

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENTAL KÖK HÜCRELERİN KEMİĞE FARKLILAŞMASINDA MİKROBİYOTA
ÜRÜNLERİNİN ROLÜ

Muhammet Habip Güçlü

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Kamil Can Akçalı

Nisan

2023

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.



Muhammet Habip Güçlü

imza

ONAY

Prof. Dr. Kamil Can Akçalı danışmanlığında Muhammet Habip Güçlü tarafından hazırlanan bu çalışma 17/04/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Zehranur Yüksekdağ.

İmza:

Üye: Prof. Dr. Kamil Can Akçalı

İmza:

Üye: Prof. Dr. Hilal Özdağ Sevgili

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Demet Cansaran Duman

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Dental Kök Hücrelerin Kemiğe Farklılaşmasında Mikrobiyota Ürünlerinin Rolü

Muhammet Habip Güçlü

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Kamil Can Akçalı

Dişin süt dişleri veya yetişkin diş pulpasından, periodontal veya diş folikülü gibi farklı bölümlerinden kök hücre elde etmek mümkündür. Elde edilen bu kök hücrelerin osteojenik farklılaştırıldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada klinik sonuçları araştırılmaya devam eden postbiyotiklerin dental pulpa kök hücreden kemiğe farklılaşması açısından kullanılabilirliği araştırıldı. Kök hücreler, vücutta hasarlı ve hastalıklı hücrelerin yerine geçerek organizma homeostasisini sağlayan önemli bir umut vadeden rejeneratif tedavi yöntemidir. Ancak kök hücre izolasyonu, farklılaşma ve maliyet, bu umut vadeden yöntemin yaygınlaşmasını engellemektedir. Farklı kaynaklardan elde edilmiş postbiyotiklerin varlığında dental pulpa kök hücrelerinin kemiğe farklılaşması araştırıldı ve kontrol grupları ile karşılaştırıldı. Elde edilen verilere göre farklılaşmanın gerçekleşmediği, deney grupları ile kontrol grupları arasında fark olmadığı gözlenmiştir.

2023, 56 sayfa

Anahtar kelimeler: dental kök hücre, kemik hücre farklılaşması, microbiota, postbiyotik

ABSTRACT

MSc Thesis

Role of microbiota products in differentiation of dental stem cells to bone

Muhammet Habip Güçlü

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Kamil Can Akçalı

It is possible to obtain stem cells from different parts of the tooth such as deciduous or adult dental pulp, periodontal or dental follicle. These stem cells have been shown to be osteogenically differentiated. In this study, the usability of postbiotics, whose clinical results are still being investigated, in terms of dental pulp stem cell to bone differentiation was investigated. Stem cells are an important promising regenerative therapy method that provides hemostasis by replacing damaged and diseased cells in the body. However, stem cell isolation, differentiation and cost prevent the widespread use of this promising method. Differentiation of dental pulp stem cells into bone in the presence of postbiotics from different sources was investigated and compared with control groups. According to the data obtained, it was observed that osteogenic differentiation did not occur and there was no difference between the groups.

2023, 56 pages

Keywords: dental stem cell, osteocyte differentiation, microbiota, postbiotic

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın sonuçlanmasını sağlayan saygı değer tez danışmanım Prof. Dr. Kamil Can Akçalı'ya; bu süreçteki bana destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Fadime Kıran'a, Prof. Dr. Hilal Özdağ Sevgili'ye, Prof. Dr. Zehranur Yüksekdağ'a, Doç. Dr. Yusuf Olğar'a, Doç. Dr. Erkan Tuncay'a; Emine Omer Oglou'na, Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Farmabiyotik Teknoloji Laboratuvarı ekibi arkadaşlarıma ve sevgili eşim Ümran Çıtak Güçlü'ye ile oğlum Mehmet Çağan Güçlü'ye teşekkür ederim.

Muhammet Habip Güçlü

Ankara, Nisan 2023



İÇİNDEKİLER

<u>ETİK BEYAN</u>	<u>i</u>
<u>ONAY</u>	<u>ii</u>
<u>ÖZET</u>	<u>iii</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>iv</u>
<u>TEŞEKKÜR</u>	<u>v</u>
<u>ŞEKİLLER DİZİNİ</u>	<u>ix</u>
<u>ÇİZELGELER DİZİNİ</u>	<u>x</u>
<u>SİMGELER DİZİNİ</u>	<u>xi</u>
<u>1. GİRİŞ</u>	<u>1</u>
<u>2. GENEL BİLGİLER</u>	<u>3</u>
2.1. KÖK HÜCRELER	3
2.2. KÖK HÜCRELERİN SINIFLAMASI	5
2.2.1. KÖK HÜCRELERİN FARKLILAŞMA POTANSİYELLERİ GÖRE SINIFLAMA	5
2.2.1.1. Totipotent	5
2.2.1.2. Pluripotent	6
2.2.1.3. Multipotent (Erişkin tip kök hücre)	6
2.2.1.4. Oligopotent	6
2.2.1.5. Unipotent	7
2.2.2. KÖK HÜCRELERİN KAYNAKLARINA GÖRE SINIFLAMA	7
2.2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler (EKH)	7

2.2.2.2. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPKH).....	8
2.2.2.3. Yetişkin Kök Hücreler (YKH).....	8
2.2.2.3.1. Hematopoetik Kök Hücreler (HKH).....	9
2.2.2.3.2. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH).....	9
2.2.2.3.3. Dokularda Yerleşik Kök Hücreler (DYKH).....	9
2.2.3. DENTAL KÖK HÜCRELER (DKH).....	9
2.2.3.1. Dental Pulpa Kök Hücreler (DPKH).....	10
2.3. HÜCRE BÜYÜTME	11
2.4. MİKROBİYOTA	12
2.4.1. PROBİYOTİKLER VE PREBİYOTİKLER.....	13
2.4.2. POSTBİYOTİKLER	14
2.4.2.1. Süpernatantlar	14
2.4.2.2. Ekzopolisakkaritler	15
2.4.2.3. Enzimler.....	15
2.4.2.4. Hücre duvarı parçacıkları.....	16
2.4.2.5. Kısa Zincirli Yağ Asitleri	16
2.4.2.6. Bakteriyal lizatlar.....	17
2.4.2.7. Bağırsak mikrobiyota metabolitleri	17
<u>3. GEREKÇE VE AMAC</u>	<u>19</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	<u>21</u>
4.1. DENTAL PULPA KÖK HÜCRE İZOLASYONU VE PROLİFERASYONU	21
4.2. MİKROBİYOTA ÜRÜNLERİNİN HAZIRLANMASI	21

4.3. POSTBİYOTİKLERİN SİTOTOKSİSİTE BELİRLEME ÇALIŞMALARI	22
4.4. DENTAL PULPA KÖK HÜCRELERİN FARKLILAŞMANIN MİKROBİYOTA ÜRÜNLERİ VARLIĞINDA İNDÜKLENMESİ VE KONTROL GRUBU	23
4.5. BOYAMA TESTİ.....	23
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>25</u>
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>34</u>
6.1. TARTIŞMA	34
6.2. SONUÇ.....	36
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>38</u>
<u>EKLER</u>	<u>43</u>
EK 1 ETİK KURUL ONAYI.....	43
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>44</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kök hücrelerin sınıflaması (12).....	7
Şekil 2.2. Dental Kök Hücrelerin Kaynak aldığı bölümler (21).....	10
Şekil 2.3. Prebiyotik, probiyotik ve postbiyotik arasındaki ilişki	13
Şekil 2.4. Belirli postbiyotiklerin konakçıdaki etkileri (39,40).....	14
Şekil 5.1. MTT analiz görseli	25



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 5.1. MTT Sonuçları	26
Çizelge 5.2. 7. gün sonuçları	28
Çizelge 5.3. 14. gün sonuçları	30
Çizelge 5.4. 21. gün sonuçları	32



SİMGELER DİZİNİ

ABMSC	Alveolar kemik kaynaklı kök hücreler
DFPC	Dental apikal follikül prekürsör kök hücreleri
DKH	Dental kök hücreler
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbecco'nun Modifiye edilmiş Eagle besiyeri)
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPKH	Dental (diş) pulpa kök hücreleri
DYKH	Dokularda yerleşik kök hücre
EKH	Embriyonik kök hücre
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FBS	Fetal sığır serumu
GFSC	Gingivada bulunan mezenkimal kök hücreleri
HKH	Hematopoetik kök hücre
iPKH	İndüklenmiş pluripotent kök hücre
MKH	Mezenkimal kök hücre
NDPSC	Natal dental pulpa kök hücreleri
PDLSC	Periodontal ligament kök hücreleri
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute (Roswell Park Memorial Enstitüsü)
SCAP	Dental apikal papilla kök hücreleri
SHED	Dökülen süt dişlerinde bulunan kök hücreler
YKH	Yetişkin kök hücre
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Dişin, süt dişi veya yetişkin diş pulpa, periodontal veya diş folikülü gibi farklı bölümlerinden kök hücre elde etmek mümkündür. Ayrıca 2000 yılından beri diş pulpası kaynaklı kök hücrelerin kemiğe farklılaşabildiği bilinmektedir. Diş pulpasından elde edilen mezenkimal kök hücrelerde osteojenik farklılaşma, L-glutamin, gliserol fosfat disodyum hidrat tuzu, L-askorbik asit, deksametazon ve fetal sığır serumu (FBS) ile kültürlenmiş kök hücrelerde alkalik fosfat aktivitesinin artması ve kalsiyum yönünden zengin bir matris birikmesi ile gerçekleşir (1). Ancak dental pulpa kök hücrelerin (DPKH) kemik oluşumunu sağladığı gösterilmiş olsa da laboratuvar ortamında diş kök hücre izolasyonu ve proliferasyonu pahalı, zaman alıcı olup kontaminasyon açısından ise risklidir (2).

Hücre kültürü ortamı olan besiyerleri, hücrelerin çoğalması ve canlılığı için esastır. Bu ortamın en önemli bileşenlerinden biri olan serumlar büyüme faktörü, vitamin, mineral, hormon gibi hücre büyümesi ve çoğalması gibi gerekli bileşenleri içermektedir. Serum olarak genelde sığır serumu kullanılır. Memeli hücrelerinin kültürlendiği bu ortamlardaki en ciddi sorunlardan birisi FBS'in görece diğer bileşenlere göre fazla kullanılmasıdır. 1 litre FBS üretimi için yaklaşık 2-3 sığır fetüsüne ihtiyaç olduğu düşünüldüğünde Dünya'da yaklaşık 2.000.000 sığır fetüsünün FBS üretimi için kullanıldığı tahmin edilmektedir. Ayrıca FBS üretimi için kullanılan sığırların mevsimsel ve coğrafik olarak değişmesi, FBS içeriğini de değiştirmekte ve standart bir üretimin önüne geçmektedir. Bununla birlikte otolog insan serumu ile karşılaştırıldığında mezenkimal kök hücrelerde (MKH) daha az kararlı hücre profillerine indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca FBS başta olmak üzere kullanılan bileşenlerin her geçen gün artan maliyetleri ve son kullanıcılara yansıtılan ücretler, bu sorunların başında gelmektedir. Ancak önerilen kaynakların hiçbiri hücre büyümesine FBS kadar etki edememiştir. Bu sebeple hücre proliferasyonunda kullanılması gereken en az düzey FBS oranı da birçok çalışmada belirlenmeye çalışılmıştır. Söz konusu bu bilimsel sorunlar ile tedarik sorunları nedeniyle alternatif arayışların hızla arttığı bilinmektedir (3,4).

Postbiyotikler ise mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri sonucu salınan veya üretilen yararlı mikrobiyota ürünleri olarak tanımlanabilir. Örneğin *Lactobacillus* spp. türünden elde edilmiş probiyotikler bazı gastrointestinal bozuklukların tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca son çalışmalarda probiyotikler ile postbiyotiklerin patojenlerin büyümesini engellediği ve

biyofilm oluşumunu azaltarak hastalıkları önlediği de gösterilmiştir. Postbiyotik araçlar olarak da bilinen probiyotikler, kök hücre alanında olduğu gibi umut vadeden bir araştırma konusudur (5).

Bu araştırmada postbiyotiklerin dental kök hücreden kemiğe farklılaşması sürecindeki kullanılabilirliği araştırılmıştır. Önemli bir umut vadeden rejeneratif tedavi yöntemi olan kök hücrelerin izolasyonu, farklılaşması ve maliyeti gibi problemleri bulunmaktadır. DPKH'ler ve arı bağırsağı, *Spalax* türü bağırsağı, anne ve inek sütü gibi farklı kaynaklardan elde edilmiş 4 farklı postbiyotik varlığında kemik hücrelerine farklılaşma durumu araştırılmış ve kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. KÖK HÜCRELER

İnsanlığın ilk zamanlarından bugüne kadarki hastalıklar ile mücadelesi sonucunda pek çok uygulama hayata geçmiştir. Tıp alanında son yıllardaki dikkat çekici uygulamalardan biri de kök hücre çalışmalarıdır. Yapılan çalışmalar ile kök hücre alanı her geçen gün genişlemekte olup endikasyon, süreç ve maliyetleri azaltma gibi hedeflerle uygulamalar çeşitlenmektedir (6).

Kök hücreler, sınırsız çoğalabilen, kendilerini yenileyen, kendilerinden başka hücelere farklılaşarak doku onarabilen hücre tipleridir. Bol miktarda olmaları ve kolay elde edilebilir olmaları ile otolog ve allojenik nakledilebilmeleri nedeniyle tedavi yöntemi olarak umut vadetmektedirler (7).

1800'lü yılların ilk yarısında hücre tanımının yapılmasının ardından hücre alanında birçok dikkat çekici çalışma yapılmıştır. Ancak 1958 yılında Dr. Min Chueh Chang tarafından tavşanlar üzerinde in vitro fertilizasyonun gösterilmesi ve 1978 yılında ise bu yöntem ile Louise Brown adındaki ilk tüp bebeğin doğması olayları kök hücre alanı için çığır açan çalışmaların başında gelir. Daha sonra 1981 yılında Evans, Kaufman ve Martin tarafından blastosistlerin iç hücre tabakasından elde edilen fare embriyonik hücreleri gösterilmiştir. Bu çalışmanın ardından ise 1998 yılında James Thomson ve ekibi in vitro fertilizasyon laboratuvarında beş adet insan embriyonik kök hücre serisi elde ettiklerini ve bu hücrelerin farklı hücre tiplerine dönüşebildiklerini raporlamışlardır (6,8).

Kök hücreleri genel olarak diğer hücre tipinden ayıran özellikler, kendilerini yenileyebilmeleri ve belirli koşullar altında farklı hücre tiplerine dönüşebilmelidir. Özdeş hücre kümeleri oluşturabilmek için mitozla süresiz ve çok hızlı bölünebilen kök hücrelerin farklılaşabilme yetenekleri bilim dünyası açısından daha dikkat çekici olmuştur. Belirli koşullarda hücresel ve moleküler etmenler ile uyarılarak farklı tipteki hücelere farklılaşma, kök hücre araştırmalarının odak noktasıdır. Laboratuvarında uyarılan kök hücreler; deri, beyin, osteoblast, karaciğer, insülin için pankreas beta, damar çeperleri için düz kas gibi çok sayıda hücre tipine farklılaşabilmektedir (6,8).

Farklılaşma, hücrelerin belli bir doğrultuda geçirdikleri bir dizi değişim olarak tanımlanabilir. Bu değişim öncesinde kök hücreler doğal olarak çoğalma eğilimindedirler ve sürekli bölünerek kendilerini yenilerler. Sınırsız çoğalabilen ve kendilerini yenileyen kök hücrelerin bölünmesi simetrik ve asimetrik olarak gerçekleşir.

Simetrik hücre bölünmesinde tamamen birbirinin aynı iki farklı hücre meydana gelir. Böylece hücre bütünlüğü iki eşit parçaya bölünür. Oluşan yavru 2 hücrenin birbiri ile ve kaynak aldıkları hücre ile arasında herhangi bir anlamlı fark oluşmaz. Asimetrik hücre bölünmesinde ise oluşan yavru 2 hücreden bir tanesi kaynak aldığı ana hücrenin özelliklerini taşırken diğeri öncü (progenitör) hücre özelliklerini taşır. Farklılaşmanın temelindeki bu öncü hücreler, birkaç mitoz bölünme evresinden sonra son farklılaşma sürecini tamamlayarak başka bir hücre dönüşmüş olurlar.

Kök hücrelerin bulunduğu ortamda kendi aralarındaki ve diğer farklılaşmış hücreler ile ilişkileri, ekstraselüler matriks bileşenleri, büyüme faktörleri, sitokinler, adezyon molekülleri ile pH, metabolit, iyon gibi çevresel faktörler; asimetrik hücre bölünmesi ve farklılaşma üzerinde etkilidir. Niş (niche) olarak adlandırılan bu etmenler, Kök hücre ile etkileşime giren ve kök hücrenin sistemlerini düzenleyen hücresel ve moleküler düzeydeki tüm faktörlerdir. Bu sebeple sadece bazı bileşenlerden oluşan fiziksel bir alan değil ayrıca kendi aralarındaki iletişim ve diğer dış sinyaller ile oluşan etkileşim olarak da tanımlanmaktadır.

Söz konusu niş, kök hücrelerin asimetrik bölünme geçirerek farklılaşmaya yönlendirirken sadece simetrik bölünme geçirmelerini ve farklılaşmadan çoğalmalarını da sağlayabilir. Sadece simetrik bölünen kök hücreler, farklılaşmadan sürekli kendilerini yenileyerek hücreler arası önemli sinyaller alabilir ve bu sinyalleri kullanmak iletmek için kullanılabilirler. Farklılaşma sürecinde değişimi uyaran faktörlerin ortadan kalkması durumlarında ise birçok hücre tekrar simetrik bölünme döngüsüne girebilir.

Dokularda bulunan kök hücrelerin niş olarak adlandırılan ortamlarda bulunduğu fikri hematopoetik öncüler (progenitörler) üzerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Daha sonra Drosophila yumurtalığında yapılan çalışmalarda kök hücrelerin dış faktörlerden ciddi oranda etkilendiği belirtilmiştir. Bu çalışmalar kök hücre araştırmalarının odağında yer alan farklılaşma yeteneklerinin in vitro koşullarda çalışılmasını sağlamıştır. Bu sayede

laboratuvarlarda kök hücrelerin belli bir doğrultuda uyarılması için gerekli olan niş ortamı, kimyasal ve fiziksel olarak sağlanabilmektedir. Örneğin yetişkin kök hücrelerden biri olan dental pulpa kaynaklı kök hücrelerin kemik hücrelerine farklılaştırılması gibi yönlendirilmiş farklılaşmalar gerçekleştirilebilmektedir (6,9).

2.2. KÖK HÜCRELERİN SINIFLANMASI

Kök hücreler için günümüzde birçok farklı sınıflama mevcuttur. Ancak genel hatları ile kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri ve elde edildikleri kaynaklara göre yapılan tanımlamalar en sık karşılaşılan sınıflamalardır (Şekil 2.1.).

2.2.1. KÖK HÜCRELERİN FARKLIŞMA POTANSİYELLERİ GÖRE SINIFLAMA

Kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri veya farklılaşma yetenekleri hücre tiplerine göre farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar kök hücrelerin farklılaşma gen ekspresyonları veya aktiviteleri ile değişmektedir. En yüksek potansiyele sahip olandan en aza olacak şekilde totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak sınıflandırılırlar.

2.2.1.1. Totipotent

Totipotent, tek bir hücreden somatik hücreler, plasental ve fetal membran hücreleri ile tüm organizmayı bütünüyle oluşturabilme potansiyelidir. Totipotent hücrelere en iyi örnek sperm ve yumurtanın birleşmesinden meydana gelen zigotun oluşmasından sonraki ilk dört veya beş gün içerisinde meydana gelen blastomerlerdir. Bu hücreler plasental sitotrofoblast ve sinsiyoitrofoblasta ek olarak endoderm, ektoderm ve mezoderm tabakasından herhangi bir hücreye farklılaşabilme potansiyeline sahiptirler.

Vücuttaki tüm hücrelere farklılaşabilme potansiyeline sahip totipotent hücreleri düzenleyen mekanizmalar henüz tam olarak bilinmese de olası gen aktivasyonu mekanizmaları, RNA düzenlemesi, miRNA ve RNA bağlayıcı proteinler arasındaki etkileşim veya CAF-1'in kromatin birleştirme aktivitesinin aşağı regülasyonu olduğu belirtilmektedir (10).

2.2.1.2. Pluripotent

Embriyonik dönemden 4 veya 5 gün sonra meydana gelen blastosist evresine ait iç tabakada kalan hücreler embriyoyu oluştururken dış tabakada kalan hücreler trofoektoderme dönüşüp plasentayı oluşturur. Blastosistin iç tabakasında kalan hücreler totipotent hücreler gibi vücuttaki tüm hücrelere farklılaşma potansiyeline sahip olmalarına karşın organizmayı tümüyle oluşturabilme potansiyeline sahip değildirler. Tüm vücut hücrelerinin köken aldığı mezoderm, endoderm ve ekdoderm hücrelerine dönüşebilen pluripotent hücrelerin, uygun şartlarda yaklaşık 250 farklı hücre tipine farklılaşabildikleri bilinmektedir.

Pluripotent kök hücrelerin immün yetmezliği olan fareye enjekte edildiğinde teratom oluşturma yetenekleri ve blastosist evresinde enjekte edilen farenin germ hattına kimera oluşturma yetenekleri vardır. Ayrıca karakteristik morfolojisi, transkripsiyon faktörlerinin ifadesi ve X kromozomunun reaktivasyonu gibi özellikleri de vardır. Embiyonik kök hücreler ile indüklenmiş pluripotent kök hücreler bu grupta yer almaktadır (10).

Embryonik kök hücreler ve ips hücreleri bu grupta bulunmaktadır.

2.2.1.3. Multipotent (Erişkin tip kök hücre)

Erken embriyonik dönemden sonraki evrelerdeki kök hücreler yani yetişkin kök hücrelerin sadece belli hücre tiplerine dönüşebilme potansiyelleri vardır. Örneğin kemik iliğinde bulunan kök hücreler, beyaz ve kırmızı kan hücreleri ile pıhtılaşmayı sağlayan trombositlere dönüşme potansiyeline sahipken epitel dokuda bulunan kök hücreler sadece deri hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahiptir. Totipotent ve pluripotent hücrelere göre çok daha fazla özelleşmiş bu hücreler multipotent olarak adlandırılırlar.

Osteojenik, kondrojenik ve adipojenik hücrelere farklılaşabilen dental pulpa kök hücreleri gibi mezenkimal kök hücreler, en iyi bilinen multipotent farklılaşma potansiyeline sahip kök hücrelerdir. Bu sebeple rejeneratif uygulamalarda en çok multipotent özellikteki mezenkimal kök hücreler tercih edilir.

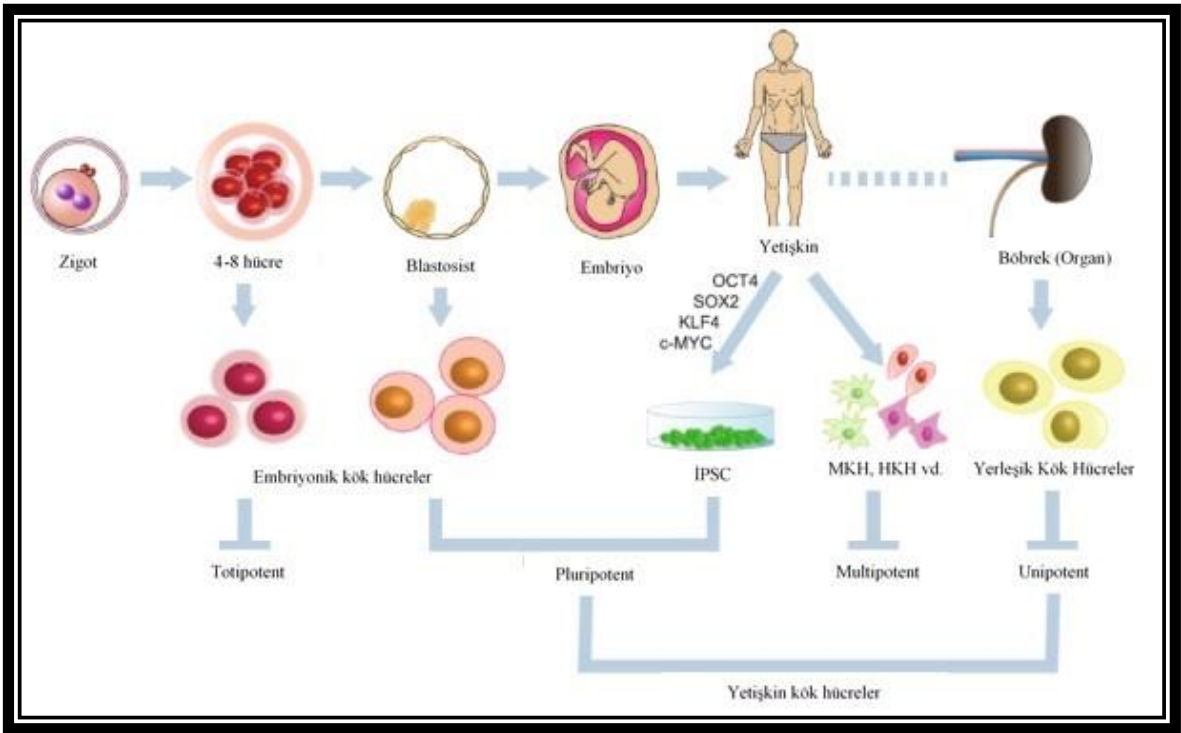
2.2.1.4. Oligopotent

Yetişkin kök hücrelerden bazıları sadece birkaç farklı tip hücreye farklılaşma potansiyeline sahiptir. nötrofil, eozinofil ve bazofile farklılaşabilen myeloid kök hücreler, B ve T

hücrelerine farklılaşabilen lenfoid kök hücreler ile endotelial ve düz kas hücrelerine farklılaşabilen vasküler kök hücreler örnek olarak verilebilir.

2.2.1.5. Unipotent

Bu hücreler yalnızca bir tip hücreye farklılaşma potansiyeline sahiptir. Çok nadir görülen bu hücreler genellikle geçici hücrelerdir. Öncü hücrelerin aksine kendini yenileme özellikleri ile ayrılırlar. Ölmüş olgun hücrelerin yerine geçerek organ veya dokunun bütünlüğünü sağlarlar. Sperm üreten germ hattı kök hücreleri ile cildin bütünlüğünü sağlayan epidermal kök hücreler en iyi örneklerdir (6,10,11).



Şekil 2.1. Kök hücrelerin sınıflaması (12).

2.2.2. KÖK HÜCRELERİN KAYNAKLARINA GÖRE SINIFLAMA

2.2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

Embriyonun erken gelişim evrelerinde tek başına bir bireyi oluşturabilecek potansiyele sahip totipotent hücreler ile gelişimin 4 veya 5. gününden sonraki blastosist evresinde iç tabakada yer alan pluripotent hücreler embriyonik kök hücrelerdir. Bu hücreler in vitro kültür koşullarında yüksek derecede telomerez aktivitesi gösterirken tüm fetal dokulara ve yetişkin kök hücrelerine ve öncü progenitörlere farklılaşma potansiyeline sahiptirler.

EKH'lar diyabet, miyokart ve Parkinson gibi hastalıkların deneysel çalışmalarında kullanılmıştır. Ancak in vitro fertilizasyon sırasında implante edilen embriyo dışında kalan fazla embriyoların kullanılması ile elde edilirler. Bu sebeple pluripotent özelliklerinin yanında etik problemleri de vardır.

2.2.2.2. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPKH)

Farklılaşma potansiyelleri farklı olan kök hücrelerin elde edildikleri kaynaklar da farklılık göstermektedir. Kök hücreler temelde embriyonik ve yetişkin olmak üzere iki farklı kaynaktan elde edilmelerine göre birbirinden ayrılırlar. Daha sonra kendi içlerinde yine farklı kaynaklara göre sınıflandırılabilirler.

iPKH'lar, somatik hücre çekirdeğinin belli koşullarda uyarılarak embriyonik kök hücre benzeri bir genetik yapıya sahip yapay kök hücrelerdir. Bu alanda yapılan ilk başarılı çalışmada 2006 yılında fare yetişkin fibroblastlarına 4 adet transkripsiyon faktörü (Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc) eklenerek pluripotent kök hücreler elde edildiği gösterilmiş ve 2012 yılında Nobel ödülünün alınmasını sağlamıştır. Daha sonra 2007 yılında benzeri bir çalışma insan fibroblastları üzerinde gerçekleştirilmiş ve başarılı olmuştur. iPKH'lar olarak tanımlanan bu hücreler embriyonik kök hücreler gibi in vitro koşullarda süresiz ve hızlı bir şekilde çoğaltılabilir ve pluripotent özellik gösterebilirler. Çığır açan bu keşfin ardından embriyonik kök hücrelerin etik problemleri aşılmış olup klinik uygulamalarda araştırma ve prespektif için yeni yollar açılmıştır. Daha sonra günümüze gelinceye kadar fibroblastlar dışında dek iPKH'lar kan hücreleri, diş pulpa hücreleri, hepatositler, kordon kanı ve lenfositler gibi bir çok kaynaktan elde edilmişlerdir (8,13–16).

2.2.2.3. Yetişkin Kök Hücreler (YKH)

Embriyonik olmayan ya da erişkin kök hücreler olarak da isimlendirilen YKH'lar, EKH'ların aksine buldukları doku veya organın özelleşmiş hücrelerine farklılaşabilme potansiyeline sahip olup multipotent hücrelerdir. Bu sebeple YKH'ların ana görevi dokunun hasarını gidermek ve bütünlüğünü korumaktır.

Bu hücrelerin avantajları, EKH'lara nazaran otolog kullanılabilir olmaları, etik kaygıların bulunmaması, düşük tümörojenite ve immünojenisiteye sahip olmalarıdır. EKH'ların elde edilmesi yönteminin embriyoya zarar vermesine karşın yetişkin kaynaklı kök hücreler,

küçük bir iğne biyopsisi yoluyla elde edilebilmektedir. Henüz vücut dokularının tümünde keşfedilmemiş olan YKH'lar embriyo tahribatı gibi etik engelleri aşabilmesi açısından da önemlidir (2).

Erişkin bir vücutta YKH'ların beyin, kan, kalp, ince bağırsak, yağ, diş, kas, deri, göz ve pankreastan izole edilebildikleri gösterilmiştir. Ancak bu kaynakları 3 alt başlıkta toplamak uygun olur.

2.2.2.3.1. Hematopoetik Kök Hücreler (HKH)

Beyaz ve kırmızı kan hücreleri ve trombositler dahil olmak üzere her tür kan hücresine dönüşebilen HKH'lar kemik iliği, periferik kan ve kordon kanı kaynaklı olabilirler. Uygun şartlarda kas, kemik ve kıkırdak gibi hücelere de farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Ayrıca HKH'lar kemik iliği yetersizlikleri, kanserler ve bazı bağışıklık sistemi hastalıklarının tedavilerinde kullanılmaktadır.

2.2.2.3.2. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

Stromal kök hücreler olarak da bilinen MKH'lar osteoblast, kondrosit, miyosit ve adiposit hücreler de dahil olmak üzere çeşitli erişkin hücelere farklılaşabilen multipotent hücrelerdir. Bu hücreler dokularda destek hücreleri olarak bulunmakta olup kemik iliği, kemik, kas, karaciğer, diş pulpası, yağ dokularından izole edilebilirler (6,11,17)

2.2.2.3.3. Dokularda Yerleşik Kök Hücreler (DYKH)

Asıl görevleri doku hasarlarını kısmen gidermek olan DYKH'lar, unipotent hücreler olup sadece buldukları dokuya özgü hücelere farklılaşabilme potansiyelleri vardır. Örneğin kalp kası kök hücreleri, sindirim sistemi epitel kök hücreleri, böbrek kök hücreleri gibi hücrelerin progenitör yani öncü hücreleridir (6,11,18).

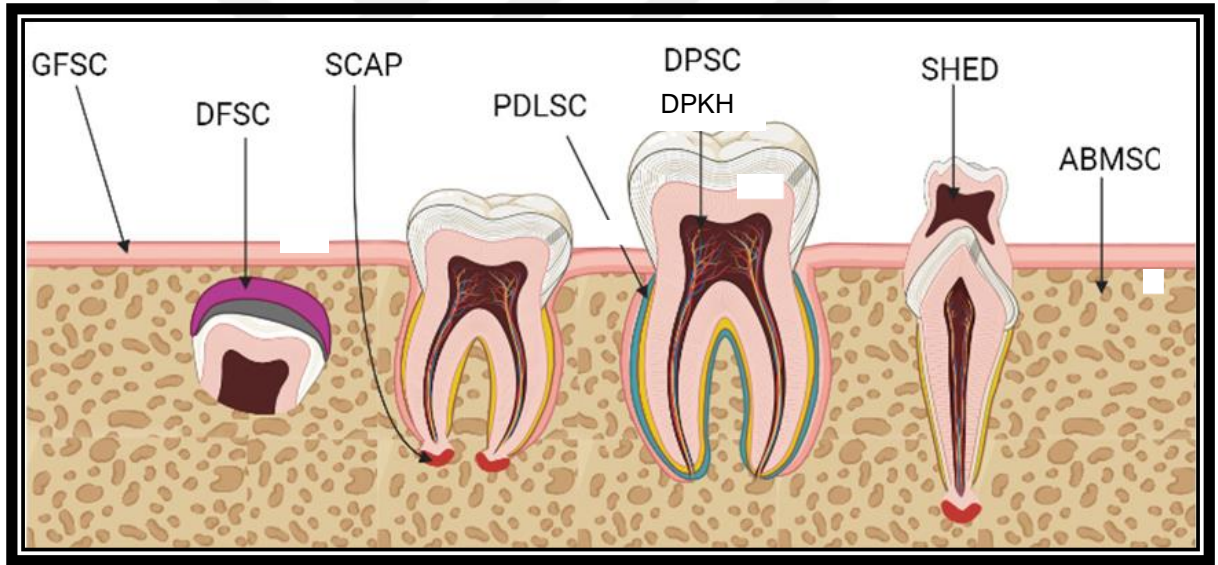
2.2.3. DENTAL KÖK HÜCRELER (DKH)

Dental kök hücreler diş dokularına kolay ve zahmetsiz ulaşılabilmesi sebebiyle tercih edilen pluripotent mezenkimal kök hücrelerdir. Diş dokuları, embriyonik olarak dental ektoderm ile dental mezenşim arasındaki etkileşimden gelişir. Diş dokularının geneli mezenşim

kökenli iken diş minesi ektoderm kökenlidir. Bu nedenle DKH'lar hem mezoderm hem de ektoderm özellik gösterirler ve bu onların önemli bir avantajıdır (2,19).

Kök hücreler, dökülen süt dişleri veya yetişkin diş pulpasından, diş kökünü kemiğe bağlayan periodontal bölümden veya diş folikülü gibi farklı evre ve kısımlardan elde edilebilmektedir. Bu zamana kadar 7 farklı tip diş kök hücresi izole edilmiştir: alveolar kemik kaynaklı kök hücreleri (ABMSC), dökülen süt dişlerinde bulunan kök hücreleri (SHED), diş pulpa kök hücreleri (DPKH), periodontal ligament kök hücreleri (PDLSC), dental apikal follikül prekürsör kök hücreleri (DFSC), gingivada bulunan mezenkimal kök hücreleri (GFSC), diş apikal papilla kök hücreleri (SCAP) (2,20,21).

Literatürde yer alan in vitro çalışmalar, dental kök hücrelerin yüksek kapasitede hücre kümeleri oluşturarak yüksek derecede proliferasyon yaptığı ve üç germ tabakasında yer alan farklı hücre tiplerine farklılaşabildiğini göstermiştir (21).



Şekil 2.2. Dental kök hücrelerin kaynak aldığı bölümler (21).

2.2.3.1. Dental Pulpa Kök Hücreler (DPKH)

Dental pulpa, dentin dokusu ile pulpa boşluğu arasında kalan, mezoderm kaynaklı ve odontoblastları içeren gevşek bir bağ dokudur (Şekil 2.2.). Dental pulpanın fonksiyonel görevi periodontal dokunun tamiri ve bütünlüğünün sağlanmasıdır. Çürük gibi ciddi bozulmalarda dental pulpa içerisinde yer alan DPKH'ler odontoblastlara farklılaşarak hasarlı dokuya geçerler (22,23)

DPKH'ler hem osteoblast hem de hemotopoezi destekleyen endotelyal hücelere dönüşüm yeteneği nedeniyle kemik dokusu onarımında deneysel olarak kullanılmıştır (24). Bu çalışmalarda diğer kaynaklardan elde edilen yöntemlere göre dental pulpadan elde edilen DPKH'lerin kolay ulaşılması, poliferasyonunun yüksek olması ve çok yönlü farklılaşabilmesi tercih edilme sebebidir. DPKH'ler 2000 yılında tanımlanmış, 2009 yılında ise in vivo koşullarda kemik oluşumunu sağladığını gözlenmiştir (25,26).

Osteoblast hüceleri ise pluripotent mezenkimal kök hücelerden kaynaklanan ve kemik oluşumunu sağlayan hücelerdir. Toplam kemik yapısının yaklaşık %4-6'sını oluşturur. DPKH'lerin osteoblast hücelerine farklılaşması alkalın fosfataz, osteokalsin, osteopontin kemik sialoproteini ve osteonektin gibi kemik belirteçleri eksprese edilmesi ile gerçekteşir. Farklılaşmanın sonucunda oluşan kemik hücre dışı mineralizasyonu da farklılaşmasının önemli bir ölçütüdür. Alizarin kırmızı boyası, bu mineralizasyonun gösterilmesi için kullanılır. Spesifik olarak kalsiyum katyonları ile reaksiyona giren alizarin kırmızı boyası, farklılaşmanın gerçekteştiğini, ortamdaki kalsiyum salın hüceleri kırmızıya boyayarak gösterir (27).

2.3. HÜCRE BÜYÜTME

Hücre kültürü ortamı olan besiyerleri, hücelerin çoğalması ve canlılığı için esastır. Kullanılan besiyerleri, proliferasyon istenen hücre tiplerine göre farklılık gösterse de genel olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), DMEM Yüksek-Glikoz besiyerleri kullanılmaktadır. Bu ortamlar vitaminler, aminoasitler, karbonhidratlar, tuzlar, hormonlar, enzimler, serum ve antibiyotikler gibi bileşenlerden oluşmaktadır. Bu ortamın en önemli bileşenlerinden biri olan serumlar büyüme faktörü, vitamin, mineral, hormon gibi hücre büyümesi ve çoğalması gibi gerekli bileşenleri içermektedir. Serum olarak genelde FBS kullanılır. İçeriği tam olarak bilinmemekle birlikte hücre çoğalmasına direk etkisi olduğu bilinmektedir. Ayrıca fiziksel hasarları azalttığı da gösterilmiştir (4,28).

FBS, Theodore Puck tarafından 1950'lerin sonunda ilk kez kullanılmış olup daha sonra özellikle biyoteknoloji ve ilaç çalışmalarında insan ve hayvan hücre kültürleri için çok sık kullanılmıştır. Donör, yenidoğan buzağı veya dana gibi birçok sečenek arasında düşük immunoglobulin içeriği nedeniyle en yaygın olarak kullanılan FBS türüdür.

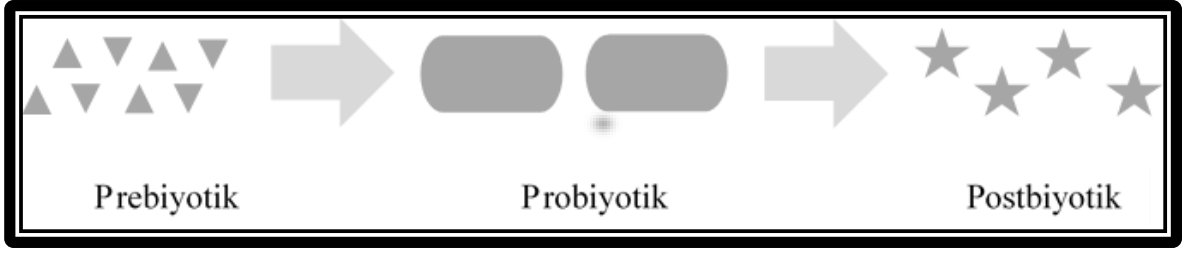
FBS'ler buzağı fetüslerinden üretilmesi sebebiyle etik ve tedarik açıdan tartışmaların odak noktası haline gelmiştir. Çünkü yaklaşık olarak yılda 800.000 litre FBS üretildiği düşünüldüğünde yaklaşık 2.000.000 sığır fetüsü kullanılmaktadır. Fetal buzağuların ölü annelerinden çıkarılmaları, kalp ve kandan şırınga ile serumların toplanması işlemlerinin tamamı bu çalışmaların in vitro çalışmalar ile yer değiştirmesi gerektiği düşüncesini ve araştırmalarını yaygınlaştırmaktadır (29,30).

Bununla birlikte beklenmedik sonuçlara sebep olan mevsimsel ve coğrafi değişkenlik, seriden seriye farklılık gösterebilmektedir. Serumun içeriğindeki farklılıklar farklı biyolojik aktivitelere sebep olabilmektedir. Bu açıdan bakıldığında yine önemli bir maliyet kalemi olan hücre kültürünün istenilen şekilde gerçekleşmesini engelleyebilmektedir. Bu sebeple araştırmacıların mümkün olduğunda standart kimyasal bileşenlere yöneliği bilinmektedir (3). Bu değişkenlik bilimsel açıdan etki yaratabildiği gibi laboratuvar personeli için de hastalık endişelerine sebep olabilmektedir.

2.4. MİKROBİYOTA

Mikrobiyota, belirli bir çevrede yaşayan canlı mikroorganizmaların tamamı için kullanılan bir terimdir. Bağırsak, oral, deri mikrobiyotası ile balık, arı bağırsağı, inek sütü mikrobiyota için örnek verilebilir. İnsan bağırsak mikrobiyotasının baskın türleri, Firmicutes ve Bacteroidetes şubelerine ait bakteri türleri ile *Candida*, *Saccharomyces Malassezia* ve *Cladosporium* cinslerine ait mantar türleri olup insan bağırsağının 1.500'den fazla tür içerdiği bilinmektedir. Bakteri ve mantar türleri dışında virüs ve arkeleri de içerir. Diğer memeli türlerinde de benzer türlerin baskınlığı gözlenmiştir. Ancak memeli türlerinde görülmesine rağmen çoğunlukta olmayan proteobakterilerin balık türlerinde baskın ve çoğunlukta olduğu gösterilmiştir (31–33).

Mikrobiyota genel olarak birbiri ile ilişkili prebiyotik, probiyotik ve postbiyotik olmak üzere 3 farklı terim ile ilişkilendirilir. Genel olarak mikrobiyota ürünleri olarak da bilinen postbiyotikler, genel anlamda mikroorganizma tarafından üretilen veya salınan ve konakçı üzerine doğrudan veya dolaylı olarak yarar sağlayan metabolitlerdir. Salınan veya üretilen bu ürünlere postbiyotik, mikroorganizmaya ise probiyotik denmektedir. Postbiyotik üreten probiyotiğin büyümesini ve aktivitesini olumlu yönde uyaran gereksinimler ise prebiyotik olarak ifade edilmektedir (34).



Şekil 2.3. Prebiyotik, probiyotik ve postbiyotik arasındaki ilişki

2.4.1. PROBİYOTİKLER VE PREBİYOTİKLER

Probiyotik kelime kökeninin Latince olduğu ve “yaşam için” anlamı taşıdığına dair tahminler bulunmaktadır. 1954 yılında yararlı ve zararlı bakterilerin karşılaştırılmasının yapıldığı “*Anti-und Probiotika*” adlı bir makalede ilk defa probiyotik teriminin kullanıldığı söylenmektedir. Daha sonra birçok kez benzer anlamlarda kullanılmasına rağmen 1989 yılında “*Probiotics in man and animals*” adlı makalede konakçısına yarar sağlayan mikroorganizma olarak tanımlanmıştır. 2001 yılında ise Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından “yeterli dozda uygulandığında konakçısına fayda sağlayan özellikle seçilmiş mikroorganizma” tanımı yapılmıştır (35,36).

Genel olarak probiyotikler, konakçısı üzerinde olumlu etkisi olan canlı mikroorganizmalardır. En yaygın olarak bilinen probiyotikler, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Streptococcus* bakterileri ile *Saccharomyces* mayasıdır (34).

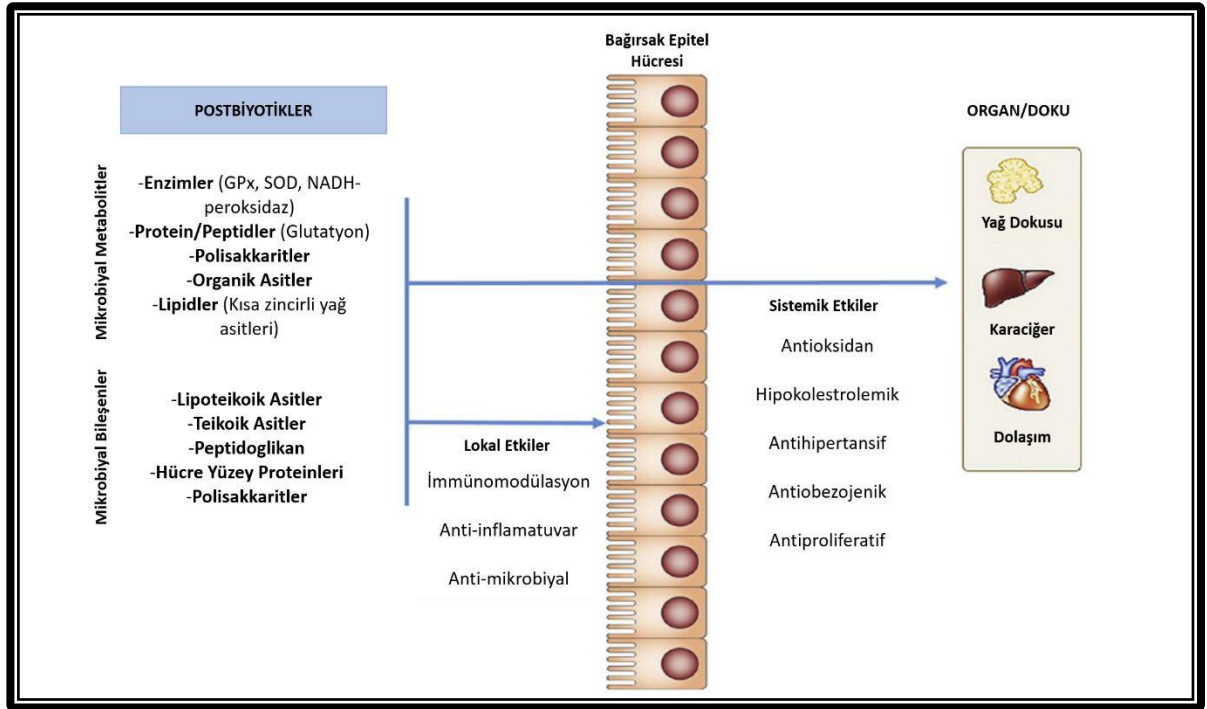
Probiyotik olarak adlandırılan ve canlı olan mikroorganizmaların insan, hayvan, bitki ve gıdalar üzerindeki faydaları hususunda literatürde birçok çalışma yer almaktadır. Obesite, insülin direnci sendromu, diyabet, karaciğer yağlanması, rahatsız ve inflamatuvar bağırsak sendromları, gastrointestinal bozukluklar, atopik dermatit, farklı kanser türleri ve kanserle ilişkili yan etkiler üzerine probiyotiklerin etkileri araştırılmış ve kanıtlanmıştır. Ayrıca cilt mikrobiyomunu dengede tutmak ve cilt sağlığını iyileştirmek gibi amaçlarla kozmetik endüstrisinde, hayvan yemi katkısı ve hayvan sağlığı gibi amaçlarla tarım endüstrisinde, atık su arıtım ve çevre kirliliğini azaltma gibi amaçlarla çevre endüstrisinde de probiyotikler kullanılmaktadır (34,36,37).

Postbiyotik üreten probiyotiğin büyümesini ve aktivitesini olumlu yönde etkileyen gereksinimler ise prebiyotik olarak ifade edilmektedir. Daha net bir ifade ile probiyotikler

tarafından gıda olarak kullanılırlar. İnülin, laktuloz ve galaktuloz ile bunların türevleri, en iyi bilinen prebiyotiklerden bazılarıdır (34,38).

2.4.2. POSTBİYOTİKLER

Biyojenikler veya metabolitler veya hüresiz süpernatant gibi farklı isimlerle tanımlanabilen bu postbiyotikler, canlı mikroorganizmalardan yani probiyotiklerden salınan veya bakteriyel lizisten sonra ortaya çıkan çeşitli polisakkaritler, enzimler, peptidler, hücre yüzeyi proteinleri, vitaminler ve organik asitler gibi çözünebilir faktörlerdir (39).



Şekil 2.4. Belirli postbiyotiklerin konakçıdaki etkileri (39,40).

Bu kapsamda postbiyotiklerin en genel anlamda ana bileşenlerini süpernatantlar, ekzopolisakkaritler, enzimler, hücre duvarı parçacıkları, kısa zincirli yağ asitleri, bakteriyel lizatlar ve bağırsak mikrobiyota metabolitleri olarak söylenebilir.

2.4.2.1. Süpernatantlar

Süpernatantlar, bakteri ve mayalar tarafından dış ortama salınan hüresiz aktif metabolitlerdir. İnkübe edilen mikroorganizmalardan santrifüj yöntemi ile direk elde edilir ve steril olması için filtrelenir.

Farklı bakteri ve maya türlerinin çok farklı etkilere sahip süpernatantları olduğu kanıtlanmıştır. Örneğin *Lactobacilli acidophilus* and *Lactobacilli casei* süpernatantlarının antikanser, antiinflamatuvar ve antioksidan etkileri ile kolon kanserinin invazyonunu önleyebildiği gösterilmiştir. Ayrıca *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakteri türlerinden elde edilen hücresiz süpernatantları, *Escherichia coli* türlerini baskılayarak antibakteriyel özellik göstermişlerdir.

Saccharomyces cerevisiae ve *Saccharomyces boulardii* süpernatantlarının ise stres kaynaklı bağırsak hareketlerini düzenleyebildiği, antiinflamatuvar ve antioksidan aktivite, yara iyileşmesi ve bağırsak bariyeri rejenerasyonunu hızlandırdıkları gösterilmiştir (34,38).

2.4.2.2. Ekzopolisakkaritler

Probiyotiklerin ürettiği farklı kimyasal yapılara ve özelliklere sahip biyopolimerler, heterojen bir madde grubu olan ekzopolisakkaritleri oluşturur ve hücre dışına salgırlar. Ekzopolisakkaritler halihazırda stabilizatör ve su bağlayıcı maddeler olarak gıda endüstrisinde uzun zamandır kullanılmaktadır.

Ekzopolisakkaritlerin dendritik hücreler ile birlikte T ve NK lenfositlerinin proliferasyonu arttırdığı ve bu şekilde immün yanıtı regüle edebildiği gösterilmiştir. Bunun dışında T ve NK lenfositlerinin çoğalmasını sağlaması sebebiyle *Lactobacilli casei* ekzopolisakkaritleri şap hastalığı aşısında adjuvan olarak kullanıldığında aşının etkinliğinin arttığı da gösterilmiştir.

Lactobacilli helveticus ekzopolisakkaritleri ise demir bağlama özelliği sebebiyle antioksidan olarak kullanılabileceği, *Lactobacilli kefiranofaciens* ekzopolisakkaritlerinin ise kolesterol absorpsiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.

Bununla birlikte bakteri, virüs, parazit ve kanser hücrelerine karşı bağışıklık tepkisini arttırdıkları ve atopik dermatitin iyileşmesine ve tekrarlamasının önlenmesine olumlu etki ettikleri gösterilmiştir. (34,38).

2.4.2.3. Enzimler

Antioksidan enzimler olan glutatyon peroksidaz, peroksid dismutaz, katalaz ve NADH-oksidad, probiyotiklerin savunma mekanizmalarından biridir.

Lactobacillus fermentum suşunun yüksek oranda glutatyon peroksidaz içerdiği ve bu sebeple in vitro yüksek bir antioksidan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca peroksit dismutaz veya katalaz sentezleyen ve rekombinant yöntemlerle değiştirilmiş *Lactobacillus* türlerinin Crohn hastalığının semptomlarını azalttığı fare modeli üzerinde gösterilmiştir. (34,38).

2.4.2.4. Hücre duvarı parçacıkları

Bakteriyel hücre duvarı parçalarının bağışıklık sistemini tetiklediğine yönelik bir çok çalışma bulunmaktadır.. Gram-pozitif bakterilerin lipoteikoik asitleri gibi bu bileşenler de hücre duvarından ortama salınırlar.

Gram pozitif bakterilerin lipoteikoik asitin sitokin indüklenmesi gibi immünomodülasyon etkilerinin olduğuna yönelik çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte lipoteikoik asitin dermatolojik hastalıklarda da kullanılmaktadır. Örneğin lipoteikoik asitin topikal uygulaması ile insan spesifi olmayan savunma mekanizmalarını geliştirir. Ayrıca önemli miktarda lipoteikoik asit ürettiği bilinen *Lactobacillus* ve *Bifidobacteria* cinsi bakterilerin vital ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı cilt mast hücre yanıtını uyardığı gösterilmiştir. Ancak yararlı etkilerin yanında lipoteikoik asitin organizma üzerinde aşırı bir enflamatuvar tepkiye neden olduğu da bilinmektedir (34,38).

2.4.2.5. Kısa Zincirli Yağ Asitleri

Bağırsak mikrobiyotasının bitki polisakkaritlerini fermente etmesi sonucu ortaya çıkan ve asetik, propiyonik ve bütirik asitlerine karşılık gelen yağ asidi tuzlarını içeren ürünlerdir. Bağırsak epitelinin yenilenmesini ve gen ekspresyonunu modüle eden bütirat, eritrositler için önemli bir enerji kaynağıdır. Ayrıca bütiratın immünosupresif olduğu da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bununla birlikte önemli miktarda bütirat ürettiği bilinen *Resoburia intestinalis* türünün aterogenezi inhibe ettiği, fare modeli üzerinde gösterilmiştir.

Kısa zincirli yağ asitleri glukagon benzeri peptid 1'in salgılanmasını sağlayarak enerji yönetimini etkileyebildiği üzerine çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca propiyonat, kolesterol sentez yolağını inhibe etmekte, bütirat ile karşılaştırıldığında ise anti inflamatuvar aktivite göstermektedir.(34,38).

2.4.2.6. Bakteriyal lizatlar

Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin kimyasal veya fiziksel olarak bozunmaları sonucu oluşan bakteriyal lizatlar, birçok dahili ve bulaşıcı hastalığın klinik çalışmalarına konu olmuştur. Klinik kullanımı ise enfeksiyonların önlenmesine yönelik olarak bağırsağın bağışıklık sistemi ile solunum sistemi arasındaki fonksiyonel bağlantıya dayanmaktadır. Oral olarak alınan liyofilize edilmiş bakteriyal lizatların ince bağırsaktaki Peyer yamalarında T ve B lenfositleri uyardığı gösterilmiştir.

Klinik çalışmalarda bağışıklık sistemini uarmak için kullanılıyor olmaları nedeniyle önem arz etmektedir. Çünkü bakterilerin varlığını taklit etmeleri, bakterilerin zararlı etkilerinin bazılarında kurtularak bağışıklığın uyarılmasının ve aşı olarak kullanılmasını sağlayabilir.

Bakteriyel lizatlar, 4.800'den fazla çocuğu içeren bir çalışmada düşük solunum yolu enfeksiyonu insidansı göstermiştir. Ayrıca enfeksiyonların önlenmesi, atopik dermatit semptomlarını hafifletme, çocuk astım ve kronik akciğer hastalıklarının etkilerini azaltmada olumlu etki göstermişlerdir. (34,38).

2.4.2.7. Bağırsak mikrobiyota metabolitleri

Bağırsak mikrobiyotası; vitamin, aromatik amino asitler ve fenolik türevli metabolitleri gibi molekülleri salgılar. DNA sentezi, onarımı ve metilasyonunda önemli rolü olan folat, K2 vitamininin bir formu olan ve anti-kanserojenik etkisi gösterilen menakinon, B12 vitamini bu moleküllerden bazılarıdır.

Folat; DNA sentezi, onarımı ve metilasyonunda önemli bir rol oynayan sistematik bir metabolittir. Ayrıca folat takviyesi, inme riskini düşürürken kolorektal kanserli veya riski taşıyan hastalarda karsinogenezi hızlandırır. Bu sebeple hem yararlı hem de zararlı etkilerden bahsedilebilmesi sebebiyle folat kullanımı, sağlık ve hastalık arasındaki U ilişkisi olarak gösterilir.

Bağırsak mikrobiyotasında bazı bakteriler, konakçısı için B12 ve diğer B vitaminleri kaynağıdır. Aynı şekilde K vitamini insanlarda kan pıhtılaşma faktörleri için gereklidir. Bağırsak mikrobiyotasının aromatik amino asitlerin metabolizmasına direk dahil olduğu ve

beyin, b6brek ve kardiyovask6ler sistemlere uzaktan genetik modifikasyon gibi etkiler sağladığı ile polifenollerin obeziteye karşı etkili olduğu g6sterilmiştir. (34,38).

Bu çalışmada kullanılacak olan postbiyotikler tek bir mikroorganizma t6r6nden ziyade s6z konusu ortamda bulunan t6m mikroorganizmalardan salınan postbiyotiklerdir. S6z konusu postbiyotikler “2A” kodu ile arı bağırsağından, “KS” kodu ile anne s6t6nden, “R1” kodu ile *Spalax* t6r6n6n bağırsağından, “S1” kodu ile inek s6t6nden elde edilmiştir. 2A kodlu postbiyotik 500 mg/mL; KS, S1 ve R1 Kodlu postbiyotikler ise 100 mg/mL konsatrasyonda olacak şekilde Ankara 6niversitesi Biyoloji B6l6m6 Farmabiyotik Teknoloji Laboratuvarı’ndan temin edilmiştir.



3. GEREKÇE VE AMAÇ

Kök hücreler, vücutta hasarlı ve hastalıklı hücrelerin yerine geçerek organizma homeostasisini sağlayan önemli bir umut vadeden rejeneratif tedavi yöntemidir. Mezenkimal kök hücrelerin in vitro şekilde diğer hücelere farklılaşma potansiyelleri ve farklılaşma ile uygulanabilecek tedavi yöntemleri, birçok çalışma ile gösterilmiş ve yoğun şekilde de prelinik ve klinik çalışmalarla araştırılmaya devam edilmektedir. Özellikle mezenkimal kök hücrelerin geniş kapsamlı fizyolojik etkilere sahip oldukları bilinmektedir. Söz konusu araştırmaların sorunlarının başında iyi klinik uygulamaları ve iyi imalat uygulamaları gibi kalite sistemleri, stabilite, canlılık ve farklılaşma gibi parametreler açısından oluşan tutarsızlıklar ve maliyet gelmektedir (41).

DPKH'lerin kolay elde edilebiliyor olmaları, proliferasyonlarının yüksek olması ve çok yönlü değişime açık olması gibi tercih sebeplerinden dolayı osteoblast hücelere değişim yetenekleri, kemik dokusu onarımında deneysel olarak kullanılmışlardır (24,25). Bununla birlikte DPKH'lerin kemik onarımı ve oluşumu sağladığı gösterilmiş olsa da laboratuvar ortamında diş kök hücre izolasyonu ve proliferasyonu pahalı, zaman alıcı ve kontaminasyon açısından risklidir (7).

Farklı kaynaklardan elde edilen postbiyotiklerin farklı içerikleri sebebiyle antimikrobiyal ve antiinflamatuvar gibi lokal etkileri ile antioksidan ve hipokolestrolemik gibi sistematik etkileri literatürde birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bunun yanı sıra mikrobiyota ve postbiyotiklerin farklı kök hücre hatları üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur.

Xiao ve diğerlerinin (2017) kemik iliği mezenkimal kök hücre hatlarının değişimlerini ve immünomodülasyonunu inceledikleri çalışmada antibiyotik kullanılmış fareler ile normal fareler in vitro koşullarda karşılaştırılmıştır. Antibiyotiklerin mikrobiyotayı olumsuz etkilediği yoluyla yapılan çalışmada mikrobiyotanın adipogenezini arttırdığı, osteogenezini ise azalttığı belirtilmiştir (42).

Su ve diğerleri (2020) mikrobiyotanın fare kesici dişlerinin hücresel dönüşümündeki rolünü inceledikleri in vitro çalışmada DPKH'lerin antibiyotik aldırılmış olan farelerde etkinliklerinin azaldığı ve bu doğrultuda osteojenik farklılaşma yeteneğinin bozulduğu gösterilmiştir. Antibiyotik etkisi ile mikrobiyotası bozulan farelerin normal fareler ile

birlikte barındırılması ve antibiyotikle muamele edilen farelere kısa zincirli yağ asitlerinin verilmesi sonucunda DPKH'lerin normalleştiği ve bozulan osteojenik farklılaşma yeteneğinin düzeldiği rapor edilmiştir (43).

H. Lee ve diğerleri (2022), bağırsak gelişiminde bağırsak mikrobiyotasının düzenleyici etkilerini inceledikleri çalışmalarında bağırsak kök hücresi modelinde *Limosilactobacillus reuteri* suşuna ait hücresiz süpernatanın kök hücre proliferasyonunu arttırdığı ve bağırsak epitel hücrelerinin korunması için önemli olduğu sonucuna varmışlardır (44).

Literatüre bakıldığında farklı kök hücrelerin çoğalma durum ve potansiyelleri, probiyotik ve postbiyotiklerin bulunduğu ortamlarda birçok kez test edildiği ve postbiyotiklerin proliferasyonu arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada mikrobiyota ürünleri olan postbiyotiklerin dental kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşma etkisine odaklanılmıştır. Bu kapsamda klinik sonuçları araştırılmaya devam eden postbiyotiklerin dental kök hücreden kemiğe farklılaşması açısından kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Bu çalışmada kullanılacak olan postbiyotikler tek bir mikroorganizma türünden ziyade ortamda bulunan tüm mikroorganizmalardan salınan postbiyotikler olup söz konusu postbiyotikler "2A" kodu ile arı bağırsağından, "KS" kodu ile anne sütünden, "R1" kodu ile *Spalax* türünün bağırsağından, "S1" kodu ile inek sütünden elde edilmiştir. 2A kodlu postbiyotik 500 mg/mL; KS, S1 ve R1 kodlu postbiyotikler ise 100 mg/mL konsatrasyonda olacak şekilde alınmıştır.

Yapılan çalışma ile dental pulpadan izole edilmiş kök hücreler, farklı kaynaklardan elde edilmiş 4 farklı postbiyotik varlığında farklılaşmaya olan etkileri araştırılmış ve kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Hipotezimiz, postbiyotiklerin varlığında dental pulpa kök hücrelerinin kemiğe farklılaşma işleminin daha hızlı ve etkili olacaktır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. DENTAL PULPA KÖK HÜCRE İZOLASYONU VE PROLİFERASYONU

Bu çalışmada kullanılan DPKH hattı, Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Farmabiyotik Teknoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. DPKH'ler Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden sağlıklı bireylerden onam formu ile alınmış olup etik kurulu izni (No:01-2023/20), Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmış ve ekte sunulmuştur.

Çalışma kapsamında DPKH hattının pasajlanması Class II laminar akışlı mikrobiyolojik güvenlik kabininde (MN 120, Nüve, Türkiye) gerçekleştirilmiştir. DPKH'ler steril flasklarda (Corning, NY, ABD) %10 FBS (FBS, Biological Industries), %1 penisilin-streptomisin (Biological Industries), ve %89 Mem-Alpha (Biological Industries, ABD) içeren standart besiyeri ile kültüre edilmiştir. Her üç günde bir ortalama %80 hücre doluluk oranlarına ulaşıldığında tekrar hazırlanan besiyeri ile değiştirilerek pasajlanmıştır. Pasajlanma işlemi için Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen PBS (Merck, ABD) ve Tripsin-EDTA (Merck, ABD) kullanılmıştır. Tripsinleme ve inkübasyon işlemleri için ise Tripsin-EDTA ile 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatör (EN 120, Nüve, Türkiye) kullanılmıştır. Santrifüj ise 200 rpm'de 5 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Hücre doluluk oranları ve canlılık için ZeissPrimovert (Almanya) invert faz-kontrast mikroskopu kullanılmıştır.

4.2. MİKROBİYOTA ÜRÜNLERİNİN HAZIRLANMASI

Mikrobiyota ürünleri kapsamında kullanılan 4 farklı postbiyotik, tek bir mikroorganizma türünden ziyade ortamda bulunan tüm mikroorganizmalardan salınan postbiyotiklerdir. Söz konusu postbiyotikler "2A" kodu ile arı bağırsağından, "KS" kodu ile anne sütünden, "R1" kodu ile *Spalax* türü bağırsağından, "S1" kodu ile inek sütünden elde edilmiş olup hazır bir şekilde Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Farmabiyotik Teknoloji Laboratuvarı'ndan alınmıştır. 2A kodlu postbiyotik 500 mg/mL; KS, S1 ve R1 Kodlu postbiyotikler ise 100 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde temin edilmiştir.

Söz konusu postbiyotikler daha önce Omer Oglou ve arkadaşları (2022) tarafından gerçekleştirilen çalışma kapsamında hazırlanmıştır (45).

4.3. POSTBİYOTİKLERİN SİTOTOKSİSİTE BELİRLEME ÇALIŞMALARI

Temin edilmiş olan DPKH'ların 3. pasajından sonra Tripsin-EDTA (Merck, ABD) kullanıldıktan sonra santrijüj edilmiştir. Daha sonra hücreler 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde şekilde 96'lık kuyu plakalara (well plate) aktarılmıştır.

“2A” kodu ile arı bağırsağından elde edilen postbiyotik 500 mg/mL; “KS” kodu ile anne sütünden, “R1” kodu ile *Spalax* bağırsağından, “S1” kodu ile inek sütünden elde edilmiş postbiyotikler ise 100 mg/mL konsantrasyonda temin edilmiştir.

96 kuyucuklu plaka 72 saat boyunca %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %89 Mem-Alpha içeren besiyerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra kuyulardan besiyeri aspire edilmiş ve 10-100-500 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanmış ve 4 farklı kaynaktan elde edilmiş olan postbiyotikler eklenmiştir. Ayrıca 4 adet kuyucuk da kontrol amacıyla sadece Mem-Alpha içeren besiyeri ile inkübe edilen hücrelere ayrılmıştır. Her bir postbiyotik her konsantrasyon için 3'er örnek çalışılmıştır.

MTT analizi için besiyerleri aspire edildikten sonra hazırlanan 500 µg/mL'lik MTT çözeltisinden 10 µL her kuyucağa eklenmiştir. 4 saatlik inkübasyon süresi sonrası MTT çözeltisi uzaklaştırılarak yine her kuyuya 150 µL'lik dimetil sülfoksitte (DMSO, Merck) eklenerek iyice çözünmenin gerçekleşmesi sağlanmıştır. Daha sonra 570 nm dalga boyunda ölçümler yapılmıştır. Ölçümler sırasında UV spektrofotometre (Multiscan Ascent, Labsystems) kullanılmıştır.

MTT analizi hücre canlılığı ve proliferasyon ölçümünde altın standart olarak kabul edilen kolorimetrik bir analiz yöntemidir. Mitokondriyel dehidrojenaz enzimi aktivitesi sonucunda MTT olarak adlandırılan sarı renkli tetrazolyum tuzu, mor renkli formazan kristallerine döner. Canlılığın göstergesi olarak söz konusu enzim aktivitesi yüksek ise mor renk daha da koyu görünür. Oluşan mor renkli formazan kristalleri dimetil sülfoksitte (DMSO) çözünür. Daha sonra 570nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbans ölçülür.

4.4. DENTAL PULPA KÖK HÜCRELERİN FARKLILAŞMANIN MİKROBİYOTA ÜRÜNLERİ VARLIĞINDA İNDÜKLENMESİ VE KONTROL GRUBU

DPKH'lerin osteojenik farklılaşması için

- 0,1 µM deksametazon (Merck, ABD),
- 0,2 mM γ ile ışınlanmış L-askorbik asit Merck, ABD),
- 10 mM gliserol fosfat disodyum hidrat tuzu Merck, ABD),
- %10 FBS (Biological Industries, ABD),
- %1 penisilin-streptomisin (Biological Industries, ABD)
- %1 L-glutamin (Merck, ABD) içeren bir koşullandırılmış besiyeri hazırlandı.

Pasaj sayısı P3 olan DPKH'ler 3 farklı 6'lı hücre kuyularına (6'lı well plate) yaklaşık 100-150.000 hücre yerleşecek şekilde aktarılmıştır. Öncelikle 1 gün (24 saat) standart besiyeri (%89 mem-alpha, %5 FBS ve %1 penisilin-streptomisin) ile 37 °C sıcaklık, %5 CO₂, %95 bağıl nem koşullarında inkübasyona kaldırılmıştır.

Ana stok konsantrasyonları 500 mg/mL olan 2A kodlu postbiyotik ve 100 mg/mL olan KS, R1 ve S1 kodlu postbiyotiklerden 1 mg/mL olacak şekilde alınmıştır.

24 saat sonra inkübatörden çıkarılan DPKH içeren 6'lı well plateden standart besiyeri çekilmiştir. Kuyulara 2A, KS, R1 ve S1 kodlu postbiyotikler ile koşullandırılmış (osteojenik) besiyeri tekrar konulmuştur. Her üç günde bir kuyulardaki besiyerleri değiştirilmiştir.

4.5. BOYAMA TESTİ

DPKH'lerin kemik hücrelerine indüklenmesi sürecinde 7., 14. ve 21. günlerde farklılaşma açısından incelenmiştir.

Boyama için öncelikle besiyerleri aspire edilmiş, PBS (Merck, ABD) ile yıkandıktan sonra 1 mL'lik etanol ile 15 fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası önce PBS, daha sonra distile su ile yıkanmıştır. 40 mM pH 4.0-4.2 olan alizarin red boyası (Sigma, ABD) örneklerin üzerine 1 mL olacak şekilde eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra her yıkama 5 dakika olacak şekilde örnekler 5 kez distile su ile yıkandı ve mikroskopla görüntü alındı.

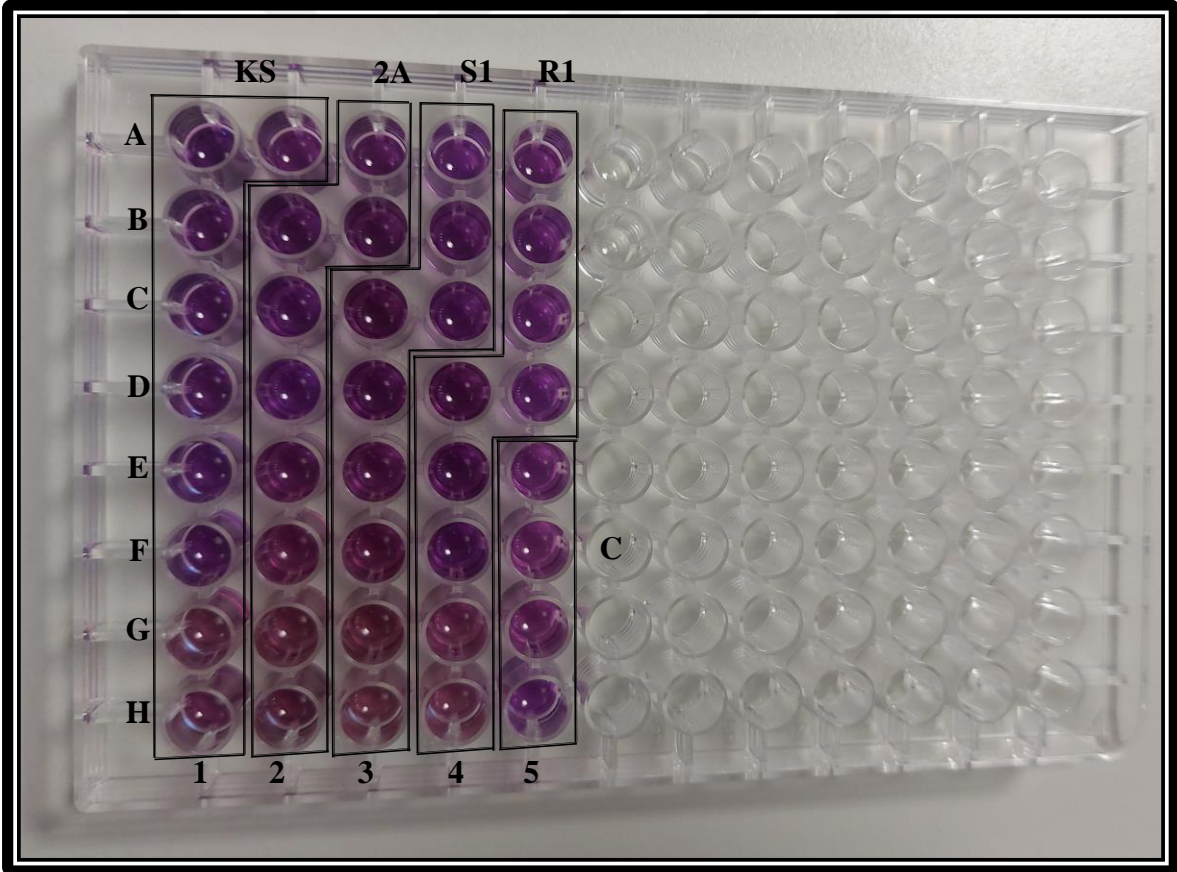
sonucunda hücre doluluk oranı için ZeissPrimovert invert faz-kontrast mikroskopu kullanılmıştır. Canlılık testi için ise Cell-Counter (Thermo Fisher, ABD) cihazı kullanılmıştır.



5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden onam formları ile birlikte sağlıklı bireylerden alınan dişlerden temin edilen DPKH'ler hücre kültürüne alınmıştır. P3'te yeterli sayıya ulaşılmasının ardından öncelikle 4 farklı kaynaktan elde edilmiş olan postbiyotiklerin sitotoksitesi konsantrasyonu değerlendirilmiştir.

“2A” kodlu arı bağırsağından elde edilen postbiyotik 500 mg/mL; “KS” kodlu anne sütünden, “R1” kodlu ile *Spalax* türünün bağırsağından, “S1” kodlu inek sütünden elde edilmiş postbiyotikler ise 100 mg/m konsantrasyonda temin edilmiştir. Daha sonra 10, 100 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanmış postbiyotikler 72 saat süresince hücreler ile inkübe edilmiş olup 72 saat sonunda MTT testi ile analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen görüntü ve değerler aşağıda verilmiştir.



Şekil 5.1. MTT analiz görseli

Çizelge 5.1. MTT Sonuçları

	1	2	3	4	5
A	1,637	1,184	1,227	1,026	1,054
	1,591	1,138	1,181	0,98	1,007
B	1,271	1,458	1,401	1,278	1,143
	1,225	1,411	1,354	1,232	1,096
C	1,24	1,366	1,451	1,196	1,028
	1,194	1,32	1,404	1,15	0,981
D	1,224	1,311	1,45	1,393	1,019
	1,177	1,264	1,404	1,346	0,973
E	1,265	1,254	1,165	1,448	0,919
	1,219	1,207	1,118	1,401	0,873
F	1,353	1,034	1,117	1,384	0,815
	1,306	0,988	1,07	1,338	0,768
G	0,691	0,721	0,753	0,637	0,836
	0,644	0,674	0,707	0,59	0,789
H	0,848	0,872	0,566	0,546	0,937
	0,801	0,826	0,519	0,499	0,89

Elde edilen verilere göre 10, 100 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarındaki 4 farklı kaynaktan elde edilmiş olan postbiyotiklerin 72 saat inkübasyon sonunda kontrol grubuna göre DPKH'lerin proliferasyonu arttırdığı değerlendirilmiştir. Postbiyotiklerin 10-100 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarında sitotoksik olmadığı anlaşılmıştır.

Postbiyotiklerin toksisitesi çalışılan konsantrasyonlarda görülmemesi üzerine söz konusu 4 farklı kaynaktan elde edilmiş olan postbiyotiklerin osteojenik farklılaşmaya etkisi değerlendirilmiştir. Bu kapsamda 500 mg/mL konsantrasyonda olan 2A kodlu postbiyotik ve 100 mg/mL konsantrasyonda olan KS, R1 ve S1 kodlu postbiyotikler 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Böylece hem 1 mg/mL konsantrasyondaki postbiyotiklerin toksisitesi hem de farklılaşmaya olan etkisi araştırılmıştır.


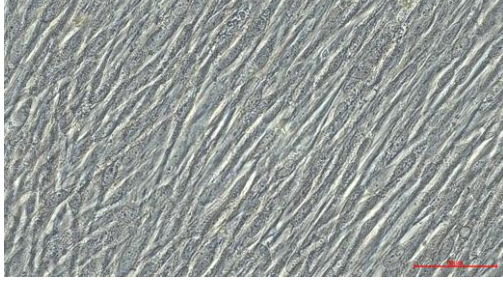

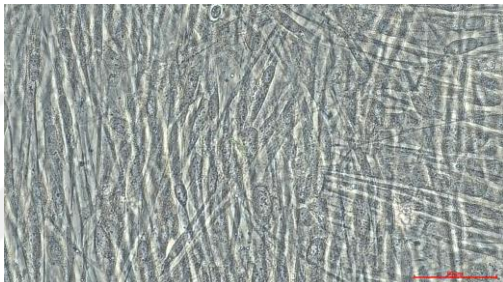

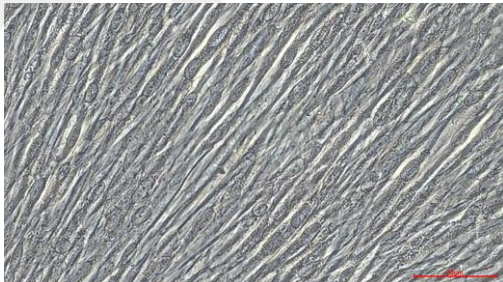
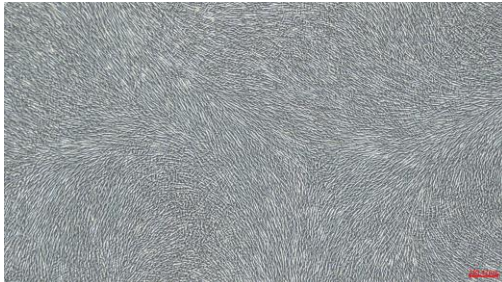
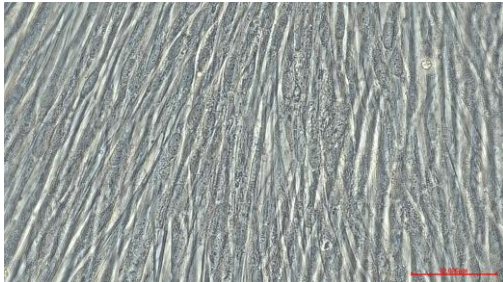
Bu çalışmada DPKH'lar 6'lı hücre kuyularına alındıktan sonra 2A, KS, R1 ve S1 kodlu postbiyotikler ile inkübe edilmiştir. Ayrıca koşullandırılmış (osteojenik) besiyeri ve a-MEM besiyeri ile kontrol grupları oluşturulmuştur. 7., 14., ve 21. günler alizarin red boyaması yapılarak sonuçlar incelendi ve kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır.


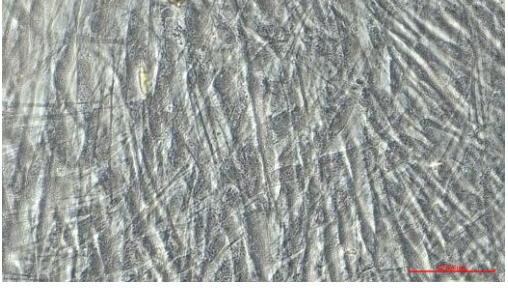


Çalışma sonucunda 2A, KS, R1 ve S1 postbiyotikleri içeren deney grupları ile koşullandırılmış (osteojenik) besiyeri ve a-MEM besiyeri içeren kontrol gruplarında farklılaşma olmadığı görülmüştür. Ayrıca 2A, KS, R1 ve S1 kodlu 4 farklı kaynaktan elde

edilmiş olan postbiyotiklerin kendi aralarında da bir fark olmadığı ve herhangi bir farklılaşmanın gerçekleşmediği anlaşılmıştır. Ancak literatür çalışmalarında da görüldüğü üzere tüm postbiyotik içeren deney gruplarında proliferasyon açısından artış olduğu gözlenmiştir. (Çizelge 5.2. 7. gün sonuçları, Çizelge 5.3. 14. gün sonuçları, Çizelge 5.4. 21. gün sonuçları)



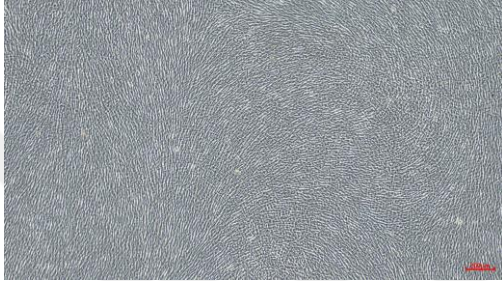
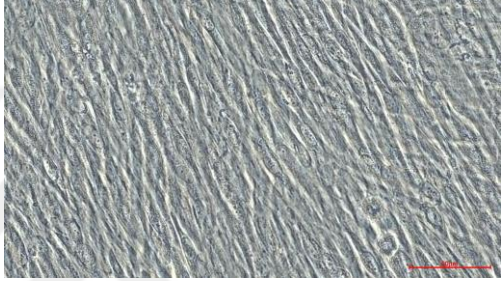

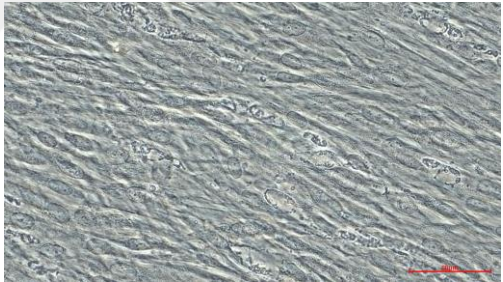

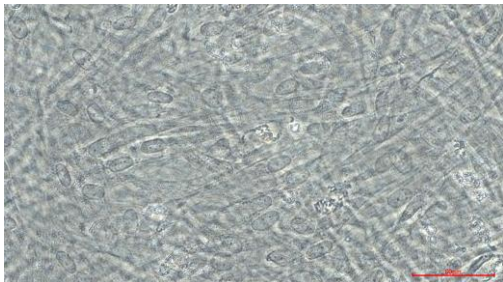





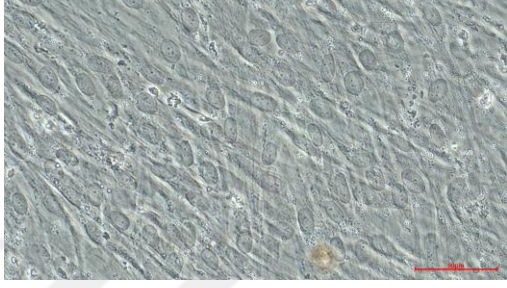
Çizelge 5.2. 7. gün sonuçları

	4x	40x
2A		
KS		
R1		
S1		


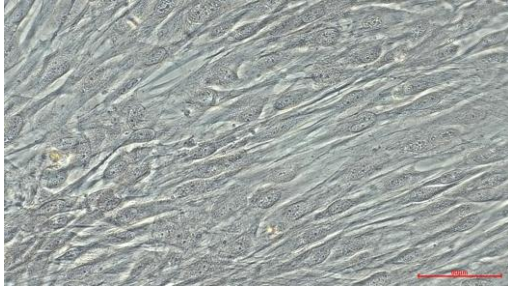

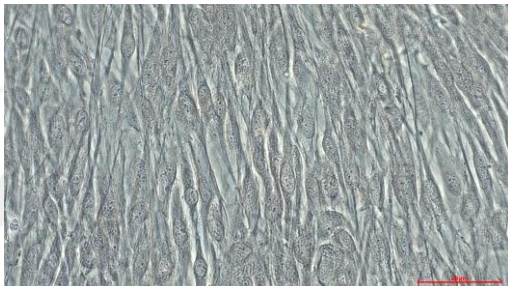



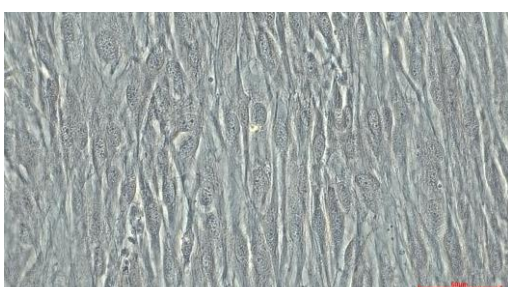
Koşullu besiyeri		
Mem- α besiyeri		


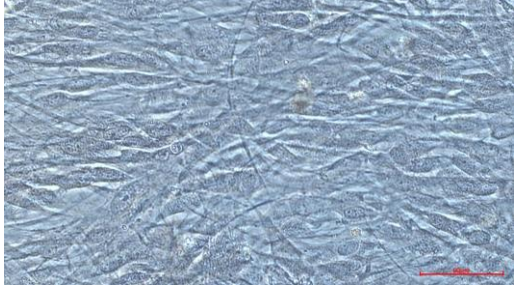


Çizelge 5.3. 14. gün sonuçları

	4x	40x
2A		
KS		
R1		
S1		

Koşullu		
Mem- α besiyeri		

Çizelge 5.4. 21. gün sonuçları

	4x	40x
2A		
KS		
R1		
S1		

Koşullu		
Mem- α besiyeri		

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Kök hücreler, hastalıklı ve/veya hasarlı hücrelerin yerine geçerek homeostazisi sağlarlar (46). Kök hücreler, embriyonik ve yetişkin (embriyonik olmayan) kaynaktan elde edilmelerine yönelik sınıflandırılmaktadır. Yetişkin kök hücreler dermis, kan, yağ, kıkırdak ve kemik iliği gibi farklı kaynaklardan izole edilebilirler. Dental pulpa kök hücreleri de yetişkin mezenkimal kök hücrelerdendir (2).

Yetişkin kök hücrelerin mikroçevreleri olan niş, kök hücre ile etkileşime giren ve kök hücrenin sistemlerini düzenleyen hücreler ve moleküler düzeydeki tüm etkenlerdir. Kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma yeteneklerini dengeler ve kontrol eder. Niş kavramının bilimsel olarak anlaşılmasının ardından in vitro koşullarda izole edilen kök hücrelerin kendi kendini yenilemeleri ve farklılaşmaları için uygun koşullar laboratuvar ortamında da sağlanabilmektedir. DPKH'lerin osteojenik farklılaşması için 0,1 µM deksametazon, 0,2 mM γ ile ışınlanmış L-askorbik asit, 10 mM gliserol fosfat disodyum hidrat tuzu, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin içeren bir koşullandırılmış besiyeri ortamı kullanılmıştır.

Bu çalışmada daha önce literatürde birçok kez kök hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilen postbiyotiklerin dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteoblast hücrelerine farklılaşmasındaki etkisi araştırılmıştır. Bu araştırma sırasında 4 farklı kaynaktan elde edilmiş postbiyotik kullanılmış olup bu postbiyotikler tek bir mikroorganizma türünden ziyade ortamda bulunan tüm mikroorganizmalardan salınan postbiyotiklerdir. Söz konusu postbiyotikler "2A" kodu ile arı bağırsağından, "KS" kodu ile anne sütünden, "R1" kodu ile *Spalax* türünün bağırsağından, "S1" kodu ile inek sütünden elde edilmiştir.

Öncelikle 4 farklı kaynaktan elde edilmiş olan postbiyotiklerin toksisitesi çalışılmıştır. 72 saat boyunca 10, 100 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarında DPKH'lar %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %89 Mem-Alpha içeren besiyerinde inkübe edilmiştir. MTT analizi sonucunda söz konusu postbiyotiklerin 10, 100 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarında toksik olmadığı ve proliferasyonu genel olarak arttırdığı değerlendirilmiştir.

Daha sonra farklı kaynaklardan elde edilmiş 4 farklı postbiyotiğin, dental pulpadan izole edilmiş kök hücrelerin farklılaşmasına olan etkileri araştırılmış ve kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Hipotezimiz ise postbiyotiklerin varlığında dental pulpa kök hücrelerinin kemiğe farklılaşma işlemi daha hızlı ve etkili olacaktır.

Çalışma sonucunda 1 mg/mL konsantrasyonunda 2A, KS, R1 ve S1 postbiyotiklerini içeren deney grupları ile koşullandırılmış (osteojenik) besiyeri ve α -MEM besiyeri içeren kontrol gruplarında farklılaşma olmadığı görülmüştür. Ayrıca 2A, KS, R1 ve S1 kodlu 4 farklı kaynaktan elde edilmiş olan postbiyotiklerin kendi aralarında da bir fark olmadığı ve herhangi bir farklılaşmanın gerçekleşmediği anlaşılmıştır. Ancak literatür çalışmalarında ve tarafımızca yapılan MTT testinde de görüldüğü üzere tüm postbiyotik içeren deney gruplarında proliferasyon açısından artış olduğu gözlenmiştir. (Çizelge 5.2. 7. gün sonuçları, Çizelge 5.3. 14. gün sonuçları, Çizelge 5.4. 21. gün sonuçları)

Mikroçevre olarak da adlandırılabilen niş genel olarak kök hücrelerini yenileyerek çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenlemektedir. Bu düzenleme nişteki kök hücreler ve diğer farklılaşmış hücreler ile ilişkileri, ekstraselüler matriks bileşenleri, büyüme faktörleri, sitokinler, adezyon molekülleri ile pH, metabolit, iyon gibi çevresel faktörler ile sağlanır. Örneğin osteojenik farklılaşmada Runx2, Wnt yolağı, Sox9, Bmp gibi yolaklar vitamin D, retionik asit, SMAD proteinleri, beta katenin gibi faktörlerle düzenlenir (47). Diğer taraftan kök hücrelerin çoğalarak kendilerini yenilemeleri; prostaglandin ve retinoik asit gibi faktörlerin Wnt, Notch ve Hedgegod gibi sinyal yolaklarını düzenlemesi ile sağlanır (48).

Farklılaşma açısından deney grubu ile kontrol grubu arasında bir fark olmaması, kök hücrelerin farklılaşmasını uyaran söz konusu niş ortamındaki hücrel ve moleküler etmenlerin, kullandığımız postbiyotikler arasında bulunmadığının bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Bununla birlikte proliferasyonda görülen artış, söz konusu nişin proliferasyonu sağlayan metabolitleri içerdiği ancak farklılaşmayı sağlayan metabolitleri içermediği değerlendirilmiştir.

Dental pulpa kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını sağlayan koşullu besiyerini içeren pozitif kontrol gruplarında deney gruplarında olduğu gibi farklılaşma gözlenmemiştir. Dekzamethazon, askorbik asit, gliserol fosfat disodyum hidrat tuzu ve L-glutamin içeren pozitif kontrol grubunda farklılaşmanın gözlenmemiş olması, Ankara Üniversitesi Diş

Hekimliği Fakültesi'nden temin edilmiş olan dişlerden izole edilen kök hücrelerin incelenmesini gerektirdiği değerlendirilmiştir. Bu açıdan postbiyotiklerin varlığından bağımsız olarak kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin incelenmesi uygun olacaktır.

Postbiyotiklerin farklı konsantrasyonları ile MTT testinde de gözleendiği üzere literatürde birçok kez kök hücre proliferasyonunda gerçekleşen artış bir diğer etmen olabilir. DPKH'lerin fazlasıyla proliferasyon olmuştur olması, söz konusu niş ortamını hücre düzeyinde etkilemiş ve farklılaşmanın gerçekleşmesini engellemiş olabileceği düşünülmektedir.

4 farklı kaynaktan elde edilen postbiyotiklerin hiçbirinin dental pulpa kök hücrelerinin osteoblast hücrelerine farklılaşmasını sağlamadığı düşünüldüğünde birbirinden farklı olmadığı görülmüştür. Bu sebeple yine 4 farklı postbiyotik de hiç birinin dental pulpa kök hücrelerinin osteoblast hücrelerine farklılaşma nişini sağlayamamış olduğu sonucuna varılmıştır.

6.2. SONUÇ

Kök hücreler ve özellikle dental kök hücreler ile gerçekleştirilen deneysel ve klinik birçok çalışmalarda DPKH'lerin osteoblast hücrelerine farklılaşabildiği gösterilmiştir. Postbiyotiklerin ise obezite, insülin direnci sendromu, diyabet, karaciğer yağlanması, rahatsız ve inflamatuvar bağırsak sendromları, gastrointestinal bozukluklar, atopik dermatit, farklı kanser türleri ve kanserle ilişkili etkileri araştırılmaya devam etmektedir. Bu çalışmada spalax bağırsağından, arı gutundan, anne ve inek sütünden ayrı ayrı elde edilmiş olan postbiyotiklerin dental kök hücrelerin osteojenik farklılaşması açısından kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Osteojenik farklılaşma, deney ve kontrol gruplarında karşılaştırılmıştır. Literatür çalışmalarında birçok kez kök hücrelerin proliferasyonunu ve canlılığını arttırdığı gösterilen postbiyotiklerin osteojenik farklılaşmayı sağlayacak herhangi bir etki gözlenmemiştir. Bununla birlikte arı bağırsağı, anne sütü, *Spalax* türü bağırsağı ve inek sütünden olmak üzere 4 farklı kaynaktan elde edilmiş olan postbiyotiklerin hiçbirinin varlığında farklılaşma gözlenmemiştir. Bu sebeple dental pulpa kök hücrelerinin kemik hücrelerine farklılaşmasını uyaran niş mikroçevresi için gerekli olan hücresel ve moleküler faktörlerin, kullanılan 4 farklı postbiyotik ile sağlanamadığı sonucuna varılmıştır.

Son yıllarda kök hücrelerin hastalıklara olan etkilerinin araştırılmasının yanında konvansiyonel yöntemlere göre daha etkin bir *in vitro* üretim yöntemi ihtiyacı her geçen gün artmaktadır. Konvansiyonel yöntemlere göre daha hızlı ve etkin yöntemlerin araştırılması da önem arz etmektedir. Elde edilen veriler neticesinde postbiyotiklerin hem kendi içlerindeki farklılık açısından hem de osteojenik farklılaşma açısından herhangi bir fark görülmemiş olsa da postbiyotiklerin hücre proliferasyonunu arttığı gözlenmiştir. Bu açıdan postbiyotiklerin kök hücreler ile birlikte kullanımı açısından farklı kök hücre türleri ve farklı konsantrasyondaki farklı postbiyotik kaynakların test edilmesi gerektiği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2004 Apr;36(4):568–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272503003625>
2. Pilbauerová N, Suchánek J. Cryopreservation of Dental Stem Cells. *Acta medica (Hradec Kral [Internet]*. 2018;61(1):1–7. Available from: <https://dx.doi.org/10.14712/18059694.2018.16>
3. van der Valk J. Fetal bovine serum (FBS): Past – present – future. *ALTEX* [Internet]. 2018;99–118. Available from: <https://www.altex.org/index.php/altex/article/view/101>
4. IHLAMUR M, AKGÜL B, ABAMOR EŞ. Farklı Hücre Hatlarında Besiyeri ve FBS'in Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edeb Fakültesi Fen Derg.* 2022;17(1):55–64.
5. OmerOglou E, Karaca B, Kibar H, Haliscelik O, Kiran F. The role of microbiota-derived postbiotic mediators on biofilm formation and quorum sensing-mediated virulence of *Streptococcus mutans*: A perspective on preventing dental caries. *Microb Pathog* [Internet]. 2022 Mar;164:105390. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401022000031>
6. Ateş U. Let's familiarize ourselves with the stem cell. *Istanbul Bilim Univ Florence Nightingale Transplant J.* 2016;1(1):19–28.
7. Erdal Y. Current mesenchymal stem cell applications with regard to clinical studies. *Istanbul Bilim Univ Florence Nightingale Transplant J.* 2017;2(2):52–5.
8. Thieman WJ, Palladino MA. *Introduction to Biotechnology.* 3rd ed. Pearson Education; 2012. 402 p.
9. Ohlstein B, Kai T, Decotto E, Spradling A. The stem cell niche: Theme and variations. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(6):693–9.
10. Gabr HM, El-Kheir WA. Stem cells: definition, biological types, classifications, and properties. In: *Stem Cell Therapy* [Internet]. Elsevier; 2023. p. 21–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012821569200003X>

11. Unsal G, Ozmekik O, Ulukapı I. Dental Stem Cells and The Importance of Deciduous Teeth for Stem Cell Studies. *J Dent Fac Atatürk Uni.* 2014;8:98–106.
12. Liu D, Cheng F, Pan S, Liu Z. Stem cells: A potential treatment option for kidney diseases. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):1–20.
13. Moradi S, Mahdizadeh H, Šarić T, Kim J, Harati J, Shahsavarani H, et al. Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): Social, legal, and ethical considerations. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):1–13.
14. Ye L, Swingen C, Zhang J. Induced Pluripotent Stem Cells and Their Potential for Basic and Clinical Sciences. 2013;63–72.
15. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006;126(4):663–76.
16. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007;131(5):861–72.
17. Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol [Internet].* 2014 Mar 23;32(3):252–60. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt.2816>
18. Ören H. Kök Hücreler. *Stem Cells.* 2019;
19. Asutay F, Acar AH, Yolcu Ü, Kırtay M, Alan H. Dental Stem Cell Sources and Their Potentials for Bone Tissue Engineering. *J Istanbul Univ Fac Dent.* 2015;49(2):51.
20. Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol [Internet].* 2010 Dec;20(12):715–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892410002102>
21. Al Madhoun A, Sindhu S, Haddad D, Atari M, Ahmad R, Al-Mulla F. Dental Pulp Stem Cells Derived From Adult Human Third Molar Tooth: A Brief Review. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9(October):1–20.
22. ERGEN E. İnsan diş pulpa mezenkimal kök hücrelerinin koşullu besiyeri aracılığıyla osteojenik olarak farklılaştırılması: deneysel çalışma [Internet]. T.C. Erciyes Üniversitesi; 2017. Available from:

<https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=X2aixsYzQ4KkVop3RBGW0Q&no=jVHGnMv73Q7JIW35mUIEKA>

23. Çağlayan A, Elbe H. Her Yönüyle Dental Kök Hücreler Dental Stem Cells. 2020;7(1):60–4.
24. Leyendecker Junior A, Gomes Pinheiro CC, Lazzaretti Fernandes T, Franco Bueno D. The use of human dental pulp stem cells for in vivo bone tissue engineering: A systematic review. *J Tissue Eng* [Internet]. 2018 Jan 1;9:204173141775276. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2041731417752766>
25. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2000 Dec 5;97(25):13625–30. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.240309797>
26. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, et al. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Gingiva Are Capable of Immunomodulatory Functions and Ameliorate Inflammation-Related Tissue Destruction in Experimental Colitis. *J Immunol* [Internet]. 2009 Dec 15;183(12):7787–98. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.0902318>
27. Bernar A, Gebetsberger JV, Bauer M, Streif W, Schirmer M. Optimization of the Alizarin Red S Assay by Enhancing Mineralization of Osteoblasts. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Dec 31;24(1):723. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/1/723>
28. Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol*. 2017;16(2):99–117.
29. Jochems CEA, van der Valk JBF, Stafleu FR, Baumans V. The Use of Fetal Bovine Serum: Ethical or Scientific Problem? *Altern to Lab Anim* [Internet]. 2002 Mar 1;30(2):219–27. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/026119290203000208>
30. Brindley DA, Davie NL, Culme-Seymour EJ, Mason C, Smith DW, Rowley JA. Peak serum: implications of serum supply for cell therapy manufacturing. *Regen Med* [Internet]. 2012 Jan;7(1):7–13. Available from:

<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/rme.11.112>

31. Hou K, Wu Z-X, Chen X-Y, Wang J-Q, Zhang D, Xiao C, et al. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2022 Apr 23;7(1):135. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-022-00974-4>
32. Gomaa EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* [Internet]. 2020;113(12):2019–40. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>
33. Luan Y, Li M, Zhou W, Yao Y, Yang Y, Zhang Z, et al. The Fish Microbiota: Research Progress and Potential Applications. *Engineering* [Internet]. 2023 Mar; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095809923000991>
34. Zolkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M, Feleszko W. Postbiotics—A Step Beyond Pre- and Probiotics _ Enhanced Reader. *Nutrients*. 2020;1–17.
35. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* [Internet]. 1989 May;66(5):365–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2666378>
36. Markowiak P, Ślizewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*. 2017;9(9).
37. Puebla-barragan S, Reid G. Probiotics in Cosmetic and Personal Care Products : Trends and Challenges. 2021;1–11.
38. Scarpellini E, Rinninella E, Basilico M, Colomier E, Rasetti C, Larussa T, et al. From Pre- and Probiotics to Post-Biotics : A Narrative Review †. 2022;
39. Garcia HS. Trends in Food Science & Technology Postbiotics : An evolving term within the functional foods field. 2018;75(June 2017):105–14.
40. Kibar H. PROBİYOTİK KAYNAKLI POSTBİYOTİK MEDİYATÖRLERİN İNSAN PERİODONTAL LİGAMENT FİBROBLAST HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ [Internet]. TC ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ; 2020. Available from: https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=iPRMowPW_z3IqgcKqPEhPw&no=o6iBZeM1pREZ5bOHUnNEcA
41. Zhou T, Yuan Z, Weng J, Pei D, Du X, He C, et al. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2021 Dec

- 12;14(1):24. Available from:
<https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-021-01037-x>
42. Xiao E, He L, Wu Q, Li J, He Y, Zhao L, et al. Microbiota regulates bone marrow mesenchymal stem cell lineage differentiation and immunomodulation. 2017;1–7.
 43. Su S, Ren Y, Zhang Y, Zhao Y, Xiao E. Antibiotics Disturb Dentin Formation and Differentiation of Dental Pulp Stem Cells: The Role of Microbiota in Cellular Turnover of Mouse Incisor. 2020;2020.
 44. Lee H, Bo K, Kwon O, Seul Y, Choi E, Dong W. *Limosilactobacillus reuteri* DS0384 promotes intestinal epithelial maturation via the postbiotic effect in human intestinal organoids and infant mice. *Gut Microbes* [Internet]. 2022;14(1):1–22. Available from: <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2121580>
 45. OmerOglou E, Karaca B, Kibar H, Haliscelik O, Kiran F. The role of microbiota-derived postbiotic mediators on biofilm formation and quorum sensing-mediated virulence of *Streptococcus mutans*: A perspective on preventing dental caries. *Microb Pathog*. 2022;164.
 46. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2008 Jan;9(1):11–21. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrm2319>
 47. Rutkovskiy A, Stensløkken K-O, Vaage IJ. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med Sci Monit Basic Res* [Internet]. 2016 Sep 26;22:95–106. Available from: <http://www.basic.medscimonit.com/abstract/index/idArt/901142>
 48. Cicek G, Duman S, Aktan TM. Mesenchymal Stem Cell Signaling Pathway and Interaction Factors. *Experimed*. 2020;9(3):120–9.

EKLER

EK 1 ETİK KURUL ONAYI



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Muhammet Habip GÜÇLÜ

Doğum Yeri:

Doğum Tarihi:

Medeni Hali:

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Ümitköy Anadolu Lisesi (2003-2007)

Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji (2007-2012)

İş Tecrübesi

Kurumu:

Görevi:

Yılları: