

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORAL KAVİTEDE FARKLI KAYNAKLARDAN ELDE EDİLEN  
ÖRNEKLERDEKİ KÖK HÜCRE POTANSİYELLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI: DENEYSEL ÇALIŞMA

AĞIZ, DIŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

Diş Hekimi

Yasin ER

DANIŞMAN

Prof. Dr. Turgay SEÇKİN

İZMİR

2013



T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORAL KAVİTEDE FARKLI KAYNAKLARDAN ELDE EDİLEN  
ÖRNEKLERDEKİ KÖK HÜCRE POTANSİYELLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI: DENEYSEL ÇALIŞMA

AĞIZ, DIŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

Diş Hekimi

Yasin ER

DANIŞMAN

Prof. Dr. Turgay SEÇKİN

İZMİR

2013



**DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ**

**(Adı Soyadı)**

**(İmza)**

**Başkan (Danışman) : Prof.Dr.Turgay SEÇKİN (Danışman)**

**Üye / İmza : Prof.Dr.Sevtap GÜNBAY**

**Üye / İmza : Prof.Dr.Hüseyin KOCA**

**Üye / İmza : Prof.Dr.M.İbrahim TUĞLU**

**Üye / İmza : Doç.Dr.Candan EFEOĞLU**

**Tezinin Kabul Edildiği Tarih:**

## ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince engin bilgi ve birikimlerinden keyifle faydalandığım, ilk günden itibaren beni kanatlarının altına alarak gözeten, başta doktora danışmanım Sayın Prof.Dr.Turgay SEÇKİN'e, gerek öğrencilik gerekse doktora eğitimim boyunca benden hiçbir bilgisini esirgemeyen ve her konuda hep yanımda olan değerli hocam Prof.Dr.Hüseyin KOCA'ya, araştırmanın şekillenmesi ve ilerlemesi aşamalarında bana yardımcı olan ve ufkumu açan C.B.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof.Dr.Mehmet İbrahim TUĞLU'ya, desteğini her zaman arkamda hissettiğim anabilim dalı başkanım Sayın Prof.Dr.Sevtap GÜNBAŞI'ya, doktora eğitimim süresince kendisinin üstün bilgi ve birikiminden yararlandığım çok sevgili hocam emekli öğretim üyesi Sayın Prof.Dr.Erdoğan ÇETİNGÜL'e, tez çalışmamda benden yardımlarını esirgemeyen değerli abilerim Doç.Dr.Candan EFEOĞLU, Dr.Evren SÜTEKİN ve Dr.Ayhan TETİK'e, her zaman ve koşulda yanımda olan dostlarım Dt.Murat Cihan SOLMAZ, Dr.Mehmet Ali HACIOĞLU ve Dt.Sezai GÜVEN'e, anabilim dalımızda görevli değerli hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma, araştırmamızın yapılması için maddi imkan sağlayan E.Ü.Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Fonu'na teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca her zaman yanımda olan ve bana sonsuz destek veren canım eşim Sayın Dt.Ceren ER'e, bugünlere gelebilmem için büyük özveriler göstermiş olan anneme, babama, ablama ve tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	III
TABLolar DİZİNİ .....	VIII
GRAFİKLER DİZİNİ .....	IX
RESİMLER DİZİNİ .....	X
KISALTMALAR DİZİNİ .....	XIV

## BÖLÜM I

1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1. Kök Hücre .....	5
2.1.1. Kendini Yenileyebilme .....	5
2.1.2. Farklı Hücre Dizilerine Farklılaşma .....	5
2.2. Erişkin Kök Hücreler .....	8
2.2.1. Kök Hücre Mikroçevresi .....	9
2.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler .....	12
2.2.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanma Yöntemleri .....	15
2.2.2.2. Plastik Adherens .....	17
2.2.2.3. Spesifik Yüzey Antijenlerinin Ekspresyonu .....	18

2.2.2.4. Multipotent Farklılaşma Kapasitesi.....	21
2.3. Maksillofasiyal Bölgedeki Kök Hücre Kaynakları .....	26
2.3.1. Dental Kökenli Kök Hücre Kaynakları .....	27
2.3.1.1. Süt Dişi Pulpası .....	28
2.3.1.2. Dental Pulpa.....	29
2.3.1.3. Dental Folikül.....	31
2.3.1.4. Apikal Papilla.....	32
2.3.1.5. Periodontal Ligament .....	32
2.3.2. Dental Kökenli Olmayan Kök Hücre Kaynakları.....	33
2.3.2.1. Periost .....	33
2.3.2.2. Alveol Kemik Dokusu .....	33
2.3.2.3. Yağ Dokusu.....	34

## BÖLÜM II

<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>36</b>
3.1. Etik Kurul .....	36
3.2. Doku Örneklerinin Elde Ediliş Prosedürü .....	37
3.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültüre Edilmesi.....	39
3.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Sayımı .....	46

3.5. İzole Edilen Hücrelerin Osteojenik ve Odontojenik Farklılaşmalarının Araştırılması.....	48
3.5.1. İzole Edilen Hücrelerin Canlılık ve Çoğalma Testleri .....	49
3.5.2. In vitro Osteojenik ve Odontojenik Farklılaşma .....	50
3.5.2.1. ALP/VK Boyaması.....	51
3.5.2.2. İmmünohistokimyasal İnceleme .....	52
3.5.2.3. TUNEL İmmünohistokimyasal İnceleme.....	53
3.5.2.4. Morfometrik Değerlendirme .....	54
3.6. İstatistiksel Değerlendirme.....	54

### **BÖLÜM III**

<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>55</b>
4.1. Hücrelerin Morfolojik Görünümleri .....	55
4.2. Hücrelerin Çoğalma Özellikleri.....	57
4.3. Hücre Yüzey Antijenlerine Göre MKH'lerin Tespiti.....	60
4.4. Osteoblastik ve Odontoblastik Besiyeri Uygulamaları.....	65
4.4.1. Osteojenik Farklılaşma .....	66
4.4.2. Odontojenik Farklılaşma .....	73

## BÖLÜM IV

5. TARTIŞMA .....	80
-------------------	----

## BÖLÜM V

6. SONUÇ ve ÖNERİLER .....	90
----------------------------	----

## BÖLÜM VI

ÖZET .....	92
------------	----

SUMMARY .....	94
---------------	----

## BÖLÜM VII

YARARLANILAN KAYNAKLAR .....	96
------------------------------	----

ÖZGEÇMİŞ .....	119
----------------	-----

## TABLO DİZİNİ

### TABLO

### SAYFA

- Tablo 1.** ISCT (International Society of Cellular Therapy) tarafından MKH tanımlaması için belirlenmiş kriterler ..... 15
- Tablo 2.** Kemik iliği kökenli MKH'lerin temel immünofenotipik özellikleri.. 19
- Tablo 3.** Hücre yüzey protein ekspresyonlarının karşılaştırılması .....31
- Tablo 4.** Çalışmaya dahil edilen hastaların cinsiyet/yaş bilgileri ve elde edilen doku örneklerinin tablo şeklinde gösterimi.....37

## GRAFİK DİZİNİ

<u>GRAFİK</u>	<u>SAYFA</u>
<b>Grafik 1.</b> In vitro ortamda çoğaltılmış insan MKH'lerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen fenotipik özellikleri .....	20
<b>Grafik 2.</b> P4 hücrelerinin MTT canlılık testi ile belirlenen çoğalma kapasitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	60
<b>Grafik 3.</b> OKKH kültüründeki P4 hücrelerinin belirteçlere göre farklılaşma kapasitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi .....	65
<b>Grafik 4.</b> OSBY uygulaması ile P4 hücrelerinin 3, 7, 14 ve 21. günlerdeki çoğalma kapasitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi .....	67
<b>Grafik 5.</b> P4 hücrelerinin OSBY'deki farklılaşma kapasitelerinin belirteç boyamalarına göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi .....	72
<b>Grafik 6.</b> ODBY uygulaması ile P4 hücrelerinin 3, 7, 14 ve 21. günlerdeki çoğalma kapasitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	74
<b>Grafik 7.</b> P4 hücrelerinin ODBY'deki farklılaşma kapasitelerinin belirteç boyamalarına göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi .....	79

## RESİM DİZİNİ

<u>RESİM</u>	<u>SAYFA</u>
<b>Resim 1.</b> Gelişimsel yönden köken aldıkları kaynaklara göre kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri .....	6
<b>Resim 2.</b> Blastosist ve iç hücre kitlesi .....	7
<b>Resim 3.</b> Kök hücre bölünmesi ve farklılaşmasının şematik gösterimi .....	10
<b>Resim 4.</b> MKH'lerin in vitro koşullarda plastik adherens ve fenotipik özellikleri .....	18
<b>Resim 5.</b> İnsan kaynaklı MKH'lerin in vitro kültür ortamındaki immünohistokimyasal görüntüsü.....	21
<b>Resim 6.</b> Kemik iliği kökenli MKH'ler ile hematopoetik kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin şematik gösterimi .....	24
<b>Resim 7.</b> Dental kökenli kök hücre kaynaklarının şematik gösterimi .....	28
<b>Resim 8.</b> Ortodontik tedavi görmekte olan hastanın radyolojik görüntüsü .....	36
<b>Resim 9.</b> Ortodontik tedavi görmekte olan hastadan kök formasyonunu tamamlamamış diş örneğinin elde edilişi .....	38
<b>Resim 10.</b> Kültür çalışmalarının yapıldığı laminar flow (Herasafe biosafety cabinet class II) cihazı .....	39

- Resim 11.** Doku örnekleri (A. Yağ dokusunun görüntüsü, B. Dental folikül dokusunun görüntüsü) .....40
- Resim 12.** Doku örneklerinin bistüri yardımıyla mekanik olarak küçük parçalara ayrılması .....40
- Resim 13.** Doku örnekleri (A. Kök formasyonunu tamamlamamış diş örneğinin görüntüsü, B. Separe edilmiş diş görüntüsü).....41
- Resim 14.** Mine dokusu zayıflatılan dişin davye yardımıyla kırılması.....42
- Resim 15.** Doku örnekleri (A. Dental pulpa dokusunun görüntüsü, B. Apikal papil dokusunun görüntüsü) .....42
- Resim 16.** Mekanik olarak küçük parçalara ayrılan dokuların tip 1 kollajenaz solüsyonunun içerisinde 1 saat boyunca 37°C'lik su banyosunda enzimatik parçalanma için bekletilmesi.....43
- Resim 17.** Mekanik ve enzimatik olarak parçalanan doku örneklerinin 70µm'lik gözenekleri olan hücre süzgecinden geçirilmesi.....43
- Resim 18.** Hücre kültürlerinin 37°C'de %5'lik CO<sub>2</sub> ve nemli ortam koşullarında (CO<sub>2</sub> inkübatöründe) inkübasyona alınması .....44
- Resim 19.** Inverted faz kontrast mikroskobu yardımıyla hücrelerin sayımı ve canlılıklarının kontrol edilmesi.....45
- Resim 20.** Inverted faz kontrast mikroskobunda hücre sayımı öncesi Tripan mavisi solüsyonun mikropipetle eklenmesi .....47

- Resim 21.** Oral kavitede farklı kaynaklardan elde edilen MKH'lerin primer kültürleri (P0) ile pasaj 4 (P4) hücrelerinin karşılaştırılmaları.....57
- Resim 22.** Oral kavitede farklı kaynaklardan elde edilen MKH'lerin primer kültürleri (P0) ile pasaj 4 (P4) hücrelerinin koloni şeklinde çoğalma gösterdikleri konfluent hücre morfolojisinin inverted faz kontrast mikroskobu görüntüleri .....59
- Resim 23.** P4 hücrelerine ait kontrol grubunun (KR) primer antikor kullanılmayan boyaması ile STRO-1 belirteci kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyamalarının görüntüleri.....61
- Resim 24.** CD105 belirteç boyaması yapılan P4 hücrelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılmalı immünohistokimyasal görüntüleri .....62
- Resim 25.** P4 hücrelerinin C-KİT boyaması açısından kontrol grubu ile karşılaştırılmalı immünohistokimyasal görüntüleri.....63
- Resim 26.** P4 hücrelerinin CD45 belirteci ile negatif boyama görüntüleri....64
- Resim 27.** OKKH kültüründe P4 hücrelerinin osteoblastik besiyeri uygulaması ile oluşan morfolojik görüntüleri .....66
- Resim 28.** Osteoblastik besiyerindeki P4 hücrelerinin Alizarin kırmızısı ile boyama görüntüleri.....68
- Resim 29.** Osteoblastik besiyerindeki P4 hücrelerinin Von Kossa ile boyama görüntüleri .....69

- Resim 30.** Osteoblastik besiyerindeki P4 hücrelerinin Osteonektin ile boyama görüntüleri .....70
- Resim 31.** Osteoblastik besiyerindeki P4 hücrelerinin Dentin fosfoprotein ile boyama görüntüleri .....71
- Resim 32.** OKKH kültüründe P4 hücrelerinin odontoblastik besiyeri uygulaması ile oluşan morfolojik görüntüleri .....73
- Resim 33.** Odontoblastik besiyerindeki P4 hücrelerinin Alizarin kırmızısı ile boyama görüntüleri.....75
- Resim 34.** Odontoblastik besiyerindeki P4 hücrelerinin Von Kossa ile boyama görüntüleri .....76
- Resim 35.** Odontoblastik besiyerindeki P4 hücrelerinin Osteonektin ile boyama görüntüleri .....77
- Resim 36.** Odontoblastik besiyerindeki P4 hücrelerinin Dentin fosfoprotein ile boyama görüntüleri .....78

## KISALTMALAR DİZİNİ

AK: Alveol Kemik

AKKH: Alveol Kemik Kökenli Kök Hücre

ALP: Alkalen Phosphatase

AP: Apikal Papilla

APKH: Apikal Papilla Kökenli Kök Hücre

ATP: Adenozin Tri Phosphate

bFGF: Basic Fibroblast Growth Factor

BMP: Bone Morphogenic Protein

DAB: Di Amino Benzidin

DF: Dental Folikül

DFKH: Dental Folikül Kökenli Kök Hücre

DFP: Di İzopropil Fluorophosphate

Do: Seyreltme Oranı

DP: Dental Pulpa

DPKH: Dental Pulpa Kökenli Kök Hücre

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

FBS: Fetal Bovine Serum

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

HCl: Hidroklorik Asit

Hs: Sayılan Hücre Sayısı

IL: Interlökin

ISCT: International Society of Cellular Therapy

KİKH: Kemik İliği Kökenli Kök Hücre

LFA-1: Leucocyte Function Antigen-1

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

MMP-2: Matrix Metallo Proteinaz-2

MSCs: Mesenchymal Stem Cells

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

OKKH: Oral Kavite Kök Hücresi

PBS: Phosphate Buffer Saline

RNA: Ribo Nükleik Asit

SDPKH: Süt Dişi Pulpası Kökenli Kök Hücre

SHEDs: Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth

SHH: Sonic Hedgehog Gene

Ss: 0,1 mm<sup>3</sup>'deki Sayım Sonucu

SSC: Sodium Saline Citrate

Tdt: Terminal Deoxynucleotide Transferase

TGF  $\beta$ 3: Transforming Growth Factor Beta 3

Wnt: Wingless Type

YD: Yağ Dokusu

YDKH: Yağ Dokusu Kökenli Kök Hücre

## BÖLÜM I

### 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kök hücreler canlı organizmaya ait bütün dokuları ve organları oluşturan temel hücrelerdir. Farklılaşmamış olan bu hücreler, bir canlının vücudunda çok uzun süre bölünmeye devam ederek kendini yenileyebilen ve bu sayede en az iki farklı hücre tipine farklılaşabilen hücrelerdir. Bu iki özellik, bir hücrenin kök hücre olarak adlandırılabilmesi için mutlaka gereklidir (3,15,92,95,121).

Bilim ve teknoloji alanındaki son gelişmelerin ışığında, kök hücrelerin kanser ve immün hastalıklar, sinir sistemi hastalıkları ve hasarları, kalp hastalıkları, kemik hastalıkları, organ/doku transplantasyonları ve daha birçok alanda kullanılması gündeme gelmiştir. Rejeneratif tıp açısından büyük umutlar vaadeden kök hücrelere ilişkin çalışmalar hızla devam etmektedir (1,52).

Kök hücrelerin güncelliğini arttıran ve bu hücreleri popüler yapan durum, embriyonik kök hücrelere ilişkin çalışmalar ile erişkin kök hücrelerin köken aldığı dokulardan diğer dokulara farklılaşabilme özelliklerini ortaya koyan (kök hücre plastisitesi) çalışmalardır (29,30,99).

Kök hücreler köken aldıkları kaynağa göre; "**embriyonik ve erişkin (postnatal, yetişkin, somatik) kök hücreler**" olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Embriyonik kök hücreler blastosistin iç hücre kitlesinden köken almakta olup vücuttaki bütün dokuları oluşturabilme yeteneğine sahiptirler (70,90).

Embriyonik kök hücrelerin klinik kullanımında; etik sorunların yanısıra seçici farklılaşmanın tam olarak sağlanamaması, teratom veya benzeri neoplazik oluşumlara yol açabilmesi ve elde edilen dokunun immünolojik uyumsuzluğu gibi sorunlarla karşılaşılabilir. Bu nedenle embriyonik kök hücrelere alternatif olarak "**erişkin kök hücre**" olarak adlandırılan ve somatik dokulardan elde edilebilen kök hücre kaynakları, özellikle de mezenkimal kök hücre kaynakları önem kazanmıştır (95).

Mezenkimal kök hücreler kendilerini yenileyebilme konusunda yüksek kapasiteye sahiptir. Ayrıca bu hücrelerin kırıkta, kemik, yağ dokusu, iskeletsel kaslar ve bağ dokusu stromasını oluşturabilen mezodermal türlere farklılaşma potansiyeline sahip olmaları (9), in vitro ortamda kolay çoğaltılabilir olmaları, gen transferi kolaylığının olması ve defekt bölgelerine migrasyon göstermeleri klinik kullanım açısından ilgi çekmektedir (101,124).

Günümüzde mezenkimal kök hücreler amniyotik sıvı, sinoviyal membran, kas dokusu gibi birçok değişik dokulardan elde edilse de MKH açısından en zengin kaynaklar; kemik iliği, periferik mononükleer hücreler, kordon kanı, fetal akciğer, karaciğer ve dalaktır. Oral kavitede bulunan alternatif mezenkimal kök hücre kaynakları üzerindeki araştırmalar ise hala devam etmektedir. Bu bölgede bulunan süt dişi pulpası, dental pulpa, apikal papil, dental folikül, periodontal ligament, periost, yağ ve alveol kemik dokusu gibi farklı dokulardan mezenkimal kök hücre elde edilmesine dair çalışmalar bildirilmiştir (36,81,127,128).

Herhangi bir nedenle oral bölgede veya dişlerde oluşan defektlerde, bölgesel dokulardan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin elde edilmiş

kolaylığının yanısıra lokal mikroçevre ortamında olmasına bağlı olarak bölgeye özel patolojilerin giderilmesi için de avantaj sağlayacağı düşünölmektedir (2).

Bu çalışmanın amacı, otolog olarak oral bölgeden kolay ve güvenilir biçimde elde edilebilen mezenkimal kök hücre kaynaklarının belirlenmesinin yanısıra bu hücrelerin odontojenik ve osteojenik aktivitelerinin ortaya konulmasıdır. Oral bölgeden kolay ve güvenilir biçimde izole edilebilen apikal papil, dental pulpa ve dental foliköl kökenli projenitör hücreler, kendini yenileme yeteneğine sahip olan hücrelerdir. Dental pulpadan izole edilen projenitör hücrelerin osteoblastlara, nöronlara ve odontoblastlara farklılaştığı, dental foliköldenki projenitörlerin ise adipozitlere, osteoblastlara ve sementoblastlara farklılaştığı öne sürölmektedir (131). Buna rağmen dental foliköl hücrelerinin odontoblastik potansiyeli ise günümüzde halen tartışmalı bir konudur.

Dental kökenli projenitörlerin osteojenik ve odontojenik aktivitelerinin belirlenmesi ile bu bölgedeki sert doku ve dental defektlerin tamirinde hem lokalizasyonu hem de uygulamadaki pratikliği ve güvenilirliği ile öne çıkan mezenkimal kök hücre kaynağı olabilme yetenekleri incelenecektir. Ayrıca alveol kemik ve yanak yağ dokusunun oral bölgedeki diğer mezenkimal kök hücre kaynağı oldukları bilinmesine rağmen bu konu ile ilgili fazla çalışma olmaması nedeniyle bu iki doku grubu da çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmalarımız ile literatüre yeni mezenkimal kök hücre kaynaklarının sunulması ve oral bölgedeki farklı dokulardan elde edilen kök hücrelerin,

çoğalma yetenekleri ile osteojenik ve odontojenik farklılaşma kapasitelerinin karşılaştırılmaları hedeflenmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kök Hücre

Kök hücre, canlı organizmaya ait bütün dokuları ve organları oluşturan, uzun süre bölünmeye devam ederek kendini yenileyebilen ve bu sayede en az iki farklı hücre tipine dönüşebilen farklılaşmamış temel hücredir. Bu özellikler, bir hücrenin kök hücre olarak adlandırılabilmesi için yeterlidir.

Kök hücrelerin, kas, karaciğer, deri hücreleri gibi belirlenmiş herhangi bir spesifik fonksiyonları bulunmamaktadır. Bu yüzden dış ortamdan aldıkları sinyallere göre farklı hücre tiplerine dönüşebilirler. Bunu belirleyen en önemli etkenler de genler ve dış uyaranlardır. Vücudumuzdaki herhangi bir hücre grubunda ölüm ya da hasar meydana gelince kök hücreler hangi hücreye ihtiyaç varsa o hücreye dönüşüm gösterirler (3,1515,92,95,121).

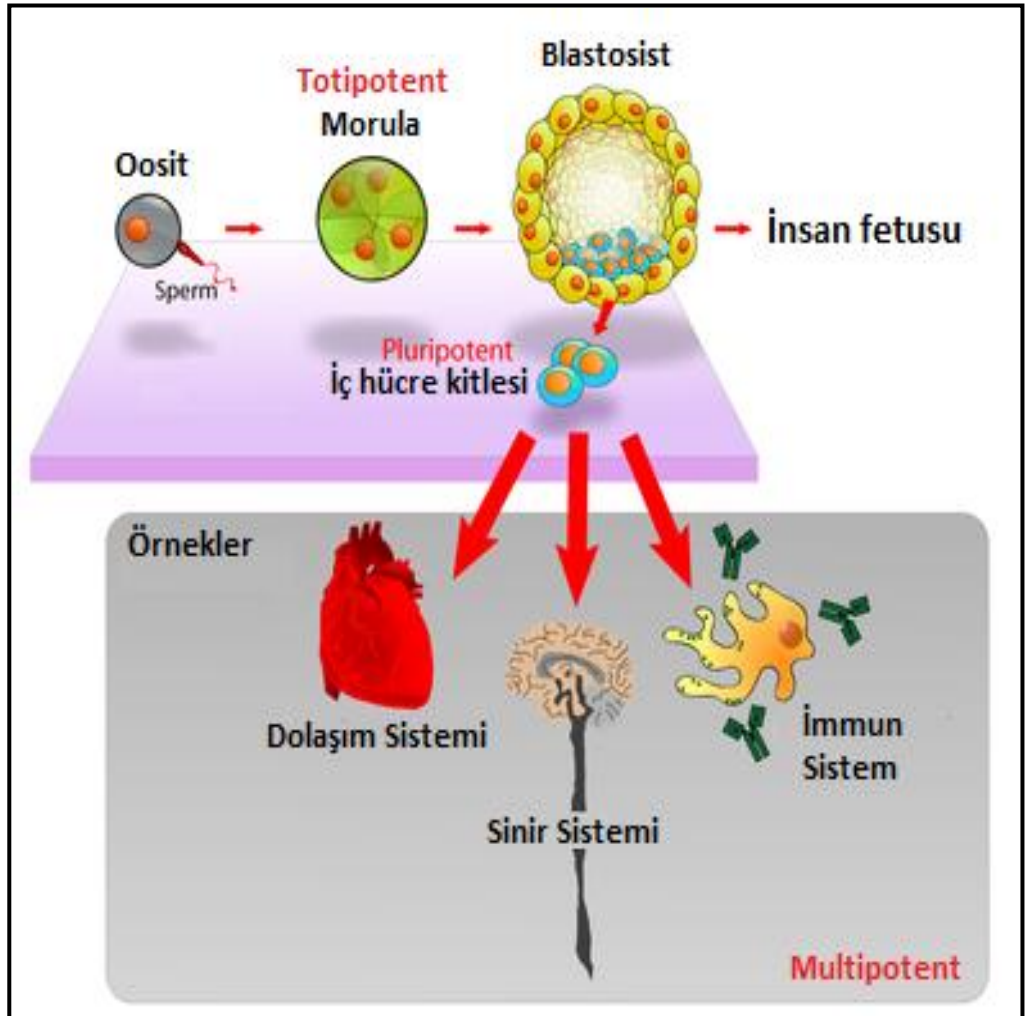
#### 2.1.1. Kendini Yenileyebilme

Kendini yenileyebilme, hücrelerin orijinal karakteristik özelliklerini kaybetmeden doğru şekilde ve çok sayıda bölünebilmesini ifade eder (3,15).

#### 2.1.2. Farklı Hücre Dizilerine Farklılaşma

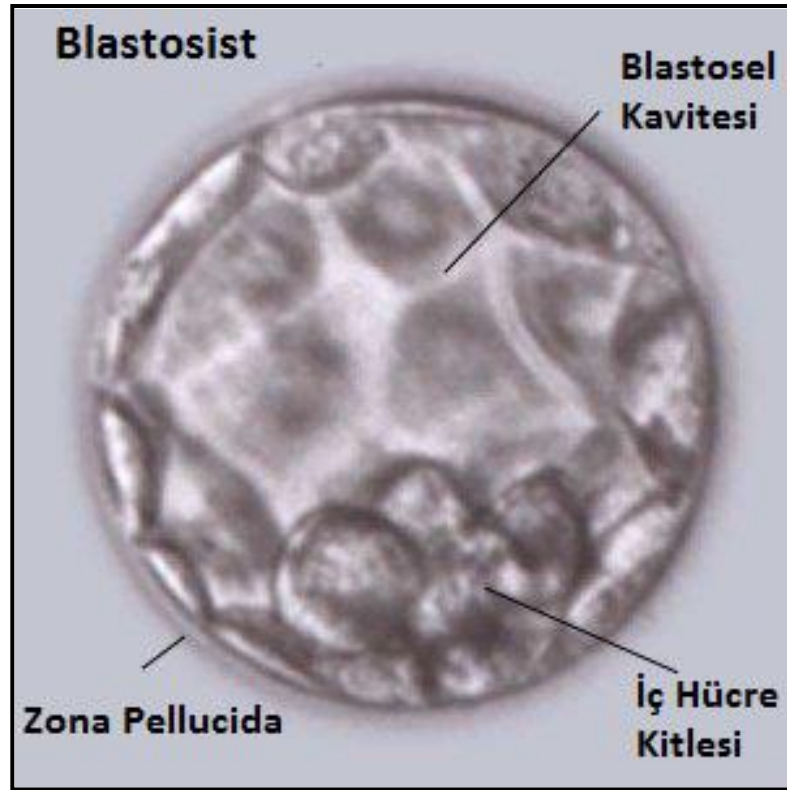
Tüm kök hücrelerin ortak özelliklerinden biri olan plastisite; hücrenin köken aldığı dokudan farklı dokulara farklılaşabilme yeteneği olarak tanımlanır (71). Kök hücreler gelişimsel yönden köken aldıkları kaynaklara göre "**embriyonik (fötal)** ve **erişkin (post-natal) kök hücre**" olarak ikiye ayrılmaktadır (30). Embriyonik kök hücreler embriyodan köken almakta olup bütün vücut dokularını oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Erişkin

dokulardaki kök hücreler ise farklılaşmamış hücreler olup, genellikle için de buldukları dokuya ait olan hücre tiplerini üretirler (70,90). Erişkin kök hücrelerin farklılaşmaları embriyonik kök hücrelere göre daha kısıtlı olmakla birlikte, farklı kaynaklardan elde edilen erişkin kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin de benzer olmadığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. (2,57,105,130,133). Farklılaşma kapasitelerine göre "**totipotent, pluripotent** ve **multipotent**" olarak adlandırılan 3 tip kök hücre tanımlanmıştır (83).



**Resim 1.** Gelişimsel yönden köken aldıkları kaynaklara göre kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri (42,92)

Döllenme sonucu ortaya çıkan zigot tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Zigot oluşumunu takip eden 1-3 gün içerisinde bölünme ile meydana gelen 8 adet embriyonel hücreye "*totipotent hücre*" adı verilir. Totipotent hücreler tüm hücre tiplerini içeren tam organizmayı oluşturabilecek kapasiteye sahiptir. Döllenme sonrası 5. günde oluşan hücre kitlesine 'blastosist' adı verilir (Resim 2). Zigot oluşumundan sonraki 5 ile 14. günler arasında gelişen ve erişkin dokularda kısmi farklılaşma gösteren blastosistin iç tabakasındaki hücreler ise "*pluripotent hücre*" olarak tanımlanmaktadır. Pluripotent kök hücrelerin bilinen 200 çeşit hücre tipine farklılaşma potansiyeli olmasına rağmen bu hücreler tüm organizmayı oluşturabilme kapasitesinden yoksundurlar (49,71,85).



**Resim 2.** Blastosist ve iç hücre kitlesi (121)

Bu aşamadan sonra hücreler daha özel fonksiyonlara sahip olmakta ve erişkin dokularda kısmi farklılaşma göstererek "*multipotent hücre*" adını almaktadır (71,85).

Hücrelerin yaşam süreleri ile yakın ilişki gösteren telomeraz aktivitesi, embriyonik kök hücrelerde belirgin bir biçimde yüksektir. Telomeraz, hücre bölünmesi sonucunda kısa sıralı DNA zincirlerinde meydana gelen oksidatif DNA hasarı ile oluşan telomer kısalmalarını engelleyen enzimdir. Yüksek telomeraz aktivitesine sahip olan embriyonik kök hücreler ektoderm, mezoderm ve endoderm kaynaklı hücrelere farklılaşabilme yeteneğindedir (30). Embriyonik kök hücrelerin bu özelliği olası teratom oluşturma potansiyelleri nedeniyle klinik çalışmalara dezavantaj olarak yansımaktadır. Bir başka dezavantaj ise allojenik bağlamda kullanılmaları nedeni ile olası greft reddidir. Dolayısıyla embriyonik kök hücrelerin kullanımı ve çalışmaları ciddi etik sorunlar nedeni ile ülkemizde de olduğu gibi birçok ülkede kısıtlanmış ya da belirli kurallara bağlanmıştır. Bu nedenlerden ötürü embriyonik kök hücrelere alternatif olarak erişkin kök hücre kaynakları sunulmuştur (29,30).

## **2.2. Erişkin Kök Hücreler**

Embriyonun iç hücre kitlesi dışındaki kaynaklardan elde edilen kök hücreler, "*embriyonik olmayan kök hücreler*" adını alır. Embriyon dışı kök hücreleri genel olarak "*erişkin kök hücreleri* veya *dokuya özgü kök hücreleri*" olarak adlandırılır. Bu hücreleri destekleyen hücreler, mikroçevre olarak adlandırılan ve lokal bir bölge olan erişkin organizmasının kemik iliği,

kalp, böbrek, beyin, deri, göz, gastrointestinal sistem, karaciğer, pankreas, akciğer, meme, over, prostat ve testis gibi organlarında tespit edilmiştir (51).

### **2.2.1. Kök Hücre Mikroçevresi (Niş)**

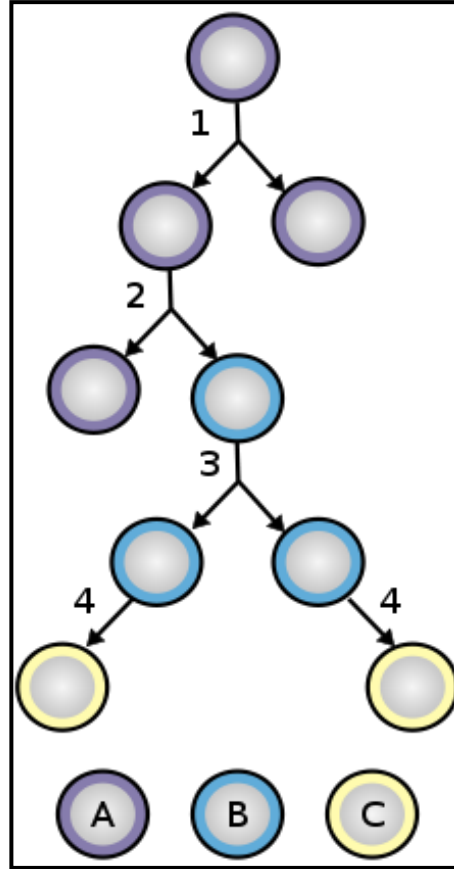
Kök hücrelerin, farklılaşma yetenekleri iç ortam genetik yolları ve dış ortam sinyallerinin etkisinde düzenlenmektedir. Kök hücreler kendilerine destek olan ve bu düzenleyici sinyallerin iletilmesine olanak sağlayan bir çevreye ihtiyaç duyarlar. **“Kök hücre nişi”** olarak adlandırılan bu mikroçevre, hücrelerin düzenlenmesi ve işlevlerinin kontrol edilebilmesi için gerekli hücresel ve moleküler faktörleri içermektedir. Bazı dokularda (deri gibi) bu mikroçevre hem kök hücreleri hem de bu hücrelerin öncülleri üzerinde düzenleyici etki göstermektedir (132).

Erişkin kök hücreleri, bir doku veya organdaki farklılaşmamış hücreler olup, mikroçevrelerindeki değişiklikleri takiben kendilerini yenileyebilme ve buldukları doku veya organın özel hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeline sahiptirler.

Erişkin kök hücrelerin asıl görevleri, buldukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır. Kök hücrelerin buldukları ortam, bu hücrelerin fonksiyonları üzerinde önemli etkilere sahiptir. Mikroçevreden kaynaklanan değişikliklerle, kök hücrenin gen ekspresyonundaki değişim yeni hücrelere farklılaşmasına yol açmakta ve yeni oluşan bu hücreler de dokuya uyum sağlamaktadır (38,51).

Günümüzde, erişkin organizmasında pek çok dokuda sessiz biçimde bölünmeden bekleyen kök hücreler olduğu düşünülmektedir. Bu hücreleri buldukları bölgede aktif hale geçirecek çevresel uyarıların, normalden çok daha düşük yada eksik olduğu sanılmaktadır (38,51).

Erişkin kök hücrelerin kendilerini yenilemeleri esnasında, her bir kök hücre simetrik bölünmeyle benzer iki kardeş kök hücre oluşturur. Farklılaşma esnasında ise kök hücreler asimetrik bölünme göstererek bir kardeş kök hücre ile bir kardeş ara geçiş kök hücrelerini oluştururlar (4).



**Resim 3.** Kök hücre bölünmesi ve farklılaşmasının şematik gösterimi (1) A. Kök hücre, B. Projenitör hücre, C. Farklılaşmış hücre, 1. Simetrik hücre bölünmesi, 2. Asimetrik kök hücre bölünmesi, 3. Projenitör bölünme, 4. Terminal farklılaşma (42)

Kök hücrelerin simetrik olarak bölünmesi tüm kök hücre hatlarının oluşumunu sağlayabilmekte ve kök hücre sayısı sabit kalmaktadır. Bunun nedeni, herhangi bir eksilmenin artışla dengelenmesidir (108).

Erişkin kök hücrelerin farklılaşma özelliğinin olabileceği, ilk kez kemik iliği transplantasyonu yapılmış olgularda non-hematopoetik dokulardaki donör hücrelerinin gösterilmesi ile olmuştur. Son yıllarda erişkin kök hücrelerin plastisitesilerini açıklayan yeni bir kavram gelişmiştir. Buna göre kök hücre farklı bir doku veya organa ait kök hücre fenotipini kazanabilir ve bazı durumlarda mezoderm, ektoderm ve endoderm hücreleri birbirine değişebilir (102). Bu yeni "kök hücre plastisite" kavramını açıklayan 5 farklı mekanizma vardır:

**1.Dediferansiyasyon:** Bir seriye ait matür bir hücrenin daha immatür bir hücreye diferansiye olmasından sonra farklı bir seriye ait hücreye diferansiyasyonu ile açıklanabilir.

**2.Transdeterminasyon:** Kök hücrenin farklı bir dokuya ait kök hücreye dönüşümü ile açıklanır.

**3.Transdiferansiyasyon:** Diferansiye olmuş bir hücrenin farklı bir dokuya ait ve diferansiye olmuş hücre fenotipini kazanması ile açıklanabilir.

**4.Hücre füzyonu:** Klonlama sırasında matür bir hücre çekirdeğinin enükleasyon ile çekirdeği çıkarılmış ovuma verilmesi sonucunda, hücrenin yeni bir programlanmaya gitmesidir.

**5.Totipotent kök hücreden spesifik multipotent doku hücrelerinin gelişmesidir (102).**

Erişkin kök hücreler, embriyonik kök hücrelerin aksine teratom oluşturma potansiyellerinin düşük olması, bireylerden doğrudan elde edilebilmesi ve hazır kök hücre kaynağı olarak görülmesi nedeniyle daha az etik problemlere yol açmaktadır. Ancak laboratuvar ortamında saflaştırılma, ayrıştırılma ve tanımlanma işlemlerinin embriyonik kök hücrelere göre daha zor olmasının yanısıra sınırlı bölünme kapasiteleri nedeniyle büyük miktarlarda elde edilmeleri oldukça güçtür. Ayrıca sadece belirli hücre tiplerine farklılaşabilme kapasitesine sahip olup alıcı dokularda daha fazla rejeksiyon tepkimesine neden olabilirler (12).

Erişkin kök hücrelerden en yaygın olarak çalışılanları "**hematopoetik kök hücreler** ile **non-hematopoetik kök hücrelerdir.**" Hematopoetik kök hücreler, kemik iliği, kordon kanı veya periferik kandan elde edilmektedir. Non-hematopoetik kök hücreleri olarak kategorize edilebilecek hücreler arasında ise en çok çalışılanı "**mezenkimal kök hücrelerdir (MKH)**" (96).

### **2.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler**

Embriyonik kök hücre çalışmalarının başarılı sonuçlarına rağmen kullanımındaki kısıtlamalar, alternatif olarak görülen erişkin kök hücre araştırmaları ile mezenkimal kök hücre uygulamalarını da ön plana çıkarmıştır.

Bu hücreler ilk kez 1976 yılında "Friedenstein" tarafından tanımlanmıştır. Stromal kökenli olmaları nedeniyle genel anlamda "**destek hücresi**" özelliği taşımaları, MKH'lerin tıbbın bir çok alanında kullanım potansiyeli taşımasının temelini oluşturmaktadır. Birçok dokudan elde edilebilen ve sayıca çoğaltılmaya elverişli olan dayanıklı hücrelerdir.

Salgıladıkları çözünebilir (solubl) faktörler sayesinde, içinde buldukları dokuya ait özel hücrelerin fonksiyonlarına önemli derecede katkıda bulunurlar (79,89).

Gelişim sırasında, nöral arktan köken alan mezenkimal kök hücrelerin göç ederek farklılaştığı ve daha sonra kemik, kıkırdak, periodonsiyum, ligamentler, kraniyal süturler, kas sistemi, tendonlar ve dişler gibi hemen hemen bütün kraniyofasiyal yapıların morfogenezinde mezodermal hücrelerle birlikte sinerjistik olarak çalıştığı bilinmektedir (69).

Mezenkimal kök hücreler asimetric bölünmeye uğradıkları zaman biri öncül hücre diğeri ise mezenkimal kök hücre olmak üzere iki farklı hücre verir (69). Bölünme sonucu ortaya çıkan mezenkimal kök hücreler, morfogenezin tamamlanmasıyla birlikte çeşitli dokular içerisinde yer almaya devam eder ve fizyolojik olarak gerekli olan doku yenilenmesi ve tamirinde görev alır.

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society of Cellular Therapy, ISCT) mezoderm kökenli bu hücrelerin "*kök hücre*" olarak adlandırılmasının yerine "*mezenkimal stromal hücre*" veya "*multipotent mezenkimal stromal hücre/ MSC*" olarak adlandırılmalarını önermiştir (25,39). Bununla birlikte, çeşitli çalışmalarda, hücrelerin konnektif dokular yanında endodermal ve ektodermal kökenli farklı hücrelere dönüşebilme özelliklerinin de gösterilmiş olması, bu hücrelerin halen birçok araştırmacı tarafından "mezenkimal kök hücre" olarak bahsedilmesine neden olmaktadır (15).

Günümüzde, mezenkimal kök hücrelerin karakteristik özelliklerinin tanımlaması hususunda araştırmacılar arasında bazı görüş ayrılıkları

yaşanmaktadır. Birbirinden çok da önemli farklılıklar içermeyen protokoller izlenerek MKH'lerin izolasyonu ve bu hücrelerin çoğaltılması, farklılaşmaya yönlendirilmesi için çeşitli metotlar kullanılmaktadır. Bu metotlar ile farklı dokulardan morfolojik ve biyolojik olarak benzer özelliklere sahip MKH'ler izole edilebilmektedir. Ancak yine de hücrelerin farklılaşma ve immünomodülatör özellikleri, in vivo etkinliği gibi konularda hücrelerin geliştirildiği mikroçevre koşullarına bağlı değişiklikler olduğu bildirilmektedir (48,75).

Özellikle doku mühendisliği ve hücre esaslı tedavi uygulamalarında farklı kaynaklardan elde edilebilecek olan kök hücrelerin birbirlerine karşı olan üstünlüklerinin saptanarak en uygun olan kaynağın seçilmesi önemli rol oynamaktadır. Böyle bir durumda, çeşitli yöntemlerle izole edilmiş ve farklı kıstaslara göre kök hücre olarak isimlendirilmiş bu hücrelerin, birbirleriyle biyolojik özellikleri ve deney sonuçları açısından doğrudan bir kıyaslanmanın yapılabilirliği ile ilgili karşıt görüşler ileri sürülmektedir. Elde edilen bu hücrelerin birbirleriyle kıyaslanması ile ilgili tartışmalar, MKH'leri tanımlayan uluslararası kriterlerin eksikliğinden kaynaklandığı sanılmaktadır. Bu nedenle, farklı kaynaklardan elde edilen MKH'ler ile ilgili kıyaslama çalışmalarının verimli olarak yapılamamasından ötürü bu konuda hızlı gelişmeler sağlanamamaktadır (25).

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği'nin (International Society of Cellular Therapy, ISCT) hem temel araştırmalar hem de pre-klinik çalışmalar için, insan MKH'lerin tanımlanması konusundaki yayınlamış olduğu gerekli kriterler tablo 1'de belirtilmiştir.

<b>1. Standart kültür koşullarında plastik adherensi olması</b>		
<b>2. Fenotip</b>	<u>Pozitif (%95 ≤ +)</u>	<u>Negatif (%2 ≥ +)</u>
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 veya CD11b
		CD79α veya CD19
		HLA-DR
<b>3. In vitro diferensiyasyon; osteoblast, adiposit, kondroblast</b>		

**Tablo 1.** ISCT (International Society of Cellular Therapy) tarafından MKH tanımlanması için belirlenmiş kriterler (25)

### 2.2.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerinin Tanımlanma Yöntemleri

Mezenkimal kök hücreler iğ şeklinde ve fibroblast benzeri hücre topluluklarıdır. Fibroblastlardan ayrılan en önemli özellikleri ise simetrik çekirdeğe sahip olmalarıdır. Kültür kabına adhezyon gösteren ve pasajlarda çoğalan stromal hücreler, MKH'ler olarak kabul edilirken, makrofajlar ve plazma hücreleri gibi kemik iliği stromasında bulunan diğer hücreler, tipik olarak kültür kabına adhezyon göstermezler (3).

Başka bir tanımlayıcı yöntem ise, hücre membranlarının adenozin tri fosfat (ATP) iyonları gibi ekstrasellüler uygulamalara karşı gösterdikleri duyarlılıktır. Makrofajlar ve hematopoetik hücreler, ekstrasellüler ATP iyonlarının uygulamasına karşı duyarlı oldukları gibi membranda yaralar açarak letal maddelerin içeri girişine de neden olmaktadır. Oysa MKH'ler ATP iyonlarına karşı duyarlı değildir (3).

MKH'lerin telomer uzunlukları kısa olmasına rağmen yüksek telomeraz aktivitesine sahiptirler. In vitro ortamdaki yüksek çoğalma kapasitelerine karşın normal karyotiplerini ve telomeraz aktivitelerini kaybetmezler (78,95). Aynı zamanda kültür ortamındaki MKH'ler yüksek düzeyde sitokin ve büyüme faktörü sentezlerler; bunlar: kök hücre faktörü (c-kit ligand), interlökin-7 (IL-7), IL-8, IL-11, transforming growth factor (TGF- $\beta$ ), cofilin, galectin-1, laminin-reseptörü-1, cyclophilin A, matrix metalloproteinaz-2 (MMP-2)'dir (3,74).

MKH'lerin küçük bir bölümü aktif olarak çoğalma eğilimi göstermekte olup (yaklaşık %10'u S+G2+M), diğer büyük çoğunluğu ise hücre döngüsünün G0/G1 fazında beklemektedir (17). Çok sayıdaki pasajdan sonra, MKH'ler geniş fakat kararsız yayılım göstermektedir. 30-40 katlanmanın üzerinde ise yayılım gösteremedikleri rapor edilmiştir (11,94). Bunun nedenlerinin;

- kök hücrenin elde edilme prosedürü,
- verici dokudaki projenitör hücrelerin frekansı ( $1 \times 10^6$  mononükleer hücreye karşın, 2-5 projenitör hücre),
- donörün yaşı ve genetik özellikleri gibi faktörlere bağlı olabileceği ve ileri alt kültürler sonrasında da hücrelerde yaşlanma ve hücre ölümleri gözlemlendiği öne sürülmektedir (8, 17,94).

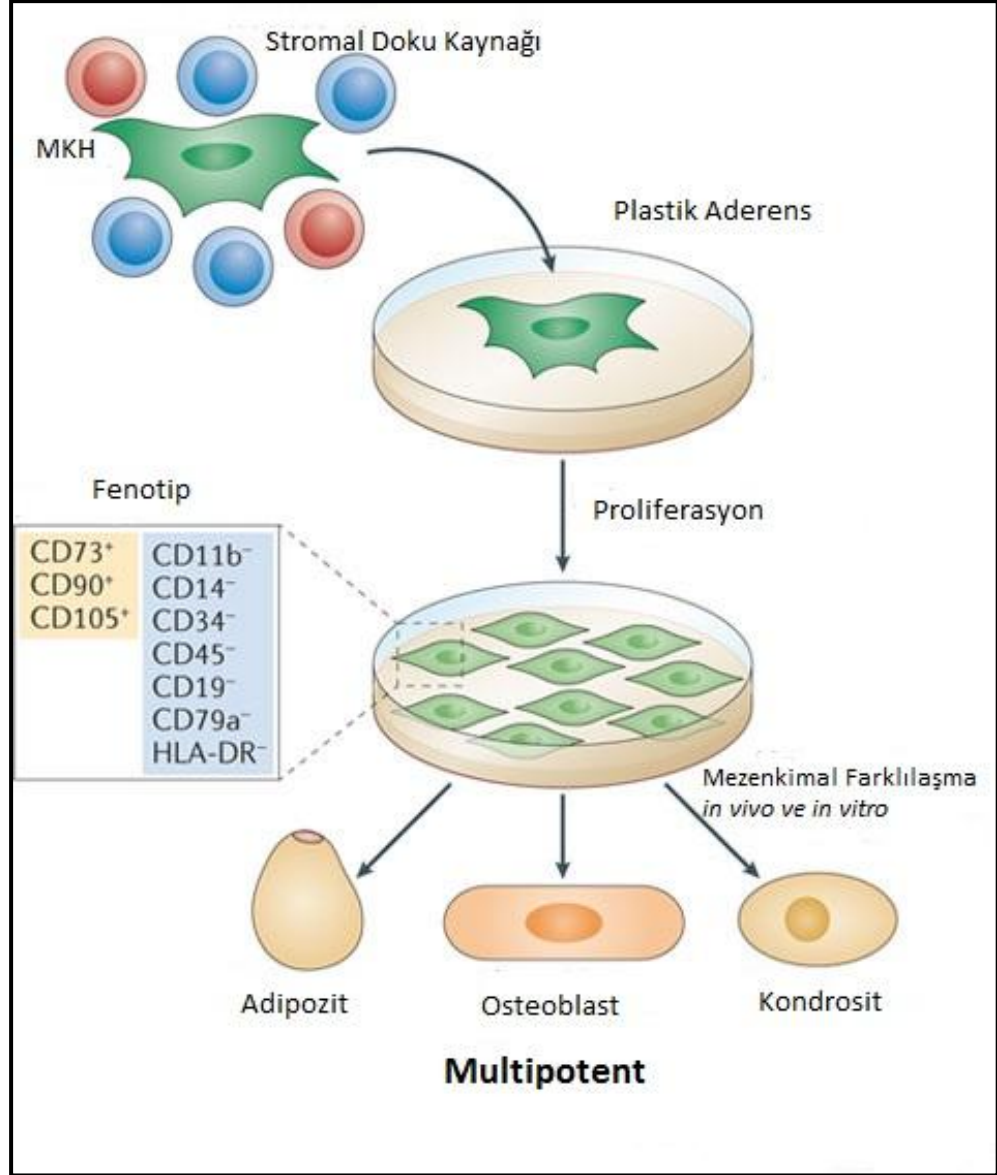
Günümüzde MKH'lerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan başlıca özellikler;

- Plastik adherens (plastik yüzeye yapışabilme)
- Spesifik yüzey antijenlerinin ekspresyonu
- Multipotent farklılaşma kapasitesidir.

#### **2.2.2.2. Plastik Adherens**

İlk olarak 1970'li yıllarda Friedenstein ve arkadaşları tarafından kemik iliği kökenli MKH'lerin izolasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada aspire edilen kemik iliğinin in vitro kültüründe, diğer hücrelerden farklı olarak plastik doku kaplarına yapışarak koloni oluşturabilen fibroblast benzeri hücre kolonileri rapor edilmiştir (32,88).

Standart koşullar altında kültüre bırakılan hücre topluluğunun içinden sadece küçük bir kısmı saatler içerisinde plastik doku kabının tabanına yapışmaya başlamaktadır. Plastik doku tabanına yapışma özelliği gösteren bu hücrelerin MKH'ler olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte MKH'ler, standart koşulların dışında çok özel koşullar sağlanarak doku kültür kaplarına yapışma sağlanmadan da çoğaltılabilmektedir (7). Halen günümüzde MKH'lerin izolasyonu için Friedenstein ve arkadaşlarının rapor etmiş olduğu basit yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır.



**Resim 4.** MKH'lerin in vitro koşullarda plastik adherens ve fenotipik özellikleri (63)

### 2.2.2.3. Spesifik Yüzey Antijenlerinin Ekspresyonu

Heterojen hücre topluluğu ile başlanan kültürlerde MKH popülasyonunun diğer hücre popülasyonlarından ayırt edilebilmesi için, hücrelerin izole edildikleri dokuya özgü olan antijenlerin negatif olması gerekmektedir. Bu hücrelerin, hematopoetik antijenleri (veya dokuya özgü antijenleri) taşımadıkları, buna karşın adhezyon, hücre-hücre, hücre-hücre

dışı matriks ilişkilerinde rol oynayan ve stromaya özgü antijenleri yüksek oranda eksprese ettikleri bilinmektedir. Sadece MKH'leri tanımlayan spesifik bir antijen henüz tanımlanmamıştır (25,48,75).

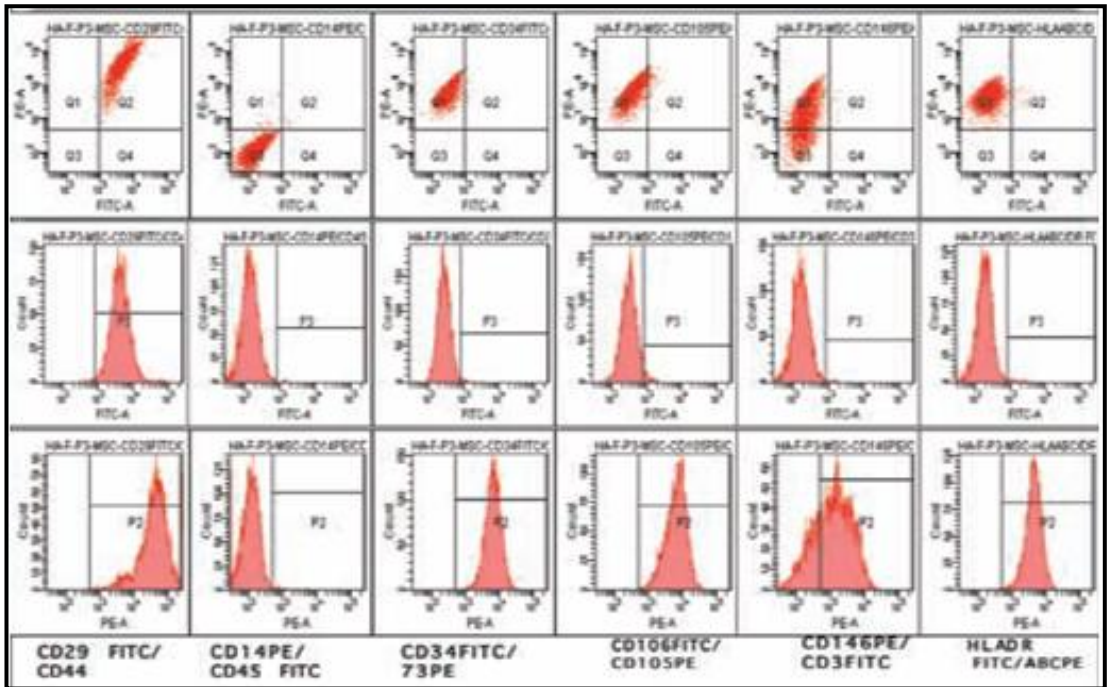
Kemik iliğinden elde edilmiş ve kültürde çoğaltılmış MKH'lerin akım sitometri ile immünofenotipik özellikleri detaylı olarak incelendiğinde, bu hücre popülasyonunda CD45, CD34, CD14 veya CD11b, HLA sınıf II, CD79 $\alpha$  veya CD19 ve gibi hematopoetik antijenlerdeki pozitiflik oranının %2'yi geçmemesi gerekmektedir (25). Buna karşın, MKH'lerde stroma ile ilgili tipik kabul edilen antijenlerden SH2 (CD105), SH3 -SH4 (CD73 ), CD90, CD29 , CD44 pozitifdir (32).

İşaretçi (Markır) Tipleri	Belirteçler
Spesifik antijenler	SH2, SH3, SH4, STRO-1, $\alpha$ -düz kas aktin, MAB1740
Sitokin ve büyüme faktörleri	Interlökinler: 1 $\alpha$ , 6, 7, 8, 11, 12, 14 ve 15, LIF, SCF, Flt-3 ligand, GM-CSF, G-CSF, M-CSF
Sitokin ve büyüme faktörü reseptörleri	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIFR, SCFR, G-CSFR, IFN $\gamma$ R, TNFIR, TNFIIR, TGF-IR, TGF- $\beta$ IIR, bFGFR, PDGFR, EGFR
Adhezyon molekülleri	Integrinler: $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 5 Integrin zinciri: $\alpha$ 1, $\alpha$ 2, $\alpha$ 3, $\alpha$ 4, $\alpha$ 5, $\alpha$ v, $\beta$ 1, $\beta$ 3, $\beta$ 4 ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM-1, LFA-3, L-selektin, endoglin, CD44
Ekstrasellüler matriks	Kollajen tip I, III, IV, V ve VI, Fibronektin, laminin, hiyalüronan, proteoglikan

**Tablo 2.** Kemik iliği kökenli MKH'lerin temel immünofenotipik özellikleri

Ayrıca yukarıda belirtilen markırların yanısıra MKH'lerin tanımlanmasında ek olarak birtakım belirteçler de dikkat çekmektedir. Bunlardan, hücre yüzey antijeni: STRO-1, diğer adezyon molekülleri ve sitokin büyüme faktörü reseptörleri: CD166, CD54, CD102, CD121ab, CD123, CD124, CD49'dur. Buna karşın MKH'ler de endotelial hücre belirteci olan CD31, lenfosit hücre markırı olan CD11a/LFA-1 ve diğer hematopoetik hücre markırı olan CD3, CD38, CD66b'e karşı negatiftirler (104).

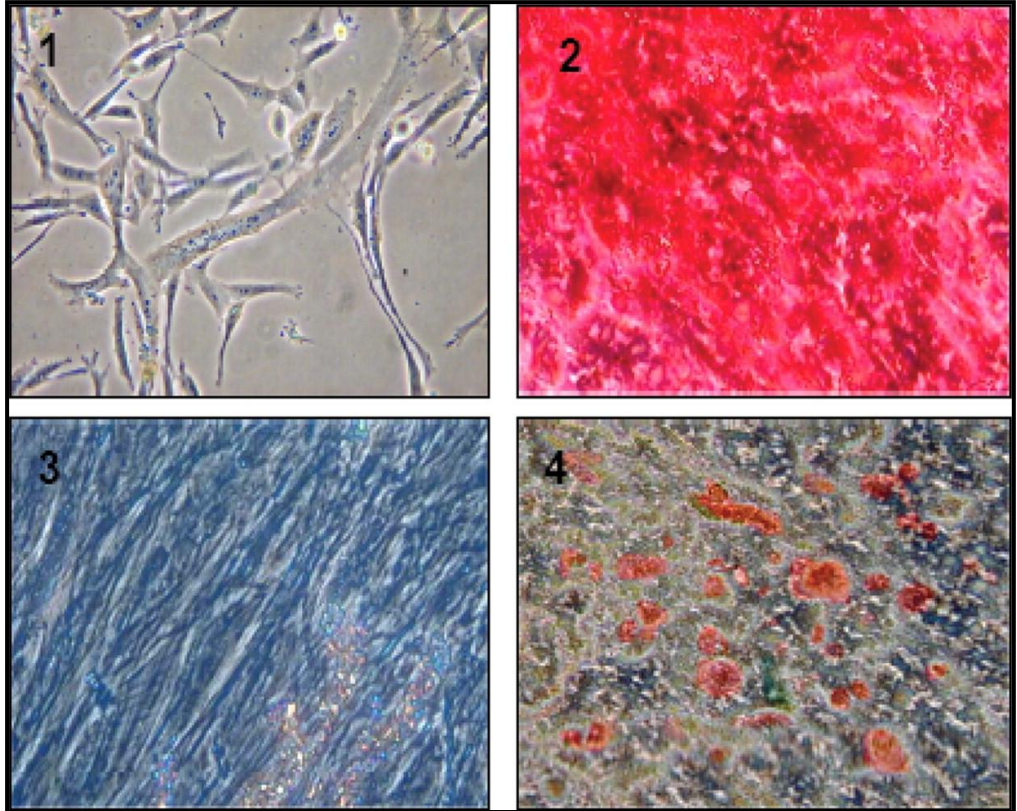
Uluslararası Hüresel Tedavi Derneği'nin kriterlerine göre ise; bir MKH popülasyonunun %95 veya daha fazlasının CD105 (endoglin olarak bilinir ve orijinal olarak MAB SH2 şeklinde tanımlanmıştır), CD73 (ekto-5-nükleotidaz olarak bilinir ve orijinal olarak MAB SH3/SH4 şeklinde tanımlanmıştır), CD90 (Thy-1 olarak da bilinir) antijenleri için pozitif olması gerekmektedir (7,32,68,88).



**Grafik 1.** In vitro ortamda çoğaltılmış insan MKH'lerinin akım sitometri yöntemi ile belirlenen fenotipik özellikleri (118)

#### 2.2.2.4. Multipotent Farklılaşma Kapasitesi

Mezenkimal kök hücrelerin, özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için en dikkat çekici özelliği, bu hücrelerin uygun mikroçevre koşullarında başta konnektif doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeli varlığının gösterilmiş olmasıdır. Araştırmacılar in vitro koşullarda ortama uygun stimülanların eklenmesiyle birlikte MKH'lerin, osteojenik, adipojenik, kondrojenik, miyojenik farklılaşma kapasitelerini ve hematopoetik stroma oluşturabildiklerini göstermiştir (14,88,95).



**Resim 5.** İnsan kaynaklı MKH'lerin in vitro kültür ortamındaki immünohistokimyasal görüntüsü, 1. Farklılaşmamış MKH, 2. Osteojenik farklılaşma, 3. Kondrojenik farklılaşma, 4. Adipojenik farklılaşma (82)

MKH'lerin in vitro ortamda osteoblastlara farklılaşması tek tabaka şeklinde yayılım göstermiş hücrelerin yaklaşık 2-3 hafta süreyle askorbik asit, deksametazon ve  $\beta$ -gliserofosfat muamelesi sonucu gerçekleşmektedir. Osteoblast öncüllerine farklılaşan hücreler küboidal morfoloji göstermektedirler (61). Bu koşullar büyük ölçüde etkili olmakla beraber osteojenik farklılaşma için kullanılan diğer indükleyici ajanların başında, kemik morfojenik proteinleri (BMP'ler) gelmektedir. Ancak BMP'ler yüksek konsantrasyonda (100 ng/ml gibi) uygulandığında alkalen fosfataz ya da kalsiyum depozisyonu indüksiyonunu engellemekte ve Msx-2 ekspresyonunu arttırmaktadırlar (123). Msx-2, osteoprojenitör hücrelerin farklılaşmasını inhibe eden bir transkripsiyon faktörüdür. Pozitif wingless (Wnt) sinyalinin MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını inhibe ettiği gösterilmiş (10) olmasına rağmen sadece alternatif koşullar altında indükleyici bir ajandır (123). Ayrıca, Wnt inhibitörü olan Dickkopf Dkk-1'in osteojenik farklılaşmayı inhibe ettiği de bilinmektedir (114).

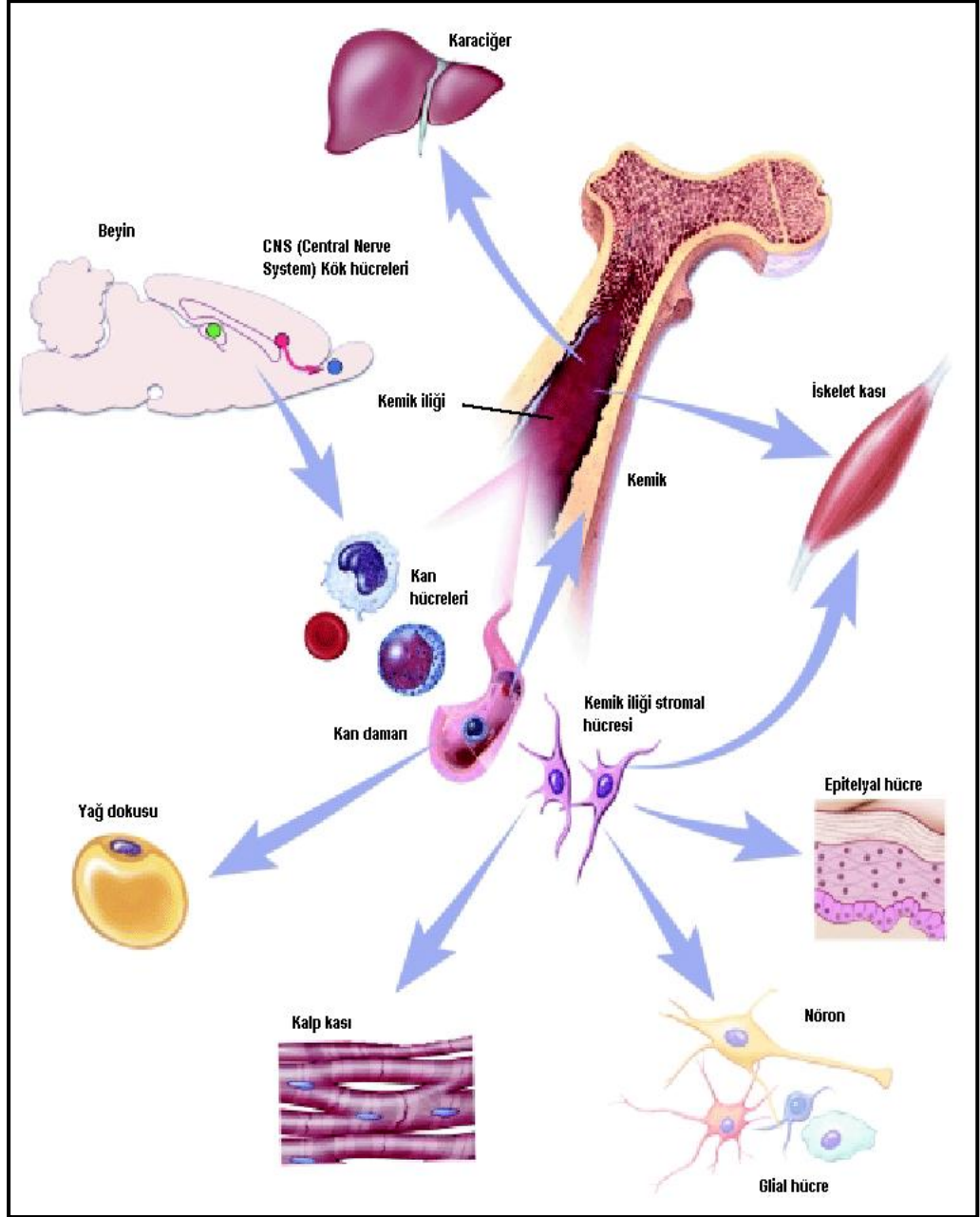
Osteojenik farklılaşma için  $\beta$ -gliserofosfat, askorbik asit , deksametazon ve fetal bovine serum içeren besiyeri kullanılarak yapılan kültürleme işlemi sonucunda, Alizarin kırmızısı veya Von Kossa boyaması ile osteoblastik hücre görünümleri, kalsiyum birikimi ve alkalen fosfataz ekspresyonunun gözlenmesi osteoblastik farklılaşma olarak değerlendirilir (95).

Kondrojenik farklılaşmada ise hücreler ilk pasaj sonunda polipropilen tüp içinde pellet oluşturacak şekilde santrifüje edilir ve üzerine TGF  $\beta$ 3 içeren besiyeri eklenerek kültüre edilir. Bu durumda hücreler fibroblastik karakterlerini kaybederek kartilajenöz spesifik ekstrasellüler matris özelliği

gösterirler. Kültür işleminin sonunda Safranin-O veya Alcian mavisi boyaları ile hücrelerin farklılaşma kapasiteleri değerlendirilir (67,109). Adipojenik farklılaşmayı ortaya koymak için ise hücreler deksametazon, 3-izobutil-1-metilksantin, rekombinant insan (Rh) insülini, indometazin ve serum içeren besiyeri ile kültüre edilir. Yaklaşık 3-4 pasaj sonunda Oil-Red O boyaması ile lipidden zengin vakuollerin intrasellüler birikiminin ortaya konması adipojenik farklılaşmanın gerçekleştiğini gösterir (67).

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile birlikte erişkin kök hücrelerin, köken aldıkları dokuya özgü hücrelerin dışında farklı dokulara ait hücrelere de farklılaşabilme kapasitelerinin olduğunu göstermekte olup bu durum 'kök hücre plastisitesi' olarak tanımlanmaktadır (53,59). Bu çalışmaların ışığında plastisite kavramının ön plana çıkmasıyla birlikte kemik iliğinden izole edilen kök hücreler ile yapılan araştırmalar sonucunda bu hücrelerin renal (97), myoblast (27), hepatik (113), endotel (100), kardiyak (87) ve nöral (76) hücrelere farklılaştığı rapor edilmiştir.

Organizmadaki mezenkimal kök hücrelerin birincil kaynağı olarak kemik iliğinin (98) gösterilmesine karşın, günümüzde periost (34), kas dokusu (13), dental pulpa (117) ve maksillofasiyal dokular (110), karaciğer, lipoaspirasyon materyalleri (134), kordon kanı, kordon stroması, plasenta, amniyon sıvısı (116), sinoviyal sıvı (20), periferik kan gibi birçok kaynaktan MKH izole edilebilmektedir. Kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücrelerin genç erişkin dönemde 1/10.000'i, erişkin dönemde 1/250.000'i ve 80 yaşından sonraki dönemde ise 1/2.000.000'i ancak MKH'dir (28).



**Resim 6.** Kemik iliği kökenli MKH'ler ile hematopoetik kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin şematik gösterimi (85)

Mezenkimal kök hücrelerin organizmadaki dokularda sınırlı ve az sayıda bulunması nedeniyle bu hücreler haftalar boyunca pasajlanarak in vitro kültür ortamında çoğaltılmaları gerekmektedir (95). Klinik kullanım açısından en büyük dezavantaj olarak gösterilen bu durum ciddi bir teknoloji, alt yapı ve tecrübe gerektirmektedir. Ayrıca maliyetinin yüksek olması

nedeniyle rutin klinik işlemlerde MKH kullanımı Avrupa'daki belli başlı merkezlerde uygulanmaktadır.

Günümüzde literatürlerde yer alan araştırmaların pek çoğu kültürlerde çoğaltılan MKH çalışmalarını kapsamaktadır. In vitro kültür ortamında haftalarca süren manipülasyonlar hücrelerin biyolojik özelliklerini olumsuz yönde etkilemekte ve yapılan çalışmalar in vivo ortamdaki patolojileri ve/veya fizyolojileri tam olarak yansıtmamaktadır. Ayrıca mikroorganizma kontaminasyonu, sitogenetik patolojilerin gelişimi, kültürde hücre yaşlanması, telomer kısalması ve kanser gelişimi gibi ciddi riskler araştırmacılar arasında halen tartışmalı bir konudur (62).

Mezenkimal kök hücrelerin klinik uygulamalarında karşılaşılan diğer bir önemli dezavantaj ise organizmaya verilen hücrelerin bu ortamda uzun süreli olarak canlılığını ve fonksiyonunu koruyamamasıdır (55,56).

Klinik uygulamalarda mezenkimal kök hücrelerin en önemli avantajı bu hücrelerin immünojenitesinin düşük olması ve immünosupresif olmalarıdır. Bu özelliklerinden dolayı tedavi amacıyla kullanıldıkları zaman herhangi bir doku reddi reaksiyonuyla karşılaşmazlar (62,64). Ancak, allojenik kök hücre tedavilerinde tekrarlayan infüzyonlara bağlı olarak immün reaksiyon gelişebilme riski söz konusudur (24). Bu durumda otolog kök hücre kullanımı ön plana çıkmaktadır. Otolog olarak elde edilen kök hücrelerin kullanımı ile konak dokuda gelişebilecek immün reaksiyon önlenerek rejeneratif klinik uygulamalarında güvenli bir biçimde kullanılabilir.

MKH'lerin klinik kullanım açısından diğer avantajları ise farklılaşma kapasitelerinin yüksek olması (59,95), migrasyon yetenekleri sayesinde

hasarlı dokuya kolayca ulaşabilmeleri (101,124) ve hasarlı hücreler ile füzyona uğramaları (5), solubl faktörler (kemokinler, sitokinler, büyüme faktörleri gibi) salgılayarak hasarlı hücre / doku tamirine katkı sağlamaları (106), gen transferi kolaylığı ve dayanıklı olmaları nedeniyle gen tedavisi için uygun olmaları sayılabilir (23). Ayrıca konnektif doku kökenli olmaları nedeniyle stromal destek sağlayarak ilgili doku hücrelerinin gelişimine ve fonksiyonuna yardımcı olurlar (89,95,101,124).

Kök hücrelerin izolasyonu için kemik iliği elverişli bir kaynak olmasına rağmen lokal anestezi altında sınırlı miktarda hücre elde edilmesi nedeniyle genel anestezi altında işlem yapılması gerekliliği doğmaktadır. Ayrıca yapılan işlemin invaziv olması donör sahada morbidite riskini arttırmaktadır (86). Bu nedenlerden dolayı rejeneratif tıptaki klinik uygulamalarda çekincelere yol açmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda lokal anestezi altında kolay elde edilebilir, düşük maliyetli, morbidite riski minimal ve daha az invaziv olan kök hücre kaynaklarına yönelmeler görülmektedir. Bu bağlamda özellikle maksillofasiyal bölgedeki kök hücre kaynakları ön plana çıkmaktadır.

### **2.3. Maksillofasiyal Bölgedeki MKH Kaynakları**

Kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin kullanımında karşılaşılan sıkıntıların elimine edilmesi için araştırmacılar tarafından maksillofasiyal bölgede yer alan MKH kaynakları ile ilgili çalışmalar rapor edilmiştir. Bu bölgeye ait olan MKH kaynakları "*dental kökenli kök hücre kaynakları*" ve "*dental kökenli olmayan kök hücre kaynakları*" olarak iki ana başlıkta incelenebilir.

### 2.3.1. Dental Kökenli Kök Hücre Kaynakları

Günümüzdeki teknolojik gelişim ile birlikte yapılan güncel araştırmalar sonucunda dokuların gen düzeyindeki gelişim aşamaları anlaşılmaya başlanmıştır. Özellikle de alanımızla ilgili olan dişlerin sayı, şekil ve pozisyonlarını belirleyen genler bilinmektedir. Embriyologlar, dişlerin gelişimi sırasında oluşan sinyallerin epitelial ve mezenkimal doku bileşenlerinin arasında olduğunu bildirmişlerdir. Üzerinde en çok çalışılan etkin uyarıcılar fibroblast büyüme faktörü (FGF), kemik morfogenetik proteinleri (BMP), sonik hedgehog genidir (SHH) (77,126).

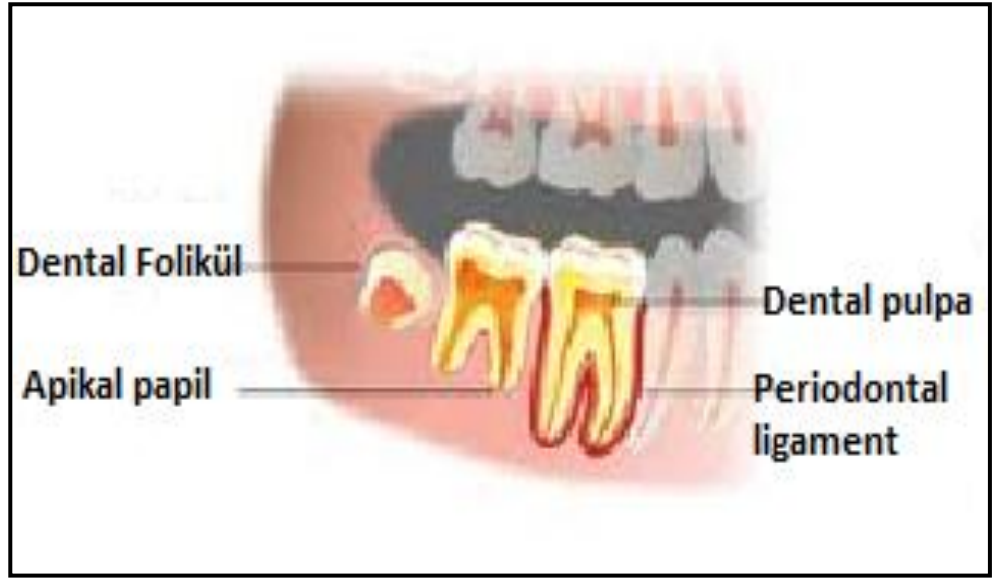
Fibroblast büyüme faktörünün (FGF) periodontal rejenerasyon ve yara iyileşmesinde etkili olduğu fare çalışmalarında in vivo olarak belirlenmiştir (77). Sonik hedgehog (SHH) geni ise, ektoderm ve mezodermden türeyen dokuların oluşumunda tamamlayıcı bir uyarıcıdır. Dişlerin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. (84). Kemik morfogenetik proteinleri (BMP)'nin yeni amputasyon yapılmış dişlerde tamir edici dentinogenezisi uyardığı bildirilmektedir. Bu proteinler, diş gelişiminin başlamasını sağlamaktadır (45,77).

Dental epitelden elde edilen kök hücrelerin (ektodermal kök hücreler) dışındaki diğer dental kökenli kök hücrelerin tümü, nöral ark kaynaklı ektomezenkimal hücrelerdir. Bu kök hücreler, dentin ve diğer diş dokularının gelişimi ile hücresel farklılaşma süreçlerine katılmaktadır (120).

Süt dişleri, mesiodensler, artı dişler, gömük yirmi yaş dişleri ve ortodontik amaçlı çekilmiş dişler gelecekte rejeneratif tedavilerde kullanılabilecek önemli bir MKH kaynakları olarak görülmektedir. Kişinin kendi

hücrelerinin depolanması; allojenik kök hücrelerin kullanılması ile ilgili immünolojik ve etik zorlukların ortadan kalkmasını sağlayacaktır (126).

Maksillofasiyal bölgede yer alan dental kökenli kök hücre kaynakları; süt dişi ve dental pulpa dokusu (9,83), dental folikül (127), apikal papil, periodontal ligament (128) olarak tanımlanmıştır.



**Resim 7.** Dental kökenli kök hücre kaynaklarının şematik gösterimi (40)

### 2.3.1.1. Süt Dişi Pulpası

Süt dişlerinin damarsal yönden zengin olan pulpasından izole edilen kök hücreler "**süt dişi pulpası kök hücreleri (SDPKH)**" olarak adlandırılır. Uluslararası literatürlerde "**stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED)**" olarak bilinen bu hücrelerin içerisinde bol miktarda erişkin kök hücre kaynağı bulunmaktadır (80).

Son yapılan çalışmalarda özellikle süt keser dişlerin pulpalarında bol miktarda MKH bulunduğu rapor edilmiştir (80). Bu hücreler hızlı çoğalma

özelliklerinin yanısıra nöron, adipozit, osteoblast ve odontoblast gibi farklı hücre tiplerine farklılaşabilme kapasitesine sahip multipotent hücrelerdir (80,103). Her ne kadar kemik ve dentin benzeri sert doku formasyonunu indükleyebilme yeteneğine sahip olsalar da dentin-pulpa kompleksi oluşturamazlar (9,128).

SPDKH'leri çoğalma kapasiteleri bakımından kemik iliği ve dental pulpa kökenli MKH'lere göre üstün olmalarına karşın dentin-pulpa kompleksi oluşturabilme kapasiteleri göz önüne alındığında dental pulpa dokusu kökenli MKH'lerden ayrılırlar (128).

### **2.3.1.2. Dental Pulpa**

Dental pulpadaki damarların çevresinde yer alan ve "**dental pulpa kök hücreleri (DPKH)**" olarak adlandırılan hücre popülasyonunun MKH oldukları düşünülmektedir. 1990'lı yılların ortalarında, dental pulpadan öncül hücrelerin izole edildiği bildirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise, dental kökenli MKH'lerin gömük yirmi yaş dişlerinin pulpasından da izole edilebildiği belirtilmiştir. DPKH'lerin izolasyonu ve tanımlanması, ilk olarak 2000 yılında Gronthos ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (37).

Kemik iliğinden elde edilen kök hücrelere benzer bir immünofenotip gösteren, enzimatik olarak erişkin pulpa dokusundan izole edilebilen klonojenik ve proliferatif hücrelerdir (58). Multipotensi özelliği gösteren dental pulpa kök hücreleri osteoblast, odontoblast, nöron ve adipozitelere dönüşebilme kapasitesine sahiptir (80,90,128). Literatürdeki çalışmalarda bu hücrelerin kendilerini yenileyebilme ve odontoblastlara dönüşebilme yetenekleri sayesinde tübüler dentin yapımında rol aldıkları rapor edilmiştir.

Ancak odontoblastlara farklılaşma mekanizması ile ilgili araştırmalar halen deneysel aşamadır (36,37).

DPKH'lerinin kemik iliği kökenli kök hücrelerden, sahip oldukları hücre siklusu ile ilişkili genleri eksprese etmeleri nedeni ile ayırt edilebildiği belirtilmektedir. DPKH'lerinde, hücre siklusu aktivatörü olan siklin bağımlı kinaz-6 yüksek oranda eksprese edilmektedir. Bu yüksek ekspresyon DPKH'lerin neden daha yüksek bir proliferasyona sahip olduklarını açıklamaktadır (58,115).

DPKH'lerinin kolay izole edilebilmesi ve daha yüksek bir proliferasyon hızı göstermeleri, bu hücreleri kemik iliği kökenli kök hücrelerden üstün kılmaktadır. Ayrıca damarların çevresinde lokalize olan bu hücreler, kök hücre belirteci olan STRO-1 antijenini eksprese etmektedir (58,120).

Yapılan araştırmalara göre, kemik iliği kökenli MKH'ler ile dental kökenli (dental pulpa, süt dişi pulpası) MKH'lerin eksprese ettikleri yüzey antijenlerinin değerlendirilmesi tablo 3'te belirtilmiş ve dental pulpadan izole edilen MKH'lerin CD14, CD34 ve CD45 antijenlerini eksprese etmediği, buna karşın CD44, CD146, STRO-1 antijenlerini yüksek oranda eksprese ettikleri rapor edilmiştir.

Bu sonuçlara göre hücre yüzey antjenlerinin ekspresyonları hususunda kemik iliği kökenli MKH'ler ile süt dişi ve dental pulpa kökenli MKH'lerin büyük oranda benzerlik gösterdiği belirtilmiştir (115).

Yüzey antijeni	DPKH	SDPKH	KIKH
CD14	-	-	-
CD34	-	-	-
CD44	++	++	++
CD45	-	-	-
CD106	+	+/-	++
CD146	++/+/-	++/+/-	++/+/-
STRO-1	++/+/-	++/+/-	++/+/-
Tip I kollajen	++	++	++
Tip III kollajen	++/+	++/+/-	++/+
Osteokalsin	++/+	++/+/-	+/-
Osteonektin	++/+	++/+	++/+
Osteopontin	+/-	+/-	+/-

**Tablo 3.** Hücre yüzey protein ekspresyonlarının karşılaştırılması, DPKH: Dental pulpa kök hücresi, SDPKH: Süt dişi pulpası kök hücresi, KIKH: Kemik iliği kökenli kök hücre; (++) yüksek ekspresyon, (+) düşük ekspresyon, (-) negatif, (/) alt kültür (115)

### 2.3.1.3. Dental Folikül

Dental folikül, gelişim sürecindeki dişlerin mine ve dental papilla organlarının çevresini kese biçiminde saran, ektomezencim kaynaklı gevşek bir bağ dokusudur. Özellikle sürmemiş ve gelişmekte olan yirmi yaş dişlerinden kolaylıkla izole edilebilmektedir (81). Dental folikül dokusu ile yapılan kök hücre çalışmalarında, izole edilen hücrelerin farklılaşma kapasitelerinin oldukça yüksek olduğu; nöron, adipozit, sementoblast ve osteoblastlara dönüşebildikleri rapor edilmiştir (54,120,127).

Yokoi ve arkadaşları, dental folikül dokusundan izole edilen projenitör hücrelerin periodontal ligamenti yeniden rejenere edebilme yeteneklerinin olduğunu bildirmişlerdir (129).

#### **2.3.1.4. Apikal Papilla**

Kök formasyonunu tamamlamamış dişlerin apikal bölgesinden izole edilen "**apikal papilla kök hücreleri (APKH)**", dental kökenli kök hücreler sınıflamasına yeni giren bir kök hücre kaynağıdır. Bu doku dentinogenezis döneminde dental pulpayı oluşturur ve kök formasyonunun tamamlanmasıyla birlikte ortadan kalkar. Bu yüzden sadece dişin olgunlaşma evresinde izole edilebilir (81).

Yapılan çalışmalarda periodontal ligament ve dental pulpa dokusu kökenli kök hücrelerine göre daha fazla proliferasyon kapasiteleri olduğu rapor edilmiştir (9,33). Ayrıca yüksek dentin rejenerasyon kapasitesine sahip olmaları nedeniyle kök dentininin formasyonunda yer alan primer odontoblast kaynağı olarak düşünülmektedirler (33).

#### **2.3.1.5. Periodontal Ligament**

İnsan periodontal ligament dokusundan mezenkimal kök hücrelerin belirlenmesi ve izole edilmesi ilk olarak Seo ve arkadaşları tarafından 2004 yılında gerçekleştirilmiştir (107). Çekilmiş dişlerin sement yüzeylerinden kolaylıkla izole edilebilen "**periodontal ligament kök hücreleri**" multipotenttir. Bu hücreler plastik adherens özelliklerinin yanısıra STRO-1, CD14, CD29, CD44 ve CD106 yüzey antijenlerini eksprese ederler (18) ve uygun kültür ortamında sementoblast, adipozit ve fibroblastlara dönüşebilmektedir (81).

Yapılan çalışmalarda, periodontal ligament dokusundan izole edilen kök hücrelerin in vitro koşullar altında zayıf osteojenik potansiyele sahip

olmalarına karşın periodontal rejenerasyon kapasitelerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (81,128). Bu özelliklerinden dolayı rejeneratif dişhekimliği alanında periodontal hastalıkların tedavisinde yeni bir alternatif oluşturmaktadır (18).

### **2.3.2. Dental Kökenli Olmayan Kök Hücre Kaynakları**

Maksillofasiyal bölgedeki dental kökenli olmayan MKH kaynakları periost, alveol kemik (133) ve yağ dokusu (130) olarak literatürdeki yerini almıştır.

#### **2.3.2.1. Periost**

Hayvan çalışmalarında periost dokusundan izole edilen MKH'lerin osteojenik potansiyele sahip olduğu rapor edilmiştir (133). Daha sonraki yıllarda insan maksilla ve mandibulasından izole edilen periosteal kök hücrelerin de in vitro olarak plastik adherent, klonojenik ve proliferatif oldukları belirtilmiştir. Ayrıca bu hücreler hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat matriks içerisine transplante edildiklerinde osteojenik formasyonu sağladıkları gözlenmiştir (16).

Osteojenik kapasiteleri bakımından kemik iliğinden ve alveol kemik dokusundan izole edilen MKH'ler ile karşılaştırıldığında, periosteal MKH'lerin diğerlerine göre daha üstün oldukları belirtilmiştir (133).

#### **2.3.2.2. Alveol Kemik Dokusu**

Alveol kemik iliği dokusundan izole edilen MKH'ler kendini yenileyebilme özelliği olan klonojenik ve multipotent hücrelerdir. Yapılan son

çalışmalarda bu hücrelerin in vitro koşullarda osteojenik farklılaşma yeteneğine sahip oldukları, bunun yanısıra sınırlı düzeyde adipojenik ve kondrojenik farklılaşma gösterdikleri rapor edilmiştir (72).

1998 yılında Lang ve arkadaşları, domuz kaynaklı alveol kemik iliği ve periodontal ligament dokusundan izole ettikleri progenitör hücrelerin kalsifiye doku adacıkları oluşturduğunu bildirmişlerdir (60).

### 2.3.2.3. Yağ Dokusu

İnsan yağ dokusundan izole edilen kök hücrelerin immünofenotip özellikleri kemik iliği kökenli kök hücreler ile benzerlik göstermektedir. Yaygın olarak kullanılan CD105, STRO-1 ve CD166 markırları yağ dokusu kökenli kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin identifikasyonu için kullanılmaktadır (21). Morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen **"yağ dokusu kök hücreleri (YDKH)"** kendilerini yenileyebilme özelliklerinin yanısıra klonojenik ve multipotenttirler. Kemik iliği kökenli kök hücreler gibi birçok farklı hücre tipine farklılaşabilen bu hücreler osteoblast, kondroblast, adipozit, myozit ve nöronlara dönüşebilme kapasitesine sahiptirler (22,134).

Wen ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada non-kollajenöz dentin proteini içeren dental folikül medyumu içerisinde kültüre edilen YDKH'lerinin, fibroblasta benzer morfolojilerini kaybettikleri ve proliferasyon kapasitelerinde de önemli derecede azalma olduğu gözlenmiştir. Ayrıca in vitro koşullarda mineralizasyon davranışları ve alkalin fosfataz aktivitelerinde artış olduğu, sementoblasta benzer morfolojiye dönüştükleri bildirilmiştir. Mineralizasyon ile ilgili markırlardan sement ataşman proteini, kemik sialoproteini, osteokalsin, osteonektin ve osteopontin bu hücrelerin mRNA'larında veya

protein seviyelerinde tespit edilmesine rağmen, dentin sialoprotein ve dentin sialofosfoprotein tespit edilememiştir. Buna göre YDKH'lerinin non-kollajenöz dentin proteini içeren dental folikül medyumu içerisinde kültüre edilmesiyle, sementoblast benzeri morfolojiye dönüştükleri ve periodontal hastalıkların tedavisinde yeni bir alternatif olabileceği rapor edilmiştir (122).

Araştırmalar sonucunda, YDKH'lerinin lokal anestezi altında "liposuction veya lipoaspirasyon" yöntemiyle kolayca elde edilebilir oldukları belirtilmiştir. Bu nedenle yağ dokusundan elde edilen kök hücreler rejeneratif tıp tedavilerinde oldukça önemli bir yere sahip olmaya başlamıştır (93).

Çalışmamızda oral kavitedeki alveol kemik, yağ dokusu ve dental (apikal papil, dental pulpa ve dental folikül) kökenli MKH kaynaklarından izole ettiğimiz hücrelerin osteojenik ve odontojenik aktiviteleri incelenmiştir. Kolay elde edilebilmesi, düşük maliyetli olması ve morbidite riskinin sifıra yakın olması gibi nedenlerle oldukça cazip hale gelen dental kökenli MKH'lerin, doku mühendisliğinin yardımı ile klinik anlamda kullanılmaları bakımından olasılıklar irdelenmiştir.

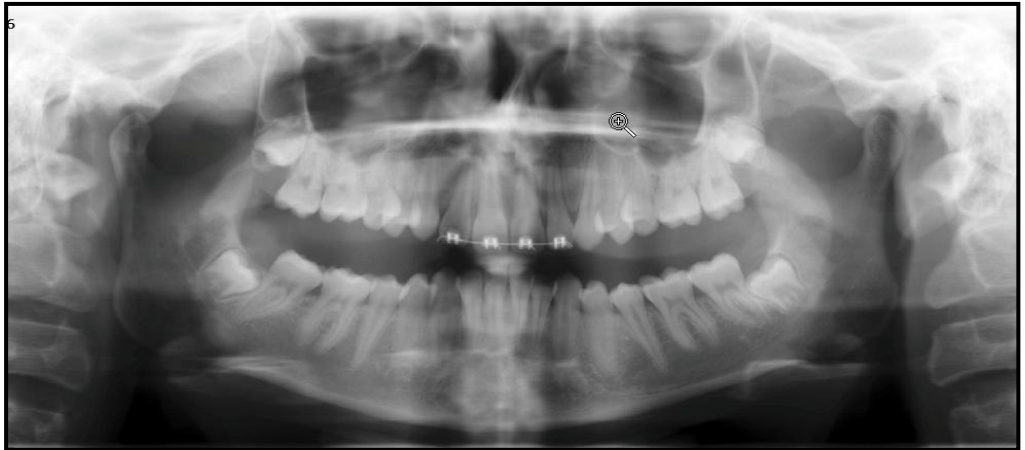
## BÖLÜM II

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Etik Kurul

Çalışmaya "Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurul" onayı alındıktan sonra başlanarak uygun kriterlere sahip olan hasta grubu çalışmamıza dahil edildi. Doku örneklerinin elde edilmesinden önce tüm hastalara detaylı bir şekilde hazırlanmış olan "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" okutularak imzalatıldı.

Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı kliniğine başvuran, ortodontik tedavi görmekte/görecek olan ve profilaktik olarak çekim endikasyonu konulan kök gelişimini tamamlamamış gömük 20 yaş dişine sahip olan (18-24 yaş aralığındaki) hastalar ile birlikte, üst çene arka bölgede yer alan diş çekimine bağlı oluşan sinüs perforasyonu bulunan (18-24 yaş aralığındaki) hastalar çalışmaya dahil edildi.



**Resim 8.** Çalışmaya dahil edilen ve ortodontik tedavi görmekte olan hastanın radyolojik görüntüsü

Gömük 20 yaş diş operasyonu yapılan 5 hastanın herbirinden dental folikül dokusu, diş ve alveol kemik dokusu örnekleri elde edilmiştir. Sinüs perforasyonu bulunan 2 hastadan ise yanak yağ dokusuyla sinüs kapatma işlemi esnasında yağ dokusu örnekleri alınmıştır. Ayrıca üst çene gömük yirmi yaş diş operasyonu esnasında sinüs perforasyonu gözlenen bir hastadan da incelenmek üzere tüm doku örnekleri (dental folikül, diş, alveol kemik ve yağ dokusu) elde edilmiştir (Tablo 4).

	Cinsiyet	Yaş	Dental Folikül	Dental Pulpa	Apikal Papil	Alveol Kemik Dokusu	Yanak Yağ Dokusu
1.Hasta	Erkek	24	-	-	-	-	+
2.Hasta	Kadın	22	-	-	-	-	+
3. Hasta	Kadın	22	+	+	+	+	-
4. Hasta	Kadın	19	+	+	+	+	+
5. Hasta	Erkek	20	+	+	+	+	-
6. Hasta	Kadın	22	+	+	+	+	-
7. Hasta	Kadın	19	+	+	+	+	-
8. Hasta	Kadın	19	+	+	+	+	-
Toplam			6	6	6	6	3

**Tablo 4.** Çalışmaya dahil edilen hastaların cinsiyet/yaş bilgileri ve elde edilen doku örneklerinin tablo şeklinde gösterimi

### 3.2. Doku Örneklerinin Elde Ediliş Prosedürü

Tüm hastalara %0,2'lik klorheksidin içerikli ağız gargarası yaptırdıktan sonra operatif işlemlere başlandı. Gömük 20 yaş diş çekimleri, zarf insizyonunu takiben mukoperiosteal flep kaldırılarak gerçekleştirildi (Resim 9). Çekim sırasında yapılan osteotomi işlemi ile birlikte yaklaşık 2mm × 2mm × 1mm boyutlarında alveol kemik (AK) dokusu örnekleri alındı. Ayrıca çalışma dahilinde sinüs perforasyonu gözlenen hastalarda, yanak yağ (YD) dokusu flebi kaydırılarak rutin sinüs kapatma işlemi uygulandı. Bu işlem

sırasında incelenmek üzere yaklaşık 5mm uzunluğunda yağ dokusu örnekleri de elde edildi.

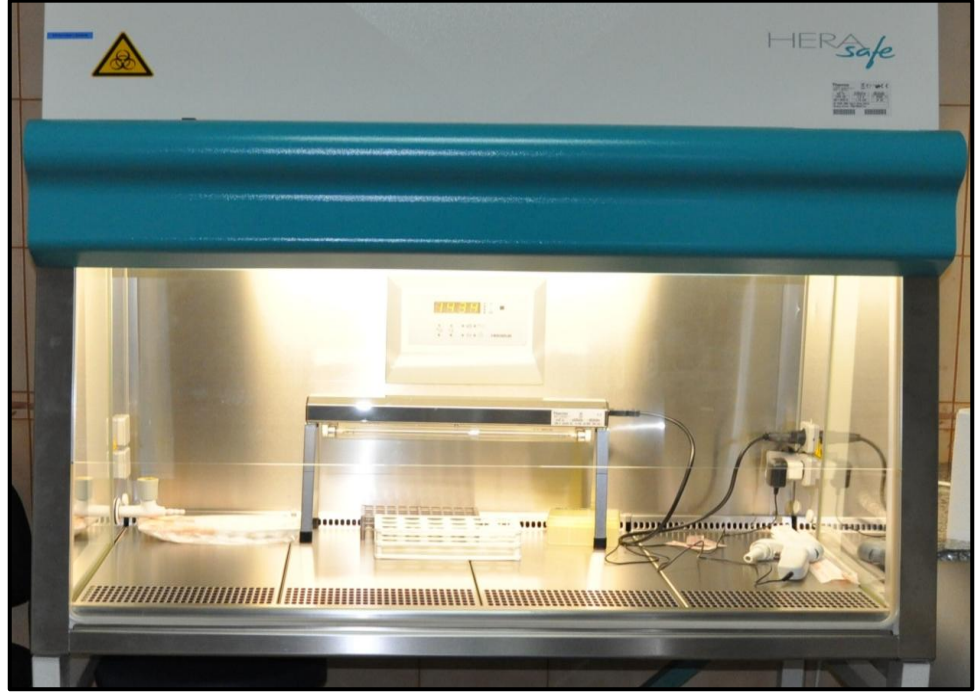


**Resim 9.** Ortodontik tedavi görmekte olan hastadan kök formasyonunu tamamlamamış diş örneğinin elde edilişi

Laboratuvar işlemleri için elde edilen diş, dental folikül (DF), alveol kemik ve yağ dokusu örnekleri %70'lik alkolden geçirildikten sonra içerisinde %5 oranında penisilin/streptomisin içeren  $\alpha$ -MEM besiyeri (Phospate Buffer Saline-PBS-taşıyıcı solüsyonu) bulunan falkon tüplerine alınarak buz kalıplar içerisinde muhafaza edildi. Daha sonra alınan tüm örnekler MKH araştırmasında kullanılmak üzere Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Farmakoloji Araştırma Laboratuvar'ına ulaştırılarak yaklaşık 1 saat içerisinde işleme alındı.

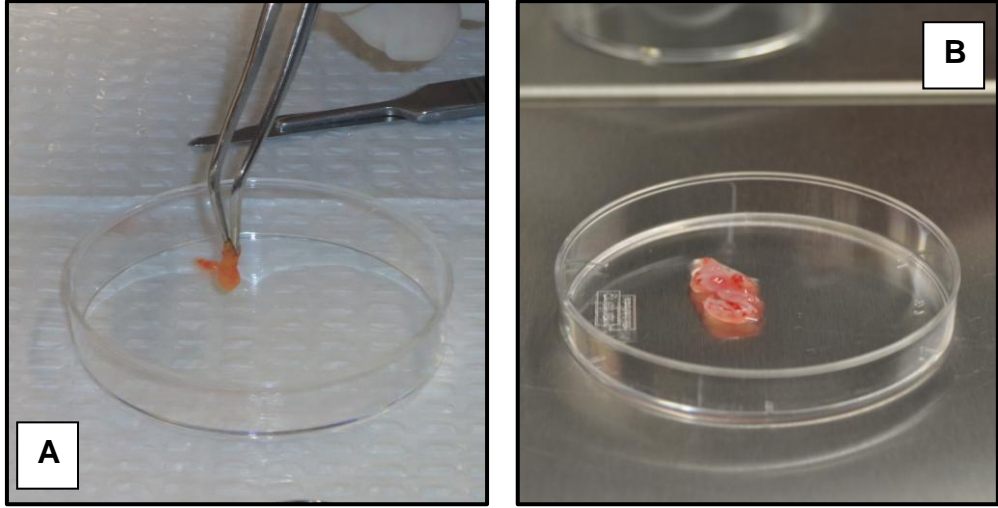
### 3.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültüre Edilmesi

Tüm doku örneklerinin kültür çalışmaları, kontaminasyon ihtimalinin önlenmesi amacı ile laminar flow (biosafety cabinet class II) cihazının içerisinde yapıldı (Resim 10).

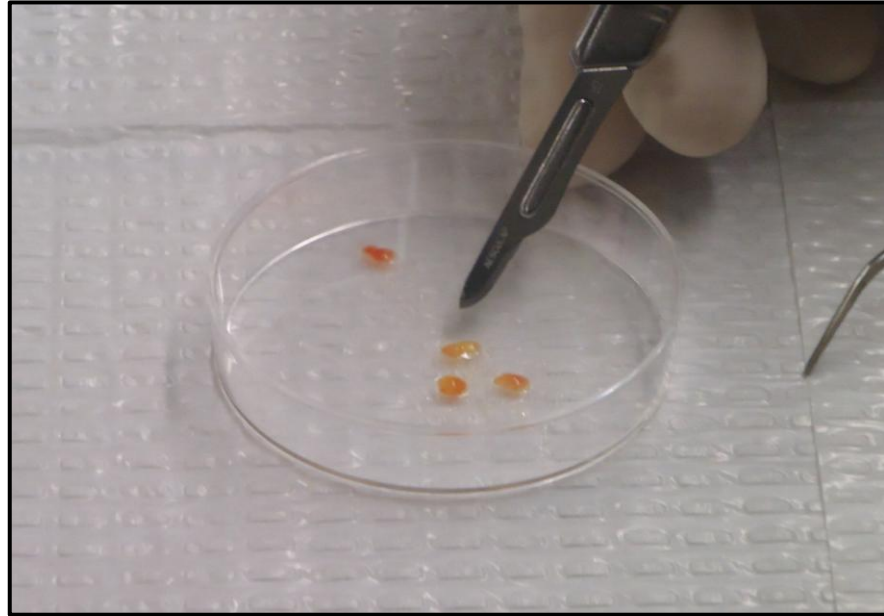


**Resim 10.** Kültür çalışmalarının yapıldığı laminar flow (Herasafe biosafety cabinet class II) cihazı

Taşıyıcı solüsyon içeren tüplerde bulunan dental folikül, alveol kemik ve yağ dokularına ait örnekler tüplerin içerisinden çıkartılarak steril petri kaplarının içerisine alındı (Resim 11). Daha sonra yumuşak dokular enzimatik parçalanma öncesinde steril bir bistüri yardımıyla mekanik olarak küçük parçalara ayrıldı (Resim 12).



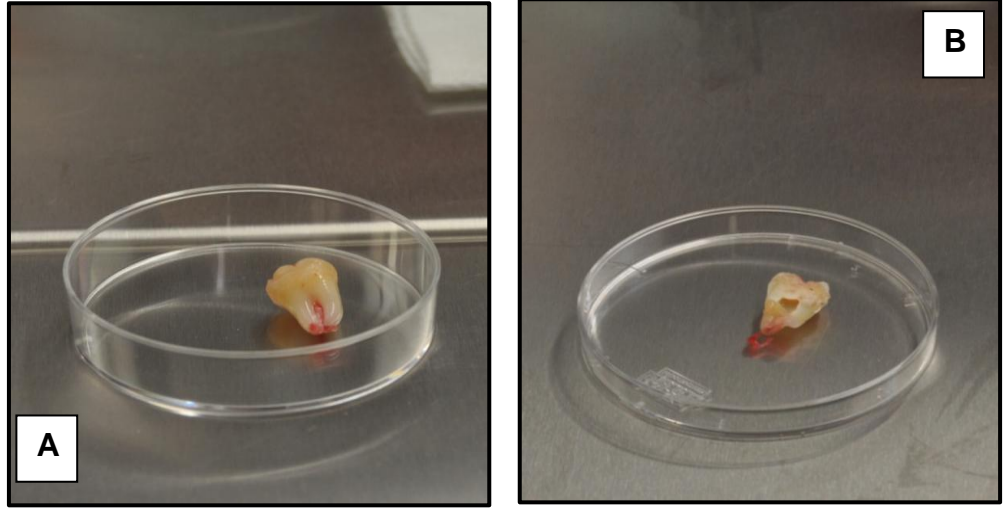
**Resim 11.** Doku örnekleri, A. Yağ dokusunun görüntüsü, B. Dental folikül dokusunun görüntüsü



**Resim 12.** Doku örneklerinin bistüri yardımıyla mekanik olarak küçük parçalara ayrılması

Dental pulpa dokusunun açığa çıkartılması ve MKH izolasyonu için, Gronthos ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntem kullanıldı (36). Dental pulpa (DP) ve apikal papil (AP) dokularının açığa çıkartılması için diş yüzeyindeki

gingival ve periodontal dokular kazınarak uzaklaştırıldı. Sterilizasyon amacıyla, diş %70'lik alkolden geçirildikten sonra steril gazlı beze sarıldı. Dişin yüzeyi üç kere %5 oranında penisilin/streptomisin içeren PBS solüsyonu ile yıkanarak temizlendikten sonra apikal papil ve dental pulpa dokularının izolasyonu işlemlerine geçildi.

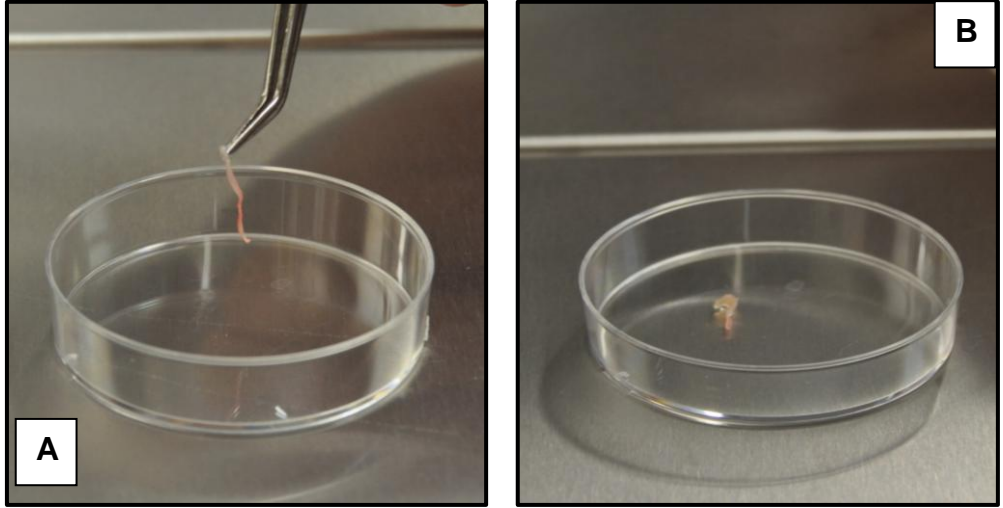


**Resim 13.** Doku örnekleri, A. Kök formasyonunu tamamlamamış diş örneğinin görüntüsü, B. Separe edilmiş diş görüntüsü

Öncelikle dişin apikal bölgesinde bulunan AP dokusu steril bir sond yardımıyla dişten ayıklanarak steril petri kabının içerisine alındı. Steril frezler yardımıyla serum fizyolojik soğutması altında tüm diş minesini zayıflatıldıktan sonra diş steril bir gazlı bezin içerisine sarılarak davye yardımıyla kırıldı (Resim 14). Doku pensleri yardımıyla pulpa dokusu zedelenmeden ayıklanarak steril petri kabının içerisine alındı (Resim 15). Bu işlemler tüm diş örnekleri ( 6 adet diş örneği) için ayrı ayrı gerçekleştirildi.

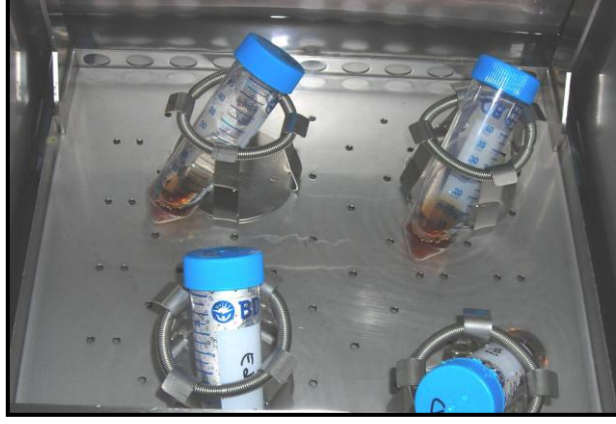


**Resim 14.** Mine dokusu zayıflatılan dişin davye yardımıyla kırılması



**Resim 15.** Doku örnekleri, A. Dental pulpa dokusunun görüntüsü, B. Apikal papil dokusunun görüntüsü

Elde edilen doku örneklerinden MKH'lerin izolasyonunu sağlamak için; tüm doku örnekleri ayrı ayrı olmak üzere 2mg/ml'lik tip 1 kollajenaz solüsyonunun içerisine koyularak, yaklaşık 1 saat boyunca 37°C'lik su banyosunda enzimatik parçalanma için bekletildi (Resim 16).



**Resim 16.** Mekanik olarak küçük parçalara ayrılan dokuların tip 1 kollajenaz solüsyonunun içerisinde 1 saat boyunca 37°C'lik su banyosunda enzimatik parçalanma için bekletilmesi (26)

İnkübasyon işleminin sonunda tüpler vortekslenerek (solüsyonların girdap oluşturacak şekilde iyici karıştırılarak homojenizasyonunun sağlanması), hücrelerin doku parçacıklarından ayrılıp, tek hücre süspansiyonu haline gelmesi sağlandı. Enzimatik olarak parçalanmış doku materyallerini içeren solüsyon 70µm'lik gözenekleri olan hücre süzgecinden geçirildi (Resim 17).



**Resim 17.** Mekanik ve enzimatik olarak parçalanan doku örneklerinin 70µm'lik gözenekleri olan hücre süzgecinden geçirilmesi (26)

Ayrıştırılan hücrelerin bulunduğu 15ml'lik konik tabanlı tüplere Hank's dengeleyici tampon çözeltisinden (HBSS) 5ml eklenerek, 1300rpm'de 5 dakika boyunca santrifüje edildi. Süpernatant kısım atılarak, 5ml HBSS eklenerek 1300rpm'de 5 dakika boyunca santrifüje edildi. İkinci kez yapılan santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra süpernatant kısım atıldı.

Son yıkama işleminden sonra elde edilen hücreler, %15 oranında Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 oranında penisilin/streptomisin içeren  $\alpha$ -MEM besiyerinde (T-25 kültür kaplarında), 37°C'de %5'lik CO<sub>2</sub> ve nemli ortam koşullarında (CO<sub>2</sub> inkübatöründe) kültüre alındı (Resim 18).



**Resim 18.** Hücre kültürlerinin 37°C'de %5'lik CO<sub>2</sub> ve nemli ortam koşullarında (CO<sub>2</sub> inkübatöründe) inkübasyona alınması (26)

Yaklaşık 48 saat sonra besiyeri değiştirilerek kültür kabının tabanına adhezyon göstermeyen hücreler uzaklaştırıldı. Sonraki günlerde hücreler düzenli olarak inverted mikroskopta (Resim 19) kontrol edilerek haftada 2 kez besiyerleri değiştirildi. Oral kavitedeki farklı kaynaklardan izole edilen kök hücrelerin kültivasyonunda, taze olarak %15 oranında FBS ve %1 oranında penisilin/streptomisin ilave edilmiş  $\alpha$ -MEM besiyeri kullanıldı.



**Resim 19.** Inverted faz kontrast mikroskobu yardımıyla hücrelerin sayımı ve canlılıklarının kontrol edilmesi (44)

Yaklaşık 16-18 gün sonunda hücreler kültür kabı yüzeyinin %70-80'ini kaplayana kadar besiyerinin değişimine devam edildi. Kültür kabının içerisinde adhezyon gösteren hücreler %70-80 oranında konfluente ulaştıkları zaman %0.25'lik tripsin-EDTA ile tripsinize edilerek adhezyon gösteren hücreler kaldırıldı ve solüsyon içerisine alınarak alt kültür işlemine geçildi.

Primer kültür sıfırncı pasaj (P0) kabul edilerek, primer kültürü takip eden her alt kültür işlemi sonrası pasaj sayıları P1, P2, P3, P4 şeklinde belirtildi.

Laminar flow cihazında gerçekleştirilen alt kültür işlemlerinde; besi ortamı ve kültür kabına adhezyon göstermeyen hücreler uzaklaştırıldıktan sonra, kültür flasklarının yüzeyleri 3-4ml  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  içermeyen PBS ile yıkandı. 1.5-2ml %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek,  $CO_2$  inkübatöründe 4-5 dakika boyunca inkübe edildi.

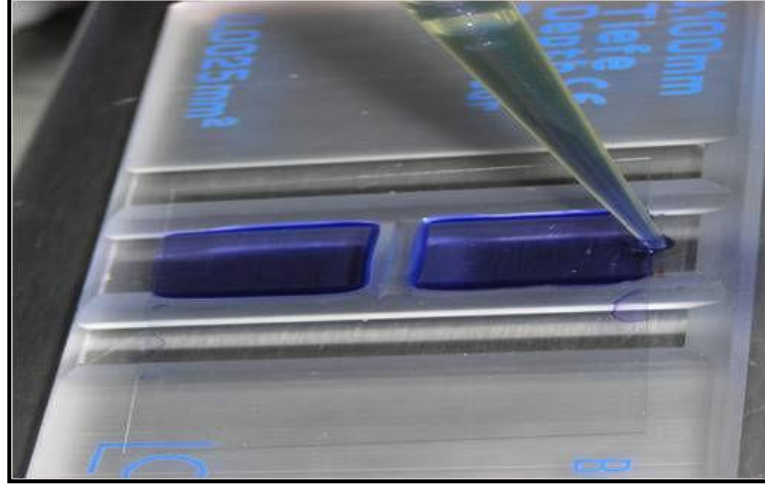
Mikroskopta hücrelerin tümünün yüzeyden ayrıldığı gözlemlendikten sonra, tripsinin inaktivasyonu için kültür flasklarına, 4ml besi ortamı eklendi. Daha sonra hücreler 15ml'lik konik tabanlı tüplere alındı ve 1300rpm'de 5 dakika boyunca santrifüje edildi. Süpernatant kısım atıldıktan sonra, pelete 1ml besi ortamı eklenerek pipetleme ile homojenizasyon sağlandı.

Hücre sayımı için eppendorf tüpüne mikropipetlerin yardımıyla 100µl hücre süspansiyonu alındı. Hücre süspansiyonunun üzerine, mikropipetle 100µl tripan mavisi solüsyonu eklendikten sonra inverted mikroskobunda hücre sayımı gerçekleştirildi. Sayımı gerçekleştirilen hücreler, uygun oranda besi ortamıyla seyreltilerek,  $1 \times 10^6$  hücre yoğunluğunda 75cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür flasklarına (T-75 kültür kaplarına) ekildi ve 3 günde bir besi ortamı değiştirilerek kültür işlemi devam ettirildi (31,50).

### **3.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Sayımı**

Oral kavitedeki farklı kaynaklardan izole edilen kök hücreler için; her alt kültür işlemi sırasında, dondurma/çözdürme işlemlerinin sonrasında ve karakterizasyon işlemlerinin öncesinde gerçekleştirilen hücre sayımları, Karaöz ve arkadaşlarının tanımlamış olduğu yöntemle uygun olarak gerçekleştirildi (50).

Hücre sayımı için; tripsinizasyon işlemi ile adhezyon gösteren hücreler yüzeyden kaldırıldıktan sonra süpernatant kısım atılarak pelete 1 ml besi ortamı eklendi ve pipetle homojenizasyon sağlandı. Eppendorf tüplerine 100µl hücre süspansiyonu alındı. Hücre süspansiyonunun üzerine, mikropipetle 100µl tripan mavisi solüsyonu eklendi (Resim 20).



**Resim 20.** Inverted faz kontrast mikroskobunda hücre sayımı öncesi Tripan mavisi solüsyonun mikropipetle eklenmesi (26)

Sayım kamarası olarak "*Thoma*" lamı kullanıldı. Thoma lamı, düz bir zemin üzerine alınarak, lamelin yapışması gereken sayım alanı çerçevesi üzerine lamel kapatıldı. Hazırlanan süspansiyondan 50µl alınarak Thoma lamının her iki yanında bulunan kanalların ortasında bulunan sayım alanında, lamelin lam ile birleştiği noktaya pipetin ucu dayanarak tam orta noktasından yavaşça hücre solüsyonu sayım alanına pipetlendi. Hücre sayımı, inverted faz kontrast mikroskobunda 40x objektifte gerçekleştirildi. Toplam hücre sayıları aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\mathbf{Hs \times Do \times Ss = \text{Toplam Hücre Sayısı}}$$

Hs: Sayılan hücre sayısı, Do: Seyreltme oranı, Ss: 0,1 mm<sup>3</sup>'deki sayım sonucu 1ml'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılır. Sabit sayı 10.000'dir.

### **3.5. İzole Edilen Hücrelerin Osteojenik ve Odontojenik Farklılaşmalarının Araştırılması**

İzole edilen hücrelerin immünohistokimyasal yöntemlerle karakterizasyon çalışmaları, P4'de poli-L-lizin kaplı 8 kuyucuklu hücre kültür odacıklarına ekilen  $2 \times 10^5$  hücre/kuyucuk ile gerçekleştirildi. Tutunmanın sağlanması için bir gecelik inkübasyon muamelesinin ardından immünohistokimyasal işlemlere geçildi.

Oral kavitenin farklı bölgelerinden izole ettiğimiz MKH'lerin identifikasyonu için; STRO-1, CD105, C-KIT ve CD45 boyamaları gerçekleştirildi. İmmünohistokimyasal çalışmalarda, uygun bir immünohistokimya kiti ve bu kitle uyumlu biyotinli sekonder antikorlar kullanıldı.

Hücreler immünohistokimyasal çalışmalar için %4'lük paraformaldehitte 20 dakika süresince fiksasyona maruz bırakıldı. Daha sonra PBS ile yıkayıp, %0.1 oranında  $H_2O_2$  içeren metanolde endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için, oda ısısında (nemli ortamda) 10 dakika süreyle inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra, Triton 100x ile buz üzerinde 15 dakika muamele edildi ve tekrardan PBS ile yıkayıp bloklama serumunda 1 saat bekletildi. Daha sonra uygun dilüsyonlarda primer antikorlar eklenerek 1 gece boyunca  $+4^\circ C$ 'te bırakıldı.

PBS ile yıkayıp sekonder antikorlar yani biotin ve streptavidin ile 30'ar dakikalık muameleden sonra tekrar PBS ile yıkayıp DAB (Diaminobenzidin) ile 10 dakika ve art alan boyaması içinde 1 dakika süreyle Mayers uygulaması yapıldı. Negatif kontroller için, aynı yöntem uygulanmış olup

primer antikor yerine PBS kullanıldı. Örnekler fluoressan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflandı (31,50).

### **3.5.1. İzole Edilen Hücrelerin Canlılık ve Çoğalma Testleri**

İzole edilen hücrelerin canlılık ve proliferasyonlarını tespit etmek için "MTT canlılık testi" uygulandı. Canlı ve apoptozisin erken evresindeki hücrelerin mitokondriyal aracılığıyla MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) solüsyonuyla oluşturduğu reaksiyonda, MTT'nin tetrazolyum halkası hücrelerin mitokondriyalarında bulunan dehidrojenaz enzimlerince parçalanarak mor renkli formazan kristallerini, ölü hücreler ise formazan kristallerini oluşturmuştur. Oluşan renk mitokondriyal aktiviteyle ilişkili olup, oluşan formazan kristalleri izopropanol/HCl içeren çözücülerde çözüldükten sonra oluşan mavi/mor renk spektrofotometrik yöntemle (mikroplaka okuyucuda) 570nm'de ölçüldü.

P4 hücreler, hücre kültür kaplarını %70-80 oranında doldurduğu zaman MTT testine alındı. Alt kültür işlemleri sonrasında izole edilen hücreler (P4), 6 kuyucuklu kültür kaplarına 12.500 hücre/kuyucuk olacak şekilde ve 1., 4., 7., 14., ve 21. gün uygulamaları için ekildi. Her test günü, istenen kuyucuktaki hücreler 3-4ml PBS ile yıkandıktan sonra 1 dakika bekletildi ve PBS uzaklaştırıldı. Daha sonra, 2ml tripsin eklenerek örnekler 5-6 dakika inkübatörde bekletildi.

Inverted faz kontrast mikroskobu ile hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildi. Hücreler konik tabanlı 15ml'lik tüpe alınıp üzerine tripsinle aynı miktarda besi ortamı (FBS içeren) eklendi. 1300rpm'de

5 dakikalık santrifüj işleminin ardından süpernatant atıldı ve 100µl besi ortamı eklenerek pipetlendi.

MTT testi için, kör olarak hücre kültüründe kullanılmamış taze besi ortamı ve standart olarak süpernatant kullanıldı. Buharlaştırmanın engellenmesi için, 96 kuyucuklu plakaların en dış sıralarına serum fizyolojik pipetlendi. Serum fizyolojik, besi ortamı ve hücreler 96 kuyucuklu plakalardaki yerlerine pipetlendikten sonra karanlık ortamda üzerine 0.5mg/ml MTT solüsyonu eklendi. Alüminyum folyoya sarılarak inkübatörde 4 saat boyunca 37°C'de bekletildikten sonra solüsyon boşaltıldı ve her kuyucuğa 100µl izopropanol-HCl eklendi. Oda sıcaklığında 30 dakika süreyle bekletildikten sonra absorbans 570nm'de dalga boyu seçicisi (monokromator) sistemli mikropilaka okuyucuda tespit edildi. Her deney 3 kez tekrarlandı (31,47,50).

### **3.5.2. In vitro Osteojenik ve Odontojenik Farklılaşma**

Osteojenik farklılaşma için P4 hücreler, 3000 hücre/cm<sup>2</sup> yoğunlukta, 6 kuyucuklu plakalarda tip I kollajen kaplı lamellere ekildi. Osteojenik farklılaştırmada besi ortamı olarak, %10 oranında FBS, 100nM oranında deksametazon, 0.05µM oranında askorbat-2-fosfat, 10mM oranında β-gliserofosfat, %1 oranında penisilin/streptomisin eklenmiş α-MEM besiyeri kullanıldı ve besi ortamı haftada iki kez değiştirilerek hücreler 4 hafta boyunca kültüre edildi.

Odontojenik farklılaştırma ise 0.05µM oranında askorbat-2-fosfat, 10mM oranında β-gliserofosfat kültür ortamına eklenerek gerçekleştirildi. Kültürün 4.haftasının sonunda primer kemik nodülleri olarak lameller hücre dışı

kalsifikasyonun histokimyasal olarak gösterilmesi amacıyla Alizarin kırmızısı ve Von Kossa ile boyandı. Ayrıca, osteojenik farklılaşmanın geç evrelerinin tanımlanması için osteonektin ve dentin fosfoprotein boyamaları yapıldı.

Alizarin kırmızısı boyaması için, lameller 5 dakika boyunca %70'lik alkol ile yıkandı. Distile su içerisine 20 kez batırıldıktan sonra Alizarin kırmızısı solüsyonu ile 45 saniye muamele edildi. Örnekler, önce asetona, daha sonra ksilol-aseton karışımına ve son olarak ksilol içine 20 kez batırılıp çıkarıldı. Karanlık ortamda kurumaya bırakıldıktan sonra lam üzerine kapatılarak mikroskopta incelendi (11,36).

#### **3.5.2.1. ALP/VK Boyaması**

Hücreler 24 kuyucuklu kültür kaplarında inkübe edildikten sonra alkalin fosfataz (ALP) aktivitesi ve nodüllü alanlar gözlemlendi. Kültür kaplarındaki besi ortamı uzaklaştırılarak, soğuk PBS ile yıkandı. Daha sonra %10'luk soğuk nötral formalin tamponda 15 dakika fikse edildi. Süre sonunda tüm tampon uzaklaştırılarak bir kere distile su ile yıkandıktan sonra 15 dakika boyunca distile su içerisinde bırakıldı. Daha sonra taze substrat ile kültür kapları 45 dakika inkübe edilerek, 4 kez distile su ile yıkandı. Son olarak %2,5'lük gümüş nitrat ile 30 dakika boyanarak 3 kez distile su ile yıkandı. Gümüş nitrat tamamen uzaklaştırıldıktan sonra mikroskop altında incelenerek kurumaya bırakıldı (73).

Tutunan hücrelerde ALP enzim aktivitesinin olduğu alanların kırmızı, mineralize nodüllü alanların kahverengi veya siyah boyandığı gözlemlendi .

### 3.5.2.2. İmmünohistokimyasal İnceleme

Kültürlere odontoblast farklılaşması için dentin fosfoprotein ve benzeri tanımlama faktörleri ile kök hücre tanımlayıcı pozitif ve negatif markırlar olan STRO-1, CD105, C-KIT ve CD45 ile immünohistokimya protokolü uygulandı. Bu amaç ile proteinlere karşı antikorlar kullanılarak immünohistokimyasal olarak tayin edildi.

Örnekler PBS'de hazırlanmış %4'lük paraformaldehid solüsyonu (pH7,4) ile fikse edildikten sonra 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra %0,5'lik tripsin solüsyonu ile 5 dakika inkübe edildikten sonra yukarıda tarif edilen şekilde yıkama işlemi yapıldı ve %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile 30 dakika beklendi. 1 saat bloklama serumu ile inkübe edilen hücreler yıkanmadan sadece serumun alınmasından sonra STRO1, dentin fosfoprotein primer antikorları ile 18 saat boyunca inkübe edildi. Yıkama işleminden sonra "biotinlayted anti-mouse/antihumant" konjuge edilmiş streptavidin-horsedish peroksidaz solüsyonları ile 30'ar dakika boyandı (Zymed Histostain kit San Fransisco, A.B.D).

Her bir ikincil antikor 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra immün reaktiviteleri görünür halde saptamak amacıyla diaminobenzidin (DAB, Zymed, San Fransisco, A.B.D) ile 5 dakika boyandı. Primer antikorun yerine PBS konarak negatif kontrolleri yapıldı. Distile su ile yıkama işleminden sonra kapatma solüsyonu (Histomount mounting solution, Sanfransisco, ABD) ile kapatıldı.

### 3.5.2.3. TUNEL İmmünohistokimyasal İnceleme

TUNEL yöntemi ile apoptotik hücre ölümlerinin belirlenmesinde "Dead End Colorimetric TUNEL system, Promega G7130 kiti" kullanılarak 5 µm kalınlığındaki parafin bloklardan alınan kesitlere uygulandı. Kesitler 1 gece 60°C'lik etüvde ısı ile deparafinize edildikten sonra 1 saatte ksilen ile kimyasal olarak deparafinize edildi. Azalan alkol serileri ile 2'şer dakika (%95, %80, %70, %60) rehidratasyon uygulandıktan sonra dokular serum fizyolojik ile oda ısısında 5 dakika (%0.85 NaCl) muamele edildi. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkanan doku kesitleri %4'lük paraformaldehit ile 15 dakika oda ısısında fikse edildi. Daha sonra 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. 1/500 oranında PBS ile dilüe edilen 20-µg/ml proteinaz-K 20 dakika doku kesitlerine uygulandı. PBS ile yıkamayı takiben %4'lük paraformaldehit ile 5 dakika yeniden fiksasyon yapıldı. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkanan kesitler, 5-10 dakika Equilibration buffer ile oda ısısında tutuldu. TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 37 °C de 60 dakika plastik kapaklar kesitleri kapatacak şekilde koyuldu. 15 dakikalık SSC yıkamasının ardından 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. 3-5 dakika hidrojen peroksit uygulanmasını takiben tekrar 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı. 1/500 oranında PBS ile hazırlanan Streptavidin HRP solüsyonu ile 30 dakika oda ısısında inkübasyona tabi tutuldu. 5 dakika PBS ile oda ısısında yıkandı ve ardından DAB ile boyama yapılarak birkaç kere distile su ile yıkandı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksileni ile yapıldı.

Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptanmaya çalışıldı, negatif kontrol için primer antikor yerine PBS, pozitif kontrol olarak da kitin içinde olan apoptozis olduğu bilinen preparatlar kullanıldı.

#### **3.5.2.4. Morfometrik Değerlendirme**

İmmünohistokimyasal ve morfometrik değerlendirmelerde preparatlara boyanın yoğunluğu ve dağılımına göre + (1), ++ (2), +++ (3), ++++ (4), +++++ (5) olarak körlemesine göre semi-kantitatif puanlama yapıldı. Ortalamalar istatistiksel olarak değerlendirildi.

#### **3.6. İstatistiksel Değerlendirme**

Her deney en az üç kere tekrarlandı. Çalışmaların verileri, standart sapma (SD) değerleri göz önünde bulundurularak rapor edildi. Tüm istatistiksel analizler, Graphpad 3.0 ile gerçekleştirildi. Veriler, tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA testi) ve eşli t-testi kullanılarak değerlendirildi. Çalışma ve kontrol grupları arasındaki farklar için,  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı sayıldı.

## BÖLÜM III

### 4. Bulgular

Oral kavitenin farklı bölgelerinden elde ettiğimiz dental pulpa, dental folikül, apikal papil, alveol kemik ve yağ dokusu kökenli MKH'lerin in vitro ortamda karakterizasyon çalışması yapıldı. İzole edilen hücreler;

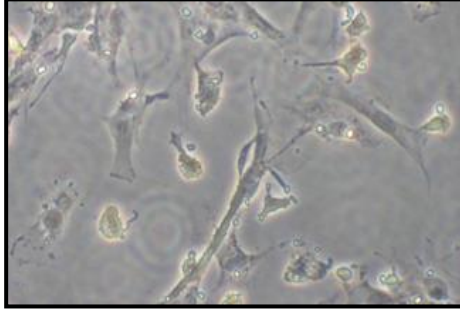
1. morfolojik görünümleri,
2. çoğalma özellikleri,
3. eksprese ettikleri yüzey antijenleri ve
4. osteojenik/odontojenik farklılaşma kapasitelerine göre tanımlandı.

#### 4.1. Hücrelerin Morfolojik Görünümleri

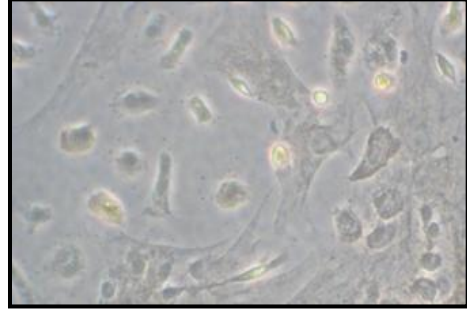
Oral kavite kök hücrelerinin (OKKH) morfolojik özelliklerinin incelenmesi için alınan doku örneklerinde (DP, DF, AP, AK: n=6; YD: n=3) primer hücre kültürlerinin (P0) sayısal eşitsizliğinin engellemesi ve farklılaşma anlamında dengenin kurulması amaçlanarak, hücreler pasaj 4 (P4) için başarılı bir şekilde çoğaltıldı. Dental kökenli DP, AP, DF hücreleri ile dental kökenli olmayan AK ve YD hücreleri inverted faz kontrast mikroskobu ile incelendi.

P0 hücreleri ile P4 hücrelerine ait morfolojik görüntülerin mikroskobik incelemesinde, benzer morfolojiye sahip olan ve fibroblast benzeri içsi veya bipolar fenotip gösteren adherent hücreler gözlemlendi (Resim 21). P0 kültüründe çoğunluğunun fibroblastoid yapıda olduğu gözlenen hücrelerin, ilerleyen pasajlarda minimal oranda farklılık göstererek çoğaldığı; ancak

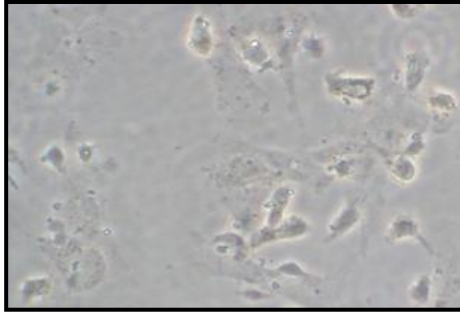
pasajlar arasındaki bu morfolojik farklılığın istatistiksel olarak anlamlı bir değer taşımadığı saptandı.



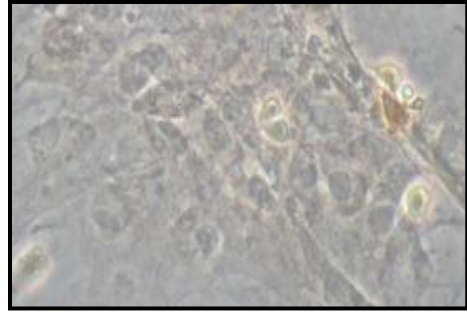
P0 - DP x400



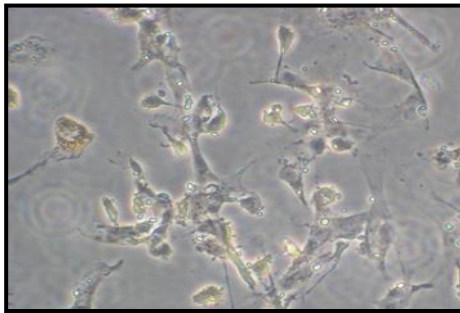
P4 - DP x400



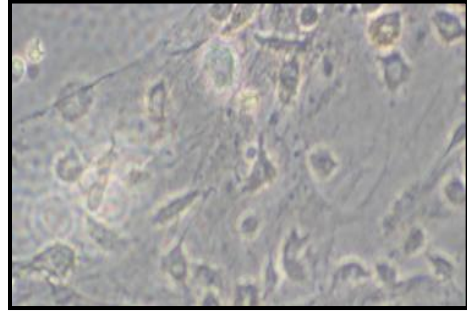
P0 - AP x400



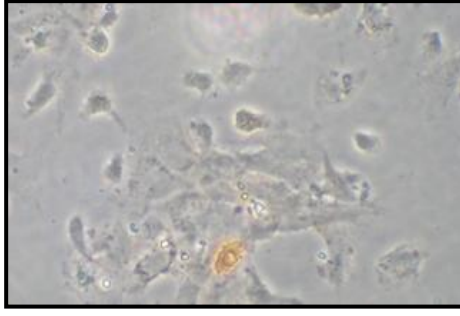
P4 - AP x400



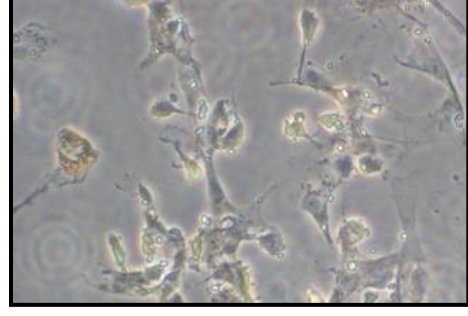
P0 - DF x400



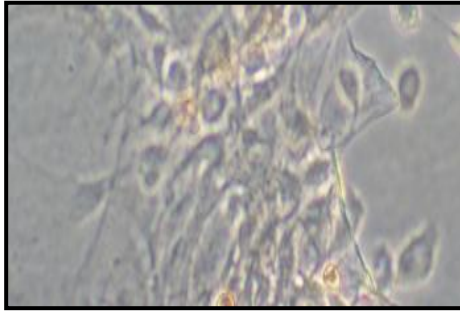
P4 - DF x400



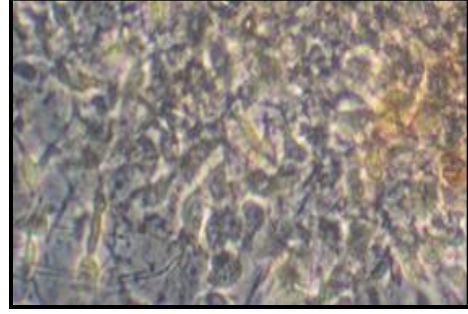
P0 - AK x400



P4 - AK x400



P0 - YD x400



P4 - YD x400

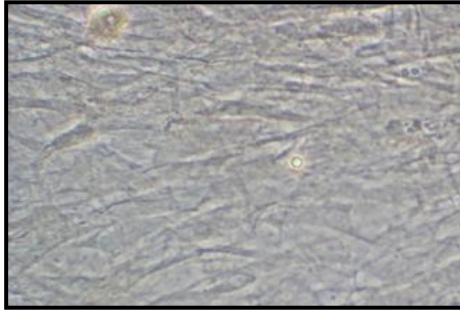
**Resim 21.** Oral kavitede farklı kaynaklardan elde edilen MKH'lerin primer kültürleri (P0) ile pasaj 4 (P4) hücrelerinin karşılaştırılmaları için alınan görüntülerde benzer morfoloji ve davranış izlendi.

#### 4.2. Hücrelerin Çoğalma Özellikleri

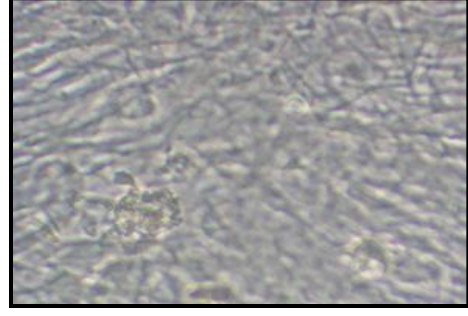
P0 hücreleri in vitro koşullarda pasajlanarak kültür kaplarında hücre çoğalması sağlandı. Pasajlama işlemleri sırasında, hücrelerin küçük koloni adacıkları oluşturarak çoğaldıkları gözlenmesine rağmen farklı kaynaklardan elde edilen hücre kültürleri arasında kolonileşme bağlamında anlamlı farklılıkların olmadığı saptandı. Ancak P0 ve P4 hücre kültürleri değerlendirildiği zaman, ilerleyen pasajlarda primer hücre kültürlerine göre

hücrelerin daha belirgin bir şekilde koloni oluşturma ve çoğalma eğiliminde oldukları izlendi.

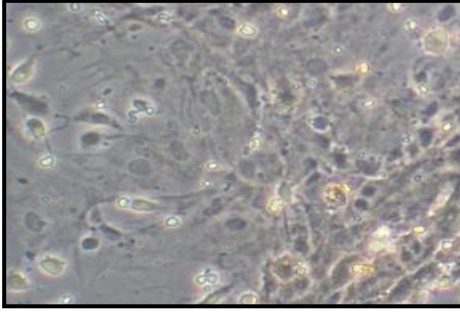
Hücre kolonileri ilk 7 günde yavaş, ilerleyen günlerde ise artan bir hızla çoğaldıkları görüldü. Kolonilerin 7-14 günlük süreçte semi-konfluent, 15-21 günlük zaman dilimi arasında ise konfluent oldukları gözlemlendi (Resim 22).



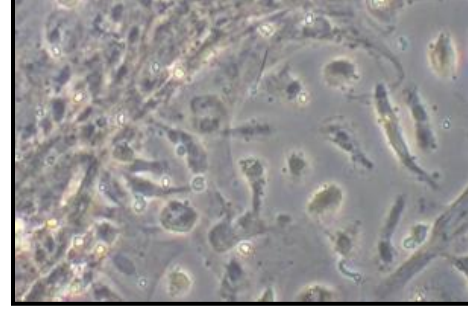
P0 - DP x400



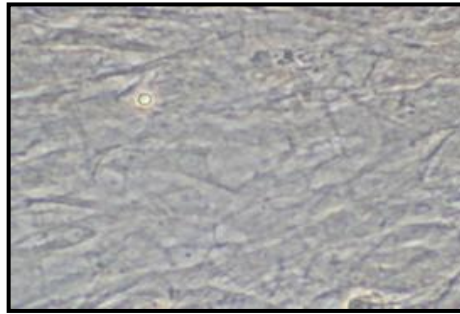
P4 - DP x400



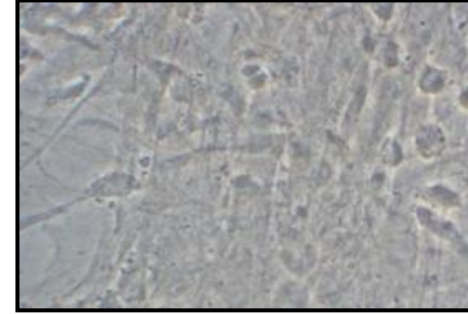
P0 - AP x400



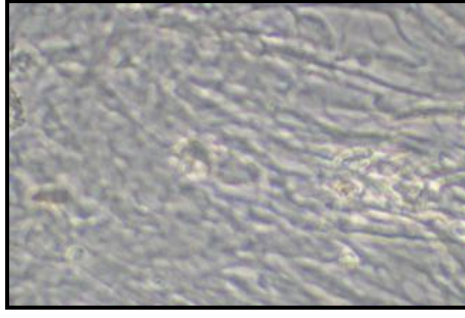
P4 - AP x400



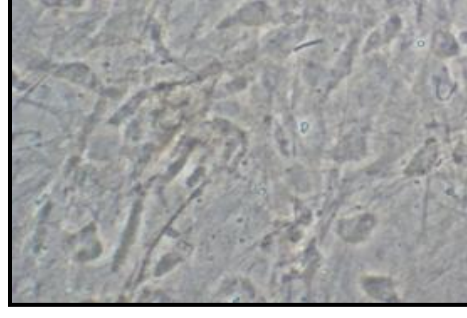
P0 - DF x400



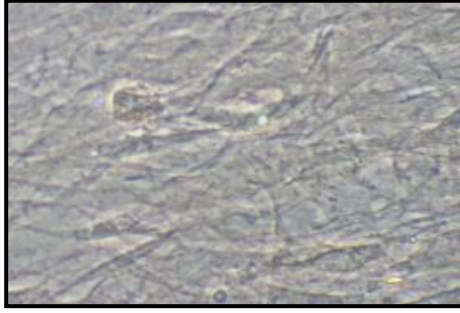
P4 - DF x400



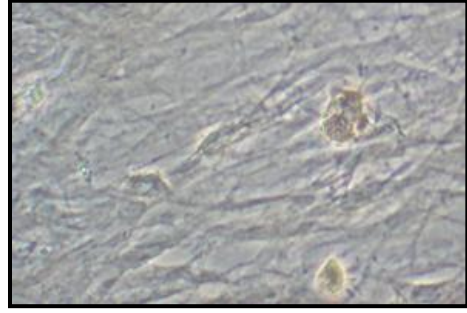
P0 - AK x400



P4 - AK x400



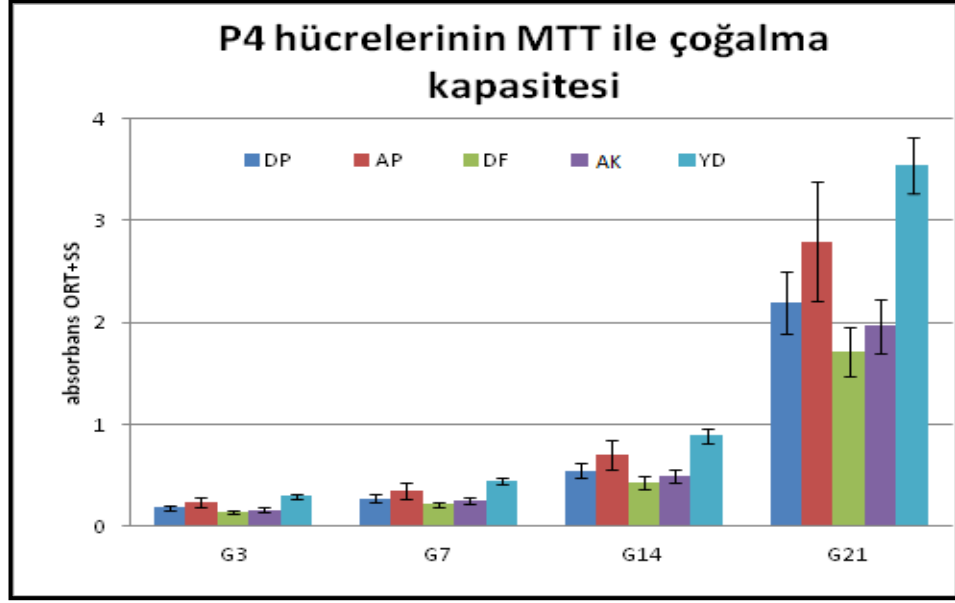
P0 - YD x400



P4 - YD x400

**Resim 22.** Oral kavitede farklı kaynaklardan elde edilen MKH'lerin primer kültürleri (P0) ile pasaj 4 (P4) hücrelerinin koloni şeklinde çoğalma gösterdikleri konfluent hücre morfolojisinin inverted faz kontrast mikroskobu görüntüleri

Yapılan MTT canlılık testinde, kültüre edilmiş P4 hücrelerinin çoğalma kapasiteleri istatistiksel olarak değerlendirildiği zaman, ilk sırada YD hücreleri yer alırken bunu sırasıyla AP, DP, AK ve DF hücrelerinin izlediği saptandı (Grafik 2).



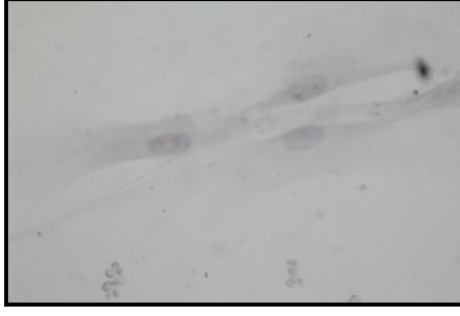
**Grafik 2.** P4 hücrelerinin MTT canlılık testi ile belirlenen çoğalma kapasitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

7-14. günler arasındaki zaman diliminde gözlenen hücre çoğalma kapasiteleri ile 14-21. günler arasında gözlenen hücre çoğalma kapasitelerinin farklı olduğu gözlemlendi.

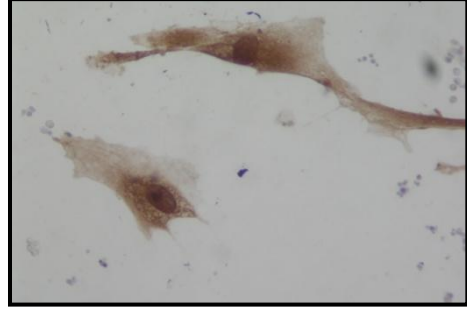
Elde edilen istatistiksel değerlere göre YD ( $p < 0,001$ ) ve AP hücrelerinin ( $p < 0,05$ ) diğer kaynaklardan elde edilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde daha hızlı çoğaldıkları görüldü.

### 4.3. Hücre Yüzey Antijenlerine Göre MKH'lerin Tespiti

P4 hücrelerinin 21. gün sonunda yapılan immünohistokimyasal boyamalarında, tüm hücrelerin stromal kökenli hücrelere özgü olan STRO-1 (Resim 23), CD105 (Resim 24) ve C-KIT (Resim 25) antijenlerine karşı pozitif boyandığı gözlemlendi. Ayrıca P4'te elde ettiğimiz hücrelerin, hematopoetik kök hücre belirteci olan CD45 ile pozitif boyanma göstermedikleri izlendi (Resim 26).



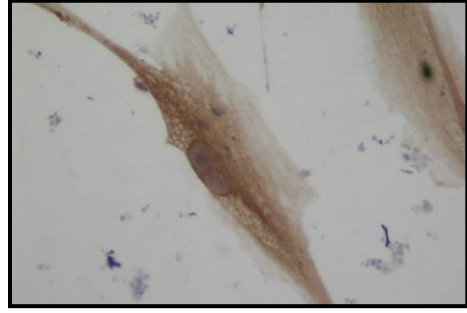
KR x400



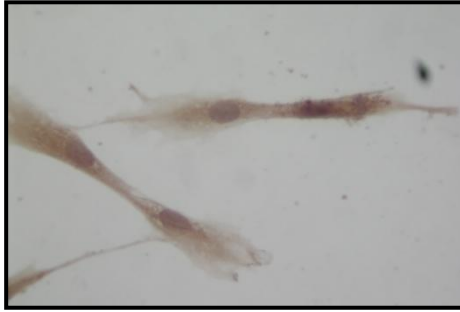
DP x400



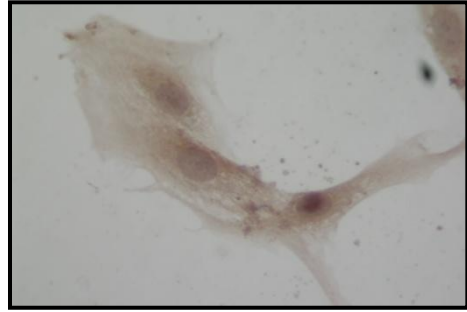
AP x400



DF x400

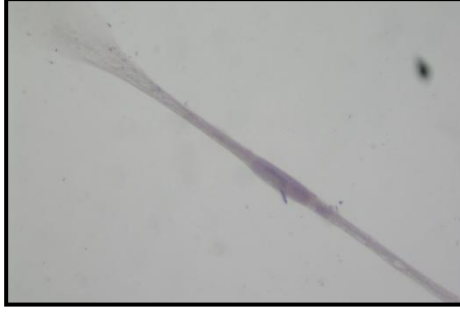


AK x400

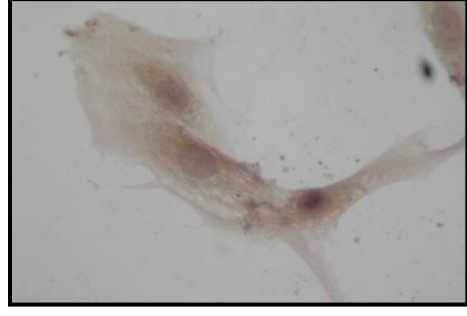


YD x400

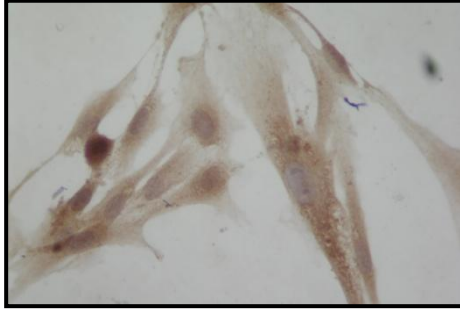
**Resim 23.** P4 hücrelerinin kontrol grubu (KR) primer antikor kullanılmayan boyamalarda pozitif reaksiyon göstermezken, STRO-1 belirteci ile özgün bir biçimde pozitif olarak boyandıkları gözlemlendi.



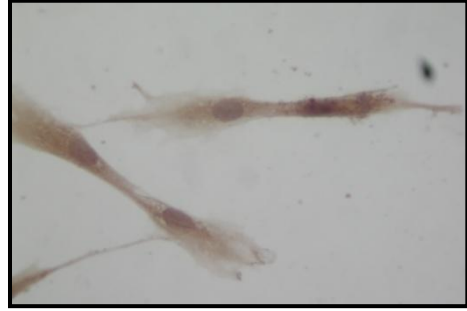
KR x400



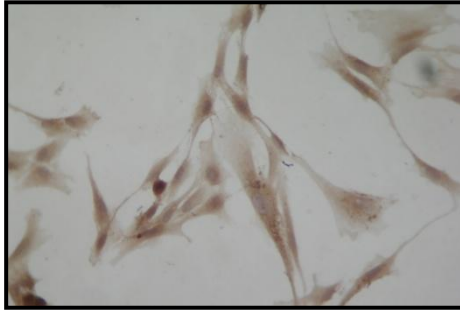
DP x400



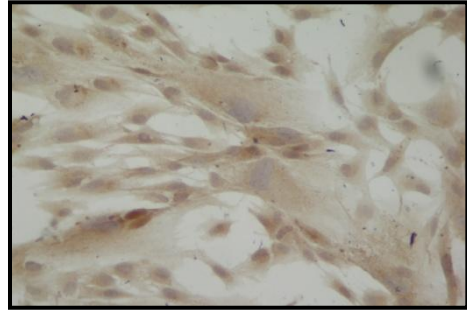
AP x400



DF x400

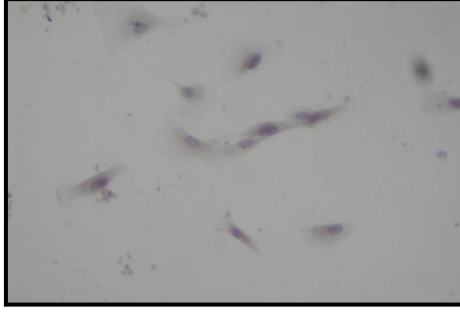


AK x400



YD x400

**Resim 24.** CD105 belirteç boyaması yapılan P4 hücreleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, P4 hücrelerinin özgün bir biçimde pozitif olarak boyandıkları gözlemlendi.



KR x100



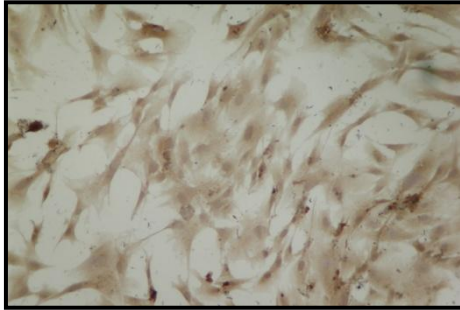
DP x100



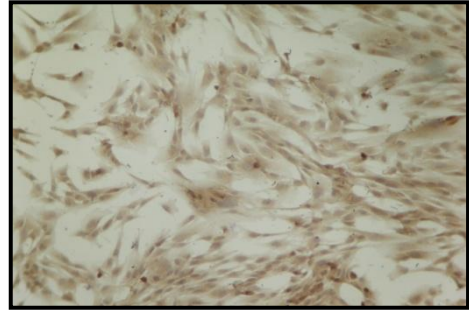
AP x100



DF x100

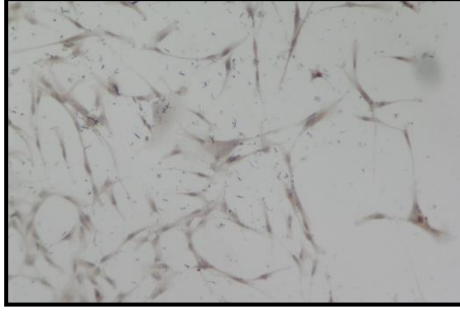


AK x100

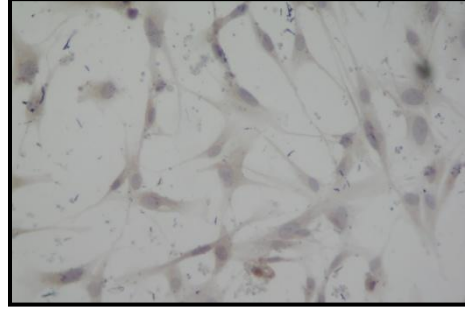


YD x100

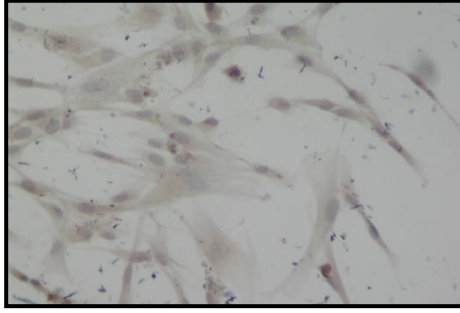
**Resim 25.** P4 hücreleri C-KIT boyaması açısından KR ile karşılaştırıldığında, P4 hücrelerinin özgün bir biçimde pozitif olarak boyandıkları gözlemlendi.



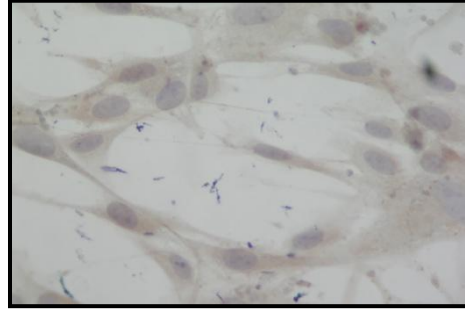
KR x400



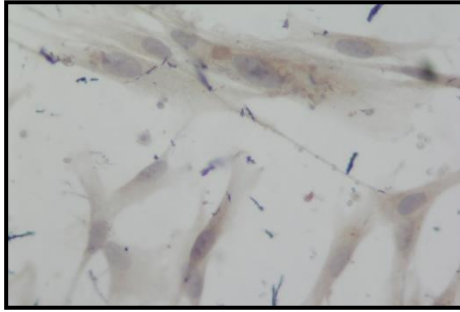
DP x400



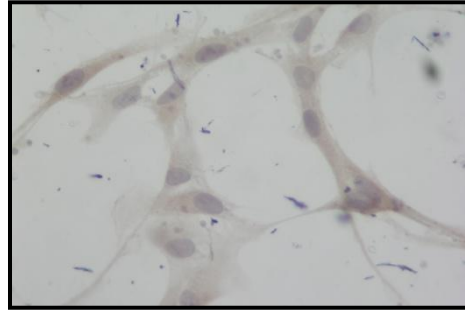
AP x400



DF x400



AK x400



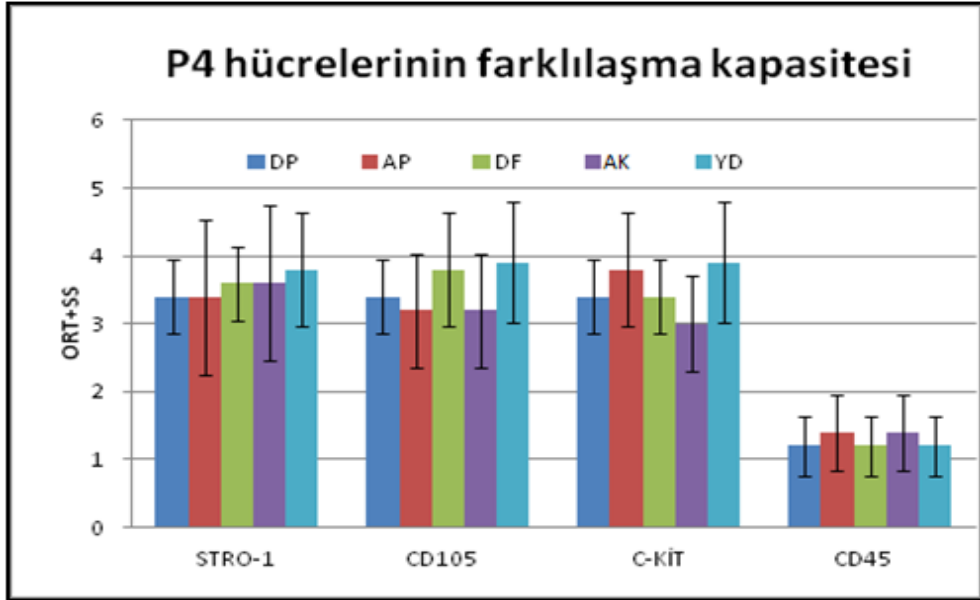
YD x400

**Resim 26.** P4 hücrelerinin, bir hematopoetik kök hücre belirteci olan CD45 ile negatif olarak boyandıkları gözlemlendi.

Oral kavitenin farklı bölgelerinden elde edilen hücre kaynakları karşılaştırıldığında, YD ve DF hücrelerinin AK, AP ve DP hücrelerine göre daha yüksek oranda pozitif boyanma gösterdikleri tespit edildi. Dental kökenli

DP, DF, AP hücreleri ile dental kökenli olmayan AK ve YD hücrelerinin birer MKH olduklarının tespiti için çalışmada kullandığımız yüzey antijenlerini eksprese ettikleri ve gruplar arasında immünohistokimyasal boyanma açısından anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı (Grafik 3).

Belirgin bir biçimde konfluent olan, birbirlerine sıkıca yapışan ve koloni adacıkları oluşturarak çoğalan hücrelerin P4 safhasında hücrel farklılaşma anlamında en iyi aşamada oldukları gözlemlendi.



**Grafik 3.** OKKH kültüründeki P4 hücrelerinin belirteçlere göre farklılaşma kapasitelerinin benzer oldukları ve anlamlı bir fark göstermedikleri ( $p>0,05$ ) saptandı.

#### 4.4. Osteoblastik ve Odontoblastik Besiyeri Uygulamaları

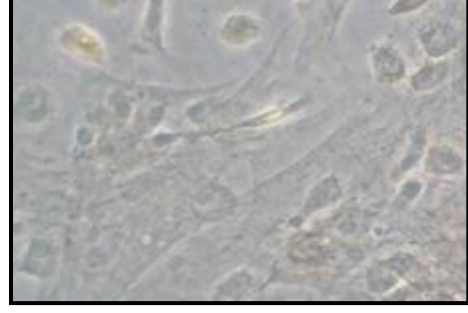
OKKH farklılaşmasında P4 hücrelerinin 21 günlük inkübasyon işleminde, osteoblastik besiyeri (OSBY) / odontoblastik besiyeri (ODBY) uygulamaları ile hücrelerin osteoblastlara ve odontoblastlara farklılaşmaları başarılı bir şekilde sağlandı.

#### 4.4.1. Osteojenik Farklılaşma

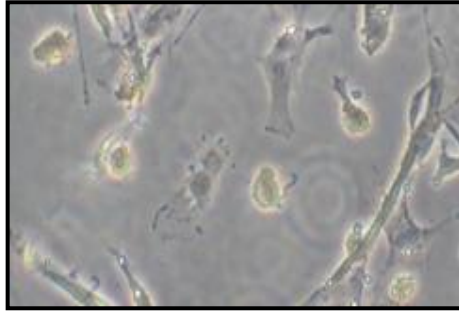
OSBY uygulaması ile hücrelerin az miktarda epiteloid morfolojide oldukları gözlemlendi. Geriye kalan hücrelerin çoğunluğunun iğsi veya bipolar morfolojiye sahip oldukları izlendi (Resim 27).



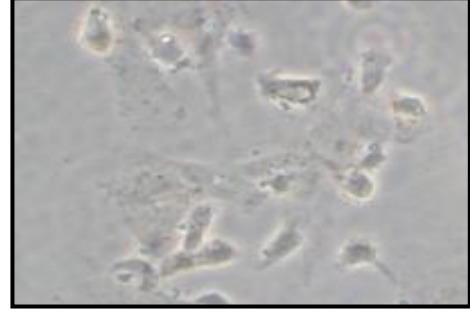
KR x400



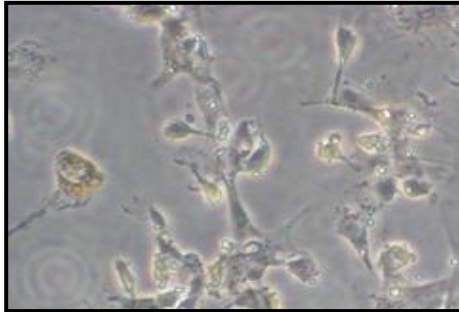
DP x400



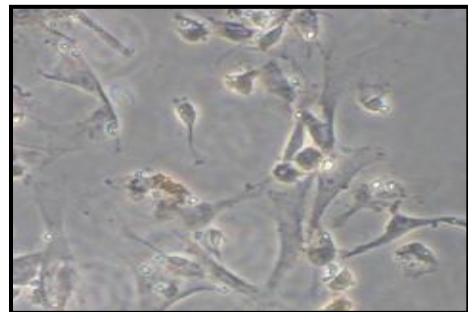
AP x400



DF x400



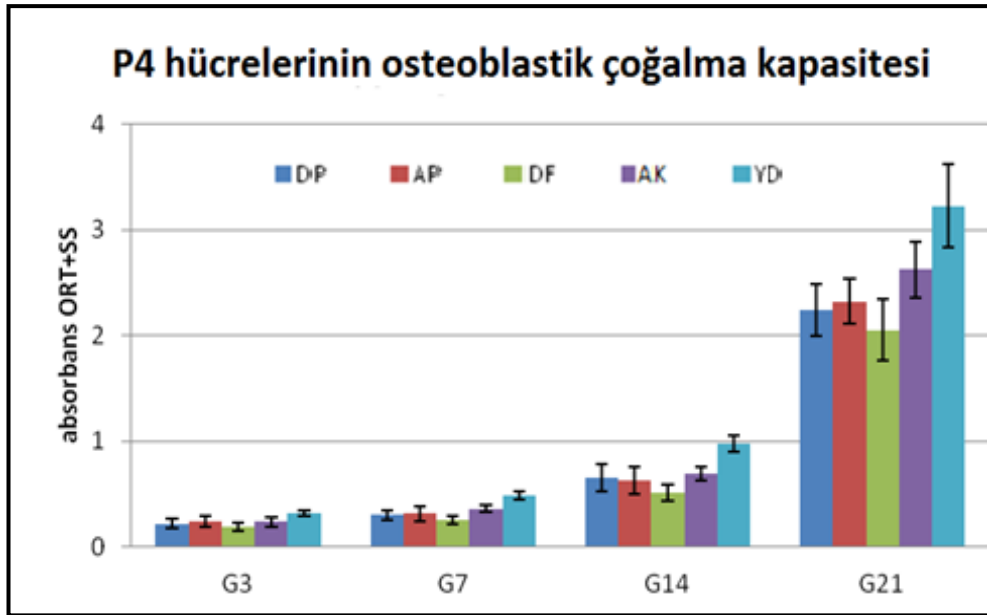
AK x400



YD x400

**Resim 27.** P4 hücrelerinin OSBY'ndeki morfolojik görünüşleri

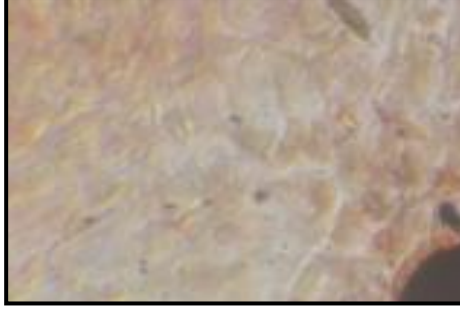
OSBY'ndeki P4 hücrelerinin çoğalma kapasiteleri ile faktör eklenmemiş normal besiyeri ortamındaki hücrelerin çoğalma kapasitelerinin benzerlik gösterdiği saptandı. Farklı kaynaklardan elde edilen P4 hücrelerinin çoğalma kapasiteleri incelendiğinde ise, grupların birbirlerine benzerlik gösterdiği ancak 21. gün sonunda YD hücrelerinin en yüksek çoğalma kapasitesine sahip olduğu ve YD hücrelerini sırasıyla AK ve AP hücrelerinin izlediği görüldü. OSBY'deki en düşük çoğalma kapasitesine sahip hücre grubu ise DF kökenli hücreler olduğu saptandı.(Grafik 4).



**Grafik 4.** OSBY uygulaması ile P4 hücrelerinin 3, 7, 14 ve 21. günlerdeki çoğalma kapasitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Kültürleme işleminin 4.haftasında, primer kemik nodülleri olarak lameller hücre dışı kalsifikasyonun histokimyasal olarak gösterilmesi amacıyla Alizarin kırmızısı (Resim 28) ve Von Kossa (Resim 29) boyamaları yapıldı. Ayrıca, osteojenik farklılaşmanın geç evrelerinin tanımlanması için osteonektin (Resim 30) ve dentin fosfoprotein (Resim 31) immün boyamaları yapıldı.

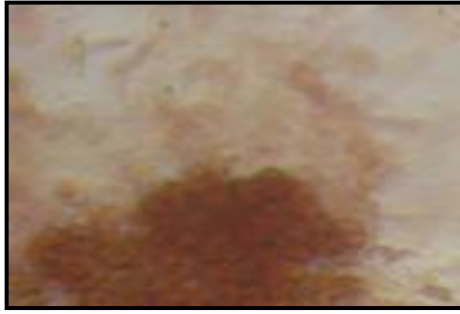
Farklılaşma sürecinde osteoblast benzeri hücreler haline dönüşen P4 hücrelerinin, altlarındaki matriksi koyulaştırdıkları ve bu anlamda Alizarin kırmızısı ile en iyi boyanmanın YD hücrelerinde olduğu gözlemlendi.



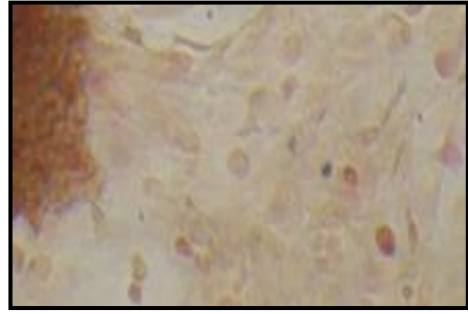
KR x400



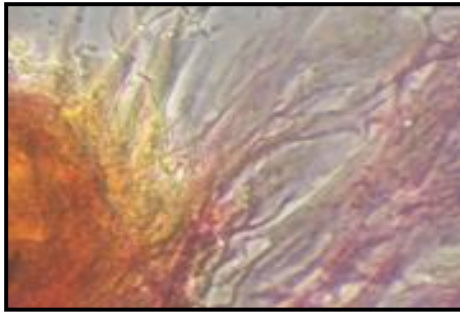
DP x400



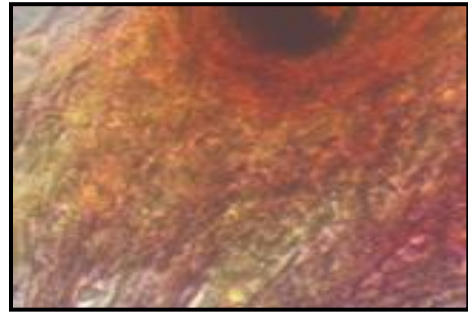
AP x400



DF x400



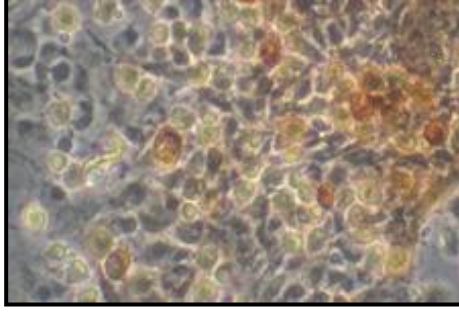
AK x400



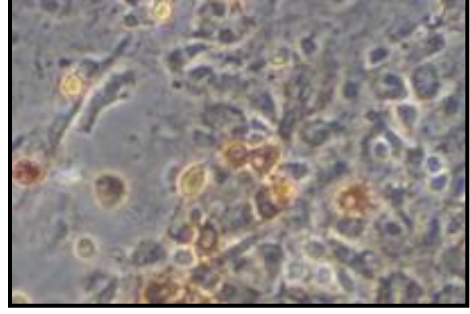
YD x400

**Resim 28.** OSBY'ndeki P4 hücrelerinin mineralizasyon için belirteç olan Alizarin kırmızısı ile boyama görüntüleri

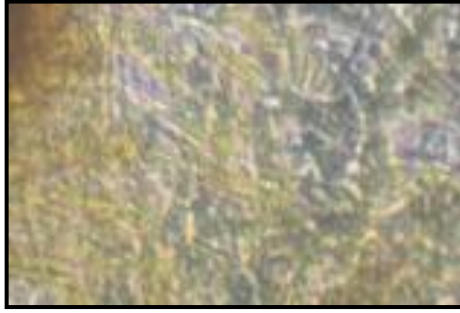
P4 hücrelerinin ossifikasyon sürecinde mineralizasyonu takiben gerçekleşen kalsiyum birikimi için belirteç olan Von Kossa ile boyandıkları ve en iyi boyanmanın YD hücrelerinde olduğu gözlemlendi.



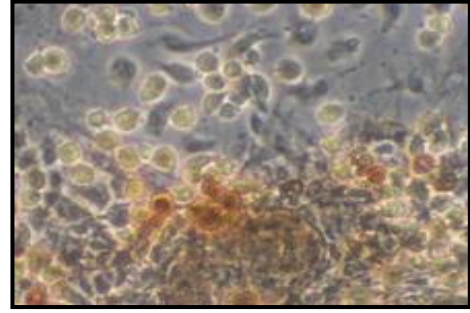
KR x400



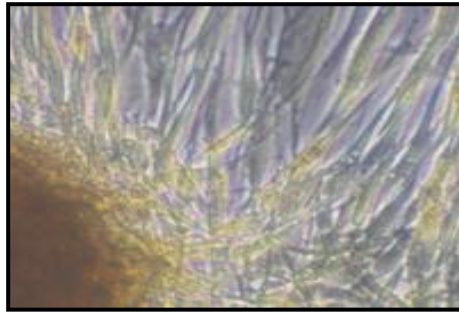
DP x400



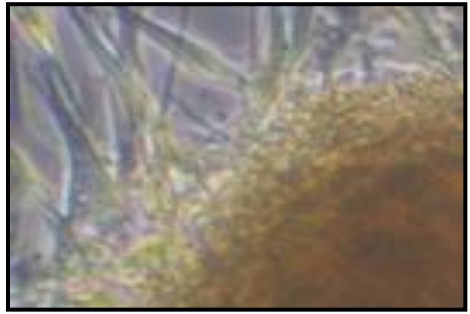
AP x400



DF x400



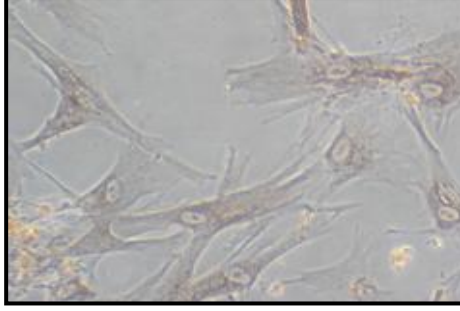
AK x400



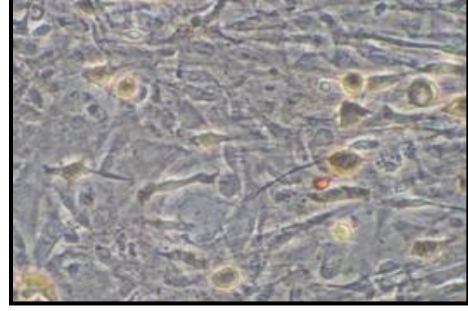
YD x400

**Resim 29.** OSBY'ndeki P4 hücrelerinin kalsiyum birikimi için belirteç olan Von Kossa ile boyama görüntüleri

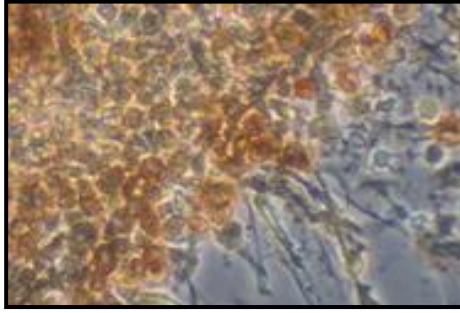
P4 hücrelerinin osteonektin ile boyandıkları ve en iyi boyanmanın YD ve AK hücrelerinde olduğu gözlemlendi. Buna karşın en az boyanma AP hücrelerinde görüldü.



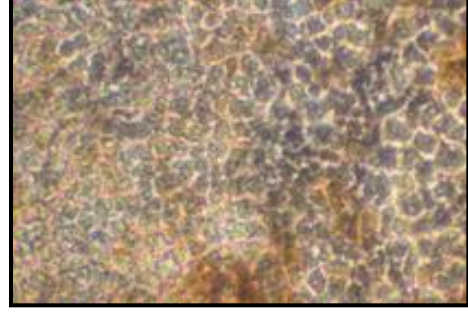
KR x400



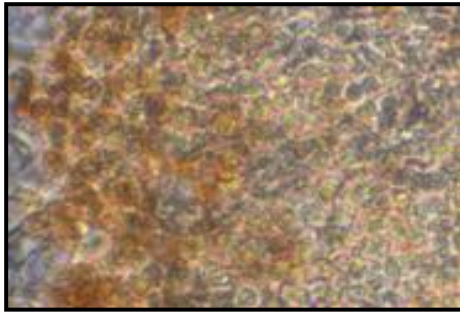
DP x400



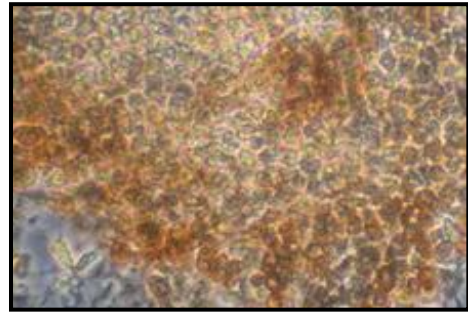
AP x400



DF x400



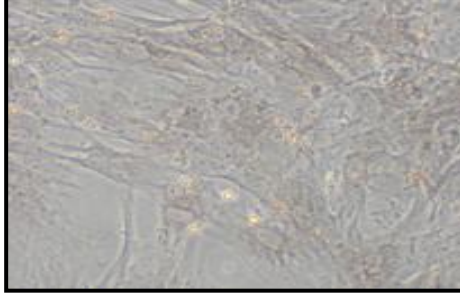
AK x400



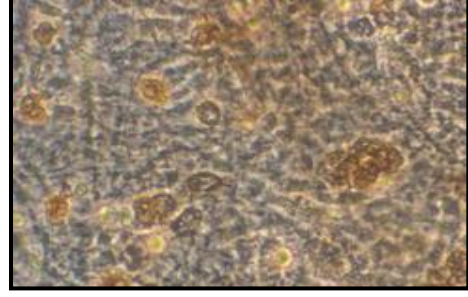
YD x400

**Resim 30.** OSBY'ndeki P4 hücrelerinin osteonektin ile boyama görüntüleri

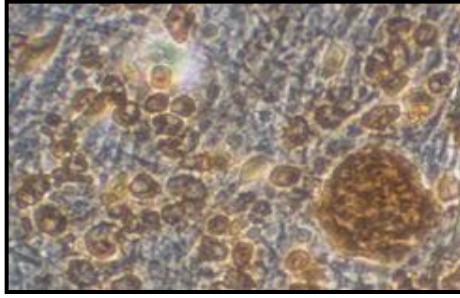
P4 hücrelerinin osteoblastlara yönlendirildikleri osteojenik besiyerinde de dentin fosfoprotein ile boyandıkları ve en iyi boyanmanın YD, DF ve DP hücrelerinde olduğu gözlemlendi.



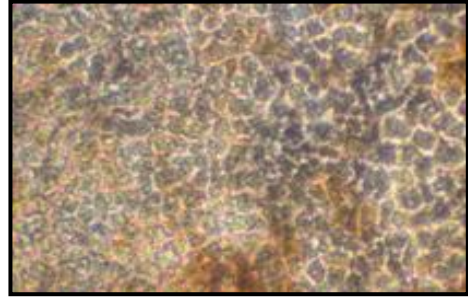
KR x400



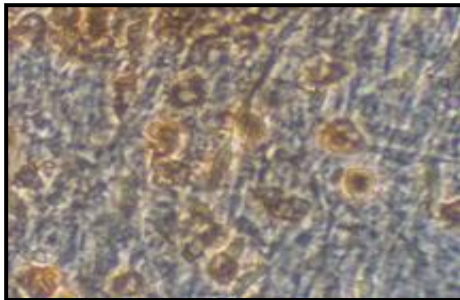
DP x400



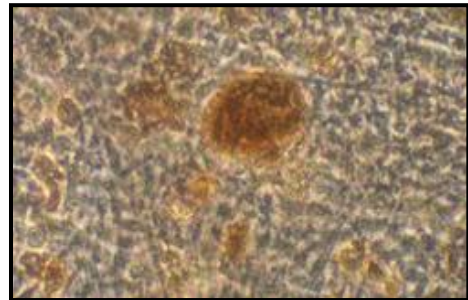
AP x400



DF x400



AK x400

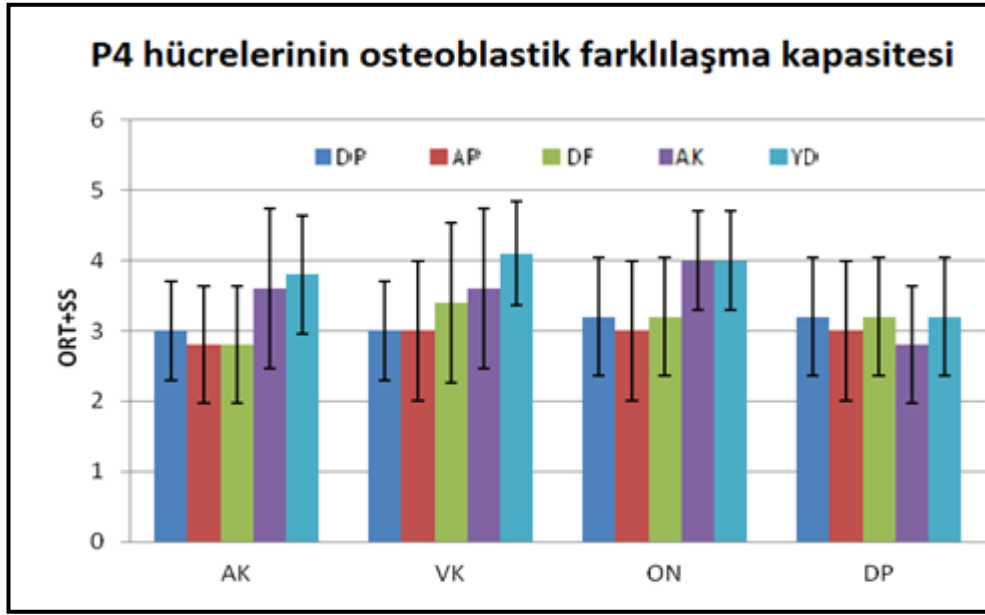


YD x400

**Resim 31.** OSBY'ndeki P4 hücrelerinin dentin fosfoprotein ile boyama görüntüleri

İmmünohistokimyasal incelemelerin sonucunda, P4 hücrelerinin Alizarin kırmızısı, Von Kossa, osteonektin ve dentin fosfoprotein belirteç boyamaları göz önüne alındığında, en az boyanmanın dentin fosfoprotein belirtecinde olduğu görüldü.

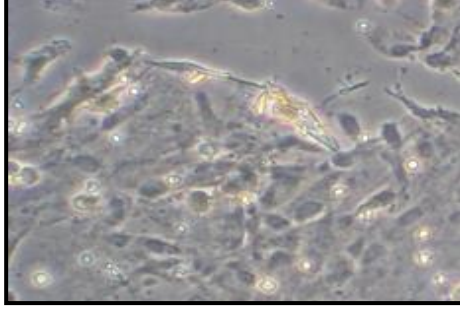
OKKH kültüründe osteoblastik besiyeri uygulaması ile P4 hücrelerinin farklılaşma potansiyelleri incelendiğinde, grupların birbirine benzer oldukları ancak YD hücrelerinin diğer gruplara göre daha üstün olduğu saptandı. OSBY'nde farklılaşma anlamında YD hücrelerini AK hücrelerinin izlediği görüldü (Grafik 5).



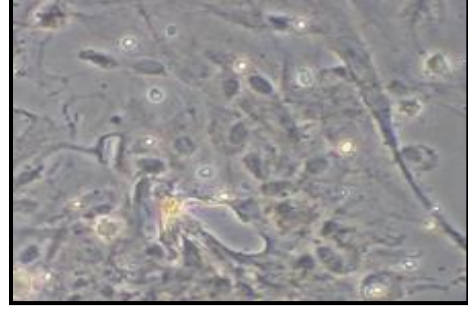
**Grafik 5.** P4 hücrelerinin OSBY'deki farklılaşma kapasitelerinin belirteç boyamalarına göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi

#### 4.4.2. Odontojenik Farklılaşma

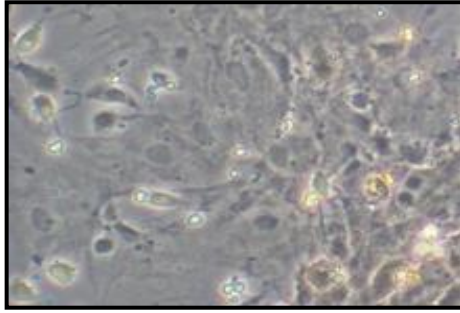
ODBY uygulamaları ile odontoblastlara yönlendirilen hücrelerin epiteloid morfolojide olanlarının, iğsi ve bipolar morfolojiye sahip olan hücrelere oranla daha fazla olduğu gözlemlendi (Resim 32).



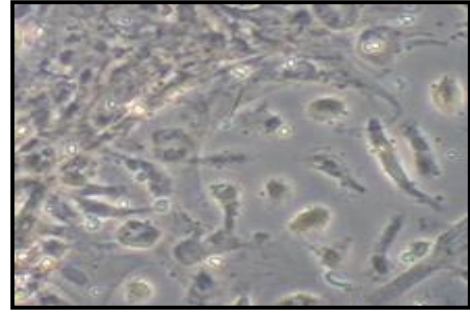
KR x400



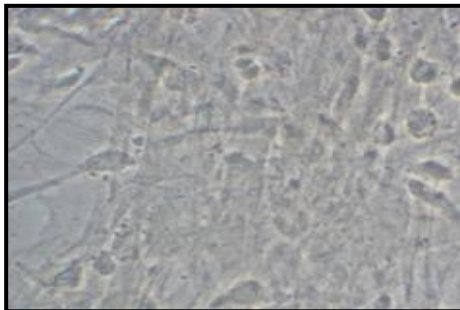
DP x400



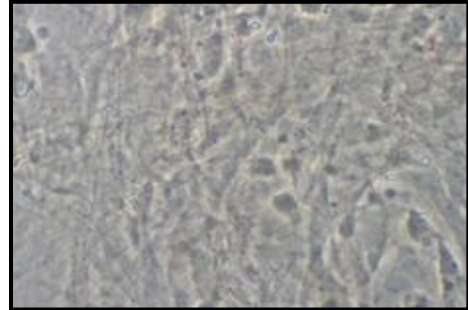
AP x400



DF x400



AK x400

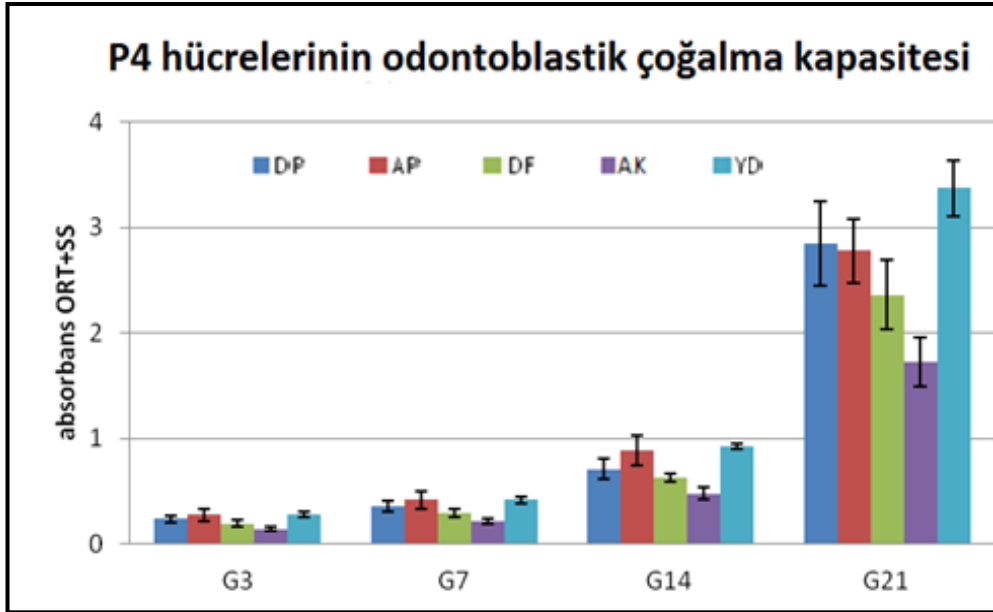


YD x400

**Resim 32.** P4 hücrelerinin ODBY'ndeki morfolojik görünüşleri

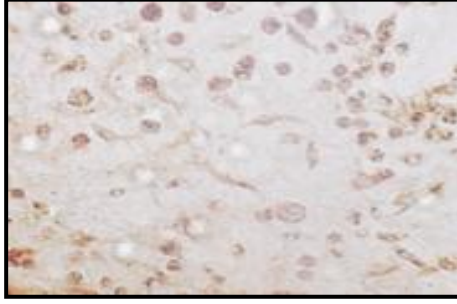
P4 hücrelerinin OSBY'ndeki iğsi ve bipolar morfolojik görüntülerinin aksine ODBY'de epiteloid morfolojideki hücre görüntüsünün daha baskın olduğu gözlemlendi. Hücrelerin koloni olarak çoğalmaları ise, OSBY ortamındaki hücrelere benzer şekilde gerçekleştiği görüldü. Ayrıca P4 hücrelerinin odontoblastik besiyeri ortamındaki çoğalma kapasiteleri faktör eklenmemiş normal besiyeri ile benzer şekilde olduğu görüldü.

OKKH kültüründeki P4 hücrelerinin odontoblastlara yönlendirilmelerini sağlayan odontoblastik besiyeri ortamında hücrelerin çoğalma potansiyelleri incelendiğinde ise, grupların birbirine benzerlik gösterdikleri ve YD hücrelerinin en yüksek çoğalma kapasitesine sahip oldukları saptandı. Buna karşın en düşük çoğalma kapasitesi AK hücrelerinde gözlemlendi (Grafik 6).

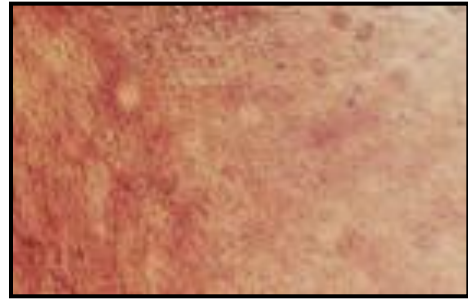


**Grafik 6.** ODBY uygulaması ile P4 hücrelerinin 3, 7, 14 ve 21. günlerdeki çoğalma kapasitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

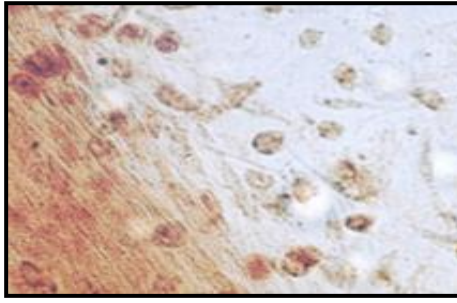
Farklılaşma belirteçlerinden Alizarin kırmızısı (Resim 33), Von Kossa (Resim 34), osteonektin (Resim 35) ve dentin fosfoprotein (Resim 36) ile yapılan immünohistokimyasal hücre boyamalarında, en az boyanmanın osteonektin belirtecinde olduğu gözlemlendi.



KR x400



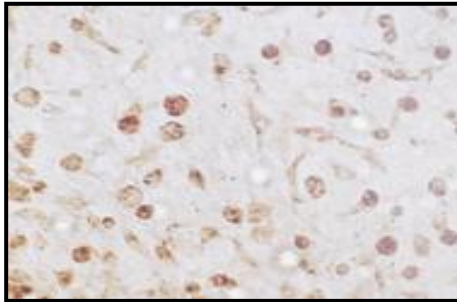
DP x400



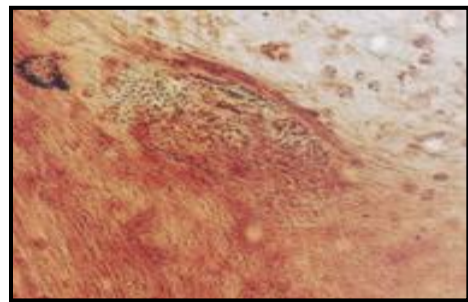
AP x400



DF x400



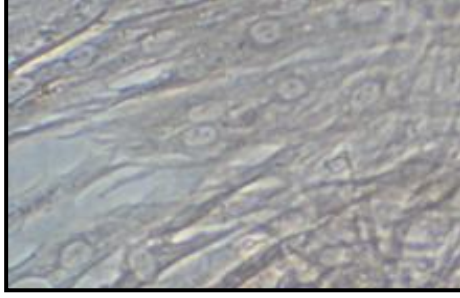
AK x400



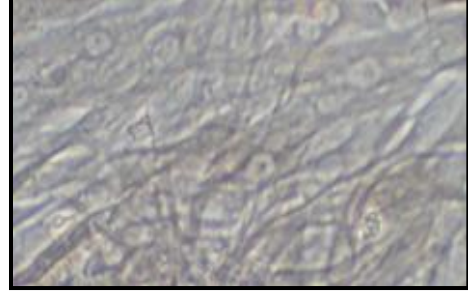
YD x400

**Resim 33.** ODBY'ndeki P4 hücrelerinin Alizarin kırmızısı belirteci ile boyanma görüntüleri

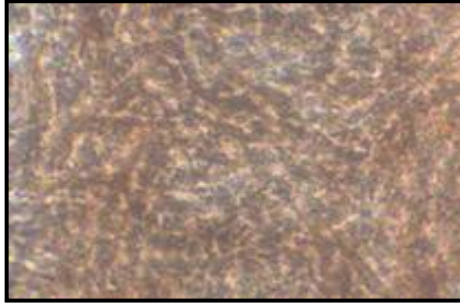
ODBY uygulaması ile odontoblast benzeri hücrelere farklılaşan P4 hücrelerinin Von Kossa boyamasına pozitif yanıt verdikleri gözlemlendi. Hücre grupları arasında yapılan değerlendirmede ise DF hücrelerinin en iyi boyanma gösterdiği saptandı.



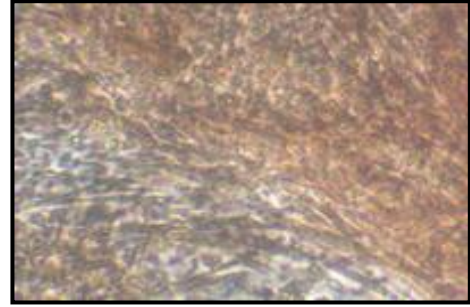
KR x400



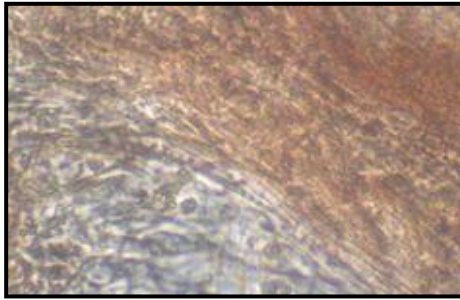
DP x400



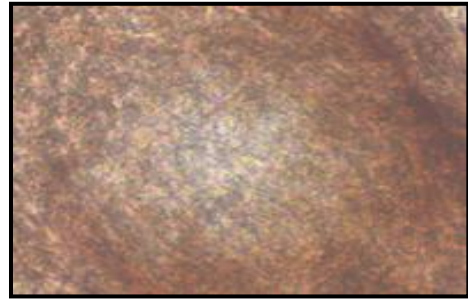
AP x400



DF x400



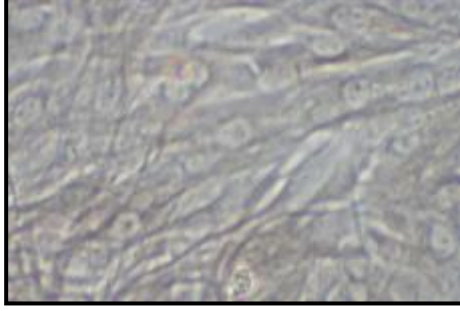
AK x400



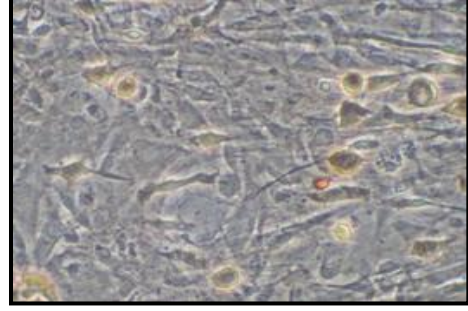
YD x400

**Resim 34.** ODBY'ndeki P4 hücrelerinin Von Kossa belirteci ile boyanma görüntüleri

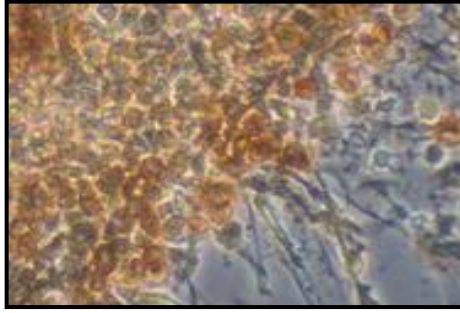
P4 hücrelerinin odontoblastlara yönlendirildikleri odontojenik besiyerinde de osteonektin ile boyandıkları ve en iyi boyanmanın YD hücrelerinde olduğu gözlemlendi.



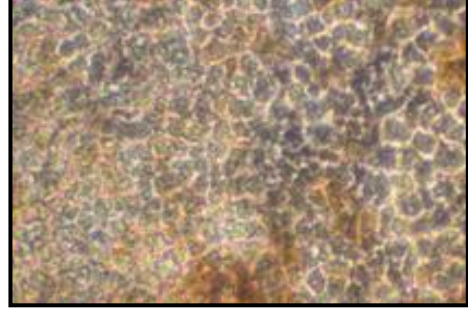
KR x400



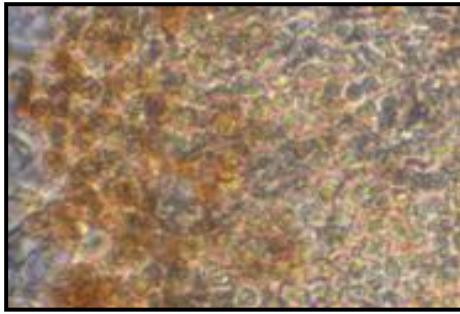
DP x400



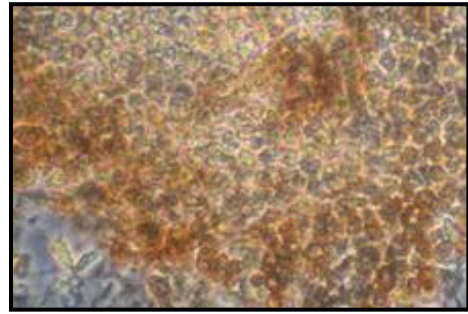
AP x400



DF x400



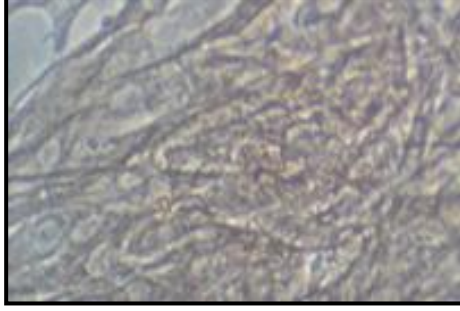
AK x400



YD x400

**Resim 35.** ODBY'ndeki P4 hücrelerinin osteonektin belirteci ile boyanma görüntüleri

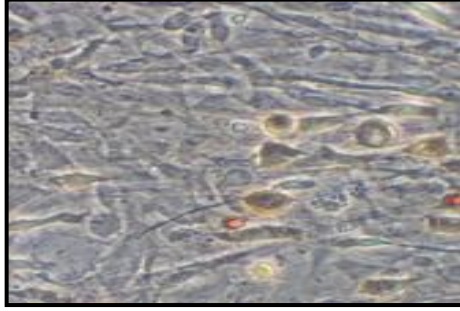
P4 hücrelerinin dentin fosfoprotein ile boyandıkları ve en iyi boyanmanın YD hücrelerinde olduğu gözlemlendi. Buna karşın en az boyanma AK hücrelerinde görüldü.



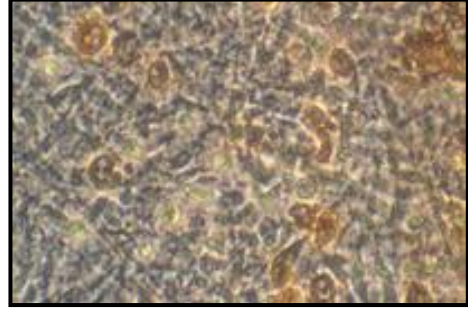
KR x400



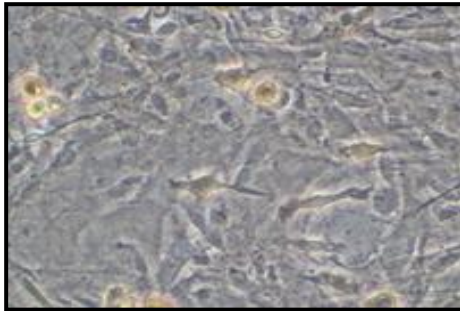
DP x400



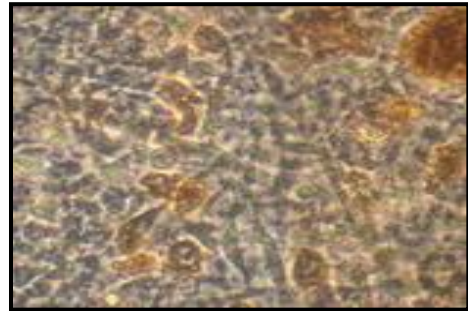
AP x400



DF x400



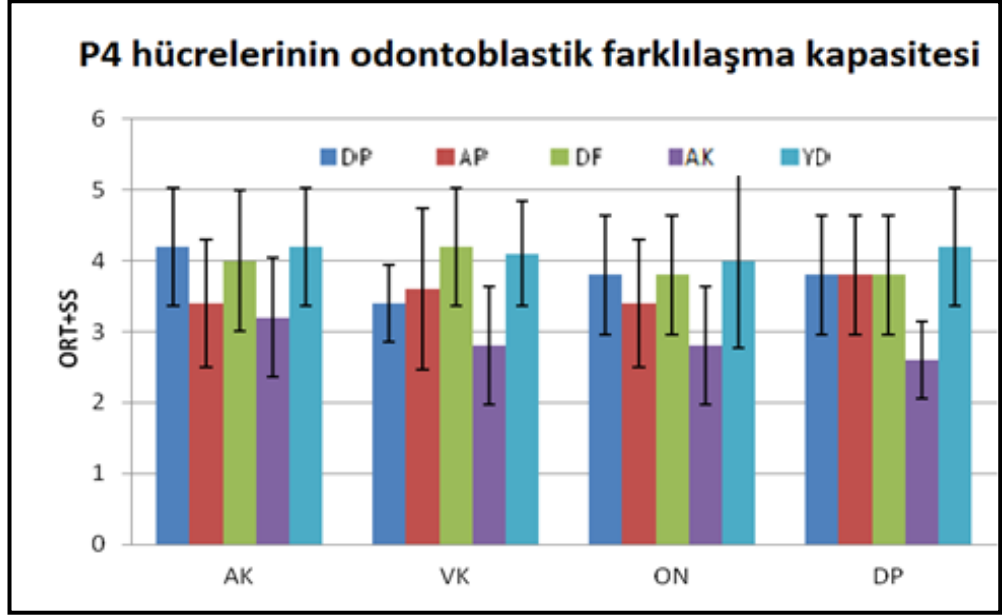
AK x400



YD x400

**Resim 36.** ODBY'ndeki P4 hücrelerinin dentin fosfoprotein belirteci ile boyanma görüntüleri

OKKH kültüründe odontoblastik besiyeri uygulaması ile P4 hücrelerinin farklılaşma potansiyelleri incelendiğinde grupların birbirine benzerlik gösterdikleri ancak YD hücrelerinin diğer hücre gruplarına oranla daha üstün olduğu saptandı. Odontoblastik farklılaşma anlamında YD hücrelerini DP ve DF hücrelerinin takip ettiği gözlemlendi (Grafik 7).



**Grafik 7.** P4 hücrelerinin ODBY'deki farklılaşma kapasitelerinin belirteç boyamalarına göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi

## BÖLÜM IV

### 5.TARTIŞMA

Günümüzde hastalıklı ya da hasar görmüş hücre, doku ve organların biyolojik işlevlerinin geri kazandırılmasını amaçlayan hücre esaslı tedavilerde mezenkimal kök hücreler giderek önem kazanmaktadır. Yakın bir geçmişe dayanan deneysel araştırmalardan sonra hematopoetik kök hücreler akut lösemi, lenfoproliferatif hastalıklar, hemoglobino patiler ve kalıtsal metabolik hastalıkların tedavisinde yüksek başarı oranları ile uygulanmaktadır.

Embriyonik kök hücrelerin in vitro ortamda sınırsız bir biçimde çoğaltılıp istenilen hücre tipine farklılaştırılmaları ve somatik hücre çekirdek transferi yöntemi ile kişiye özel üretim gerçekleştirilebilmektedir. Ancak in vivo ortamda yerine geçecekleri hücrelerde yeterli düzeyde benzerlik taşımalarını sağlayacak şekilde tekrarlanabilir ve etkin farklılaşabilmeleri hala önemli bir sorun olarak belirtilmektedir.

Belirli bir doku karakteri taşımayan MKH'ler, buldukları lokal mikroçevre ortamındaki bazı sinyallerin etkisiyle başta konnektif doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilmektedir. Farklılaşan bu hücreler, hasarlı olan bölgeye göç ederek doku tamirinde rol oynarlar (47,64).

Ancak, günümüzde bazı araştırmacılar MKH'lerin elde edildikleri dokuya göre farklı biyolojik özellikler taşıdıkları fikrini savunmaktadır. Bu düşünceden yola çıkılarak spesifik bir dokunun tamiri için hasarlı dokuya özgü kök hücrelerin elde edilmesi ve kullanımına yönelik çalışmalar gündeme gelmiştir (2,57,105,130,133).

Tuğlu ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları hayvan çalışmasında, sıçan mandibulasında oluşturdukları defektlerin iyileşme surecini incelemişlerdir. Kemik iliği stromal hücrelerini osteojenik farklılaşmaya yönlendirerek hidroksi apatit jel ile kombine olarak kullanmışlar ve hasarlı bölgedeki iyileşme surecinin daha hızlı ve etkin olduğunu belirtmişlerdir (118).

MKH'lerin buldukları dokulardan yeterli sayıda elde edilmeleri oldukça güçtür. Gerek klinik uygulamalar gerekse temel bilim araştırmalarında yeterli hücre sayılarına ulaşabilmek için in vitro ortamda çoğaltılmaları gerekmektedir. Kültür ortamında çoğaltılan MKH'ler ışık veya faz kontrast mikroskobu ile incelendiğinde hücrelerin iğ şeklinde fibroblast benzeri hücre toplulukları oldukları belirtilmektedir. Hücreler düşük konsantrasyonlarda kültüre edildiğinde koloni formasyonuna meyil ederken yüksek hücre yoğunluğunda ise yanyana dizilmiş hücre grupları şeklinde çoğaldıkları bildirilmektedir.

Bizde çalışmalarımızda minimal invaziv yöntemlerle elde edilen doku örnekleri, laboratuvar ortamında kültüre edilerek fibroblast benzeri stromal morfolojiye sahip MKH'ler elde ettik. Primer kültürlerdeki sayısal eşişsizliğin ortadan kaldırılmak, homojen hücre kültürü elde etmek ve pasaj sayısının artmasıyla birlikte hücrelerde sitogenetik bozukluk ve telomer kısalması gelişebileceğini belirten araştırmacıların uyarılarını dikkate alarak çoğaltma işlemini pasaj 4 (P4)'te sonlandırdık. P0' a göre ilerleyen pasajlarda hücrelerin daha fazla kolonileşme gösterdiklerini ve çoğalma kapasitelerinin daha yüksek olduğunu gözledik. Pasajlar arasında hücrelerin morfolojik görünümlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir değer taşımadığını saptadık.

Karaöz ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, 8 haftalık Wistar sıçanlarının femur ve tibialarından izole edilen kemik iliği kökenli MKH'ler in vitro ortamda pasaj 25'e kadar çoğaltılmıştır. İnkübasyonun ilk günlerinde MKH'lerin kültür kaplarına seyrek olarak yapıştığı ve hücrelerin iğsi görünümde fibroblastoid morfolojiye sahip oldukları gözlenmiştir. İnkübasyonun 3-4. günü hücrelerin küçük koloniler halinde çoğaldıkları izlenmiştir. Çoğalma devam ederken hücrelerin birbirleri ile bitişik ve bağlantılı biçimde kolonileşerek konfluent görünüm kazanmasının inkübasyonun 12-15. günlerine denk geldiği belirtilmiştir. İlerleyen pasajlarda hücrelerin biraz daha yassı veya fibroblastoid morfolojiye sahip oldukları gözlenmiş ve bu görüntünün 25.pasajda da herhangi bir farklılık göstermediği rapor edilmiştir (50).

Bakopoulou ve arkadaşları, gömük 3. azı dişlerinden izole ettikleri dental pulpa ve apikal papil hücrelerinin çoğalma kapasiteleri bakımından birbirlerinden farklı olduklarını rapor etmişlerdir. Apikal papil hücrelerinin konfluent olma süresinin dental pulpa hücrelerine göre daha kısa olduğu, dolayısıyla çoğalma kapasitelerinin de bu veri ile paralellik gösterdiği belirtilmiştir. Bu durumun 10. pasajda da farklılık göstermediği saptanmıştır (6).

Ikeda ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, sürmüş ya da gömülü 3. büyük azı dişi bulunan 5 hastadan alınan diş örneklerinden izole edilen dental pulpa ve periodontal ligament kökenli MKH'ler in vitro ortamda çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bu MKH'lerin 1. ve 3. günlerdeki çoğalma kapasitelerinin benzerlik gösterdiği, ancak 5., 7. ve 9. günlerde periodontal

ligament kökenli hücrelerin çoğalma kapasitelerinin dental pulpa kökenli hücrelere göre minimal düzeyde de olsa üstünlük gösterdiği bildirilmiştir (46).

Dental dokular ile kemik iliğinden elde edilen MKH'lerin in vitro koşullarda yapılan analizlerine göre, dental kökenli hücrelerin çoğalma kapasitelerinin kemik iliğinden izole edilen hücrelere oranla anlamlı derecede üstün oldukları Tamaki ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Aynı çalışmada dental dokular üzerinde yapılan değerlendirmeye göre, çoğalma kapasitelerinin sırasıyla dental folikül, apikal papil, periodontal ligament ve dental pulpa hücreleri şeklinde olduğu bildirilmiştir (112).

İncelediğimiz DP, DF, AP, AK ve YD gibi farklı kök hücre kaynaklarına dair hücre kültürü örneklerini karşılaştırdığımızda, çoğaltılma işlemi esnasında gözlenen kolonileşme oranında anlamlı bir fark gözlemedik. Ancak yaptığımız MTT canlılık testine göre hücrelerin çoğalma potansiyelleri ele alındığında 21 günlük inkübasyon süresinin sonunda YD hücrelerinin diğer kaynaklardan elde edilen hücrelere göre daha üstün olduğunu saptadık.

İnsan kaynaklı gömük 3.büyük azı dişlerinden izole edilen dental pulpa, dental folikül, periodontal ligament kökenli hücreler ile bukkal mukoza kökenli fibroblastlara yönelik karakterizasyon çalışması Lindroos ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Çalışmada dental kökenli hücreler 4 kez, bukkal mukoza fibroblastları ise 6 kez pasajlanarak çoğaltılmıştır. Çoğaltılan hücrelerin STRO-1, CD9, CD29, CD105, CD59, CD90, CD44, CD106, CD166 yüzey antijenlerini eksprese ettikleri gözlenmiştir. Bunun aksine hematopoetik kök hücre belirteci olan CD31 ve CD45 gibi antijenlerden yoksun oldukları bildirilmiştir (65).

Yagyu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, insan kaynaklı dental folikül ve dental papilladan izole edilen MKH'lerin CD90 ve CD105 antijenlerinin pozitiflik oranının %95'in üzerinde olduğu, bunun aksine CD34 ve CD45 antijenlerinin pozitiflik oranının ise %3'den daha az olduğu belirtilmiştir (125).

Zuk ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, lipoaspirasyon yöntemiyle alınan yağ dokusu hücrelerinin kültüre edilmesiyle elde edilen MKH'lerin flow sitometrik yöntemle eksprese ettikleri yüzey antijenleri incelenmiştir. Çalışmanın sonucuna göre yağ dokusu kökenli MKH'lerin CD29, CD44, CD71, CD90, CD105 ve STRO-1 antijenlerini eksprese ettikleri, ancak CD31, CD34 ve CD45 antijenlerine karşı ekspresyon göstermedikleri rapor edilmiştir (134).

Strem ve arkadaşlarının yağ dokusundan izole edilen MKH'lerin karakterizasyonlarını ve multipotent farklılaşma kapasitelerini inceledikleri çalışmada, CD105, STRO-1, CD166 antijenlerinin yanısıra CD117, CD29 ve CD44 antijenlerini eksprese ettikleri belirtilmiştir (111).

Elde edilen hücrelerin MKH olduklarını tespit edebilmek için STRO-1, CD105 ve C-KIT (CD117) boyamalarını yaptık ve hücrelerin bu yüzey antijen belirteçlerine karşı pozitif yanıt verdiklerini izledik. Özellikle YD ve DF hücrelerinin diğer kaynaklardan elde edilen hücrelere nazaran daha yoğun olarak boyandıklarını gördük. Ayrıca hematopoetik kök hücre belirteci olan CD45 boyamasına karşı hücrelerin pozitif olarak boyanmamaları da, bu hücrelerin MKH olduklarının diğer bir belirtisi olarak düşünüldü. Elde ettiğimiz

bulgular yukarıda bahsedilen çalışmaların bulguları ile paralellik göstermektedir.

MKH'lerin klinik kullanım açısından en önemli avantajlarından birisi de kültür ortamına eklenen faktörlerin yardımıyla farklı doku tiplerindeki hücelere farklılaşabilmesidir (59,95). Çeşitli araştırmacıların in vitro ortamda yaptıkları çalışmalarda, MKH'lerin osteojenik, adipojenik, kondrojenik, myojenik ve hatta nörojenik farklılaşma kapasitelerinin olduğu ve hematopoetik stroma oluşturabildikleri rapor edilmiştir (14,88,95,123).

Liu ve arkadaşları, ortodontik amaçlı çekim endikasyonu konulmuş, gömük 3. büyük azı dişlerinden elde ettikleri dental pulpa ve periodontal ligament kökenli MKH'lerin osteojenik ve odontojenik farklılaşma kapasitelerini değerlendirmek için; hücrelerin Von Kossa boyamasına verdikleri yanıt ile ALP aktivitelerini incelemişlerdir. Mineralizasyon depolanmalarının gözleendiği dental pulpa ve periodontal ligament hücrelerinin Von Kossa belirteci ile pozitif olarak boyandıkları gözlenmiş, ancak periodontal ligament hücrelerinde gözlenen mineral nodüllerinin daha yoğun bir biçimde izlendiği bildirilmiştir. İlerleyen pasajlarda da kalsiyum birikimine bağlı oluşan mineralizasyonun, periodontal ligament hücrelerinde anlamlı derecede yüksek olduğu rapor edilmiştir (66).

Cui ve arkadaşları, 2007 yılında köpek yağ dokusundan elde ettikleri MKH'leri mercan skaffold ile kombine uygulayarak daha önceden oluşturulan kraniyal defektin tamirini gerçekleştirmişlerdir. Osteojenik indüksiyon uygulanan hücrelerin ALP aktiviteleri incelenmiş olup 14. günde maksimum seviyeye ulaştığı rapor edilmiştir. 14. günden sonra ALP aktivitesinin stabil

konuma geldiği bildirilmiştir. Osteokalsin sekresyonu değerlendirildiğinde ise, osteojenik indüksiyon sonrasında artmaya başlayan ve 28. güne kadar azalma göstermeyen bir grafik izlenmiştir. Kontrol grubu incelendiğinde ise, 7. güne kadar ALP aktivitesi ve osteokalsin sekresyonunda artış gözlenmesine rağmen 7. günden sonra her iki parametreninde sinerjistik olarak azaldığı bildirilmiştir (19).

Gosau ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış oldukları insan çalışmasında, daimi ve süt dişlerden izole edilen AP ve SHED kökenli MKH'lerin odontoblastik besiyeri uygulamasının ardından ALP aktiviteleri değerlendirilerek farklılaşma kapasiteleri irdelenmiştir. Bu değerlendirmede hücreler, Alizarin kırmızısı ile boyanarak odontoblastik markırlar olan dentin sialo fosfoprotein, dentin matriks protein-1, bone sialoprotein ve osteokalsin ekspresyonları incelenmiştir. Farklılaşmanın 7. gününde DMP-1 ekspresyonu sadece AP hücrelerinde gözlenmiştir. Buna karşın BSP ekspresyonu ise sadece SHED hücrelerinde görülmüştür. Diğer markırların ekspresyonlarında ise her iki hücre kültüründe de benzer sonuçlara rastlanmıştır. Çalışmanın sonucunda farklı hücre kültürleri arasında mineralizasyon açısından anlamlı farklılıklar saptanmamış olup hücrelerin başarılı bir şekilde odontoblastlara farklılaştıkları bildirilmiştir (35).

Deri, kemik iliği ve dental folikül dokularından izole edilen MKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasitelerinin incelendiği çalışmada, Alizarin kırmızısı ve Von Kossa boyamaları ile mineralizasyon tanımlaması yapılmıştır. 2012 yılında Park ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada, osteojenik tanımlama işlemi, in vitro olarak elde edilen MKH'lerin kültürleme

işleminin 4. haftasında in vivo olarak scaffold üzerinde farelere subkutanöz olarak implante edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Kemik iliği ve dental folikül kökenli dokulardan izole edilen hücrelerin yüksek oranda osteokalsin ve osteonektin eksprese ettikleri gözlenmiştir. In vivo implantasyondan 4 hafta sonra yapılan radyolojik incelemeler sonucunda, deri dokusundan elde edilen hücre grubunun kontrol grubuna göre farklılık göstermediği rapor edilmiştir. Diğer hücre grupları incelendiği zaman radyolojik densitenin kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklılık gösterdiği belirtilmiştir. Kalsiyum birikimleri değerlendirildiğinde ise, en fazla birikimin dental folikül kökenli MKH'lerde görüldüğü bildirilmiştir (91).

16 ile 18 yaşları arasındaki 3 donörden çekilen gömük 3. azı dişlerinden izole edilen dental pulpa ve apikal papil kökenli MKH'lerin odontojenik farklılaşmaları araştırılmıştır. Bakopoulou ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada, hücreler 0.01 mM deksametazon disodyum fosfat, 1.8 mM monopotasyumfosfat ve 5mM b-gliserofosfat faktörlerinin besiyerine eklenmesiyle indüklenmiştir. 3-4 günde bir besiyeri değiştirilen hücreler 3 hafta boyunca kültüre edilmiştir. Farklılaştırma işleminin 2. haftasında odontojenik farklılaşma markırı olan dentin sialofosfoprotein ekspresyonunun ve yeni mineralize olmuş dentin benzeri yapıların gözlendiği bildirilmiştir. İndüklenmeyen grupta yer alan kontrol hücrelerinde ise çok düşük düzeyde dentin sialofosfoprotein ekspresyonu gözlenmiştir. Apikal papil hücreleri ile dental pulpa kökenli hücreler karşılaştırıldığında, apikal papil hücrelerinin dentin sialofosfoprotein ekspresyonunda gecikme olduğu rapor edilmiştir (6).

Yapmış olduğumuz çalışmada kültür ortamına ostejenik ve odontojenik besiyeri ekleyerek, elde ettiğimiz MKH'lerin osteoblastlara ve odontoblastlara farklılaşmalarını gözledik. Farklılaşma sağladıktan sonra DP, AP, DF, AK ve YD dokularından izole edilen MKH'lerin osteoblastik ve odontoblastik besiyerindeki çoğalma kapasitelerini değerlendirdik. Pasaj 4 sonunda elde edilen hücrelerin, osteoblastik ve odontoblastik besiyeri ortamındaki çoğalma kapasitelerinin faktör eklenmemiş normal besiyeri ile benzer şekilde olduğunu saptadık. Farklı kaynaklardan elde edilen hücreler kendi aralarında karşılaştırıldığında ise hem osteoblastik hem de odontoblastik besiyerindeki çoğalma kapasitesi en yüksek olan grubun YD kökenli MKH'ler olduğunu tespit ettik.

Odontoblastik ve osteoblastik besiyerlerinde çoğaltılan hücrelerin Alizarin kırmızısı, Von Kossa, osteonektin ve dentin fosfoprotein gibi farklılaşma belirteçleri ile boyamalarını yaptık. Farklı dokulardan elde ettiğimiz tüm hücrelerin pozitif boyanma gösterdiklerini ve en iyi boyanan hücre grubunun YD kökenli MKH'ler olduğunu gördük.

Oral kavitenin farklı bölgelerinden elde edilen nöral ark kökenli MKH kaynaklarının karakterizasyonlarını yaparak osteoblastik ve odontoblastik farklılaşma kapasitelerini değerlendirdik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, ektomezenkimal kökenli AP, DP, DF, AK ve YD hücrelerinin çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri literatürdeki çoğu çalışma ile paralellik göstermektedir.

Oral kavitede MKH kaynağı olabilecek dokuların birbirlerine göre üstünlüklerini değerlendirdiğimiz zaman hem çoğalma hem de osteojenik ve

odontojenik farklılaşma anlamında en üstün olan grubu YD kökenli MKH'ler olarak saptadık. Osteoplastik besiyeri uygulamasında çoğalma ve farklılaşma anlamında YD hücrelerini AK kökenli hücreler takip ederken, odontoplastik besiyeri uygulamasında ise bu durumun DP ve DF hücrelerinin lehine olduğunu gözledik.

## BÖLÜM V

### 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre; oral kavitenin farklı bölgelerindeki dental kökenli olan / olmayan dokulardan başarılı bir şekilde izole edilen hücrelerin, spesifik yüzey antijenlerini eksprese edebilme, plastik yüzeylere yapışabilme ve farklı hücre tiplerine (osteoblast, odontoblast) farklılaşabilme gibi MKH tanımlamasındaki temel kriterlerin hepsine sahip oldukları gözlemlendi.

Elde edilen farklı doku örneklerindeki hücrelerin morfolojik olarak fibroblastoid görünüme sahip oldukları ve birbirleri ile karşılaştırıldıklarında bu bağlamda aralarında anlamlı farklılıklar olmadığı görüldü. Yapılan karakterizasyon çalışmamızda ise; hücrelerde STRO-1, CD105, C-KIT yüzey antijenlerinin ekspresyonu gözlenmiş olup hücrelerin hematopoetik kök hücre belirteci olan CD45 ile pozitif boyanmadıkları saptandı. Bu bağlamda da farklı dokulardan izole ettiğimiz hücreler arasında belirgin bir farklılığa rastlanmadı ve literatürdeki diğer çalışmalar ile benzerlik gösterdiği saptandı.

Kültür ortamına eklediğimiz faktörlerin yardımıyla osteojenik ve odontojenik indükleme yapılan farklı doku kökenli hücrelerin Alizarin kırmızısı, Von-Kossa, osteonektin ve dentin fosfoprotein boyamalarına pozitif yanıt verdikleri gözlemlendi. Hücre kültür grupları arasında yaptığımız değerlendirmede ise; yanak yağ dokusundan izole ettiğimiz hücrelerin diğer dokulardan köken alan hücrelere göre her iki besiyerinde de hem çoğalma hem de farklılaşma kapasitelerinin anlamlı derecede üstün oldukları saptandı.

Bu sonuçlardan yola çıkarak; maksillofasiyal bölgede ve dişlerde meydana gelen defektlerin tamirinde yanak yağ dokusunun alternatiften ziyade temel bir MKH kaynağı olabileceği düşünüldü. İntraoral girişimle kolay bir biçimde ulaşılabilir olması, rutin oral cerrahi işlemlerle (sinüsplastik operasyonları) veya minimal invaziv yöntemlerle elde edilebilmesi (liposuction, lipoaspirasyon) ve buna bağlı olarak donör sahada gelişebilecek olası morbidite riskinin sıfıra yakın olması, yanak yağ dokusunun önemli avantajları olarak sayılabilir. Ayrıca diğer kaynaklarda da olduğu gibi her yaşta ve istenilen miktarda elde edilebilmesi sebebiyle, kök hücre bankalarında saklanma zorunluluğunun bulunmaması da maliyet açısından büyük avantaj olarak düşünülebilir.

## BÖLÜM VI

### ÖZET

#### ORAL KAVİTEDE FARKLI KAYNAKLARDAN ELDE EDİLEN ÖRNEKLERDEKİ KÖK HÜCRE POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI: DENEYSEL ÇALIŞMA

Kök hücreler insan vücudunda bütün dokuları ve organları oluşturan temel hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler, rejenerasyon kapasiteleri, immünsupresif özellikleri ve destek doku oluşturabilme yetenekleri nedeniyle hücresel tedavi uygulamalarına umut vermekte olup, günümüze kadar hiçbir sakıncasının görülmemiş olması oldukça anlam taşımaktadır. Kemik iliği başta olmak üzere birçok dokudan elde edilebildikleri gibi maksillofasial bölgede de MKH izolasyonu ile ilgili birçok literatür çalışması bulunmaktadır.

Çalışmada oral kavitenin MKH için potansiyel bir kaynak olabileceği düşünülerek bu bölgedeki farklı kaynaklardan elde edilen hücrelerin araştırılması amaçlandı. Denta pulpa, dental folikül, apikal papil, alveolar kemik ve yanak yağ dokusundan alınan örneklerdeki kök hücre potansiyellerinin yanısıra bu hücrelerin osteojenik ve odobtojenik farklılaşma kapasiteleri karşılaştırıldı.

Çalışmaya, ortodontik tedavi gören ve profilaktik olarak çekim endikasyonu konulmuş, kök gelişimini tamamlamamış gömük 20 yaş dişi olan 6 hasta (18-24 yaş) ile birlikte üst çene arka bölge diş çekimine bağlı oluşan sinüs perforasyonu bulunan 3 hasta (18-24 yaş) dahil edildi. Çekim sırasında yapılan osteotomi işlemi ile birlikte yaklaşık 2mm × 2mm × 1mm boyutlarında

alveol kemik dokusu örnekleri alındı. Ayrıca çalışma dahilinde sinüs perforasyonu gözlenen hastalarda, yanak yağ dokusu flebi kaydırılarak rutin sinüs kapatma işlemi uygulandı. Bu işlem sırasında yaklaşık 5mm uzunluğunda yağ dokusu örnekleri de elde edildi. İncelenmek üzere alınan dental pulpa, dental folikül, apikal papil, alveol kemik ve yağ dokusu örneklerinden hücre kültürü yapıldı ve tüm örneklerden adhezyon özelliği gösteren mezenkimal kök hücreler izole edilerek kültür besiyerinde dördüncü pasaja kadar çoğaltıldı. İmmünohistokimyal yöntem ile hücrelerin STRO-1, CD105 ve C-KIT için immünofenotipleri tanımlandı. Farklılaşma belirteçleri olarak Alizarin kırmızısı ve Von-kossa boyamaları yapıldı, immünohistokimyasal inceleme ile osteonektin ve dentinfosfoprotein tanımlamaları gerçekleştirildi.

Oral kavitedeki beş farklı kaynaktan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin belirteçler açısından STRO-1, CD105 ve C-KIT için herhangi bir fark oluşturmadıkları ve hatta benzer buldukları görüldü. Kültür besiyeri faktörleri ile yapılan farklılaşma deneylerinde ise elde edilen kök hücrelerin osteojenik ve odontojenik farklılaşma kapasitelerinin bulunduğu ve en iyi farklılaşmanın yağ dokusu kökenli hücrelerde olduğu görüldü.

Elde edilen sonuçlar, diğer yöntemlere göre daha minimal invaziv metodla elde edilebilir olması ve defekt bölgesine olan komşuluğu açısından avantaj sağlayan oral kavitedeki hücre kaynaklarının önemli bir mezenkimal kök hücre kaynağı olabileceği düşüncesini ortaya koymuş ve yanak yağ dokusu kökenli hücrelerin en ideal MKH kaynağı olabileceği kanıtlandı.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, yanak yağ dokusu, alveol kemik, diş, osteoblast, odontoblast, farklılaşma.

## **SUMMARY**

### **STEM CELLS POTENTIALS DERIVED FROM DIFFERENT SOURCES OF THE ORAL CAVITY: AN EXPERIMENTAL STUDY**

Stem cells form the basis of all tissues and organs in humans. Mesenchymal stem cells are utilized in cellular therapy due to their regenerative potentials, immune suppressive properties and ability to form connective tissue. Bone marrow and some other tissues can be used as a source of stem cells and their isolation from maxillofacial region is extensively studied in the literature.

This study aims to investigate stem cells obtained from various tissues accessible through the oral cavity. The potential for obtaining stem cells from dental pulp, dental follicle, apical papilla, alveolar bone and buccal fat pad is investigated as well as the osteogenic and odontogenic differentiation potential of these stem cells.

Tissue samples were obtained from 6 patients (aged 18 to 24) who were scheduled for removal of their impacted wisdom teeth with incomplete root formation, and 3 patients (aged 18 to 24) that were surgically treated for the oro-antral communication that occurred as a consequence of maxillary posterior teeth extraction. Bone samples measuring 2mm × 2mm × 1mm were obtained from alveolar bone during the osteotomy made for the removal of impacted wisdom teeth. Buccal fat pad samples were obtained during the two-layered (buccal fat pad and mucoperiosteal flaps) surgical closure of oro-antral communications. Dental pulp, dental follicle and apical papilla were also harvested from the removed wisdom teeth. Tissue samples were

processed for cell culture and stem cells with adhesive properties were isolated and cultured for 4 passages. Most common of MSC's markers, such as STRO-1, CD105 and C-KIT were expressed in all group of cells. Differentiation of the cultured stem cells were identified by Alizarin red and Von-Kossa staining. Osteonectine and dentinephosphoprotein identification were done by immunohistochemical analysis.

Stem cells obtained from 5 different sources in the oral cavity were identified to be similar. Osteogenic and odontogenic differentiation potential of stem cells obtained from fat tissue were found to superior to other tissues.

Results of this study show that oral tissues are an important source of stem cells and that they can easily be obtained less invasively within close proximity to maxillofacial deffect sites.

Key words: Mesenchymal stem cells, buccal fat pad, alveolar bone, tooth, osteoblast, odontoblast, differentiation.

## BÖLÜM VII

### YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Abdallah BM, Kassem M. (2008) Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 15:109-16.
2. Akintoye SO, Lam T, Shi S, Brahim J, Collins MT, Robey PG. (2006) Skeletal site specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. *Bone.* 38:758-68.
3. Alhadlaq A, Mao JJ. (2004) Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev.* 13:436-48.
4. Alsan S. (1998) Yeni bin yılın tedavi araçları: kök hücreler. *Bilim ve Teknik Dergisi.* 1-7.
5. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. (2003) Fusion of bone marrow derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature.* 425:968-73.
6. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W. (2010) Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Archives of Oral Biology.* 56:709-21.
7. Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. (2003) Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion independent survival and expansion. *Exp Hematol.* 31:723-32.

8. Blazsek I, Delmas Marsalet B, Legras S, Marion S, Machover D, Misset JL. (1999) Large scale recovery and characterization of stromal cell-associated primitive hematopoietic progenitor cells from filter-retained human bone marrow. *Bone Marrow Transplant.* 23:647-57.
9. Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA. (2008) Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater.* 16:1-9.
10. Boland GM, Perkins G, Hall D. (2004) Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry.* 93:1210-30.
11. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. (1997) Growth kinetics self renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem.* 64:278-94.
12. Can A, Karahüseyinoğlu S. Erişkin kök hücrelerin farklanmasındaki hücrel ve moleküler mekanizmalar. *Sağlıkta Birikim.* Cilt 1 Sayı 5.
13. Cao B, Zheng B, Jankowski RJ, Kimura S, Ikezawa M, Deasy B, Cummins J, Epperly M, Qu-Petersen Z, Huard J. (2003) Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat Cell Biol.* 5:640-46.
14. Caplan AI, Dennis JE. (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 98:1076-84.
15. Caplan AI. (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 9:641-50.

16. Cicconetti A, Sacchetti B, Bartoli A. (2007) Human maxillary tuberosity and jaw periosteum as sources of osteoprogenitor cells for tissue engineering. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 104:618.
17. Conget PA, Minguell JJ. (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 181:67-73.
18. Creeper F, Lichanska AM, Marshall RI, Seymour GJ, Ivanovski S. (2009) The effect of platelet-rich plasma on osteoblast and periodontal ligament cell migration, proliferation and differentiation. *Journal of Periodontal Research.* 2:258-65.
19. Cui L, Liu B, Liu G, Zhang W, Cen L, Sun J, Yin S, Liu W, Cao Y. (2007) Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials.* 28:5477-86.
20. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. (2001) Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44:1928-42.
21. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH, Fraser JK. (2003) Differential expression of stem cell mobilization associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett.* 89:267-70.
22. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH.

(2003) Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 174:101-09.

23. Deans RJ. (2000) Mesenchymal stem cells: cell and gene therapy applications. *Eur Cytokine Netw*. 11:323-24.

24. Dickinson AM, Charron D. (2005) Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol*. 17:517-25.

25. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*. 8:315-17.

26. Eroğlu T. (2008) Dişeti ve dental folikül dokularında mezenkimal kök hücre araştırılması ve plastisitelerinin karşılaştırılması. Doktora Tezi. *Başkent Üniv Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.

27. Ferrari G, Cusella G, Angelis D, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 279:1528-30.

28. Fibbe WE. (2002) Mesenchymal stem cells: a potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis*. 2:29-31.

29. Filip S, English D, Mokry J. (2004) Issues in stem cell plasticity. *J Cell Mol Med*. 8:572-77.

30. Fortier LA. (2005) Stem cells: classifications, controversies and clinical applications. *Vet Surg*. 34:415-23.

31. Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM. (2007) Culture of human stem cells. *Wiley Interscience Publication*. 233-49.
32. Friedenstein AJ. (1980) Immunology of bone marrow transplantation. *Berlin: Springer*.
33. Friendlander LT, Cullinan MP, Love RM. (2009) Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. *International Endodontic Journal*. 42:955-62.
34. Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Conover CA, O'Driscoll SW. (2003) Combined effects of insulin like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. 11:55-64.
35. Gosau M, Götz W, Felthaus O, Ettl T, Jager A, Morsczeck C. (2012) Comparison of the differentiation potential of neural crest derived progenitor cells from apical papilla (dNC-PCs) and stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED) into mineralising cells. *Archives of Oral Biology*. 2919:1-8.
36. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A. (2002) Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 81:531-35.
37. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 97:13625-30.

38. Herzog EL, Chai L, Krause DS. (2003) Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 102:3483-93.
39. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 7:393-95.
40. <http://carolinewallacedds.blogspot.com/2012/04/dentistry-and-stemcells-future.html>
41. [http://en.wikipedia.org/wiki/Cell\\_potency](http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_potency)
42. [http://en.wikipedia.org/wiki/Stem\\_cell](http://en.wikipedia.org/wiki/Stem_cell)
43. <http://www.embriyo.org/?part=urun&gorev=oku&id=192>
44. [http://www.olympusamerica.com/seg\\_section/product.asp?product=1038](http://www.olympusamerica.com/seg_section/product.asp?product=1038)
45. Huysseune A, Thesleff I. (2004) Continuous tooth replacement: the possible involvement of epithelial stem cells. *Bioessays*. 26:665-71.
46. Ikeda H, Sumita Y, Ikeda M, Ikeda H, Okumura T, Sakai E, Nishimura M, Asahina I. (2011) Engineering bone formation from human dental pulp and periodontal ligament-derived cells. *Annals of Biomedical Engineering*. 39:26-34.
47. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, OrtizGonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S,

Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 418:41-9.

48. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH. (2007) Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng*. 13:767-73.

49. Kansu E. (2007) Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar. 4.National bone marrow transplantation and stem cell therapies congress. 1-2.

50. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Eker Sarıboyacı A, Kaymaz F, Kasap M. (2009) Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol*. 132:533-46.

51. Karaöz E, Ovalı E. (2004) Kök hücreler. Celepler matbaası, Trabzon. 17-68.

52. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. (2004) Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 95:209-14.

53. Keller R. (2002) Stem cells on the way to restorative medicine. *Immunology Letters*. 83:1-12.

54. Kemoun PH, Laurencin S, Rue J, Farges J, Salles JP, Brunel G. (2007) Human dental follicle cells acquire cementoblast features under BMP-

2/-7 and enamel matrix derivatives stimulation in vitro. *Euro Cel and Materia*. 14:93.

55. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW. (2000) Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high dose chemotherapy. *Clin Oncol*. 18:307-16.

56. Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. (2002) Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of Metachromatic Leukodystrophy (MLD) and Hurler Syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant*. 30:215-22.

57. Koga H, Muneta T, Nagase T, Nimura A, Ju YJ, Mochizuki T, Sekiya I. (2008) Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res*. 333:207-15.

58. Krebsbach PH, Robey PG. (2002) Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. *J Dent Educ*. 66:766-73.

59. Lakshmi pathy U, Verfaillie C. (2005) Stem cell plasticity. *Blood Rev*. 19:29-38.

60. Lang H, Schüler N, Nolden R. (1998) Attachment formation following replantation of cultured cells into periodontal defects: A study in mini pigs. *J Dent Res*. 77:393-405.

61. Lanza F, Campioni D, Moretti S, Dominici M, Punturieri M, Focarile E, Pauli S, Dabusti M, Tieghi A, Bacilieri M, Scapoli C, De Angeli C, Galluccio L, Castoldi G. (2001) CD3 cell subsets and long-term culture colony-forming cells evaluated on both autologous and normal bone marrow stroma predict long-term hematopoietic engraftment in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Experimental Hematology*. 29:1484-93.
62. Le Blanc K , Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. (2004) Treatment of severe Acute Graft Versus Host Disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet*. 363:1439-41.
63. Le Blanc K, Mougiakakos D. (2012) Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nature Reviews Immunology*. 12:383-96.
64. Le Blanc K, Ringdén O. (2005) Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 11:321-34.
65. Lindroos B, Maenpaa K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S. (2008) Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 368:329-35.
66. Liu L, Ling J, Wei X, Wu L, Xiao Y. (2009). Stem cell regulatory gene expression in human adult dental pulp and periodontal ligament cells

undergoing odontogenic/osteogenic differentiation. *Journal of Endodontics*. 35:1368-76.

67. Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, He C, Dash AB, Clarke J, Gleneck K, Shihabuddin L, Tubo R. (2002) Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Engineering*. 8:739-51.

68. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. (1998) Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*. 176:57-66.

69. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, Shi S. (2006) Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res*. 85:966-79.

70. Maria OM, Khosravi R, Mezey E, Tran SD. (2007) Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications. *Oral Dis*. 13:11-6.

71. Martin-Rendon E, Watt SM. (2003). Exploitation of stem cell plasticity. *Transfus Med*. 13:325-49.

72. Matsubara T, Suardita K, Ishii M, Sugiyama M, Igarashi A, Oda R, Nishimura M, Saito M, Nakagawa K, Yamanaka K, Miyazaki K, Shimizu M, Bhawal UK, Tsuji K, Nakamura K, Kato Y. (2004) Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: Differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*. 20:399-409.

73. Mauney JR, Jaquiéry C, Volloch V, Heberer M, Martin I, Kaplan DL. (2005) In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. *Biomaterials*. 26:3173-85.
74. Meirelles S, Nardi NB. (2003). Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol*. 123: 702-11.
75. Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, Dejeneffe M, Massy M, Libertalis M, Bron D, Lagneaux L. (2006). Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical Alpha-MEM Medium. *Eur J Haematol*. 76:309-16.
76. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. (2000) Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 290:1779-82.
77. Millar SE, Koyama E, Reddy ST, Andl T, Gaddapara T, Piddington R, Gibson CW. (2003) Over and ectopic expression of Wnt 3 Causes progressive loss of ameloblasts in post natal mouse incisor teeth. *Connect Tissue Res*. 44:124-29.
78. Minguell JJ, Erices, Conget P. (2001) Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Biology and Medicine*. 226:507-20.
79. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. 8:315-17.

80. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG. (2003) SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci.* 100:5807-12.
81. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O. (2008) Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig.* 12:113-18.
82. Mouseddine M, Franc S, Semont A, Sache A, Allenet B, Mathieu N, Frick J, Thierry D, Chapel A. (2007) Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model. *The British Journal of Radiology.* 80:49-55
83. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. (2007) Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod.* 33:377-90.
84. Nakashima M, Tanese N, Ito M, Auerbach W, Bai C. (2002) A novel gene Gli H1 with homology to the Gli zinc finger domain not required for mouse development. *Mechanism of development.* 119:21-34.
85. National Institutes of Health. (2001) Stem cells: Scientific progress and future research directions. Terese Winslow.
86. Nishimori M, Yamada Y, Hoshi K, Akiyama Y, Hoshi Y, Morishima Y, Tsuchida M, Fukuhara S, Koderu Y. (2002) Health related quality of life of unrelated bone marrow donors in Japan. *Blood.* 99:1995-2001.

87. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Natura*. 410:701-05.
88. Owen M., Friedenstein AJ. (1988) Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 136:42-60.
89. Owen ME. (1998) The marrow stromal system. *In Marrow Stromal Cell Culture*. Cambridge Univ. Press. 1-10.
90. Özel BH, Ozan E, Dabak DÖ. (2008) Embryonic stem cells. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 28:333-41.
91. Park BW, Kang EJ, Byun JH, Son MG, Kim HJ, Hah YS, Kim TH, Kumar BM, Ock SA, Rho GJ. (2012) In vitro and in vivo osteogenesis of human mesenchymal stem cells derived from skin, bone marrow and dental follicle tissues. *Differentiation*. 83:249-59.
92. Parker GC, Anastassova-Kristeva M, Broxmeyer HE, Dodge WH, Eisenberg LM, Gehling UM, Guenin LM, Huss R, Moldovan NI, Rao M, Srour EF, Yoder MC. (2004) Stem cells: shibboleths of development. *Stem Cells Dev*. 13:579-84.
93. Patricia AZ, Min Z, Ashjian P, Daniel A, Huang JI, Mizuno H, Zeni C, Fraser JK, Benhaim P, Marc H. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *MBC Online*. 13:4279-95.
94. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Darwin J. (1999) Prockop plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of

inbred mice: variations in yield, growth and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 72:570-85

95. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999) Multi-lineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284:1168-70.

96. Poulosom R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. (2002) Adult stem cell plasticity. *J Pathol*. 197:441-56.

97. Poulosom R, Alison MR, Cook T, Jeffery R, Ryan E, Forbes SJ, Hunt T, Wyles S, Wright NA. (2003) Bone marrow stem cells contribute to healing of the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 14:48-54.

98. Prockop DJ. (1997) Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science*. 276:71-4.

99. Quesenberry PJ, Dooner G, Colvin G, Abedi M. (2005) Stem cell biology and the plasticity polemic. *Exp Hematol*. 33:389-94.

100. Rafii S, Shapiro F, Rimarachin J, Nachman RL, Ferris B, Weksler B, Moore MA, Asch AS. (1994) Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: Hematopoietic progenitor cell adhesion. *Blood*. 84:10-9.

101. Ratajczak MZ, Reza R, Wysoczynski M, Yan J, Ratajczak J. (2006) Modulation of the SDF-1-CXCR4 axis by the third complement component (C3)-implications for trafficking of CXCR4+ stem cells. *Exp Hematol*. 34:986-95.

102. Rendon-Martin E, Watt SM. (2003) Exploitation of stem cell plasticity. *Transfusion Med.* 13:325-49.
103. Risbud MV, Shapiro IM. (2005) Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering. *Orthod Craniofacial Res.* 8:54-9.
104. Roche E, Jones J, Arribas MI, Leon-Quinto T, Soria B. (2006) Role of small bioorganic molecules in stem cell differentiation to insulin-producing cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*14:6466-74.
105. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. (2005) Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 52:2521-29.
106. Scott T Avecilla. (2004) Chemokine mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature Medicine.* 10:64-71.
107. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold BM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 364:149-55.
108. Shibata D, Tavaré S. (2007) Stem cell chronicles: autobiographies within genomes. *Stem Cell Rev.* 3:94-103.
109. Shizuko I, Motoki T, Takeshi M, Ichiro S. (2005) Morphological examination during in vitro cartilage formation by human mesenchymal stem cells. *Cell and Tissue Res.* 322:217-26.

110. Steinhardt Y, Aslan H, Regev E, Zilberman Y, Kallai I, Gazit D, Gazit Z. (2008) Maxillofacial derived stem cells regenerate critical mandibular bone defect. *Tissue Eng.* 14:1763-73.
111. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. (2005) Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.*54:132-41.
112. Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S. (2012) In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology.*
113. Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. (2000) Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation induced myeloablation. *Hepatology.* 31:235-40.
114. Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, Shaughnessy JD. (2003) The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med.* 349:2483-94.
115. Todorović V, Marković D, Milošević-Jovčić N, Petakov M, Balint B, Čolić M, Milenković A, Čolak I, Jokanović V, Nikolić N. (2008) Dental pulp stem cells-potential significance in regenerative medicine. *Stom Glas.* 55:170-78.
116. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. (2004) Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second trimester amniotic fluid using a novel two stage culture protocol. *Hum Reprod.* 19:1450-56.

117. Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y. (1992) Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 37:1045-55.1
118. Tuğlu Mİ, Koca H, Saraç A, Kazanç A, Barut T, Özdal Kurt F. (2010) The contribution of differentiated bone marrow stromal cell-loaded biomaterial to treatment in critical size defekt model in rats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 16:783-92.
119. Uçkan Çetinkaya D. (2009) Kök hücre biyolojisi ve klinik uygulamalar. *Türkiye Bilimler Akademisi Raporları.* 20:53-61.
120. Völlner F, Driemel O, Reichert TE, Morsczeck C. (2007) Differentiation and charecterization of dental follicle precursor cells. *Euro Cel and Materia.* 14:111.
121. Weissman IL. (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. *Science.* 287:1442-46.
122. Wen X, Nie X, Zhang L, Liu L, Deng M. (2011) Adipose tissue-deprived stem cells acquire cementoblast features treated with dental follicle cell conditioned medium containing dentin non-collagenous proteins in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 409:583-89.
123. Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G, Rogiste B. (2005) Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: Switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells.* 23:392-402.

124. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. (2004) A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. 104:2643-45.
125. Yagyuu T, Ikeda E, Ohgushi H, Tadokoro M, Hirose M, Maeda M, Inagake K, Kirita T. (2010) Hard tissue-forming potential of stem/progenitor cells in human dental follicle and dental papilla. *Archives of Oral Biology*. 55:68-76.
126. Yamankoç G, Aren G. (2010) İnsan dişlerinin doku mühendisliğindeki önemi. *İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*. 44:33-8.
127. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. (2008) Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res*. 87:767-71.
128. Yen AH-H, Sharpe PT. (2008) Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res*. 331:359-72.
129. Yokoi T, Saito M, Kiyono T, Iseki S, Kosaka K, Nishida E, Tsubakimoto T, Harada H, Noguchi T, Teranaka T. (2007) Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell Tissue Res*. 327:301-11.
130. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. (2007) Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue and muscle. *Cell Tissue Res*. 327:449-62.

131. Yu J, Shi J, Jin Y. (2008) Current approaches and challenges in making a bio-tooth. *Tissue Eng.* 14:307-19.
132. Zhang W, Walboomers XF, Van Kuppevelt TH, Daamen WF, Van Damme PA, Bian Z, Jansen JA. (2008) In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. *J Tissue Eng Regen Med.* 2:117-25.
133. Zhu SJ, Choi BH, Huh JY. (2006) A comparative qualitative histological analysis of tissue-engineered bone using bone marrow mesenchymal stem cells, alveolar bone cells and periosteal cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 101:166-71.
134. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 13:4279-95.

## **ÖZGEÇMİŞ**

20.10.1984 yılı Eskişehir doğumlu olup ilköğrenimimi 1990-1995 yılları arasında Eskişehir İbrahim Karaoğlanoğlu İlkokulu'nda tamamladım. 1995-1998 yılları arasında ortaöğrenimimi Eskişehir Atatürk Ortaokulu'nda tamamladıktan sonra lise öğrenim hayatım başladı. Aynı yıl Eskişehir Yunusemre Lisesi Yabancı Dil Ağırlıklı Bölümü'ne girdim. 4 yıllık lise öğrenimimi tamamladıktan sonra 2002 yılında Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi'ne girmeye hak kazandım. İlk yılı yabancı dil hazırlık sınıfı ile geçen üniversite öğrenimimi 2008 yılında tamamlayarak "Dişhekimi" ünvanını aldım. Aynı yıl fakültemizin Ağız,Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'na girerek doktora eğitimime başladım. 2010 yılında "Araştırma Görevlisi" kadrosuna atandım ve halen daha aynı anabilim dalı bünyesinde çalışmalarına devam etmekteyim.