bu solüsyon 1/10 distile su ile dilüe edilerek kullanıldı. Kültür kabındaki besi ortamı dikkatli bir şekilde uzaklaştırılarak hücreler %70’lik soğuk etanol ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda alkol dikkatlice uzaklaştırılarak 5 dk’lık sürelerle 2 defa distile su ile yıkandı. Suyu uzaklaştırıp hücreleri kaplayacak şekilde AK eklenip 30 dk inkübe edildi. Daha sonra

AK alınıp 4 defa distile su ile yıkanarak mikroskop altında incelendi. Kalsiyum birikimi olan alanlar kırmızı kahverengi boyanmış olarak gözlemlendi.

AK pozitif koloni sayısı ile 100'den fazla hücre içeren büyük koloni (BK) sayıları ona kadar (+1), yirmiye kadar (+2) ve yirminin üstü için (+3) olarak kabul edildi.

İmmunohistokimya Yöntemi ile Osteokalsin, Osteonektin, Alkalen Fosfataz ve RANKL Aktivitesi Tayini:

Kültürler 28. günde Osteonektin (ON), Osteokalsin (OK), ALP ve RANKL antikoları kullanılarak immunohistokimyasal olarak incelendi. Örnekler PBS'de hazırlanmış %4'lük paraformaldehid solüsyonu (pH 7,4) ile fikse edildikten sonra 3 defa 5'er dk PBS ile yıkandı. Daha sonra %0,5'lik tripsin solüsyonu ile 5 dk inkübe edildikten sonra yukarıda tarif edilen şekilde yıkama işlemi yapıldı ve %3 hidrojen peroksit (H₂O₂) içinde 30 dk bektildi. 1 saat bloking serumu ile inkübe edilen hücreler yıkanmadan sadece serumun alınmasından sonra anti-OK (sc-365797, Zymed, San Francisco, A.B.D), anti-ON (33-5500, Zymed, San Francisco, A.B.D), anti-RANKL (sc-52950, Zymed, San Francisco, A.B.D) ve ALP (E-AB-70383, Zymed, San Francisco, A.B.D) primer antikoları ile 18 saat inkübe edildi. Yıkama işleminden sonra biotinlayted anti-mouse/anti-rabbit konjuge edilmiş streptavidin-horsedish peroksidaz solüsyonları ile 30'ar dk boyandı (85-9043, Zymed Histostain kit San Francisco, A.B.D). Her bir ikincil antikor 3 defa 5'er dk PBS ile yıkandı. İmmünreaktiviteleri görünür halde saptamak amacıyla diaminobenzidin (DAB, 00-2020, Zymed, San Francisco, A.B.D) ile 5 dk boyandı. Primer antikorun yerine PBS konarak negatif kontrolleri yapıldı. Distile su ile yıkama işleminden sonra kapatma medyumunu (00-8030, Histomount mounting solution, San Francisco, ABD) ile kapatıldı (241-244).

SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ile İnceleme Yöntemi:

Kültür kabı üzerinde çoğaltılan hücreler, 0.1 mol/l sodyum kakodilat ile tamponlanmış %2,5'lik glutaraldehit solüsyonu içine yerleştirilerek buz üzerinde 30 dk. süre ile bekletildi. Daha sonra örnekler, sodyum kakodilat tamponu içinde 30 dk. süre ile yıkandıktan sonra, 0,1 mol/l sodyum kakodilat ile tamponlanmış %2'lik ozmiyum tetroksit içinde post-fiksasyon sürecine tabi tutuldu. Bu süreç sonunda, distile su ile iki kez 5'er dk. yıkanan örnekler, alkol serisi içinde (%35, 50, 70, 85, 95

ve 100, 5'er dk) dehidrate edilerek kurutma amacı ile 5 dk hekzametildisilazan solüsyonu içerisine konuldu. 30 dk süre ile havalandırılarak kurutulduktan sonra pirinç taşıyıcılar üzerine yerleştirilen örnekler yaklaşık 200 Å kalınlığında altın ile kaplanarak SEM'de (JEOL JSM-5200, Japonya) incelendi (245,246).

Verilerin İstatistiksel Analizi:

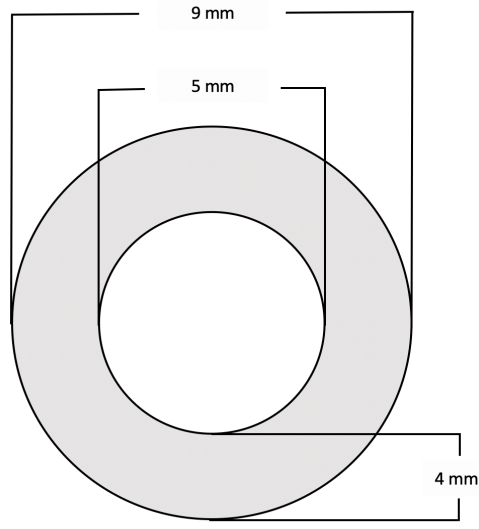
İstatistiksel çalışmada Graphpad İstatistik programı (Graphpad, San Diego, CA) kullanılarak tek yönlü ANOVA analizi yapıldı. Ortalama ve standart sapmalar karşılaştırılarak bulunan değerler az anlamlı ($p<0,05$), anlamlı ($p<0,01$), çok anlamlı ($p<0,001$) veya anlamsız ($p>0,05$) olarak değerlendirildi.

3.2.3. Cerrahi Yöntem

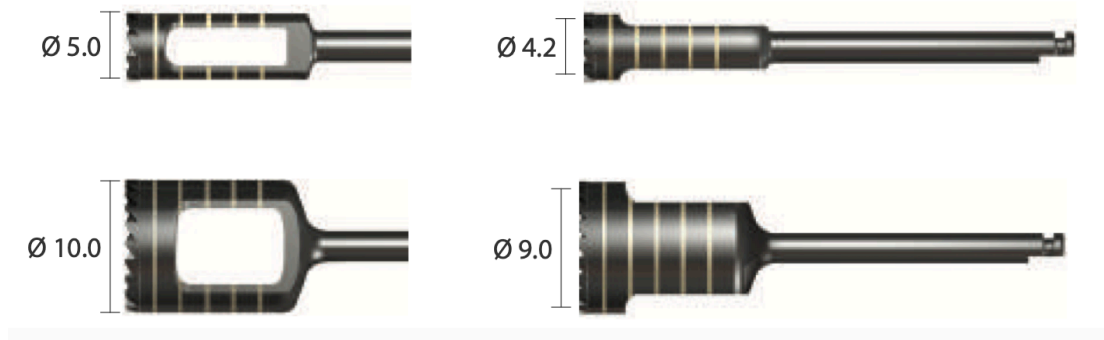
Cerrahi işlemlerden önce deney hayvanları 90 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar; Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg xylazin (Rompun; Bayer, İstanbul, Turkey)'in intramusküler enjeksiyonu ile genel anestezi altına alındı. Genel anestezi altına alınan deney hayvanları tespit tahtasına yerleştirilerek kraniyum sabit duracak şekilde tahtaya tespit edildi. Cerrahi alanın antisepsisini sağlamak amacıyla kafatası her iki hemikraniyumu içine alacak şekilde kulaklara kadar povidon-iyodin solüsyonu (Poviodex, Kimpa, Türkiye) ile yıkandı. Gerekli asepsi, antisepsi ve sterilizasyon koşulları sağlandıktan sonra cerrahi alan steril cerrahi örtülerle örtüldü ve cerrahi alanın izolasyonu sağlandı. Kanama kontrolü ve analjezi amacıyla cerrahi işlem yapılacak alana ve çevresine 0,5 ml 1:200,000 epinefrin içeren anestetik solüsyonla (Ultracain-DS hoechst Marion Roussel, İstanbul, Türkiye) lokal anestezi yapıldı. Lokal anestezinin infiltrasyonu için 5 dakika beklendi. Daha sonra 15C numaralı bistüri ile kraniyal yumuşak doku orta hattı üzerinde, sagittal düzlemde, yaklaşık 30 mm uzunluğunda, periostu içerecek şekilde tam kalınlıkta insizyon yapıldı. Yumuşak dokular ve periost frontal, parietal ve oksipital kemikler tamamen açığa çıkacak şekilde her iki yana doğru genişçe disseke edildi. Her iki hemikranyum tamamen görülecek hale geldiğinde yumuşak doku ekartörleri yerleştirildi ve ameliyat sahası açığa çıkarıldı. Kalvaryum tamamen açığa çıkarıldıktan sonra örneklerin alınacağı alan üzerinde herhangi bir yumuşak doku artığı kalmadığından emin olmak amacıyla kemik yüzeyi keskin küret ile kürete edildi.

Her bir kalvaryumdan 2 adet kemik halkası çıkartıldı. Kemik halkalarının dış çaplarının 9 mm, iç çaplarının 5 mm, yüksekliklerinin ise yaklaşık 1 mm olması

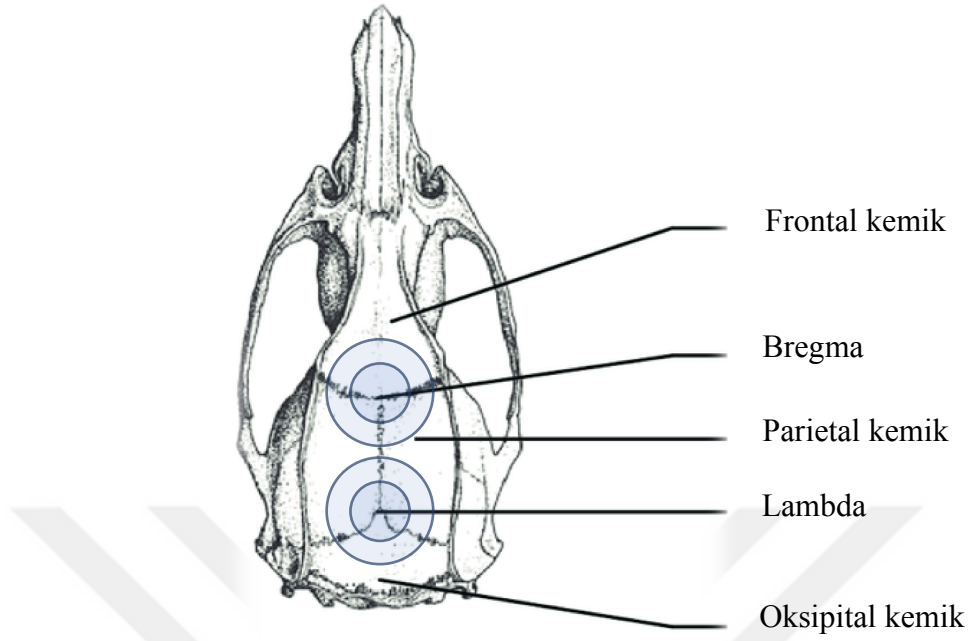
hedeflendi. Dış çapı 10 mm, iç çapı 9 mm olan trefan frez ile (Dentium, Güney Kore) birinin sınırları frontal kemik ve parietal kemikler üzerinde olan, diğerinin sınırları ise parietal kemikler ile oksipital kemik üzerinde bulunacak şekilde iki adet kemik kesisi yapıldı. Bu kesiler kemik üzerinde yaklaşık 0,5 mm derinliğinde olması hedeflenen monokortikal kesilerdi bu sayede iç taraflarından çıkartılacak olan kemik parçasının kesisi yapılırken kemik parçalarının kranyuma bağlı kalmaları sağlandı. 9 mm'lik kesiler yapıldıktan sonra merkezleri çıkışacak şekilde dış çapı 5 mm iç çapı 4.2 mm olan trefan frez (Dentium, Güney Kore) ile çapı 9 mm olan daire içerisinde 5 mm'lik bikortikal bir kemik kesisi yapıldı. Bikortikal kemik kesisinden sonra içerdeki kemik parçası dıştaki halkaya zarar vermeden nazik şekilde dışarı çıkartıldı. Merkezinde bulunan kemik parçası çıkartıldıktan sonra monokortikal yapılan 9 mm'lik kesiler dikkatli bir şekilde bikortikal hale getirildi ve kemik halkaları hasar görmeden kranyumdan ayrıldı. Kemik halkalarının dura matere bakan yüzeyleri yumuşak dokuların temizlenmesi amacıyla kürete edildi. İşlem 30 deney hayvanı için aynı şekilde tekrarlandı. Kemik halkalarının çıkarılması işlemi tamamlandıktan sonra deney hayvanları genel anestezi altındayken servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.



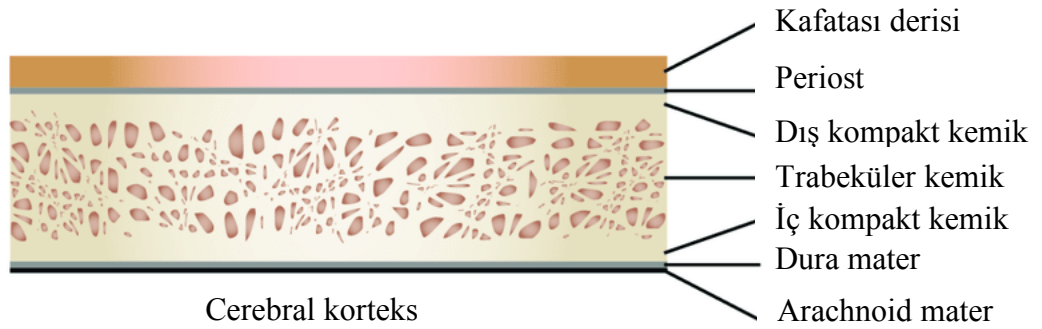
Şekil 6. Kemik halkasının şematik görüntüsü.



Şekil 7. Kullanılan trefan frezler.



Şekil 8. Osteotomi hatlarının anatomik oluşumlarla ilişkisinin şematik görüntüsü.



Şekil 9. Sıçan kafatasının anatomik yapısı (enine kesit).

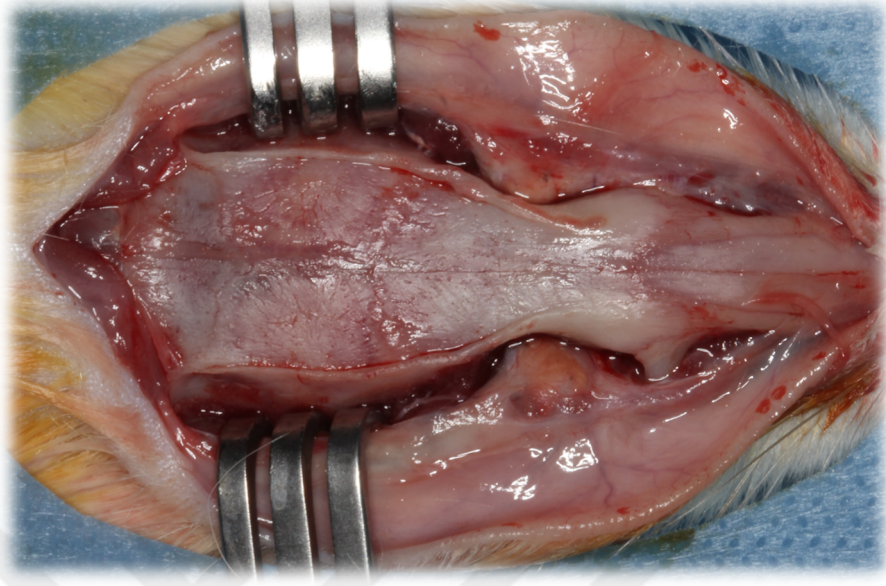
3.2.4. Cerrahi Uygulama



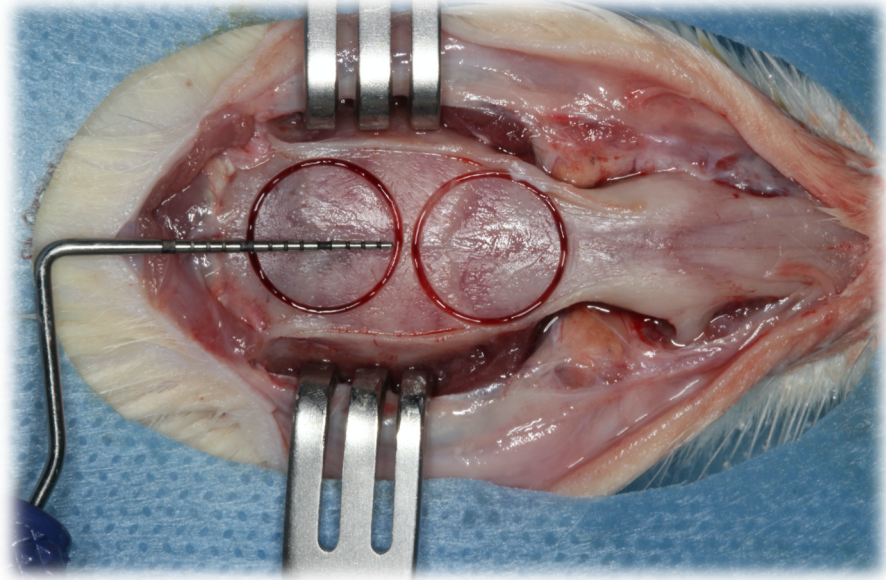
Resim 1. Cerrahi alanın antisepsisini sağlamak amacıyla kafatası derisinin povidon-iyodin solüsyonu (Poviodex, Kimpa, Türkiye) ile yıkanması ardından steril cerrahi örtünün örtülmesi.



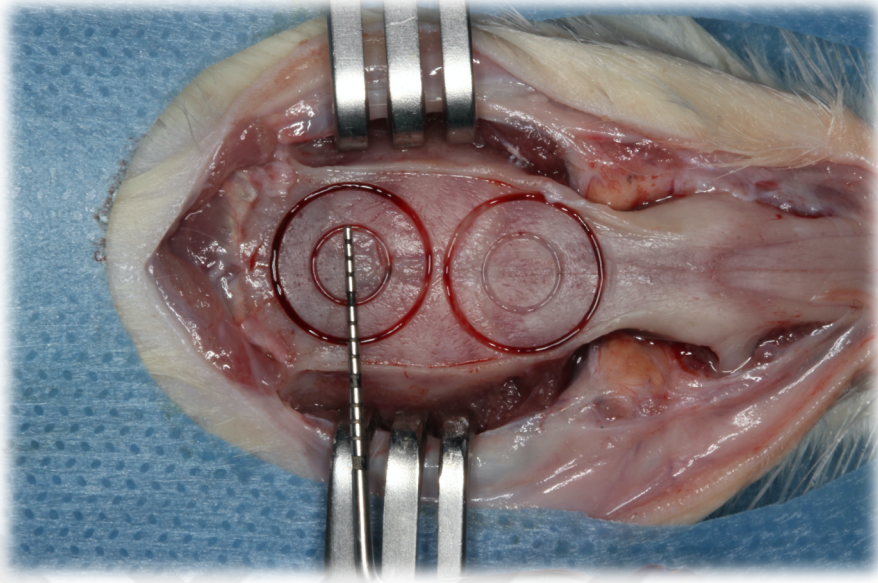
Resim 2. Kraniyal yumuşak doku orta hattı üzerinde, sagittal düzlemde, yaklaşık 30 mm uzunluğunda tam kalınlıkta insizyonun yapılması.



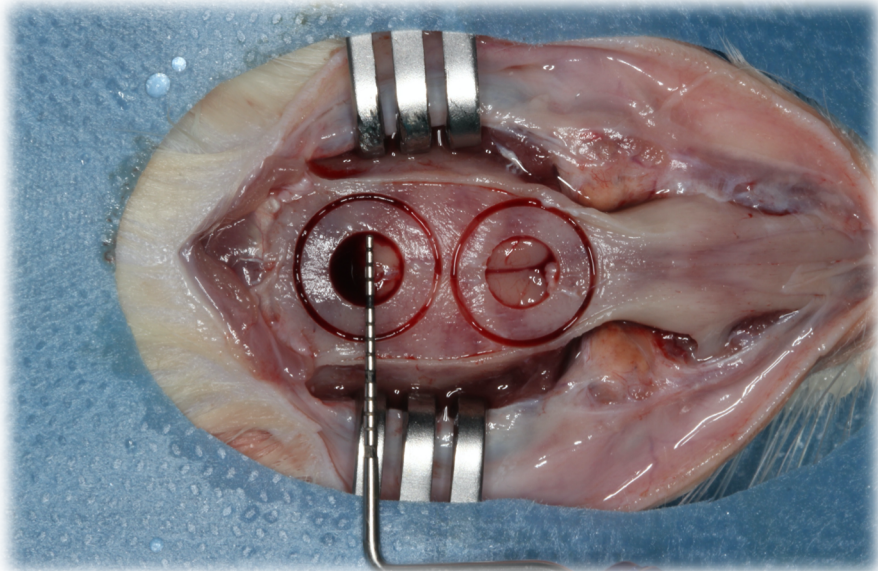
Resim 3. Tam kalınlıklı flep kaldırılarak frontal, parietal ve occipital kemiklerin açığa çıkarılması ve ekartörlerin yerleştirilmesi.



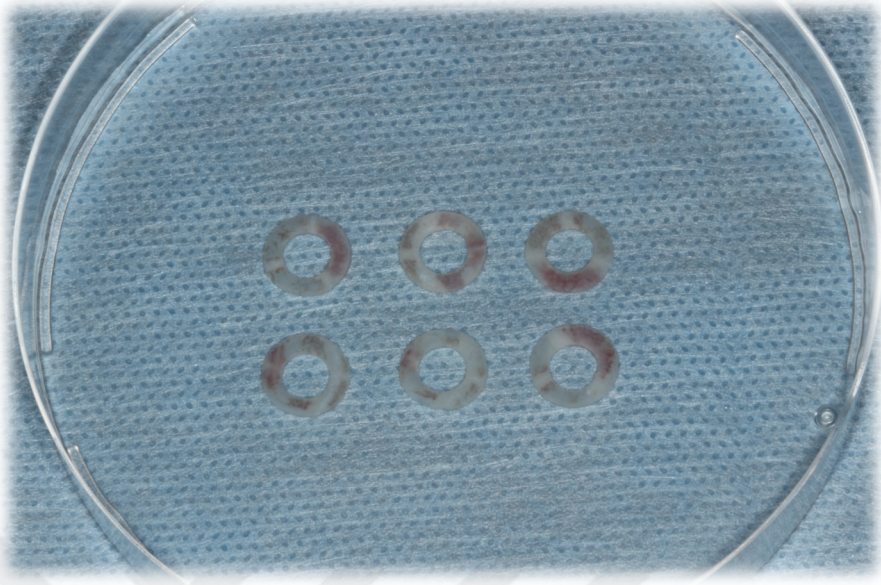
Resim 4. Dış çapı 10 mm, iç çapı 9 mm olan trefan frez ile kalvaryum üzerinde derinlikleri yaklaşık 0.5 mm olan monokortikal kesilerin yapılması.



Resim 5. Dış çapı 5 mm, iç çapı 4.2 mm olan trefan frez ile dıştaki kemik halkaları kalvaryumla ilişik durumdayken içteki kemik parçalarının yerlerinin belirlenmesi ve monokortikal kesinin yapılması.



Resim 6. Dış çapı 5 mm iç çapı 4.2 mm olan trefan frez ile bikortikal kemik kesileri yapılarak içteki kemik parçasının kalvaryumdan ayrılması ve dıştaki kemik halkalarına zarar verilmeden kemik parçalarının çıkartılması.



Resim 7. Dış çapı 10 mm iç, çapı 9 mm olan trefan frez ile kalvaryum üzerindeki monokortikal kesiler bikortikal hale getirilerek kemik halkalarının dikkatli bir şekilde kalvaryumdan ayrılması.

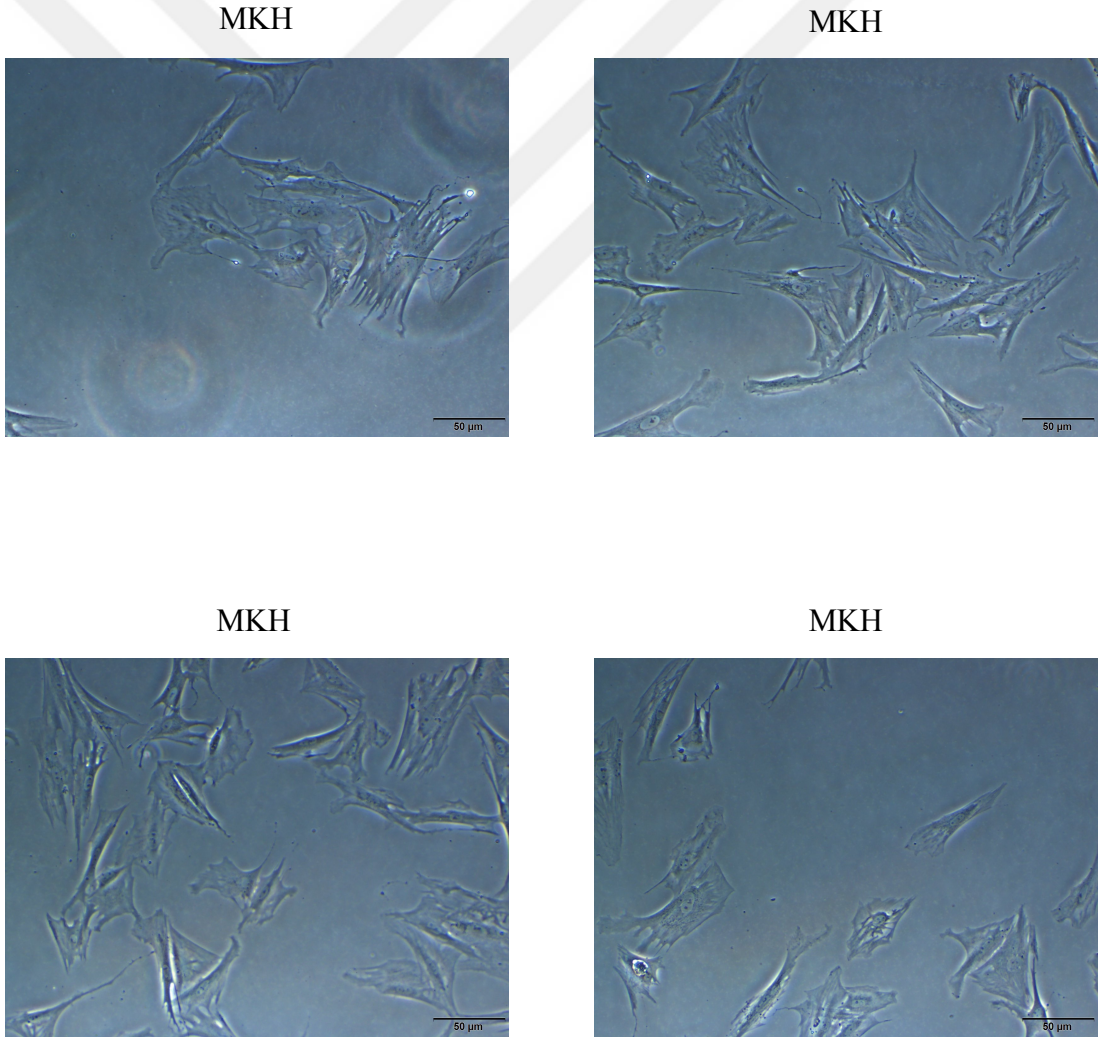
3.2.5. Kemik Halkalarının Kültür Ortamına Alınması ve Kültürde Gerçekleştirilen İşlemler

Çıkarılan 60 adet kemik halkası (KH) hücre kültür kuyucuklarına yerleştirildi ve KH, KH+BOR, KH+MKH, KH+MKH+BOR olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Kemik halkalarının bulunduğu hücre kültür kuyucukları içine osteojenik besi yeri ilave edildi. Borik asit içeren gruplara 6 µg/ml borik asit çözeltisi ilave edildi. KH+MKH ve KH+MKH+BOR gruplarına kuyucuk başına 50 bin MHK hücre ilave edildi. MHK'ler ilave edildikten sonra örnekler kültür ortamına alındı ve 37⁰ C, %5 CO₂ koşulunda inkübasyona bırakıldı (HeraCell, Kendro Laboratory, Almanya). Hücrelerin üremesine göre 2-3 günde bir hücrelerin besi ortamı yenilendi. Hücrelerin üremesi morfolojik olarak faz kontrast ataçmanlı inverted mikroskopla (CK40-F200, Olympus, Japonya) incelendi ve mikrofotografi ile görüntülendi. Hücreler 28 gün süre ile gözlemlendi. 28. günde örneklerin bir bölümü için histolojik inceleme amacıyla deney sonlandırıldı. Kalan örneklerde yara modeli oluşturularak iki hafta daha iyileşme süreci gözlemlendi. 6. hafta sonunda deney sonlandırıldı.

BULGULAR

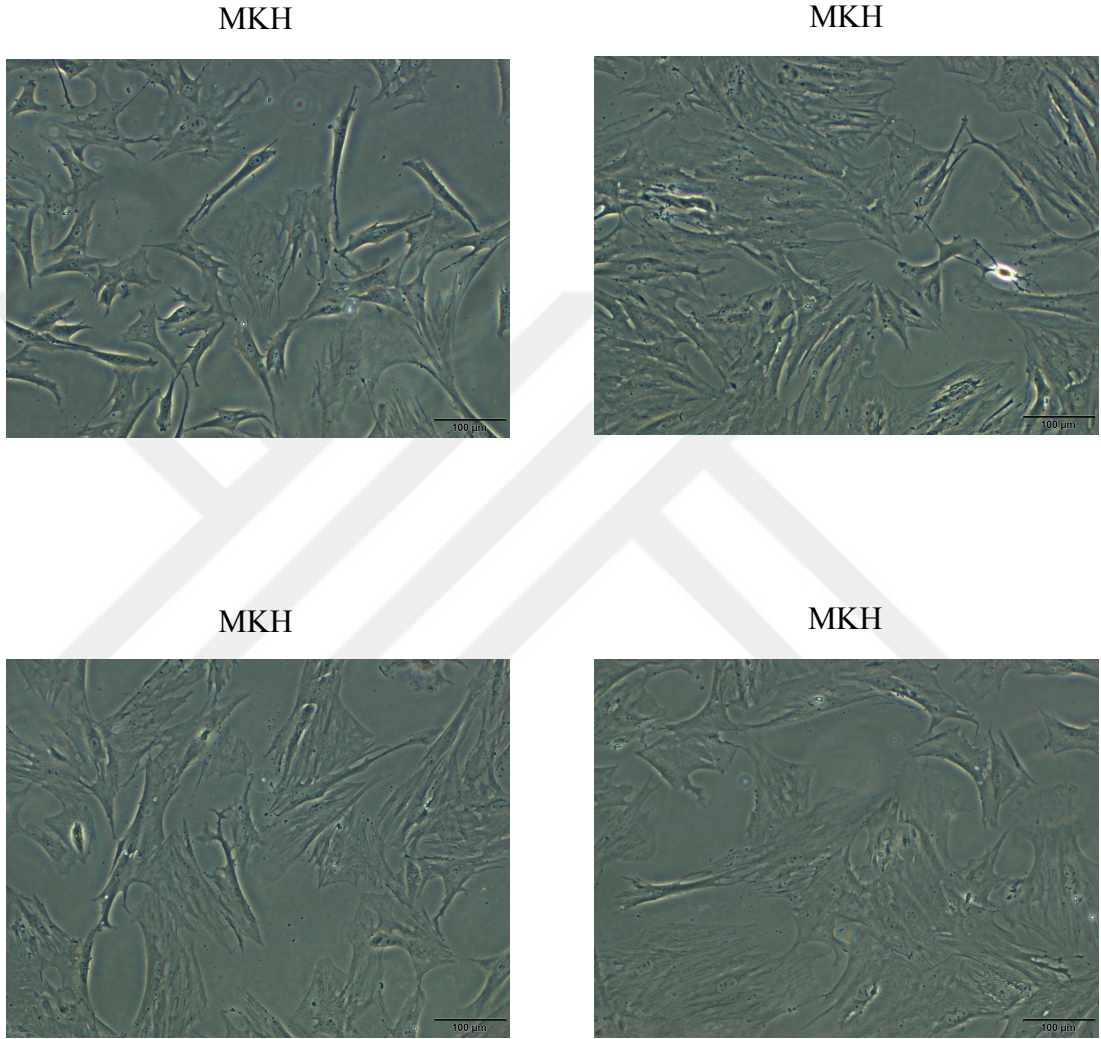
4.1. MKH'lerin Eldesi, Kùltürü ve Karakterizasyonu

Sprague-Dawley sıçanların adipoz dokusundan izole edilen yağ kaynaklı MKH'ler dondurmadan çıkarılıp kùltür kaplarından kùltüre edildi ve bu hücrelerin seçici olarak plastik yüzeylere yapışma özelliğinden yararlanıldı. Böylece, MKH'lerin yüzeye tutunma özellikleri ile süspanse olarak üreyen hematopoetik kök hücrelerden ayrılmaları sağlandı. Hematopoetik hücreler ise PBS ile yıkamalar sonrası ortamdan uzaklaştırıldı. MKH'lerin 1/3 pasaj oranında yaklaşık olarak 3 gün içerisinde yüzeyi kapladıkları gözlemlendi (Resim 8).



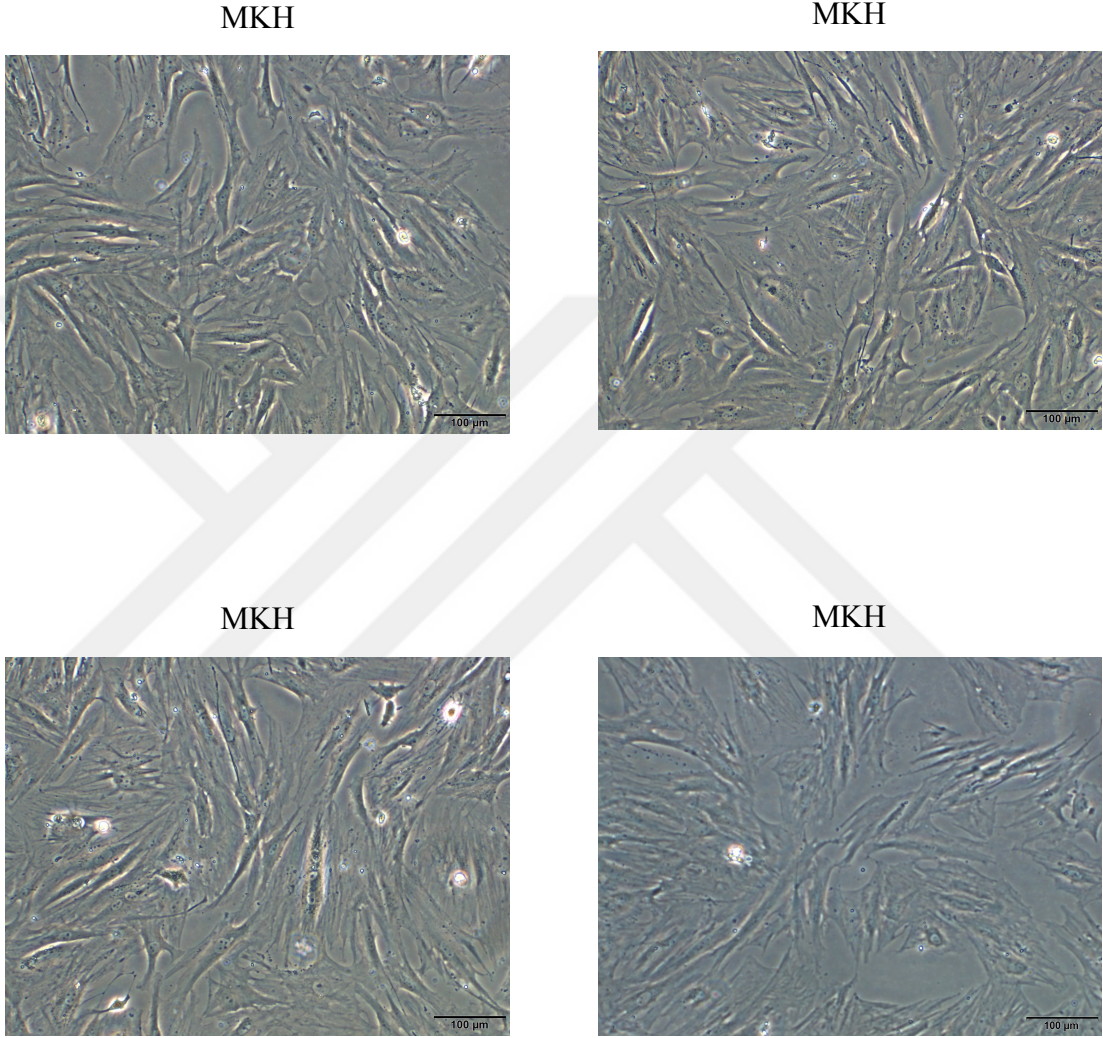
Resim 8. 3. günde MKH'lerin tutunma, çoğalma ve göç etme davranışlarını göstermesi.

7. günde mikroskop görüntülerinde hücrelerin kültür kabının yüzeyine tutunup yayıldıkları ve fibroblast benzeri iğsi bir morfoloji sergiledikleri belirlendi (Resim 9).



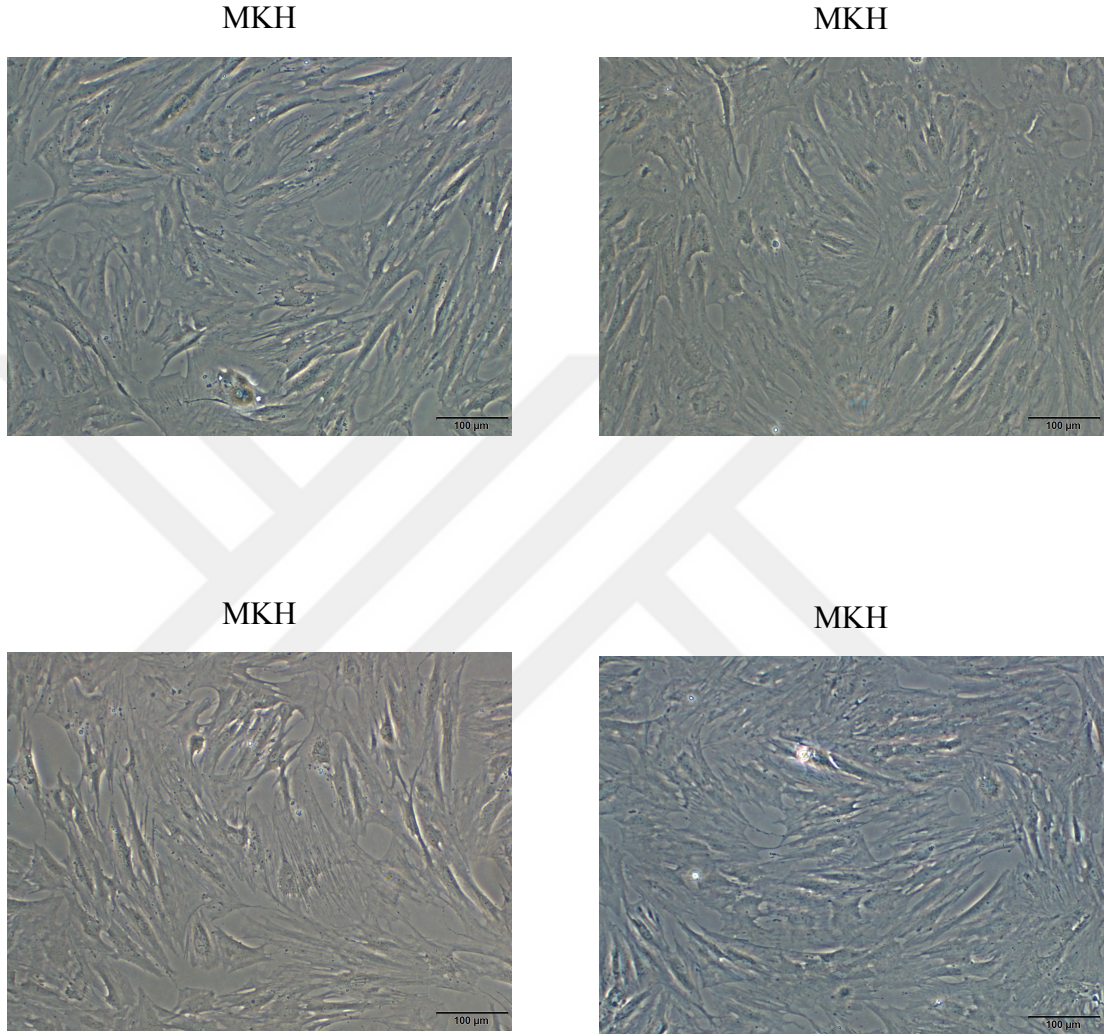
Resim 9. 7. günde yapılan yıkamalar sonrasında MKH'lerin tutunma, çoğalma ve göç etme davranışları göstermesi ve semikonfluent olmaları.

14. günde kültürde hücrelerin konfluent oldukları ve sıkışarak tüm alanı kapladıkları saptandı. Morfolojik olarak benzer özellikler gösteren homojen bir oluşum sergiledikleri izlendi (Resim 10).



Resim 10. 14. günde MKH'lerin tutunma, çoğalma ve göç etme davranışlarını göstermesi ve konfluent olmaları.

4. haftanın sonunda hücrelerin konfluent hallerini korudukları ve başka bir hücreye farklılaşma göstermedikleri gözlemlendi (Resim 11).



Resim 11. 28. günde MKH'lerin tutunma, çoğalma ve göç etme davranışlarını göstermesi ve konfluent olmaları.

28. gün sonunda yapılan analizlerde zaman dilimleri içerisinde hücre sayılarının artışı kıyaslandığında her zaman diliminde bir öncekine göre hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$). Mikroskop görüntülerinde hücrelerin kültür kabının yüzeyine tutunup yayıldıkları ve fibroblast benzeri iğsi bir morfoloji sergiledikleri belirlendi. MTT ile yapılan analizde hücrelerin çoğaldıkları ve konfluent oldukları izlendi (Tablo 5).

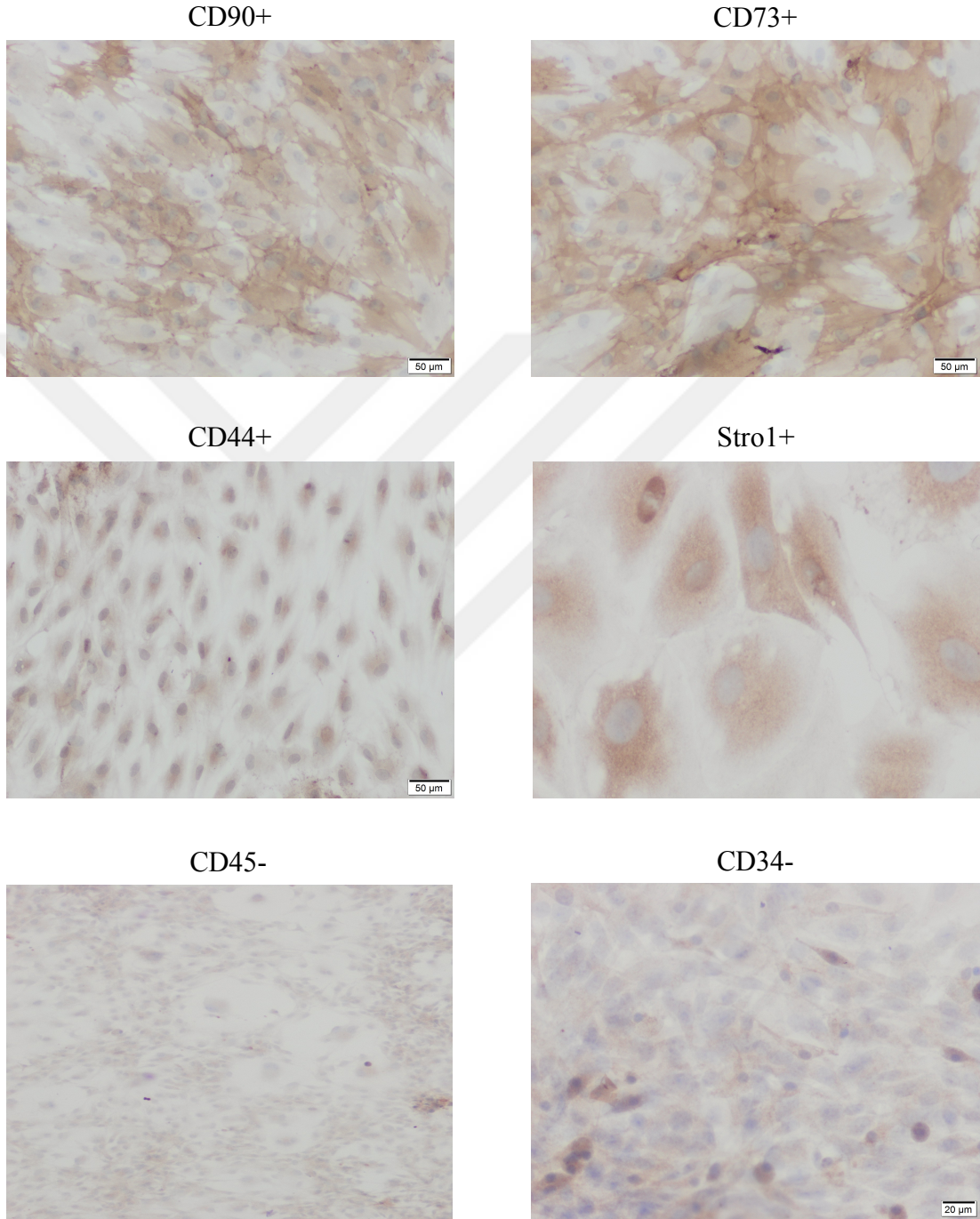
Gruplar	Nokta sayısı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	Medyan
G3	6	163.99	36.473	21.058	167.78
G7	6	363.43	36.101	21.436	368.98
G14	6	764.28	37.128	21.436	766.96
G28	6	1328.70	90.813	52.431	1314.70

Tablo 5. MTT analizi ile MKH çoğalması ve canlılığının değerlendirilmesi.

Karşılaştırma	Fark	q	P değeri
G3 ile G7	-199.44	6.240**	P< 0.01
G3 ile G14	-600.29	18.781**	P< 0.001
G3 ile G28	-1164.70	36.439***	P< 0.001
G7 ile G14	-400.84	12.541***	P< 0.001
G7 ile G28	-965.23	30.199***	P< 0.001
G14 ile G28	-564.38	17.658***	P< 0.001

Tablo 6. İlerleyen günlerdeki MKH çoğalmasının istatistiksel değerlendirilmesi.

Alınan ve çoğaltılan hücrelerin MKH'ler olduğu belirteçler ile gösterildi. Belirteçler olarak CD90, CD44, CD73 ve Stro1 için pozitif olma ve hematopoetik belirteçler olan CD45 ve CD34 için negatif olma özelliği kullanıldı (Resim 12).



Resim 12. İmmunohistokimya görüntüleri (CD90+, 44+, 73+, Stro1+ ve CD45-, 34-).

İmmünohistokimya görüntüleri H-skor ile değerlendirildi ve CD90, CD44, CD73, Stro1 için pozitif olma ve hematopoetik belirteçler olan CD45 ve CD34 için negatif olma kriterleri sağlandı, istatistiksel olarak homojen bir MKH eldesi olduğu saptandı (Tablo 7).

Gruplar	Nokta sayısı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	Medyan
CD90	6	254.670	7.024	4.055	254.000
CD73	6	245.000	9.000	5.196	245.000
CD44	6	235.000	9.539	5.508	234.000
STRO1	6	233.670	21.502	12.414	234.000
CD45	6	32.667	9.018	5.207	32.000
CD35	6	35.667	8.622	4.978	34.000

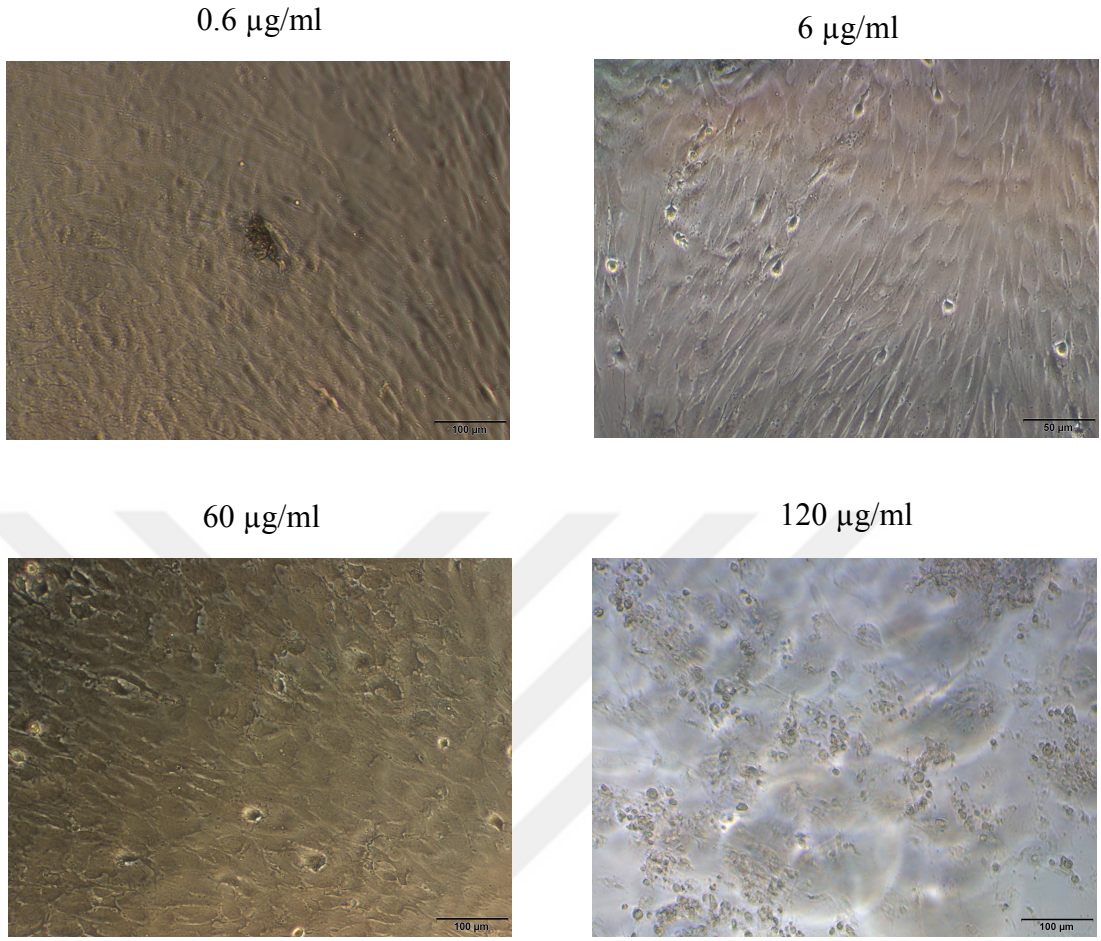
Tablo 7: Yüzey belirteçlerinin immünohistokimya görüntülerinin H-skor ile değerlendirilmesi.

Karşılaştırma	Fark	q	P değeri
CD90 ile CD45	222.00	32.510***	P< 0.001
CD90 ile CD35	219.00	32.071***	P< 0.001
CD73 ile CD45	212.33	31.095***	P< 0.001
CD73 ile CD35	209.33	30.655***	P< 0.001
CD44 ile CD45	202.33	29.630***	P< 0.001
CD44 ile CD35	199.33	29.191***	P< 0.001
STRO1 ile CD45	201.00	29.435***	P< 0.001
STRO1 ile CD35	198.00	28.996***	P< 0.001

Tablo 8: Yüzey belirteçlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

4.2. Etkili Borik Asit Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Kültürde kullanılacak borik asit dozunu belirlemek amacıyla literatürdeki bilgiye (247) dayanarak 0.6 µg/ml, 6 µg/ml, 60 µg/ml ve 120 µg/ml borik asit içeren, farklı konsantrasyondaki borik asit solüsyonları, MKH barındıran besiyerlerine (kültür besi ortamı) eklendi (Resim 13). Farklı borik asit konsantrasyonlarının kök hücrelerin çoğalması ve canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirildi.



Resim 13. Borik asitin etkisini değerlendirmek için besiyerine değişik dozlarda yapılan eklemelerde borik asitin MKH çoğalması üzerindeki etkisi.

Etkili borik asit konsantrasyonunu belirlemek için yapılan ölçümler MTT analizi ile gerçekleştirildi. Besiyerlerine değişik konsantrasyonlarda yapılan eklemelerde 0.6 µg/ml, 6 µg/ml ve 60 µg/ml borik asitin MKH'lerin canlılığı ve çoğalması üzerinde olumlu etkisi olduğu gözlemlendi. 120 µg/ml konsantrasyondaki borik asit MKH'ler üzerinde toksik etki gösterdi, hücrelerin canlılığını ve çoğalmasını olumsuz etkiledi. 0.6 µg/ml'lik konsantrasyonla karşılaştırıldığında 6 µg/ml ve 60 µg/ml'lik konsantrasyonların MKH'lerin canlılığı ve çoğalması üzerinde daha etkili olduğu görüldü. MKH canlılığı ve çoğalması üzerinde en etkili konsantrasyonların 6 µg/ml ve 60 µg/ml olduğu saptadı ve bu iki grup arasındaki istatistiksel değerlendirmede anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P>0.05$). 6 µg/ml

konsantrasyondaki borik asit MHK'lerin en yüksek yoğunluğa ulaştığı grup oldu (Tablo 9).

Gruplar	Nokta sayısı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	Medyan
0.6 µg	6	820.67	90.534	52.270	832.00
6 µg	6	1201.30	75.567	43.628	1205.00
60 µg	6	1175.00	89.500	51.673	1175.00
120 µg	6	220.67	90.534	52.270	232.00

Tablo 9. Farklı borik asit konsantrasyonlarının MKH çoğalması ve canlılığı üzerindeki etkilerinin MTT analizi ile değerlendirilmesi.

Karşılaştırma	Fark	q	P değeri
0.6 µg ve 6 µg	-380.67	7.599**	P< 0.01
0.6 µg ve 60 µg	-354.67	7.080**	P< 0.01
0.6 µg ve 120 µg	600.00	11.977***	P< 0.001
6 µg ve 60 µg	26.00	0.5190ns	P> 0.05
6 µg ve 120 µg	980.67	19.576***	P< 0.001
60 µg ve 120 µg	954.67	19.057***	P< 0.001

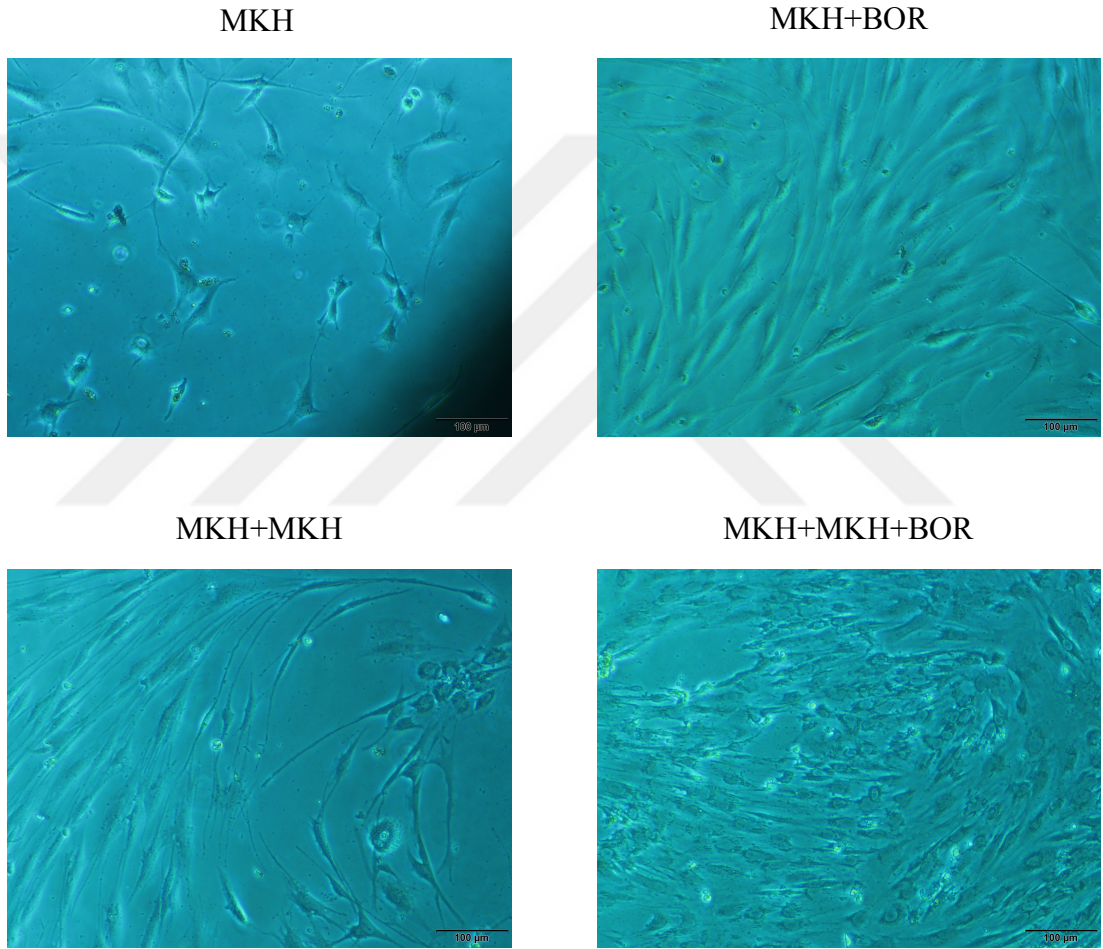
Tablo 10. Farklı borik asit konsantrasyonlarının MKH canlılığı ve çoğalması üzerine olan etkilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

4.3. Kültürde Osteojenik Farklılaşmada Borik Asitin Etkisi

Osteojenik farklılaşma için semikonfluent aŗamada besiyerine askorbik asit, beta gliserofosfat ve deksametazon eklendi. MKH'ler için osteoblasta yönlenme olması beklendi (Resim 14).

- **Osteojenik Farklılaşma 7. Gün:**

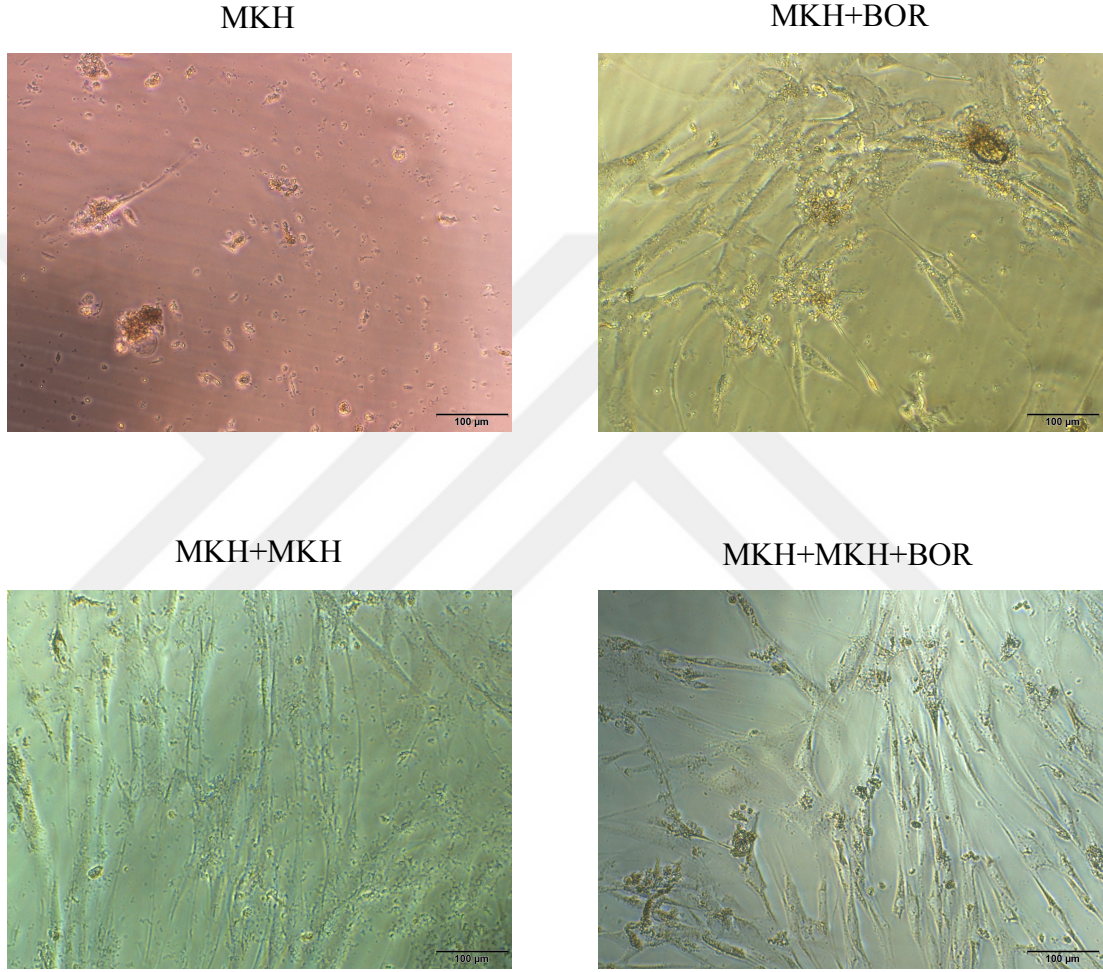
Osteojenik besi yerindeki hücreler birinci hafta sonunda çoğalmaya baŗladı.



Resim 14. 7. günde hücrelerin çoğalmaya baŗlaması.

- **Osteojenik Farklılaşma 21. Gün:**

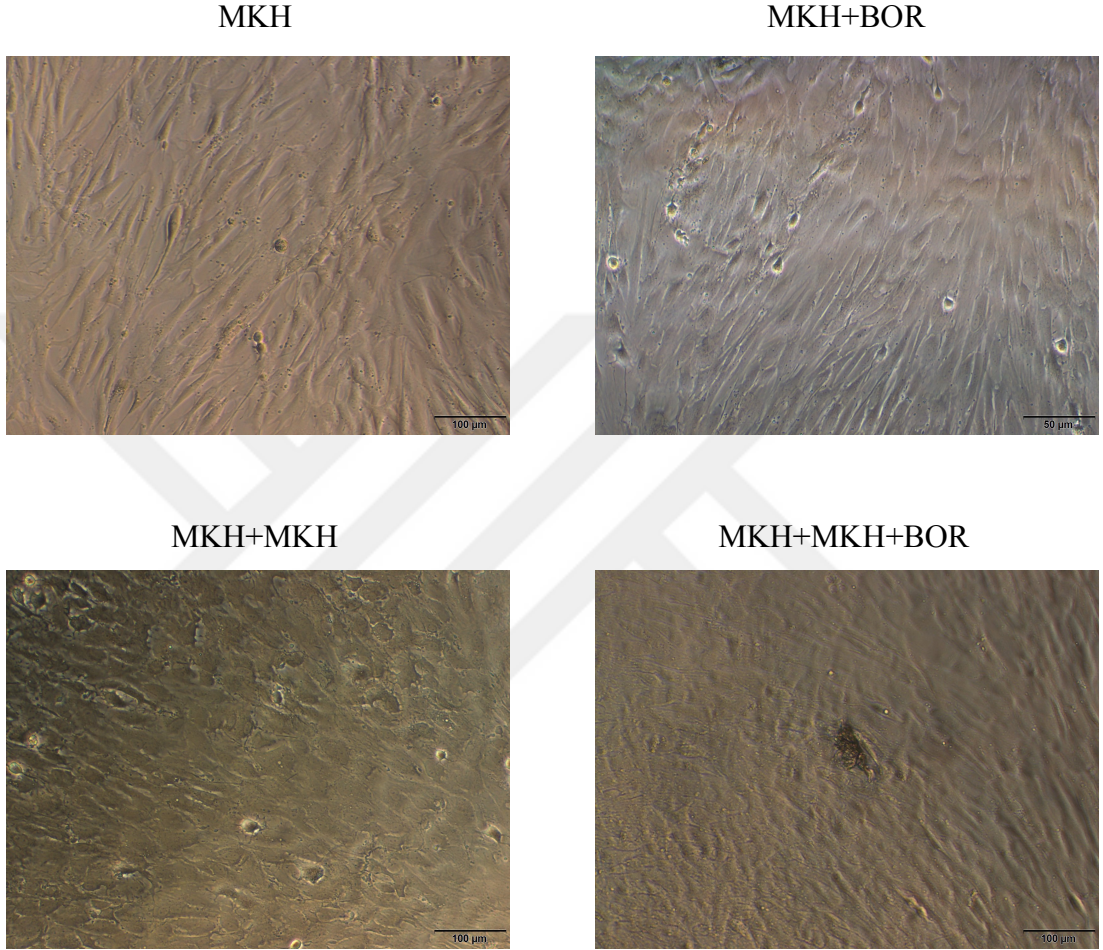
MKH'ler önce adacıklar yapmaya başladı ve üçüncü hafta sonunda bu adacıklarda mineralizasyon ve kalsiyum biriktirme göstererek tipik kemiksi odaklar oluşturdu. (Resim 15).



Resim 15. 21. günde mineralizasyon ve kalsiyum birikiminin gözlenmesi, tipik kemiksi odakların oluşumu.

- **Osteojenik Farklılaşma 28. Gün:**

MKH'ler dördüncü hafta sonunda bu adacıklarda mineralizasyon ve kalsiyum birikimini arttırdı ve kemiksi odakların sayısında artış görüldü. (Resim 16).

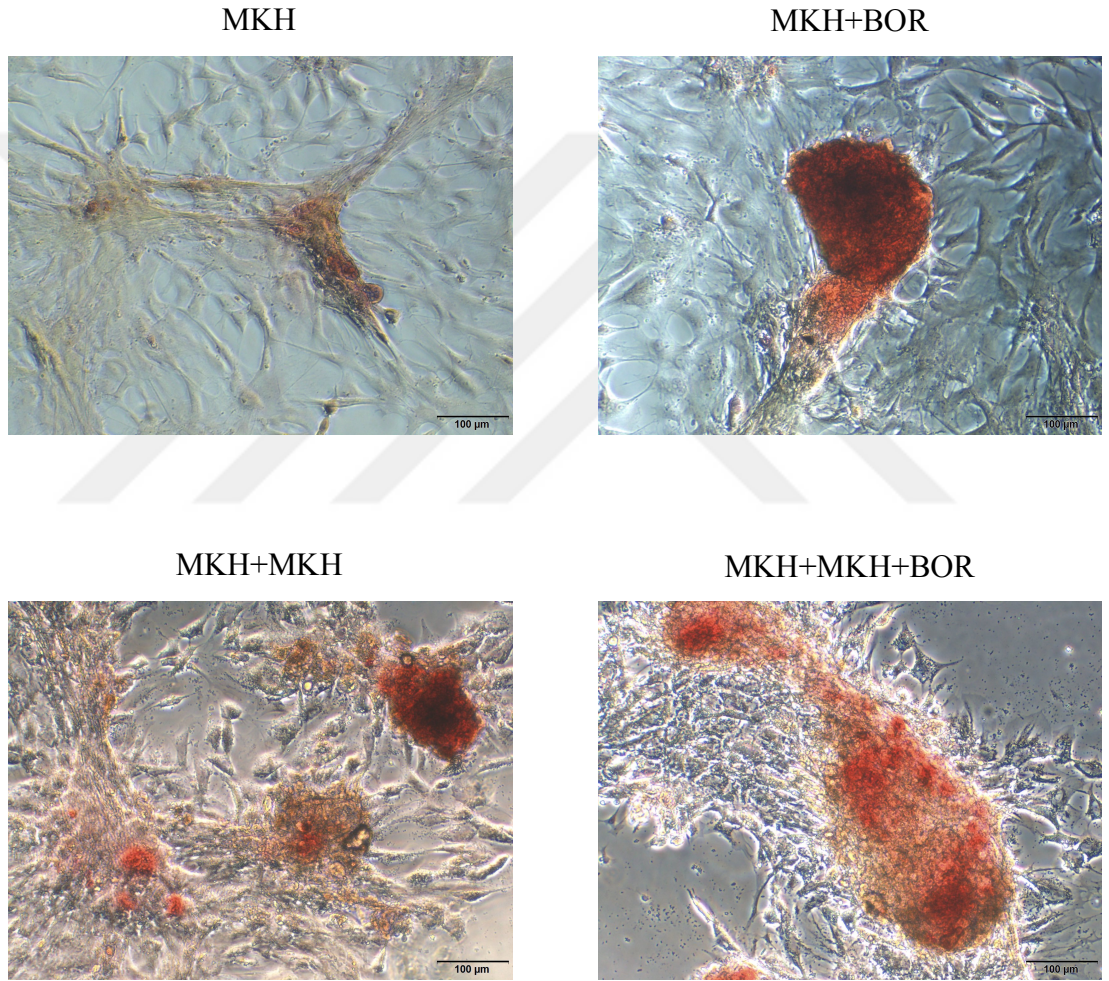


Resim 16. 28. günde osteojenik farklılaşma ile kemiksi adacıkların oluşması.

4.4. Kültürde Osteojenik Farklılaşma İçin Alizarin Kırmızısı (AK) ve Von Kossa (VK) Histokimyası

Osteojenik farklılaşma için semikonfluent aşamada besiyerine askorbik asit, beta gliserofosfat ve deksametazon eklendi. MKH'ler için osteoblasta yönlenme olması beklendi. Oluşan adacıklar AK ile gösterildi (Resim 17).

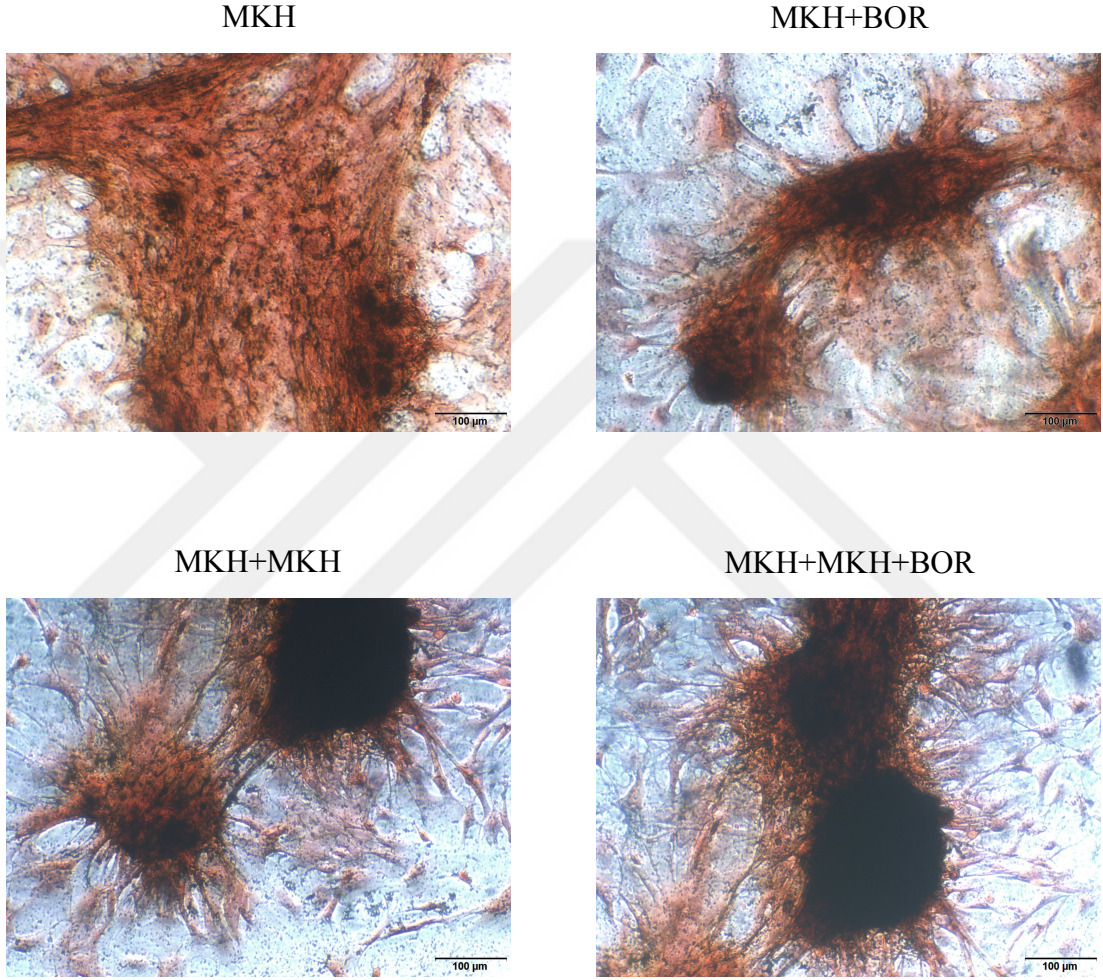
- Osteojenik Farklılaşma 28. Gün Alizarin Kırmızısı:



Resim 17. AK ile osteojenik farklılaşma ve kemiksi adacık oluşumunun gözlenmesi.

Osteojenik farklılaşma için semikonfluent aşamada besiyerine askorbik asit, beta gliserofosfat ve deksametazon eklendi. MKH'ler için osteoblasta yönelme olması beklendi. Oluşan adacıklar Von Kossa ile gösterildi (Resim 18).

- **Osteojenik Farklılaşma 28. Gün Von Kossa:**



Resim 18. VK ile osteojenik farklılaşma ve kemiksi adacık oluşumunun izlenmesi.

4.5. Kültürde Osteojenik Farklılaşmaya Kemik Halkası, Borik Asit ve MKH'nin Etkisi

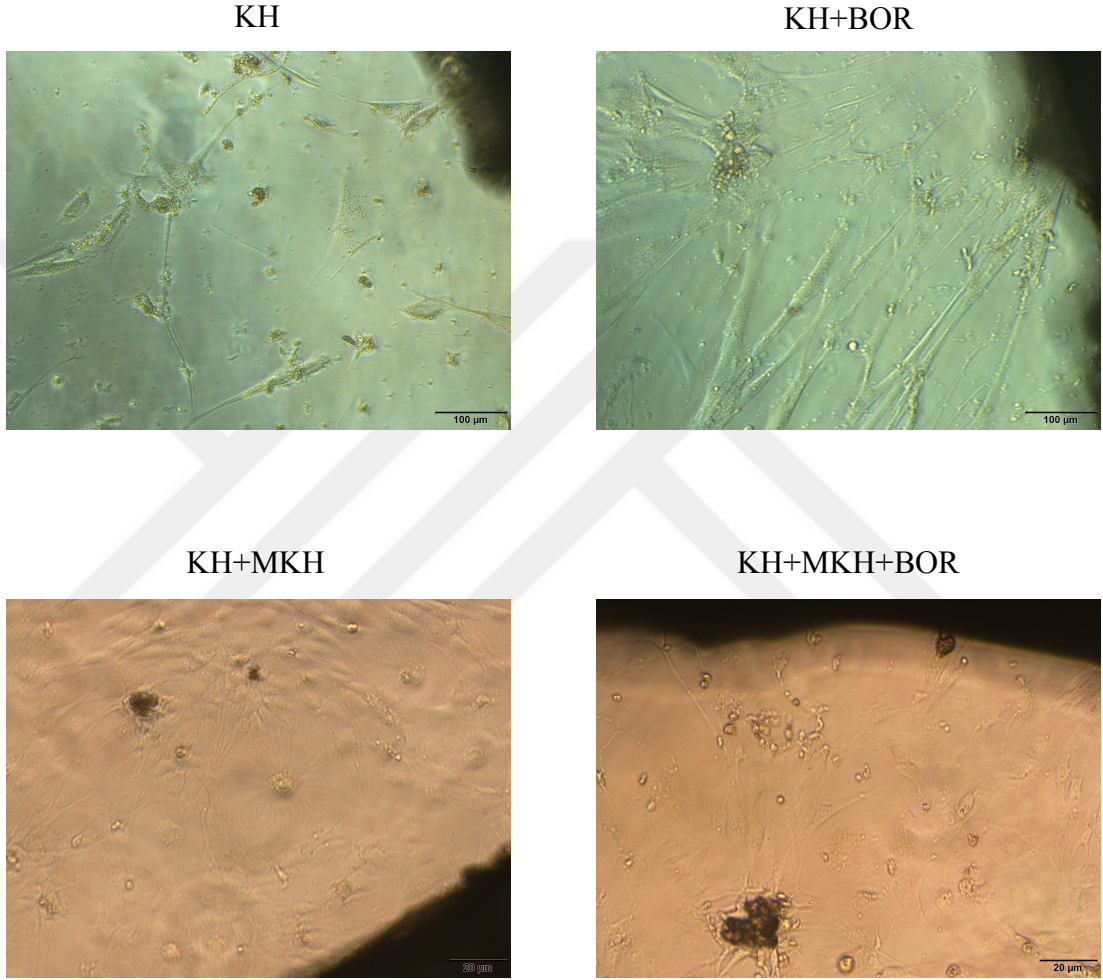
Osteojenik besiyerinde MKH'ler ile oluşturulan kemiksi adacıklar gözlenmesi  zerine Kemik halkası (KH), borik asit ve MKH etkisinin anlaşılması için kemik halkalarının içi boş bırakılarak veya ortama borik asit, MKH, borik asit+MKH eklenerek kemiksi doku oluşumu değerlendirildi.

Boş bırakılan (KH) ve sadece borik asit uygulanan (KH+BOR)  rneklerde ilk hafta hücre üretimi olmazken MKH ve MKH+BOR gruplarında hücrelerin çoğalma ve farklılaşma sürecine girdikleri görüldü (Resim 19).



Resim 19. MKH ve BOR+MKH gruplarında hücrelerin çoğalma ve farklılaşma sürecine girmesi.

2. hafta ile başlayan süreçte, boş bırakılan (KH) ve sadece borik asit eklenen (KH+BOR) örneklerde kemik kaynaklı hücre üretiminin kemik halkasının kenarından başladığı görüldü. Bu aşamada MKH ve MKH+BOR gruplarında hücrelerin çoğalma ve farklılaşma sürecini ilerlettikleri izlendi (Resim 20).



Resim 20. KH ve KH+BOR gruplarında kemik kaynaklı hücre üretiminin kemik halkasının kenarından başlaması. MKH ve MKH+BOR gruplarında hücrelerin çoğalma ve farklılaşma sürecini ilerletmesi.

2. hafta sonunda MTT ile yapılan analiz sonucunda KH ve KH+BOR gruplarında bir miktar hücre artışı olurken, iki grup arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($P>0.05$). KH+BOR grubunda KH grubuna kıyasla daha fazla hücre gözlemlendi. İkinci hafta sonunda borik asitin tek başına hücre çoğalmasında anlamlı bir artışa sebep olmadığı görüldü. KH+MKH ve KH+MKH+BOR gruplarında hücrelerin çoğalma ve farklılaşma sürecini ilerlettikleri saptandı, hücre çoğalması ve farklılaşmasında çok belirgin bir artış olduğu gözlemlendi. En fazla hücre artışı KH+MKH+BOR grubunda gözlemlendi. MKH içermeyen gruplarla kıyaslandığında MKH içeren gruplarda hücre sayısında anlamlı bir artış gözlemlendi ($P<0.001$). MKH hücre içeren gruplar kıyaslandığında borik asitin hücre çoğalmasında olumlu bir etkisi olduğu görüldü fakat bu artış istatistiksel olarak az anlamlı ($P<0.05$) bulundu (Tablo 12).

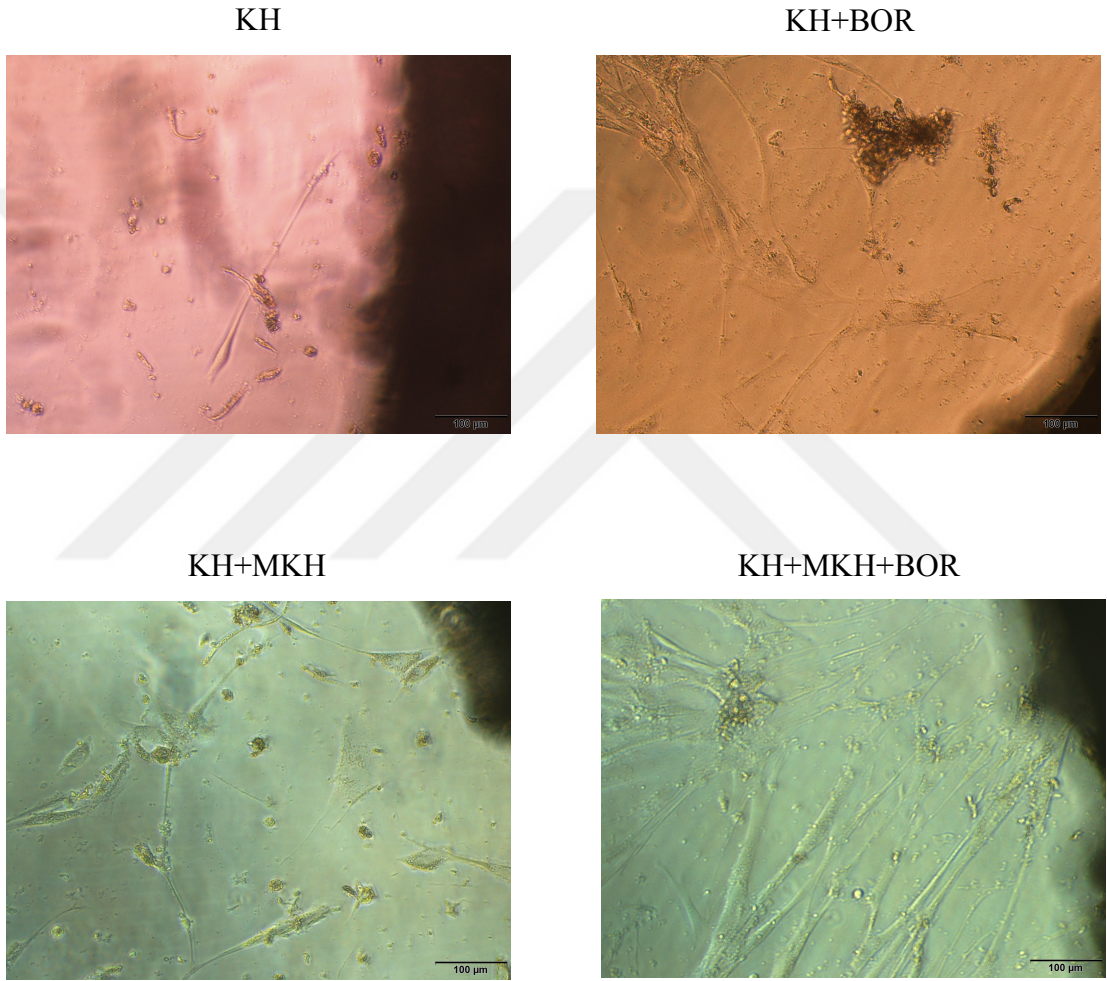
Gruplar	Nokta sayısı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	Medyan
KH	6	61.667	15.275	8.819	65.000
KH+BOR	6	63.667	9.609	5.548	62.000
KH+MKH	6	521.670	65.064	37.565	525.000
KH+MKH+BOR	6	692.670	78.015	45.042	675.000

Tablo 11. 2. hafta sonunda yapılan MTT analizi ile hücre çoğalması ve farklılaşması sürecinin değerlendirilmesi.

Karşılaştırma	Fark	q	P değeri
KH ile KH+BOR	-2.00	0.06715ns	P> 0.05
KH ile KH+MKH	-460.00	15.444***	P< 0.001
KH ile KH+MKH+BOR	-631.00	21.186***	P< 0.001
KH+BOR ile KH+MKH	-458.00	15.377***	P< 0.001
KH+BOR ile KH+MKH+BOR	-629.00	21.118***	P< 0.001
KH+MKH ile KH+MKH+BOR	-171.00	5.741*	P< 0.05

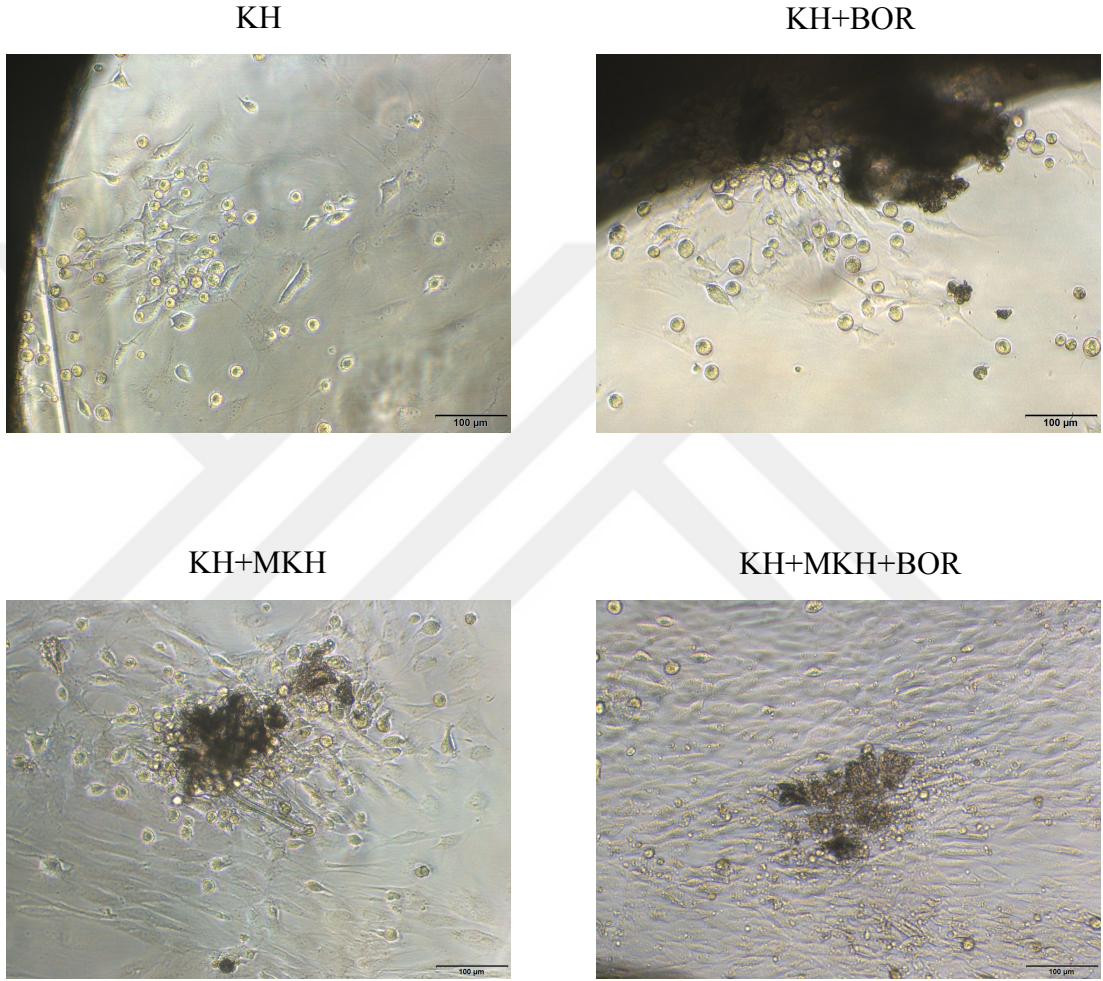
Tablo 12. 2. hafta sonunda hücrelerin çoğalma ve farklılaşma sürecinin istatistiksel analizi.

3. haftaya varıldığında boş bırakılan (KH) ve sadece borik asit eklenen (KH+BOR) örneklerle kıyasla daha az olmakla birlikte tüm gruplarda hücrelerin boşlukları kaplayacak şekilde çoğaldıkları, göç ettikleri ve farklılaşma sürecine girdikleri gözlemlendi. Bu aşamada MKH ve MKH+BOR gruplarında kemiksi adacıkların oluşumunun ve osteoblastik farklılaşmanın başladığı saptandı (Resim 21).



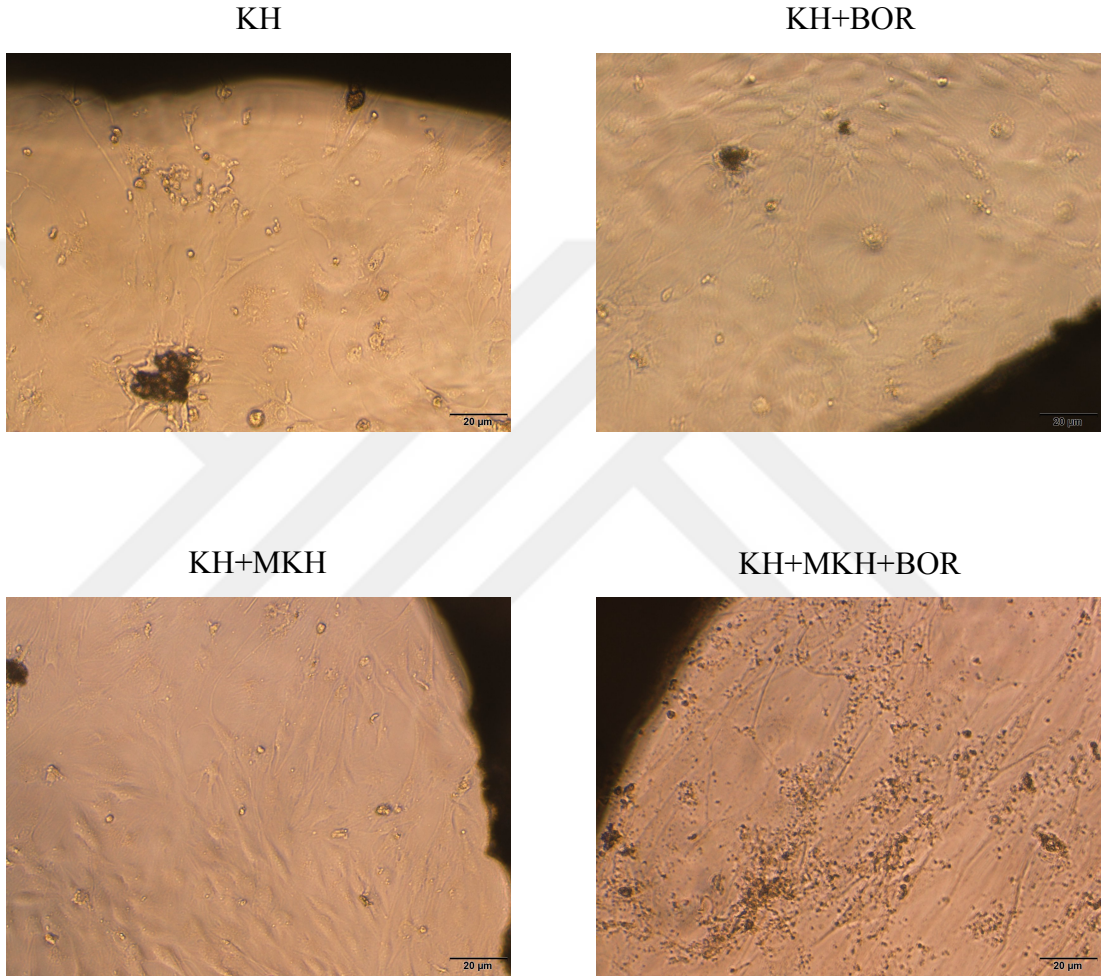
Resim 21. KH ve KH+BOR gruplarına göre daha az olmakla birlikte tüm gruplarda hücrelerin boşlukları kaplayacak şekilde çoğalması, göç etmesi ve farklılaşma sürecine girmesi. MKH ve MKH+BOR gruplarında kemiksi adacıkların oluşumu ve osteoblastik farklılaşmanın başlaması.

3. haftanın ortalarında boş bırakılan (KH) ve sadece borik asit eklenen (KH+BOR) örneklerde kemiğin farklı yerlerinden hücre çıkışı gözlenirken, MKH ve MKH+BOR gruplarında boş alanın ortalarında kemiksi adacıkların oluşumunun ve osteoblastik farklılaşmanın başladığı saptandı (Resim 22).



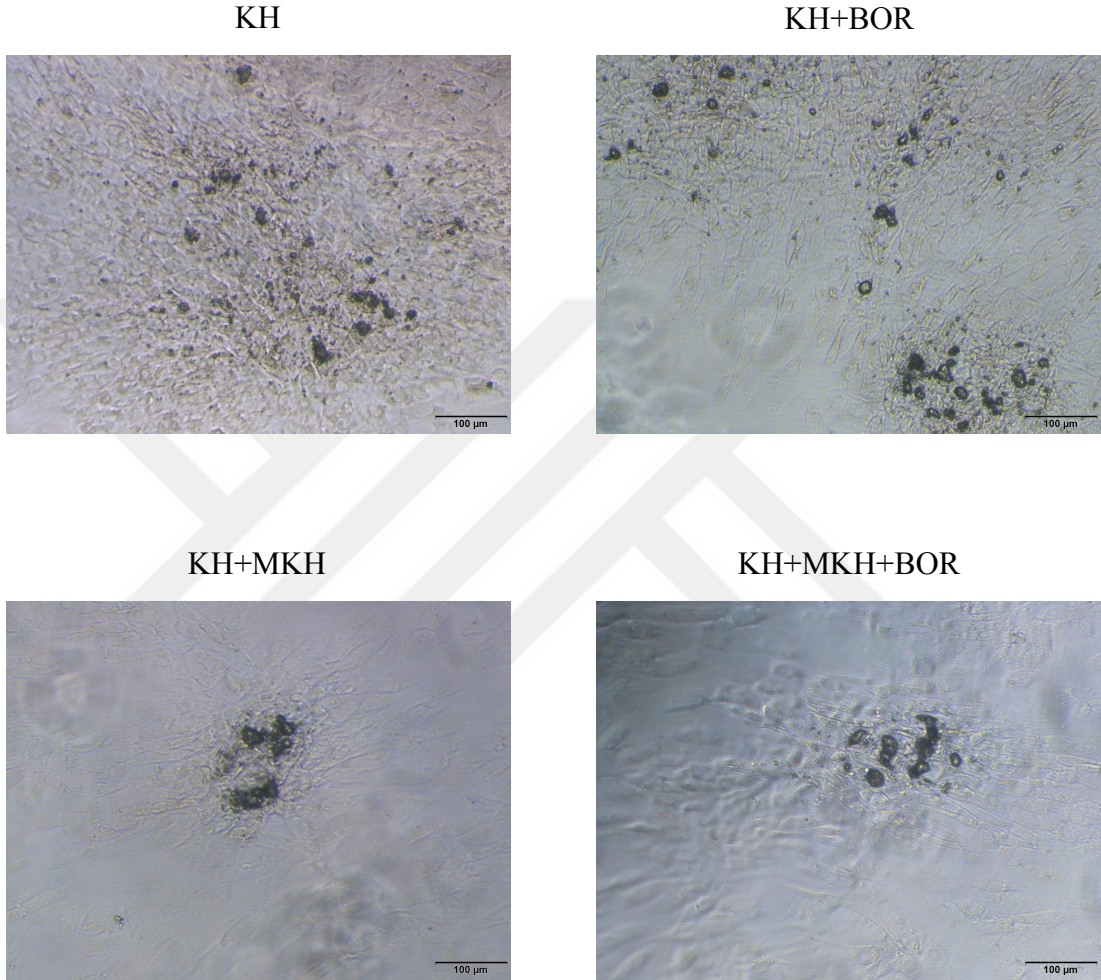
Resim 22. KH ve KH+BOR gruplarında kemiğin farklı yerlerinden hücre çıkışının gözlenmesi, MKH ve BOR+MKH gruplarında boş alanın ortalarında kemiksi adacıkların ve osteoblastik farklılaşmanın saptanması.

4. haftanın başlangıcında bütün gruplarda hücrelerin konfluent olduğu ve boşluğu tamamen doldurduğu gözlemlendi. Osteoblastik farklılaşma ve kemiksi adacık yapımı MKH ve MKH+BOR gruplarında çok daha belirgin bir biçimde gerçekleşti (Resim 23).



Resim 23. Bütün gruplarda boşluğun tamamen dolması. MKH ve MKH+BOR gruplarında osteoblastik farklılaşma ve kemiksi adacık yapımının çok daha belirgin bir biçimde gerçekleşmesi.

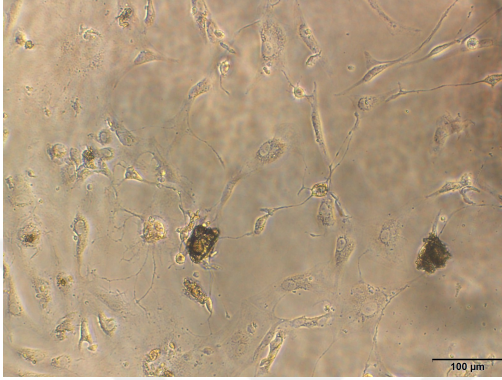
4. hafta ortasında çoğalma ve farklılaşma bütün gruplarda devam etti. MKH ve MKH+BOR gruplarında daha belirgin bir biçimde gerçekleşen, boşluğun ortasını da içeren, kemiksi adacık formasyonu gözlemlendi (Resim 24).



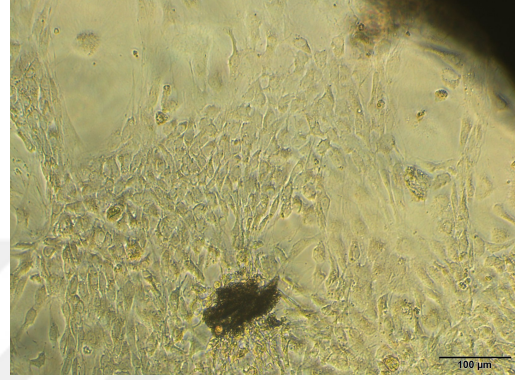
Resim 24. MKH ve MKH+BOR gruplarında daha belirgin olan, boşluğun ortasını da içeren kemiksi adacık formasyonu.

4. hafta sonunda çoğalma ve kemiksi adacık oluşumu bütün gruplarda devam etti, MKH ve MKH+BOR gruplarında daha belirgin bir biçimde olmak üzere daha büyük adacıkların oluştuğu saptandı (Resim 25).

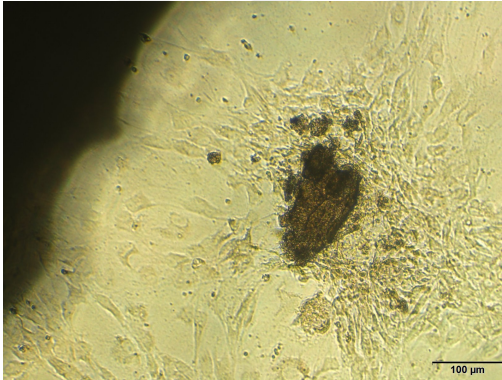
KH



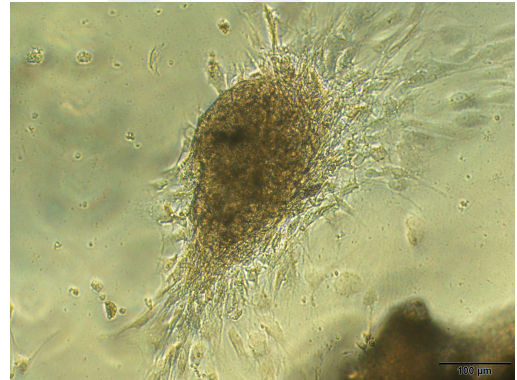
KH+BOR



KH+MKH



KH+MKH+BOR



Resim 25. MKH ve MKH+BOR gruplarında daha belirgin bir biçimde olmak üzere daha büyük adacıkların oluşumu.

4. hafta sonunda yapılan MTT analizi ile hücrelerin çoğalması ve kemiksi adacık oluşumu değerlendirildi. KH grubunda en az sayıda hücre artışı ve kemiksi adacık oluşumu gözlenirken, KH+MKH+BOR grubunda en fazla hücre artışı ve kemiksi adacık oluşumu gözlemlendi. Borik asitin hücre artışı ve kemiksi adacık oluşumuna etkisi değerlendirildiğinde KH+BOR grubunda KH grubuna kıyasla hücre sayısı ve kemiksi adacık oluşumunda daha fazla artış olduğu gözlemlendi fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$). KH+MKH ve KH+MKH+BOR grupları kıyaslandığında borik asit içeren grupta hücre sayısındaki ve kemiksi adacık oluşumundaki artışın daha fazla olduğu gözlemlendi ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$). MKH içeren gruplar ile kök hücre içermeyen gruplar karşılaştırıldığında kök hücre içeren gruplarda hücre sayısı ve kemiksi adacık oluşumundaki artış istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.01$) bulundu (Tablo 14).

Gruplar	Nokta sayısı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	Medyan
KH	6	7.667	1.528	0.8819	8.000
KH+BOR	6	11.333	1.155	0.6667	12.000
KH+MKH	6	16.333	2.517	1.4530	16.000
KH+MKH+BOR	6	20.333	2.082	1.2020	21.000

Tablo 13. 4. hafta sonunda yapılan MTT analizi ile hücre çoğalması ve kemiksi adacık oluşumunun değerlendirilmesi.

Karşılaştırma	Fark	q	P değeri
KH ile KH+BOR	-3.667	3.335ns	P> 0.05
KH ile KH+MKH	-8.667	7.930**	P< 0.01
KH ile KH+MKH+BOR	-12.667	11.590***	P< 0.001
KH+BOR ile KH+MKH	-5.000	4.575*	P< 0.05
KH+BOR ile KH+MKH+BOR	-9.000	8.235**	P< 0.01
KH+MKH ile KH+MKH+BOR	-4.000	3.660ns	P> 0.05

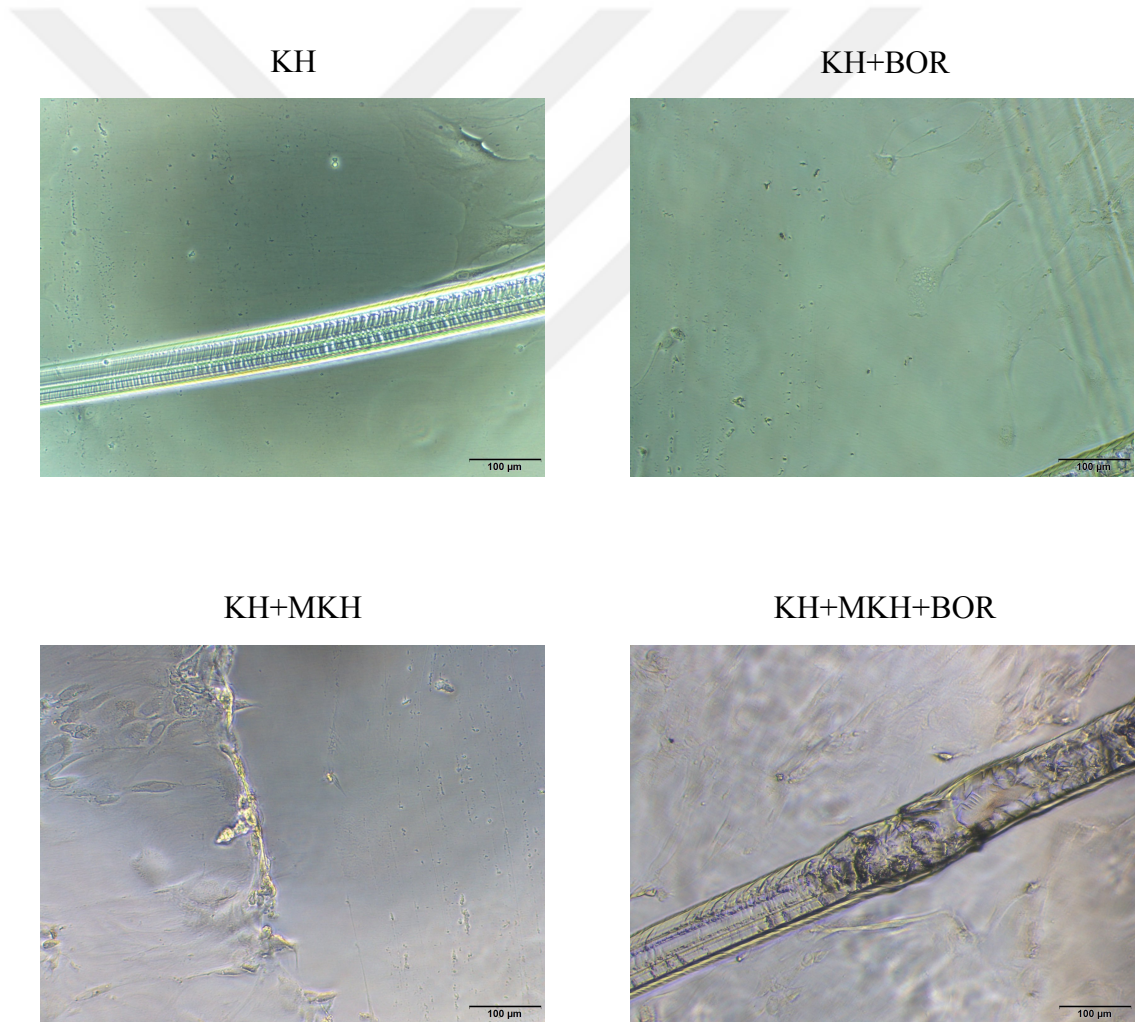
Tablo 14. 4. hafta sonunda hücrelerin çoğalması ve kemiksi adacık oluşumunun istatistiksel analizi.

Kemik halka etkisinin bakıldığı örneklerde AK ve VK boyamalarının, kemik halka kullanılmayan örneklerle benzer olduğu görüldü (Resim 17,18).

4.6. Kültürde Osteojenik Farklılaşma Sonrası Oluşturulan Yara (Çizik) Modeli ile Yara İyileşmesinde Kemik Halkası, Borik Asit ve MKH Etkisinin İncelenmesi

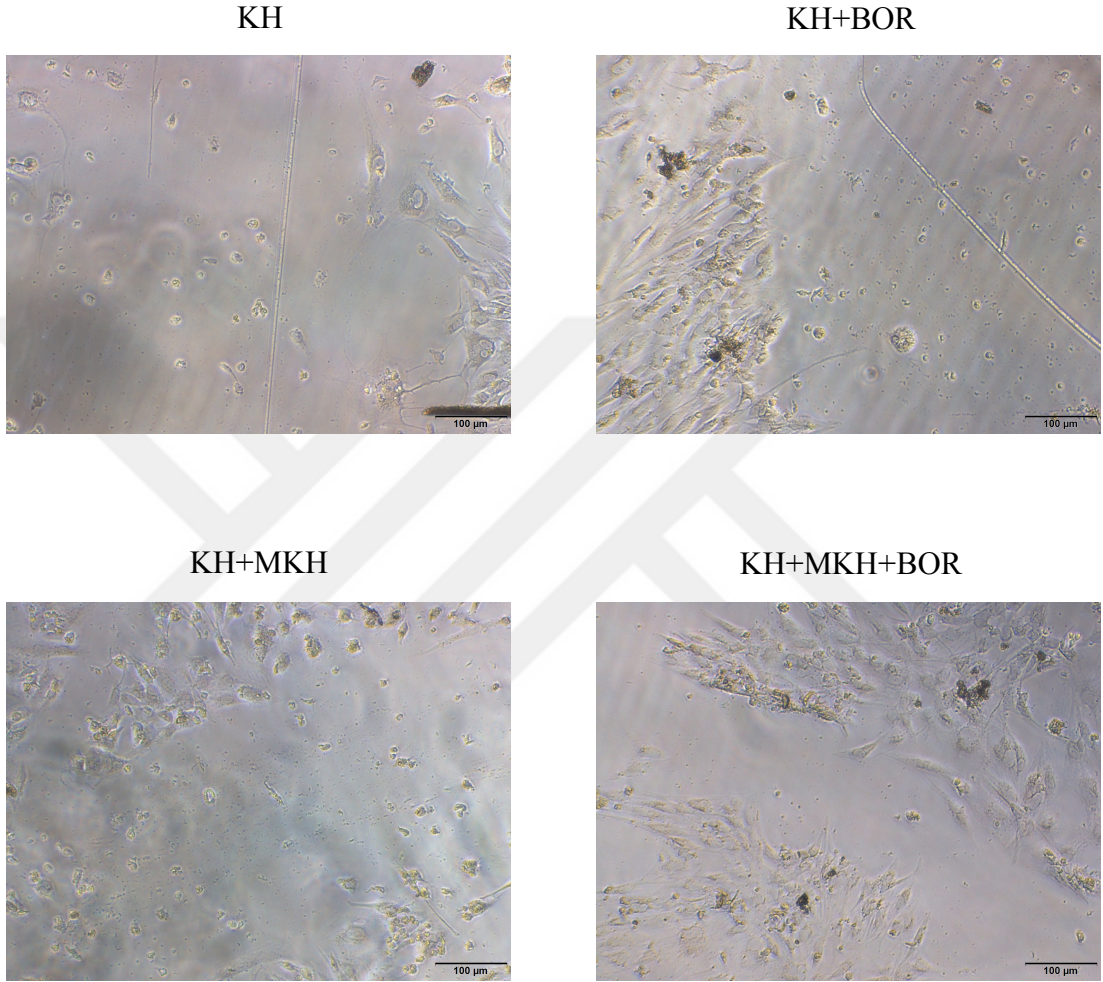
MKH farklılaşması için kullanılan osteojenik besiyerinde oluşan kemiksi dokuya pipet ucu ile yapılan çizik sonrasında gerçekleşen yaranın iyileşme sürecine KH, borik asit ve MKH'nin etkisi incelendi (248).

5. haftada yara yerlerinden hücre çoğalmasının ve iyileşmenin başladığı görüldü. Yara izinin farklı bölgelerinden tamir dokusu oluşmaya başladı (Resim 26).



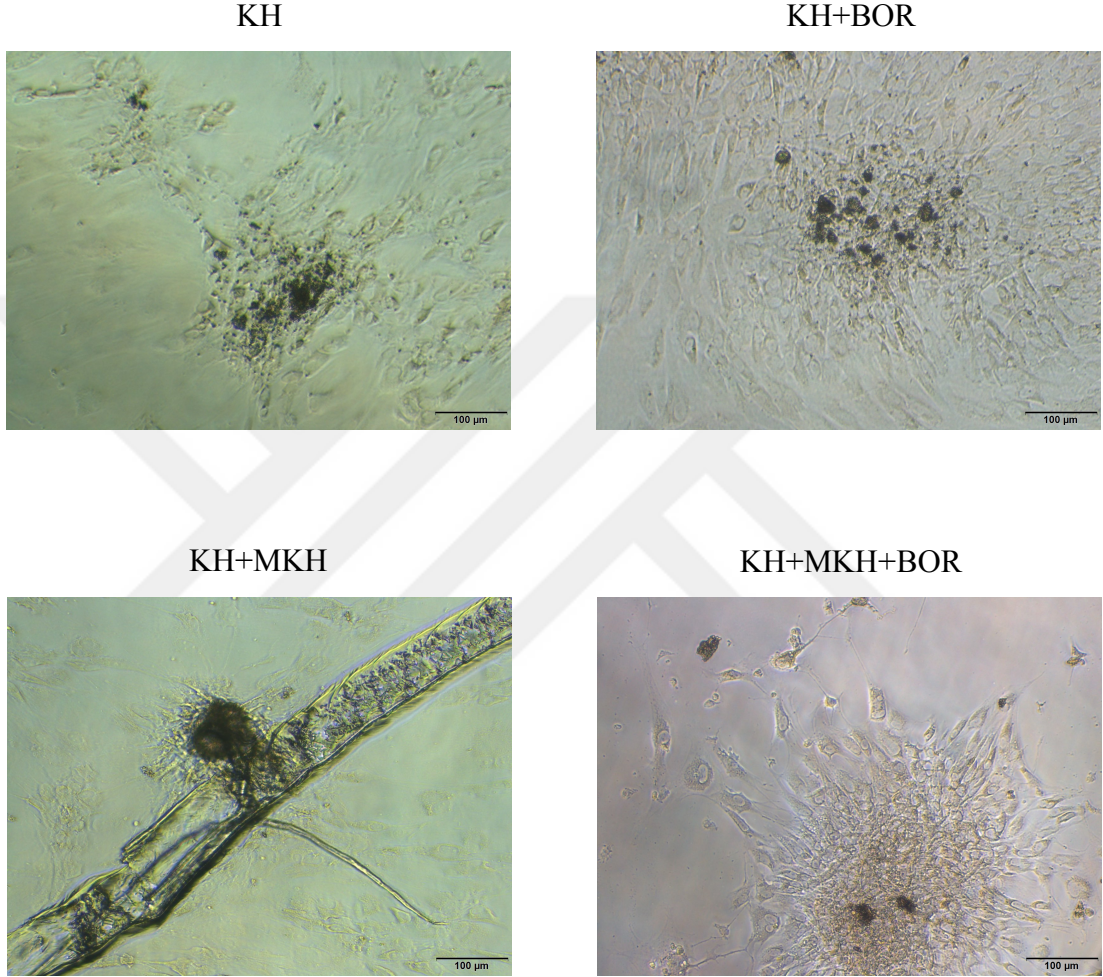
Resim 26. 5. haftada yara yerlerinden hücre çoğalmasının ve iyileşmenin başlaması.

Yara yerlerinde de kenarlardan ortaya doğru kapanma şeklinde hücre çoğalmasının olduğu izlendi. İyileşme MKH ve MKH+BOR gruplarında çok daha belirgin bir biçimde gerçekleşti (Resim 27).



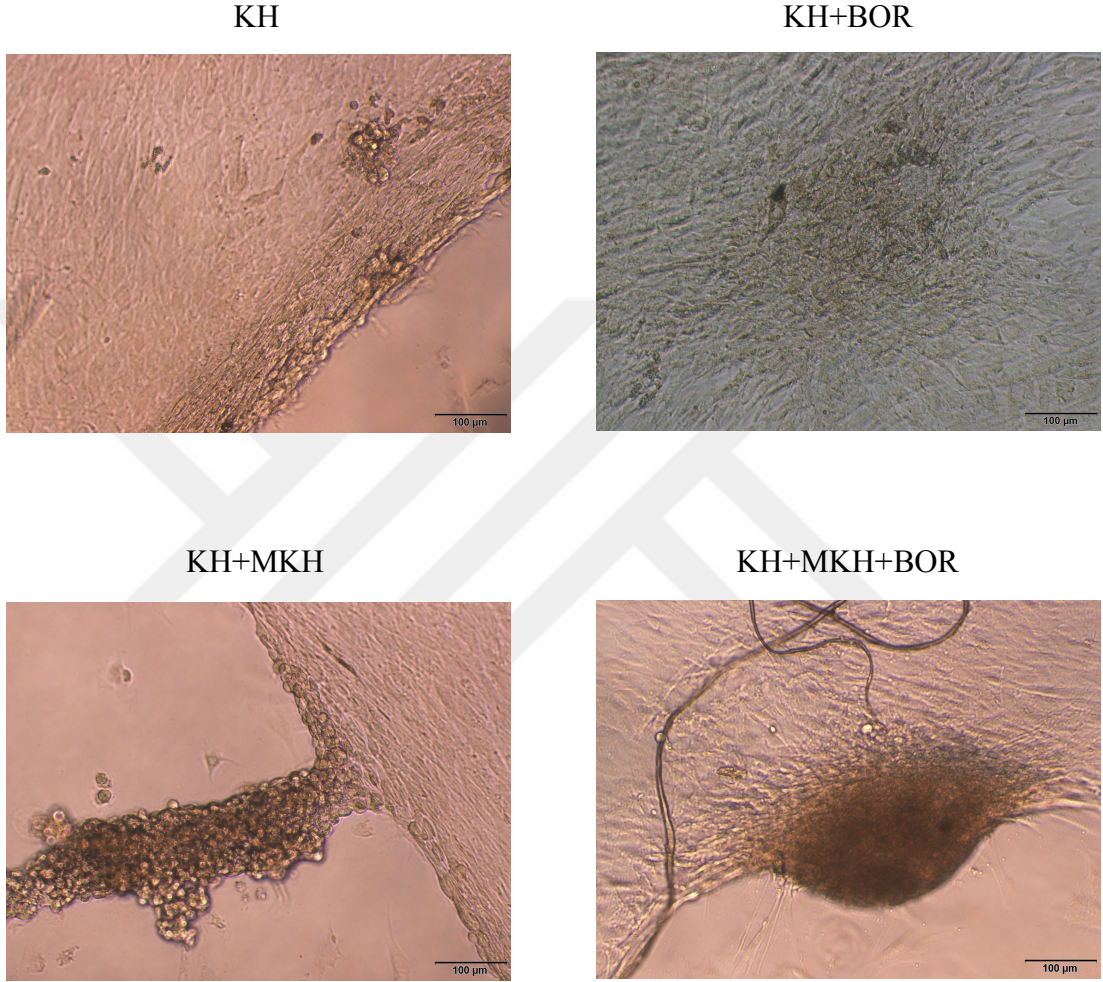
Resim 27. MKH ve MKH+BOR gruplarında çok daha belirgin bir biçimde olacak şekilde yara yerlerinde kapanma şeklindeki hücre çoğalması.

6. haftada yara yerlerinde osteoblastik farklılaşma ve kemiksi adacıklar oluşmaya başladı. Bu durum MKH ve MKH+BOR gruplarında çok daha belirgin bir biçimde gerçekleşti (Resim 28).



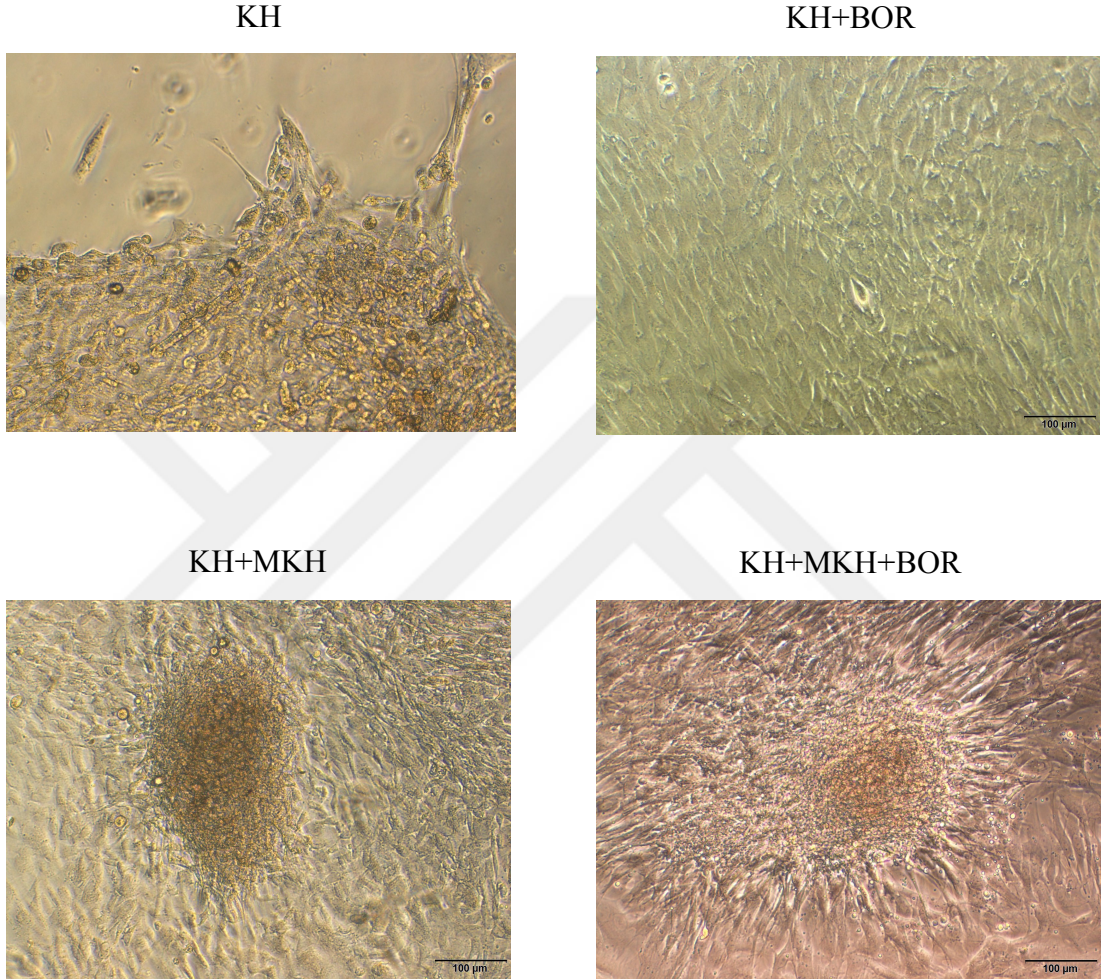
Resim 28. MKH ve MKH+BOR gruplarında çok daha belirgin bir biçimde gerçekleşen, yara yerlerinde osteoblastik farklılaşmanın ve kemiksi adacıkların oluşmaya başlaması.

6. hafta sonunda yara yerlerinin osteoblastik farklılaşma ve kemiksi adacıkların oluşumu ile kapatılması sonucu tedavi tamamlandı. Bu durum MKH ve MKH+BOR gruplarında çok daha belirgin bir biçimde gerçekleşti (Resim 29).



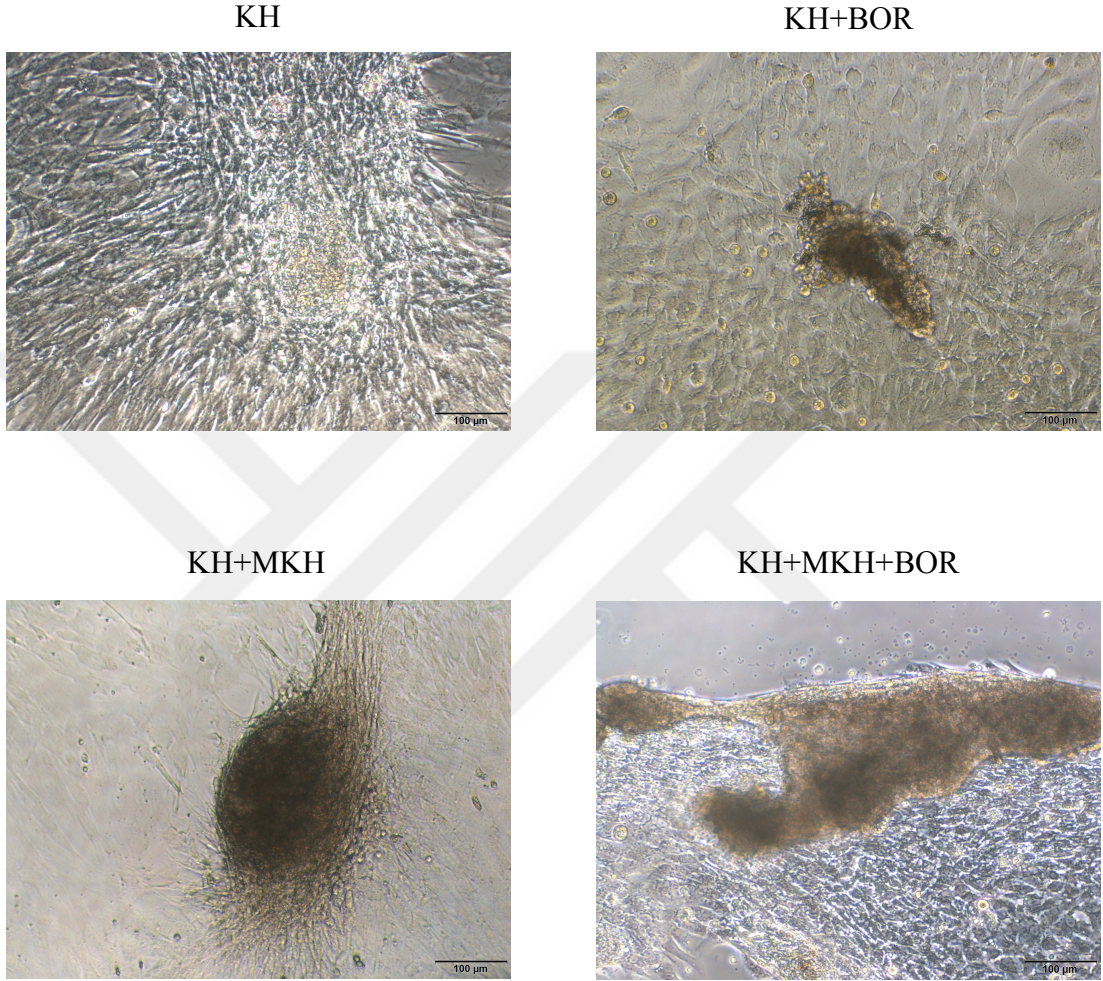
Resim 29. MKH ve MKH+BOR gruplarında çok daha belirgin bir biçimde gerçekleşen, yara yerlerinin osteoblastik farklılaşma ve kemiksi adacıkların oluşumu ile kapatılması.

6. hafta sonunda yara yerleri osteoblastik farklılaşma ve kemiksi adacıkların oluşumu ile kapanırken, KH ve KH+BOR gruplarına kıyasla MKH ve MKH+BOR gruplarında çok daha belirgin bir kemikleşme olduğu gözlemlendi (Resim 30).



Resim 30. KH ve KH+BOR gruplarına kıyasla MKH ve MKH+BOR gruplarında çok daha belirgin bir kemikleşme olduğunun gözlenmesi.

6. hafta sonunda kapanan yara yerlerinde MKH ve MKH+BOR gruplarında çok daha belirgin bir kemikleşme olduğu gözlemlendi (Resim 31).



Resim 31. MKH ve MKH+BOR gruplarında kapanan yara yerlerinde çok daha belirgin bir kemikleşme olduğunun gözlenmesi.

6. hafta sonunda çizik alanında (yara yerlerinde) kapanma (iyileşme) miktarı için yapılan ölçümlerde en az kapanmanın KH grubunda gerçekleştiği gözlenirken en fazla kapanma KH+MKH+BOR grubunda gözlemlendi. KH ve KH+BOR grupları karşılaştırıldığında borik asit içeren grupta daha fazla kapanma olduğu gözlemlendi, fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$). MKH içeren gruplarla kök hücre içermeyen gruplar karşılaştırıldığında kök hücre içeren gruplarda daha fazla kapanma olduğu gözlemlendi ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlıydı ($P < 0.001$ ve $P < 0.01$). MKH içeren gruplar içerisinde borik asit ilave edilen grupta kapanmanın daha fazla olduğu saptandı ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($P>0.05$) görüldü (Tablo 16).

Gruplar	Nokta sayısı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	Medyan
KH	6	0.7467	0.12220	0.07055	0.7200
KH+BOR	6	0.5567	0.08622	0.04978	0.5400
KH+MKH	6	0.2833	0.03512	0.02028	0.2800
KH+MKH+BOR	6	0.1933	0.05132	0.02963	0.1800

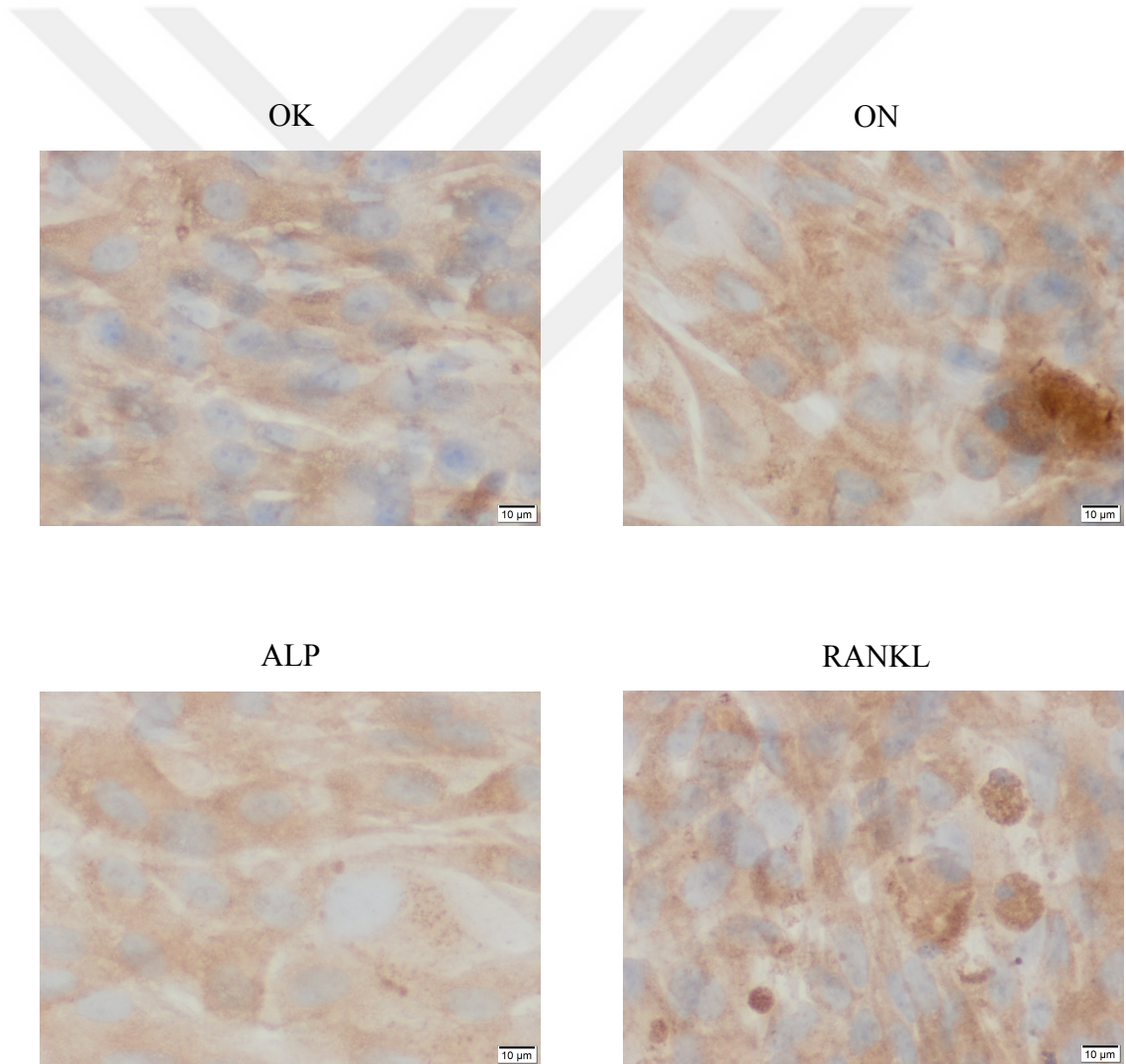
Tablo 15. 6. hafta sonunda çizik alanında kapanma için yapılan ölçümlerle iyileşmenin değerlendirilmesi.

Karşılaştırma	Fark	q	P değeri
KH ile KH+BOR	0.1900	4.064ns	P> 0.05
KH ile KH+MKH	0.4633	9.910**	P< 0.001
KH ile KH+MKH+BOR	0.5533	11.835***	P< 0.001
KH+BOR ile KH+MKH	0.2733	5.846*	P< 0.05
KH+BOR ile KH+MKH+BOR	0.3633	7.771**	P< 0.01
KH+MKH ile KH+MKH+BOR	0.0900	1.925ns	P> 0.05

Tablo 16. 6. hafta sonunda çizik alanında kapanmanın istatistiksel analizi.

4.7. Kültürde Osteojenik Farklılaşmanın ve Kemiksi Adacık Oluşumunun İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu ve Bu Duruma Kemik Halkası, Borik Asit ve MKH'nin Etkisi

Osteojenik besiyerinde farklılaşmanın belirteçleri olarak Osteonektin (ON), Osteokalsin (OK), Alkalen Fosfataz (ALP) ve RANKL protein ekspresyonu immünohistokimyası, kemiksi adacık oluşumu için ise Alizarin Kırmızısı ve Von Kossa histokimyası kullanıldı. Osteonektin, Osteokalsin, Alkalen fosfataz ve RANKL protein ekspresyonu immünohistokimyasında hücrelerin spesifik olarak boyandıkları ve boyanmanın gruplar arasında sayı ve yoğunluk olarak değiştiği farklı büyütmelerde görüldü (Resim 32).

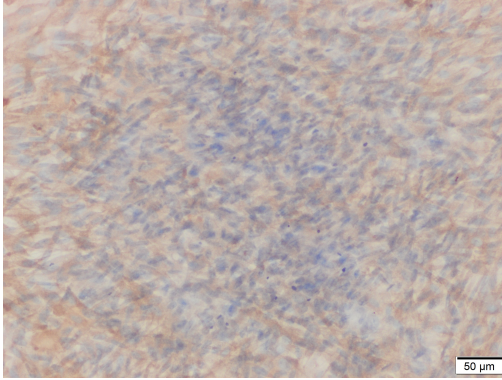


Resim 32. Belirteç immünohistokimyasında hücrelerin spesifik olarak boyanmaları.

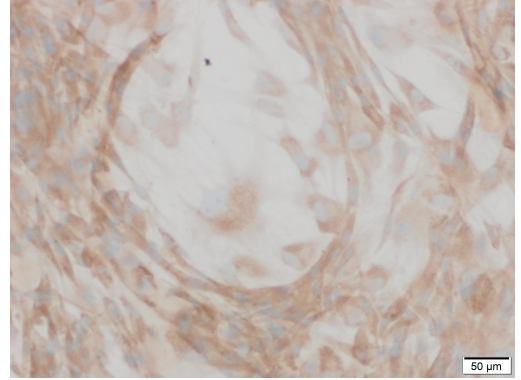
4.7.1. Osteokalsin (OK) İmmunohistokimyası

OK immunohistokimyasında 4. hafta sonunda hücrelerin çoğunluğunun boyandığı görüldü (Resim 33). H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma KH grubunda izlenirken en fazla boyanma KH+MKH+BOR grubunda izlendi. KH ve KH+BOR grupları karşılaştırıldığında borik asit içeren grupta daha fazla boyanma olduğu görüldü fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$). KH ve KH+MKH grupları kıyaslandığında kök hücre içeren grupta daha fazla boyanma olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak az anlamlı bulundu ($P<0.05$). KH ve KH+MKH+BOR grupları kıyaslandığında kök hücre ve borik asit içeren grubun belirgin şekilde çok daha fazla boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak çok anlamlı bulundu ($P<0.001$). KH+BOR ve KH+MKH grupları karşılaştırıldığında kök hücre içeren grupta daha fazla boyanma olduğu görüldü fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$). KH+BOR ve KH+MKH+BOR grupları kıyaslandığında borik asit ve kök hücrenin bir arada bulunduğu grupta daha fazla boyanma olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.01$). KH+MKH ve KH+MKH+BOR grupları kıyaslandığında borik asit ve kök hücrenin bir arada bulunduğu grupta daha fazla boyanma olduğu fakat bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($P>0.05$) görüldü (Tablo 18).

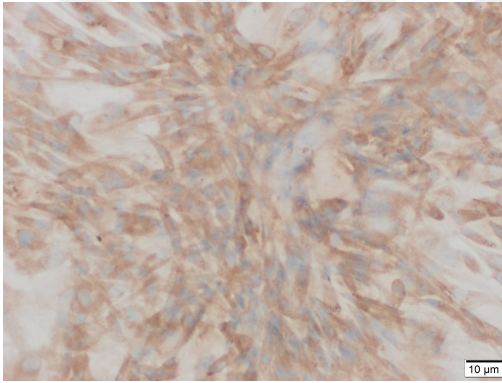
KH



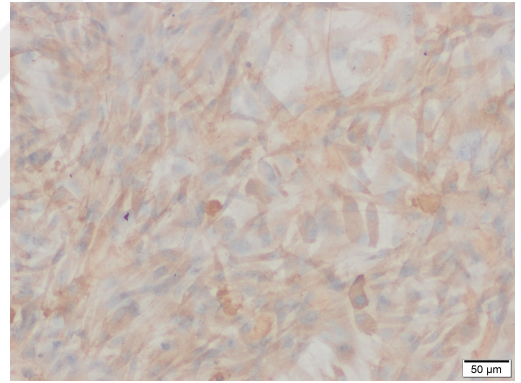
KH+BOR



KH+MKH



KH+MKH+BOR



Resim 33. 4. hafta sonunda OK immunohistokimyası görüntüleri.

Gruplar	Nokta sayısı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	Medyan
KH	6	182.67	8.021	4.631	182.00
KH+BOR	6	191.67	6.506	3.756	192.00
KH+MKH	6	214.67	11.240	6.489	212.00
KH+MKH+BOR	6	234.33	11.590	6.692	236.00

Tablo 17. 4. hafta sonunda H-skor ile yapılan analiz ile OK immunohistokimya görüntülerinin değerlendirilmesi.

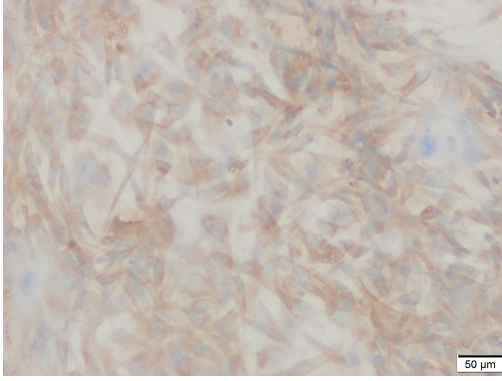
Karşılaştırma	Fark	q	P değeri
KH ile KH+BOR	-9.000	1.627ns	P> 0.05
KH ile KH+MKH	-32.000	5.784*	P< 0.05
KH ile KH+MKH+BOR	-51.667	9.338***	P< 0.001
KH+BOR ile KH+MKH	-23.000	4.157ns	P> 0.05
KH+BOR ile KH+MKH+BOR	-42.667	7.712**	P< 0.01
KH+MKH ile KH+MKH+BOR	-19.667	3.555ns	P> 0.05

Tablo 18. OK immunohistokimyasının istatistiksel analizi.

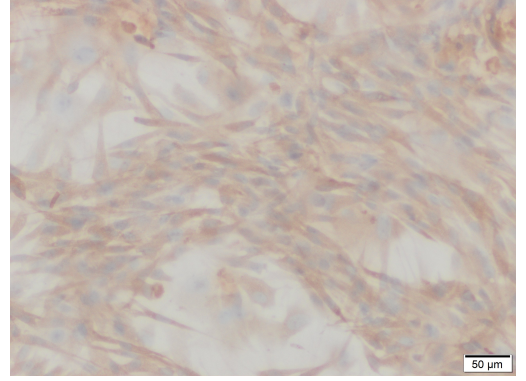
4.7.2. Ostenektin (ON) İmmunohistokimyası

ON immunohistokimyasında 4. hafta sonunda hücrelerin çoğunluğunun boyandığı görüldü (Resim 34). H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma KH grubunda izlenirken en fazla boyanma KH+MKH+BOR grubunda izlendi. KH ve KH+BOR grupları karşılaştırıldığında borik asit içeren grupta daha fazla boyanma olduğu görüldü fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$). KH ve KH+MKH grupları kıyaslandığında kök hücre içeren grupta daha fazla boyanma olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak çok anlamlı bulundu ($P<0.001$). KH ve KH+MKH+BOR grupları kıyaslandığında kök hücre ve borik asit içeren grubun belirgin şekilde çok daha fazla boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak çok anlamlı bulundu ($P<0.001$). KH+BOR ve KH+MKH grupları karşılaştırıldığında kök hücre içeren grupta daha fazla boyanma olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak az anlamlı bulundu ($P<0.05$). KH+BOR ve KH+MKH+BOR grupları kıyaslandığında borik asit ve kök hücrenin bir arada bulunduğu grupta daha fazla boyanma olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.01$). KH+MKH ve KH+MKH+BOR grupları kıyaslandığında borik asit ve kök hücrenin bir arada bulunduğu grupta daha fazla boyanma olduğu fakat bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($P>0.05$) görüldü (Tablo 20).

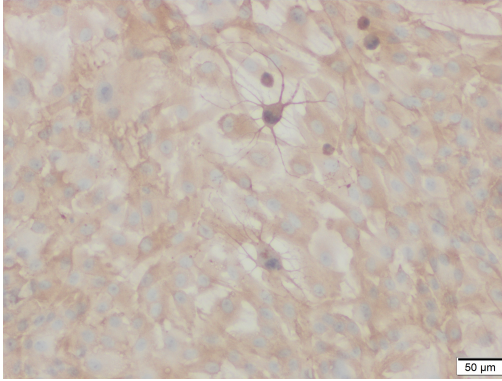
KH



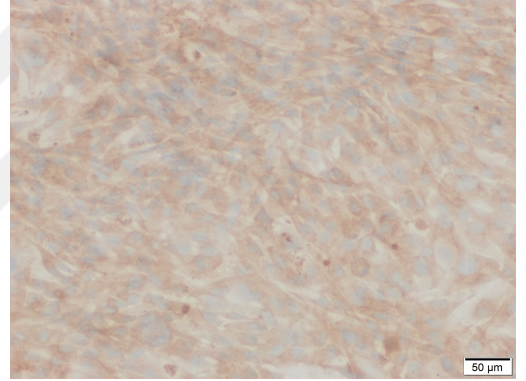
KH+BOR



KH+MKH



KH+MKH+BOR



Resim 34. 4. hafta sonunda ON immunohistokimyası görüntüleri.

Gruplar	Nokta sayısı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	Medyan
KH	6	155.33	13.013	7.513	156.00
KH+BOR	6	174.00	12.000	6.928	174.00
KH+MKH	6	210.67	6.658	3.844	209.00
KH+MKH+BOR	6	221.00	8.888	5.132	218.00

Tablo 19. 4. hafta sonunda H-skor ile yapılan analiz ile ON immunohistokimya görüntülerinin değerlendirilmesi.

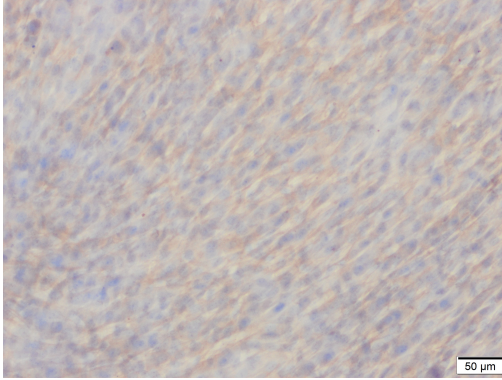
Karşılaştırma	Fark	q	P değeri
KH ile KH+BOR	-18.667	3.094ns	P> 0.05
KH ile KH+MKH	-55.333	9.173***	P< 0.001
KH ile KH+MKH+BOR	-65.667	10.886***	P< 0.001
KH+BOR ile KH+MKH	-36.667	6.078*	P< 0.05
KH+BOR ile KH+MKH+BOR	-47.000	7.791**	P< 0.01
KH+MKH ile KH+MKH+BOR	-10.333	1.713ns	P> 0.05

Tablo 20. ON immunohistokimyasının istatistiksel analizi.

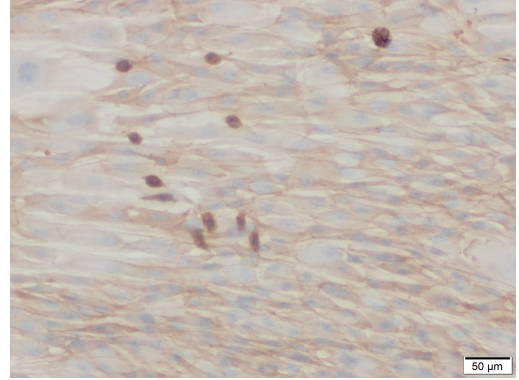
4.7.3. Alkalen Fosfataz (ALP) İmmunohistokimyası

ALP immunohistokimyasında 4. hafta sonunda hücrelerin çoğunluğunun boyandığı görüldü (Resim 35). H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma KH grubunda izlenirken en fazla boyanma KH+MKH+BOR grubunda izlendi. KH ve KH+BOR grupları karşılaştırıldığında borik asit içeren grupta daha fazla boyanma olduğu görüldü fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$). KH ve KH+MKH grupları kıyaslandığında kök hücre içeren grupta daha fazla boyanma olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak çok anlamlı bulundu ($P<0.001$). KH ve KH+MKH+BOR grupları kıyaslandığında kök hücre ve borik asit içeren grubun belirgin şekilde çok daha fazla boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak çok anlamlı bulundu ($P<0.001$). KH+BOR ve KH+MKH grupları karşılaştırıldığında kök hücre içeren grupta daha fazla boyanma olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak çok anlamlı bulundu ($P<0.001$). KH+BOR ve KH+MKH+BOR grupları kıyaslandığında borik asit ve kök hücrenin bir arada bulunduğu grupta daha fazla boyanma olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak çok anlamlıydı ($P<0.001$). KH+MKH ve KH+MKH+BOR grupları kıyaslandığında borik asit ve kök hücrenin bir arada bulunduğu grupta daha fazla boyanma olduğu fakat bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($P>0.05$) görüldü (Tablo 22).

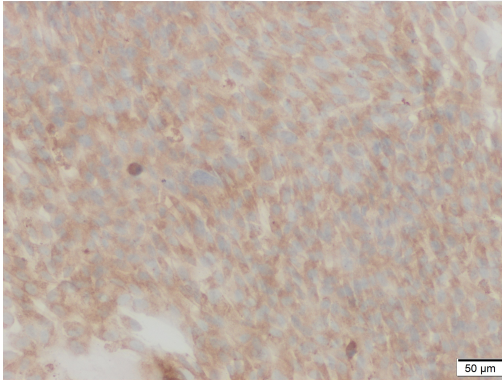
KH



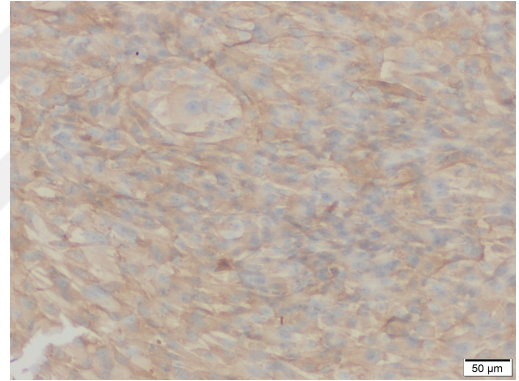
KH+BOR



KH+MKH



KH+MKH+BOR



Resim 35. 4. hafta sonunda ALP immunohistokimyası görüntüleri.

Gruplar	Nokta sayısı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	Medyan
KH	6	149.17	12.238	4.996	147.50
KH+BOR	6	165.17	14.317	5.845	164.50
KH+MKH	6	203.83	10.722	4.377	206.50
KH+MKH+BOR	6	218.00	8.462	3.454	216.00

Tablo 21. 4. hafta sonunda H-skor ile yapılan analiz ile ALP immunohistokimya görüntülerinin değerlendirilmesi.

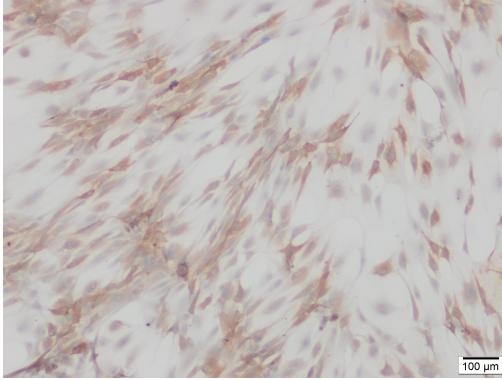
Karşılaştırma	Fark	q	P değeri
KH ile KH+BOR	-16.000	3.369ns	P> 0.05
KH ile KH+MKH	-54.667	11.511***	P< 0.001
KH ile KH+MKH+BOR	-68.833	14.494***	P< 0.001
KH+BOR ile KH+MKH	-38.667	8.142***	P< 0.001
KH+BOR ile KH+MKH+BOR	-52.833	11.125***	P< 0.001
KH+MKH ile KH+MKH+BOR	-14.167	2.983ns	P> 0.05

Tablo 22. ALP immunohistokimyasının istatistiksel analizi.

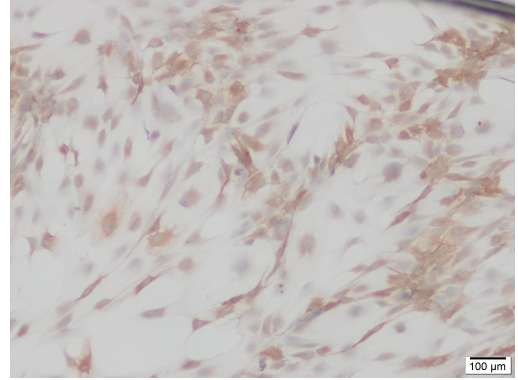
4.7.4. RANKL İmmunohistokimyası

RANKL immunohistokimyasında 4. hafta sonunda hücrelerin çoğunluğunun boyandığı görüldü (Resim 36). H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma KH grubunda izlenirken en fazla boyanma KH+MKH+BOR grubunda izlendi. KH ve KH+BOR grupları karşılaştırıldığında borik asit içeren grupta daha fazla boyanma olduğu görüldü fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$). KH ve KH+MKH grupları kıyaslandığında kök hücre içeren grupta daha fazla boyanma olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.01$). KH ve KH+MKH+BOR grupları kıyaslandığında kök hücre ve borik asit içeren grubun belirgin şekilde çok daha fazla boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak çok anlamlı bulundu ($P<0.001$). KH+BOR ve KH+MKH grupları karşılaştırıldığında kök hücre içeren grupta daha fazla boyanma olduğu görüldü fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$). KH+BOR ve KH+MKH+BOR grupları kıyaslandığında borik asit ve kök hücrenin bir arada bulunduğu grupta daha fazla boyanma olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.01$). KH+MKH ve KH+MKH+BOR grupları kıyaslandığında borik asit ve kök hücrenin bir arada bulunduğu grupta daha fazla boyanma olduğu fakat bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($P>0.05$) görüldü (Tablo 24).

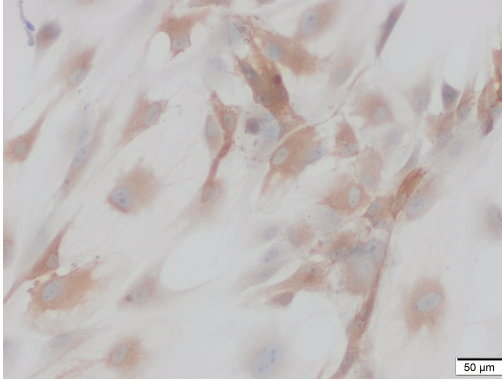
KH



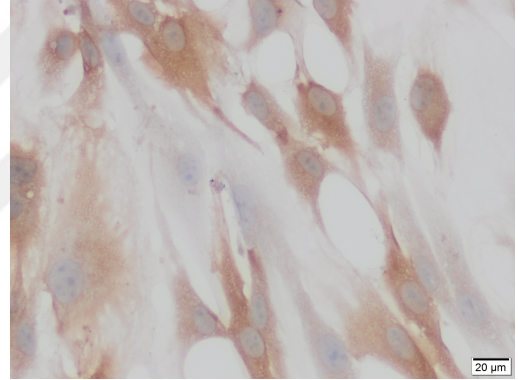
KH+BOR



KH+MKH



KH+MKH+BOR



Resim 36. 4. hafta sonunda RANKL immunohistokimyası görüntüleri.

Gruplar	Nokta sayısı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	Medyan
KH	6	173.50	22.052	9.003	176.00
KH+BOR	6	192.67	22.196	9.062	195.50
KH+MKH	6	222.33	14.501	5.920	221.50
KH+MKH+BOR	6	236.50	20.276	8.277	233.50

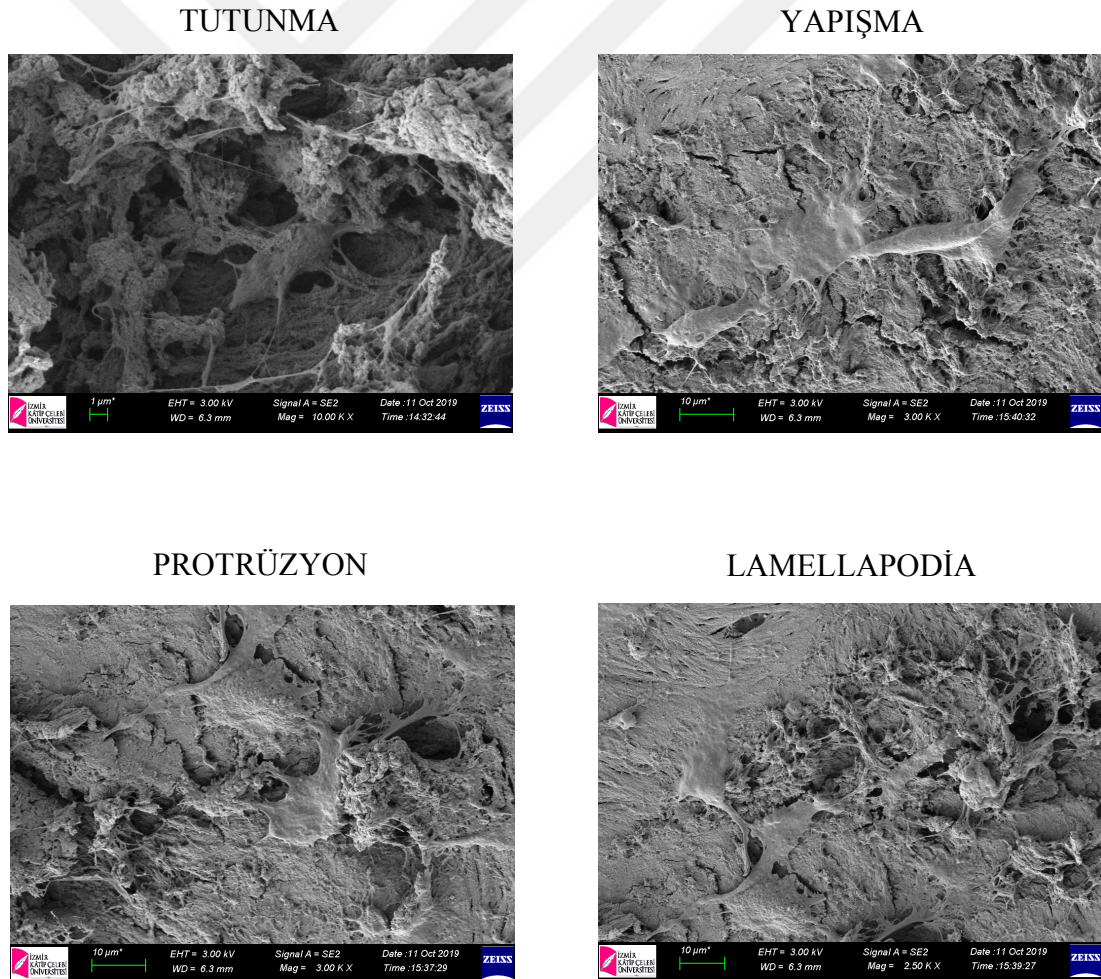
Tablo 23. 4. hafta sonunda H-skor ile yapılan analiz ile RANKL immunohistokimya görüntülerinin değerlendirilmesi.

Karşılaştırma	Fark	q	P değeri
KH ile KH+BOR	-19.167	2.347ns	P> 0.05
KH ile KH+MKH	-48.833	5.980**	P< 0.01
KH ile KH+MKH+BOR	-63.000	7.715***	P< 0.001
KH+BOR ile KH+MKH	-29.667	3.633ns	P> 0.05
KH+BOR ile KH+MKH+BOR	-43.833	5.368**	P< 0.01
KH+MKH ile KH+MKH+BOR	-14.167	1.735ns	P> 0.05

Tablo 24. RANKL immunohistokimyasının istatistiksel analizi.

4.8. Kültürde Osteojenik Farklılaşma Sonrası Oluşturulan Yara (Çizik) Modeli İle Yara İyileşmesinde Kemik Halkası, Borik Asit ve MKH Etkisinin SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ile İncelenmesi

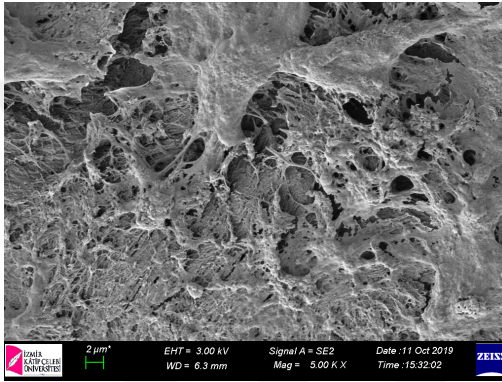
MKH'lerin osteoblastik farklılaşma sürecindeki koloni oluşumu, KH ve borik asitin MKH'lerin hücre davranışına yaptığı etkiler SEM ile incelendi. Morfolojik değişiklikler olarak uzun sitoplazmik çıkıntılar ve hücreler arasında bağlantı şeklinde yapışmalar görüldü. Uzun sitoplazmik yumrular, çıkıntılar, protrüzyonlar ve mikrovilli ile tutunma davranışları izlendi. Özellikle yüksek orandaki büyütmelerde yayılımı olan hücre sitoplazmasının kabarcıklar yaptığı, lamellepodia ve filapodialar oluşturarak çevresi ile ilişki kurmaya ve tutunmaya çalıştığı görüldü (Resim 37).



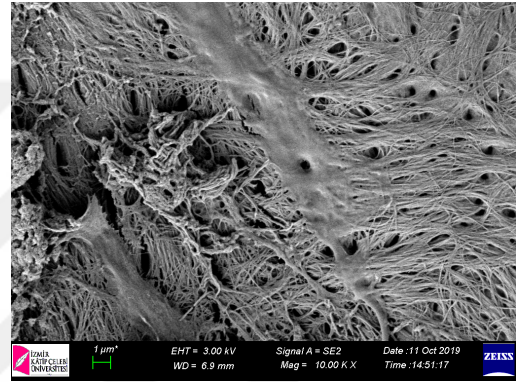
Resim 37. MHK'lerde morfolojik değişiklikler olarak uzun sitoplazmik çıkıntılar ve hücreler arasında bağlantı şeklinde yapışmaların görülmesi.

Özellikle yüksek orandaki büyütmelerde yayılımı olan hücre sitoplazmasının kabarcıklar yaptığı, lamellepodia ve filapodialar oluşturarak çevresi ile ilişki kurmaya ve tutunmaya çalıştığı görüldü. Morfolojik değişiklikler içinde tutunmanın borik asit ve MKH'nin birlikte kullanımlarında daha belirgin olduğu izlendi. Uzun sitoplazmik yumrular, çıkıntılar, protrusionlar ve mikrovilli ile tutunma davranışlarının borik asit ve MKH'nin birlikte kullanımlarında daha belirgin olduğu görüldü (Resim 38).

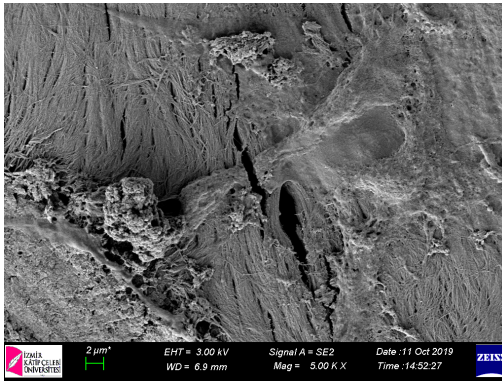
KH



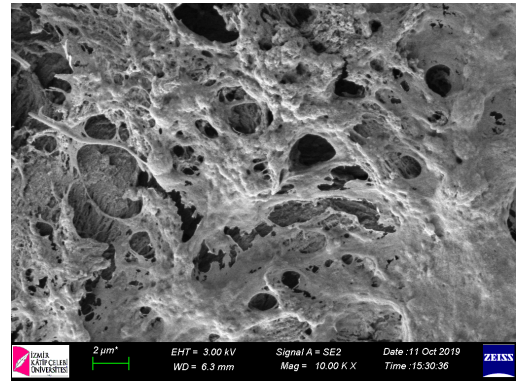
KH+BOR



KH+MKH



KH+MKH+BOR



Resim 38. Borik asit ve MKH'nin birlikte kullanımlarında daha belirgin olan uzun sitoplazmik yumrular, çıkıntılar, protrusionlar ve mikrovilli ile tutunma davranışları.

TARTIŞMA

Bu çalışma ağız, diş ve çene cerrahisi pratiğinde önemli bir yeri bulunan kemik rejenerasyonu uygulamalarındaki osteojenik ve osteoindüktif etkinin artırılması amacıyla, mezenkimal kök hücre ve borik asit kombinasyonunun, kültür ortamındaki kemik defekti modeli üzerindeki etkilerinin incelenmesi ve kemik dokusunun bu duruma olan katkısının değerlendirilmesi amacıyla yapıldı. Diş hekimliğinin, özellikle de ağız cerrahisinin, en önemli araştırma konularından biri olan kemik iyileşmesi, kemik rejenerasyonu ve erken dönemde osteoblastik farklılaşma kültür ortamında kemik eksplantları (halkaları) ile taklit edildi. Doğrudan deney hayvanı (in vivo) aşamasına geçilmeden önce daha etik, daha az maliyetli ve daha öngörülebilir uygulamaların etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Kemik dokusu faktörü olmadan yapılmış çok fazla çalışma mevcut olmasına rağmen kültür ortamında in vivo durumu daha iyi temsil edebilmesi amacıyla kemik dokusu kullanımı daha önce yapılmamış, özgün bir deneysel çalışmadır. Kemikten gelen hücre ve sinyallerin etkisini gösteren başka bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Çalışmada elde edilen temel bulgular boş bırakılan kemik halkalarının (kontrol grubu) içerisinde iki hafta sonra hücre çoğalmasının başlaması ve bu duruma borik asit eklenen ortamlarda hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının daha erken ve daha hızlı gerçekleşmesinin eşlik etmesidir. MKH uygulanan ortamlarda uygulanmayanlara kıyasla hücre çoğalması ve osteoblastik farklılaşma çok daha hızlı gerçekleşmiştir. Borik asit bu durumda da çoğalma ve farklılaşmayı etkin ve anlamlı bir şekilde hızlandırmış ve arttırmıştır. Önceki çalışmalarda başka amaçlarla kullanılan kültür ortamında çizik yaparak yara oluşturma modelinin bu çalışmada kırık oluşturma modeline uyarlanması ile MKH ve borik asit uygulamalarının bireysel olarak anlamlı olduğu, birlikte kullanımlarının ise oldukça anlamlı bir şekilde yaranın kapanarak iyileşmesini sağladığı görülmüştür. Kullanılan MKH karakterizasyonu CD90, CD73, CD44 ve Stro1 pozitif, CD45 ve CD34 negatif olma kriterleri ile sağlanmıştır. Osteoblastik farklılaşma ON, OK, ALP ve RANKL antikoru ile mineralize kemiksi adacık oluşumu ise AK ve VK boyamaları ile gösterilmiştir. Oluşan etkiler sonrasında hücre davranışı SEM ile incelendi. Oluşan etkilerin histokimyasal, immunohistokimyasal ve morfometrik

analizlerinde anlamlı sonuçlar alındı. Deneysel modelde alınan tüm sonuçların deney hayvanı ve faz çalışmalarını yönlendirecek önemli bilgiler sağlandı.

Seçim soketlerinin iyileşmesi, alveoler kemik defektlerinin onarımı ve yönlerdirilmiş kemik rejenerasyonu uygulamalarında, osteoindüktif potansiyeli arttırmak için birçok yöntem kullanılmaktadır. Günümüzde yaygın kullanılan trombositten zengin plazma (PRP), trombositten zengin fibrin (PRF) çeşitleri, konsantre büyüme faktörleri (PRGF), kemik morfojenik proteinleri (BMP) gibi osteoindüksiyonu arttıracak ajanlardan bu amaçla yararlanılmasına klinik pratikte sıkça rastlanmaktadır fakat birçoğunun etkinliği bilimsel olarak tartışmalıdır (249-251). Doku mühendisliği istenen dokuyu üretmek için; bir progenitör veya kök hücre, progenitör hücrelere gerekli indüktif sinyalleri sağlamak için büyüme faktörleri ve büyüyen dokunun uygun 3 boyutlu konfigürasyonunu yönlendirmek için bir iskele olmak üzere 3 ana bileşen gerektirir (76). Osteokondüktif materyaller kemik hücrelerinin yer değiştirmesine ve kemik oluşumuna izin veren osteokondüksiyon özelliklerine sahiptir. Bununla birlikte, osteokondüktif materyaller büyük ölçekli kemik kusurlarını tamamen kapatamazlar, bu yapılar içerisindeki hücresel açığı telafi etmek şarttır. Bu nedenle çalışmamızda kemik halkası osteokondüktif ve osteoindüktif etkileri, içerdiği progenitör hücreler ve sinyal faktörlerinden faydalanmak amacıyla kullanıldı ve iki boyutlu kültür ortamında MKH'ler üzerindeki etkileri araştırıldı. Bu etkilerin MKH ve borik asit ile olan etkileşimleri ise daha önce incelenmemiş olmasından dolayı çalışmamız özgün ve anlamlıdır. Çalışmamızda kemik doku mühendisliğinde osteogenezi sağlayacak MKH'lere ve bu MKH'lerin osteoindüksiyonunu arttıracak borik asit gibi minerallere olan ihtiyacın mekanizmaları histolojik, immünohistokimyasal ve elektromikroskopik olarak araştırıldı.

Son yıllarda MKH'lerin osteoindüksiyon ve osteogenez üzerindeki etkinliği, hem kültür ortamında hem de in vivo çalışmalar ile gösterilmiştir. Dolayısıyla MKH'ler klinik deneylerde yoğun bir şekilde araştırılıp güvenli bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (252). MKH ile yapılan tedaviler sonrasında alınan sonuçlar kişiye özel olup her defasında istenilen başarının elde edilememesi, osteoblastik farklılaşma ve kemik iyileşmesinin hala araştırılması ve mekanizmaların anlaşılıp başarının mükemmelleştirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Bizim çalışmamızın amacı da bu ihtiyaçla ortaya çıkmıştır.

MKH ilk olarak kemik iliğinde bulunmuş ve yaklaşık 20 yıl boyunca kemik iyileşmesini teşvik etmek amacıyla kullanılmıştır (5). Daha sonra diş pulpası ve yağ dokusu ile damarlar gibi hemen her dokuda MKH bulunduğu anlaşılmıştır. Kaynaklarına veya özelliklerine göre değişmekle birlikte, MKH popülasyonlarının kemik rejenerasyonu üzerine göreceli avantajları bulunmuştur (6). Kemik doku mühendisliği çekim soketlerinin hızlı iyileşmesi, alveoler kemik defektlerinin onarımı, kemik ogmentasyon prosedürleri gibi çeşitli uygulamaların başarı oranını arttırarak günümüz klinik pratiğinde çok fazla yer bulmaya başlamıştır. Kök hücrelerin ve çeşitli büyüme faktörlerinin çeşitli biyolojik iskeleler, otolog kan ürünleri ve greft materyalleri ile birlikte kullanımı kemik rejenerasyon hızını ve kalitesini arttırmakta ve daha öngörülebilir sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır (7,8). Çalışmamızdan çıkan sonuçlar, sadece MKH için değil aynı zamanda borik asit ile olan etkileşiminin de bir sonucu olarak, oldukça etkin şekilde kültür ortamındaki iyileşmenin arttığını göstermektedir ve bu bulgular literatür ile uyumludur. Kemik halkası kullanımının, içerdiği progenitör hücreler ve sinyal faktörleri yoluyla, iyileşmeyi etkilediğinin gösterilmesi özgün ve anlamlıdır.

Kemik, yenilenme ve rejenerasyon kapasitesine sahip dinamik bir doku olmasına rağmen kemik defektlerinin yeniden yapılandırılması önemli bir klinik zorluk olmaya devam etmektedir. Kök hücrelerin ve doku mühendisliğinde kullanılan yapı iskelelerinin implantasyonunu içeren yeni teknikler hem yaralanmanın, hem de cerrahi onarımın morbiditesini azaltmak için kemik defektlerinin rejeneratif potansiyelini geliştirmeye yardımcı olmaktadır (209,210,253).

YKH'lerin mezodermal orijinleri nedeniyle adipojenik, osteojenik, kondrojenik, miyojenik, anjiyojenik, kardiyomiyojenik, tendonojenik ve periodontojenik soylara farklılaşabileceği yaygın olarak kabul görmüştür. İn vitro YKH farklılaşması, köken spesifik indüksiyon faktörleri içeren seçici ortam tarafından indüklenir (209,210). MKH'ler osteoblastlara, kondrositlere ve adipositlere farklılaşabilen önemli bir kök hücre sınıfıdır (254). Özellikle osteoblastlara farklılaşması kemik dokusu rejenerasyonu ve onarımı için kritik öneme sahiptir (255). Çalışmamızda YKH'ler kullanılıp osteoblasta farklılaşmaları immünohistokimyasal karakterizasyon ile gösterildi ve bu literatürdeki çalışmalar ile uyumlu bulundu.

Yakın zamana kadar yetişkin kök hücrelerin sadece köken aldıkları dokuların veya organların karakteristiğine sahip soylara farklılaşabildikleri düşünülmesine rağmen, son çalışmalar yetişkin kök hücrelerinin daha önce düşünülenden daha fazla farklılaşma kabiliyetine sahip olduğunu, yumuşak doku yaralanmaları, kemik yaralanmaları, yara iyileşmesi ve yaşlanma üzerine etkileri olabileceğini göstermiştir (256). Bunun yanında pluripotent yetişkin kök hücreler tümör oluşumu açısından bu güne kadar hiçbir olumsuz etki göstermemiştir. Ayrıca birkaç çalışmada tümör metastasını arttırdığı ve kistik oluşumlara neden olduğu düşünülmüş olsa da meta analizlere bakıldığında olumsuz etkisi yok gibi gözükmektedir. Klinik açıdan bakıldığında yetişkin kök hücrelerin çoğaltılması, farklılaştırılması ve kullanılması kolay aynı zamanda az maliyetli olduğu tespit edilmiştir. Kök hücrelerin otolog veya allogenic olarak kullanılabileceği literatürlerde rapor edilmiştir. Ayrıca immünsüpresif etkileri *growth versus host* hastalığında klinik olarak gösterilmiştir (257-259). Bu önemli avantajlar göz önüne alındığında yetişkin kök hücre tedavisi birçok alanda çekici alternatif haline gelmiştir. Çalışmamızdan elde edilen veriler deney hayvanı ve faz çalışmalarının yapılması durumunda bu ürünlerin klinikte anlamlı sonuçlar vereceğini düşündürdü.

MKH'ler başlangıçta kemik iliğinden izole edilmiş ve bu bölgenin MKH'lerin ana kaynağı olduğu düşünülmüştür. Fakat son yıllarda, MKH'lerin yağ, dermis, periosteum, göbek kordonu, kan, plasenta, amniyotik ve sinovyal sıvı dahil olmak üzere birçok farklı yetişkin ve fetal dokudan izole edilebileceği tespit edilmiştir. Tüm bu MKH kaynaklarının göz önünde bulundurulması önemli olmakla birlikte YKH'ler hasat kolaylığı, minimal donör bölge morbiditesi ve göreceli bolluğu göz önüne alındığında diğer kaynaklara göre özellikle önemlidir (260). Olağanüstü farklılaşma potansiyellerine sahip YKH'ler, azaltılmış immünotoleransları, elde edilme kolaylığı, bol miktarda elde edilebilmeleri ve terapötik hücre sayılarını elde etmek için daha az *in vitro* pasajlamaya ihtiyaç duymaları nedeniyle tercih edilmektedir (261). Çalışmamızın sonuçları literatür ile karşılaştırıldığında, YKH'ler için bahsedilen avantajları gösterdi, bulgularımız önceki çalışmalarda kullanılan farklı kaynaklı kök hücreler ile elde edilen sonuçlar ile uyumlu bulundu.

Burun çeşitli metabolik faaliyetleri etkilediği bilinmektedir. Bor kemik metabolizması için önemli olan kalsiyum, D vitamini ve magnezyum ile etkileşime

girer ve tüketilen miktara bağılı konsantrasyonlarda kemikte birikir (11). Bor, doğada borik asit ve borat olarak bol miktarda bulunur. Meyve, sebze ve baklagillerin tüketilmesiyle diyet yoluyla elde edilebilmektedir (12). Güncel literatür incelendiğinde, yapılmış çalışmalar borik asit veya MHK'nin lokal uygulamalarının kemik rejenerasyonunu hızlandırdığını göstermektedir. Son çalışmalar borun kemik büyümesine ve onarımına yardımcı olduğunu, osteoblast ve osteoklastların aktivitelerini de etkilediğini göstermiştir (13). Bor, lokal veya sistemik yollarla uygulandığında kırık iyileşmesi ve kemik rejenerasyonu üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bor, hem lokal hem de sistemik olarak uygulandığında kemik iyileşme sürecinin erken döneminde yeni kemik oluşumunu hızlandırmaktadır (14,15). Güncel literatüre bakıldığında borun MKH üzerindeki etkilerini araştırmış az sayıda çalışma olmasına rağmen borun hücrelerin osteojenik kabiliyetini arttırdığı, kemik matriks mineralizasyonunun erken indüksiyonuna neden olduğu, osteojenik farklılaşmaya dahil olan faktörlerin (örneğin, enerji üretimine katılan genler, proteinler ve metabolik enzimler gibi) normalde olması gerekenden daha erken ifade edilmesini sağlayabileceği in vitro ve in vivo çalışmalar ile gösterilmiştir (14-16). Çalışmamızın sonuçları bunlarla uyumlu olmakla birlikte kemik halka kullanımının progenitör hücre ve sinyal etkisi anlamında literatürde ilk olarak yerini alacağı düşünüldü.

Hayvan bağ dokusundaki en yaygın hücreler olan fibroblastlar, hücre dışı matriksi ve kolajeni sentezler ve yara iyileşmesinde kritik bir rol oynar. Bor, bu anahtar enzimlerin fibroblastlardaki aktivitesini kolaylaştırır, böylece hücre dışı matriks devir hızını artırır. 2000 yılında, insan fibroblastları kullanılarak yapılan in vitro araştırmalar, borik asit çözeltisinin, hücre dışı matriks üzerindeki etkisi yoluyla yara iyileşmesini geliştirdiğini göstermiştir (147). Önceki in vitro çalışmalar, borun bu yararlı etkilerinin fibroblastlarda bulunan spesifik enzimler olan elastaz, tripsin benzeri enzimler, kolajenaz ve alkalen fosfataz üzerindeki doğrudan etkilere bağlı olduğunu ortaya koymuştur (148). Çalışmamızda özellikle kırık iyileşmesi modelinden aldığımız sonuçlar, fibroblastlar ile gerçekleştirilen yara iyileşme çalışmaları ile oldukça uyumlu bulundu. MKH ve borik asit etkileşimi altında osteoblastik farklılaşmanın gerçekleşmesiyle, ilk defa uyguladığımız bu modelin yeterliliğini gösterdiği ve sonraki çalışmalar için model olarak kullanılabileceği düşünüldü.

Çalışmamızda, bor kaynağı olarak borik asit (H_3BO_3) tercih edilmesinin nedeni vücut dokularında ve sıvılarındaki borun çoğunlukla borik asit ve daha az miktarda tetrahidroksiborat ($B(OH)_4^-$) anyonu formunda bulunmasındandır (262). Borik asit formundaki borun düşük konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu ve büyümesini arttırdığı, bunun aksine yüksek konsantrasyonlarda mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) sinyal yolunu güçlü bir şekilde aktive ederek bu durumu inhibe ettiği tahmin edilmektedir (263). Yapılan çalışmalarda yetersiz borla beslenen sıçanlarda alveoler kemiğin iyileşmesinin tam olarak sağlanmadığı bildirilmiştir. 7 ve 14. günlerde değerlendirilen yeterli bor alan sıçanlarla (diyette 3 mg/kg/gün bor) karşılaştırıldığında, bor eksikliği olan sıçanların (diyette 0.07 mg/kg/gün bor) osteoblastlarında durgun bölgelerde artış (sırasıyla 7. gün ve 14. gün'de %120 ve %126) meydana gelmiş ve bununla birlikte osteoblast sayılarında önemli azalmalar (7. gün ve 14. gün'de sırasıyla %57 ve % 87) görülmüştür, bu da bor eksikliğinin osteogenezde belirgin bir azalmaya sebep olarak kemik iyileşmesinde bozulmaya yol açabileceğini göstermektedir (264,265). Hakkı ve ark. (146) borun osteogenez üzerindeki etkilerinin altında yatan mekanizmaları araştırdıkları çalışmalarında, borun doku mineralizasyonu ile ilgili genlerin ekspresyonunu ve kemik büyümesi ve döngüsünde yer alan kilit hormonlardan 17β -estradiol, testosteron ve D vitamininin etkilerini düzenleyerek osteoblastların mineralizasyonunu indüklediğini saptamışlardır. Borun doku mineralizasyonu indüksiyonu, yara iyileşmesi üzerindeki yararlı etkilerinin de temelini oluşturmaktadır. Hakkı ve ark. (146) borun etki mekanizmalarından yara onarımına dahil olanlar dışında, aynı zamanda mineralize doku ile ilişkili proteinler olan kolajen tip 1 (COL1), osteopontin (OPN), kemik sialoprotein (BSP) ve osteokalsin (OK) gibi çok çeşitli hücre dışı matriks proteinlerinin mRNA ekspresyonunu düzenlediğini de göstermiştir. Bu proteinlerin birleşik etkilerinin kemik hücrelerinin mineralizasyonunun yanı sıra osteoblast hücresi canlılığını, proliferasyonunu ve morfolojisini de arttırdığı gösterilmiştir. Çalışmamızda benzer şekilde borun anlamlı etkisi gösterildi.

İnsan kemik iliği stromal hücreleri üzerinde yapılan araştırmalar, borun osteojenik farklılaşmayı arttırdığını doğrulamıştır. Borun ayrıca alkalen fosfataz ve kemik morfogenetik proteinlerinin (BMP'ler) mRNA ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Borun temel BMP'lerin (BMP-4, BMP-6 ve BMP-7) protein

seviyelerini ve ayrıca RUNX2'nin mRNA ekspresyonunu düzenledi doğrulanmıştır (149). BMP'ler, dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β) süper familyasına ait çok işlevli büyüme faktörleridir ve bazıları yeni kıkırdak ve kemiğin oluşumuna neden olur. Bugüne kadar tanımlanmış ve karakterize edilmiş 20 BMP ailesi üyesinden, BMP-2, BMP-4, BMP-6 ve BMP-7'nin, bor tarafından düzenlenen transkripsiyon ve aktiviteyi gösterdiği, primer insan MKH'lerinde osteoblastik farklılaşmayı indüklemek için gerekli olduğu bulunmuştur. (150-153). Borun ayrıca çekirdek bağlayıcı faktör alt birimi α -1 (CBF- α 1) olarak da bilinen RUNX2 üretimini düzenlediği belirlenmiştir. RUNX2 osteoblastik farklılaşma, kemik oluşumu ve kemik devamlılığının sağlanması için gereklidir. RUNX2, osteoblast gen ekspresyonunu ve MKH'lerin osteoblastlara farklılaşmasını uyarmak için BMP'lerle birlikte çalışan bir transkripsiyon faktörüdür ve olgun osteoblastlarda aktif kalır. Aktif RUNX2 seviyeleri düşürüldüğünde, BSP, OK, OPN ve COL1 dahil olmak üzere ana kemik matriks proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonu azalır (154,155,156,157). Çalışmamızın osteoblastik farklılaşmayı belirlemek amacıyla kullanılan ON immünohistokimyası sonuçları nedeniyle, yukarıda bahsedilen mekanizmalar ile ilişkili olduğu görülmektedir. Bu durum MKH ve borik asit ile artan ON ekspresyonunun yukarıda adı geçen tüm proteinler özellikle RUNX2 ve BMP ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Yapılacak ileri çalışmalarda bu ilişkinin gösterilmesinin, kemik halkası ile MKH ve borik asit etkileşiminin daha detaylı ilişkisini ortaya koyacağı düşünüldü.

Yukarıda da bahsedildiği gibi literatürde borik asitin kemik metabolizmasına etkisini hücresele düzeyde inceleyen çalışmalar bulunmaktadır. Fakat az sayıda bulunan hayvan çalışması borun rejenerasyona olan etkisi üzerinde araştırmaya açık sorular ortaya çıkartmaktadır. Bunun yanında MKH'ler doku mühendisliğinde daha sık yer bulmaya başlamıştır ve kemik rejenerasyonu üzerine olan potansiyellerinin her geçen gün ortaya konması ve klinik kullanımlarının giderek artması çalışmamızın önemini göstermektedir. Daha önemlisi deneysel model olarak kültür ortamında kemik halkası kullanımı literatürde bulunmamaktadır. Ancak dentin diskin biyoiskele olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Hücre-hücre etkileşimleri, hücre-matriks etkileşimleri, dentin ve pulpa arasındaki etkileşim kök hücrelerin farklılaşması, doku rejenerasyonu ve organizasyonu için çok önemlidir. Aksel ve ark. (266) VEGF ve

BMP-2'nin, kendi ortamlarına benzer üç boyutlu bir kültür sistemi kullanılarak insan pulpa kök hücrelerinin farklılaşması üzerindeki etkisini araştırmıştır. Bu çalışma fibrin jel entegre demineralize dentin matriksinin, insan pulpa kök hücrelerinin anjiyojenik ve odontojenik potansiyeli arttırmak amacıyla VEGF ve BMP-2'yi serbest bırakarak insan pulpa kök hücrelerinin etkileşimine ve farklılaşmasına izin verdiğini ortaya koymuştur. Dentin türevi sinyallerin, insan pulpa kök hücrelerinin odontoblastik kökene farklılaşmasını indüklemek için gerekli olduğu gösterilmiştir. İnsan pulpa kök hücrelerinin farklılaşması için deneysel modeller arasında yapılan karşılaştırmalar, dentin içeren modellerin diğer modellere kıyasla daha yüksek odontojenik belirteç ekspresyonu içerdiğini göstermiştir. Özellikle yakın zamanda yapılan bir çalışmada kültür ortamında dentin diskin bizim çalışmamızdakine benzer kullanımı ile MKH üzerinde oldukça anlamlı etki yaptığı ve VEGF, TGF- β , BMP-2 ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) salınımını onlarca kat arttırdığı saptanmıştır (245). Zhu ve ark. (267) MKH'lerin koşullu kültür ortamında kondrositler ve fibroblastlarla olan etkileşimleri kemik dokusunda da etkili olur mu sorusuna bir çalışmada cevap aramış ve küçük kemik parçacıklarını eksplant şeklinde kullanan bir model geliştirmiştir. Bu amaçla kemik iliğinden alınan MKH'ler, kemik eksplantlarının etkisini incelemek amacıyla eksplantlarla birlikte kültüre edilmiştir. Osteojenik farklılaşmanın TGF- β 1 ve BMP-2'nin ekspresyonuna olan etkisi araştırılmıştır. Kemik eksplantlarının MKH çoğalması ve farklılaşmasını arttırdığı ve çoğaltılan bu hücrelerin in vivo kemik iyileşmesinde tek başlarına kültürlenemeyen kemik iliği MKH'lerinden daha etkili olduğu bulunmuştur. Kemik ve kemik iliği MKH'lerinin birlikte kültürlenmesinin kemik dokusu onarımı için kullanılacak tohum hücrelerinin elde edilmesinde faydalı bir yöntem olabileceğini belirtmişlerdir. Ancak çalışmanın in vitro bölümünde kemik eksplantlarından gelen MKH'lerin çoğalma ve farklılaşma fonksiyonları açısından daha zayıf olduğu bulunmuştur. Bu zayıflığın nedeni kemikteki hücrelerin dokudan daha zor ayrılması olarak açıklanmıştır. Yapılmış çok az çalışmada bulunan, kemikten gelen progenitör hücrelerin gecikmesi, çoğalma ve osteojenik farklılaşma açısından zayıf olması bu çalışmalar ile bizim bulgularımızın oldukça uyumlu olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda KH ve KH+BOR grupları iki hafta sonra hücre üretimine başladı, çoğalma kapasitenin azlığına rağmen dördüncü haftada diğer grupları yakaladı ve kemiksi doku oluşumu gerçekleştirdi. Bu anlamda borik asitin etkisi, yapılmış önceki

çalışmaları da göz önüne aldığımızda önemli bir katkı olarak görüldü. Translasyonel tıp anlamında açıklamak gerekirse klinik uygulamalarda kullanılacak olan MKH'ler kemikteki progenitör hücrelerin gecikmesini ve zayıflığını engelleyecektir, borik asit ise katkısıyla bu etkileri daha da ilerletecek bir role sahip olacaktır. Yukarıdaki çalışmada kemik eksplantıyla birlikte kültürlenmiş kemik iliği MKH'leri için TGF- β 1 ve BMP-2 ekspresyonunun, kemik iliği kaynaklı MKH'lerden anlamlı olarak fazla olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple kemik eksplantının bu iki büyüme faktörünü arttırdığı belirtilmiştir (267). Bu bulgular bizim hipotezimizdeki kemik halkası kullanımının amacını ve mekanizmalarını destekler niteliktedir. Kullanılan dentin iskenelin kök hücreleri uyarak farklılaşmayı teşvik ettiği düşünülmektedir. Kemik eksplantları ise hem MKH kaynağı hemde MKH'leri uyaran bir yapı olarak görev almaktadır. Çalışmamızda kemik eksplantı olarak kullandığımız kemik halkaları da aynı uyarıcı etkiyi gösterdi. Kontrol grubunda 2. hafta sonunda meydana gelmeye başlayan kemik oluşumu, kemik halkası kökenli progenitör hücrelerin çoğalmaya başladığını gösterdi. Bu durumun deney gruplarında oluşan MKH ve borik asit etkisini anlamlı bir şekilde arttırması kemik halkalarının kemik rejenerasyonunu tetikleyen sinyalleri yolladığını düşündürdü. Bu sinyallerin tüm deney gruplarında osteojenik hücre farklılaşmasının hızlanmasını, artmasını ve yara iyileşmesini hızlandırmasını sağlaması bu sinyallerin oldukça önemli olduğunu düşündürdü.

Ying ve ark. (149) borun insan kemik iliği MKH (iMKH)'lerinin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında borun iMKH'lerin in vitro osteojenik farklılaşmasında güçlü bir regülatör olarak düşünülmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında borik asit 1, 10 ve 100 ng/ml konsantrasyonda eklendiğinde iMKH'lerin çoğalmasının kontrol grubundan farklı olmadığını bulmuşlardır. Ancak 1,000 ng/ml borik asit 4, 7 ve 14. günlerde iMKH'lerin çoğalmasını önlemiştir. Osteoblast farklılaşması sırasında erken ortaya çıkan, hücre zarı ile ilişkili bir enzim olan ALP, en yaygın şekilde tanınan belirteçtir. 10 ve 100 ng/ml borik asit ile muamele edilen iMKH'lerin, kontrole kıyasla daha yüksek bir ALP aktivitesi sunduğunu keşfetmişlerdir. Gerçek zamanlı PCR analizi ile ALP, OK ve COL-I'in mRNA ekspresyonunun da 10 ve 100 ng/ml borik asit tedavi gruplarında arttığını tespit etmişlerdir. 1 ve 10 ng/ml borik asit tedavi gruplarında kalsiyum birikimleri artmış, 100 ve 1.000 ng/ml borik asit tedavi gruplarında ise

kalsiyum konsantrasyonu azalmıştır. Movahedi ve ark. (16) 6 ng ve 6 µg/ml gibi düşük dozlardaki borik asitin sıçan KMKH'lerinin osteoblastlara farklılaşması üzerindeki etkisini araştırmış ve farklılaşmış KMKH'lerin hücresel ve moleküler yapısını karakterize etmeye çalışmışlardır. Çalışmada, 6 ng/ml borik asit ile muamele edildiğinde, farklılaştırılmış KMKH'lerin hücre canlılığının kontrol grubundan farklı olmadığını, 6 µg/ml borik asitin 10, 15 ve 21. günlerde canlılığı engelleyebildiğini bulmuşlardır. Önceki çalışmalarında, 24 ve 36 saat sonra 6 ng/ml ve 6 µg/ml borik asitin KMKH'lerin hücre sağkalımında bir azalmaya neden olacağını göstermişlerdir (268). Bu çalışmalarında, farklılaştırılmış KMKH'lerin canlılığı üzerinde 6 ng/ml borik asit hiçbir etki göstermediğinden, osteoblastların borik asite KMKH'lerden daha dirençli olduğu sonucuna varılabilir; bu sonuç Hakkı ve ark. (146) çalışmasıyla da uyushmaktadır. Bor için kullanılmış ng/ml konsantrasyonlarının çelişkisi başka makalelerde de irdelenmiştir. Hakkı ve ark. (146) pre-osteoblastların (MC3T3-E1) çoğalmasının 72 saat boyunca 1, 10, 100 ve 1000 ng/ml'lik bir konsantrasyonda borik asit ile muamele edildiğinde kontrol grubundan farklı olmadığını ve sadece 5 ve 14. günlerde hafif bir azalma gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, aynı çalışmada, bu hücrelerde mineralizasyon için sadece 1 ve 10 ng/ml'lik konsantrasyonların uygun olduğunu iddia ederler ve daha yüksek konsantrasyonlarda olumsuz bir etkisi oluşabileceği konusunda uyarırlar. Akdere ve ark. (247) borun YKH'lerin osteojenik potansiyeli üzerindeki etkisini araştırmıştır. Çalışmada farklı borik asit konsantrasyonları (1, 10 ve 20 µg/ml) kullanılmıştır. Gözlemlerine göre, borik asit en yüksek konsantrasyonda bile YKH'ler üzerinde herhangi bir toksik etki göstermemiştir. Analizlerinin sonuçları, her bir grupta hücre canlılığının zamanla arttığını göstermiştir. 1. günde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1 µg/ml borik asit proliferasyonu tetiklemiştir. 7. güne kadar kontrol ve borik asit grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. 7. günde tüm borik asit grupları proliferasyonda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ve 1 µg/ml borik asit grubu nispeten daha etkili bulunmuştur. Osteojenik hücrelerin Col1A1, RunX2 ve ON gen ekspresyonları RT-PCR ile doğrulanmıştır. 20 µg/ml borik asit konsantrasyonu 7. günde Col1A1 ekspresyonunu arttırmıştır. Ayrıca Col1A1'in ekspresyonu, 14. günde 20 µg/ml borik asit grubunda kontrol grubuna göre daha yüksektir. Son gün, Col1A1 ekspresyonu, 10 µg/ml borik asit grubunda, kontrol grubuna ve 1 µg/ml borik asit

grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksektir. Sonuçlar, RUNX2 ekspresyonunun 7, 14 ve 21. günlerde 20 µg/ml borik asit grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermiştir. 7. günde, RUNX2 ekspresyonu, 1 µg/ml borik asit grubuna kıyasla 20 µg/ml borik asit grubunda anlamlı derecede yüksektir. 21. günde, 10 ve 20 µg/ml borik asit uygulanan gruplarda kontrol grubundan ve 1 µg/ml borik asit grubundan daha yüksektir. ON ekspresyon seviyeleri her grup için 7 ve 14. günde neredeyse aynıdır. 21. günde, 10 µg/mL borik asit grubunda kontrol grubundan daha yüksektir. Ayrıca 10 µg/ml borik asit grubu, 1 µg/ml borik asit grubundan daha yüksektir. Sonuç olarak, kültür ortamında YKH'lerin osteojenik farklılaşması ve proliferasyonu için borik asitin en etkili konsantrasyonunu tanımlamanın mümkün olmadığına karar vermişlerdir. Bununla birlikte, borik asitin YKH'lerin osteojenik farklılaşmasını teşvik ettiğini açıkça göstermişlerdir. Ayrıca, en yüksek konsantrasyonda bile, borik asitin hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkisi gözlemlenmemiştir. Çalışmamızda nanogramın çok üzerinde olan mikrogram düzeyi kullanıldı ve borun hem olumlu etkisi hemde toksik etkisi açısından benzer sonuçlar görüldü. Nano düzeyi oldukça az bir miktar olduğundan ve bizim sonuçlarımız ile çeliştiğinden dolayı borik asitin o kadar düşük dozda bile etkili olabileceğini düşündürdü. Bizim çalışmamızda toksik etkisi görülmedi. Yukarıda da bahsedildiği gibi bu bulguları destekleyen, çalışmamızla uyumlu ve çalışmada kullandığımız formuyla borik asit kullanan birçok çalışmada, borik asitin kullandığımız dozlarda MKH'ler için toksik olmayan olumlu etkileri saptanmıştır ve bu etkiler çalışmamızı destekler niteliktedir.

Sodyum borat (NaB)'ın üçüncü azı dişinden elde edilen insan diş germi kök hücrelerinin (iDGKH) farklılaşmasına etkisinin incelendiği bir çalışmada NaB varlığında hücreler, başlangıça kıyasla osteojenik ve odontojenik ilişkili genlerin ve proteinlerin en yüksek ekspresyonunu göstermişlerdir. Yüksek gen belirteci ekspresyonu seviyeleri, NaB varlığının osteogenez ve odontogenezi nasıl artırabileceğini açıklamaya yardımcı olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmanın bir diğer değerli sonucu NaB'nin kemik ve dişin matriksini veya yapısal protein ekspresyon profilini değiştirerek iDGKH'lerin farklılaşma verimliliğini artırabilmesidir. Hücreler, bir kültür kabında NaB içeren ve NaB içermeyen osteojenik ortamda 14 güne kadar muamele edilmiştir. ALP sonuçları, NaB ile tedavi edilen

grubun 14 gün boyunca tek osteojenik farklılaşma ortamı ile tedavi edilen grup olarak pozitif kontrol grubundan önemli ölçüde daha yüksek ALP aktivitesi gösterdiğini belirtmektedir. Farklı NaB konsantrasyonları ile inkübe edilen iDGKH'lerin hücre canlılığı 24, 48 ve 72. saatlerde ölçülmüş ve sonuçlar, NaB'nin hücre canlılığını 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarda arttırdığını göstermiştir. Diğer yandan yüksek NaB konsantrasyonları iDGKH üzerinde toksik etki yapmışlardır. Mineralleşmenin NaB ile tedavi edilen hücreler üzerinde bazal gruba göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu bulgular NaB'nin kalsiyum mineralizasyonu sağlayarak iDGKH 'lerin osteojenik ve odontojenik farklılaşmasına katılabileceğini düşündürmüştür (269). Ying ve ark. (149)'nın da belirttiği gibi borun kemik ve diş büyümesini desteklediği zaten bilinmektedir; fakat bu etkinin moleküler mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Büyüme uyarısı için olası açıklamalardan biri, burada VK boyaması ile gösterilen hücre dışı matriks mineralizasyonunun indüklenmesinden sorumlu olan kalsiyum birikimidir. Bu bulgular bizim çalışmamızla da bağdaşmaktadır. Çalışmamızda da VK'nın yanı sıra AK ile mineralizasyonun varlığı, osteojenik farklılaşmanın gerçekleştiği ve kemiksel adacıkların olduğu gösterilmiştir. Movahedi ve ark. (16)'nın çalışmalarında kullanılan KMKH'ler kemik iliğinde bulunabilir ve osteoblastlar gibi kemiğe bağlı hücrelerin üretimi için hücre sel yedek olarak kabul edilir. Benzer şekilde, Hakkı ve ark. (146) çalışmalarında fare kalvaryasından türetilmiş bir osteoblast öncü hücre dizisi olan MC3T3-E1 kullanmışlardır. Her iki çalışma arasındaki küçük farklar dışındaki benzerlik bizim çalışmamız ile uyumludur. Bu küçük farklar dizin hücreleri ile primer kültür hücreleri arasındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Bu durum bizim verilerimiz ile olan uyumsuzluğu da açıklıyor olabilir. 10000 ng/ml olan ve 10 µg/ml ye denk gelen dozda sadece proliferasyonda bir azalma olmuş ama kültür süresi uzatıldığında toksik olmayan bir çoğalma gözlenmiş olması bizim çalışmamızdaki dozu desteklemiş görülmektedir.

Daha da önemlisi bu iki çalışmada kültürdeki osteojenik farklılaşmanın başlama süresidir. Movahedi ve ark. (16)'larının çalışmasının önemli bir bulgusu, tedavi edilen gruplarda osteojenitenin erken başlamasıdır. Bu çalışmaya ve diğerlerine dayanarak (146,268) osteojenik farklılaşmanın 10. günde başladığını belirtmişlerdir, ancak 6 ng/ml ve 6 µg/ml borik asit ile muamele matriks birikiminde sola kaymaya

neden olmuş ve osteojenik farklılaşma borik asitin varlığında 5. günde başlamıştır. Bu durum borik asitin osteojenik farklılaşmaya dahil olan faktörlerin (enerji üretimine katılan genler, proteinler ve metabolik enzimler gibi) normalde olması gerekenden daha erken ifade edilmesine neden olabileceğini göstermiştir. Çalışmamızda birinci hafta sonunda osteojenik farklılaşmanın başlaması bu çalışma ile uyumludur. Daha önce belirttiği gibi borik asit için yapılan doz çalışmalarında 6 µg/ml dozun toksik olduğunun gösterilmesine karşılık yakın zamanda yapılan bir çalışmada 20 µg/ml konsantrasyonda hem iki hem üç boyutlu kültürde toksik olmadığı gösterilmiştir (247,270).

Biyomühendislik alanındaki teknolojik gelişmeler bor kullanımı daha etkin bir hale getirmiştir. Buna örnek olabilecek bor ile muamele edilmiş nanotüplerin MKH'lerin osteojenik farklılaşmasında hücrelerin yapışması, göç etmesi ve farklılaşması anlamında ideal bir matris oluşturduğu ve hücrelerin oldukça yüksek protein sekresyonu yaptığı saptanmıştır. Borik asit içerikli nanotüp kullanımı MKH'lerin erken bir osteoblast belirteci olan ALP'yi ve geç bir osteoblast belirteci olan OK'yı kontrol gruplarına göre çok daha fazla eksprese etmesini sağlamıştır. Bunun yanı sıra hücrelerin fonksiyonel davranışını gösteren fibril yapısını arttırmıştır (271). Li ve ark. (271) boron nitrat nanotüp (BNNT)'lerin MKH'lerin osteoblastlara farklılaşmasını arttırdığını ve osteogenez üzerinde olumlu etkileri olduğunu doğrulamıştır. Polimerlere BNNT eklenmesinin daha yüksek osteoblast hücre canlılığını sağladığı gösterilmiştir. Artmış osteogenezin bir nedeninin, BNNT'lerden hidroliz yoluyla bor salınımı olduğu belirtilmiştir. Kültür ortamında bor nitrür, amonyum borat hidratlara dönüştürülen borik asit ve amonyağa hidrolize edilebilir. BNNT'lerin hidrolizi, borun yavaş salınmasına neden olur. Yoğun BNNT katmanı durumunda, çok fazla serbest BNNT parçacığının ayrılacağı ve MKH'ler tarafından endosite edilebileceğini bunun da MKH'lerin canlılığını ve ALP aktivitesini etkileyebileceğini belirtmişlerdir. Diğer bir örnek çalışmada iskele emdirilmiş bor kullanımı incelenmiştir. Doğan ve ark. (261) osteojenik farklılaşmanın bir modulatorü olan boru kullanarak rejenerasyon süresini azaltmayı ve iyileşme etkinliğini arttırmayı amaçladıkları çalışmalarında, sıçan YKH'sı olan veya olmayan, poli-(laktit-ko-glikolid-asit) (PLGA) iskelelere bor eklenmesinin in vitro ve in vivo kemik iyileşmesi üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. PLGA iskelelere bor eklenmesi, bağlı kök

hücre sayısını ve kalsiyum mineralizasyon seviyelerini önemli ölçüde arttırmıştır. Çalışmanın in vitro bölümünde hücre canlılığı için elde edilen sonuçlar, borun hücre canlılığı üzerindeki olumlu etkilerini göstermiştir. Sıçan YKH'lerinin NaB olan veya olmayan iskele üzerinde çoğalması, 1, 4, 7 ve 10. günlerde incelenmiştir. Sonuçlar, yüksek doz (500 µg/ml) NaB içeren PLGA iskeleler içindeki hücre sayısının düşük doz (100 µg/ml) NaB içeren iskele ve kontrol grubundan 4, 7 ve 10. günlerde anlamlı ölçüde yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Öte yandan, düşük doz (100 µg/ml) NaB içeren PGLA iskelelerdeki canlı hücre sayılarının, sadece 10. günde kontrol grubundan önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur. Çalışmanın in vivo bölümünde sıçan femurlarında defekt oluşturulmuş ve içlerine PGLA iskeleler yerleştirilmiştir. Bor içeren iskelelerin, kontrol gruplarına kıyasla OK ve COL1 ile birlikte VEGF'nin yüksek prevalansına ve yoğunluğuna neden olduğunu bulmuşlardır. Kemik yoğunluğu tahminleri ve BT analizi, PLGA iskelelerine bor eklenmesinin artmış kemik mineralizasyonu ile sonuçlandığını göstermiştir. Bor içeren iskeleler üzerine sıçan YKH transplantasyonu, muhtemelen sıçan YKH'lerinin osteojenik soylara karşı yüksek farklılaşma kapasiteleri nedeniyle kemik dokusu oluşumunu daha da geliştirmiştir. Düşük doz bor destekli grupta kısmi iyileşme gözlenirken, en iyi iyileşme yüksek doz bor içeren grupta elde edilmiştir. Bu nedenle yüksek doz (500 µg/ml) bor ve sıçan YKH kombinasyonunu içeren PLGA iskelelerin daha iyi kemik iyileşme potansiyeline sahip olduğunu belirtmişlerdir. Arslan ve ark. (272) osteojenik aktiviteyi arttırmak için üç boyutlu poli(butilen adipat-ko-tereftalat) (PBAT) iskeleler içine amorf hidroksiapatit (HAp) ve bor katkılı hidroksiapatit (B-HAp) nanopartikülleri kapsüllemiştir. Sonuçlar B-HAp'nin, gelişmiş OK, OPN ve COL-I ekspresyonları ile gösterilen, iKMKH'lerinin farklılaşması üzerindeki osteoindüktif ve osteokondüktif etkisini geliştirdiğini göstermiştir. Beklendiği gibi, B-HAp içeren iskeleler iKMKH'lerinin osteojenik farklılaşması üzerinde en önemli etkiyi göstermiştir. Bu veriler hipotezimiz ve bulgularımız ile uyusmaktadır.

Liu ve ark. (273) Mg borat, Zn borat ve borik asiti, insan süt dişi kök hücleri (iSDKH)'nde osteoblastik farklılaşmayı etkili bir şekilde indükleyebilen, 3 boyutlu gözenekli bir iskele oluşturmak için kitosan ile başarıyla harmanlanmıştır. Bor, Mg veya Zn gibi iyonların, iskelelerden kültür ortamına salınması, saf kitosan iskelede olduğundan daha fazla iSDKH proliferasyonuna sebep olmuş ve osteoblastik

farklılaşmayı arttırmıştır. Bu çalışmada Mg borat, Zn borat veya borik asit içeren kitosan iskelesi kemik mineral kimyasını taklit etmiş ve iskeleden salınan eser iyonlar kemik metabolizmasını etkili bir şekilde düzenlemiştir. Mg borat, Zn borat ve borik asit, farklı zamanlarda yüksek osteokondüktivite ve osteoindüktivite, yeni kan damarlarının büyümesi için kemikle ilgili proteinlerin yüksek ekspresyonu ve yüksek derecede mineral birikimi ile iSDKH hücrelerinden osteoblastik farklılaşmanın arttığını göstermiştir. Mg borat ve Zn borat, indüksiyon süresi boyunca ALP ekspresyonunu arttırarak osteojenik farklılaşmayı olumlu bir şekilde etkilemiştir. Zn borat ile indüklenmiş durumda kültürün 21. gününde maksimum OK ekspresyonu gözlenmiştir. VEGF ve anjiyopöietin-1 (Ang-1)'in gen ekspresyon seviyeleri Mg borat ve Zn borat tarafından önemli ölçüde yukarı regüle edilmiştir. Boyama ve ELISA sonuçları, kimyasal bulgularıyla Zn borat üzerindeki maksimum mineralizasyonun osteojenik süreçleri arttırdığını, Mg borat ve borik asit üzerinde kalsiyum birikiminin saf kitosan iskelesinde olduğundan biraz daha yüksek olduğunu göstermiştir. Zn borat ile indüklenen ortamda maksimum mineralize kalsiyum içeriğinin biriktiği gözlenmiştir. Bu veriler borun olumlu etkisini kanıtlamakta olup özellikle osteojenik farklılaşma belirteçleri olan ALP ve OK için çalışmamızla uyumlu bulundu.

Hakkı ve ark. (146) borun mineralize dokuya bağlı proteinlerin hücre canlılığı, proliferasyonu, mineralizasyonu ve mRNA ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırmış ve borun pre-osteoblastik hücrelerin (MC3T3-E1) BMP-4, 6 ve 7 protein seviyeleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesini amaçlamışlardır. Çalışmada MTT analizine göre 24. saatte 1 µg/ml ve daha yüksek borik asit konsantrasyonlarında azalma olurken, 72. saatte hücre sağ kalım oranında anlamlı bir azalma olmamıştır. Uzun süreli hücre proliferasyon deneylerinde, borik asit ile muamele edilen gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Borik asit için daha yüksek konsantrasyonlar, erken dönemde hücre sağ kalım oranını düşürmüştü, ancak daha sonra bu etki ortadan kalkmıştır. Böylece, borik asitin MC3T3-E1 hücreleri için toksik etkisi olmadığını gözlemlemişlerdir. Bor hücre dışı matriksin devir hızını değiştirir ve TNF-alfa salınımını arttırır. Borun hücre dışı matriks döngüsünde yer alan elastaz, tripsin benzeri enzimler, kolajenaz ve alkalen fosfataz gibi spesifik enzimler üzerindeki doğrudan etkisi araştırılmış ve borun bu enzimleri in vitro olarak fibroblastlarda düzenleyebileceği bulunmuştur (148). Ayrıca borik asit çözeltisinin, in vitro ortamda

hücre dışı matriks üzerinde etki yoluyla yara iyileşmesini arttırdığı saptamıştır (147). Yukarıdaki çalışmalarda fibroblast için yara iyileşmesinde gösterilen olumlu bor etkisi bizim çalışmamızda osteojenik farklılaştırılmış MKH'ler için yara iyileşmesi modelinde benzer şekilde etkili bulundu. Fibroblast çalışmaları ile uyumlu olduğu saptandı.

Hakkı ve ark. (146) çalışmada ayrıca borun mineralize doku ile ilişkili proteinler olan COL I, OPN, BSP ve OK dahil hücre dışı matriks proteinlerinin mRNA ekspresyonunu düzenlediğini bulmuşlardır. BMP-2, 4, 6 ve 7'nin primer insan MKH'lerinde osteoblastik farklılaşmayı indüklediği bilinmektedir (152). Osteoblastik bir fenotipin sürdürülmesi ve uyarılması için kemik morfogenetik proteine ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (153). Çalışmada borun kemik morfogenezinde önemli proteinler olan BMP -4, 6 ve 7'yi düzenlediği gösterilmiştir. Borik asitin 1 µg/ml konsantrasyonun altında BMP proteinlerinin ekspresyonlarını indüklediğini göstermişlerdir. Daha yüksek borik asit konsantrasyonunun (1 µg/ml'nin üzerinde) MC3T3-E1 hücrelerinin hücre canlılığını 24 saatte azalttığını, ancak 72 saatte olumsuz bir ekinin olmadığını ve borik asitin osteoblastik hücreler üzerinde doza bağlı bir regülatör olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda 6 µg/ml dozunda borik asit etkisinin toksik olmadığı ve yukarıda geçen çalışmalardakine benzer şekilde osteojenik farklılaşmayı anlamlı bir şekilde hızlandırdığı ve kemiksi adacık oluşumunun daha kaliteli olmasını sağladığı gösterildi.

RUNX2, osteoblast farklılaşması için gerekli olan bir transkripsiyon faktörüdür (155,156). RUNX2, olgun osteoblastlarda da aktiftir ve aktif RUNX2 seviyeleri azaldığında, kemik matriksini kodlayan BSP, OK, OPN ve COL I'in genlerinin düşük ekspresyonu gözlenir (157,274). Otokrin BMP üretimi RUNX2 şifreleme faktörünün aktif olması için gereklidir ve BMP'ler ile RUNX2 osteoblast gen ekspresyonunu uyarmak için işbirliği içinde etkileşime girmektedir (154). Yapılan çalışmalar borun sadece osteoblastik transkripsiyon faktörünü düzenleyen RUNX2'yi değil; aynı zamanda BMP'leri de düzenlediğini gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına dayanarak, borun RUNX2, BSP (mRNA ekspresyon seviyesi) ve BMP-4, 6 ve 7'yi (protein seviyesi) düzenleyerek osteogenezi indüklemek için umut verici bir unsur olduğu sonucuna varmışlardır. Yukarıdaki çalışmalarda gösterilen bor etkisinin primer ve dizin hücrelerindeki osteoblastların RUNX2 ve BMP ile ilişkilendirilmesi

ve sonuç olarak elde edilen benzer kemikleşme mekanizmaları açısından ortak bir kullanımın olduğuna işaret etmektedir.

Gizer ve ark. (275) B-nHAp (bor içeren nano hidroksiapatit) kompozitin SaOS-2 hücreleri ve iKMKH'lerin çoğalması ve farklılaşması üzerindeki etkilerini, nHAp (nano hidroksiapatit) ve borik asit ile karşılaştırmışlardır. Borik asit, nHAp ve B-nHAp'ın SaOS-2 osteoblastik hücreleri üzerinde hücre içi sinyal mekanizması transkriptomik analiz ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, 90 ve 900 µg/ml B-nHAp ve nHAp, 3 ve 5. günlerde iKMKH proliferasyonunu arttırmıştır, ancak 1. günde etki göstermemiştir. SaOS-2 osteoblastik hücreleri, 1. ve 3. günlerde aynı doz aralığında sınırlı proliferasyon sergilemiştir, ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. 5. günde B-nHAp, nHAp (0.9 ila 90 µg/ml) ve borik asit (0.006 ila 6 µg/ml) SaOS-2 hücrelerinin proliferasyonunu azaltmıştır. nHAp seramikleri, borik asit için 0.001 ila 0.3 µg/ml aralığında bir salınım sağlamıştır. Birlikte ele alındığında, borik asit ve B-nHAp kompozitleri, MKH'lerde kemik hücrelerine kıyasla farklı proliferatif kapasiteye sahiptir. B-nHAp kompozitler, hücreler üzerinde proliferatif bir etkiye sahip olmak yerine öncelikle hücre dışı matriksi destekleyebilir. B-nHAp, diğer gruplara kıyasla 0.9 µg/ml'lik dozda iKMKH'lerde en iyi osteojenik farklılaşmasını göstermiştir. Ayrıca 0.006 µg/ml borik asidin 7. günde kontrole kıyasla iKMKH'lerin osteojenik farklılaşmasını artırdığını göstermişlerdir. Borik asit ve B-nHAp kompozitlerin yüksek dozları, 21. güne kadar doza bağlı bir şekilde osteojenik farklılaşmayı azaltmıştır. ALP sonuçları iKMKH'ler üzerinde 0.006 µg/ml borik asitin 5. ve 10. günlerde hücre içi Ca^{2+} birikimini ve 5, 10, 15. günlerde ALP aktivitesini arttırdığını gösteren Movahedi ve ark. (16)'nın sonuçları ile uyumludur. ALP aktivite testi sonuçları, B-nHAp'nin 7. günde 0.9 µg/ml'de iKMKH'lerin osteojenik farklılaşmasını etkilemediğini ortaya koymaktadır. 900 µg/ml B-nHAp kompozitlerin 0.1-0.3 µg/ml borik asit salınımı yaptığını, bu durumun da 7. günde nHAp ile karşılaştırıldığında osteojenik farklılaşmayı hafifçe arttırdığını belirtmişlerdir. B-nHAp kompozitin 21. günde AK boyaması ve Quantichrome kalsiyum analizi ile mineralizasyon ve kalsiyum miktarı üzerindeki olumlu etkisini göstermişlerdir. 7. günde 0.006 µg/ml dozda borik asit ve 0.9 µg/ml dozda B-nHAp (0.006 µg/ml borik aside karşılık gelir) osteojenik aktiviteyi uyarmıştır. Bir başka çalışmada kitosan ve nHAp iskeleye yüklenmiş borik asit uygulanmış ve 20 µg/ml dozunda hücrelerin

proliferasyonunun ve farklılaşmasının arttığı görülmüş hatta bu yüksek dozda COL1 ekspresyonunun diğer dozlara oranla en fazla olduğu saptanmıştır (247).

Semaphorin-6D (SEMA6D), pleksin transmembran reseptörleri yoluyla hücre farklılaşmasını düzenleyen bir hücre yüzeyi proteindir (276). SEMA6D'nin B-nHAp kompozit ve borik ile arttığını ancak nHAp uygulaması ile artmadığını göstermişlerdir. Dolayısıyla, etkinin borik aside ait olduğu düşünülmektedir. Ayrıca 0.006 µg/ml borik asidin 7. günde iKMKH'lerde ALP aktivitesini arttırdığını gözlemlemişlerdir. Bu çalışmanın sonucu öncelikle SEMA6D'nin hücre farklılaşma etkisinde rol oynayabilecek osteoblastlar üzerindeki etkisi hakkında fikir vermiştir. SOX6, kondrositlerin proliferasyon fazında tip II kolajen sentezini ve birikimini uyaran bir transkripsiyon faktörüdür. SOX6'nın osteoblastların çoğalmasında uyardığı bilinmektedir (277). B-nHAp kompozitler ve borik asit uygulanan hücrelerde SOX6 gen ekspresyon seviyesinin hafifçe arttığı görülmüştür. nHAp kompozit ile muamele edilmiş hücrelerde artış olmamıştır. Bu durum B-nHAp kompozitinin SOX6 üzerindeki etkisinin borik aside ait olabileceğini düşündürmüştür. Smad7 gen ekspresyonu artmış hücrelerde ALP aktivitesi, mineralizasyonu, COL1 ve ALP gen ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (278). B-nHAp kompozitler, TGF-β sinyal yolunun ve osteojenik farklılaşmanın bir antagonisti olan Smad7 gen ekspresyonunu inhibe etmiştir. Borik asit ve kompozitleri bu çalışmada Wnt ve TGF-β sinyalizasyon yollarında gen ekspresyon değişikliklerine neden olmuştur. Smad7 gen ekspresyonu, nHAp ve borik asite kıyasla 0.9 µg/ml B-nHAp ile azalmıştır. 0.9 µg/ml B-nHAp artan Kazein Kinaz 1 Gama 3 (CSNK1G3) seviyesi yoluyla TGF-β ve Wnt sinyal yollarını uyarmıştır. Kobylewski ve ark. (279) eşzamanlı Smad7 gen ekspresyonunun inhibisyonu ve BMP2, Sirt1, Dkk2, TGF-βI, BMP2R ve Runx2 ekspresyonunun artışı bildirmiştir. Yin ve ark. (280) 100 µg/ml bor içeren mezaporöz biyoaktif cam seramiklerin 7. günde Wnt/β-katenin sinyal yolunda yer alan Setd7 gen ekspresyonunu arttırarak osteojenik farklılaşmayı desteklediğini göstermiştir.

Bu çalışmanın Wnt sinyal yolunun indüksiyonu ile ilgili sonuçları Kobylewski ve Yin'in bor içeren biyomalzemeler veya borik asit ile ilgili sonuçlarına benzerdir. B-nHAp kompozitlerinin ve borik asidin, SEMA6D ve SOX6'yı teşvik ederek hücre farklılaşması üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir. Öte yandan nHAp kompozitler

SEMA6D ve SOX6 gen ekspresyon seviyelerini deęiřtirmemiřtir. Bu durumda olumlu etkilerden borik asitin sorumlu olduęu dūřunūlmektedir. İn vitro kemik oluřumu çoęalma, matriks olgunlařması ve mineralizasyon ařamalarını içerir. Hūcre proliferasyonunu, kemięin en temel proteini olan COL-I sentezi ve ALP gen ekspresyonunda ve aktivitesinde bir artıř izler. Mineralizasyonun bařlangıcında, OK ve OPN gibi kolajenōz olmayan proteinler matrikste birikir (281,). Teorik olarak, COL-I ve ALP ekspresyonları erken farklılařma durumlarında artmaktadır. RT-PCR analizleri B-HAp-PBAT yapı iskelelerindeki iKMKH'lerin daha yūkses OK ve OPN ifadeleri, bor ilavesinin mineralizasyonu dikkate deęer řekilde indūkledięini gōsterir. Sonuçta, B-HAp-PBAT iskeleleri üzerinde kūltūrlenen iKMKH'lerin kūltūr sūresi boyunca en yūkses ALP aktivitesi, kalsiyum ve kolajen miktarlarına sahip olduęu gōzlenmiřtir. Yine bu veriler borik asitin olumlu etkilerini gōstermektedir. Yukarıdaki çalıřmalarda bahsedilen bor etkisinin bizim çalıřmamızda elde ettięimiz MKH proliferasyonu, osteoblastik farklılařması, kemiksi doku oluřumu, kalsiyum birikimi ve mineralizasyon bulgularındaki artıřın ilgili mekanizmaları konusunda uyumlu olduęu dūřūnūldū. Borun farklı dozlarda ve kullanılan iskelenin yapısına baęlı olarak yukarıda geçen mekanizmaları farklı řekillerde etkiledięi anlařıldı. Bu etkilerin kemik halkası üzerinden gerçekleřen etkileřimlerinin mekanizmalarını anlamının önemli olacaęı ōngōrūldū.

Kalsiyum birikintileri vūcutta, ōzellikle kemik dokularında bulunur. AK ve VK, hūcre içi kalsiyum, kalsiyum bağlayıcı proteinler ve proteoglikanları boyamak için kullanılır. Kalsiyum fosfat tuzlarının oluşumu veya mineral birikimi osteoblast hūcrelerinin birincil işlevidir. Bu yōntem kemik farklılaşmasının değerlendirilmesinde yararlıdır. Movahedi ve ark. (16) borik asitin sıçan KMKH'lerinin osteoblastlara farklılaşması üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmalarında, KMKH'lerin farklı borik asit konsantrasyonları varlığında mineralizasyonu 5. gūnde başlamıştır, burada AK ve kalsiyum konsantrasyonlarının kantitatif analizi, kontrollere kıyasla önemli bir artış gōstermiřtir. Borik asit içermeyen kontrol grubunda mineralizasyon esas olarak 10. gūnde başlamış ve 15. ve 21. gūnlere kadar devam etmiştir. Borik asit varlığı, kontrole kıyasla 10. gūnde önemli bir fark yaratmış, ancak 15. gūnde aynı seviyeye ulaşmıştır. Liu ve ark. (273) iSDKH'den osteoblastik farklılaşmayı değerlendirmişlerdir. Mg borat, Zn borat veya borik asit içeren ve içermeyen çeşitli kitosan yapı iskelelerinde 7,

14 ve 21 günlük kültürden sonra AK boyaması yapılmıştır. Kalsiyum içeriği 21 gün farklılaşma süresi boyunca tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla daha fazla olacak şekilde sürekli artmıştır. Tüm indükleyiciler tüm iskelelerde kalsiyum içeriğini arttırmıştır. Mg borat, Zn borat veya borik asit kitosan iskelelerinde kalsiyum birikimleri saf kitosan iskelesinde olduğundan daha yüksek bulunmuştur. Ying ve ark. (149) borun iMKH üzerindeki etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında; VK boyaması ile 21. günde mineral birikimini değerlendirmiştir. Kontrol grubuna kıyasla 1 ve 10 ng/ml borik asit uygulanan gruplarda artmış kalsiyum birikimi gözlenmiştir. Bununla birlikte, kalsiyum birikimleri 100 ve 1,000 ng/ml borik asit uygulanan gruplarda azaltılmıştır; özellikle 1.000 ng/ml borik asit grubunda azalma anlamlı seviyede bulunmuştur. Taşlı ve ark. (269) iDGKH'lerin osteojenik farklılaşması sonrasında hücre dışı mineralizasyonu göstermek için, NaB ile indüklenen hücreler üzerinde 14 günlük kültür sonrasında VK boyaması yapmışlardır. Mineralleşmenin NaB ile muamele edilen hücreler üzerinde kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Hakkı ve ark. (146) pre-osteoblastik hücrelere borik asit etkisini inceledikleri çalışmalarında VK boyaması ile mineralizasyonu değerlendirmiş; borik asit uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, borik asit uygulanan gruplarda artan mineralleşmiş nodüller gözlenmiştir. Özellikle 1 ve 10 ng/ml borik asit konsantrasyonu içeren gruplarda, mineralize nodüllerde artış belirgin bulunmuştur. Endotel hücrelerinin osteojenik farklılaşmadaki etkisini inceleyen bir çalışmada, osteojenik ve vasküler endotel hücre tabakalarından, osteogenez ve kan damarı oluşum potansiyeline sahip, çift tabakalı hücre komplekleri geliştirilmiştir. Endotelyal hücre tabakasını kaplayan osteojenik tabakanın AK ve VK ile gösterilen daha iyi bir kemiksi doku yaptığı saptanmıştır. Bu hücrelerin HA içeren bir iskele kullanıldığında daha olgun bir kemiksi doku oluşturması, klinik kullanımda yer bulabilecek bir ürün olduğunu düşündürmüştür (283). Benzer şekilde yapılmış bir çalışmada AK ve VK histokimya boyamaları ile gösterilmiş kemiksi dokunun immünohistokimyasal belirteçler ile paralel bir şekilde olgun kemiksi doku yapıyor olması sinüs membran hastalığında kullanılabileceklerini göstermiştir (284). MKH'nin tedavide kullanımında enjekte edilebilir hidrojel ile verilebilmesi de klinikte anlamlı sonuçlar verebileceğini göstermiştir (285). Bizim çalışmamızda AK ve VK boyamaları hem kullandığımız belirteçlerle hemde literatürdeki bulgularla uyumlu bulundu.

Kemik halkası ve borik asit etkileşiminin kemiksi dokunun gösterilmesinde kullanılan histokimyasal boyalar açısından önemli olduğu düşünüldü.

MKH için osteoblastik farklılaşmada önemli belirteçlerden bazıları ALP, ON, OK ve RANKL birçok yayında hücre davranışını etkileyen yönleriyle incelenmiştir (247,271,286). Gelişim sırasında kemik oluşumu MKH'lerin agregasyonu ve sırasıyla kondrosit ve osteoblastlara farklılaşması olan endokondral kemikleşme ile gerçekleşir. MKH kondansasyonu sonrası MKH direkt olarak da osteoblasta farklılaşır ve bunun adına membranöz kemikleşme denir. MKH'nin osteoblastik farklılaşmasındaki esansiyel transkripsiyon faktörleri RUNX2 ve SOX9 dur. Bu hücre içi sinyal faktörlerinin yanı sıra hücre dışı yolaklar olarak IHH, PTH, BMP, WNT- β catenin ve MAPK yolaklarıdır. RUNX2, DLX5 ve MSX2 gibi faktörler immatür osteoblastların çoğalmasını ve olgunlaşmasını yönlendirir. Pre-osteoblast haline gelmiş bir hücre Osterix, Col1A1, PTH-R1 ve ALP eksprese eder. Osterix bir transkripsiyonel faktör olarak geç osteogenezin esansiyel düzenleyicisi olup kondrojenin inhibisyonunu sağlar. Osteoblast matürasyonunda önemli bir aşama olan bu süreci BMP ve WNT sinyali indükler. Olgunlaşan osteoblast OK, BSP, PTH-R1 ve ON eksprese eder. Bu mekanizmaların anlaşılması BMP'lerin kemik oluşumunda stimule edilmesi, WNT antagonistlerinin kemik formasyonunu hızlandırıp densitesinin artmasını sağlaması, lityum klorür (LiCl) ile birleştirilen kök hücrelerin in vivo ve in vitro osteoblastik farklılaşmasının artırılması gibi tedavi yaklaşımlarını ortaya çıkartmıştır. Kemik oldukça dinamik bir remodeling süreci olup MKH'dan farklılaştırılmış osteoblast ile kemik formasyonunun ve osteoklastın indüklenmesi ayrıca CD34 pozitif hematopoetik progenitör kaynaklı osteoblastların kemik rezorpsiyonunu artırması sağlanır. Kemik oluşumu ve rezorpsiyonu sürecinde birçok sitokin yer alır. Bu süreci açıklayan en önemli mekanizma OPG ve RANKL ilişkisidir. RANKL bir otokrin faktör olarak pre-osteoklast ve osteoklastın farklılaşması ve olgunlaşmasını sağlarken, OPG RANKL'ı bloklayarak osteoklastın olgunlaşmasını, fonksiyonunu ve yaşamını inhibe etmektedir. RANKL'ın aktive olmasıyla T hücresinin sitoplazmasındaki nükleer faktör tetiklenerek, osteoklastogenesis in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir. Bunlarla ilişkili olarak MKH'nin immünomodülatör etkisi önemlidir. Bu modülatör etki özellikle kemik iyileşmesi anlamında enflamasyonun önlenmesi yönünden çok etkili bir fonksiyondur. Osteoblasta farklılaşan MKH için bu

kemik iyileşmesinde kendisinin, salgıladığı faktörlerin ve sekretom, proteom ve eksozomları ile bu süreçte büyük yararlar gösterdiği saptanmıştır. Kemik remodelinginde hem osteoblast gibi davranması hem de kök hücre davranışını göstermesi bugün klinikte kök hücre kullanımının asıl nedenleridir. MKH için hücre davranışı ve moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması klinik kullanımlarındaki etkinliği arttıracaktır (287). Çalışmamızda bulunan kemik halkası ve borik asit etkileşimi, kültür ortamında osteoblastik farklılaşma ve yara iyileşmesinin yukarıdaki mekanizmalarla açıklanabilmesi, translasyonel tıp anlamında klinik kullanımı olan yeni tedavi imkanları sunabilecektir.

Alkalen fosfataz (ALP), osteojenik farklılaşmanın erken aşama belirtecidir ve ALP'nin ekspresyonu, osteoblastların ana karakteristik özelliklerinden biridir. Osteoprogenitör hücreler yeni kemik oluştururken, ALP aktivitesi artar. Son olarak osteoblastlar osteositlere dönüşürken ALP aktivitesi stabilize olur (288). Ying ve ark. (149) ALP boyamasıyla, 10 ve 100 ng/ml borik asit ile muamele edilen iMKH'lerin, kontrole kıyasla daha yüksek bir ALP aktivitesi gösterdiğini keşfetmiştir. Gerçek zamanlı PCR ile ALP ekspresyonunun 10 ve 100 ng/ml borik asit gruplarında arttığını belirtmişlerdir. Taşlı ve ark. (269) iDGKHlerin NaB'li ve NaB'siz ortamdaki osteojenik farklılaşmalarını değerlendirmiş ve 14 günün sonunda NaB ile tedavi edilen grubun daha yüksek ALP aktivitesi gösterdiğini belirtmişlerdir. Movahedi ve ark. (16) sıçan KMKH'lerinin 6 ng ve 6 µg/ml gibi düşük dozlarda osteoblastlara farklılaşması üzerindeki etkisini araştırmış, kontrol hücrelerindeki ALP aktivitesinin 5. günde minimal ve 21. günde maksimum seviyesine ulaştığını belirtmişlerdir. Hücrelerin 6 ng/ml ve 6 µg/ml borik asit ile muamelesi, 5 ve 10. günlerde ALP aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur. 15 ve 21. günlerde ALP aktivitesinde kontrol ve 6µg/ml ile muamele edilmiş hücrelere kıyasla sadece 6 ng/ml ile muamele edilmiş hücrelerde önemli bir artış görülmüştür. Li ve ark. (271) BNNT tabakaları ile MKH'ler arasındaki etkileşimi değerlendirmişlerdir. Düşük BNNT içeriğine sahip BNNT katmanındaki MKH'ler, 7 günlük kültürden sonra kontrol grubundan daha yüksek ALP aktivitesi gösterir. BNNT katmanı üzerinde kültürlen MKH'lerin ALP aktivitesi, 14 günlük kültürden sonra 7 günlük kültürden sonraki aktiviteye kıyasla önemli ölçüde artmıştır. 1-10 µg/ml konsantrasyona sahip BNNT katmanında, MKH'ler 14 günlük kültürden sonra kontrollere kıyasla belirgin şekilde artmış ALP aktivitesi sergiler. 2 µg/ml

konsantrasyona sahip BNNT katmanı üzerindeki MKH'ler, diğer tüm konsantrasyonlar arasında en yüksek ALP aktivitesini gösterir. 2 µg/ml konsantrasyonlu BNNT katmanı üzerinde MKH'lerin ALP aktivitesi, 14 günlük kültürden sonra BNNT katmanı olmayanlara kıyasla yaklaşık iki kat daha yüksektir. 14 günlük kültürden sonra toplam protein başına ALP aynı eğilimi gösterir, toplam protein başına en yüksek ALP 2 µg/ml konsantrasyondadır. Liu ve ark. (273) iSDKH'den osteoblastik farklılaşmayı değerlendirdiklerinde test edilen tüm iskelelerde Mg borat, Zn borat ve borik asit, ALP aktivitesini önemli ölçüde arttırmıştır. Zn borat içeren iskele, kültürün 14. gününde en yüksek ekspresyonu gösterirken borik asit içeren iskele, kültürasyon döneminde sadece orta derecede eksprese edilmiştir. Gizer ve ark. (275) B-nHAp kompozitin iKMKH'lerin çoğalması ve farklılaşması üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında, B-nHAp ve nHAp kompozitler 7 ve 21. günlerde ALP aktivitesini değiştirmemiştir. Bununla birlikte bu kompozitler ile ALP aktivitesi pozitif kontrole kıyasla 14. günde azalmıştır. 21. günde B-nHAp kompozit, 0.006 µg/ml borik aside kıyasla 0.9 µg/ml dozda iKMKH'lerin osteojenik farklılaşmasını önemli ölçüde arttırmıştır. iKMKH'lerin ALP aktivitesi 0.006 µg/ml borik asit dozu ile artmış, ancak 7. günde 0.06 ila 6 µg/ml dozlarda değişmemiştir. Borik asit, iKMKH'lerin ALP aktivitesini 0.006 µg/ml dozda etkilememiştir; bununla birlikte 14. günde ALP aktivitesi tedavi edilmemiş kontrollere kıyasla 0.06-6 µg/ml'de azaltmıştır. Tüm borik asit dozları kontrollere kıyasla 21. günde osteojenik farklılaşmayı azaltmıştır. Arslan ve ark. (272) osteojenik aktiviteyi arttırmak için üç boyutlu PBAT iskeleler içine amorf HAp ve B-HAp nanopartikülleri kapsülledikleri çalışmalarında B-HAp-PBAT iskelelerinde kültürlenen iKMKH'lerin kültür süresi boyunca en yüksek ALP aktivitesi, kalsiyum ve kolajen miktarlarına sahip olduğunu gözlemlemiştir. Yapılan bir çalışmada iPKH'lerin MKH'ye farklılaşması üzerinden osteogenez kültür ortamında incelenmiş ve koşullu besi yeri etkisine 14 gün sürecinde bakılmıştır. Koşullu osteojenik besi yeri sağlamak amacıyla, fare osteoblast koşullu besi yeri ve normal besi yerinin 3:7 oranında karıştırılarak kullanıldığında osteogenezle ilgili genlerden ALP, RUNX2, COL1 ve ON ekspresyonlarının anlamlı bir şekilde arttığı saptanmıştır (289). İlgili bir çalışmada metformin ile bu etkinin daha da fazlaştığı görülmüştür (290). Bu çalışmalara ek olarak makrofaj kültüründen elde edilen koşullu besi yerinin benzer şekilde aynı

faktörleri arttırdığı ve hidrojen peroksit ile yapılan kültür ortamındaki hastalık modelinde makrofajın koşullu besi yerinin tedavi edici olduğu gösterilmiştir (291). Özellikle ALP ekspresyonuna eksozomların katkısını inceleyen bir başka çalışmada kemik iliği ile çene kemiği MKH'leri karşılaştırılıp AK boyaması, ALP ve osteojenik gen ekspresyonlarına bakıldığında çene kemiği MKH'lerinin daha etkin bir şekilde osteogenezi sağladığı in vitro ve in vivo örneklerle gösterilmiştir (292). Bizim çalışmamızda ALP ekspresyonu osteoblastik farklılaşma sürecinde gruplar arasında anlamlı farklar içeren bulgular gösterdi. Kemik halka etkisinin yapılan H-skorlamaya göre anlamlı bir şekilde en yüksek düzeyde olduğu bulundu. Hepsi farklılaşmış osteoblastları ve kemiksi adacıkları içeren kültür gruplarında bu farkın görülmesinin kemikten gelen sinyal, borik asitin farklı etki mekanizmaları ve hücrenin farklı davranışlarından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Osteonektin kalsiyum bağlayıcı matriks-hücrel bir proteindir. Bir zamanlar ON'nin özellikle mineralize dokularda ifade edildiği düşünülmüş, ancak daha sonra hem mineralize hem de mineralize olmayan dokularda çok daha geniş bir ekspresyon paternine sahip olduğu gösterilmiştir. ON, kemik oluşumu sırasında osteoblastlar tarafından salgılanır. Olgunlaşmamış kemikte yüksektir ve kolajenin mineralizasyonu ile ilişkilidir. Olgun kemik homeostazında ON ekspresyonunda bir azalma görülür. Özellikle yüksek turnover hızına sahip kemiklerde, aktif osteoblastlarda, kemik iliği progenitor hücrelerinde ve osteoidte yüksek seviyede ekspresyon edilir (293). Akdere ve ark. (247) borik asitin farklı dozlarda YKH'lerin osteojenik potansiyeli üzerindeki etkisini değerlendirdiğinde ON ekspresyon seviyelerinin her grup için 7 ve 14. günlerde neredeyse aynı olduğunu belirtmişlerdir. ON değeri 21. günde, 10 µg/ml borik asit grubunda kontrol grubundan daha yüksektir. Ayrıca 10 µg/ml borik asit grubu, 1 µg/ml borik asit grubundan daha yüksektir. ON ekspresyonunun diğer belirteçler ile birlikte varlığı ve iskeleler ile ekspresyonunun artması biyomühendislik ürünlerinin etkisini göstermektedir. Son zamanlarda klinikte kullanılan *Wharton's Jelly* MKH'leri için 3 boyutlu biyomimetik iskele yapılarak ON ve diğer belirteçlerin translasyonel açıdan çok daha uyumlu bir ortamda artmış olduğu gösterilmiştir. HAp-kitosan-jelatin kombinasyonunun hücrenin yapışması, çoğalması, göçü ve farklılaşması anlamında ve özellikle salgıladığı matriks proteinleri açısından ideale yakın olduğu düşünülmüştür (294). Bir başka çalışmada nanoporöz mikropiramidal

yapılı Si yüzey iskelesi kullanılarak MKH'ler kültüre edilmiş ve elektrik uyarısı ile ON ve diğer belirteçlerin anlamlı bir şekilde arttığı görülmüş ve daha fazla osteoblastik farklılaşma elde edilmiştir (295). Üç boyutlu kültür ortamlarının kullanılmasının iki boyutlu ortamlara göre terminal farklılaşma gösteren osteoblastlardaki ON ekspresyonunu anlamlı bir şekilde arttırdığı da gösterilmiş (296). Çalışmamızdaki ON immünohistokimya bulguları kemik halka ve borik asit etkisi altında benzer şekilde daha iyi bir osteoblastik farklılaşmanın olduğunu gösterdi. Bu etkinin üç boyutlu kültür ortamında incelenmesinin translasyonel tıp anlamında daha anlamlı veriler getireceği düşünüldü.

Osteokalsin, kolajenöz olmayan bir proteindir ve OK'den oluşan kolajenöz olmayan kemik proteininin %15'ini ifade eder. OK'nin yapısı, K vitaminine bağımlı karboksilasyona uğrayan üç glutamik asit kalıntısından oluşur ve bu γ -karboksiglutamik asit kalıntıları, kemik minerali hidroksiapatite yüksek afinite ile bağlanması için OK'yı destekler. OK, vücudun metabolik aktivasyonu, kemik döngüsü, mineralizasyon ve kalsiyum iyonu homeostazının düzenlenmesinde rol oynar (297,298). Osteoblast farklılaşmasının negatif regülatörü olarak bilinir ve farklılaşmanın sonraki safhasında eksprese edilir (299). OK, mineralizasyon sürecinin kontrolüne dahil olmuş, osteojenik farklılaşmanın geç aşamasında ortaya çıkmış ve osteoblastik soyun olgun hücreleri ile karakterize edilmiştir (300,301). Liu ve ark. (273) iSDKH'den en yüksek OK ekspresyonunu 21 günlük kültürden sonra Zn borat örneklerinde gözlemlemiştir. Farklılaştırılmış iSDKH'lerin gen ekspresyonu Mg borat ve Zn borat tarafından uyarılmıştır; bununla birlikte borik asit osteoblastik farklılaşma için en düşük etkiyi indüklemiştir. Hakkı ve ark. (146)'nın çalışmasında tüm zaman dilimlerinde 10, 100 ve 1000 ng/ml borik asit OK ekspresyonunu arttırmıştır. Ying ve ark. (149) gerçek zamanlı PCR ile OK ekspresyonunun 10 ve 100 ng/ml borik asit gruplarında arttığını tespit etmiştir. Li ve ark. (271) BNNT tabakaları ile MKH'ler arasındaki etkileşimi değerlendirmişlerdir. BNNT katmanlarındaki MKH'ler, 14 günlük kültürden sonraki kontrole kıyasla önemli ölçüde artmış OK protein konsantrasyonu göstermiştir. 10 μ g/ml konsantrasyonlu BNNT katmanı üzerindeki MKH'ler en yüksek OK miktarını göstermiştir. Arslan ve ark. (272) osteojenik aktiviteyi arttırmak için PBAT iskeleler içine amorf HAp ve B-HAp nanopartikülleri kapsülledikleri çalışmalarında B-HAp-PBAT yapı iskelelerindeki iMKH'lerin daha

yüksek OK ifadesi gösterdiğini ve borik asit ilavesinin mineralizasyonu dikkate değer şekilde indüklediğini belirtmişlerdir. Yapılan birçok çalışmada OK ekspresyonunun osteojenik farklılaşmada var olduğu ve birçok faktör tarafından etkilendiği gösterilmiştir. İskele çalışmalarında MKH farklılaşmasında OK ekspresyonunun arttığı in vitro ve in vivo çalışmalarla saptanmıştır. OK, ON ekspresyonu, AK, VK ve ALP-Elisa yöntemleriyle birlikte kemikleşmenin belirteçleri olarak yer almaktadır (241,242,302). Kültür ortamındaki kemikleşmede OK ekspresyonunun farklılaşma faktörleri olan deksametazon, askorbik asit ve betagliserofosfat düzeyleri ile ilişki olduğu bulunmuştur (303). Çalışmamızdaki OK bulguları yukarıdaki çalışmalarda gösterilen iskele etkisine benzer şekilde kemik halka ve borik asit etkisinin gerçekleştiğini göstermektedir. OK ekspresyonunun çalışmamızdaki kültür hücrelerinde farklılaşmanın gerçekleştiğini göstermesi ve gruplar arasında farklılıklar göstermesi kültürdeki kemikleşmenin değişik süreçlerini göstermekte olup literatür ile uyumlu bulundu. Bu durum kültür ortamındaki kemik halkasının ve yaptığımız çizik ile yara oluşturulmasının klinik durumu taklit eden bir model olduğunu düşündürdü.

Kemiğin yeniden yapılanmasında osteoklastların rezorbe ettiği kalsifiye kemik matriksine osteoblastların yapısal bütünlüğü koruyacak bir biçimde mekanik yüklenmesi yoluyla yeniden yapılanmayı sağlaması asıl mekanizmadır. MKH öncülerinden oluşan osteoblastlar lokal ve çevresel sinyallerin etkisi altında otokrin ve parakrin sinyaller ile bu yapılanmayı gerçekleştirirler. Yapılan bir çalışmada proliferasyonun gerçekleştiği 2-5. gün, farklılaşmanın gerçekleştiği 5-10. gün ve maturasyonun gerçekleştiği 10-28. gün kültürdeki gen ekspresyonlarına bakıldığında önemli belirteç olarak RANKL ve TNF-A ile MKH etkileşiminin matriks oluşumu ve mineralizasyonunun gerçekleşmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (304). MKH'nin osteoblastik farklılaşma sürecinde osteoklast öncülerini etkilediği de gösterilmiştir. RAW264 dizin hücrelerinin osteoklastik farklılaşma sürecinde MKH kültüründen elde edilen besi yerinin koşullu besi yeri olarak kullanılmasıyla RANKL ekspresyonunun yükseldiği OPG ekspresyonunun düştüğü saptanmıştır (305). Bitki ekstraktının osteoblastik farklılaşmaya etkisinin incelendiği bir çalışmada RANKL ile indüklenmiş SEMA4D ve SEMA7A üzerinden osteoklastogenezi azalttığı ve osteoblastogenezi arttırdığı bulunmuştur. Bu durum MKH farklılaşması sürecinde, terminal farklılaşma öncesinde ve sırasında, RANKL ekspresyonunun kemik

remodelingini yönlendirmek üzere önemli olduğunu düşündürmüştür (276). Benzer şekilde W9 peptidinin insan MKH osteojenik farklılaşmasında RANKL'ı bloklayarak kemik formasyonunu aktive ettiği ve bu aktivasyonun P38, JNK, Erk-2, Akt ve BMP-2 ile ilişkili olduğu bulunmuştur (306). MKH'nin osteoblastik farklılaşmasında miR-99a-5p ekspresyonunun önemli olduğu, *Knock-out* yapılarak azaltılan veya aşırı ekspresyon yapılarak artırılan mRNA'nın osteoklastogenesis ile osteoblastogenesis arasındaki iletişimi sağlamak üzere birbirlerine sinyal gönderdikleri saptanmıştır (286). Çalışmamızda osteoblastik farklılaşmanın terminal döneminde RANKL ekspresyonu anlamlı bir şekilde yüksek bulundu ve bunun kemik halkası ve borik asit ile ilişkili olduğu görüldü. Yukarıdaki çalışmalarla benzer şekilde MKH'nin farklılaşma sürecinde RANKL içerdiği ve bunu kemiksi adacık yapma yönünde kullandığı düşünüldü.

İlk defa yapılmış bir deney modeli olarak MKH'ler üzerinde kemik halkasının ve borik asitin etkilerinin araştırılması ve yine ilk defa bu ortamda yapılmış yara modeline etkilerinin incelenmesi ile bu çalışmada elde edilen sonuçlar klinik uygulamalarda kullanılacak önemli veriler elde edilmesini sağlamıştır. Çalışmamızın en önemli katkısı kemik halkasının sağladığı sinyallerin ve progenitör hücrelerin in vivo ortam için ön görülen sonuçlarıdır. Klinikte kolaylıkla kullanılacak olan borik asit in vivo şartlarda kemikten gelen progenitör hücreler ve sinyallerle karşılaşacaktır. İki boyutlu kültür ortamında aldığımız bu sonuçların üç boyutlu in vivo ortamda farklı olabilme ihtimaline karşılık bizim bulduğumuz olumlu katkı daha da etkin bir halde gerçekleşebilir. Borik asitin MKH üzerindeki olağanüstü olumlu etkileri bu çalışma ile teyit edilmiştir. Kemik halkasının bu duruma katkısı sonucu açığa çıkardığımız veriler, kemik iyileşmesinde ve rejenerasyon işlemlerinde istenilen ideal tedavinin yapılabileceğini düşündürmüştür. Osteojenik farklılaşma ve kemiksi adacık oluşumunda kemik halkası ve borik asit kullanımının bizim gösterdiklerimizin dışındaki proteinlerin ekspresyonları, Western Blot ve PCR analizleri ile değişen genlerin belirlenmesi ve değerlendirilmesi mükemmel tedavi için önemli bir yol gösterici olacaktır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

- Kemik halkasının kültür ortamında eksplanttan biraz daha farklı olacak şekilde kullanılması bildiğimiz kadarıyla literatürdeki ilk deneysel modeldir.
- İki haftalık bir zaman aralığından sonra kemikten gelen progenitör hücrelerin kontrol grubunda osteojenik farklılaşmaya gitmesi ve kemiksi adacıklar oluşturması önemli bir veri olarak düşünüldü.
- Kemik halkasından gelen progenitör sinyallerin MKH'lerin osteojenik farklılaşma potansiyelini olumlu yönde etkilediği ve arttırdığı görüldü.
- Bu çalışma sonucunda borik asitin MKH'lerin osteojenik farklılaşması üzerine bilinen etkilerine ek olarak, kemik halkası etkileşimi sayesinde bilinmeyen veriler ortaya çıktı. MKH'lerin kemikten gelen progenitör sinyaller sayesinde farklılaşma yoluna gittiği ve borik asitin bu etkiyi çok daha fazla arttırdığı görüldü.
- Bu etkilerin MKH ve borik asit ile olan etkileşimleri ise daha önce incelenmemiş olmasından dolayı çalışmamız özgün ve anlamlıdır.
- MKH'nin borik asit ile etkileşiminin toksik olmayan dozlarda oldukça anlamlı ve fonksiyonel olduğu görüldü.
- Borik asitin MKH'ler üzerinde yüksek dozlarda bile toksik etki göstermesinin çok olası olmadığı tespit edildi.
- Bu modelin özellikle yara iyileşmesi bölümü göz önüne alındığında diş hekimliği ve tıp uygulamalarında model olarak kullanılabileceği düşünüldü.
- İn vivo aşamalara geçilmeden önce, biyomateryallerin, ilaçların vb. faktörlerin etkilerinin incelenebileceği ve sonuçların öngörülebileceği, anlamlı verilere neden olabilecek bir model olduğu düşünüldü.
- Osteojenik farklılaşma ve kemiksi adacık oluşumunda kemik halkası ve borik asit kullanımının MKH'ler üzerindeki etkilerinin, bizim kullandıklarımızın dışındaki proteinlerin immünohistokimyası, Western Blot ve PCR analizleri ile gösterilmesi, değişen genlerin belirlenmesi ve değerlendirilmesi mükemmel tedavi için önemli bir yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Hassel AJ, Safaltin V, Grill S, et al. Risk factors for tooth loss in middle and older age after up to 10 years: An observational cohort study. *Arch Oral Biol.* 2018;86:7-12.
2. Rocchietta I, Fontana F, Simion M. Clinical outcomes of vertical bone augmentation to enable dental implant placement: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8 Suppl):203-215.
3. Moy PK, Aghaloo T. Risk factors in bone augmentation procedures. *Periodontol* 2000. 2019;81(1):76-90.
4. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317.
5. Hernigou P, Bernaudin F, Reinert P, Kuentz M, Vernant JP. Bone-marrow transplantation in sickle-cell disease. Effect on osteonecrosis: a case report with a four-year follow-up. *J Bone Joint Surg Am.* 1997;79(11):1726-1730.
6. Jin YZ, Lee JH. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Bone Regeneration. *Clin Orthop Surg.* 2018;10(3):271-278.
7. Khojasteh A, Eslaminejad MB, Nazarian H, et al. Vertical bone augmentation with simultaneous implant placement using particulate mineralized bone and mesenchymal stem cells: a preliminary study in rabbit. *J Oral Implantol.* 2013;39(1):3-13.
8. Jin IG, Kim JH, Wu HG, Kim SK, Park Y, Hwang SJ. Effect of bone marrow-derived stem cells and bone morphogenetic protein-2 on treatment of osteoradionecrosis in a rat model. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015;43(8):1478-1486.
9. The Effect of Boric Acid and Borax on the Broad Bean and certain other Plants, *Annals of Botany*, Volume os-37, Issue 4, October 1923, Pages 629–672
10. Nielsen, F.H., Boron an overlooked element of potential nutritional importance, *Nutr. Today* (Jan/Feb), 1988; 4–7.
11. Chapin RE, Ku WW, Kenney MA, McCoy H. The effects of dietary boric acid on bone strength in rats. *Biol Trace Elem Res.* 1998;66(1-3):395-399.
12. Sutherland B, Strong P, King JC. Determining human dietary requirements for boron. *Biol Trace Elem Res.* 1998;66(1-3):193-204.
13. Gorustovich AA, Steimetz T, Nielsen FH, Guglielmotti MB. A histomorphometric study of alveolar bone modelling and remodelling in mice fed a boron-deficient diet. *Arch Oral Biol.* 2008;53(7):677-682.
14. Gölge UH, Kaymaz B, Arpacı R, et al. Effects of Boric Acid on Fracture Healing: An Experimental Study. *Biol Trace Elem Res.* 2015;167(2):264-271.
15. Ulu M, Kütük N, Cıçık MF, et al. Effects of boric acid on bone formation after maxillary sinus floor augmentation in rabbits. *Oral Maxillofac Surg.* 2018;22(4):443-450.
16. Movahedi Najafabadi BA, Abnosi MH. Boron Induces Early Matrix Mineralization via Calcium Deposition and Elevation of Alkaline Phosphatase

Activity in Differentiated Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Cell J*. 2016;18(1):62-73.

17. Ammann, P., Rizzoli, R. Bone strength and its determinants. *Osteoporos Int* 14, 13–18 (2003).

18. Marotti G, Palumbo C. The mechanism of transduction of mechanical strains into biological signals at the bone cellular level. *Eur J Histochem*. 2007;51 Suppl 1:15-19.

19. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*. 2008;42(4):606-615.

20. Nango N, Kubota S, Hasegawa T, Yashiro W, Momose A, Matsuo K. Osteocyte-directed bone demineralization along canaliculi. *Bone*. 2016;84:279-288.

21. Lin Z, Fateh A, Salem DM, Intini G. Periosteum: biology and applications in craniofacial bone regeneration. *J Dent Res*. 2014;93(2):109-116.

22. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect*. 1996;45:371-386.

23. Raisz L. G., Rodan G. A. Cellular basis of bone turnover. *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*, edited by L. V. Avioli and S. M. Krane. Ed. 2, pp. 1-41. Philadelphia, W. B. Saunders, 1990.

24. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - a hypothesis. *Calcif Tissue Int*. 1982;34(3):311.

25. Russell R. G. G., Bunning, R. A. D., Hughes, D. E., Gowen, M. Humoral and local factors affecting bone formation and resorption. In *New Techniques in Metabolic Bone Disease*, pp. 1-20. Edited by J. C. Stevenson. London. Butterworth. 1990.

26. Raisz LG, Kream BE. Regulation of bone formation. *N Engl J Med*. 1983;309(1):29-35.

27. Cooper RR, Milgram JW, Robinson RA. Morphology of the osteon. An electron microscopic study. *J Bone Joint Surg Am*. 1966;48(7):1239-1271.

28. Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone*. 1992;13 Suppl 1:S3-S6.

29. Matthews J. L. Bone structure and ultrastructure. In *Fundamental and Clinical Bone Physiology*, pp. 4-44. Edited by M. R. Urist. Philadelphia, J. B. Lippincott, 1980.

30. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1116:281-290.

31. Väänänen HK, Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):132-138.

32. Burger EH, Klein-Nulend J, van der Plas A, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone--their role in mechanotransduction. *J Nutr*. 1995;125(7 Suppl):2020S-2023S.

33. Marotti G. The osteocyte as a wiring transmission system. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2000;1(2):133-136.

34. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*. 1989;245(4920):855-857.

- 35.** Athanasou NA, Sabokbar A. Human osteoclast ontogeny and pathological bone resorption. *Histol Histopathol.* 1999;14(2):635-647.
- 36.** Glimcher MJ. The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Instr Course Lect.* 1987;36:49-69.
- 37.** Boskey AL. Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization. *Bone Miner.* 1989;6(2):111-123.
- 38.** Fisher LW, Termine JD. Noncollagenous proteins influencing the local mechanisms of calcification. *Clin Orthop Relat Res.* 1985;(200):362-385.
- 39.** Allen MR, Hock JM, Burr DB. Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone.* 2004;35(5):1003-1012.
- 40.** Reilly TM, Seldes R, Luchetti W, Brighton CT. Similarities in the phenotypic expression of pericytes and bone cells. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;(346):95-103.
- 41.** Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lopez-Alonso A, Gonzalez R, Varela H. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1992;(275):280-286.
- 42.** Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol.* 2006;34(5):548-565.
- 43.** Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood.* 2015;125(17):2605-2613. doi:10.1182/blood-2014-12-570200
- 44.** Buckwalter, J. A. Musculoskeletal tissues and the musculoskeletal system. *Turek's Orthopaedics: Principles and Their Application.* S. L. Weinstein and J. A. Buckwalter. Ed. 5. pp. 13-67. Philadelphia. J. B. Lippincott. 1994.
- 45.** Currey J. D. Function and form of bone. *Biomechanics of Diarthrodial Joints.* Vol. 2, pp. 3-30. New York, Springer. 1990.
- 46.** Buckwalter J.A., Cruess R. Healing of musculoskeletal tissues. *Rockwood and Green's Fractures in Adults.* pp. 181-222. Lippincott, 1991.
- 47.** Sevitt S. Bone Repair and Fracture Healing in Man. pp. 1-24. New York, Churchill Livingstone, 1981.
- 48.** Cohen J, Harris WH. The three-dimensional anatomy of haversian systems. *J Bone Joint Surg Am.* 1958;40-A(2):419-434.
- 49.** Currey J.D. The Mechanical Adaptations of Bones. Princeton, New Jersey. Princeton University Press, 1984.
- 50.** Martin IL B., Burr D. B. Structure, Function and Adaptation of Compact Bone. New York, Raven Press. 1989.
- 51.** Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater.* 2008;15:100-114. Published 2008 May
- 52.** Marks SC., Hermey DC. The Structure and Development of Bone. *Principles of Bone Biology.* pp. 3-24. Academic Press, San Diego, 1996.
- 53.** Percival CJ, Richtsmeier JT. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Dev Dyn.* 2013;242(8):909-922.

- 54.** Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone*. 2015;80:14-18.
- 55.** Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*. 1999;5(6):623-628.
- 56.** Burkus JK, Ganey TM, Ogden JA. Development of the cartilage canals and the secondary center of ossification in the distal chondroepiphysis of the prenatal human femur. *Yale J Biol Med*. 1993;66(3):193-202.
- 57.** Baron J, Klein KO, Yanovski JA, et al. Induction of growth plate cartilage ossification by basic fibroblast growth factor. *Endocrinology*. 1994;135(6):2790-2793.
- 58.** Burr DB, Martin RB, Schaffler MB, Radin EL. Bone remodeling in response to in vivo fatigue microdamage. *J Biomech*. 1985;18(3):189-200.
- 59.** Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*. 2006;85(7):596-607.
- 60.** Raisz LG. Clinical practice. Screening for osteoporosis. *N Engl J Med*. 2005;353(2):164-171.
- 61.** Parfitt AM. Life history of osteocytes: relationship to bone age, bone remodeling, and bone fragility. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2002;2(6):499-500.
- 62.** Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1092:385-396.
- 63.** Schepetkin I. Osteoclastic bone resorption: normal and pathological. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;832:170-193.
- 64.** Bonewald LF. Osteocytes: a proposed multifunctional bone cell. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2002;2(3):239-241.
- 65.** Harkness LS, Bonny AE. Calcium and vitamin D status in the adolescent: key roles for bone, body weight, glucose tolerance, and estrogen biosynthesis. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2005;18(5):305-311.
- 66.** Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19(5):444-451.
- 67.** Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357(3):266-281.
- 68.** Lips P, Hosking D, Lippuner K, et al. The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation [published correction appears in *J Intern Med*. 2007 Apr;261(4):408]. *J Intern Med*. 2006;260(3):245-254.
- 69.** Quinn JM, McGee JO, Athanasou NA. Cellular and hormonal factors influencing monocyte differentiation to osteoclastic bone-resorbing cells. *Endocrinology*. 1994;134(6):2416-2423.
- 70.** Quinn JM, McGee JO, Athanasou NA. Cellular and hormonal factors influencing monocyte differentiation to osteoclastic bone-resorbing cells. *Endocrinology*. 1994;134(6):2416-2423.

- 71.** McCauley, L.K. & Nohutcu, R.M. (2002). Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: Principles and implications for diagnosis and therapy. *Journal of Periodontology* 73, 1377–1391.
- 72.** Fazzalari NL. Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporos Int*. 2011;22(6):2003-2006.
- 73.** Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005;36(12):1392-1404.
- 74.** Gerstenfeld LC, Alkhiary YM, Krall EA, et al. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *J Histochem Cytochem*. 2006;54(11):1215-1228.
- 75.** Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res*. 2008;87(2):107-118.
- 76.** Runyan CM, Gabrick KS. Biology of Bone Formation, Fracture Healing, and Distraction Osteogenesis. *J Craniofac Surg*. 2017;28(5):1380-1389.
- 77.** Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551-555.
- 78.** Hankenson KD, Zimmerman G, Marcucio R. Biological perspectives of delayed fracture healing. *Injury*. 2014;45 Suppl 2(0 2):S8-S15.
- 79.** Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, et al. Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone*. 2009;44(2):335-344.
- 80.** Wang Q, Huang C, Zeng F, Xue M, Zhang X. Activation of the Hh pathway in periosteum-derived mesenchymal stem cells induces bone formation in vivo: implication for postnatal bone repair. *Am J Pathol*. 2010;177(6):3100-3111.
- 81.** Jilka RL, O'Brien CA, Ali AA, Roberson PK, Weinstein RS, Manolagas SC. Intermittent PTH stimulates periosteal bone formation by actions on post-mitotic preosteoblasts. *Bone*. 2009;44(2):275-286.
- 82.** Bodine PV, Seestaller-Wehr L, Kharode YP, Bex FJ, Komm BS. Bone anabolic effects of parathyroid hormone are blunted by deletion of the Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1. *J Cell Physiol*. 2007;210(2):352-357.
- 83.** Guo J, Liu M, Yang D, et al. Suppression of Wnt signaling by Dkk1 attenuates PTH-mediated stromal cell response and new bone formation. *Cell Metab*. 2010;11(2):161-171.
- 84.** Minear S, Leucht P, Jiang J, et al. Wnt proteins promote bone regeneration. *Sci Transl Med*. 2010;2(29):29ra30.
- 85.** Hall BK, Miyake T. The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. *Anat Embryol (Berl)*. 1992;186(2):107-124.
- 86.** Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT. A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res*. 1993;11(2):305-312.
- 87.** Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation?. *Mech Dev*. 1999;87(1-2):57-66.

- 88.** Craft PD, Mani MM, Pazel J, Masters FW. Experimental study of healing in fractures of membranous bone. *Plast Reconstr Surg.* 1974;53(3):321-325.
- 89.** Paccione MF, Warren SM, Spector JA, Greenwald JA, Bouletreau PJ, Longaker MT. A mouse model of mandibular osteotomy healing. *J Craniofac Surg.* 2001;12(5):444-450.
- 90.** Hasegawa T, Miwa M, Sakai Y, et al. Mandibular hematoma cells as a potential reservoir for osteoprogenitor cells in fractures [published correction appears in *J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Apr;71(4):825.
- 91.** Oe K, Miwa M, Sakai Y, Lee SY, Kuroda R, Kurosaka M. An in vitro study demonstrating that haematomas found at the site of human fractures contain progenitor cells with multilineage capacity. *J Bone Joint Surg Br.* 2007;89(1):133-138.
- 92.** Steinbrech DS, Mehrara BJ, Rowe NM, et al. Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105(6):2028-2038.
- 93.** Spector JA, Luchs JS, Mehrara BJ, Greenwald JA, Smith LP, Longaker MT. Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. *Plast Reconstr Surg.* 2001;107(1):124-134.
- 94.** Lindhe, J., & In Lang, N. P. (2015). *Clinical periodontology and implant dentistry.*
- 95.** Pizzorno L. Nothing Boring About Boron. *Integr Med (Encinitas).* 2015;14(4):35-48.
- 96.** Devirian TA, Volpe SL. The physiological effects of dietary boron. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003;43(2):219-231.
- 97.** Ricardo A, Carrigan MA, Olcott AN, Benner SA. Borate minerals stabilize ribose. *Science.* 2004;303(5655):196.
- 98.** Kot FS. Boron sources, speciation and its potential impact on health. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2009;8:3–28
- 99.** Woods WG. An introduction to boron: history, sources, uses, and chemistry. *Environ Health Perspect.* 1994;102 Suppl 7(Suppl 7):5-11.
- 100.** Kistler RB, Helvacı C. Boron and borates. *Industrial minerals and rocks* 1994;6:171–186
- 101.** Sirin Y. Mining, Metallurgy, and Chemistry, Eti Mine Works General Management. Annual Report, 2003.
- 102.** Smith RA, McBroom RB. Boron Oxides, Boric Acid, and Borates. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* 2000
- 103.** Naghii MR. The Significance of Dietary Boron, with Particular Reference to Athletes. *Nutrition and Health*, vol. 13, no. 1, Jan. 1999, pp. 31–37.
- 104.** Loomis WD, Durst RW. Chemistry and biology of boron. *Biofactors.* 1992;3(4):229-239.
- 105.** Nielsen FH. Boron- an overlooked element of potential nutritional importance. *Nutrition Today.* 1988;23(1):4–7

- 106.** Khaliq H, Juming Z, Ke-Mei P. The Physiological Role of Boron on Health. *Biol Trace Elem Res.* 2018;186(1):31-51.
- 107.** Howe PD. A review of boron effects in the environment. *Biol Trace Elem Res.* 1998;66(1-3):153-166.
- 108.** Kabu M, Akosman MS. Biological effects of boron. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2013;225:57-75.
- 109.** Samman S, Naghii MR, Lyons Wall PM, Verus AP. The nutritional and metabolic effects of boron in humans and animals. *Biol Trace Elem Res.* 1998;66(1-3):227-235.
- 110.** Argust P. Distribution of boron in the environment. *Biol Trace Elem Res.* 1998;66(1-3):131-143.
- 111.** Hunt CD, Shuler TR, Mullen LM. Concentration of boron and other elements in human foods and personal-care products. *J Am Diet Assoc.* 1991;91(5):558-568.
- 112.** Bhasker TV, Gowda NKS, Pal DT, Bhat SK, Pattanaik AK. Boron profile in common feedstuffs used in tropical livestock systems. *Anim Feed Sci Technol* 2015;209:280–285
- 113.** Vanderpool RA, Johnson PE. Boron isotope ratios in commercial produce and boron-10 foliar and hydroponic enriched plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1992;40(3):462-466
- 114.** Hunt CD. Regulation of enzymatic activity: one possible role of dietary boron in higher animals and humans. *Biol Trace Elem Res.* 1998;66(1-3):205-225.
- 115.** Clarke WB, Koekebakker M, Barr RD, Downing RG, Fleming RF. Analysis of ultratrace lithium and boron by neutron activation and mass-spectrometric measurement of ³He and ⁴He. *Int J Rad Appl Instrum A.* 1987;38(9):735-743.
- 116.** Green NR, Ferrando AA. Plasma boron and the effects of boron supplementation in males. *Environ Health Perspect.* 1994;102 Suppl 7(Suppl 7):73-77.
- 117.** Rainey C, Nyquist L. Multicountry estimation of dietary boron intake. *Biol Trace Elem Res.* 1998;66(1-3):79-86.
- 118.** Kim MH, Bae YJ, Lee YS, Choi MK. Estimation of boron intake and its relation with bone mineral density in free-living Korean female subjects. *Biol Trace Elem Res.* 2008;125(3):213-222.
- 119.** Richold M. Boron exposure from consumer products. *Biol Trace Elem Res.* 1998;66(1-3):121-129.
- 120.** Rainey CJ, Nyquist LA, Christensen RE, Strong PL, Culver BD, Coughlin JR. Daily boron intake from the American diet. *J Am Diet Assoc.* 1999;99(3):335-340.
- 121.** Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington (DC): National Academies Press (US); 2001.
- 122.** Meacham SL, Taper LJ, Volpe SL. Effects of boron supplementation on bone mineral density and dietary, blood, and urinary calcium, phosphorus, magnesium, and boron in female athletes. *Environ Health Perspect.* 1994;102 Suppl 7(Suppl 7):79-82.

- 123.** Naghii MR, Mofid M, Asgari AR, Hedayati M, Daneshpour MS. Comparative effects of daily and weekly boron supplementation on plasma steroid hormones and proinflammatory cytokines. *J Trace Elem Med Biol.* 2011;25(1):54-58.
- 124.** Miljkovic D, Scorei RI, Cimpoiaşu VM, Scorei ID. Calcium fructoborate: plant-based dietary boron for human nutrition. *J Diet Suppl.* 2009;6(3):211-226.
- 125.** Başaran N, Duydu Y, Bolt HM. Reproductive toxicity in boron exposed workers in Bandırma, Turkey. *J Trace Elem Med Biol.* 2012;26(2-3):165-167.
- 126.** Newnham RE. Agricultural practices affect arthritis. *Nutr Health.* 1991;7(2):89-100.
- 127.** Moseman RF. Chemical disposition of boron in animals and humans. *Environ Health Perspect.* 1994;102 Suppl 7(Suppl 7):113-117.
- 128.** Abou-Shakra FR, Havercroft JM, Ward NI. Lithium and boron in biological tissues and fluids. *Trace Elem Med.* 1989;6:142–146.
- 129.** Hunt CD. Boron. *Encyclopedia of Food Science and Nutrition.* Academic Press. 2003;566-574.
- 130.** Von Burg R. Toxicology update. *J. Appl. Tox.* 1992;12:149–152.
- 131.** Kabu M, Civelek T. Effects of propylene glycol, methionine and sodium borate on metabolic profile in dairy cattle during periparturient period. *Rev Med Vet* 2012;163(8):419–430
- 132.** Barranco WT, Eckhert CD. Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Lett.* 2004;216(1):21-29.
- 133.** Moustafa SR. Clinical association between alterations of boron, cesium, rhenium and rubidium with the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Clin Exp Med.* 2015;3(5):247–254
- 134.** Sogut I, Paltun SO, Tuncdemir M, Ersoz M, Hurdag C. The antioxidant and antiapoptotic effect of boric acid on hepatotoxicity in chronic alcohol-fed rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018;96(4):404-411.
- 135.** Nielsen FH. Is boron nutritionally relevant?. *Nutr Rev.* 2008;66(4):183-191.
- 136.** Henderson K, Stella SL, Kobylewski S, Eckhert CD. Receptor activated Ca(2+) release is inhibited by boric acid in prostate cancer cells. *PLoS One.* 2009;4(6):e6009. Published 2009 Jun 23.
- 137.** Sogut I, Oglakci A, Kartkaya K, et al. Effect of boric acid on oxidative stress in rats with fetal alcohol syndrome. *Exp Ther Med.* 2015;9(3):1023-1027.
- 138.** Ustündağ A, Behm C, Föllmann W, Duydu Y, Degen GH. Protective effect of boric acid on lead- and cadmium-induced genotoxicity in V79 cells. *Arch Toxicol.* 2014;88(6):1281-1289.
- 139.** Coban FK, Ince S, Kucukkurt I, Demirel HH, Hazman O. Boron attenuates malathion-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. *Drug Chem Toxicol.* 2015;38(4):391-399.

- 140.** Ince S, Keles H, Erdogan M, Hazman O, Kucukkurt I. Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Drug Chem Toxicol.* 2012;35(3):285-292.
- 141.** Ince S, Kucukkurt I, Cigerci IH, Fatih Fidan A, Eryavuz A. The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2010;24(3):161-164.
- 142.** Ince S, Kucukkurt I, Demirel HH, Acaroz DA, Akbel E, Cigerci IH. Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats. *Chemosphere.* 2014;108:197-204.
- 143.** Nielsen FH, Hunt CD, Mullen LM, Hunt JR. Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women. *FASEB J.* 1987;1(5):394-397.
- 144.** Beattie JH, Peace HS. The influence of a low-boron diet and boron supplementation on bone, major mineral and sex steroid metabolism in postmenopausal women. *Br J Nutr.* 1993;69(3):871-884.
- 145.** Hunt CD. The biochemical effects of physiologic amounts of dietary boron in animal nutrition models. *Environ Health Perspect.* 1994;102 Suppl 7(Suppl 7):35-43.
- 146.** Hakki SS, Bozkurt BS, Hakki EE. Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *J Trace Elem Med Biol.* 2010;24(4):243-250.
- 147.** Benderdour M, Van Bui T, Hess K, Dicko A, Belleville F, Dousset B. Effects of boron derivatives on extracellular matrix formation. *J Trace Elem Med Biol.* 2000;14(3):168-173.
- 148.** Nzietchueng RM, Dousset B, Franck P, Benderdour M, Nabet P, Hess K. Mechanisms implicated in the effects of boron on wound healing. *J Trace Elem Med Biol.* 2002;16(4):239-244.
- 149.** Ying X, Cheng S, Wang W, et al. Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biol Trace Elem Res.* 2011;144(1-3):306-315.
- 150.** Rosen V, Wozney JM. Bone morphogenetic proteins. *Principles of Bone Biology.* Vol 2. 2nd ed. San Diego, CA. Academic Press. 2002:919-928.
- 151.** Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 2004;22(4):233-241.
- 152.** Lavery K, Swain P, Falb D, Alaoui-Ismaili MH. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem.* 2008;283(30):20948-20958.
- 153.** Martinovic S, Borovecki F, Miljavac V, et al. Requirement of a bone morphogenetic protein for the maintenance and stimulation of osteoblast differentiation. *Arch Histol Cytol.* 2006;69(1):23-36.
- 154.** Phimpilalai M, Zhao Z, Boules H, Roca H, Franceschi RT. BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res.* 2006;21(4):637-646.

- 155.** Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Cells Tissues Organs*. 2009;189(1-4):144-152.
- 156.** Ducy P, Starbuck M, Priemel M, et al. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev*. 1999;13(8):1025-1036.
- 157.** Gersbach CA, Byers BA, Pavlath GK, García AJ. Runx2/Cbfa1 stimulates transdifferentiation of primary skeletal myoblasts into a mineralizing osteoblastic phenotype. *Exp Cell Res*. 2004;300(2):406-417.
- 158.** Dupre JN, Keenan MJ, Hegsted M, Brudevold AM. Effects of dietary boron in rats fed a vitamin D-deficient diet. *Environ Health Perspect*. 1994;102 Suppl 7(Suppl 7):55-58.
- 159.** Nielsen FH, Mullen LM, Gallagher SK. Effect of boron depletion and repletion on blood indicators of calcium status in humans fed a magnesium-low diet. *J Trace Elem Exp Med*. 1990;3:45-54.
- 160.** Miljkovic D, Miljkovic N, McCarty MF. Up-regulatory impact of boron on vitamin D function -- does it reflect inhibition of 24-hydroxylase?. *Med Hypotheses*. 2004;63(6):1054-1056.
- 161.** Zofková I, Nemcikova P, Matucha P. Trace elements and bone health. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51(8):1555-1561.
- 162.** Stubbs JR, Zhang S, Friedman PA, Nolin TD. Decreased conversion of 25-hydroxyvitamin D3 to 24,25-dihydroxyvitamin D3 following cholecalciferol therapy in patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(11):1965-1973.
- 163.** Wang G, Li N, Chang S, et al. A prospective follow-up study of the relationship between C-reactive protein and human cancer risk in the Chinese Kailuan Female Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015;24(2):459-465.
- 164.** Chen F, Wang W, Teng Y, et al. Relationship between high-sensitivity C-reactive protein and obesity/metabolic syndrome in children. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2014;35(6):621-625.
- 165.** Kaur R, Matharoo K, Sharma R, Bhanwer AJ. C-reactive protein + 1059 G>C polymorphism in type 2 diabetes and coronary artery disease patients. *Meta Gene*. 2013;1:82-92. Published 2013 Nov 21.
- 166.** Hamirani YS, Katz R, Nasir K, et al. Association between inflammatory markers and liver fat: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Clin Exp Cardiol*. 2014;5:1000344.
- 167.** Rocha P, Morgan CJ, Templeton AJ, Pond GR, Naik G, Sonpavde G. Prognostic impact of C-reactive protein in metastatic prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncol Res Treat*. 2014;37(12):772-776.
- 168.** Jin Y, Sun Y, Shi X, Zhao J, Shi L, Yu X. Prognostic value of circulating C-reactive protein levels in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *J Cancer Res Ther*. 2014;10 Suppl:C160-C166.

- 169.** Au B, Smith KJ, Gariépy G, Schmitz N. C-reactive protein, depressive symptoms, and risk of diabetes: results from the English Longitudinal Study of Ageing (ELSA). *J Psychosom Res.* 2014;77(3):180-186.
- 170.** Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet.* 2010;375(9709):132-140.
- 171.** Newnham RE. Essentiality of boron for healthy bones and joints. *Environ Health Perspect.* 1994;102 Suppl 7(Suppl 7):83-85.
- 172.** Newnham R. Discovering the cure for arthritis. *Nutr Health.* 2004;17(4):281-284.
- 173.** Scorei R, Mitrut P, Petrisor I, Scorei I. A double-blind, placebo-controlled pilot study to evaluate the effect of calcium fructoborate on systemic inflammation and dyslipidemia markers for middle-aged people with primary osteoarthritis. *Biol Trace Elem Res.* 2011;144(1-3):253-263.
- 174.** Korkmaz M, Sayli U, Sayli BS, et al. Estimation of human daily boron exposure in a boron-rich area. *Br J Nutr.* 2007;98(3):571-575.
- 175.** Helliwell TR, Kelly SA, Walsh HP, et al. Elemental analysis of femoral bone from patients with fractured neck of femur or osteoarthritis. *Bone.* 1996;18(2):151-157.
- 176.** Travers RL, Rennie GC, Newnham RE. Boron and arthritis: the results of a double-blind pilot study. *J Nutr Environ Med.* 1990;1(2):127-132.
- 177.** Scorei RI, Ciofrangeanu C, Ion R, et al. In vitro effects of calcium fructoborate upon production of inflammatory mediators by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biol Trace Elem Res.* 2010;135(1-3):334-344.
- 178.** Penland JG. The importance of boron nutrition for brain and psychological function. *Biol Trace Elem Res.* 1998;66(1-3):299-317.
- 179.** Scorei RI, Popa R Jr. Boron-containing compounds as preventive and chemotherapeutic agents for cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 2010;10(4):346-351.
- 180.** Wang X. Stem cells in tissues, organoids, and cancers. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(20):4043-4070.
- 181.** Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, et al. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Med Iran.* 2017;55(1):6-23.
- 182.** Hassani SN, Moradi S, Taleahmad S, Braun T, Baharvand H. Transition of inner cell mass to embryonic stem cells: mechanisms, facts, and hypotheses. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(5):873-892.
- 183.** Nawab K, Bhare D, Bommarito A, Mufti M, Naeem A. Stem Cell Therapies: A Way to Promising Cures. *Cureus.* 2019;11(9):e5712. Published 2019 Sep 20.
- 184.** Delaney M, Ballen KK. The role of HLA in umbilical cord blood transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2010;23(2):179-187.

- 185.** Brown C, McKee C, Bakshi S, et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(9):1738-1755.
- 186.** Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. *Biotechnol Adv.* 2018;36(4):1111-1126.
- 187.** Louwen F, Ritter A, Kreis NN, Yuan J. Insight into the development of obesity: functional alterations of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Obes Rev.* 2018;19(7):888-904.
- 188.** Fraser JK, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z. Adipose-derived stem cells. *Methods Mol Biol.* 2008;449:59-67.
- 189.** Corselli M, Crisan M, Murray IR, et al. Identification of perivascular mesenchymal stromal/stem cells by flow cytometry. *Cytometry A.* 2013;83(8):714-720.
- 190.** Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue [published correction appears in *Cytometry A.* 2010 Apr;77(4):406]. *Cytometry A.* 2010;77(1):22-30.
- 191.** Nielsen FM, Riis SE, Andersen JI, et al. Discrete adipose-derived stem cell subpopulations may display differential functionality after in vitro expansion despite convergence to a common phenotype distribution. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):177. Published 2016 Dec 1.
- 192.** Zimmerlin L, Donnenberg VS, Donnenberg AD. Pericytes: a universal adult tissue stem cell?. *Cytometry A.* 2012;81(1):12-14.
- 193.** Corselli M, Chen CW, Crisan M, Lazzari L, Péault B. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(6):1104-1109.
- 194.** Rezai Rad M, Bohloli M, Akhavan Rahnama M, Anbarlou A, Nazeman P, Khojasteh A. Impact of Tissue Harvesting Sites on the Cellular Behaviors of Adipose-Derived Stem Cells: Implication for Bone Tissue Engineering. *Stem Cells Int.* 2017;2017:2156478.
- 195.** James AW, Zara JN, Zhang X, et al. Perivascular stem cells: a prospectively purified mesenchymal stem cell population for bone tissue engineering. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(6):510-519.
- 196.** König MA, Canepa DD, Cadosch D, et al. Direct transplantation of native pericytes from adipose tissue: A new perspective to stimulate healing in critical size bone defects. *Cytotherapy.* 2016;18(1):41-52.
- 197.** Chung CG, James AW, Asatrian G, et al. Human perivascular stem cell-based bone graft substitute induces rat spinal fusion [published correction appears in *Stem Cells Transl Med.* 2015 May;4(5):538. Pang, Shen [added]]. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3(10):1231-1241.
- 198.** Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, et al. Does the Harvesting Technique Affect the Properties of Adipose-Derived Stem Cells?-The Comparative Biological Characterization. *J Cell Biochem.* 2017;118(5):1097-1107.

- 199.** Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013;15(6):641-648.
- 200.** Li H, Zimmerlin L, Marra KG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Rubin JP. Adipogenic potential of adipose stem cell subpopulations. *Plast Reconstr Surg*. 2011;128(3):663-672.
- 201.** Kim WS, Han J, Hwang SJ, Sung JH. An update on niche composition, signaling and functional regulation of the adipose-derived stem cells. *Expert Opin Biol Ther*. 2014;14(8):1091-1102.
- 202.** Fraser J, Wulur I, Alfonso Z, Zhu M, Wheeler E. Differences in stem and progenitor cell yield in different subcutaneous adipose tissue depots. *Cytotherapy*. 2007;9(5):459-467.
- 203.** Palumbo P, Lombardi F, Siragusa G, Cifone MG, Cinque B, Giuliani M. Methods of Isolation, Characterization and Expansion of Human Adipose-Derived Stem Cells (ASCs): An Overview. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):1897. Published 2018 Jun 28.
- 204.** Barbatelli G, Murano I, Madsen L, et al. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;298(6):E1244-E1253.
- 205.** Raposio E, Bertozzi N. Isolation of Ready-to-Use Adipose-Derived Stem Cell (ASC) Pellet for Clinical Applications and a Comparative Overview of Alternate Methods for ASC Isolation. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2017;41:1F.17.1-1F.17.12. Published 2017 May 16.
- 206.** Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-228.
- 207.** Li SH, Liao X, Zhou TE, et al. Evaluation of 2 Purification Methods for Isolation of Human Adipose-Derived Stem Cells Based on Red Blood Cell Lysis With Ammonium Chloride and Hypotonic Sodium Chloride Solution. *Ann Plast Surg*. 2017;78(1):83-90.
- 208.** Palumbo P, Miconi G, Cinque B, et al. In vitro evaluation of different methods of handling human liposuction aspirate and their effect on adipocytes and adipose derived stem cells. *J Cell Physiol*. 2015;230(8):1974-1981.
- 209.** Radtke C, Schmitz B, Spies M, Kocsis JD, Vogt PM. Peripheral glial cell differentiation from neurospheres derived from adipose mesenchymal stem cells. *Int J Dev Neurosci*. 2009;27(8):817-823.
- 210.** Almalki SG, Agrawal DK. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation*. 2016;92(1-2):41-51.
- 211.** Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, et al. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng*. 2001;7(6):729-741.

- 212.** Gentile P, Orlandi A, Scioli MG, Di Pasquali C, Bocchini I, Cervelli V. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(3):230-236.
- 213.** García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum.* 2005;48(7):1416-1423.
- 214.** Yun IS, Jeon YR, Lee WJ, et al. Effect of human adipose derived stem cells on scar formation and remodeling in a pig model: a pilot study. *Dermatol Surg.* 2012;38(10):1678-1688.
- 215.** Rigotti G, Marchi A, Galiè M, et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(5):1409-1424.
- 216.** da Silva RA, de Camargo Andrade AF, da Silva Feltran G, et al. The role of triiodothyronine hormone and mechanically-stressed endothelial cell paracrine signalling synergism in gene reprogramming during hBMSC-stimulated osteogenic phenotype in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 2018;478:151-167.
- 217.** Bertolini F, Lohsiriwat V, Petit JY, Kolonin MG. Adipose tissue cells, lipotransfer and cancer: a challenge for scientists, oncologists and surgeons. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1826(1):209-214.
- 218.** Fang B, Song Y, Lin Q, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as salvage therapy for treatment of severe refractory acute graft-vs.-host disease in two children. *Pediatr Transplant.* 2007;11(7):814-817.
- 219.** Puissant B, Barreau C, Bourin P, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol.* 2005;129(1):118-129.
- 220.** Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, et al. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(4):503-510.
- 221.** Chulpanova DS, Kitaeva KV, Tazetdinova LG, James V, Rizvanov AA, Solovyeva VV. Application of Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Agent Delivery in Anti-tumor Treatment. *Front Pharmacol.* 2018;9:259. Published 2018 Mar 20.
- 222.** Colwell AS, Borud LJ. Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121(2):701-702.
- 223.** Zimmerlin L, Donnenberg AD, Rubin JP, Basse P, Landreneau RJ, Donnenberg VS. Regenerative therapy and cancer: in vitro and in vivo studies of the interaction between adipose-derived stem cells and breast cancer cells from clinical isolates. *Tissue Eng Part A.* 2011;17(1-2):93-106.
- 224.** Matsumoto D, Sato K, Gonda K, et al. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng.* 2006;12(12):3375-3382.

- 225.** Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg.* 2008;32(1):48-57.
- 226.** Køllef SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, et al. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2013;382(9898):1113-1120.
- 227.** Lee SK, Kim DW, Dhong ES, Park SH, Yoon ES. Facial Soft Tissue Augmentation using Autologous Fat Mixed with Stromal Vascular Fraction. *Arch Plast Surg.* 2012;39(5):534-539.
- 228.** Eterno V, Zambelli A, Pavesi L, et al. Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells (ASCs) may favour breast cancer recurrence via HGF/c-Met signaling. *Oncotarget.* 2014;5(3):613-633.
- 229.** Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2007;449(7162):557-563.
- 230.** Mesimäki K, Lindroos B, Törnwall J, et al. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009;38(3):201-209.
- 231.** Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg.* 2004;32(6):370-373.
- 232.** Zhang HN, Li L, Leng P, Wang YZ, Lv CY. Uninduced adipose-derived stem cells repair the defect of full-thickness hyaline cartilage. *Chin J Traumatol.* 2009;12(2):92-97.
- 233.** Lin Y, Luo E, Chen X, et al. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *J Cell Mol Med.* 2005;9(4):929-939.
- 234.** Bahrani H, Razmkhah M, Ashraf MJ, et al. Differentiation of adipose-derived stem cells into ear auricle cartilage in rabbits. *J Laryngol Otol.* 2012;126(8):770-774.
- 235.** Glass GE, Ferretti P. Adipose-Derived Stem Cells in Aesthetic Surgery. *Aesthet Surg J.* 2019;39(4):423-438.
- 236.** Reid AJ, Sun M, Wiberg M, Downes S, Terenghi G, Kingham PJ. Nerve repair with adipose-derived stem cells protects dorsal root ganglia neurons from apoptosis. *Neuroscience.* 2011;199:515-522.
- 237.** Sowa Y, Imura T, Numajiri T, Nishino K, Fushiki S. Adipose-derived stem cells produce factors enhancing peripheral nerve regeneration: influence of age and anatomic site of origin. *Stem Cells Dev.* 2012;21(11):1852-1862.
- 238.** Kingham PJ, Kolar MK, Novikova LN, Novikov LN, Wiberg M. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells Dev.* 2014;23(7):741-754.
- 239.** Choi SA, Lee YE, Kwak PA, et al. Clinically applicable human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells delivering therapeutic genes to brainstem gliomas. *Cancer Gene Ther.* 2015;22(6):302-311.

- 240.** Visweswaran M, Arfuso F, Dilley RJ, Newsholme P, Dharmarajan A. The inhibitory influence of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell environment and Wnt antagonism on breast tumour cell lines. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;95:63-72.
- 241.** Özdal-Kurt F, Tuğlu I, Vatansever HS, Tong S, Şen BH, Deliloğlu-Gürhan SI. The effect of different implant biomaterials on the behavior of canine bone marrow stromal cells during their differentiation into osteoblasts. *Biotech Histochem.* 2016;91(6):412-422.
- 242.** Özdal-Kurt F, Tuğlu I, Vatansever HS, Tong S, Deliloğlu-Gürhan SI. The effect of autologous bone marrow stromal cells differentiated on scaffolds for canine tibial bone reconstruction. *Biotech Histochem.* 2015;90(7):516-528.
- 243.** Deliloglu-Gurhan I, Tuglu I, Vatansever HS, et al. The effect of osteogenic medium on the adhesion of rat bone marrow stromal cell to the hydroxyapatite. *Saudi Med J.* 2006;27(3):305-311.
- 244.** Deliloglu-Gurhan SI, Vatansever HS, Ozdal-Kurt F, Tuglu I. Characterization of osteoblasts derived from bone marrow stromal cells in a modified cell culture system. *Acta Histochem.* 2006;108(1):49-57.
- 245.** Atesci AA, Avci CB, Tuglu MI, Ozates Ay NP, Eronat AC. Effect of Different Dentin Conditioning Agents on Growth Factor Release, Mesenchymal Stem Cell Attachment and Morphology. *J Endod.* 2020;46(2):200-208.
- 246.** Özdal-Kurt F, Şen BH, Tuğlu I, Vatansever S, Türk BT, Deliloğlu-Gürhan I. Attachment and growth of dental pulp stem cells on dentin in presence of extra calcium. *Arch Oral Biol.* 2016;68:131-141.
- 247.** Akdere ÖE, Shikhaliyeva İ, Gümüşderelioğlu M. Boron mediated 2D and 3D cultures of adipose derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology.* 2019;71(2):611-622.
- 248.** Karakayalı M, Önal T, Tuğlu M. Effect of mesenchymal stem cells and their niche on diabetic and osteoporotic wound healing following osteogenic differentiation and bone matrix formation in vitro. *Anatomy.* 2019;13(3):192-183.
- 249.** Miron RJ, Zucchelli G, Pikos MA, et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin Oral Investig.* 2017;21(6):1913-1927.
- 250.** Sanz M, Dahlin C, Apatzidou D, et al. Biomaterials and regenerative technologies used in bone regeneration in the craniomaxillofacial region: Consensus report of group 2 of the 15th European Workshop on Periodontology on Bone Regeneration. *J Clin Periodontol.* 2019;46 Suppl 21:82-91.
- 251.** Oryan A, Alidadi S, Moshiri A. Platelet-rich plasma for bone healing and regeneration. *Expert Opin Biol Ther.* 2016;16(2):213-232.
- 252.** Luby AO, Ranganathan K, Lynn JV, Nelson NS, Donneys A, Buchman SR. Stem Cells for Bone Regeneration: Current State and Future Directions. *J Craniofac Surg.* 2019;30(3):730-735.
- 253.** Timper K, Seboek D, Eberhardt M, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341(4):1135-1140.

- 254.** Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(5):815-820.
- 255.** Morcos MW, Al-Jallad H, Hamdy R. Comprehensive Review of Adipose Stem Cells and Their Implication in Distraction Osteogenesis and Bone Regeneration. *Biomed Res Int.* 2015;2015:842975.
- 256.** Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration [published correction appears in *PLoS One.* 2015;10(3):e0119262]. *PLoS One.* 2014;9(9):e107001. Published 2014 Sep 8.
- 257.** Fujii S, Miura Y, Fujishiro A, et al. Graft-Versus-Host Disease Amelioration by Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal/Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Is Associated with Peripheral Preservation of Naive T Cell Populations. *Stem Cells.* 2018;36(3):434-445.
- 258.** Yahng SA, Jeon YW, Yoon JH, et al. Negative Impact of Unidirectional Host-versus-Graft Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Ligand Mismatch on Transplantation Outcomes after Unmanipulated Haploidentical Peripheral Blood Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(2):316-323.
- 259.** Knoepfler PS. From bench to FDA to bedside: US regulatory trends for new stem cell therapies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;82-83:192-196.
- 260.** Liao HT, Chen CT. Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells.* 2014;6(3):288-295.
- 261.** Doğan A, Demirci S, Bayir Y, et al. Boron containing poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014;44:246-253.
- 262.** Bakirdere S, Örenay S, Korkmaz M. Effect of boron on human health. *TOMPJ* 2010;3:54-59.
- 263.** Park M, Li Q, Shcheynikov N, Zeng W, Muallem S. NaBC1 is a ubiquitous electrogenic Na⁺-coupled borate transporter essential for cellular boron homeostasis and cell growth and proliferation. *Mol Cell.* 2004;16(3):331-341.
- 264.** Gorustovich AA, Steimetz T, Nielsen FH, Guglielmotti MB. A histomorphometric study of alveolar bone modelling and remodelling in mice fed a boron-deficient diet. *Arch Oral Biol.* 2008;53(7):677-682.
- 265.** Nielsen FH, Stoecker BJ. Boron and fish oil have different beneficial effects on strength and trabecular microarchitecture of bone. *J Trace Elem Med Biol.* 2009;23(3):195-203.
- 266.** Aksel H, Öztürk Ş, Serper A, Ulubayram K. VEGF/BMP-2 loaded three-dimensional model for enhanced angiogenic and odontogenic potential of dental pulp stem cells. *Int Endod J.* 2018;51(4):420-430.
- 267.** Zhu C, Sha M, Jiang H, et al. Co-culture of the bone and bone marrow: a novel way to obtain mesenchymal stem cells with enhanced osteogenic ability for fracture healing in SD rats. *J Orthop Surg Res.* 2019;14(1):293. Published 2019 Sep 3.

- 268.** Abnosi MH, Movahedi B. Investigation of the effect of boron on the rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Cell and Tissue*. 2015;5(4):351-360.
- 269.** Taşlı PN, Doğan A, Demirci S, Şahin F. Boron enhances odontogenic and osteogenic differentiation of human tooth germ stem cells (hTGSCs) in vitro. *Biol Trace Elem Res*. 2013;153(1-3):419-427.
- 270.** Pham TAV. In vitro characteristics of human periodontal ligament stem cells incubated with boric acid [published online ahead of print, 2020 Mar 17]. *J Oral Biosci*. 2020;S1349-0079(20)30013-X.
- 271.** Li X, Wang X, Jiang X, et al. Boron nitride nanotube-enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016;104(2):323-329.
- 272.** Arslan A, Çakmak S, Gümüşderelioğlu M. Enhanced osteogenic activity with boron-doped nanohydroxyapatite-loaded poly(butylene adipate-co-terephthalate) fibrous 3D matrix. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(sup2):790-799.
- 273.** Liu YJ, Su WT, Chen PH. Magnesium and zinc borate enhance osteoblastic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in vitro. *J Biomater Appl*. 2018;32(6):765-774.
- 274.** Bronckers AL, Engelse MA, Cavender A, Gaikwad J, D'Souza RN. Cell-specific patterns of Cbfa1 mRNA and protein expression in postnatal murine dental tissues. *Mech Dev*. 2001;101(1-2):255-258.
- 275.** Gizer M, Köse S, Karaosmanoglu B, et al. The Effect of Boron-Containing Nano-Hydroxyapatite on Bone Cells. *Biol Trace Elem Res*. 2020;193(2):364-376.
- 276.** Deng X, Liang LN, Zhu D, et al. Wedelolactone inhibits osteoclastogenesis but enhances osteoblastogenesis through altering different semaphorins production. *Int Immunopharmacol*. 2018;60:41-49.
- 277.** Zhang Y, Yang TL, Li X, Guo Y. Functional analyses reveal the essential role of SOX6 and RUNX2 in the communication of chondrocyte and osteoblast. *Osteoporos Int*. 2015;26(2):553-561.
- 278.** Yano M, Inoue Y, Tobimatsu T, et al. Smad7 inhibits differentiation and mineralization of mouse osteoblastic cells. *Endocr J*. 2012;59(8):653-662.
- 279.** Kobylewski SE, Henderson KA, Yamada KE, Eckhert CD. Activation of the EIF2 α /ATF4 and ATF6 Pathways in DU-145 Cells by Boric Acid at the Concentration Reported in Men at the US Mean Boron Intake. *Biol Trace Elem Res*. 2017;176(2):278-293.
- 280.** Yin C, Jia X, Miron RJ, et al. Setd7 and its contribution to Boron-induced bone regeneration in Boron-mesoporous bioactive glass scaffolds. *Acta Biomater*. 2018;73:522-530.
- 281.** Beck GR Jr. Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*. 2003;90(2):234-243.
- 282.** Lian JB, Stein GS. Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1992;3(3):269-305.

- 283.** Zhang H, Zhou Y, Zhang W, et al. Construction of vascularized tissue-engineered bone with a double-cell sheet complex. *Acta Biomater.* 2018;77:212-227.
- 284.** Berbéri A, Al-Nemer F, Hamade E, Noujeim Z, Badran B, Zibara K. Mesenchymal stem cells with osteogenic potential in human maxillary sinus membrane: an in vitro study. *Clin Oral Investig.* 2017;21(5):1599-1609.
- 285.** Kwon JS, Kim SW, Kwon DY, et al. In vivo osteogenic differentiation of human turbinate mesenchymal stem cells in an injectable in situ-forming hydrogel. *Biomaterials.* 2014;35(20):5337-5346.
- 286.** Moura SR, Bras JP, Freitas J, et al. miR-99a in bone homeostasis: Regulating osteogenic lineage commitment and osteoclast differentiation. *Bone.* 2020;134:115303.
- 287.** Lombard T, Neirinckx V, Rogister B, Gilon Y, Wislet S. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: New Insights into Molecular Mechanisms and Cellular Therapeutic Approaches. *Stem Cells Int.* 2016;2016:8768162.
- 288.** Kaveh K, Ibrahim R, Bakar MZA, Ibrahim TA. Mesenchymal stem cells, osteogenic lineage and bone tissue engineering: A review. *J Anim Vet Adv* 2011;10(17):2317-2330.
- 289.** Zhong S, He X, Li Y, Lou X. Conditioned Medium Enhances Osteogenic Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Regen Med.* 2019;16(2):141-150. Published 2019 Jan 29.
- 290.** Wang P, Ma T, Guo D, et al. Metformin induces osteoblastic differentiation of human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12(2):437-446.
- 291.** Luo ML, Jiao Y, Gong WP, et al. Macrophages enhance mesenchymal stem cell osteogenesis via down-regulation of reactive oxygen species. *J Dent.* 2020;94:103297.
- 292.** Li X, Zheng Y, Hou L, et al. Exosomes derived from maxillary BMSCs enhanced the osteogenesis in iliac BMSCs. *Oral Dis.* 2020;26(1):131-144.
- 293.** Rosset EM, Bradshaw AD. SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biol.* 2016;52-54:78-87.
- 294.** Jamalpoor Z, Taromi N, Soleimani M, Koudehi MF, Asgari A. In vitro interaction of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells with biomimetic 3D scaffold. *J Biomed Mater Res A.* 2019;107(6):1166-1175.
- 295.** Huang Y, Deng H, Fan Y, et al. Conductive nanostructured Si biomaterials enhance osteogenesis through electrical stimulation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;103:109748.
- 296.** Rumiński S, Ostrowska B, Jaroszewicz J, et al. Three-dimensional printed polycaprolactone-based scaffolds provide an advantageous environment for osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12(1):e473-e485.
- 297.** Jang JH, Castano O, Kim HW. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(12):1065-1083.

- 298.** Chen Y, Huang Z, Li X, Li S, Zhou Z, Zhang Y, Feng QL, Yu B. In vitro biocompatibility and osteoblast differentiation of an injectable chitosan/nano-hydroxyapatite/collagen scaffold. *J Nano Mat* 2012
- 299.** Zhu LL, Zaidi S, Peng Y, et al. Induction of a program gene expression during osteoblast differentiation with strontium ranelate. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;355(2):307-311.
- 300.** Luu HH, Song WX, Luo X, et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 2007;25(5):665-677.
- 301.** Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev.* 1989;69(3):990-1047.
- 302.** Mok PL, Cheong SK, Leong CF. In-vitro differentiation study on isolated human mesenchymal stem cells. *Malays J Pathol.* 2008;30(1):11-19.
- 303.** Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* 1997;64(2):295-312.
- 304.** Luttrell LM, Dar MS, Gesty-Palmer D, et al. Transcriptomic characterization of signaling pathways associated with osteoblastic differentiation of MC-3T3E1 cells. *PLoS One.* 2019;14(1):e0204197. Published 2019 Jan 4.
- 305.** Abe T, Sumi K, Kunimatsu R, et al. The effect of mesenchymal stem cells on osteoclast precursor cell differentiation. *J Oral Sci.* 2019;61(1):30-35.
- 306.** Otsuki Y, Ii M, Moriwaki K, Okada M, Ueda K, Asahi M. W9 peptide enhanced osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;495(1):904-910.

EKLER

Ek 1

T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

KARAR TARİH / NO	10/03/2020 / 77.637.435						
ARAŞTIRMANIN ADI	Kültür Ortamında Kemik Rejenerasyonu Deneysel Modelinde Mezenkimal Kök Hücre Tedavisine Borik Asit'in Etkisi ve Kemik Dokusunun Katkısı						
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof. Dr. Gülten Kavak - İ. K.Ç. Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı						
ARAŞTIRMA EKİBİ	Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU, Araş. Gör. Dt. Alper KARA						
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ ☐ YÜKSEK LİSANS - DOKTORA TEZİ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐ Eğitim ☐						
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	28 / 02 / 2020 / Tarih ve 8954 sayılı; dilekçe						
KARAR BİLGİLERİ	Düzeltilme dilekçeniz incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.						
Unvanı/Adı/Soyadı		Araştırma ile ilişkili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	Unvanı/Adı/Soyadı		Araştırma ile ilişkili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ		☐	☐	Prof. Dr. Gökhan TEMELTAŞ		☐	☐
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestezi ve Reanimasyon AD		☐	☐	Prof. Dr. Özge YILMAZ Çocuk Hastalıkları AD.		☐	☐
Prof. Dr. Ertuğrul TATLISUMAK Anatomi AD		☐	☐	Dr. Öğr. Üyesi Fulya OCAK – Veteriner Hekim		☐	☐
Prof. Dr. Kıvanç GÜNHAN (DEHAM MD)		☐	☒	Saime ÖZKARA Sivil Toplum Üyesi		☐	☐
Dr. Öğr. Üyesi Selim ALTAN Tıp Tarihi ve Etik AD		☐	☐	Levent ÖDEMİŞ Sivil Üye		☐	☒
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim. Ercüment ÖLMEZ Başkan							

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında İstanbul’da dünyaya geldim. İlkokul eğitimimi Fehmi Ekşioğlu İlköğretim Okulu ve Eyüboğlu Koleji’nde tamamladım. Ortaokul eğitimime Eyüboğlu Koleji’nde devam ettim. Lise eğitimimi Kartal Anadolu Lisesi’nde 2009 yılında tamamladım. 2010 yılında Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’nde lisans eğitimine başladım ve 2015 yılında mezun oldum. Aynı yıl Eylül ayında İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başladım.

