

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

MEZENKİMAL KÖK HÜCRE UYGULAMASININ RATLARDA
DENEYSEL PERİODONTİTİS ÜZERİNE ETKİSİ

Yunus Emre BALABAN

UZMANLIK TEZİ

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Sema S. HAKKI

KONYA-2022

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

MEZENKİMAL KÖK HÜCRE UYGULAMASININ RATLARDA
DENEYSEL PERİODONTİTİS ÜZERİNE ETKİSİ

Yunus Emre BALABAN

UZMANLIK TEZİ

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Sema S. HAKKI

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 20132006 proje numarası ile desteklenmiştir

KONYA-2022

ÖNSÖZ

Periodontoloji eğitim sürecimde ve tez çalışmamın hazırlanmasında büyük destek ve katkıları olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Sema S. HAKKI' ya

Uzmanlık eğitimim süresince emeği geçen değerli hocalarım Prof. Dr. Tamer ATAÖĞLU, Prof. Dr. İsmail MARAKOĞLU, Dr. Öğr. Üy. E. Elif MUTAFCILAR VELİOĞLU, Dr. Öğr. Üy. Sefa AYDINDOĞAN' a,

Berberer aynı mesaiyi paylaştığımız, başta eş kıdemlerim M. Serdar KESKİN ve Duygu DURMAZ olmak üzere, sevgi ve dostlukları ile her zaman destek olan tüm asistan arkadaşlarıma,

Projenin biyomalzemelerinin hazırlanması aşamasında bize destek veren Prof. Dr. Ayşen TEZCANER ve Sema AKBABA' ya,

Kök hücre temini konusunda bize yardımcı olan Doç. Dr. Burçin GÖNEN' e,

Histolojik kesitlerin hazırlanması ve değerlendirilmesinde yardımcı olan Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ' a,

Çalışmanın laboratuvar aşamalarındaki desteklerinden dolayı Dr. Öğr. Üy. Şerife Buket Bozkurt'a

Hayatım boyunca bana destek olan, varlıklarıyla güven ve huzur veren sevgili babam Ercan BALABAN, annem Serpil BALABAN, kardeşlerim Beyza BALABAN, Büşra BALABAN ve Ömer BALABAN'a,

Beni her zaman destekleyen ve sabır gösteren, hayatı paylaşmaktan büyük mutluluk duyduğum sevgili eşim Elif Can ŞİMŞEK BALABAN'a

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	v
ÖZET	viii
1.GİRİŞ.....	1
1.1.Periodontal Hastalıklar	2
1.1.1.Başlangıç Lezyonu.....	3
1.1.2.Erken Lezyon	4
1.1.3.Yerleşmiş Lezyon	4
1.1.4.İlerlemiş Lezyon	4
1.2.Periodontal Hastalıklarda Konak Yanıtı ve Doku Yıkımı:	5
1.3.Periodontal Rejenerasyon	6
1.3.1.Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu (YDR)	8
1.3.2.Doku Mühendisliği ve Hücresel Tedaviler.....	8
2.GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
2.1.Fibroin/Kitosan Oligosakkarit Laktat Hidrojellerin Hazırlanması.....	20
2.2.Deney Hayvanları Üzerinde Yapılan İşlemler.....	23
2.2.1.Ligatür tekniği ile periodontitis indüksiyonu	27
2.2.2.Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu ve GFP ile işaretlenmesi	29
2.2.3.Mezenkimal kök hücrelerin Ratlara Transferi	31
2.3.Micro BT Analizi.....	33
2.4.Histolojik Kesitlerin Hazırlanması:	37
2.5. İstatistiksel Analizler	41
3.BULGULAR.....	42
4.TARTIŞMA	68
5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	76
6.KAYNAKLAR	77
7.EKLER	85
8.ÖZGEÇMİŞ	88

SİMGELER ve KISALTMALAR

AKT:	Alveol kret tepesi
ALP:	Alkaline Phosphatase
AMKH :	Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre
BMKH:	Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre
BMP:	Bone morphogenetic protein
CEMP1:	Cementum Protein 1
COL1:	Collagen Type 1
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DOS:	Diş eti oluşu sıvısı
DPMKH:	Dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücre
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
EKH:	Embriyonik kök hücre
ESM:	Ekstrasellüler matris
F: KOS:	Fibroin/Kitosan Oligosakkarit Laktat
FBS:	Fetal Bovine Serum
GFP :	Green floresan protein
GMKH:	Gingival doku kaynaklı mezenkimal kök hücre
GMKH:	Gingival fibroblast kaynaklı mezenkimal kök hücre
H&E:	Hematoksilen-Eozin
HGF:	Hepatosit büyüme faktörü
ICAM:	Interselluler adezyon molekülü
IFN:	İnterferon
IgG:	İmmunglobulin G

IL:	İnterlökin
ISCT:	Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği
KNKH:	Kraniyal nöral krest hücreleri
LiBr:	Lityum Bromür
LPS:	Lipopolisakkaritler
M-CSF:	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
Mikro-BT:	Mikro bilgisayarlı tomografi
MKH:	Mezenkimal kök hücre
MMP:	Matriks Metalloproteinaz
MSS:	Mine sement sınırı
mTOR:	Mammalian target of rapamycin
NK:	Negatif kontrol grubu
OPG:	Osteoprotegerin
PDL:	Periodontal ligament
PDL-MKH:	Periodontal Ligament Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
PGE2:	Prostaglandin E2
PK:	Pozitif kontrol grubu
PMN:	Polimorfonükleer lökosit
PRP:	Platelet rich fibrin
RANK:	Reseptör aktivatör nükleer kappa B
RANKL:	Reseptör aktivatör nükleer kappa B ligand
SDMKH:	Süt dişi kaynaklı mezenkimal kök hücre
SK:	Sham kontrol grubu
STAT:	Signal transducer and activator of transcription

SÜDAM: Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi

TLR: Toll like reseptör

TNF: Tumor nekroz faktör

YDR: Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu



ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

MEZENKİMAL KÖK HÜCRE UYGULAMASININ RATLARDA DENEYSSEL PERİODONTİTİS ÜZERİNE ETKİSİ

Yunus Emre BALABAN, Periodontoloji Anabilim Dalı

UZMANLIK TEZİ / KONYA-2022

Cerrahi ve cerrahi olmayan geleneksel periodontal tedaviler genellikle hastalığın ilerlemesini önlemede başarılı olmakla birlikte kaybedilen periodontal doku rejenerasyonunda sınırlı bir etkinliğe sahiptir. Son dönemlerde yapılan çalışmalar öngörülebilir periodontal rejenerasyon elde etmek için hücre bazlı rejeneratif tedaviler üzerine odaklanmaktadır. Bu çalışmada, deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlarda fibroin/kitosan oligosakkarit laktat hidrojel (F: KOS) yapı içerisinde lokal olarak uygulanan adipoz doku kaynaklı (AMKH) ve gingival fibroblast kaynaklı (GMKH) mezenkimal kök hücrelerin periodontal doku rejenerasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Yetmiş beş adet erkek Wistar rat rastgele beş gruba ayrıldı: A) Pozitif kontrol grubu (Periodontal sağlık; n:15), B) Negatif kontrol grubu (Deneysel periodontitis grubu; n:15) C) Sham kontrol grubu (Hücresiz hidrojel grubu; n:15), D) AMKH enjekte edilen grup (n:15), E) GMKH enjekte edilen grup (n:15). Deneysel periodontitis oluşturmak amacıyla maksiller ikinci molar dişlerin çevresine subgingival pozisyonda 3/0 ipek sütür yerleştirildi; 14 gün sonra dikişler alındı. Hücreler, prob ile sonike edilmiş F ve F: KOS hidrojeller içinde kapsüllendi. Hücre canlılığı, live/dead boyamadan sonra Alamar Blue testi ve konfokal görüntüleme ile değerlendirildi. Green floresan protein (GFP) geni ile transfekte edilmiş GMKH ve AMKH (250.000) içeren F: KOS, ikinci molar dişlerin mezial ve distal interproksimaline uygulandı. Mikro bilgisayarlı tomografi (Mikro-BT) ve histopatolojik inceleme kullanılarak alveolar kemik seviyeleri ölçümleri için hayvanlar 2, 4 ve 8. haftalarda sakrifiye edildi.

Elde edilen mikro-BT verilerinin değerlendirilmesi sonucu GMKH uygulanan grupta 8 hafta sonunda NK grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az kemik kaybı olduğu görüldü. SK ve AMKH gruplarında da NK grubuna göre daha az kemik kaybı olduğu görülmekle birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Histolojik kesitler üzerinde yapılan değerlendirmede GMKH grubunda daha belirgin olmakla birlikte kök hücre uygulanan gruplarda kontrol gruplarına kıyasla uzun bağlantı epiteli oluşumun daha az, bağ dokusu ve pdl yapısının sıkı ve düzgün olduğu görüldü. SK grubunda kök hücre uygulanan gruplara kıyasla ataçman kaybı biraz daha fazla olmakla birlikte 8 hafta sonunda epitel ve bağ dokusu görüntüsü NK grubuna göre daha iyi olduğu görüldü. GFP ve PKH ile işaretlenen AMKH ve GMKH'lerin 8 hafta sonunda dokuda varlığını sürdürdüğü gözlemlendi. F: KOS hidrojellerin etkinliğin değerlendirmek amacıyla yapılan in vitro çalışmalarda; Alamar Blue testi ve konfokal görüntüleme ile kapsüle edilmiş AMKH'lerin ve GMKH'lerin 14 günlük uygulama süresince canlılığının arttığı ortaya çıkarıldı. Hidrojellerde KOS'un dahil edilmesinin, F ve kontrol gruplarına kıyasla hücre canlılığını arttırdığı da bulundu.

Bu çalışma ile F: KOS hidrojel içerisinde uygulanan GMKH ve AMKH'lerin lökosit infiltrasyonunu azaltabileceği, doku iyileşmesini hızlandırabileceği ve periodontal rejenerasyona olumlu yönde katkı sağlayabilecekleri gözlenmiştir. Ancak F: KOS içinde AMKH ve GMKH lerin periodontal rejeneratif tedavilerde uygun bir tedavi alternatifi olabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre; Deneysel periodontitis; Gingival mezenkimal kök hücre; Hidrojel; Periodontal rejenerasyon.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY

SELCUK UNIVERSITY

FACULTY OF DENTISTRY

THE EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELL APPLICATION ON EXPERIMENTAL PERIODONTITIS IN RATS

Yunus Emre BALABAN, Department of Periodontology

THESIS / KONYA-2022

Conventional surgical and non-surgical periodontal treatments are generally successful to prevent disease progression but have limited effectiveness in the regeneration lost periodontal tissue. To achieve predictable periodontal regeneration, studies focused on cell-based regenerative treatments. In this study we aim to investigate the effects of local application of adipose tissue derived (AMSC) or gingiva derived (GMSC) mesenchymal stem cells with fibroin/chitosan hydrogel (FCh) on periodontal tissue healing in experimental periodontitis in rats.

Seventy-five Wistar rats were divided into five groups as follows: A) Periodontally healthy (H), B) Experimentally induced periodontitis group (P; n:15) C) Hydrogel group without cells (Sham control group; S; n:15), D) AMSC injected group (n:15), E) GMSC injected group (n:15). A 3/0 silk suture was bilaterally placed in a subgingival position around the maxillar second molars; after 14 days sutures were removed. Cells were encapsulated in probe sonicated F and FCh hydrogels. Cell viability was assessed by Alamar blue assay and confocal imaging after live/dead staining. Fibroin/chitosan hydrogel containing GMSCs or AMSCs (250.000), which were transfected with the green fluorescent protein (GFP) gene, were applied to mesial and distal interproximal of second molars. Animals were sacrificed at 2, 4 and 8 weeks for the alveolar bone levels measurements using micro-CT and histopathological examination

As a result of the evaluation of the obtained micro-CT data, it was observed that there was statistically significantly less bone loss in the GMSC group compared to the NK group at the end of 8 weeks. There was less bone loss in the SK and AMSC groups than in the NK group, but this difference was not statistically significant. Histological sections, the stem cell applied groups had less long junctional epithelium formation compared to the control groups, but this difference was more pronounced in the GMSC group. It was observed that the connective tissue and pdl structure were tight and smooth in stem cell applied groups. It was determined that the attachment loss was slightly higher in the SK group compared to the stem cell applied groups, but at the end of 8 weeks, the epithelial and connective tissue appearance was better than the NK group. It was observed that AMSCs and GMSCs marked with GFP and PKH persisted in the tissue at the end of 8 weeks. Alamar Blue and live/dead assays revealed that viability of encapsulated AMSCs and GMSCs increased during 14 days of cultivation. It was also found that incorporation of Ch in hydrogels promoted cell viability compared to F and control groups.

In this study, it is thought that GMSCs and AMSCs applied in F:Ch hydrogel can reduce leukocyte infiltration, accelerate tissue healing and contribute positively to periodontal regeneration. However, further studies are required in order to make LMSCs and GMCHs in F:COS an appropriate treatment alternative in periodontal regenerative treatments.

Key Words: Adipose derived stem cells; Experimental periodontitis; Gingiva-derived mesenchymal stem cells; Hydrogel; Periodontal regeneratio

1. GİRİŞ

Periodonsiyum, dişeti, periodontal ligament(PDL), sement ve alveolar kemikten oluşan diş destekleyen dokularının meydana getirdiği kompleks bir yapıdır (Narayanan ve Bartold 1996).

Periodontal hastalıklar, periodontal patojen bakterilerin neden olduğu ataçman ve alveolar kemik kaybı ile karakterize diş destekleyen dokularının enflamatuvar hastalıklarıdır (Graves ve ark 2000). Dünya çapında önemli bir halk sağlığı problemi olup yetişkinlerdeki diş kaybının önemli bir nedenini oluşturmaktadır (Pihlstrom ve ark 2005).

Periodontal tedavinin nihai amacı enflamasyon kontrolü sağlanarak periodontal dokuların kaybının önlenmesi, dişeti bağ dokusu, PDL, alveolar kemik ve sement gibi kaybedilen periodontal dokuların yeniden kazanılmasıdır (Bassir ve ark 2016). Geleneksel cerrahi ve cerrahi olmayan periodontal tedaviler genellikle hastalığın ilerlemesini önlemede başarılı olsa da kaybedilen periodontal dokuların yeniden üretilmesinde sınırlı bir etkiye sahiptir (Salvi ve ark 2014). Geleneksel periodontal tedavi sonrası bazı vakalarda bir miktar rejenerasyon görülmekle birlikte, histolojik incelemelerde iyileşmenin genellikle uzun bağlantı epiteli şeklinde gerçekleştiği görülmüştür (CATON ve GREENSTEIN 1993).

Rejeneratif tedavinin amacı yeni periodontal ligament, sement, alveolar kemiği ve kollajen fibriller oluşturulması ile kaybedilen periodontal destek dokuların tekrar kazanılmasıdır (Sculean ve ark 2008). Günümüzde rejenerasyon sağlayabilmek için kemik greftleri, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu tekniği, biyolojik mediyatörler (mine matriks proteinleri, trombosit zengin plazma/fibrin), kemik morfogenetik proteinleri ve büyüme faktörleri ile bunların kombinasyonları uygulanmaktadır (Needleman ve ark 2006, Sculean ve ark 2008, Esposito ve ark 2009). Bununla birlikte, bu tedavi yaklaşımlarının çoğu değişken olup öngörülemez klinik sonuçlar gösterebilmektedir (Kao ve ark 2015). Öngörülebilir periodontal rejenerasyona ulaşmak için alternatif tedavi yöntemleri araştırılmaya devam etmektedir.

Son dönemde yapılan çalışmalar hücre temelli rejeneratif tedaviler üzerine odaklanmaktadır. Özellikle kök hücreler üzerinde yapılan çalışmalar, tıp ve diş

hekimliğinin en çok ilgi duyulan ve en hızlı gelişen alanlarından birisi haline gelmiştir. Kök hücrelerin, plastisiteleri ve farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneklerinden dolayı rejeneratif tıpta umut verici bir terapötik potansiyele sahip oldukları, böylece periodontal dokuların yenilenmesi için yeni bir tedavi modeli olarak umut vadetmektedir(Bianco ve ark 2010, Bassir ve ark 2016).

Kök hücrelerin periodontal hastalıkların güncel klinik tedavi yaklaşımlarından birisi olarak görülmeye başlaması, periodontal dokuları oluşturan hücre tiplerine farklılaşma kapasitesine sahip, kolay erişilebilir ve güvenli kök hücre popülasyonlarının tespit edilmesini zorunlu hale getirmiştir. Bu çalışmanın amacı deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlarda, F: KOS hidrojel yapıya sahip doku iskelesi içerisinde lokal olarak uygulanan adipoz doku ve gingival fibroblast kaynaklı mezenkimal kök hücreler (MKH)'in periodontal dokuların iyileşmesi üzerine etkisinin değerlendirilmesidir.

1.1.Periodontal Hastalıklar

Doğal periodonsiyum, sement, fonksiyonel olarak yönlendirilmiş bir periodontal ligament, alveolar kemik ve diş etini içerir. Patolojik ve / veya travmatik olaylar bu anatomik yapının kaybolmasına veya hasar görmesine neden olabilir. Gingivitis ve Periodontitis olmak üzere periodonsiyumu etkileyen iki yaygın hastalık bulunmaktadır. Gingivitis bağ dokusu ataçmanının orijinal seviyesinde kaldığı, diş eti epiteli ile sınırlı, yıkıcı olmayan diş eti iltihabı olarak tanımlanmaktadır(Newman ve ark 2011). Periodontitis ise ilerleyici ataçman kaybı ve kemik yıkımı ile karakterize diş destek dokularının kaybına yol açan biyofilm kaynaklı kronik inflamatuvar bir hastalıktır (Darveau 2010). Ağız boşluğu, sürekli gelişen önemli bir mikrobiyal yük barındırır. Konak ve patojenler arasındaki ekolojik etkileşimler hastalığın şiddetini belirler. Birçok bulaşıcı hastalıktan farklı olarak, periodontal hastalıklar, eksojen bir patojenin edinilmesinden ziyade kommensal organizmaların aşırı büyümesinin aracılık ettiği enfeksiyonlar gibi görünmektedir(Gemmell ve ark 1997).

Periodontal hastalıkların patogenezinde dental biyofilmdeki bakterilere karşı enflamatuvar yanıt önemli bir yer tutar. Tannerella forsythia, Porphyromonas gingivalis ve Treponema denticola gibi “kırmızı kompleks” bakterileri ilerleyen periodontitisi bulunan hastalara ait biyofilmler içerisinde gösterilmiştir (Holt ve Ebersole 2005), Spesifik bakterilerin hastalığın ilerleyici formları ile ilişkili olduğuna

dair kanıtlar bulunmakla birlikte hastalığın ilerlemesine dair hiçbir kanıt bulunmayan bireylerde de bu mikroorganizmaların varlığı, hastalığın sadece bakterilerin mevcudiyeti ile alakalı olmadığı, bağışıklık sistemi ve enflamatuvar süreçlerin belirleyici bir etken olduğunu göstermektedir(Seymour 1991, Seymour ve Gemmell 2001).

Klinik olarak enfeksiyon bulunmayan ve sağlıklı olduğu düşünülen dişeti dokularında bile, mikroskopik olarak incelendiklerinde her zaman enflamatuvar yanıtın olduğu gösterilmiştir. Ortaya çıkan düşük dereceli enflamatuvar yanıt, bakterilerin ve ürünlerinin dokulara sızmasını ve doku hasarına neden olmasını önlemek için mikrobiyal tehditle mücadelede temel bir koruyucu mekanizmadır. Oluşan enflamasyon, makroskopik olarak saptanamamaktadır(Novak ve ark 2006).

Periodontal dokulardaki ilk enflamasyon, patolojiden ziyade mikrobiyal tehdide karşı fizyolojik bir savunma mekanizması olarak düşünülmektedir. Hastalığın bu evredeki klinik bulguları, genellikle diş taşı oluşumu ve dişeti iltihabının eşlik ettiği supragingival ve subgingival plak oluşumudur. Bu aşamada plak uzaklaştırılırsa, homeostazi tekrar sağlanabilir fakat lezyon devam ederse, patolojik durumlar ortaya çıkmaya başlamaktadır (Cekici ve ark 2014). Bakteriyel atağa karşı konak yanıtı, çok sayıda hücre tipi ve enflamatuvar araçlar arasındaki karmaşık bir etkileşimden oluşmaktadır(Ohlich ve ark 2009). Gingivitis ve periodontitis gelişimi Page ve Schroeder (1976) tarafından “başlangıç”, “erken”, “yerleşik” ve “ileri” lezyonlar olarak sınıflandırılmaktadır(Page ve Schroeder 1976).

1.1.1.Başlangıç Lezyonu

Başlangıç lezyonu plak birikiminin başlamasından 2-4 gün sonra ortaya çıkar. Bu aşamada klinik inflamasyon belirtisi yoktur, ancak dokulardaki değişiklikler histolojik olarak gözlemlenebilir. Bakterilerin metabolik ürünleri, epitel hücreleri ve nöronları uyararak sitokin üretimi ve lokal kan damarlarının vazodilatasyonuna neden olan nöropeptitlerin üretilmesini sağlar. Böylece dişeti damar sisteminden nötrofillerin ve monositlerin bağ dokularından, kemotaktik uyarının kaynağı olan gingival sulkusta bulunan bakteri ürünlerine doğru göç etmesi sağlanır. Artan damar geçirgenliği aynı zamanda diş eti oluşu sıvısında da (DOS) artışa sebep olur. Artan DOS akışı, bakteriler ve ürünlerinin seyreltilmesini ve bölgeden uzaklaştırılmasına yardımcı olur(Novak ve ark 2006).

1.1.2.Erken Lezyon

Erken lezyon yaklaşık 4-7 günlük plak birikiminden sonra gelişir. Başlangıç lezyonu ve erken lezyonun arasında çok keskin bir ayrım yoktur. Genel olarak başlangıç lezyonunda izlenen olayların şiddetlenmiş halidir. Bu aşamada esas olarak polimorfonükleer lökosit (PMN)'lerden oluşan bir lezyon, artan sayıda lenfosit ve makrofaj içeren bir lezyona dönüşür(Lindhe ve ark 2003). Diş etinde bulunan kılcak damarların çoğalması, mikrovasküler yatakların açılması ve devam eden vazodilatasyonun bir sonucu olarak eritemli görünüm oluşmaya başlar(Lindhe ve Rylander 1975). Diş eti dokularının ödemi sonucu dişeti hafif şişmiş gibi görünebilir ve buna bağlı olarak dişeti oluşu biraz daha derinleşir. Subgingival biyofilm bu ekolojik nişten yararlanır ve apikal olarak çoğalır (böylece etkili plak kontrolünü daha zor hale getirir)(Novak ve ark 2006).

1.1.3.Yerleşmiş Lezyon

Bu, doğuştan gelen bağışıklığın kazanılmış bağışıklığa geçiş dönemi olarak düşünülebilir. Makrofajlar, plazma hücreleri ve T ve B lenfositleri baskındır ve B lenfositlerinin IgG1 ve IgG3 alt sınıfları da mevcuttur(Cekici ve ark 2014). Kollajen yıkımın devam etmesiyle epitel bağ dokusu boşluklarına doğru çoğalmaya başlar. Bağ dokusu içerisinde iltihap hücreleri birikir. Nötrofillerden yüksek miktarda matriks metalloproteinaz (MMP) ve lizozomal içerik salınır. Çok sayıda nötrofil içeren cep epiteli oluşur(Novak ve ark 2006).

1.1.4.İlerlemiş Lezyon

İlerlemiş lezyon, diş eti iltihabından periodontitise geçişi ifade eder. Bu aşamada geri dönüşümsüz ataçman ve kemik kaybı oluşur. Histolojik incelemede periodontal ligament ve alveolar kemiğe uzanan kollajen yıkımı görülmektedir. Cep epitelinde ve periodontal cepte nötrofiller, bağ dokusunda ise plazma hücreleri baskındır. Bağlantı epiteli, sağlam epitel bariyerini korumak için kök yüzeyi boyunca apikal yönde göç eder. Osteoklastik kemik rezorpsiyonu başlar ve kemik dokusu, bakterilerin kemiğe yayılmasını önlemek için bir savunma mekanizması olarak inflamatuvar bölgeden geri çekilir. Cep derinleştikçe plak bakterileri, periodontal patojenler olarak kabul edilen birçok tür için çok uygun olan bir niş içinde apikal yönde çoğalır. Böylece kronik inflamasyonun ve buna bağlı doku hasarının devam ettiği bir

döngü oluşmaktadır(Novak ve ark 2006). Artık genel olarak, doku yıkım mekanizmasının bağışıklık tepkisinin etkileri yoluyla olduğu ve kendi başına bakterilerin doğrudan bir sonucu olmadığı kabul edilmektedir(Birkedal-Hansen 1993).

1.2.Periodontal Hastalıklarda Konak Yanıtı ve Doku Yıkımı:

Bakteriler tarafından salınan lipopolisakkaritler (LPS) ve peptidoglikanlar gibi antijenler ve ürünler, konakçı hücrelerin yüzeyindeki toll like reseptörler (TLR'ler) tarafından tanınır, bu durum bir inflamatuvar yanıt başlatır(Mahanonda ve Pichyangkul 2007). Bir dizi olay yoluyla mast hücreleri, vazoaktif aminleri ve önceden oluşturulmuş Tümör nekroz faktör (TNF) α 'yı salmak üzere uyarılır, bu da damar geçirgenliğini ve endotelial hücre yüzeyleri üzerinde İntersellüler adezyon molekülü-1(ICAM-1) ve P-selektin gibi yapışma moleküllerinin ekspresyonunu artırır(Madianos ve ark 2005). Bu süreç PMN'leri doku içerisinde toplar ve doku hasarına katkıda bulunan lizozomal enzimleri serbest bırakır(Ohlrich ve ark 2009). Yanıt olarak, lenfositler ve makrofajlar dokuyu istila eder. Bu noktada, dişeti bağ dokusundaki kollajenin %60–70'i lezyon bölgesinde parçalanır, fakat kemik dokusu hala sağlamdır(Page ve Schroeder 1976). Bu aşamada diş eti dokularında kalıcı hasar oluşmamıştır, onarılması ve yeniden şekillenmesi hala mümkündür. Bununla birlikte, bazı bireylerde doğuştan gelen yatkınlık ve/veya çevresel faktörler nedeniyle inflamasyon devam eder ve ardından bağ dokusu yıkımı ve geri dönüşü olmayan kemik kaybı olur(Van Dyke ve Serhan 2003).

İnflamatuvar bir reaksiyona yanıt olarak kemik kaybının oluşup oluşmayacağı iki faktöre bağlıdır. İlk olarak, dişeti dokusunda bulunan enflamatuvar mediatörlerin konsantrasyonu kemik rezorpsiyonuna neden olan yolları aktive etmek için yeterli miktarda olmalıdır. İkinci olarak, enflamatuvar mediyatörler, alveolar kemiğe ulaşabilmek için dişeti dokusuna yeteri kadar penetre olabilmelidir(Graves ve Cochran 2003).

Periodontitiste kemik rezorpsiyonu, osteoblastlar ve osteoklastların aktivasyonu arasındaki etkileşim tarafından düzenlenir. İnterlökin-1 β (IL-1 β), TNF α , IL-6, makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF), IL-17 ve Prostoglandin E2 (PGE2) gibi sitokinler, osteoklast aktivasyonunu uyardığı bildirilen önemli pro-enflamatuvar mediatörlerden bazılarıdır (Braun ve Zwerina 2011). IL-4, -10, -12, -13, -18, İnterferon- β (IFN- β) ve IFN- γ gibi anti-enflamatuvar sitokinler ise kemik

rezorpsiyonunu engellemeye yönelik etki gösteren sitokinlerdir(Lerner 2006). RANK, ligandı (RANKL) ve antagonisti (osteoprotegerin), osteoklastların ve osteoklast öncüllerinin farklılaşmasını, aktivasyonunu ve hayatta kalmasını sağlayarak kemiğin yeniden şekillenmesinde düzenleyici rol oynarlar(Lacey ve ark 1998). İnflamatuvar bir yanıt sırasında sitokinler, kemokinler ve diğer mediatörler, osteoblast yüzeyinde bulunan RANKL'ın ekspresyon seviyelerini değiştirerek periosteal osteoblastları uyarır(Lerner 2006). RANKL osteoblastlar, stromal hücreler, kondrositler ve diğer mezenkimal hücreler tarafından eksprese edilir. Bunun yanında aktive edilmiş T ve B hücreleri de RANKL'ı eksprese edebilir(Theill ve ark 2002). RANKL osteoklast aktivasyonunu ve farklılaşmasını uyarırken osteoklast apoptozunu inhibe eder. RANK ise osteoklast progenitörleri, olgun osteoklastlar, kondrositler, monositler / makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından eksprese edilir(Hsu ve ark 1999). RANK sunan osteoklast ve öncülleri yüzeyine RANKL bağlanması ile birlikte denge osteoklast oluşumu ve kemik rezorpsiyonunun aktivasyonu lehine değişir(Yasuda ve ark 1998). TNF reseptörlerinden çözünebilir bir protein olan OPG konsantrasyonu, RANKL ekspresyonundan yüksek olduğunda, OPG RANKL'a bağlanarak RANK'a bağlanmasını engeller. RANKL'ın RANK'a bağlanmasının önlenmesi, osteoklast oluşumunun azalmasına ve önceden var olan osteoklastların apoptozisine yol açar(Boyle ve ark 2003). Bu mekanizmanın anlaşılmasıyla birlikte doku ve diş eti oluşu sıvısı içerisinde RANKL/OPG oranının yükselmesi periodontal hastalığın ilerleyişi ile doğru orantılı olabileceği düşünülmektedir(Babür ve Özcan 2010).

Bu sonuçlardan kaçınmak amacıyla, geleneksel periodontitis tedavisi 3 aşamaya ayrılır. Başlangıç aşaması, diş taşı temizliği ve kök yüzeyi düzleştirme işlemi ile birlikte ağız hijyeni talimatları yoluyla lokal faktörleri ortadan kaldırarak periodontal dokuların yıkımının ilerlemesini durdurmaya odaklanır. İkinci aşama düzelticidir ve dokuların fonksiyon ve estetiğini geri kazanmayı amaçlarken, son aşama periodontitisin tekrarını önlemeyi amaçlayan periodontal bakım olarak kabul edilir(Matoss Cruz ve Bascones-Martínez 2011).

1.3.Periodontal Rejenerasyon

Doğal periodonsiyum, sement, periodontal ligament, alveolar kemik ve diş etinden oluşan kompleks bir yapıdır. Patolojik ve / veya travmatik olaylar bu anatomik yapının kaybolmasına veya hasar görmesine neden olabilir (Polimeni ve ark 2006).

Rejenerasyon terimi, kaybedilen veya hasar gören dokuların hem orijinal yapılarının hem de işlevlerinin tamamen restore edilecek şekilde yeniden yapılandırılması olarak tanımlanmaktadır (Ramseier ve ark 2012). Rejeneratif periodontal tedavi, periodontal hastalık veya dental travma nedeniyle kaybedilen diş destek dokularını (periodontal ligament, sememnt, alveol kemiği, kollajen fibriller) fonksiyonel ve estetik olarak eski haline getirmeyi amaçlamaktadır (Polimeni ve ark 2006).

Geleneksel mekanik/antienfektif periodontal tedaviler, enflamatuvar süreçleri ortadan kaldırma ve hastalığın ilerlemesini durdurma konusunda etkili olmasına rağmen hastalığın ilerlemesinden kaynaklanan kusurları tedavi etmede yeterli etkinliği gösterememektedirler. Bu nedenle, periodontitis öyküsü olan tedavi edilen hastalarda genellikle fonksiyonel ve/veya estetik kusurlar bulunmaktadır (Adriaens ve Adriaens 2004).

1970'lerden bu yana, bu tür kayıp dokuları restore etmek için bir dizi prosedür araştırılmıştır. Çok sayıda klinik çalışma, çeşitli rekonstrüktif cerrahi protokoller için olumlu sonuçlar göstermiştir (Polimeni ve ark 2006).

Günümüzde rejenerasyon sağlayabilmek için kemik greftleri, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu tekniği, biyolojik mediyatörler (mine matriks proteinleri, trombosit zengin plazma/fibrin), kemik morfogenetik proteinleri ve büyüme faktörleri ile bunların kombinasyonları uygulanmaktadır (Needleman ve ark 2006, Sculean ve ark 2008, Esposito ve ark 2009).

Bununla birlikte, bu tedavi yaklaşımlarının çoğu değişken olup öngörülemeyen klinik sonuçlar gösterebilmektedir(Villar ve Cochran 2010, Kao ve ark 2015). Öngörülebilir periodontal rejenerasyona ulaşmak için alternatif tedavi yöntemleri araştırılmaya devam etmektedir. Son dönemde yapılan çalışmalar hücre temelli rejeneratif tedaviler üzerine odaklanmaktadır. Kök hücrelerin, plastisiteleri ve farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneklerinden dolayı periodontal dokuların yenilenmesi için yeni bir tedavi modeli olarak umut vadetmektedir(Bassir ve ark 2016) (Bianco ve ark 2010).

1.3.1.Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu (YDR)

YDR, enfekte sement yüzeyi uzaklaştırılmış bir kök yüzeyi ile bağ dokusu arasında hücre geçişini engelleyen bir membranın cerrahi olarak yerleştirilmesiyle kaybedilen periodontal ataçmanın yeniden kazanılmasını hedefleyen bir yaklaşımdır(McClain ve Schallhorn 2000).

Rejenerasyonun gerçekleşebilmesi için, iyileşme sürecinin hem zamansal hem de mekansal olarak düzenli ve programlanmış bir sırayla ilerlemesi, periodontal rejenerasyonda anahtar bir rol oynar(Bartold ve ark 2000). Geleneksel periodontal tedaviler sonrası oluşan periodontal defekt alanları boş bırakıldığı takdirde hücre proliferasyonu aşamasında bölgeye ilk önce epitelyal hücreler ve fibroblastlar ulaşır. Bu hücrelerin oluşturduğu fibro-epitelyal doku gerçek periodontal dokuların düzenli ve sıralı rejenerasyonunu engeller. Bu nedenle YDR tekniği, defekt bölgesinde epitel ve fibroblast çoğalmasını önlemek için değişken gözenekli bir bariyer membranı kullanır. Bu sayede hedef periodontal doku rejenerasyonu için boşluk bölgesi korunmuş olur(Caffesse ve Becker 1991, Murphy ve Gunsolley 2003). Bu yöntem ile periodontal defekt bölgesinde yer alan progenitör hücrelerin, henüz tam olarak tanımlanmamış bazı sinyaller aracılığıyla büyüme faktörlerini uyararak fonksiyonel bir periodontal rejenerasyonu için gerekli spesifik hücre tiplerine farklılaştığı düşünülmektedir(Bartold ve ark 2006).

Sonuç olarak YDR kemik içi defektlerde tek başına flep operasyonu ile karşılaştırıldığında klinik ataçman seviyesinde kazanç, sondalama derinliğinde azalma ve kemik kazancı gibi konularda önemli üstünlükleri vardır; bununla birlikte, rejenerasyon miktarı ve elde edilen dokunun türü açısından değişkenlik göstermektedir(Zohar ve Tenenbaum 2005).

1.3.2.Doku Mühendisliği ve Hücresel Tedaviler

Doku mühendisliği hücre biyolojisinin ilkelerine dayalı olarak, hasarlı dokuların yerini alacak yeni dokuların gelişimini kolaylaştırmak için prosedürler ve biyomalzemeler geliştirmeyi amaçlayan bir bilim dalıdır. Bu yöntemle kayıp dokunun rejenerasyonunu gerçekleştirmek için ekstrasellüler matriksin (ESM) doğal yapı iskelesinin taklit edildiği, hücrelerin çoğalma ve farklılaşmalarına uygun, in vivo yapay ESM (iskele) ortamı sağlamaya çalışır(Bartold ve ark 2000). Genel olarak, doku

mühendisliği stratejilerine dayanan başarılı bir periodontal doku rejenerasyonu, aşağıdaki üç temel unsur arasında hassas bir etkileşim gerektirir(Chen ve Jin 2010):

- Yeni periodontal dokuları oluşturacak uygun sayıda duyarlı progenitör kök hücrenin varlığı,
- Hücreleri tutmak için bir iskele görevi görecektir uygun bir ekstrasüllüler matris yapısı veya taşıyıcı yapı,
- Hücrelere periodonsiyum içerisinde (sinyal molekülleri) çoklu doku tiplerini oluşturma talimatını veren düzenleyici sinyallerin uygun seviyeleri ve dizilimi.

Polimerler, seramikler, metaller ve kompozitler olmak üzere farklı türlerde biyomalzemeler bulunmaktadır. Fibroin polimer yapıda doğal bir biyomalzemedir (Yucel ve ark 2014).

Fibroin ve Kitosan Oligosakkarit Laktat

Fibroin, çeşitli omurgasız canlılar tarafından üretilen ve ipek kozalarını oluşturan protein tipi bir biyomalzemedir. *Bombyx mori* türü ipek kozaları doğada en yaygın bulunan fibroin kaynağıdır(Yucel ve ark 2014). İpek fibroin hafif ve ağır zincirlerin 1:1 oranında disülfid bağları ile bağlanmasıyla oluşur. Fibroin, ipek liflerine üstün mekanik özellikleri sağlayan yarı kristal yapıya sahip bir proteindir (Kim ve ark 2004). Bu yarı-kristalin yapı, elektrik, pH ve sıcaklık gibi etkilerle çapraz bağlı kristalin bir yapı oluşturabilmektedir(Rockwood ve ark 2011).

Kitosan oligosakkarit laktat (KOS) kabuklu canlıların dış iskeletleri ve mantarlarda bulunan, biyopolimer yapıda olan kitin'in deasetile edilmesi oluşan polisakkarit tipi bir biyomalzemedir(Austin ve ark 1981, Azuma ve ark 2015). Suda çözünebilir bir biyomalzeme olan KOS, nötral pH'ya sahip ve düşük vizkositelidir. Aynı zamanda anti-kanser ve antimikrobial özelliklere sahiptir(Park ve ark 2009). Kitosan, biyoyumluluğu, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve mukoadesiv olması nedeniyle doku mühendisliği ve farmasötik uygulamalar için uzun zamandır araştırılmaktadır(Pellá ve ark 2018).

Hücresel tedaviler

Hücre biyolojisi ve doku mühendisliği teknolojilerindeki son gelişmeler, in vitro olarak kültüre edilen hücreler kullanılarak hastalıkların tedavi edilebileceğini göstermektedir(Marks ve Gottlieb 2018). Hem dokuya özgü hücreler hem de kök

hücreler doku mühendisliği protokollerinin başarısı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Doku mühendisliğinde kullanılacak hücre kaynakları, canlı türlerindeki farklılıklar temelinde otolog, allojenik ve ksenojenik olmak üzere üç ana tipte sınıflandırılabilir. Otolog kök hücreler hem farklılaşma ve çoğalma kapasitelerinin yüksek olması hem de immünojenik etkilerinin allojenik ve ksenojenik hücrelerden daha az olması nedeniyle periodontal rejenerasyon açısından diğer hücre türlerine göre avantajlı görünmektedir(Fodor 2003).

Ayrıca literatürde kök hücreler dışında bu hücrelerin ürünlerinin de periodontal doku rejenerasyonu kullanabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur(Kawai ve ark 2015, Chew ve ark 2019, Qiu ve ark 2020). Bu alanda yapılacak çalışmalarla ileride hücresiz tedavilerinde önemli bir tedavi alternatifi olabileceği düşünülmektedir.

Kök hücre

Kök hücre, mitoz bölünmeyle özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen ve daha fazla kök hücre üretmek için kendini yenileme yeteneğine sahip olan, bütün çok hücreli canlıların doku ve organlarını oluşturan ana hücre türleridir (Bassir ve ark 2016).

Kök hücrelerin iki önemli özelliği vardır: kendini yenileme ve farklılaşma potansiyeli. Kendini yenileme, uzun süre hareketsiz kaldıktan sonra bile kendilerini mitoz yoluyla yenileme yeteneklerini ifade eder. Farklılaşma potansiyeli, kök hücrelerin farklı bir fenotipe farklılaşmasını gerektirir. Bu iki nitelik birlikte kök hücrelerin eksik veya hasarlı dokuları çoğaltmasına ve yeniden oluşturmaya izin verir(Bianco ve ark 2010).

Kök hücre terimi ilk kez 19. yüzyılın sonlarında Theodor Boveri ve Valentin Haecker tarafından kullanılmıştır (Ramalho-Santos ve Willenbring 2007). Kök hücre araştırmaları 1981 yılında Evans ve Kaufman tarafından fare embriyonik kök hücrelerinin elde edilmesi ile hız kazanmıştır (Evans ve Kaufman 1981). Daha sonrasında 1998 yılına gelindiğinde Thomson ve ark. araştırma amaçlı olarak bağışlanmış embriyolardan, in vitro olarak uygun koşullarda ektoderm, mezoderm ve endoderm kökenli hücreleri farklılaştırarak, insan embriyonik kök hücre serileri elde etmişlerdir (Thomson ve ark 1998). 2006 yılında ise Dr. Yamanaka indüklenmiş pluripotent kök hücre çalışmasıyla önemli bir başarıya imza atmıştır (Takahashi ve Yamanaka 2006).

2006 yılında ise Dr. Shinya Yamanaka'nın çalışma grubu tarafından embriyonik kök hücrelerde önemli olduğu saptanan transkripsiyon faktörlerinden bazıları (Oct4, Sox2, c-Myc ve Klf4) fare fibroblastlarına retroviral transdüksiyon yöntemiyle aktratılarak pluripotent hücreler elde edildi (Takahashi ve Yamanaka 2006).

Kök hücreler farklı hücelere dönüşebilme kapasitelerine göre 5 gruba ayrılmaktadır (Zakrzewski ve ark 2019);

Totipotent kök hücreler: Totipotent hücreler vücuttaki tüm hücre ve dokulara (embriyonik ve embriyonik olamayan) farklılaşabilen hücre tipidir. Fertilizasyon sırasında spermium ve ovumun birleşmesi ile oluşan zigot, vücuttaki tüm hücelere dönüşebilme potansiyeline sahip ilk embriyonik hücredir. Bu tanımlama embriyonun 5. gününe kadar olan süreçte oluşan tüm blastomerler için geçerlidir. Totipotent hücreler zamanla pluripotent hücelere dönüşebilirler (Weissman 2000).

Pluripotent kök hücre: Pluripotent kök hücreler embriyonik dokular hariç, ektoderm, mezoderm ve endorderme ait tüm hücelere farklılaşabilmektedir. Döllenmenin 5. gününden sonra meydana gelen blastosiste ait bu hücreler farklılaşma özelliklerinden dolayı embriyonik kök hücre olarak kabul edilmektedir. Gelişimin devam etmesiyle birlikte hücreler pluripotensi özelliklerini kaybederek daha kısıtlı farklılaşma kabiliyetine sahip erişkin kök hücelerine dönüşmektedir (Brink ve ark 2008).

Multipotent kök hücreler: Multipotent kök hücreler, yetişkin kök hücrelerdir, bu hücreler tek bir germ tabakasına ait hücelere farklılaşabilmektedir. Örneğin kordon kanından elde edilen kök hücreler uygun uyarılarla kas hücelerine, nöronlara ve vücuttaki diğer hücelere dönüşebilmektedir (Ateş 2016).

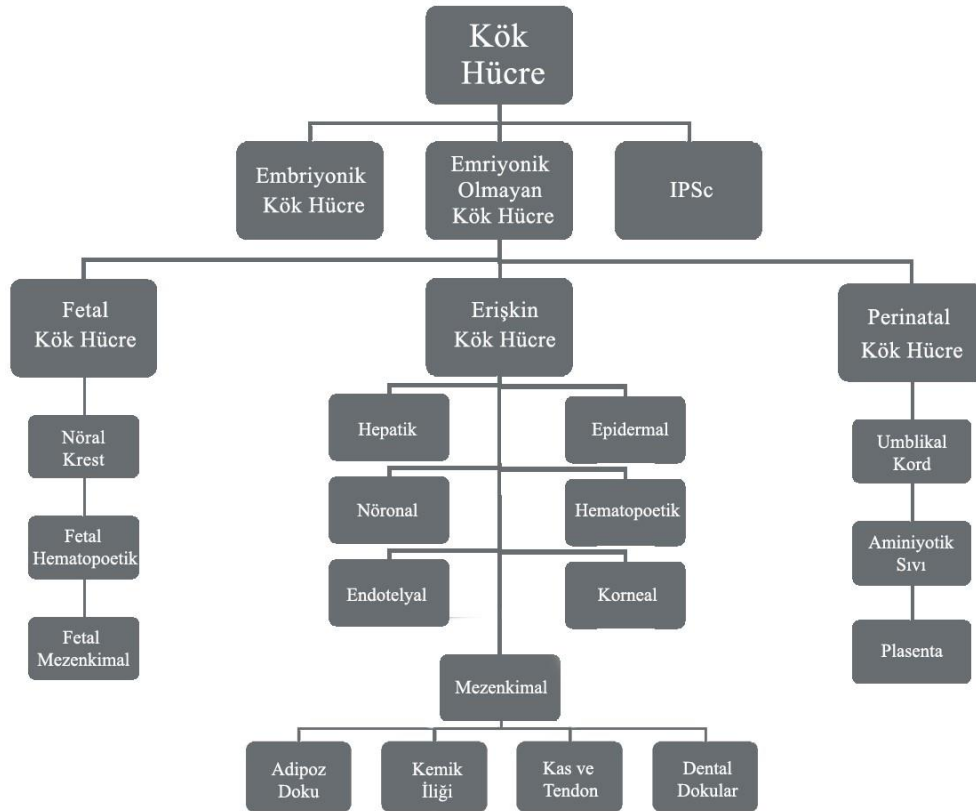
Oligopotent Kök Hücreler: Oligopotent kök hücreler sadece birkaç hücre tipine farklılaşabilmektedir. Lenfoid, miyeloid ve vasküler kök hücreler bu gruba örnektir. Vasküler kök hücreler uyarın tipine göre endotel veya düz kas hücelerine farklılaşma kabiliyetine sahiptir (Kolios ve Moodley 2013).

Unipotent Kök Hücreler: Unipotent kök hücreler kendi kendini yenileyebilmekte ve yalnızca belirli bir hücre tipine farklılaşabilmektedir. İnsan deri

hücreleri, hepatositler ve alveollerin tip II pnömositleri bu gruba örnektir (Kolios ve Moodley 2013, Ateş 2016).

Kök hücreler elde edildikleri kaynak itibariyle başlıca 3 ana grup altında incelenmektedir(Takahashi ve Yamanaka 2006);

- 1) Embriyonik Kök Hücreler
- 2) Embriyonik Olmayan Kök Hücreler
- 3) İndüklenmiş Kök Hücreler



Şekil 1.1. Kök hücre tiplerinin genel hatlarıyla sınıflaması.

Embriyonik Kök Hücreler(EKH)

Emriyonik kök hücelere ait ilk çalışmalar 1981 yılında Dr. Evans ve Kaufman tarafından yapılmıştır. Fare embriyoları üzerinde yapılan çalışmalarda 5 günlük blastosistlerin iç yüzeyindeki hücrelerden sınırsız sayıda bölünebilen embriyonik kök hücreler izole edilmiştir (Evans ve Kaufman 1981). 1998 yılına gelindiğinde ise Thomson ve arkadaşları tarafından insan embriyonik kök hücreleri izole edilmiştir

(Thomson ve ark 1998). Blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen EKH'ler, farklılaşmadan sınırsız olarak çoğaltılabildikleri ve korunabildikleri için ölümsüz olarak kabul edilmektedir. Bu hücreler organizmada bulunan tüm doku tiplerini oluşturabilme yeteneğine sahip pluripotent hücrelerdir (Pera ve ark 2000). Güncel çalışmalarda, embriyonik kök hücrelerin oluşumu, implantasyon öncesi embriyonun tahrip edilmesini (veya en azından manipülasyonunu) içerdiğinden, etik ve hukuki nedenlerle kullanımı pek çok ülkede yasaklanmıştır (Nadig 2009).

Yetişkin (Embriyonik Olmayan) Kök Hücreler:

Yetişkin kök hücreler; gelişmenin daha ileri safhalarında görülen, bir doku ya da organdaki farklılaşmış hücrelerle birlikte bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Daha sınırlı olmakla birlikte kendi kendini yenileyebilme ve bulunduğu doku veya organ içerisindeki özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilme kapasitesine sahiptir (Czyz ve ark 2003). Yetişkin kök hücreler, belirli organ ve dokular içerisinde kendilerine ait bir mikro çevrede uzun bir süre dinlenmede kalabilirler(Fuchs ve ark 2004). Embriyonik olmayan erişkin kök hücreler organizmada buldukları yere göre hematopoetik, mezenkimal ve organlarda bulunan kök hücreler olarak sınıflandırılmaktadır.

Mezenkimal Kök Hücreler:

Birçok farklı kaynaktan kök hücre elde edilebilmekle birlikte MKH'ler kendi kendini yenileme ve pek çok hücre hattına farklılaşma potansiyelleri olan ve hücre temelli rejeneratif tedavilerde en yaygın kullanılan hücrelerdir (Tassi ve ark 2017). MKH'ler osteoblastlar, adipositler ve kondrositler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşma kapasitesine sahip olan multipotent stromal hücrelerdir (Mohr ve Zwacka 2018).

MKH'ler ilk kez 1970'li yıllarda Fridenstein ve arkadaşları tarafından tanımlanmışlardır. Fridenstein, fetal buzağı serumu kullanılarak yaptığı kemik iliği kültürlerinde adezyon yeteneğine sahip, morfolojik olarak fibroblasta benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğunu ve bunların kemik ve yağ dokusu hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olduklarını göstermiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda bu hücrelerin hematopoietik özelliği olmayan pluripotent kök hücreler olduğu ortaya konmuştur (Afanasyev ve ark 2009). Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar MKH'lerin osteoblastlar, adipositler, kondrositler, tenositler ve düz kas hücreleri dahil olmak üzere çeşitli mezenkimal soylara ve ayrıca nöronal hücreler, endotelial hücreler,

hepatositler ve kardiyomyositler gibi mezenkimal olmayan soylara da farklılaşma potansiyellerini ortaya koymuştur (Pittenger ve ark 1999, Toma ve ark 2002, Sasaki ve ark 2008).

Mezenkimal kök hücrelerin ana kaynağı kemik iliği olmakla birlikte son zamanlarda kordon kanı, plasenta, Wharton jeli, amnion sıvısı, yağ dokusu, diş, diş eti, periodontal ligament, dental pulpa, dental folikül gibi farklı kaynaklardan da elde edilebildikleri belirtilmektedir (Seo ve ark 2004, Huang ve ark 2006, MATUR ve SOLMAZ 2011). Farklı dokulardan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin belirli ortak özellikleri olmakla birlikte farklılaşma potansiyelleri ve fonksiyonel özelliklerin açısından köken aldıkları dokuların tipine göre farklılık gösterebilmektedir(Mattar ve Bieback 2015). İdeal bir kök hücre kaynağı, immünojenik olmamalı, proliferasyon kapasitesi yüksek olmalı, elde edilmesi kolay ve uzun süreli işlemeye dirençli olmalı ve istenen hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahip olmalıdır(Bluteau ve ark 2008).

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT), MKH'leri tanımlamak için üç kriter kullanır (Dominici ve ark 2006) :

- 1) MKH'ler standart kültür koşulları altında plastiğe yapışabilmeli;
- 2) MKH'ler CD105, CD73 ve CD90 dahil olmak üzere hücre yüzey belirteçlerini eksprese eder fakat CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 ve HLA-DR gibi endotelyal, hematopoietik veya immünolojik hücre belirteçleri eksprese etmez.
- 3) MKH'ler in vitro koşullarda uygun uyaranlara maruz kaldıklarında osteoblastlara, adipositlere ve kondroblastlara farklılaşma yeteneğine sahiptir

Dental Doku Kaynaklı Kök Hücreler

Orofasiyal bölgede, periodontal ligament, apikal papilla, dental folikül, pulpa, süt dişi ve gingival dokular dahil olmak üzere birçok farklı mezenkimal kök hücre kaynağı vardır. Kemik iliğinden elde edilen MKH'lere benzerlikleri, immünomodülatör etkileri ve minimal invaziv bir şekilde elde edilme prosedürleri göz önüne alındığında, hepsi de rejeneratif çalışmalarda ilgi çekici kök hücre kaynakları olarak görülmüştür(Hernández-Monjaraz ve ark 2018).

Periodontal Ligament Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (PDLMKH):

Periodontal ligament (PDL), sement ile alveol kemiğinin dişe bakan iç yüzeyi arasında uzanan, dişi içerisinde bulunduğu alveol kemiğine bağlayan özelleşmiş bağ dokusu lifleridir. PDL aynı zamanda dişin beslenmesine, homeostazisine ve hasarlı dokunun onarımına da katkıda bulunmaktadır(Shimono ve ark 2003). 2004 yılında Seo ve ark. periodontal ligament üzerinde yapmış oldukları çalışmada post-natal PDLMKH'lerin klonojenik ve yüksek oranda proliferatif özelliğe sahip, sement/PDL benzeri dokuları yenileyebildiği, bu özellikleri nedeniyle kök hücreler olarak tanımlanabileceğini göstermiştir. Bu çalışmadan yol çıkarak PDLMKH'lerin periodontal doku rejenerasyonunda kullanım potansiyeli olduğunu söylemişlerdir(Seo ve ark 2004). Yine benzer bir şekilde Hakkı ve ark. Bone morphogenetic protein (BMP) -2, -6 ve -7'nin insan periodontal ligament kök hücrelerinin osteojenik farklılaşması üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, gömülü üçüncü azı dişlerinin PDL'sinden izole ettikleri MKH'lerin, kondrojenik, osteojenik, adipojenik ve nörojenik farklılaşma potansiyeli olduğunu ayrıca kemik iliğinden izole edilen MKH'ler ile benzer osteojenik potansiyele sahip olduğunu göstermişlerdir(Hakkı ve ark 2014). Liu ve ark. minyatür domuzlar üzerinde yapmış oldukları deneysel periodontitis modelinde lokal olarak uygulanan GFP işaretli PDLMKH'lerin transplantasyondan on iki hafta sonra, GFP işaretli hücrelerin yeni oluşan periodontal kemikte mevcut olduğu ve osteoblastlara farklılaştığını göstermişlerdir. Transplante edilen PDLMKH'lerin kaybedilen periodontal dokuların bir kısmını oluşturduğunu ve periodontal defektlerin iyileşmesini optimize etmek için defekt içerisine epitelyal büyümeyi önleyen yerel mikro ortamın yeniden şekillenmesine yardımcı olduğunu ortaya koymuşlardır(Liu ve ark 2008). Literatür taramalarında, yapılan diğer hayvan çalışmalarında da benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür(Ding ve ark 2010, Zhao ve ark 2021).

Süt Dişi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (SDMKH):

İlk kez 2003 yılında Miura ve ark. tarafından izole edilen SDMKH, nöral hücreler, adipositler ve odontoblastlar dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen yüksek oranda çoğalan, klonojenik hücrelerden oluşan bir popülasyon olarak tanımlanmıştır(Miura ve ark 2003). Gao ve ark. ratlar üzerinde uyguladığı deneysel periodontitis modelinde lokal olarak uyguladıkları SDMKH'lerin diş eti oluşu sıvısındaki sitokin ekspresyon profilini değiştirdiğini, diş eti kanamasını

azalttığını, periodontal ataçman kazancı sağladığı ve osteoklast farklılaşmasını azalttığını göstermişlerdir(Gao ve ark 2018). Son araştırmalar, SDMKH'lerin diğer kök hücre türlerinden daha fazla vücut dokusu türüne dönüşme yeteneğine sahip olduğunu söylemektedir(Seo ve ark 2008, Arora ve ark 2009).

Dental Pulpa Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (DPMKH):

Dental pulpa, dişlerin merkezinde bulunan pulpa boşluğunu kaplayan yumuşak bağ dokusu, vasküler, lenfatik ve sinirsel elementlerden oluşan mineralize olmayan bir oral dokudur. Bu hücreler mezenkimal orijinlidir, ancak embriyonik gelişim sırasında spesifik olarak nöral krestten türetilmiştir ve bu nedenle sıklıkla ekto-mezenkimal kök hücreler olarak adlandırılırlar(Marei ve El Backly 2018). İlk kez 2000 yılında Gronthos ve ark. tarafından izole edilen DPMKH'leri klonojenik, yüksek oranda proliferatif etkiye sahip ve bir dokuyu yenileyebilecek hücreler içeren kök hücreler olarak tanımlamışlardır. Ayrıca DPMKH'ler, in vitro kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre (BMKH)'lere kıyasla daha yüksek bir çoğalma oranı sergilediği ve BMKH'lerden farklı olarak odontoblast benzeri hücrelere farklılaşabildikleri gösterilmiştir. (Gronthos ve ark 2000). Hakkı ve ark. pulpa ve PDL'den izole edilen MKH'lerin rejeneratif özelliklerini karşılaştırmak için yaptıkları in vitro çalışmada DPMKH'lerin, PDLMKH'lerden daha yüksek bir çoğalma hızına ve daha yüksek telomeraz aktivitesine sahip olduğu ayrıca DPMKH'lerin nörojenik ve miyojenik farklılaşmaya daha yatkın olduğunu tespit etmişlerdir. Osteojenik farklılaşmanın değerlendirildiği yine aynı çalışmada DPMKH'lerde çok daha fazla olmakla birlikte 2 hücre grubunda da kalsifiye nodüller oluştuğu tespit edilmiştir(Hakkı ve ark 2015). Dental pulpa ile ilgili yapılan diğer çalışmalar bu hücrelerin insan MKH'leri için alternatif bir kaynak sağlayabileceğini göstermektedir(Karaöz ve ark 2011, Aurrekoetxea ve ark 2015, Li ve ark 2016).

Gingival Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (GMKH):

Periodonsiyumun önemli bir bileşeni olan diş eti dokusu dişlerin etrafını bant şeklinde çevreleyen, minimal skar oluşumu ve hızlı yara iyileştirme özelliği ile karakterize çığneyici mukozanın bir parçasıdır.(Kim ve ark 2021). Diş eti dokusu diş çekimi, kuron boyu uzatma, gingivektomi, gingivoplasti ve diğer periodontal cerrahi işlemler sırasında sık sık eksize edilmesi sebebiyle kolay ulaşılabilen bir kök hücre kaynağıdır(El-Sayed ve ark 2012). Diş eti dokusunun lamina propriası içerisinde yer

alan GMKH'ler normal veya iltihaplı durumda olan serbest, yapışık veya hiperplastik diş etinden izole edilebilmektedir(Apatzidou ve ark 2018, Grawish 2018). GMKH'lerin %90'ı kranial nöral krest hücrelerinden (KNKH), %10'u mezenşimden elde edilmektedir(Xu ve ark 2013). Nöral krest hücreleri; melanositler, nöronlar, dental dokular, kraniofasial kırıldak ve kemik gibi çeşitli hücre dizilerine yol açan omurgalılara özgü göçmen hücrelerdir. Özellikle, KNKH'lerin göç ettikleri dokularda kök hücreleri koruması, kraniofasial yapıları yeniden oluşturma yeteneğini ortaya koymaktadır(Chung ve ark 2009). GMKH'ler diğer MKH'lerin aksine, daha belirgin anti-enflamatuvar ve immünomodülatör etkiye sahiptirler. Bunun yanında GMKH'ler stabil bir morfoloji sergiler ve daha yüksek pasajlarda MSC özelliklerini kaybetmezler GMKH'ler uzun süreli kültürlerde normal karyotip ve telomeraz aktivitesini korurlar, tümörojenik değildirler(Tomar ve ark 2010). Yapılan son çalışmalar GMKH'lerin T-lenfosit çoğalmasını ve aktivasyonunu baskıladığını ve başta makrofajlar, mast hücreleri ve dendritik hücreler olmak üzere çeşitli doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinde güçlü immünomodülatör işlevlere sahip olduğunu bildirmektedir(Şimoliūnas ve ark 2021).

Gingival dokudan kök hücre eldesi ilk kez 2009 yılında Zhang ve ark. tarafından yapılmıştır(Zhang ve ark 2009). GMKH'lerle ilgili 2009 yılından günümüze kadar yapılan çalışmalarda bu hücrelerin kaynak bakımından zengin, kolay ulaşılabilir ve minimal invaziv prosedürle kolay elde edilebilir olmaları sebebiyle mezenkimal kök hücre kaynağı olarak umut vadeden bir potansiyele sahip oldukları düşünülmektedir (Kim ve ark 2021).

Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (AMKH):

Mezodermden gelişen yağ dokusu, memeli organizmalarda koruma ve ısı yalıtımı açısından hayati bir öneme sahip olup; aynı zamanda endokrin organ olarak da işlev görmektedir(Greenberg ve Obin 2006). İlk kez 2002 yılında tanımlanan AMKH'ler, o zamandan beri kök hücre alanında kullanılan en popüler yetişkin kök hücre popülasyonlarından biri olmaya devam etmektedir(Zuk 2010). İki tip yağ dokusu (kahverengi ve beyaz) mevcut olsa da, adipoz doku kaynaklı kök hücre çalışmaları yaygın olarak beyaz yağ dokusu üzerinde yapılmaktadır(Minteer ve ark 2013). AMKH'ler vücut içinde birçok farklı bölgeden elde edilebilmekle birlikte palatal bölgedeki adipoz dokudan da yüksek verimlilikle elde edilebilmektedir(Hakki

ve ark 2017). Bugüne kadar hem in vitro hem de in vivo olmak üzere birçok çalışmada AMKH'lerin özelliklerini tanımlamıştır. AMKH'lerin çoğalma kapasitesinin BMKH'lerinkinden daha iyi olduğu gösteren çalışmalar mevcuttur ancak bu hücrelerin rejenerasyon kapasitesi donör yaşından, yağ dokusu tipinden ve kültür koşullarından etkilenebilir(Mizuno ve ark 2012).

Adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin bazı avantajları bulunmaktadır; (Zhang ve ark 2020)

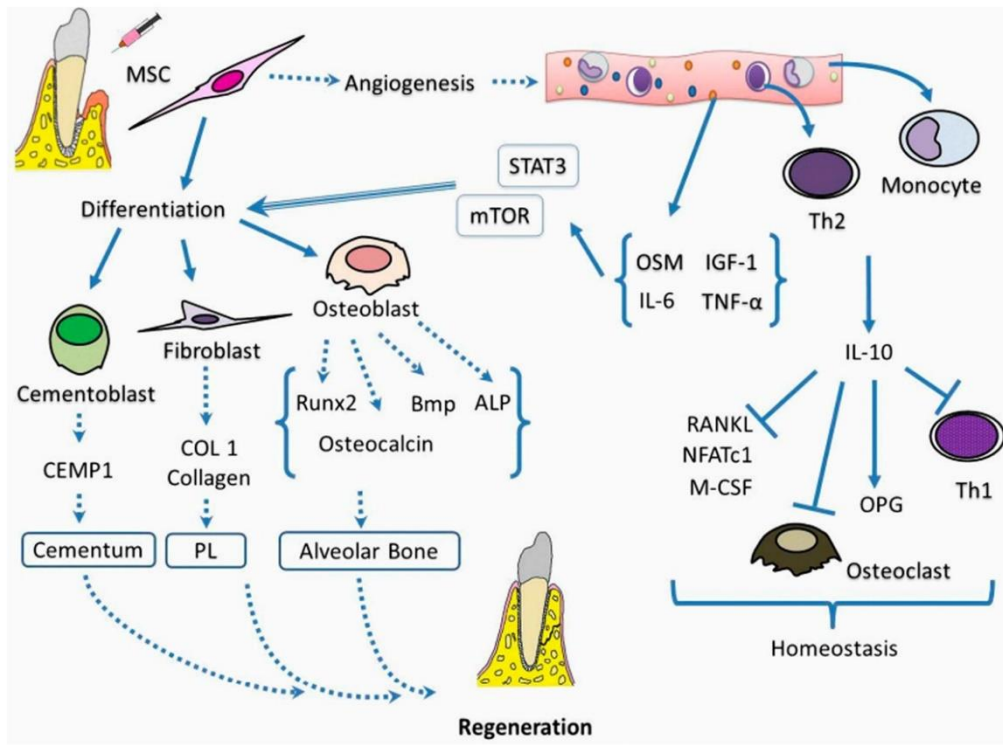
- 1) Deri altı yağ dokusundan minimal invaziv ve ağrısız bir prosedürle yüksek verimli kök hücre elde edilebilmektedir.
- 2) AMKH'ler kültüre edildiklerinde fenotiplerini uzun süre koruyabilirler ve proliferasyon kapasiteleri yüksektir.
- 3) AMKH'ler adipositler, osteoblastlar, kondrositler, nörositler ve hepatositler gibi üç gelişimsel germ tabakasının (endoderm, mezoderm ve ektoderm) hücre tiplerine farklılaşabilme kapasitesine sahiptirler.

Çok sayıda klinik ve prelinik çalışma, AMKH tabanlı yaklaşımların rejeneratif tıpta giderek daha önemli roller oynayacağını göstermektedir.

Dental Kaynaklı MKH'lerin Etki Mekanizması:

DP-MKH'ler yoluyla periodontal dokunun rejenerasyonunda yer aldığı varsayılan mekanizmaya göre; DP-MKH'lerin periodontal defekt bölgesine yerleştirilmesi, rejenerasyonu başlatacak olan sinyalleri (IL-6, IGF-1 ve TNF- α ve OSM) ve hücreleri (Th2 ve monositler) lezyon bölgesine taşıyan kan damarlarının neoformasyonuna yol açmaktadır. Sinyaller; STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) ve mTOR (mammalian target of rapamycin) yolları üzerinden, DP-MKH'lerin osteoblastlara dönüştürülmesine sebep olmakta ve bu da alveolar kemik üretimi için BMP, Alkaline Phosphatase(ALP) ve Runx2'ye ligandlar üretmektedir, IL-10 ve OPG üretimi ise osteoklast aktivitesinin inhibe edildiği ve doku onarımının teşvik edildiği uygun bir mikro ortam oluşturmaktadır. Diğer taraftan DP-MKH'ler sırasıyla periodontal ligament, sement ve kollajen liflerin sentezi için Cementum Protein 1 (CEMP1) ve Collagen Type 1 (COL1) gibi proteinleri salgılayan sementoblastlara ve fibroblastlara da farklılaşmaktadır. Son olarak, belirtilen sinyallere sahip ortam ile birlikte kan damarlarının neoformasyonu ve DP-MKH'lerin

periodonsiyumun öncü hücrelerine farklılaşması, ortaklaşa bir şekilde periodontal dokuların rejenerasyonunu sağlamaktadır(Hernández-Monjaraz ve ark 2018).



Şekil 1.2. DP-MKH lerin varsayılan etki mekanizmasını gösteren şema (Hernández-Monjaraz ve ark 2018)

Günümüze kadar dental dokular da dahil olmak üzere birçok farklı kaynaktan mezenkimal kök hücre elde edilmiş ve bu hücreler in vitro ve in vivo deneylerde kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, mezenkimal kök hücreler periodontal dokuların rejenerasyonu için potansiyel bir tedavi aracı olarak kabul edilmektedirler. Kök hücrelerin rutin olarak periodontal tedavilerde kullanılabilmesinde minimum cerrahi stresle büyük miktarlarda elde edilebilmesi önemli bir avantaj oluşturmaktadır. Gerek adipoz gerekse gingival dokular rejeneratif potansiyellerinin yüksek olması dışında diğer dokulara kıyasla erişilebilirliği kolay, verimliliği ise yüksek dokulardır. Ayrıca GMKH'lerin antienflamatuar ve immunomodülatör etkilerinin bulunması bu hücreleri tercih etmemizdeki en önemli etkenlerdir. Biz bu çalışmada deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlarda, F: KOS hidrojel yapıya sahip doku iskelesi içerisinde lokal olarak uygulanan adipoz doku ve gingival fibroblast kaynaklı mezenkimal kök hücreler (MKH)'in periodontal dokuların iyileşmesi üzerine etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın etik kurul onayı Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı. (27.12.2019; 2019-68). İlgili proje için gerekli deneysel bütçe (sarf malzeme ve hizmet alımı) Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü SÜ-BAP-20132006 numaralı proje desteği ile karşılandı. Proje kapsamında; rat adipoz ve gingival doku hücre izolasyonu ve mezenkimal kök hücre karakterizasyonu Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde gerçekleştirildi. Fibroin/kitosan oligosakkarit laktat (F: KOS) hidrojellerinin hazırlanması ve hücre canlılık analizleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi'nde gerçekleştirildi. Ratlar üzerinde yapılan anestezi, tıbbi uygulamalar ve dekapitasyon işlemleri Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Mikro bilgisayarlı tomografi (BT) ve histolojik kesitlerin alınması işlemi Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı.

2.1.Fibroin/Kitosan Oligosakkarit Laktat Hidrojellerin Hazırlanması

Fibroin İzolasyonu

Kaynamakta olan 1 lt distile su içerisine 4.24 gr Na₂CO₃ (sodyum karbonat) eklendi ve sonrasında 5 gr ipek kozası parçaları bu çözeltinin içerisinde 30 dk kaynatıldı. Bu sayede ipek kozasının diğer bileşeni olan serisin proteini uzaklaştırıldı. Devamında, serisinden arındırılmış olan fibroin, soğuk saf su ile yıkandı ve 50°C'de kurutuldu. Kuru halde bulunan fibroin, ağırlığının 4 katı kadar LiBr (lityum bromür) içerisinde çözüldürüldü. Çözünmenin tam olarak gerçekleştirilebilmesi için, karışım 60°C'de 4 saat inkübe edildi. Hazırlanan fibroin solüsyonu 48 saat boyunca distile suya karşı diyaliz edildi ve sonrasında 14.000 devirde 15 dakika boyunca santrifüj yapılarak pelet uzaklaştırıldı. Fibroin çözeltisi kurutularak birim hacimden elde edilen kuru ağırlığı hesaplandı ve bu ağırlık üzerinden gravimetrik yöntem ile saf fibroin çözeltisinin konsantrasyonu belirlendi. Sonrasında saf fibroin çözeltisinin konsantrasyonu distile su yardımıyla %9'a getirilerek 4°C'de muhafaza edildi (Rockwood ve ark 2011).

Fibroin/Kitosan Oligosakkarit Laktat Hidrojellerin Hazırlanması

Fibroin/kitosan oligosakkarit laktat (KOS) hidrojellerinin hazırlanması için sonikasyon yöntemi kullanıldı. Bu amaçla; KOS, rat gingival fibroblast kaynaklı kök hücre/ rat adipoz doku kaynaklı kök hücre ve fibroin solüsyonları ayrı ayrı hazırlanarak hidrojelin oluşturulması aşamasında eş hacimlerde karıştırıldı. Hidrojellerin hazırlanması için öncelikle %0,6'lık COS'un hücre vasatı içerisinde çözünmesi ve 0,22 µm'lik filtre ile sterilize edilmesi ile steril COS çözeltisi hazırlandı. Devamında, enkapsüle edilecek hücreler %0,05'lik Trypsin-EDTA ile buldukları hücre kültürü flasklarından kaldırılarak hücre kültürü vasatı ile 15×10^5 hücre/ml konsantrasyona ayarlandı. Önceden hazırlanmış olan %6'lık steril fibroin çözeltisi ise fibroinin jelleşmesi için problu sonikatör kullanılarak %10'luk titreşim genliği ile 15 saniye sonike edildi (Branson Digital Sonifier SFX 250, Emerson, ABD). Son olarak, hazırlanmış olan KOS, kök hücre ve fibroin solüsyonlarının her birinden 60 µL karıştırılarak hidrojeller hazırlandı. Hidrojeller, hücre kültürü plakalarına dökülerek jelleşmenin gerçekleşmesi için 37°C'de %95 nem ve %5 CO₂ (karbondioksit) içeren ortamda 30 dakika inkübe edildi (MCO-5M-PE CO2 Incubator, Panasonic, Japonya). Deneysel grupların son hacimlerindeki fibroin, COS ve kök hücre konsantrasyonları Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1: F ve F: KOS hidrojellerinin içerdiği biyomalzeme ve kök hücre konsantrasyonları.

Grup	Fibroin (%)	COS (%)	Hücre
F	2	0	5×10^5
F/COS	2	0.2	5×10^5

Hidrojellerin Karakterizasyonu

In Vitro Bozunma Analizi

Hücresiz hidrojeller 1 cm çapındaki deri biyopsi pançı ile kesilerek -80°C'de liyofilizatör ile kurutuldu (Freezone 6, Labconco, ABD). Kuru hidrojeller tartılarak ilk ağırlıkları (W_{ilk}) hesaplandı. Sonrasında, örnekler pH7.4 olan 10 ml PBS içerisinde inkübe edildi. 1, 4, 7, 14 ve 21. günlerde örnekler filtre kağıdı ile hafif bir şekilde silindikten sonra ve -80°C'de liyofilizasyon yapılarak kurutuldu. Bu işlem sonrası kurutulan örneklerin ağırlıkları (W_{son}) tekrar tartılarak ağırlık kaybetme yüzdeleri aşağıda verilmiş olan formüle göre hesaplandı.

Formül 2.1. Kurutulan hidrojenlerin ağırlık kaybetme yüzdelere gösteren formül

$$\text{Ağırlık Kaybı (\%)} = 100 \times \frac{(W_{ilk} - W_{son})}{W_{ilk}}$$

Mekanik Özelliklerin Belirlenmesi

Hidrojenlere ait mekanik özelliklerinin tespiti amacı ile basma testi uygulandı. Bu amaçla, kalınlığı 4 mm çapı ise 10 mm olan hücre içermeyen hidrojenler kesitlerine 10 N yük altında 1 mm/dk hızla baskı uygulandı (Lloyd LS500 Univert Mechanical Tester, CellScale, Canada). Elde edilen veriler ile hidrojenlere ait gerilim ve Young modülü değerleri hesaplandı.

In Vitro Çalışmalar

Hücre Canlılık Analizi

Hidrojen gruplarının biyoyumluluğunun belirlenmesi amacıyla hücre canlılık analizi yapıldı. Hücre canlılığı testi adipoz ve gingival doku kaynaklı kök hücreleri üzerinde AlamarBlue™ (7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one) kullanılarak yapıldı. Hidrojen ile etkileşimde bulunmayan hücreli kuyular pozitif kontrol olarak kullanılırken enkapsüle edilmemiş hücre ve hidrojenler arka plan sinyalini engellemek için kullanıldı. Steril hidrojenler 37°C'de %95 nem oranına sahip %5 CO₂ içeren ortamda 7 gün boyunca inkübe edildi (MCO-5M-PE CO₂ Incubator, Panasonic, Japonya). Kültür işleminin 1, 3 ve 7. günlerinde hücre canlılık belirteci olarak AlamarBlue™ boyasının indirgenme yüzdesi hesaplandı. PBS ile yıkanan hücreler ve örneklerin bulunduğu kuyulara fenolsüz hücre vasatında hazırlanan %10'luk (v/v) AlamarBlue™ çözeltisi eklenerek 4 saat boyunca inkübe edildi. Sonrasında AlamarBlue™ çözeltileri yeni hazırlanan steril plakalara transfer edildi ve üzerlerine yeni hücre vasatları eklenerek kültüvasyona devam ettirildi. Spektrofotometre kullanılarak 570 ve 600 nm'de absorbans okumaları gerçekleştirildi (Paradigm Fluorescence Plate Reader. Molecular Devices, ABD). Ölçümlerin sonrası gruplar için AlamarBlue™ indirgenme yüzdesi hesaplandı. Hücre canlılığı ise aşağıda yer alan formüle göre hesaplanmıştır.

Formül 2.2. AlamarBlue™ indirgenme yüzdesini hesaplamak için kullanılan formül.

$$\text{İndirgenme (\%)} = \frac{117216 \times \text{örneklere ait } OD_{570} - 80586 \times \text{örneklere ait } OD_{600}}{155677 \times \text{arka plana ait } OD_{600} - 14652 \times \text{arka plana ait } OD_{570}} \times \%100$$

Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopisi

Lazer taramalı konfokal mikroskopisi ile hidrojel içerisine hapsedilmiş hücrelerin görüntülenmesi gerçekleştirildi (LSM 510, Zeiss, Almanya). Bu hücreler, jellerin hazırlanmasının ve 1 günlük kültivasyonun ardından üreticinin önerdiği protokole göre görüntüledi. Hidrojel bulunan kuyulardaki hücre vasatları uzaklaştırılarak hidrojeller PBS ile yıkandı. Sonrasında, hidrojeller ışık almayan bir ortam içerisinde 2 µm'lık 100µL Calcein AM boyası ile 37°C'de 20 dakika boyunca inkübe edildi. Sonrasında boya uzaklaştırılarak görüntüledi(Sun ve Zheng 2009).



Şekil 2.1: Fibroin/KOS doku iskelesi

2.2.Deney Hayvanları Üzerinde Yapılan İşlemler

Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi (SÜDAM) Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen bu çalışmada, ortalama 400 gr ağırlığında, 36 haftalık, 76 adet erkek Wistar Albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar Ankara Kobay Deney

Hayvanları Laboratuvarı San. ve Tic. A.Ş. den satın alındı. Pandemi kuralları gereğince dış merkezden SÜDAM'a getirilen hayvanlar 14 gün karantinede bekletildi.

Ratlar plastik kafesler içerisinde beşerli gruplar halinde muhafaza edilip standart pelet cinsi yem (Bil-yem Gıda San. Tic. Ltd. Şti. Ankara, Türkiye) ve su ile ad libitum beslendi. Ratların fizyolojik ihtiyaçları, bakımları, anestezi ve bütün cerrahi işlemleri aynı merkezde bulunan veteriner hekim kontrolünde sağlandı. Hayvanlar çalışma boyunca 20-24°C sıcaklıkta % 30-40 bağıl nem oranına sahip; 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ışık periyoduna sahip ortamda tutuldu. Randomize olarak gruplara ayrılan ratların kuyrukları ait oldukları gruba göre boyanarak numaralandırıldı (şekil 2.2) ve gruplarına göre ayrı ayrı numaralandırılmış beşerli kafeslere yerleştirildi (Şekil 2.1). Çalışma boyunca düzenli aralıklarla silinen boyalar tekrar boyandı ve kilo değişiklikleri takip edildi.



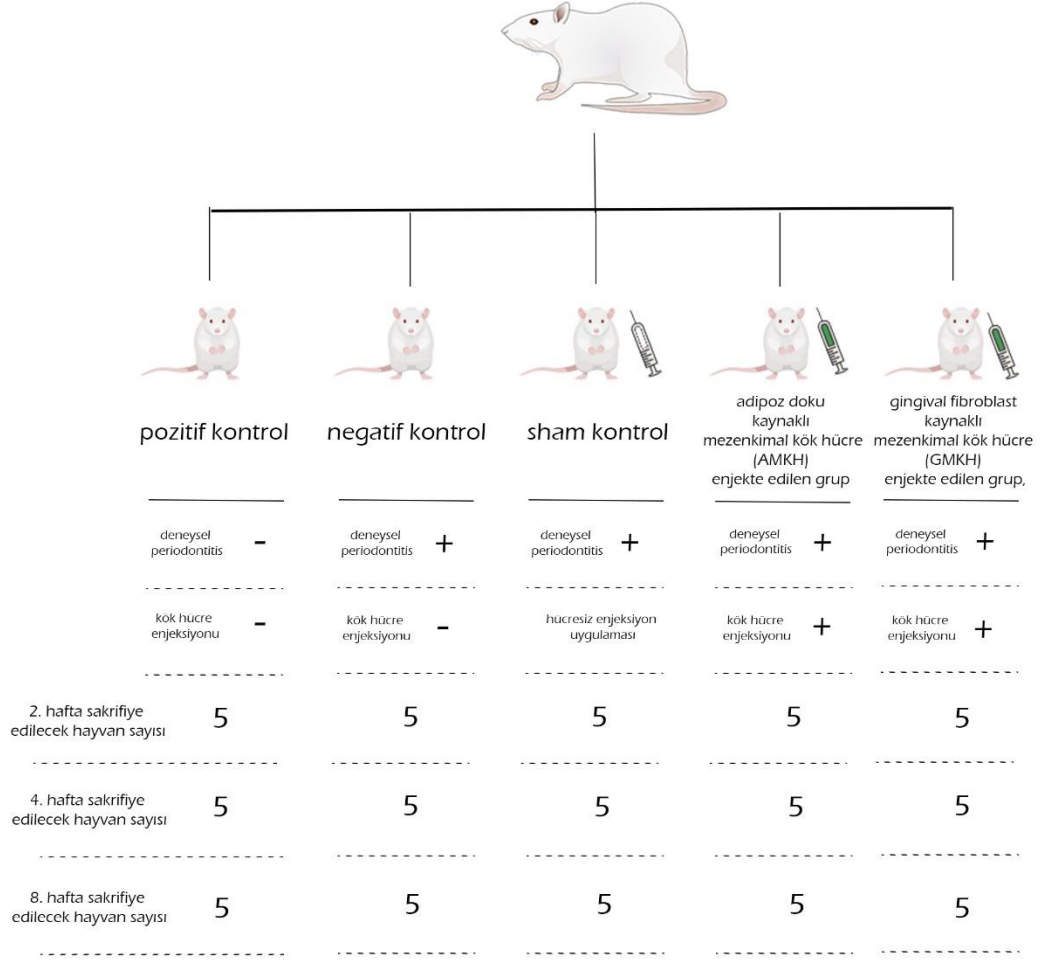
Şekil 2.2: Hayvanların kafeslere dağılımı ve genel kafes görünümü



Şekil 2.3. Gruplar içerisinde bulunan hayvanların takibinin daha düzenli yapılabilmesi için kuyrukları gruplarını belirtecek şekilde boyandı.

Çalışma planlamasına göre; 75 adet erkek rat, randomize bir şekilde her grupta 15 adet hayvan olacak şekilde 5 ayrı gruba ayrılmıştır. Ayrıca her bir grubunda kendi içerisinde üç farklı zaman diliminde (2,4 ve 8. Hafta) sakrifiye edilmesi planlanmıştır. Her kafeste 5 hayvan olacak şekilde toplam 15 kafesle çalışmaya başlanmıştır.

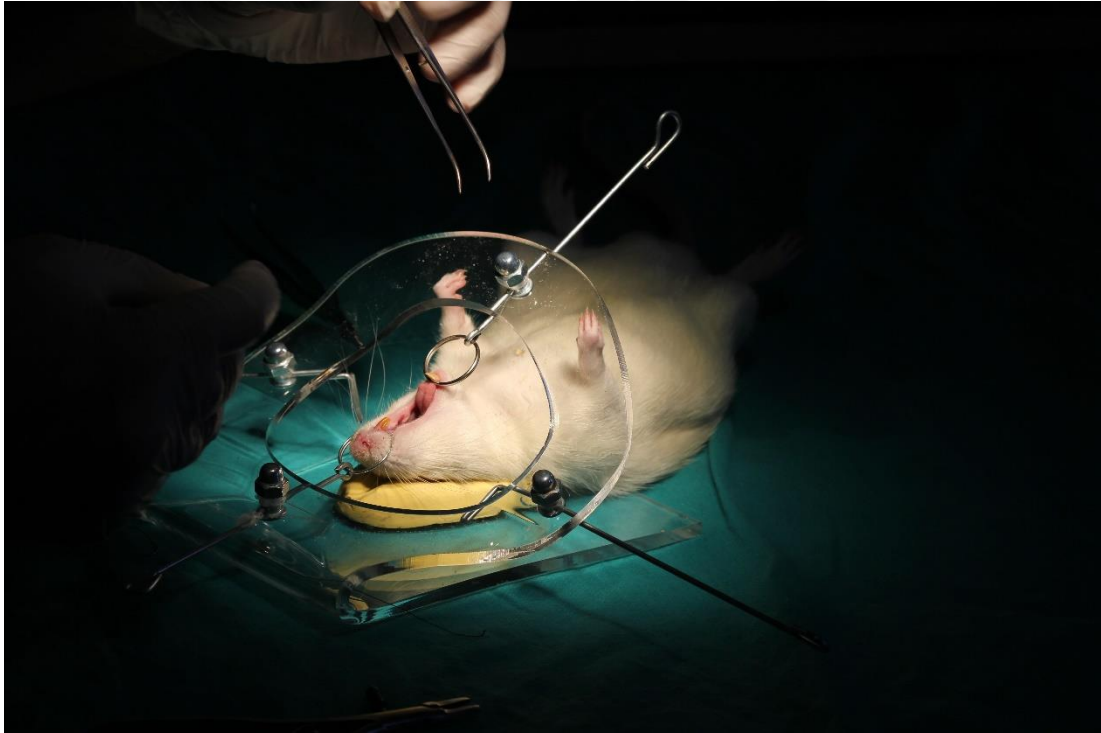
- *Pozitif Kontrol Grubu (PK):* Deneysel periodontitis oluşturulmayan kontrol grubu
- *Negatif Kontrol Grubu(NK):* Deneysel periodontitis oluşturulan ve herhangi bir uygulama yapılmayan grup
- *Sham Kontrol Grubu(SK):* Deneysel periodontitis oluşturulmuş ve hücre içermeyen F: KOS yapıya sahip doku iskelesi enjekte edilen grup
- *AMKH Uygulanan Grup:* Deneysel periodontitis oluşturulmuş ve F: COS içerisinde adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre (AMKH) enjekte edilen grup,
- *GMKH Uygulanan Grup:* Deneysel periodontitis oluşturulmuş ve F: COS içerisinde gingival kaynaklı mezenkimal kök hücre (GMKH) enjekte edilen grup



Şekil 2.4. Planlanan deney akış şeması

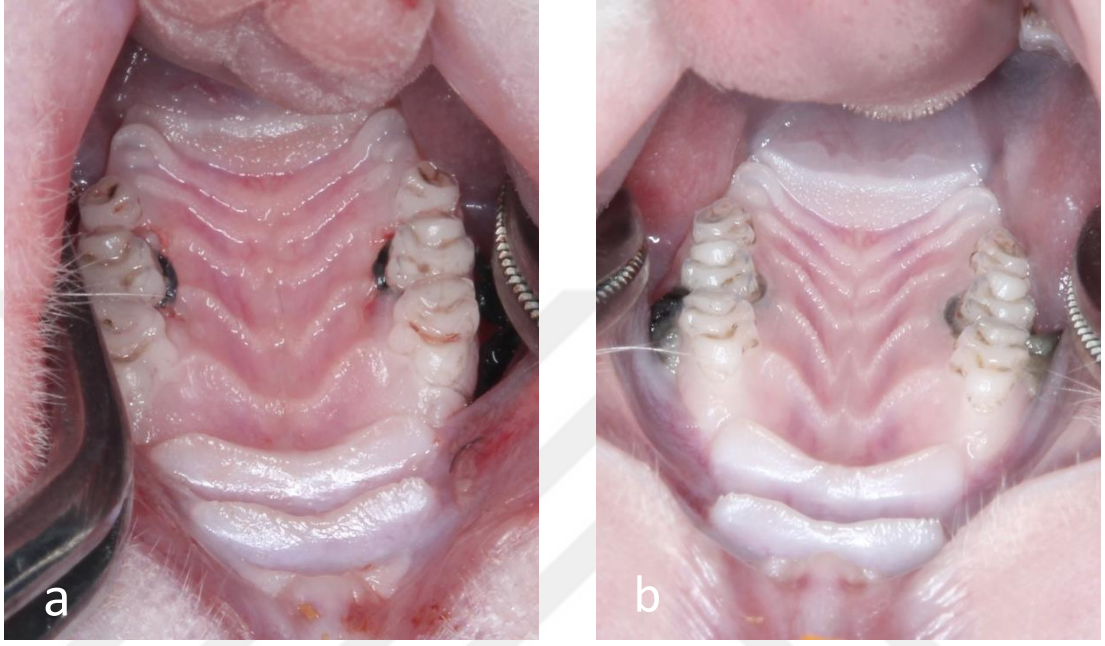
2.2.1.Ligatür tekniği ile periodontitis indüksiyonu

Deneysel periodontitis oluşturmak için daha önce literatürde tanımlanan ligatür tekniği uygulandı (de Molon ve ark 2018). Hayvanlar intraperitoneal olarak uygulanan genel anestezi altında (xylazine 30 mg/kg ve ketamine 70 mg/kg) immobilize edildi. Ratların masaya sabitlenmesi, kafa pozisyonlarının ayarlanması ve uygun ağız açıklığın sağlanması için özel olarak üretilen oral retraktör kullanıldı. Pozitif kontrol grubu dışında kalan 60 adet ratın çift taraflı üst çene 2. Molar dişlerinin etrafına dişetin altında kalacak şekilde 3.0 ipek suture yerleştirilerek bukkal yüzeyde düğümlendi. Bu yöntemle ipek suture üzerinde mikroorganizmaların akümüasyonu ve kolonizasyonu oluşturularak ilgili dişin çevresinde periodontal yıkım olması hedeflenmiştir. De molon ve ark. yapmış olduğu çalışma göz önüne alınarak 14 günlük sürenin istenilen düzeyde periodontal yıkıma sebep olabileceği düşünölmüştür(de Molon ve ark 2018).

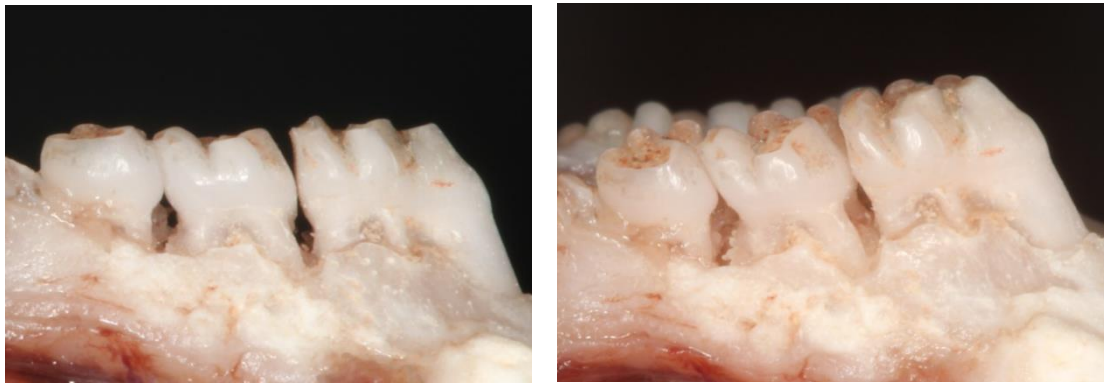


şekil 2.5. Kafa pozisyonlarının ayarlanması ve uygun ağız açıklığın sağlanması için özel olarak üretilen oral retraktör

Deney protokolünün denenmesi amacıyla yapılan ön çalışmada bir adet rat üzerinde 14 günlük suture uygulaması sonrasında sakrifikasyon işlemi yapılarak oluşturulan defekt boyutu incelendi(Şekil 2.6).



Şekil 2.6. a) Suture bağlandığı gün, b) 14 gün sonra suture alınmadan önceki görüntü



Şekil 2.7. 14 gün devam eden ön çalışma sonucunda oluşan defekt görünümü

2.2.2.Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu ve GFP ile işaretlenmesi

Adipoz Doku Kaynaklı ve Gingival Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Tezde kullanılan hücre hatları Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi'nden temin edildi. Donmuş rat adipoz doku kaynaklı ve rat gingiva mezenkimal kök hücre hatları 37°C su banyosunda çözülürerek 75cm² 'lik hücre kültür kaplarına (TPP, İsviçre) ekimleri yapıldı. Kültür kabında hücrelerin büyümesi ve çoğalabilmesi için bazal besiyeri içerisinde %1 antibiyotik (Biological Industries, ABD), %1 stabil L-glutamin (Biological Industries, ABD), %1 askorbik asit (Biological Industries, ABD), ve %10 fetal sığır serumu (FBS) eklendi ve 37°C de %5 CO₂ içeren inkübatörde (Sanyo, Japonya) inkübe edildi.

Hücreler %80 üzerinde yoğunluğa ulaştığında tripsin metodu ile kültür kabının tabanından kaldırılarak pasajlandı. Projedeki hayvanlara 3. pasajdaki hücreler kullanıldı.

Hücrelerin MKH olduğunun ispatında adipojenik farklılaşma potansiyelleri değerlendirildi. Bu test için adipoz doku kaynaklı ve rat gingiva mezenkimal kök hücre hatları adipojenik farklılaşma sonucunda oluşturdukları yağ damlacıklarını belirlemek için yapıldı. Bu amaçla 3.Pasaja gelmiş hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 3.000 hücre/cm² olacak şekilde ekildi. Hücreler %90-95 yoğunluğa ulaştığında üzerindeki kültür besiyeri çekilerek adipojenik farklılaşmayı indüklemek için adipojenik farklılaştırma besiyeri ile değiştirildi. Bunun için MKH adipojenik indüksiyon besiyeri kiti (PT-3102B, Lonza MD, ABD) ve adipojenik devam besiyeri kiti (PT-3102A, Lonza MD, ABD) kullanıldı. İlk olarak hücreler 3 gün boyunca indüksiyon besiyeri ile kültüre edildi. Bu ticari besiyeri içeriğinde 170 ml Adipojenik İndüksiyon Besiyeri, 2 ml İnsan İnsülini (rekombinant), 4 ml L-Glutamin, 20 ml MCGS, 1 ml Dekametazon, 0,4 ml İndometasin, 0,2 ml IBMX (3-isobutil-1-metilksantin), 0,2 ml GA-1000 bulunmaktadır. Sonraki üç gün adipojenik devam besiyeri ile kültüre edildi. Bu ticari besiyeri içeriğinde ise, 170 ml Adipojenik Devam Besiyeri, 20 ml MCGS, 4 ml L-Glutamin, 2 ml İnsan İnsülini (rekombinant) ve 0,2 ml GA-1000 bulunmaktadır. Bu döngü üç günde bir yeni besiyeri ile değiştirilerek 21 gün boyunca bu şekilde tekrarlandı. Daha sonra kök hücrelerin adipojenik farklılaşması sonucu oluşan yağ damlacıkları Adipo Red Assay Kit (PT-7009, Lonza, ABD) kullanılarak gösterildi. Kit protokolüne göre, 6 kuyucuklu kültür kapları içerisinde farklılaşan yağ

damlacıklarının yerinden oynamaması için besiyeri yavaşça çekildi. PBS ile iki kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 140µl/kuyucuk olacak şekilde Adipo Red kit boyası eklendi. Hücreler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

Adipoz Doku Kaynaklı ve Gingival Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Green Fluorescent Protein(GFP) İle İşaretlenmesi

GFP (Yeşil floresan protein) Transfeksiyonu:

pCMV-GFP plazmiti (Sino biological Inc China) *Eshereshia coli* (*E.coli*) *DH5a* suşlarına transforme edildi. Transforme olan *E.coli*'ler ampisilin selektif antibiyotiği ile seçildi ve pCMV-GFP seçilen bakteriler aracılığıyla transfeksiyon için çoğaltıldı. Daha sonra miniprep ve maksiprep plazmit izolasyon kiti (Qiagen) kullanılarak çoğalan plazmitler izole edildi. Kullanılan plazmit çok kopyalı memeli ekspresyon vektörü olup prokaryotik olarak ampisilin, ökaryotik olarakta higromisin direnç gen bölgelerine sahipti. Hazırlanan plazmitin DP-MKH'lere transfeksiyonunda higromisin antibiyotiği minimum inhibitör konsantrasyonu (mik) ve optimize elektroporasyon parametreleri için daha önce belirlenen parametreler kullanıldı(Salkın ve ark 2019).

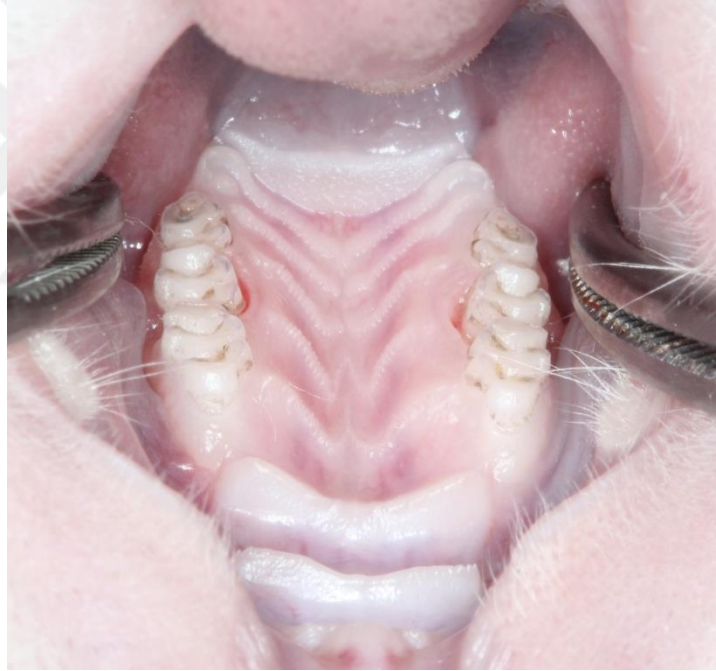
Hücelere GFP transfeksiyonu elektroporasyon tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Bu teknik için Neon Electroporator sistemi (Invitrogen, USA) kullanıldı. Kit içerisindeki resüspanسیون tamponu (Neon buffer R) ile 1×10^6 hücre resüspanse edildi ve üzerine GFP plazmidini (Sino Biological, China) $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA konsantrasyonu olacak şekilde eklendi. Elektrolitik tampon içerisinde 1200v 20ms 1puls elektroporasyon parametreleri ile transfeksiyon gerçekleştirildi ve standart büyüme medyumları içerisinde transfekte hücreler ekildi. Transfeksiyon sonrası iki hafta boyunca 50ug/ml konsantrasyonda higromisin ile transfekte hücreler seçildi ve seçilen hücreler ileriki deneyler için kullanıldı. Ayrıca transfeksiyondan 24 saat sonra floresan mikroskop altında GFP ekspresyonları değerlendirildi.

PKH-26 Membran Boyama:

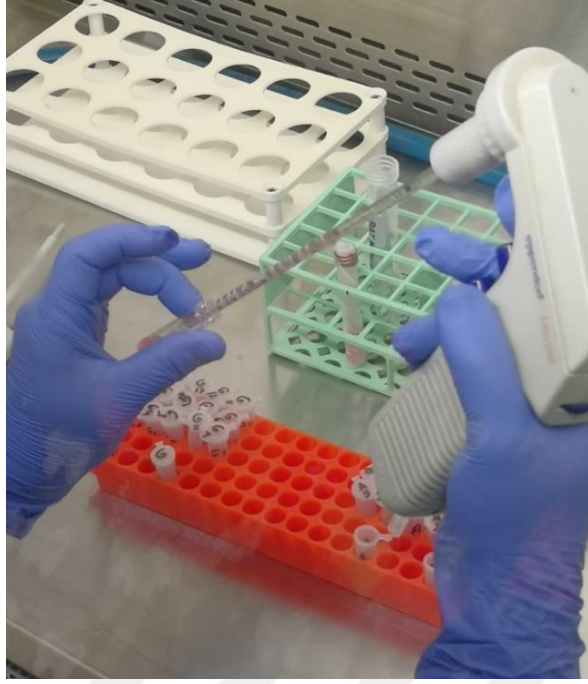
Hücrelerin membran etiketleme işlemi PKH26 ile yapıldı. (Red Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labeling). Boyama işlemi kit içeriğine göre yapıldı ve hücreler floresan mikroskopta görüntülendi.

2.2.3.Mezenkimal kök hücrelerin Ratlara Transferi

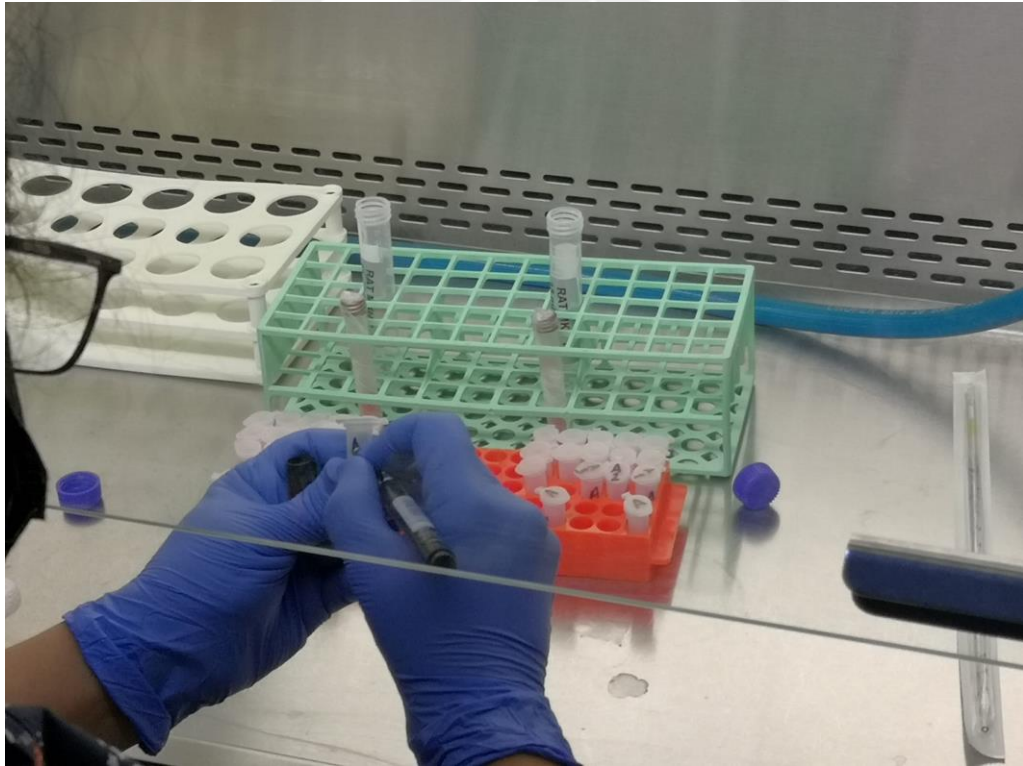
GFP ve PKH26 ile işaretlenmiş olan GMKH'ler ve AMKH'lerin % 10 FBS DMEM ortamları aspire edildi. Sonrasında hücreler tripsin-EDTA enzimi ile muamele edilerek hücre kültürü kabından ayrılmaları sağlandı. Hücreler pipetaj yapılarak tüpler içerisinde toplandı ve gruplara göre isimlendirildi. Daha sonra diş başına 33 µl jel ve 17 µl kök hücre pipetaj yapılarak karıştırıldı (250.000 hücre/50 µL). Genel anestezi altında kök hücre uygulanacak grupların süturları çıkarıldıktan sonra hazırlanan kök hücre-jel karışımı, sağ ve sol maxiller ikinci molar dişlerin mezial ve distal ara yüzlerinden iki eşit parça (125.000 /25 µl) halinde uygulandı. Hücre enjeksiyonu 26 gauge insülin enjektörleri (Berika, Konya, Türkiye) kullanılarak yapıldı.



Şekil 2.8. 14 gün sonunda süturlar alındıktan sonraki diş eti görüntüsü



Şekil 2.9. Hayvan başına uygulanacak kök hücre pipetaj yapılarak ependorf tüplere bölünmesi.



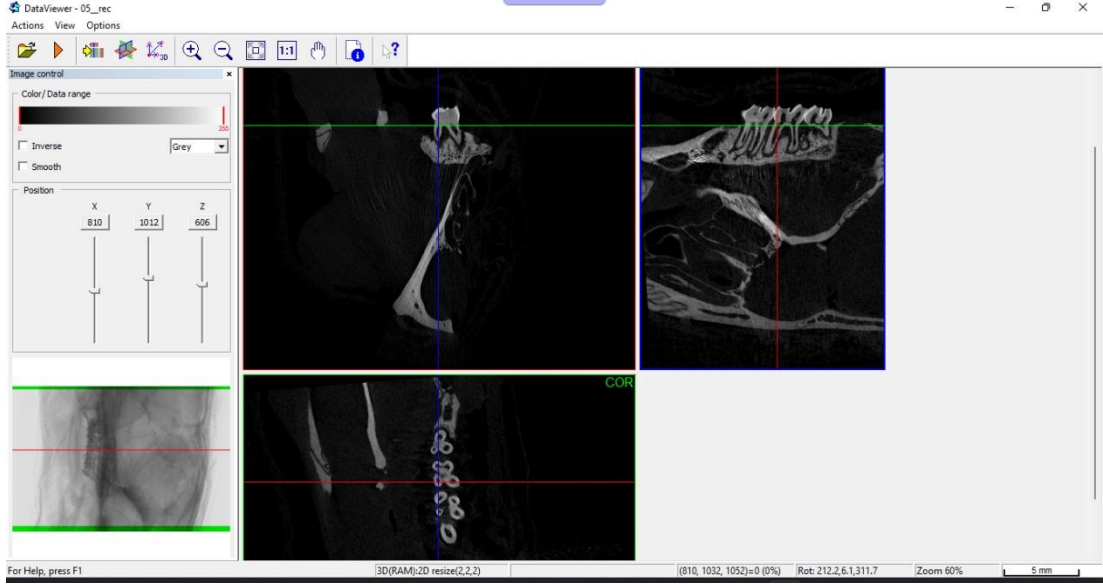
Şekil 2.10. Ependorf tüplere bölünen hücreler gruplara göre isimlendirilmesi



Şekil 2.11. İkinci molar dişlerin mezial arayüzünden kök hücre jel karışımının uygulanması

2.3. Micro BT Analizi

Kök hücre transplantasyonunu takip eden 2, 4 ve 8. haftalarda hem test hem de kontrol gruplarında bulunan hayvanlar yüksek doz anestezi verilerek sakrifiye edildi. Micro-ct incelemelerinin yapılabilmesi amacıyla sol maxilla palatinal orta hat hizasından dikkatli bir şekilde ayrılarak %10 luk formalin içerisinde alındı. Örnekler Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan micro-CT (Skyscan 1272, Bruker x-ray, Belçika) cihazı ile tarandı. Taramalar 90 kV, 108 uA ve 16 µm piksel boyutunda gerçekleştirildi. Tarama prosedürü örnek başına ortalama 142 dk sürdü ve yaklaşık 1000 adet 1632 x 1632 piksel çözünürlükte iki boyutlu görüntü elde edildi. Elde edilen verilerin yeniden yapılandırılması NRecon v.1.7.4.6 (Skyscan 1272, Bruker x-ray, Belçika) yazılımı ile yapıldı. CTVox (Skyscan 1272, Bruker x-ray, Belçika) üç boyutlu görüntülerin oluşturulması, DataViewer (Skyscan 1272, Bruker x-ray, Belçika) yazılımı ise örneklerin iki boyutlu görüntüler üzerinden ölçümlerinin yapılması amacıyla kullanıldı.

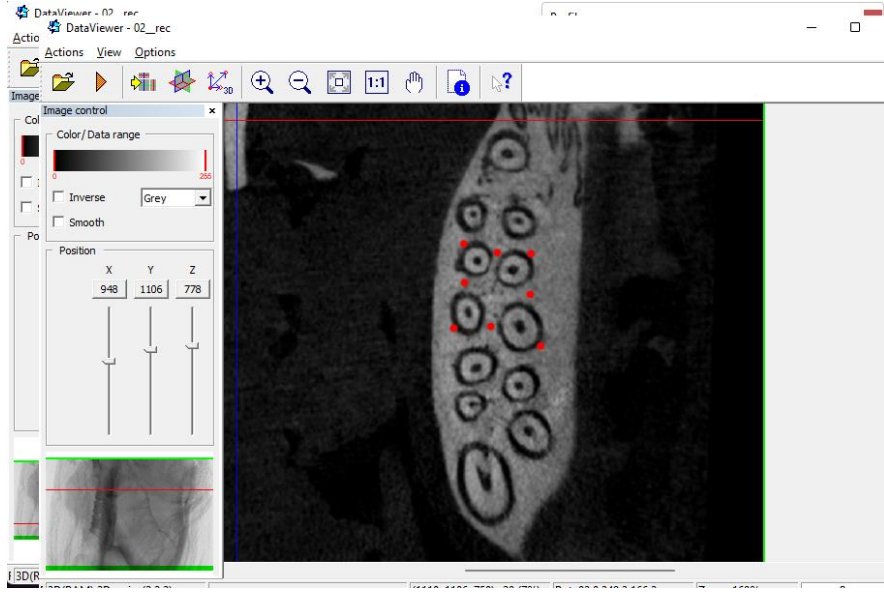


Şekil 2.12. Ölçüm öncesi DataViewerRelease 1.6 uygulaması üzerinde örneğin üç farklı yöndeki görüntüsü

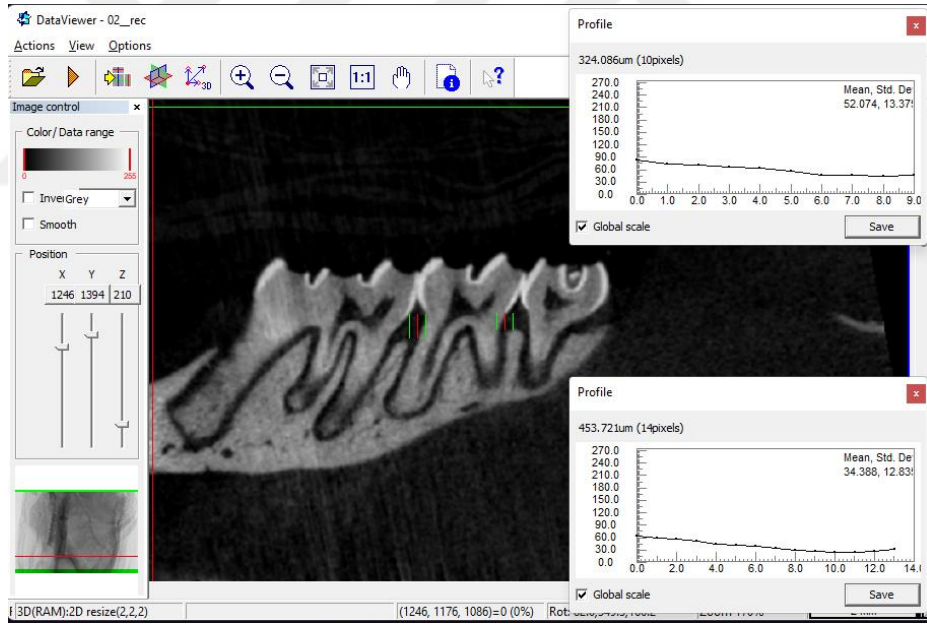
Alveolar kemik kaybı, ikinci molar dişin mezial ve distal interdental bölgelerin orta noktasından, palatinal ve bukkal bölgelerin orta noktasından, meziobukkal meziopalatinal, distobukkal ve distopalatinal noktalardan olmak üzere toplam 8 ayrı noktadan, mine-sement sınırı ile (mss) alveol kret tepesine (akt) olan mesafe ölçülerek morfometrik olarak değerlendirildi.



Şekil 2.13. Ölçüm yapılan noktaların 3 boyutlu model üzerinde görüntüsü



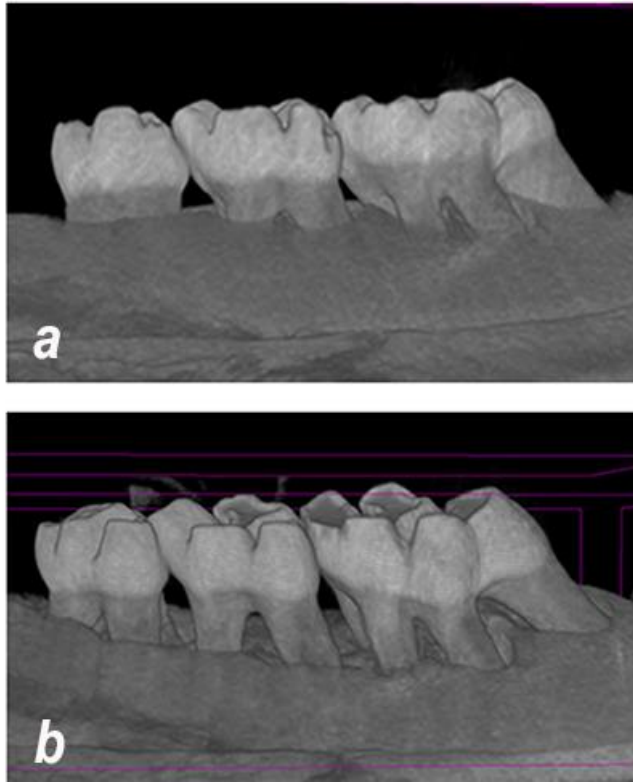
Şekil 2.14. Ölçüm yapılan noktalarının oklüzal yüzeyden gösteren radyografik görüntü



Şekil 2.15. DataViewer uygulamasında transversal yöndeki kesit üzerinde mss-akt seviyesinin ölçümünü gösteren radyografik görüntü



Şekil 2.16. DataViewer uygulamasında transversal yöndeki kesit üzerinde mss-akt seviyesinin ölçümünü gösteren radyografik görüntü



Şekil 2.17. CTVox (Skyscan 1272, Bruker x-ray, Belçika) uygulaması kullanılarak oluşturulan 3 boyutlu modeller. a) PK grubu b) NK grubu 2. hafta

2.4.Histolojik Kesitlerin Hazırlanması:

Alınan örnekler %10'luk formalin solüsyonu ile fikse edildikten sonra dekalsifikasyon işlemi için %10 etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) çözeltisi içerisine alındı. Belirli zaman aralıklarında röntgen görüntüleri elde edilerek dekalsifikasyon derecesi kontrol edilen dokuların 5 hafta sonunda dekalsifikasyon işlemi tamamlandı. Daha sonra dereceli alkollerden geçirilerek dehidre edilen dokular ksilol ile saydamlaştırıldı. Son aşamada doku içerisindeki ksilolün parafin ile yer değiştirmesi sağlandı. Metal kalıplar içerisine 60 derecede erimiş olan sıcak parafin ilave edildi ve açısı belirlenmiş olan dokular yerleştirildi. Kaplar üzerine plastik tutucular yerleştirilerek bir miktar daha parafin eklendi ve gömme işlemi tamamlanmış oldu. Parafin bloklar yeterince soğuduktan sonra mikrotom cihazına yerleştirilerek 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 37°C sıcaklıktaki su banyosuna bırakıldı ve bu sayede kesitlerdeki kırışıklıkların en az seviyeye indirilmesi—hedeflendi. Ardından, kesitler su banyosu içerisinden jelatin kaplı lamalar üzerine alındı ve bir gece boyunca kurumaya bırakılarak kesitlerin lam üzerine yapışması sağlandı. Boyama aşamasının başlangıcında kesitlerde bulunan parafinin uzaklaştırılması amacıyla ksilolde (10 dk ksilol I, 5 dk ksilol II) bekletildi ve sonrasında aşağıda sırasıyla belirtilen işlemler uygulandı. Bu işlemler sırasında kesitler; 3dk absöü alkol I, 3dk absöü alkol II, 3 dk %96'lık alkol, 3 dk %80'lik alkol, 3 dk %70'lik alkol, 6 dk distile su ve son olarak 5 dk akan su altında bekletildi. Parafini uzaklaştırılan kesitler aşağıda belirtilen protokol izlenerek Masson-Goldner boyası ile boyandı (Çizelge 2.2). Boyanan preparatlar üzerine entellan solüsyonu damlatıldı ve lamel ile kapatma işlemi gerçekleştirildi.

Çizelge 2.2. Masson-Goldner boyama kiti uygulama protokolü

Hematoksilen Eosin boyası	5 dk.
Akan musluk suyu	5 dk
% 1 lik asetik asit	30 sn
Ayıraç 1 (Azophiloksin solüsyonu)	10 dk
% 1 lik asetik asit	30 sn
Ayıraç 2 (Tungstophosphoric asit orange G solüsyonu)	1 dk
% 1 lik asetik asit	30 sn
Ayıraç 3 (Light green SF solüsyonu)	2 dk
% 1 lik asetik asit	30 sn
% 70 lik Etanol	30 sn
% 96 lik Etanol	30 sn
% 100 lik Etanol	30 sn
% 100 lik Etanol	30 sn
% 100 lik Etanol	2 dk
Ksilol	5 dk
Ksilol	5 dk

Histolojik analizler maksiller ikinci molar dişin mezial ve distal arayüzlerinden yapıldı. İlgili bölgelerde alveol kreti, periodontal ligament, epitel ve sement dokuları incelendi. Aynı zamanda bölgedeki enflamatuvar hücre infiltrasyonu değerlendirildi.



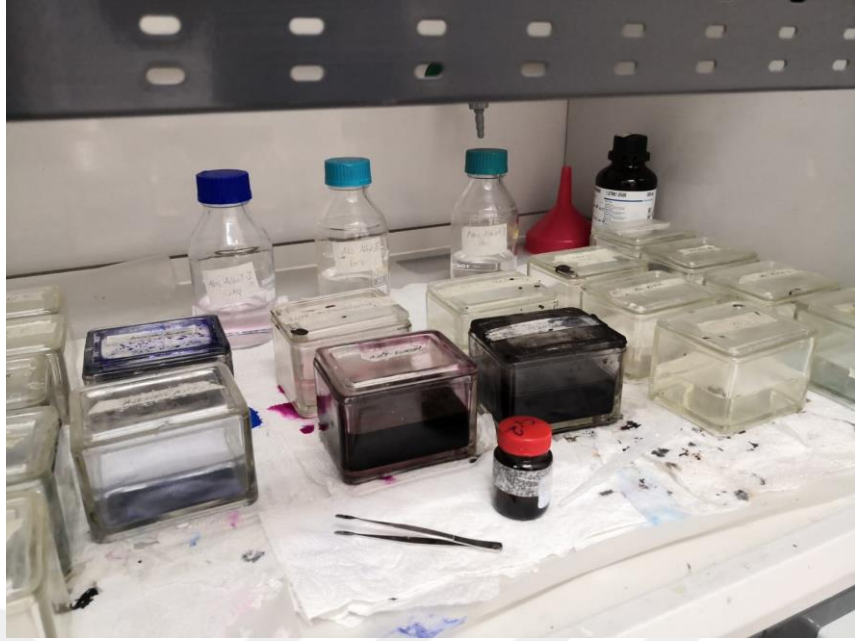
Şekil 2.18. Mikro-BT ve histolojik değerlendirmeler için alınan sol maksilla doku örneği



Şekil 2.19. Histolojik kesitlerin alınması sırasında kullanılan mikrotom cihazı (Leica RM 2125 RT, Germany)



Şekil 2.20. Kesitlerin kırışıklıklarının açılması için kullanılan sıcak su banyosu



Şekil 2.21. Lam üzerindeki parafinin uzaklaştırıldığı, sonrasında h&e boyamasının yapıldığı sıralı alkol ve ksilollerin bulunduğu bölüm



Şekil 2.22. Masson-Goldner Boyama Kiti (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

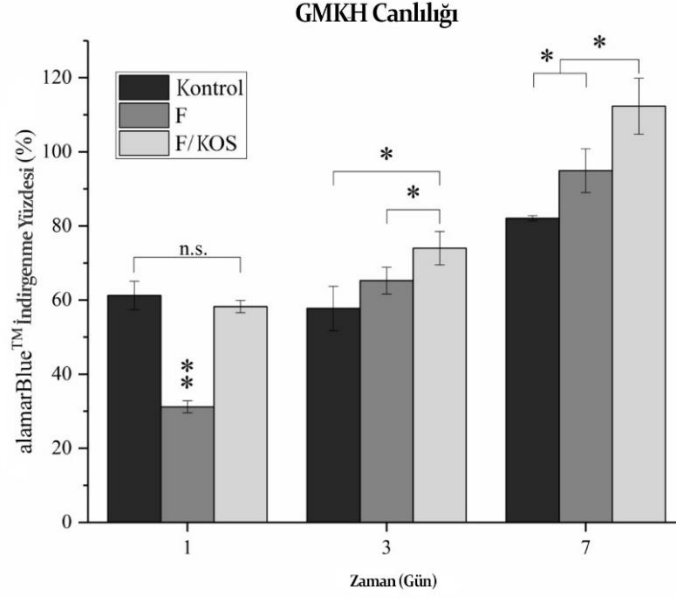
2.5. İstatistiksel Analizler

Çalışmadaki bulguları değerlendirmede IBM SPSS Statistics 22 paket programı kullanılmıştır. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak incelenmiştir. Çalışma verileri değerlendirilirken gruplar arası karşılaştırmada, normal dağılım gösteren parametrelerde Oneway ANOVA testi kullanılmıştır. Gruplar arası anlamlı sonuçlarda Levene homojenite testine göre uygun posthoc test yapılmıştır. Tüm gruplarda homojenite olması üzerine Tukey HSD testi uygulanmıştır. Grup içi değişimlerde normal dağılım gösteren parametreler Student's-t paired testi ile değerlendirilmiştir.

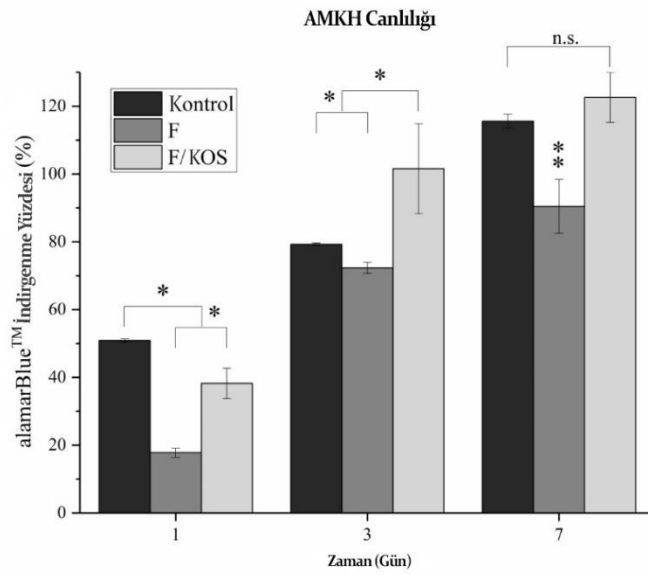
Levene testinde $p \geq 0.05$ ise varyanslar homojen olarak kabul edilmiştir. Çalışmada $p < 0.05$ ise istatistiksel anlamlı değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

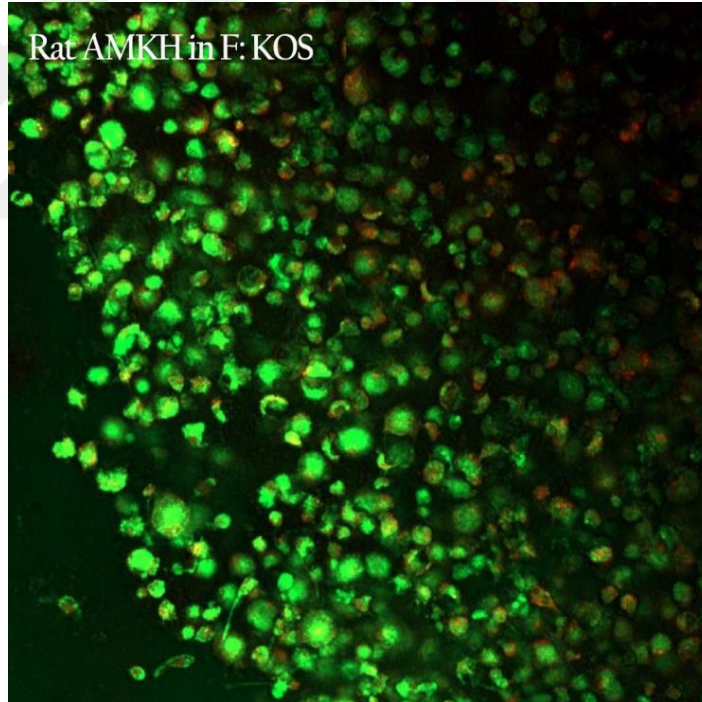
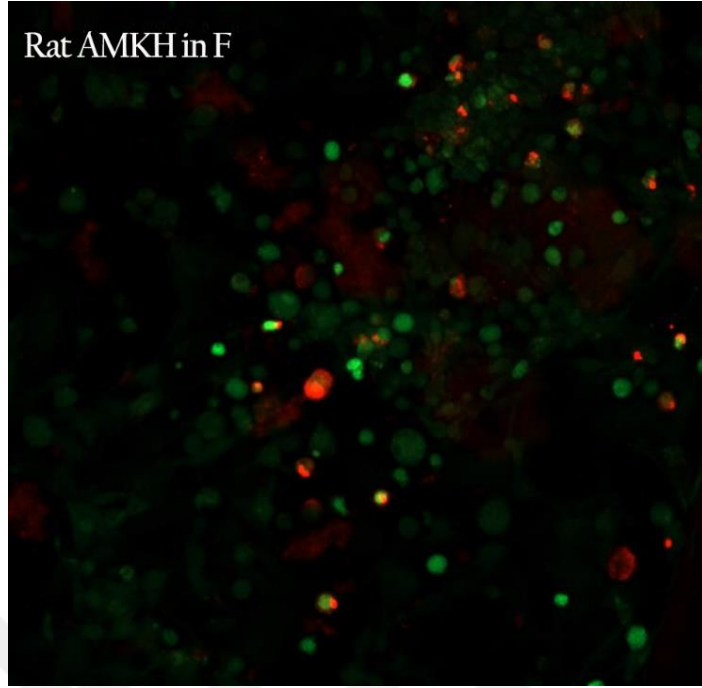
F: KOS hidrojenlerinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla yapılan in vitro çalışmalarda; AlamarBlue analizi ve konfokal görüntüleme ile kapsüle edilmiş AMKH'lerin ve GMKH'lerin 14 günlük uygulama süresince canlılığının arttığı ortaya çıkarıldı. Hidrojellerde KOS'un dahil edilmesinin, F ve kontrol gruplarına kıyasla hücre canlılığını arttırdığı da bulundu.



Şekil 3.1: GMKH'lere ait 7 günlük AlamarBlue indirgenme yüzdesini gösteren tablo

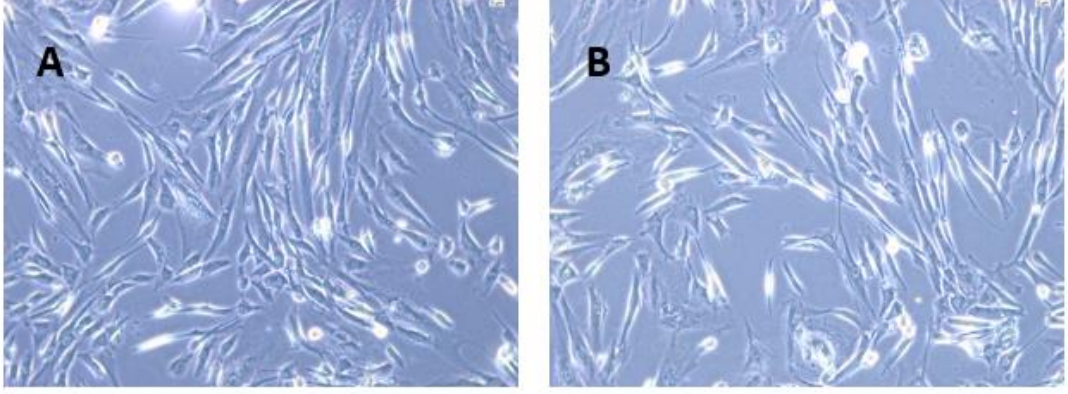


Şekil 3.2: AMKH'lere ait 7 günlük AlamarBlue indirgenme yüzdesini gösteren tablo

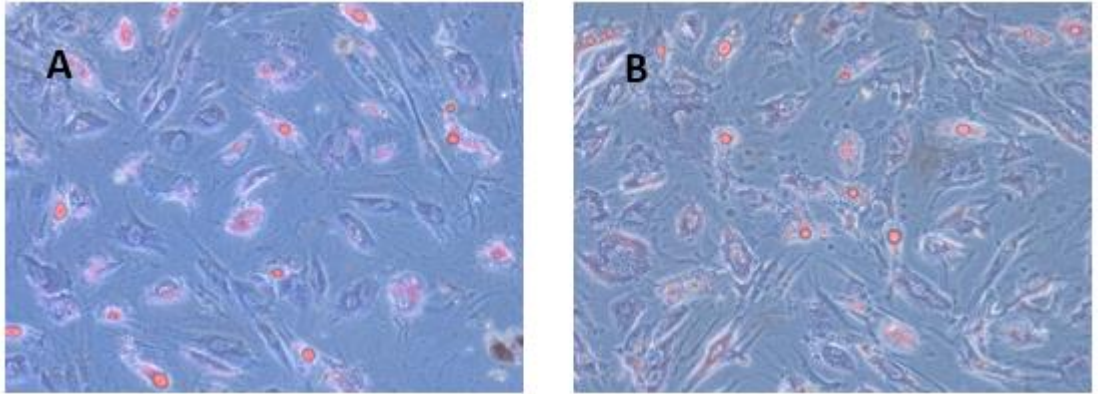


Şekil 3.3: Fibroin ve F: KOS içerisindeki AMKH'lerin 24 saatlik inkübasyon sonrası live/dead hücre analizi konfokal görüntüsü (yeşil ışımalar: canlı hücre/ kırmızı ışımalar: ölü hücre)

Adipoz doku ve gingiva kaynaklı rat MKH hücreleri kültür kabına yapışan karakterde idi. Her iki hücre grubu da tipik fibroblast benzeri, iğsi görüntüsünü kültürde koruyarak sağlıklı bir şekilde çoğaldı (Şekil 3.4). Hücrelerin adipojenik farklılaşması invert mikroskop (Leica DMI 3000, Leica Microsystems, Almanya) altında yağ damlacıkları turuncu-kırmızı renkte boyanarak gözlemlendi (Şekil 3.5).

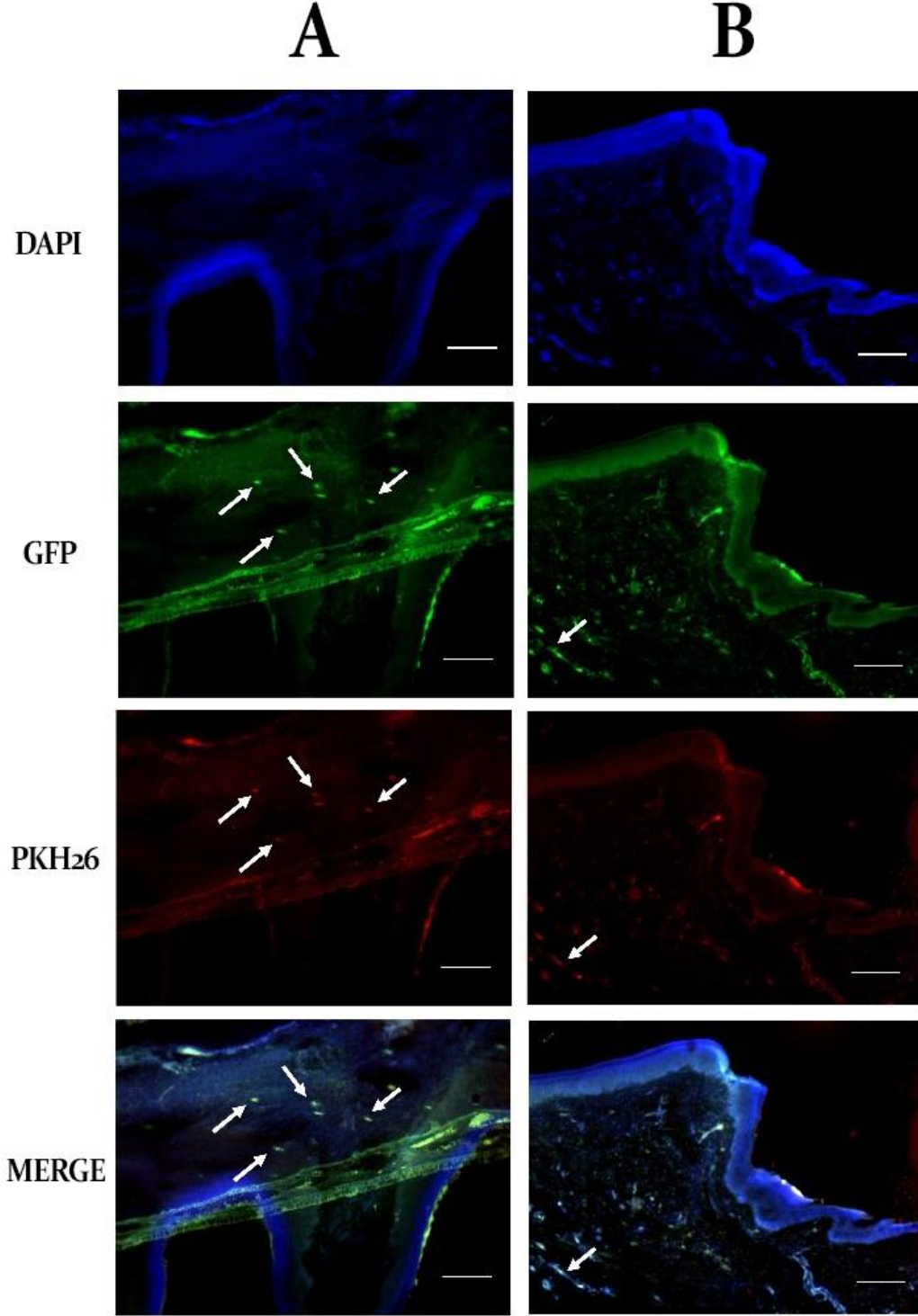


Şekil 3.4: A: AMKH adipojenik farklılaşması B: GMKH adipojenik farklılaşması



Şekil 3.5: A: AMKH adipojenik farklılaşma B: GMKH adipojenik farklılaşma

GFP ve PKH ile işaretlenen adipoz ve gingiva kaynaklı MKH'lerin 8 hafta sonunda dokuda varlığını sürdürdüğü gözlemlendi (Şekil 3.40).



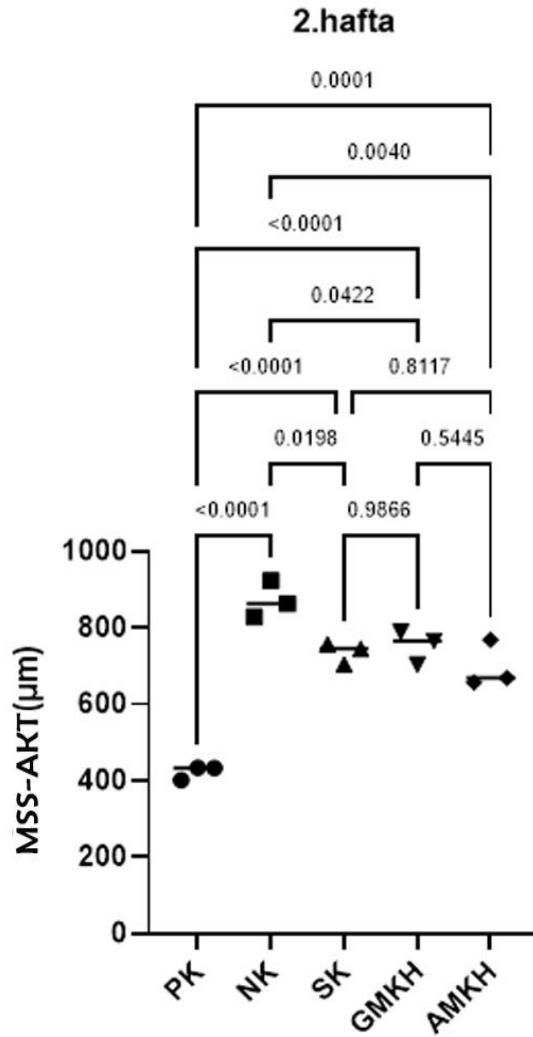
Şekil 3.6: **A.** Beyaz ok, alveolar kemikteki gingiva kaynaklı MKH'lerin farklılaştığı osteositler **B.** Alveolar kemikteki Adipoz kaynaklı MKH'lerin farklılaştığı osteositler, 10X, skala bar 200 mikrometre

Deneyisel periodontitis oluşturmak için ipek suture ile dişin suture edilmesi ve devamında lokal olarak kök hücre uygulanmasının hayvanların büyük çoğunluğu tarafından iyi tolere edildiği görülmüştür. Çalışma süresince başlangıçta zayıf olan 1 hayvan anestezi sonrasında, 2 tane hayvan ise suture atıldıktan 1 hafta sonra hızlı bir şekilde kilo kaybederek ölmüştür. Bunlar dışında çalışmanın 4. haftasında nedeni bilinmeyen bir akciğer enfeksiyonu nedeniyle 2 ayrı kafesten toplam 9 hayvan ölmüştür. Kaybedilen hayvanların dengeli bir şekilde gruplara dağıtılabilmesi amacıyla pozitif kontrol grubundaki bazı hayvanlara tekrar ligatür bağlanarak negatif kontrol grubuna dahil edilmiştir. Çalışma 63 hayvanla tamamlanmıştır. 14 günün sonunda hiç bir sutureda açılma olmamıştır. 14 günlük deneyisel periodontitis oluşturma süresinin sonunda yapılan klinik ve radyografik incelemelerde, periodontitis oluşturulan ratlarda sağlıklı ratlara göre anlamlı düzeyde alveol kemiği rezorpsiyonu ve ataçman kaybı varlığı gözlemlenmiştir. 5 ayrı grupta bulunan ratların ağırlıkları düzenli aralıklarla ölçülmüştür. Yapılan değerlendirmelerde 3 zaman diliminde de ağırlıklar gruplar arasında benzer bulunmuştur ($p < 0,05$). Grupların mss-akt ölçümleri Çizelge 3.1’ de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Mikro-BT ile yapılan mss-akt ölçümlerinin 2,4 ve 8. haftalarda gruplara göre karşılaştırılması

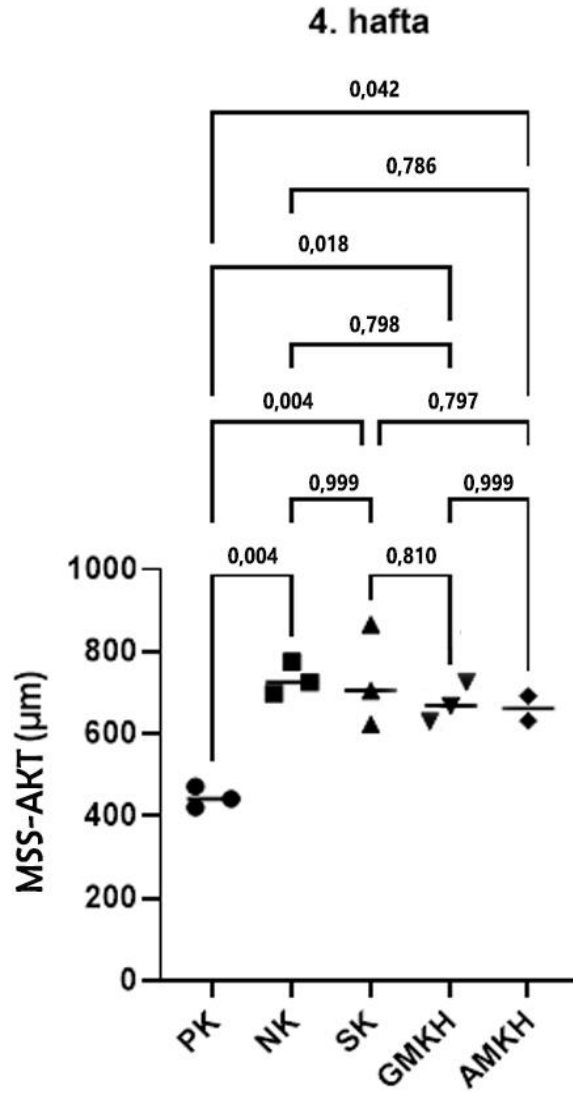
	P.K	N.K	S.K	GMKH	AMKH	P
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
2.hafta	422,7±18,6	871,7±48,1	735,9±27,5	753,0±44,2	698,1±61,3	<0.001
4.hafta	445,1±25,9	733,0±38,9	731,7±123,4	671,1±51,7	662,4±42,4	0.003
8.hafta	480,3±35,3	755,4±14,1	677,6±20,3	609,5±59,9	661,2±39,4	<0.001

Gruplar arasında mss-akt seviyeleri arasında yapılan karşılaştırmalarda tüm zaman dilimlerinde de en düşük değerlerin PK grubunda en yüksek değerlerin ise NK grubunda olduğu belirlenmiştir. 2. hafta sonuçları değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır. Tukey testi ile yapılan gruplar arası ikili karşılaştırmalar sonucunda, P.K grubunun 2. hafta mss-akt seviyesi NK ($p < 0.001$), SK ($p < 0.001$), GMKH ($p < 0.001$) ve AMKH ($p < 0.001$) gruplarından anlamlı derecede düşük bulunmuştur. NK grubunun 2. hafta mss-akt seviyesi ise SK ($p:0.019$; $p < 0.05$), GMKH ($p:0.042$; $p < 0.05$) ve AMKH ($p:0.004$; $p < 0.05$) gruplarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Diğer grupların 2. Hafta mss-akt seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$).



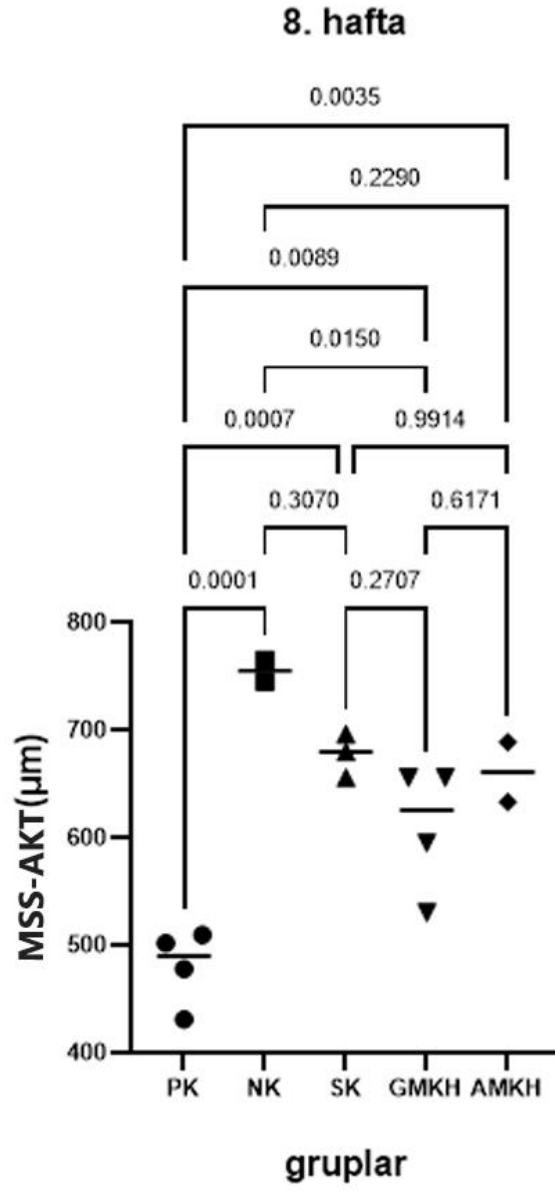
Şekil 3.7. PK, NK, SK, GMKH ve AMKH gruplarının 2. hafta mss-akt ölçümlerinin gruplar arası karşılaştırması

Grupların 4. hafta mss-akt seviyeleri arasında istatistik olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır. Tukey testi ile yapılan gruplar arası ikili karşılaştırmalar sonucunda, PK grubunun 4. hafta mss-akt seviyesi NK ($p:0.004;p<0.05$), SK ($p:0.004;p<0.05$), GMKH ($p:0.018;p<0.05$) ve AMKH ($p:0.042;p<0.05$) gruplarından anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Diğer grupların 4. Hafta mss-akt seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).








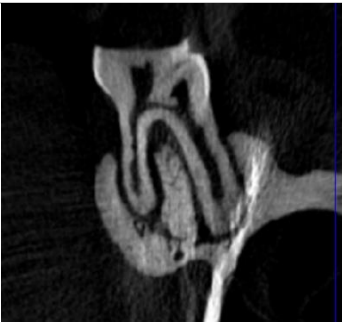



Şekil 3.8. PK, NK, SK, GMKH ve AMKH gruplarının 4. hafta mss-akt ölçümlerinin gruplar arası karşılaştırması



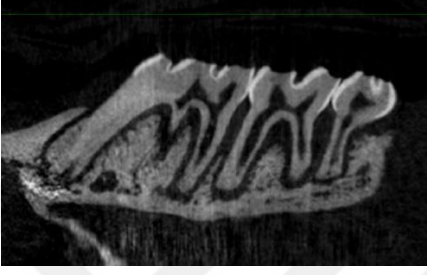






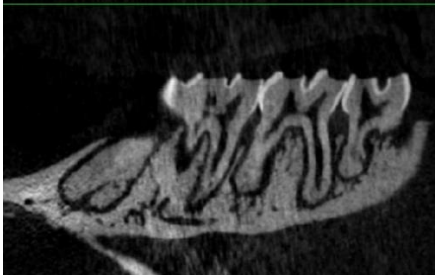
Grupların 8. hafta mss-akt seviyeleri arasında istatistik olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır. Tukey testi ile yapılan gruplar arası ikili karşılaştırmalar sonucunda, PK grubunun 8. hafta mss-akt seviyesi NK ($p < 0.001$), SK ($p: 0.0007; p < 0.001$), GMKH ($p: 0.0089; p < 0.05$) ve AMKH ($p: 0.0035; p < 0.05$) gruplarından anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Ayrıca NK grubunun 8. hafta MSS-AKT seviyesi GMKH ($p: 0.015; p < 0.05$) grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Diğer grupların 8. Hafta mss-akt seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$).



Şekil 3.9. PK, NK, SK, GMKH ve AMKH gruplarının 8. hafta mss-akt ölçümlerinin gruplar arası karşılaştırması

	2. HAFTA	8. HAFTA
PK		
NK		
SK		
GMKH		
AMKH		

Şekil 3.10. Gruplara ait örneklerin transversal kesitte 2. ve 8. haftalardaki mss-akt seviyelerini gösteren bazı mikro-BT görüntüleri

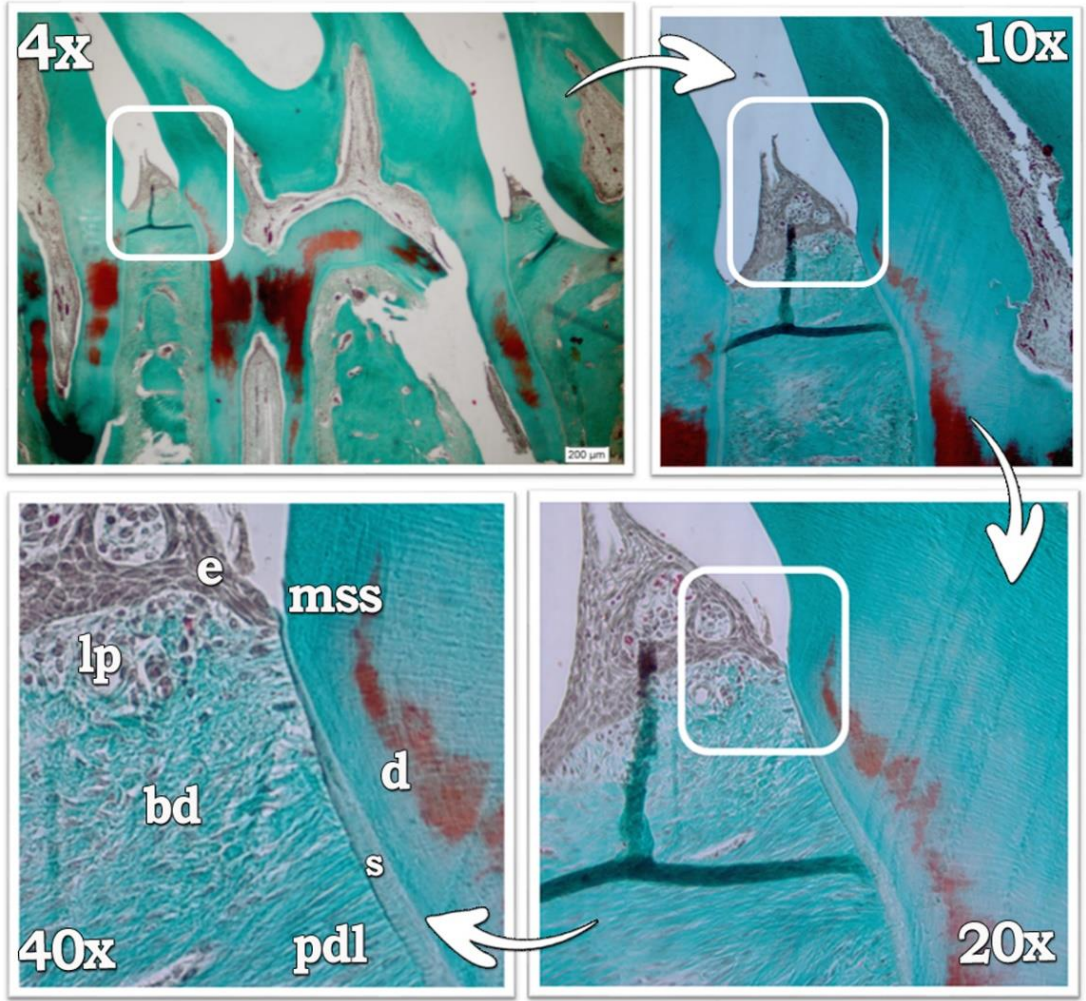
SAGİTTAL		
	2. HAFTA	8. HAFTA
PK		
NK		
SK		
GMKH		
AMKH		

Şekil 3.11. Gruplara ait örneklerin sagittal kesitte 2. ve 8. haftalardaki mss-akt seviyelerini gösteren bazı mikro-BT görüntüleri

Çizelge 3.2. Grupların kendi içlerinde mss-akt ölçümlerinin farklı zaman dilimlerine göre kıyaslanması, *paired samples t test*

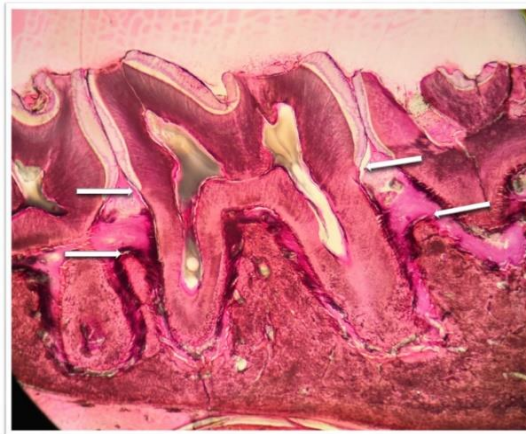
GRUP		Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	<i>p</i>
PK	2.hf ort.- 4.hf ort.	-22,400	12,734	6,367	0,039*
	2.hf ort- 8.hf ort	-57,627	40,013	20,006	,064
	4.hf ort- 8.hf ort	-35,227	31,993	15,996	,110
NK	2.hf ort- 4.hf ort	138,646	75,541	43,613	,086
	2.hf ort- 8.hf ort	116,323	38,249	22,083	0,034*
	4.hf ort- 8.hf ort	-22,322	43,511	25,121	,468
SK	2.hf ort- 4.hf ort	4,183	147,522	85,171	,965
	2.hf ort- 8.hf ort	58,283	43,727	25,245	,147
	4.hf ort- 8.hf ort	54,100	104,106	60,106	,463
GMKH	2.hf ort- 4.hf ort	81,816	75,849	37,924	,120
	2.hf ort- 8.hf ort	143,433	77,372	38,686	0,034*
	4.hf ort- 8.hf ort	61,616	79,395	39,697	,218
AMKH	2.hf ort- 4.hf ort	35,7145	87,504	50,520	,553
	2.hf ort- 8.hf ort	36,889	85,536	49,384	,533
	4.hf ort- 8.hf ort	1,175	2,162	1,248	,446

Grupların 2, 4 ve 8. hafta mss-akt değerlerindeki değişimleri kendi içlerinde kıyaslamak amacıyla paired samples t test uygulanmıştır. NK ($p:0.034$; $p<0.05$) ve GMKH ($p:0.034$; $p<0.05$) gruplarının 2. ve 8. hafta sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark bulunmuştur. Ancak ilgili grupların 8. hafta değerleri incelendiğinde GMKH ($609,5\pm59,9$) grubunda NK ($755,4\pm14,1$) grubuna göre daha yüksek bir iyileşme olduğu görülmektedir. SK ve AMKH gruplarında ise mss-akt seviyesinde sırasıyla 4 ve 8. haftalarda devam eden bir düşüş olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

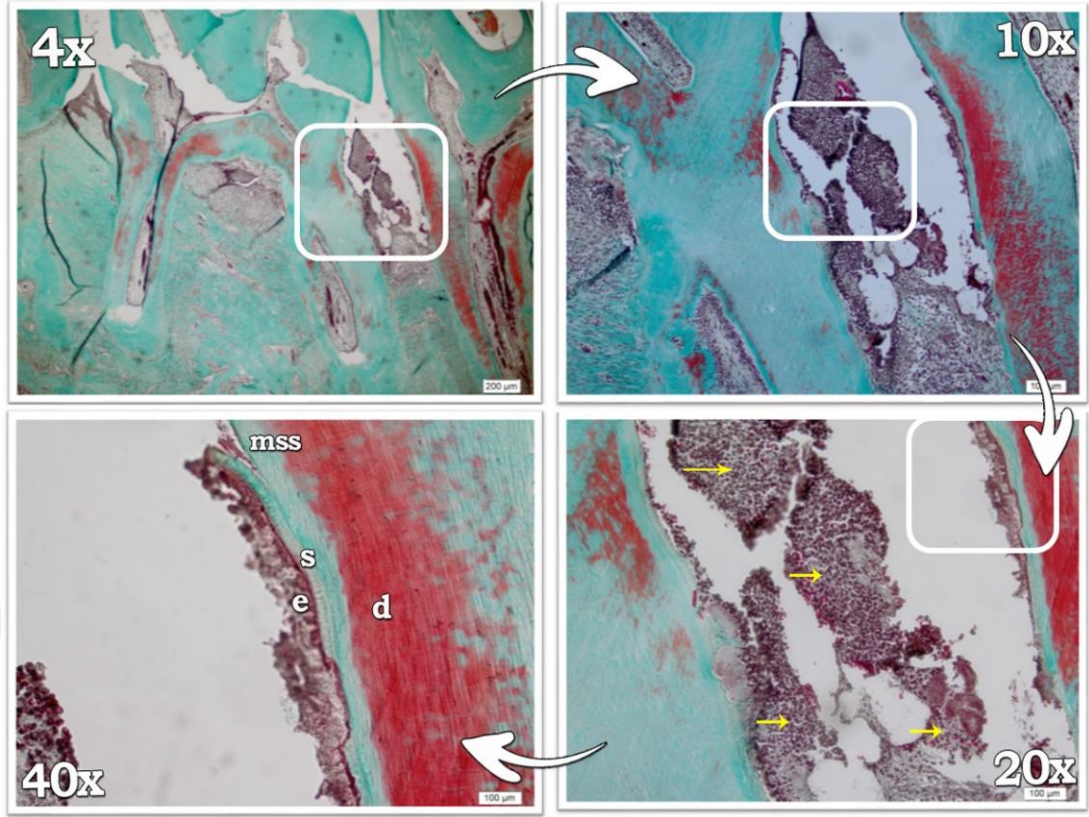


Şekil 3.12. PK grubu 2. hafta görüntüsü (Masson goldner boyaması).

Kesitlerde sağlıklı kontrol grubuna ait normal histolojik görünümdeki diş eti görülmektedir. İnterdental bölgede yer alan diş eti epiteli, mss sınırının altına uzanmayan çok katlı yassı bir epiteldir. Diş eti lamina propriası bağ doku hücrelerinden zengin sıkı ve düzensiz yapıda bir dokudur. PDL hücreleri dişin alveol soketine tutunmasını sağlayan kollajen lif bakımından zengin ara madde bakımından fakir paralel seyreden liflerden oluşan düzenli yapıda bir bağ dokusudur. (mss: mine-sement sınır, e:epitel, lp: lamina propria, bd: bağ doku, s: sement, d: dentin, pdl: periodontal ligament)

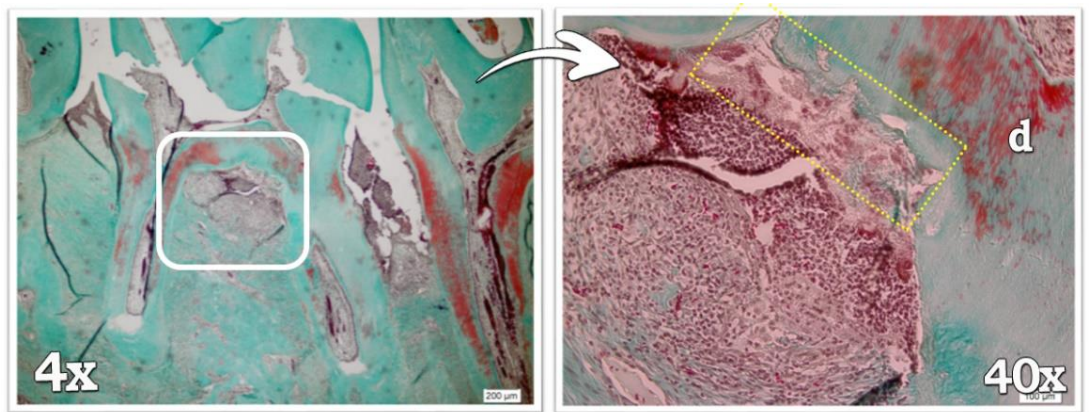


Şekil 3.13. Pozitif kontrol grubuna ait mss ve akt sınırlarını gösteren dekalsifiye edilmemiş kesit (H&E boyaması)



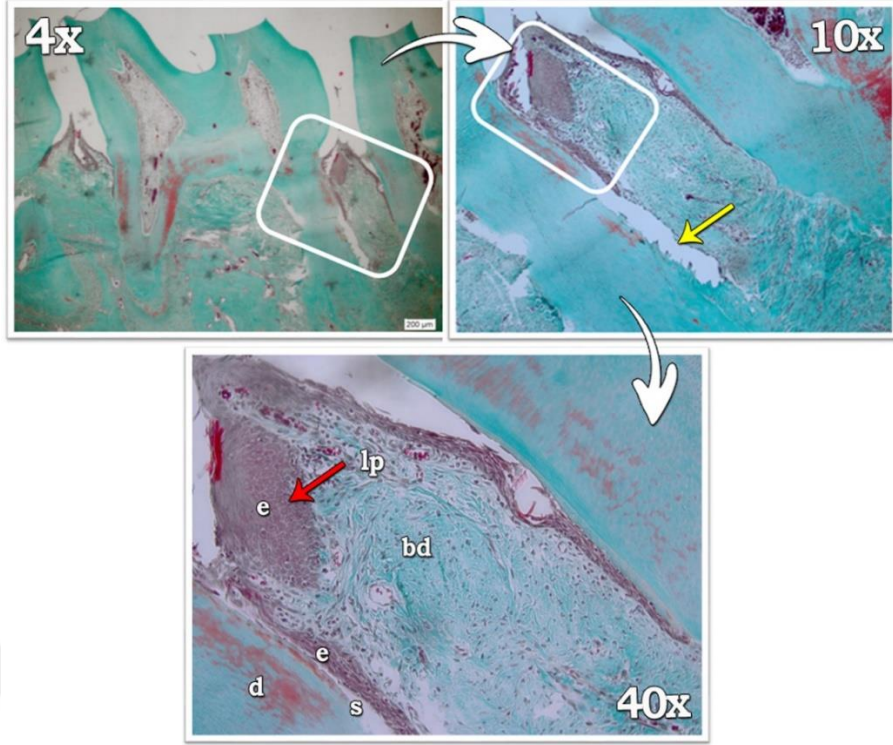
Şekil 3.14. NK grubu 2. hafta görüntüsü (Masson goldner boyaması).

Kesitlerde periodontal dokuları etkileyen yaygın bir diş eti inflamasyonu görülmektedir. Diş eti bağ dokusunda aşırı bir lökosit infiltrasyonu mevcuttur. Epitel bütünlüğünü kaybetmiştir. Yer yer epitelde dökülmeler bulunmaktadır. Epitel mss sınırının altına uzanmaktadır..(mss: mine sement sınırı, e:epitel, s: sement, d: dentin, sarı ok: lökosit infiltrasyon bölgeleri)



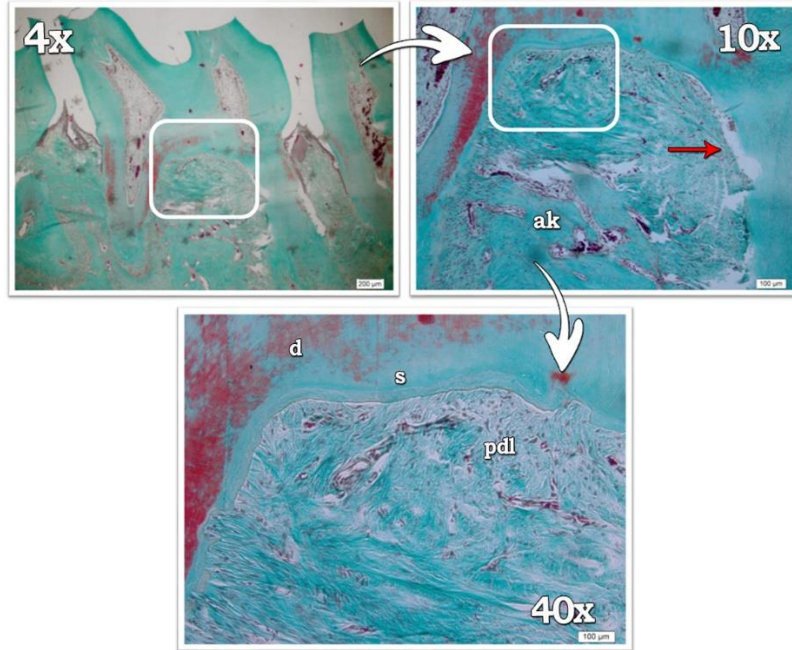
Şekil 3.15. NK grubu 2. haftaya ait furkasyon bölgesini gösteren görüntü

Kesitlerde aşırı lökosit infiltrasyonu görülmektedir. Enflamasyona bağlı olarak alveol kreti ile sement bağlantısını sağlayan pdl ortadan kalkmıştır. Sementin devamlılığı bozulmuştur.(d: dentin, sarı kutu: sement dokusunda yer alan dejenerasyon bölgesi)



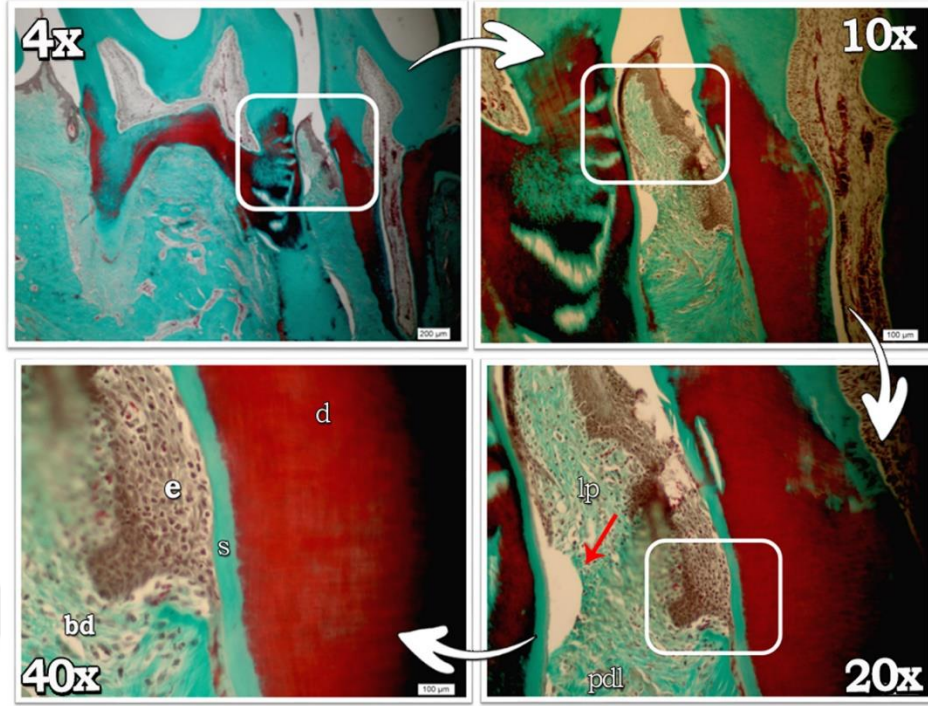
Şekil 3.16. NK grubu 8. hafta görüntüsü (Masson goldner boyaması).

8 hafta sonunda doku içerisinde çok fazla lökosit hücresi görünmemektedir. Çok katlı yassı epitelde aşırı bir kalınlaşma vardır(kırmızı ok).Lamina propria gevşek ve düzensiz bir yapıya sahiptir. Diş eti dokusu ile sement arasında geniş bir boşluk bulunmaktadır(sarı ok). Epitel cep içerisine invaze olarak uzun bağlantı epiteli oluşturmuştur.(pdl: periodontal ligament, e:epitel, s: sement, d: dentin bd: bağ dokusu, lp: lamina propria)



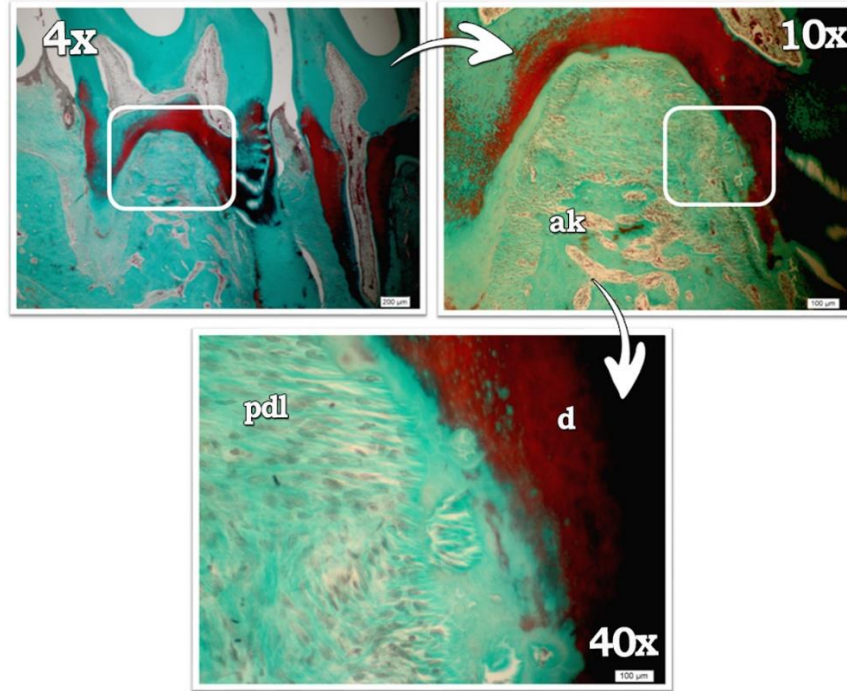
Şekil 3.17. SK grubu 2. haftaya ait furkasyon bölgesini gösteren görüntü

Furkasyon bölgesi genel itibariyle normal bir histolojik görüntüye sahipken sadece kırmızı ok ile gösterilen bölgede pdl ile sement arasında boşluk görülmektedir. Aynı bölgede sement yüzeyinde de düzensizlik bulunmaktadır.



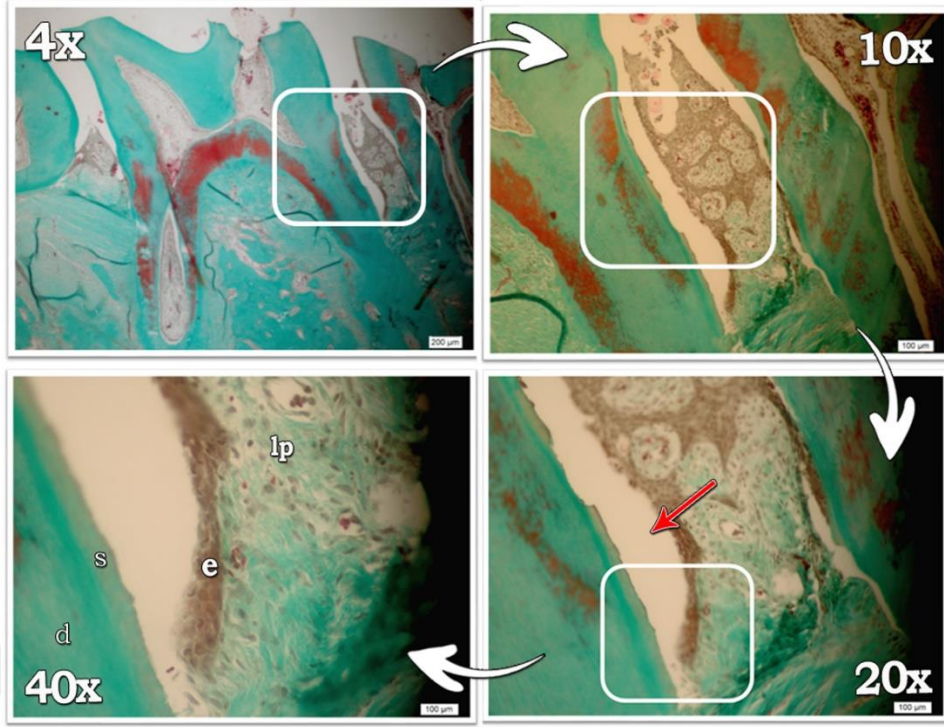
Şekil 3.18. SK grubu 2. hafta görüntüsü (Masson goldner boyaması).

Kesitlerde belirgin bir lökosit infiltrasyonu görülmemektedir. Çok katlı yassı epitelde ve lamina propriada kalınlaşmalar vardır. Lamina propria gevşek ve düzensiz bir yapıya sahiptir. Diş eti dokusu ile sement arasında yer yer boşluklar oluşmuştur. Epitel cep içerisine invaze olarak uzun bağlantı epiteli oluşturmuştur.(pdl: periodontal ligament, e:epitel, s: sement, d: dentin bd: bağ dokusu, lp: lamina propria, kırmızı ok: bağ dokusu ile diş arasında oluşan boşluk)



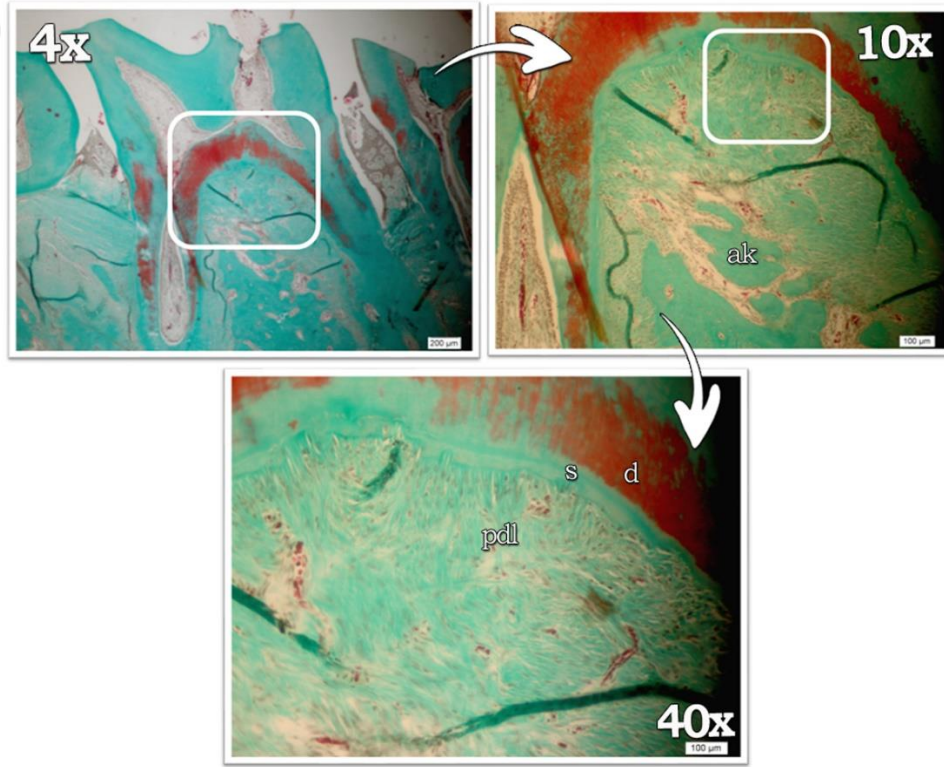
Şekil 3.19. SK grubu 2. haftaya ait furkasyon bölgesini gösteren görüntü

Furkasyon bölgesi normal bir histolojik görüntüye sahiptir.(ak: alveol kreti)



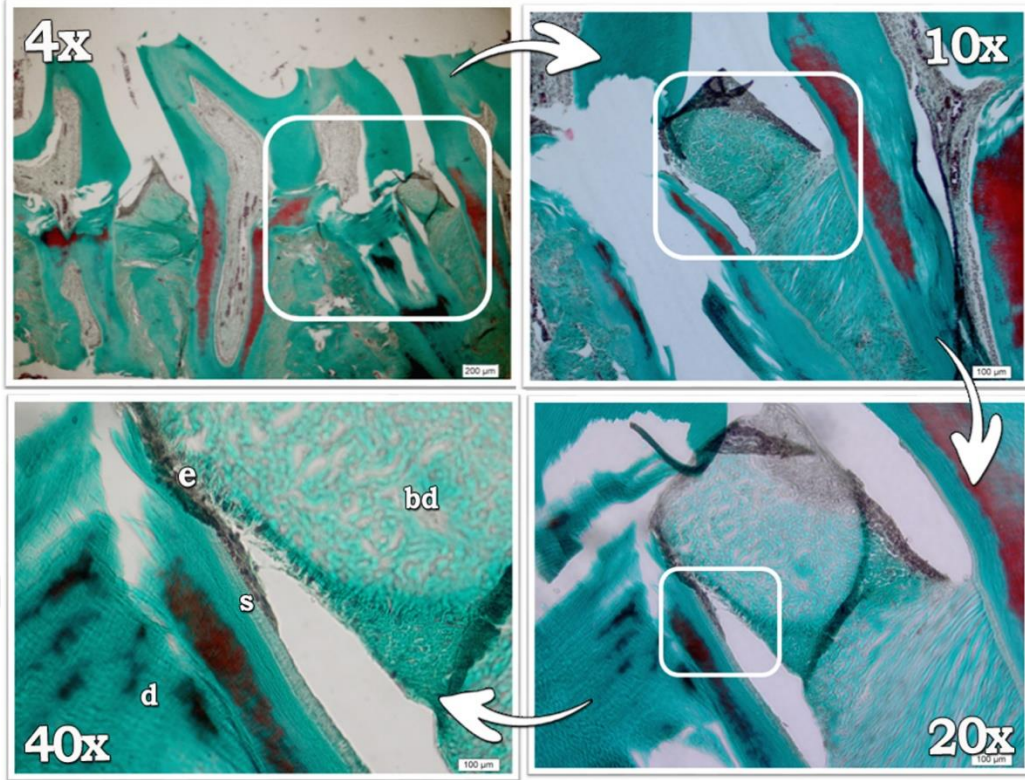
Şekil 3.20. SK grubu 4. hafta görüntüsü (Masson goldner boyaması).

2. hafta görüntülerine benzer bir görüntüye sahiptir. Uzun bağlantı epiteli devam etmektedir. Kesitlerde belirgin bir lökosit infiltrasyonu görülmemektedir. (e:epitel, s: sement, d: dentin lp: lamina propria, kırmızı ok: epitel ile sement arasında oluşan boşluk)



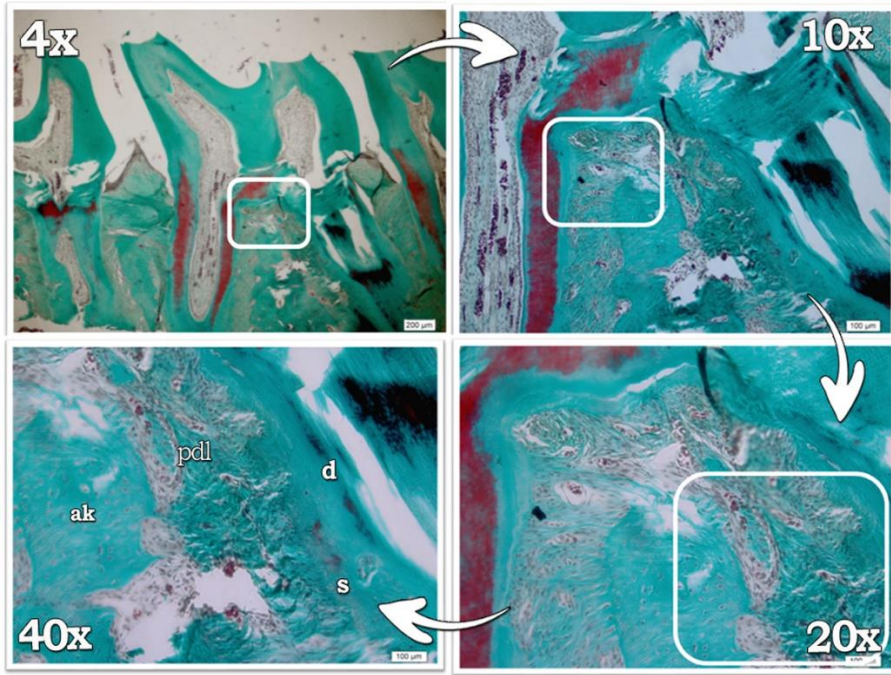
Şekil 3.21. SK grubu 4. haftaya ait furkasyon bölgesini gösteren görüntü

Furkasyon bölgesi normal bir histolojik görüntüye sahiptir.(ak: alveol kreti)



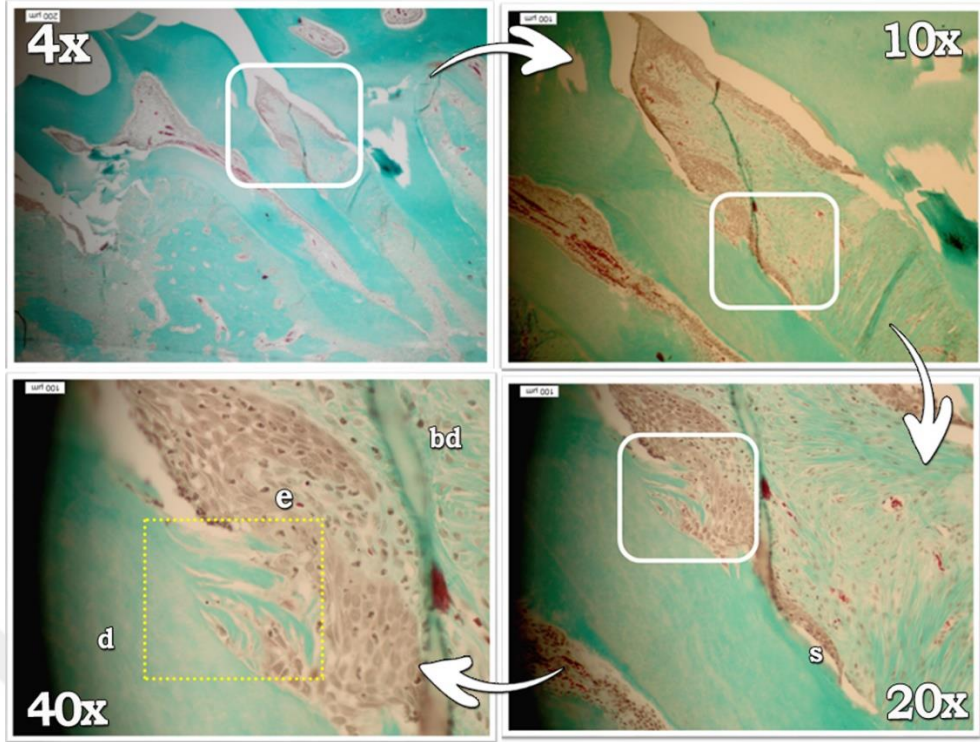
Şekil 3.22. SK grubu 8. hafta görüntüsü (Masson goldner boyaması).

Önceki haftalardan farklı olarak lamina proria normal bir görünüme sahiptir. Uzun bağlantı epiteli devam etmektedir. Kesitlerde belirgin bir lökosit infiltrasyonu görülmemektedir. Sement dokusu ile dişeti arasında yer yer boşluklar devam etmektedir. (e:epitel, s: sement, d: dentin bd:bağ dokusu)



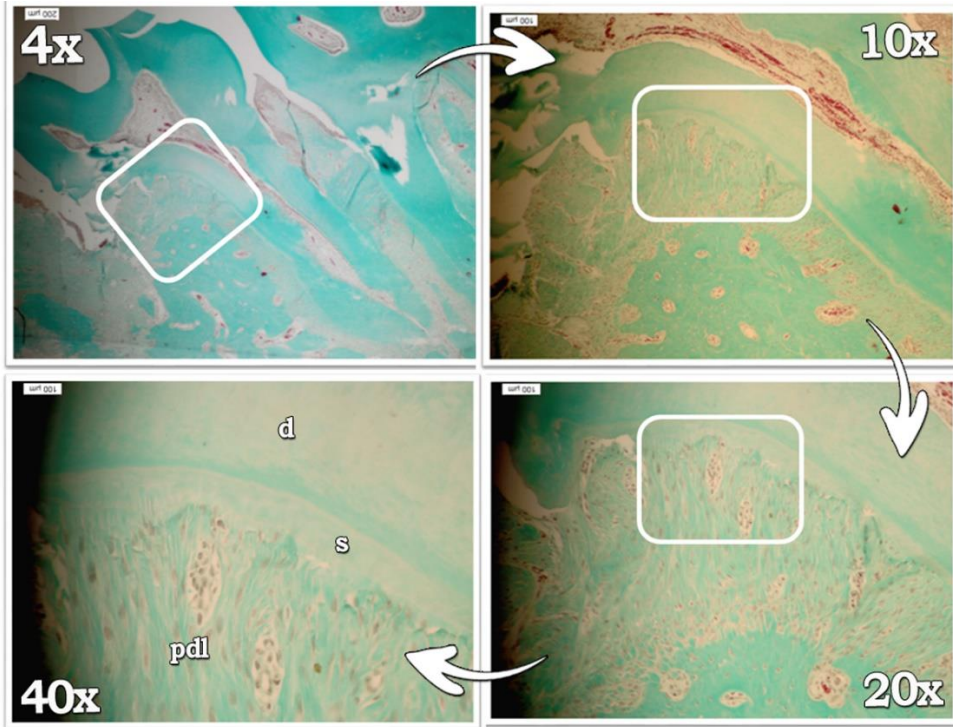
Şekil 3.23. SK grubu 8. haftaya ait furkasyon bölgesini gösteren görüntü

Furkasyon bölgesi normal bir histolojik görüntüye sahiptir.



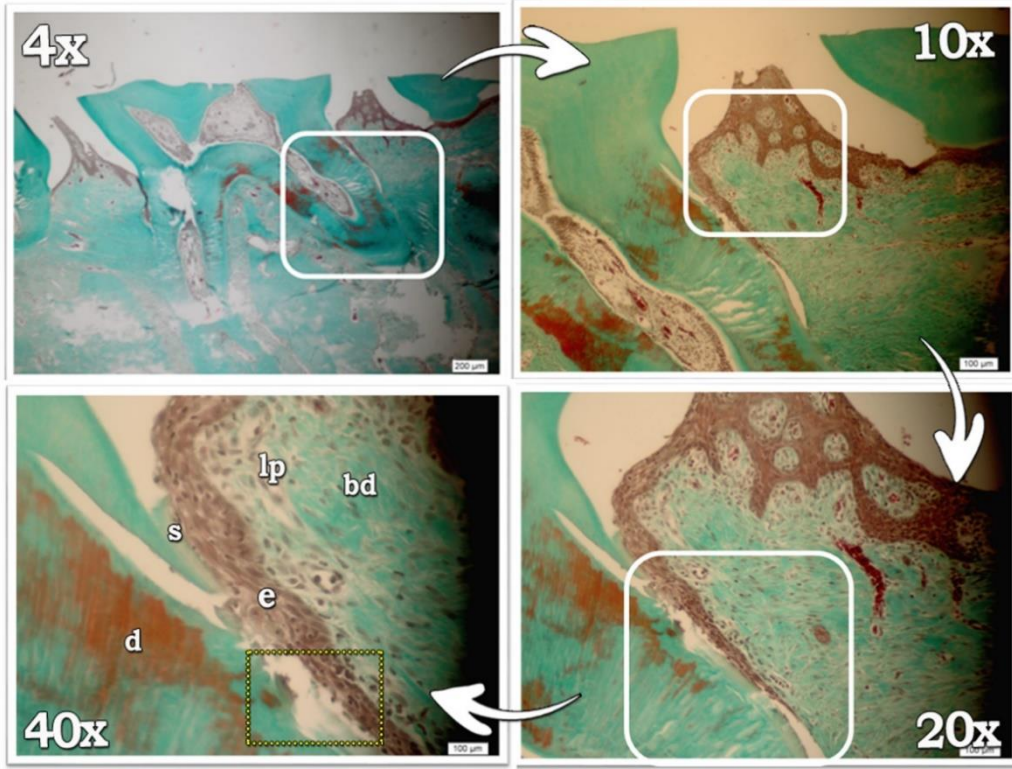
Şekil 3.24. GMKH grubu 2. hafta görüntüsü (Masson goldner boyaması).

Kesitlerde belirgin bir lökosit infiltrasyonu görülmemektedir. Çok katlı yassı epitelde ve lamina propria kalınlaşmalar vardır. Lamina propria gevşek ve düzensiz bir yapıya sahiptir PDL de kalın ve düzensiz fibriller bulunmaktadır. Epitel cep içerisine invaze olarak uzun bağlantı epiteli oluşturmuştur.(pdl: periodontal ligament, e:epitel, s: sement, d: dentin bd: bağ dokusu, sarı kutu: epitel içerisine uzanan pdl uzantıları)



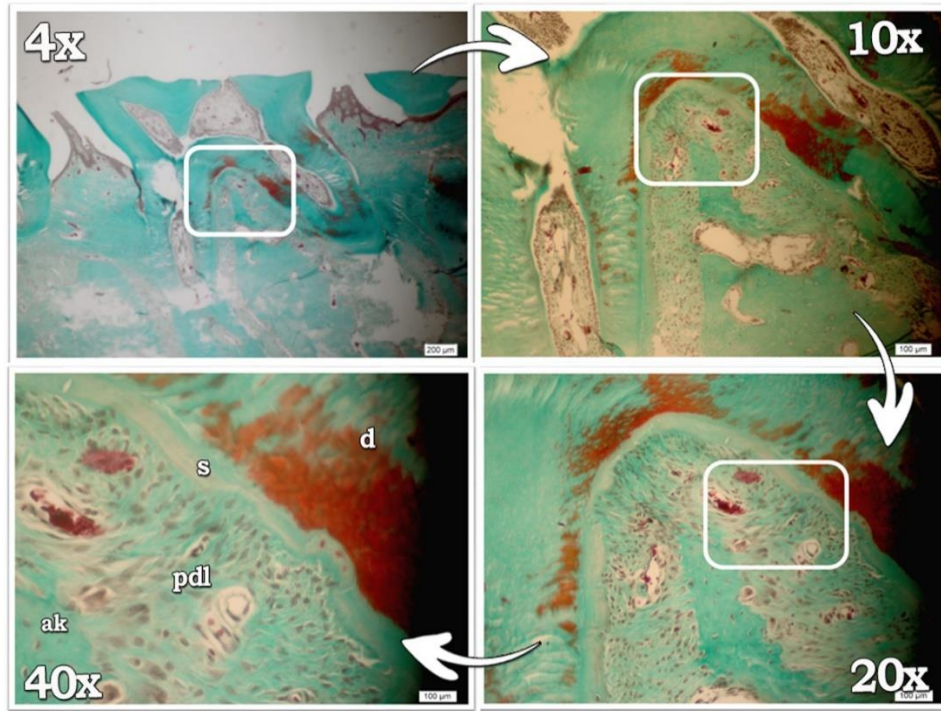
Şekil 3.25. GMKH grubu 2. haftaya ait furkasyon bölgesini gösteren görüntü

Furkasyon bölgesi normal bir histolojik görüntüye sahiptir.



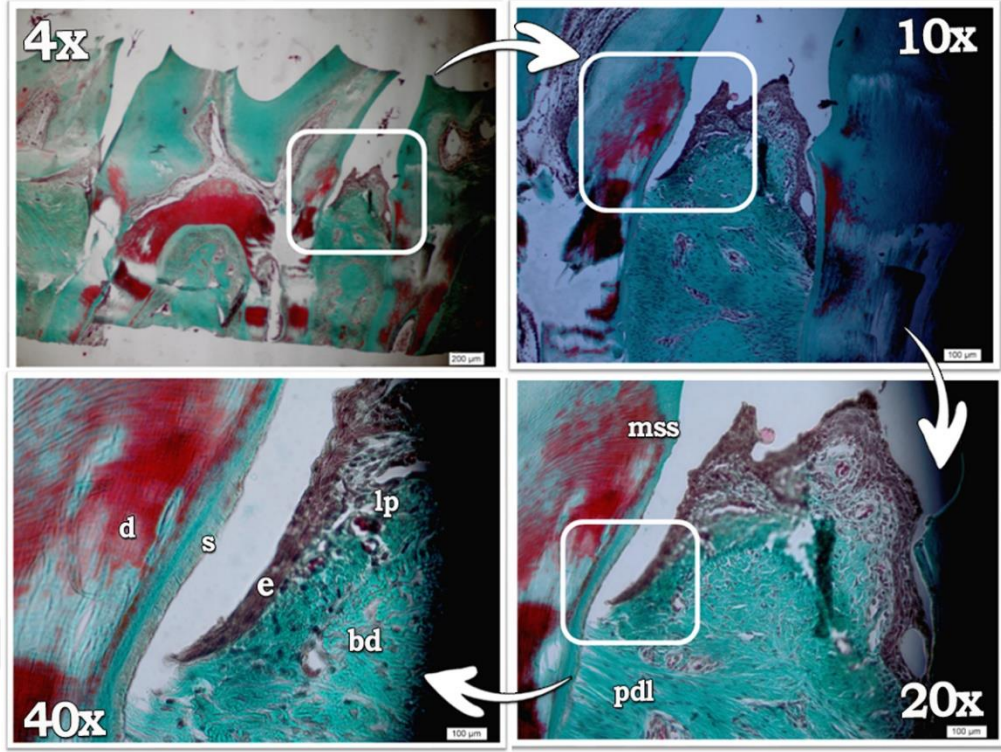
Şekil 3.26. GMKH grubu 4. hafta görüntüsü (Masson goldner boyaması).

Bir önceki kesitle benzer görünüme sahiptir. Çok katlı yassı epitelde ve lamina propriada kalınlaşmalar vardır. Epitel cep içerisine invaze olarak uzun bağlantı epiteli oluşturmuştur. Diş eti ile sement arasında yer yer boşluklar bulunmaktadır. Bir önceki kesite göre pdl fibriller biraz daha düzenli ve sıkıdır. (pdl: periodontal ligament, e:epitel, s: sement, d: dentin bd: bağ dokusu, lp: lamina propria)



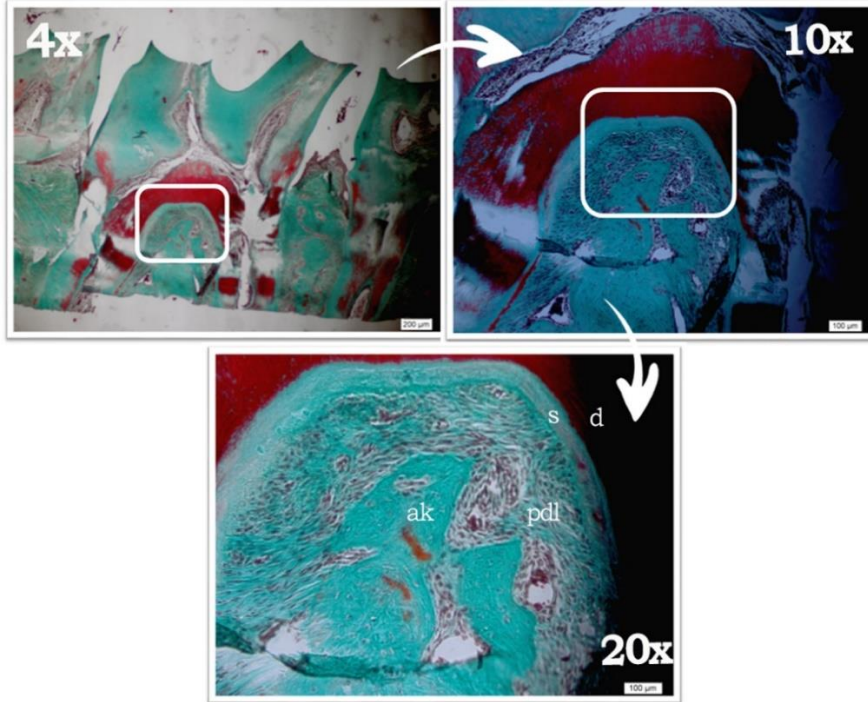
Şekil 3.27. GMKH grubu 4. haftaya ait furkasyon bölgesini gösteren görüntü

Furkasyon bölgesi normal bir histolojik görüntüye sahiptir.



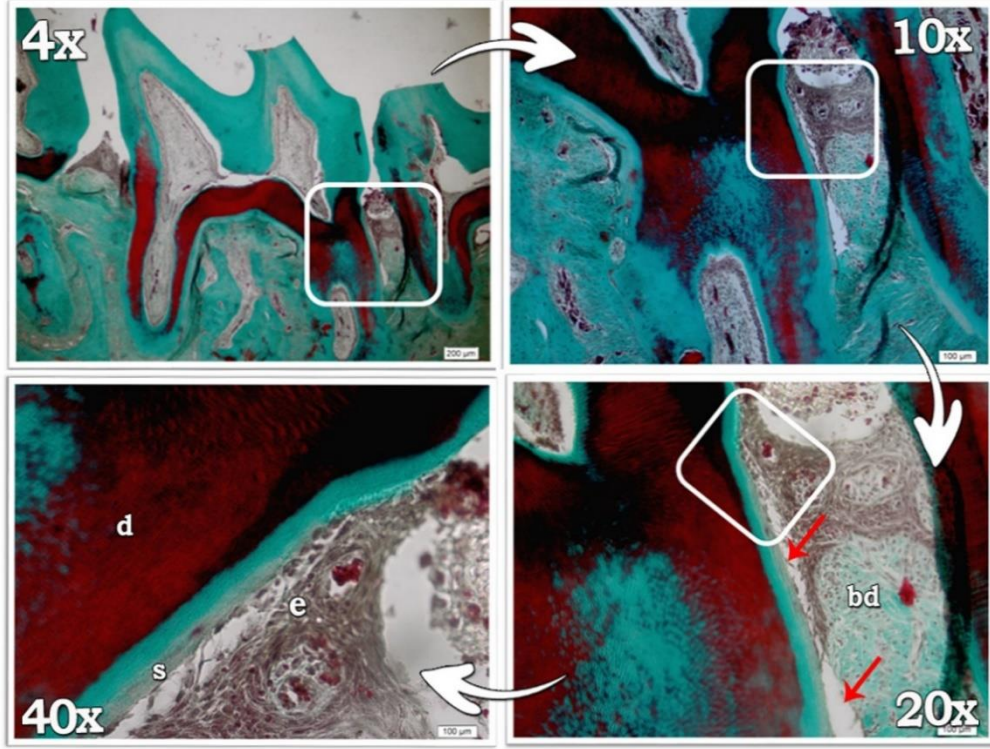
Şekil 3.28. GMKH grubu 8. hafta görüntüsü (Masson goldner boyaması).

8. haftaya ait bu kesitlerde de uzun bağlantı epiteli görülmekle birlikte önceki haftalara kıyasla önemli derecede daha az ve daha incedir. Bağ dokusu genel olarak sıkı ve sağlıklı görünmektedir. Pdl lifleri düzenli seyretmektedir. Diğer kesitlerin aksine epitel sınırının altına uzanan bir ataçman kaybı yoktur.(mss: mine sement sınırı, pdl: periodontal ligament, e:epitel, s: sement, d: dentin bd: bağ dokusu, lp: lamina propria)



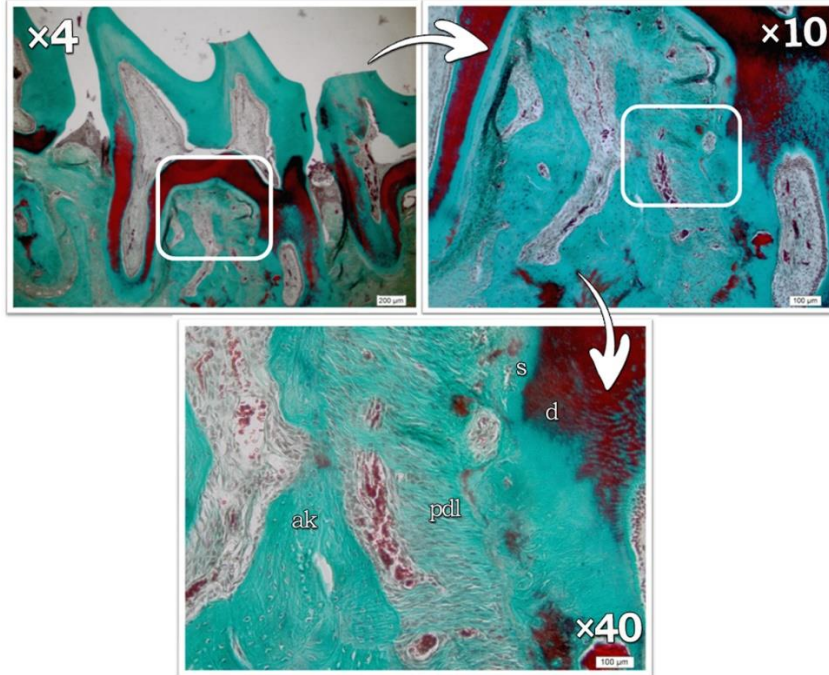
Şekil 3.29: GMKH grubu 8. haftaya ait furkasyon bölgesini gösteren görüntü

Furkasyon bölgesi normal bir histolojik görüntüye sahiptir.



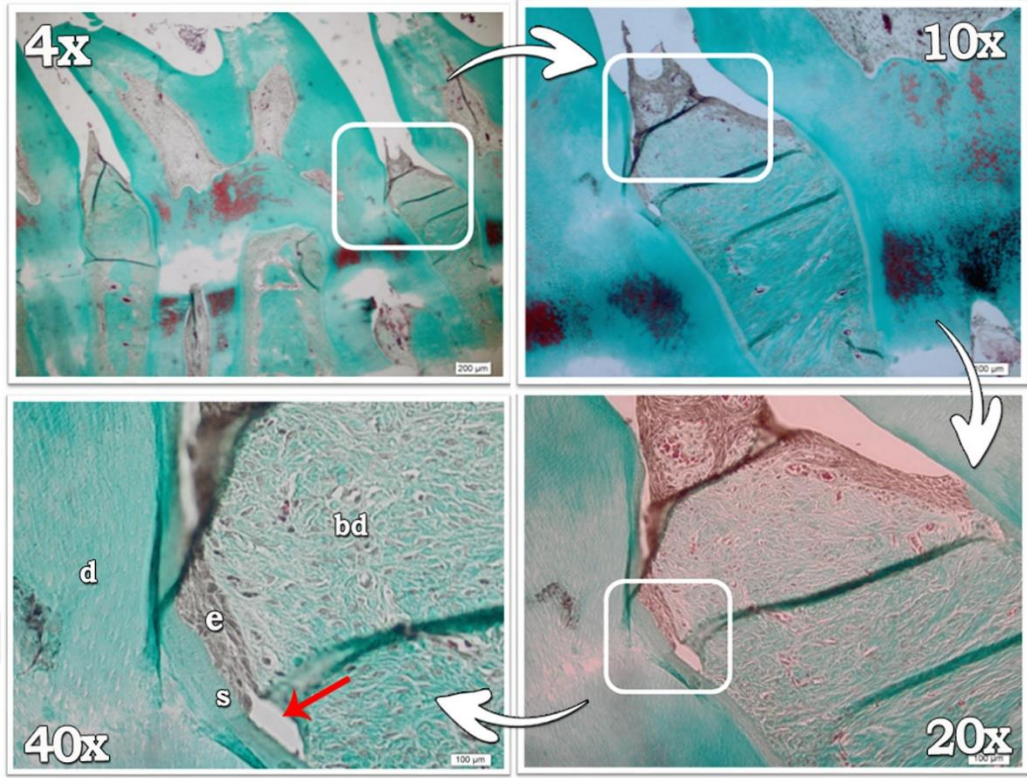
Şekil 3.30. AMKH grubu 2. hafta görüntüsü (Masson goldner boyaması).

GMKH 2. Hafta görüntüsüne benzer bir görüntü mevcuttur. Kesitlerde belirgin bir lökosit infiltrasyonu görülmemektedir. Çok katlı yassı epitelde ve lamina propria kalınlaşmalar vardır. Lamina propria gevşek ve düzensiz bir yapıya sahiptir. Epitel cep içerisine invaze olarak uzun bağlantı epiteli oluşturmuştur. Epitel sınırının altına uzanan bağ dokusu ile seiment arasında yer yer boşluklar bulunmaktadır.(pdl: periodontal ligament, e:epitel, s: seiment, d: dentin bd: bağ dokusu, kırmızı ok: diş eti ile seiment arasındaki boşluklar)



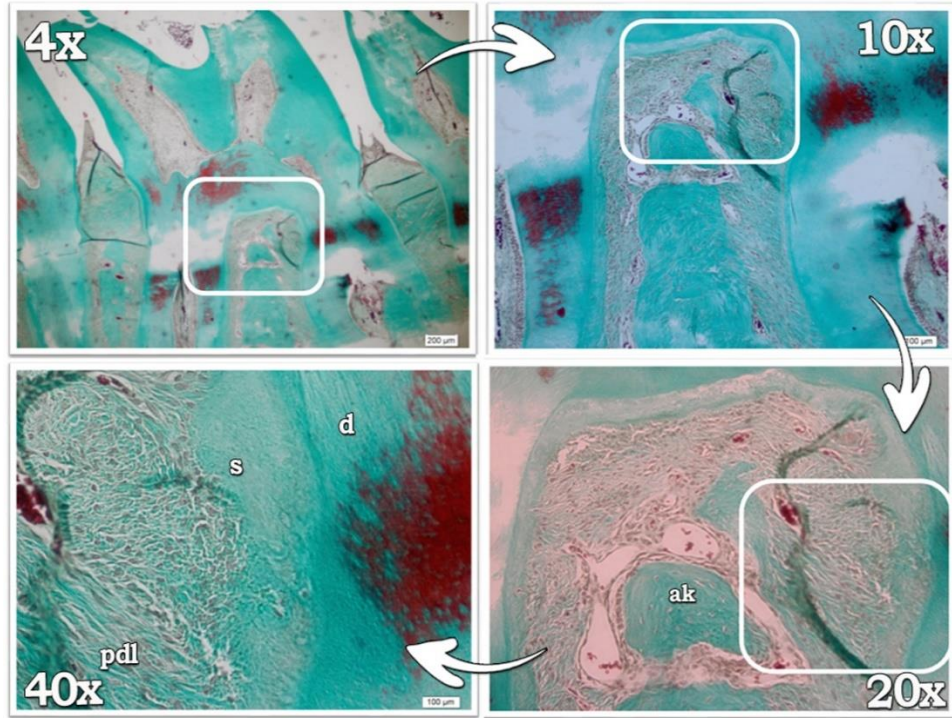
Şekil 3.31. AMKH grubu 2. haftaya ait furkasyon bölgesini gösteren görüntü

Furkasyon bölgesi normal bir histolojik görüntüye sahiptir.



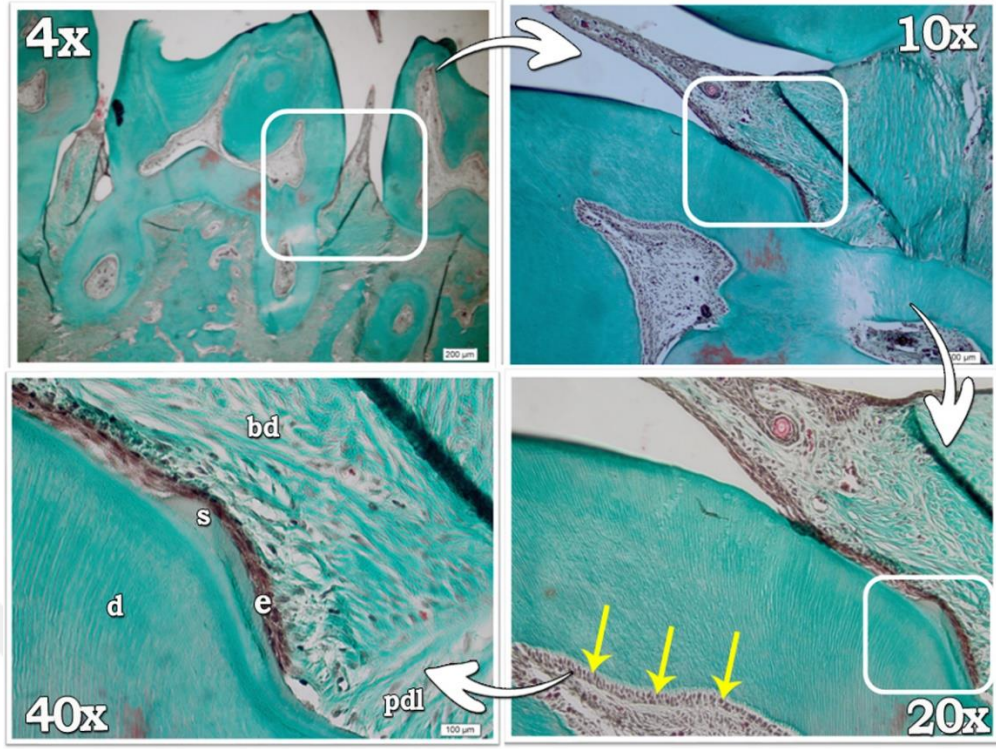
Şekil 3.32. AMKH grubu 4. hafta görüntüsü (Masson goldner boyaması).

Uzun bağlantı epiteli oluşmakla birlikte mss sınırının çok fazla altına ilerlememektedir. Normal ve sıkı bir bağ dokusu görünümüne sahiptir. Epitel sınırının altında bağ dokusu ile sement arasında minimal bir açıklık bulunmaktadır(kırmızı ok).(pdl: periodontal ligament, e:epitel, s: sement, d: dentin bd: bağ dokusu,



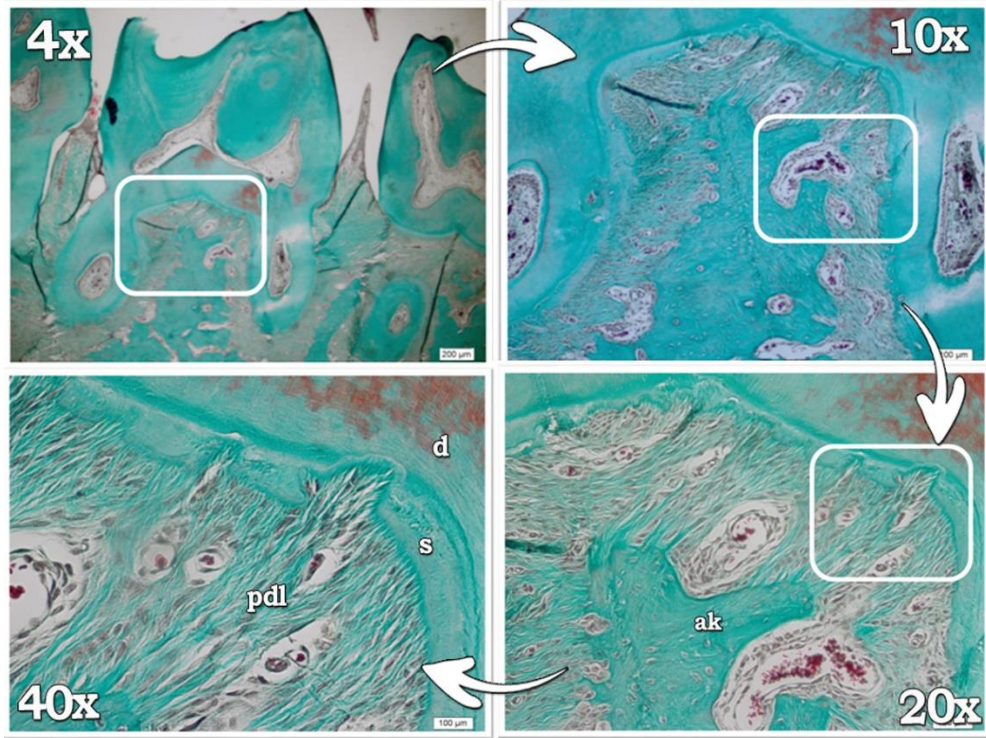
Şekil 3.33. AMKH grubu 4. haftaya ait furkasyon bölgesini gösteren görüntü

Furkasyon bölgesi normal bir histolojik görüntüye sahiptir.



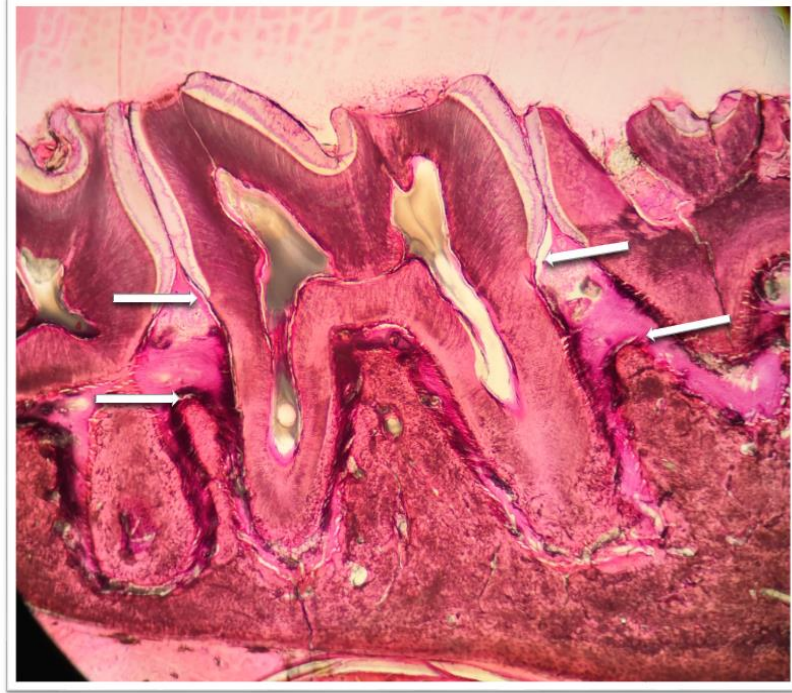
Şekil 3.34. AMKH grubu 8. hafta görüntüsü (Masson goldner boyaması).

4. haftaya benzer bir görüntüye sahiptir. Mss'nin çok fazla altına ilerlemeyen epitel invajinasyonu devam etmektedir. PDL lifleri düzgün ve paralel seyretmektedir. Epitel sınırının altında bağ dokusu ile sement arasında minimal bir açıklık bulunmaktadır. (pdl: periodontal ligament, e: epitel, s: sement, d: dentin bd: bağ dokusu, sarı ok: odontoblast hücreleri)



Şekil 3.35. AMKH grubu 8. haftaya ait furkasyon bölgesini gösteren görüntü

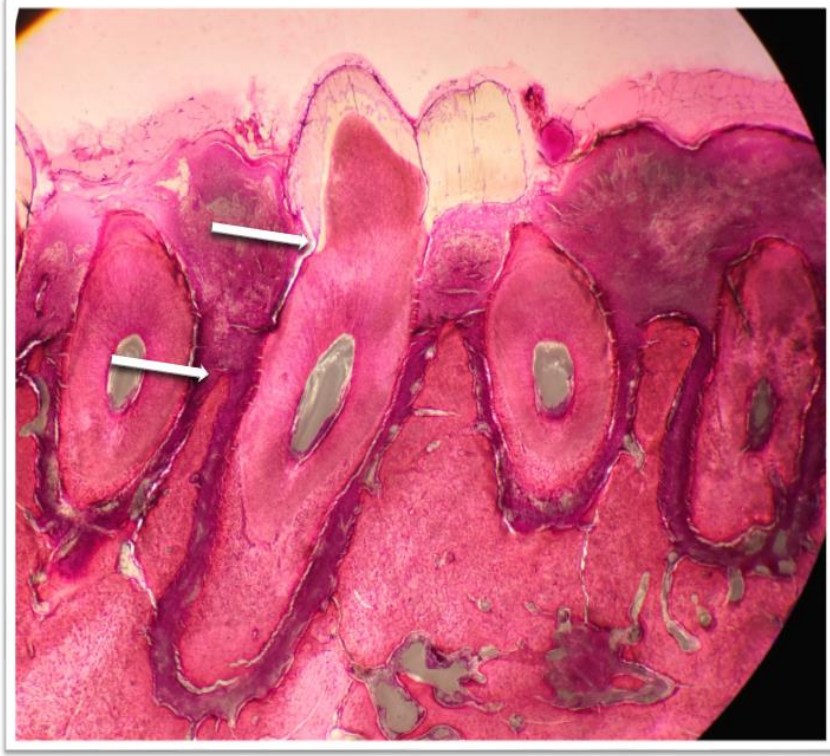
Furkasyon bölgesi normal bir histolojik görüntüye sahiptir.



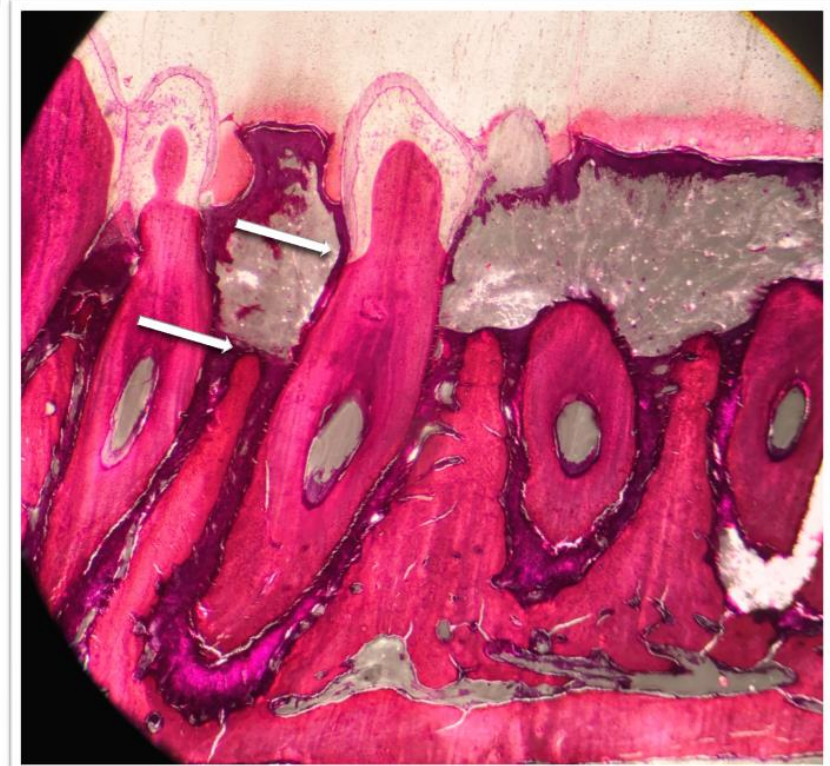
Şekil 3.36. PK grubu 8. haftaya ait mss ve akt sınırlarını gösteren dekalsifiye edilmemiş kesit (H&E boyaması)



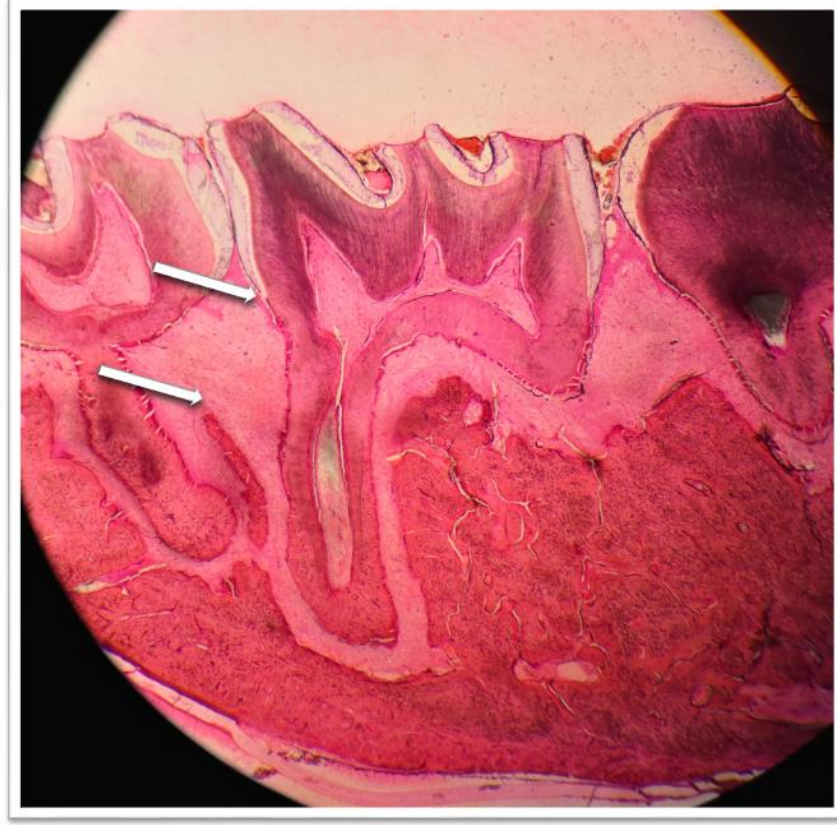
Şekil 3.37. NK grubu 2. haftaya ait mss ve akt sınırlarını gösteren dekalsifiye edilmemiş kesit (H&E boyaması)



Şekil 3.38. SK grubu 8. haftaya ait mss ve akt sınırlarını gösteren dekalsifiye edilmemiş kesit (H&E boyaması)



Şekil 3.39. GMKH grubu 8. haftaya ait mss ve akt sınırlarını gösteren dekalsifiye edilmemiş kesit (H&E boyaması)



Şekil 3.40. AMKH grubu 8. haftaya ait mss ve akt sınırlarını gösteren dekalsifiye edilmemiş kesit (H&E boyaması)

8 hafta sonunda elde edilen histolojik kesitler üzerinde yapılan değerlendirmeye göre GMKH grubunda daha belirgin olmakla birlikte kök hücre uygulanan gruplarda kontrol gruplarına kıyasla mss altına invaze olan epitel miktarı daha azdır. Aynı zamanda pdl ve bağ dokusu yapısı normale daha yakın görünmektedir. SK grubunda kök hücre uygulanan gruplara kıyasla ataçman kaybı biraz daha fazla olmakla birlikte 8 hafta sonunda epitel ve bağ dokusu görüntüsü NK grubuna göre daha iyi görünmektedir. NK grubu 2. hafta kesitleri dışında diğer gruplarda belirgin bir lökosit infiltrasyonu bulunmamaktadır. Aynı şekilde NK kontrol grubu dışında diğer bütün gruplarda furkasyon bölgesi normal bir histolojik görüntüye sahiptir.

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında ligatür tekniği ile deneysel periodontitis oluşturulan ratlarda, fibroin/KOS hidrojel yapıya sahip doku iskelesi içerisinde lokal olarak uygulanan adipoz doku ve gingival fibroblast kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (MKH) periodontal dokuların iyileşmesi üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Kök hücrelerin diş eti dokularına ve periodontal ligamente penetrasyonu GFP immünohistokimyasal boyama ile doğrulanmıştır.

Periodontal tedavi için kullanılan mevcut geleneksel teknikler, periodonsiyumdaki mikrobiyal yükü ve inflamasyonu azaltarak hastalığın ilerlemesini durdurmaya odaklanmaktadır(Han ve ark 2014). Bu tedavi yaklaşımları ile cep miktarında azalma ve enfeksiyon kontrolü sağlanmakla birlikte hasarlı sement ve alveol kemiği üzerinde minimal bir onarım gerçekleşmekte fakat bu iyileşme tanım gereği, periodonsiyumun gerçek rejenerasyonu olarak kabul edilememektedir (Narayanan ve Bartold 1996). Rejenerasyonun sağlanabilmesi için, uygun hücre popülasyonunun, sinyal moleküllerinin ve matris yapı iskelesinin hem zamansal hem de mekânsal olarak düzenli ve programlanmış bir sırayla ilerlemesi, periodontal rejenerasyonda anahtar bir rol oynamaktadır. Doku mühendisliği ve kök hücre çalışmaları canlı ve fonksiyonel diş yapılarını yeniden oluşturarak geleneksel tedavi yöntemlerinin eksikliklerini gidermek için alternatif bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır(Bartold ve ark 2000). Bu amaçla uygulanacak kök hücreler önceden hazırlanan üç boyutlu bir iskelet yapı içine yerleştirilerek defekt bölgesine implante edilebilmektedir.

Doku iskeleleri hücrelerin doku içine taşınmasını ve bir hacim oluşturmasını sağlayan yapılar olarak tanımlanmaktadır (Kim ve ark 2016). İdeal bir iskelenin hücre yapışmasını ve çoğalmasını desteklemesi, besinler, büyüme faktörleri, metabolik atık gibi moleküllerin taşınmasına izin vermesi ve mekanik destek sağlaması gerektiği belirtilmiştir(Geckil ve ark 2010). Periodontal doku rejenerasyonu için tasarlanmış yapı iskeleleri geliştirmek için birçok farklı yaklaşım önerilmiştir(Bousnaki ve ark 2022). Polimerler, seramikler, metaller ve kompozitler olmak üzere farklı türlerde biyomalzemeler bulunmaktadır. Fibroin polimer yapıda doğal bir biyomalzemedir (Yucel ve ark 2014). İpek fibroini mükemmel biyomekanik özelliklere sahip, biyouyumlu, bozunma süresi klinik gereksinimlere göre kontrol edilebilen çeşitli

ilaçlar, büyüme faktörleri vb. için kullanılabilen bir taşıyıcıdır(Cao ve Wang 2009, Pritchard ve ark 2013). Kitosan oligosakkarit laktat (KOS) ise, kitosan'ın depolimerize bir oligomer türevidir. Kitosanın aksine, KOS suda çözünür, bu da farklı yapılara ve karışımlara dahil edilmesini kolaylaştırmaktadır(Azuma ve ark 2015). Ayrıca, KOS'un anti-kanser, antimikrobiyal ve immünomodülatör etkileri bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda F: KOS hidrojel doku iskelesi kullanılmıştır.

Rejeneratif uygulamalardaki potansiyelleri göz önüne alındığında, vücuttaki çoğu organ ve dokulardan çeşitli kök hücreler elde edilmiştir(Baksh ve ark 2004). Bugüne kadar, ekstraoral ve intraoral dokulardan elde edilen birçok farklı türde kök hücreler prelinik uygulamalardaki potansiyellerini değerlendirmek için küçük ve büyük hayvan modellerinde kullanılmıştır. Literatüre bakıldığında MKH'ler, çoklu özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilme ve yüksek çoğalma potansiyelleri nedeniyle periodontal rejenerasyon için kullanılabileceği fikrini destekleyen çok sayıda kanıt bulunmaktadır(Han ve ark 2014).

Bizim çalışmamızda proliferasyon özelliklerinin yüksek olması, minimal yollarla elde edilebilmesi, periodontal dokulara farklılaşma kapasitesinin bulunması bunun yanında immünomodülatör ve antienflamuar etkileri bulunması nedeniyle GMKH'ler tercih edildi(Tomar ve ark 2010). Çalışmamızda tercih edilen diğer bir kök hücre kaynağı ise minimal invaziv ve ağrısız bir prosedürle yüksek verimde elde edilmesi, kültüre edildiklerinde fenotiplerini uzun süre koruyabilmesi, proliferasyon kapasitelerinin yüksek olması ve üç gelişimsel germ tabakasının (endoderm, mezoderm ve ektoderm) hücre tiplerine farklılaşabilme kapasitesine sahip olmaları nedeni ile AMKH'dir(Zhang ve ark 2020).

Çalışmamızda gingival ve adipoz doku kaynaklı MKH uygulamasının periodontal rejenerasyon üzerine etkisini değerlendirmek için wistar ratlar üzerinde deneysel hayvan modeli oluşturulmuştur. Dişi ratların östrojen döngüsü esnasında fenotip ve gen ekspresyonu üzerinde önemli etkileri bulunan bazı hormon düzeylerinde değişiklikler göstermesi nedeniyle erkek ratlar kullanılmıştır(Caligioni 2009). Deneysel periodontitis oluşturmak amacıyla daha önce literatürde tanımlanan ligatür tekniği tercih edilmiştir. Ratlarda ligatür ile indüklenen periodontal hastalık modeli ilk olarak 1966 yılında Rovin ve ark. tarafından tanımlanmıştır ve şu anda periodontal araştırmalarda en yaygın kullanılan modellerden biri olarak kabul

edilmektedir(Rovin ve ark 1966, de Molon ve ark 2013). Bu yöntemde maksiller veya mandibular molar dişlerin servikal bölgesine yerleştirilen pamuk, ipek veya naylon ligatür ile hem epitel yüzeyinde ülserasyon hem de ligatür üzerinde mikroorganizmaların akümüasyonu ve kolonizasyonu sağlanarak ilgili dişin çevresinde periodontal yıkım oluşması hedeflenmektedir(de Molon ve ark 2018). Bizim çalışmamızda oral retraktörümüzün maksiller molar dişlerde çalışmaya daha uygun olması ve 2. Molar diş çevresinde suture stabilizasyonunun daha güvenli olması nedeniyle maksiller 2. molar diş tercih edilmiştir. Ligatür olarak plak birikiminin daha fazla olması ve oluşturulacak periodontal defektin istenilen boyutlarda olabilmesi amacıyla 3/0 ipek (Doğsan, İstanbul, Türkiye) tercih edilmiştir. De Lima ve ark. tarafından ratlar üzerinde yapılan deneysel periodontitis çalışmasında kemik kaybının önemli bir miktarının 7 günden itibaren başladığı, 7. ila 11. günler arasında en yüksek seviyeye çıktığı ve 14. günden itibaren azaldığı ifade edilmektedir(de Lima ve ark 2000). De Lima ve De molon ve ark. yapmış oldukları çalışmalar göz önüne alınarak 14 günlük sürenin istenilen düzeyde periodontal yıkıma sebep olabileceğine karar verilmiştir. Bizim çalışmamızda deneysel periodontitis oluşturulan gruplardaki doku kaybı miktarları, literatürde tanımlanan ligatür yöntemi ile deneysel periodontitis oluşturulmasını öneren çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Çalışmamız, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu (SÜDAM) Yönergesi'ne ve Russell & Burch tarafından 1959'da "İnsani Deneş Tekniğinin İlkeleri" ne uygun olarak, yapılan güç analizi sonrası uygun olan en az sayıda hayvan ile gerçekleştirilmiştir.

Wang ve ark. tarafından GMKH'lerin in vivo kemik rejenerasyonunu tetiklemesini değerlendirmek için yapılan pilot çalışmada kollajen jel matrisi ile birleştirilen GMKH'ler bağışıklığı baskılanmış farelerin sırt derisi altına yerleştirilmiştir. 6 hafta sonunda implantasyon bölgesinden alınan kesitlerde hem deney grubunda (kollajen jel + GMKH) hem de kontrol grubunda (kollajen jel) iyi mineralize adacıklar oluşmadığını fakat immünohistokimyasal boyamada, kontrol grubu ile kıyaslandığında deney grubunda OPN ve Col I'in yüksek seviyelerde eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde GMKH'lerin osteojenik potansiyele sahip olduğuna ve ileride yapılacak rejeneratif çalışmalar için uygun bir aday olabileceğine karar verilmiştir(Wang ve ark 2011). Pilot çalışmanın devamında yapılan rat periodontal defekt modelinde defekt içerisine kollajen matris

ile birlikte eGFP+GMKH yerleştirilmiş ve 8 hafta sonunda sakrifiye edilerek mikrobt ve histolojik kesit değerlendirmeleri yapılmıştır. H&E boyaması yapılan kesitlerde deney grubunda iyi mineralize trabeküler yapıya sahip yeni oluşmuş kemik dokusu görülürken, kontrol grubunda sınırlı bir kemik rejenerasyonu görülmüştür(Wang ve ark 2011).

Xu ve ark. tarafından oluşturulan periodontal defekt modelinde ise farelerin kuyruk venleri üzerinden sistemik dolaşıma verdikleri GMKH'lerin rejenerasyon potansiyelini değerlendirdikleri çalışmada; 2. ve 3. haftalarda yapılan histolojik ve morfolojik değerlendirmelerde kök hücre uygulanan grupta yeni oluşan kemik dokusu miktarı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken 1. haftada anlamlı bir fark bulunmamıştır. Aynı zamanda immünohistokimyasal boyamalarda, GFP işaretli GMKH ler 1,2 ve 3. haftalarda defekt bölgesinde saptanmıştır(Xu ve ark 2014). Sun ve ark. tarafından hazırlanan deneysel periodontitis modelinde ise sistemik olarak uygulanan GMKH lerin literatürdeki diğer çalışmalara benzer bir şekilde kemik kazancı elde edilmiştir(Sun ve ark 2019).

Li ve ark. tarafından GMKH'lerin tümörojenik etkisini değerlendirmek için yapılan çalışmada ratların sırt derisi altına 2×10^6 GMKH enjekte edilerek ve 6 ay boyunca takip edilmiştir. Bu süre boyunca herhangi bir tümör oluşumu görülmemiştir. Ayrıca GMKH'in diş eti iyileşmesi üzerine etkisini değerlendirmek için mandibular keser dişlerin labial yüzeyinde diş eti defekti oluşturarak bölgeye GMKH uygulanmış ve 4. hafta sonunda yapılan gözlemlerde defekt oluşturulmayan kontrol grubu ile aynı seviyede diş eti oluştuğu görülmüştür. Bu sonuçlar üzerine Li ve ark. tarafında diş eti çekilmelerinin tedavisinde bağ doku greftleri yerine GMKH kullanımının başarılı bir tedavi alternatifi olduğu sonucuna varılmıştır(Li ve ark 2018).

Qiu ve ark. nın GMKH'ler üzerinde yapmış oldukları çalışmada yeni oluşan kemik ve bağ dokusunun kök hücre uygulanan gruplarda 1. haftada histolojik kesitlerde görülmeye başlandığı, sement dokusunun ise 2. haftada görülmeye başlandığı 4. haftada daha düzenli hale geldiği tespit edilmiştir. Hiç bir vakada ankiloz görülmemiştir(Qiu ve ark 2020).

Sanchez ve ark. diş eti çekilmelerinin tedavisinde GMKH'lerin etkisini değerlendirdikleri çalışmada koronale kaydırılan flep dokusu altına kollajen matris üzerinde GMKH uygulamıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda GMKH

uygulanan grupta anlamlı olmamakla birlikte olumlu yönde bir etki görülmüştür(Sanchez ve ark 2022).

Zhang ve ark. tarafından yılında yapılan bir çalışmada diş çekimi sonrası alveol soketinde oluşan boşluğun sert ve yumuşak doku formasyonunun istenilen şekilde gerçekleşmesi amacıyla nano-hidroksiapatit ve gingival fibroblast içerikli 3d hücre baskısı ile anahtar kilit uyumuna sahip bir doku iskelesi üretilmiştir. Yapılan değerlendirmelerde başarılı bir rejenerasyon elde edilmiştir. Bu tarz 3d hücre baskılı sert ve yumuşak doku rejenerasyonları ileride yapılacak rejeneratif tedavilerde önemli bir tedavi alternatifi olarak görülmektedir(Zhang ve ark 2022).

Literatürdeki çalışmalardan yola çıkarak hem sistemik hem de lokal olarak uygulanan GMKH'lerin, periodontitisin neden olduğu periodontal yıkım bölgesine ulaşabileceği ve periodontal doku rejenerasyonunu teşvik edebileceği gösterilmiştir(Xu ve ark 2014, Sun ve ark 2019, Qiu ve ark 2020). Biz çalışmamızda bu çalışmalardan farklı olarak GMKH leri F: KOS yapıya sahip enjekte edilebilir bir doku iskeleti içinde hasar bölgesine lokal olarak uygulandı. Uygulandığında sıvı formda olan doku iskeleti kısa bir süre içerisinde bölgede jelleşerek daha rijit bir yapı oluşturmuştur. Defekt bölgesinde hem fiziksel bir hacim oluşturması hem de içinde hücre barındırması nedeniyle rejenerasyonu olumlu yönde etkileyeceği düşünülmüştür. GMKH grubunda 2. ve 8. hafta mikro-BT ölçümleri değerlendirildiğinde literatürle uyumlu olarak negatif kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca SK grubu ile kıyaslandığında anlamlı olmamakla birlikte daha iyi sonuçlar bulunmuştur. Gingival fibroblast kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin diş eti dokularına ve periodontal ligamente penetrasyonu GFP immünohistokimyasal boyama ile doğrulanmıştır. Histolojik kesitlerde de negatif kontrol grubuna kıyasla daha az ataçman kaybı ve daha sınırlı bir uzun bağlantı epiteli oluşumu görülmektedir. PDL ve bağ dokusu yapısı NK grubuna kıyasla normale daha yakın görünmektedir.

Periodontal rejenerasyonda kullanılan diğer bir hücre türü olan AMKH'ler, anjiyogenez ve normal yara iyileşmesinde yer alan çok sayıda büyüme faktörü salgılamaktadır. AKH'ler yüksek düzeyde epidermal büyüme faktörü, temel fibroblast büyüme faktörü, keratinosit büyüme faktörü, PDGF, insülin benzeri büyüme faktörü, VEGF, TGF-BETA, hepatosit büyüme faktörü (HGF) salgılar ayrıca AKH'lerden

salgılanan büyüme faktörleri, endotelial hücrelerin göçünü ve çoğalmasını indükleyerek, yara yatağının vaskülaritesini. granülasyon dokusu kalınlığını ve kollajen birikimini artırarak yara iyileşmesini desteklemektedir(Kilroy ve ark 2007, Ebrahimian ve ark 2009).

Tobita ve ark. tarafından ratlar üzerinde oluşturulan periodonal defekt modelinde AKH'li veya AKH'siz PRP'nin alveolar kemik rejenerasyonunu indüklediğini ancak sadece AKH/PRP grubunun özellikle 8. haftada sement ve periodontal ligament benzeri yapı dahil olmak üzere diğer periodontal dokuların rejenerasyonunu başarılı bir şekilde gösterilmiştir(Tobita ve ark 2013). Literatür taramalarında AKH'lerle ilgili yapılan diğer hayvan çalışmalarında da benzer sonuçlar rapor edilmiştir(Takedachi ve ark 2013, Venkataiah ve ark 2019). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu bir şekilde AMKH uyguladığımız grupta negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli bir iyileşme olmasına rağmen 8. Hafta sonunda SK grubuyla arasında fark bulunmamıştır. Literatürde AMKH'lerin kullanıldığı klinik çalışmaların neredeyse tamamında kök hücreler yapay olarak oluşturulan kemik içi defekt modelleri içerisine uygulanarak kapalı bir alanda rejenerasyon oluşturulmuştur. Bizim çalışmamızda lokal olarak ağız ortamına açık bir alana enjekte edilen jel içerisindeki kök hücrelerin çevresel etmenlerle bölgeden belirli bir kısmının uzaklaşmış olabileceği buna bağlı olarak tahmin edilen düzeyde rejenerasyon oluşmadığı düşünülmektedir. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin diş eti dokularına ve periodontal ligamente penetrasyonu GFP immünohistokimyasal boyama ile doğrulanmıştır. Histolojik kesitlerde de negatif kontrol grubuna kıyasla daha az ataçman kaybı ve daha sınırlı bir uzun bağlantı epiteli oluşumu görülmektedir. PDL ve bağ dokusu yapısı NK grubuna kıyasla normale daha yakın görünmektedir.

Ratlar üzerinde gerçekleştirilen deneysel periodontitis modellerinde kaybedilen kemik miktarını değerlendirmek için geleneksel radyografiler, kalibre edilmiş histolojik görüntüler ve mikro-BT gibi farklı yöntemler kullanılabilir. Hem hayvan hem de insan örneklerinde Mikro-BT yöntemi ile yapılan morfolojik ölçümlerin doğruluğu, geleneksel yöntemlerle yapılan ölçümlerle kıyaslanarak değerlendirilmiş ve mikro-BT ile yapılan ölçümlerin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği gösterilmiştir(Barbier ve ark 1999). Bizim çalışmamızda dişlerin farklı yüzeylerinde ölçüm yapılabilmesi ayrıca görüntülenen dokular üzerinde bir hasar oluşturulmadığı

için sonrasında yapılacak histolojik analizlerde tekrar kullanılabilmesi gibi avantajları nedeniyle mikro-BT yöntemi tercih edilmiştir.

NK grubunda yapılan 2. hafta Mikro-BT değerlendirmelerinde başta düğümün bulunduğu mb köşe olmak üzere dışı çevreye etkileyen ciddi bir doku yıkımı olduğu görülmüştür. Bununla birlikte 8. haftanın sonunda test gruplarıyla birlikte hiçbir tedavi uygulanmayan negatif kontrol grubunda da önemli bir kemik kazancı olduğu tespit edilmiştir. Histolojik kesitler üzerinde yapılan değerlendirmelerde oluşan dokuların tam bir rejenerasyon göstermediği iyileşmenin büyük oranda uzun bağlantı epiteli ile gerçekleştiği görülmüştür. Bu sonuçlar Caton ve ark. akut defekt modellerinde yaklaşık %50 ila %70 spontan rejenerasyon beklenebileceği bildirdikleri çalışma ile uyumlu bulunmuştur(Caton ve ark 1994).

Sham kontrol grubu üzerinde yapılan mikro-BT değerlendirmelerinde 2. Hafta sonunda negatif kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. 2. haftadan sonraki süreçte SK grubunun rejenerasyon hızı azalmış negatif kontrol grubunda ise spontan rejenerasyon devam ederek 2 grup arasındaki fark azalmıştır. 8 hafta sonuçları değerlendirildiğinde ise SK grubunun sonuçları NK grubuna göre daha iyi olmakla birlikte fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Histolojik kesitler üzerinde yapılan değerlendirmede ise nk grubuna göre lökosit infiltrasyonunun azaldığı fakat uzun bağlantı epitelinin azalmakla birlikte devam ettiği görülmüştür. Jel kıvamında bulunan bu doku iskelesi kapalı bir alan içine uygulanmadığı için uygulandıktan sonra bölgede kalan miktarı ve kaldığı süre tam olarak tespit edilememektedir. Bu da elde edilen sonuçları analiz etmeyi zorlaştırmakla birlikte genel itibarıyla hücresiz bir şekilde uygulanan F: KOS un rejenerasyonu hızlandırdığı ve anlamlı olmamakla birlikte olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar fibroin yapıya sahip doku iskelelerinin rejeneratif tedavilerde kullanımını değerlendiren çalışmalarla genel olarak uyumlu bulunmuştur(Kim ve ark 2005, Geão ve ark 2019, Ding ve ark 2021).

Hasar bölgesine uygulanan F: KOS + kök hücre karışımının miktar ve süre olarak bölgede ne kadar kaldığının tespit edilememesi ayrıca oluşan defekt boyutlarının standart olmaması çalışmanın bir limitasyonudur. Bu durum kök hücrelerin rejeneratif etkisinin net olarak değerlendirmeyi güçleştirdiği düşünülmektedir.

F: KOS hidrojel içerisinde uygulanan gingival fibroblast kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin lökosit infiltrasyonunu azaltabileceği, doku iyileşmesini hızlandırabileceği ve periodontal rejenerasyona olumlu yönde katkı sağlayabilecekleri düşünülmektedir. Elde edilen veriler ışığında F: KOS içerisinde AMKH ve GMKH lerin rejeneratif potansiyellerinin daha iyi anlaşılabilmesi örnek sayısının daha fazla olduğu, doku yapım ve yıkım parametrelerini değerlendirmek için immünohistokimyasal değerlendirmelerinde yer aldığı yeni klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Ligatür ile indüklenen deneysel periodontitis modelinde 14 günlük süreç istenilen düzeyde doku yıkımı için yeterli olduğu görüldü.
2. Mikro-BT üzerinde MSS-AKT mesafesi ölçümü belirlenen noktalardan hassas bir şekilde yapılabildiği tespit edildi.
3. 2. Hafta MSS-AKT ölçümleri değerlendirildiğinde NK grubu nun SK, GMKH ve AMKH gruplarına göre anlamlı düzeyde fazla kemik kaybı olduğu tespit edildi.
4. 8 hafta MSS-AKT ölçümleri değerlendirildiğinde sadece NK grubu ile GMKH grubu arasında anlamlı bir fark vardı. SK grubu ve AMKH grubu değerleri de NK grubuna göre anlamlı olmamakla birlikte daha düşük olduğu tespit edildi.
5. Tüm zaman dilimlerinde de PK grubu değerleri diğer bütün gruplardan anlamlı bir şekilde daha düşük olduğu görüldü.
6. PK grubunda 8. haftaya kadar devam eden süreçte anlamlı olmamakla birlikte MSS-AKT seviyesinde minimal düzeyde bir artış görüldü.
7. NK grubunda 2. Haftadan 8. Haftaya kadar geçen süreçte istatistiksel olarak anlamlı düzeyde spontan bir rejenerasyon olduğu tespit edildi.
8. SK grubu MSS-AKT ölçümleri NK grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte daha düşük olduğu tespit edildi.
9. AMKH grubu MSS-AKT ölçümleri NK grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte daha düşük olduğu tespit edildi.
10. Histolojik kesitler üzerinde yapılan değerlendirmeye göre GMKH grubunda daha belirgin olmakla birlikte kök hücre uygulanan gruplarda kontrol gruplarına kıyasla uzun bağlantı epiteli oluşumun daha az olduğu görüldü.
11. SK grubunda kök hücre uygulanan gruplara kıyasla ataçman kaybı biraz daha fazla olmakla birlikte 8 hafta sonunda epitel ve bağ dokusu görüntüsü NK grubuna göre daha iyi olduğu görüldü.
12. F: KOS hidrojellerin etkinliğin değerlendirmek amacıyla yapılan in vitro çalışmalarda; Alamar Blue testi ve konfokal görüntüleme ile kapsüle edilmiş AMKH'lerin ve GMKH'lerin 14 günlük uygulama süresince canlılığının arttığı ortaya çıkarıldı. Hidrojellerde KOS'un dahil edilmesinin, F ve kontrol gruplarına kıyasla hücre canlılığını arttırdığı da bulundu.

6. KAYNAKLAR

- Adriaens PA, Adriaens LM, 2004. Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. *Periodontol* 2000, 36, 121-45.
- Afanasyev B, Elstner E, Zander A, 2009. A. J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. *Cellular Therapy and Transplantation*, 1, 35-8.
- Apatzidou D, Nile C, Bakopoulou A, Konstantinidis A, Lappin D, 2018. Stem cell-like populations and immunoregulatory molecules in periodontal granulation tissue. *Journal of periodontal research*, 53, 4, 610-21.
- Arora V, Arora P, Munshi A, 2009. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 33, 4, 289-94.
- Ateş, 2016. Let's familiarize ourselves with the stem cell. *Istanbul Bilim University Florence Nightingale Transplantation Journal*, 1, 1, 19-28.
- Aurrekoetxea M, Garcia-Gallastegui P, Irastorza I, Luzuriaga J, Uribe-Etxebarria V, Unda F, Ibarretxe G, 2015. Dental pulp stem cells as a multifaceted tool for bioengineering and the regeneration of craniomaxillofacial tissues. *Frontiers in physiology*, 6, 289.
- Austin P, Brine C, Castle J, Zikakis J, 1981. Chitin: New facets of research. *Science*, 749-53.
- Azuma K, Osaki T, Minami S, Okamoto Y, 2015. Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides. *Journal of functional biomaterials*, 6, 1, 33-49.
- Babür C, Özcan G. OPG/RANK/RANKL AXIS IN PERIODONTOLOGY.
- Baksh D, Song L, Tuan RS, 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine*, 8, 3, 301-16.
- Barbier A, Martel C, de Vernejoul MC, Tirode F, Nys M, Mocaer G, Morieux C, Murakami H, Lacheretz F, 1999. The visualization and evaluation of bone architecture in the rat using three-dimensional X-ray microcomputed tomography. *J Bone Miner Metab*, 17, 1, 37-44.
- Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S, 2000. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol* 2000, 24, 253-69.
- Bartold PM, Xiao Y, Lyngstaadas SP, Paine ML, Snead ML, 2006. Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration. *Periodontol* 2000, 41, 123-35.
- Bassir SH, Wisitrasameewong W, Raanan J, Ghaffarigarakani S, Chung J, Freire M, Andrada LC, Intini G, 2016. Potential for stem cell-based periodontal therapy. *Journal of cellular physiology*, 231, 1, 50-61.
- Bianco P, Robey PG, Saggio I, Riminucci M, 2010. "Mesenchymal" stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. *Human gene therapy*, 21, 9, 1057-66.
- Birkedal-Hansen H, 1993. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *Journal of periodontology*, 64, 474-84.
- Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA, 2008. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater*, 16, 1-9.
- Bousnaki M, Beketova A, Kontonasaki E, 2022. A Review of In Vivo and Clinical Studies Applying Scaffolds and Cell Sheet Technology for Periodontal Ligament Regeneration. *Biomolecules*, 12, 3.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL, 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423, 6937, 337-42.
- Braun T, Zwerina J, 2011. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 13, 4, 235.
- Brink TC, Sudheer S, Janke D, Jagodzinska J, Jung M, Adjaye J, 2008. The origins of human embryonic stem cells: a biological conundrum. *Cells Tissues Organs*, 188, 1-2, 9-22.

- Caffesse RG, Becker W, 1991. Principles and techniques of guided tissue regeneration. *Dent Clin North Am*, 35, 3, 479-94.
- Caligioni CS, 2009. Assessing Reproductive Status/Stages in Mice. *Current Protocols in Neuroscience*, 48, 1, A.4I.1-A.4I.8.
- Cao Y, Wang B, 2009. Biodegradation of silk biomaterials. *International journal of molecular sciences*, 10, 4, 1514-24.
- Caton J, Mota L, Gandini L, Laskaris B, 1994. Non-human primate models for testing the efficacy and safety of periodontal regeneration procedures. *J Periodontol*, 65, 12, 1143-50.
- CATON JG, GREENSTEIN G, 1993. Factors related to periodontal regeneration. *Periodontology* 2000, 1, 1, 9-15.
- Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE, 2014. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000, 64, 1, 57-80.
- Chen FM, Jin Y, 2010. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. *Tissue Eng Part B Rev*, 16, 2, 219-55.
- Chew JRJ, Chuah SJ, Teo KYW, Zhang S, Lai RC, Fu JH, Lim LP, Lim SK, Toh WS, 2019. Mesenchymal stem cell exosomes enhance periodontal ligament cell functions and promote periodontal regeneration. *Acta biomaterialia*, 89, 252-64.
- Chung IH, Yamaza T, Zhao H, Choung PH, Shi S, Chai Y, 2009. Stem cell property of postmigratory cranial neural crest cells and their utility in alveolar bone regeneration and tooth development. *Stem Cells*, 27, 4, 866-77.
- Czyz J, Wiese C, Rolletschek A, Blyszczuk P, Cross M, Wobus AM, 2003. Potential of embryonic and adult stem cells in vitro.
- Darveau RP, 2010. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 7, 481-90.
- de Lima V, Bezerra MM, de Menezes Alencar VB, Vidal FD, da Rocha FA, de Castro Brito GA, de Albuquerque Ribeiro R, 2000. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. *Eur J Oral Sci*, 108, 2, 123-9.
- de Molon RS, de Avila ED, Cirelli JA, 2013. Host responses induced by different animal models of periodontal disease: a literature review. *J Investig Clin Dent*, 4, 4, 211-8.
- de Molon RS, Park CH, Jin Q, Sugai J, Cirelli JA, 2018. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microscopy Research and Technique*, 81, 12, 1412-21.
- Ding G, Liu Y, Wang W, Wei F, Liu D, Fan Z, An Y, Zhang C, Wang S, 2010. Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. *Stem cells*, 28, 10, 1829-38.
- Ding X, Huang Y, Li X, Liu S, Tian F, Niu X, Chu Z, Chen D, Liu H, Fan Y, 2021. Three-dimensional silk fibroin scaffolds incorporated with graphene for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 109, 4, 515-23.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E, 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 4, 315-7.
- Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, Buard V, André M, Cousin B, Gourmelon P, Benderitter M, Casteilla L, Tamarat R, 2009. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29, 4, 503-10.
- El-Sayed KF, Dörfer C, Fändrich F, Gieseler F, Moustafa M, Ungefroren H, 2012. Adult mesenchymal stem cells explored in the dental field. In: *Mesenchymal Stem Cells-Basics and Clinical Application II*. Eds: Springer, p. 89-103.
- Esposito M, Grusovin MG, Papanikolaou N, Coulthard P, Worthington HV, 2009. Enamel matrix derivative (Emdogain®) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. *Cochrane database of systematic reviews*, 4.

- Evans MJ, Kaufman MH, 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 5819, 154-6.
- Fodor WL, 2003. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 102.
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G, 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, 116, 6, 769-78.
- Gao X, Shen Z, Guan M, Huang Q, Chen L, Qin W, Ge X, Chen H, Xiao Y, Lin Z, 2018. Immunomodulatory Role of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth on Periodontal Regeneration. *Tissue Eng Part A*, 24, 17-18, 1341-53.
- Geão C, Costa-Pinto AR, Cunha-Reis C, Ribeiro VP, Vieira S, Oliveira JM, Reis RL, Oliveira AL, 2019. Thermal annealed silk fibroin membranes for periodontal guided tissue regeneration. *J Mater Sci Mater Med*, 30, 2, 27.
- Geckil H, Xu F, Zhang X, Moon S, Demirci U, 2010. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine (Lond)*, 5, 3, 469-84.
- Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ, 1997. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology 2000*, 14, 1, 112-43.
- Graves DT, Cochran D, 2003. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 74, 3, 391-401.
- Graves DT, Jiang Y, Genco C, 2000. Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 13, 3, 227-32.
- Grawish ME, 2018. Gingival-derived mesenchymal stem cells: An endless resource for regenerative dentistry. *World J Stem Cells*, 10, 9, 116-8.
- Greenberg AS, Obin MS, 2006. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 2, 461S-5S.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S, 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 25, 13625-30.
- Hakki SS, Bozkurt B, Hakki EE, Kayis SA, Turac G, Yilmaz I, Karaoz E, 2014. Bone morphogenetic protein-2, -6, and -7 differently regulate osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 102, 1, 119-30.
- Hakki SS, Kayis SA, Hakki EE, Bozkurt SB, Duruksu G, Unal ZS, Turaç G, Karaoz E, 2015. Comparison of mesenchymal stem cells isolated from pulp and periodontal ligament. *Journal of periodontology*, 86, 2, 283-91.
- Hakki SS, Turac G, Bozkurt SB, Kayis SA, Hakki EE, Şahin E, Subaşı C, Karaoz E, 2017. Comparison of different sources of mesenchymal stem cells: palatal versus lipoaspirated adipose tissue. *Cells Tissues Organs*, 204, 5-6, 228-40.
- Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold P, 2014. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Australian dental journal*, 59, 117-30.
- Hernández-Monjaraz B, Santiago-Osorio E, Monroy-García A, Ledesma-Martínez E, Mendoza-Núñez VM, 2018. Mesenchymal stem cells of dental origin for inducing tissue regeneration in periodontitis: a mini-review. *International journal of molecular sciences*, 19, 4, 944.
- Holt SC, Ebersole JL, 2005. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*, 38, 72-122.
- Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ, 1999. Tumor necrosis factor receptor family

- member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7, 3540-5.
- Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH, 2006. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*, 324, 2, 225-36.
- Kao RT, Nares S, Reynolds MA, 2015. Periodontal regeneration—intrabony defects: a systematic review from the AAP regeneration workshop. *Journal of periodontology*, 86, S77-S104.
- Karaöz E, Demircan PC, Sağlam Ö, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G, 2011. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochemistry and Cell Biology*, 136, 4, 455.
- Kawai T, Katagiri W, Osugi M, Sugimura Y, Hibi H, Ueda M, 2015. Secretomes from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells enhance periodontal tissue regeneration. *Cytotherapy*, 17, 4, 369-81.
- Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A, Ludlow JW, Stricker DM, Potiny S, Green P, 2007. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *Journal of cellular physiology*, 212, 3, 702-9.
- Kim D, Lee AE, Xu Q, Zhang Q, Le AD, 2021. Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells: Potential Application in Tissue Engineering and Regenerative Medicine - A Comprehensive Review. *Frontiers in Immunology*, 12, 1282.
- Kim K-H, Jeong L, Park H-N, Shin S-Y, Park W-H, Lee S-C, Kim T-I, Park Y-J, Seol Y-J, Lee Y-M, Ku Y, Rhyu I-C, Han S-B, Chung C-P, 2005. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. *Journal of Biotechnology*, 120, 3, 327-39.
- Kim U-J, Park J, Li C, Jin H-J, Valluzzi R, Kaplan DL, 2004. Structure and properties of silk hydrogels. *Biomacromolecules*, 5, 3, 786-92.
- Kim Y, Ko H, Kwon IK, Shin K, 2016. Extracellular Matrix Revisited: Roles in Tissue Engineering. *Int Neurourol J*, 20, Suppl 1, S23-9.
- Kolios G, Moodley Y, 2013. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 85, 1, 3-10.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ, 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93, 2, 165-76.
- Lerner U, 2006. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *Journal of dental research*, 85, 7, 596-607.
- Lerner UH, 2006. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*, 85, 7, 596-607.
- Li J, Xu S-q, Zhang K, Zhang W-j, Liu H-l, Xu Z, Li H, Lou J-n, Ge L-h, Xu B-h, 2018. Treatment of gingival defects with gingival mesenchymal stem cells derived from human fetal gingival tissue in a rat model. *Stem Cell Research & Therapy*, 9, 1, 27.
- Li Y, Zhao S, Nan X, Wei H, Shi J, Li A, Gou J, 2016. Repair of human periodontal bone defects by autologous grafting stem cells derived from inflammatory dental pulp tissues. *Stem cell research & therapy*, 7, 1, 1-9.
- Lindhe J, Karring T, Lang NP, 2003. *Clinical periodontology and implant dentistry*, Blackwell, p.
- Lindhe J, Rylander H, 1975. Experimental gingivitis in young dogs. *Scand J Dent Res*, 83, 6, 314-26.

- Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM, Gronthos S, Shi S, Wang S, 2008. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells*, 26, 4, 1065-73.
- Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF, 2005. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol*, 32 Suppl 6, 57-71.
- Mahanonda R, Pichyangkul S, 2007. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000, 43, 41-55.
- Marei MK, El Backly RM, 2018. Dental Mesenchymal Stem Cell-Based Translational Regenerative Dentistry: From Artificial to Biological Replacement. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 49.
- Marks P, Gottlieb S, 2018. Balancing Safety and Innovation for Cell-Based Regenerative Medicine. *N Engl J Med*, 378, 10, 954-9.
- Matos Cruz R, Bascones-Martínez A, 2011. Tratamiento periodontal quirúrgico: Revisión. Conceptos. Consideraciones. Procedimientos. Técnicas. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 23, 3, 155-70.
- Mattar P, Bieback K, 2015. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. *Front Immunol*, 6, 560.
- MATUR İ, SOLMAZ S, 2011. Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20, 3, 168-86.
- McClain PK, Schallhorn RG, 2000. Focus on furcation defects--guided tissue regeneration in combination with bone grafting. *Periodontol* 2000, 22, 190-212.
- Minteer D, Marra KG, Rubin JP, 2013. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Biology and Potential Applications. In: *Mesenchymal Stem Cells - Basics and Clinical Application* I. Eds: Weyand B, Dominici M, Hass R, Jacobs R, Kasper C. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 59-71.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S, 2003. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 10, 5807-12.
- Mizuno H, Tobita M, Uysal AC, 2012. Concise review: adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem cells*, 30, 5, 804-10.
- Mohr A, Zwacka R, 2018. The future of mesenchymal stem cell-based therapeutic approaches for cancer - From cells to ghosts. *Cancer Lett*, 414, 239-49.
- Murphy KG, Gunsolley JC, 2003. Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. *Ann Periodontol*, 8, 1, 266-302.
- Nadig RR, 2009. Stem cell therapy - Hype or hope? A review. *J Conserv Dent*, 12, 4, 131-8.
- Narayanan AS, Bartold PM, 1996. Biochemistry of periodontal connective tissues and their regeneration: a current perspective. *Connective tissue research*, 34, 3, 191-201.
- Needleman I, Worthington HV, Giedrys-Leeper E, Tucker R, 2006. Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2.
- Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA, 2011. *Carranza's clinical periodontology*, Elsevier health sciences, p.
- Novak M, Newman M, Takei H, Klokkevold P, 2006. *Carranza's clinical periodontology*. Classification of diseases and conditions affecting the periodontium, 100-9.
- Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ, 2009. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J*, 54 Suppl 1, S2-10.
- Page RC, Schroeder HE, 1976. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 34, 3, 235-49.

- Park JH, Lee HW, Chae DK, Oh W, Yun JD, Deng Y, Yeum JH, 2009. Electrospinning and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan oligosaccharide/clay nanocomposite nanofibers in aqueous solutions. *Colloid and Polymer Science*, 287, 8, 943-50.
- Pellá MC, Lima-Tenório MK, Tenório-Neto ET, Guilherme MR, Muniz EC, Rubira AF, 2018. Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 196, 233-45.
- Pera MF, Reubinoff B, Trounson A, 2000. Human embryonic stem cells. *J Cell Sci*, 113 (Pt 1), 5-10.
- Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW, 2005. Periodontal diseases. *The lancet*, 366, 9499, 1809-20.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR, 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 5411, 143-7.
- Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjö UM, 2006. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000*, 41, 30-47.
- Pritchard EM, Valentin T, Panilaitis B, Omenetto F, Kaplan DL, 2013. Antibiotic-releasing silk biomaterials for infection prevention and treatment. *Advanced functional materials*, 23, 7, 854-61.
- Qiu J, Wang X, Zhou H, Zhang C, Wang Y, Huang J, Liu M, Yang P, Song A, 2020. Enhancement of periodontal tissue regeneration by conditioned media from gingiva-derived or periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells: a comparative study in rats. *Stem Cell Research & Therapy*, 11, 1, 1-15.
- Qiu J, Wang X, Zhou H, Zhang C, Wang Y, Huang J, Liu M, Yang P, Song A, 2020. Enhancement of periodontal tissue regeneration by conditioned media from gingiva-derived or periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells: a comparative study in rats. *Stem Cell Research & Therapy*, 11, 1, 42.
- Ramalho-Santos M, Willenbring H, 2007. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell*, 1, 1, 35-8.
- Ramseier CA, Rasperini G, Batia S, Giannobile WV, 2012. Advanced reconstructive technologies for periodontal tissue repair. *Periodontol 2000*, 59, 1, 185-202.
- Rockwood DN, Preda RC, Yücel T, Wang X, Lovett ML, Kaplan DL, 2011. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nature protocols*, 6, 10, 1612-31.
- Rovin S, Costich ER, Gordon HA, 1966. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodontal Res*, 1, 3, 193-204.
- Salkın H, Gönen ZB, Ergen E, Bahar D, Çetin M, 2019. Effects of TGF- β 1 Overexpression on Biological Characteristics of Human Dental Pulp-derived Mesenchymal Stromal Cells. *Int J Stem Cells*, 12, 1, 170-82.
- Salvi GE, Mischler DC, Schmidlin K, Matuliene G, Pjetursson BE, Brägger U, Lang NP, 2014. Risk factors associated with the longevity of multi-rooted teeth. Long-term outcomes after active and supportive periodontal therapy. *Journal of clinical periodontology*, 41, 7, 701-7.
- Sanchez N, Vignoletti F, Sanz-Martin I, Coca A, Nuñez J, Maldonado E, Sanz-Esporrin J, Hernando-Pradies I, Santamaría S, Herrera D, Garcia-Sanz JA, Sanz M, 2022. Cell Therapy Based on Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells Seeded in a Xenogeneic Collagen Matrix for Root Coverage of RT1 Gingival Lesions: An In Vivo Experimental Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 6, 3248.
- Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H, 2008. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*, 180, 4, 2581-7.

- Sculean A, Nikolidakis D, Schwarz F, 2008. Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials—biological foundation and preclinical evidence: a systematic review. *Journal of clinical periodontology*, 35, 106-16.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S, 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364, 9429, 149-55.
- Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuri T, Akiyama K, Lee JS, Shi S, 2008. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis*, 14, 5, 428-34.
- Seymour GJ, 1991. Importance of the host response in the periodontium. *Journal of clinical periodontology*, 18, 6, 421-6.
- Seymour GJ, Gemmell E, 2001. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontologica Scandinavica*, 59, 3, 167-73.
- Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K, Inoue T, 2003. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microsc Res Tech*, 60, 5, 491-502.
- Šimoliūnas E, Ivanauskienė I, Bagdzevičiūtė L, Rinkūnaitė I, Alksnė M, Baltrikienė D, 2021. Surface stiffness depended gingival mesenchymal stem cell sensitivity to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 169, 62-73.
- Sun J, Zheng Q, 2009. Experimental study on self-assembly of KLD-12 peptide hydrogel and 3-D culture of MSC encapsulated within hydrogel in vitro. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 29, 4, 512-6.
- Sun W, Wang Z, Xu Q, Sun H, Liu X, Yang J, Hong R, 2019. The treatment of systematically transplanted gingival mesenchymal stem cells in periodontitis in mice. *Exp Ther Med*, 17, 3, 2199-205.
- Takahashi K, Yamanaka S, 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*, 126, 4, 663-76.
- Takedachi M, Sawada K, Yamamoto S, Ozasa M, Shimabukuro Y, Kitamura M, Murakami S, 2013. Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived stem cells. *Journal of Oral Biosciences*, 55, 3, 137-42.
- Tassi S, Sergio N, Misawa M, Villar C, 2017. Efficacy of stem cells on periodontal regeneration: systematic review of pre-clinical studies. *Journal of Periodontal Research*, 52, 5, 793-812.
- Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM, 2002. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol*, 20, 795-823.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM, 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 5391, 1145-7.
- Tobita M, Uysal CA, Guo X, Hyakusoku H, Mizuno H, 2013. Periodontal tissue regeneration by combined implantation of adipose tissue-derived stem cells and platelet-rich plasma in a canine model. *Cytotherapy*, 15, 12, 1517-26.
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD, 2002. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 105, 1, 93-8.
- Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, Barhanpurkar AP, Pote ST, Jhaveri HM, Mishra GC, Wani MR, 2010. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochem Biophys Res Commun*, 393, 3, 377-83.
- Van Dyke TE, Serhan CN, 2003. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res*, 82, 2, 82-90.
- Venkataiah VS, Handa K, Njuguna MM, Hasegawa T, Maruyama K, Nemoto E, Yamada S, Sugawara S, Lu L, Takedachi M, Murakami S, Okura H, Matsuyama A, Saito M, 2019.

- Periodontal Regeneration by Allogeneic Transplantation of Adipose Tissue Derived Multi-Lineage Progenitor Stem Cells in vivo. *Scientific Reports*, 9, 1, 921.
- Villar CC, Cochran DL, 2010. Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration. *Dental Clinics*, 54, 1, 73-92.
- Wang F, Yu M, Yan X, Wen Y, Zeng Q, Yue W, Yang P, Pei X, 2011. Gingiva-derived mesenchymal stem cell-mediated therapeutic approach for bone tissue regeneration. *Stem cells and development*, 20, 12, 2093-102.
- Weissman IL, 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 100, 1, 157-68.
- Xu QC, Wang ZG, Ji QX, Yu XB, Xu XY, Yuan CQ, Deng J, Yang PS, 2014. Systemically transplanted human gingiva-derived mesenchymal stem cells contributing to bone tissue regeneration. *Int J Clin Exp Pathol*, 7, 8, 4922-9.
- Xu X, Chen C, Akiyama K, Chai Y, Le AD, Wang Z, Shi S, 2013. Gingivae contain neural-crest- and mesoderm-derived mesenchymal stem cells. *J Dent Res*, 92, 9, 825-32.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T, 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7, 3597-602.
- Yucel T, Lovett ML, Kaplan DL, 2014. Silk-based biomaterials for sustained drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 190, 381-97.
- Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z, 2019. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*, 10, 1, 68.
- Zhang J, Liu Y, Chen Y, Yuan L, Liu H, Wang J, Liu Q, Zhang Y, 2020. Adipose-Derived Stem Cells: Current Applications and Future Directions in the Regeneration of Multiple Tissues. *Stem Cells International*, 2020, 8810813.
- Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, Le AD, 2009. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *The Journal of Immunology*, 183, 12, 7787-98.
- Zhang S, Li Q, Liu P, Lin C, Tang Z, Wang HL, 2022. Three-Dimensional Cell Printed Lock-Key Structure for Oral Soft and Hard Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part A*, 28, 1-2, 13-26.
- Zhao J, Faure L, Adameyko I, Sharpe PT, 2021. Stem cell contributions to cementoblast differentiation in healthy periodontal ligament and periodontitis. *Stem Cells*, 39, 1, 92-102.
- Zohar R, Tenenbaum HC, 2005. How predictable are periodontal regenerative procedures? *J Can Dent Assoc*, 71, 9, 675-80.
- Zuk PA, 2010. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Molecular biology of the cell*, 21, 11, 1783-7.