



**PERİODONSIYUM KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
KEMİK FARKLILAŞMA KAPASİTELERİNİN 2 VE 3 BOYUTLU
KÜLTÜR ORTAMINDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

Kadriye Merve ALTİKAT

**DOKTORA TEZİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Kadriye Merve ALTİKAT

08/12/2022

PERİODONSIYUM KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN KEMİK
FARKLILAŞMA KAPASİTELERİNİN 2 VE 3 BOYUTLU KÜLTÜR ORTAMINDA
DEĞERLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Kadriye Merve ALTIKAT

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2022

ÖZET

Periodonsiyum, dişin temel dokuları olan dişeti, periodontal ligament (PDL), sement ve alveolar kemikten meydana gelmektedir. Periodontal hastalıkların tedavisinde Faz I tedavi yöntemleri ve gerekli durumlarda ileri periodontal cerrahi teknikler uygulansa da hedeflenen rejenerasyona ne yazık ki bu tedavi yöntemleriyle ulaşamamıştır. Bu bağlamda hücresel tedavi amacıyla mezenkimal kök hücrelerden (MKH) yararlanmak son yıllarda önemli bir seçenek olarak görülmektedir. MKH'ler farklı kaynaklardan elde edilebildikleri ve kökenlerine göre tedavi edici özellikleri değişebildiği için periodontal tedavilerde hangi MKH tipinin daha avantajlı olacağına yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, 2 boyutlu (2B) ve 3 boyutlu (3B) *in vitro* kültür ortamlarında periodonsiyumdan köken alan adipoz doku (AD), dental pulpa (DP) ve PDL kökenli MKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasitelerinin karşılaştırılmasıdır. Bu amaçla 2B ve hidroksiapatit (HA) takviyesi ile oluşturulan 3B kültür ortamlarında 28 gün süre ile farklılaştırılan MKH'ler akım sitometri, histolojik ve immün floresan (IF) boyamalar ile gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda hem 2B hem 3B kültür ortamlarında hücrelerin osteojenik farklılaşma gösterdikleri belirlenmiş olup tüm analizler birlikte değerlendirildiğinde en yüksek osteojenik farklılaşma potansiyelinin PDL kökenli MKH'lere ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 3B kültür ortamlarının 2B kültür ortamlarına göre osteojenik farklılaşma için daha avantajlı olduğu bulgulanmıştır. Çalışmamızda geliştirdiğimiz yüksek oranda HA içeren 3B kültür ortamı ile en yüksek farklılaşma potansiyeli gösteren PDL-MKH'lerin birlikte kullanımının gelecekteki periodonsiyum tedavilerinde etkili bir rejeneratif yaklaşım olarak kullanılabilir.

Bilim Kodu : 1017
Anahtar Kelimeler : Doku iskelesi, *In vitro*, Kök hücre, Periodontal doku mühendisliği, Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu, Periodontal ligament
Sayfa Adedi : 145
Danışman : Prof. Dr. Ayşe Emel ÖKTE
İkinci Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Hakan DARICI

EVALUATION OF BONE DIFFERENTIAL CAPACITY OF PERIODONTIUM
ORIGINATED MESENCHYMAL STEM CELLS IN 2 AND 3 DIMENSIONAL CULTURE
ENVIRONMENT

(Ph. D. Thesis)

Kadriye Merve ALTIKAT

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

December 2022

ABSTRACT

Periodontium consists of gingiva, periodontal ligament (PDL), cementum and alveolar bone, which are the basic tissues of the tooth. Although Phase I treatment methods and advanced periodontal surgical techniques are applied when necessary in the treatment of periodontal diseases, unfortunately, the targeted regeneration could not be achieved with these treatment methods. In this context, using mesenchymal stem cells (MSCs) for cellular therapy has been seen as an important option in recent years. Since MSCs can be obtained from different sources and their therapeutic properties may vary according to their origin, there is no study on which MSC type would be more advantageous in periodontal treatments. The aim of this study is to compare the osteogenic differentiation capacities of adipose tissue (AD), dental pulp (DP) and PDL-derived MSCs originating from the periodontium in 2-dimensional (2D) and 3-dimensional (3D) in vitro culture media. For this purpose, MSCs differentiated for 28 days in 3D culture media created with 2D and hydroxyapatite (HA) supplementation were evaluated by flow cytometry, histological and immune fluorescent (IF) staining and real-time polymerase chain reaction (PCR) methods. As a result of the study, it was determined that the cells showed osteogenic differentiation in both 2D and 3D culture media, and when all analyzes were evaluated together, it was determined that the highest osteogenic differentiation potential belonged to PDL-derived MSCs. In addition, it has been found that 3D culture media are more advantageous for osteogenic differentiation than 2D culture media. The combined use of the 3D culture medium containing high HA and PDL-MSCs, which show the highest differentiation potential, can be used as an effective regenerative approach in future periodontium treatments.

Science Code : 1017
Key Words : Guided tissue regeneration, *In vitro*, Stem cell, Periodontal ligament, Periodontal tissue engineering, Tissue scaffold
Page Number : 145
Supervisor : Prof. Dr. Ayşe Emel ÖKTE
Co-Supervisor : Assist. Prof. Dr. Hakan DARICI

*Bu tez çalışması kıymetli ailem ve
Ulu Önderimiz Mustafa Kemal ATATÜRK'ün aziz hatırasına ithaf edilmiştir.*

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimde bilgi ve tecrübesiyle yol gösterici olan akademik danışmanım, kıymetli hocam Prof. Dr. Emel ÖKTE'ye,

Tez çalışmamda laboratuvar ortamına dair bilgi ve deneyim kazanmamı sağlayan ikinci akademik danışmanım değerli Dr. Hakan DARICI ve kıymetli hocam Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e

Lisans hayatımdan itibaren Periodontoloji alanını sevdiren ve bu alanda uzmanlaşmam için beni yönlendiren, kıymetli hocalarım Prof. Dr. Mehmet YALIM ve Prof. Dr. Berrin ÜNSAL'a, her zaman desteklerini hissettiren, samimiyet ve sevgisiyle hayatıma dokunan Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji A.D.'nın çok kıymetli öğretim üyelerine,

En zor günlerimde elimden tutarak beni tekrar motive eden Başkent Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nin değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Emine ALAADDİNOĞLU, Doç. Dr. Bahar Füsun ODUNCUOĞLU ve Prof Dr. Ayşe GÜLŞAHI'na,

Beni bugünlere hazırlayan, gizli kahramanlarıma ev sahipliği yapan Özel Genç Karınca Dershanesi öğretmenleri başta olmak üzere üzerimde emeği olan tüm öğretmenlerime,

Lisans hayatımın ilk gününden itibaren hayatımda olan, beraber büyüdüğüm, tüm sevinç ve kederlerime ortak, dostluktan öte bir bağ ile bağlı olduğum kıymetli arkadaşlarım Dr. Başak ARSLAN'a,

Son olarak, en kıymetli ve anlamlı teşekkürümü hayatımın baş kahramanları, her zaman beni destekleyen, kimi zaman bana benden daha çok güvenen, en kıymetli varlıklarım olan annem Hava ALTİKAT, babam Ömer Eşref ALTİKAT ve kardeşim İbrahim Alperen ALTİKAT'a sunarım.

Bu tez çalışması YÖK 100/2000 Doktora Programı Kök Hücre alanı kapsamında ve TDK-2021-6977 Proje Kodu ile Gazi Üniversitesi BAP Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kök Hücre Araştırmalarına Genel Bakış	5
2.2. Kök Hücre Kavramı ve Özellikleri	6
2.2.1. Farklılaşma yeteneklerine göre kök hücreler	7
2.2.2. Elde edildikleri kaynaklara göre kök hücreler	10
2.3. Mezenkimal Kök Hücre	12
2.3.1. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (Kİ-MKH)	15
2.3.2. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AD-MKH)	15
2.3.3. Dental dokulardan elde edilen mezenkimal kök hücreler (D-MKH).....	16
2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerde CD Yüzey Belirteçleri	20
2.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Özellikleri.....	22
2.5.1. MKH'lerin osteojenik farklılaşma özellikleri	22
2.6. Doku Mühendisliği.....	24
2.7. MKH'lerin Farklılaşma Seviyelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Analizler....	30
2.7.1. Akım sitometri analizleri.....	30

	Sayfa
2.7.2. Alizarin red histolojik boyaması	31
2.7.3. İmmün floresan boyama.....	31
2.7.4. Gerçek zamanlı PZR (real-time PCR) analizleri.....	33
2.8. Osteojenik Farklılaşma Analizlerinde Değerlendirilen Genler.....	34
2.8.1. GAPDH	34
2.8.2. ALP	34
2.8.3. BMP-2	35
2.8.4. RUNX2	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. Gereçler	37
3.1.1. Sarf malzemeler	37
3.1.2. Kullanılan cihazlar	38
3.1.3. Kullanılan kitler	38
3.1.4. Kimyasal malzemeler.....	39
3.1.5. Kullanılan primer gen dizileri	40
3.1.6. Hücre hatları.....	40
3.2. Yöntem.....	42
3.2.1. Hücrelerin deneye hazırlanması.....	44
3.2.2. 2B ve 3B kültür ve osteojenik farklılaşma aşaması	46
3.2.3. Karakterizasyon işlemleri.....	50
4. BULGULAR	65
4.1. 2B deneylerde Kültür Süresi Boyunca Kaydedilen Işık Mikroskop Görüntüleri	65
4.2. Histolojik Boyamalar	73
4.3. İmmün Floresan Boyamalar	76
4.4. Akım sitometri Analizlerinde Elde Edilen Bulgular	82

Sayfa

4.5. Osteojenik Farklılaşma Gruplarında Gerçek Zamanlı PZR Analizinde Elde Edilen Bulgular	89
4.6. İstatistiksel Analizler.....	92
4.6.1. Mezenkimal kök hücrelerin gen ekspresyon seviyelerinin çalışma gruplarına göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi	92
4.6.2. Çalışma gruplarında mezenkimal kök hücrelerin gen ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	96
5. TARTIŞMA	99
6. SONUÇ	117
KAYNAKLAR	119
ÖZGEÇMİŞ	145

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. 50 nmol hacminde OPC grade primerler	40
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan MKHH'lere ait akım sitometri analiz sonuçları.....	42
Çizelge 3.3. Histolojik boyamalarda değerlendirilen çalışma grupları.....	51
Çizelge 3.4. Osteojenik farklılaşma deneylerinin değerlendirilmesi için oluşturulan IF çalışma grupları	54
Çizelge 3.5. Gerçek zamanlı PZR analizi için oluşturulan çalışma grupları	56
Çizelge 3.6. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit'e ait sıcaklık ve süre bilgileri.....	60
Çizelge 3.7. SensiFAST SYBR Hi-ROX Kit (Bioline) hazırlanma protokolü.....	60
Çizelge 3.8. BIO-RAD Real-Time PCR System cihazında analiz aşamaları	61
Çizelge 4.1. Çalışma gruplarının alizarin red boyama yoğunlukları. (-) ile ifade edilen gruplarda boyanma gözlemlenmezken (+) ile ifade edilen gruplarda boyanma gözlenmiş olup boyanma yoğunlukları (osteojenik farklılaşma) (+) sembollerinin sayısı ile ifade edilmiştir	75
Çizelge 4.2. 2B çalışma gruplarında IF analizlerde kullanılan primer antikorlar ve çalışma gruplarda ışıma miktarlarının değerlendirilmesi. (Oluşturulan çizelgede (-) ile ifade edilen gruplarda boyanma gözlemlenmezken (+) ile ifade edilen gruplarda boyanma gözlemlenmiş olup boyanma yoğunlukları (osteojenik farklılaşma) (+) sembollerinin sayısı ile ifade edilmiştir).....	79
Çizelge 4.3. 3B çalışma gruplarında IF analizlerde kullanılan primer antikorlar ve çalışma gruplarının ışıma miktarlarının değerlendirilmesi. (Oluşturulan çizelgede (-) ile ifade edilen gruplarda boyanma gözlemlenmezken (+) ile ifade edilen gruplarda boyanma gözlemlenmiş olup boyanma (osteojenik farklılaşma) yoğunlukları (+) sembollerinin sayısı ile ifade edilmiştir).....	81
Çizelge 4.4. İzole edilen RNA konsantrasyonları ve saflık değerleri	90

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Kök hücrelerden mitoz sonucunda oluşan hücrelerden biri kök hücre ile aynı özelliğe sahipken, diğeri fonksiyonel olarak farklılaşacağı dokuya ait özellik sergiler.....	6
Şekil 2.2. Farklılaşma yeteneklerine (turuncu) ve elde edildikleri kaynaklara göre (mavi) kök hücreler.....	7
Şekil 2.3. Farklılaşma yeteneklerine göre kök hücreler	8
Şekil 2.4. Pluripotent ve Unipotent kök hücrelerin farklılaşması	10
Şekil 2.5. Embriyonik kök hücre modelasyonu	11
Şekil 2.6. İnsan kaynaklı MKH'ler kemik iliği, adipoz doku, amniyotik sıvı, göbek kordonu, Wharton jeli, periodonsiyum ve dental pulpa gibi çeşitli dokulardan izole edilebilir	14
Şekil 2.7. Dental dokulardan elde edilen MKH. Dental apikal papilla kökenli MKH (DAP-MKH), eksfoliye süt dişlerinden izole edilen MKH (SD-MKH), dental folikül kaynaklı MKH (DF-MKH), dental pulpa kaynaklı MKH (DP-MKH), periodontal ligament kökenli MKH (PDL-MKH)	17
Şekil 2.8. Dental kök hücrelerinin kaynaklarını ve yüzey belirteçlerini gösteren şematik çizimler.....	21
Şekil 2.9. 2B ve 3B Kültürü şematik diyagramı	26
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan MKHH'lere ait akım sitometri analiz sonuçları.....	42
Şekil 3.2. Çalışma planı	44
Şekil 4.1. Çalışma başlangıcında AD-MKH'lere ait akım sitometri analiz sonuçları ...	82
Şekil 4.2. Çalışma başlangıcında DP-MKH'lere ait akım sitometri analiz sonuçları....	83
Şekil 4.3. Çalışma başlangıcında PDL-MKH'lere ait akım sitometri analiz sonuçları .	83
Şekil 4.4. AD-MKH'lerde 2B çalışma gruplarında a) KGB ile kültüre edilen hücrelerin akım sitometri analizlerinde bulgularanan yüzey belirteçleri % değerleri (CD90: %91.22, CD105: %94.87, CD73: %99.64, CD45/34/11b/HLA-DR: %0.05), b) OFGB ile kültüre edilen hücrelerin akım sitometri analizlerinde bulgularanan yüzey belirteçleri % değerleri (CD90: %66.74, CD105: %0.92, CD73: %96.65, CD45/34/11b/HLA-DR: %0.01).....	84

Şekil	Sayfa
Şekil 4.5. DP-MKH’lerde 2B çalışma gruplarında a) KGB ile kültüre edilen hücrelerin akım sitometri analizlerinde bulgularan yüzey belirteçleri % değerleri (CD90: %95.3, CD105: %97.98, CD73: %99.5, CD45/34/11b/HLA-DR: %0.03), b) OFGB ile kültüre edilen hücrelerin akım sitometri analizlerinde bulgularan yüzey belirteçleri % değerleri (CD90: %31.08, CD105: %2.77, CD73: %89.43, CD45/34/11b/HLA-DR: %0).....	85
Şekil 4.6. PDL-MKH’lerde 2B çalışma gruplarında a) KGB ile kültüre edilen hücrelerin akım sitometri analizlerinde bulgularan yüzey belirteçleri % değerleri (CD90: %19.22, CD105: %7.79, CD73: %97.04, CD45/34/11b/HLA-DR: %0.04), b) OFGB ile kültüre edilen hücrelerin akım sitometri analizlerinde bulgularan yüzey belirteçleri % değerleri (CD90: %7.79, CD105: %0.71, CD73: %97.04, CD45/34/11b/HLA-DR: %0.04).....	86
Şekil 4.7. Akım sitometri analizinde elde edilen veriler	87
Şekil 4.8. OFGB ile kültüre edilen AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH’lerin CD90 ekspresyon seviyelerinin çalışma başlangıcında elde edilen ekspresyon seviyelerine göre istatistiksel olarak karşılaştırılması	88
Şekil 4.9. OFGB ile kültüre edilen AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH’lerin CD105 ekspresyon seviyelerinin çalışma başlangıcında elde edilen ekspresyon seviyelerine göre istatistiksel olarak karşılaştırılması	88
Şekil 4.10. OFGB ile kültüre edilen AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH’lerin CD73 ekspresyon seviyelerinin çalışma başlangıcında elde edilen ekspresyon seviyelerine göre istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	89
Şekil 4.11. GAPDH, ALP, BMP-2 ve RUNX genlerine ait amplifikasyon eğrileri	91
Şekil 4.12. AD-MKH’lere ait gen ekspresyon seviyelerine ait istatistiksel kat artış grafikleri.....	92
Şekil 4.13. DP-MKH’lere ait gen ekspresyon seviyelerine ait istatistiksel kat artış grafikleri.....	94
Şekil 4.14. PDL-MKH’lere ait gen ekspresyon seviyelerine ait istatistiksel kat artış grafikleri.....	95
Şekil 4.15. 2B çalışma gruplarında OFGB ile kültüre edilen MKH’lerin gen ekspresyon seviyelerine ait istatistiksel kat artış grafikleri.....	96
Şekil 4.16. 3B çalışma gruplarında Boneink™ ve KGB ile kültüre edilen MKH’lerin gen ekspresyon seviyelerine ait istatistiksel kat artış grafikleri.....	97
Şekil 4.17. 3B çalışma gruplarında Boneink™ ve OFGB ile kültüre edilen MKH’lerin gen ekspresyon seviyelerine ait istatistiksel kat artış grafikleri.....	98

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. 3B kültür ortamlarında kullanılan Boneink™ ve Baseink™	47
Resim 3.2. Hidrojellerin hazırlanma aşamaları	48
Resim 3.3. a. Alizarin red boyası, Sigma; b. Kağıt filtre kullanılarak homojenize edilmesi; c. Görüntülerin alındığı Nikon Eclipse TS2 marka ışık mikroskobu.....	52
Resim 3.4. Akım sitometri analizlerinin değerlendirilmesi için hazırlanan tüpler	56
Resim 3.5. a. 3B çalışma gruplarında jelleri uzaklaştırmak için kullanılan hücre süzgeci, b. Santrifüj edilen çalışma grupları, c. 2B çalışma gruplarında santrifüj sonrası gözlemlenen tabakalar, d. 3B çalışma gruplarında santrifüj sonrası gözlemlenen tabakalar	58
Resim 3.6. Nanodrop, Thermofisher	59
Resim 3.7. BIO-RAD Real-Time PCR System cihazı	61
Resim 4.1. AD-MKH'lerin 2B deneylerde 28 günlük kültür süresi boyunca kaydedilen ışık mikroskop görüntüleri (100X).....	66
Resim 4.2. DP-MKH'lerin 2B kültür ortamında 28 günlük kültür süresi boyunca kaydedilen mikroskop görüntüleri (100X).....	68
Resim 4.3. PDL-MKH'lerin 2B kültür ortamında 28 günlük kültür süresi boyunca kaydedilen mikroskop görüntüleri (100X).....	70
Resim 4.4. 2B kültür ortamında 28 gün kültüre edilen çalışma gruplarına ait kaydedilen ışık mikroskop görüntüleri (100X).....	72
Resim 4.5. Çalışma gruplarında alizarin red boyamalarına ait ışık mikroskop görüntüleri (100X).	74
Resim 4.6. IF Analizlerine 2B Kontrol grubuna ait mikroskobik görüntüler (100X büyütme)	76
Resim 4.7. 2B deneylerde OFGB ile kültüre edilen hücre hatlarının IF boyamalarının ışık mikroskobu altındaki görüntüleri (200X)	78
Resim 4.8. 3B deneylerde Boneink™ kültür ortamında KGB ve OFGB ile kültüre edilen çalışma gruplarına ait IF boyamaların mikroskobik görüntüleri(100X)	80

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklamalar
AD	Adipoz Doku
ALP	Alkalen Fosfataz (Alkalen Phosphatase)
BMP	Kemik Farklılaşma Proteini (Bone Morphogenetic Protein)
CD	Yüzey Belirteci (Clusters of Differentiation)
DAP	Dental Apikal Papilla
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DP	Dental Pulpa
EKH	Embriyonik Kök Hücreler
FBS	Fetal Sığır Serumumu (Fetal Bovine Serum)
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
HA	Hidroksiapatit
HLA	İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen)
ISSCR	Uluslararası Kök Hücre Araştırma Komitesi (International Society for Stem Cell Research)
KG	Kontrol Grubu
KGB	Kontrol Grubu Besiyeri
Kİ	Kemik İliği
miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
NK	Negatif Kontrol
Notch-1	Neurogenic locus notch homolog protein
OCN	Osteokalsin (Osteocalcin)
OFG	Osteojenik Farklılaşma Grubu
OFGB	Osteojenik Farklılaşma Grubu Besiyeri

Kısaltmalar	Açıklamalar
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate Buffered Saline)
PDL	Periodontal Ligament
PFA	Paraformaldehit
PTM	Post Transkripsiyonel Modifikasyon
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SD	Süt Dişı
SEM	Ortalamanın Standart Hatası (Standard Error of the Mean)
SKH	Somatik Kök Hücreler
SVF	Stromal Vasküler Fraksiyon
TCP	Triksiyum Fosfat (Tricalcium Phosphate)
TZP	Trombositten Zengin Plazma
VEBF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
YDR	Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu

1. GİRİŞ

Periodonsiyum, dişin temel dokuları olan dişeti, periodontal ligament (PDL), sement ve alveolar kemikten meydana gelmektedir. Diş ve dişeti kenarında biriken biyofilmin uzun süreli retansiyonu periodontal dokularda patolojik değişikliklere neden olur. Periodontal hastalıkların tedavisinde Faz I tedavi yöntemleri ve gerekli durumlarda ileri periodontal cerrahi teknikler uygulanmaktadır. Bu tedaviler sonrasındaki iyileşmelerde, genelde tam bir rejenerasyon elde edilememekte ve periodonsiyumda azalma, kemik ve PDL gibi anatomik yapılarda bozulmalar gerçekleşebilmektedir. Periodonsiyumda meydana gelen bu yıkım sonucunda alveolar kemikte kayıp, dişlerde mobilite ve diş kayıpları gözlenebilmektedir (Pitaru, McCulloch ve Narayanan, 1994).

Periodontal rejenerasyon, hastalık sonucu hasara uğramış periodonsiyumun tüm bileşenlerinin orijinal form ve fonksiyonunun yeniden yapılanmasını sağlayan karmaşık bir süreçtir (Annunziata ve diğerleri, 2005; Garrett, 1996). Rejeneratif periodontal tedavinin amacı alveol kemik ve sementin rejenerasyonunu sağlamak ve yeni periodontal ligament oluşumunu indüklemektir (Carranza ve diğerleri, 2002). Günümüze kadar periodontal rejenerasyonu sağlamak için pek çok yöntem uygulanmıştır. Öncelikle uygulanan Faz-1 tedavi ile oral hijyen eğitimi, diş taşı temizliği ve kök yüzey düzeltme işlemleri yapılarak hastalık oluşturacak faktörler elimine edilmektedir. Faz-1 tedaviyi takiben kimyasal maddelerle kök yüzey dezenfeksiyonu ve hazırlanması, çeşitli greft materyallerinin (otojen, allojen, sentetik), fiziksel bariyer yöntemi olarak membranların ve polipeptit büyüme faktörleri ve ataşman faktörlerinin uygulanması gibi Faz-2 Tedavi yöntemleri sıralanabilir (Garrett, 1996).

Periodonsiyumun rejenerasyonunu hedefleyen bir diğer yöntem greft ve membranların bir arada kullanıldığı yönlendirilmiş doku rejenerasyonu tekniğidir. Bu teknikle periodontal rejenerasyonu sağlayacak olan hücre popülasyonlarına öncelik verilerek kök yüzeyinde rejenerasyon artışı sağlanabilir (Cortellini, Prato ve Tonetti, 1993). Ancak başarılı sonuçlar elde edilmiş olsa da sonuçların öngörülebilirlik derecesi azdır. Uygulanan greft materyalleri veya bariyer membranların yerleştirilmesini takiben iyileşme periyodunda dokuda enfeksiyon gelişebilmekte bu durum da rejenerasyonu olumsuz etkileyebilmektedir. (Macdonald ve diğerleri, 1998). Bartold ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada membran bariyerin kullanım amacı epitel dokunun geçişini engellemek olmasına rağmen

yapılan histolojik incelemelerin çoğunda membran ve diş yüzeyi arasında epitel dokunun bulunduğu tespit edilmiştir (Bartold ve diğerleri, 2000).

Periodonsiyumun rejenerasyonunu hedefleyen bu çalışmalarda dokuların hastalık öncesi duruma gelecek şekilde tam bir rejenerasyon sağlanması hedefine ne yazık ki mevcut tedavi yöntemleriyle ulaşılamamıştır. Bu bağlamda haras gören periodonsiyumu onarmada bir hücresel tedavi yöntemi olarak kök hücrelerin kullanımı ön plana çıkmaktadır. Kök hücre tedavisi uygulamaları hakkındaki bilgi ve farkındalığın artması, periodontal rejeneratif tedaviler için de yeni bir bakış açısı gelişmesine katkıda bulunmuştur (Akita ve diğerleri, 2015; Asutay ve diğerleri, 2016; Can, 2008).

Kök hücreler, uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme, kendilerini yenileyebilme, özelleşmiş hücrelere kaynaklık ederek farklılaşma ve hasar sinyallerini algılama özellikleriyle vücuttaki diğer hücrelerden farklı, özelleşmemiş hücrelerdir. Vücutta, kemik iliği dışındaki en yaygın kök hücre tipi olan mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) kemik iliği, adipoz doku ve diş kaynaklı dokular gibi pek çok farklı dokudan izole edilebilmektedir. Gerçekleştirilen çalışmalar, uygun in vitro ve in vivo ortam koşullarında MKH'lerin farklı doku ve hücrelere farklılaşabildiğini göstermekte ve aynı zamanda bu hücreler, embriyonik gelişimde ve organların oluşmasında ve hasarlı dokuların tamir edilmesinde önemli rol oynamaktadır (Petersen ve diğerleri, 1999; Sun ve Karaoz, 2020).

Kök hücreleri karakterize etmek için kullanılan en yaygın yöntemlerden birisi, hücrelerin yüzeyinde yer alan ve hücre yapışma molekülleri olarak rol oynayan 'Farklılaşma Kümeleri' (Cluster of Differentiation / CD) olarak adlandırılan yüzey belirteçlerdir. MKH, yüzey belirteçleri CD11b, CD14, CD34, CD45 ve İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen/ HLA-DR) için negatif; CD73, CD90 ve CD105 belirteçleri açısından da pozitif olmaları ile ayırt edilmektedir (Dominici ve diğerleri, 2006). Aynı zamanda kök hücreler adipojenik, osteojenik ve kondrojenik yönde farklılaşma özelliklerine sahiptirler. Doku bütünlüğünün herhangi bir durumda bozulması sonucunda MKH'ler o bölgelere göç ederek, onarımı gerçekleştirebilirler. Klinik olarak da sıklıkla kullanılan MKH'lerin bir diğer önemli avantajı ise immünsupresif ve non-immünojenik özellikte olmalarıdır (Sun ve Karaoz 2020).

MKH'lerin kemik ve diş dokusunun yenilenmesine yönelik çalışmalarda adipoz dokular (AD), kolay izole edilebilmeleri nedeniyle MKH kaynakları arasında önemli bir yere

sahiptir. Buradan elde edilen AD-MKH'ler, multipotent farklılaşma kapasiteleri sayesinde osteosit, kondrosit ve adipositlere farklılaşabilirler. Kolay erişilebilirlikleri, bol miktarda olmaları, hücre canlılığını daha uzun süre korumaları AD-MKH'lerin en önemli avantajlarıdır (Liu ve diğerleri, 2014; Pei ve diğerleri, 2015).

Diğer bir MKH kaynağı olan ve diş pulpasından (DP) izole edilen DP-MKH popülasyonu, ilk olarak 2000 yılında Gronthos ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir. Aynı ekip tarafından, bu hücrelerin odontoblastik, adipojenik ve nöral hücre tiplerine farklılaşması gösterilmiştir (Gronthos ve diğerleri, 2002). Sonraki çalışmalarda, benzer olarak diş pulpası kaynaklı MKH'lerin in-vitro koşullarda düz kas (d'Aquino ve diğerleri, 2007), kondrosit (Takeyasu ve diğerleri, 2004), ve sinir hücrelerine (Stevens ve diğerleri, 2008) farklılaşma potansiyeline sahip oldukları rapor edilmiştir. Bu nedenlerle, diş tedavilerinde kolay elde edilebilir bir kaynak olmaları, diş bölgesine özgü olmaları ve diğer MKH'lerle benzer özellikler göstermeleri nedeniyle rejeneratif tıp ve doku/organ mühendisliği amaçlı çalışmalarda alternatif bir kaynak oluşturmuştur.

Periodontal Ligament (PDL) kökenli progenitor hücreler, kendi kendilerini yenileyebilme ve farklı hücre tiplerine farklılaşabilme özelliğine sahip olup, periodontal doku rejenerasyonunda önemli fonksiyona sahiptir (Ivanovski ve diğerleri, 2006). PDL-MKH'lerin osteojenik farklılaşma özelliğine sahip oldukları ve periodontal rejenerasyonu sağladığı belirtilmiştir (Hasegawa ve diğerleri, 2006). Periodonsiyumda meydana gelen herhangi bir yaralanma ve travma durumunda dokuda yer alan kök hücrelerin aktif hale gelmesiyle bölgedeki hasarlı dokunun tamiri sağlanır. Göç eden hücreler fibroblast, osteoblast veya sementoblastlara farklılaşarak PDL, kemik ve sement dokusunu oluşturur (McCulloch ve diğerleri, 1987).

Kök hücrelerin farklılaşma ve rejenerasyon yetenekleri izole edildikleri dokularla oldukça ilişkilidir. Bu bağlamda diş pulpası ve periodontal ligament gibi dişe özgü dokular ile adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin farklı farklılaşma kapasitelerine sahip oldukları düşünülmektedir. Diğer yandan bu kaynaklar arasında izolasyon kolaylığı ve elde edilen hücre sayılarında da önemli farklılıklar bulunmaktadır. Kök hücreler, in vitro ortamda çeşitli hücre tiplerine farklılaştırılarak, hücre kültüründe sert doku oluşumları değerlendirilebilmektedir. Bu değerlendirme için hücresel düzeyde testler uygulanmaktadır. Bu testler yardımıyla hücresel belirleyicilerin tayini yapılarak dokuda meydana gelen

farklılaşma düzeyi tespit edilebilmektedir. Tüm bu özellikler kök hücrelerin doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında en önemli biyolojik aktör olmalarını sağlamıştır (Murray, Garcia-Godoy ve Hargreaves, 2007).

Doku mühendisliği hasar görmüş dokuların yenisiyle değiştirilmesi için biyouyumlu yapı iskeleleri ve büyüme faktörleri ile birlikte ayrıştırılmış hücrelerden oluşan yapıları kullanarak yeni doku üretim teknikleri geliştirmeyi hedefleyen bir bilim alanıdır. Hücre biyolojisi, gelişimsel biyoloji ve biyomateryal bilimleri prensibine dayanır (Reddi ve diğerleri, 1998). Doku mühendisliği çalışmalarında hücre kültürü sistemleri, hücreleri vücut dışı ortamlarda yaşatmaya ve bu sayede çeşitli hastalıkların mekanizmalarını ve davranışlarını çözmeye yarayan yöntemlerdir. Hücrelerin moleküler mekanizmalarını ve davranışlarını incelemek için klasik yöntemlerden 2B kültür sistemleri kullanılmaktadır. Hücrelerin vücut içerisindeki gibi doğal ortamlarını taklit etmek amacıyla 3B kültür sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemler hücrelerin gelişmesine ve etkileşmesine izin veren, hücrelerin in vivo ortamda da olduğu gibi her yöne gelişebildiği yapay sistemlerdir.

Gelecekte insanlara implante edilebilir yapay doku ve organların oluşturulması ve rejeneratif tıp alanında kullanılabilmesi için hücrelerin 3B ortamdaki özelliklerinin daha iyi araştırılmalıdır (Cidonio ve diğerleri, 2019). Periodontoloji ve doku mühendisliği alanında MKH'lerin rejeneratif kapasitelerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar son yıllarda ön plana çıkmaktadır. Ancak bu alanda yapılan çalışma sayısı çok sınırlı olup, hangi kökenden elde edilmiş MKH'lerin kemik rejenerasyonunda daha etkili olabileceğine dair bir çalışma bulunmamaktadır. Araştırmamızın amacı periodontal rejeneratif tedavide kullanımının ilerleyen yıllarda yaygınlaşması ön görülen MKH'lerin adipoz doku, periodontal ligament ve diş pulpasından köken alan farklı tiplerinin karakterizasyonu, farklılaşma potansiyelleri ve osteo-rejeneratif kapasitelerinin 2B ve 3B kültür ortamlarında in vitro değerlendirilmesidir. Elde edilecek sonuçlar neticesinde gelecekte periodontal tedavilerde daha doğal ve etkili hücresel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre Araştırmalarına Genel Bakış

Kök hücre çalışmaları, ilk olarak 1960'lı yıllarda Ernest McCulloch ve James Till tarafından kan hücrelerini üreten hematopoietik kök hücrelerin keşfi ile başlamıştır (Becker, McCulloch ve Till, 1963). 1970'li yıllara gelindiğinde Friedenstein ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarla kemik iliği kök hücrelerinin birden çok hücre tipine dönüşebilen multipotent özelliğe sahip olduklarını belirtmişlerdir (Friedenstein ve Gorskaja, 1976).

1981 yılında Evans ve Matt Kauffman farelerden embriyonik kök hücre izole etmişlerdir (Evans ve Kaufman, 1981). 2007 yılında ise Fizyoloji veya Tıpta Nobel Ödülü, "Embriyonik kök hücrelerin kullanımıyla farelerde belirli gen modifikasyonlarının geliştirilmesine yönelik prensiplerin keşifleri" adlı çalışmayla Mario R. Capecchi, Sir Martin J. Evans ve Oliver Smithies'e ortak olarak verilmiştir (The 2007 Nobel Prize in Physiology or Medicine, t.y.).

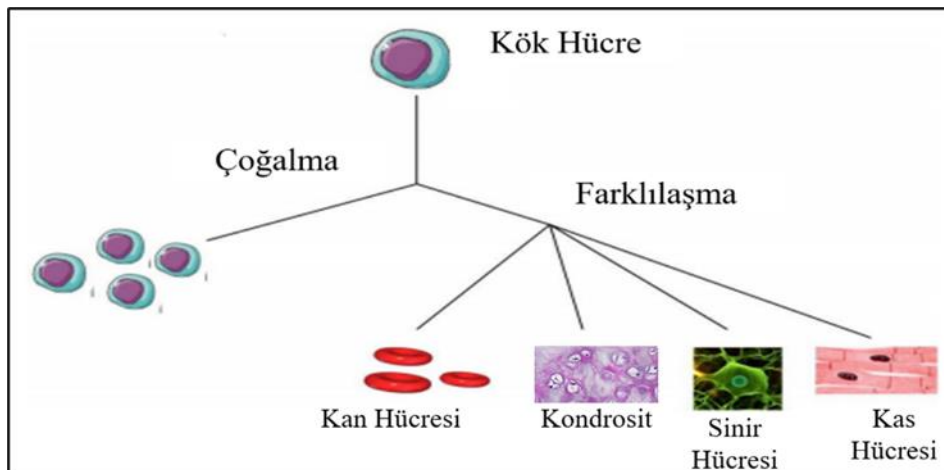
1998 yılında James Thomson ve çalışma arkadaşları insan embriyonik kök hücrelerini elde etmişlerdir. Ancak, hücrelerin izole edilmesi için insan embriyolarının yok edilmesinden dolayı etik engelleri doğurmuştur (Thomson, 1998). 2012 yılına gelindiğinde ise Nobel Fizyoloji ve Tıp ödülü ikinci kez kök hücre uygulamalarıyla ilgili bir çalışmaya verilmiştir. Dr. Gurdon ve Dr. Yamanaka'nın yaptıkları çalışmalar sayesinde hâlihazırda laboratuvar ortamında yetişkin bireylerden alınan deri, kas, vb. özelleşmiş hücrelerin, farklı yöntemlerle yeniden programlanarak vücuttaki pek çok dokuyu oluşturabilecek özelliğe sahip pluripotent kök hücreye dönüştürülebildiği gösterilmiştir (Johnson ve Cohen, 2012).

Embriyonik kök hücrelerin keşfedilmesinden sonraki dönemde kök hücre ve doku mühendisliği alanında yapılan multidisipliner çalışmalar sayesinde tıp ve diş hekimliğinde rejeneratif tedavi alanında çok çeşitli tanı ve tedavi uygulamaları geliştirilmeye başlanmıştır (Aras ve diğerleri, 2015; Iezzi ve diğerleri, 2019; Kon ve diğerleri, 2000; Zhai ve diğerleri, 2018). Konu ile ilgili araştırmalar devam etmekte ve elde edilen sonuçların ümit verici olduğu gözlemlenmektedir.

2.2. Kök Hücre Kavramı ve Özellikleri

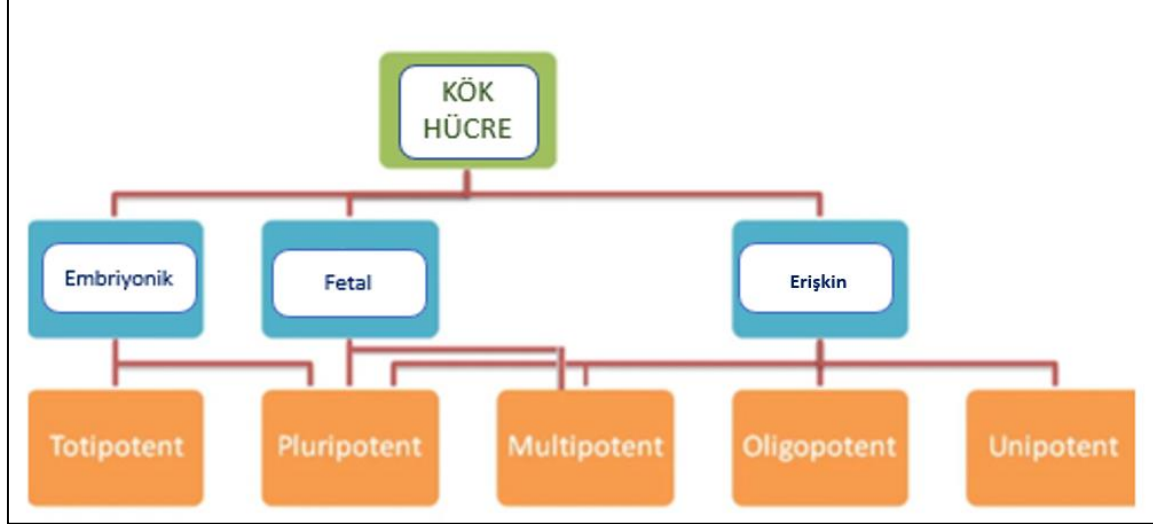
Kök hücreler, uzun zaman dilimleri boyunca kendilerini yenileyebilme, özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilme, farklılaşabilme yeteneklerine sahip hücre topluluklarıdır. Çok hücreli canlıların dokuların aktivite ve fonksiyonlarının tutarlılığını ifade eden doku homeostazisini ve hayat boyu rejenerasyonunu sağlamada önemli rol oynamaktadırlar (Sun ve Karaoz, 2020).

Son yıllarda kök hücrelerin rejeneratif tıpta önemli bir konuma sahip olmalarının bir diğer nedeni de köken aldıkları doku ve organların dışındaki hücrelere de farklılaşabilme yeteneklerinin (kök hücre plastisitesi) gösterilmiş olmasıdır. Plastisite, çok hücreli organizmaları oluşturan hücrelerin farklılaşma sırasında sitokinler, büyüme faktörleri, hücreler arası iletişim gibi etmenlerin etkisiyle oluşan olayların bütünüdür. Özelleşmemiş bir kök hücreden, özelleşmiş bir hücre oluşma sürecine farklılaşma denir. Fonksiyonel olarak farklılaşmadan, mitoz ile çoğalabilme özelliğine sahip bu hücreler asimetric bir şekilde bölünür. Mitoz sonucunda oluşan hücrelerden biri kök hücre ile aynı özelliğe sahipken diğeri fonksiyonel olarak farklılaşacağı dokuya ait özellik sergiler (Kalra ve diğerleri, 2014) (Şekil 2.1). Bunun yanı sıra dokuda meydana gelen bir yaralanma sonucu hücrelerin vermiş oldukları hasar sinyallerini algılama özellikleri de kök hücreleri vücuttaki diğer hücrelerden ayırmaktadır (Petersen ve diğerleri, 1999).



Şekil 2.1. Kök hücrelerden mitoz sonucunda oluşan hücrelerden biri kök hücre ile aynı özelliğe sahipken, diğeri fonksiyonel olarak farklılaşacağı dokuya ait özellik sergiler (Kalra ve diğerleri, 2014)

Kök hücreler farklılaşma yeteneklerine göre ve elde edildikleri kaynaklara göre sınıflandırılırlar (Şekil 2.2).

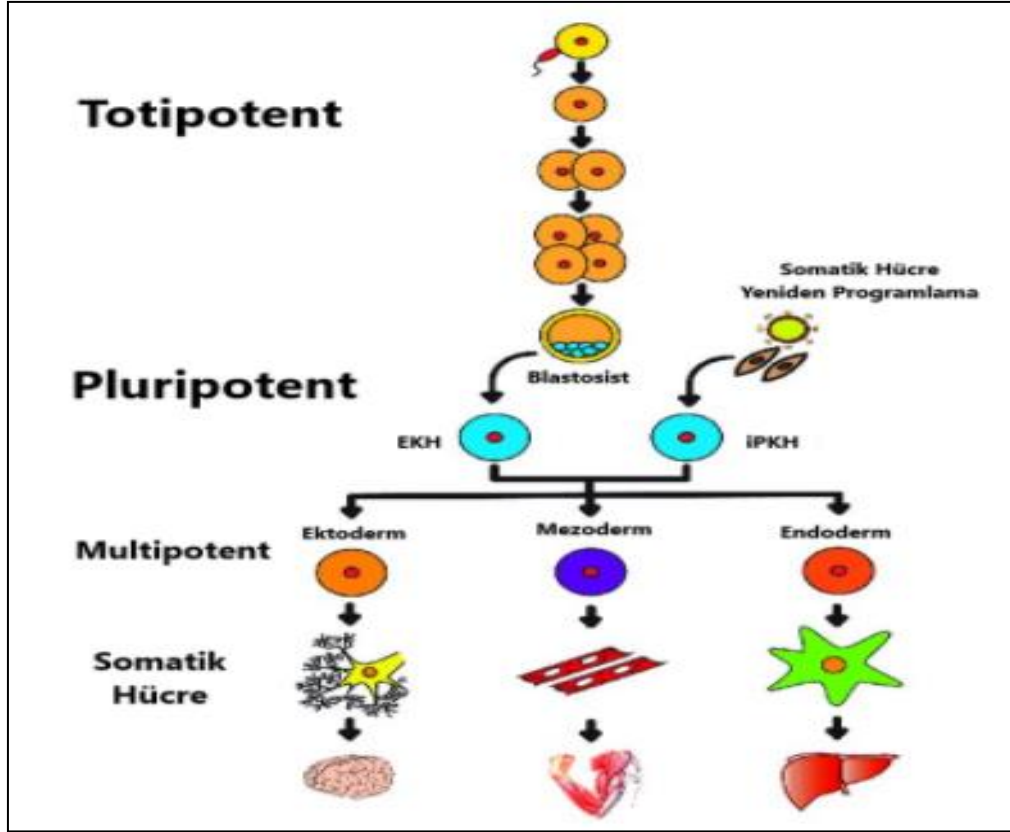


Şekil 2.2. Farklılaşma yeteneklerine (turuncu) ve elde edildikleri kaynaklara göre (mavi) kök hücreler (Lei, Zhang ve Du, 2021)

2.2.1. Farklılaşma yeteneklerine göre kök hücreler

Kök hücrelerin özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşma kapasiteleri ‘plastisite’ olarak adlandırılır. Kök hücreler plastisite seviyelerine göre beş grupta incelenir (Kolios ve Moodley, 2012) (Şekil 2.3). Bu gruplar:

1. Totipotent kök hücreler
2. Pluripotent kök hücreler
3. Multipotent kök hücreler
4. Oligopotent kök hücreler ve
5. Unipotent kök hücrelerdir.



Şekil 2.3. Farklılaşma yeteneklerine göre kök hücreler (Kolios ve Moodley, 2012)

Totipotent kök hücreler

Totipotent kök hücre, embriyonik ve ekstraembriyonik (plasenta gibi) dokulardaki hücre tiplerine farklılaşabilen, uygun koşullarda tek başına yaşayabilen bir organizmanın tamamının meydana gelmesi için gereksinim duyulan bütün fonksiyonları taşıyan hücre grubudur. Döllenmiş yumurta hücresinin ilk bir iki mitoz bölünmesi sonucunda oluşan hücrelerdir. Bu hücreler yumurta ve sperm hücrelerinin füzyonundan sonra üretilirler ve sahip oldukları özellikleri döllenmeden sonraki 4 gün boyunca sürdürürler (Kalra ve diğerleri, 2021). Totipotent kök hücreler, etik nedenler sebebiyle insan tedavisinde kullanılmamaktadır.

Pluripotent kök hücreler

Pluripotent kök hücreler, totipotent kök hücrelerden köken alan farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir. Totipotent kök hücreler gibi tek başına tam olarak yaşayabilen organizmayı oluşturamazlar (Bilic ve Belmonte, 2012). Fakat ektoderm, mezoderm ve endoderm olarak

adlandırılan germ tabakalarından köken alan bu hücreler, bir yetişkindeki 220'den fazla hücre tipini oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Sınırsız olarak kendini yenileyebilme ve plastisite yetenekleri sebebiyle bu hücre grubu rejeneratif tıbbın önem verdiği konulardan biridir (Chang ve diğerleri, 2021).

Multipotent kök hücreler

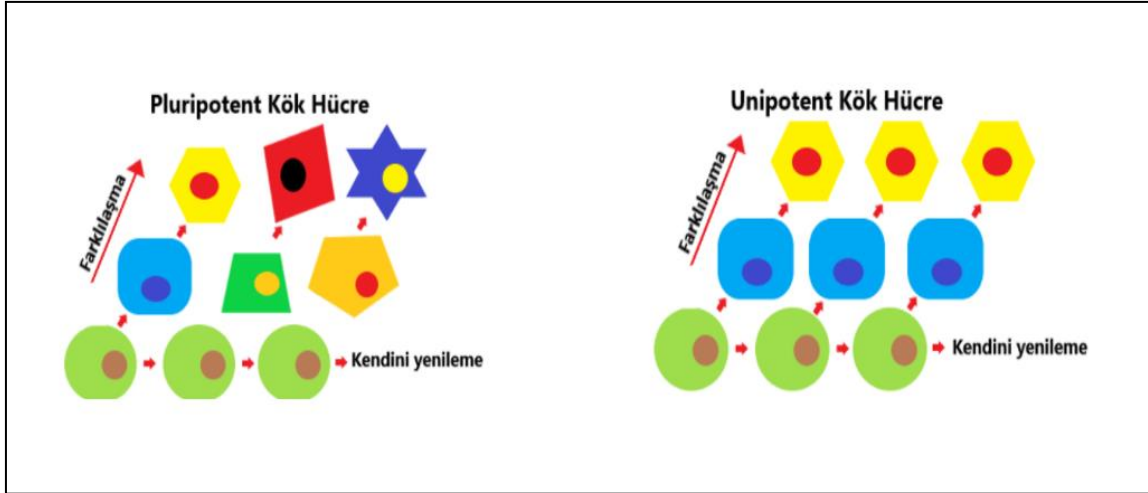
Multipotent kök hücreler, kemik iliği, kas, göz, sinir, karaciğer ve deri gibi dokularda bulunan ve tek bir germ tabakasından elde edildikleri doku ve organa dönüşebilme yeteneğine sahip olan kök hücre topluluğudur (Ratajczak ve diğerleri, 2012). Multipotent kök hücreler; ölen ya da hasar gören hücreleri yenileme özelliğine sahip, yetişkinlerde farklılaşmış dokularda bulunan farklılaşmamış kök hücrelerdir. Bölünebilme ve kendini yenileyebilme özellikleri vardır (Dzobo 2021).

Oligopotent kök hücreler

Oligopotent kök hücreler kendi kendini yenileyebilen ve lenfoid ve miyeloid kök hücreler gibi sadece birkaç hücre tipine farklılaşabilen hücre topluluğudur. Kornea epiteli (Majo ve diğerleri, 2008), hematopoitik kök hücreler (Marone ve diğerleri, 2002) bu gruba örnek olarak verilebilir.

Unipotent kök hücreler

Sadece bir hücre tipine farklılaşabilen hücre grubudur. Erişkin somatik hücrelerinden ayırıcı özelliği kendini sınırsız yenileyebilme yeteneğidir. Kendi kendini yenileyebilen, deri, barsak epiteli, kemik, kan gibi birçok doku unipotent öncü hücre içermektedir (Bahmada ve diğerleri, 2020) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Pluripotent ve Unipotent kök hücrelerin farklılaşması (Kolios ve Moodley, 2012)

2.2.2. Elde edildikleri kaynaklara göre kök hücreler

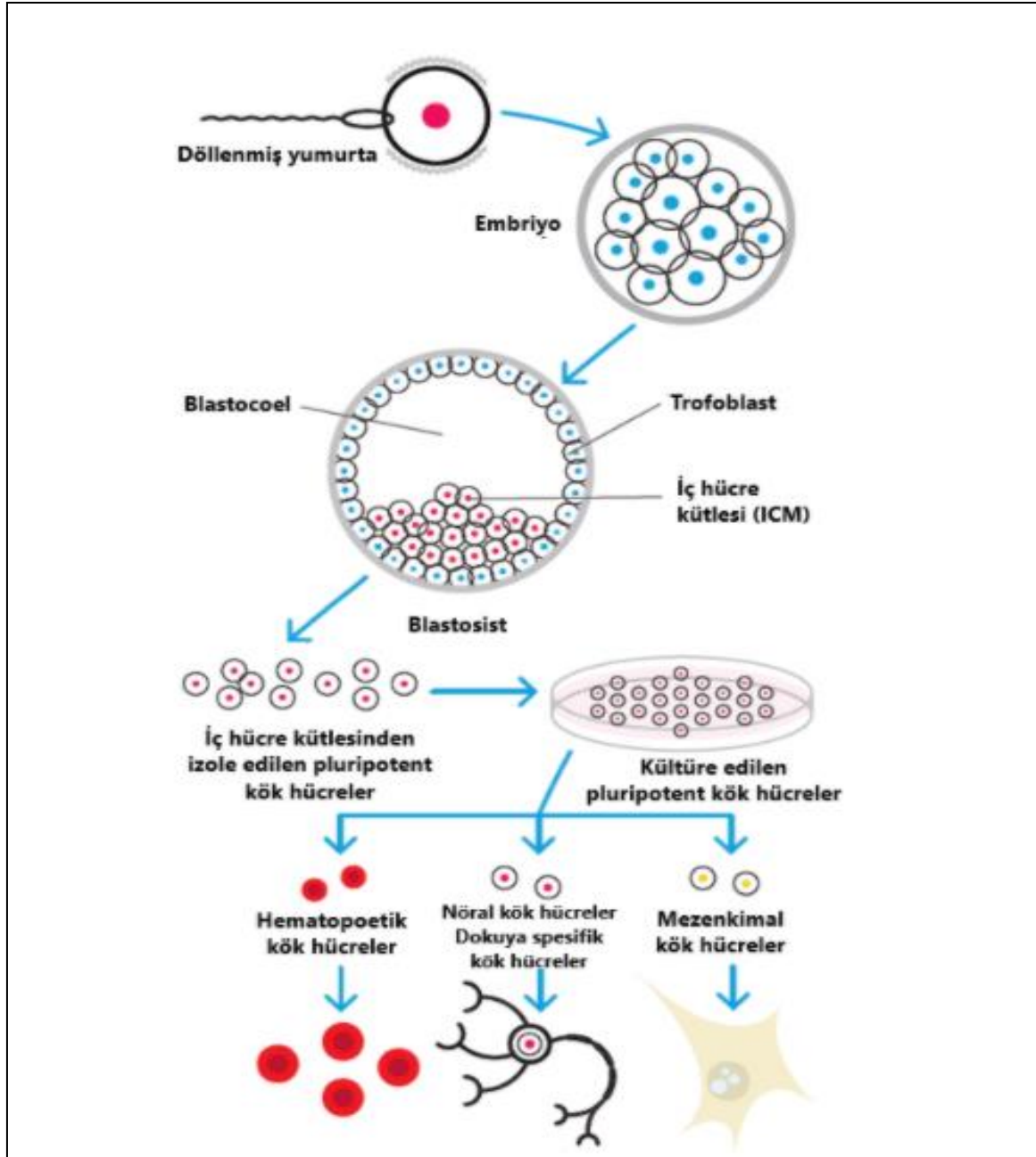
Kök hücreler, 2006 Avrupa Moleküler Biyoloji ve Genetik Çalıştayında kökenlerine göre iki temel kategoride sınıflandırılmışlardır. Bunlar:

1. Embriyonik kök hücreler (EKH)
2. Somatik (Erişkin) kök hücrelerdir (SKH).

Embriyonik kök hücreler (EKH)

Anneden gelen yumurta ve babadan gelen spermin döllenmesi sonucu oluşan hücreye zigot adı verilir. Zigot 36 saatte bir sayısını ikiye katlayacak şekilde bölünerek 4.günün sonunda 8 hücreli sayıya ulaşan yapıda her bir hücre bir insan oluşturabilecek potansiyele sahiptir. Anne karnındaki gelişimin 5.gününde oluşan hücre topluluğuna blastosit adı verilir. Blastositler tek başına birey oluşturamaz ama insan vücudunda bulunan 200'den fazla hücre tipine dönüşebilirler. Embriyonik kök hücreler, blastosit aşamasında iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent kök hücrelerdir. Hücrelerin ömrünü belirleyen kromozomların ucunda bulunan ve telomer olarak adlandırılan DNA zincirlerinin uzun kalmasını sağlayan enzim telomeraz olarak adlandırılır. EKH'ler yüksek telomeraz aktivitesine sahiptirler ve ektoderm, endoderm ve mezoderm germ yapraklarına ait doku ve organların hücrelerine dönüşebilme yeteneğine sahiptirler (Terada ve diğerleri, 2002) (Şekil 2.5). EKH araştırmalarındaki en önemli sorun, üç germ katmanı oluşturan hücre tiplerini içeren, cenine özgü dokulardan oluşmuş, teratomlar olarak adlandırılan tümör oluşturabilmeleridir (Kolios

ve Moodley, 2012). Çalışmalar, teratom oluşumunun nedenlerinin kültür sırasında EKH'lerde meydana gelen kromozomal değişikliklerden, kültürde geçen süre ve pasajlama sayısının artmasından kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir (Stewart ve diğerleri, 2021). Embriyonik kök hücre çalışmaları etik değerlerden ötürü ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafından yasaklanmıştır.



Şekil 2.5. Embriyonik kök hücre modelasyonu (Kolios ve Moodley, 2012)

Somatik (erişkin) kök hücreler (SKH)

Somatik kök hücreler kendilerini yenileyebilen ve dokuların özelleşmiş fonksiyonuna sahip hücrelerine farklılaşabilen, erişkin doku ve organlardaki farklılaşmamış hücrelerdir (Bongso ve diğerleri, 2004). SKH'ler kemik iliği, plesanta membranı, amniyotik sıvı, diş pulpası gibi vücuttaki çeşitli doku ve organlardan izole edilebilirler. Somatik kök hücreler, EKH'lere oranla sınırlı düzeyde çoğalma ve farklılaşma kapasitelerine sahiptirler. Ancak tedavi için EKH'lerde yaşanılacak etik sorunlardan dolayı somatik kök hücreler önemli alternatif kaynaktır (Morsczeck ve diğerleri, 2007).

Uyarılmış pluripotent kök hücreler (UPKH), somatik hücrelerin genetik olarak yeniden programlanması ile elde edilir. UPKH'ler somatik bir hücreden tersine farklılaşma yoluyla üretilen hücrelerdir. Sınırsız olarak çoğalabilme yetenekleri vardır ve vücuttaki diğer hücre tiplerine farklılaşabilirler. Hastalık ya da travma nedeniyle kaybedilen dokuların rejeneratif tedavisinde kullanılabilecek hücre kaynaklarıdır. UPKH'ler üç emriyojenik germ tabakasına ait hücrelere farklılaşabilme yetenekleri nedeniyle çeşitli terapötik ortamlarda geliştirilir ve yeniden programlanabilir (Wertheim ve Leventhal, 2015).

Mezodermal farklılaşmanın belirlenmesine yönelik yapılan kemik iliği çalışmaları, kemik iliği ve çeşitli erişkin dokularda bulunan multipotent hematopoitik olmayan hücrelerin varlığını ortaya koymuştur. Vücutta, kemik iliği dışındaki en yaygın kök hücre tipi olan hematopoetik MKH'ler, pek çok farklı dokudan izole edilebilmekte ve bu hücrelerle gerçekleştirilen canlı dışı (*in vitro*) çalışmalarla MKH'lerin uygun ortam ve koşullarda farklı doku ve hücrelere farklılaşabildiğini göstermektedir. Aynı zamanda bu hücreler, embriyonik gelişimde ve organların oluşmasında ve hasarlı dokuların tamir edilmesinde önemli rol oynamaktadır (Murray ve diğerleri, 2007; Petersen ve diğerleri, 1999).

2.3. Mezenkimal Kök Hücre

MKH'ler, embriyonun oluşum sürecinde mezoderm tabakasından köken alan kas, kıkırdak, kemik, yağ dokusu gibi tüm dokulara ait hücreleri oluşturabilen pluripotent kök hücrelerdir. Somatik kök hücre grubunda yer alırlar ve insan ve hayvan kaynaklarından izole edilebilirler. MKH'ler rejeneratif tıp için uygun hücrelerdir. *In vitro* koşullarda uygun uyaranlarla osteojenik, adipojenik, kondrojenik, miyojenik farklılaşma kapasitelerinin

olduğu bilinmektedir. Friedenstein ve arkadaşları tarafından yapılan deneysel bir çalışmada bulunan MKH'ler fare kemik iliği kaynağından elde edilmiştir. Bu hücrelerin iğsi yapıda oldukları ve plastik yüzeylere tutundukları saptanmıştır (Friedenstein, Gorskaja ve Kulagina, 1976). Günümüzde ilerleyen teknoloji ve doku mühendisliği çalışmaları ise yağ, kemik iliği, dental pulpa, PDL gibi birçok dokuda bulunan MKH'lerin çeşitli faktörler ile uyarılması sonucu osteoblast, kondrosit, hepatosit ve nöron gibi çok fazla sayıda hücre tipine farklılaşabildikleri belirtilmiştir (Longoni ve diğerleri, 2020; Pei 2017; Yu, Han ve Kim, 2012).

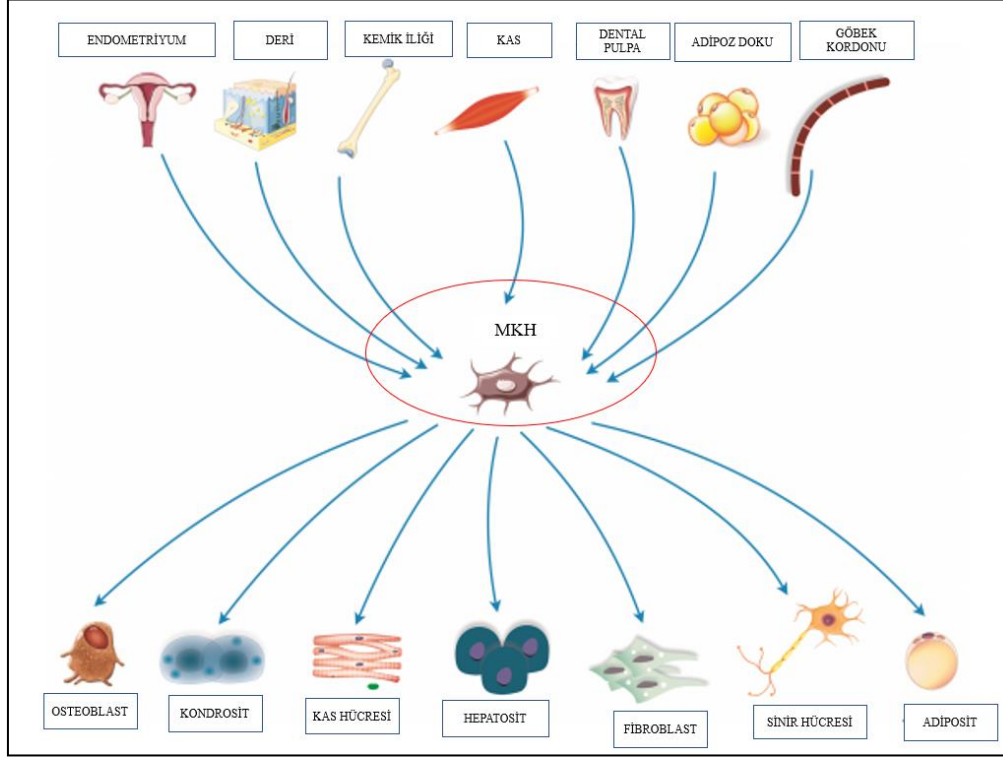
İnsanlardan elde edilen MKH'ler multipotent özelliktedir. Ektodermal (nöron), endodermal (hepatosit) ve mezodermal (osteoblast, adiposit, kondrosit) kökenli hücrelere farklılaşma kapasitelerine sahiptirler.

Uluslararası Kök Hücre Araştırma Komitesinin (International Society for Stem Cell Research/ ISSCR) belirlediği MKH'lerin *in vitro* özellikleri aşağıda belirtilmiştir:

1. Hücre kültür ortamında kültür kabına yapışabilen iğsi fibroblast benzeri özelliktedirler.
2. MKH'lerde eksprese edilen yüzey işaretleyicileri CD105, CD73, CD90, CD44 ve eksprese edilmeyen (hematopoietik spesifik yüzey belirteçleri) CD45, CD34, CD11b, CD14, CD31, CD79A, HLA-DR (İnsan lökosit antijeni, DR izotipi)'dir
3. Adiposit, osteosit ve kondrositlere farklılaşma kapasitesi göstermelidir (Volarevic ve diğerleri, 2017).

Vücutta inflamasyon veya doku hasarı gelişmesi durumunda, MKH'lerin yüzeyinde bulunan kemokin reseptörleri sayesinde bu hücreler iltihap ve hasar bölgelerine göç edebilmektedir (Marshak, 2001). MKH'ler, immün düzenleyici özelliğe sahiptirler. Bu kök hücreler T lenfosit, B lenfosit ve doğal öldürücü hücrelerin fonksiyonlarını baskılamakta ve dendritik hücre farklılaşmasını inhibe etmektedir. Salgıladıkları sitokinler ile immünomodülatör ve antiinflamatuvar özellik gösterirler (Ullah, Subbarao ve Rho, 2015). İmmünolojik olarak bağımsız hücreler olmaları nedeniyle, bağışıklık sistemini baskılamaya gerek duymadan akut ve kronik hastalıkların tedavisinde kullanılabilirler (Devine ve diğerleri, 2003).

İnsan kaynaklı MKH'ler kemik iliği, Adipoz (yağ) doku, amniyotik sıvı, göbek kordonu yapısını oluşturan ve içinden damarların geçtiği Wharton jelinden, periodonsiyum ve dental pulpa gibi çeşitli dokulardan izole edilebilir (Tavakoli ve diğerleri, 2020) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. İnsan kaynaklı MKH'ler kemik iliği, adipoz doku, amniyotik sıvı, göbek kordonu, Wharton jeli, periodonsiyum ve dental pulpa gibi çeşitli dokulardan izole edilebilir (Tavakoli ve diğerleri, 2020)

Günümüzde MKH'ler pek çok farklı dokudan elde edilebilmektedir. Bu kaynakların başlıcaları;

1. Kemik iliği kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (Kİ-MKH)
2. Adipoz doku kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (AD-MKH)
3. Dental dokulardan elde edilen Mezenkimal Kök Hücreler (D-MKH)
 - 3.1. Dental Apikal Papilla Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler (DAP-MKH)
 - 3.2. Eksfoliyte Süt Dişlerinden izole edilen Mezenkimal Kök Hücreler (SD-MKH)
 - 3.3. Dental Folikül kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (DF-MKH)
 - 3.4. Dental Pulpa kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (DP-MKH)
 - 3.5. Periodontal Ligament kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (PDL-MKH)

2.3.1. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (Kİ-MKH)

Freidenstain ve arkadaşları tarafından kemik iliğinde yer alan, kendi kendini yenileyebilen stromal hücrelerin bir alt popülasyonu olarak tespit edilmiştir. Genel olarak kullanım amaçları kemik yıkımına neden olan osteoklastik aktiviteyi düzenlemektir. Kİ -MKH'lerin en iyi bilinen farklılaşma özelliği in vivo ortama transplante edildiğinde kemik ve kemikle ilişkili hematopoitik ilik oluşturmalarıdır (Krebsbach ve diğerleri, 1997). Travma ya da osteonekroz sonucu oluşan kemik defektlerine uygulandığında osteogenezi artırdığı çeşitli araştırmalarda belirtilmiştir (Kon ve diğerleri, 2000; Oshima ve diğerleri, 2005; Peterson ve diğerleri, 2005). Kİ -MKH'ler sistemik transplantasyondan sonra önemli bir antiinflamatuvar etki gösterirler. Kemik defektlerinin tedavisinde sitoterapide ve doku mühendisliğinde kullanılırlar (Friedenstein ve diğerleri, 1976; Guo ve diğerleri, 2018). Ayrıca kemik iliği kaynaklı MKH'lerin klinikte kanser hastalarında kemoterapi sonrası hematopoitik sistemin yeniden düzenlenmesi amacıyla kullanılmakta olup, bağışıklık sistemi hastalıklarının tedavisine yönelik araştırmalar devam etmektedir.

2.3.2. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AD-MKH)

AD-MKH'ler, bağ dokusunda bulunan, mezoderm kaynaklı erişkin kök hücrelerdir. Zuk ve arkadaşları tarafından 2001 yılında morfolojik ve fenotipik bakımdan alternatif kök hücre kaynağı olarak bulunmuştur (Zuk ve diğerleri, 2001). Somatik kök hücreler arasında, hücre tedavisi ve doku mühendisliği çalışmalarında elde edilebilirlik bakımından en avantajlı olan hücreler olarak görülmektedir. AD-MKH'ler osteosit, kondrosit ve adiposit olmak üzere farklı dokulara farklılaşabilirler (Zheng ve diğerleri, 2018).

Kİ-MKH'lerle kıyaslandığında, AD-MKH'ler liposuction yöntemiyle elde edildiğinden, izolasyon yöntemi kemik iliği aspirasyonuna göre daha az invazivdir. Bir diğer avantajı ise lokal anestezi altında az miktarda adipoz doku elde edilmesine rağmen çok sayıda kök hücre izolasyonu yapılabilmesi olmasıdır. Liposakşın yöntemi ile 100-200 ml adipoz doku alınması, uygun sayıda kök hücre izolasyonu için yeterlidir (Bajek ve diğerleri, 2017). Eşit miktarda alınan adipoz doku ve kemik iliği dokusundan elde edilen kök hücreler kıyaslandığında, adipoz dokudan kemik iliğine kıyasla 500 kat fazla kök hücre elde edilebildiği bildirilmiştir (Mizuno, 2013). Liposakşın işlemi ile alınan adipoz dokunun kollajenaz ile sindirimi sonrası olgun adipositler uzaklaştırılır. Geride büyüme

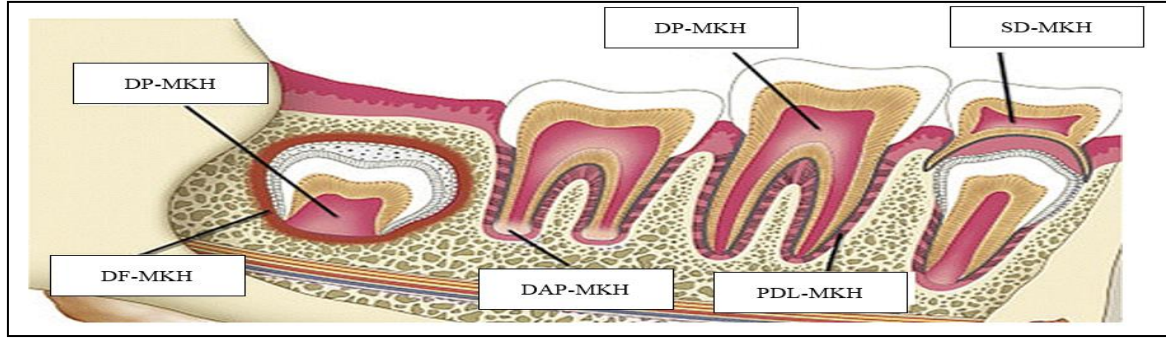
faktörlerinden zengin, lenfosit, makrofaj ve MKH'lerin bulunduğu bir sıvı kalır. Bu sıvıya Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF) adı verilir (Peinado ve diğerleri, 2012). Baer ve diğerleri (2013) SVF örneğinin 1 gramından, $0.5-2.0 \times 10^6$ hücresi izole edildiğini ve bunların %1-10'unu kök hücreler oluşturduğunu bildirmişlerdir. Daha önce 1999 yılında yayınlanan bir çalışmada ise bu oranın sadece % 0.001 – 0.01 aralığında olduğu bildirilmiştir (Pittenger, 1999).

AD-MKH'leri Kİ-MKH'lerden ayıran bir diğer özellikleri ise daha geç yaşlanmaları ve daha yüksek çoğalma kapasitesine sahip olmalarıdır. Kİ-MKH'lerin farklılaşma kapasiteleri, sayıları ve maksimum yaşam süreleri yaş ilerledikçe azalmasına rağmen (Mazini ve diğerleri, 2019), AD-MKH'lerde yaş arttıkça çoğalma hızı azalsa da farklılaşma kapasiteleri değişmediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Shi ve diğerleri, 2005).

AD-MKH'ler, direkt olarak özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşmalarının yanı sıra bir diğer özellikleri de çeşitli hücre tiplerinin olgunlaşması ve farklılaşması sırasında indirek rejeneratif etki göstermeleridir (Gimble, Bunnell ve Guilak, 2012).

2.3.3. Dental dokulardan elde edilen mezenkimal kök hücreler (D-MKH)

Embriyonik gelişimde diş germi ektodermal yapı sayesinde meydana gelirken; dental papilla ve dental folikül nöral krest hücrelerinin özelleşmesiyle meydana gelmektedir. Dolayısıyla dental dokular ektoderm kökenli nöral krest hücrelerini de yapısında barındıran mezenkimal bileşenler bulundurmaktadır (Morsczech ve diğerleri, 2007). Dişlerde bulunan MKH'ler, kaynaklandıkları dokuya göre adlandırılırlar (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Dental dokulardan elde edilen MKH. Dental apikal papilla kökenli MKH (DAP-MKH), eksfoliyeye süt dişlerinden izole edilen MKH (SD-MKH), dental folikül kaynaklı MKH (DF-MKH), dental pulpa kaynaklı MKH (DP-MKH), periodontal ligament kökenli MKH (PDL-MKH) (Srijaya ve diğerleri, 2016)

Dental apikal papilla kökenli kök hücreler (DAP-MKH)

Dental apikal papilla kökenli kök hücreler (DAP-MKH), dental dokuların erken gelişim evresinde gömülü dişlerde ve kesici dişlerin kök uçlarından izole edilen bu kök hücre grupları primer odontoblastlara kaynaklık ederler. DAP-MKH'ler Stro-1, CD 24, ve CD 29 gibi hücre yüzey antijenlerini eksprese edebilme yeteneklerine sahiptirler. Dental pulpa kaynaklı kök hücrelere kıyasla daha fazla dentin oluşturabilme özelliği gösterirler (Atalayın, Ergücü ve Tezel, 2012).

Eksfoliyeye süt dişlerinden izole edilen mezenkimal kök hücreler (SD-MKH)

Eksfoliyeye süt dişi pulpasından elde edilen kök hücreler, yetişkinlerin dental pulpasından elde edilen kök hücrelerle karşılaştırıldığında daha yüksek proliferatif aktiviteye sahiptirler. Bu özelliklerinden ötürü daha yüksek seviyede odontojenik ve osteojenik farklılaşma gösterirler. Elde edilmesi ve kültürü nispeten daha kolay olan SD-MKH'ler, rejeneratif özelliklerini, kriyotrepi ile dondurulduktan iki yıl sonrasına kadar korurlar. (Ma ve diğerleri, 2012).

Dental folikül kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DF- MKH)

Diş germi etrafında bulunan, dental folikül kök hücreleri genellikle gelişmekte olan 20 yaş dişlerinden kaynak alan ektomezenkimal kökenli kök hücre gruplarıdır. Notch-1 (Neurogenic locus notch homolog protein), CD34 MKH monoklonal antikoru olan Stro-1

ve CD133 gibi yüzey antijenlerine sahip olan bu kök hücreler yüksek plastisiteye sahiptirler. Sementoblastlara ve osteoblastlara diferansiye olabilirler (Yücel ve Gültekin, 2015).

Dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DP-MKH)

Diş pulpası, ektodermal kökenli nöral krest hücrelerini de kapsayan mezenkimal bileşenler içermektedir (Huwig ve Graf-Hausner, 2007). Diş pulpasının perivasküler bölgesinde yer alan dental pulpa kaynaklı MKH'ler (DP-MKH) 2000'li yıllarda Gronthos ve arkadaşları tarafından 3. molar dişlerden izole edilmiştir (Gronthos ve diğerleri, 2002).

Dental pulpa kaynaklı kök hücreler, morfolojik olarak incelendiğinde fibroblast benzeri yapı göstermektedir (Mochizuki ve Nakahara, 2018). Yetişkin dental pulpasında çeşitli progenitor hücre popülasyonu bulunmaktadır ve hücreler yüksek plastisiteye sahip multipotent özelliktedirler (Gronthos ve diğerleri, 2000).

DP-MKH'ler odontojenik, osteojenik, kondrojenik, adipojenik, vasküler ve nörojenik hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler (Mitsiadis, 2015). Bu hücre grubu, kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin gen ekspresyonları benzerlik göstermekle birlikte DP-MKH'lerinin proliferasyon yetenekleri ve hücre döngüsü ile ilgili genleri sentezlemeleri onları kemik iliği kaynaklı kök hücrelerden daha üstün kılar (Kunimatsu ve diğerleri, 2018).

DP-MKH'lerin tedavide kullanılmasının avantajları ise;

- Kolay elde edilebilmeleri,
- Etik bir sorun yaşanmaması,
- Yaşam sürelerinin uzun olması,
- Farklılaşma yeteneklerinin yüksek olması,
- Kültür ortamında kolay çoğaltılabilmesi ve
- Elde edilen kök hücre ekstraksiyonlarının yüksek verimli olması olarak sıralanabilir (Todorović ve diğerleri, 2008).

DP-MKH'ler, antiinflamatuvar ve immünosupresif özelliktedirler. T ve B lenfositlerinin proliferasyonunu baskılayarak bağışıklık cevabının oluşmasını sağlar (d'Aquino ve diğerleri, 2007).

Yaşlanma ile birlikte dental pulpa kök hücrelerinin boyutunda artış gözlenirken, proliferasyon ve osteojenik diferansiyon yeteneklerinde azalma gözlemlendiği literatürde yapılan çalışmalarla belirtilmiştir (Feng ve diğerleri, 2013; Yi ve diğerleri, 2017).

Periodontal ligament kaynaklı mezenkimal kök hücreler (PDL-MKH)

PDL-MKH, ilk defa 2004 yılında tanımlanmıştır (Seo ve diğerleri, 2004). PDL-MKH, çekilmiş dişlerin kök yüzeylerinden elde edilen hücrelerdir. Bu hücreler, periodontal doku rejenerasyonunda yer alan başlıca kök hücre tiplerindendir, çünkü sadece *in vivo* olarak sement ve periodontal ligament benzeri dokuları yenilemekle kalmaz (Seo ve diğerleri, 2004), aynı zamanda morfoloji ve yapı bakımından da diğer kök hücre tiplerine oranla periodonsiyumda daha iyi organizasyon gösterirler.

PDL-MKH'lerin rejeneratif kapasitesi ile ilgili yapılan araştırmalarda rejeneratif kapasitesinin kemik iliği ve pulpa kaynaklı kök hücrelerden fazla olduğu belirtilmiştir (Abedian ve diğerleri, 2020; Eleuterio ve diğerleri, 2013; Trubiani ve diğerleri, 2019).

Ayrıca, araştırmacılar PDL-MKH'lerin mekanik dirençlere daha dayanıklı hücreler olduğunu, bu sonucun periodonsiyumun sürekli olarak okluzal ve çiğneme kuvvetlerine maruz kalması ile ilişkili olduğunu ileri sürmektedirler (Liu ve diğerleri, 2017).

PDL-MKH'ler multipotent yapıdadırlar ve ektoderm, endoderm ve mezenkimal kaynaklı çeşitli hücrelere farklılaşabilme yetenekleri vardır. Uygun kültür ortamında yapılan çalışmalarda PDL-MKH'lerin; osteoblast (Seo ve diğerleri, 2004), adiposit, kondrosit (Xu ve diğerleri, 2009), nöral hücrelere (Kádár ve diğerleri, 2009) ve kardiyak miyositlere (Pelaiez ve diğerleri, 2017) farklılaşabildikleri araştırmacılar tarafından kanıtlanmıştır.

Mezenkimal kaynaklı diğer kök hücrelerde olduğu gibi PDL-MKH'lerin de immün mediatör özelliği vardır. Periodontitis gibi prevelansı yüksek görülen ve kemik yıkımı ile sonuçlanan hastalıkta PDL-MKH'lerin osteoklastik aktiviteyi baskıladıkları (Andrukhov ve diğerleri, 2017; Shi ve diğerleri, 2009) ve proinflamatuvar mediatörler salgıladıkları bildirilmiştir (Na Ayuthaya, 2016). Yalnız inflame periodontal dokudan elde edilen kök hücrelerin osteojenik farklılaşma kapasiteleri azalmıştır (Tang, 2016).

Son yıllarda MKH'ler ile ilgili yapılan araştırmalar, bu hücre gruplarının rejeneratif hücre yenilenmesi, doku onarımı ve yara iyileşmesine katkıda bulunduklarını ve tıp alanındaki tedavi ve araştırmalar için güvenli bir kaynak oluşturduklarını ortaya koymaktadır (Fang ve diğerleri, 2012; Lee ve diğerleri, 2019; Oryan ve diğerleri, 2017).

Kök hücre uygulamaları ve tedavileri hakkındaki bilgi ve farkındalığın gelişmesine etki eden en önemli faktörler ise gelişen teknolojinin de katkısıyla doku mühendisliği alanındaki çalışmalara verilen önemin artmasıdır.

2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerde CD Yüzey Belirteçleri

Genellikle hücre zarının dış kısmında bulunan bu yapılar, immün floresan (IF) boyamalar ve akım sitometri analizleriyle gösterilebilir. Yapılan analizlerle, hücrelerin içinde bulundukları popülasyonda yüzde kaç pozitif veya negatif işaretlenmiş hücre bulunduğu tespit edilerek popülasyonun saflık derecesi belirlenir. Bu yöntemlerle kök hücrelerin karakterizasyonu yapılabileceği gibi farklılaşma deneyleri sonuçlarının değerlendirilmeleri de yapılabilir. MKH'ler için, uluslararası standartlara göre, CD105, CD90, CD73, CD271, Nestin ve vimentin gibi belirteçlerin bulunması; CD34, CD45, CD117, CD133 ve HLA-DR gibi belirteçlerin ise bulunmaması gerekmektedir (Karaöz ve diğerleri, 2010; Lei ve diğerleri, 2021).

Kök hücre tedavisinde stabilitenin sağlanması her zaman klinik tedavinin en önemli noktası olmuştur (Lei ve diğerleri, 2014; Pei ve diğerleri, 2015). Rejeneratif tıpta en temel problem hücre popülasyonunun kalitesinin ve etkinliğinin nasıl kontrol edileceğidir. Bu, kök hücre tedavilerinin güvenliğinin sadece hücre popülasyonu heterojenitesiyle garanti edilebileceği anlamına gelir. Bununla birlikte, insan dışından izole edilen kök hücre alt grupları bile proliferasyon ve diferansiyasyon gibi hücre özellikleri açısından önemli farklara sahiptir. Bu sebeple dental kök hücrelerin nasıl tanımlanacağı ve karakterize edileceği, temel araştırmalar için önemli bir noktadır (Şekil 2.8).

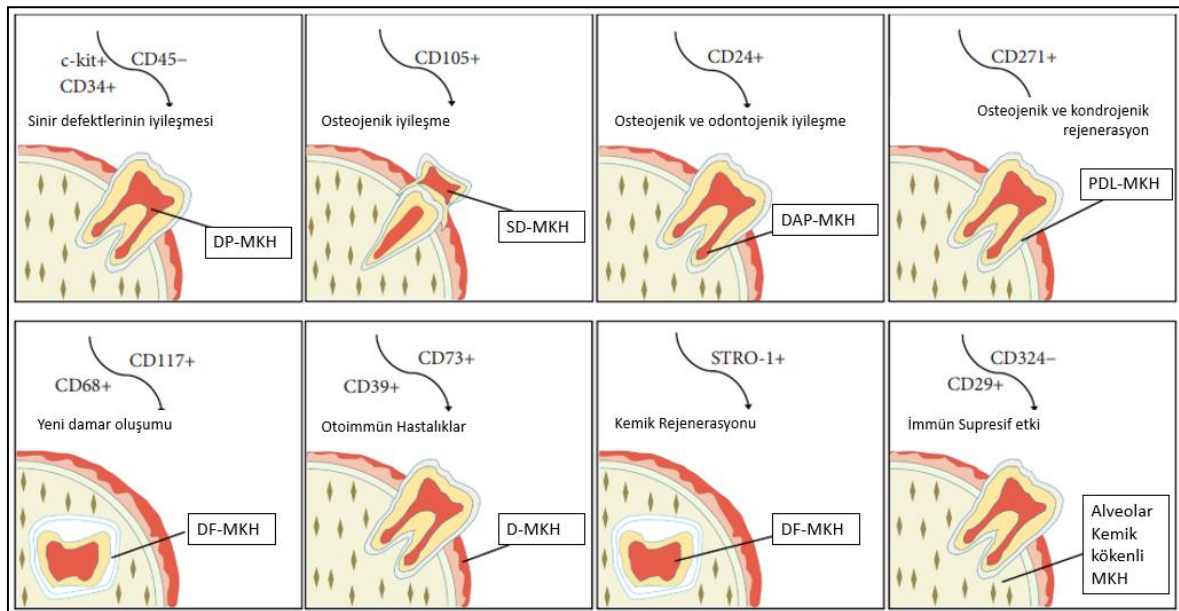
CD34, CD45 ve CD117 hematopoietik hücrelerin yüzey belirteçleridir. CD34'ün kısa ve sürekli replodüksiyon kapasitesiyle ve hücre kolonilerinin formasyonu ile bağlantılı olduğu bulunmuştur. Hematopoietik faktörlere yanıt olarak çoğalabilirler (Osawa ve diğerleri,

1996). Bunun yanı sıra CD45 yüzey belirtecinin proliferasyon ve miyogenik kapasitede rol oynadığı belirtilmiştir (Taoudi ve diğerleri, 2008).

CD90 ve CD271 mezenkimal progenitör hücrelerde pozitifdir ancak deri fibroblastlarında negatiftir (Jones ve diğerleri, 2006). Bu yüzey belirteçleri pozitif olan hücreler uzun süreli proliferasyon ve çoklu gelişimsel geçmiş diferansiyasyon potansiyeline sahiptir. Dolayısıyla bu belirteçlere sahip kök hücreler yeni osteojenik rejenerasyonu indükleyebilir ve kemik defektlerinin tedavilerinde kullanılabilirler (Yasui ve diğerleri, 2016).

CD105, iskelet-kas kökenli kök hücrelerin potansiyel belirteçlerinden biridir. CD105 ayrıca kemik iliğinin ve kırmızı kan hücrelerinin üretimini artırabilir ve spesifik hematopoitik dizilerin gelişimini regüle edebilir (Kato ve diğerleri, 2018).

CD146, bir hücre adezyon molekülüdür. CD146 yüzey belirteci pozitif olan MKH'ler kemik oluşturma eğilimindedir ve kemik oluşturma kabiliyeti hipoksida azaltılarak düzenlenir (Tormin ve diğerleri, 2011). CD146 sistemik skleroz, kolorektal kanser ve meme kanseri gibi hastalıkların tanısında ve osteosarkomun immünoterapötik tedavisinde hedef olarak sıklıkla kullanılan bir belirteçdir (Ito ve diğerleri, 2017).



Şekil 2.8. Dental kök hücrelerinin kaynaklarını ve yüzey belirteçlerini gösteren şematik çizimler (Lei, Zhang ve Du, 2021)

2.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Özellikleri

Rejenertatif tıp alanında yapılan çalışmalarda *in vivo* uygulamaların öncesinde, hücrelerin *in vitro* ortamlarda osteoblastlara, kondroblastlara ya da sinir hücreleri gibi çeşitli hücre hatlarına farklılaşmaları değerlendirilir. Bu farklılaşma işlemleri, hücrelerin kültür ortamına eklenen bazı mekanik yönlendiriciler aracılığıyla olabileceği gibi çeşitli bileşiklerin ve küçük moleküllerin eklenmesi ya da gen aktarımı gibi yöntemlerle gerçekleştirilmektedir.

Günümüzde genel olarak MKH'ler, laboratuvar koşullarında uygun bir takım çözünebilen faktörlerle 2-4 hafta boyunca kültürün ardından osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmaya başarılı bir şekilde yönlendirilebilmektedir (Atashi, Modarressi ve Pepper 2015; Vidoni ve diğerleri, 2019).

2.5.1. MKH'lerin osteojenik farklılaşma özellikleri

MKH'ler *in vitro* kültür ortamında uygun mikroçevresel koşullar sağlandığında farklı dokulara farklılaşabilirler. Osteojenik farklılaşma amacıyla geliştirilen kültür ortamı; β -gliserofosfat (Coelho, Trigo Cabral ve Fernandes, 2000), askorbik asit (Shevchenko ve diğerleri, 1996) ve deksametazon (Hong ve diğerleri, 2009) kimyasalları içermekte ve ortalama 21-28 gün boyunca kültüre edilen hücrelerde osteojenik farklılaşmalar gözlemlenmektedir (Vidoni ve diğerleri, 2019).

Kök hücrelerin farklılaşma sırasında hücrelerde proliferasyon, matriks oluşumu ve mineralizasyon oluşumu aşamaları gözlemlenmektedir. Osteojenik farklılaşma sürecinin özellikle son aşamalarında osteojenik gen ekspresyonu ve osteopontin, kemik siyoloprotein gibi proteinlerin sentezlenmesi ve kemik dokusuna özgü hidroksi-1-apatitin birikmesiyle ekstraselüler matriks kemik doku bileşenleri açısından zenginleşmeye başlar.

Araştırmacılar, diş kökenli MKH'lerin yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitelerine sahip olduklarını bildirilmekle birlikte bu hücrelerin odontoblastlara farklılaşarak dentin pulpa kompleksini de oluşturabildiklerini bildirmişlerdir (Gronthos ve diğerleri, 2002; Ivanovski ve diğerleri, 2006; Seo ve diğerleri, 2004).

Pluripotent kök hücreler de insanda herhangi bir hücre tipindeki popülasyonların üretilmesi için önemli bir potansiyele sahiptir (Koehler ve diğerleri, 2013). Tang ve diğerleri (2014),

yapmış oldukları bir çalışmada kemik iliğinde bulunan CD34 pozitif yüzey belirtecine sahip hücrelerden elde edilmiş, indüklenmiş pluripotent hücrelerden elde ettikleri MKH'leri kullanarak osteojenik farklılaşma elde ettiklerini bildirmişlerdir. Aynı şekilde elde edilmiş MKH'ler kullanılarak yapılan başka bir hayvan çalışmasında araştırmacılar periodontal doku rejenerasyonunu incelemişler ve başarılı sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir (Hynes ve diğerleri, 2013). Fareler üzerinde yapılan bir pilot çalışmada, periodontitis hastalık modeli oluşturulan deney hayvanlarına intravenöz olarak sistemik ve topikal olmak üzere iki farklı şekilde indüklenmiş pluripotent MKH'LER uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda inflamasyonun azaldığı ve alveolar yıkımın inhibe edildiği bildirilmiştir (Yang ve diğerleri, 2014).

Duan ve arkadaşları, mine matriks ve türevleriyle yapmış oldukları bir çalışmada PDL-MKH'lerin, sement, periodontal ligament ve alveolar kemiğe farklılaşabildiğini bildirmişlerdir (Duan ve diğerleri, 2011). PDL-MKH'lerin farklılaşma özelliklerini incelemek için yapılan başka bir çalışmada bu hücrelerin osteojenik farklılaşma yeteneklerine sahip oldukları ve sement-periost kompleksinin rejenerasyonuna katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (Tang ve diğerleri, 2016).

Osteojenik farklılaşmanın değerlendirildiği *in vivo* çalışmalarda proliferasyon, matriks oluşumu ve minerilizasyon olarak adlandırılan üç temel aşama bulunmaktadır. Proliferasyon aşamasında hücre sayısında artış meydana gelmekte iken matriks oluşumu aşamasında ise kemik dokunun en önemli elemanlarından olan ALP ve Kollajen I sentezi başlamaktadır. Mineralizasyon aşamasında ise ALP aktivitesi düşerken osteokalsin protein sentezi gözlemlenmektedir (Akguner, 2021).

Yapılan çalışmalarda DP-MKH'lerin multipotent olduğu ve osteojenik olarak farklılaşabildiği gösterilmiştir (Aydin ve Şahin, 2019; d'Aquino ve diğerleri, 2007; Tóth ve diğerleri, 2020).

Osteojenik farklılaşma, Alirazin histokimyasal boyamayla histolojik olarak kanıtlanırken, gerçek zamanlı-qPCR ile RUNX2, OLC, ALP gibi osteojenik genlerin ekspresyonuyla transgenetik olarak da kanıtlanmıştır (Lee ve diğerleri, 2019). 2021 yılında yapılan bir çalışmada DP-MKH'lerin diğer dental doku kaynaklı MKH'lere kıyasla daha yüksek

kalsiyum depozit ettiğini ve osteojenik farklılaşmaları arasında istatistiksel olarak DP-MKH'lerin lehinde fark olduğunu göstermiştir (Son ve diğerleri, 2021).

PDL-MKH'lerin sementoblastlara, odontoblastlara, osteoblastlara ve adiposit hücrelerine farklılaşabileceği birçok çalışmada gösterilmiştir (Cong ve diğerleri, 2020; Habibovic ve diğerleri, 2006; Kotova ve diğerleri, 2021; Moritani ve diğerleri, 2018; Zheng ve diğerleri, 2018).

Osteojenik farklılaşmanın *in vitro* ortamda üç boyutlu hücre kültürlerinde gerçekleştirmesi *in vivo* ortama adaptasyonu kolaylaştırırken, bu durum klinik olarak uygulanabilirliği arttırmaktadır (Kirsch ve diğerleri, 2021; Moritani ve diğerleri, 2018).

2.6. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği; malzeme bilimleri, fizik, kimya ve yaşam bilimlerinin prensiplerini kapsayan çok disiplinli bir bilimdir. Çalışma alanı, hücre dışı yapılar üreterek, insan vücudunda zarar görmüş veya fonksiyon bozukluğu bulunan organların tamiri ve rejenerasyonu sağlayarak ve bu amaç doğrultusunda yeni yöntem ve teknikler geliştirmektir (Vacanti ve diğerleri, 2006). Doku mühendisliği ile ilgili uygulamaların geliştirilmesindeki temel amaç; herhangi bir hastalık ya da kaza sonucu fonksiyonunu kaybeden doku ya da organların iyileştirilmesi için hastadan ya da başka bir vericiden alınan hücrelerin biyoyumlu doku iskeleleri üzerinde geliştirilerek rejenerasyonun sağlanmasıdır.

MKH popülasyonları; sinir, kemik, kıkırdak ve kas dokularının bazı hastalık ve defektlerinin hücre temelli tedavisi için benzersiz potansiyele sahiptir (Seo ve Na, 2011). Yapılan çalışmalar MKH'lerin doku rejenerasyonu için doku mühendisliğindeki klinik potansiyelini ve önemini göstermektedir (van Hout ve diğerleri, 2011; Russo ve diğerleri, 2021).

Kemik dokusu mühendisliği, donör bölgeye zarar vermeden daha az zaman ve maliyetle alveolar defektlerin onarılmasını sağlamaktadır (van Hout ve diğerleri, 2011). Abukawa ve arkadaşları tarafından köpek ve domuzlarda yapılan bir çalışmada, oluşturulan alveol kemik defektlerinde, MKH uygulamasının kemik rejenerasyonunu arttırdığı belirlenmiştir (Abukawa ve diğerleri, 2004). Bir başka araştırma grubunun 2004 yılında diş çekim soketinde otojen kemik greftleri ve MKH/TZP (Trombositten Zengin Plazma) rejeneratif

etkinliklerini kıyaslamak için köpeklerde yaptıkları çalışmada, her iki grubun da benzer şekilde rejenerasyon sağladığı bildirilmiştir (Yamada ve diğerleri, 2004).

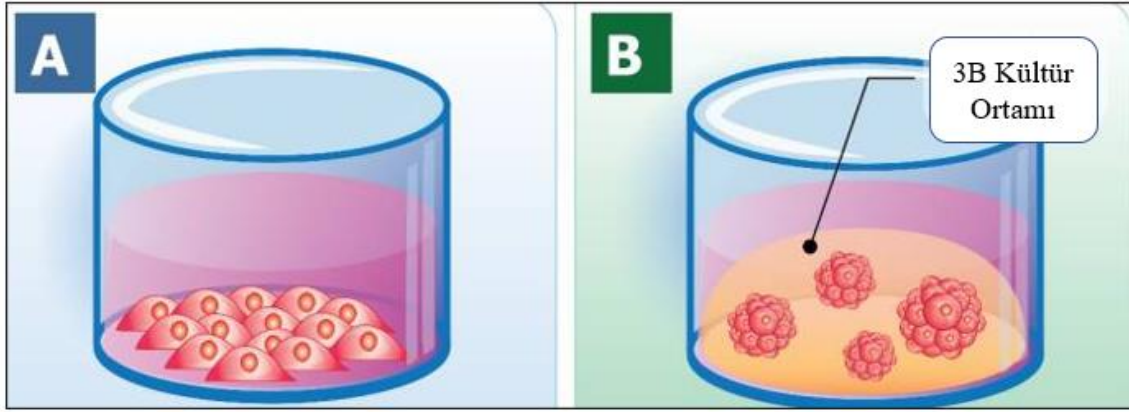
Dental kaynaklı kök hücreler, gelecekte rejeneratif tıbbı katkı sağlayabilecek hücrelerdir. Dental pulpa enfeksiyonu, periodontal hastalık ve bu hastalığa bağlı kemik kayıplarının tamir ve rejenerasyonunda kullanılabilirler. Hidroksiapatit-trikalsiyum fosfat ve demineralize dentin matriksi gibi biyomateryallerin kullanımı canlı organizmada ve deney ortamlarında osteojenik farklılaşma etkinliğini artırabilmektedir (Boccellino ve diğerleri, 2019). Dental kaynaklı kök hücreler oluşturulan spesifik bir ortamda osteojenik, adipojenik ve nöral farklılaşma gösterebilmektedirler (Moshy ve diğerleri, 2020).

Kök hücrelerin, *in vitro* ortamda çeşitli hücre tiplerine farklılaştırılarak, hücre kültüründe sert doku oluşumları değerlendirmeleri için hücresel düzeyde testler uygulanmaktadır. Bu testler yardımıyla hücresel belirleyicilerin tayini yapılarak dokuda meydana gelen farklılaşma düzeyi tespit edilebilmektedir. İki boyutlu (2B) tek tabakalı (monolayer) hücre kültürü, *in vitro* araştırmalar için standart yaklaşımdır. Dr. Harrison tarafından ilk olarak 1907 yılında kurbağa embriyolarından eksplante edilen sinir liflerinin kökenlerini araştırmak için geliştirilmiştir (Breslin ve O'Driscoll, 2013). Bu geleneksel yöntemde, düz bir yüzeye sahip hücre kültürü kaplarına hücrelerin yapışması, yer değiştirmesi ve yayılması sağlanarak yapılması planlanan çalışmalar analiz edilmiştir (Mabry, Payne ve Anseth, 2016). Bu çalışmalarda hücrelerin hareketleri x-y düzlemi ile sınırlıdır. Her ne kadar 2B hücre kültürü tekniğinin uygulamasının kolay ve maliyetinin düşük olması avantaj gibi görülse de bu yöntemle oluşturulan kültür ortamların *in vivo* ortamı tam olarak taklit edemeyeceği belirtilmiştir (Baker ve Chen, 2012). 2B ortamda kültürlenmiş hücrelerin, aynı mikroçevrede bulunan hücrelerle iki boyutlu teması yol açan tek tabakalarda büyümesi sırasında büyüme faktörlerini ve homojen besinleri çevreden alırken anormal hücre yayılması ve gerçekçi olmayan hücre reseptörü dağılımına neden olduğu söylenmektedir (Rubashkin, Ou ve Weaver, 2014).

Ayrıca 2B kültür ortamında yapılan deneylerde hücreler dokuların doğal yapısını taklit edemedikleri için; değerlendirilmek istenen hücre çoğalması, farklılaşması, gen ve protein ekspresyonu, uyarana yanıt, ilaç metabolizmasına karşı etkileşim veya hücre canlılığına yönelik çalışmalarda hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimini temsil edemedikleri için elde edilen sonuçların yanıltıcı olabileceği ifade edilmektedir (Magin, Alge ve Anseth, 2016;

Zorba Yıldız ve diğerleri, 2022). 2B kültür ortamlarında yapılan deneylerde hücrelerin *in vivo* özelliklerini uzun süre devam ettirememeleri de dezavantaj olarak değerlendirilmektedir (Weigelt, Ghajar ve Bissell, 2014).

Bu sınırlamaları ve 2B kültürün dezavantajlarını gidermek için, 3B kültür yöntemleri geliştirilmiştir. 3B kültür ortamı, hücrelerin matris içinde veya üzerinde morfolojik olarak vücuttaki doğal ortamlarına benzer bir mikroçevredir. Hücreler bu sayede hücre-hücre, hücre-ekstrasellüler matris etkileşimini *in-vivo* ortamdaki gibi taklit edebilirler (Schroeder ve diğerleri, 2021) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. 2B ve 3B Kültürü şematik diyagramı (Chaicharoenaudomrung, Kunhorn ve Noisa, 2019). 2B kültür ortamında hücreler kültür kabının tabanında tek tabaka halindedir (A). 3B kültür ortamında hücreler jel yapının üzerinde veya içinde bulunurlar (B)

3B kültür ortamında oluşturulan mikro çevrelere hücrelerin daha iyi adapte olduğu ve hücrelerin davranışlarının, hücre morfolojilerinin, farklılaşma derecelerinin, polaritelerinin, proliferasyon hızları ve gen ekspresyon seviyelerinin *in vivo* koşullarda daha iyi değerlendirildiği bildirilmiştir (Reig-Vano ve diğerleri, 2021). Bunun yanı sıra 3B ortamların, yapılan deneylerde hücrelerin *in vivo* benzeri gen veya protein ekspresyon seviyelerinin korunmasını sağladığı ifade edilmiştir (Weigelt ve diğerleri, 2014). 3B kültür ortamı hazırlanarak yapılan deneylerde mikro çevresel faktörler uygun bir şekilde hazırlanırsa kök hücrelerde; çoğalma, matris üretimi ve farklılaşma görüldüğü bildirilmiştir (Duval ve diğerleri, 2017).

3B hücre kültürü ortamları kök hücre çalışmalarında, rejeneratif tıp veya hücre bazlı ilaç testlerinde, kanser araştırmalarında, gen ve protein ekspresyon çalışmalarında yaygın olarak

kullanılmaktadır (Sapet ve diğeri, 2013). Hücreler karmaşık biyokimyasal ve mekanik ipuçları yoluyla ECM ile etkileşime girip, biyolojik dokuların özgüllüğünü koruyan bir 3B ağ kurmaktadır. 3B matrisler hücrelerin bağlanması ve büyümesi için mekanik platformlar olarak çalışmaktadır (Griffith ve Swartz, 2006).

Osteojenik farklılaşma amacıyla yapılan çalışmalarda aljinat, jelatin HA içerikli 3B kültür ortamlarının osteoblast farklılaşmasının pozitif yönde etkilendiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Farrell ve diğeri, 2007; Polat, 2020).

Dental dokular için de doku mühendisliğinin ilerlemesi ümit vericidir. Dişler ve oral dokular insanların günlük fonksiyonlarında önemli rol oynar. Hidroksiapatit-trikalsiyum fosfat ve demineralize dentin matriksi gibi biyomateryallerin kullanımı canlı organizmada ve deney ortamlarında osteojenik diferansiyasyonun etkinliğini artırabilir (M Boccellino ve diğeri, 2019).

DP-MKH'ler rejeneratif tıpta; dentin rejenerasyonu, retinal dejenerasyon tedavisi, spinal kord yaralanmaları, parkinson hastalığı, alzheimer hastalığı, serebral iskemi, miyokard enfarktüsü, muskular distrofi, diyabet ve immün hastalıklar gibi çeşitli klinik alanlarda kullanılmaya başlanmıştır (Bahmada ve diğeri, 2020). Yüksek proliferasyon özelliklerine sahip CD34 pozitif ve CD4 negatif yüzet belirteçlerine sahip DP-MKH'ler, osteoblastlara diferansiye olabilirler. İmmün yetmezliğe sahip sıçanlara DP-MKH transplantasyonu sonrasında katmanlı kemik dokusu oluşturabilen *in vitro* aktif otolog fibröz kemik dokusu üretebildikleri belirtilmiştir (Laino ve diğeri, 2005).

SD-MKH'ler, dental rejenerasyon, kemik rejenerasyonu, zorlu pediatrik cerrahi hastalıklar, karaciğer yetmezliği, nöral rejenerasyon ve terapötik uygulamaların revaskülarizasyonu gibi klinik uygulamalar için potansiyel bir hücre kaynağıdır (Ercal, Pekozer ve Kose, 2018). CD105 yüzey belirteci pozitif olan SD-MKH alt populasyonlarının *in vitro* osteojenik potansiyeli yüksektir (Ishiy ve diğeri, 2018).

Periodontal rejeneratif tedavide hücrelerin, 3B kültür ortamlarıyla oluşturulan mikroçevre daha iyi adapte olduğu ve hücrelerin davranışlarının, morfolojilerinin, farklılaşma derecelerinin, polaritelerinin, proliferasyon hızları ve gen ekspresyon seviyelerinin *in vivo*

koşullarda daha iyi değerlendirildiği bildirilmiştir (Reig-Vano, 2021; Weigelt ve diğerleri, 2014).

Periodonsiyum kökenli kök hücrelerin osteojenik farklılaşma seviyelerinin değerlendirildiği bir çalışmada, 3B kültür ortamlarının osteoblast farklılaşmasını pozitif yönde etkilediği bildirilmiştir (Farrell ve diğerleri, 2007). Elango ve arkadaşları PDL-MKH'lerin osteojenik farklılaşmaya etkisini 2B ve 3B kültür ortamlarında değerlendirmişlerdir. 3B kültür ortamında bulunan hücrelerin osteokalsin ekspresyon seviyelerinin, 2B kültür ortamında bulunan hücrelerden anlamlı seviyede yüksek olduğunu ve bu bulgunun periodontal rejeneratif tedavi için umut verici bir yaklaşım olduğunu bildirmişlerdir (Elango ve diğerleri, 2020).

Yapılan bir başka çalışmada, periodonsiyum kökenli MKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasitelerine olan etkisi histokimyasal analizler ve gen ekspresyon seviyelerinin tespiti ile değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda 3B kültür ortamlarının osteojenik farklılaşmada büyük bir role sahip oldukları bildirilmiştir (Eswaramoorthy ve diğerleri, 2021).

Periodontal rejeneratif tedaviye yönelik son yıllarda yapılan çalışmalarda, 3B kültür ortamlarına eklenen ilaçlar, büyüme faktörleri ve nano sistemlerin kök hücrelerin rejeneratif etkisini daha efektif hale geldiği bildirilmiştir. Oluşturulan 3B kültür ortamlarının periodonsiyum kökenli kök hücrelerin osteojenik farklılaşma potansiyelini artırmasının yanı sıra immünomodülatör etki göstermeleri de bu ortamların avantajları arasında değerlendirilmektedir (D'Avanzo ve diğerleri, 2021; Zeng, Ning ve Huang, 2021).

Doku mühendisliği alanında MKH'lerin osteojenik farklılaşmasına yönelik hayvan çalışmaları da mevcuttur.

2013 yılında AD-MKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasitelerinin değerlendirmek amacıyla yapılan hayvan çalışmasında köpeklere cerrahi olarak sınıf-III furka defektleri oluşturulmuştur. Çalışmada kontrol grubuna TZP, deney grubuna ise AD-MKH ve TZP uygulanmıştır. Araştırmacılar, AD-MKH ile tedavi edilen grupta 8 hafta sonunda alvelolar kemik, sement ve PDL benzeri yapıların oluştuğunu, kontrol gruplarında ise bu oluşumların gözlemlenmediğini bildirmişlerdir (Tobita ve diğerleri, 2013).

Periodontal rejeneratif tedavide AD-MKH'lerin osteojenik farklılaşmasının değerlendirildiği bir başka hayvan çalışmasında, ratların alveolar kemiklerinde fenestrasyon defekleri oluşturulmuştur. Yapı iskelesi olarak poliglikolid-polilaktid (PLGA) kullanılarak oluşturulan çalışmada 5 hafta sonunda AD-MKH'ler kullanılarak oluşturulan grupta yeni sement ve kemik formasyonu gözlemlendiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Akita ve diğerleri, 2016).

Asutay ve arkadaşları tarafından DP-MKH'lerin ve HA ve Trikalsiyum Fosfat (Tricalcium-phosphate/ TCP) içerikli yapı iskelelerinin osteojenik farklılaşmaya etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada ratlar üzerinde kraniyal defekt oluşturulmuştur. Çalışma 8 hafta olarak planlanmış olup, deney grupları sırasıyla;

- DP-MKH, HA, TCP
- HA + TCP
- Sadece defekt şekilde belirlenmiştir.

Araştırmacılar çalışmanın sonucunda DP-MKH içerikli deney grubunda kemik mineral yoğunluğu ve kalsifikasyon oranının diğer gruplara göre daha yüksek seviyede anlamlı olduklarını bildirmişlerdir (Asutay ve diğerleri, 2015).

Mrozik ve arkadaşlarının, periodontal rejenerasyonda PDL-MKH'lerin etkinliğinin histolojik olarak değerlendirildiği bir çalışmada koyunlar üzerinde periodontal defekt modelleri oluşturulmuştur. Çalışmada kontrol gruplarına aljinat ve jelatin içerikli yapı iskelesi, deney grubuna ise PDL-MKH, aljinat ve jelatin içerikli yapı iskelesi uygulanmıştır. Uygulamadan dört hafta sonra ilgili bölgelerde yapılan histolojik analizlerde deney grubunun uygulandığı bölgede, yeni oluşan alveolar kemik bölgesinin yüzey alanının kontrol grubuna göre yüksek olduğu ve daha fazla miktarda sement olduğu bildirilmiştir (Mrozik ve diğerleri, 2013).

PDL-MKH ve kalsiyum fosfat içerikli yapı iskelelerinin periodontal rejenerasyonda etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada köpeklerde periodontal defekt modelleri oluşturulmuş, elde edilen bulgular 4,8 ve 12. haftalarda bilgisayarlı tomografi, IF analizler ve ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Araştırmacılar yapılan analizler sonucunda PDL-MKH'lerde sitokeratin proteinlerinin negatif, vimentin ve STRO-1 proteinlerinin pozitif

ışıma verdiğini ve kalsiyum fosfat içerikli yapı iskelelerinin osteojenik farklılaşmaya katkı sağladığını bildirmişlerdir (Shi ve diğerleri, 2018).

PDL-MKH ve kollajen içerikli yapı iskelelerinin periodontal iyileşmeye olan etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada köpeklerin bilateral maksiller premolarlar ve birinci molarlar dişlerinde cerrahi olarak dehisens defektler oluşturulmuş ve 8 hafta sonrasında periodontal iyileşme histolojik olarak değerlendirilmiştir. Araştırmacılar çalışmanın sonucunda, PDL-MKH'lerin sement ve yeni kemik oluşumu dâhil olmak üzere periodontal rejenerasyonu artırdığını bildirmişlerdir (Yoo ve diğerleri, 2019).

2.7. MKH'lerin Farklılaşma Seviyelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Analizler

Kök hücrelerin 2B ve 3B ortamlarda kültüre edildiğinde göstermiş oldukları farklılaşma kapasitelerinin değerlendirilmesi amacıyla uygulanan yöntemler ile ilgili bilgiler aşağıda verilmiştir.

2.7.1. Akım sitometri analizleri

MKH'ler köken aldıkları dokudan bağımsız olarak hücre kültürü kaplarında yüzeye yapışabilme ve çoğalabilme özelliğine sahiptirler. Fibroblastlara benzer bir morfoloji gösteren bu hücreler aynı zamanda çok yönlü farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Hücre yüzeyinde bulunan bazı belirteçler kök hücrelere özgü karakteristik niteliktedirler (Seo ve diğerleri, 2004).

Akım sitometri analizleriyle hücre yüzeyinde bulunan spesifik yüzey antijenleri tespit edilerek hücrelerin karakterize edilmesi ve tanımlanması sağlanır. Farklılaşma deneylerinde elde edilen sonuçlar değerlendirilirken MKH'lerin yüzeyinde bulunan spesifik antijenlerdeki değişim oranı dikkate alınmaktadır (Gronthos ve diğerleri, 2000). Araştırmacılar çalışmalarında kullandıkları hücre hatlarının, kök hücre olduğunu karakterize etmek ve farklılaşma seviyelerini değerlendirmek amacıyla akım sitometri analizlerini kullanmaktadırlar (Kaya ve diğerleri, 2021; Sun ve Karaoz, 2020).

Süspansiyon halindeki hücre ve partiküllerin gerekli monoklonal antikorlar yardımı ile hücrelerin fenotipik ve karakteristik özelliklerini kantitatif olarak değerlendirmek amacıyla yapılan bu yöntem, hücre tiplerinin belirlenmesi için pozitif, negatif ve kontrol tüpleri

kullanılarak hücre yüzeyinde karakteristik olarak taşınması gereken yüzey belirteçlerinin saptanma yüzdesinin belirlenmesiyle gerçekleştirilir (Ormerod ve Novo, 2008; Uçaryılmaz ve Artaç, 2013).

Hücrelerin MKH olarak tanımlanabilmesi için, hücrelerde %95 ya da daha fazla oranda CD90, CD105 ve CD73 antijeninin pozitif olması gerekirken; hematopoitik ve endotelial hücre gruplarından ayırt etmek için CD45/34/11b/19/HLA-DR yüzey antijenlerinin toplamının %2 oranını geçmemesi gerekir (Lei, Zhang ve Du, 2021).

2.7.2. Alizarin red histolojik boyaması

Alizarin red boyaları, kalsifiye kemik varlığında kırmızı-turuncu renkli boyamalar vermekte olup ve bu boyanan alanlar kalsifiye kemik nodülleri ve kemikleşmenin göstergesi olduğu kabul edilmiştir (Berbéri ve diğerleri, 2017; Fan ve diğerleri, 2020; Mahmoud ve diğerleri, 2020; Puchtler ve diğerleri, 1969).

MKH'lerin, osteojenik farklılaşma öncesinde yapılan analizlerde hücre dışı kalsiyum birikimine sahip olmadığı ve alizarin red boyanmasının gözlemlenmediği yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. Mikroçevrenin osteojenik farklılaşmaya uygun olarak değiştirilmesi sonucu yapılan alizarin red boyamalarında osteoblastlara dönüşen hücrelerde kalsiyum birikmesi görülmektedir (Jaiswal ve diğerleri, 1997; Puchtler, Meloan, ve Terry, 1969; Takeyasu ve diğerleri, 2004).

2.7.3. İmmün floresan boyama

İmmünfloresan boyama (IF), antijenlerin hücre içindeki lokasyonunu floresan etiketi ile belirlemek için kullanılan bir yöntemdir (Kaya ve Tulun, 2021). Bu amaçla boyama öncesi hücrelerin fikse edilmesi gerekmektedir. Fiksasyon sonrası, hücreler yıkanarak fiksatif uzaklaştırılır. Deterjan içeren solüsyonlar ile hücreler muamele edilerek hücre membranının geçirgenliği ve bloklama solüsyonları ile boyama spesifikliği artırılabilir. Bu işlem, sıgır serum albümini içeren bir solüsyon ile hücreleri muamele ederek gerçekleştirilir.

İşaretlemede öncelikle ortama, hedef antijene bağlanacak primer (birincil) antikor eklenir. Primer antikor ile antijenin bağlanmasından sonra ortama, primer antikor ile uyumlu olan, bir ucunda floresan ışığa veren sekonder (ikincil) antikor eklenir. Primer antikor

yakalanmak istenen antijene bağlanırken, sekonder antikor primer antikora bağlanır ve floresan etiketi ile antijenin varlığını ve yerini tespit etmemizi sağlar.

Birden fazla primer kullanılarak eş zamanlı olarak birden fazla antijen immüno-lokalize edilebilir (Donaldson, 2015). Bu gibi durumlarda sekonder antikorların çapraz bağlanmamasına dikkat edilmelidir. Bir diğer dikkat edilmesi gereken nokta ise sekonder antikorlara bağlı florofor olarak adlandırılan ışımaların farklı renklerde olmasıdır. Sekonder antikor, primer antikor dışında başka bir yere bağlanabiliyor ise yanlış ışımaya alınabilir. Bu yüzden deneye kontrol olarak, primer antikoru olmayan, yalnızca sekonder antikor eklenmiş örnek de dahil edilmelidir (Schieker ve diğerleri, 2004).

MKH'leri osteojenik farklılaşma kapasitelerinin değerlendirildiği çalışmalarda tercih edilen primer antikorlara örnek olarak ALP, Osteokalsin, Osteopontin, COL-1, RUNX, vimentin verilebilir.

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilin-dol), floresan boyama ile DNA'yı dolayısıyla hücrelerin çekirdeğini mavi renge boyayan bir boyadır. DAPI boyaması histokimyasal ve biyokimyasal çalışmalarda DNA'da meydana gelen değişimleri tespit etmek amacıyla kullanılan boyama tekniğidir (Kapuscinski 2009). Hücrelerde ışık mikroskobu altında kaydedilen DAPI boyanmasının mekanizması araştırıldığında, DAPI'nin hücrenin DNA'sında bulunan A-T nükleik asit kompleksi bakımından zengin bölgelere bağlandığında, floresan etkisinin 20 kat arttığı ve bütün hücre çekirdeklerini boyadığı bildirilmiştir (Larsen ve diğerleri, 2012). DAPI floresan boyası ışığa hassas olduğu için boyama işlemleri karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

MKH'ler, kendini yenileyebilen ve farklı hücre türlerine dönüşebilen multipotent hücrelerdir. Nörepiyetal kök hücrelerde bulunan Nestin, gelişimin erken evrelerinde tanımlanan bir ara filament olarak adlandırılan hücre isketi elemanı olmakla birlikte kemik gelişimine katkıda bulunan hematopoitik kök hücrelerin karakterizasyonunda kullanılan spesifik bir belirteçtir (Xie ve diğerleri, 2015).

Osteojenik farklılaşma pek çok farklı protein ve transkripsiyon faktörüne sahiptir. ALP, Osteokalsin, Osteopontin, COL-1, RUNX gibi gen proteinleri en çok bilinen osteojenik

farklılaşma belirteçleridir (Martin ve diğerleri, 2017). Kemiğin organik bileşenlerinde COL-1, Osteokalsin, Osteonektin, ALP bulunmaktadır.

Osteopontin, hücre dışı yapısal bir proteindir ve kemiğin organik bileşenidir. COL-1 Proteinini ise kemiğin organik kısmında ve dentinin yapısında bulunmaktadır (McKee, Addison ve Kaartinen, 2006).

Vimentin, mezodermal kökenli hücrelerde bulunan, organellerin yerini sabitlemeye yarayan ve hücreye esneklik veren lifli yapıda bir ara filamenttir. Embriyonik ve mezenkimal hücreler ile kaslarda yaygın olarak bulunur (Rubashkin ve diğerleri, 2014).

2.7.4. Gerçek zamanlı PZR (real-time PCR) analizleri

1980'lerde Kary Mullis tarafından geliştirilen PZR analizi, DNA ya da mRNA'ya ait örneklerin çoğaltılmasına yönelik moniterize edilebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı bir yöntemdir. Gerçek zamanlı olarak adlandırılmasının nedeni ise floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı bir artış göstermesidir (Kb ve diğerleri, 1987). Eser miktardaki spesifik nükleik asit dizilimini tespit edip ölçebildiğinden, biyolojik araştırmalarda sağlam ve yaygın bir kanıt olarak kullanılan bu yöntem ile gen ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler hızlı ve doğru bir şekilde değerlendirilmektedir. Gerçek zamanlı PZR analizi yapılacak olan örneklerde belirli bir hedef diziyi yükseltir. Ardından floresan teknolojisini kullanarak amplifikasyon sürecini başlatır.

Amplifikasyon, floresan sinyalinin bir eşik seviyesine ne kadar hızlı ulaştığı, orijinal hedef dizinin miktarı ile ilişkilidir ve böylece incelemeyi mümkün kılar. Amplifikasyon grafikleri PZR reaksiyonunun seyri boyunca meydana gelen ışıma miktarının döngü sayısına göre grafiğinin çizilerek reaksiyon sırasında ürün birikimini temsil etmekte olup, pik yaptığı nokta reaksiyon içindeki DNA'nın düzenli olarak logaritmik faza geçtiği ilk andır (Palmer ve diğerleri, 2004).

Analizlerde DNA'nın hedef bölgede olduğunu bulunup bulunmadığını belirlemek amacıyla erime eğrisi (melting curve) değerlendirilir. Bu değerlendirme iki iplikli yapıya sahip olan DNA'nın sıcaklığını kademeli olarak artırarak SYBR-Green gibi floresan sinyallerin sıcaklığa bağlı olarak değişimini gösteren bir grafikdir (Şahiner ve diğerleri, 2020).

“Kinetik PZR”, “Homojen PZR” ve “Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR” gibi çeşitli adlarla da isimlendirilen yöntem ile hücrelerin gen ekspresyon seviyelerinin analizleri doğru ve hassas bir şekilde yapılmış olur (Kesarwani ve diğerleri, 2018).

Gerçek zamanlı PZR metodu DNA’nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılar. Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işleminin hem de çoğaltılan ürünleri saptama işleminin yapılabilmesi, bu yöntemi çok pratik bir yöntem haline getirmiştir. Yöntemin avantajları arasında duyarlılığının yüksek olması, tekrarlanabilirliğinin fazla olması ve kontaminasyon riskinin düşük seviyede olması sayılabilir (Schmittgen ve Livak 2008).

2.8. Osteojenik Farklılaşma Analizlerinde Değerlendirilen Genler

Gerçek Zamanlı PZR analizlerinde genlerin ekspresyon seviyelerindeki artış ya da azalışla elde edilen farklılaşma değerlendirilir. Çalışmamızda gerçek zamanlı PZR analizlerinde değerlendirmeler için GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz), ALP (Alkalen Fosfat), BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein/Kemik Farklılaşma Proteini) ve RUNX genleri kullanılmıştır.

2.8.1. GAPDH

Gardiyan gen (Housekeeping gen) çeşitleri, genellikle temel hücresel fonksiyonun sürdürülmesi için gerekli olan ve bir organizmanın hemen hemen tüm hücrelerinde aynı oranda eksprese edilen temel genler olarak kabul edilir. Hücrelerin nicel gen ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmek istendiği araştırmalarda housekeeping genlerinden olan GAPDH geninin kullanım amacı, dokularda ve hücrelerde ekspresyon seviyesinin sabit olmasıdır. GAPDH, yeni doğan ve yetişkin kalp hücreleri için diğer kontrol genlerine kıyasla en tutarlı şekilde eksprese edilen gen olmakla birlikte mRNA ekspresyonunun kapsamlı bir analizini sağlar ve analiz edilen diğer genlerin ekspresyon düzeyleri de seçilen housekeeping gene göre otomatik olarak hesaplanır (Barber ve diğerleri, 2005).

2.8.2. ALP

ALP, ekstrasellüler plazma membranına bağlı glikoproteinlerdir. Nükleotidler ve proteinlerden fosfat gruplarının koparılmasını sağlar. Farklılaşmamış pluripotent kök

hücrelerin hücre membranında yüksek miktarda bulunmaktadır. İnorganik fosfat salınımı ile optimum pH'da çeşitli monofosfat esterlerini hidrolize eder (Yu ve diğerleri, 2015). Ayrıca hücre stoplazmasında kalsiyumun, kalsiyum fosfat olarak çökmesinde rol oynayarak, kalsifikasyonda görev alır. Osteoblast aktivitesinde rol alan önemli bir enzimdir (Florencio-Silva ve diğerleri, 2015).

2.8.3. BMP-2

MKH'lerin osteojenik farklılaşmasında ve aynı zamanda kemik oluşumunun düzenlenmesinde BMP'ler önemli rol oynar (Hong Huang ve diğerleri, 2018). Ayrıca sitokin-sitokin reseptör etkileşiminde ve büyüme faktörü TGF- β sinyal ileti yolunda da rol alır. BMP2'nin yapılan bir çalışmada osteogenezi indüklediği gösterilmiştir. Kemik dejenerasyonunu tedavi etmek için yapılan kök hücrelerle yapılan bir çalışmada BMP2'nin osteogenezi ve *in vivo* yeni kemik oluşumunu indüklediği gösterilmiştir (Kim ve diğerleri, 2019). BMP2 klinikte uygulanmak için onaylanmıştır. Fakat hala altta yatan mekanizmaları tam olarak anlayamamıştır (Hong Huang ve diğerleri, 2018).

2.8.4. RUNX2

DNA bağlayıcı etki alanna sahip olan RUNX ailesi RUNX1, RUNX2 ve RUNX3'ten oluşur. RUNX2, gelişmiş DNA bağlanma kabiliyeti ve protein stabilitesi kazanır. RUNX2'nin P1 ve P2 olarak adlandırılan iki promotörü vardır. P1'den gelen transkript tip II RUNX2'yi kodlar ve P2'den gelen tip I RUNX2'yi kodlar. RUNX2 osteoblastlarda ve kondrositlerde eksprese edilir. MKH'lerin osteoblastlara farklılaşması için RUNX2 geninin regülasyonu kilit rol oynamaktadır. Bunun için eksozomları uyarmasının yanı sıra, 21-23 nükleotit uzunluğunda tek iplikli RNA molekülü olan mikroRNA (miRNA)'ların düzenlenmesi ile de hücrelerin farklılaşması üzerine çalışmalar sürmektedir (Almalki ve Agrawal, 2016).

Diş Hekimliğinde kök hücre uygulamaları henüz periodontal rejeneratif tedavide rutin olarak kullanıma girmemiştir. Bu konu hakkında yapılan klinik, hayvan ve *in vitro* çalışmalar olsa da yeterli seviyede değildir. Periodontal rejeneratif tedaviye yönelik yapılan *in vitro* çalışmalarda 2B hücre kültürü standart bir yaklaşımdır. Hücreler bu ortamlarda kültüre edildiğinde, davranış ve morfolojilerinde 3B doğal ortamlara kıyasla sınırlamalar bulunmaktadır. Çalışmamızda AD, DP ve PDL kökenli MKH'ler 2B ve 3B ortamlarda

kültüre edilerek, hücrelerin morfolojileri, kök hücre ve osteojenik farklılaşma özellikleri yapılan histolojik boyamalar, IF boyamalar, akım sitometri analizleri ve gerçek zamanlı PZR analizleri üzerinden değerlendirilerek, kantitatif sonuçlar elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla planladığımız çalışmamızda önceki çalışmaların sonuçlarına yeni veriler dâhil ederek, gelecek çalışmalar için basamak oluşturmayı hedeflemekteyiz.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın deneysel kısımları İstinye Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kök Hücre ve Doku Mühendisliği (İSÜKÖK) ile 3B Tasarım ve Prototipleme (İSÜ3D) Araştırma ve Uygulama merkezlerinde yer alan laboratuvarlarda gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması, YÖK 100/2000 Kök Hücre Doktora Programı kapsamında ve Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2021-6977 numaralı proje kodu ile desteklenmiştir.

Periodonsiyum kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik farklılaşma kapasitelerinin 2 ve 3 boyutlu kültür ortamında değerlendirilmesi başlıklı tez çalışmasında kullanılan gereçler ve uygulanan yöntem aşağıda belirtilmiştir.

3.1. Gereçler

Araştırma kapsamında kullanılan kimyasal/ mekanik malzemeler, hücre hatları ve primerler aşağıda belirtilmiştir.

3.1.1. Sarf malzemeler

- 25,75,175 cm² 'lik kültür kapları, Corning
- 6, 24 ve 48 kuyulu kültür kapları, Corning
- 5, 10, 25 ml hacimlerinde serolojik pipetler, Isolab
- 5 ml ve 10 ml hacimlerinde enjektörler, Set inject
- 10-100-1000 µl'lik pipet uçları, Isolab
- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Corning
- Steril santrifüj tüpleri (15-50 ml), Nest
- Mikrosantrifüj tüpleri (0,2- 1 – 1,5-2 ml eppendorf), Eppendorf
- Thoma lamı, Bright
- Line, Hausser Scientific Horsham, PA, USA
- Mikroskop lamı, Nest
- 2ml – 4mlKriyoviyal, Corning
- Diyaliz membran, Sigma&Aldrich, Inc., Almanya
- Petri kutusu 60x15 mm ve 80x15 mm, Isolab

3.1.2. Kullanılan cihazlar

- Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR), Jasco FT/IR-4600
- Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (¹H NMR), Varian UNITY INOVA
- İndüktif Eşleşmiş Plazma ve Kütle Spektrometresi (ICP-MS), Agilent 7800
- X-Işını Difraktometresi (XRD) cihazı, PANalytical X'Pert Pro MPD
- Zeta Potansiyeli ve Partikül Boyutu Ölçüm Cihazı, NanoZS Malvern Instrument
- Liyofilizatör, Telstar Lyo Quest
- Mekaniksel Test Cihazı, TA. XT Plus
- Hidrotermal Reaktör, Kent Kimya
- Mikroplaka Okuyucu, Spektrostar Nano-Floresans Mikroskobu, Zeiss Axio
- pH Metre, Ohaus - Hassas Terazî, SHIMADZU AUW220D
- Santrifüj, Hitachi, Japonya-Etöv, Nüve FN055
- Hücre Kültürü İnkübatörü (CO₂ inkübatörü), Panasonic
- Steril Kabin, Telstar- Otoklav, Nüve, OT120M
- Inverted Mikroskop, Nikon, Japonya
- UV Light, Omnicure S2000, Excelitas Technologies, ABD
- Mikrotom Cihazı, Leica
- Spektrofluorometre, Jasco, FP 8300
- Manyetik karıştırıcı, Jeiotech - Buzdolabı, Panasonic
- Mikropipet, Rainin
- BİO RAD Real-Time PCR System, CFX96 TOUCH, 4376600
- Işık Mikroskobu, Nikon Eclipse TS2
- Step One Plus RT-PCR System, Applied Biosystems
- Nanodrop, Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers, ND-2000
- Santrifüj, Neofuge 13R-Refrigerated Centrifuge-Heal Force Bio

3.1.3. Kullanılan kitler

- Gerçek zamanlı PZR Master Mix, Thermo Scientific™ Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), K0221
- cDNA Kiti, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, 4368814

3.1.4. Kimyasal malzemeler

- %0,05 Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco, ABD
- 4',6-Diamidino -2-fenilindol dihidroklorür (DAPI), Sigma
- Alizarin Red S, Sigma, Almanya
- Alizarin, Sigma&Aldrich, USA
- Alkaline Phosphatase(H-300), sc 30203, Lot #K1109, Santa Cruz Biotechnology
- Alkol, Tekkim Kimya, Türkiye
- Anti- Collagen, #PA1-26204, Lot #MJ4723355D, Thermo
- Baseink™, HDBioink, Türkiye
- BMP-2 (N-14), sc6895, Lot #G1310, Santa Cruz Biotechnology
- BMP-4 (N-16), sc-6896, Lot #K1610, Santa Cruz Biotechnology
- Boneink™, HDBioink, Türkiye
- CaCl₂
- COL-1, sc-59772, Santa Cruz Biotechnology
- Dexamethasone, Sigma, Almanya
- Dimetilsülfoksit (DMSO), Sigma, Almanya
- DMEM F12, BI, İsrail
- Fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum/ FBS), Gibco, ABD
- Fibronectin (EP5), sc8422, Lot #F1808, Santa Cruz Biotechnology
- Fosfat tuz tamponu (Phosphate Buffered Salin/ PBS), Gibco, ABD
- Gaot anti-mouse, IgM-FITC, SC2082, Lot #F0509, Santa Cruz Biotechnology
- Goat anti-mouse, IgG-TR, sc2781, Lot #C3109, Santa Cruz Biotechnology
- Goat anti-rabbit, IgG-FITC, SC2012, Lot #J1514, Santa Cruz Biotechnology
- Goat anti-rabbit, IgG-FITC, sc2780, Lot #C1015, Santa Cruz Biotechnology
- High Glucose DMEM, BI, İsrail
- Kloroform, Sigma, Almanya
- L- Ascorbic Acid Phosphate Magnesium Salt n- Hydrate, Sigma
- L-glutamin, Gibco, USA
- Nestin (5C93), sc71665, Lot #H1707, Santa Cruz Biotechnology
- Nükleaz Free, Ultra Distile Su, Biochrom AG Ultra Pure Water, Sterile, Suitable for HPLC, L0015-BC
- OPN (AKm2A1), sc-21742, Lot #H2709, Santa Cruz Biotechnology
- Paraformaldehit (PFA) Sigma&Aldrich, Inc., Almanya

- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu, Gibco, ABD
- Primerler, (Sentegen, Ankara)
- Sodyum hidroksit (NaOH), Sigma, Almanya
- Trizol Reagent, Sigma, Almanya
- Vimentin (C-20), sc7557, Lot #E2909, Santa Cruz Biotechnology
- Water Thermo Scientific™ Water, Nuclease-free, Molecular Biology Grade, Ultrapure, 7732-18-5
- β - Glycerophosphate Disodium Salt Pentahydrate, Sigma

3.1.5. Kullanılan primer gen dizileri

Çalışmada kullanılan primerler dizileri Dr. Hakan DARICI tarafından tasarlanmış olup Sentegen (Ankara) firması tarafından sentezlenmiştir. Kullanılan primerlere ait baz dizileri Çizelge 3.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. 50 nmol hacminde OPC grade primerler

PRİMER ADI	PRİMER DİZİSİ	BAZ UZUNLUĞU
ALP forward primer	CTATCCTGGCTCCGTGCTCC	20
ALP reverse primer	GCACCCCAAGACCTGCTTTA	20
BMP2 forward primer	ACTCGAAATTCCCCGTGACC	20
BMP2 reverse primer	CCACTTCCACCACGAATCCA	20
GAPDH forward primer	CAAATTCCATGGCACCGTCA	20
GAPDH reverse primer	GACTCCACGACGTACTCAGC	20
RUNX forward primer	TGAGCATCACCAACCCACAG	20
RUNX reverse primer	GCACTGTGGGTACGAAGGAA	20

3.1.6. Hücre hatları

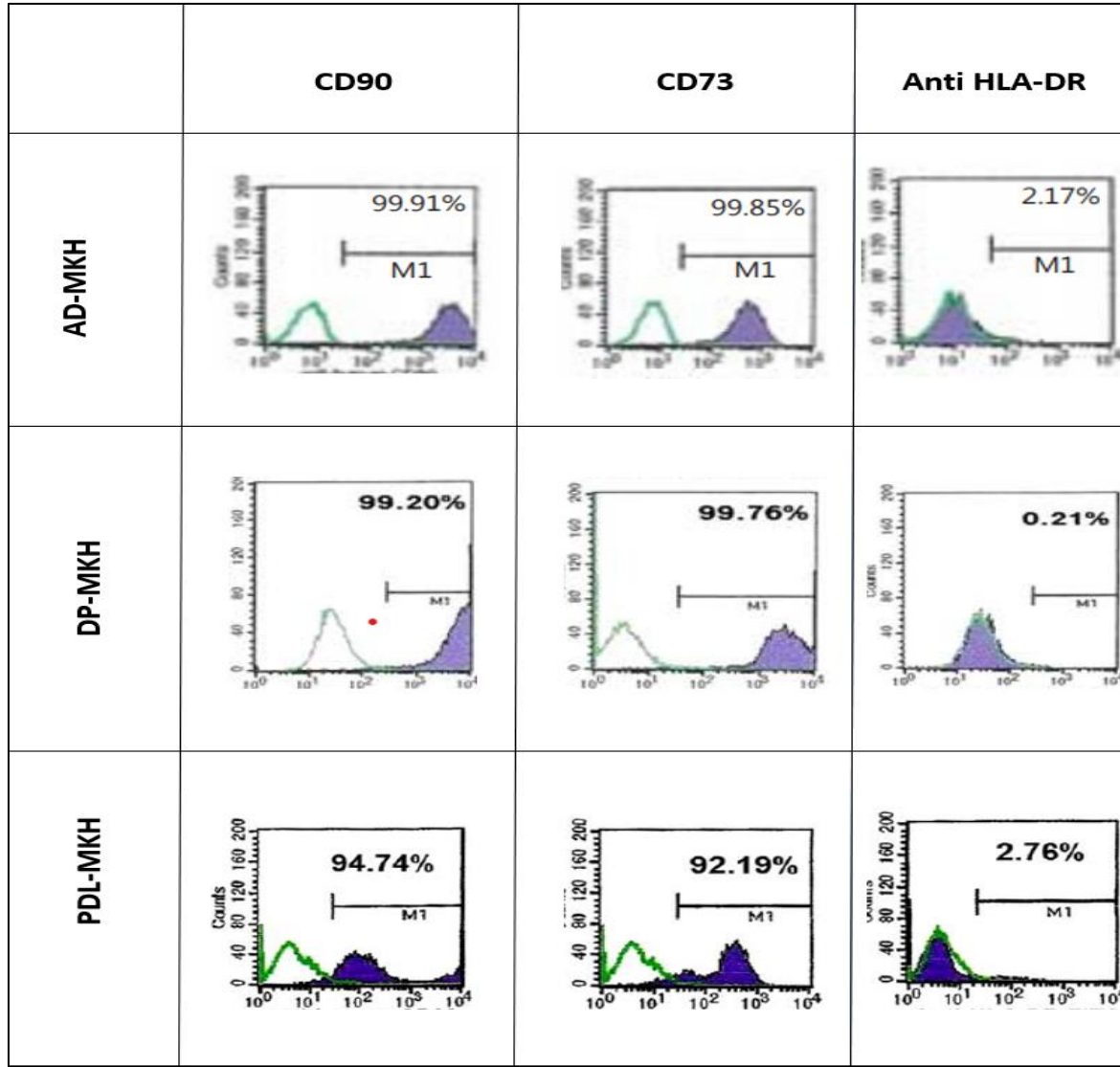
Çalışmamızda daha önceden izole edilen, çoğaltılıp karakterize edildikten sonra dondurularak saklanmış insan kök hücre hatları kullanılmıştır. Kullanılan hücreler İstinye Üniversitesi Rektörü Prof. Dr. Erdal KARAÖZ tarafından hediye edilmiştir. Çalışma için hücre kaynağı olacak üç farklı bölge seçilmiştir.

Buna göre çalışmada kullanılacak hücreler şu şekilde isimlendirilmiştir:

1. Adipoz Doku-Mezenkimal Kök Hücreler (AD-MKH)
2. Dental Pulpa-Mezenkimal Kök Hücreler (DP-MKH)
3. Periodontal Ligament-Mezenkimal Kök Hücreler (PDL-MKH)

Çalışmada kullanılan hücrelerin karakterizasyonları ve detaylı analizleri daha önce Prof. Dr. Erdal KARAÖZ ve ekibi tarafından yapılmış olan bu hücreler ile yapılan deneylerden oluşturulan yayınlar ve hücre hatlarına ait akım sitometri analiz sonuçları (şekil 3.1 ve çizelge 3.2) aşağıda belirtilmiştir.

1. Adipoz Doku-Mezenkimal Kök Hücreler (AD-MKH):
 - Comparison of different sources of mesenchymal stem cells: Palatal versus lipoasirated adipose tissue (Hakki ve diğerleri, 2017).
2. Dental Pulpa-Mezenkimal Kök Hücreler (DP-MKH):
 - Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth (Karaöz ve diğerleri, 2017).
3. Periodontal Ligament-Mezenkimal Kök Hücreler (PDL-MKH):
 - Comparison of Mesenchymal Stem Cells Isolated From Pulp and Periodontal Ligament (Hakki ve diğerleri, 2015).



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan MKHH'lere ait akım sitometri analiz sonuçları

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan MKHH'lere ait akım sitometri analiz sonuçları

	CD90	CD73	Anti HLA-DR
AD-MKH	99,91	99,85	2,12
DP-MKH	99,20	99,76	0,21
PDL-MKH	94,74	92,19	2,76

3.2. Yöntem

Çalışmamıza ilk önce AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH'lerin 6. pasaja (P6) kadar çoğaltılmasıyla başlanmıştır. Her hücre tipi için, her deney tekrarında bir kültür kabı olacak şekilde içlerinde en az $8 \cdot 10^6$ hücre bulunan 3 adet T75 kültür kabı ile deneylere başlanmıştır.

Her hücre tipinde $10,6.10^6$ hücre 2B deneylerde, 14.10^6 hücre ise 3B deneylerde kullanılmıştır. Deneylerin hemen öncesinde 2B ve 3B kültür ortamları oluşturularak deneylere başlanmış ve örnekler 28 gün süreyle kültüre edilmiştir. Hücrelerin deney başlangıcındaki halleri ile deney sonundaki osteojenik farklılaşmalarını karşılaştırabilmek için, deneyin başlangıcının ertesi gününde (1. Gün) ve deneyin sonunda (28. Gün) hücreler ilgili analizlere alınmıştır (Şekil 3.2).

Her aşamada uygulanan işlemler özetle şu şekildedir:

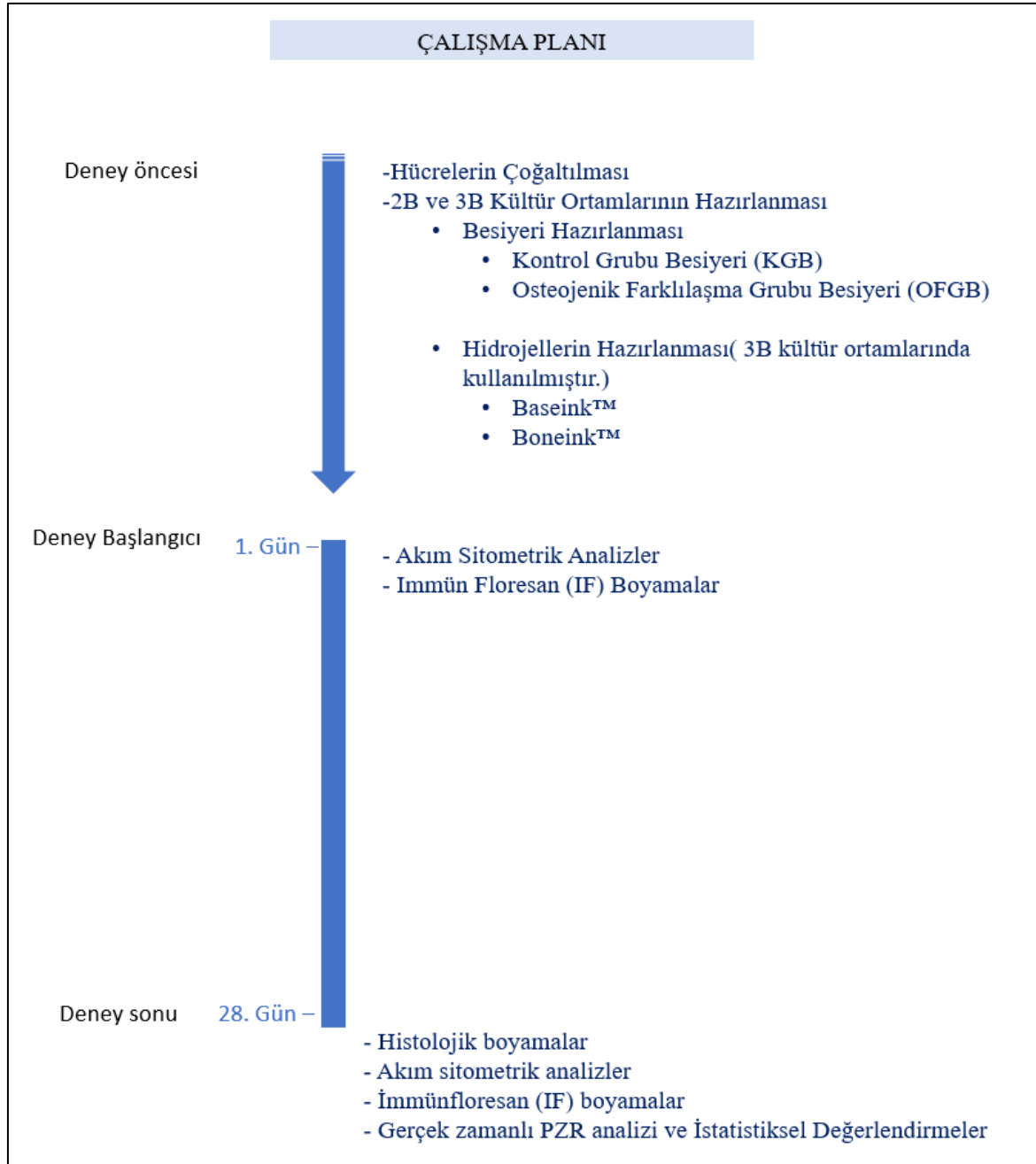
3.2.1. Hücrelerin Deneye Hazırlanması

3.2.2. 2B ve 3B Kültür ve Osteojenik Farklılaşma Aşaması

- Kültür Ortamlarının Hazırlanması
 - Deneylerde Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması
 - 3B Kültür Ortamı İçin Hidrojellerin Hazırlanması
- Hücrelerin 2B ve 3B Ortamlarda Osteojenik Farklılaşması

3.2.3. Karakterizasyon İşlemleri

- Histolojik Boyamalar (Alizarin Red Boyaması)
- İmmün Floresan (IF) Boyama
- Akım Sitometri Analizi
- Gerçek Zamanlı PZR Analizi ve İstatistiksel Değerlendirmeler



Şekil 3.2. Çalışma planı

3.2.1. Hücrelerin deneye hazırlanması

Çalışmamızın bu aşamasında uygulanan protokoller aşağıda belirtildiği gibidir.

Besiyeri hazırlanması

Çalışmamızın bu aşamasında hazırlanan besiyeri dondurulmuş hücrelerin çözünmesi ve pasajlama işlemlerinde kullanılmıştır. Hazırlanan besiyeri içeriğinde %10 oranında FBS

(Fetal Bovine Serum) (S.American- origin BI04-127-1A), 100 U/mL Penisilin, 0.1 mg/mL Streptomisin (Gibco, USA) içeren DMEM-F12 (1:1) (Thermo Fisher – 31330038) bulunmaktadır.

Hücrelerin çözülmesi

1. Stoktaki içleirnde 1 veya 2.10^6 dondurulmuş hücre bulunan kriovialler, 37 °C'lik su banyosuna konarak hızla ısıtılmıştır.
2. Santrifüj tüpüne alınan vial içeriğine besiyeri eklenerek 1500 RPM'de 5 dakika santrifüjlenmiştir.
3. Hücreler Thoma lamı ile sayılıp hücrelerin ne kadar seyreltilmesi gerektiğine ve ekim konsantrasyonuna karar verildikten sonra belirlenen miktarda hücre, yeni kültür kabına aktarılmıştır. Bu aşamada hücreler T25'e ekilecekse 6.10^5 , T75'e ekilecekse 6.10^5 hücre kültür kabına ekilmiştir.
4. Kültür kabı nazikçe sallanarak hücrelerin eşit şekilde dağılması sağlanmıştır. Ardından inkübatöre kaldırılan hücreler %90 konfluensiye ulaşana kadar kültüre edilmiş, gerektiğinde besiyeri değiştirilmiştir.

Çalışmamızda pasaj numaraları sırasıyla P3, P2 ve P2 olan AD-MKH'ler, PDL-MKH ve DP MKH'ler T175 kültür kaplarında %90 yoğunlukta olacak şekilde pasaj 6'ya gelene çoğaltılmıştır. Pasajlama işlemi aşağıda belirtilen protokole uygun olarak yapılmıştır (Sun ve Karaoz, 2020).

Hücrelerin pasajlanması

1. İnkübatörden alınan hücrelerin üzerinden besiyeri çekilmiştir.
2. Hücreler fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate Buffer Salin/ PBS) ile yıkadıktan sonra PBS atılmıştır.
3. Kültür kabına hücrelerin yüzeyini kaplayacak miktarda %0,25 tripsin eklendikten sonra 37°C'de 5dk inkübatörde bekletilmiştir.
4. Yüzeyden ayrıldığı mikroskopla kontrol edilen hücrelerin üzerine tripsin miktarı kadar KGB eklenmiştir. Hücreler, tripsin ve yeni besiyeri ile yaklaşık 2-3 dakika inkübatörde bekledikten sonra hücreleri de içeren karışım pipetle toplanmıştır.

5. Elde edilen karışım santrifüj tüpüne alınarak ve 1500 RPM’de 5 dakika santrifüj yapılmıştır.

Hücreler Thoma lamı ile sayıldıktan sonra, yeni kültür kabına önceden ısıtılmış taze KGB ile aktarılmıştır. Çoğaltma aşamasında T75 kültür kapları için 2.10^6 , T175 kültür kabı için 6.10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır.

6. Kültür kabı nazikçe sallanıp hücrelerin eşit şekilde dağılması sağlanarak %5 karbondioksitli ve 37°C’deki inkübatöre kaldırılmış, çoğaltma süresince gerektiğinde besiyeri değiştirilerek %80-90 konfluensiye ulaşana kadar kültüre devam edilmiştir.

Bu işlemler sonucunda hücrelerin bir kısmı 2B ve 3B kültür ortamlarındaki analizler için sayımı yapılarak hücre kültürü kaplarına yüzey alanlarıyla orantılı olacak şekilde paylaştırılmış olup bir kısmı da deneylerin tekrarlandığı durumlarda aynı pasaj numarasında tekrar kullanılabilmesi açısından dondurulmuştur.

Hücrelerin sayımı

Sayım için 1.5 ml santrifüj tüpünün içine mikropipet ile 10 µl hücre ve 10 µl trypan mavisi eklenmiştir. Elde edilen karışımdan 10 µl alınarak mikroskopta hemasitometri üzerinde beş alanda hücre sayım yapılmış ve bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml besiyerindeki hücre sayısı hesaplanmıştır.

3.2.2. 2B ve 3B kültür ve osteojenik farklılaşma aşaması

Kültür ortamlarının hazırlanması

Deneylerde kullanılan besiyerlerinin hazırlanması

Kontrol grubunda besiyeri (KGB)

Hücrelerin deneylere hazırlanması aşamasında kullanılan, içeriğinde %10 oranında FBS (S. American- origin BI04-127-1A), 100 U/mL Penisilin, 0.1 mg/mL Streptomisin (Gibco, USA) içeren DMEM-F12 (1:1) (Thermo Fisher – 31330038) besiyeri, hücrelerin osteojenik farklılaşmalarını değerlendirmek amacıyla kullanılmış olup kontrol grubu besiyeri (KGB) olarak adlandırılmıştır.

Osteojenik farklılaşma grubu besiyeri (OFGB)

Osteojenik farklılaşma için %10 oranında FBS (S.American- origin BI04-127-1A), 100 U/mL Penisilin, 0.1 mg/mL Streptomisin (Gibco, USA) kullanılmakla birlikte KGB'den farklı olarak 10^{-8} M Deksetazon, ve 10mM β - Gliserofosfat, içeriğinde 4,5g/l D- Glucose ve 4 mM L-Glutamine olan 500 ml High Glucose DMEM (Sartorius), (BI, Israel) ile çözünerek hazırlanmıştır (Lee ve diğerleri, 2013). Deksetazon uygulama sırasında taze olarak hazırlanmıştır.

3B kültür ortamı için hidrojellerin hazırlanması

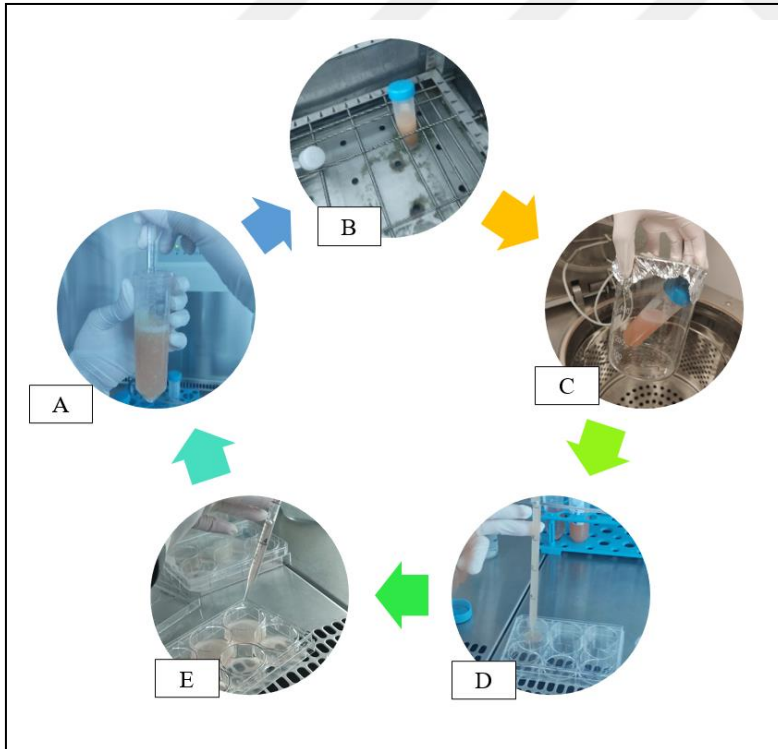
Çalışmamızda 3B çalışma gruplarında kontrol amaçlı olarak %5 oranında aljinat ve jelatin içeren Baseink™ ile osteojenik farklılaşmayı tetiklemesini beklediğimiz aljinat ve jelatine hidroksiapatit eklentili hidrojel Boneink™ kullanılmıştır. Osteojenik farklılaşma grupları, oluşturulacak mikroçevrenin alveolar kemiği taklit edecek bir formda olması için (Frohbergh ve diğerleri, 2012; Gallagher, 1954) hacimsel olarak %65 kütleli olarak ise %15 oranında hidroksiapatit (HA) içeren, HD Bioink firması tarafından çalışma için modifiye edilmiş aljinat ve jelatin içerikli hidrojel (Boneink™) ürünü kullanılarak oluşturulmuştur. Hazırlanan 20ml'lik Boneink™ karışımının hacimsel olarak 13 ml'si HA'lı çözelti iken 7 ml'si aljinat ve jelatin içermektedir. Özkütlesi (d) 0,3 g/ml olan HA'nın firmadan talep edilen karışım içindeki ağırlığı 3,9 g olarak belirlenmiş olup karışımda çözünen diğer maddelerden toplam katı ağırlığı 560 mg olarak belirlenmiştir (Resim 3.1).



Resim 3.1. 3B kültür ortamlarında kullanılan Boneink™ ve Baseink™

Baseink™ ve Boneink™ hazırlanma aşamaları aşağıda belirtilmiştir (Resim 3.2).

1. Firmadan alınan hidrojeller, 20 ml KGB içerisinde cam baget yardımıyla homojen bir kıvama gelene kadar çözdürülmüştür.
2. Çözünen karışım sıcak su banyosunda 37°C'de 15 dk bekletilmiştir.
3. Homojenitesi kontrol edilen karışım 121°C'de sıvı prosedürlere uygun şekilde otoklavlanmıştır.
4. Otoklavlanan jeller soğumadan hücre ekimi yapılacak olan hücre kültürü kaplarına kuyucukların yüzeylerini kaplayacak şekilde steril pipet yardımıyla yavaş bir şekilde aktarılmıştır. Bu aşamada jellerin sıcak bir şekilde uygulanmasının nedeni daha homojen bir yayılım sağlanmak istenmesidir.
5. Hazırlanan homojen karışım 37°C'de %5 CO₂ atmosfer basıncı altında 10 dk inkübe edilmiştir.
6. Çapraz bağlayıcı olarak 50 mM CaCl₂ çözeltisi hazırlanmış ve kuyucuklara eklenmiştir. 10-15 dakikalık inkübasyon süresinin ardından CaCl₂ çözeltisi pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır.



- A. Cam baget yardımıyla karıştırılması
- B. Sıcak su banyosunda ısıtılması
- C. Hidrojellerin otoklavlanması
- D. Hidrojellerin kültür kaplarına aktarılması (Boneink™)
- E. Hidrojellerin kültür kaplarına aktarılması (Baseink™)

Resim 3.2. Hidrojellerin hazırlanma aşamaları

Hücrelerin 2B ve 3B ortamlarda osteojenik farklılaşması

Çalışmamızda T175 hücre kültürü kaplarında %80-90 yoğunlukta ekilmiş olan, 2B deneylerde her bir hücre hattı için $10,6 \cdot 10^6$, 3B deneylerde her bir hücre hattı için $14 \cdot 10^6$ sayıda, pasaj numaraları P6 olan AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH'leri kullanılmıştır.

2B kültür farklılaşması

Osteojenik farklılaşmalarını değerlendirebilmek amacıyla 28 gün boyunca kültüre edilecek çalışma gruplarını oluşturan her bir hücre hattı ayrı ayrı akım sitometri testleri için T25 hücre kültürü kaplarına, gerçek zamanlı PZR analizleri için 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına, IF boyamalar için 48'er kuyucuklu kültür kaplarına ve histolojik boyamalar için 12'şer kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

İki boyutlu çalışma grupları oluşturulurken,

- Akım sitom analizleri için $3,6 \cdot 10^6$,
- IF boyamalar için $1 \cdot 10^6$,
- Histolojik boyamalar için $1,5 \cdot 10^6$ ve
- Gerçek zamanlı PZR analizleri için $4,5 \cdot 10^6$ sayıda hücre kullanılmıştır.

Hücreler deney kuyucuklarına ekilirken KGB ile ekilmiştir. Çalışma planımızda 1. gün olarak adlandırılan bu işlemde amacımız MKH'lerin hücre kültürü kaplarında yüzeye tutunmasını sağlamaktır. Yaklaşık 24 saat 37°C 'de inkübe edilen hücrelerin yüzeye tutunması mikroskopla kontrol edildikten sonra hücre kültürü kaplarındaki besiyerleri OFGB besiyerleri ile değiştirilerek 28 gün sürecek olan osteojenik farklılaşma deneyleri başlatılmıştır.

Deneyler sırasında 28 gün boyunca her 3 günde bir besiyeri değiştirilerek, 37°C 'de %5 CO_2 atmosfer basıncı altında inkübe edilmiştir. Hücrelerin kültür dönemi içinde morfolojik yapılarında meydana gelen değişimleri takip etmek ve yapılacak olan analizlerden önce elde edilecek bulguların ön yorumlamasının yapılabilmesi istenmiş, bu amaçla 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarında bulunan her bir hücre hattının mikroskopla 3, 7, 14, 21 ve 28. günlerde görüntüleri ışık mikroskobu altında kaydedilmiştir. Kontrollü olarak takip edilen 2B

osteojenik farklılaşma gruplarında deneyler 28. günün sonunda tamamlanmış olup karakterizasyon aşamasına geçilmiştir.

3B kültür farklılaşması

Hücreler 28 gün sonunda histolojik boyamalar, gerçek zamanlı PZR analizleri ve IF boyamalar için değerlendirilmek üzere aşağıda belirtilen şekilde hazırlanan jellerin üzerine ekilmiştir.

3B çalışma grupları oluşturulurken;

- IF boyamalar için 2.10^6 (KGB ve OFGB ile kültüre edilen her bir çalışma grubu için 1.10^6)
- Histolojik boyamalarda için 3.10^6 (Baseink ve Boneink ile kültüre edilen her bir çalışma grupları için $1,5.10^6$)
- Gerçek zamanlı PZR analizleri için $4,5.10^6$ sayıda hücre kullanılmıştır.

Hücreler, hazırlanan jeller üzerine KGB ile ekilmiştir. Çalışma gruplarında bulunan MKH'lerin jellere tutunması için 24 saat 37°C 'de inkübe edildikten sonra mikroskopta kontrol edilerek tutunduğu gözlemlenmiş ve kontrol besiyerleri çekilerek OFGB eklenmiştir. Sonrasında 28 gün boyunca sürecek olan kültür periyodunda çalışma grupları her 3 günde bir besiyeri değiştirilerek 37°C 'de %5 CO_2 atmosfer basıncı altında inkübe edilmiştir.

Oluşturulan çalışma grupları ile kontrollü olarak takip edilen deneyler 28. günün sonunda tamamlanmış olup karakterizasyon aşamasına geçilmiştir.

3.2.3. Karakterizasyon işlemleri

Histolojik boyamalar

İki boyutlu deneylerde OFGB ve KGB ile kültüre edilen çalışma gruplarında 28. günün sonunda hücre dışı kalsifikasyonun (primer kemik nodüllerinin) ışık mikroskobu altında histokimyasal olarak incelenmesi amacıyla alizarin red ile boyanmıştır.

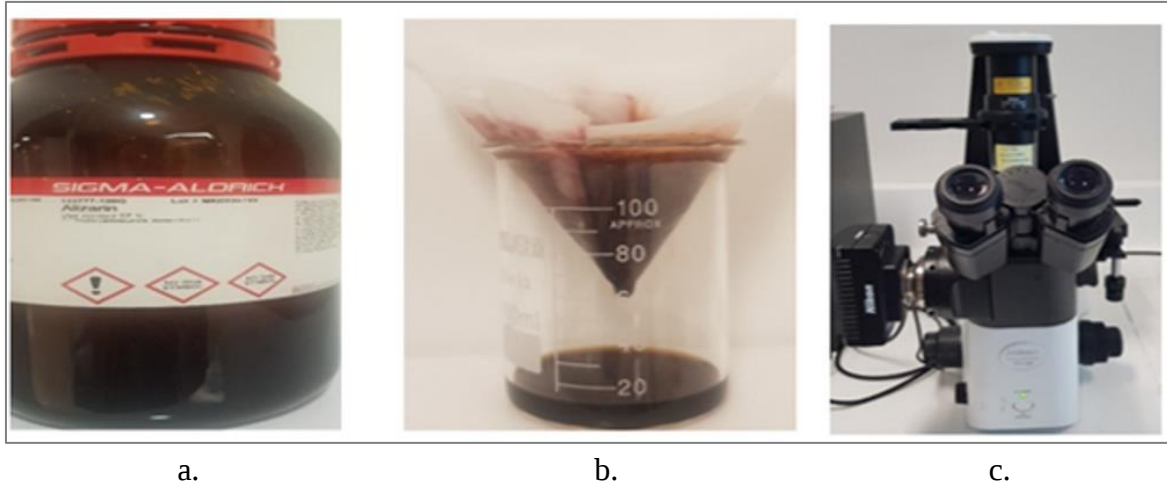
Histolojik boyama analizleri için Çizelge 3.3'te belirtilen 2B ve 3B çalışma gruplarının tamamında öncelikle hücrelerin ekilmiş olduğu kuyucuklardaki besiyerleri çekilerek, her bir kuyucuk 3'er defa 5dk olmak üzere PBS solüsyonla yıkanmıştır. Sonrasında tüm gruplar %4'lük Paraformaldehit (PFA) ile fikse edilerek boya hazırlama aşamasına geçilmiştir.

Çizelge 3.3. Histolojik boyamalarda değerlendirilen çalışma grupları

Kültür Ortamı	Besiyeri	Hidrojel	AD-MKH	DP-MKH	PDL-MKH
2B	KGB	YOK			
	OFGB	YOK			
3B	KGB	Baseink™			
		Boneink™			
	OFGB	Boneink™			

Histolojik boya hazırlanırken

1. 2 gr alizarin red (Sigma, USA) 100 ml distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla homojen bir şekilde çözdürüldü (Resim 3.3.a).
2. Çözünen karışımın pH değeri değeri HCl ve NaOH kullanılarak 4,5 olacak şekilde sabitlenmiştir.
3. Oluşturulan karışım kağıt filtreden geçirilerek daha homojen bir hale getirilmiştir (Resim 3.3.b).
4. Hazırlanan karışım çalışma gruplarına uygulanmadan önce fikse etmek için kullanılan PFA çekilerek her kuyucuk 3'er kere 5 dk olmak üzere PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işlemlerinden sonra kuyucuklara yüzeyi kaplayacak şekilde hazırlanmış olduğumuz alizarin red boyalar eklenmiş ve karanlık ortamda 1 saat 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda çalışma grupları Nikon Eclipse TS2 marka ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir (Resim 3.3.c).



Resim 3.3. a. Alizarin red boyası, Sigma; b. Kağıt filtre kullanılarak homojenize edilmesi; c. Görüntülerin alındığı Nikon Eclipse TS2 marka ışık mikroskobu

İmmun floresan boyamalar

Osteojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi amacıyla yapılan IF analizlerde 2B kültür ortamında kontrol grupları, farklılaşma çalışmaları başlangıcında KGB ile kültüre edilmiş AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH hatları ile oluşturulmuş ve bu gruplarda DAPI ve nestin ışımaları değerlendirilmiştir. 2B ve 3B çalışma gruplarında IF boyamalar için oluşturulan çalışma grupları Çizelge 3.4'te belirtildiği gibi uygulanmış olup boyamalar ikili boyama yöntemiyle üçer kez tekrarlanarak yapılmıştır.

IF boyamada hücre varlığını kontrol etmek amacıyla DAPI boyası kullanılmış olup, boyamalarda primer antikorlarla uyumlu, yeşil ışıma veren Floresein izotiyosiyanat (FITC) ve kırmızı ışıma veren (Texas Red) sekonder antikorlar seçilmiştir.

IF boyama analizleri aşağıda belirtilen sıralamayla yapılmıştır (Karaöz ve diğerleri, 2010).

1. Kültür kabında %50-60 yoğunlukta inkübe edilmiş olan hücrelerin besiyerleri çekilerek her kuyucuk 2 kez 200 µl fosfat tampon solüsyonu (Phosphate Buffered Saline/PBS) ile yıkanmıştır.
2. 200 ul %1,6 paraformaldehit (PFA) kuyucuklara eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir.
3. PFA kuyucuklardan çekilerek 3 kez 200 µl PBS ile yıkanmış ve her yıkama işlemi sırasında kültür lamı çalkalayıcıda 5 dakika boyunca PBS çalkalanmıştır.

4. 200 µl 0,125M glisin ve 200 µl %0,1 Triton-X-100 kuyucuklara sırayla eklenerek her biri oda sıcaklığında 5'er dakika çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir.
5. 200 µl %0,5 Triton-X-100 kuyucuklara eklenerek çalkalayıcıda 15 dakika inkübe edilmiş ve son olarak 200 µl %0,1 Triton-X-100 kuyucuklara eklenerek çalkalayıcıda 5 dakika boyunca çalkalayarak yıkanmıştır. Bu işlem her hücre hattı için 3'er kez tekrar edilmiştir.
6. 200 µl %5 bloklama solüsyonu kuyucuklara eklenmiş ve çalkalayıcıda 1 saat boyunca bloklama işlemi yapılmıştır. Sonrasında kullanılacak primer antikorlardan bloklama solüsyonu ile 1:200 dilüsyon hazırlanmış olup hazırlanan dilüsyonlardan kuyucuklara 100 µl eklenerek gece boyu 4°C'de inkübe edilmiştir.
7. Ertesi gün solüsyon kuyucuklardan çekilerek ve kuyucuklara 200 µl PBS eklenmiştir. Sonrasında çalkalayıcıda 10 dakika boyunca yıkanmış ve bu işlem her hücre hattı için 3 kez gerçekleştirilmiştir.
8. 200 µl PBS eklenerek kültür lamı 5 dakika boyunca çalkalanmış ve 1:200 oranında seyreltilmiş bloklama solüsyonu ile sekonder antikor her kuyucuğa bu dilüsyondan 100 µl eklenerek oda sıcaklığında 45 dakika çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir.
9. Sekonder antikor içerikli solüsyon aspire edildikten sonra kuyucuklara 200 µl PBS eklenerek çalkalayıcıda 15 dakika boyunca çalkalanarak yıkanıp her kuyucuk küçük birer damla kapatma solüsyonu damlatılmış ve uzun bir lamel yardımıyla lam kapatılmıştır. Sonrasında örnekler floresan mikroskopta incelenmiştir.

Çizelge 3.4. Osteojenik farklılaşma deneylerinin değerlendirilmesi için oluşturulan IF çalışma grupları

Kültür Ortamı	Besiyeri	Hidrojel	Antikor			AD-MKH	DP-MKH	PDL-MKH
			Primer		Sekonder			
2B	OFGB	X	1	COL-1	R			
				Nestin	M			
			2	ALP	R			
				Fibronektin	M			
			3	BMP-2	G			
				Vimentin	M			
			4	BMP-4	G			
				Osteopontin	M			
			5	Negatif Kontrol	R/M/G			
3B	KGB	Boneink™	1	ALP	R			
				Vimentin	M			
			2	COL-1	R			
				Osteopontin	M			
			3	Nestin	M			
				BMP-2	G			
			4	Negatif Kontrol	R/M/G			
	OFGB	Boneink™	1	ALP	R			
				Vimentin	M			
			2	COL-1	R			
				Osteopontin	M			
			3	Nestin	M			
				BMP-2	G			
			4	Negatif Kontrol	R/M/G			

Negatif kontrol gruplarında da aynı protokol yöntemleri uygulanmış olsa da primerler yerine PBS kullanılmıştır. DAPI çekirdek boyası tüm gruplara uygulanmıştır (R: Rabbit, M: Mouse, G: Goat)

Akım sitotometri analizleri

Osteojenik farklılaşma ortamında inkübe edilen MKH'lerin immunofenotipik özelliklerinin belirlenmesi için akım sitometrik analizleri uygulanmıştır. Bu yöntemle hücrelerin MKH yüzey reseptörlerini taşıyıp taşımadıkları analiz edilerek hücrelerin CD90, CD105, CD73 gibi MKH belirteçleri bakımından pozitif ve CD45, CD34, CD11b, CD19 ve HLA-DR gibi hematopoetik belirteçler bakımından negatif oldukları belirlenmiştir. Analizlerde, belirlenen hücre yüzey belirteçlerine özgü, floresan işaretli monoklonal antikorlar kullanılmış ve analizler BD firmasına ait FACS Calibur cihazında gerçekleştirilmiş ve yüzde değerler üzerinden değerlendirme yapılmıştır (Sun ve Karaoz, 2020).

Analizlerde kontrol grubu olarak, çalışma başlangıcında (1. gün)AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH hatlarına ait akım sitometri analizinden elde edilen veriler kullanılmıştır. Bu datalar aynı zamanda hücrelerin kök hücre karakterizasyonunu da sağlamaktadır. 3B kültürlerdeki jel yapısının, akım sitometri cihazının kapiller sistemi ile uyumsuz olmasından dolayı bu analizler sadece 2B çalışma gruplarında uygulanmış, 3B gruplarda uygulanamamıştır.

Analizler uygulanırken izlenen işlem basamakları aşağıda belirtilmiştir (Sun ve Karaoz, 2020).

1. Sayıca yaklaşık 1×10^6 olan MKH'ler pelet şeklinde alınarak üzerine yaklaşık 300 μ l PBS solüsyonu ilave edilmiştir.
2. Pozitif, negatif ve kontrol olmak üzere üç sitometri tüpü hazırlanmıştır (Resim 3.4).
3. Her sitometri tüpüne yaklaşık 100 μ l PBS olacak şekilde hücreler paylaştırılmıştır.
4. Hücrelere,
 - Pozitif tüpe; Pozitif kokteyl antikorları (CD90, CD105, CD73)
 - Negatif tüpe; Negatif kokteyl antikorları (CD45, CD34, CD11b, CD19, HLA-DR)
 - Kontrol tüpüne; pozitif ve negatif kontrol antikorlarından 20 μ l koyulmuştur.
5. Hassas bir şekilde karıştırılıp, birkaç saniye vorteks cihazında santrifüj edildikten sonra 30 dakika oda ısısında ve karanlıkta inkübe edilmiştir.
6. Sonrasında her tüpe 2 ml PBS solüsyonu eklenerek 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

7. Tüplerdeki süpernatant kısmı döküldükten sonra pelet üzerine her tüpe okutma yapmak için PBS solüsyonu eklenerek analizler yapılmıştır.



Resim 3.4. Akım sitometri analizlerinin değerlendirilmesi için hazırlanan tüpler

Gerçek zamanlı PZR analizi ve istatistiksel değerlendirmeler:

28 gün boyunca 37°C’de %5 CO₂ atmosfer basıncı altında inkübe edilen 2B ve 3B hücre hatlarının gerçek zamanlı PZR analizleri için manuel yöntem uygulanmıştır. Bu yöntem uygulanırken aşağıdaki işlem basamakları takip edilmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak 2B deneylerde 28 gün boyunca KGB ile kültüre edilen hücre hatları kullanılmıştır.

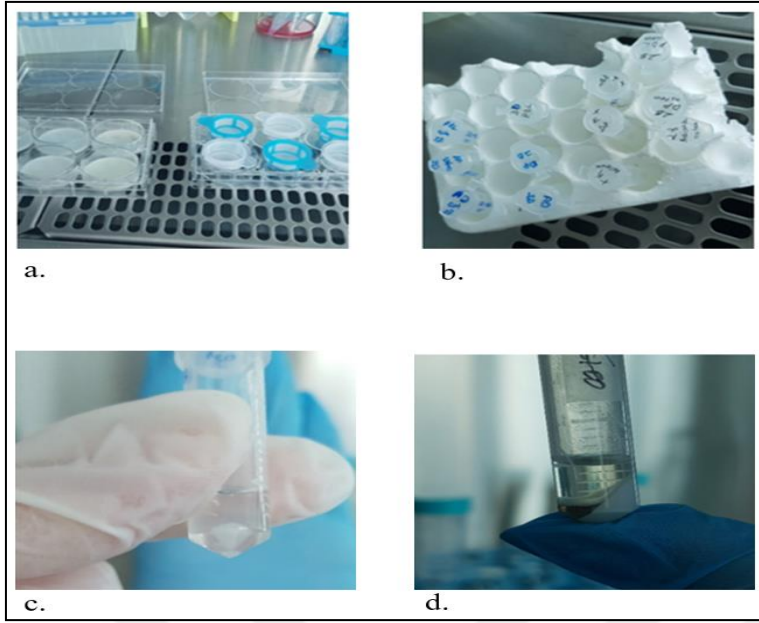
Analizler için oluşturulan gruplar Çizelge 3.5’te belirtilmiştir.

Çizelge 3.5. Gerçek zamanlı PZR analizi için oluşturulan çalışma grupları

Kültür Ortamı	Besiyeri	Hidrojel	AD-MKH	DP-MKH	PDL-MKH
2B	KGB (+ Kontrol)	YOK			
	OFGB	YOK			
3B	KGB	Boneink™			
	OFGB	Boneink™			

Manuel RNA izolasyonu

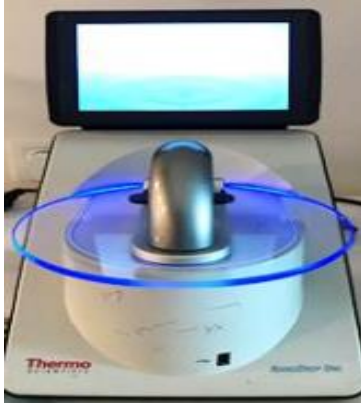
1. 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarında yaklaşık ağırlığı 25mg olan her bir kuyucuğun içindeki besi yeri çekilerek 1ml trizol eklenmiştir.
2. 3B osteojenik farklılaşma deneylerinde diğer gruplardan farklı olarak jelleri hücrelerden uzaklaştırmak için, trizolle jellerin parçalanmasından sonra 70 um büyüklüğünde porlara sahip hücre süzgeci (Cell Stainer) kullanılmıştır. Bu işlemin amacı jel kalıntılarını uzaklaştırmaktır (Resim 3.5.a).
3. İçerisine trizol koyulan kuyucuklara pipetaj yapılarak 2 ml hacmindeki santifüj tüplerine aktarılmıştır (Resim 3.5.b).
4. 1-2 dk elle hızlıca çalkalanarak 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
5. Daha sonra 0,5 ml kloroform ekleyerek çalkalama işlemi yaptığımız tüpler 4 °C, 12000 rpm'de, 2dk santrifüj edilmiştir.
6. 2B çalışma gruplarında santrifüj edilen tüplerde aşağıdan yukarıya doğru sırasıyla protein, DNA ve RNA olmak üzere 3 faz gözlenmiştir (Resim 3.5.c). Boneink™ kullanılarak oluşturulan 3B çalışma gruplarında ise 4. bir tabaka olarak en alt katmanda HA birikimi gözlenmiştir (Resim 3.5.d).
7. Üst katmanı oluşturan RNA kısmı dikkatli bir şekilde mikropipetlerle alınarak daha önceden otoklavlanmış olan RNAaz/DNAaz içermeyen ependorf tüplerine nakledilmiş ve 1:1 oranında isopropanol eklenmiştir.
8. Oda sıcaklığında 10 dk bekletip 4 °C, 12000 rpm'de, 2dk santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüj edilen tüplerin süpernatant kısımları dökülerek her bir tüper %96 derişiminde etanol eklenmiştir.
10. DNA/RNA içermeyen suda (DNA/RNA free Water) yıkama yapılarak RNA konsantrasyonları ölçümlerine geçilmiştir.



Resim 3.5. a. 3B çalışma gruplarında jelleri uzaklaştırmak için kullanılan hücre süzgeci, b. Santrifüj edilen çalışma grupları, c. 2B çalışma gruplarında santrifüj sonrası gözlemlenen tabakalar, d. 3B çalışma gruplarında santrifüj sonrası gözlemlenen tabakalar

RNA konsantrasyon ölçümü

İzole edilen RNA'ların saflığı ve konsantrasyonları Thermo Fisher marka Nanodrop cihazı ile ölçülmüştür (Resim 3.6). Ölçüm için DNA/RNA içermeyen suda çözünen RNA peletleri 2'şer µl alınarak cihazda ölçüm yapılmış olup sonuçlar Çizelde 4.4'te verilmiştir. Sonrasında elde edilen konsantrasyonlar ile tamamlayıcı DNA (Completed DNA/ cDNA) sentezi için gerekli hesaplamalar yapılmıştır. Ölçümlerde A260/A280 değeri izole edilen RNA'ların saflıklarını ifade etmektedir. RNA için yaklaşık 1.8-2.0 oranı yüksek saflık olarak kabul edilmektedir.



Resim 3.6. Nanodrop, Thermofisher

cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'ların ng/ μ l cinsinden miktarları ölçülmüş ve bu değerlere göre tüm gruplarda ve MKH hücre hatlarında cDNA sentezinde kullanılacak diğer malzemeler oranlanmıştır.

Cihazda ölçülen değerler ng/ μ l cinsinden olduğu için reaksiyon 20 ng'dan kurulmuş ve gerekli hesaplamalar yapılmıştır. Her bir örnek için hesaplama aşağıda belirtilen formüle uygun olarak yapılmıştır;

Hesaplama

$$\frac{1\mu\text{l}}{X} = \frac{(\text{cihazda ölçülen değer}) \text{ ng}}{1000\text{ng}}$$

$$X = 1000 / (\text{cihazda ölçülen değer}) \mu\text{l}$$

cDNA standart reaksiyon (1 örnek için)

10X RT Buffer-----	2 μ l
25X dNTP Mix (100 mM)-----	0.8 μ l
10X RT Random Primers -----	2 μ l
MultiScribe™ Reverse Transcriptase-----	1 μ l
Nuclease-free H ₂ O-----	4,2 μ l

Reaksiyon, çalışmamızda kullanılan her bir örnek için yukarıda belirtilen birim değer sayısı ile çarpılıp, 1.5 mL lik ependorf tüplerinde hazırlanmıştır. Örnek başına mix karışımı totalde 10 µl olduğundan her bir örneğin RNA'sı eklenip total hacim 20 µl'den çıkarılarak eklenecek su miktarı hesaplanmıştır.

Kullanılan kite ait çalışma protokolündeki kurallara uygun olarak 4 aşamada gerçekleşecek olan çalışmada sıcaklık ve süre bilgileri Çizelge 3.6'da belirtilen şekilde cihaza girilmiştir. Stok primerler, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit'e ait protokole uygun olarak 10 µM' olacak şekilde dilüe edilmiştir.

Çizelge 3.6. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit'e ait sıcaklık ve süre bilgileri

Settings	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temp.	25°C	37°C	85°C	4°C
Time	5 minutes	120 minutes	10 minutes	∞

Gerçek zamanlı PZR

Elde edilen cDNA'lar kullanılarak gerçek zamanlı PZR analizi yapılabilmesi için SensiFAST SYBR Hi-ROX Kit (Bioline) kiti kullanılmıştır. Kitin önermiş olduğu protokole uygun olarak analiz edilecek karışımlar, PZR tüplerinde kuyucuk başına 20 µl hacminde olacak şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.7). Örneklerin analize hazırlanması sırasında gerçekleştirilen tüm işlemler çalışma sıcaklığını koruyabilmek amacıyla buz üzerinde yapılmıştır.

Çizelge 3.7. SensiFAST SYBR Hi-ROX Kit (Bioline) hazırlanma protokolü

2x SensiFAST SYBR Hi-ROX Mix	10 µl
10 µl forward	0,8 µ
10 µl reverse primer	0,8 µl
cDNA	8,4 µl 'ye kadar
H2O	20 µl 'ye tamamlayacak miktarda
Toplam	20 µl

Hazırlanan örnekler karıştırılma amacıyla kısa bir süre santrifüj edilerek Applied Biosystems BIO-RAD Real-Time PCR System cihazına yerleştirilmiştir (Resim 3.7). Aşağıda belirtilen aşamalarla analizler yapılmıştır (Çizelge 3.8). Analizlerde GAPDH, ALP, RUNX-2 ve BMP-2 genlerinin ekspresyon seviyeleri hesaplanmıştır.

Çizelge 3.8. BIO-RAD Real-Time PCR System cihazında analiz aşamaları

Sıcaklık(°C)	Süre(saniye)	Döngü	Aşama
95°C	300		Döngü Aşaması
95°C	15	x 40	
60°C	30		
72°C	30		
60°C	15	+0,5°C artış ile	Melt Curve Aşaması
95°C	15		



Resim 3.7. BIO-RAD Real-Time PCR System cihazı

İstatistiksel değerlendirmeler

Ct değeri, örneklerin döngü eşiğini (Ct) ifade eder. Ct değeri PZR cihazı tarafından reaksiyondan sonra verilir. Basitçe, PZR ürünü tarafından üretilen floresansın arka plan görüntüsünden ayırt edilebildiği döngü numarasıdır. Δ sembolü deltayı ifade eder. Delta, iki

sayı arasındaki farkı tanımlamak için kullanılan matematiksel bir terimdir (Karamustafaoğlu, 2017).

ΔCt değerlerinin hesaplanması

ΔCt , belirli bir örnek için ilgilendiğiniz hedef gen ile ve kontrol geni arasındaki Ct değerlerindeki farktır. Bu, ilgilenilen geni, deneyinden etkilenmeyen bir gene göre normalleştirmek için yapılır (Dincer ve diğerleri, 2014).

$$\Delta Ct = Ct (\text{hedef gen}) - Ct (\text{kontrol geni})$$

$\Delta\Delta Ct$ değerlerinin hesaplanması

$\Delta\Delta Ct$ hesaplaması gruplar arasındaki ΔCt farklarını hesaplamak için kullanılır.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{uygulama yapılmış grup}) - \Delta Ct (\text{kontrol grubu})$$

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin hesaplanması

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi olarak da bilinen delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) yöntemi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirirken numunelerin nispi kat gen ekspresyonunu hesaplamak için kullanılan bir formüldür. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri hesaplanırken $\Delta\Delta Ct$ değerinin 2 üssüne yerleştirilmesi ile hesaplanır.

Normallik testi

Örnek Grupları oluşturulup ilk olarak çalışma gruplarına Shapiro-Wilk normallik testi yapılmıştır. Shapiro-Wilk testi, rastgele bir örneğin normal dağılımdan gelip gelmediğini anlamanın bir yoludur. Test sonucunda bir W değeri üretilir; küçük W değeri grupların normal dağılmadığını gösterir. W değeri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Dincerve diğerleri, 2014).

$$W = \frac{\left(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)} \right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (3.1)$$

ANOVA testi

Normallik analizi sonrasında hipotezler çerçevesinde gruplar arasındaki farklılıkların analizi için Welch ve Brown-Forsythe Varyans Analizi (ANOVA) testi yapılmıştır. Varyans analizi (ANOVA), bir veri setinde gözlemlenen toplu değişkenliği sistematik faktörler ve rastgele faktörler olarak iki bölüme ayıran ve istatistikte kullanılan bir analiz aracı olarak kullanılmıştır (Cuevas, Febrero ve Fraiman 2004).

Sistematik faktörlerin, verilen veri seti üzerinde istatistiksel bir etkisi varken, rastgele faktörlerin yoktur. Bu nedenle bir veri kümesinde bağımsız değişkenlerin bağımlı değişken üzerindeki etkisini belirlemek için ANOVA testini kullanılır (Kim, 2014).

Analizlerde Welch ve Brown-Forsythe ANOVA kullanılarak bir Gauss dağılımından örneklendiği varsayılan, ancak grupların eşit varyanslara sahip olduğu varsayılmadan üç veya daha fazla eşleştirilmemiş ölçüm seti karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda üretilen P değeri 0,05'ten küçük olan karşılaştırmalar bir “*”, 0,01'den küçük olan karşılaştırmalar “**”, 0,001'den küçük olan karşılaştırmalar “***” ile işaretlenmiştir.

Ki kare Testi

Ki-kare testi parametrik olmayan testlerdir. İki nitel değişken arasında bir ilişkinin varlığı ortaya konmak istendiğinde ki-kare bağımsızlık testi uygulanır. Ki-kare bağımsızlık testi; 2x2 ya da r x c tipindeki çapraz çizelgelerde gözlenen frekansların (Gij), marjinal olasılıklar yaklaşımına göre hesaplanan teorik frekanslara (Tij) benzerliğini test etmeyi amaçlar (Doğan ve diğerleri, 2010).

Grafiklerin hazırlanması

Grafikler oluşturulurken kontrol gruplarına göre hesaplanan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin ortalamaları kullanılmıştır. Hata çubukları için ortalamanın standart hatası (standard error of the mean/ SEM) kullanılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. 2B deneylerde Kùltür Süresi Boyunca Kaydedilen Işık Mikroskop Görüntüleri

İki boyutlu çalışma grupları 6 kuyucuklu hücre kùltürü kaplarına ekilmiş olup uygulanan besiyerine göre gruplar OFG ve KG olarak adlandırılmıştır. Oluşturulan gruplar 28 gün boyunca kùltüre edilmiştir. Kùltür süresince çalışma gruplarının 3, 7, 14, 21 ve 28.günlerde ışık mikroskobu altında 100X büyütme ile kaydedilmiştir.



Adipoz Doku MKH'lere ait 2B deneylerde ışık mikroskonu altında çekilen görüntüler Resim 4.1'de değerlendirilmiştir.

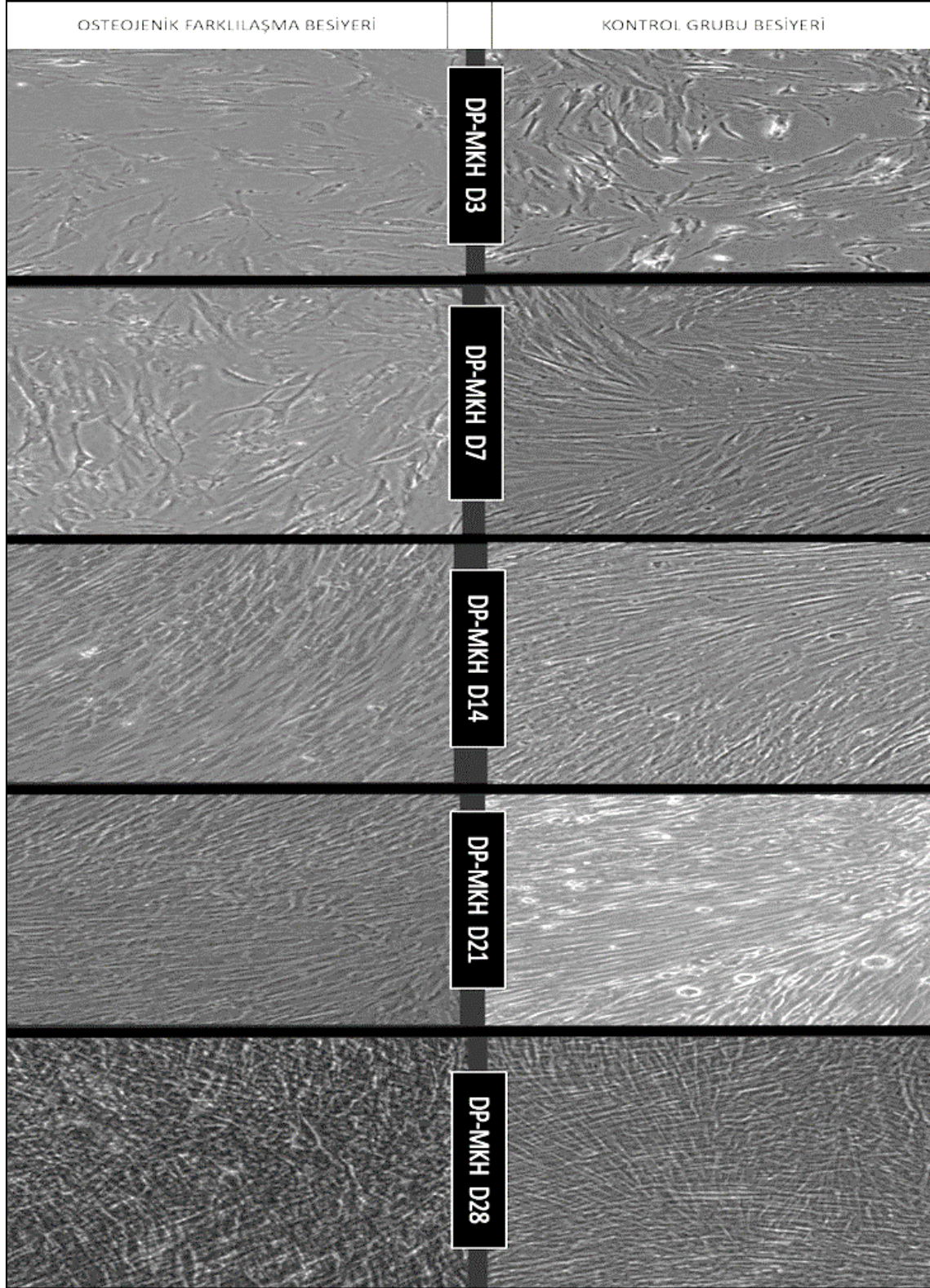


Resim 4.1. AD-MKH'lerin 2B deneylerde 28 günlük kültür süresi boyunca kaydedilen ışık mikroskop görüntüleri (100X).

Elde edilen görüntüler incelendiğinde;

- 3. gün kaydedilen görüntülerde, çalışma gruplarında bulunan hücrelerin kültür kabının tabanına tutunduğu ve 7.günden itibaren taban yüzeyini kaplamıştır.
- 7. günde KGB ve OFGB ile kültüre edilen hücrelerde, MKH'lere özgü iğsi yapılarda fark edilir bir değişiklik gözlemlenmemiştir.
- 14. günde her iki grupta da hücrelerin ortama adepte oldukları ve sayıca çoğaldıkları gözlemlenmiştir.
- 21. günde elde edilen görüntülerde hücrelerin tabakalar halinde yığılmalar yaptığı tespit edilmiştir.
- 28. günde OFGB ve KGB ile kültüre edilen gruplarda hücrelerin morfolojik yapılarında belirgin değişikliklerin olmadığı, her iki grupta da kök hücrelere özgü olan iğsi yapının değişmediği bulgulanmıştır.

Dental Pulpa kökenli MKH'lere ait 2B deneylerde ışık mikroskonu altında çekilen görüntüler Resim 4.2'de değerlendirilmiştir.

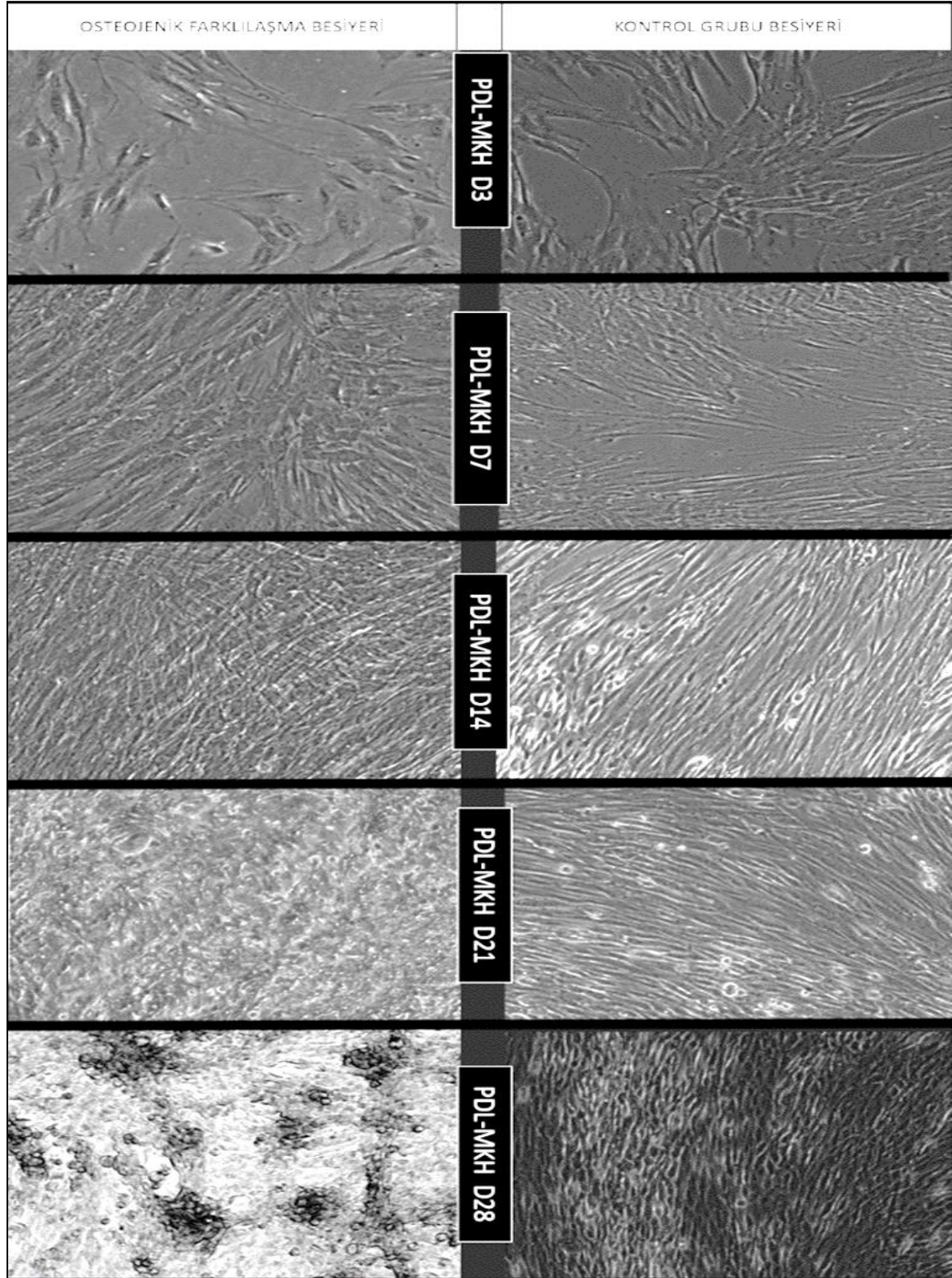


Resim 4.2. DP-MKH'lerin 2B kültür ortamında 28 günlük kültür süresi boyunca kaydedilen mikroskop görüntüleri (100X).

DP-MKH'lere ait elde edilen mikroskopik görüntüler değerlendirildiğinde;

- 3. ve 7. günde elde edilen görüntüler AD-MKH'lerle benzer olarak bulgulanmıştır.
- 14. günde elde edilen görseller değerlendirildiğinde ise OFGB ile kültüre edilen hücrelerin boylarında kısaltmalarla birlikte morfolojik yapılarında değişiklik başladığı gözlemlenmiştir. Bu farklılık KGB ile kültüre edilen gruplarda gözlemlenmemiştir.
- 21. günde kaydedilen görüntülerde hücrelerin morfolojik yapıları 14.gün ile benzer olmakla birlikte hücrelerin sayıca çoğaldıkları ve üst üste tabakalar oluşturdıkları gözlemlenmiştir.
- 28. güne ait görseller değerlendirildiğinde KGB ile kültüre edilen hücrelerin morfolojilerinde fark edilir bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra OFGB ile kültüre edilen DP-MKH'lerde morfolojik değişiklik devam ederek daha kare şeklinde yapılar gösterdiği tespit edilmiştir.

PDL-MKH'lere ait mikroskopik görüntüler Resim 4.3'te değerlendirilmiştir.

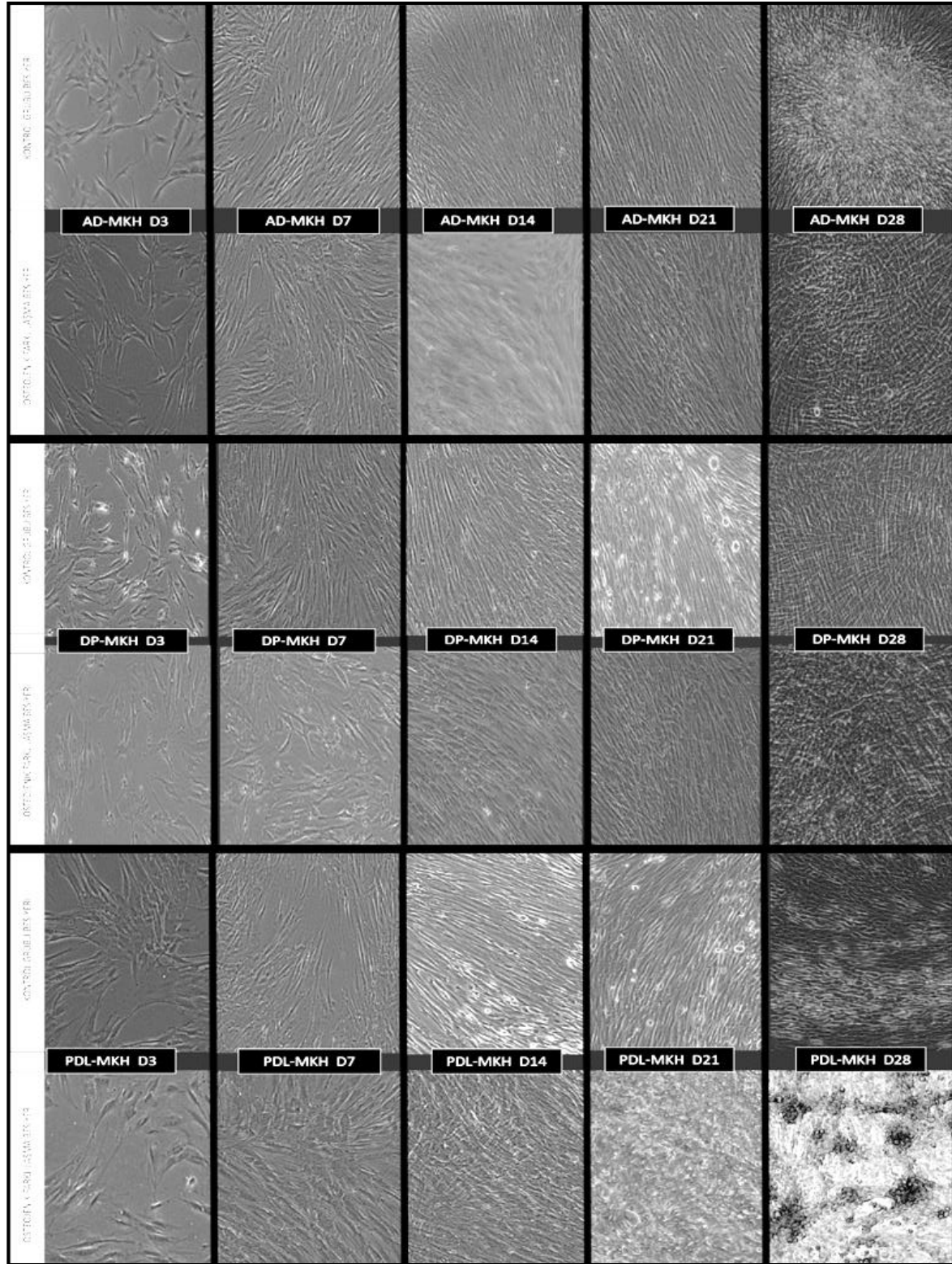


Resim 4.3. PDL-MKH'lerin 2B kültür ortamında 28 günlük kültür süresi boyunca kaydedilen mikroskop görüntüleri (100X).

PDL-MKH'lere ait mikroskopik görüntüler incelendiğinde elde edilen bulgular aşağıda belirtilmiştir;

- 3. günde hücreler kültür kabı yüzeyine tutunmuşlardır.
- 7. günün sonunda OFGB ile kültüre edilen grupta kök hücreler özgü iğsi yapının değişmeye başladığı gözlemlenmiştir.
- 14. günde KGB ile kültüre edilen hücrelerin morfolojik yapılarında değişiklik gözlemlenmezken OFGB ile kültüre edilen hücrelerde iğsi morfolojik yapıların değiştiği gözlemlenmiştir.
- 21. günde KGB ile kültüre edilen hücrelerin morfolojik yapılarının OFGB ile kültüre edilen hücrelere benzer şekilde değiştiği gözlemlenmiştir.
- 28. günde, KGB ile kültüre edilen hücrelerde morfolojik değişikliklerin devam ettiği, OFGB ile kültüre edilen hücrelerde ise iğsi morfolojinin tamamen kaybolduğu belirlenmiştir. Çalışma gruplarında bulunan hücreler 28 gün boyunca aynı kültür kabında kültüre edildiklerinden, sayıca artmaları sonucu hücreler üst üste tabakalar oluşturmaktadır.

Her üç hücre hattına ait mikroskopik görüntüler Resim 4.4.'te incelenerek aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:



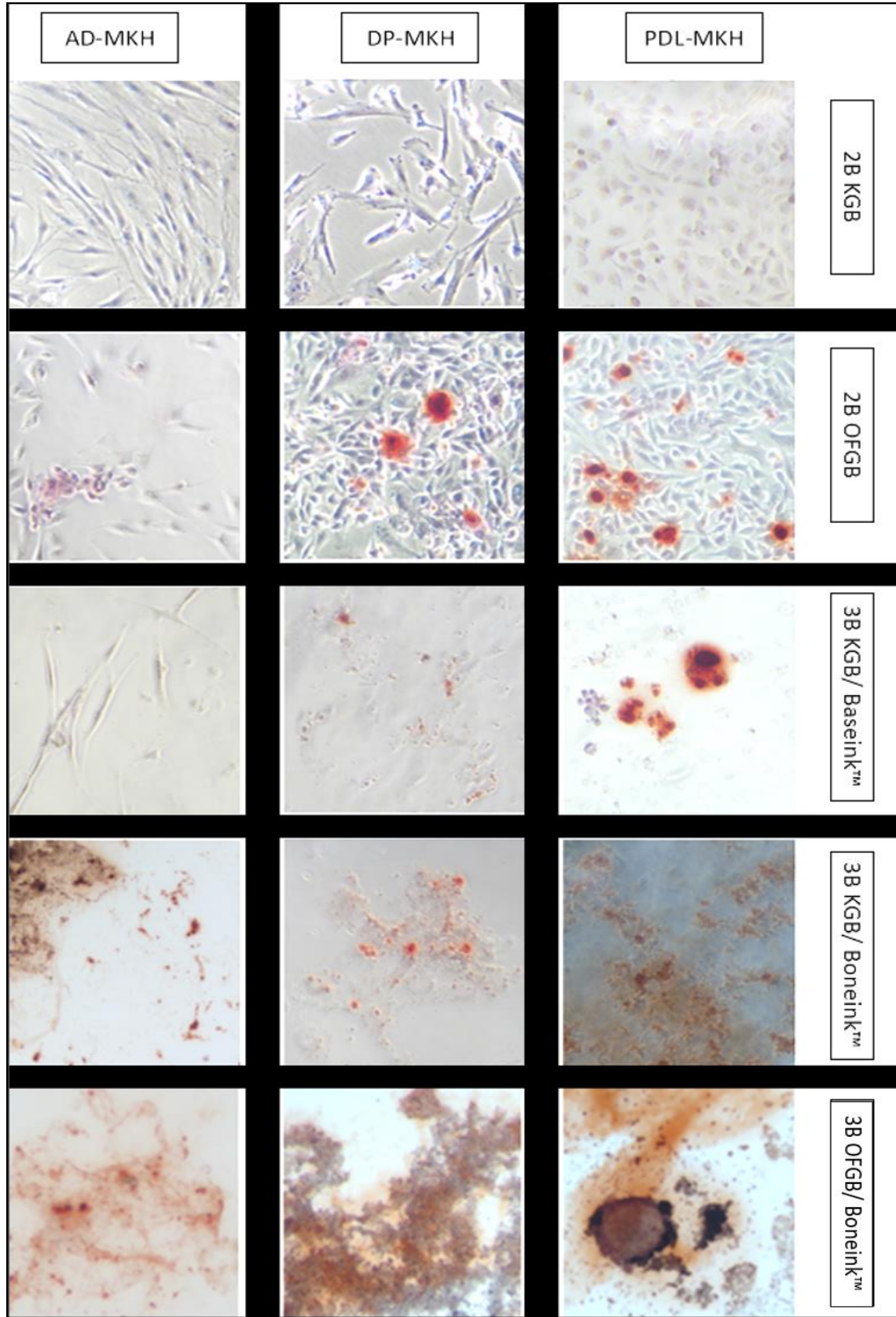
Resim 4.4. 2B kültür ortamında 28 gün kültüre edilen çalışma gruplarına ait kaydedilen ışık mikroskop görüntüleri (100X).

- Çalışma gruplarında bulunan hücrelerin 3. gün mikroskopik görüntülerinde, MKH'lere özgü uzun iğsi yapılar gözlemlenmiştir.
- 7. güne ait mikroskopik görüntülerde, her üç hücre hattında da hücrelerin kültür kaplarında taban yüzeyini kapladığı görülse de AD-MKH'lerin özellikle KGB ile kültüre edilen grupta sayıca daha fazla çoğaldıkları belirlenmiştir.
- 14. günde kaydedilen mikroskopik görüntüler karşılaştırıldığında AD-MKH'lere ait görüntülerde hücre sayısı, diğer hücre hatlarına daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. OFGB ile kültüre edilen çalışma gruplarının morfolojik değişimleri incelendiğinde ise AD-MKH'lerde, kök hücrelere özgü morfolojik uzun iğsi yapıda bir değişiklik gözlenmezken; DP-MKH'lerde bu iğsi yapının bir miktar değiştiği, PDL-MKH ise bu değişimin daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir.
- 21. gün sonunda kaydedilen görüntüler değerlendirildiğinde hücre sayısının 14. güne oranla artış sergilediği ve bu artış sonucunda hücrelerin tabakalar halinde yığılmalarının daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir.
- 28. günde morfolojik yapılarda meydana gelen en belirgin değişiklik OFGB ile kültüre edilen PDL-MKH'lerde gözlemlenmiştir.

4.2. Histolojik Boyamalar

Alizarin red boyamaları ışık mikroskobu altında 100X büyütme yapılarak değerlendirilmiştir. Görsellerdeki kırmızı alanlar alizarin red boyası ile boyanan hücreleri ifade etmekte olup (Resim 4.5), osteojenik farklılaşmaya ait değerlendirmeler boyanan yüzey alanları ve boyanma yoğunlukları üzerinden yapılmıştır (Çizelge 4.1). Değerlendirmede $-/+$ değerler aşağıdaki skalaya göre, Özer ve arkadaşları ile Murata ve arkadaşlarının çalışmalarına dayanılarak oluşturulmuştur (Murata ve diğerleri, 2020; Özer ve diğerleri, 2012).

<u>Boyanma yoğunluğu</u>	<u>Skorlama</u>
%0	-
%1-20	+
%21-40	++
%41-60	+++
%61-80	++++
%81-100	+++++



Resim 4.5. Çalışma gruplarında alizarin red boyamalarına ait ışık mikroskop görüntüleri (100X).

Çizelge 4.1. Çalışma gruplarının alizarin red boyama yoğunlukları. (-) ile ifade edilen gruplarda boyanma gözlemlenmezken (+) ile ifade edilen gruplarda boyanma gözlenmiş olup boyanma yoğunlukları (osteojenik farklılaşma) (+) sembollerinin sayısı ile ifade edilmiştir

Kültür Ortamı	Besiyeri	Hidrojel	AD-MKH	DP-MKH	PDL-MKH
2B	KGB (+Kontrol)	YOK	-	-	+
	OFGB	YOK	+	++	+++
3B	KGB	Baseink™	-	+	+++
		Boneink™	++	+++	++++
	OFGB	Boneink™	+++	++++	+++++

Buna göre;

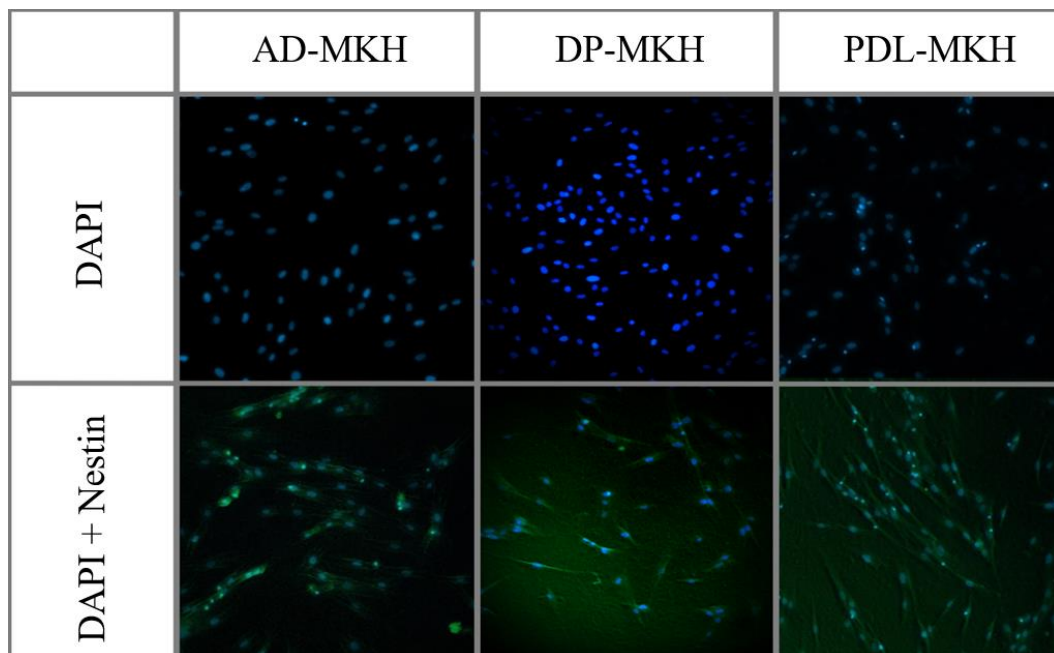
- 2B çalışma gruplarında;
 - o KGB ile kültüre edilen PDL-MKH hatlarında alizarin red boyanması gözlemlenirken, AD-MKH ve DP-MKH’ de gözlemlenmemiştir.
 - o OFGB ile kültüre edilen tüm çalışma gruplarında osteojenik farklılaşmanın belirtici olan alizarin red boyanması gözlemlenmiş olmakla birlikte, bu yoğunluk en fazla PDL-MKH’lerde daha sonra sırasıyla DP-MKH ve AD-MKH’lerde gözlemlenmiştir.
- 3B çalışma gruplarında;
 - o KGB ve Baseink™ ile kültüre edilen ortamlarda AD-MKH’lerde alizarin red boyanması gözlenmezken, DP-MKH ve PDL-MKH’lerde ise gözlemlenmiştir.
 - o KGB ve HA içerikli Boneink ile kültüre edilen çalışma gruplarında ise tüm hücre hatlarında alizarin red boyanması gözlemlenmiş olup boyanma yoğunluğu en fazla olan hücre hattı PDL-MKH’lerdir.
 - o OFG ve Boneink™ ile oluşturulan çalışma gruplarında ise gözlemlenen alizarin red boyanma miktarı, tüm hücre hatlarında diğer çalışma gruplarına oranla en yüksek yoğunlukta gözlemlenmiştir.

- Genel olarak 3B kültür ortamlarında çalışma gruplarında bulunan hücre hatlarına ait alizarin red boyama miktarı 2B kültür ortamlarına kıyasla daha yüksek seviyede bulgulanmıştır.
- Boneink™ ile oluşturulan 3B kültür ortamlarında OFGB kullanılmasa da alizarin red boyanması olduğu gözlemlenmiştir.
- Tüm çalışma gruplarında en yüksek boyanma PDL-MKH'lerde gözlemlenmiştir.

4.3. İmmün Floresan Boyamalar

Çoğaltılan hücrelerin karakterizasyonları için MKH antijenlerine özgü antikorlar kullanılarak belirtilen protokole uygun olarak hücre yüzeyi, sitoplazmik ya da nükleer bölgelerin floresan işaretlenmesi ve floresan mikroskopta görüntüleri alt başlıklarda elde edilen görsellerde belirtilmiştir.

2B kontrol gruplarına uygulanan DAPI boyası hücre çekirdeklerini boyayarak mavi ışığa verirken, nestin hücre çeperlerini boyayarak yeşil ışımaların görünmesini sağlamıştır. AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH hattında mavi ve yeşil renkli ışımalar gözlemlenmiştir (Resim 4.6). Mavi renkli ışımaların varlığı hücrelerin canlılığını gösterirken, elde edilen yeşil renkli ışımalar çalışmamızın başlangıcında kullanılan hücrelerin MKH özelliğine sahip olduğunu destekler niteliktedir.

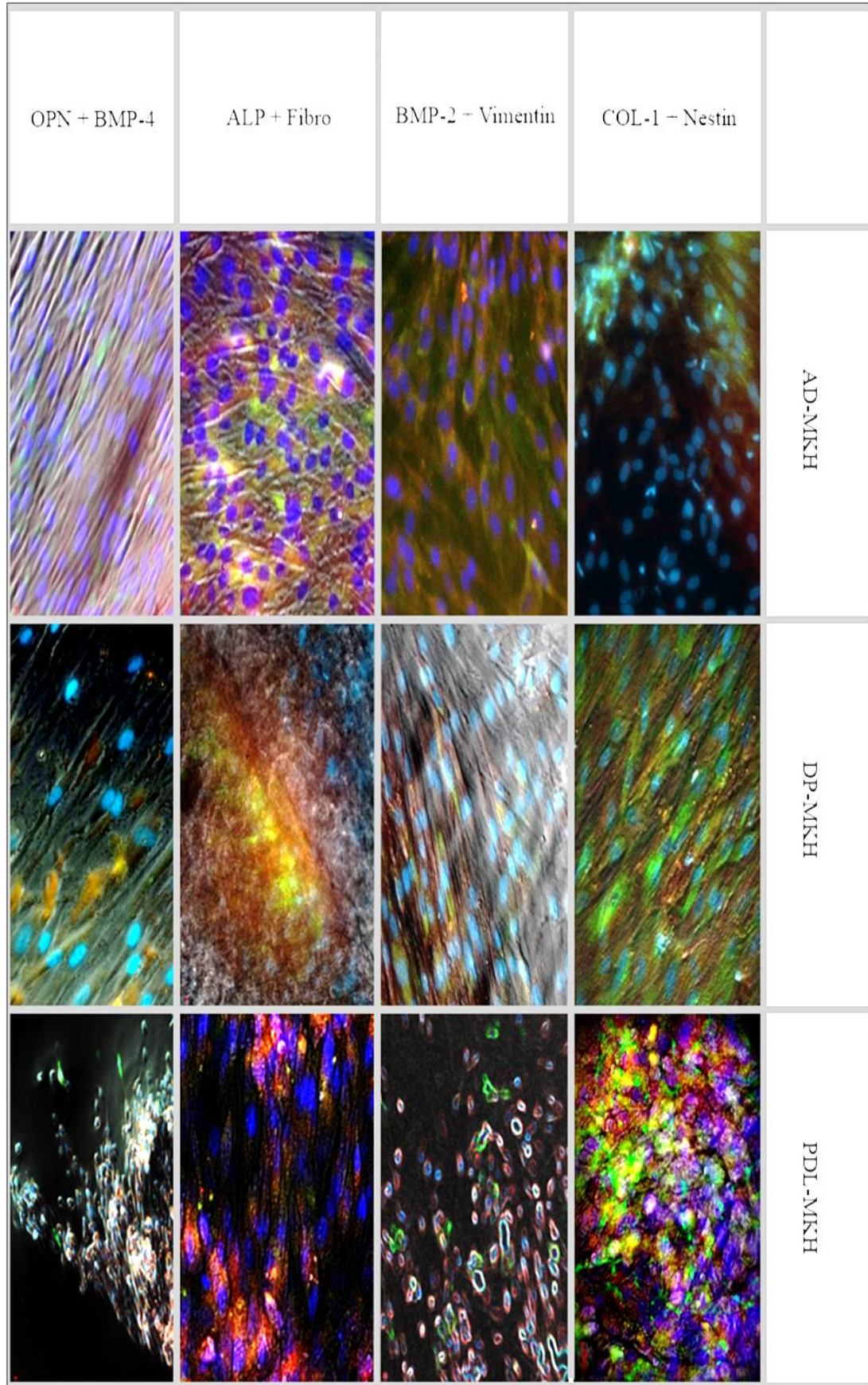


Resim 4.6. IF Analizlerine 2B Kontrol grubuna ait mikroskopik görüntüler (100X büyütme)

IF boyamalarda 28 gün boyunca OFGB ile kültüreedilen 2B ve 3B çalışma gruplarını değerlendirmek amacıyla ikili ışıma yöntemi uygulanmıştır. Boyama yapılan her kuyucukta kırmızı ve yeşil renkli elde edilen ışımlar farklı bir antikorları temsil etmektedir. Mavi renkli elde edilen ışımlar ise hücre çekirdeğini göstermektedir.

2B çalışma gruplarında ışık mikroskobu altında 200X büyütme ile kaydedilen görseller Resim 4.7’de verilmiş olup görsellerde renkleri temsil eden primer antikorlar ve ışımalara ilişkin değerlendirmeler ise Çizelge 4.2’de belirtilmiştir.





Resim 4.7. 2B deneylerde OFGB ile kültüre edilen hücre hatlarının IF boyamalarının ışık mikroskobu altındaki görüntüleri (200X)

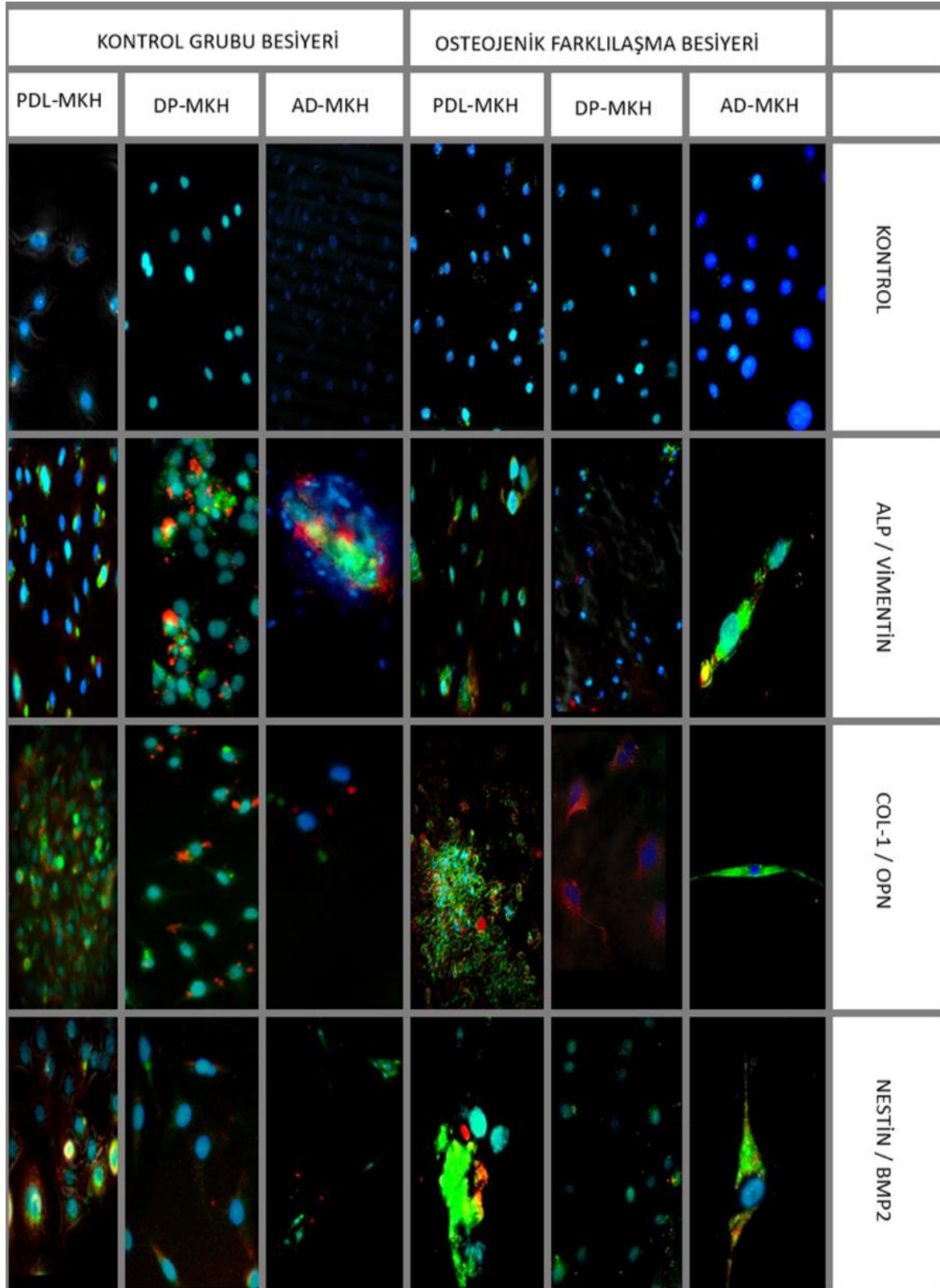
Çizelge 4.2. 2B çalışma gruplarında IF analizlerde kullanılan primer antikorlar ve çalışma gruplarda ışıma miktarlarının değerlendirilmesi. (Oluşturulan çizelgede (-) ile ifade edilen gruplarda boyanma gözlemlenmezken (+) ile ifade edilen gruplarda boyanma gözlemlenmiş olup boyanma yoğunlukları (osteojenik farklılaşma) (+) sembollerinin sayısı ile ifade edilmiştir)

	Besiyeri	Hidrojel	Antikor			AD-MKH	DP-MKH	PDL-MKH
			Primer	Işıma				
2B	OFGB	X	1	COL-1	Yeşil	+	+	+
				Nestin	Kırmızı	++	++	+
			2	ALP	Yeşil	++	++	+
				Fibronectin	Kırmızı	+	+	+
			3	BMP-2	Kırmızı	+	+	+++
				Vimentin	Yeşil	+++	++	+
			4	BMP-4	Kırmızı	+++	++	+
				Osteopontin	Yeşil	+	++	+++
			5	Neg. Kontrol	-	-	-	-

Floresan mikroskopta elde edilen görüntüler değerlendirildiğinde;

- OFGB ile kültüre edilen 2B çalışma gruplarında uygulanan primer antikorların tamamının ışıma verdiği bulgulanmıştır.
- COL-1 ve Fibronectin antikorlarına ait ışımlar tüm çalışma gruplarında eşit seviyededir.
- Nestin Primer antikoruna ait ışımlar AD-MKH ve DP-MKH’lerde PDL-MKH’lere kıyasla daha yüksek seviyede gözlemlenmiştir.
- ALP primer antikoru, AD-MKH ve DP-MKH’lerde eşit seviyede ışıma verirken bu ışıma miktarının PDL-MKH’lerde daha düşük seviyede olduğu bulgulanmıştır.
- BMP-2 ve Osteopontin en yüksek ışıma miktarını PDL-MKH’lerde vermiştir.
- BMP-4 ve vimentin antikorlarının verdiği ışıma miktarları çoktan aza doğru sırasıyla AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH çalışma gruplarında gözlemlenmiştir.
- Negatif kontrol gruplarında ışıma gözlenmemiştir.

3B deneylerde 2B deneylerden farklı olarak hücrelerin bir araya gelerek sferoid yapılar oluşturduğu gözlemlenmiştir. Işık mikroskobunda çalışma gruplarına ait 100X büyütme ile kaydedilen görseller Resim 4.8’de belirtilmiştir. Çizelge 4.3’te bu ışımları temsil eden primer antikorlar ve çalışma gruplarının ışıma miktarları değerlendirilmiştir.



Resim 4.8. 3B deneylerde Boneink™ kültür ortamında KGB ve OFGB ile kültüre edilen çalışma gruplarına ait IF boyamaların mikroskopik görüntüleri(100X)

Çizelge 4.3. 3B çalışma gruplarında IF analizlerde kullanılan primer antikorlar ve çalışma gruplarının ışına miktarlarının değerlendirilmesi. (Oluşturulan çizelgede (-) ile ifade edilen gruplarda boyanma gözlemlenmezken (+) ile ifade edilen gruplarda boyanma gözlemlenmiş olup boyanma (osteojenik farklılaşma) yoğunlukları (+) sembollerinin sayısı ile ifade edilmiştir)

	Besiyeri	Hidrojel	Antikor		AD-MKH	DP-MKH	PDL-MKH
			Primer	Işıma			
3B Kültür Ortamı	KGB	Boneink™	1	ALP	Kırmızı	++	+
				Vimentin	Yeşil	++	+
			2	Osteopontin	Kırmızı	-	++
				COL-1	Yeşil	-	+
			3	Nestin	Kırmızı	-	++
				BMP-2	Yeşil	-	++
			4	Negatif Kontrol	-		
	OFGB	Boneink™	1	ALP	Kırmızı	-	++
				Vimentin	Yeşil	-	++
			2	Osteopontin	Kırmızı	-	++
				COL-1	Yeşil	+	++
			3	Nestin	Kırmızı	++	+
				BMP-2	Yeşil	+	+++
			4	Negatif Kontrol	-		

Elde edilen görüntüler değerlendirildiğinde;

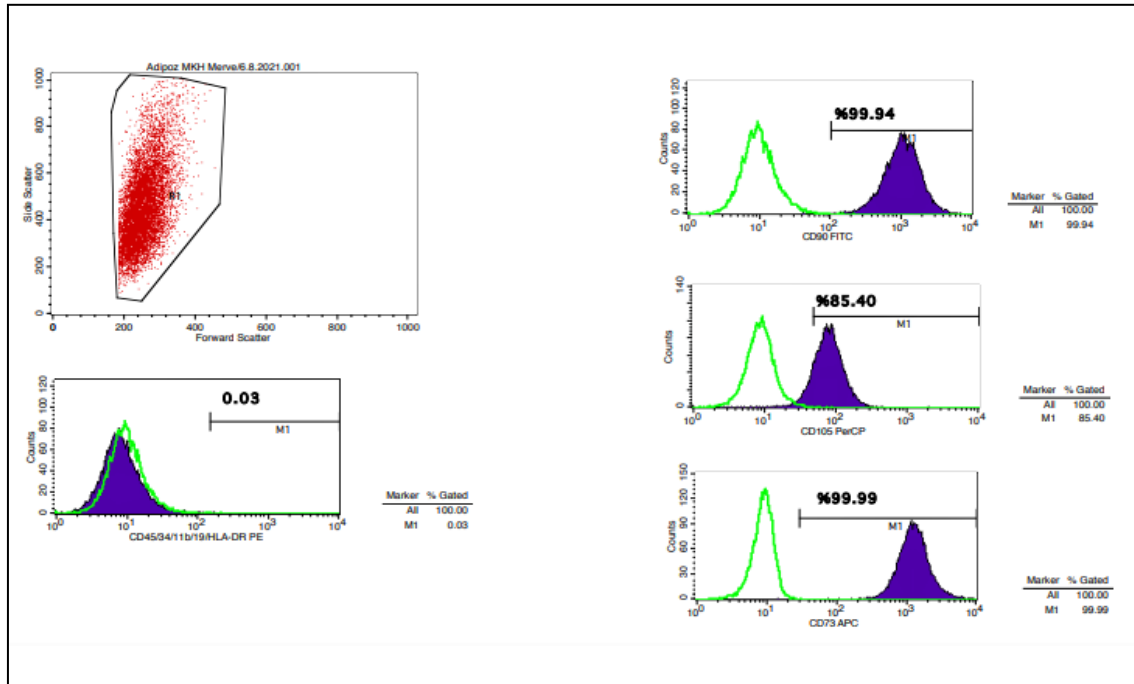
- KGB ile kültüre edilen çalışma gruplarında AD-MKH'lere ait hücreler sadece ALP ve vimentin antikorunda ışına vermiş olup bu seviye, DP-MKH ve PDL-MKH'lerinin vermiş oldukları ışına miktarından daha yüksektir.
- KGB ile kültüre edilen DP-MKH ve PDL-MKH'ler uygulanan tüm antikorlarda ışına vermiş olmakla birlikte Osteopontin, Nestin ve BMP-2 antikorlarına ait ışınmalar PDL-MKH'lerde daha yüksek seviyede gözlemlenmiştir.

- OFGB ile kültüre edilen çalışma gruplarında AD-MKH'ler COL-1, Nestin ve BMP-2 primer antikorları ışına verirken, DP-MKH ve PDL-MKH'ler uygulanan tüm primer antikorlarda ışına vermişlerdir. Bunun yanı sıra PDL-MKH çalışma grubunda bulunan hücrelerin verdiği ışına miktarı DP-MKH'lerden daha yüksek seviyede olduğu bulgulanmıştır.
- PDL-MKH'lerde OFGB ile kültüre edilen çalışma grubunun verdiği ışına miktarı, KGB ile kültüre edilen çalışma grubundan daha yüksek seviyede olduğu bulgulanmıştır.

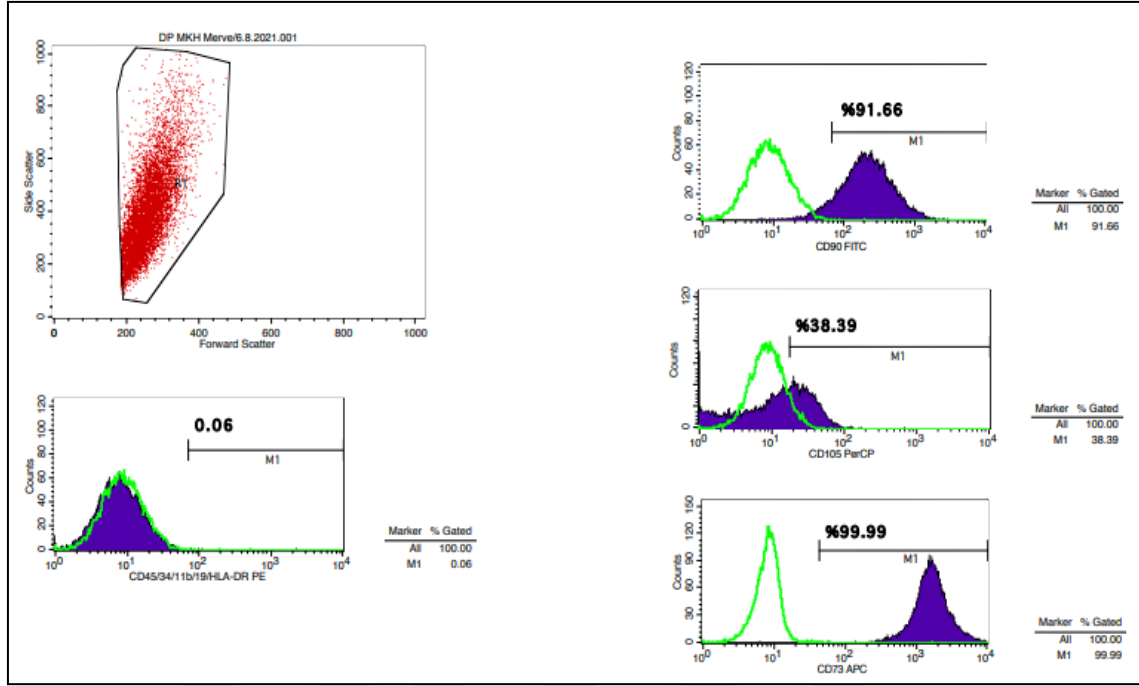
3B deneylerde Baseink™ hidrojel ile çalışma grubu oluşturulmadığı için bu çalışma grubuna ait görüntüler kaydedilemiştir.

4.4. Akım sitometri Analizlerinde Elde Edilen Bulgular

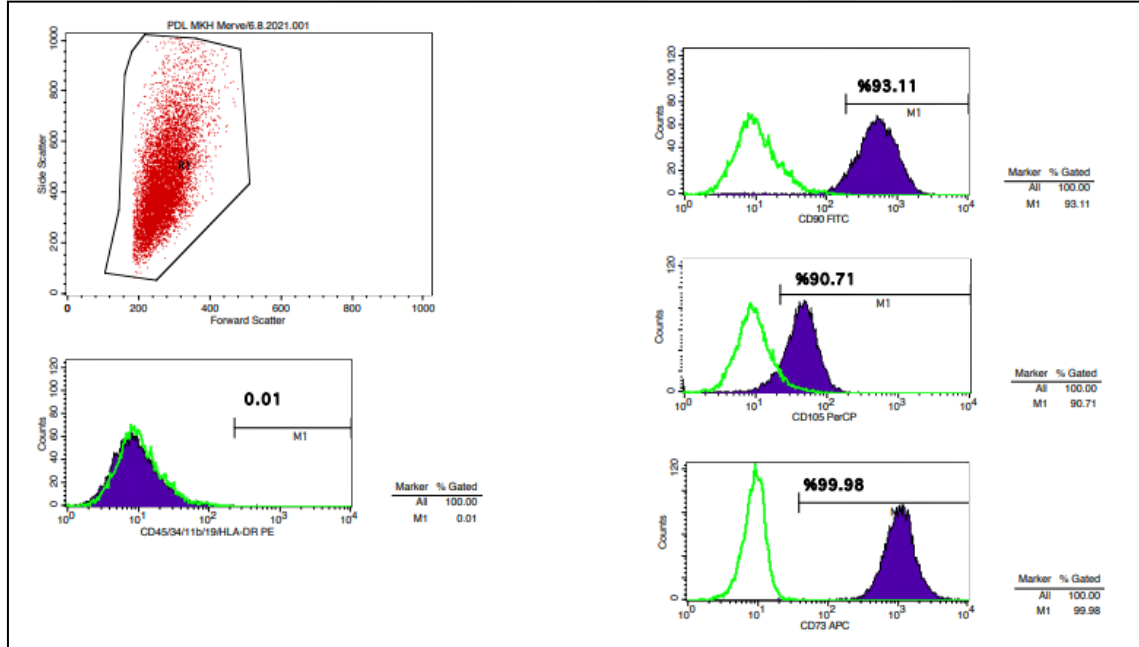
Farklılaşma çalışmalarının başlangıcında kontrol gruplarında yer alan AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH'lere ait spesifik yüzey antijen miktarlarının belirlendiği akım sitometri analizlerinde, elde edilen ölçümler yüzde değeriyle birlikte sırasıyla Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir



Şekil 4.1. Çalışma başlangıcında AD-MKH'lere ait akım sitometri analiz sonuçları (CD90: %99.34, CD105: %85.4, CD73: % 99.99, CD45/34/11b/HLA-DR: %0.03)



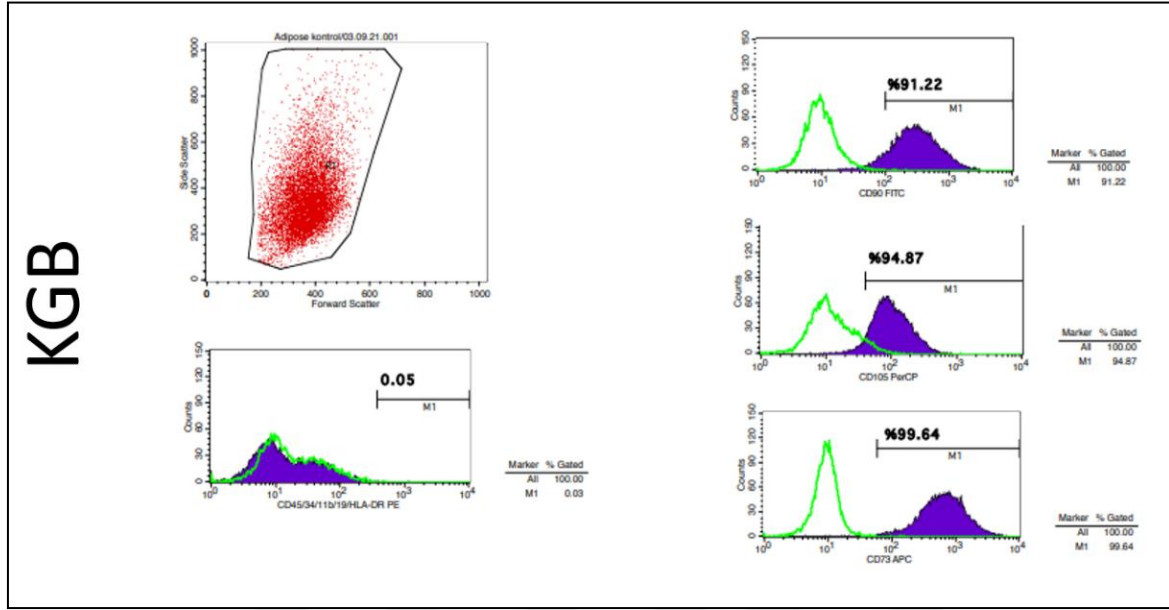
Şekil 4.2. Çalışma başlangıcında DP-MKH'lere ait akım sitometri analiz sonuçları (CD90: %91,66, CD105: %38,39, CD73: % 99,99, CD45/34/11b/HLA-DR: %0,06)



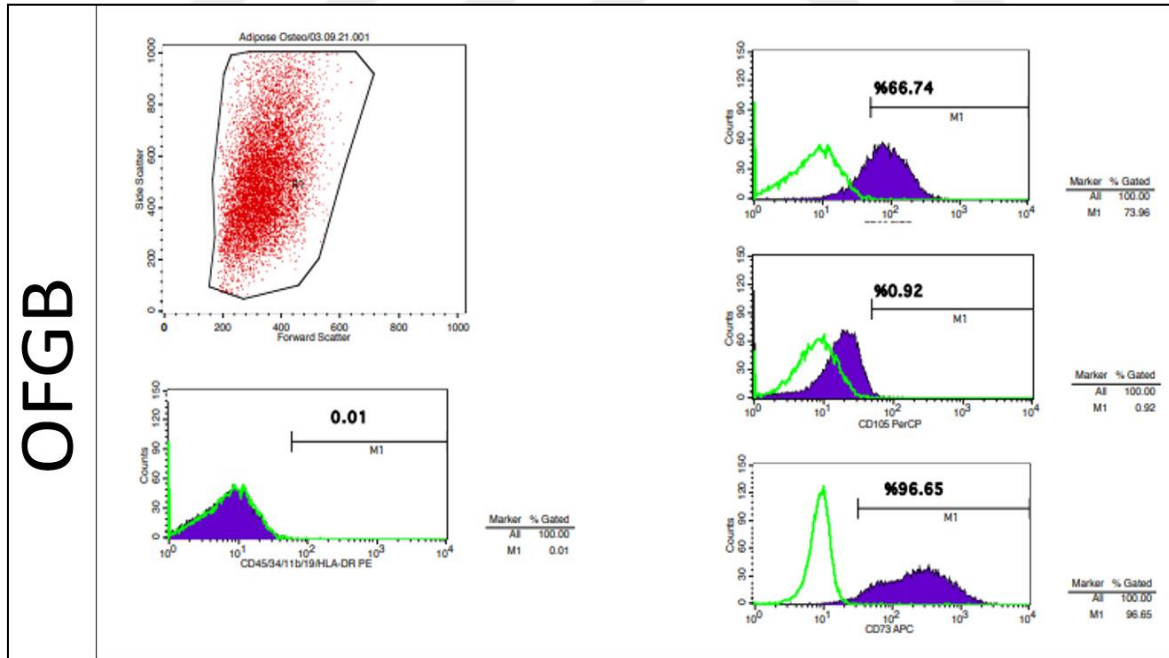
Şekil 4.3. Çalışma başlangıcında PDL-MKH'lere ait akım sitometri analiz sonuçları (CD90: %93,11, CD105: %90,71, CD73: %99,98, CD45/34/11b/HLA-DR: %0,01)

2B çalışma gruplarında 28. günün sonunda KGB ve OFGB yeri ile kültüre edilen hücrelerde akım sitometri analizlerinin yapılmasının nedeni çalışma gruplarını oluşturan hücre

hatlarında MKH'lere özgü yüzey belirteçlerinin miktarındaki değişimi yüzdesel olarak ifade etmektedir. Çalışma sonunda AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH'lere ait akım sitometri analiz sonuçları sırasıyla Şekil 4.4(a,b), Şekil 4.5(a,b) ve Şekil 4.6(a,b)'de verilmiştir.

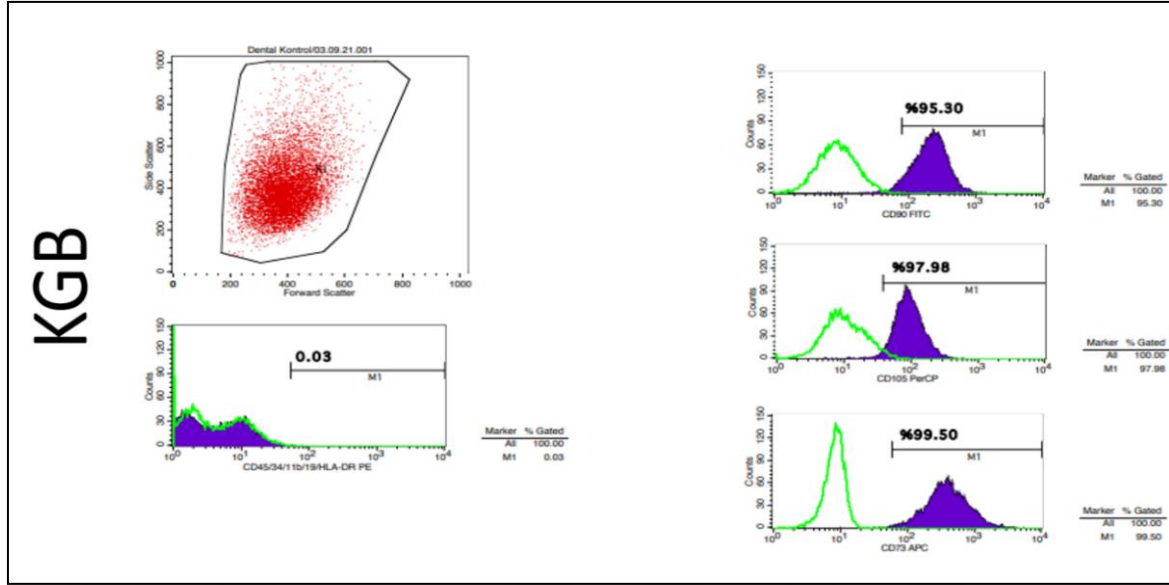


(a)

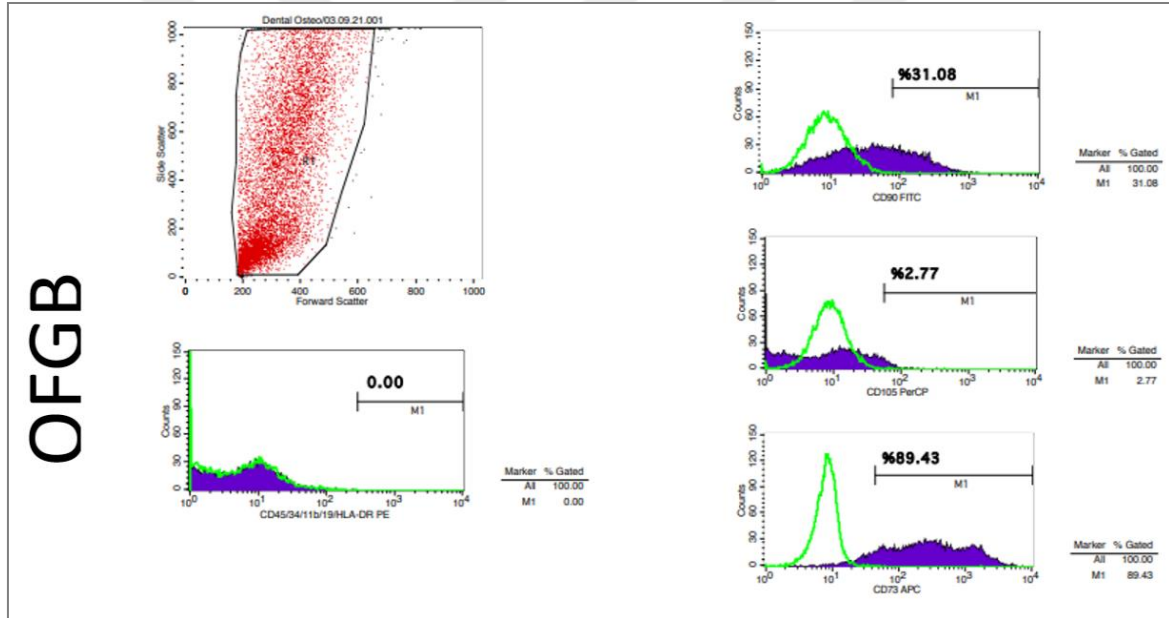


(b)

Şekil 4.4. AD-MKH'lerde 2B çalışma gruplarında a) KGB ile kültüre edilen hücrelerin akım sitometri analizlerinde bulgularan yüzey belirteçleri % değerleri (CD90: %91.22, CD105: %94.87, CD73: %99.64, CD45/34/11b/HLA-DR: %0.05), b) OFGB ile kültüre edilen hücrelerin akım sitometri analizlerinde bulgularan yüzey belirteçleri % değerleri (CD90: %66.74, CD105: %0.92, CD73: %96.65, CD45/34/11b/HLA-DR: %0.01)

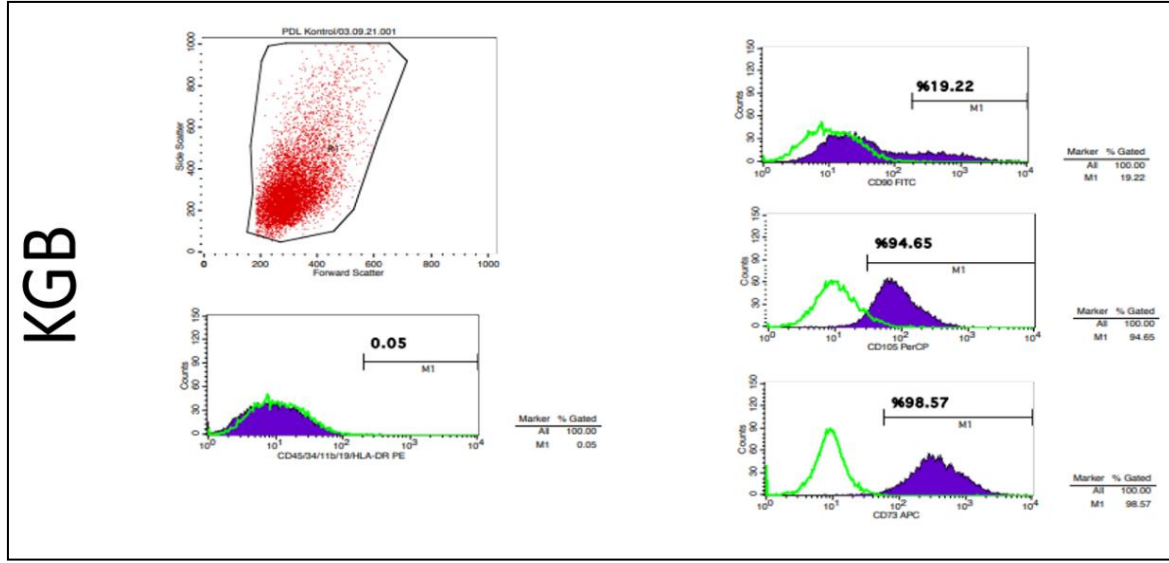


(a)

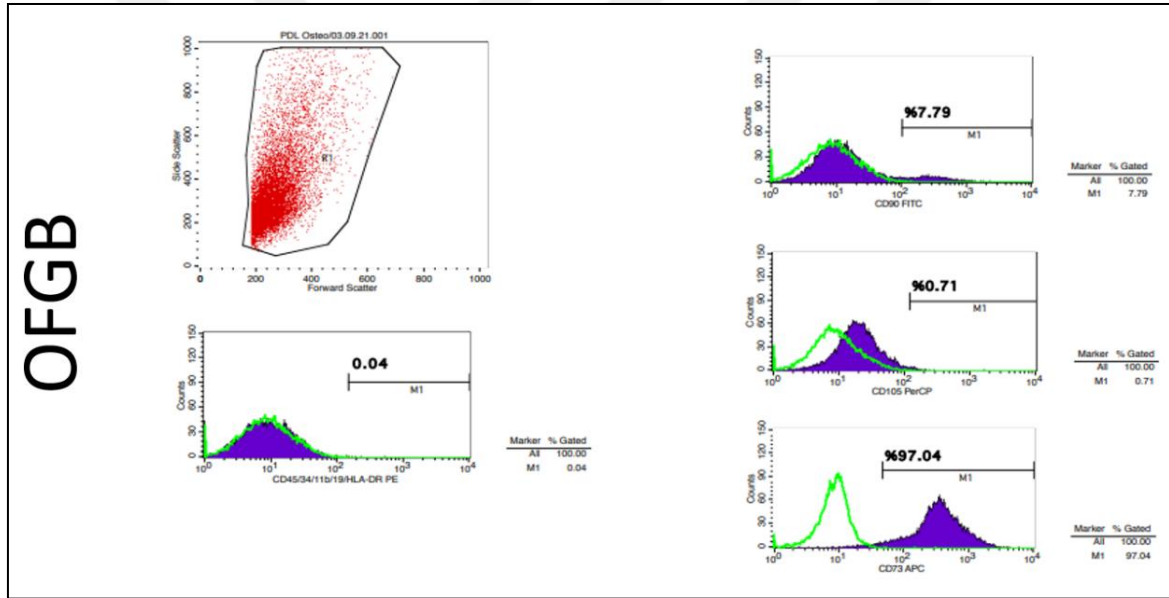


(b)

Şekil 4.5. DP-MKH'lerde 2B çalışma gruplarında a) KGB ile kültüre edilen hücrelerin akım sitometri analizlerinde bulgularan yüzey belirteçleri % değerleri (CD90: %95.3, CD105: %97.98, CD73: %99.5, CD45/34/11b/HLA-DR: %0.03), b) OFGB ile kültüre edilen hücrelerin akım sitometri analizlerinde bulgularan yüzey belirteçleri % değerleri (CD90: %31.08, CD105: %2.77, CD73: %89.43, CD45/34/11b/HLA-DR: %0)



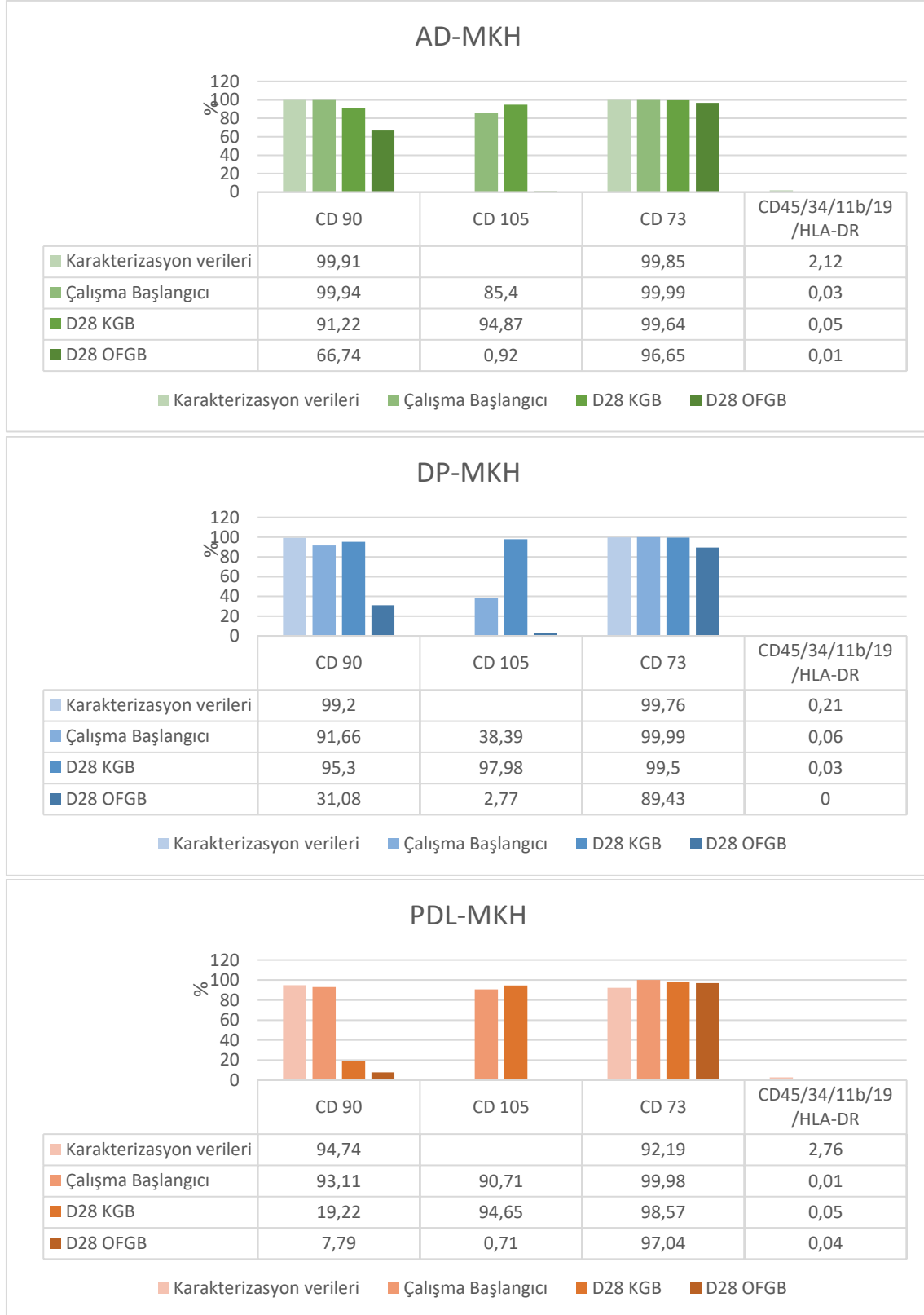
(a)



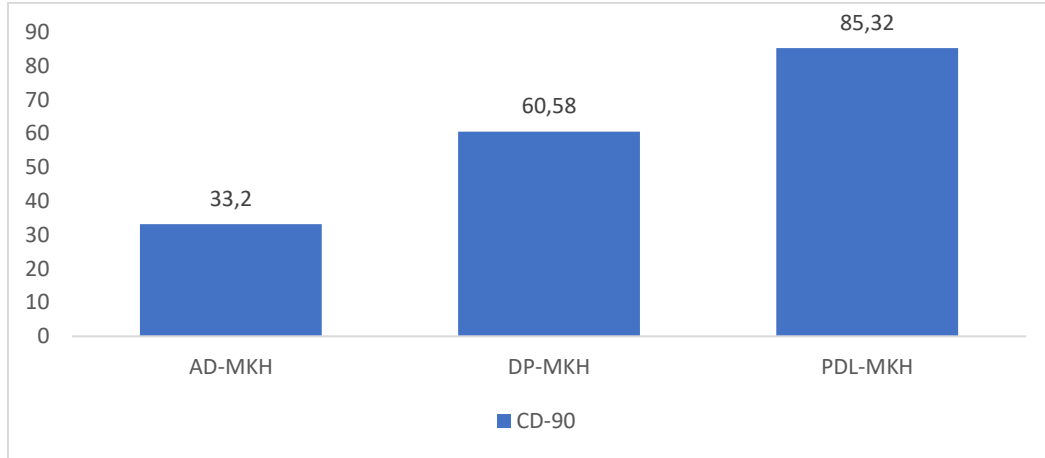
(b)

Şekil 4.6. PDL-MKH'lerde 2B çalışma gruplarında a) KGB ile kültüre edilen hücrelerin akım sitometri analizlerinde bulgularan yüzey belirteçleri % değerleri (CD90: %19.22, CD105: %7.79, CD73: %97.04, CD45/34/11b/HLA-DR: %0.04), b) OFGB ile kültüre edilen hücrelerin akım sitometri analizlerinde bulgularan yüzey belirteçleri % değerleri (CD90: %7.79, CD105: %0.71, CD73: %97.04, CD45/34/11b/HLA-DR: %0.04)

AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH'lere ait CD90, CD105, CD73 ve CD45/34/11b/HLA-DR yüzey belirteçlerinin % değerlerinin bir bütün olarak incelenmesi için şekil 4.7 oluşturulmuştur. CD90 (Şekil 4.8), CD105 (Şekil 4.9) ve CD73(Şekil 4.10) yüzey belirteçlerinde meydana gelen % değişimi ki kare testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

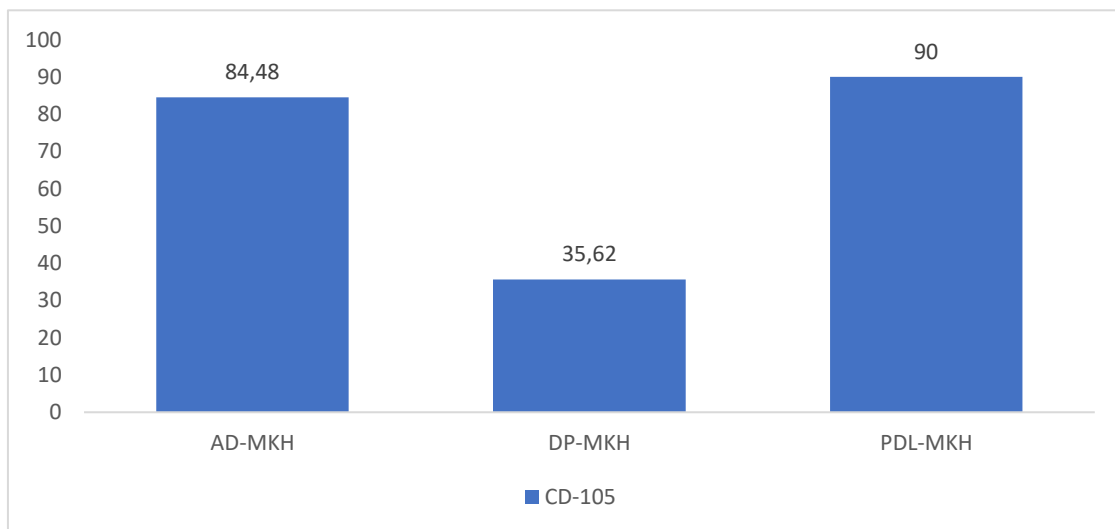


Şekil 4.7. Akım sitometri analizinde elde edilen veriler



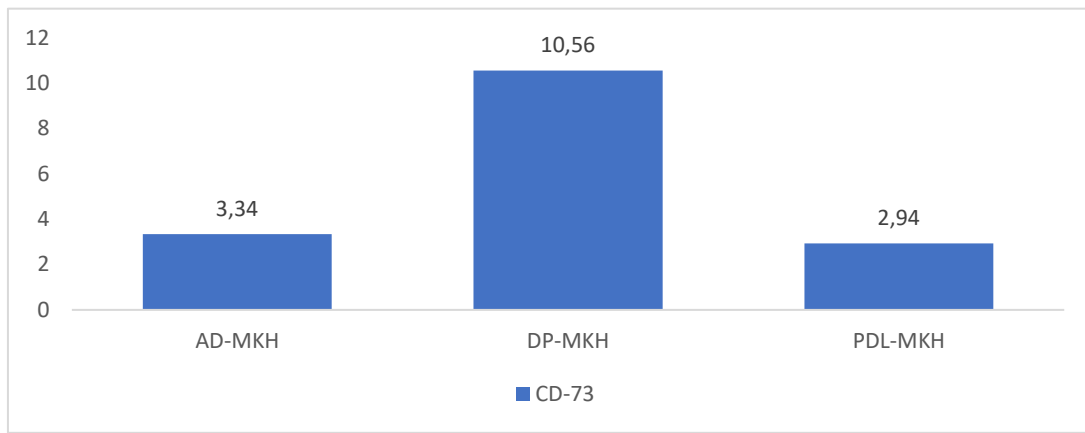
Şekil 4.8. OFGB ile kültüre edilen AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH'lerin CD90 ekspresyon seviyelerinin çalışma başlangıcında elde edilen ekspresyon seviyelerine göre istatistiksel olarak karşılaştırılması

Çalışma başlangıcında oluşturulan gruplarla ve akım sitometri analizinde CD90 yüzey belirtecine ait elde edilen veriler, çalışma başlangıcında ve 28 gün kültür sonunda OFGB ile kültüre edilen çalışma gruplarının karşılaştırılmasını göstermektedir. Bu karşılaştırma sonucunda en çok ekspresyon gösteren PDL-MKH'dır. Ekspresyon miktarı başlangıç düzeyinden itibaren gözlemler sonucunda 28 günün sonuna kadar tüm hücre tutulumun azaldığını gözlemlemektedir. Bu gözlem sonucunda yukarıdaki fark grafiği oluşmaktadır. Bu grupların karşılatırılmasına göre PDL-MKH hücrelerinde tutulumun daha fazla olduğu görülmüştür ve bu gözlem istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur($p < 0,05$).



Şekil 4.9. OFGB ile kültüre edilen AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH'lerin CD105 ekspresyon seviyelerinin çalışma başlangıcında elde edilen ekspresyon seviyelerine göre istatistiksel olarak karşılaştırılması

Çalışma başlangıcında oluşturulan gruplarla ve akım sitometri analizinde CD105 yüzey belirtecine ait elde edilen veriler, çalışma başlangıcında ve 28 gün kültür sonunda OFGB ile kültüre edilen çalışma gruplarının karşılaştırılmasını göstermektedir. Bu karşılaştırma sonucunda en çok ekspresyon gösteren PDL-MKH'dır. Ekspresyon miktarı başlangıç düzeyinden itibaren gözlemler sonucunda 28 günün sonuna kadar tüm hücre tutulumun azaldığını gözlemektedir. Bu gözlem sonucunda yukarıdaki fark grafiği oluşmaktadır. Bu grupların karşılatırılmasına göre PDL-MKH hücrelerinde tutulumun daha fazla olduğu görülmüştür ve bu gözlem istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur($p<0,05$).



Şekil 4.10. OFGB ile kültüre edilen AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH'lerin CD73 ekspresyon seviyelerinin çalışma başlangıcında elde edilen ekspresyon seviyelerine göre istatistiksel olarak karşılaştırılması

Çalışma başlangıcında oluşturulan gruplarla ve akım sitometri analizinde CD73 yüzey belirtecine ait elde edilen veriler, çalışma başlangıcında ve 28 gün kültür sonunda OFGB ile kültüre edilen çalışma gruplarının karşılaştırılmasını göstermektedir. Bu karşılaştırma sonucunda en çok ekspresyon gösteren DP-MKH'dir. Ekspresyon miktarı başlangıç düzeyinden itibaren gözlemler sonucunda 28 günün sonuna kadar tüm hücre tutulumun azaldığını gözlemektedir. Bu gözlem sonucunda yukarıdaki fark grafiği oluşmaktadır. Bu grupların karşılatırılmasına göre DP-MKH hücrelerinde tutulumun daha fazla olduğu görülmüştür ve bu gözlem istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur($p<0,05$).

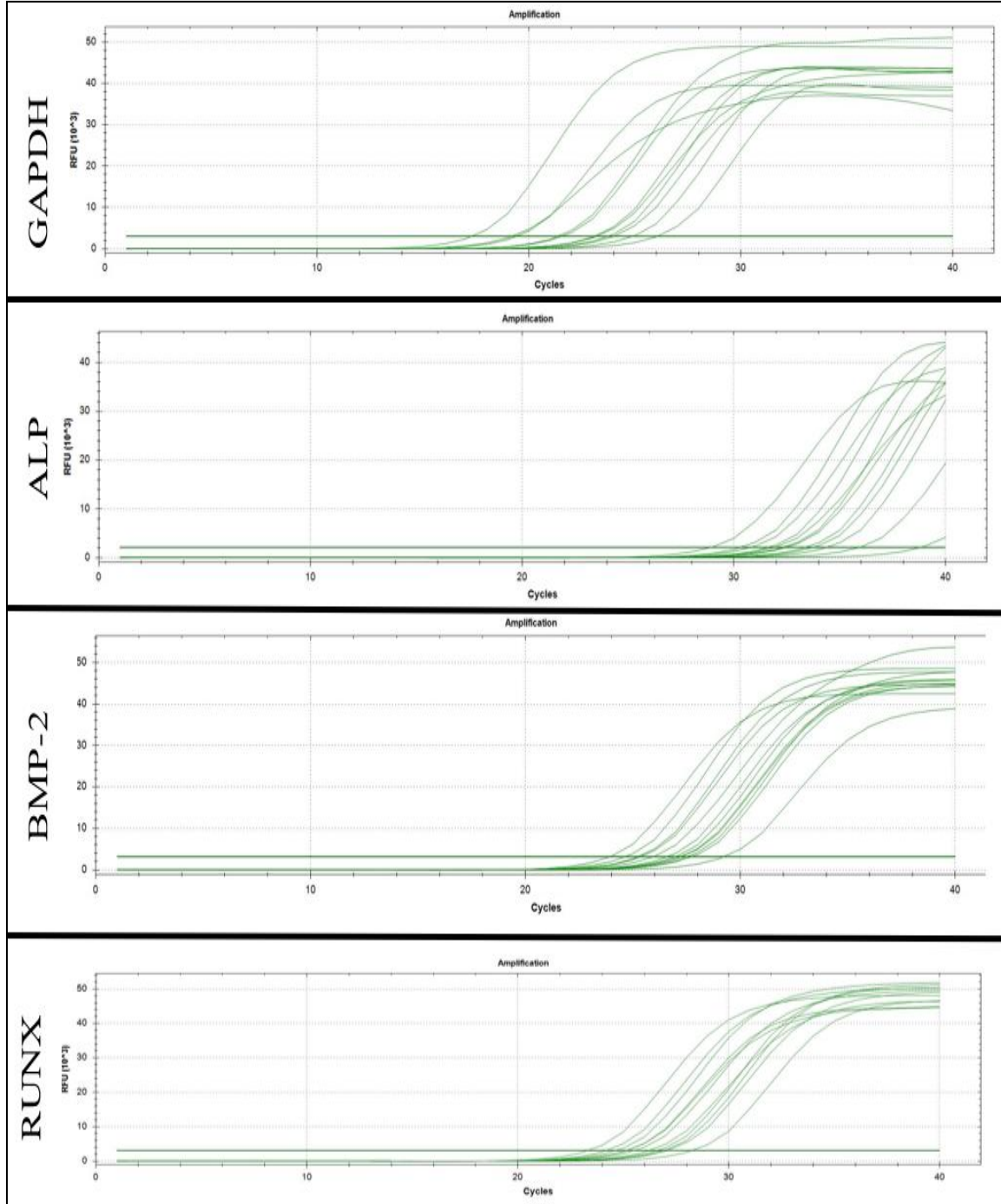
4.5. Osteojenik Farklılaşma Gruplarında Gerçek Zamanlı PZR Analizinde Elde Edilen Bulgular

Gerçek zamanlı PZR analizinde çalışma gruplarına ait elde edilen RNA konsantrasyon ve saflık değerleri çizelge 4.4'te belirtilmiştir.

Çizelge 4.4. İzole edilen RNA konsantrasyonları ve saflık değerleri

Kültür Ortamı	Besiyeri	Hidrojel	AD-MKH		DP-MKH		PDL-MKH	
			ng/μl	A260/A280	ng/μl	A260/A280	ng/μl	A260/A280
2B	KGB (+Kontrol Grubu)	YOK	113,0	1,61	348	1,84	186	1,78
	OFGB	YOK	346,0	1,91	280,6	1,78	961,1	2,02
3B	KGB	Boneink™	45,7	1,59	66,7	1,52	494,0	1,34
	OFGB	Boneink™	22,3	1,53	81,2	1,70	181,2	1,79

Analizlerde GAPDH, ALP, BMP-2 ve RUNX genlerine ait erime eğrisi ve amplifikasyon eğrilerine ait grafikler sırasıyla Şekil 4.11’de verilmiştir. Grafiklerde elde edilen her bir çizgi çalışma gruplarını ifade etmektedir.



Şekil 4.11. GAPDH, ALP, BMP-2 ve RUNX genlerine ait amplifikasyon eğrileri

Elde edilen grafiklerde çalışma gruplarını oluşturan hücrelere ait DNA'lar GAPDH, BMP-2 ve RUNX genlerinde 20.döngüden itibaren logaritmik artış fazına geçerken, ALP geninde bu geçişin 30. döngüden sonra başladığı gözlemlenmiştir.

4.6. İstatistiksel Analizler

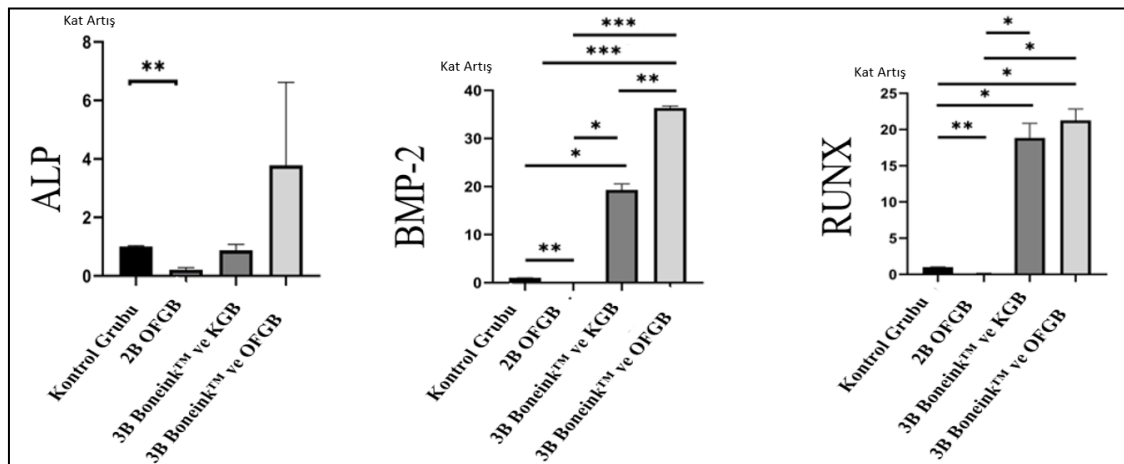
İstatistiksel analizlerde 2B ve 3B çalışma gruplarında 28 gün boyunca kültüre edilen AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH'lerin gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar osteojenik farklılaşmayı gösteren ALP, BMP-2 ve RUNX genlerinin ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesiyle yapılmış olup kontrol grubu olarak 2B deneylerde KGB ile 28 gün kültüre edilen çalışma grubu baz alınmıştır. ANOVA yöntemiyle değerlendirilmiş olan karşılaştırmalarda anlamlı fark bulunan sonuçlar, anlamlılık derecesine göre '*', '**' ve '***' sembolleri ile işaretlenmiştir.

İstatistiksel değerlendirmeler yapılırken çalışma grupları gen ekspresyon seviyelerinin grup içi ve grup bazlı analizleri değerlendirilmiştir.

4.6.1. Mezenkimal kök hücrelerin gen ekspresyon seviyelerinin çalışma gruplarına göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi

İstatistiksel analizlerle çalışma gruplarının oluşturan AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH hatlarının ALP, BMP-2 ve RUNX gen ekspresyon seviyelerinin istatistiksel bulguları kat artış grafikleri ile belirtilmiştir.

AD-MKH'lere ait gen ekspresyon seviyelerine ait kat artış grafiği şekil 4.12'de belirtilmiş olup elde edilen bulgular aşağıda belirtilmiştir.

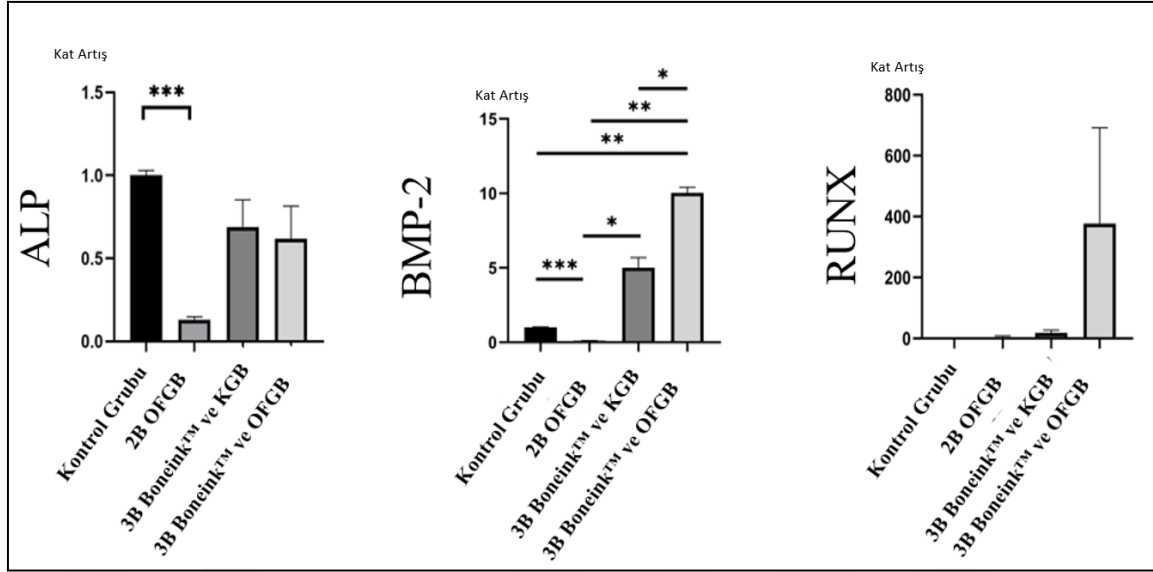


*, p < 0.05, **, p < 0.01, ***, p < 0.001

Şekil 4.12. AD-MKH'lere ait gen ekspresyon seviyelerine ait istatistiksel kat artış grafikleri

- Kontrol grubuna ait hücrelerin ALP gen ekspresyon seviyeleri, 2B osteojenik farklılaşma gruplarına kıyasla yüksek düzeyde anlamlı fark ($p<0,01$) bulunmuştur.
- BMP-2 gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında;
 - 3B çalışma gruplarında OFGB ile kültüre edilen hücrelerin gen ekspresyon seviyeleri;
 - 3B çalışma grubunda KGB ile kültüre edilen hücrelere oranla anlamlı düzeyde yüksek fark ($p<0,01$) bulunmuştur.
 - 2B çalışma grubunda OFGB ile kültüre edilenlere oranla çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0,001$) bulunmuştur.
 - Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0,001$) bulunmuştur.
 - 3B çalışma grubunda KGB ile kültüre edilen hücrelerin BMP-2 gen ekspresyon seviyeleri;
 - Kontrol grubu ve 2B OFGB ile kültüre edilen hücrelerin gen ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırıldığında anlamlı fark ($p<0,05$) bulunmuştur.
 - Kontrol grubunda bulunan hücrelerin BMP-2 gen ekspresyon seviyeleri, 2B OFGB ile kültüre edilenlere oranla yüksek düzeyde anlamlı fark olduğu bulunmuştur.
- RUNX gen ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise
 - 3B çalışma grubunda OFGB ile kültüre edilen AD-MKH'lerin RUNX gen ekspresyon seviyeleri;
 - 2B OFGB ile kültüre edilenlerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0,05$) bulunmuştur.
 - Kontrol grubunda bulunan hücrelerin gen ekspresyon seviyeleri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0,05$) bulunmuştur.
 - 3B çalışma grubunda KGB ile kültüre edilen hücrelerin RUNX ekspresyon seviyeleri, Kontrol grubu ve 2B KGB ile kültüre edilen çalışma grupları ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p<0,05$) gözlemlenmiştir.
 - Kontrol grubunda bulunan AD-MKH'lerin RUNX gen ekspresyon seviyeleri ile 2B OFGB ile kültüre edilen çalışma grupları ile karşılaştırıldığında yüksek düzeyde anlamlı fark bulunmuştur.

DP-MKH'lere ait gen ekspresyon seviyelerine ait kat artış grafiği şekil 4.13'de belirtilmiş olup elde edilen bulgular aşağıda belirtilmiştir.

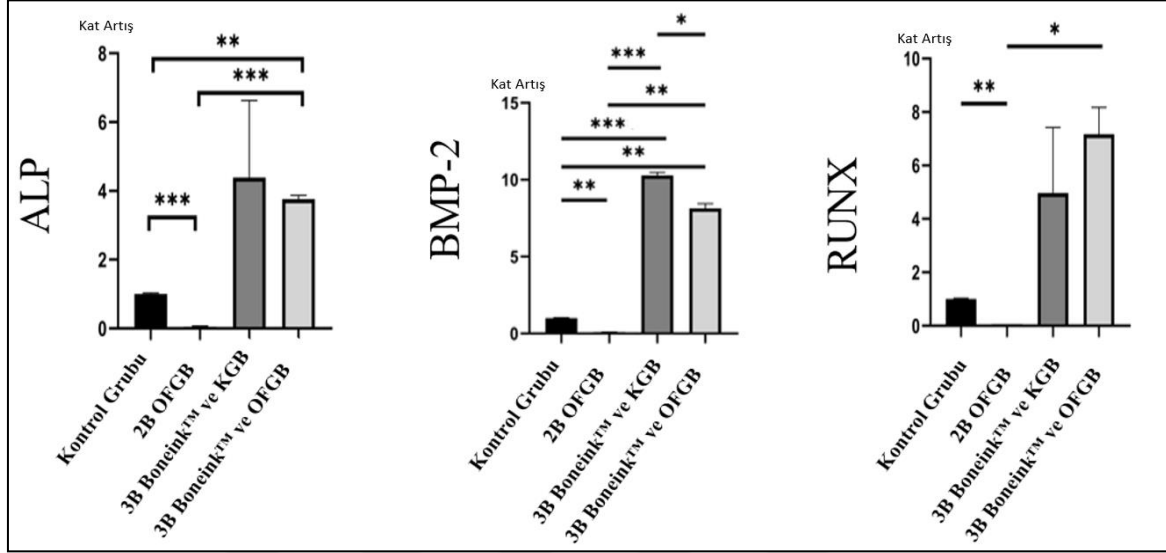


*, p < 0.05, **, p < 0.01, ***, p < 0.001

Şekil 4.13. DP-MKH'lere ait gen ekspresyon seviyelerine ait istatistiksel kat artış grafikleri

- ALP gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında Kontrol grubu ve 2B OFGB ile kültüre edilen çalışma grupları arasında çok yüksek düzeyde anlamlı fark ($p < 0,001$) bulunmuştur.
- BMP2 gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında;
 - 3B çalışma gruplarında OFGB ile kültüre edilen hücrelerin gen ekspresyon seviyeleri;
 - 3B KGB ile kültüre edilen hücrelerle karşılaştırıldığında anlamlı fark ($p < 0,05$) bulunmuştur.
 - 2B OFGB ile kültüre edilenlerle karşılaştırıldığında yüksek düzeyde anlamlı fark ($p < 0,01$) bulunmuştur.
- Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yüksek düzeyde anlamlı fark ($p < 0,01$) bulunmuştur.
 - 3B KGB ile kültüre edilen hücrelerin gen ekspresyon seviyeleri ve 2B OFGB grubu karşılaştırıldığında anlamlı fark ($p < 0,05$) bulunmuştur.
 - Kontrol grubu ile 2B OFGB ile kültüre edilen çalışma grubu karşılaştırıldığında ise çok yüksek seviyede istatistiksel olarak anlamlı fark ($p < 0,001$) bulunmuştur.
- RUNX gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır.

PDL-MKH'lere ait gen ekspresyon seviyelerine ait kat artış grafiği şekil 4.14'te belirtilmiş olup elde edilen bulgular aşağıda belirtilmiştir.



*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

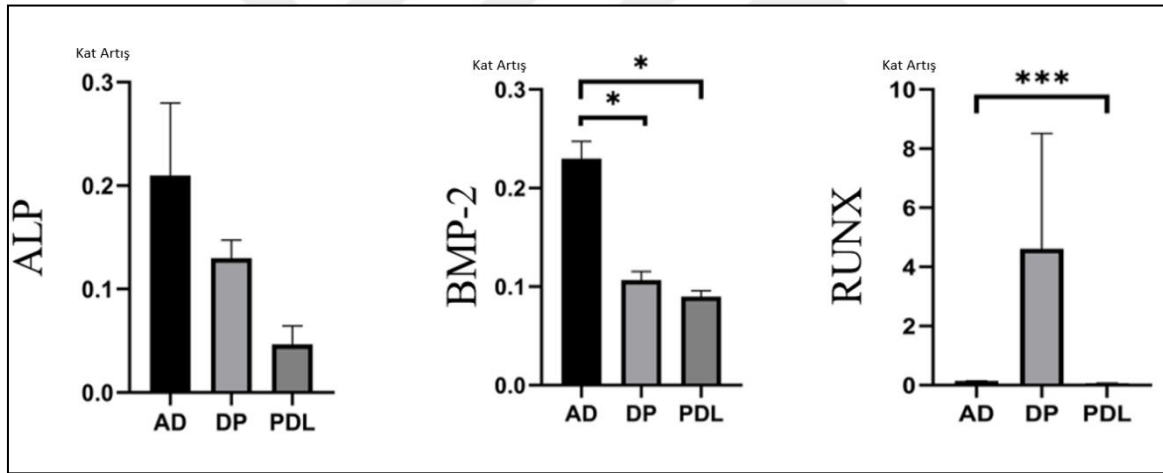
Şekil 4.14. PDL-MKH'lere ait gen ekspresyon seviyelerine ait istatistiksel kat artış grafikleri

- ALP gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında;
 - Kontrol grubunda bulunan MKH'lerin ALP gen ekspresyon seviyeleri 2B OFGB ile kültüre edilen grupta yer alan hücrelere kıyasla çok yüksek seviyede anlamlı ($p < 0,001$) bulunmuştur.
 - OFGB ile kültüre edilen 2B ve 3B çalışma grupları arasında yapılan karşılaştırmada, 3B çalışma grupları çok yüksek seviyede anlamlı ($p < 0,001$) bulgu vermiştir.
- BMP-2 gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında;
 - 3B OF grubunda bulunan hücrelerin gen ekspresyon seviyeleri;
 - 3B ve 2B KGB ile kültüre edilen gruba oranla değerinde anlamlı fark ($p < 0,05$) bulunmuştur.
 - 2B OFGB ile kültüre edilen çalışma grubuna oranla yüksek anlamlı fark ($p < 0,01$) bulunmuştur.
 - 3B çalışma grubunda KGB ile kültüre edilen hücrelerin gen ekspresyon seviyeleri;
 - 2B KGB ve OFGB ile kültüre edilen çalışma gruplarıyla grubuyla karşılaştırıldığında çok yüksek seviyede anlamlı fark ($p < 0,001$) bulunmuştur.
- RUNX gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında;

- OFGB ile kültüre edilen 3B çalışma gruplarının RUNX gen ekspresyon seviyeleri aynı besiyeri ile kültüre edilen 2B çalışma gruplarından anlamlı yüksek ($p<0,05$) bulunmuştur.
- Kontrol grubunda bulunan hücrelerin gen ekspresyon seviyeleri ise 2B OFGB ile kültüre edilen çalışma grubundan yüksek düzeyde anlamlı fark ($p<0,01$) bulunmuştur.

4.6.2. Çalışma gruplarında mezenkimal kök hücrelerin gen ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

2B çalışma gruplarında OFGB ile kültüre edilen MKH'lerin ALP, BMP-2 ve RUNX gen ekspresyonuna ait bulgulardaki anlamlılık seviyeleri Şekil 4.15'te gösterilmiş olup aşağıda belirtilen bulgular elde edilmiştir.



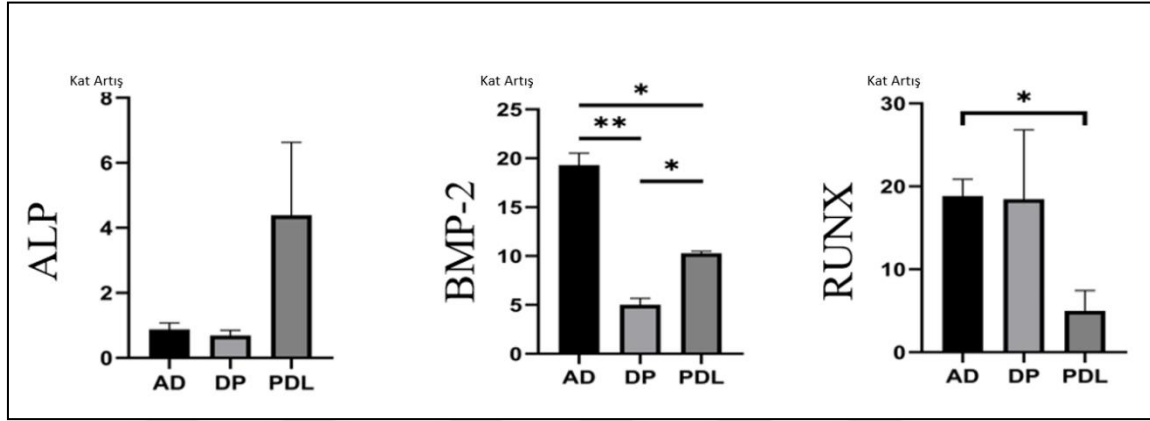
*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

Şekil 4.15. 2B çalışma gruplarında OFGB ile kültüre edilen MKH'lerin gen ekspresyon seviyelerine ait istatistiksel kat artış grafikleri.

Buna göre;

- ALP gen ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.
- AD-MKH'lere ait hücelere BMP-2 gen ekspresyonu DP-MKH ve PDL-MKH'lere göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p<0,05$) göstermiştir.
- RUNX gen ekspresyonu karşılaştırıldığında AD-MKH ve PDL-MKH hücre hatları arasında istatistiksel olarak çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0,001$) bulunmuştur.

3B çalışma gruplarında Boneink™ ve KGB ile kültüre edilen MKH'lerin ALP, BMP-2 ve RUNX gen ekspresyonuna ait bulgulardaki anlamlılık seviyeleri Şekil 4.16'da gösterilmiş olup aşağıda belirtilen bulgular elde edilmiştir.

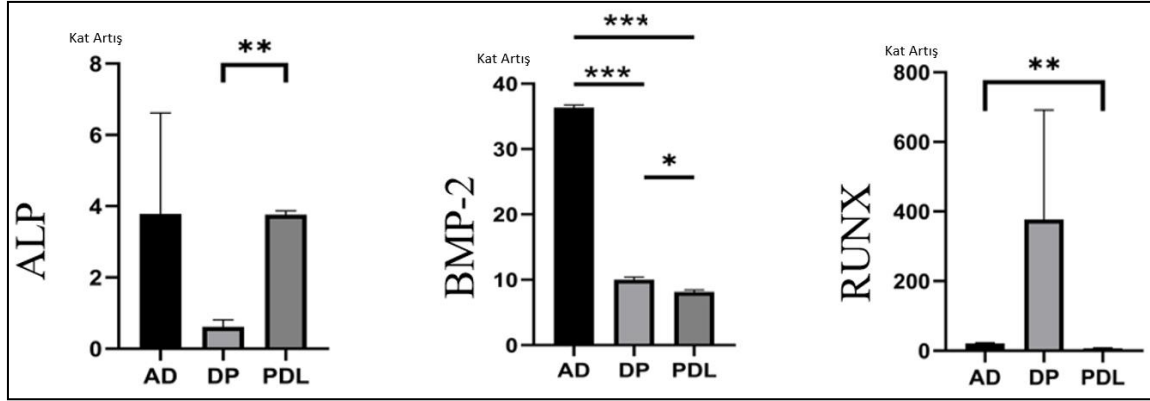


*, p < 0.05, **, p < 0.01, ***, p < 0.001

Şekil 4.16. 3B çalışma gruplarında Boneink™ ve KGB ile kültüre edilen MKH'lerin gen ekspresyon seviyelerine ait istatistiksel kat artış grafikleri.

- ALP gen ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.
- Hücre hatlarının BMP-2 gen ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde;
 - AD-MKH'lerin gen ekspresyon seviyesi,
 - DP-MKH'ler ile karşılaştırıldığında yüksek düzeyde anlamlı fark (p<0,01) bulunmuştur.
 - PDL-MKH'ler ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0,05) bulunmuştur.
 - PDL-MKH'lerin BMP-2 gen ekspresyon seviyeleri ile DP-MKH'lerin gen ekspresyon seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0,05) vardır.
- RUNX gen ekspresyonunda AD-MKH ve PDL-MKH grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0,05) gözlemlenmiştir.

3B çalışma gruplarında Boneink™ ve OFGB ile oluşturulan kültür ortamlarında AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH'lerin ALP, BMP-2 ve RUNX gen ekspresyonuna ait bulgulardaki anlamlılık seviyeleri Şekil 4.17'de gösterilmiş olup aşağıda belirtilen bulgular elde edilmiştir.



*, p< 0.05, **, p< 0.01, ***, p< 0.001

Şekil 4.17. 3B çalışma gruplarında Boneink™ ve OFGB ile kültüre edilen MKH'lerin gen ekspresyon seviyelerine ait istatistiksel kat artış grafikleri.

- ALP gen ekspresyon seviyelerinde PDL-MKH ve DP-MKH hücre hatları arasında yüksek düzeyde anlamlı fark (p<0,01) vardır.
- Hücre hatlarına ait BMP-2 gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında;
 - AD-MKH'lerin gen ekspresyon seviyeleri, DP-MKH ve PDL-MKH'ler ile karşılaştırıldığında çok yüksek seviyede anlamlı fark (p<0,001) bulunmuştur.
 - DP-MKH'ler ile PDL-MKH'lerin gen ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı fark (p<0,5) bulunmuştur.
- 3B çalışma gruplarında OFGB ile kültüre edilen hücrelerin RUNX gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde AD-MKH'lerin gen ekspresyon seviyeleri, PDL-MKH'leri ile karşılaştırıldığında yüksek seviyede anlamlı fark (p<0,01) bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Periodontal tedavinin temel hedefi olan periodontal rejenerasyonu sağlamak amacıyla zaman içerisinde pek çok tedavi yöntemi geliştirilmiş olup bu yönde çalışmalar devam etmektedir. Bu yöntemlerin her biri, kendilerine özgü avantaj ve dezavantajlara sahip olmakla birlikte hedeflenen rejeneratif tedavi için optimal sonuç henüz elde edilememiştir (Seo ve diğerleri, 2004). Bu alanda yapılan çalışmalar çoğunlukla konvansiyonel 2B ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Ancak özellikle son yıllarda, kök hücre ve doku mühendisliği alanında yapılan çalışmalar, hücrelerin 3B kültür ortamında kültüre edildiklerinde, çevrelerine daha iyi adapte olduğu, morfolojilerinin, farklılaşma derecelerinin, polaritelerinin, proliferasyon hızları ve gen ekspresyon seviyelerinin de *in vivo* koşullara benzer şekilde daha sağlıklı sonuçlar verdiğini göstermiştir (Bahmada ve diğerleri, 2020; Boccellino ve diğerleri, 2019; Lei ve diğerleri, 2021; Zorba Yıldız ve diğerleri, 2022). Konu ile ilgili yapılan bir çalışmada 3B kültür ortamlarında hücre davranışlarının *in vivo* koşullara daha çok benzerlik gösterdiği ve bu ortamda hücrelerin gen ve protein ekspresyon seviyelerinin *in vivo* ortamda elde edilen bulgularla daha uyumlu olduğunu bildirilmiştir (Zuppinger, 2019). Periodonsiyum kökenli kök hücrelerin osteojenik farklılaşma seviyelerinin değerlendirildiği başka bir çalışmada ise, 3B kültür ortamlarının osteoblast farklılaşmasını pozitif yönde etkilediği bildirilmiştir (Farrell ve diğerleri, 2007).

Periodontoloji ile kök hücre ve doku mühendisliğinin kesiştiği bir çalışmada doku iskelelerine yüklenmiş AD-MKH'lerin etkinliğinin değerlendirilmiştir. Çalışmada, hemimaksillektomi olmuş bir hastanın rectus abdominalis kasına, AD-MKH içerikli β -TCP içerikli yapı iskelesi yerleştirmiştir. İlgili bölgeden 6 ay sonra alınan biyopsinin histolojik incelemelerinde kemik morfolojisine uygun mineralize trabeküler yapıların yanı sıra osteositlerin varlığı gözlemlenmiştir. Sonrasında, alınan kemik grefti hastanın maksillasındaki defektli bölgeye yerleştirilmiş ve ilgili bölgeye implant tedavisi uygulanmıştır. Araştırmacılar yerleştirilen implatta primer stabilitenin sağlandığını bildirmişlerdir (Mesimäki ve diğerleri, 2009).

DP-MKH'lerin osteojenik farklılaşmaya etkinliğinin araştırıldığı başka bir klinik çalışmada, molar dişler çekildikten sonra çekim soketlerine DP-MKH içerikli kollajen yapı iskeleleri kompakt kemik oluşturmak hedefiyle yerleştirilmiş ve üç yıl süreyle takip edilmiştir. Takip süresi sonunda ilgili bölgelerden biyopsi örnekleri alınarak yapılan histolojik analizlerde,

rejenere kemik yapısı, lameller ile çevrili Havers kanal yapısı ve osteosit içerek alanlar gözlemlendiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Giuliani ve diğerleri, 2013).

Yapılan bir diğer klinik çalışmada da DP-MKH'lerin periodontal rejenerasyonda etkinliğinin değerlendirilmiştir. Bu amaçla periodontitis hastalarının kemik içi defektlerine DP-MKH taşıyan, mikro boyuttaki kollajen yapı iskeleleri yerleştirilmiş ve hastalar 1 yıl süreyle takip edilmiştir. Araştırmacılar çalışmanın sonucunda periodontal cep derinliğinde önemli ölçüde azalma, klinik ataçman kazanımında ise artış elde ettiklerini bildirmişlerdir (Ferrarotti ve diğerleri, 2018).

2017 yılında yapılan DP-MKH'lerin osteojenik farklılaşmaya etkinliğinin değerlendirildiği bir diğer klinik çalışmada, deney grubunda bulunan çekim soketlerine kollajen içerikli yapı iskelesi kullanılarak DP-MKH'ler nakledilmiştir. Kontrol grubunda ise sadece kollojen içerikli yapı iskelesi kullanılmıştır. İşlemden altmış gün sonra ilgili bölgelerden alınan yapılar histolojik olarak analiz edildiğinde, DP-MKH bulunan deney grubunda Havers sistemine sahip diferansiye kemik yapıları gözlemlenirken, kontrol grubunda bu dokuların eser miktarda olduğu bildirilmiştir (Monti ve diğerleri, 2017).

Diğer çalıştığımız hücre tipi olan PDL-MKH'lerle yapılmış bir klinik çalışmada da yönlendirilmiş periodontal doku rejenerasyonu (YDR) araştırılmıştır. Çalışmada PDL-MKH'ler ksenojenik greft materyali olan Bio-oss® ile kombine edilerek uygulanmıştır. Çalışmada karşılaştırma grupları PDL-MKH/ Bio-oss®/ YDR ve Bio-oss®/ YDR olarak oluşturulmuştur. Araştırmacılar her iki deney grubunda da başlangıca göre alveolar kemik yüksekliğinde anlamlı bir artış bulgulanmış olsalar da deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadığını bildirmişlerdir (Chen ve diğerleri, 2018).

Literatürde yer alan periodontal rejeneratif tedavide kök hücre uygulamalarına yönelik yapılan yapılan klinik çalışmalar az sayıdadır. Bu çalışmalara yön vermek için yapılan *in vitro* çalışmalarda özellikle 3B doku mühendisliği alanında farklı materyaller denense de altın bir standart oluşturulamıştır. Ayrıca yapılan çalışmalar genellikle AD-MKH ve DP-MKH hatları kullanılarak iki farklı hücre grubu karşılaştırılmıştır. Literatür değerlendirildiğinde PDL-MKH'lerin de yer aldığı ve diğer hücre hatlarıyla aynı anda periodontal rejeneratif tedavilerin değerlendirildiği çalışmalara rastalamamıştır. Çalışmamız literatürdeki bu eksiği kapatmak ve gelecekteki çalışmalar için bir basamak oluşturulması amacıyla planlanmıştır.

Bu amaçla çalışmamızda periodontal rejeneratif tedavide periodonsiyumdan köken alan AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH'lerin oluşturulan 2B ve 3B kültür ortamlarında osteojenik farklılaşmada etkinlikleri, alizarin red boyamaları, akım sitometri analizleri, IF boyamalar ve gerçek zamanlı PZR analizleri ile değerlendirilerek literatüre katkı sağlaması hedeflenmiştir.

Çalışmamız 2. ve 3. pasajlardaki MKH hatlarının çözünmesi ve çoğaltılmasıyla başlamıştır. MKH'lerin farklılaşma deneylerinde yüksek sayıdaki pasaj numaraları önerilmemekte olup, pasaj sayısı 20 ve üzerine çıktıkça hücrelerin *in vivo* özelliklerinde çevresel strese bağlı bozulmalar gözlemlendiği, hücrelerin kültür kabı tabanına tutunma oranında ve koloni oluşma kabiliyetlerinde azalma olduğu bildirilmiştir (Liu ve diğerleri, 2020). Ovalı ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada pasaj numarası P3-P6 arasında olan MKH'lerin en hızlı çoğalma ve farklılaşma yeteneklerine sahip olduğu bulgulanmış ve bu yüzden çalışmaların bu pasaj numaralarında yapılması tavsiye edilmiştir (Ovalı ve KTÜ-Ati Teknoloji, Laboratuarda Kök Hücre). Bu bilgiler ışığında çalışma gruplarını oluşturan hücreler P6'ya ulaştıklarında deneylere başlanılmıştır.

Son yıllarda MKH'lerin osteojenik farklılaşmasına yönelik pek çok çalışma olmasına rağmen ideal bir kültür ortamı seçimi konusunda hala fikir birliğine varılamamıştır. MKH'lerin fizyolojik özellikleri, oluşturulan kültür ortamına göre şekillenmekte olup (Corradetti ve diğerleri, 2015), bu ortamlarının oluşturulmasında yaygın olarak kullanılan besiyerleri DMEM/F12 ile yüksek veya düşük glikoz içerikli DMEM çeşitleridir (Hagmann ve diğerleri, 2013).

DMEM F12, yüksek glikoz içerikli DMEM ve düşük glikoz içerikli DMEM besiyerleri ile oluşturulmuş kültür ortamlarının osteojenik farklılaşmaya etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, 6. kültür gününde kaydedilen mikroskopik görüntülerde hücrelerin dağınık iğsi yapılar sergilemiş olmalarına rağmen 21. günde kaydedilen görüntülerde düşük glikoz ve yüksek glikoz içerikli besiyerleri ile kültüre edilen hücrelerin daha düzenli kare eşkinde morfoloji sergilendikleri bildirilmiştir (Cong ve diğerleri, 2020). Sebastien ve arkadaşlarının, yüksek glikoz içerikli DMEM, DMEM/F12 ve düşük glikoz içerikli DMEM ile kültürlen 3. pasajdaki MKH'lerinin fizyolojik özelliklerini karşılaştırdığı bir çalışmada, MKH'lerin çoğalma seviyeleri arasında anlamlı bir fark olmadığı, osteojenik farklılaşma kapasitelerinin ise yüksekten düşüğe doğru sırasıyla yüksek glikoz içerikli DMEM,

DMEM/F12 ve düşük glikoz içerikli DMEM kullanılarak oluşturulan kültür ortamlarında bulgularındığı bildirilmiştir (Hagmann ve diğerleri, 2013). Konu ile ilgili yapılan başka bir çalışmada, farklı glikoz konsantrasyonu içeren kültür ortamlarında MKH'lerin fizyolojik özellikleri incelenmiş ve 10 mmol/L glikoz içeren ortamın MKH çoğalmasını desteklediğini, yüksek konsantrasyonda glikozun (>30 mmol/L) ise MKH çoğalmasını engellediğini bildirilmiştir (Hai ve diğerleri, 2017). Çalışmalar, belirli bir aralıkta yüksek glikoz konsantrasyonuna sahip kültür ortamının, MKH'lerin çoğalma kabiliyetini etkili bir şekilde geliştirebileceğini göstermiştir (Hagmann ve diğerleri, 2013; Hai ve diğerleri, 2017).

Çalışmamızda kültür ortamları oluşturulurken, yüksek glikoz içerikli DMEM, β -gliserofosfat, askorbik asit ve deksametazon gibi çeşitli kimyasal ve büyüme faktörleri ile oluşturulan OFGB kullanılmıştır. Araştırmacılar çözeltiye eklenen β -gliserofosfatın, kültür ortamında kalsiyum fosfat birikiminde etkili olduğunu ve yapısında bulunan inorganik fosfatın, osteopontin, BMP-2 gibi birçok gen ekspresyonunu düzenlemek için sinyal ileti yolunda rol aldığını bildirmişlerdir (Bonewald ve diğerleri, 2003; Cong ve diğerleri, 2020; Tada ve diğerleri, 2011). Ayrıca çözeltiye eklenen askorbik asitin Tip 1 kollajen salgılanmasını artırarak osteojenik farklılaşmayı kolaylaştırdığı, deksametazonun ise hücre dışı matris proteinleri ile etkileşime girerek hücrelerde kalsiyum fosfat birikimini uyarmada ve RUNX geni aktivitesinde de rol oynadığı konu ile ilgili benzer çalışmalarda bildirilmiştir (Coelho ve diğerleri, 2000; Gaur ve diğerleri, 2005; Hong ve diğerleri, 2009; Khojasteh ve diğerleri, 2019; Shevchenko ve diğerleri, 1996; Si ve diğerleri, 2020).

2B osteojenik farklılaşma çalışmalarında AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH'lerin morfolojik değişimlerinde OFGB etkinliğinin belirlenmesi amacıyla, çalışma gruplarının 3, 7, 14, 21, 28. kültür günlere ait mikroskopik görüntüleri değerlendirildiğinde, KGB ve OFGB ile kültüre edilen çalışma gruplarının 3.güne ait görüntülerinde gözlemlenen iğsi yapılar, MKH'lerin morfolojik özellikleriyle uyumlu olmakla birlikte (Sun ve Karaoz 2020), elde edilen bu görüntüler osteojenik farklılaşmanın henüz başlamamış olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Çalışmamızda AD-MKH'lerde her iki besiyeri ile kültüre edilen çalışma gruplarında, 3. gün ile 28. gün arasında kaydedilen görsellerdeki farklılığın nedeninin, hücre sayısındaki artışa bağlı olarak meydana gelen yığılmalar kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. DP-MKH'lere ait mikroskopik görüntülerde KGB ile kültüre edilen çalışma gruplarında 28. güne ait görseller değerlendirildiğinde hücrelerde iğsi yapı gözlenirken; OFGB ile kültüre edilen hücrelerin morfolojik yapılarının 14. günden itibaren değişmeye

başladığı ve bu değişimin 28. günün sonunda kare şekline daha belirgin yapılara dönüştüğü tespit edilmiş ve DP-MKH'lerin OFGB ile kültüre edildiğinde osteojenik farklılaşmaya uğradığı ön sonucuna varılmıştır. PDL-MKH'ye ait görüntüler değerlendirildiğinde ise KGB kültüre edilen bazı hücrelerde de morfolojik yapının bir miktar değiştiği ve bu değişimin OFGB ile kültüre edilen PDL hücrelerine ait görüntülerle uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Osteojenik farklılaşma çalışmalarında kaydedilen bu gözlem, 2B çalışma gruplarında PDL-MKH'lerin mikroçevre değişimi olmadan da osteojenik farklılaşma yeteneğine sahip olabilecekleri yorumunu yapmamızı sağlamıştır.

Çalışma gruplarının 28. güne ait mikroskobik görüntüleri karşılaştırıldığında morfolojik farklılaşmanın en çok OFGB ile kültüre edilen PDL-MKH'lerde olduğu bulgulanmış olup bu bulgu PDL-MKH'lerin diğer hücre hatlarına göre osteojenik farklılaşma seviyesinin daha fazla olabileceği olarak yorumlanmıştır. Histolojik boyama analizlerinin sonuçları değerlendirildiğinde bu elde edilen bulgular, yorumlarımızı destekler nitelikte olmuştur.

3B çalışma gruplarında kültür ortamları hidrojeller kullanılarak oluşturulmuştur. Hidrojellerin, hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını yönlendirmek için uyarlanabilen aljinat, jelatin, kitosan, fibrin, matrijel gibi polimerler içeren yapılar oldukları (Freeman ve diğerleri, 2017) ve içeriklerine eklenen çeşitli biyokimyasallar ve biyoaktif moleküller ile osteojenik farklılaşmaya pozitif katkı sağladığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Cheng ve diğerleri, 2019; Koch ve diğerleri, 2020; Łabowska ve diğerleri, 2021). Araştırmalarda 3B kültür ortamlarını oluşturmak için genellikle suda çözünmeyen ve çapraz bağlı polimer yapılar oluşturan aljinat ve jelatin içerikli hidrojeller tercih edilmiştir (Aroguz ve diğerleri, 2014; Cidonio ve diğerleri, 2019; Eswaramoorthy ve diğerleri, 2021; Jian ve diğerleri, 2018). Araştırmacılar hidrojelin yapısındaki jelatinin, hücrelerin farklılaşmasını ve çoğalmasını destekleme potansiyeline sahip bir materyal olmasının yanı sıra kolay işlenebilir bir malzeme olmasından dolayı, 3B kültür ortamlarının oluşturulmasında bir avantaj olarak değerlendirmişlerdir (Chaicharoenaudomrung ve diğerleri, 2019; Cidonio ve diğerleri, 2019; Echave ve diğerleri, 2019). Yapılan bir araştırmada hidrojelin yapısındaki aljinatın ortamda bulunan kalsiyum varlığında yumuşak jelleşme göstererek hidrojellere dayanıklılık sağladığı ve aljinat kullanılarak oluşturulan kültür ortamlarında endotel hücrelerinin canlılık değerlerinin %83'ün üzerinde olduğunu bildirilmiştir (Dolati ve diğerleri, 2014). Konu ile ilgili yapılan güncel bir araştırmada ise aljinat ve jelatin içerikli hidrojellerin kök hücrelerde osteojenik farklılaşmaya etkisi histokimyasal analizler ve gen ekspresyon seviyelerinin

tespiti ile değerlendirilmiş ve bu hidrojellerin osteojenik farklılaşmada büyük bir role sahip olduklarını ifade edilmiştir (Eswaramoorthy ve diğerleri, 2021). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda toplamda 20 ml hacminde, çözücü olarak DMEM/F12 kullanılarak hazırlanmış aljinat ve jelatin içerikli Baseink™ ve kemik dokuya özgü içeriğe (HA eklentisine) sahip Boneink™ olarak adlandırılan iki farklı ticari hidrojel kullanılmıştır. HA, yüksek biyouyumluluğa sahip osteoindüktif bir materyal olmasından dolayı gerek rejeneratif tedavilerde gerekse ortopedi ve implantoloji cerrahilerinde sıklıkla tercih edilen bir materyaldir (Godino Izquierdo, 2020; Habibovic ve diğerleri, 2006; Yoshikawa ve Myoui 2005; Zarate-Córdova ve diğerleri, 2020). Farelerle yapılan bir çalışmada HA'nın ALP ve osteokalsin eksepsiyonunu regüle ettiği bildirilmiştir (Shu ve diğerleri, 2003). HA'nın kök hücrelerde osteoindüktif etkisinin değerlendirildiği bir başka çalışmada ise yapılan deneyler sonucunda hücrelerin eksprese ettiği BMP, ALP, COL-1 ve osteokalsin gibi çeşitli osteo-spesifik genlerin ekspresyon seviyelerinde artış olduğu bildirilmiştir (Lin, Chow ve Leng, 2009).

Alveolar kemiğin 2/3'lük kısmını inorganik maddeler oluştururken 1/3'lük kısmını organik maddeler oluşturmakta olup, inorganik komponentlerinin de yaklaşık %65'ini HA kristalleri oluşturmaktadır (Frohbergh ve diğerleri, 2012; Gallagher, 1954; Phelps ve diğerleri, 2010; Ressler ve diğerleri, 2018). Osteojenik farklılaşma çalışmalarında kullandığımız Boneink™ de, alveolar kemiğe benzer olması için, toplam karışımın hacimsel olarak %65'i HA içerikli olacak şekilde modifiye edilerek hazırlanmıştır. Çalışmamıza özgünlük katan en önemli nokta da aslında alveolar kemikteki HA oranını referans alarak belirlemiş olduğumuz HA oranıdır. Kollajen içerikli çözücülerde farklı HA oranlarının, MKH'lerin osteojenik farklılaşma etkinliklerinin değerlendirildiği 2018 yılında yayınlanan bir çalışmada; araştırmacılar ideal HA/Kollajen oranının 3:1 olduğunu bildirmişlerdir (Cheng ve diğerleri, 2018). Konu ile ilgili bir başka çalışmada ise farklı oranlarda hazırlanan HA/Jelatin karışımlarının osteojenik farklılaşma etkinlikleri değerlendirilmiştir. Araştırmacılar değerlendirilecek oranları sırasıyla 7:3, 5:5 ve 3:7 olarak belirlenmiş olup, 7:3 oranındaki deney gruplarında gözlenen MKH'lerin osteojenik farklılaşması, ALP aktivitesi, kalsiyum birikimi ve osteojenik gen ekspresyonu seviyelerinin diğer deney gruplarına oranla daha üstün olduğunu bildirilmişlerdir (Lian, Zhang ve Meng, 2018). Jackson ve diğerleri (2018) MKH'lerde osteojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi amacıyla yapmış oldukları bir çalışmada, 100/0, 90/10, 80/20, 60/40 oranlarında poliüretan (PU) ve nano-hidroksiapatit (n-HA) kompozitleri kullanılarak yapı iskeleleri tasarlamış olup, 80/20 oranında hazırlanan

kompozit yapının hücrelerin tutunması, çoğalması ve osteojenik farklılaşması için optimal ortam oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda periodonsiyum kökenli MKH'lerin osteojenik farklılaşmalarının değerlendirilmesi amacıyla 28 gün süreyle kültüre edilen çalışma gruplarına, temel histolojik analiz yöntemlerinden birisi olarak kabul edilen, alizarin red boyası uygulanmıştır. Hücrelerde kalsiyum içeren bölgelerin alizarin red boyası ile temasa girmesi sonucu elde edilen kırmızı renkli alanlar osteojenik farklılaşmanın bir belirteci olarak kabul edilmektedir ve çalışmamız sonucunda elde edilen histolojik görüntülerdeki kırmızı renkli alanlar bu literatür verileri ile uyumludur (Li ve diğerleri, 2014; Nantavisai ve diğerleri, 2020; Noda ve diğerleri, 2019; Thanasrisuebwong ve diğerleri, 2020; Zhao ve Liu 2014). Çalışmamızda Boneink™ ile oluşturulan kültür ortamlarında gözlemlenen alizarin red boyanmalarının, Baseink™ ile oluşturulan kültür ortamlarına kıyasla daha yüksek seviyede olması, HA içerikli hidrojellerin osteojenik farklılaşmaya katkısı olarak değerlendirilmiştir. Kİ-MKH'lerde osteojenik farklılaşmanın değerlendirildiği bir çalışmada, çalışma grupları 28 gün kültüre edilemiş ve 7, 14, 21 ve 28. günlerde çalışma gruplarına alizarin red boyası uygulanmış, araştırmacılar 14. günden itibaren çalışma gruplarının alizarin red ile pozitif olarak boyandığını, 21. ve 28. günlerde ise bu boyanmanın daha belirgin olduğunu bildirmişlerdir (Wang ve diğerleri, 2015). Konu ile ilgili benzer başka bir çalışmada, kollojen içerikli 3B kültür ortamında MKH'lerin osteojenik farklılaşmaları alizarin red boyaması ile değerlendirilmiş, araştırmacılar 28. günün sonunda kontrol gruplarında minimal boyanmaların gözlemlendiğini, osteojenik farklılaşma gruplarında ise yoğun ve daha büyük boyanma alanlarının gözlemlendiğini bildirmişlerdir (Donzelli ve diğerleri, 2007). AD-MKH'lerin osteojenik farklılaşmasının değerlendirildiği bir başka çalışmada ise, farklılaşma besiyeri ile kültüre edilen çalışma gruplarında 14. günün sonunda alizarin red boyanmasının gözlemlendiği bildirilmiştir (Li ve diğerleri, 2009). Kollojen ve HA içerikli 3B kültür ortamında MKH'lerin osteojenik farklılaşmalarının 8 hafta boyunca takip edildiği bir başka çalışmada ise alizarin red boyanmalarının 2. haftadan itibaren görülmeye başladığı ve 8. haftaya kadar boyanan bölgelerin arttığı bildirilmiştir (Calabrese ve diğerleri, 2016).

Çalışmamızda KGB ile hazırlanan 2B kültür ortamlarında yapmış olduğumuz histolojik analizlere ait mikroskopik görüntülerde, AD-MKH ve DP-MKH'lerde alizarin red boyanmasının olmaması ve hücrelerin kök hücrelere özgü iğsi morfolojide gözlemlenmesi, bu hücrelerde osteojenik farklılaşma olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Buna karşın KGB

ile kültüre edilen PDL-MKH'lerde gözlemlenen boyanma, hücrelerin kendi kendine osteojenik farklılaşmaya uğrayabildiğinin bir bulgusu olarak yorumlanmış olup, ı ışık mikroskobu altında kaydedilen görsellerde hücre morfolojilerindeki iğsi yapının değışmesi bu yorumumuzu destekler nitelikte olmuştur. Ayrıca OFGB ile kültüre edilen 2B çalışma gruplarında gözlemlenen alizarin red boyanması, OFGB'nin osteojenik farklılaşmaya olan olumlu etkisi olarak değerlendirilmiş, diğer çalışma gruplarına oranla daha yoğun boyanan PDL-MKH'lerde osteojenik farklılaşmanın daha yüksek seviyede olduğu düşünülmüştür.

Histolojik boyama analizlerinde, HA içermeyen 3B kültür ortamlarının osteojenik farklılaşmaya etkisinin değerlendirilmek amacıyla, diğer analizlerdeki çalışma gruplarına ek olarak KGB ve Baseink™ ile kültüre edilen çalışma grubu oluşturulmuştur. Araştırmacılar aynı amaçla yaptıkları farklılaşma çalışmalarında, 3B kültür ortamında elde edilen sonuçların 2B ortamlara kıyasla daha avantajlı olduğunu bildirmişlerdir (Reig-Vano ve diğerleri, 2021; Weigelt, Ghajar ve Bissell, 2014). Çalışmamızda KGB ve Baseink™ ile hazırlanan 3B kültür ortamında hücre morfolojilerinin, 2B çalışma gruplarında KGB ve OFGB ile hazırlanan kültür ortamlarına kıyasla daha fazla değışime uğraması, 3B kültür ortamının osteojenik farklılaşmaya katkı sağladığı yorumumuzu desteklemektedir.

KGB ve Boneink™ ile hazırlanan 3B ortamlarda kültüre edilen çalışma gruplarının alizarin red boyanmaları karşılaştırıldığında, her hücre hattında boyanma olduğu gözlemlenmiş olması, araştırmacıların da belirttiği doğrultuda HA'nın osteojenik farklılaşmayı indüklediği (Bernardo ve diğerleri, 2022; De Luca ve diğerleri, 2020; Rahmani-Moghadam ve diğerleri, 2021) ve bunun neticesinde HA kullanılarak hazırlanan hidrojelilerin osteojenik farklılaşmada etkili olduğu yorumumuza katkı sağlamıştır. Çalışmamızda elde edilen bulgulara AD-MKH'lere ait çalışma grupları kendi içlerinde değerlendirildiğinde, KGB ile kültüre edilen 2B ve Baseink™ kullanılarak oluşturulmuş 3B çalışma gruplarında alizarin boyanması gözlenmezken, KGB ve Boneink™ ile kültüre edilen çalışma gruplarında gözlemlenmiş olması bu yorumumuzu destekler niteliktedir.

Boneink™ ve KGB ile hazırlanan 3B kültür ortamında, çalışma gruplarındaki boyanmalar karşılaştırıldığında, boyanma yoğunluğu en fazla PDL-MKH'lerde gözlemlenmiş olması, hazırlanan kültür ortamında en fazla osteojenik farklılaşma gösteren hücre hattının PDL-MKH olduğu olarak yorumlanmıştır. Ayrıca Boneink™ kullanılarak oluşturulan kültür ortamlarında, PDL-MKH'lerin KGB ve OFGB ile kültüre edilen çalışma gruplarının alizarin

red boyanması kıyaslandığında ise OFGB kültüre edilen çalışma gruplarında boyanma miktarının fazla olması ise OFGB'nin hücrelerin osteojenik farklılaşma kapasitesini artırmış olabileceği yorumumuzu desteklemektedir.

Histolojik boyama analizlerinde DP-MKH'ler ve AD-MKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasitelerinin karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar benzer amaçla yaptıkları karşılaştırmalarda DP-MKH'lerin osteojenik ortama daha iyi adapte olduklarını ve daha fazla osteojenik farklılaşma gösterdiklerini bildirmişlerdir (Hosseini-Khannazer ve diğerleri, 2019; Jin ve diğerleri, 2019; Tsutsui 2020; Zhang ve diğerleri, 2018). Çalışmamızda AD-MKH ve DP-MKH'ler için elde edilen histolojik bulguların, araştırmacıların bulgularıyla uyumlu olduğu görülmüştür.

OFGB ve Boneink™ ile kültüre edilen 3B çalışma grupları arasında alizarin red boyanmasının diğer çalışma gruplarına oranla daha fazla olduğu; en fazla boyanmanın ise PDL-MKH hücre hattında olduğu gözlemlenmiştir. Araştırmacılar AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH'nin osteojenik farklılaşma kapasitelerine yönelik yaptıkları çalışmalarda alizarin red boyama bulgularını değerlendirdiklerinde DP-MKH'lerin daha fazla boyanma gösterdiklerini bildirmiş olsalar da (Abedian ve diğerleri, 2020; Venkataiah ve diğerleri, 2019), yapmış olduğumuz çalışmada en yüksek boyanma miktarı PDL-MKH hatlarında olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçları elde etmemizdeki temel faktörün hazırlanan hidrojellerdeki HA oranının %65 olması ile ilişkilendirilmiş, PDL'nin aslında iki farklı sert doku olan diş ve alveoler kemik ile olan komşuluğu olduğundan dolayı (Somerman ve diğerleri, 1990), alveolar kemiği taklit eden kültür ortamında, PDL-MKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasitesinin daha yüksek olduğu düşünülmüştür.

MKH'lerde osteojenik farklılaşma spesifik antikorların ışık mikroskobu altında verdiği florasan ışımlarla da değerlendirilmektedir. Osteoblastik hücrelerin, osteopontin, nestin, ALP ve Tip-1 kollojen gibi spesifik belirteçleri eksprese ettiği bilinmektedir (Iezzi ve diğerleri, 2019; McKee ve diğerleri, 2006). MKH'lerde yapılan bir çalışmada osteojenik farklılaşma öncesi ve sonrasında osteonektin, BMP-2 ve BMP-4 antikorlarına ait ışımlar incelenmiş olup, osteonektin ve BMP-2 antikorlarına ait elde edilen pozitif ışımlar osteojenik farklılaşma olarak değerlendirilmiştir (Sun ve Karaoz, 2020). Kİ-MKH ve DP-MKH'lerin osteojenik ve nörojenik farklılaşmalarının karşılaştırıldığı başka bir çalışmada, BMP-2 primer antikoruna ait ışımların Kİ-MKH'lerde daha yüksek seviyede olduğu bunun

yanı sıra DP-MKH'lerin nörojenik farklılaşmaya daha yatkın olduğu bildirilmiştir (Riekstina ve diğerleri, 2009).

Çalışma planımızın osteojenik farklılaşma aşamasının başlagıcında ve sonunda, 2B kültürde ve 3B ortamda jel içerisinde ve üzerindeki sferoidleri görüntüleme amacıyla çekirdekdeki DNA'yı boyayan DAPI ile işaretleme yapılarak elde edilen floresan ışımlar ışık mikroskopunda gözlenmiştir (Kapuscinski, 2009; Larsen ve diğerleri, 2012; Mohan, Yathindra ve Yathindra, 2012). 2B çalışma gruplarında 28. günün sonundaki kaydedilen görüntüler değerlendirildiğinde KGB ile kültüre edilen çalışma gruplarında AD-MKH'lerde diğer gruplara kıyasla sayıca daha çok hücrede DAPI ışıması vermesi, hücrelerin, diğer gruplarına kıyasla sayıca daha fazla çoğalmış oldukları şeklinde yorumlanmıştır. Kök hücreler kendini yenileme özellikleri ile bilindiğinden (Kalra ve diğerleri, 2014; Sun ve Karaöz, 2020), sayıca artış, AD-MKH'lerin kök hücre özelliklerini diğer gruplara göre daha çok koruduğu, başka bir deyişle, diğer grupların daha çok farklılaştığı şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmamızda osteojenik farklılaşma aşamasına geçmeden önce nestin antikoruyla ait ışımları değerlendirmek amacıyla, her ne kadar nestin proteini kemik gelişimine katkıda bulunsa da, MKH karakterizasyonunda araştırmacıların sıklıkla değerlendirdikleri bir parametre olmasıdır (Iezzi ve diğerleri, 2019; Karaöz ve diğerleri, 2010; Xie ve diğerleri, 2015). Osteojenik farklılaşma deneyleri öncesinde tüm çalışma gruplarında hemen hemen eşit seviyede kaydedilen ışımlar, hücrelerin MKH karakterizasyonu gösterdiğinin bir belirteci olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızın final karakterizasyon aşamasında yapılan IF analizlerde, OFGB ile kültüre edilen 2B çalışma gruplarında hücrelerin nestin ışıması karşılaştırıldığında AD-MKH'lerde gözlemlenen ışıma miktarı PDL-MKH'lerde gözlemlenen miktardan daha fazla olması AD-MKH'lerin göstermiş oldukları MKH özelliğinin, PDL-MKH'lerden daha yüksek seviyede olduğu ya da bir başka şekilde ifade etmek gerekirse PDL-MKH'lerin AD-MKH'lere oranla daha fazla osteojenik farklılaşma göstermeleri olarak yorumlanmıştır. Osteojenik farklılaşmanın en yüksek seviyede olması beklenen OFGB ve Boneink™ ile kültüre edilen 3B çalışma grupları da dahil olmak üzere tüm çalışma gruplarında nestin primerine ait ışımlar gözlemlenmiş olması ise kök hücrelerde mitoz bölünme sonucunda oluşan hücrelerden birinin kök hücre ile aynı özelliğe sahipken, diğerinin fonksiyonel olarak farklılaşacağı dokuya ait özellik sergilemesinden kaynaklı olabileceği ile açıklanmıştır (Kalra ve diğerleri, 2014). Ayrıca AD-MKH çalışma

grubunda elde edilen daha fazla ışımanın, bu çalışma grubunu oluşturan hücrelerin diğer gruplara oranla daha az farklılaşmış oldukları şeklinde yorumlanmıştır.

2B çalışma gruplarında KGB ile kültüre edilen hücrelerin osteojenik farklılaşma gösterip göstermediklerini kontrol etmek amacıyla, ALP, COL-1, fibronektin BMP-2, BMP4, osteopontin ve vimentin antikorlarına ait ışımlar değerlendirilmiştir. Torres ve arkadaşlarının MKH'lerin osteojenik farklılaşmaları değerlendirdikleri bir çalışmada, MKH'lerin farklılaşma sonrası osteojenik belirteç olan COL-1 ve ALP yüzey antijenlerini immünohistokimyasal analizlerle gözlemlediklerini belirtmişlerdir (Faia-Torres ve diğerleri, 2015). Çalışmamızda 2B kültür ortamında KGB ile kültüre edilen hücre hatlarında, belirtilen antikorlara ait belirgin floresan ışıma kaydedilmemiş olması, bu çalışma gruplarında osteojenik farklılaşmanın olmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Farklılaşma çalışmalarında, hücre iskeletinde ara filaman olan vimentinin IF boyamalarda ışıma vermesi, hücrelerin MKH özelliğini devam ettirdiğinin bir göstergesi olarak bildirilmiştir (Rubashkin ve diğerleri, 2014; Schroeder ve diğerleri, 2021). Çalışmamızda OFGB ile kültüre edilen 2B çalışma gruplarında ve Boneink™ ve KGB ile kültüre edilen 3B çalışma gruplarında, vimentin antikorunun yapmış olduğu ışıma miktarları değerlendirildiğinde AD-MKH'lerin hücre periferlerinde gözlemlenen bu ışımlar, osteojenik farklılaşmaya diğer çalışma gruplarına oranla daha az uğramış oldukları şeklinde değerlendirilmiştir. Boneink™ ve OFGB ile kültüre edilen çalışma gruplarında ise AD-MKH'lerin vimentin antikoruna ait ışıma vermemiş olması, bu çalışma grubunda osteojenik farklılaşmanın gerçekleşmiş olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca vimentin primerine ait ışımlar DP-MKH'lerde görülmesine rağmen PDL-MKH'lerde bu ışıma miktarının diğer hücre hatlarından daha düşük seviyede olması, PDL-MKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasitelerinin diğer hücre hatlarından daha yüksek olabileceği yorumumuzu destekler niteliktedir.

KGB ve Boneink™ ile oluşturulan 3B kültür ortamlarında, ALP primerine ait ışımların da vimentin primerine benzer şekilde olduğu bulgulanmış ve bu bulgumuzu destekler nitelikteki sonuçlar, gerçek zamanlı PZR analizlerinde 3B çalışma gruplarını oluşturan hücreler arasında ALP gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırıldığı istatistiksel analizlerde de desteklenmiştir. Yapılan her iki analizde de benzer bulguların elde edilmiş olması çalışmamızda tutarlı sonuçlar elde edildiğinin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Çalışma gruplarında değerlendirilen bir diğer antikor ise BMP-4'tür. Araştırmacılar bu antikoru adipoz dokuda adiposit farklılaşmasını desteklen bir özelliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir (Blázquez-Medela, Jumabay ve Boström, 2019). IF analizlerde elde ettiğimiz bulgularda BMP-4 antikoruna ait ışımlar değerlendirildiğinde en yüksek ışıma miktarının AD-MKH'lerde bulgulanmış olması; bunun yanı sıra BMP-2 antikoruna ait ışımlar değerlendirildiğinde ise en az ışımanın AD-MKH çalışma grubunda elde edilmesi, AD-MKH'lerin diğer çalışma gruplarına oranla osteojenik farklılaşmaya daha az uğradıklarının bir göstergesi olarak yorumlanmıştır. AD-MKH'lerde gözlemlenen yüksek ışımanın bir diğer nedeninin, hücrelerin kümeleşerek sferoid yapılar meydana getirmesi sonucu, aynı alandaki çok fazla sayıda hücrenin ışıma vermesinden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür.

OFGB ve Boneink™ ile oluşturulan kültür ortamlarında, kemiğin organik bileşeninin yapısında bulunan COL-1, OPN ve BMP-2 proteinlerine ait (McKee ve diğerleri, 2006) ışımlar değerlendirildiğinde PDL-MKH çalışma gruplarında OPN ve BMP-2 primer antikorlarına ait spesifik ışıma alanların sadece hücre içinde değil, hücre periferinde de gözlemlenmiş olması ve ışıma miktarlarının diğer çalışma gruplarına oranla daha fazla olması, PDL-MKH'lerin daha fazla osteojenik farklılaşma göstermiş oldukları şeklinde yorumlanmıştır.

IF analizlerinde 2B çalışma gruplarında elde edilen bulgular, deneyler sırasında ışık mikroskobu altında kaydedilen görüntüler ve alizarin red boyamasında elde edilen mikroskobik görüntülerle uyumlu sonuçlar vermiştir. 3B çalışma gruplarında HA içerikli hidrojel kullanılarak oluşturulan mikroçevrelerde KGB ve OFGB besiyerleri uygulanmış olup, gruplar arasındaki farklılık kullanılan besiyerlerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Çalışma planının bu şekilde oluşturulmasındaki amaç temelde iki farklı alt başlığın değerlendirilmek istenmesidir. Bunlardan birincisi osteojenik farklılaşmada HA içerikli hidrojellerle oluşturulan kültür ortamında, OFGB ile kültüre edilen hücrelerdeki osteojenik farklılaşma kapasitelerinin KGB yeri ile kültüre edilen hücrelerle karşılaştırılmak istenmesidir. Bir diğer alt başlık ise oluşturulan kültür ortamlarından hücrelerin osteojenik farklılaşma kapasitelerinin karşılaştırılmak istenmesidir. Bu değerlendirmenin sonucunda HA'nın oluşturulan kültür ortamlarında osteojenik farklılaşma'da etkili bir kültür elemanı olduğu ve PDL-MKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasitesinin diğer hücre türlerinden daha üstün olabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca KGB ve Boneink™ ile oluşturulan kültür ortamlarında PDL-MKH'lerde spesifik boyanma miktarının diğer hücre hatlarından daha

yüksek seviyede bulgulanmış olması, PDL-MKH'lerin KGB ile kültüre edilen Boneink™ içeren kültür ortamlarında daha iyi osteojenik farklılaşma potansiyeline sahip oldukları olarak yorumlanmıştır.

3B kültür ortamlarında elde edilen BMP-2, osteopontin, COL-1 antikoruna ait ışımların 2B kültür ortamına göre daha belirgin ve yüksek seviyede olması, farklılaşma çalışmalarının değerlendirilmesinde 3B kültür ortamının avantajı olarak değerlendirilmiştir (Chan ve diğerleri, 2021; Zeng ve diğerleri, 2021). IF analizlerde elde edilen bu sonuçlar osteojenik farklılaşmanın incelenmesi için çalışma kapsamında yapılan diğer analizlerin bulguları ile uyumludur.

Çalışmamızda mezenkimal kök hücrelerin tanımlanabilmesi ve osteojenik farklılaşmalarının değerlendirilmesi amacıyla uygulanan bir diğer analiz yöntemi ise akım sitometri analizleridir. Araştırmacılar farklılaşma çalışmalarında, çalıştıkları hücrelerin MKH olduğunu doğrulamak ve çalışma sonucunda hücrelerde meydana gelen farklılaşmaları değerlendirmek amacıyla bu yöntemi uyguladıklarını bildirmişlerdir (Baer ve diğerleri, 2013; Iwasaki ve diğerleri, 2019; Yasui ve diğerleri, 2016).

Yapılan bir çalışmada CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49d, CD59, CD106, CD146, CD166 gibi yüzey belirteçlerinin pozitifliğinin periodonsiyum kökenli kök hücrelerin karakterizasyonu için kullanılabileceği belirtilmiştir (Seo ve diğerleri, 2015). Konu ile ilgili başka bir çalışmada CD90, CD105, STRO-1 ve Scleraxis yüzey belirteçlerinin PDL-MKH karakterizasyonunda değerlendirilebileceği belirtilmiştir (Shi ve diğerleri, 2005). Diş eti ve PDL kökenli MKH kaynaklarının osteojenik ve kondrojenik farklılaşmalarının değerlendirildiği bir çalışmada akım sitometri analizleri ile yapıldan değerlendirmelerde bu hücrelerin, CD105, CD146, CD90, CD29 ve CD73 MKH yüzey belirteçlerini eksprese ettikleri belirtilmiştir (Yu ve diğerleri, 2015). Osteojenik farklılaşma çalışmalarına başlamadan önce yapmış olduğumuz akım sitometri analizleri, hücrelerin kök hücre karakterini göstermek amacıyla yapılmış olup elde edilen veriler, çalışmamızda kullanılan hücrelerin MKH karakteri gösterdiğini doğrulamaktadır. Ayrıca bu veriler, 2B kültür ortamlarında yapılan çalışmalarının sonunda elde edilen verilerle karşılaştırılarak osteojenik farklılaşma da değerlendirilmiştir.

Osteojenik farklılaşma aşamasında, KGB ile kültüre edilen 2B çalışma grubunu oluşturmadaki amacımız, kök hücrelerin spontan farklılaşma yönündeki eğilimlerinin değerlendirilerek 28 günlük kültür süreleri boyunca gerçekleşen osteojenik farklılaşma oranı için bir taban oluşturmaktır. Aynı yöntemin uygulandığı benzer bir çalışmada farklı pasaj numaralarına sahip MKH'lerin yüzey belirteç ekspresyonları değerlendirilmiş, CD73, CD90 ve CD105 ekspresyonu açısından pozitif; CD45, CD34, CD19 ve HLA-DR molekül ekspresyonu açısından negatif bulgular elde edildiği bildirilmiştir. Araştırmadaki bu veriler, kök hücrelerin pasaj numarası ilerlemesine rağmen karakteristik özelliklerini korumaya devam ettirdiği şeklinde yorumlanmıştır (Çiçek ve diğerleri, 2017). Konu ile yapılan bir başka çalışmada farklı kaynaklardan türetilen MKH'ların kendini yenileme osteojenik farklılaşma kapasiteleri değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda SD-MKH'lerin PDL-MKH ve AD-MKH'lere oranla daha yüksek seviyede mRNA ekspresyonu göstermesine rağmen tüm hücrelerin eksprese ettikleri yüzey belirteçleri karşılaştırıldığında benzer ekspresyon seviyeleri bulgulandığı bildirilmiştir (Trivanović ve diğerleri, 2015). Çalışmamızda AD-MKH ve DP-MKH gruplarının çalışma başlangıcında değerlendirilen CD90 ve CD105 değerlerinin %95 seviyesinin altında bulgulanması dondurulup çözünme işlemleri sonrası hücrelerin ortama adepte olamasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Bu hücre hatlarının 28 gün KGB ile kültüre edilmesinden sonraki CD90 ve CD105 değerlerinin, Uluslararası Kök Hücre Araştırma Komitesinin belirttiği referans aralığında pozitif seviyede kalması, bu hücrelerin 2B ortamda MKH özelliklerini devam ettirmekte olduğu göstermektedir. Ayrıca, AD-MKH ve DP-MKH'lerde KGB ile kültüre edilen çalışma gruplarında 28 gün sonunda yapılan analizlerde pozitif yüzey belirteçlerinin yaklaşık %95 seviyelerinde olması, bu hücrelerde spontan gerçekleşen osteojenik farklılaşmanın minimal düzeyde olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Buna karşın PDL-MKH grubunda CD90 belirtecinde düşüş görülmesi, bu hücrelerin spontan olarak osteojenik farklılaşmaya başladığı şeklinde yorumlanmıştır. Bu sonuçlar, ışık mikroskobu ile çekilen fotoğraflar ve histolojik analizlerde alizarin red boyaması ile elde edilen görüntüler ile de uyumlu şekilde osteojenik farklılaşmaya işaret etmektedir.

Araştırmacılar, farklı kültür ortamlarında MKH'lerin yüzey belirteçlerinde oransal olarak meydana gelen pozitif yüzey belirteçlerindeki (CD90, CD73, CD105, CD44) azalışı osteojenik farklılaşma olarak değerlendirmişlerdir (Bonab ve diğerleri, 2006; Çiçek ve diğerleri, 2017; Riekstina ve diğerleri, 2009). Çalışmamızda OFGB ile hazırlanan çalışma grubuna ait veriler değerlendirildiğinde; CD73 yüzey belirteci her üç hücre hattı için de

pozitif seviyede ölçülmüşken CD90 ve CD105 değerleri pozitif olarak değerlendirilen %95 seviyesinin altında ölçülmüştür. Bu ölçüm araştırmacıların bildirdikleri sonuçlarla uyumlu olup, OFGB ile kültüre edilen MKH'lerin farklılaştığının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir(Hakki ve diğerleri, 2017; Mrozik ve diğerleri, 2013; Zhang ve diğerleri, 2018). Ayrıca karşılaştırılan hücre hatları arasında CD90 ve CD105 yüzey belirteç miktarlarındaki en büyük azalma ise PDL-MKH'lere ait çalışma gruplarında gözlenmiştir. Yüzey belirteçlerindeki azalma miktarına bakılarak yapılan sıralamayı PDL-MKH'den sonra DP-MKH takip etmekte olup, belirlenen en küçük azalma oranı AD- MKH'lerde gözlemlenmiştir. Bu gözlem sonucunda ise OFGB ile kültüre edilen MKH'lerdeki osteojenik farklılaşmalar değerlendirildiğinde AD-MKH'lere kıyasla DP-MKH ve PDL-MKH'lerde daha fazla osteojenik farklılaşma olduğu şeklinde yorumlanmış olup, PDL-MKH'lerin bu üç hücre grubu arasında osteojenik farklılaşma kapasitesinin en yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda 2B ve 3B kültür ortamlarında oluşturulan çalışma gruplarının ve çalışma gruplarını oluşturan her bir hücre hattının, osteojenik farklılaşmaya özgü gen/protein ekspresyon seviyelerinin değerlendirmesi amacıyla, gerçek zamanlı PZR analizi yapılmış, elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek literatür ile karşılaştırılmıştır.

Araştırmacılar 3B kültür ortamında kullanılan hidrojellerin, ekstrasellüler matriks benzeri bir ortamı taklit edebilen yapılar olmasından dolayı, MKH'lerin osteojenik farklılaşmasına yönelik yapılan PZR analizlerinde 3B kültür ortamında elde edilen sonuçların daha nitelikli olduğu ve klinik uygulanabilirliği artırdığını bildirilmişlerdir (Caló ve Khutoryanskiy, 2015; Kirsch ve diğerleri, 2021; Moritani ve diğerleri, 2018). Osteoporoz tedavisi için yapılan bir araştırmada osteojenik farklılaşma için oluşturulan valproik asit içerikli kültür ortamlarının, MKH'lerin osteopontin, RUNX ve BMP-2 gen ekspresyon seviyelerini artırdığı gerçek zamanlı PZR analizi sonuçları ile bildirilmiştir (Cho ve diğerleri, 2005).

Çalışmamızda kullanılan hücre hatlarının ALP, BMP ve RUNX gen ekspresyon seviyeleri literatür ile karşılaştırıldığında araştırmacıların bildirmiş olduğu bulguları destekler niteliktedir (Cho ve diğerleri, 2005; Kirsch ve diğerleri, 2021; Moritani ve diğerleri, 2018).

DP-MKH ve KI-MKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasitelerinin karşılaştırılması amacıyla yapılmış bir çalışmada kültür ortamları Bio-oss materyali kullanılarak oluşturulmuş ve

gerçek zamanlı PZR yöntemi ile RUNX2, ALP ve osteokalsin gibi osteojenik genlerin ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda DP-MKH'lerin RUNX ve osteokalsin genlerini Kİ-MKH'lere göre daha yüksek düzeylerde eksprese ettiği bildirilmiştir (Lee ve diğerleri, 2019). Yapılan başka bir çalışmada periodontitis hastalık modelinde PDL-MKH'lerin osteojenik farklılaşmasının değerlendirilmiş, RUNX2 ile istatistiksel bir korelasyon bulunurken, ALP ve osteokalsin ile bulunamadığı bildirilmiştir (Xu ve diğerleri, 2019). MKH'lerin osteojenik farklılaşmasına yönelik Meshram ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, bukkal yağ dokusundan elde edilen AD-MKH'lerin ALP eksprese ettiklerini ve osteojenik farklılaşma seviyelerinin anlamlı olduğunu bildirilmiştir (Meshram ve diğerleri, 2019). Genova ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir başka çalışmada ise, AD-MKH'ler ile DP-MKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasitelerini karşılaştırmak amacıyla gerçek zamanlı PZR yöntemi ile RUNX2, COL-1 ve ALP gen ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda her iki grupta bu osteojenik genleri yüksek seviyelerde eksprese ederken, AD-MKH'lerin COL-1 ve ALP genlerini, DP-MKH'lere oranla daha fazla eksprese ettiğini bildirmişlerdir (Genova ve diğerleri, 2021).

Çalışmamızda yapılmış olan akım sitometri, histolojik boyama ve IF boyama analiz yöntemlerine ait bulgulara AD-MKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasitelerinin DP-MKH ve PDL-MKH'lere oranla daha düşük seviyede oldukları gözlemlenmiş olmasına rağmen gerçek zamanlı PZR analizinde AD-MKH'lerin BMP-2 ve RUNX genlerini daha yüksek seviyede eksprese ettikleri belirlenmiştir. Bu bulguları yorumlamak için yapılan literatür araştırmalarında 2 temel başlık ön plana çıkmıştır. Bunlardan birincisi post transkripsiyonel modifikasyon (PTM) iken diğeri mikroRNA'ların (miRNA) osteojenik farklılaşmadaki etkilerinden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. HA içerikli kültür ortamlarında MKH'lerin osteoblastlara farklılaşmasına yönelik yapılan çalışmalarda, spesifik gen ekspresyonlarının kültür ortamındaki osteoblastların canlılıklarının bir belirteci olsa da bu osteoindüktif aktivitenin göstergesi olmadığı ifade edilmiş ve osteojenik farklılaşma değerlendirilirken hücrelerin gen ekspresyon miktarlarından ziyade, eksprese edilen genlerin osteojenik olarak anlamlı proteinlere dönüşüp dönüşmediklerinin değerlendirilmesi gerektiği bildirilmiştir. Bu amaçla proteinlerin biyo-sentezlendikten hemen sonra genellikle enzimatik modifikasyonu değerlendirmek amacıyla PTM incelenmesi gerektiğini bildirmişleridir (Lin ve diğerleri, 2009; Chou ve diğerleri, 2020). Stein ve arkadaşlarının MKH'lerin osteojenik farklılaşmasında RUNX ekspresyon seviyelerini değerlendirdikleri bir çalışmada,

MKH'lerin osteoblast öncüsü hücrelerin oluşumu ve olgunlaşmamış osteoblastların oluşum aşamasına kadar olan periyotta RUNX ekspresyon seviyelerinin yüksek düzeyde olduklarını; olgun osteoblastların ve osteositlerin oluşum periyodunda ise RUNX ekspresyon seviyelerinin düştüğünü bildirmişlerdir (Stein ve diğerleri, 2004). Çalışmamızda, RUNX ekspresyonu DP-MKH ve PDL-MKH'lerde AD-MKH'ye göre daha düşük bulunmuştur. Bu durum Stein ve arkadaşları tarafından belirtildiği şekilde, ilk iki grubun farklılaşmanın öncül aşamalarını tamamlayıp olgun kemik hücreleri oluştururken, AD-MKH grubunun osteojenik farklılaşmaya daha geç başlayıp, çalışmanın sonlandırıldığı 28. günde RUNX'in yüksek düzeyde eksprese edildiği erken osteojenik farklılaşma döneminde olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Gruplar arasındaki gen ekspresyon farklılıklarını açıklayacak bir diğer neden de mRNA'ların proteine dönüştürülmesinde rol alan bir kontrol mekanizması olan miRNA'lardır. Küçük RNA dizileri olan miRNA'lar MKH'lerin kendini yenilemesi ve farklılaşmasında da büyük öneme sahiptirler (Cai ve diğerleri, 2009). Farklılaşma deneylerinde miRNA'ların görevi bir veya daha fazla hedef geni ve sinyal yollarını düzenlemektir (Ye ve diğerleri, 2008). DP-MKH ve PDL-MKH'lerin kök hücre özelliğinin devamlılığı ve farklılaşmasından sorumlu olan NANOG geninin düzenlenmesinde miR-720'nin etkili olduğunu bildirilmiştir (Hara ve diğerleri, 2013). DP-MKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasiteleirinin değerlendirildiği bir başka çalışmada ise miR-720'nin MKH'lerin çoğalma kapasitesi azalttığı fakat bunun yanı sıra odontojenik farklılaşma kapasitesini artırdığı bildirilmiştir (Mazziotta ve diğerleri, 2021). Sun ve arkadaşları tarafından DP-MKH'lerde yapılan bir başka çalışmada miR-34a'nın son derece aktif olan Notch yolağını inhibe ederek, bu hücrelerdeki osteojenik ve odontojenik farklılaşmaya pozitif yönde katkı sağladığı bildirilmiştir (Sun ve diğerleri, 2014). DP-MKH'lerin odontoblastlara farklılaşmasının *in vitro* kültür ortamında değerlendirildiği farelerle yapılmış olan bir çalışmada ise miR-145 ve miR-143'ün odontoblast farklılaşmasını düzenlediği bildirilmiştir (Chen ve diğerleri, 2009). PDL-MKH'lerin osteojenik farklılaşmasında miRNA etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada miRNA 17 ve miR-218 seviyelerinde azalış olduğu bunun yanı sıra RUNX gen ekspresyon seviyesinde artış olduğu bildirilmiştir (Guo ve diğerleri, 2008).

Çalışmamızda 2B çalışma grubunda KGB ile kültüre hücrelerin ALP, BMP-2 ve RUNX genlerine ait ekspresyon seviyelerinin, OFGB ile kültüre edilen hücrelerle

karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğu belirlenmiştir. Araştırmacıların bildirmiş oldukları sonuçlar da göz önüne alındığında elde ettiğimiz gerçek zamanlı PZR sonuçlarındaki uyumsuzluğun, çalışma grupları arasında osteojenik farklılaşma hızlarındaki değişkenlik, miRNA aktivitesi veya post transkripsiyonel modifikasyonlardan kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Elde edilen bu bulgu MKH'lerin osteojenik farklılaşmasına yönelik ilerleyen çalışmalarımızda miRNA'ların ve post transkripsiyonel modifikasyonların incelenmesi için yeni bir araştırma penceresi açmıştır.

Çalışmamızın limitasyonları aşağıda belirtilmiştir;

1. 2B çalışma gruplarına ait IF boyama analizlerinde 28 günlük deneylerin sonunda KGB ile kültüre edilen çalışma gruplarında görüntü elde edilemediği için bu grup çalışmaya konmamıştır.
2. 3B kültürlerdeki akım sitometri analizleri, kültür ortamında kullanılan hidrojenlerin polimerik yapısının ve oluşan hücre sferoidlerinin, akım sitometri cihazının kapiller sisteminden geçemeyecek olması nedeniyle gerçekleştirilememiş, sadece 2B örneklerde analiz yapılmıştır.
2. Baseink™ hidrojeni kullanılarak oluşturulan kültür ortamı sadece histolojik boyamalarda analiz edilmiştir. Bu çalışma grubu gelecekte yapılması planlanan çalışmalar için ön değerlendirme yapmak amacıyla oluşturulmuş olup tez çalışmasındaki diğer analiz yöntemlerinde kullanılmamıştır.
3. 3B çalışma gruplarının deneysel aşamasında, özellikle HA içerikli hidrojenlerden izole edilen RNA'ların saflığı, HA kristallerinin varlığı nedeniyle düşük olabilmektedir. Bu durum gerçek zamanlı PZR analizleri için sınırlayıcı bir etken olarak ortaya çıkmaktadır. Bu konunun çözümü ve RNA saflığının artırılması için ek çalışmalar gereklidir.

6. SONUÇ

Periodontal rejeneratif tedavide MKH kullanımı ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızda AD-MKH, DP-MKH ve PDL-MKH'lerin 2B ve 3B kültür ortamında osteojenik farklılaşma kapasiteleri değerlendirilmiştir. 3B kültür ortamında kullanılan %65 HA içerikli hidrojel çalışmamızı özgün kılan bir kriterdir.

Değerlendirme amacıyla çalışma gruplarına alizarin red boyamaları, IF boyamalar, akım sitometri analizleri ve gerçek zamanlı PZR analizleri yapılmıştır. Elde edilen bulgular göz önüne alınarak, aşağıda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir;

1. Çalışmamızda OFGB ile kültüre edilen çalışma gruplarında bulgularan alizarin red boyamaları, akım sitometri analizlerinde elde edilen MKH'lere özgü pozitif yüzey belirteçlerinde yüzdesel oranda meydana gelen azalma ve gerçek zamanlı PZR BMP-2, RUNX gibi genlerin ekspresyon seviyelerindeki artış OFGB etkinliğinin göstergesi olarak yorumlanmıştır.
2. OFGB ile oluşturulan 2B kültür ortamlarında alizarin red boyamaları, IF boyalamalar ve akım sitometri analizleri değerlendirildiğinde en yüksek osteojenik farklılaşma miktarı PDL-MKH'lerde gözlemlenmiştir.
3. %65 oranında HA kullanılarak oluşturulan hidrojel ile kültüre edilen PDL-MKH'lerin, osteojenik farklılaşma seviyesi diğer hücre hatlarından daha yüksek seviyede olduğu bulgulanmıştır.
4. Periodonsiyum kökenli MKH'lerin, HA içeren 3B kültür ortamında, osteojenik farklılaşmayı indükleyecek bir besiyeri kullanılmasa da osteojenik farklılaşmaya uğradıkları gözlemlenmiştir.
5. Gerçek Zamanlı PZR analizlerinde osteojenik farklılaşmaya yönelik genlerin 3B kültür ortamında 2B ortama göre çok daha yüksek oranlarda eksprese edildiği gözlenmiştir. Bu durum 3B kültür ortamının osteojenik farklılaşmaya pozitif etkisini göstermektedir.
6. AD-MKH'lerde OFGB ya da HA'lı hidrojellerle ile kültüre edildiğinde gen ekspresyon seviyesi yüksek çıkması çalışmamızdaki diğer analizlerde elde edilen bulgularla çelişmektedir. Bu bulgunun nedeninin araştırmak için ilerideki çalışmalarda miRNA aktivitelerinin değerlendirilmesi düşünülmektedir.

Çalışmamız sınırları dâhilinde, bir bütün olarak değerlendirildiğinde; elde edilen en önemli noktası, periodonsiyum tedavilerinde kullanılmak üzere yapay kemik doku oluşturmaya yönelik *in vitro* çalışmalarda HA içeren üç boyutlu kültür ortamının konvansiyonel iki boyutlu kültür ortamına kıyasla çok daha avantajlı olduğunu ortaya koymasındır. Analizlerimiz bu amaçla kullanılabilecek en uygun hücre tipinin ise PDL-MKH olduğunu göstermiştir.

Tez çalışmamızın sonunda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, çalışmamızın bir sonraki aşaması olarak MKH destekli periodontal rejeneratif tedavide HA içerikli hidrojelin hayvan deneyleri ve elde edilen bulgular eşliğinde klinik çalışmalar ile değerlendirilmesi hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

- Abedian, Z., Jenabian, N., Moghadamnia, A. A., Zabihi, E., Pourbagher, R., Hossein-Nataj, H., and Mohamadnia-Afrouzi, M. (2020). A comparative study on immunophenotypic characterization and osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells derived from periodontal ligament and gingiva. *Journal of Periodontology*, 91(9), 1194–1202. doi: 10.1002/JPER.19-0535.
- Abukawa, H., Shin, M., Williams, W. B., Vacanti, J. P., Kaban, L. B., and Troulis, M. J. (2004). Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 62(5), 601-606. doi: 10.1016/j.joms.2003.11.010.
- Akguner, Z. P. (2021). *Kök hücre yüklü ipek fibroin-temelli nanohibrit kemik dokuiskelelerinin geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Akita, D., Kano, K., Saito-Tamura, Y., Mashimo, T., Sato-Shionome, M., Tsurumachi, N., Yamanaka, K., Kaneko, T., Toriumi, T., Arai, Y., Tsukimura, N., Matsumoto, T., Ishigami, T., Isokawa, K., and Honda, M. (2016). Use of rat mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells as a cell source for periodontal tissue regeneration. *Frontiers in Physiology*, 7, doi: 10.3389/FPHYS.2016.00050.
- Almalki, S. G., and Devendra K. A. (2016). Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 92(1–2), 41–51. doi: 10.1016/J.DIFF.2016.02.005.
- Alsaeedi, H. A., Lam, C., Koh, A. E.-H., Teh, S. W., Mok, P. L., Higuchi, A., Subbiah, S. K. (2019). Looking into dental pulp stem cells in the therapy of photoreceptors and retinal degenerative disorders. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 203, 111727. doi: 10.1016/J.JPHOTOBIO.2019.111727.
- Andrukhov, O., Hong, J. S. A., Andrukhova, O., and Blufstein, B. (2017). Response of human periodontal ligament stem cells to IFN- γ and TLR-agonists. *Scientific Reports*, 7(1), 1-8.
- Annunziata, M., Oliva, A., Buonaiuto, C., Di Feo, A., Di Pasquale, R., Passaro, I., and Guida, L. (2005). In vitro cell-type specific biological response of human periodontally related cells to platelet-rich plasma. *Journal of Periodontal Research*, 40(6), 489–495. doi: 10.1111/j.1600-0765.2005.00828.x.
- Aras, Y., Akin Sabanci, P., Kabatas, S., Duruksu, G., Subasi, C., Erguven, M., and Karaoz, E. (2015). The effects of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation during the acute and subacute phases following spinal cord injury. *Turkish Neurosurgery*, 26(1), 127–139. doi: 10.5137/1019-5149.JTN.15724-15.0.
- Aroguz, A. Z., Baysal, K., Adiguzel, Z., and Baysal, B. M. (2014). Alginate/polyoxyethylene and alginate/gelatin hydrogels: preparation, characterization, and application in tissue engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(2), 433–448. doi: 10.1007/S12010-014-0851-0/FIGURES/14.

- Asutay, F., Polat, S., Gül, M., Subaşı, C., Kahraman, S. A., and Karaöz, E. (2015). The effects of dental pulp stem cells on bone regeneration in rat calvarial defect model: micro-computed tomography and histomorphometric analysis. *Archives of oral biology*, 60(12), 1729-1735.
- Asutay, F., Polat, S., Gül, M., Subaşı, C., Kahraman, S. A., and Karaöz, E. (2015). The effects of dental pulp stem cells on bone regeneration in rat calvarial defect model: Micro-computed tomography and histomorphometric analysis. *Archives of Oral Biology*, 60(12), 1729–1735. doi: 10.1016/J.ARCHORALBIO.2015.09.002.
- Atalayın, Ç., Ergücü, Z., and Tezel, H. (2012). Diş hekimliğinde kök hücre ve dental pulpa kök hücreleri. *GÜ Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 29(2), 115-120.
- Atashi, F., Modarressi, A., and Pepper, M. S. (2015). The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: A review. *Stem Cells and Development*, 24(10), 1150–1163. doi: 10.1089/SCD.2014.0484.
- Aydin, S., and Şahin, F. (2019). Stem cells derived from dental tissues. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1144, 123–132. doi: 10.1007/5584_2018_333.
- Baer, P. C., Kuçi, S., Krause, M., Kuçi, Z., Zielen, S., Geiger, H., Schubert, R. (2013). Comprehensive phenotypic characterization of human adipose-derived stromal/stem cells and their subsets by a high throughput technology. *Stem Cells and Development*, 22(2), 330–339. doi: 10.1089/scd.2012.0346.
- Bahmada, H. F., Elajami, M. K., Daouk, R., Jalloul, H., Darwish, B., Chalhoub, R. M., Assi, S., Chamaa, F., and Abou-Kheir, W. (2020). Stem cells: In sickness and in health. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 15. doi: 10.2174/1574888X15999200831160710.
- Bajek, A., Gurtowska, N., Olkowska, J., Maj, M., Zmierski, L. K., Bodnar, M., Andrzej Marszałek, Dę, R., and Drewa, T. (2017). Does the harvesting technique affect the properties of adipose-derived stem cells?-The comparative biological characterization. *J. Cell. Biochem*, 118(5), 1097–1107. doi: 10.1002/jcb.25724.
- Baker, B. M., and Chen, C. S. (2012). Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science*, 125(13), 3015–3024. doi: 10.1242/JCS.079509.
- Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A., and Clark, B. J. (2005). GAPDH as a housekeeping gene: Analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological Genomics*, 21, 389–95. doi: 10.1152/PHYSIOLGENOMICS.00025.2005/SUPPL_FILE/GAPDH_EXPRESSION_TABLES_SUPPLEMENTAL.PDF.
- Bartold, P. M., Christopher, A. G., McCulloch, A., Narayanan, S., and Pitaru, S. (2000). Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontology 2000*, 24(1), 253–269. doi: 10.1034/j.1600-0757.2000.2240113.x.

- Becker, A. J., McCulloch, E. A., and Till, J. E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 197(4866), 452–454. doi: 10.1038/197452a0.
- Berbéri, A., Al-Nemer, F., Hamade, E., Noujeim, Z., Badran, B., and Zibara, K. (2017). Mesenchymal stem cells with osteogenic potential in human maxillary sinus membrane: An in vitro study. *Clinical Oral Investigations*, 21(5), 1599–1609. doi: 10.1007/S00784-016-1945-6/FIGURES/9.
- Bernardo, M. P., da Silva, B. C. R., Hamouda, A. E. I., de Toledo, M. A. S., Schalla, C., Rütten, S., Goetzke, R., Mattoso, L. H. C., Zenke, M., Sechi, A. (2022). PLA/hydroxyapatite scaffolds exhibit in vitro immunological inertness and promote robust osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells without osteogenic stimuli. *Scientific Reports*, 12(1), 1–15. doi: 10.1038/s41598-022-05207-w.
- Bilic, J., and Belmonte, J. C. I. (2012). Concise review: induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: close enough or yet too far apart?. *STEM CELLS*, 30(1), 33–41. doi: 10.1002/stem.700.
- Blázquez-Medela, A. M., Jumabay, M., and Boström, K. I. (2019). Beyond the bone: Bone morphogenetic protein signaling in adipose tissue. *Obesity Reviews*, 20(5), 648. doi: 10.1111/OBR.12822.
- Boccellino, M., Di Stasio, D., Dipalma, G., Cantore, S., Ambrosio, P., Coppola, M., Quagliuolo, L., Scarano, A., Malcangi, G., Borsani, E., Rinaldi, B., Nuzzolese, M., Xhajanka, E., Ballini, A., Inchingolo, F., Di Domenico, M. (2019). Steroids and growth factors in oral squamous cell carcinoma: Useful source of dental-derived stem cells to develop a steroidogenic model in new clinical strategies. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(20), 8730–8740. doi: 10.26355/EURREV_201910_19267.
- Bonab, M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S., Ghavamzadeh, A., and Nikbin, B. (2006). *BMC Cell Biology*, 7(1), 14. doi: 10.1186/1471-2121-7-14.
- Bonewald, L. F., Harris, S. E., Rosser, J., Dallas, M. R., Dallas, S. L., Camacho, N. P., Boskey, A. (2003). Von kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcified Tissue International*, 72(5), 537–547. doi: 10.1007/s00223-002-1057-y.
- Bongso, A., and Richards, M. (2004). History and perspective of stem cell research. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 18(6), 827–842. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2004.09.002.
- Breslin, S., and O'Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today* 18(5–6), 240–49. doi: 10.1016/J.DRUDIS.2012.10.003.
- Cai, Y., Yu, X., Hu, S., and Yu, J. (2009). A brief review on the mechanisms of mirna regulation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 7(4), 147–154. doi: 10.1016/S1672-0229(08)60044-3.

- Calabrese, G., Giuffrida, R., Fabbi, C., Figallo, E., Lo Furno, D., Gulino, R., Forte, S. (2016). Collagen-hydroxyapatite scaffolds induce human adipose derived stem cells osteogenic differentiation in vitro. *PLOS ONE*, 11(3), e0151181. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0151181.
- Caló, E., and Khutoryanskiy, V. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65, 252–267. doi: 10.1016/J.EURPOLYMJ.2014.11.024.
- Can, A. (2008). A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turk J Hematol*, 25, 57-59.
- Carranza, F. A., McClain, P. K., and Schallhorn, R. G. (2002). Regenerative osseous surgery. *Clinical Periodontology*, 9, 804-824.
- Chaicharoenaudomrung, N., Kunhorm, P., and Noisa, P. (2019). Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. *World Journal of Stem Cells* 11(12), 1065. doi: 10.4252/WJSC.V11.I12.1065.
- Chang, P.-H., Chao, H.-M., Chern, E., and Hsu, S. (2020). Chitosan 3D cell culture system promotes naïve-like features of human induced pluripotent stem cells: A novel tool to sustain pluripotency and facilitate differentiation. *Biomaterials*, 268, 120575. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120575.
- Chen, F. M., Gao, L. N., Tian, B. M., Zhang, X. Y., Zhang, Y. J., Dong, G. Y., Lu, H., Chu, Q., Xu, J., Yu, Y., Wu, R. X., Yin, Y., Shi, S., and Jin, Y. (2018). Correction to: Treatment of periodontal intrabony defects using autologous periodontal ligament stem cells: A randomized clinical trial. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1). doi: 10.1186/S13287-018-1000-4.
- Chen, S., J. Gluhak-Heinrich, Y. H. Wang, Y. M. Wu, H. H. Chuang, L. Chen, G. H. Yuan, J. Dong, I. Gay, and M. MacDougall. (2009). Runx2, Osx, and Dspp in Tooth Development. *Journal of Dental Research* 88(10), 904–909. doi: 10.1177/0022034509342873.
- Cheng, H., Chabok, R., Guan, X., Chawla, A., Li, Y., Khademhosseini, A., and Jang, H. L. (2018). Synergistic interplay between the two major bone minerals, hydroxyapatite and whitlockite nanoparticles, for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia*, 69, 342–351. doi: 10.1016/J.ACTBIO.2018.01.016.
- Cheng, L., Yao, B., Hu, T., Cui, X., Shu, X., Tang, S., Huang, S. (2019). Properties of an alginate-gelatin-based bioink and its potential impact on cell migration, proliferation, and differentiation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 1107–1113. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2019.06.017.
- Cho, H. H., Park, H. T., Kim, Y. J., Bae, Y. C., Suh, K. T., and Jung, J. S. (2005). Induction of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by histone deacetylase inhibitors. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96(3), 533–542. doi: 10.1002/JCB.20544.

- Chou, K. C. (2020). Progresses in predicting post-translational modification. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(2), 873–88. doi: 10.1007/S10989-019-09893-5/TABLES/3.
- Cidonio, G., Glinka, M., Dawson, J. I., and Oreffo, R. O. C. (2019). The cell in the ink: Improving biofabrication by printing stem cells for skeletal regenerative medicine. *Biomaterials*, 209, 10–24.
- Coelho, M., Trigo Cabral, A., and Fernandes, M. (2000). Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in α -MEM and in DMEM. *Biomaterials*, 21(11), 1087–1094. doi: 10.1016/S0142-9612(99)00284-7.
- Cong, Z., Ming-Ming, G., Ben-Wen, W., Na-Na, C., Huang, G., and Zhen-Qi, D. (2020). Comparison and optimization: Different medium and a novel scheme for rabbit bone marrow mesenchymal stem cells culture. doi: 10.21203/rs.3.rs-93190/v1.
- Corradetti, B., Taraballi, F., Powell, S., Sung, D., Minardi, S., Ferrari, M., Tasciotti, E. (2015). Osteoprogenitor cells from bone marrow and cortical bone: understanding how the environment affects their fate. *Stem Cells and Development*, 24(9), 1112–1123. doi: 10.1089/SCD.2014.0351.
- Cortellini, P., Prato, G. P., and Tonetti, M. S. (1993). Periodontal regeneration of human infrabony defects. I. Clinical measures. *Journal of Periodontology*, 64(4), 254–260. doi: 10.1902/jop.1993.64.4.254.
- Cuevas, A., Febrero, M., and Fraiman, R. (2004). An anova test for functional data. *Computational Statistics & Data Analysis*, 47, 111–22. doi: 10.1016/j.csda.2003.10.021.
- Çiçek, G. (2017). *Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre kültürlerinde hücre yüzey markırlarının immunositokimyasal değerlendirmesi*. Tıpta Uzmanlık Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Konya.
- D'Aquino, R., De Rosa, A., Lanza, V., Tirino, V., Laino, L., Graziano, A., Desiderio, V., Laino, G., and Papaccio, G. (2009). Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *European Cells & Materials*, 18, 75–83. doi: 10.22203/ECM.V018A07.
- D'Aquino, R., Graziano, A., Sampaolesi, M., Laino, G., Pirozzi, G., De Rosa, A., and Papaccio, G. (2007). Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: A pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death & Differentiation*, 14(6), 1162–1171. doi: 10.1038/SJ.CDD.4402121.
- D'Avanzo, N., Bruno, M. C., Giudice, A., Mancuso, A., Gaetano, F. D., Cristiano, M. C., Fresta, M. (2021). Influence of materials properties on bio-physical features and effectiveness of 3D-scaffolds for periodontal regeneration. *Molecules*, 26(6), 1643. doi: 10.3390/MOLECULES26061643.

- De Luca, A., Vitrano, I., Costa, V., Raimondi, L., Carina, V., Bellavia, D., Giavaresi, G. (2019). Improvement of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on composite poly l-lactic acid/nano-hydroxyapatite scaffolds for bone defect repair. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(2), 250–257. doi: 10.1016/J.JBIOSC.2019.08.001.
- Devine, S. M., Cobbs, C., Jennings, M., Bartholomew, A., and Hoffman, R. (2003). Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, 101(8), 2999-3001. doi: 10.1182/blood-2002-06-1830.
- Dincer, S. (2014). *Meta-analize giriş*. Ankara: Anı Yayıncılık, 41-46.
- Doğan, N., ve Başokçu, T. O. (2010). İstatistik tutum ölçeği için uygulanan faktör analizi ve aşamalı kümeleme analizi sonuçlarının karşılaştırılması. *Journal of Measurement and Evaluation in Education and Psychology*, 1(2), 65-71.
- Dolati, F., Yu, Y., Zhang, Y., Jesus, A. M. D., Sander, E. A., and Ozbolat, I. T. (2014). In vitro evaluation of carbon-nanotube-reinforced bioprintable vascular conduits. *Nanotechnology*, 25(14), 145101. doi: 10.1088/0957-4484/25/14/145101.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. ., Krause, D. S., Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy*, 8(4), 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905.
- Donaldson, J. G. (2015). Immunofluorescence staining. *Current Protocols in Cell Biology*, 69(1), 431-437. doi: 10.1002/0471143030.CB0403S69.
- Donzelli, E., Salvadè, A., Mimo, P., Viganò, M., Morrone, M., Papagna, R., Tredici, G. (2007). Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. *Archives of Oral Biology*, 52(1), 64–73. doi: 10.1016/J.ARCHORALBIO.2006.07.007.
- Duan, X., Tu, Q., Zhang, J., Ye, J., Sommer, C., Mostoslavsky, G., Chen, J. (2010). Application of induced pluripotent stem (iPS) cells in periodontal tissue regeneration. *Journal of Cellular Physiology*, 226(1), 150–157. doi: 10.1002/jcp.22316.
- Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., and Chen, Z. (2017). Modeling physiological events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology*, 32(4), 266–277. doi: 10.1152/PHYSIOL.00036.2016.
- Dzobo, K. (2021). Multipotent human mesenchymal stem/stromal cells: An updated review on historical background, recent trends and advances in their clinical applications. doi: 10.20944/preprints202103.0373.v1.
- Echave, M. C., Pimenta-Lopes, C., Pedraz, J. L., Mehrali, M., Dolatshahi-Pirouz, A., Ventura, F., and Orive, G. (2019). Enzymatic crosslinked gelatin 3D scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Pharmaceutics*, 562, 151–61. doi: 10.1016/J.IJPHARM.2019.02.043.

- El Moshly, S., Radwan, I. A., Rady, D., Abbass, M. M. S., El-Rashidy, A. A., Sadek, K. M., Fawzy El-Sayed, K. M. (2020). Dental stem cell-derived secretome/conditioned medium: the future for regenerative therapeutic applications. *Stem Cells International*, 2020, 1–29. doi:10.1155/2020/7593402.
- Elango, J., Selvaganapathy, P. R., Lazzarid, G., Bao, B., and Wenhui, W. (2020). Biomimetic collagen-sodium alginate-titanium oxide (TiO₂) 3D matrix supports differentiated periodontal ligament fibroblasts growth for periodontal tissue regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 9–18. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.06.173.
- Eleuterio, E., Trubiani, O., Sulpizio, M., Di Giuseppe, F., Pierdomenico, L., Marchisio, M., Angelucci, S. (2013). Proteome of human stem cells from periodontal ligament and dental pulp. *PLoS ONE*, 8(8), e71101. doi: 10.1371/journal.pone.0071101.
- Ercal, P., Pekozer, G. G., and Kose, G. T. (2018). Dental stem cells in bone tissue engineering: Current overview and challenges. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1107, 113–127. doi: 10.1007/5584_2018_171.
- Eswaramoorthy, S. D., Dhiman, N., Joshi, A., and Rath, S. N. (2021). 3D Bioprinting of mesenchymal stem cells and endothelial cells in an alginate-gelatin-based bioink. *Journal of 3D Printing in Medicine*, 5(1), 23–36. doi: 10.2217/3DP-2020-0026.
- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–56. doi: 10.1038/292154a0.
- Faia-Torres, A. B., Goren, T., Ihalainen, T. O., Guimond-Lischer, S., Charnley, M., Rottmar, M., Neves, N. M. (2015). Regulation of human mesenchymal stem cell osteogenesis by specific surface density of fibronectin: A gradient study. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(4), 2367–2375. doi:10.1021/am506951c.
- Fan, T., Qu, R., Yu, Q., Sun, B., Jiang, X., Yang, Y., Dai, J. (2020). Bioinformatics analysis of the biological changes involved in the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(14), 7968–78. doi: 10.1111/JCMM.15429.
- Fang, Y., Tian, X., Bai, S., Fan, J., Hou, W., Tong, H., and Li, D. (2012). Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats by inhibiting oxidative stress, pro-inflammatory cytokines and the P38 MAPK signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 30(1), 85–92. doi: 10.3892/ijmm.2012.977.
- Farrell, E., Byrne, E. M., Fischer, J., O'Brien, F. J., O'Connell, B. C., Prendergast, P. J., and Campbell, V. A. (2006). A comparison of the osteogenic potential of adult rat mesenchymal stem cells cultured in 2-D and on 3-D collagen glycosaminoglycan scaffolds. *Technology and Health Care*, 15(1), 19–31. doi: 10.3233/THC-2007-15103.
- Feng, X., Xing, J., Feng, G., Sang, A., Shen, B., Xu, Y., Li, L. (2013). Age-dependent impaired neurogenic differentiation capacity of dental stem cell is associated with Wnt/ β -catenin signaling. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 33(8), 1023–1031. doi: 10.1007/s10571-013-9965-0.

- Ferrarotti, F., Romano, F., Gamba, M. N., Quirico, A., Giraudi, M. Audagna, M., and Aimetti, M. (2018). Human intrabony defect regeneration with micrografts containing dental pulp stem cells: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(7), 841–850. doi: 10.1111/JCPE.12931.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., and Cerri, P. S. (2015). Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Research International*, 2015, 1–17. doi: 10.1155/2015/421746.
- Freeman, F. E., and Kelly, D. J.- (2017). Tuning alginate bioink stiffness and composition for controlled growth factor delivery and to spatially direct MSC fate within bioprinted tissues. *Scientific Reports*, 7(1), 1-12.
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., and Kulagina, N. N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology*, 4, 267-274.
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, U. F., and Kulagina, N. N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology*, 4(5), 267–274.
- Frohbergh, M.E., Katsman, A., Botta, G.P., Lazarovici, P., Schauer, C.L., Wegst, U.G.K. and Lelkes, P.I. (2012). Electrospun hydroxyapatite-containing chitosan nanofibers crosslinked with genipin for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 33(36), 9167–9178.
- Gallagher, J. W. (1954). Periodontics in general practice. *The Journal of the American Dental Association*, 49(5), 533–537. doi: 10.14219/JADA.ARCHIVE.1954.0190.
- Garrett, S. (1996). Periodontal regeneration around natural teeth. *Annals of Periodontology*, 1(1), 621–666. doi: 10.1902/annals.1996.1.1.621.
- Gaur, T., Lengner, C. J., Hovhannisyan, H., Bhat, R. A., Bodine, P. V., Komm, B. S., Javed, A., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S., and Lian, J. B. (2005). Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(39), 33132-33140. doi: 10.1074/jbc.M500608200.
- Genova, T., Cavagnetto, D., Tasinato, F., Petrillo, S., Ruffinatti, F. A., Mela, L., Carossa, M., Munaron, L., Roato, I., and Mussano, F. (2021). Isolation and characterization of buccal fat pad and dental pulp MSCs from the same donor. *Biomedicines*, 9(3), 265. doi: 10.3390/BIOMEDICINES9030265.
- Gimble, J. M., Bunnell, B. A., and Guilak, F. (2012). Human adipose-derived cells: An update on the transition to clinical translation. *Regenerative Medicine*, 7(2), 225–235. doi: 10.2217/rme.11.119.

- Giuliani, A., Manescu, A., Langer, M., Rustichelli, F., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., Laino, L., d'Aquino, R., Tirino, V., and Papaccio, G. (2013). Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line holotomography revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: Biological and clinical implications. *Stem Cells Translational Medicine*, 2(4), 316–324. doi: 10.5966/SCTM.2012-0136.
- Godino Izquierdo, M. (2020). Osteogenic in vitro training of bone marrow mesenchymal cells for application in segmentary bone resections. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (English Edition)*, 64(4), 236–243. doi: 10.1016/J.RECOTE.2020.06.001.
- Griffith, L. G., and Swartz, M. A. (2006). Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(3), 211–224.
- Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., Shi, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research*, 81(8), 531–535. doi: 10.1177/154405910208100806.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., and Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13625–13630. doi: 10.1073/pnas.240309797.
- Guo, R., Yamashita, M., Zhang, Q., Zhou, Q., Chen, D., Reynolds, D. G., Xing, L. (2008). Ubiquitin ligase smurf1 mediates tumor necrosis factor-induced systemic bone loss by promoting proteasomal degradation of bone morphogenetic signaling proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 283(34), 23084–23092. doi: 10.1074/JBC.M709848200.
- Guo, Y., Yuan, Y., Wu, L., Ho, T. V., Jing, J., Sugii, H., Li, J., Han, X., Feng, J., Guo, C., and Chai, Y. (2018). BMP-IHH-mediated interplay between mesenchymal stem cells and osteoclasts supports calvarial bone homeostasis and repair. *Bone Res*, 6(30), <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0031-x>
- Habibovic, P., Sees, T. M., van den Doel, M. A., van Blitterswijk, C. A., and de Groot, K. (2006). Osteoinduction by biomaterials—Physicochemical and structural influences. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 77A(4), 747–762. doi: 10.1002/JBM.A.30712.
- Hagmann, S., Moradi, B., Frank, S., Dreher, T., Kämmerer, P. W., Richter, W., and Gotterbarm, T. (2013). Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 14(1). doi: 10.1186/1471-2474-14-223.
- Hai, G., Xiao, C., Dong-Hua, G., Ying-Jie, Z., and Chang-Lu, L. (2017). Effects of high glucose on osteogenic differentiation of HBMSC. *Journal of Prevention and Treatment for Stomatological Diseases*, 26–30. doi: 10.12016/J.ISSN.2096-1456.2017.01.005.

- Hakki, S. S., Kayis, S. A., Hakki, E. E., Bozkurt, S. B., Duruksu, G., Unal, Z. S., and Karaoz, E. (2015). Comparison of mesenchymal stem cells isolated from pulp and periodontal ligament. *Journal of Periodontology*, 86(2), 283-291.
- Hakki, S. S., Turac, G., Bozkurt, S. B., Kayis, S. A., Hakki, E. E., Şahin, E., and Karaoz, E. (2017). Comparison of different sources of mesenchymal stem cells: palatal versus lipoaspirated adipose tissue. *Cells Tissues Organs*, 204(5-6), 228-240.
- Hara, E. S., Ono, M., Eguchi, T., Kubota, S., Pham, H. T., Sonoyama, W., Kuboki, T. (2013). miRNA-720 controls stem cell phenotype, proliferation and differentiation of human dental pulp cells. *PLoS ONE*, 8(12), e83545. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0083545.
- Hasegawa, N., Kawaguchi, H., Hirachi, A., Takeda, K., Mizuno, N., Nishimura, M., Kurihara, H. (2006). Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *Journal of Periodontology*, 77(6), 1003–1007. doi: 10.1902/jop.2006.050341.
- Hong, D., Chen, H.-X., Xue, Y., Li, D.-M., Wan, X.-C., Ge, R., and Li, J.-C. (2009). Osteoblastogenic effects of dexamethasone through upregulation of TAZ expression in rat mesenchymal stem cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 116(1-2), 86–92. doi: 10.1016/J.JSBMB.2009.05.007.
- Hosseini-Khannazer, N., Hashemi, S. M., Namaki, S., Ghanbarian, H., Sattari, M., and Khojasteh, A. (2018). Study of the immunomodulatory effects of osteogenic differentiated human dental pulp stem cells. *Life Sciences*, 216, 111–118. doi: 10.1016/J.LFS.2018.11.040.
- Huwig, A. K., and Graf-Hausner, U. (2007). *Periodontitis and periodontopathogens view project osteosarcoma project view project*.
- Hynes, K., Menicanin, D., Han, J., Marino, V., Mroziak, K., Gronthos, S., and Bartold, P. M. (2013). Mesenchymal stem cells from iPS cells facilitate periodontal regeneration. *Journal of Dental Research*, 92(9), 833–839. doi: 10.1177/0022034513498258.
- Iezzi, I., Cerqueni, G., Licini, C., Lucarini, G., and Mattioli Belmonte, M. (2018). Dental pulp stem cells senescence and regenerative potential relationship. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 7186–97. doi: 10.1002/jcp.27472.
- Ishiy, F. A. A., Fanganiello, R. D., Kobayashi, G. S., Kague, E., Kuriki, P. S., and Passos-Bueno, M. R. (2018). CD105 is regulated by hsa-miR-1287 and its expression is inversely correlated with osteopotential in SHED. *Bone*, 106, 112–120. doi: 10.1016/J.BONE.2017.10.014.
- Ito, T., Tamura, N., Okuda, S., Tada, K., Matsushita, M., Yamaji, K., Takasaki, Y. (2016). Elevated serum levels of soluble CD146 in patients with systemic sclerosis. *Clinical Rheumatology*, 36(1), 119–124. doi: 10.1007/s10067-016-3434-3.
- Ivanovski, S., Gronthos, S., Shi, S., and Bartold, P. M. (2006). Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Diseases*, 12(4), 358–363. doi: 10.1111/j.1601-0825.2006.01253.x.

- Iwasaki, K., Nagata, M., Akazawa, K., Watabe, T., and Morita, I. (2018). Changes in characteristics of periodontal ligament stem cells in spheroid culture. *Journal of Periodontal Research*, 54(4), 364–373. doi: 10.1111/jre.12637.
- İnternet: The 2007 Nobel Prize in Physiology or Medicine. (t.y.). *Advanced Information*. Web: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2007/advanced-information/> 7 Nisan 2021'de alınmıştır.
- Jackson, B. K., Bow, A. J., Kannarpady, G., Biris, A. S., Anderson, D. E., Dhar, M., and Bourdo, S. E. (2018). Polyurethane/nano-hydroxyapatite composite films as osteogenic platforms. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 29(12), 1426–1443. doi: 10.1080/09205063.2018.1464264.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., Bruder, S. P. (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*, 64(2), 295–312. doi: 10.1002/(SICI)1097-4644(199702)64:2.
- Jian, H., Wang, M., Wang, S., Wang, A., and Bai, S. (2018). 3D bioprinting for cell culture and tissue fabrication. *Bio-Design and Manufacturing*, 1(1), 45–61. doi: 10.1007/S42242-018-0006-1.
- Jin, Q., Yuan, K., Lin, W., Niu, C., Ma, R., and Huang, Z. (2019). Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp and adipose tissue for bone regeneration potential. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 47(1), 1577–1584. doi: 10.1080/21691401.2019.1594861/SUPPL_FILE/IANB_A_1594861_SM6356.DOC X
- Johnson, M., and Cohen, J. (2012). Reprogramming rewarded: The 2012 Nobel Prize for physiology or medicine awarded to John Gurdon and Shinya Yamanaka. *Reproductive BioMedicine Online*, 25(6), 549–550.
- Jones, E. A., English, A., Kinsey, S. E., Straszynski, L., Emery, P., Ponchel, F., and McGonagle, D. (2006). Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 70B(6), 391–399. doi: 10.1002/CYTO.B.20118.
- Kádár, K., Molnár, B., Blazsek, J., and Kálló, K. (2009). *Differentiation potential of stem cells from human dental origin-promise for tissue engineering “Direct OSSİ” project view project*.
- Kalra, K., and Tomar, P. C. (2014). Stem cell: Basics, classification and applications. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2(7), 919–930.
- Kapuscinski, J. (1995). DAPI: A DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic and Histochemistry*, 70(5), 220–233. doi:10.3109/10520299509108199
- Karamustafaoğlu, O. (2017). Akademik araştırmalarda araştırma yöntemleri ile örnek ilişkisi: Doğrulayıcı doküman analizi örneği. *Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Dergisi*, (30), 556–565. doi: 10.14582/duzgef.1803.

- Karaöz, E., Doğan, B. N., Aksoy, A., Gacar, G., Akyüz, S., Ayhan, S., Sariboyacı, A. E. (2009). Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochemistry and Cell Biology*, 133(1), 95–112. doi: 10.1007/s00418-009-0646-5.
- Kato, M., Placencio-Hickok, V. R., Madhav, A., Haldar, S., Tripathi, M., Billet, S., Bhowmick, N. A. (2018). Heterogeneous cancer-associated fibroblast population potentiates neuroendocrine differentiation and castrate resistance in a CD105-dependent manner. *Oncogene*, 38(5), 716–730. doi: 10.1038/s41388-018-0461-3.
- Kaya, M. ve Tutun, M. H. (2021). Kök hücre üretimi, izolasyonu ve tedavide kullanımı. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 12(2), 55–78. doi: 10.38137/VFTD.969798.
- Kb, M. (1987). Polimeraz katalizli bir reaksiyon yoluyla in vitro spesifik DNA sentezi. *Methods Enzymol*.
- Kesarwani, A. K., Malhotra, A., Srivastava, A., Ananda, G., Ashoor, H., Kumar, P., Karuturi, R. K. M. (2018). Genome informatics. *Reference Module in Life Sciences*, 1(3), 178–194. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20223-9.
- Khojasteh, A., Hosseinpour, S., Rezai Rad, M., Alikhasi, M., and Zadeh, H. H. (2019). Buccal fat pad-derived stem cells with anorganic bovine bone mineral scaffold for augmentation of atrophic posterior mandible: An exploratory prospective clinical study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 21(2), 292–300. doi: 10.1111/CID.12729.
- Kim, H.-Y. (2014). Analysis of variance (ANOVA) comparing means of more than two groups. *Restorative Dentistry and Endodontics* 39(1), 74–77. doi: 10.5395/RDE.2014.39.1.74.
- Kirsch, M., Rach, J., Handke, W., Seltsam, A., Pepelanova, I., Strauß, S., Vogt, P., Scheper, T., and Lavrentieva, A. (2021). Comparative analysis of mesenchymal stem cell cultivation in fetal calf serum, human serum, and platelet lysate in 2D and 3D systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. doi: 10.3389/FBIOE.2020.598389.
- Koch, F., Tröndle, K., Finkenzeller, G., Zengerle, R., Zimmermann, S., and Koltay, P. (2020). Generic method of printing window adjustment for extrusion-based 3D-bioprinting to maintain high viability of mesenchymal stem cells in an alginate-gelatin hydrogel. *Bioprinting*, 20, e00094. doi: 10.1016/J.BPRINT.2020.E00094.
- Koehler, K. R., Mikosz, A. M., Molosh, A. I., Patel, D., and Hashino, E. (2013). Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature*, 500(7461), 217–221. doi: 10.1038/NATURE12298.
- Kolios, G., and Moodley, Y. (2012). Introerative medicineduction to stem cells and regen. *Respiration*, 85(1), 3–10.
- Kon, E., Muraglia, A., Corsi, A., Bianco, P., Marcacci, M., Martin, I., Quarto, R. (2000). Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *Journal of Biomedical Materials Research*, 49(3), 328–337. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(20000305)49:3<328::AID-JBM5>3.0.CO;2-Q.

- Kong, Y., Cheng, L., Ma, L., Li, H., Cheng, B., and Zhao, Y. (2019). Norepinephrine protects against apoptosis of mesenchymal stem cells induced by high glucose. *Journal of Cellular Physiology*, 234(11), 20801–15. doi: 10.1002/JCP.28686.
- Kotova, A. V., Lobov, A. A., Dombrovskaya, J. A., Sannikova, V. Y., Ryumina, N. A., Klausen, P., Shavarda, A. L., Malashicheva, A. B., and Enukashvily, N. I. (2021). Comparative analysis of dental pulp and periodontal stem cells: Differences in morphology, functionality, osteogenic differentiation and proteome. *Biomedicines*, 9(11). doi: 10.3390/BIOMEDICINES9111606.
- Krebsbach, P. H., Kuznetsov, S. A., Satomura, K., Emmons, R. V., Rowe, D. W., and Robey, P. G. (1997). Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation*, 63(8), 1059-1069. doi: 10.1097/00007890-199704270-00003.
- Kunimatsu, R., Nakajima, K., Awada, T., Tsuka, Y., Abe, T., Ando, K., Tanimoto, K. (2018). Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 501(1), 193–198. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.213.
- Łabowska, M. B., Cierluk, K., Jankowska, A. M., Kulbacka, J., Detyna, J., and Michalak, I. (2021). A review on the adaption of alginate-gelatin hydrogels for 3D cultures and bioprinting. *Materials*, 14(4), 858. doi: 10.3390/MA14040858.
- Laino, G., D'Aquino, R., Graziano, A., Lanza, V., Carinci, F., Naro, F., Papaccio, G. (2005). A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(8), 1394–1402. doi: 10.1359/JBMR.050325.
- Larsen, T. A., Goodsell, D. S., Cascio, D., Grzeskowiak, K., and Dickerson, R. E. (1989). The structure of DAPI bound to DNA. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 7(3), 477–491. doi: 10.1080/07391102.1989.10508505.
- Lee, T.-J., Jang, J., Kang, S., Bhang, S. H., Jeong, G.-J., Shin, H., Kim, B.-S. (2014). Mesenchymal stem cell-conditioned medium enhances osteogenic and chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells by mesodermal lineage induction. *Tissue Engineering Part A*, 20(7-8), 1306–1313. doi: 10.1089/TEN.TEA.2013.0265.
- Lee, Y.-C., Chan, Y.-H., Hsieh, S.-C., Lew, W.-Z., and Feng, S.-W. (2019). Comparing the osteogenic potentials and bone regeneration capacities of bone marrow and dental pulp mesenchymal stem cells in a rabbit calvarial bone defect model. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5015. doi:10.3390/ijms20205015
- Lei, M., Li, K., Li, B., Gao, L.-N., Chen, F.-M., and Jin, Y. (2014). Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation. *Biomaterials*, 35(24), 6332–6343. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.071.

- Lei, T., Zhang, X., and Du, H. (2021). Characteristics, classification, and application of stem cells derived from human teeth. *Stem Cells International*, 8886854. doi: 10.1155/2021/8886854.
- Li, C., Li, B., Dong, Z., Gao, L., He, X., Liao, L., Jin, Y. (2014). Lipopolysaccharide differentially affects the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells through Toll-like receptor 4 mediated nuclear factor κ B pathway. *Stem Cell Research and Therapy*, 5(3), 67. doi: 10.1186/SCRT456/FIGURES/7.
- Li, H., Liu, D., Yu, Y., and Wu, T. (2009). [Experimental research of the promotion effect of autogeneic PRP on osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in vitro]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 23(6):732-736.
- Lian, H., Zhang, L., and Meng, Z. (2018). Biomimetic hydroxyapatite/gelatin composites for bone tissue regeneration: Fabrication, characterization, and osteogenic differentiation in vitro. *Materials and Design*, 156, 381–388. doi: 10.1016/J.MATDES.2018.07.009.
- Lin, L., Chow, K. L., and Leng, Y. (2009). Study of hydroxyapatite osteoinductivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 89A(2), 326–335. doi: 10.1002/JBM.A.31994.
- Liu, J., Ding, Y., Liu, Z., and Liang, X. (2020). Senescence in mesenchymal stem cells: functional alterations, molecular mechanisms, and rejuvenation strategies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 258. doi: 10.3389/FCELL.2020.00258/BIBTEX.
- Liu, J., Li, Q., Liu, S., Gao, J., Qin, W., Song, Y., and Jin, Z. (2017). Periodontal ligament stem cells in the periodontitis microenvironment are sensitive to static mechanical strain. *Stem Cells International*, 2017, 1–13. doi:10.1155/2017/1380851
- Liu, Y., Li, Y., Nan, L., Wang, F., Zhou, S., Wang, J., Zhang, L. (2020). The effect of high glucose on the biological characteristics of nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biochemistry and Function*, 38(2), 130–40. doi: 10.1002/CBF.3441.
- Liu, Y., Wang, L., Liu, S., Liu, D., Chen, C., Xu, X., Shi, S. (2014). Transplantation of SHED prevents bone loss in the early phase of ovariectomy-induced osteoporosis. *Journal of Dental Research*, 93(11), 1124–1132. doi: 10.1177/0022034514552675.
- Longoni, A., Utomo, L., van Hooijdonk, I. E., Bittermann, G. K., Vetter, V. C., Kruijt Spanjer, E. C., Ross, J., Rosenberg, A. J., Gawlitta, D. (2020). The chondrogenic differentiation potential of dental pulp stem cells. *European Cells and Materials* 39, 121–35. doi: 10.22203/ecm.v039a08.
- Ma, L., Makino, Y., Yamaza, H., Akiyama, K., Hoshino, Y., Song, G., Yamaza, T. (2012). Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. *PLoS ONE*, 7(12), e51777. doi: 10.1371/journal.pone.0051777.
- Mabry, K. M., Payne, S. Z., and Anseth, K. S. (2016). Microarray analyses to quantify advantages of 2D and 3D hydrogel culture systems in maintaining the native valvular

- interstitial cell phenotype. *Biomaterials*, 74, 31–41. doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2015.09.035.
- MacDonald, E. S., Nowzari, H., Contreras, A., Flynn, J., Morrison, J., and Slots, J. (1998). Clinical and microbiological evaluation of a bioabsorbable and a nonresorbable barrier membrane in the treatment of periodontal intraosseous lesions. *Journal of Periodontology*, 69(4), 445–453. doi: 10.1902/jop.1998.69.4.445.
- Magin, C. M., Alge, D. L., and Anseth, K. S. (2016). Bio-inspired 3D microenvironments: A new dimension in tissue engineering. *Biomedical Materials*, 11(2), 022001. doi: 10.1088/1748-6041/11/2/022001.
- Mahmoud, N. S., Ahmed, H. H., Mohamed, M. R., Amr, K. S., Aglan, H. A., Ali, M. A. M., and Tantawy, M. A. (2019). Role of nanoparticles in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*, 72(1), 1–22. doi:10.1007/s10616-019-00353-y.
- Majo, F., Rochat, A., Nicolas, M., Jaoudé, G. A., and Barrandon, Y. (2008). Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature*, 456(7219), 250–254. doi: 10.1038/nature07406.
- Marone, M., Ritis, D. de, Bonanno, G., Mozzetti, S., Rutella, S., Scambia, G., and Pierelli, L. (2002). Cell cycle regulation in human hematopoietic stem cells: from isolation to activation. *Leukemia and Lymphoma*, 43(3), 493–501. doi:10.1080/10428190290011967.
- Marshak, D. R., Gardner, R. L., and Gottlieb, D. (2001). *Stem cell biology*.
- Mazini, L., Rochette, L., Amine, M., and Malka, G. (2019). Regenerative capacity of adipose derived stem cells (ADSCs), comparison with mesenchymal stem cells (MSCs). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2523. doi: 10.3390/ijms20102523.
- Mazziotta, C., Lanzillotti, C., Iaquina, M. R., Taraballi, F., Torreggiani, E., Rotondo, J. C., Martini, F. (2021). MicroRNAs modulate signaling pathways in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2362. doi: 10.3390/IJMS22052362.
- McCulloch, C. A. G., Nemeth, E., Lowenberg, B., and Melcher, A. H. (1987). Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *The Anatomical Record*, 219(3), 233–242. doi: 10.1002/ar.1092190304.
- McKee, M. D., Addison, W. N., and Kaartinen, M. T. (2005). Hierarchies of extracellular matrix and mineral organization in bone of the craniofacial complex and skeleton. *Cells Tissues Organs*, 181(3-4), 176–188. doi: 10.1159/000091379.
- Meshram, M., Anchlia, S., Shah, H., Vyas, S., Dhuvad, J., and Sagarka, L. (2018). Buccal fat pad-derived stem cells for repair of maxillofacial bony defects. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, 18(1):112–23. doi: 10.1007/S12663-018-1106-3.
- Mitsiadis, T. A., Orsini, G., and Jimenez-Rojo, L. (2015). Stem cell-based approaches in dentistry. *Eur Cell Mater*, 30, 248–57. doi: 10.22203/eCM.v030a17.

- Mizuno, H. (2013). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine in the field of plastic and reconstructive surgery. *Journal of Oral Biosciences* 55(3), 132–36. doi: 10.1016/j.job.2013.04.005.
- Mochizuki, M., and Nakahara, T. (2018). Establishment of xenogeneic serum-free culture methods for handling human dental pulp stem cells using clinically oriented in-vitro and in-vivo conditions. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), 25. doi: 10.1186/s13287-017-0761-5.
- Mohan, S., Yathindra, N., and Yathindra, N. (2012). A study of the interaction of DAPI with DNA containing AT and non-AT sequences—molecular specificity of minor groove binding drugs. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 11(4), 849–867. doi: 10.1080/07391102.1994.10508037.
- Monti, M., Graziano, A., Rizzo, S., Perotti, C., Del Fante, C., d'Aquino, R., Carlo Alberto Redi, C. A., and Rodriguez y Baena, R. (2017). In vitro and in vivo differentiation of progenitor stem cells obtained after mechanical digestion of human dental pulp. *Journal of Cellular Physiology*, 232(3), 548–555. doi: 10.1002/JCP.25452.
- Morissette Martin, P., Creber, K., and Hamilton, D. W. (2017). Measuring gene expression changes on biomaterial surfaces. *Monitoring and Evaluation of Biomaterials and Their Performance In Vivo*, 111–131. doi:10.1016/b978-0-08-100603-0.00006-7.
- Moritani, Y., Usui, M., Sano, K., Nakazawa, K., Hanatani, T., Nakatomi, M., Nakashima, K. (2018). Spheroid culture enhances osteogenic potential of periodontal ligament mesenchymal stem cells. *Journal of Periodontal Research*, 53(5), 870–82. doi: 10.1111/JRE.12577.
- Morszeck, C., Reichert, T. E., Völlner, F., Gerlach, T., and Driemel, O. (2007). Stand der humanen dentalen Stammzellforschung. *Mund-, Kiefer- Und Gesichtschirurgie*, 11(5), 259–266. doi: 10.1007/s10006-007-0071-7.
- Mrozik, K. M., Wada, N., Marino, V., Richter, W., Shi, S., Wheeler, D. L., Gronthos, S., and Bartold, P. M. (2013). Regeneration of periodontal tissues using allogeneic periodontal ligament stem cells in an ovine model. *Regenerative Medicine*, 8(6), 711–723. doi: 10.2217/RME.13.66.
- Murata, D., Kunitomi, Y., Harada, K., Tokunaga, S., Takao, S., and Nakayama, K. (2020). Osteochondral regeneration using scaffold-free constructs of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells made by a bio three-dimensional printer with a needle-array in rabbits. *Regenerative Therapy*, 15, 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2020.05.004>
- Murray, P. E., Garcia-Godoy, F., and Hargreaves, K. M. (2007). Regenerative endodontics: A review of current status and a call for action. *Journal of Endodontics*, 33(4), 377–390. doi: 10.1016/j.joen.2006.09.013.
- Na, A., and Issaranggun B. (2016). Interleukin-12 modulates the immunomodulatory properties of human periodontal ligament cells. *Wiley Online Kütiophanesi*, 52(3), 546–555. doi: 10.1111/jre.12421.

- Nantavisai, S., Pisitkun, T., Osathanon, T., Pavasant, P., Kalpravidh, C., Dhitavat, S., Sawangmake, C. (2020). Systems biology analysis of osteogenic differentiation behavior by canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow and dental pulp. *Scientific Reports*, 10(1), 1–18. doi: 10.1038/s41598-020-77656-0.
- Noda, S., Kawashima, N., Yamamoto, M., Hashimoto, K., Nara, K., Sekiya, I., and Okiji, T. (2019). Effect of cell culture density on dental pulp-derived mesenchymal stem cells with reference to osteogenic differentiation. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. doi: 10.1038/s41598-019-41741-w.
- Ormerod, M. G., and Novo, D. (2008). *Akış sitometrisi: Temel bir giriş*.
- Oryan, A., Kamali, A., Moshirib, A., and Eslaminejad, M. B. (2017). Role of mesenchymal stem cells in bone regenerative medicine: What is the evidence?" *Cells Tissues Organs* 204(2), 59–83.
- Osawa, M., Hanada, K.-İ., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 273(5272), 242–245. doi: 10.1126/SCIENCE.273.5272.242.
- Oshima, Y., Watanabe, N., Matsuda, K., Takai, S., Kawata, M., and Kubo, T. (2005). Behavior of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 53(2), 207–216. doi: 10.1369/jhc.4A6280.2005.
- Ovalı, E. (t.y.). *Laboratuarda kök hücre*.
- Özer, F. D., Demirel, A., Yılmaz Dilsiz, Ö., Aydın, M., Özdemir, N., Uyanıkgil, Y., and Baka, M. (2012). Effects of Levetiracetam on neural tube development and closure of the chick embryos in ovo. *Child's Nervous System*, 28(7), 969-976.
- Palmer, D. A. (2004). *Real-time PCR*.
- Pei, M. (2017). Environmental preconditioning rejuvenates adult stem cells' proliferation and chondrogenic potential. *Biomaterials*, 117, 10–23.
- Pei, M., Li, J., McConda, D. B., Wen, S., Clovis, N. B., and Danley, S. S. (2015). A comparison of tissue engineering based repair of calvarial defects using adipose stem cells from normal and osteoporotic rats. *Bone*, 78, 1–10. doi: 10.1016/j.bone.2015.04.040.
- Peinado, J. R., Pardo, M., de la Rosa, O., and Malagón, M. M. (2012). Proteomic characterization of adipose tissue constituents, a necessary step for understanding adipose tissue complexity. *PROTEOMICS*, 12(4-5), 607–620. doi: 10.1007/s00441-016-2503-x.
- Petersen, B. E. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 284(5417), 1168–1170. doi: 10.1126/science.284.5417.1168.
- Peterson, B., Zhang, J., Iglesias, R., Kabo, M., Hedrick, M., Benhaim, P., and Lieberman, J. R. (2005). Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified

- mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Engineering*, 11(1-2), 120–129. doi: 10.1089/ten.2005.11.120.
- Phelps, E. A., Landazuri, N., Thule, P. M., Taylor, W. R., and Garcia, A. J. (2009). Bioartificial matrices for therapeutic vascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8), 3323–3328. doi: 10.1073/pnas.0905447107.
- Pitaru, S., McCulloch, C. A. G., and Narayanan, S. A. (1994). Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *Journal of Periodontal Research*, 29(2), 81–94. doi: 10.1111/j.1600-0765.1994.tb01095.x.
- Pittenger, M. F. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143–47. doi: 10.1126/science.284.5411.143.
- Polat, E. (2020). Üç boyutlu hücre kültürü sistemlerine güncel yaklaşımlar. *Namık Kemal Tıp Dergisi*, 8(1), 84–92. doi: 10.37696/NKMJ.679069.
- Puchtler, H., Meloan, S. N., and Terry, M. S. (1969). On the history and mechanism of alizarin and alizarin red s stains for calcium. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 17(2), 110–24. doi: 10.1177/17.2.110.
- Rahmani-Moghadam, E., Talaei-Khozani, T., Zarrin, V., Vojdani, Z. (2021). Thymoquinone loading into hydroxyapatite/alginate scaffolds accelerated the osteogenic differentiation of the mesenchymal stem cells. *BioMedical Engineering Online*, 20(1), 1–20. doi: 10.1186/S12938-021-00916-1/TABLES/1.
- Ratajczak, M. Z., Zuba-Surma, E., Kucia, M., Poniewierska, A., Suszynska, M., and Ratajczak, J. (2012). Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. *Advances in Medical Sciences*, 57(1), 1–17.
- Reddi, A. H. (1998). Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol*, 16(3), 247–252. doi: 10.1038/nbt0398-247.
- Reig-Vano, B., Tylkowski, B., Montané, X., and Giamberini, M. (2021). Alginate-based hydrogels for cancer therapy and research. *International Journal of Biological Macromolecules*, 170, 424–436. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.12.161.
- Ressler, A., Ródenas-Rochina, J., Ivanković, M., Ivanković, H., Rogina, A., and Gallego Ferrer, G. (2018). Injectable chitosan-hydroxyapatite hydrogels promote the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Carbohydrate Polymers*, 197, 469–477. doi: 10.1016/J.CARPOL.2018.06.029.
- Riekstina, U., Cakstina, I., Parfejevs, V., Hoogduijn, M., Jankovskis, G., Muiznieks, I., Ancans, J. (2009). Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Reviews and Reports*, 5(4), 378–386. doi: 10.1007/S12015-009-9094-9.
- Rubashkin, M. G., Ou, G., and Weaver, V. M. (2014). Deconstructing signaling in three dimensions. *Biochemistry*, 53(13), 2078–2090. doi: 10.1021/BI401710D.

- Russo, T., Santis, R. D., Peluso, V., and Gloria, A. (2021). Multifunctional bioactive magnetic scaffolds with tailored features for bone tissue engineering. *Magnetic Nanoparticles in Human Health and Medicine*, 87–112. doi: 10.1002/9781119754725.CH4.
- Sahiner, F., and Gumral, R. (2020). Signal amplification techniques and applications in diagnostic virology. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine*, 83(3), 291–301. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0077.
- Sapet, C., Formosa, C., Sicard, F., Bertosio, E., Zelphati, O., and Laurent, N. (2013). 3D-fec-tion: cell transfection within 3D scaffolds and hydrogels. *Therapeutic Delivery*, 4(6), 673–685. doi: 10.4155/tde.13.36.
- Schieker, M., Pautke, C., Reitz, K., Hemraj, I., Neth, P., Mutschler, W., and Milz, S. (2004). The use of four-colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells. *Journal of Anatomy*, 204(2), 133–139. doi: 10.1111/J.1469-7580.2004.00252.X.
- Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73.
- Schroeder, M. E., Rodriguez, A. G., Speckl, K. F., Walker, C. J., Midekssa, F. S., Grim, J. C., Anseth, K. S. (2020). Collagen networks within 3D PEG hydrogels support valvular interstitial cell matrix mineralization. *Acta Biomaterialia*, 119:197–210. doi: 10.1016/J.ACTBIO.2020.11.012.
- Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., and Batouli, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429), 149–155. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16627-0.
- Seo, S., and Na, K. (2011). Mesenchymal stem cell-based tissue engineering for chondrogenesis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–8. doi:10.1155/2011/806891
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68(5), 850–858. doi: 10.1021/AC950914H.
- Shi, H., Zong, W., Xu, X., and Chen, J. (2018). Improved biphasic calcium phosphate combined with periodontal ligament stem cells may serve as a promising method for periodontal regeneration. *American Journal of Translational Research*, 10(12), 4030–4041.
- Shi, Y.-Y., Nacamuli, R. P., Salim, A., and Longaker, M. T. (2005). The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 116(6), 1686–1696. doi: 10.1097/01.prs.0000185606.03222.a9.
- Shu, R., McMullen, R., Baumann, M. J., and McCabe, L. R. (2003). Hydroxyapatite accelerates differentiation and suppresses growth of MC3T3-E1 osteoblasts. *Journal*

- of *Biomedical Materials Research Part A* 67A(4), 1196–1204. doi: 10.1002/JBM.A.20021.
- Si, Z., Kang, Y., Wang, X., Wang, X., Sun, C., Li, Y., Gao, X. (2020). Heme oxygenase 1 inhibits adult neural stem cells proliferation and survival via modulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Journal of Alzheimer's Disease*, 76(2), 623–41. doi: 10.3233/JAD-200114.
- Somerman, M. J., Young, M. F., Foster, R. A., Moehring, J. M., Imm, G., and Sauk, J. J. (1990). Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. *Archives of Oral Biology*, 35(3), 241–247. doi: 10.1016/0003-9969(90)90062-F.
- Son, Y.-B., Kang, Y.-H., Lee, H.-J., Jang, S.-J., Bharti, D., Lee, S.-L., Rho, G.-J. (2021). Evaluation of odonto/osteogenic differentiation potential from different regions derived dental tissue stem cells and effect of 17 β -estradiol on efficiency. *BMC Oral Health*, 21(1). doi: 10.1186/S12903-020-01366-2.
- Srijaya, T. C., Sriram, S., Sugii, S., and Abu Kasim, N. H. (2016). Stem cells in dentistry: Potential applications and perspectives in clinical research. In *Bone and cartilage regeneration* (pp. 293-308). Springer.
- Stein, G. S., Lian, J. B., Wijnen, A. J. van, Stein, J. L., Montecino, M., Javed, A., Pockwinse, S. M. (2004). Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene*, 23(24), 4315–4329. doi:10.1038/sj.onc.1207676
- Stevens, A., Zuliani, T., Olejnik, C., LeRoy, H., Obriot, H., Kerr-Conte, J., Polakowska, R. R. (2008). Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells and Development*, 17(6), 1175–1184. doi: 10.1089/scd.2008.0012.
- Stewart, R., Stojkovic, M., and Lako, M. (2006). Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *European Journal of Cancer*, 42(9), 1257–1272. doi:10.1016/j.ejca.2006.01.033
- Sun, E., and Karaoz, E. (2020). Can wharton jelly derived or adipose tissue derived mesenchymal stem cell can be a treatment option for duchenne muscular dystrophy? Answers as transcriptomic aspect. *American Journal of Stem Cells*, 9(4), 57–67.
- Sun, F., Wan, M., Xu, X., Gao, B., Zhou, Y., Sun, J., Zheng, L. (2014). Crosstalk between miR-34a and notch signaling promotes differentiation in apical papilla stem cells (SCAPs). *Journal of Dental Research*, 93(6), 589–595. doi: 10.1177/0022034514531146.
- Tada, H., Nemoto, E., Foster, B. L., Somerman, M. J., and Shimauchi, H. (2011). Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells. *Bone*, 48(6), 1409–1416. doi:10.1016/j.bone.2011.03.675
- Takeyasu, M., Nozaki, T., Watanabe, M., Shinohara, M., Morita, J., Hidaka, A., Iwamoto, K., Takahashi, T., Nagata, S., Daito, M., and Ohura, K. (2004). In vitro osteogenic

- differentiation potential of dental pulp stem cells. *Journal of Oral Tissue Engineering*, 2(1), 25. <https://doi.org/10.11223/jarde.2.25>
- Tang, H.-N., Xia, Y., Yu, Y., Wu, R.-X., Gao, L.-N., and Chen, F.-M. (2016). Stem cells derived from “inflamed” and healthy periodontal ligament tissues and their sheet functionalities: A patient-matched comparison. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(1), 72–84. doi: 10.1111/jcpe.12501.
- Tang, M., Chen, W., Liu, J., Weir, M. D., Cheng, L., and Xu, H. H. K. (2014). Human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on calcium phosphate scaffold for bone regeneration. *Tissue Engineering Part A*, 20(7-8), 1295–1305. doi: 10.1089/TEN.TEA.2013.0211.
- Taoudi, S., Gonneau, C., Moore, K., Sheridan, J. M., Blackburn, C. C., Taylor, E., and Medvinsky, A. (2008). Extensive hematopoietic stem cell generation in the AGM region via maturation of VE-cadherin+CD45+ pre-definitive HSCs. *Cell Stem Cell*, 3(1), 99–108. doi: 10.1016/J.STEM.2008.06.004.
- Tavakoli, S., Ghaderi Jafarbeigloo, H. R., Shariati, A., Jahangiryan, A., Jadidi, F., Jadidi Kouhbanani, M. A., Naimi, A. (2020). Mesenchymal stromal cells; a new horizon in regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology*, 235(12), 9185–9210. doi: 10.1002/jcp.29803.
- Tekeli, S., Arısu Naghavi, E., Gökçe, B., Sır, G., Yiğittürk, G., Çavuşoğlu, T. ve Uyanıkgil, Y. (2016). Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları. *FNG and Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi*, 1(2), 72-83. doi: 10.5606/fng.transplantasyon.2016.013.
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Scott, E. W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416(6880), 542–545. doi:10.1038/nature730.
- Thanasrisuebwong, P., Kiattavorncharoen, S., Surarit, R., Phruksaniyom, C., and Ruangsawasdi, N. (2020). Red and yellow injectable platelet-rich fibrin demonstrated differential effects on periodontal ligament stem cell proliferation, migration, and osteogenic differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 5153. doi: 10.3390/IJMS21145153.
- Thomson, J. A. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147. doi: 10.1126/science.282.5391.1145.
- Tobita, M., Uysal, C. A., Guo, X., Hyakusoku, H., and 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), 1517–1526. doi: 10.1016/J.JCYT.2013.05.007.
- Todorović, V., Marković, D., Milošević-Jovčić, N., Petakov, M., Balint, B., Čolić, M., Milenković, A., Čolak, I., Jakanović, V., and Nikolić, N. (2008). Dental pulp stem cells-potential significance in regenerative medicine. *Stom Glas S*, 55. doi: 10.2298/SGS0803170T.

- Tormin, A., Li, O., Brune, J. C., Walsh, S., Schutz, B., Ehinger, M., Scheduling, S. (2011). CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood*, 117(19), 5067–5077. doi: 10.1182/BLOOD-2010-08-304287.
- Tóth, F., Gáll, J. M., Tőzsér, J., and Hegedűs, C. (2020). Effect of inducible bone morphogenetic protein 2 expression on the osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in vitro. *Bone*, 132, 115214. doi: 10.1016/J.BONE.2019.115214.
- Trivanović, D., Jauković, A., Popović, B., Krstić, J., Mojsilović, S., Okić-Djordjević, I., and Bugarski, D. (2015). Mesenchymal stem cells of different origin: comparative evaluation of proliferative capacity, telomere length and pluripotency marker expression. *Life Sciences*, 141, 61-73.
- Trubiani, O., Pizzicannella, J., Caputi, S., Marchisio, M., Mazzon, E., Paganelli, R., Paganelli, A., and Diomede, F. (2019). Periodontal ligament stem cells: Current knowledge and future perspectives. *Stem Cells and Development*, 28(15), 995–1003.
- Tsutsui, T. W. (2020). Dental pulp stem cells: advances to applications. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 13, 33-42. doi: 10.2147/SCCAA.S166759.
- Uçaryılmaz, H. ve Artaç, H. (2013). Akım sitometri ve temel özellikleri. *Selçuk Pediatri*, 1(1), 12-15.
- Ullah, I., Subbarao, R. B., and Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35(2), 1–18. doi:10.1042/bsr20150025
- Vacanti, C. A. (2006). The history of tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(3), 569–576. doi:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00421.x
- van Hout, W. M., Mink van der Molen, A. B., Breugem, C. C., Koole, R., Van Cann, E. M. (2011). Reconstruction of the alveolar cleft: Can growth factor-aided tissue engineering replace autologous bone grafting? a literature review and systematic review of results obtained with bone morphogenetic protein-2. *Clinical Oral Investigations*, 15(3), 297–303. doi: 10.1007/s00784-011-0547-6.
- Venkataiah, V. S., Handa, K., Njuguna, M. M., Hasegawa, T., Maruyama, K., Nemoto, E., Saito, M. (2019). Periodontal regeneration by allogeneic transplantation of adipose tissue derived multi-lineage progenitor stem cells in vivo. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. doi: 10.1038/s41598-018-37528-0.
- Vidoni, C., Ferraresi, A., Secomandi, E., Vallino, L., Gardin, C., Zavan, B., Isidoro, C. (2019). Autophagy drives osteogenic differentiation of human gingival mesenchymal stem cells. *Cell Communication and Signaling*, 17(1). doi: 10.1186/S12964-019-0414-7.
- Volarevic, V., Gazdic, M., Simovic Markovic, B., Jovicic, N., Djonov, V., and Arsenijevic, N. (2017). Mesenchymal stem cell-derived factors: Immuno-modulatory effects and therapeutic potential. *BioFactors*, 43(5), 633–644. doi: 10.1002/biof.1374.

- Wang, L., Li, Z., Wang, Y., Wu, Z., and Yu, B. (2015). Dynamic expression profiles of marker genes in osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chinese Medical Sciences Journal*, 30(2), 108–113. doi: 10.1016/S1001-9294(15)30021-3.
- Weigelt, B., Ghajar, C. M., and Bissell, M. J. (2014). The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify biomarkers in breast cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 42. doi: 10.1016/J.ADDR.2014.01.001.
- Wertheim, J. A., and J. R. Leventhal. (2015). Clinical implications of basic science discoveries: Induced pluripotent stem cell therapy in transplantation-a potential role for immunologic tolerance. *Wiley Online Library*, 15(4), 887–90. doi: 10.1111/ajt.13155.
- Xie, L., Zeng, X., Hu, J., and Chen, Q. (2015). Characterization of nestin, a selective marker for bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells International*, 2015. doi: 10.1155/2015/762098.
- Xu, J., Wang, W., Kapila, Y., Lotz, J., and Kapila, S. (2009). Multiple differentiation capacity of STRO-1 +/CD146 + PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells and Development*, 18(3), 487–96. doi: 10.1089/scd.2008.0113.
- Xu, Q., Liu, Z., Guo, L., Liu, R., Li, R., Chu, X., Yang, J., Luo, J., Chen, F., and Deng, M. (2019). Hypoxia mediates runt-related transcription factor 2 expression via induction of vascular endothelial growth factor in periodontal ligament stem cells. *Mol Cells*, 42(11), 763–772. doi: 10.14348/molcells.2019.0023.
- Xuan, K., Li, B., Guo, H., Sun, W., Kou, X., He, X., Jin, Y. (2018). Deciduous autologous tooth stem cells regenerate dental pulp after implantation into injured teeth. *Science Translational Medicine*, 10(455), eaaf3227. doi:10.1126/scitranslmed.aaf3227
- Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Takahashi, M., Hata, K.-I., and Nagasaka, T. (2004). Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: Tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Engineering*, 10(5-6), 955–964. doi:10.1089/1076327041348284.
- Yang, H., Apreccio, R. M., Zhou, X., Wang, Q., Zhang, W., Ding, Y., and Li, Y. (2014). Therapeutic effect of TSG-6 engineered iPSC-derived MSCs on experimental periodontitis in rats: A pilot study. *PLoS ONE*, 9(6), e100285. doi:10.1371/journal.pone.0100285.
- Yasui, T., Mabuchi, Y., Toriumi, H., Ebine, T., Niibe, K., Houlihan, D. D., Matsuzaki, Y. (2015). Purified human dental pulp stem cells promote osteogenic regeneration. *Journal of Dental Research*, 95(2), 206–214. doi:10.1177/0022034515610748.
- Ye, W., Lv, Q., Wong, C.-K. A., Hu, S., Fu, C., Hua, Z., Zhang, Y. (2008). The effect of central loops in miRNA:MRE duplexes on the efficiency of miRNA-mediated gene regulation. *PLoS ONE*, 3(3), e1719. doi:10.1371/journal.pone.0001719
- Yi, Q., Liu, O., Yan, F., Lin, X., Diao, S., Wang, L., Fan, Z. (2016). Analysis of senescence-related differentiation potentials and gene expression profiles in human dental pulp stem cells. *Cells Tissues Organs*, 203(1), 1–11. doi: 10.1159/000448026.

- Yoo, S. Y., Lee, J. S., Cha, J. K., Kim, S. K., and Kim, C. S. (2019). Periodontal healing using a collagen matrix with periodontal ligament progenitor cells in a dehiscence defect model in beagle dogs. *Journal of Periodontal and Implant Science*, 49(4), 215–227. doi: 10.5051/JPIS.2019.49.4.215.
- Yoshikawa, H., and Myoui, A. (2005). Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *Journal of Artificial Organs*, 8(3), 131–36. doi: 10.1007/S10047-005-0292-1.
- Yu, D. A., Han, J., and Kim, B. S. (2012). Stimulation of Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *International Journal of Stem Cells*, 5(1), 16–22.
- Yu, Z., Gauthier, P., Tran, Q. T., El-Ayachi, I., Bhatti, F. U., Bahabri, R., Al-Habib, Mi, and Huang, G. T. (2015). Differential properties of human ALP+ periodontal ligament stem cells vs their ALP- counterparts. *Journal of Stem Cell Research and Therapy*, 5(7). doi: 10.4172/2157-7633.1000292.
- Yücel, Ö. Ö. ve Gültekin, S. (2015). Dental kök hücrelerin rejeneratif medikal tedavideki yeri. *Acta Odontologica Turcica*, 32(2), 98-105. doi: 10.17214/aot.10464.
- Zarate-Córdova, V. L., Oropeza-Guzmán, M. T., López-Maldonado, E. A., Iglesias, A. L., Ng, T., Serena-Gómez, E., Pérez-González, G. L., and Villarreal-Gómez, L. J. (2020). Temperature effect on the porosity of hydroxyapatite scaffolds and its use in tissue engineering. *Revista de Ciencias Tecnológicas*, 3(4), 213–21. doi: 10.37636/RECIT.V34213221.
- Zeng, W.-Y., Ning, Y., and Huang, X. (2020). Advanced technologies in periodontal tissue regeneration based on stem cells: Current status and future perspectives. *Journal of Dental Sciences*, 16(1), 501–507. doi: 10.1016/J.JDS.2020.07.008.
- Zhai, Q., Dong, Z., Wang, W., Li, B., and Jin, Y. (2018). Dental Stem cell and dental tissue regeneration. *Frontiers of Medicine*, 13(2), 152–159. doi: 10.1007/S11684-018-0628-X.
- Zhang, Q., Shi, S., Liu, Y., Uyanne, J., Shi, Y., Shi, S., and Le, A. D. (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), 7787–7798. doi: 10.4049/jimmunol.0902318.
- Zhang, Y., Xing, Y., Jia, L., Ji, Y., Zhao, B., Wen, Y., and Xu, X. (2018). An in vitro comparative study of multi-sources derived mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Stem Cells and Development*, 27(23), 1634–1645. doi: 10.1089/SCD.2018.0119.
- Zhao, B. J., and Liu, Y. H. (2014). Simvastatin induces the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 28(5), 583–92. doi: 10.1111/FCP.12050.
- Zheng, C.-X., Sui, B.-D., Liu, N., Hu, C.-H., He, T., Zhang, X.-Y., Jin, Y. (2018). Adipose mesenchymal stem cells from osteoporotic donors preserve functionality and modulate systemic inflammatory microenvironment in osteoporotic cytotherapy. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. doi: 10.1038/s41598-018-23098-8.

- Zorba Yildiz, A. P., Darici, H., Yavuz, B., Abamor, E. S., Ozdemir, C., Yasin, M. E., Bagirova, M., Allahverdiyev, A., and Karaoz, E. (2022). Preparation and characterization of graphene-based 3D biohybrid hydrogel bioink for peripheral neuroengineering. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (183). doi: 10.3791/63622.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211–228. doi: 10.1089/107632701300062859.
- Zuppinger, C. (2019). 3D cardiac cell culture: A critical review of current technologies and applications. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6, 87. doi: 10.3389/FCVM.2019.00087/BIBTEX.





ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ALTIKAT, Kadriye Merve
Uyruğu : T.C.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / Periodontoloji Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Lisans	Anadolu Üniversitesi / Sağlık Yönetimi	2021
Lisans	Başkent Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2018
Lise	Çankaya Milli Piyango Anadolu Lisesi	2009

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
-----	-----	-------

Yabancı Dil

İngilizce



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..