

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENTAL PULPA KÖK HÜCRELERİNİN İZOLASYONU,
KARAKTERİZASYONU VE ODONTOJENİK FARKLILAŞMA
POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ

Doktora Tezi

Dışhekim

Dt. Çiğdem ATALAYIN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL

İZMİR

2013

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Hüseyin TEZEL

(Danışman)

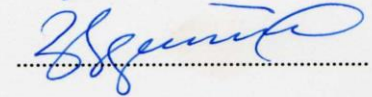
Üye : Prof. Dr. Zeynep ERGÜCÜ

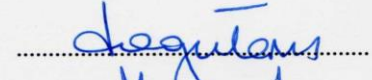
Üye : Doç. Dr. Taner DAĞCI

Üye : Prof. Dr. Ferit ÖZATA

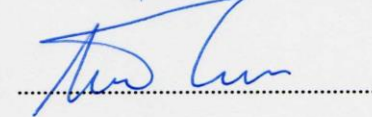
Üye : Doç. Dr. Hande ŞAR SANCAKLI











Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: 22.08.2013

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca hekimlik mesleği ve hayata yaklaşımıyla bana örnek olan, değerli bilgi birikimi ve tecrübeleriyle akademik yol haritamaya yön veren, sabır ve hoşgörüsüyle her zaman yanımda olan ve yoluma ışık tutan doktora tez danışmanım **Prof. Dr. Hüseyin TEZEL'e**,

Tezimin tüm aşamalarında değerli bilgi ve yardımlarıyla çalışmalarımın yönlendirilmesi ve yürütülmesinde sabır ve ilgiyle destek veren, doktora eğitimim boyunca katkılarını esirgemeyen ve cesaretimi artıran **Doç. Dr. Taner DAĞCI'ya**

Doktora Tez İzleme Komitesinde yer alan ve tez aşamasında olumlu katkı ve eleştirileri ile beni sürekli motive eden **Prof. Dr. Zeynep ERGÜCÜ'ye**,

Tezimin RT-PCR analizi aşamalarında yardımlarını esirgemeyen ve ihtiyacım olduğu her an bilgi ve düşüncelerine başvurduğum **Doç. Dr. N. Ülkü Karabay YAVAŞOĞLU'na**

Akım sitometri analizi ve histolojik inceleme aşamalarında gerekli olanakları tanıyan, yardımlarını esirgemeyen **Doç. Dr. Gülperi ÖKTEM'e** ve yardımları için Sayın **Ümmü Güven'e**,

Doktora eğitimim boyunca değerli bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan ve desteğini benden esirgemeyen **Prof. Dr. Ferit ÖZATA'ya**;

Tez konumun belirlenmesi aşamasında değerli fikirleri ve yol göstericiliği ile katkıda bulunan ve destek olan **Prof. Dr. Tijen PAMİR'e**,

Doktora eğitimimde bilgi ve deneyimlerimden yararlandığım Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı'nın **tüm değerli öğretim üyelerine**, bana destek veren anabilim dalımızın **tüm personeline**,

Tezimin çeşitli aşamalarındaki yardım ve destekleri için Ağız, Diş ve Çene Hastalıkları Anabilim Dalı ve Fizyoloji Anabilim Dalı **öğretim üyelerine**, **asistanlarına ve personeline**,

Doktora eğitimim süresince destek ve anlayışlarını esirgemeyen tüm **doktora öğrencisi arkadaşlarıma**,

Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) - 2211 Yurtiçi Doktora Burs Programı kapsamında doktora eğitimim boyunca bana maddi destek sağlayan ve bu sürecin kolaylaşmasına yardımcı olan **Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na**,

2009-DİŞ-036 no'lu proje kapsamında maddi destek sağlayan **Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü'ne**,

Desteğini her zaman yanımda hissettiğim, varlığı ile hayatıma anlam katan **F. Can ÖZKAYA'ya**,

Hayatım boyunca sabır ve hoşgörüsüyle her zaman yanımda olan, sonsuz fedakarlığı ile hayatımdaki en büyük şansım **anneme** ve sevgili **aileme** içtenlikle **teşekkür ederim.**

İzmir 2013

Dt. Çiğdem ATALAYIN

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
GRAFİKLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ.....	xi

1. BÖLÜM

GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
1.1. Kök Hücre Kavramı.....	3
1.2. Somatik Kök Hücreler.....	8
1.2.1. Somatik Kök Hücre Plastisitesi ve Plastisiteyi Etkileyen Faktörler	10
1.2.2. Kök Hücre Nişi.....	13
1.3. Mezenkimal Kök Hücreler	14
1.3.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin <i>in vitro</i> Özellikleri ve Farklılaşma Potansiyelleri.....	16
1.4. Diş Kaynaklı Kök Hücreler.....	20
1.5. Dental Pulpa Kök Hücreleri.....	25
1.6. Rejeneratif Dişhekimliği.....	29
1.6.1. Embriyonik Diş Gelişimi (Organogenezis, Embriyogenezis).....	32
1.6.2. Diş - Doku Mühendisliği Konsepti.....	38
1.6.2.1. Hücre Karakterizasyonu ve Farklılaşmanın Belirlenmesi.....	39
1.6.2.2. Büyüme ve Farklılaşma Faktörleri.....	43
1.6.2.3. Skaffold.....	43

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM.....	46
2.1. İnsan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Hücre Sayımı.....	46
2.2. İnsan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Akım Sitometri Analizi.....	50
2.3. İnsan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Odontojenik Farklılaştırılması.....	51
2.3.1. Histolojik İnceleme.....	53
2.3.2. RT-PCR Analizi.....	54
2.3.2.1. Kültür Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu.....	54
2.3.2.2. RNA' dan cDNA Sentezi.....	55
2.3.2.3. Real Time – PCR.....	56
2.3.2.4. Veri Analizi.....	57
2.4. İnsan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Transplantasyonu.....	58
2.4.1. Transplantasyon Sonrası Histolojik İnceleme.....	60
2.4.2. Transplantasyon Sonrası RT-PCR Analizi.....	61
2.4.2.1. Dokulardan Total RNA İzolasyonu.....	61

3. BÖLÜM

BULGULAR.....	63
3.1. İnsan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Morfolojik Özellikleri.....	63
3.2. İnsan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Akım Sitometri Analizi Sonuçları.....	65
3.3. İnsan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Odontojenik Farklılaşma Potansiyeli.....	74
3.3.1. Morfolojik Özellikleri.....	74
3.3.2. Histolojik İnceleme.....	76
3.3.3. RT-PCR Sonuçları.....	79
3.4. İnsan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Transplantasyonu.....	84
3.4.1. Histolojik İnceleme.....	84
3.4.2. RT-PCR Sonuçları.....	88

4. BÖLÜM

TARTIŞMA.....	90
---------------	----

5. BÖLÜM

SONUÇ.....	101
------------	-----

6. BÖLÜM

ÖZET.....	103
ABSTRACT.....	105

7. BÖLÜM

KAYNAKLAR.....	107
ÖZGEÇMİŞ.....	135
EKLER.....	136

TABLULAR DİZİNİ**Sayfa No**

Tablo 1.1: Embriyonik ve somatik kök hücrelerin karşılaştırılması.....	7
Tablo 1.2: İnsan diş dokusu kaynaklı kök hücrelerin özellikleri.....	24
Tablo 1.3: Dental pulpa kök hücreleri ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin hücre yüzey protein ekspresyonlarının karşılaştırılması.....	27
Tablo 2.1: Mezenkimal kök hücre besi ortamı içeriği.....	49
Tablo 2.2: Odontojenik farklılaştırma - kök hücre besi ortamı içeriği.....	52
Tablo 2.3: Beş gen için primer sekansları.....	57
Tablo 3.1: 72 saatlik kültür sonrası akım sitometri analizinde yüzey belirteçleri için ekspresyon düzeylerinin dağılımı.....	68
Tablo 3.2: CD73 + CD90 double-pozitif ekspresyon düzeyi (P0).....	70
Tablo 3.3: CD73 + CD90 double-pozitif ekspresyon düzeyi (P1).....	73
Tablo 3.4: 7 Günlük kültür periyodu sonucunda gerçekleştirilen RT-PCR analizi sonucu deney ve kontrol gruplarında beş gen için elde edilen Ct ve Δ Ct değerleri.....	79
Tablo 3.5: 14 Günlük kültür periyodu sonucunda gerçekleştirilen RT-PCR analizi sonucu deney ve kontrol gruplarında beş gen için elde edilen Ct ve Δ Ct değerleri.....	80
Tablo 3.6: 21 Günlük kültür periyodu sonucunda gerçekleştirilen RT-PCR analizi sonucu deney ve kontrol gruplarında beş gen için elde edilen Ct ve Δ Ct değerleri.....	80
Tablo 3.7: Deney grubu için 7, 14 ve 21 günlük kültür periyotları sonrasında kontrol grubuna göre hesaplanan $\Delta\Delta$ Ct değerleri ve katlı değişim oranları.....	81
Tablo 3.8: Deney (+) ve kontrol (-) grubu için 6 haftalık transplantasyon süresi sonrasında elde edilen Ct ve Δ Ct değerleri.....	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1: Kök hücrelerin sınıflandırılması.....	6
Şekil 1.2: Kök hücre bölünmesi ve farklılaşması.....	14
Şekil 1.3: Diş kaynaklı kök hücreler.....	21
Şekil 1.4: Dental pulpa kök hücrelerinin <i>in vitro</i> koşullarda üretim aşamaları.....	26
Şekil 1.5: İnsan/fare dişlerinin gelişimindeki aşamalar ve sinyal sistemi.....	33
Şekil 1.6: Dental lamina aşamasından diş erüpsiyonuna kadar olan diş morfogenezisini destekleyen ve yönlendiren karmaşık sinyal ağı, sinyal iletimi ve gen regülasyonu.....	36

Grafik 3.1: Akım sitometri analizi için seçilen, hücrelerin (P0) büyüklük ve granülizasyonlarının en iyi olduğu alan.....	66
Grafik 3.2: CD73, CD90, CD34 için ve CD45 için tekli-pozitif alanlar (P0).....	67
Grafik 3.3: Mezenkimal ve hematopoietik kök hücre yüzey belirteçleri ekspresyon düzeyi (P0).....	68
Grafik 3.4: CD73 ve CD90 için belirlenen ikili ekspresyon alanları (P0).....	69
Grafik 3.5: Mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri ekspresyon düzeyi (P0).....	70
Grafik 3.6: 21 günlük kültür periyodu hücrelerinin (P1) akım sitometri analizi için FSC ve SSC diyagramında belirlenen alan.....	71
Grafik 3.7: 21 günlük kültür hücrelerinin (P1) yüzey belirteçleri için ikili ekspresyon alanları.....	72
Grafik 3.8: Mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri ekspresyon düzeyi (P1).....	73
Grafik 3.9: DSPP'nin 7, 14 ve 21 günlük kültür periyotlarında ekspresyon düzeyindeki artış oranı.....	82
Grafik 3.10: DMP1'in 7, 14 ve 21 günlük kültür periyotlarında ekspresyon düzeyindeki artış oranı.....	82
Grafik 3.11: Enamelysin/MMP20'nin 7, 14 ve 21 günlük kültür periyotlarında ekspresyon düzeyindeki artış oranı.....	83
Grafik 3.12: Phex'in 7, 14 ve 21 günlük kültür periyotlarında ekspresyon düzeyindeki artış oranı.....	83
Grafik 3.13: 6 haftalık transplantasyon süresi sonrasında kontrol grubuna oranla odontojenik farklılaşma uyarılan deney grubunda mine ve dentin matris komponentleri için insan-spesifik transkriptlerinin ekspresyon düzeyindeki değişim.....	89

Resim 2.1: Yirmi yaş diş çekimi (A) ve pulpa dokusunun çıkarılması (B).....	47
Resim 2.2: <i>In vitro</i> hücre kültür öncesi hazırlık aşamaları: Pulpa dokusunun mekanik ve enzimatik olarak parçalanması (A), santrifüjleme ve filtrasyon (B), hücre sayımı (C) ve hücre ekimi (D).....	48
Resim 2.3: HA/TCP taşıyıcı ile karıştırılan dental pulpa kök hücre süspansiyonunun (A), immun baskılanmış farenin sırtına (subkutan cep içine) (B) transplantasyonu.....	59
Resim 2.4: 6 haftalık sürenin sonunda histolojik inceleme ve RT-PCR analizi yapılacak transplantların çıkarılması.....	59
Resim 3.1: Kültür periyodunun 2. günündeki ilk üst sıvı değişimi sonrası, yüzeye tutunmuş olan dental pulpa kök hücrelerinin fibroblast-benzeri (iğ şeklindeki), morfolojileri (x200).....	64
Resim 3.2: Hücre izolasyonundan yaklaşık 1 hafta sonra, hücre sayısındaki artış, koloni formasyonu başlangıcı ve küçük boyutlu koloniler (okla gösterilmiştir) (x100).....	64
Resim 3.3: Hücreler arası boşluğun azalarak hücrelerin yüzeyi kapladığı (konfluent hale geldiği) ~21 gün, pasajlama (subkültür) için hücre yoğunluğunun yeterli seviyeye geldiğini göstermektedir (x100).....	65
Resim 3.4: 7. günde hücre sayısındaki artış ve koloni oluşumu odontojenik farklılaştırma besi ortamı uygulanan grupta (C, D), kontrol grubuna göre (A, B) daha fazladır (x100).....	75
Resim 3.5: 14. günde hücre yoğunluğu yüksek seviyede; koloni formasyonu odontojenik farklılaştırma grubunda (C, D) kontrol grubuna göre (A, B) daha yoğun (x100).....	75

Resim 3.6: 21. günde yüzey hücrelerle kaplı (konfluent); odontojenik farklılaştırma grubundaki (C, D) girift yapı dikkat çekici, her iki grupta da pasaj için uygun dönem (x100).....	76
Resim 3.7: Odontoblast benzeri hücrelerin (P1, 2. hafta) H&E boyama sonrası morfolojik görüntüleri (A; x10, B; x20 ve C; x40 orijinal büyütme).....	77
Resim 3.8: Odontojenik farklılaşma uyarılan grupta (P1, 1. hafta) Alizarin Red boyama sonrası izlenen nodüler mineralizasyon odakları (okla gösterilmiştir) (A; x20, B; x40 orijinal büyütme).....	77
Resim 3.9: Sadece mezenkimal kök hücre besi ortamında kültüre edilmiş olan kontrol grubu hücrelerinde (P1, 2. Hafta) Alizarin Red boyama sonrası mineralizasyon alanları izlenmezken (A; x20, B; x40 orijinal büyütme), odontojenik farklılaşma uyarılan grupta (P1, 2. Hafta) mineralizasyon alanlarındaki (okla gösterilmiştir) artış (C ve E; x20, D ve F; x40 orijinal büyütme) izlenmektedir.....	78
Resim 3.10: Taşıyıcı materyalin granüllü yapısı (H&E boyama, x20).....	84
Resim 3.11: 6 haftalık (-) grup transplantlardan alınan kesitin H&E boyama sonrası görüntüsü (x20).....	85
Resim 3.12: 6 haftalık (-) grup transplantlardan alınan kesitin Alizarin Red boyama sonrası görüntüsü (x20).....	85
Resim 3.13: 6 haftalık, odontojenik farklılaştırma (+) grubundaki transplantlardan alınan kesitin H&E boyama sonrası görüntüsü.....	86
Resim 3.14: 6 haftalık, odontojenik farklılaştırma (+) grubundaki transplantlardan alınan kesitin Alizarin Red boyama sonrası görüntüsü (A: x20, B: x40).....	87

1.BÖLÜM

GİRİŞ

Rejeneratif (yenileyici) tıp; hücre kombinasyonları, biyokimyasal faktörler ve mühendislik materyallerinin kullanımı ile biyolojik fonksiyonların yerine getirilmesini amaçlayan güncel bir bilim dalıdır (141). Hasara uğramış bir organın veya dokunun fonksiyonlarını düzeltmek için yerine yenisini koymaktan daha iyi bir seçenek yoktur (90, 201). Buradan hareketle vücudun çeşitli doku ve hücre tiplerine dönüşerek hasarlı bölgeleri iyileştirme potansiyeline sahip olan kök hücreler, rejeneratif tıp uygulamalarının temelini oluşturmaktadır (3, 18, 105, 137, 157).

Kök hücreler, elde edildikleri kaynağa göre ‘embriyonik kök hücreler’ veya ‘erişkin kök hücreler’ olarak iki gruba ayrılmaktadır (55, 129, 155). Embriyonik kök hücrelerdeki teratom (germ tümörü) oluşma riski, immunolojik sorunlar ve etik tartışmalar nedeniyle araştırmacılar son dönemde erişkin kök hücreleri üzerinde yoğunlaşmaktadır (141, 216, 218).

Bir tür erişkin kök hücresi olan ve diş pulpasının perivasküler yatağında yer alan “dental pulpa kök hücreleri” ilk olarak 2000 yılında Gronthos ve ark. (64) tarafından izole edilmiştir. Dental pulpa kök hücrelerinin elde edilmesi kolaydır ve etik bir sorun söz konusu değildir. Elde edilen kök hücreler uzun bir yaşam süresi, yüksek bir farklılaşma potansiyeli ve dondurularak saklanabilme özelliklerine sahiptir (208).

Diş çürüğü veya çeşitli nedenlerle oluşan diş kayıpları; bireyin çiğneme ve konuşma fonksiyonlarını, estetik ve psikolojik durumunu (yaşam kalitesini) olumsuz etkileyen yaygın bir sağlık sorunudur (225). Diş çürüğü ve diş kayıplarının tedavisi için yüksek maliyetli harcamalar yapılmasına karşın çevre dokularla bire bir uyumlu, uzun ömürlü ve tam anlamıyla başarılı bir biyolojik tedavi seçeneği henüz mevcut değildir. Ancak son dönemde dental pulpa kök hücre çalışmaları ve doku mühendisliği tekniklerindeki gelişmelere paralel olarak bu alanda yeni bir tedavi konseptinin oluşturulabileceği fikri doğmuştur. Diş hekimliğinde hücresel tedavi için, dental pulpa kök hücrelerinin izolasyonu, manipülasyonu, farklılaştırılması ve üç boyutlu doku oluşumunu indükleyecek yöntemlerin geliştirilmesi gereklidir (147). Literatürde dental pulpa kök hücreleri ve diğer kök hücre kaynaklarını rejeneratif tıp alanında kullanmak üzere çeşitli özellikler yönünden karşılaştıran pek çok çalışma mevcuttur. Ancak diş hekimliği alanında özellikle odontojenik farklılaşmayı temel alan özgün çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Tez çalışmamızın amacı, insan yirmi yaş diş pulpasından kök hücrelerin izolasyonu, karakterizasyonu, ortam koşullarının odontojenik farklılaşma üzerine etkisinin incelenmesi, odontojenik farklılaştırma sonrası hücre içeriğinin, histolojik özelliklerinin ve farklılaşma parametrelerinin tanımlanmasıdır. Çalışmamızda besi ortamı modifikasyonu ile odontojenik farklılaştırma yapılan dental pulpa kök hücrelerinin *in vitro* kültür koşullarında ve *in vivo* transplantasyon sonrasında morfolojik özellikleri, proliferasyon kapasiteleri ve çeşitli odontojenik farklılaşma parametreleri yönünden karşılaştırması yapılmıştır. Bu sayede diş hekimliği alanında hücresel tedavinin temelini oluşturacak odontojenik farklılaşma mekanizmasına ve bu farklılaşmayı sağlamak üzere model oluşturulmasına ilişkin literatüre katkı sağlanması hedeflenmektedir.

GENEL BİLGİLER

1.1. Kök Hücre Kavramı

'Kök hücre' terimi ilk olarak 1909 yılında Rusyalı bilim adamı Alexander Maksimov tarafından, lenfosit benzer morfoloji, migrasyon, proliferasyon ve diferansiyasyon özelliklerine sahip hematopoietik hücreleri tanımlamak için kullanılmıştır (169). Canlılardaki, "kendilerini yenileyebilme", "sürekli bölünebilme" ve "farklılaşma" özelliklerine sahip özelleşmemiş hücreler, kök hücre olarak adlandırılmaktadır (18, 105, 168). Organizmanın yaşamı boyunca yenilenebilme yeteneklerini sürdürebilen bu hücreler; uygun sinyallerle karşılaşmadıkları sürece dokulara özgü işlevsellik kazanma ve farklılaşma özelliği sergilememektedir (140). *In vitro* koşullarda çoğaltılabilen bu hücrelerin kaynaklandıkları öncül hücrelerden farklı, özelleşmiş hücrelere farklılaşabilme potansiyeli ancak özel biyolojik sinyallerin etkisiyle gerçekleşmektedir (11).

Fonksiyonel olarak farklılaşmamış ve potansiyel olarak bir tür heterojen hücre olan kök hücreleri tanımlamak beş ölçüt mevcuttur (3, 18). Kök hücreler:

1. Sürekli bölünebilme ve kendini yenileyebilme yeteneğine sahiptir. Bu özellikleri telomeraz enzim aktivitesi ile ilişkilidir.

Doğrusal kromozomların ucunda yer alan ve "telomer" adı verilen DNA zincirleri hücrelerin bölünme yeteneklerini ve yaşam sürelerini belirleyen

faktörlerden biridir. Telomerler içindeki DNA tekrar dizileri, kromozom uçlarının parçalanmasını, dağılmasını veya diğer kromozomlarla kaynaşmasını engelleyerek, kromozomların yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlamaktadır (74). Telomer ne kadar uzunsa hücreler o kadar çok bölünebilmektedir. Ancak hücre döngüsü sırasında her çoğalmada telomer uzunluğu kısalmakta ve telomerde oluşan aşınmalar nedeniyle somatik hücreler bölünme yeteneklerini yitirmektedir. Teratom ve embriyonik kök hücrelerde ise mevcut telomeraz enzim aktivitesi kromozomun kısalmasını engellemekte ve bu sayede sınırsız kendini yenileyebilme kapasitesi oluşmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerde de telomerleri sabit bir uzunlukta tutacak düzeyde telomeraz üretimi söz konusudur (18, 93).

2. Özelleşmemiş hücrelerdir ve özelleşmiş işlevleri yerine getirebilecek herhangi bir dokuya özgün yapıya sahip değildir.

3. Özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilir; bu özellikleri “plastisite (farklılaşma)” olarak adlandırılmaktadır. Kök hücreler, somatik üç germ yaprağına doğru gösterdikleri farklılaşma özelliklerine göre “totipotent”, “pluripotent” ve “multipotent” olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.1).

Totipotent (totus: tam, bölünmemiş, potentia: güç) hücreler; zigot evresindeki, 8 hücrelik blastomerde yer alan, sınırsız farklılaşma yeteneğine sahip, embriyo ve embriyo dışı membran ve organların kaynağını oluşturan hücrelerdir (23). Embriyonun gelişim sürecinde organizmayı oluşturan, tüm doku ve hücre çeşitlerine farklılaşma kapasitesine sahip fertilize yumurta hücresi totipotent özelliği bilinen tek kök hücre tipidir. Bir canlıyı tümüyle oluşturma potansiyeline sahip olan totipotent hücreler, gelişmenin ileri evrelerinde pluripotent hücrelere dönüşebilmektedir (25).

Pluripotent kök hücreler; endodermal, mezodermal ve ektodermal germ yapraklarına ait hücrelere farklılaşma göstermektedir (89, 93). Vücuttaki farklılaşmış bütün hücre tiplerini oluşturabilme potansiyeline sahip “gerçek kök hücreler” olarak tanımlanan pluripotent kök hücreler ‘embriyonik kök hücreler’ veya ‘embriyonik germ hücreleri’ adıyla da anılmaktadır. Gerekli ortam sağlandığında yaklaşık 200 hücre türüne dönüşebilecek potansiyele sahip bu hücrelerin bir canlıyı tümüyle oluşturma potansiyeli ise mevcut değildir (11, 206).

Multipotent kök hücreler; embriyonik kök hücrelerle karşılaştırıldığında sınırlı bir farklılaşma yeteneği gösteren ve tek bir germ yaprağına ait hücrelere farklılaşabilen hücrelerdir. Erişkin bireylerin dokularında varolan bu hücrelerin kültür koşullarında çok miktarda çoğaltılabilmesi mümkündür. Ayrıca bu hücreler doku ve organ hasarlarında hasarlı bölgeye göç sonrasında ilgili dokuların hücrelerine farklılaşarak iyileşme sağlamaktadır (56).

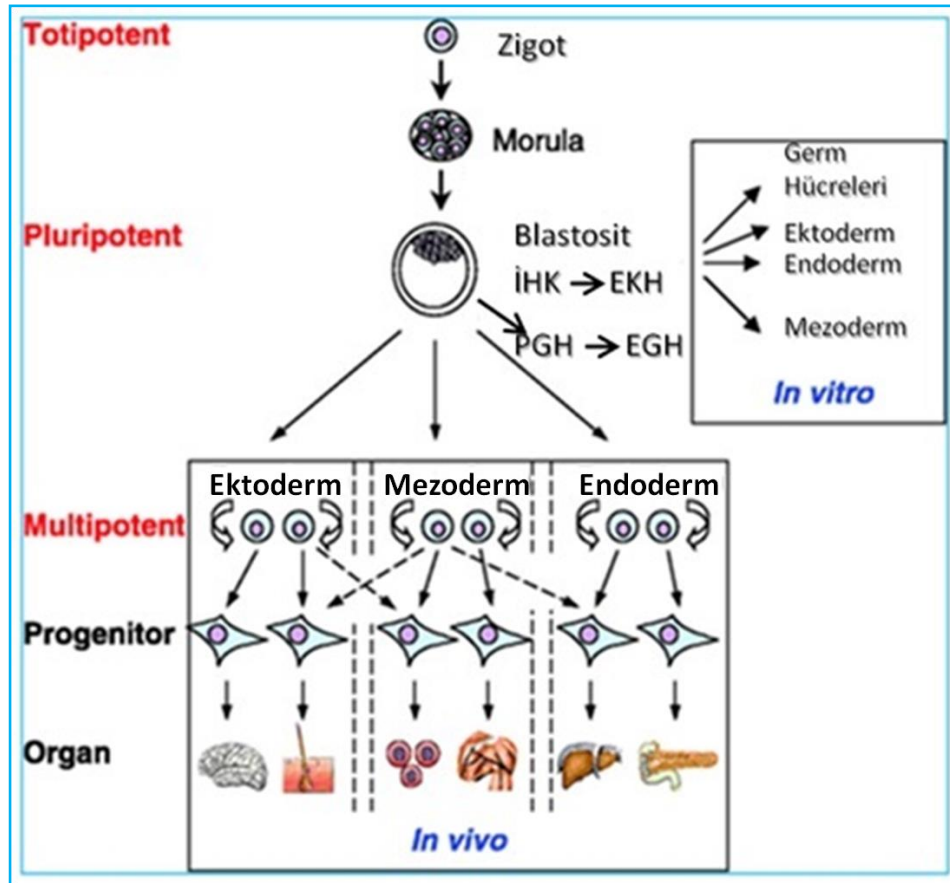
Çeşitli özelliklere göre kök hücre sınıflandırması yapmak mümkündür (170). Embriyonik kök hücre ve erişkin kök hücre sınıflandırmalarının yapılması, bu iki hücre tipinin farklı plastisite özelliğinden kaynaklanmaktadır (140). “Erişkin kök hücreleri” olarak tanımlanan “postnatal kök hücreler”, farklılaşmış somatik dokularda yerleşen farklılaşmamış hücrelerdir. Bu hücrelerin yeni doğmuş bebek ve çocuklarda da bulunmaları nedeniyle “somatik kök hücre” terimi kullanılmaktadır (164). Tablo 1.1’ de embriyonik ve somatik kök hücreler arasındaki farklılıklar belirtilmektedir.

Son dönemde tanımlanan en yeni kök hücre tipi ise; indüklenmiş pluripotent kök hücrelerdir (iPSC). Bu kök hücre tipi, erişkin kök hücrelerinin Oct4, Sox2, Nanog, c-Myc ve Klf4 gibi transkripsiyon faktörleri ile yeniden programlanması ile

oluşturulan ve emriyonik kök hücelere benzer özellikler kazandırılan kök hücelerdir (184, 203).

4. Hasarlı doku veya organların tedavisi için gerçekleştirilen nakillerde, kaynak dokunun işlevsel olarak tekrar çoğaltılablmeslını sağlamaktadır.

5. Doku hasarının gerçekleşmediği durumlarda bile farklılaşmış diğer hücelere katkıları söz konusudur (126).



Şekil 1.1: Kök hücelerin sınıflandırılması (197). (İHK: İç hücre kitlesi, EKH: Embriyonik kök hücre, PGH: Primordial germ hücresi, EGH: Embriyonik germ hücresi)

Özellik	Embriyonik Kök Hücreler	Somatik Kök Hücreler
Farklılaşma yeteneği	Pluripotent. Üç germ yaprağına ait tüm hücelere farklılaşabilirler.	Çoğu multipotent özellikte iken bazıları pluripotent farklılaşma göstermektedir.
Etik uygunluk	Embryonların erken izolasyonu ve kişiye özel embriyonik kök hücre dizilerinin geliştirilmesi (SCNT teknolojisi) konularında etik, kültürel ve dinsel tartışmalar mevcuttur.	Donörlerden bilgilendirilmiş onam alınması gerekmektedir. Somatik kök hücrelerin ticari ürüne dönüştürülmesi konusunda etik tartışmalar söz konusudur
Kaynak/izolasyon	İzolasyonları zordur. Bir embriyonik kök hücre hattının geliştirilebilmesi için 5-50 insan oositinin kullanılması gereklidir. Kişiye özel embriyonik kök hücre dizilerinin geliştirilmesi ise oldukça pahalıdır.	İzolasyonları kolaydır ancak elde edilebilen hücre sayısı oldukça azdır. İzolasyonlarında kullanılan kaynağa bağlı olarak kemik iliği aspirasyonu, nazal epitelyal biyopsi gibi cerrahi işlemler gerekebilir.
<i>In vitro</i> üretim	<i>In vitro</i> kültür koşullarında, kendilerini yenileme özelliklerini korurlar. Stabilitelelerinin korunması ise zordur.	<i>In vitro</i> kültür koşullarında kendilerini yenileme ve çoğalma hızları yavaştır.
İmmunojenik özellik	Kişiye özel geliştirilmiş embriyonik kök hücre hatları, hücresele tedavilerde daha az immunojenik etki göstermektedir.	Otolog kaynaklar, immunojenik olarak reaktif değildir. Bazı somatik kök hücrelerin immunojenik özelliği daha düşüktür.
Tümör oluşumu	<i>In vivo</i> teratom oluşturma riski mevcuttur.	<i>In vivo</i> teratom oluşturma riskleri düşüktür veya yoktur.
Hücresele tedavide kullanım potansiyeli	Klinik tedavi veya insan uygulaması rapor edilmemiştir.	Lösemi ve lenfoma tedavilerinde, kemik iliği, periferel kan veya kordon kanı nakli gibi klinik uygulamaları söz konusudur.

Tablo 1.1: Embriyonik ve somatik kök hücrelerin karşılaştırılması (140).

1.2. Somatik Kök Hücreler

Somatik kök hücreler; erişkin doku ve organlarında bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Bu hücreler, kendini yenileyebilme özelliği göstererek dokuların özelleşmiş fonksiyonlara sahip hücrelerine farklılaşabilmektedir. Bu farklılaşma sayesinde doku ve organların yenilenmeleri ve fonksiyonlarını devam ettirmeleri sağlanmaktadır (25, 215). Somatik kök hücrelerin tanımlanması için bu hücrelerin elde edilebildikleri kaynak dokular, diğer hücre ve doku tiplerine farklılaşabilme yetenekleri ve farklılaşmada rol oynayan mekanizmalar gibi konuların aydınlatılması gereklidir (126).

Geçmiş yıllarda somatik kök hücrelerin insan vücudunda çok az sayıda oldukları, izolasyonlarının ve kültür ortamında çoğalmalarının zor olduğu ve yeni hücre tiplerine farklılaşabilme kapasitelerinin oldukça sınırlı olduğu dşnlmekteydi. Son yıllarda ise bu hücrelerin yüksek plastisite yeteneğine sahip olduğu gösterilmektedir (163).

Çeşitli dokulardan elde edilen somatik kök hücrelerin çok yönlü farklılaşma özellikleri mevcuttur. Bu hücrelerin klinik uygulamalarda kullanılabilecek sayıda oğaltılabilmeleri de mümkündür. Deneysel hayvan hastalık modellerinde gerçekleştirilen somatik kök hücre çalışmaları, bu hücrelerin tedavi etkinliklerini göstermektedir (3).

Başlıca kök hücre kaynağı olan dokular:

- Göbek kordon kanı (28, 104),
- Karaciğer (116),
- Santral sinir sistemi (88),
- Sindirim kanalı (162),

- Dental pulpa (27, 64, 103),
- Pankreas (26),
- Retina (209),
- İskelet kası (232),
- Yağ dokusu (245),
- Kemik iliği (86),
- Deri epidermisi (150),
- Periferik kan (239),
- İç kulak (121),
- Amniyotik sıvı (166),
- Kornea (36),
- Akciğer (220),
- Burun mukozası (142),
- Plasenta membranı (134),
- Kalp (111) ve
- Nazal mukozadır (142).

Somatik kök hücrelerin hasarlı dokuya yerleşme özellikleri bulunmaktadır. Bu yerleşim süreci, kan akımının azaldığı durumlarda hasarlanmış dokuya kök hücrelerin göç etmesi sonucu gerçekleşmektedir. Oksijensiz kalan dokuda vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve stromal hücre kaynaklı faktör-1 (Stro-1) gibi çeşitli faktörlerin arttığı ve bu durumun yerleşim sürecinde kök hücreler için gerekli sinyalleri sağladığı düşünülmekle birlikte, süreç henüz tam olarak anlaşılammıştır (3, 72, 154).

Son yıllarda santral sinir sistemi gibi kendini yenileme özelliği olmadığı düşünülen dokularda da somatik kök hücrelerin bulunduğu saptanmış ve bazı dokulardan elde edilen somatik kök hücrelerin dokuya özgü germ yaprağının dışındaki hücre tiplerine de farklılaşabildikleri bildirilmiştir (132, 141). Bu doğrultuda somatik kök hücre plastisitesi konusundaki çalışmaların sayısı her geçen gün artış göstermektedir (141).

1.2.1. Somatik Kök Hücre Plastisitesi ve Plastisiteyi Etkileyen Faktörler

Plastisite; hücrelerin olgunlaşma ve özelleşme sürecinde geçirdikleri değişimi tanımlamaktadır. Erişkinlerde doku ve hücre yenilenmesinin temelini doku özelleşmesi oluşturmaktadır. Uzun yıllar boyunca üç germ yaprağına ait dokularda bulunan somatik kök hücrelerin, ait oldukları germ tabakalarının özelleşmesine geri-dönüşümsüz olarak yön verdikleri (212) ve diğer doku ve germ tabakalarına ilerlemedikleri teorisi geçerliliğini korumuştur (232). Ancak son dönemde somatik kök hücrelerin bazı durumlarda gelişmiş bir plastisite gösterebileceği ortaya konulmuştur (133).

Somatik kök hücre plastisitesi, mikroçevreyle ilişkili sinyallerle geliştiğinden kesin kurallar içinde tanımlanması mümkün değildir (23). Bazı araştırmacılar, artefakt ve hatalı karakterizasyon uygulamaları sonucu plastisitenin ortaya çıktığını öne sürmektedir (183, 212). Plastisitenin, doku yenilenmesinin denge durumunda somatik kök hücrelerin atipik bir fonksiyonu olarak gözlenebileceği görüşü de mevcuttur (212).

Kök hücrelerin fonksiyonel olarak düzenlenmesi; aktivasyon, kendini yenileme, proliferasyon, migrasyon (göç etme), plastisite ve sağkalım (veya ölüm) olmak üzere altı aşamada gerçekleşmektedir (143).

Bir kök hücrenin dizi değiştirmesi veya farklılaşması için; trans-diferansiyasyon, re-diferansiyasyon ve de-diferansiyasyon gibi alternatif yollar bulunmaktadır. Farklılaşmış bir hücrenin diğer özelleşmiş hücrelere farklılaşmasına trans-diferansiyasyon (indirekt /doğrudan olmayan farklılaşma) adı verilmektedir (192). Bu farklılaşma olayının gerçekleşmesi için kök hücrelerin önceki fenotiplerine dönüştüğü de-diferansiyasyon (geri yönde farklılaşma) basamağı gereklidir (ör; pigment birikimi görülen iris hücrelerinin lens hücrelerine farklılaşması) (93, 99, 119). Farklılaşma tek yönlü ve geri dönüşümsüz gerçekleştiğinden bunu değiştirebilecek tek durumun geriye yönelik farklılaşma olduğu düşünülmektedir (54). Direkt farklılaşma ise tam olarak farklılaşmış bir hücrenin, de-diferansiyasyon olmadan farklı bir olgun hücreye dönüşmesidir (ör; karaciğer ve pankreas hücreleri) (119).

Somatik kök hücreler, yüksek oranda farklılaşmış, sürekli bir hücre kaynağı sağlamaktadır. Bu özellik doku dengesinin sağlanması açısından önemlidir (193). Somatik kök hücre farklılaşmasının anlaşılabilmesi, bu hücrelerin bölünme ve oğul hücreleri oluşturma yeteneklerinin bilinmesi ile ilişkilidir. Çok fazla sayıda oğul hücrenin farklılaşması durumunda, kök hücre popülasyonu tükenecektir (117). Kendini yenileme yeteneğinin kontrol edilmemesi durumunda ise ikincil mutasyonlar ve tümör benzeri oluşumlar gözlenecektir. *In vitro* koşullarda, somatik kök hücrelerin yenilenme ve farklılaşma seçimlerinin belirlenmesi ve anlaşılması bu hücrelerin doku tamiri ve gen tedavilerinde klinik kullanım potansiyelleri açısından oldukça önemlidir (110).

Somatik kök hücreler, farklılaşma sürecinde çoğalma yeteneklerini kaybederek farklılaştıkları hücrelerin karakteristik özelliklerini kazanmaktadır. Somatik kök hücre farklılaşmasını açıklayan, “hiyerarşik model” ve “sürekli model” adı verilen iki ana model bulunmaktadır (3, 118, 167).

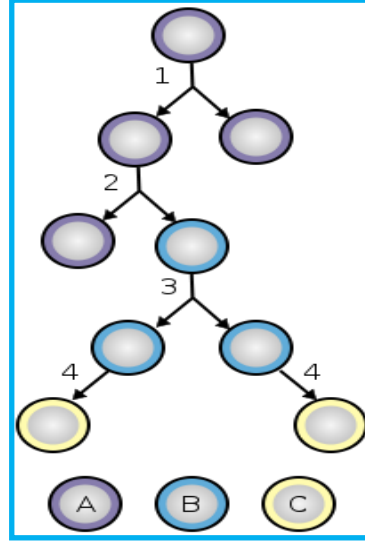
Hiyerarşik modele göre; farklılaşma sürecinde kök hücrelerden “progenitör (öncü)” hücrelere ve son olarak “prekürsör” hücrelere doğru tek yönlü bir geçiş söz konusudur. En ilkel kök hücre en yüksek çoğalma ve en düşük farklılaşma yeteneğine sahiptir. Prekürsör hücreler ise düşük çoğalma kapasitesine karşın, kolaylıkla farklılaşabilme potansiyeline sahiptir. Kök hücreden prekürsör hücreye doğru geçişin her aşamasında farklılaşma kapasitesi artarken çoğalma potansiyeli azalmaktadır (112). Bu modele göre hücreler; büyüme faktörleri, sitokinler, hücre-hücre etkileşimi ve adezyon molekülleri gibi çevresel faktörlerin etkisiyle hücre siklusunun G1 fazına girene kadar, G0 fazında durgun konumda kalmaktadır. Kök hücreler proliferasyon için uyarıyı aldıklarında, progenitör ve prekürsör geçiş aşamalarına ilerleyebilmekte ve daha sonra yeni bir uyarı alana kadar durgun konumlarına geri dönebilmektedir. Progenitör ve prekürsör hücrelerin ise tekrar kök hücre konumuna dönmesi mümkün değildir (118).

Sürekli modelde ise; kök hücrelerin bir konumdan diğer konuma kayabildiği ve tekrar eski konumuna dönebildiği değişken bir süreklilik söz konusudur. Hiyerarşik modele benzer şekilde bu modelde de durgun somatik kök hücrelerin G1 fazına girmeleri için bir uyarı gereklidir, ancak hücreler daha sonra farklılaşma yollarından ilerleyebilmekte ve tekrar G0 fazına ve durgun konuma dönebilmektedir (167).

1.2.2. Kök Hücre Nişi

Somatik kök hücreler, düzenleyici sinyallerin iletilmesine olanak sağlayan ve kendilerine destek oluşturan bir çevreye ihtiyaç duymaktadır. Hücrelerin düzenlenmesi ve işlevlerinin kontrol edilebilmesi için gerekli hücrel ve moleküler faktörleri içeren bu sınırlı fizyolojik mikroçevre “kök hücre nişi” olarak adlandırılmaktadır (178, 234).

Kök hücre nişleri; kök hücrelere destek sağlama, yaşamları için uygun ortam oluşturma, proliferasyonu düzenleme ve farklılaşmaya yön verme gibi pek çok fonksiyona sahiptir. Kök hücreler, nişlerine ait dokular içinde uykuda beklemekte veya ihtiyaç sinyali aldıktan sonra aktive olarak bölünmektedir. Bir nişte çok yönlü kök hücreler bulunabilmekte ve her niş sisteminde fiziksel etkileşimi sağlayan ve kök hücrenin asimetrik veya simetrik bölünmesine (Şekil 1.2) neden olan özel moleküllerden yararlanılmaktadır. Kök hücreler, doku hasarı geliştiğinde mikroçevrelerinden ayrılarak hasarın geliştiği bölgeye göç ettiğinden mikroçevredeki kök hücre sayısının dengelenmesi oldukça önemlidir. Kök hücrelerin çoğu asimetrik bölünerek nişte kalacak bir oğul hücre ve farklılaşmak için nişten ayrılacak bir oğul hücre oluşturmaktadır (Kök hücre → Kök hücre + Progenitör hücre). Bu sayede bölünme sırasında hem öncü hücreye dönüşecek hücre üretilmekte hem de yedek oluşturulmaktadır. Gelişim sürecinde ve doku onarımında gerekli olan yeni hücre gereksinimini karşılayabilmek için ise simetrik hücre bölünmesi gereklidir. Simetrik bölünme yeni kök hücrelerin oluşumunu sağlayabilmekte ve olası herhangi bir eksilme artışla dengelenmektedir (Kök hücre → Kök hücre + Kök hücre) (190).



Şekil 1.2: Kök hücre bölünmesi ve farklılaşması (196). (A: kök hücre, B: progenitor hücre, C: farklılaşmış hücre, 1: simetrik kök hücre bölünmesi, 2: asimetrik kök hücre bölünmesi 3: progenitor bölünme, 4: terminal farklılaşma)

1.3. Mezenkimal Kök Hücreler

Kemik iliğindeki kendini yenileme ve kemik dokusuna farklılaşma özelliğine sahip, non-hematopietik hücrelerin varlığı ilk olarak Alexander Friedenstein tarafından bildirilmiştir (57). Kemik iliği çalışmaları ile başlayan araştırmalar sonucunda kemik iliği ve çeşitli erişkin dokularında bulunan multipotent özellikte, hematopietik olmayan ve stromal karakterdeki kök hücrelerin varlığı belirlenmiştir. Bu hücreler “mezenkimal kök hücreler ” veya yeni isimlendirme ile “mezenkimal stromal kök hücreler” adını almaktadır (20). Mezenkimal kök hücreler, kemik iliği hücrelerinin CD45 negatif fraksiyonunda bulunmakta ve fibroblast benzeri bir

görünüm sergilemektedir. Bu hücreler; hematopoietik kök hücrelerin stromaya tutunmasını sağlama, kök hücre rezervi oluşturma ve doku hasarı oluştuğunda diğer dokulara göç edebilme gibi fonksiyonlara sahip, konnektif (bağ) dokunun ana hücreleridir (159, 160).

Organizmanın en zengin (ana) mezenkimal kök hücre kaynağı kemik iliğidir. Kemik iliği dışında; yağ dokusu, kemik, kıkırdak, diş pulpası, perikondriyum, iskelet kası, kordon kanı, kordon bağ dokusu, dalak, eklem sıvısı zarı ve tendonlar gibi diğer erişkin dokulardan da mezenkimal kök hücre izole edilebilmektedir. Çeşitli dokulardan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin temel özellikleri aynı olmasına karşın farklılaşma kapasitesi ve fonksiyonel özellikleri köken alınan doku tipine göre değişiklikler gösterebilmektedir. Enflamasyon veya doku hasarı durumunda ilgili bölgedeki artmış kemokinler ve hücre yüzeyindeki kemokin reseptörleri sayesinde mezenkimal kök hücrelerin hasar ve tümör bölgelerine migrasyonu gerçekleşmektedir. Migrasyon sonrası niş koşulları ile ilişkili farklılaşma sayesinde iyileşmeye katkı sağlanmaktadır (159, 160).

Mezenkimal kök hücreler; T lenfosit, B lenfosit ve doğal öldürücü hücrelerin fonksiyonlarını baskılama ve dendritik hücre farklılaşmasını inhibe edebilme gibi özellikleri sayesinde immun - düzenleyici etkiye sahiptir. Bu nedenle greft-alıcı reddi hastalığı (GVHD) ve Crohn hastalığı gibi bağışıklık sistemindeki bozuklukların görüldüğü hastalıkların tedavisine yönelik klinik uygulamalarda da kullanım potansiyelleri mevcuttur (35). Mezenkimal kök hücreler, orta seviyede MHC-I taşımaktadır. Ancak bu hücrelerde HLA-II ve yardımcı uyarıcı molekülleri mevcut değildir. İmmünolojik olarak bağımsız hücreler olduklarından bağışıklık sisteminde baskılanma gereksinimi olmaksızın nakledilebilirler. Söz konusu bu durum doku

grubu uyumu şartı olmaksızın yaygın olarak kullanılabilirmeleri avantajını oluşturmaktadır (43).

Mezenkimal kök hücreler dokulardan az sayıda izole edilebildiklerinden kullanım öncesi *in vitro* kültür ortamında çoğaltılmaları gerekmektedir. *In vitro* kültür sistemleri zahmetli olup iyi bir teknolojik alt yapı ve yüksek bir maliyet gerektirmektedir. Kültürde çoğaltma sırasında hücrelerdeki yaşlanma, bazı özelliklerini kaybetme, kontaminasyon ve sitogenetik bozukluk riski mezenkimal kök hücrelerin özellikle klinik kullanımı için dezavantaj oluşturmaktadır (41, 86).

1.3.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin *in vitro* Özellikleri ve Farklılaşma Potansiyelleri

Farklı dokulardan benzer özelliklere sahip mezenkimal kök hücre izolasyonu yapmak mümkündür. Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT) tarafından mezenkimal kök hücrelerin *in vitro* kültür koşullarında tanımlanmasına yönelik üç ölçüt belirlenmiştir (45):

1. Uygun kültür koşullarında plastik adherens (yüzeğe yapışma),
2. Stromal karakterde yüzey antijenlerinin ekspresyonu: Akım sitometri analizlerinde hücrelerin;
 - % 95'ten fazlasının, CD73 (ekto5'nükleotidaz), CD90 (Thy-1) ve CD105 (endoglin) taşıması,
 - % 98'sinden fazlasının CD45 (pan-lökosit belirteci), CD34 (primitif hematopoietik progenitör ve endotel hücre belirteci), CD11b veya CD14 (monosit belirteçleri), CD19 veya CD79a (B hücre belirteçleri) ve HLA Sınıf II antijenlerini taşıması,

3. Multipotent farklılaşma potansiyeli: Kültür ortamında uygun farklılaştırma koşullarında osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma gösterme.

Farklı dokulardan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin üretimi benzer *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmektedir. *In vitro* kültür ortamında yüksek konsantrasyonda glukoz bulunması mezenkimal kök hücrelerin erken yaşlanmasına neden olmaktadır. Glukoz oranının azaltılması ile proliferasyonun artırılması ve apoptozun (programlı hücre ölümü) azaltılması mümkündür (198).

Mezenkimal kök hücrelerin serum içeriğindeki büyüme faktörleri, hormonlar ve besinler olmaksızın çoğaltılabilmesi mümkün değildir. Bu nedenle *in vitro* şartlarda besi ortamına serum ilavesi gereklidir. Bu amaçla çoğunlukla fetal sığır serumu (FBS) kullanılmaktadır. Ancak FBS varlığında viral ve prion aktarabilme riski ile birlikte alıcıda immun reaksiyon gelişimi söz konusu olduğundan, bu koşullarda üretilen mezenkimal kök hücrelerin *in vivo* insan çalışmalarında ve tedavilerinde kullanılması uygun değildir. FBS yerine insan serumu, trombin ile aktive edilmiş, trombosit zengin insan plazması ve kordon kanı serumu kullanımı seçenekleri insan çalışmalarında kullanımın sağlanabilmesi için alternatif oluşturmaktadır (98).

Mezenkimal kök hücreler embriyonik kök hücre kültüründeki gibi besleyici bir tabaka kullanımını gerektirmez, ancak özelliklerinde herhangi olası bir sapmanın engellenmesi için pasajlanma sayıları sınırlı tutulmaktadır (107). Kültür ortamına ilişkin optimal yöntem ve ürünlerin tam olarak belirlenmemiş olması çalışmalar için engel oluşturmaktadır.

Mezenkimal kök hücrelerin özellikleri korunarak, kriyoprezervasyonu (uzun süreli dondurularak saklanması) ve gerektiğinde çözülerek kullanılabilmesi

mümkündür. Dondurma işlemi için besi ortamı olarak çoğunlukla DMEM, % 20 FBS ve % 10 dimetilsülfoksit (DMSO) karışımı kullanılmaktadır (62, 194).

Mezenkimal kök hücreler için pozitif ve negatif belirteçler saptanmıştır, ancak bu hücreler için tek bir yüzey antijeni tanımlamak mümkün değildir. Donörlerin yaşı, laboratuvarlarda kullanılan kültür teknikleri ve besi ortamı içeriği gibi farklılıklar nedeniyle mezenkimal kök hücreler için optimal bir belirteç kombinasyonu tanımlanamamıştır (40). CD90, CD73 ve CD105 mezenkimal kök hücreler için pozitifliği belirlenen biyobelirteçlerdir. CD11b/14, CD19/ 79 α , CD45 ve HLA-DR ise hematopoietik hücre hatlarıyla ilişkili görülen ve mezenkimal kök hücreler için negatif olan biyobelirteçlerdir. İzolasyon sonrası çoğalma yeteneği donörün yaşına bağlı farklılıklar sergileyen mezenkimal kök hücreler, *in vitro* koşullarda çok yönlü farklılaşma gösterebilmektedir (59).

Mezenkimal kök hücrelerin *in vitro* farklılaştırma çalışmalarında bazı kısıtlamalar mevcuttur. Örneğin; mezenkimal kök hücre farklılaşmasını *in vivo* şartlarda kontrol eden moleküller ve sinyal yolları *in vitro* koşullarda tümüyle oluşturulamamaktadır. *In vitro* ortamda ancak tek bir molekülün veya sitokinin mezenkimal kök hücre farklılaşması üzerindeki rolü incelenebilir (221). Tüm bu zorluklara ve konuya ilişkin henüz yanıtlanmamış pek çok soruya rağmen, *in vitro* koşullardaki mezenkimal kök hücre farklılaştırma çalışmaları hücre biyolojisi konusundaki bilgilerimize katkı sağlamaktadır (59).

Hücre kültüründe “temas inhibisyonu” ile uyarılabilen, büyüme fazında bulunan mezenkimal kök hücreler, uygun *in vitro* ortam koşullarında ve uygun uyarımlarla farklı doku ve hücrelere farklılaşabilmektedir. Koşullar farklılaşma için uygun olduğunda hücrelerin farklılaştıkları ve hücre morfolojisini kazandıkları “terminal olmayan farklılaşma” ve “terminal farklılaşma” gerçekleşmektedir.

Terminal olmayan farklılaşma; plazma/serum içeriğindeki çeşitli faktörler uyarılmakta veya inhibe edilmektedir (54). Terminal farklılaşma ise; protein kaybına bağlı olarak hücrelerin çoğalma yeteneğinin geri-dönüşümsüz olarak kaybedildiği son farklılaşma basamağıdır (73, 76). Terminal farklılaşma basamağı kontrolünde meydana gelen hatalar kanserlerde gözlenen kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olmaktadır (217).

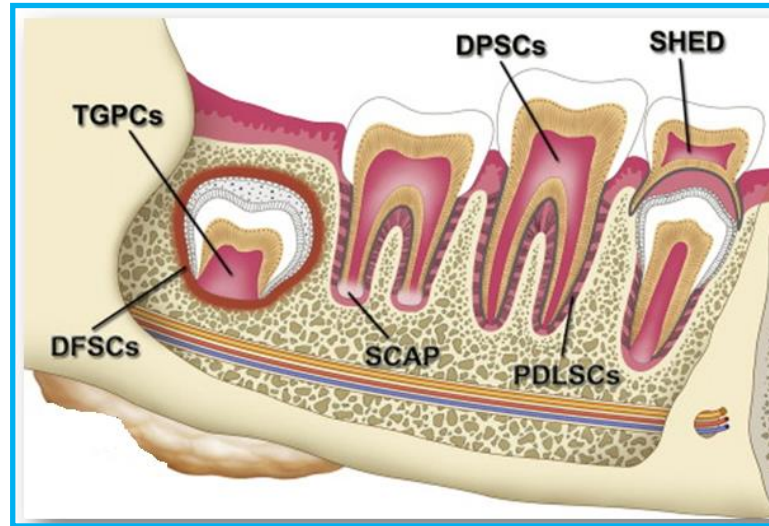
Mezenkimal kök hücreler çoklu farklılaşma potansiyeline sahiptir (195). Bu hücreler çeşitli uyarıların etkisiyle *in vitro* adipojenik, osteojenik, kondrojenik, nörojenik, kardiyojenik, myojenik, hepatik ve pankreatik farklılaşma gösterebilmektedir. Örneğin; fibroblast-benzeri morfolojiye sahip mezenkimal kök hücreler; IBMX, deksametazon, PPAR γ ligandları ve insülin varlığında oval morfolojiye sahip, nötral-lipit damlaları içeren yağ hücrelerine farklılaşmaktadır (44, 64, 87). Kemik morfogenetik proteini (BMP) gibi uyarımlarla da kalsiyum depozitleri oluşumu ve osteojenik farklılaşma sağlanmaktadır (245). Adipojenik farklılaşmayı arttıran PPAR γ , osteojenik farklılaşmayı inhibe etmektedir. Osteojenik uyarımlar da adipogenez üzerinde benzer bir inhibisyon etkisine sahiptir (33, 113). Mezenkimal kök hücreler; askorbat, deksametazon ve TGF- β varlığında, kondrojenik bir fenotip göstermekte, ayrıca ekstrasellüler matris, mekanik uyarım ve çeşitli çevresel faktörlerin etkisiyle kondrojenik farklılaşma gerçekleşmektedir (235). Hücrelerde nestin ve GFAP bulunması nörojenik farklılaşma potansiyelinin bir göstergesi olup nöral ve oligodendritik farklılaşmanın gerçekleşmesi mümkündür (133, 152, 176, 235). Mezenkimal kök hücrelerin mevcut myojenik potansiyeli nedeniyle iskelet ve düz kas hücrelerine farklılaşma gerçekleşmektedir (42, 51, 80). Ayrıca mezenkimal kök hücrelerin canlı dışı kardiyojenik (161), hepatik (114, 181) ve pankreatik (207) farklılaşmaları da mümkündür.

1.4. Diş Kaynaklı Kök Hücreler

Diş tabakasının gelişimi; embriyonik dönemde diş germelerini oluşturan ektodermden köken almaktadır. Dental papil ve dental folikül ise, nöral kret hücrelerinden farklılaşmaktadır. Dolayısıyla dental dokular ektodermal kaynaklı nöral kret hücrelerini de kapsayan mezenkimal bileşenler içermektedir (1, 131). Söz konusu bu ektomezenkimal köken diş dokusunu özel kılmaktadır. Diş gelişimi evresinde pek çok tipteki kök hücre ve progenitör hücre rol almaktadır (Şekil 1.3). Bunlar; dental epiteliyal kök hücreler, dental pulpa ile ilişkili olan dental pulpa kök hücreleri (DPSC_s), süt diş pulpası kök hücreleri (SHED_s), apikal papilladan elde edilen kök hücreler (SCAP_s), periodonsiyum ile ilişkili olan periodontal ligament kök hücreleri (PDLSC_s) ve dental folikül progenitör hücreleridir (139). Ayrıca son dönemde diş dokusu kaynaklı kök hücre olarak yeni doğan natal diş pulpasından elde edilen natal dental pulpa kök hücreleri (NDPSC) de tanımlanmıştır (92). Bu hücrelerin en önemli özelliği; embriyonik kök hücre belirteç ekspresyonu ve pluripotent potansiyel göstermeleridir (92). Ancak natal diş yaklaşık bin doğumda iki veya üç oranında görüldüğünden (120), bu kök hücre grubunun elde edilmesi nadiren mümkün olmaktadır.

Diş dokusu kaynaklı kök hücrelerin mezodermal ve ektodermal dokuları kapsayan geniş bir farklılaşma potansiyeli mevcuttur (107). Bu hücrelerden bazılarında değişik düzeylerde Oct4, Nanog, Sox2, Klf4, NC, p75, Sox10, Slug ve Nestin gibi embriyonik kök hücre belirteçleri ekspresyonu da saptanmıştır (79).

Diş dokusu kaynaklı kök hücre popülasyonları arasındaki ilişki henüz netlik kazanmamıştır ve bu hücrelerin karakterizasyonunda çoğunlukla kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (BMMSCs) ile karşılaştırma tekniğinden faydalanılmaktadır. Diş dokusu kaynaklı kök hücreler odontojenik, osteojenik, adipojenik ve nörojenik farklılaşma gibi çoklu farklılaşma potansiyeline sahiptir, ancak odontojenik farklılaşma eğilimi daha yüksektir (80).



Şekil 1.3: Diş kaynaklı kök hücreler (48). (DPSCs: dental pulpa kök hücreleri, SHED: süt diş pulpası kök hücreleri, PDLSCs: periodontal ligament kök hücreleri, SCAP: apikal papilla kök hücreleri, DFSCs: dental folikül kök hücreleri, TGPCs: diş germi progenitör hücreleri)

Dental epiteliyal kök hücreler; dental epiteliyal dokular içinde bulunan, kemirgenlerin keser dişlerinde sürekli rejenerasyonu (uzamayı) sağlayan, insan dişlerinde ise sürme sonrası dönemde ortadan kalkan farklılaşmamış hücrelerdir (139).

Dental pulpa kök hücreleri; yüksek proliferasyon gösterebilen, klonlanabilen, yüksek plastisite yeteneğine sahip, sürme sonrası dönemde yok olmayan multipotent özellikteki mezenkimal kök hücrelerdir (64). Başlıca pulpa kök hücre kaynakları arasında çekilmiş yirmi yaş dişleri, çekilmiş/sürmüş süt dişleri ve ortodontik tedavi veya travma, periodontal hastalık nedeniyle çekilen dişler bulunmaktadır. Dental pulpa kök hücre çalışmalarında çekim endikasyonu bulunması ve kolayca elde edilebilmesinden dolayı sıklıkla yirmi yaş dişleri kullanılmaktadır. Ayrıca bu dişlerin en son gelişen dişler olması nedeniyle, gelişimin erken döneminde yakalandığında pulpa dokusu açısından zengin olduğu da bildirilmektedir (62, 123).

Süt diş pulpasından elde edilen kök hücrelerin ise; yetişkin diş pulpasına oranla daha fazla proliferasyon oranına ve hücre popülasyonuna sahip olduğu, daha immatür özellikteki multipotent hücrelerden oluştuğu, ancak dental pulpa kök hücreleri gibi kompleks pulpa-dentin yapısı oluşturamadığı bildirilmektedir (136, 185). Bu hücreler için 'immatür DPSCs' terimi kullanılmaktadır (94).

Apikal papilladan elde edilen kök hücreler; diş gelişiminin oldukça erken evrelerinde gömülü dişlerin veya keser dişlerin dental papilinden elde edilmektedir. Radiküler pulpanın öncüsü olan apikal papilla pulpaya dönüştüğünde; apikal papilla kök hücrelerinin de dental pulpa kök hücrelerine dönüştüğü düşünülmektedir. Apikal papilla kök hücreleri; kök dentin formasyonundan sorumlu primer odontoblastlara kaynaklık ederken, dental pulpa kök hücreleri de reparatif dentin oluşumundan sorumlu reparatif odontoblastlara kaynaklık etmektedir (80). Apikal papilla kök

hücreleri dental pulpa kök hücrelerine oranla daha fazla dentin oluşturabilme kapasitesine sahiptir, ancak çoğunlukla gelişimin ilk evresindeki gömülü dişlerde çekim endikasyonu bulunmaması nedeniyle elde edilmesi zordur. Matür pulpaya oranla daha fazla kök hücre içerdikleri ve periodontal ligament kök hücreleri ile birlikte kullanıldığında bağ doku oluşumu sağladıkları bildirilmektedir (87, 139).

Periodontal ligament kök hücreleri; çekilmiş dişlerin kök yüzeylerinden elde edilmekte ve periodonsiyum benzeri doku ve hücrelere farklılaşabilmektedir. Bu hücrelerin koloni oluşturabildikleri, ancak *in vitro* osteojenik farklılaşma potansiyellerinin düşük olduğu belirlenmiştir. Farelere transplante edildiklerinde ise doku rejenerasyonu ve periodontal tamir sağladıkları bildirilmektedir (65, 180).

Diş folikülü progenitör hücreleri; periodontal gelişimin erken evrelerinde Hertwig epitel kını ile dentinden ayrılan, dental folikül epiteliyal hücre tabakasında yer almaktadır. Yirmi yaş dişi çekimi sonrası kolayca elde edilebilen dental folikül; osteoblast, alveol kemik, periodontal ligament, fibroblast veya sementoblast oluşturacak progenitör hücrelere sahiptir (69). Kök hücreler farklılaşmış hücreleri oluştururken; kök hücrelerden ‘progenitör’ hücrelere ve son olarak da ‘prekürsör’ hücrelere doğru tek yönlü bir geçiş olduğu bilinmektedir. Kök hücreden prekürsör hücreye doğru geçişte en ilkel kök hücre en yüksek çoğalma ve en düşük farklılaşma yeteneğine sahip iken, prekürsör hücreler düşük çoğalma potansiyeline sahiptir ve kolayca farklılaşabilmektedir (118). Buradan hareketle, progenitör özellikteki diş folikül hücrelerinin daha düşük çoğalma potansiyeline karşın, diş dokularına doğru daha kolay farklılaşabileceği açıktır. İnsan diş dokusu kaynaklı kök hücrelerin çoğalma ve farklılaşma özellikleri Tablo 1.2’de özetlenmektedir.

Hücre Tipi	Populasyon Artışı	Multipotentlik (<i>in vitro</i>)	Ektopik doku oluşturma (<i>in vivo</i>)
DPSC_s	60- > 120	Osteojenik/ Dentinojenik (+) Adipojenik (+) Kondrojenik (+) Myojenik (+) Nörojenik (+)	Pulpa-dentin kompleksi (+) Odontoblast-benzeri hücreler (+) Kemik-benzeri doku (+)
SHED_s	> 140	Dentinojenik (+) Adipojenik (+) Kondrojenik (+) Myojenik (+) Nörojenik (+) Osteo-indüktif (+)	Pulpa-dentin benzeri doku (+) Odontoblast-benzeri hücreler (+) Pulpa-dentin kompleksi (-) Kemik oluşumu (+)
SCAP_s	> 70	Dentinojenik (+) Adipojenik (+) Kondrojenik (*) Myojenik (*) Nörojenik (+)	Odontoblast-benzeri hücreler (+) Pulpa-dentin kompleksi (+)
PDLSC_s	*	Osteojenik/Sementojenik (+) Adipojenik (+) Kondrojenik (+) Myojenik (*) Nörojenik (+)	Sement-benzeri doku (+) PDL-benzeri doku oluşumu (+)
DFPC_s	*	Sementojenik (+) Odontojenik (+) Adipojenik-Kondrojenik (+) Myojenik (+) Nörojenik (*)	PDL-benzeri doku oluşumu (+) Sement matrisi oluşumu (+)
BMSC_s	30- > 50	Odontojenik (-) Osteojenik (+) Adipojenik-Kondrojenik (+) Myojenik (+) Nörojenik (+)	Ektopik doku oluşumu (+) Kemik, kemik-benzeri, kırık, kas, nöral hücre/doku oluşumu (+)

Tablo 1.2: İnsan diş dokusu kaynaklı kök hücrelerin özellikleri (80).

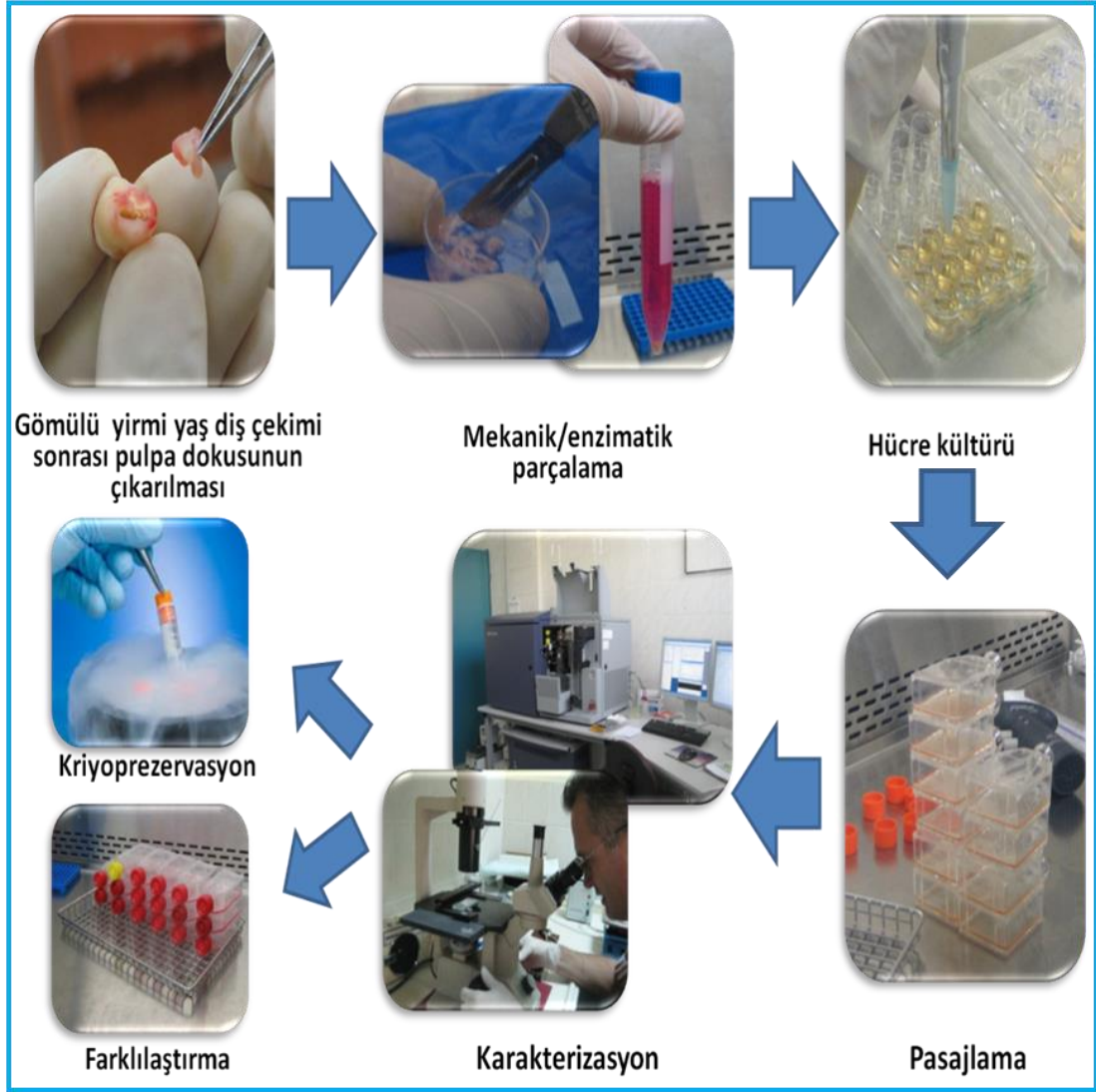
(*: Saptanmadı, +: Etkisi var, -: Etkisi yok)

1.5. Dental Pulpa Kök Hücreleri

Diş pulpasının damarları çevresindeki spesifik perivasküler nişte yeralan, yüksek proliferasyon gösterebilen, klonlanabilen ve yüksek plastisite yeteneğine sahip, multipotent hücrelere “dental pulpa kök hücreleri” adı verilmektedir. Bu hücre popülasyonunun mezenkimal kök hücre olduğu düşünülmektedir (64, 186).

Dental pulpa kök hücrelerinin izolasyonu ve tanımlanması, ilk kez 2000 yılında Gronthos ve ark. (64) tarafından gerçekleştirilmiş ve bu hücrelerin odontoblastik, adipojenik ve nöral hücre tiplerine farklılaşması gösterilmiştir. Şekil 1.4’te dental pulpa kök hücrelerinin izolasyon ve *in vitro* koşullarda üretim aşamaları özetlenmektedir.

Dental pulpa kök hücrelerinin gen analizleri sonucunda; ekstrasellüler matris bileşenleri, büyüme faktörleri ve hücre adezyon moleküllerini kodlayan çeşitli genlerin ekspresyonu gösterilmiştir (106). Dental pulpa kök hresi ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin gen ekspresyonları benzerlik göstermektedir (Tablo 1.3). Ancak hücre siklusunu aktivatörü siklin-bağımlı kinaz-6’nın yüksek düzeyde ekspresyonu nedeniyle, dental pulpa kök hücrelerinin daha yüksek bir proliferasyona oranına sahip olduğu bilinmektedir (208). Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ile karşılaştırıldığında, hücre döngüsü ile ilişkili genleri eksprese etme özellikleri ve yüksek proliferasyon hızları, dental pulpa kök hücrelerini üstün kılmaktadır. Damarların çevresinde lokalize olan bu hücreler kök hücre belirteci Stro-1’i eksprese etmektedir (106, 138). Dental pulpa kök hücrelerinin fonksiyonel odontoblastlara farklılaşma mekanizması, kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşma mekanizmasına benzerlik göstermektedir. Söz konusu iki hücre tipi *in vitro* koşullarda da benzer protein ekspresyon özelliğine sahiptir (187).



Şekil 1.4: Dental pulpa kök hücrelerinin *in vitro* koşullarda üretim aşamaları.

(Görüntüler 2009-DİŞ-036 no'lu Bilimsel Araştırma Projesine aittir.)

Yüzey Antijeni	Dental pulpa kök hücresi	Süt dişi pulpası kök hücresi	Kemik iliği mezenkimal kök hücresi
CD14	-	-	-
CD34	-	-	-
CD44	++	++	++
CD45	-	-	-
CD106	+	+/-	++
CD146	++/+/-	++/+/-	++/+/-
Stro-1	++/+/-	++/+/-	++/+/-
Tip I kollajen	++	++	++
Tip III kollajen	++/+	++/+/-	++/+
Osteokalsin	++/+	++/+/-	+/-
Osteonektin	++/+	++/+	++/+
Osteopontin	+/-	+/-	+/-

Tablo 1.3: Dental pulpa kök hücreleri ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin hücre yüzey protein ekspresyonlarının karşılaştırılması (208).

Dental pulpa kök hücreleri; spesifik çevresel uyarıların etkisiyle yeni kök hücreler oluşturma ya da özel bir farklılaşma yoluna girme kapasitesine sahiptir (63).

Yirmi yaş dişlerinden elde edilen insan dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin;

- odontoblastlar (63),
- osteoblastlar (108),
- yağ hücreleri (63, 87),
- iskelet/düz kas hücreleri (42),
- endotel hücreleri (42),
- kırık dokular (235) ve
- sinir hücrelerine (42, 235)

farklılaşabildiği gösterilmiştir. Osteoblastlara özgü karakteristik özellikler de gösteren, mezenkimal ve mezenkimal olmayan dokuların hücrelerine farklılaşabilen bu hücrelerin multipotent nöral kök hücreleri olabileceğine dair kanıtlar da söz konusudur (138). Dental pulpa kök hücreleri, bu özellikleriyle dentin, periodontal ligament ve kemiksi kırık dokularının onarılmasında, bağışıklık sistemi, kas hastalıkları ve bağ doku hasarlarının tedavisine yönelik klinik uygulamalarda önemli bir kullanım potansiyeline sahiptir (62, 208).

Sağlıklı insan dişinden elde edilen dental pulpa kök hücreleri anti-enflamatuar ve immun-düzenleyici özelliktedir. Bu hücreler, proenflamatuar transkripsiyon faktörü NF- κ B aracılığıyla pulpa ve/veya diş destek dokularının enfeksiyonlarında savunmada ve bağışıklık yanıtının oluşumunda rol almaktadır. Dental pulpa mezenkimal kök hücreleri; T lenfositlerin, B lenfositlerin, dentritik hücrelerin ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin proliferasyonunu inhibe ederek immunsupresif (bağışıklık sistemini baskılayıcı) etki göstermekte ve allojenik dokulara transplante edildiklerinde immunolojik tolerans gelişimini uyarmaktadır (34, 62, 158).

Dental pulpa kök hücrelerinin dondurularak saklandıktan sonra çözdürüldüklerinde yüksek hücre canlılık oranı göstermeleri söz konusu bu hücrelerin gerektiğinde kullanılmak üzere, örnek saklama bankalarında da saklanabileceğinin göstergesidir (62).

Ayrıca son dönemde insan gömülü yirmi yaş diş pulpasından pluripotent özellikte dental pulpa kök hücre popülasyonunun da izole edilebileceği gösterilmiştir (13).

Yukarıda detaylı şekilde anlatılan dental pulpa kök hücrelerinin, tedavi amaçlı uygulamalar için uygun olmalarına olanak sağlayan özellikleri şu şekilde özetlenebilir:

- Elde edilmeleri oldukça kolaydır,
- Elde edilen kök hücre ekstraksiyonu yüksek etkinlik göstermektedir,
- Yaşam süreleri uzundur,
- Yüksek farklılaşma yeteneğine sahiptirler,
- Dokuların yeniden yapılandırılması için kullanımları mümkündür,
- Güvenli bir şekilde dondurularak saklanmaları mümkündür (208).

1.6. Rejeneratif Diş Hekimliği

Diş çürüğü; soğuk algınlığı gibi en sık görülen hastalıklardan biri olarak tanımlanmaktadır. Çürük sonucu oluşan diş kaybı ise en sık rastlanan organ kaybıdır (225). Günümüz diş hekimliği pratiğinde hasara uğramış veya kaybedilen diş dokuları çeşitli sentetik materyaller ile restore edilmeye çalışılmakta, öte yandan mevcut protetik tedavi yöntemleri de diş kayıplarına geleneksel protezler ve implantlar gibi mekanik çözümler getirmektedir. Bu tür “biyolojik olmayan diş”

uygulamaları, biyolojik olan diş yapısı ile karşılaştırıldığında pek çok dezavantaja sahiptir. Bunlar arasında rahatsızlık duygusu, yetersiz biyoyumluluk ve çevredeki dokulara hasar verme gibi olumsuzluklar sayılabilir. Buradan hareketle dental araştırmalarda hasarlı diş dokusu ve eksik dişlerin telafisi için yeni stratejiler bulunmasına yönelik çalışmalara ağırlık verilmiştir (229). Kök hücre biyolojisindeki ilerlemeler ve gelişen doku mühendisliği teknikleri sayesinde “biyolojik diş” uygulamaları, hasarlı diş dokusu ve kaybedilen dişlerin telafisi için alternatif olarak belirmektedir (223). Bu yeni tekniklerin amacı insan yaşamında üçüncü dentisyonun oluşturulmasıdır (52). ‘Bioengineered tooth’ (46, 227) ve ‘biological tooth’ (228) terimleri; biyoteknoloji ve mühendislik kavram ve yöntemlerinden yararlanılarak oluşturulan biyomühendislik ürünü diş tanımlamak için kullanılmaktadır. Dişin biyolojik olarak onarılması veya yeniden oluşturulmasına yönelik diş hekimliği alanını tanımlamak için de rejeneratif diş hekimliği ‘regenerative dentistry’ (67, 139) terimi kullanılmaktadır.

Diş hekimliği alanında, diş hastalıkları açısından bir yenilik olarak kabul edilen ‘diş rejenerasyonu’ kavramı; dişin tedavisinden rejenerasyonuna geçişi ifade etmektedir. Metal veya yapay bir materyal anlamını çağrıştıran ‘tamir’ terimine karşın, ‘rejenerasyon’ biyolojik bir yeniden yapılandırmayı ifade etmektedir. Rejeneratif tıp alanına dahil edilen ‘diş rejenerasyonu’ doku defektlerinin orijinal haline getirilmesi ve fonksiyonun biyolojik kaynaklar ile yerine konulmasını anlatan bir süreçtir (225).

Rejeneratif diş hekimliği çalışmalarının hedefi; çeşitli diş dokularının rejenerasyonu, konjenital anomalilerin tedavisi ve kraniyofasiyal rejenerasyon gibi alanlardır. Temel biyoloji ve diş hekimliği bilimini birleştirerek, diş hekimliği pratiğine doku rejenerasyonunu bir tedavi seçeneği olarak sunacak olan dental pulpa

kök hücre çalışmaları, özellikle dentin, pulpa, sement, periodontal ligament gibi diş dokularının oluşturulması ve bu sayede hasarlı dokunun rejenerasyonunu hedef almaktadır. Araştırmalarda insanın kendi dokusundan diş dokusuna benzer bir yapı oluşturulmaya çalışılmaktadır (16, 46, 47, 81, 153, 177, 204). Uzun dönemde hedeflenen ise tamamen canlı bir diş organının oluşturulmasıdır (46, 47, 153, 177).

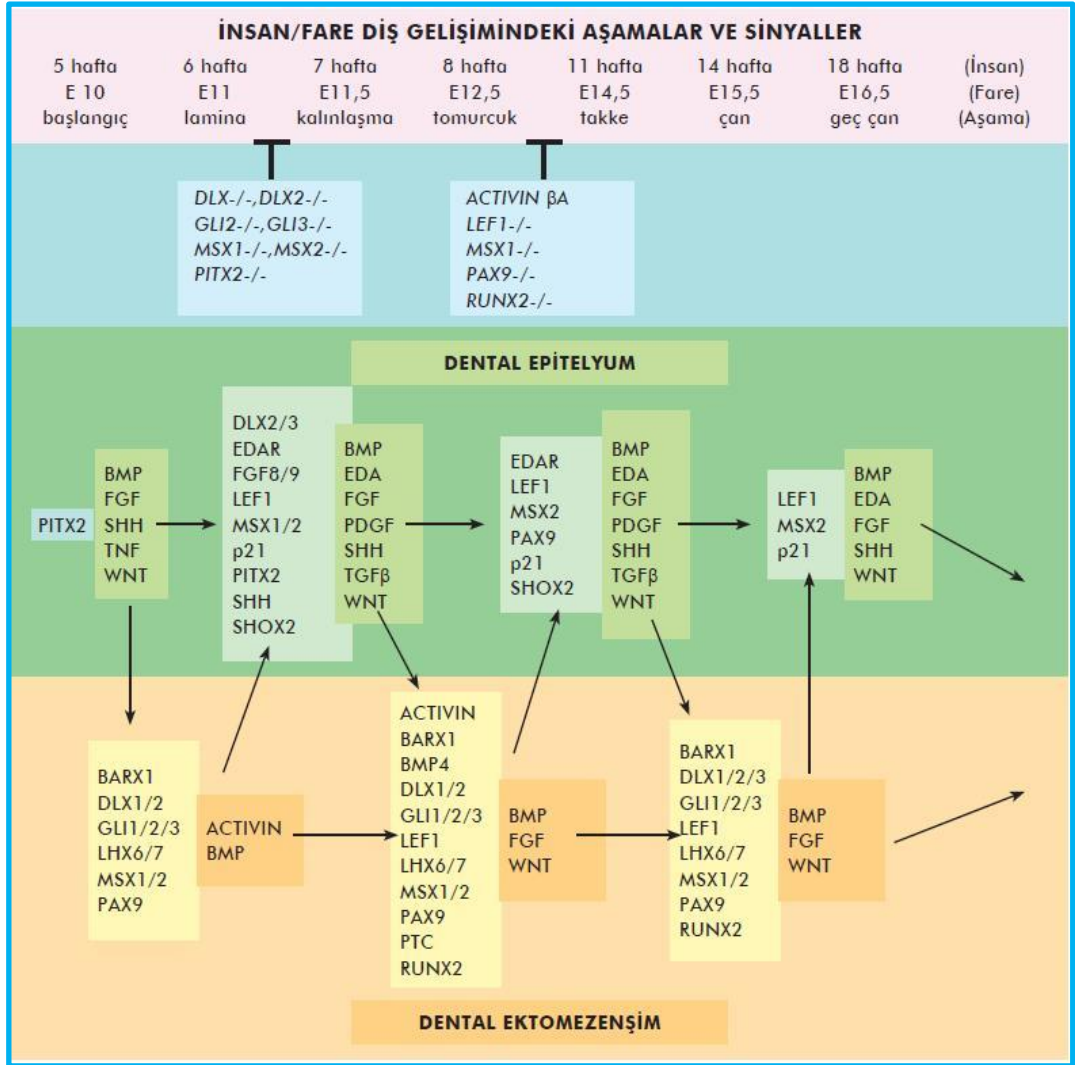
Diş hekimliği pratiğinde; pulpal enfeksiyon veya hasar durumunda pulpa dokusu uzaklaştırılmakta ve kök kanal boşluğu ve kaybedilen diş dokusu çeşitli dolgu maddeleri ile restore edilmeye çalışılmaktadır. Dental pulpa kök hücrelerinin dentin-pulpa kompleksi oluşturabilme potansiyeli bu kapsamda endodontik ve restoratif prosedürlere alternatif olarak rejenerasyonun mümkün olabileceğini düşündürmektedir (32, 38). Benzer şekilde periodontal ligament-sement kompleksinin oluşturulabilme potansiyeli de diş çevre dokularının rejenerasyonunu sağlayacaktır (180). Ancak mine rejenerasyon potansiyeline ilişkin halen devam eden zorluklar tümüyle bir diş oluşturulmasını engelleyen en önemli faktörlerden biridir (135).

Diş dokularının yeniden oluşturulması konusunda iki temel yaklaşım mevcuttur. Bu yaklaşımlardan biri, diş dokularındaki hasarların onarılması ile ilgilidir (102). Kaybedilen dokuların ve dişin yeniden oluşturulmasına yönelik diğer yaklaşım ise; embriyonik gelişim, kök hücre biyolojisi ve doku mühendisliği kavramlarını esas almaktadır (82).

1.6.1. Embriyonik Diş Gelişimi (Organogenezis, Embriyogenezis)

Mine, dentin, sement ve pulpa gibi pek çok farklı dokudan oluşan diş, karmaşık bir biyolojik organdır. Diş oluşumu, ektoderm esaslı dental epitel ile nöral kret esaslı ektomezenkim arasındaki karşılıklı indüktif sinyaller ile kontrol edilmektedir. Dental epitelde bulunan odontojenik potansiyel, altta bulunan mezenkime geçerek epitelyal morfogenez ve hücre farklılaşmasını yönlendirmektedir (14, 223).

İndükleyici uyarıyı oluşturan bir doku ve bu uyarıyı alarak ona cevap verebilme yeteneğinde olan başka bir doku, indüktif etkileşimlerin iki temel unsurunu oluşturmaktadır. Embriyonik indüksiyonlar, büyüme faktörleri olarak bilinen, difüze olabilen protein sinyal molekülleri ile başlatılmaktadır. Başlıca büyüme faktörleri; kemik morfogenetik proteini (BMP), fibroblast büyüme faktörü (FGF), tümör nekroz faktörü (TNF), sonic hedhegog (Shh) ve Wnt aileleridir. Bu büyüme faktörlerinin sinerjist ve/veya antagonist fonksiyonları, embriyonik gelişim sırasında doku ve organların oluşumunda organizasyon ve modellemeyi sağlamaktadır (Şekil 1.5). Büyüme faktörü, intraselüler sinyal yolunu tetikleyen spesifik hücre membran reseptörüne bağlanarak fonksiyon görmektedir. Bu durum latent transkripsiyon faktörlerinin aktive edildiği çekirdek içinde sinyal geçişine ve gen ekspresyonunda değişime yol açmaktadır. Bir doku tabakasındaki transkripsiyon faktörleri, bitişik dokuda oluşturulan sinyal verici büyüme faktörlerine yanıt olarak büyüme faktörlerinin ekspresyonunu aktive etmekte ve bu sayede organogenezisi düzenleyen ‘sinyal ağı’ nı oluşturmaktadır (14, 238).



Şekil 1.5: İnsan/fare dişlerinin gelişimindeki aşamalar ve sinyal sistemi (102).

(İnsan ve farelerde diş gelişim aşamalarında çok sayıda gen benzer ekspresyon modelleri göstermektedir. Oklar= aktivasyon, (T)= gösterilen aşamalardaki inhibisyon, italik yazı= genler, düz koyu yazı= büyüme faktörleri)

Diş oluşumu tomurcuk, takke, çan, kuron ve kök oluşumu evresi gibi farklı morfolojik aşamalar halinde (Şekil 1.5 ve 1.6) gerçekleşmektedir (67, 102, 144). Oral epitelde lokal olarak kalınlaşan dental lamina tabakasının proliferasyonu ve altında bulunan nöral kret esaslı ektomezenkime invajinasyonu sonucu tomurcuk oluşmaktadır. Odontojenik sinyaller, epitelde mezenkime geçmekte ve epitelde çıkan sinyaller, ektomezenkimde çeşitli transkripsiyon faktörlerini düzenlemektedir. Diş şeklindeki özelleşme; gelişimin erken dönemi olan ‘dental lamina’ aşamasında, predental mezenkimde ekspres edilen homeobox genleri ile oluşmaktadır (14, 223).

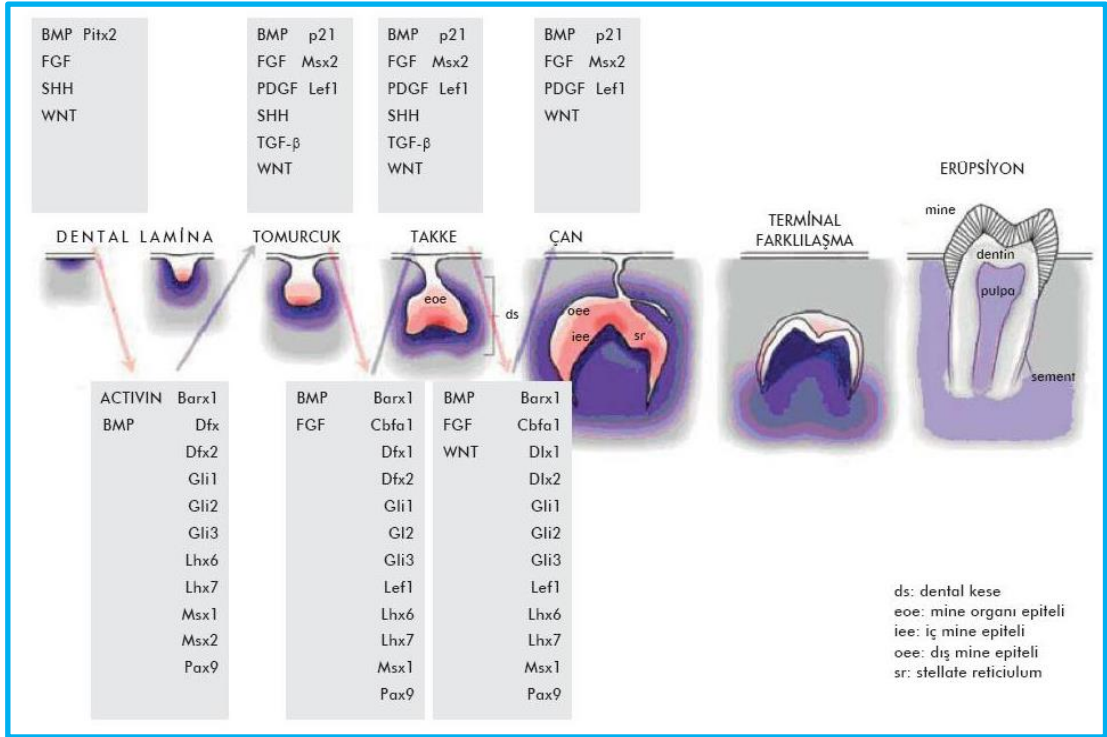
Takke aşamasında; ektomezenkimal hücreler birikerek daha sonra mezenkime invajinasyonla mine organı ve dental papilla oluşturacak epitelyal hücreleri çevrelemekte, fiziksel ve morfolojik olaylar başlamaktadır. Bu olaylar, epitelde bulunan ve homeobox genlerinin daha önce aktivasyonu ile yönlendirilen geçici sinyal merkezleri aracılığıyla, ‘mine düğümleri’ tarafından düzenlenmektedir. Ek mine düğümleri oluşumu ise kuron modellemesini sağlamaktadır. Geç takke aşamasında mine düğümleri, apoptozis ile yok olmaktadır. Epitel, mine salgılayan ameloblastlara farklılaşırken, komşu mezenkim de dentin salgılayan odontoblastlara farklılaşmaktadır (14, 210, 223).

Mine organı, dental papilla ve dental folikülden oluşan, fark edilebilir bir diş germi oluşumu ile ‘çan aşaması’ başlamaktadır. Çan safhasında geniş kapsamlı bir farklılaşma mevcuttur. Bu aşamada iç mine epiteli, dış mine epiteli, stellate reticulum ve stratum intermedium’dan oluşan ‘mine organı’, ameloblastların öncüsü olarak kabul edilmektedir. Ameloblastlar, vücuttaki en sert doku olarak bilinen mineyi üretmektedir. Bu esnada epitel ve dental papilla hücreleri arasındaki resiprokal etkileşim sonucu odontoblastların fonksiyonu ile dentin üretimi de devam etmektedir. İç ve dış mine epitelinin servikal bölgesi, Hertwig epitelyal kök kılıfını

oluşturmaktadır. Bu kılıf, kök dentini oluşumunu başlatmakta ve kök şeklini belirleyecek yapıyı oluşturmaktadır. Fibroblastlar, kan damarları, sinirler, lenfatik kanallar ve odontoblastlardan oluşan ‘dental papilla’ ise canlı bir bağ dokusu olan pulpa dokusunu oluşturmaktadır. İç mine epiteline komşu dental papilladaki mezenkimal hücrelerden türeyen odontoblast hücreleri ise yaşam boyunca fonksiyonlarına devam ederek travma durumunda ‘sekonder dentin’ oluşturabilmektedir (14, 210, 223).

Morfogenez aşamasında ortaya çıkan ve geçici bir yapı olan ‘dental folikül’, sementoblastlar, osteoblastlar ve fibroblastlar olmak üzere üç temel hücrenin kaynağıdır. Sementoblastlar, kök yüzeyine tutunan sementi salgılamaktadır. Osteoblastlar, dişlerin kökleri etrafındaki kemiği oluşturmaktadır. Fibroblastlar ise kökleri sement aracılığıyla alveoler kemiğe bağlayan periodontal ligamenti oluşturan kollajeni üretmektedir. Kuvvet uygulandığında duyu kaynağı olma özelliği sayesinde tampon görevi gören periodontal ligament, diş sürme işleminin temel tetikleyicisi olarak kabul edilmektedir (14, 223).

Ağız boşluğuna erüpsiyon sonrası diş; kuron ve kök olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır. Kuron gelişimine ilişkin mevcut bilgilerle kıyaslandığında, kök gelişiminin sinyal mekanizmaları hakkında çok az bilgi mevcuttur. FGF 10 sinyali ve NFI-C transkripsiyon faktörü gibi etkenlerin kök oluşumu için gerekli olduğu bilinmesine karşın, bunların fonksiyonu hakkındaki bilgiler yetersizdir (223).



Şekil 1.6: Dental lamina aşamasından diş erüpsiyonuna kadar olan diş morfogenezisini destekleyen ve yönlendiren karmaşık sinyal ağı, sinyal iletimi ve gen regülasyonu (67).

Odontoblastlar; morfolojik olarak kolumnar polarize yapıda olup, eksantrik bir nükleus ve dentinin dış kenarında yerleşmiş uzun hücresel uzantılara sahiptir. Diş gelişimi sırasında primer dentini oluşturan bu hücreler, yüksek derecede farklılaşmış, post mitotik hücrelerdir ve yaşam süresince dentinin organik matrisini salgılamaktadır. Diş dokularında hasar oluşturan patolojik durumlar genellikle odontoblastların ölümüne sebep olmakta ve bunu takiben pulpa hücreleri tarafından yeni odontoblastlar üretilmektedir (5). Odontoblastların pulpa dokusunda yerleşmiş

progenitör ve prekürsör hücrelerden kaynaklanarak çoğaldığı ve farklılaştığı düşünülmektedir (97). Çürük, mekanik travma veya kimyasal etkenler nedeniyle dental pulpa kök hücrelerinin terminal farklılaşmasını takiben oluşan odontoblastlar, pulpa dokusu için protektif bir bariyer görevindeki reparatif dentin oluşumunu sağlamaktadır (22). Sinyal moleküllerinin ise bu süreci yönlendirdiği ve etkinleştirdiği düşünülmektedir (77, 205).

Diş kaybının en sık görülen organ kaybı olması nedeniyle bu sorunun çözümünü hedef alan pek çok yaklaşım mevcuttur. Diş hastalıklarının patolojisi konusunda oldukça fazla bilgi olmasına rağmen hasarlı dokunun yenilenmesi ve bu yenilenme için yardımcı malzemelerin kullanılması mekanizmaları yeterince bilinmemektedir. Kök hücre uygulamalarının diş doku kayıplarında önemli bir tedavi edici etken olma olasılığı her geçen gün artmaktadır. Buna karşın akılları meşgul eden pek çok soru mevcuttur:

- Diş rejenere edilebilir mi?
- Erişkin kök hücreler diş dokuları hatta tüm diş için rejenerasyon yapacak şekilde yönetilebilir mi?
- Kök hücrelerin vücut dışına çıkarılması ve manüplasyonu her zaman gerekli midir?
- Diş rejenerasyonu ve dental implantlar ekonomik olarak karşılaştırılabilir mi? (225).

Bu sorulardan yola çıkarak tasarlanan araştırmalarla diş hekimliği alanında yeni bir konsept geliştirilmeye çalışılmaktadır.

1.6.2. Diş - Doku Mühendisliği Konsepti

Hücrelerin entegre edildiği doğal veya sentetik yapı iskeleleri ve spesifik sinyal sistemleri esasına dayanan ve multidisipliner bir bilim dalı olan doku mühendisliği, son yıllarda önemli gelişmeler göstermiştir (90, 149, 211). Bu mühendislik alanı, fonksiyonunu kaybetmiş doku ya da organların yeniden restore edilmesini amaçlar (17, 83, 172). Kaybedilen ya da hasarlı dokuların tedavisinde altın standart; dokunun aynı yapıya sahip sağlıklı dokularla yer değiştirmesidir (90).

Dental dokuların rejenerasyonu ve diş oluşturulmasına yönelik biyomühendislik yaklaşımları;

- Doku iskelesi esaslı olmayanlar (67, 130, 144, 145)
- Doku iskelesi esaslı olanlar (46, 47, 67, 130, 144) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Doku iskelesi esaslı olmayan, gelişimsel biyoloji ve organogenezis/germ dokusu kavramlarına dayanan gelişimsel (organotip) yaklaşımda diş germi hücrelerinden diş gelişimi amaçlanır (67).

Doku iskelesi esaslı yaklaşım ise; *in vitro* olarak hücrelerin alınması, çoğaltılması ve farklılaştırılması, bu hücrelerin doku iskelelerine ekilmesi ve *in vivo* olarak bu yapının implante edilmesi esasına dayanmaktadır (67). Bu uygulamanın başlıca öğeleri:

- Hedef dokuyu oluşturabilme potansiyeline sahip ‘hücreler’
- Hücre fonksiyonlarını yönlendiren ‘büyüme ve farklılaşma faktörleri’
- Oluşturulması hedeflenen dokunun üç boyutlu yapısını belirleyen doku iskelesi veya diğer bir ifadeyle skaffolddur (8).

1.6.2.1. Hücre Karakterizasyonu ve Farklılaşmanın Belirlenmesi

Diş-doku mühendisliği konseptinin ilk ögesini oluşturan dental pulpa kök hücrelerinin izolasyon, proliferasyon ve farklılaşma süreçlerinin anlaşılması; kusursuz bir pulpa-dentin kompleksi ile dental pulpa rejenerasyonu ve rekonstrüksiyonuna olanak sağlayacak biyomateryallerin geliştirilebilmesi açısından zorunludur (131). Dental pulpa kök hücrelerinin *in vitro* ve *in vivo* koşullardaki özelliklerinin incelenmesi sonucu elde edilecek veriler, uygun bir biyomateryal geliştirilmesi için gerekli koşulların belirlenmesinde esas oluşturacaktır. *In vitro* hücre kültürü ve *in vivo* transplantasyon sonrası;

- Akım sitometri analizi,
- Histolojik inceleme
- Real-time Polimeraz Zincir Reaksiyonu analizi gibi yöntemler bu açıdan hücrelerin karakterizasyonuna olanak sağlamaktadır.

Heterojen hücre topluluğu ile başlanan kültürlerde izolasyonu hedeflenen kök hücre popülasyonunu diğer hücre popülasyonlarından ayırt etmek karakterizasyon açısından önemli bir aşamayı oluşturmaktadır. Çeşitli kök hücre belirteçleri kullanılarak kök hücre tipinin belirlenmesi bu amaçla sıklıkla kullanılan yöntemlerden birisidir. Hücrenin köken aldığı dokuyu gösteren ve bir tür işaretleyici olan hücre yüzey proteinleri, doku mühendisliği uygulamalarında kaynak hücre elde etme aşamasında önemli bir yere sahiptir. Hücre yüzey proteinleri sayesinde kültüre edilecek olan hücreler fonksiyonel doku hücrelerinden ayırtedilebilmekte ve doku dizilimi belirlenebilmektedir. Hücreler, yüzeylerinde bulunan glikoprotein yapısındaki çeşitli reseptörler sayesinde organizmanın diğer hücreleriyle karşılıklı etkileşime girmektedir. Her biri antijenik bir yapı olan ve aynı zamanda bulunduğu

hücrenin kimliğini de gösteren bu reseptörler sayesinde hücreler birbirini tanımakta, birbirleriyle veya salgıladıkları ürünlerle etkileşim göstermektedir. Hücre yüzeyindeki bu antijenik yapılar günümüzde CD (Clusters of differentiation - Farklılaşma/Başkalaşım kümeleri) olarak tanımlanmaktadır. CD antijenleri; hücrelerin kökenlerini, gelişimsel aşamalarını ve fonksiyonel alt kümelerini ayırtmak için kullanılan yüzey işaretleyicileridir. Dünyanın her yerinde kabul gören bir gruplama yöntemi olan CD ilk olarak 1. İnsan Lökosit Differansiyasyon Antijenleri (HLDA) Konferansında (1982-Paris) kabul edilmiştir (21, 53). Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası İmmunoloji Dernekleri Birliği, CD adlandırmasının kullanılmasını bir zorunluluk olarak kabul etmektedir (242). CD adlandırmasında benzer reaksiyon paternine sahip antikorların gruplandırılarak tek bir numara ile belirtilmesi ve istatistiksel yöntem olarak da ‘Cluster’ analizi yapılması esası söz konusudur (241). Her CD, hücre yüzeyinde bulunan farklı bir antijenik yapıyı temsil etmektedir. CD1’den CD350’ye kadar numaralanmış bu antikorlar; araştırma, tanı, hastalık takibi ve tedavi alanında yaygın olarak kullanılmaktadır (241, 243). CD antijenik epitoplarının kantitatif analizi, hücre ayırımı ve tanımlaması için monoklonal antikorlar (MABs), floresan boyalar ve enzimlerle konjuge edilmekte, floresan mikroskobu ve/veya akım sitometri cihazıyla incelenmektedir. Akım sitometri; hücrelerin belirlenmesi ve monitorizasyonu için non-invaziv bir yöntemdir. Akım sitometri cihazında FITC ile floresanlanmış MAB ile işaretlenmiş hücreler sıvı bir ortamda sıra halinde uyarıcı ışıktan (Argon lazer, 488 nm) geçirilmektedir. Uyarıcı ışık hücreler tarafından kırılmakta veya florokromla işaretlenmiş MAB’lerin bağlandığı hücre tarafından emilmekte veya yayılmaktadır. Bu yayılan ışığın şiddet ve niteliği algılanarak bilgisayara aktarım gerçekleştirilmekte ve buna göre hücrenin tipi ve sayısı belirlenmektedir. Akım sitometri analizi sonrası hücre populasyonları

‘pozitif’ ve ‘negatif’ olarak tanımlanmaktadır (58, 214). Akım sitometri analizi için oldukça fazla sayıda hücre gerektiğinden analiz çoğunlukla kültür ortamında çoğaltılan hücreler üzerinde yapılmaktadır (128).

“Real-time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)” metodu ile çok az miktardaki bir biyolojik örneğin gen ekspresyon profili ortaya konabilmektedir (66). RT-PCR analizi gen ekspresyon profilini belirleyen güvenilir, hassas ve kantitatif bir yöntemdir (71). Yöntem, genel olarak polimeraz zincir reaksiyonu prensibi ile çalışmakta olup en önemli özelliği reaksiyon sırasında DNA amplifikasyonunun gerçek zamanlı olarak belirlenebilmesidir. Belirleme işlemi, çift iplikli DNA’ yı tanıyıp bağlanabilen floresan boyalar ya da hibridizasyon problemleri ile yapılmaktadır. RT-PCR prosesi dört fazda gerçekleşmektedir. İlk faz genellikle ilk 10-15 döngü boyunca sürmekte ve floresan seviyesi arka plan seviyesinin üzerine çıkmamaktadır. Erken eksponansiyel fazda, floresan miktarı arka plan değerinden önemli derecede fazla olan eşik değerine ulaşmaktadır. Bu olayın gerçekleştiği döngü, döngü eşik değeri (treshold cycle) olarak (CT veya CP) bilinmektedir. Eksponansiyel fazda PCR etkinliği 1-2 arasındadır. İdeal koşullarda ise etkinlik 2’dir. Her döngüde ürün miktarı iki katına çıkmaktadır. Plato safhasında reaksiyon bileşenleri tükenmekte ve floresan yoğunluğunun ölçülmesi artık bir yarar sağlamaz hale gelmektedir. RT-PCR ile geleneksel yöntemlerle ölçülebilen değerden 10.000-100.000 kat daha düşük miktardaki mRNA seviyelerinin, hatta tek bir kopya transkriptin saptanması bile mümkün olmaktadır (60).

Kök hücre çalışmalarında RT-PCR gibi yöntemlerle gen ekspresyon profilinin belirlenmesi, *in vitro* hücre kültürü veya *in vivo* transplantasyon sonrasında oluşturulması hedeflenen farklılaşmanın doğrulanabilmesi açısından önemli bir yöntemdir. RT-PCR ve mikroarray assayleri gibi tekniklerin hayata girmesinden

sonra, özelleşmiş yetişkin kök hücrelerinin karakterizasyonu ve gen ekspresyon profillerinin belirlenmesi kaçınılmaz olmuştur ve insan dental pulpa hücrelerinin farklılaşması ve mineralizasyonu konusunda bir çok çalışma yapılmıştır (182). Stro-1, özellikle dental dokulardaki çeşitli mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma durumunu belirlemek için en çok kullanılan hücre yüzey belirteçlerinden biri olmuştur (64, 186). Sıçan diş gelişiminde, bazı odontoblastlarda ve dental pulpa hücrelerinde Stro-1 immünreaksiyonu belirlenmiştir (91). Alkalen fosfataz, osteokalsin, osteonektin, tip I kollajen, dentin sialofosfoprotein (DSPP), dentin matris protein 1 (DMP1), enamelysin ve X kromozomundaki endopeptidaz ile türdeş fosfat düzenleyici gen (Phex) ise odontojenik farklılaşma ile ilişkili olarak diş hekimliği alanındaki kök hücre çalışmalarında en çok çalışılan gen gruplarından bazılarıdır (64, 84, 131). Özellikle DSPP, dişin gelişiminde ve mineralizasyonunda rol oynayan en önemli non-kollajen proteindir (29). Söz konusu protein ve genlerin yüksek düzeydeki ekspresyonu odontoblast-benzeri fenotipin göstergesi olarak kabul edilmektedir (131). İnsan dental pulpa hücrelerinin farklılaşması ve mineralizasyonu konusunda pek çok çalışma yapılmış olmasına rağmen, farklılaşma sırasındaki her safhada gen ifadesinin analizi halen tam olarak ortaya konmuş değildir ve araştırmalara açık bir konudur.

Odontojenik farklılaşmanın en önemli göstergelerinden bir diğeri de mineralize nodüllerin oluşumudur. Kalsiyum akümüasyonu sonucu oluşan bu mineralize yapının Alizarin Red boyama ile mikroskopik olarak gösterilmesi de mümkündür (194).

1.6.2.2. Büyüme ve Farklılaşma Faktörleri

Hücre proliferasyonunun düzenlenmesi, farklılaşma ve biyoaktif moleküllerle yeni doku oluşumunun sağlanması; doku mühendisliği konseptinin ikinci elemanı olan büyüme ve farklılaşma faktörleri aracılığıyla yönlendirilmektedir (202). Dış gelişiminde karmaşık bir sinyal ağı mevcuttur ve morfogenezde büyüme faktörlerinin kümülatif etkisi söz konusudur. Rejenerasyon bu karmaşık yapının anlaşılması ve taklit edilmesi ile mümkün olacaktır. Çeşitli biyosinyallerin oluşumunu sağlayan büyüme ve farklılaşma faktörleri dokudakine benzer bir ortam sağlamak için kullanılmaktadır (17). Transforme edici faktör beta (TGF- β) süper ailesi üyesi, rekombinant insan kemik morfogenetik proteinleri (rhBMP), son dönemde bu alanda üzerinde çalışılan büyüme faktörü gruplarından birini oluşturmaktadır (6, 84, 244). Primer olarak kemik ve dentinde yer alan (219) bu proteinler, enflamasyon olmadığı durumlarda pulpa kuafajı ve amputasyon tedavisinde osteo-dentin ve ardından tübüler reperatif dentin oluşumunu uyarmaktadır (147, 148, 224).

1.6.2.3. Skaffold

Doku mühendisliği konseptinde doku iskelesi esaslı yaklaşımın üçüncü bileşenini ise; doku iskelesi fonksiyonunu sağlayan skaffold oluşturmaktadır. Skaffold hücrelere fiziksel destek oluşturup, hücrelerin tutunarak fonksiyon görmeleri için uygun bir ortam sağlamakta ve üç boyutlu bir yapı oluşturarak elde edilecek hedef dokunun formunu belirlemektedir. Kök hücrelerin büyümesi, entegrasyonu ve farklılaşması için oldukça önemli bir etkiye sahip olan skaffold biyomateryalinin doku ile uyumlu olması önemlidir. Materyal; gözenek yapısı, gözenek boyutu ve yüzey özellikleri yönünden gerekli mekanik özelliklere uygun ve

biyobozunur olmalıdır (14). İdeal bir skaffoldun uygulandığı konak dokuda istenilen biyolojik etkileri sağlarken toksik ve immulojik etki göstermemesi gereklidir (230). Skaffoldun mekanik özellikleri, *in vivo* uygulamalarda hedef dokuya benzer olmalı; örneğin materyalin biyobozunurluk hızı, oluşturulması hedeflenen dokunun gelişim hızı ile paralellik göstermelidir (8). Skaffoldun ekstrasellüler matrisi taklit edebilmesi için; kök hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmasını sağlayacak büyüme faktörleri, gelişmelerini sağlayacak besin ve bakteri gelişimini önleyecek antibiyotik içermeleri gereklidir (30).

Hücre canlılığı ve lokalizasyonu açısından hücrelerin skaffold ile birlikte uygulanması önemlidir (141). Hücre ekilmiş olan skaffoldlar; bazı araştırmalarda omentum (bağırsak zarı), böbrek altı kapsülü ve subkutan doku gibi vücudun ektopik bölgelerine, bazı araştırmalarda ise diş çekim soketine veya çeneye implante edilmiştir (67).

Doku mühendisliği çalışmalarında skaffold olarak kullanılan başlıca materyaller şunlardır:

- Sentetik seramikler (HA ve/veya TCP),
- Sentetik polimerler [poliglikolik asit (PGA), polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit-poli-L-laktik asit (PGA-PLLA), polilaktik poliglikolik asit (PLGA), kaprolakton],
- İnorganik sığır kemiği (Bio-Oss)
- Doğal polimerler (kollajen, kitosan, hiyaluronik asit) (8).

Sentetik seramikler grubuna dahil edilen hidroksiapatit; biyoyumluluk, immun tolerans ve osteokondüktif özellikleri sayesinde kemik rejenerasyonu için yaygın olarak kullanılan ve üç boyutlu yapısı trabeküler kemiğe benzerlik gösteren

bir materyaldir (95). Hidroksiapatit (HA) ve/veya β -trikalsiyum fosfat (TCP) içeren materyaller kemik rejenerasyonu kadar diş hekimliği alanında da (maksillofasiyal cerrahi v.b) kullanılmaktadır (131). Por çapı, porozite ve bağlanma gibi özelliklerinin uygun olması bu materyalin mineral matrisi benzerlik gösteren kemik ve diş dokuları için skaffold olarak kullanımını sağlamaktadır. Ancak materyalin preparasyon tekniği ile ilişkili olarak düşük kırılma dayanımı sergileyebilmesi mümkündür (199). Biyoaktif materyal olarak kullanım potansiyelinin belirlenmesi için doku oluşumuna katkısının incelendiği *in vivo* çalışmalar gereklidir.

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. İnsan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Hücre Sayımı

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, 09-9.1/6 Karar No'lu etik kurul onayı alındıktan sonra hazırlanmış olan “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” çalışmaya dahil edilen tüm bireyler tarafından imzalandı. Ege Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Hastalıkları Cerrahisi Anabilim Dalı'nda çalışmaya dahil edilen, 19-29 yaş arası, sistemik hastalığı bulunmayan, kök gelişimi henüz tamamlanmamış gömülü yirmi yaş diş çekimi yapılacak olan 15 hastaya, çekim öncesi % 0,2 klorheksidin (Kloroben, Drogosan İlaçları Sanayi ve Tic. A.Ş, Çubuk/ANKARA) ile gargara yaptırıldı ve çekim bölgesi klorheksidin ile silindi. Dişlerin çekimi etik ve asepsi kurallarına uygun şekilde gerçekleştirildi (Resim 2.1).

Çekim sonrası diş üzerindeki gingival ve periodontal dokular uzaklaştırılarak, diş önce iyotlu antiseptikten (Betadin (povidone-iodine), Alcon Laboratories, Inc. Forth Worth) daha sonra da iyot artıklarını uzaklaştırmak için % 70'lik alkolden geçirildi ve penisilin/streptomisin (Gibco Invitrogen, Grand Island, ABD) antibiyotik karışımında 1 dakika bekletildi. Karışım içerisindeki diş steril gazlı bez ile tutularak alındıktan sonra elmas separe kullanılarak steril serum fizyolojik

soğutması ile diş üzerinde oluklar açıldı ve diş kırılarak steril pens yardımı ile pulpa dokusu çıkarıldı (Resim 2.1). Soğuk besi ortamına (alpha MEM, Gibco Invitrogen, Grand Island, ABD) alınan doku buz kalıpları içinde, çalışmanın gerçekleştirildiği Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı'na ulaştırıldı. Hücre kültürü aşamasında; steril ve tek kullanımlık hücre kültürü malzemeleri kullanıldı ve işlemler laminar akışlı steril kabinde (Class II, Heraeus, Hanau, Almanya) gerçekleştirildi. Kontaminasyonun önlenmesi amacıyla asepsi koşullarına uygun şekilde çalışıldı.



Resim 2.1: Yirmi yaş diş çekimi (A) ve pulpa dokusunun çıkarılması (B).

Soğuk besi ortamındaki pulpa dokusu buz kalıbı üstünde bistüri ile küçük parçalara ayrılarak mekanik parçalama yapıldı. 3 mg/mL kollajenaz tip I (Sigma-Aldrich, ABD) ve 4 mg/mL dispaz (Sigma-Aldrich, ABD) ile 37°C de 45 dakika enzimatik sindirim gerçekleştirildi. 500 g - 6 dakika (150 mm çaplı santrifüj için = 1725 rpm - 6 dakika) santrifüj sonrası hücreler pipetlenerek homojenize edildi ve 70 µm'lik gözenekleri olan filtreden (Cell Strainer, BD Biosciences Discovery Labware, CT, ABD; 352340) geçirildi. Tekrar santrifüj (1725 rpm, 6 dakika) edildikten sonra üst sıvı atılıp hücre sayımı sonrası ekim yapıldı (Resim 2.2).



Resim 2.2: *In vitro* hücre kültür öncesi hazırlık aşamaları: Pulpa dokusunun mekanik ve enzimatik olarak parçalanması (A), santrifüjleme ve filtrasyon (B), hücre sayımı (C) ve hücre ekimi (D).

Hücre sayımı için; 100 μ l hücre süspansiyonu üzerine, mikropipetle 100 μ l % 0,5 tripan mavisi (Biological Industries, Beit Haemek, İsrail) solüsyonu eklendi. Sayım kamarası olarak Thoma lamı kullanıldı. Thoma lamı üzerindeki sayım alanı çerçevesi üzerine lamel kapatıldı. Lamın her iki yanında bulunan kanalların ortasındaki sayım alanında, lamelin lam ile birleştiği noktadan 50 μ l hücre

süspansiyonu pipetlendi. Işık mikroskopunda 40x büyütmede hücre sayımı gerçekleştirildi. 'Hs x Do x Ss' formülüne göre toplam hücre sayısı hesaplandı.

Hs: Sayılan hücre sayısı,

Do: Seyreltme oranı,

Ss: 0,1 mm³'deki sayım sonucunu 1ml'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan sabit sayı, 10.000'dir.

37°C'de % 5 CO₂'li ortamda (CO₂ inkübatör, Sanyo, Etten Leur, Hollanda) inkübasyon yapıldı. Yaklaşık 48 saat sonra besiyeri değiştirilerek kültür kabının tabanına tutunmayan hücreler uzaklaştırıldı. Kültür periyodu boyunca hücreler düzenli olarak inverted (objektifleri ters çevrilmiş) mikroskopta (Olympus, Tokyo, Japonya) kontrol edildi ve besi ortamı iki günde bir değiştirildi.

Çalışmada Sonoyama ve ark.'nın (194) tanımladığı şekilde hazırlanan mezenkimal kök hücre besi ortamı (Tablo 2.1) kullanıldı.

	Stok solusyon	Gerekli hacim (ml)	Final konsantrasyon
α -MEM (Gibco Invitrogen, Grand Island, ABD)	1x	410	1x
Fötal sığır serumu (FBS; Gibco Invitrogen, Grand Island, ABD)	-	75	% 15
Glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD)	200 mM	5	2 mM
L-askorbik asit fosfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD)	10 mM	5	0,1 mM
Penisilin/Streptomisin (Gibco Invitrogen, Grand Island, ABD)	10.000 U/mL	5	100 U/mL
Final hacim		500	

Tablo 2.1: Mezenkimal kök hücre besi ortamı içeriği (194).

2.2. İnsan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Akım Sitometri

Analizi

İnsan dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin, fenotipik karakteristiklerinin belirlenmesi için 72 saatlik (pasaj 0; P0) ve 21 günlük (pasaj 1; P1) kültür periyodu akım sitometri analizleri gerçekleştirildi.

Tripsinizasyon işleminde; besi ortamı ve içindeki tutunmayan hücreler döküldükten sonra, flask yüzeyleri 3-4 ml Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen PBS (DPBC; Ca^{++} Mg^{++} -free-, Gibco Invitrogen, Grand Island, ABD) ile yıkandı. 1.5-2 ml % 0,25 tripsin-EDTA (Gibco-BRL, Paisley, İngiltere; 25200-056) solüsyonu eklenerek, CO_2 inkübatörde 4-5 dakika inkübe edildi. Mikroskopta hücrelerin tümünün yüzeyden ayrıldığı gözlemlendikten sonra, tripsinin inaktivasyonu için flaslara 4 ml besi ortamı eklendi. Daha sonra hücreler 15 ml'lik konik tabanlı tüplere (BD Biosciences Discovery Labware, CT, ABD) alındı ve 1725 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra, pelete 1ml besi ortamı eklenip, pipetlenerek homojenizasyonun sağlanmasının ardından, hücre sayımı yapıldı, yaklaşık olarak 1×10^6 hücre 100 μ l PBS içinde homojenize edildi.

- CD34; Hematopetik progenitör hücre antijeni (BD Biosciences Pharmingen, California, ABD)
- CD45; Eritrositler hariç tüm hematopetik hücrelerdeki kök hücre antijeni (BD Biosciences Pharmingen, California, ABD)
- CD73; NTES'-nucleotidase (BD Biosciences Pharmingen, California, ABD)
- CD90; Timus hücre antijeni (BD Biosciences Pharmingen, California, ABD)
- İzotipik kontrol grupları belirlendikten sonra her bir grupta 10 μ l eklenerek inkübe edildi (oda sıcaklığında- karanlıkta-30 dakika).

İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (Cell wash, BD Biosciences Pharmingen, California, ABD) eklendi ve santrifüj edilerek (1725 rpm, 5 dakika) artefaktlardan temizlendi, 400 µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edildi.

- CD45; APC-H7,
- CD34; APC,
- CD73; PE (fikoeritrin)
- CD90; FITC (fluoresan izotiyosiyonat) ile eşleştirildi.

Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akım sitometri cihazında (BD Biosciences, California, ABD) okutuldu ve analizi BD Cell Quest TM software programı (BD Biosciences, California, ABD) ile gerçekleştirildi (64, 115).

2.3. İnsan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Odontojenik Farklılaştırılması

İzole edilmiş olan insan dental pulpa mezenkimal kök hücreleri iki gruba ayrılarak 7, 14 ve 21 günlük kültür periyotları süresince 37°C'de % 5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Gruplardan birine Sonoyama ve ark.'nın (194) belirttiği şekilde hazırlanan mezenkimal kök hücre besi ortamı uygulanırken (Tablo 2.1), diğer gruba yine aynı ekibin tanımladığı, aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanan odontojenik farklılaştırma besi ortamı (Tablo 2.2) uygulandı. Ayrıca çalışmada odontojenik farklılaştırma besi ortamında büyüme faktörü olarak Iohara ve ark. (84) tarafından etkinliği gösterilmiş olan 50 ng/ml kemik morfogenetik proteini 2 (BMP2) (Santa Cruz Biotechnology Inc. California, ABD) kullanıldı.

	Stok solusyon	Gerekli hacim (ml)	Final konsantrasyon
α -MEM (Gibco Invitrogen, Grand Island, ABD)	1x	404,5	1x
Fötal sığır serumu (FBS; Gibco Invitrogen, Grand Island, ABD)	-	75	% 15
Glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD)	200 mM	5	2 mM
L-askorbik asit fosfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD)	10 mM	5	0,1 mM
Penisilin/Streptomisin (Gibco Invitrogen, Grand Island, ABD)	10.000 U/mL	5	100 U/mL
Deksamethazon (Fluka, Sigma Aldrich, Buchs, İsviçre)	10 μ M	0,5	0,01 μ M
KH ₂ PO ₄	180 mM	5	1,8 mM
Final hacim		500	

Tablo 2.2: Odontojenik farklılaştırma - kök hücre besi ortamı içeriği (194).

2.3.1. Histolojik İnceleme

Histolojik inceleme için Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, ABD) kaplı kültür kaplarına (Labtek II Chamber Slide, Nunc GmbH, Almanya) yaklaşık 1×10^5 hücre/cm² ekim yapıldı. 7, 14 ve 21 günlük kültür periyotları süresince hücre morfolojisi inverted mikroskopta (Olympus, Tokyo, Japonya) incelenerek elde edilen görüntüler kaydedildi.

Morfolojik değişimi göstermek amacıyla Hemotoksilen-Eosin (H&E) (Sigma-Aldrich, ABD) ve odontojenik farklılaşmanın bir göstergesi olan mineralizasyonu göstermek amacıyla Alizarin Red (Fluka-Sigma Aldrich, Buchs, İsviçre) ile direkt boyama yapıldı. H&E boyama için; hücreler % 4 paraformaldehit ile 10 dakika fikse edildi. 5-6 kez distile su ile yıkandı ve 2 dakika Mayer's Hemotoksilen solüsyonu (Sigma-Aldrich, ABD) uygulandı. 1 dakika çeşme suyu ile yıkandıktan sonra 10 saniye Eosin Y (Sigma-Aldrich, ABD) uygulandı. Alkol serisinden (% 70, % 96 ve % 100) geçirildi ve hava ile kısa süre kurutuldu. Bilgisayar bağlantılı mikroskop (Olympus BX50, Japonya) ile görüntüleri kaydedildi.

Alizarin Red boyama için; besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra % 4 paraformaldehit ile 10 dakika fiksasyon yapıldı. 5-6 kez distile su ile yıkandı ve amonyum hidroksit ile pH 4.1-4.3 sağlanan Alizarin Red (Fluka-Sigma Aldrich, Buchs, İsviçre) 2 dakika uygulandı. Distile su ile yıkandıktan sonra (20 kez) aseton ile dehidratasyon sağlandı. Aseton-ksilen 1:1 ile fiksasyon yapıldı (20 kez) ve ksilen ile temizlendi. Kurutma sonrası inceleme yapılarak bilgisayar bağlantılı mikroskop (Olympus BX50, Japonya) görüntüleri kaydedildi.

2.3.2. RT-PCR Analizi

7, 14 ve 21 günlük kültür periyodu gruplarında mine ve dentin matris komponentleri için insan-spesifik transkriptlerinin; DSPP, DMP1, enamelysin/MMP20 ve Phex ekspresyon düzeyi RT-PCR analizi ile incelendi. Kontrol gen olarak β -aktin kullanıldı. Analiz kit (LC Gen Expression Analysis for 96 Rx, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre kültürlerinden total RNA izolasyonu yapıldı, ardından total RNA' lardan cDNA hazırlandı. Elde edilen cDNA' ların gen ekspresyon profilleri Roche Light Cycler® 1,5 RT-PCR sistemi ile ortaya kondu.

2.3.2.1. Kültür Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu

Kültür hücrelerinden total RNA izolasyonu High Pure RNA Izolation Kit (Roche, Cat No: 11 828 665 001) kullanılarak gerçekleştirildi. Yaklaşık 1×10^6 hücre 200 μ l fosfat tampon solüsyonu (PBS, Gibco-Invitrogen, Grand Island, ABD) içinde süspanse edildikten sonra üzerine 400 μ l lizis tamponu eklendi ve 15 saniye vortekslendi. Filtreli tüpler kapaktan tutularak toplama tüplerine aktarıldı ve 600 μ l örnek eklendi. 8000 g - 15 saniye santrifüj sonrası filtreli tüp çıkarıldı, toplama tüpündeki sıvı döküldü ve filtreli tüp tekrar toplama tüpüne yerleştirildi. DNaz inkübasyon tamponundan 90 μ l ve DNaz' dan 10 μ l alınıp önceden karıştırılarak her tüpe bu karışımdan 100 μ l eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. 500 μ l yıkama tamponu I eklendi ve 8000 g - 15 saniye santrifüj sonrası toplama tüpünde bulunan sıvı dökülerek 500 μ l yıkama tamponu II eklendi. 8000 g - 15 saniye santrifüj sonrası toplama tüpünde bulunan sıvı döküldükten sonra 200 μ l yıkama tamponu II eklendi ve 13.0000 g - 2 dakika santrifüj sonrası alttaki tüpte bulunan sıvı dökülerek filtreli tüpler steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine

aktarıldı. Üzerine 50 µl Elution tamponu eklenerek 8000 g - 1 dakika santrifüj sonrası RNA'nın mikrosantrifüj tüpüne geçmesi sağlandı.

Total RNA'lar izole edildikten sonra RNA izolasyon kontrolü için Nano-Drop cihazında ölçüm yapıldı ve daha sonra cDNA sentez aşamasına geçildi. Total RNA içeren tüpler kullanılıncaya kadar -80 °C' de saklandı.

2.3.2.2. RNA' dan cDNA Sentezi

cDNA sentezi, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Cat No 04 379 012 001) kullanılarak gerçekleştirildi. Kullanılan tüm kitler çalışma öncesinde çözüldü ve birkaç saniye santrifüjlendi. Steril PCR tüplerinde; 11 µl Total RNA ve 2 µl Random Hexamer primer (600 pmol/µl) içeren Template primer karışımı hazırlandı. Template primer karışımını denatüre etmek için tüpler 10 dakika 65 °C' de bekletildi ve hemen buz üzerine alındı. Tüplere final hacim 20 µl olacak şekilde;

- 4 µl Reaksiyon tamponu
- 0.5 µl RNaz inhibitörü
- 2 µl Deoksinükleotid karışımı (dNTP)
- 0.5 µl Revers Transkriptaz enzimi eklendi.

Karışım dikkatlice karıştırıldı (birkaç saniye santrifüjlendi) ve termal cyclus'a yerleştirildi. Revers transkriptaz reaksiyonu için 25°C' de 10 dakikalık süreyi takiben 55°C' de 30 dakika inkübasyon gerçekleştirildi. 85°C' de 5 dakika bekletilerek Revers transkriptaz enzimi inaktive edildi ve tüpler soğuk buz üzerine alınarak reaksiyon durduruldu. cDNA içeren tüpler kullanılıncaya kadar -20 °C' de saklandı.

2.3.2.3. Real Time - PCR

Gen ekspresyon profilinin belirlenmesi için LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche, Cat no: 03 003 230 001) kullanıldı. Beş gen için 5 tüp hazırlandı. Genlerin primer sekansları Tablo 2.3’de gösterilmektedir.

Her tüp için aşağıda belirtilen PCR karışımı hazırlandı;

- 13.8 µl dH₂O
- 1.6 µl Mg⁺²
- 0.3 µl F primer
- 0.3 µl R primer
- 2 µl SYBR Green I enzim

LightCycler® kapiller tüpleri soğuk akü üzerine yerleştirildi ve 18 µl PCR karışımı kapiller tüplere aktarıldı. Üzerine 2 µl cDNA ilave edildi ve kapakları kapatıldı. Kapiller tüpler 5 saniye 700 g’ de santrifüjlendi ve LightCycler® 1,5 RT-PCR sistemine yerleştirildi.

Denatürasyon: 95°C 10 dakika

Amplifikasyon: 95°C 15 saniye
56°C 8 saniye
72°C 10 saniye } 45 döngü

Eritme: 95°C 0 saniye
40°C 15 saniye
95°C 0 saniye } 3 döngü

Soğutma: 40°C 30 saniye uygulandı.

DSPP Forward	5' AACATCACAGCAAATGGCATC
DSPP Reverse	5' CTCCAGCTACTTGAGGTCCA
DMP 1 Forward	5' AGACAGTGCCCAAGATACCACC
DMP 1 Reverse	5' ATTCCCTCATCGTCCAACCTCG
Enamelysin/MMP20 Forward	5' ACAAGCAGCCTCTAACTGGATC
Enamelysin/MMP20 Reverse	5' GATTTCGCATAAAGTTGCCCAT
Phex Forward	5' AACTTTGCTGCCTCAATGGGA
Phex Reverse	5' GTCAATAAAGGCCAGCGAAC
β Actin Forward	5' AGCCTCGCCTTTGCCGA
β Actin Reverse	5' CTGGTGCCTGGGGCG

Tablo 2.3: Beş gen için primer sekansları.

2.3.2.4. Veri Analizi:

Analiz sonunda LightCycler® 1,5 RT-PCR cihazından Ct değerleri elde edildi ve $\Delta\Delta C_t$ Metodu kullanılarak elde edilen verilerden gen ekspresyon düzeyleri hesaplandı (125). Odontojenik farklılaşma gerçekleştirilen grupta (deney grubu) elde edilen gen ekspresyon düzeyleri, kontrol grubuna göre % artış olarak belirlendi.

$\Delta\Delta C_t$ yöntemi aşağıdaki şekilde uygulandı;

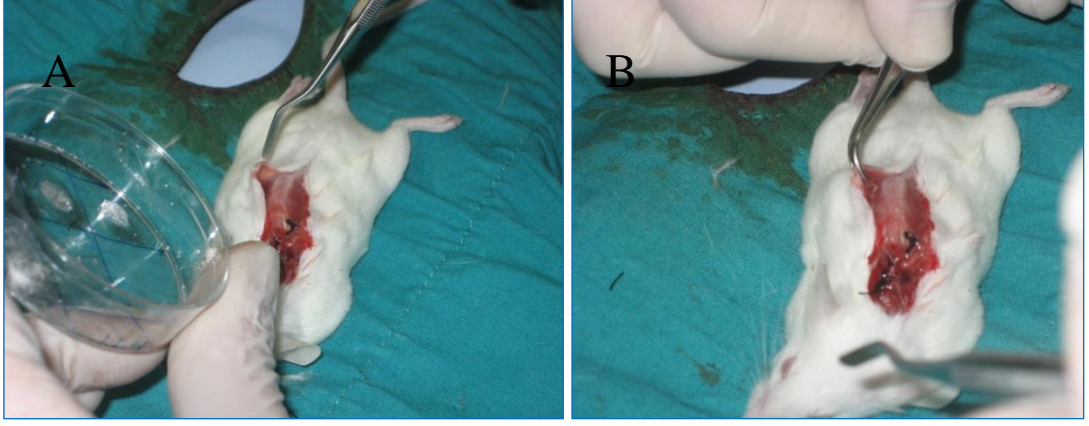
- C_t : Eşik siklus, ekspresyonun arttığı siklustaki sayıyı temsil eder (HKG: Housekeeping gen için, GOI: Test edilen gen için belirlendi). Sadece < 35 olan değerler dahil edildi.
- Kontrol grubu ve deney grubu ΔC_t değerleri hesaplandı:
 $\Delta C_t(\text{Kontrol}): C_t(\text{GOI}) - C_t(\text{HKG})$
 $\Delta C_t(\text{Deney}): C_t(\text{GOI}) - C_t(\text{HKG})$
- $\Delta\Delta C_t: \Delta C_t(\text{Deney}) - \Delta C_t(\text{Kontrol})$
- Katlı değişim (fold change): $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerlerine ulaşıldı.

2.4. İnsan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Transplantasyonu

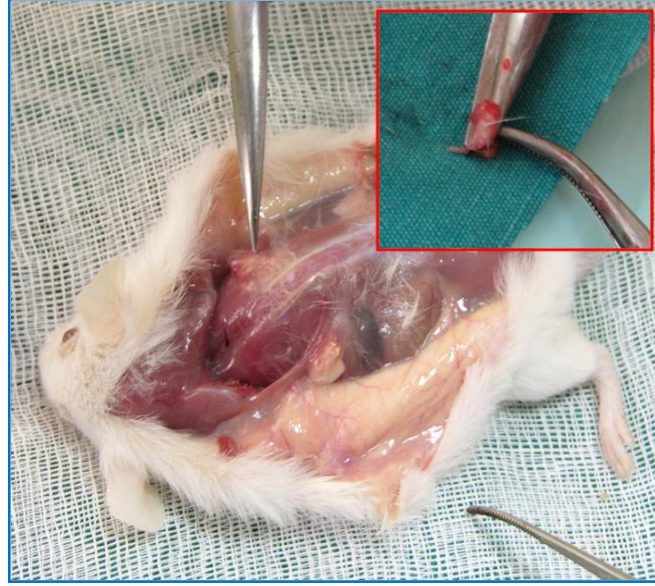
Üçüncü pasajdaki (~ 72. gün) hücrelerin [odontojenik farklılaştırma uyarılan (+) grup ve sadece mezenkimal kök hücre besi ortamında çoğaltılan (-) grup] üst sıvısı boşaltıldı ve Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen PBS (DPBC; Ca^{++} Mg^{++} -free-, Gibco Invitrogen, Grand Island, ABD) eklendi. Tripsin ilave edilerek $37^{\circ}C$ 'de 30 dakika bekletildi. Teflon kazıyıcı ile hücreler tabandan kaldırıldı ve tüplere alındı. 800 g - 6 dakika santrifüj ile dibe çöktürülen hücrelerin üst sıvısı atıldı. Hücre sayımı yapıldı ve her bir grupta yaklaşık 2×10^6 hücre içeren 10 μ l'lik hücre süspansiyonu 40 mg HA/TCP (Zimmer, Warsaw, Indiana, ABD) taşıyıcı ile karıştırıldı ve immun baskılanmış farenin sırtına subkutan olarak transplante edildi (Resim 2.3). Negatif kontrol grubunu oluşturmak üzere yine belirlenen miktarda taşıyıcı hücrelessiz olarak transplante edildi.

Transplantasyon protokolü Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2009-121 sayılı onayı ile belirlenen şartlara uygun şekilde gerçekleştirildi. Transplantasyon protokolünde anestezi 50 mg/kg Ketamin HCl (Alfamine®), 5 mg/kg Ksilazin HCl (Alfazyne®) ve acepromazine maleate (1 mg/kg) kombinasyonu ile intraperitoneal yoldan uygulandı.

6 haftalık transplantasyon süresi sonunda farelere anestezi uygulanarak transplantlar çıkarıldı (Resim 2.4). 100mg/kg Tiopental Sodyum intraperitoneal yoldan verilerek ardından toraks açıldı, kalp ve damar sistemleri hasarlanarak hayvanların tamamıyla ölmesi garanti altına alındı.



Resim 2.3: HA/TCP taşıyıcı ile karıştırılan dental pulpa kök hücre süspansiyonunun (A), immun baskılanmış farenin sırtına (subkutan cep içine) (B) transplantasyonu.



Resim 2.4: 6 haftalık sürenin sonunda histolojik inceleme ve RT-PCR analizi yapılacak transplantların çıkarılması.

2.4.1. Transplantasyon Sonrası Histolojik İnceleme

Histolojik inceleme için çıkarılan dokular % 4'lük paraformaldehit içinde 24 saat fikse edildi. Daha sonra sırasıyla 1'er saat % 70, % 80, % 95 ve % 100 konsantrasyonlarındaki alkol serisi ile dehidratasyon uygulandı. Tamamen kurutulan örnekler saydamlaştırma ve alkol giderimi amacıyla ksilol uygulandı. Örnekler 58°C'deki sıvı parafine uygun pozisyonlarda gömülerek 24 saat bekletildi. Sonrasında oda sıcaklığında bekletilerek donmuş parafin blokların oluşması sağlandı. Mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler lamlara alınarak boyama prosedürleri uygulandı.

Hemotoksilen-Eosin boyama için; örnekler 24 saat ksilol uygulanarak parafin uzaklaştırıldı. Sırasıyla % 100, % 95, % 80 ve % 70 konsantrasyondaki alkol serisi 1'er dakika uygulandı. 5 dakika distile su ve takiben 3 dakika Hemotoksilen (Sigma-Aldrich, ABD) uygulandı. Örnekler 5 dakika çeşme suyunda tutuldu, daha sonra pembe renk alana kadar asit + alkolle muamele edildi. Akan su altında yıkama işlemi sonrasında doku mor renk alana kadar amonyaklı suda tutuldu. 1 dakika çeşme suyu ve takiben 5 dakika distile su ile yıkama yapıldı. 3 dakika Eosin (Sigma-Aldrich, ABD) ile muamele edildi ve % 95'lik alkolda 2 dakika, % 100'lük alkolde 5 dakika bekletilip kurumaya bırakıldı. 30 dakika ksilolde tutulup mounting mediumla kapatıldı.

Alizarin Red ile boyama için; örnekler 24 saat ksilol uygulanarak parafinin uzaklaştırılması sağlandı. Kurutma işlemi sonrası sırasıyla % 100, % 95, % 80 ve % 70 konsantrasyondaki alkol serisi 1'er dakika uygulandı. 5 dakika distile su ve takiben 10 dakika Alizarin Red (% 2 toz Alizarin Red (Sigma-Aldrich, ABD), 100 ml distile su) ile muamele edildi. Örnekler 3 dakika aseton-ksilol (% 50-50)

karışımında bekletildi. 10 dakika ksilol uygulandı ve tamamen kurutulduktan sonra mounting mediumla kapatılıp ışık mikroskobunda incelendi.

2.4.2. Transplantasyon Sonrası RT-PCR Analizi

RT-PCR analizi için çıkarılan dokular Tripure Isolation Reagent (Roche, Cat No 11 667 157 001) içine alındı. Odontojenik farklılaştırma yapılan (+) ve sadece mezenkimal kök hücre besi ortamında çoğaltılan (-) transplantasyon gruplarında mine ve dentin matris komponentleri için insan-spesifik transkriptlerinin; DSPP, DMP1, enamelysin/MMP20 ve Phex ekspresyon düzeyi RT-PCR analizi ile incelendi.

2.4.2.1. Dokulardan Total RNA İzolasyonu

Steril polipropilen santrifüj tüpüne 1 ml TriPure Isolation Reagent konuldu (15-25°C'de). Tüp içine 50-100 mg doku eklendi. Cam-teflon homojenizatör ile dokular homojenize edildi. Nükleoprotein kompleksinin ayrılması için homojenatlar 15-25°C'de 5 dakika inkübe edildi. Her örneğe 1 ml TriPure reagent'ına 0.2 ml olacak şekilde kloroform eklendi. Tüplerin kapağı kapatıldı ve 15 saniye güçlü bir şekilde çalkalandı. Örnekler 15-25°C'de 15 dakika inkübe edildi. Faz ayırımı için +4°C'de 12000 g' de 15 dakika santrifüj yapıldı Santrifüj sonrasında 3 faz oluştu; renksiz üst sulu faz RNA izolasyonu için kullanılmak üzere polipropilen santrifüj tüpüne aktarıldı. Bu fazdan RNA' nın çöktürülmesi için 1 ml TriPure reagent'ına 0.5 ml olacak şekilde izopropanol eklendi. Tüplerin kapağı kapatıldı ve birkaç kez çevrildi. Örnekler 15-25°C'de 5-10 dakika inkübe edildi. +4°C'de 12000 g' de

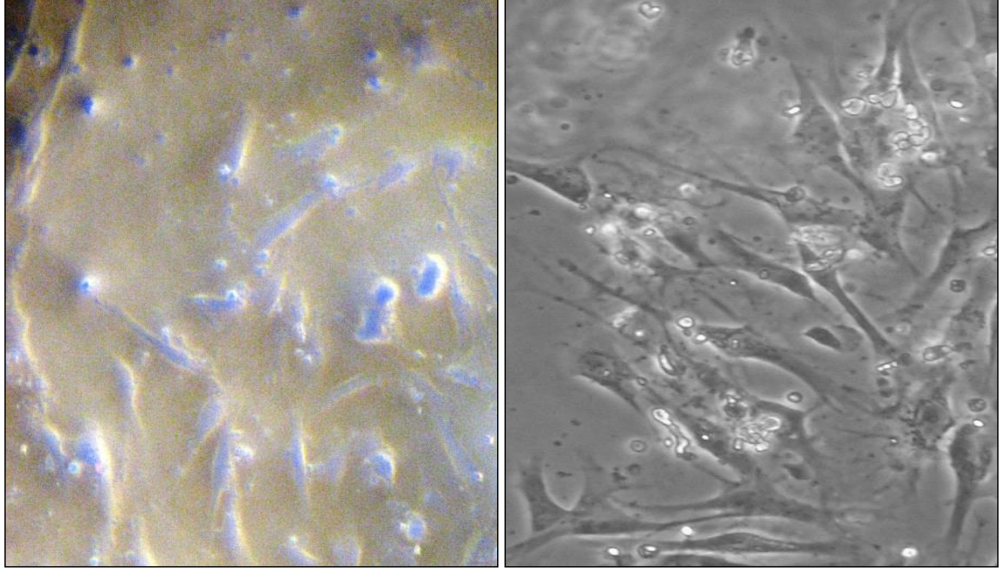
10 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı. Tüplere 1 ml TriPure reagent'ına 1 ml olacak şekilde % 75 etanol eklendi. Örnekler vortekslenerek etanolde yıkandı. +4°C'de 7500 g' de 5 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı. Vakum ya da hava akımı ile RNA' dan etanol uzaklaştırıldı. RNA pelleti Dietilpirokarbonat (DEPC) uygulanmış RNaz-free su ile resüspanse edildi. RNA bir pipet yardımı ile çözüldü, 10-15 dakika 55-60°C'de inkübe edildi. Total RNA' lar izole edildikten sonra RNA izolasyon kontrolü için Nano-Drop cihazında ölçüm yapıldı ve kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı. RNA' dan cDNA sentezi, Real Time- PCR ve veri analizi aşamaları daha önce anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

3. BÖLÜM

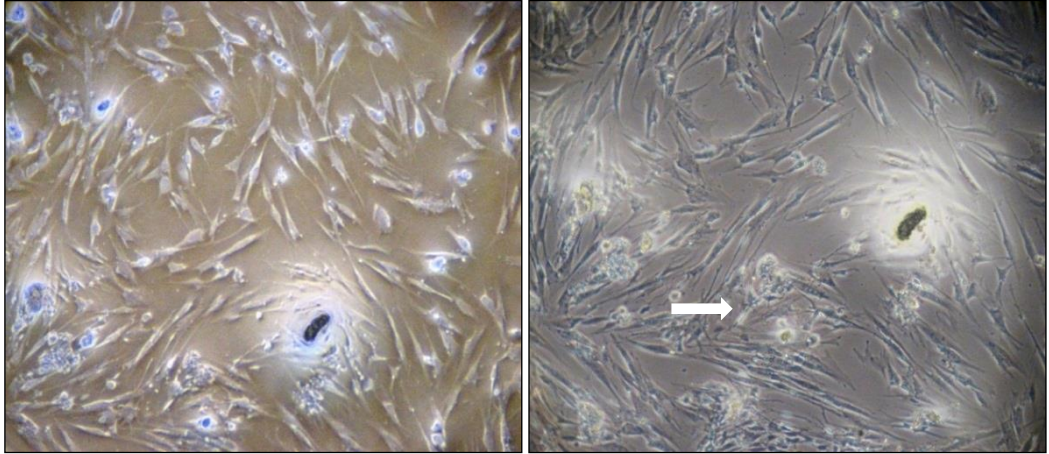
BULGULAR

3.1. İnsan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Morfolojik Özellikleri

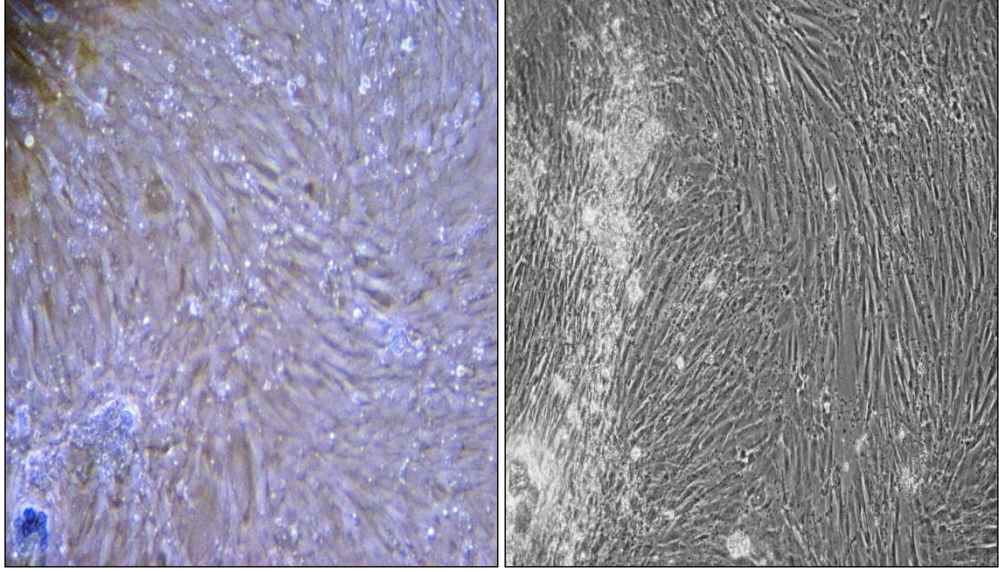
Yapılan kültür sonucunda insan yirmi yaş diş pulpasından izole edilen hücrelerin kültür kabının tabanına tutunarak fibroblast benzeri bir görüntü sergilediği (Resim 3.1), kültürün ilerleyen dönemlerinde hücre yoğunluğu ve koloni oluşumunun arttığı, yüzeye tutunamayan hücrelerin ve hücre artıklarının ise seçici hücre proliferasyonu ve yüzey adezyonu sonucu üst sıvı değişimi sırasında ortadan kalktığı belirlendi (Resim 3.2). Kültürün yaklaşık 21. gününde kültür kabı yüzeyinin % 80-90 oranında hücrelerle dolduğu gözlemlendi (Resim 3.3).



Resim 3.1: Kültür periyodunun 2. günündeki ilk üst sıvı değişimi sonrası, yüzeye tutunmuş olan dental pulpa kök hücrelerinin fibroblast-benzeri (iğ şeklindeki), morfolojileri (x200).



Resim 3.2: Hücre izolasyonundan yaklaşık 1 hafta sonra, hücre sayısındaki artış, koloni formasyonu başlangıcı ve küçük boyutlu koloniler (okla gösterilmiştir) (x100).

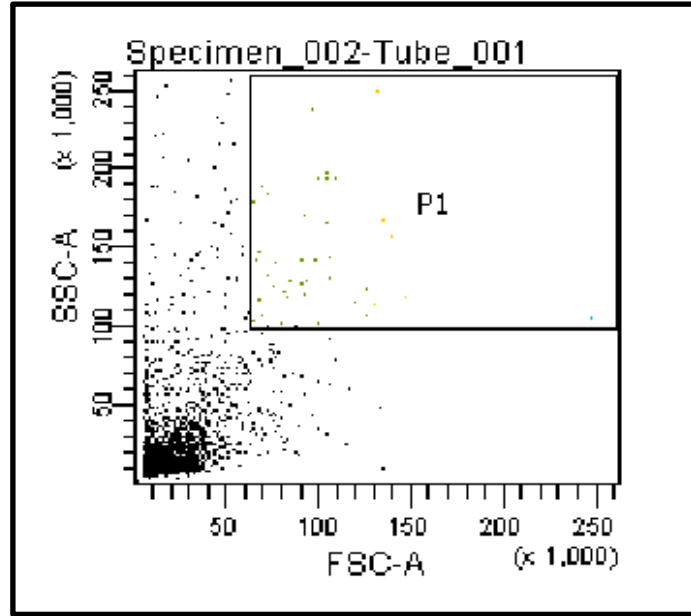


Resim 3.3: Hücreler arası boşluğun azalarak hücrelerin yüzeyi kapladığı (konfluent hale geldiği) ~21 gün, pasajlama (subkültür) için hücre yoğunluğunun yeterli seviyeye geldiğini göstermektedir (x100).

3.2. İnsan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Akım Sitometri Analizi Sonuçları

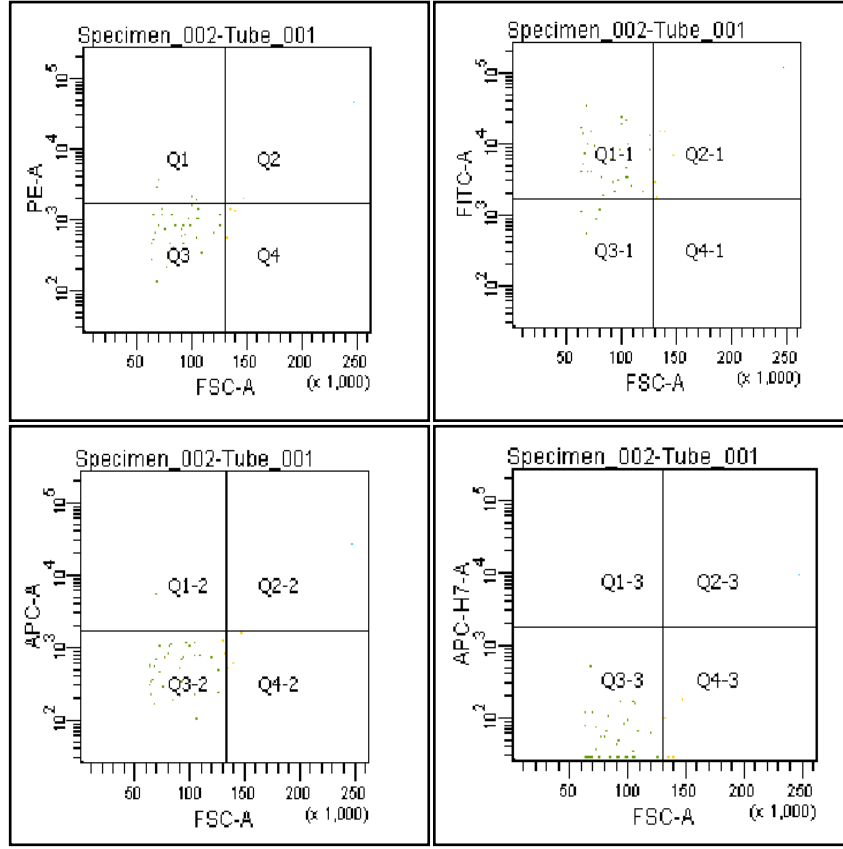
72 saatlik (pasaj 0; P0) ve 21 günlük (pasaj 1; P1) kültür periyodu sonrası yaklaşık 1×10^6 hücre/ml ile gerçekleştirilen akım sitometri analizi sonucunda, insan dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin hematopoietik kök hücre belirteçlerini (CD34, CD45) eksprese etmedikleri, buna karşın mezenkimal kök hücreler için sıklıkla kullanılan CD73 ve CD90 yüzey antijenleri için pozitif oldukları tespit edildi.

Analiz için FSC ve SSC diyagramında hücrelerin büyüklük ve granülizasyonunun en iyi olduğu alan seçildi (Grafik 3.1).



Grafik 3.1: Akım sitometri analizi için seçilen, hücrelerin büyüklük ve granülizasyonlarının en iyi olduğu alan. (P1 ile belirtilen bölüm FSC+ ve SSC+ alanı temsil etmektedir.)

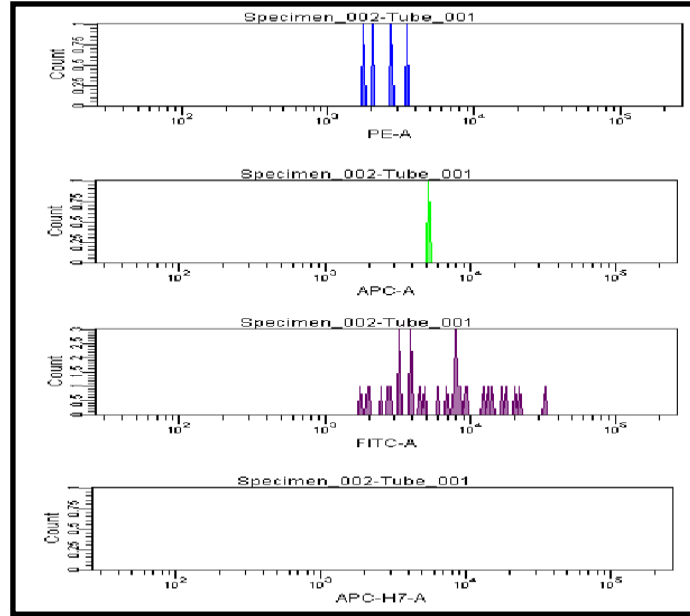
72 saatlik kültür periyodu sonrasındaki hücrelerin (P0) akım sitometri analizinde; her bir yüzey belirteci için saptanan pozitif alanlar (Grafik 3.2) ve yüzey belirteçlerinin dağılımı Tablo 3.1’de gösterilmektedir. Mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri; CD73 için % 9,5, CD90 için % 76,2 pozitif ekspresyon tespit edildi. Hematopoyetik kök hücre yüzey belirteçleri; CD34 için pozitif ekspresyon oranı oldukça düşük (% 2,4) iken, CD45 için pozitif ekspresyon saptanmadı (Tablo 3.1 ve Grafik 3.3).



Grafik 3.2: CD73, CD90, CD34 için ve CD45 için tekli-pozitif alanlar (P0). (Q1; CD73 için (A), Q1-1; CD90 için (B), Q1-2; CD34 için (C) ve Q1-3; CD45 için (D) tekli-pozitif alanı göstermektedir.)

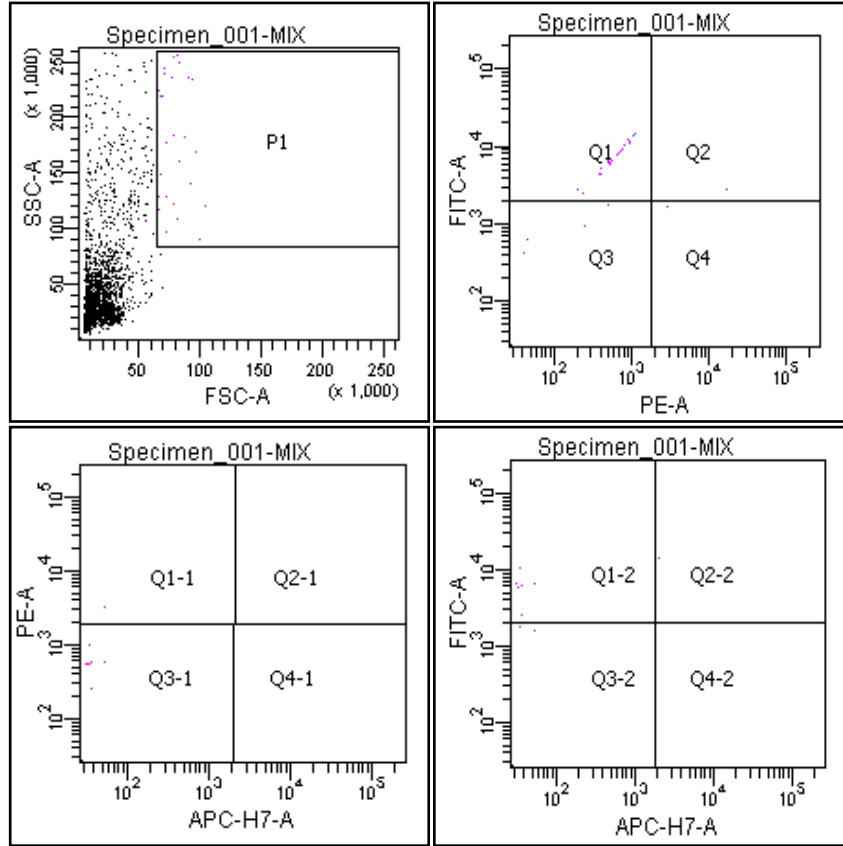
Tube: Tube_001			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	2,034	###	100.0
P1	42	2.1	2.1
Q1	4	9.5	0.2
Q2	2	4.8	0.1
Q3	32	76.2	1.6
Q4	4	9.5	0.2
Q1-1	32	76.2	1.6
Q2-1	5	11.9	0.2
Q3-1	4	9.5	0.2
Q4-1	1	2.4	0.0
Q1-2	1	2.4	0.0
Q2-2	1	2.4	0.0
Q3-2	37	88.1	1.8
Q4-2	3	7.1	0.1
Q1-3	0	0.0	0.0
Q2-3	1	2.4	0.0
Q3-3	36	85.7	1.8
Q4-3	5	11.9	0.2

Tablo 3.1: 72 saatlik kültür sonrası akım sitometri analizinde yüzey belirteçleri için ekspresyon düzeylerinin dağılımı.



Grafik 3.3: Mezenkimal ve hematopoietik kök hücre yüzey belirteçleri ekspresyon düzeyi (P0). (CD73: PE, CD34: APC, CD90: FITC ve CD45: APC-H7 ile eşleştirilmiştir.)

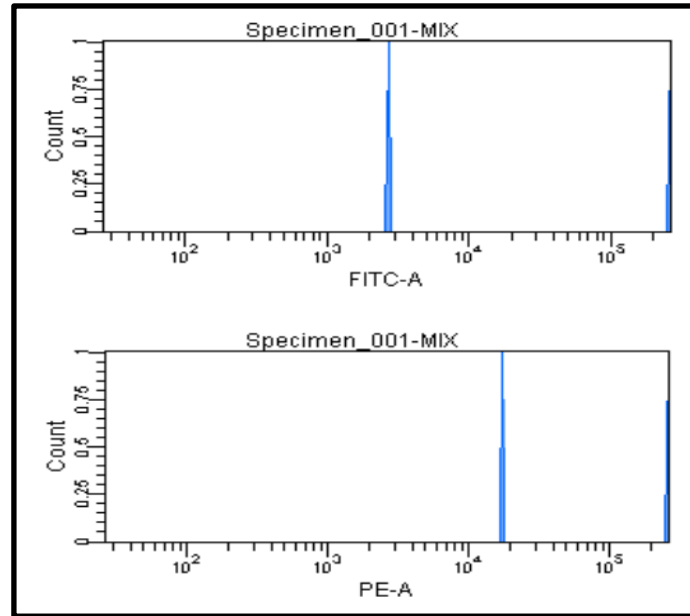
Mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri; CD73 ve CD90 için ikili ekspresyon alanları belirlendi (Grafik 3.4) ve CD73 + CD90 double-pozitif ekspresyon düzeyi % 7,1 olarak tespit edildi (Tablo 3.2 ve Grafik 3.5).



Grafik 3.4: CD73 ve CD90 için belirlenen ikili ekspresyon alanları (P0).
(Q2; CD73 + CD90 double-pozitif alanı göstermektedir.)

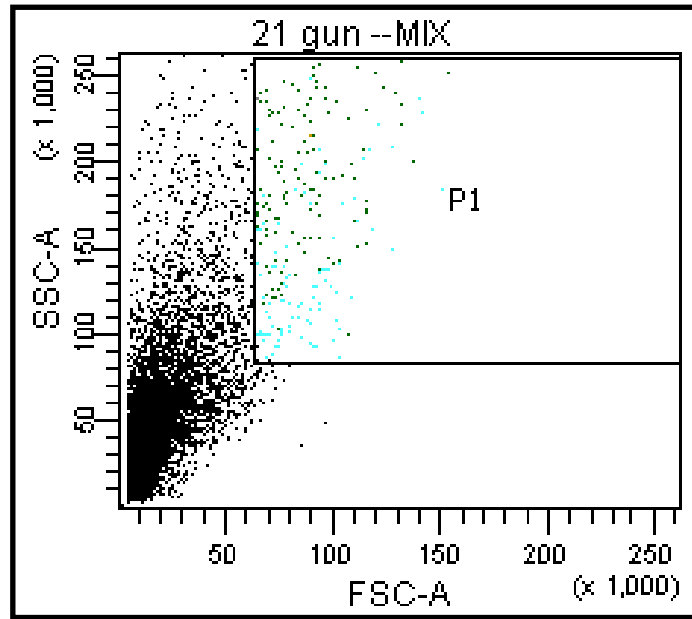
Tube: MIX			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	2,000	###	100.0
P1	28	1.4	1.4
Q1-1	3	10.7	0.2
Q2-1	0	0.0	0.0
Q3-1	24	85.7	1.2
Q4-1	1	3.6	0.0
Q1	21	75.0	1.0
Q2	2	7.1	0.1
Q3	4	14.3	0.2
Q4	1	3.6	0.0
Q1-2	22	78.6	1.1
Q2-2	1	3.6	0.0
Q3-2	5	17.9	0.2
Q4-2	0	0.0	0.0

Tablo 3.2: CD73 + CD90 double-pozitif ekspresyon düzeyi (P0). (Q2: % 7,1'dir)

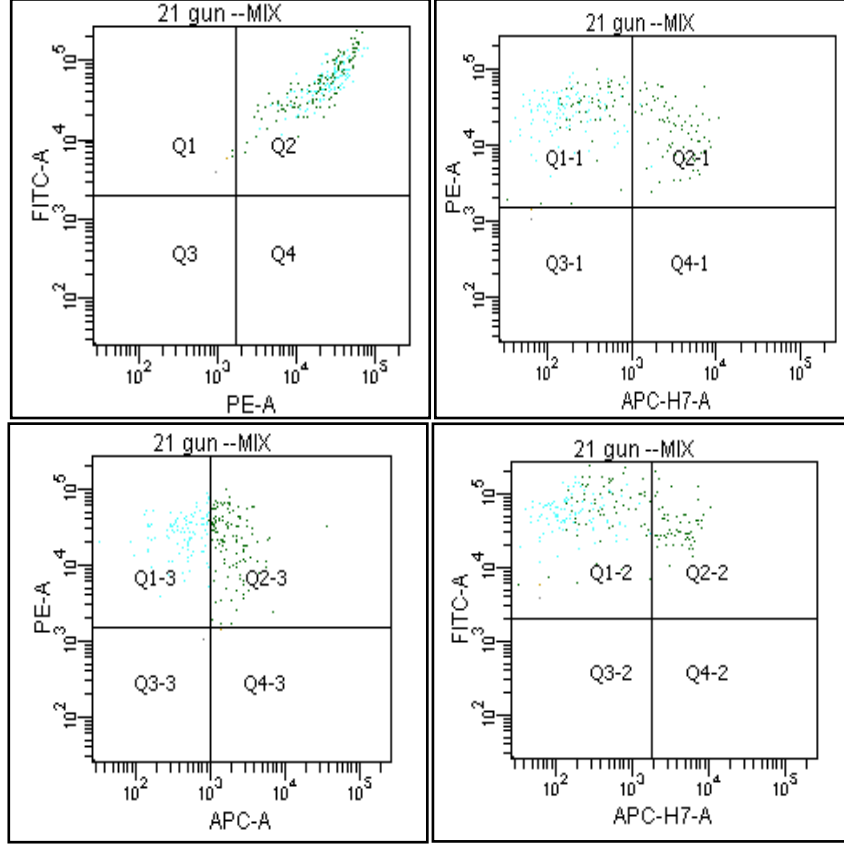


Grafik 3.5: Mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri ekspresyon düzeyi (P0). (CD90: FITC, CD73: PE ile eşleştirilmiştir.)

21 günlük kültür periyodu sonrası hücrelerin (P1) akım sitometri analizinde belirlenen alan Grafik 3.6'da gösterilmektedir. İkili ekspresyon alanları incelendiğinde (Grafik 3.7); CD73 + CD90 double-pozitif ekspresyon düzeyinin seçici hücre proliferasyonu sonucu artış göstererek % 98,3 olduğu tespit edildi (Tablo 3.3 ve Grafik 3.8).



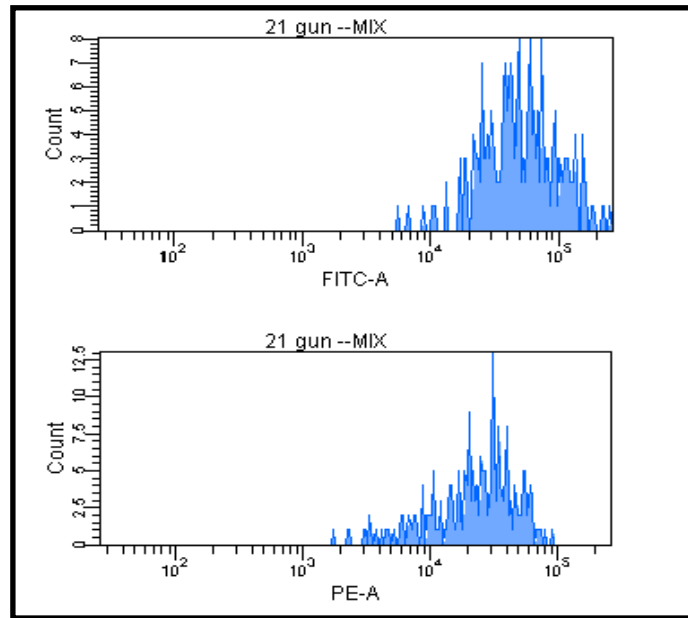
Grafik 3.6: 21 günlük kültür periyodu hücrelerinin (P1) akım sitometri analizi için FSC ve SSC diyagramında belirlenen alan.



Grafik 3.7: 21 günlük kültür hücrelerinin (P1) yüzey belirteçleri için ikili ekspresyon alanları.

Tube: MIX			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	###	100.0
P1	232	2.3	2.3
Q1-1	154	66.4	1.5
Q2-1	76	32.8	0.8
Q3-1	2	0.9	0.0
Q4-1	0	0.0	0.0
Q1	4	1.7	0.0
Q2	228	98.3	2.3
Q3	0	0.0	0.0
Q4	0	0.0	0.0
Q1-2	170	73.3	1.7
Q2-2	62	26.7	0.6
Q3-2	0	0.0	0.0
Q4-2	0	0.0	0.0
Q1-3	103	44.4	1.0
Q2-3	127	54.7	1.3
Q3-3	1	0.4	0.0
Q4-3	1	0.4	0.0

Tablo 3.3: CD73 + CD90 double-pozitif ekspresyon düzeyi (P1). (Q2: % 98,3'dür.)

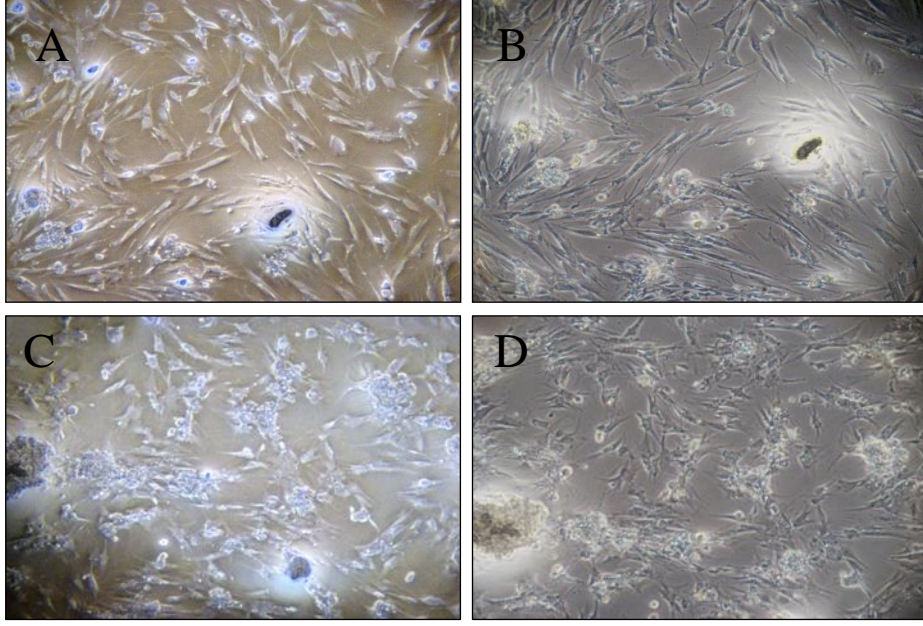


Grafik 3.8: Mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri ekspresyon düzeyi (P1). (CD90: FITC, CD73: PE ile eşleştirilmiştir)

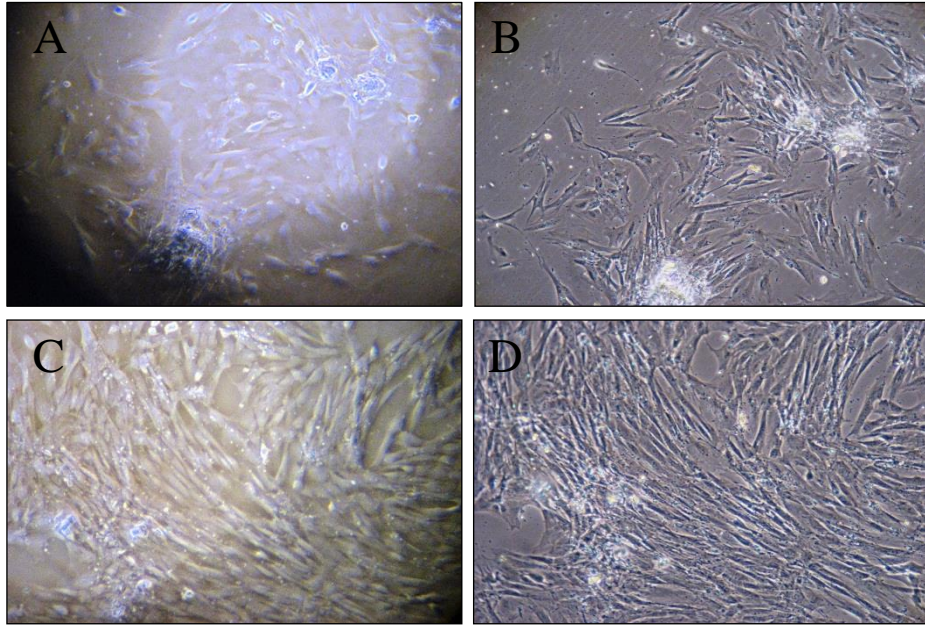
3.3. İnsan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Odontojenik Farklılaşma Potansiyeli

3.3.1. Morfolojik Özellikleri

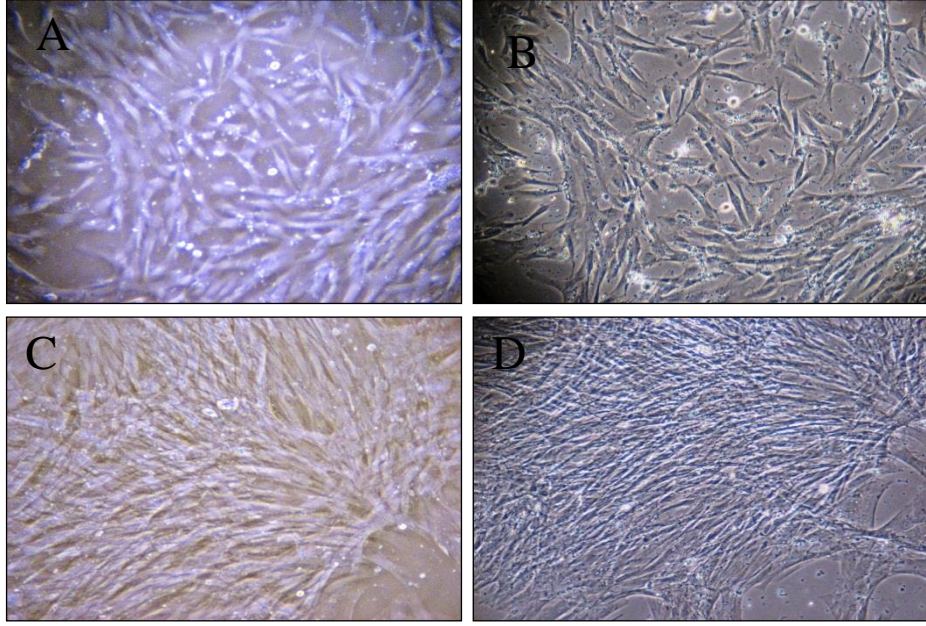
İnsan yirmi yaş diş pulpasından izole edilen ve odontojenik farklılaştırma yapılması hedeflenen hücrelerin morfolojik özellikleri, 7, 14 ve 21 günlük kültür süresi boyunca inverted mikroskopta (Olympus, Tokyo, Japonya) incelenerek sadece mezenkimal kök hücre farklılaştırma besi ortamı uygulanan kontrol grubuna ait görüntülerle karşılaştırıldı. Birincil kültürün ilk günlerinde gözlenen iğ şeklindeki ve fibroblast benzeri hücrelerin, sonraki günlerde koloniler oluşturmaya başladığı, koloni oluşumu ve hücre yoğunluğunun odontojenik farklılaşması uyarılan grupta 7. günden itibaren kontrol grubuna oranla daha belirgin şekilde artış gösterdiği belirlendi (Resim 3.4, 3.5 ve 3.6).



Resim 3.4: 7. günde hücre sayısındaki artış ve koloni oluşumu odontojenik farklılaştırma grubunda (C, D), kontrol grubuna göre (A, B) daha fazladır (x100).



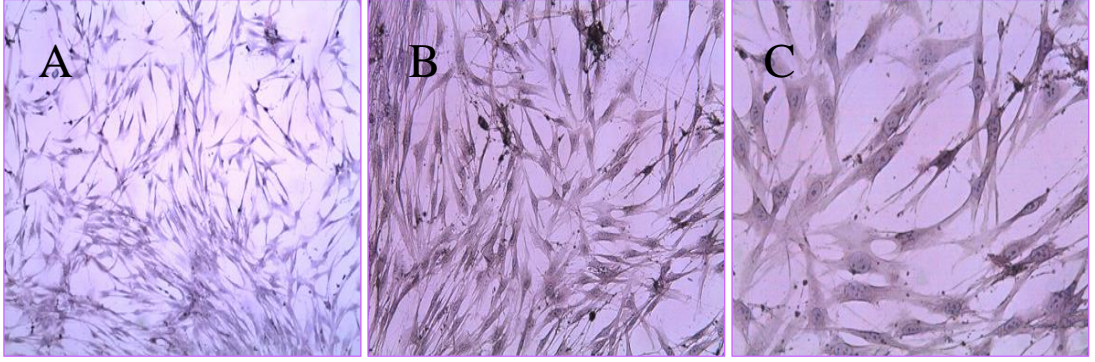
Resim 3.5: 14. günde hücre yoğunluğu yüksek seviyede; koloni formasyonu odontojenik farklılaştırma grubunda (C, D) kontrol grubuna göre (A, B) daha yoğun (x100).



Resim 3.6: 21. günde yüzey hücrelerle kaplı (konfluent); odontojenik farklılaştırma grubundaki (C, D) girift yapı dikkat çekici, her iki grupta da pasaj için uygun dönem (x100).

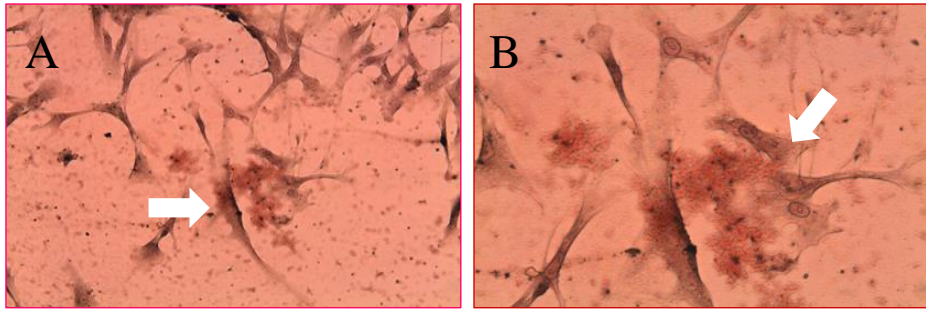
3.3.2. Histolojik İnceleme

Odontojenik farklılaşması uyarılan insan dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin, bu uyarıya yanıt verdikleri ve morfolojik olarak odontoblast benzeri hücrelere farklılaştıkları H&E boyama ile gözlendi (Resim 3.7).

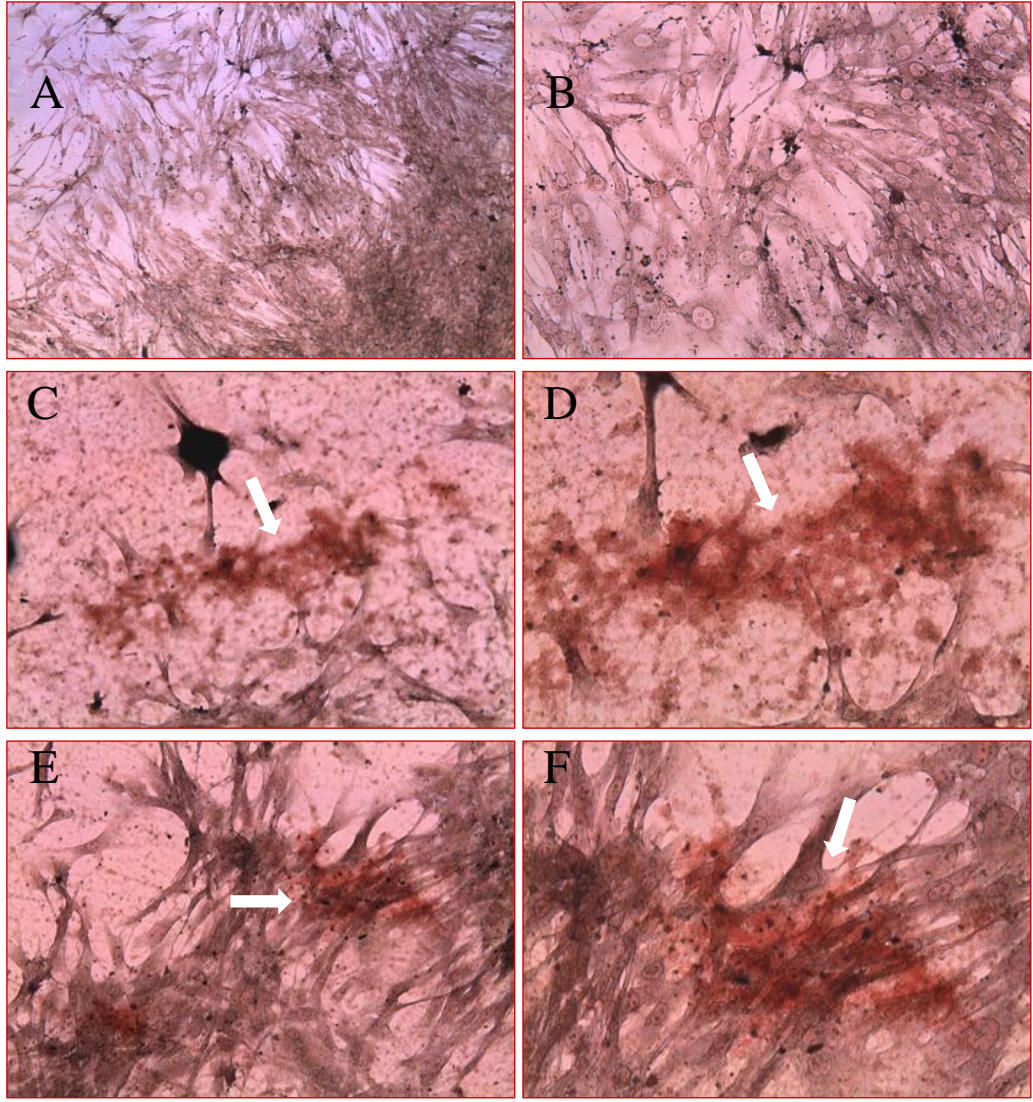


Resim 3.7: Odontoblast benzeri hücrelerin (P1, 2. hafta) H&E boyama sonrası morfolojik görüntüleri (A; x10, B; x20 ve C; x40 orijinal büyütme).

Kültürün 4. haftasından itibaren, Alizarin Red ile yapılan histokimyasal boyamalar sonucunda odontojenik farklılaşmanın göstergesi olan mineralizasyon odaklarının oluştuğu (Resim 3.8) ve kültürün ilerleyen dönemlerinde bu mineralizasyon alanlarında artış meydana geldiği saptandı (Resim 3.9).



Resim 3.8: Odontojenik farklılaşma uyarılan grupta (P1, 1. hafta) Alizarin Red boyama sonrası izlenen nodüler mineralizasyon odakları (okla gösterilmiştir) (A; x20, B; x40 orijinal büyütme).



Resim 3.9: Sadece mezenkimal kök hücre besi ortamında kültüre edilmiş olan kontrol grubu hücrelerinde (P1, 2. Hafta) Alizarin Red boyama sonrası mineralizasyon alanları izlenmezken (A; x20, B; x40 orijinal büyütme), odontojenik farklılaşma uyarılan grupta (P1, 2. Hafta) mineralizasyon alanlarındaki (okla gösterilmiştir) artış (C ve E; x20, D ve F; x40 orijinal büyütme) izlenmektedir.

3.3.3. RT-PCR Sonuçları

7, 14 ve 21 günlük kültür periyotları sonrasında gerçekleştirilen RT-PCR analizi sonucu beş gen için (DMP1, DSPP, enamelysin/MMP20, Phex ve β aktin) kontrol ve deney gruplarında elde edilen Ct ve Δ Ct değerleri Tablo 3.4, 3.5 ve 3.6'da gösterilmiştir. Bu değerlere göre hesaplanan $\Delta\Delta$ Ct değerleri ve katlı değişim oranı Tablo 3.7'de gösterilmiştir.

	7 gün (Kontrol) Ct	7 gün (Deney) Ct	7 gün (Kontrol) Δ Ct	7 gün (Deney) Δ Ct
β aktin	21,80	19,81		
DSPP	28,29	29,7	6,49	9,89
DMP1	33,10	30,80	11,3	10,99
MMP20	30,96	28,8	9,16	8,99
Phex	30,77	29,6	8,97	9,79

Tablo 3.4: 7 Günlük kültür periyodu sonunda gerçekleştirilen RT-PCR analizi sonucu deney ve kontrol gruplarında beş gen için elde edilen Ct ve Δ Ct değerleri.

	14 gün (Kontrol) Ct	14 gün (Deney) Ct	14 gün (Kontrol) Δ Ct	14 gün (Deney) Δ Ct
β aktin	17,67	18,25		
DSPP	28,91	29,77	11,24	11,52
DMP1	30,41	30,67	12,74	12,42
MMP20	26,58	27,10	8,91	8,85
Phex	27,47	28,55	9,8	10,3

Tablo 3.5: 14 Günlük kültür periyodu sonunda gerçekleştirilen RT-PCR analizi sonucu deney ve kontrol gruplarında beş gen için elde edilen Ct ve Δ Ct değerleri.

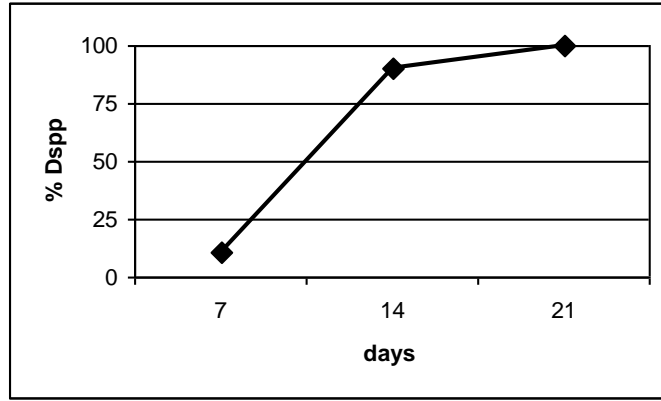
	21 gün (Kontrol) Ct	21 gün (Deney) Ct	21 gün (Kontrol) Δ Ct	21 gün (Deney) Δ Ct
β aktin	17,08	17,76		
DSPP	27,83	28,64	10,75	10,88
DMP1	31,01	31,32	13,93	13,56
MMP20	25,88	26,10	8,8	8,34
Phex	29,29	29,13	12,21	11,37

Tablo 3.6: 21 Günlük kültür periyodu sonunda gerçekleştirilen RT-PCR analizi sonucu deney ve kontrol gruplarında beş gen için elde edilen Ct ve Δ Ct değerleri.

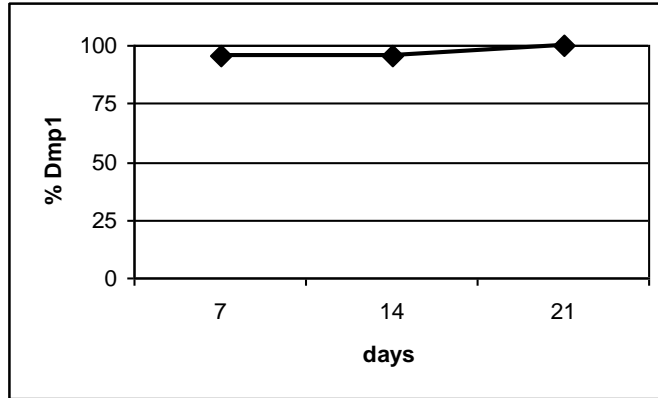
		$\Delta\Delta Ct$	Katlı değişim (fold change)	%
DSPP	7	3,4	0,095	10,39
	14	0,28	0,823	90,04
	21	0,13	0,914*	100
DMP1	7	-0,31	1,239	95,89
	14	-0,32	1,248	95,59
	21	-0,37	1,292*	100
MMP20	7	-0,17	1,125	81,81
	14	-0,06	1,042	75,78
	21	-0,46	1,375*	100
Phex	7	0,82	0,566	31,62
	14	0,5	0,707	39,49
	21	-0,84	1,790*	100

Tablo 3.7: Deney grubu için 7, 14 ve 21 günlük kültür periyotları sonrasında kontrol grubuna göre hesaplanan $\Delta\Delta Ct$ değerleri ve katlı değişim oranları.
(* En Yüksek değer % 100 olarak kabul edilir.)

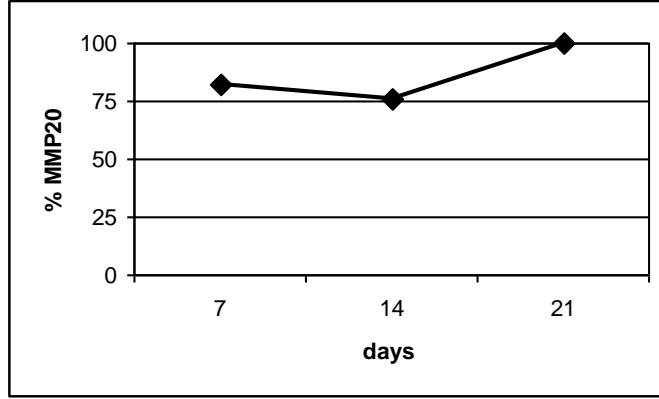
Mine ve dentin matris komponentleri için insan-spesifik transkriptlerinden; DSPP (Grafik 3.9), DMP1 (Grafik 3.10), enamelysin/MMP20 (Grafik 3.11) ve Phex (Grafik 3.12) ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna oranla odontojenik farklılaşma uyarılan deney grubunda artış gösterdiği saptandı.



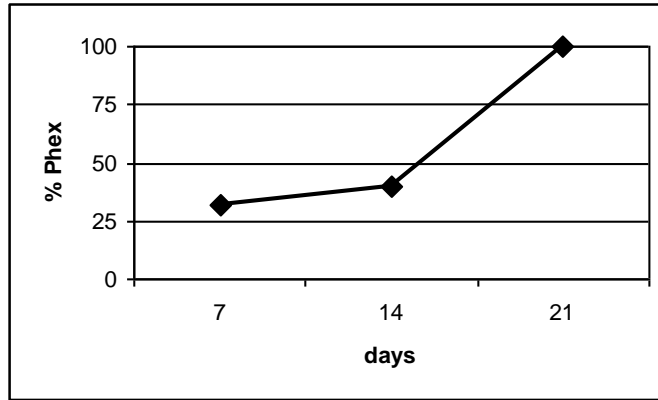
Grafik 3.9: DSPP'nin 7, 14 ve 21 günlük kültür periyotlarında ekspresyon düzeyindeki artış oranı.



Grafik 3.10: DMP1'in 7, 14 ve 21 günlük kültür periyotlarında ekspresyon düzeyindeki artış oranı.



Grafik 3.11: Enamelysin/MMP20'nin 7, 14 ve 21 günlük kültür periyotlarında ekspresyon düzeyindeki artış oranı.

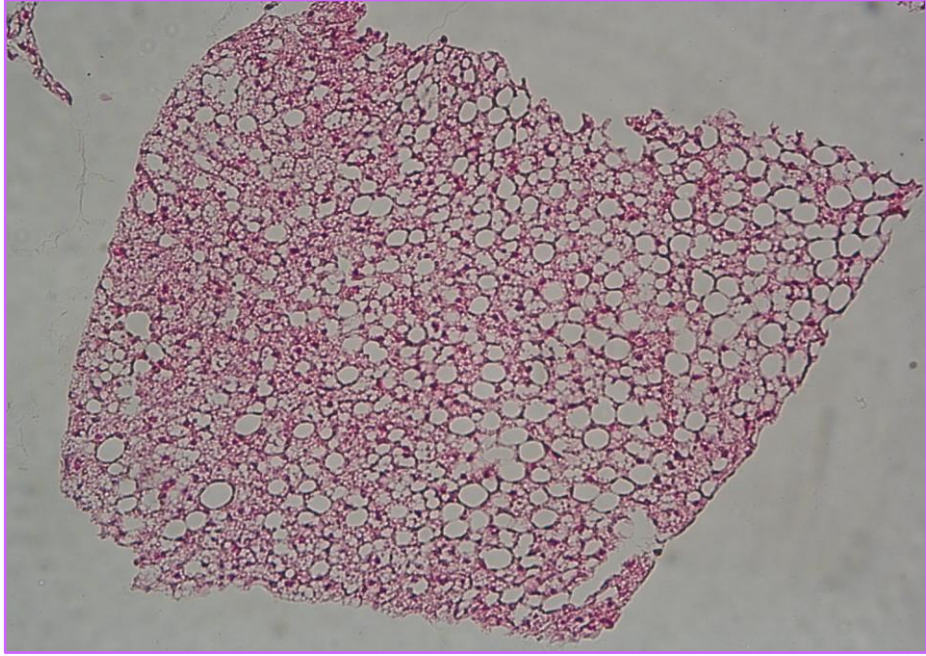


Grafik 3.12: Phex'in 7, 14 ve 21 günlük kültür periyotlarında ekspresyon düzeyindeki artış oranı.

3.4. İnsan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Transplantasyonu

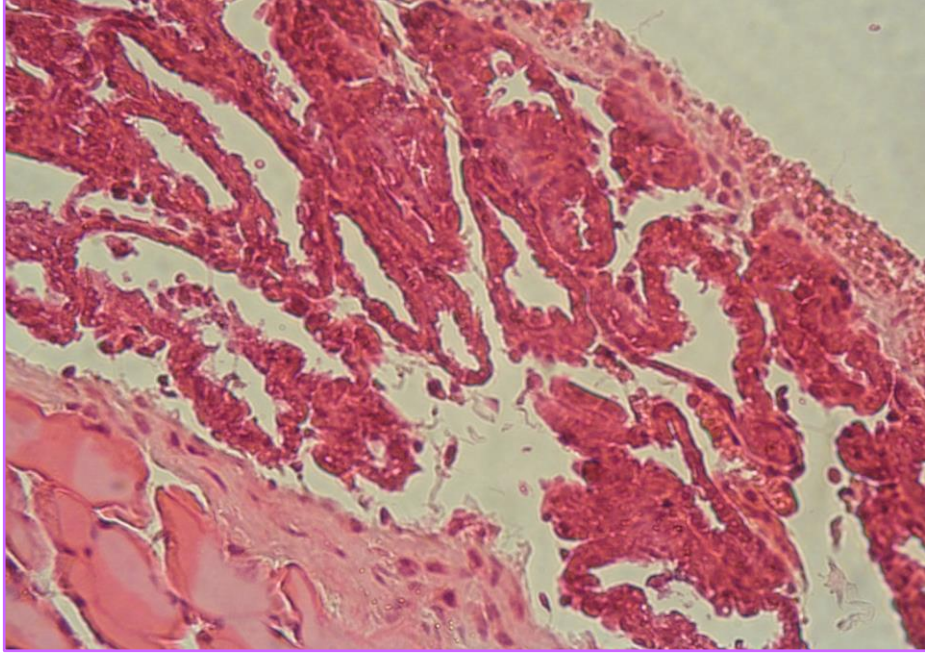
3.4.1. Histolojik İnceleme

6 haftalık transplantasyon süresi sonrasında 40 mg HA/TCP'nin hücresiz olarak transplante edildiği negatif kontrol grubunda taşıyıcının granüllü yapısı H&E boyama ile gösterildi (Resim 3.10).

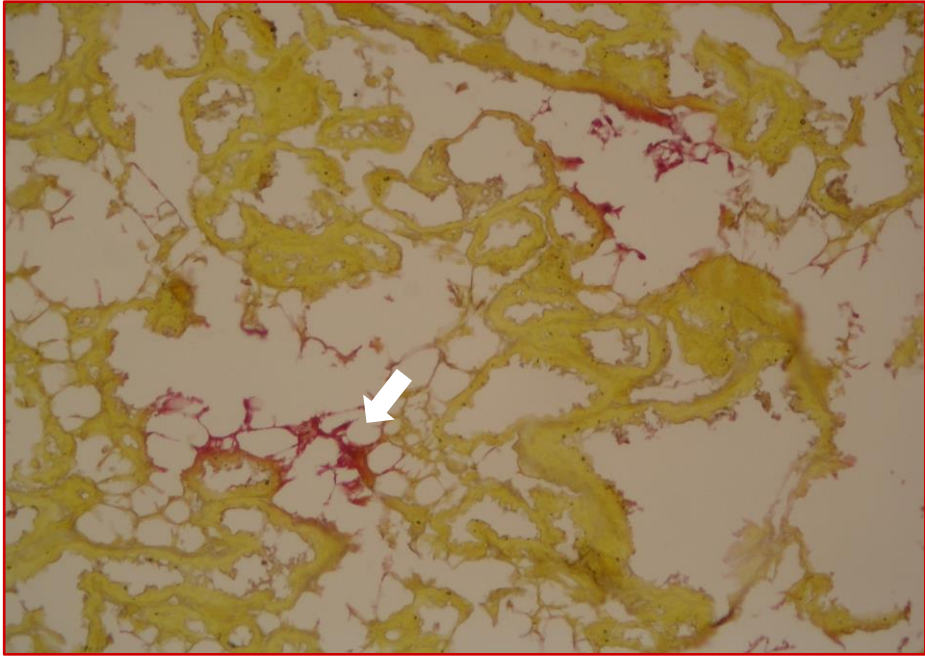


Resim 3.10: Taşıyıcı materyalin granüllü yapısı (H&E boyama, x20).

Yalnızca mezenkimal kök hücre besi ortamında çoğaltılan (-) gruba ait histojik kesitlerde bağ dokusu hücrelerinde artış ile birlikte granülasyon benzeri bir doku oluşumu (Resim 3.11) ve hafif düzeyde mineralizasyon saptandı (Resim 3.12).

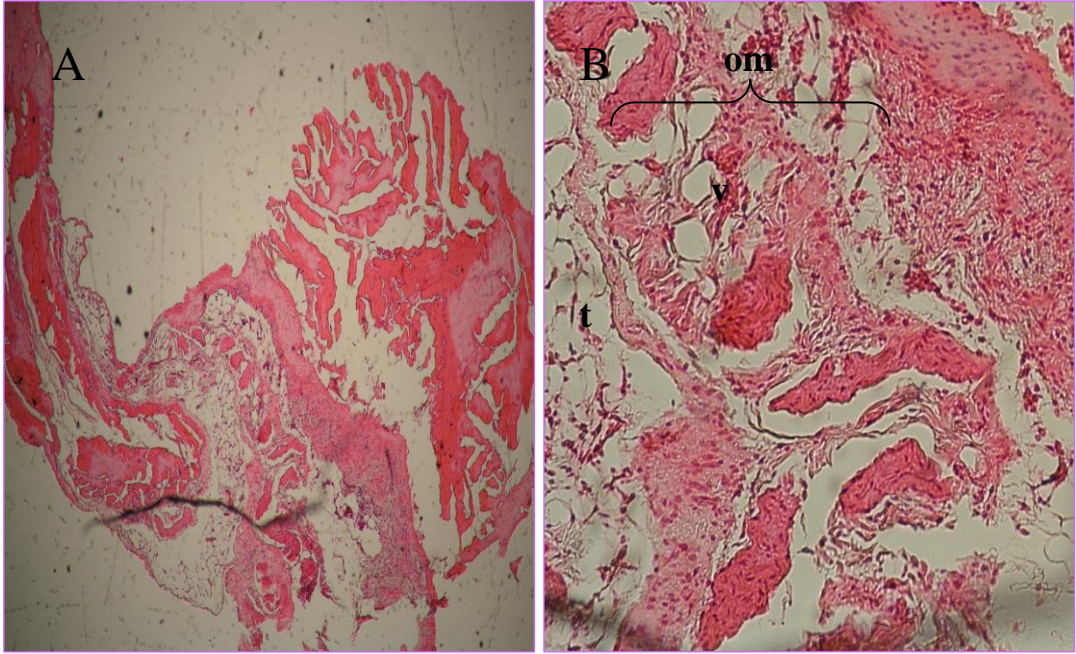


Resim 3.11: 6 haftalık (-) grup transplantlardan alınan kesitin H&E boyama sonrası görüntüsü (x20).

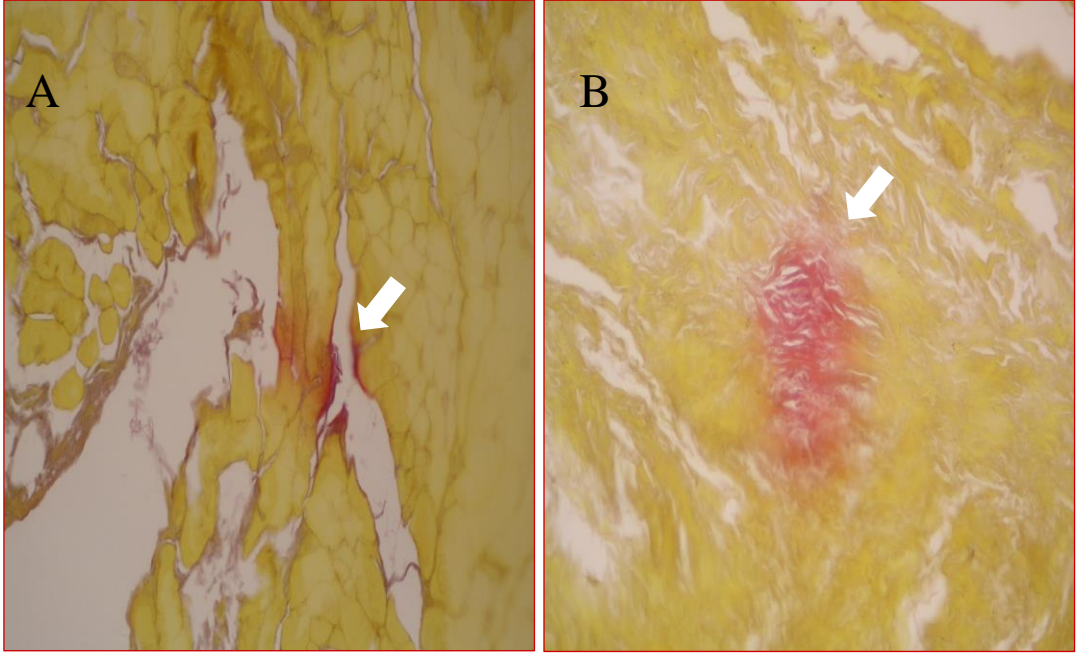


Resim 3.12: 6 haftalık (-) grup transplantlardan alınan kesitin Alizarin Red boyama sonrası görüntüsü (x20). (Sınırlı bir alanda saptanan mineralizasyon odağı okla gösterilmektedir.)

Odontojenik farklılaşmanın uyarıldığı (+) gruba ait kesitlerde ise vaskülarizasyonun arttığı, odontoblast benzeri hücre yoğunluğunda artış ve doku organizasyonu ile birlikte skaffold boşluklarının dolmaya başladığı ve hücre kompleksinde osteo-dentin benzeri bir matris oluştuğu (Resim 3.13) gözlemlendi. Mineralizasyon alanlarının ise (-) gruba göre daha yoğun olduğu (Resim 3.14) belirlendi.



Resim 3.13: 6 haftalık, odontojenik farklılaştırma (+) grubundaki transplanteden alınan kesitin H&E boyama sonrası görüntüsü. (A: x4, B: x20, t: taşıyıcı, v: vasküler yapı, om: osteodentin matris)



Resim 3.14: 6 haftalık, odontojenik farklılaştırma (+) grubundaki transplanteden alınan kesitin Alizarin Red boyama sonrası görüntüsü (A: x20, B: x40). (Mineralizasyon alanı okla gösterilmiştir.)

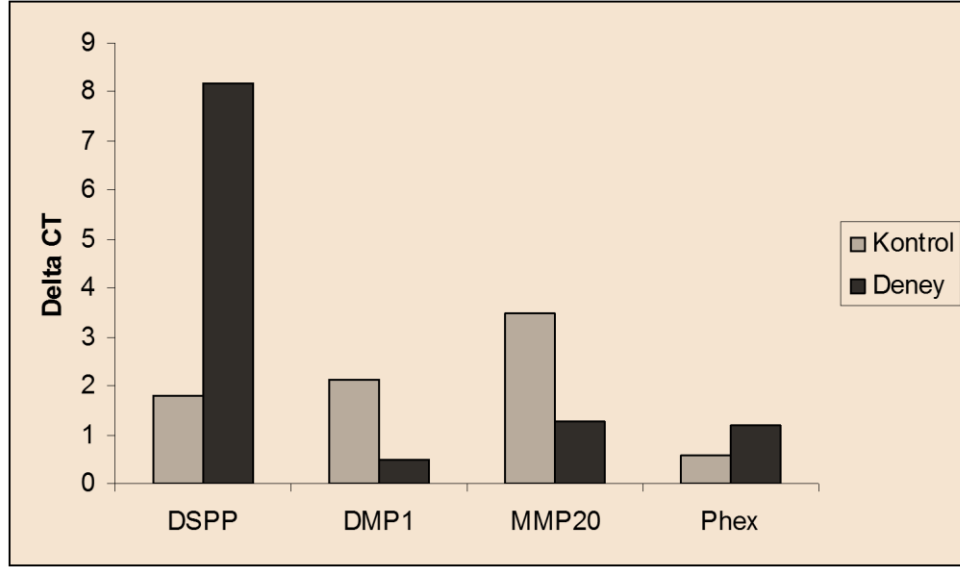
3.4.2. RT-PCR Sonuçları

6 haftalık transplantasyon süresi sonrasında gerçekleştirilen RT-PCR analizi sonucu beş gen için (DMP1, DSPP, enamelysin/MMP20, Phex ve β aktin) kontrol ve deney gruplarında elde edilen Ct ve Δ Ct değerleri Tablo 3.8’de gösterilmiştir.

	Kontrol Ct	Deney Ct	Kontrol Δ Ct	Deney Δ Ct
β aktin	32,97	33,17	-	-
DSPP	34,75	41,36	1,78	8,19
DMP1	35,09	32,66	2,12	-0,51
MMP20	36,44	34,42	3,47	1,25
Phex	33,54	34,37	0,57	1,20

Tablo 3.8: Deney (+) ve kontrol (-) grubu için 6 haftalık transplantasyon süresi sonrasında elde edilen Ct ve Δ Ct değerleri.

Mine ve dentin matris komponentleri için insan-spesifik transkriptlerinden; odontojenik farklılaşma uyarılan deney grubunda DMP1 ve enamelysin/MMP20’ nin ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna oranla farklılık göstermezken, Phex ve DSPP ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna göre artış saptadı (Grafik 3.13). Özellikle DSPP ekspresyon seviyesinde kontrol grubuna oranla yaklaşık 4 kat artış belirlendi.



Grafik 3.13: 6 haftalık transplantasyon süresi sonrasında kontrol grubuna oranla odontojenik farklılaşma uyarılan deney grubunda mine ve dentin matris komponentleri için insan-spesifik transkriptlerinin ekspresyon düzeyindeki değişim.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA

Kök hücreler; hasar gören bir dokunun veya organın biyolojik işlevlerinin yerine getirilmesi ve tedavi edilmesini amaçlayan rejeneratif tıp alanındaki hücre esaslı tedavilerde kullanılabilecek en önemli biyolojik materyallerdir (15, 93). Hücre esaslı tedaviyi hedefleyen *in vitro* ve *in vivo* deneysel çalışmalarda, embriyonik kök hücreler veya çeşitli doku ve organlardan elde edilen somatik kök hücreler kullanılmaktadır. Ancak; insan kaynaklı embriyonik kök hücrelerin elde edilmesi ve tedavide kullanılmasına yönelik devam etmekte olan etik tartışmalar ve teratom oluşma riski bu hücrelerin kullanılmasını engelleyici unsurlardır (68, 141, 216, 218). Bu nedenle kök hücre çalışmalarında; kolay elde edilebilir bir kaynak olmaları, yüksek çoğalma kapasiteleri ve teratom oluşturma olasılıklarının az olması gibi özellikleri nedeniyle mezenkimal kök hücreler tercih edilir hale gelmiştir (140, 163, 208). Çalışmamızda söz konusu avantajları sebebiyle ‘dental pulpa kök hücresi’ olarak tanımlanan mezenkimal kök hücrelerin kullanımı tercih edildi. Tüm gönüllü insan araştırmalarında olduğu gibi bu alanda da etik kurallar temel koşul olduğundan çalışmamız kapsamında; Helsinki Deklarasyonu prensiplerine uygun şekilde etik kurul onayı ve hastalardan ‘Bilgilendirilmiş onam’ alındı.

Farklı kaynaklardan elde edilebilen mezenkimal kök hücreler; plastik kültür kaplarına yapışma, spesifik bazı yüzey antijenleri taşıma ve çok yönlü

farklılaşabilme gibi birçok ortak özellik taşımaktadır (9, 31, 45, 75, 156, 159, 216). Bu hücrelerin biyolojik ve fonksiyonel özellikleri ise; izole edildikleri bölge, buldukları niş koşulları ve organizmadaki ihtiyaç durumuna göre değişiklik göstermektedir (7, 100, 176, 226, 240). Spesifik bir dokunun onarımı için o bölgeden elde edilen kök hücrelerin kullanımı avantaj sağlamaktadır. Örneğin çeşitli diş dokularından izole edilen dental-doku kökenli kök hücreler pek çok doku tipine kaynaklık edebilir, ancak odontojenik farklılaşma potansiyelleri daha yüksektir (7, 63, 79, 80). Odontoblastlara farklılaştıkları bilinen dental pulpa kök hücrelerinin kültür koşullarında kendini yenileme özellikleri ve farklılaşabilme yetenekleri korunmakta ve bu özellikleri sayesinde söz konusu hücreler kök hücre transplantasyonu içeren tedavilerde ve doku rejenerasyonunda önemli kaynaklardan birini oluşturmaktadır (63, 174, 182). Buradan hareketle odontojenik farklılaşmayı hedef alan tez çalışmamızda kök hücre kaynağı olarak; gömülü yirmi yaş diş çekimi sonrası elde edilen dental pulpa dokusu tercih edildi.

Çalışmamızda; çekim endikasyonunun sıklığı, kolay elde edilebilir olmaları ve gelişimin erken döneminde elde edildiklerinde pulpa dokusu açısından zengin olduklarının (62, 64, 123, 188) bilinmesi nedeniyle kök formasyonu henüz tamamlanmamış gömülü yirmi yaş dişleri kullanıldı. Genç donörlerden elde edilen hücrelerin kültür periyodunda daha iyi çoğalma potansiyeli ve daha uzun yaşam süresine sahip oldukları bilinmektedir (131, 189). Bu nedenle çalışmamıza 19-29 yaş arası bireyler dahil edildi. Bu sayede invaziv bir yaklaşım gerektirmeden, hücre kültüründe kolayca çoğaltılabilen mezenkimal kök hücreler izole edildi.

Hücre canlılığının korunabilmesi açısından dokunun uygun koşullarda çıkarılması, saklanması ve laboratuvar ortamına ulaştırılması önem taşımaktadır (194, 200). Çalışmamızda çekim sonrası pulpa dokusu steril şartlarda ve dokunun

ısıdan zarar görmesini engellemek için su soğutması altında çıkarılarak besi ortamı ve antibiyotik karışımından oluşan solusyon içine alındı ve en geç 24 saat içinde hücre izolasyonu gerçekleştirilmek üzere +4°C’de saklandı. Enzimatik ayırma (16, 64) ve seçici proliferasyon (4, 39, 188) teknikleri uygulanarak literatür ile uyumlu şekilde hücre izolasyonu sağlandı.

In vitro koşullarda fibroblast benzeri morfolojiye sahip dental pulpa kök hücreleri seçici yüzey adezyonu ve proliferasyonu ile plastik yüzeylere yapışmaktadır (131, 237). Çalışmamızda gömülü yirmi yaş diş pulpasından elde edilen kök hücrelerin izolasyonundan yaklaşık 1 hafta sonra fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücre sayısında artış ve koloni formasyonu başlangıcı ile bu kriterin sağlandığı belirlendi (Resim 3.2). Kültür periyodunda hücreler arası boşluğun azalarak konfluent hale geldiği dönem pasajlama zamanını temsil etmektedir (131, 194). Çalışmamızda söz konusu bu pasajlama zamanının hücrelerin neredeyse tüm yüzeyi kaplamış olduğu yaklaşık 21. güne denk geldiği belirlendi (Resim 3.3).

Diş dokusu kaynaklı kök hücrelerin tanımlanabilmesi için çalışmalarda çeşitli mezenkimal (CD73, CD90, CD105, CD146, CD166) ve hematopoietik (CD14, CD 34, CD45, CD133) kök hücre yüzey belirteçleri analiz edilmiştir (45, 63, 64, 75, 87, 92, 94, 185, 200, 222, 237). Ancak henüz standart bir belirteç kombinasyonu mevcut değildir. Çalışmamızın akım sitometri analizi aşamasında; mezenkimal kök hücre yüzey belirteçlerinden CD73 ve CD90, hematopoietik kök hücre yüzey belirteçlerinden ise CD34 ve CD45 ekspresyon düzeyi incelendi ve insan dental pulpa, periodontal ligament ve dental folikül kaynaklı mezenkimal kök hücre karakterizasyon çalışmalarıyla (45, 63, 64, 87, 92, 94, 122, 185, 222) uyumlu sonuçlar elde edildi.

Dental pulpa dokusundan izole edilen ve kültürde çoğaltılan hücrelerin yüzey antijen analizlerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda iki çeşit kök hücre grubu tanımlanmaktadır. Birinci grubun mezenkimal kök hücreler için tanımlanmış yüzey antijenlerine (Stro-1, CD29, CD44 ve CD13) sahip olduğu, ancak hematopoietik kök hücreler için tanımlanmış yüzey antijenlerinin hiçbirini (CD34, CD45 ve CD14) eksprese etmedikleri bildirilmiştir (63, 64, 87, 94, 136). İkinci grubun ise ilk gruptan farklı olarak düşük miktarda da olsa CD34 pozitif fraksiyonu gösterebileceği belirlenmiştir (42, 108). Çalışmamızda kültürün erken evresinde (P0, 72 saat) gerçekleştirilen akım sitometri analizinde hücrelerin mezenkimal kök hücre tanımlamasına uygun olarak CD45 negatif fraksiyonunda yer aldığı, bununla birlikte % 2,4'lük CD34 pozitif hücre populasyon oranı ile yukarıda bahsedilen ikinci kök hücre grubuna dahil edilebileceği belirlendi.

CD34 pozitif ve CD45 negatif hücre populasyonlarının stromal kaynaklı olduğu ve mezenkimal kök hücre prekürsörleri içerdiği bilinmektedir (2, 151, 191, 213). ISCT kriterlerine göre mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması için CD73, CD90 ve CD105 antijeni pozitif hücre populasyon oranının % 95'in üzerinde olması gereklidir (45). Çalışmamızda kültürün erken evresinde (P0, 72 saat) CD73 ve CD90 ekspresyonlarının düşük olduğu görülürken (Grafik 3.4, Tablo 3.2), 21 günlük kültür periyodu sonrası (P1) yapılan akım sitometri analizinde hücrelerin CD73 ve CD90 için ikili pozitif ekspresyon düzeyi % 98,3 (Grafik 3.7, Tablo 3.3) olarak saptandı. *In vitro* seçici proliferasyon (çoğaltılma) öncesi dokuda, beklenildiği üzere homojen bir topluluk olmaması, stromal hücreler yanında epitel ve endotel hücre populasyonlarının bulunmasının bu durum ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda dental pulpa kök hücre içeriğinin saf olarak belirtilmesi amaçlandığından akım sitometri analizi; herhangi bir farklılaşma faktörü

eklenmeksizin sadece mezenkimal kök hücre besi ortamında çoğaltılan (farklılaşma için herhangi bir yönlendirme yapılmayan) hücre kültüründe uygulandı. Selektif hücre proliferasyonu sonucu ilk pasajı takiben elde edilen yüksek pozitif mezenkimal kök hücre yüzey belirteci oranı (% 98,3); bunların gerçek mezenkimal kök hücre olduğunun göstergesidir. Ancak izolasyon ve farklılaştırmaya yönelik işlemlerin hücre karakterizasyonuna olası etkilerinin de ileri çalışmalarla incelenmesinin gerekli olduğu ve fayda sağlayabileceği düşüncesindeyiz.

Dental pulpa dokusunda, fibroblastlar, farklılaşmamış mezenkimal hücreler ve diğer hücre tipleri (makrofajlar, lenfositler vb.) bulunmaktadır. Dental pulpa; indükleyici (diş oluşumu), şekilledirici (primer ve sekonder dentin oluşumu) ve koruyucu (reparatif dentin oluşumu) fonksiyonlara sahiptir. Dental pulpa içeriğinde bulunan çeşitli farklılaşma safhalarındaki hücre grupları diş-doku mühendisliği için potansiyel oluşturmaktadır. Bu hücre gruplarından dental pulpa progenitor/kök hücreleri, odontoblastların proliferasyon ve farklılaşmasında önemli rol oynamakta ve bu sayede odontoblastlar pulpa dokusunun iyileşme ve onarımına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca büyüme faktörleri de iyileşme ve onarım için dental pulpa hücreleri ve odontoblastlarla sinerjik etki göstermektedir (231). *In vitro* koşullarda dokudakine benzer bir ortam sağlamak için hücrelerle birlikte çeşitli biyosinyallerin oluşumunu sağlayan büyüme ve farklılaşma faktörleri kullanılmaktadır (17). Ancak kültür koşullarına ilişkin optimal ve standart bir yöntem bulunmadığından çeşitli faktörlerin etkisiyle hücre özellikleri kolayca değişim göstermektedir (37, 86, 171, 179). Bu nedenle *in vitro* ortamda tek bir molekülün veya sitokinin hücre farklılaşması üzerindeki etkisinin belirlenmesi kontrollü bir inceleme sağlamaktadır. (221). Buradan hareketle çalışmamızda pulpa hücrelerinin odontoblastik seriye farklılaşmasını düzenleyerek reparatif dentin oluşumunu indüklediği (146, 147, 188)

bilinen bir çeşit büyüme faktörünün odontojenik farklılaşmaya etkisi incelendi ve bu amaçla odontojenik besi ortamı (194) 50 ng/ml BMP2 ilavesi (84) ile modifiye edildi.

BMP2 ilavesinin odontojenik farklılaşmayı indüklediği (84, 85, 147, 148), ancak hücre kültüründe proliferasyon ve hücre sayısı üzerinde farklılık oluşturmadığı (84, 85) bildirilmiştir. Çalışmamızda ise besi ortamına BMP2 ilavesi ile odontojenik farklılaşması uyarılan dental pulpa kök hücrelerinin yoğunluk ve koloni oluşturma özelliklerinin farklılık gösterdiği ve kültür süresince kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu belirlendi (Resim 3.4, Resim 3.5 ve Resim 3.6).

Osteojenik farklılaşmaya benzer bir süreç gösteren odontojenik farklılaşmanın en önemli göstergelerinden biri mineralizasyon kapasitesindeki artış ile uyumlu kalsifiye depozitler oluşumudur (64, 84, 85, 131, 194). Söz konusu bu mineralizasyonun kültür sürecinde ikinci haftadan itibaren görülmeye başladığı ve Alizarin Red boyama ile gösterilebileceği bilinmektedir (4, 10, 64, 109, 124, 131, 194, 237). Çalışmamızda Alizarin Red ile yapılan histokimyasal boyamalar sonucunda kültürün dördüncü haftasından itibaren odontojenik farklılaşma grubunda mineralizasyon odaklarının oluştuğu (Resim 3.8) ve bu mineralizasyon alanlarının kültürün ilerleyen dönemlerinde artış gösterdiği, ancak sadece mezenkimal kök hücre besi ortamında kültüre edilmiş olan kontrol grubu hücrelerinde herhangi bir mineralizasyon göstergesi olmadığı saptandı (Resim 3.9).

Farklılaşma ve spesifik doku üretimi süresince kök hücrelerin regülasyon mekanizmasının anlaşılması açısından, özel ekstrasellüler matris yapılarının oluşum ve maturasyonunu uyarıcı faktörlerin belirlenmesi doku rejenerasyonu amacıyla söz konusu aşamaların taklit edilmesi ve kontrolü için incelenmesi gereken önemli unsurlardır (101). İnsan dental pulpa hücreleri farklılaşmada rol alan çeşitli proteinler

salgılamaktadır. DSPP, DMP1, alkalen fosfataz, kemik sialoproteini, osteokalsin ve osteopontin insan dental pulpa hücrelerinin osteojenik ve odontoblastik farklılaşmasının indikatörleri olarak kullanılmaktadır (231). Çalışmamızda 7, 14 ve 21 günlük kültür periyodu gruplarında mine ve dentin matris komponentleri için insan-spesifik transkriptlerinin ekspresyon düzeyi RT-PCR analizi ile incelendi. Odontojenik farklılaştırma besi ortamında çoğaltılan hücrelerin, odontojenik farklılaşmanın göstergesi olarak kabul edilen (64, 84, 131, 186) DSPP, DMP1, enamelysin/MMP20 ve Phex ekspresyon düzeylerinde artış olduğu saptandı. Özellikle DSPP ve Phex ekspresyon seviyelerinde, kültür periyodu süresi ile orantılı olarak düzenli artış dikkat çekmektedir (Grafik 3.9 ve Grafik 3.12).

Dentin sialoprotein ve dentin fosfoproteini; DSPP olarak bilinen gen tarafından kodlanan odontoblastlara özgü gen ürünleridir (61, 127, 173). Dentinogenezis sürecinde kollajenöz pre-dentin matris formasyonu sonrasında dentin mineralizasyonunun kontrolü ile ilişkili olan dentin fosfoproteini ve moleküller arasında kovalent bağ kurulmasını sağlayan dentin sialoproteini artış göstermektedir (50, 70). Çalışmamızda odontojenik farklılaştırma grubundaki hücrelerin 7, 14 ve 21 günlük periyotlarda kontrol grubuna oranla DSPP ekspresyon düzeyindeki düzenli artış dentinogenezis ve pre-dentin matris formasyonundaki artışın göstergesidir (Grafik 3.9). DSPP ifadesinin diğer genlere göre geç olması ve 21. günde en yüksek seviyeye ulaşması da odontoblastik farklılaşmanın varlığının kanıtlarından biridir.

DMP1; aynı isimli gen tarafından kodlanan, hücrel değişim, kollajen üretimi ve dentin remineralizasyonunda etkili asidik ekstrasellüler matris proteindir (12, 24). Çalışmamızda insan dental pulpa hücrelerinin odontoblastik farklılaşmasının indikatörlerinden olan DMP1 ekspresyonun belirlenmesi, kültür hücrelerinde odontoblastik farklılaşmanın varlığını ortaya koymaktadır.

Enamelysin; MM20 geni tarafından kodlanan, sekretuar safha süresince ve erken maturasyon döneminde ameloblastlar tarafından sentezlenen mine matris metalloproteazıdır (78, 96). Phex ise aynı isimli gen tarafından kodlanan, odontoblast farklılaşması sürecinde fosfat homeostazında ve dentin remineralizasyonunda rol alan bir enzimdir (175). Odontoblastlar tarafından preentin sekresyonu süresince matris metalloproteazlarının sentezi devam etmektedir (19). Kültürün 21. günde enamelysin/MMP20 ve Phex ekspresyonunun fazla olması pulpa farklılaşmasının göstergesidir (84). Enamelysin/MMP20, ancak odontoblastlar tarafından preentin sekresyonu sırasında belirlenebilir ki çalışmamızda Enamelysin/MMP20 ifadesi ortaya konmuştur.

Çalışmamızda söz konusu tüm transkriptlerindeki ekspresyon artışının tersiyer dentin formasyonu için başlangıç periyodu olarak bilinen ve çalışma tasarımında özellikle seçilen 21 günlük sürede en üst seviyede bulunması da bulgularımızı destekler şekildedir (Grafik 3.9, 3.10, 3.11 ve 3.12).

İn vitro koşullarda birbiriyle uyumlu akım sitometrik ve histokimyasal bulgular elde ederek pek çok özelliğini tanımladığımız dental pulpa kök hücrelerinin, rejeneratif diş hekimliği konsepti içinde klinik uygulama olanağına ulaştırılabilmesi açısından *in vivo* özelliklerinin belirlenmesi de önem taşımaktadır. *İn vitro* kültür sistemleri odontojenik/odontoblastik farklılaşma için temel modeli oluşturmasına rağmen, kök hücrelerin farklılaşma sonrası oluşturdukları dokunun yapısal özelliklerinin ve fonksiyonelliğinin belirlenebilmesi için *in vivo* implantasyon sistemleri gereklidir (64, 131). Bu nedenle çalışmamızın ikinci bölümünde dental pulpa kök hücrelerinin skaffold ile immun baskılanmış fare sırtına transplantasyonu gerçekleştirildi. Pasaj sayısındaki artışa paralel olarak fazla manipule edilmiş hücrelerde stres belirtileri ortaya çıkmakta; hücre yaşlanması, telomer kısalması ve

sitogenetik bozukluk gibi durumlar taklit edilen *in vivo* koşullardan sapmalara neden olmaktadır. Hücrelerdeki bu istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasını önlemek için çoğunlukla mezenkimal kök hücrelerin 3. veya 5. Pasajdan sonra kullanılması tercih edilmemektedir (128, 159, 165). Bu nedenle çalışmamızda 3. Pasajdaki dental pulpa kök hücrelerinin transplantasyonu gerçekleştirildi.

Dentin-pulpa kompleksi oluşturulmasını hedefleyen diş-doku rejenerasyonu çalışmalarında uygun bir skaffold seçimi, optimal dentin matrisi oluşumu için anahtar öğelerden biridir. Skaffold materyalinin kimyasal ve mekanik özellikleri, geometrik yapısı, hücre adezyon, proliferasyon ve farklılaşması üzerine olan etkisi, kullanım potansiyelini belirleyen özellikleridir (131, 199). HA-TCP bileşikleri maksillofasiyal cerrahide, implantolojide ve kemik defektlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan osteoindüktif materyallerdir. Söz konusu bu materyaller ‘biyolojik diş’ ve ‘dental rejenerasyon’ açısından da uygun görünmektedir (131, 199). Kemik iliğı mezenkimal kök hücre çalışmalarında kemik oluşumunu destekleme özellikleri nedeniyle ‘oste-kondüktif’ olarak nitelendirilen HA-TCP bileşiklerinin dental pulpa kök hücre çalışmaları için odonto-kondüktif olarak nitelendirilmesi ve kullanımı mümkündür (63, 64, 236). Bu nedenle çalışmamızın tranplantasyon aşamasında skaffold olarak diş hekimliğı pratiğinde yaygın bir uygulama alanına sahip olan HA/TCP kullanımı tercih edildi.

Morfojenlerin yarılanma ömrünün sınırlı olması nedeniyle bir taşıyıcı ile birlikte oldukça yüksek konsantrasyonlarda kullanılmaları gerekmektedir (148). İdeal bir taşıyıcının henüz bulunamamış olması ve yüksek maliyetler, bu faktörlerin direkt olarak uygulanması yerine, bir gen terapisi ile dokunun bu morfojenleri üretmesini sağlamanın daha istenilen bir tedavi yaklaşımı olduğunu düşündürmektedir, ancak bu kompleks sistemin oluşturulması zordur (147). Bu konuya ilişkin karmaşık olmayan

alternatif yöntemlerin gerekli olduğu görülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda odontojenik farklılaştırma için seçilen morfojen (BMP2) odontojenik besi ortamına 50 ng/ml konsantrasyonunda ilave edilerek kültürde hücre-morfojen kompleksi oluşturuldu ve 40 mg HA-TCP skaffold ile birleştirilerek transplantasyon gerçekleştirildi.

Çalışmamızda HA/TCP hüresiz olarak transplante edildiğinde (negatif kontrol grubu) herhangi bir hüresel etkileşim, doku organizasyonu ve skaffold-doku bütünleşmesinin gerçekleşmediği gözlemlendi (Resim 3.10). Odontojenik rejenerasyon için hücrenin temel teşkil ettiğini (8, 14, 131) bu durum ile doğrulamak mümkündür. Uyguladığımız teknikle (-) grup transplantlarda sadece bağ dokusu hücrelerinde artış ve granülözasyon benzeri doku oluşumu (Resim 3.11) gözlemlendi. (+) grup transplantlarda ise odontoblast benzeri hücre yoğunluğu ve vaskülarizasyonda artış, skaffold-doku bütünleşmesi ve hüresel aktivasyon sonucu daha önceki çalışmalarla uyumlu (63, 64, 236, 238) osteo-dentin benzeri matris oluşumu (Resim 3.13) gözlemlendi. Osteojenik ve odontojenik farklılaşmada ekstrasellüler matris ve konnektif doku oluşumuna paralellik gösterdiği bilinen (16, 236) mineralizasyonun da (+) grup transplantlarda daha yoğun olduğu belirlendi (Resim 3.14).

Oluşan matris yapısının odontojenik karakteristiği RT-PCR analizi sonuçları ile doğrulanarak transplantasyon sonrasında da dental pulpa kök hücrelerini *in vivo* koşullarda inceleyen çalışmalarla (63, 64, 236, 237, 238) uyumlu bulgular elde edildi. Çalışmamızda kontrol grubuna göre odontojenik farklılaşmanın uyarıldığı grupta DSPP ekspresyonunun yaklaşık 4 kat daha fazla belirlenmesi (Grafik 3.13), odontoblastik farklılaşmanın varlığını açıkça ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda erken dönemdeki değişim ve etkiyi görebilmek açısından transplantasyon süresi literatür doğrultusunda (16, 63, 64, 236) 6 hafta olarak belirlendi. Ancak bundan sonraki araştırmalarda transplantasyon sonrası incelemenin daha uzun zaman aralıklarında gerçekleştirilmesinin, diğer transkriptlerindeki ekspresyon değişiminin de açıkça gösterilmesi ve optimal doku oluşum zamanlarının belirlenmesi açısından fayda sağlayacağı görüşündeyiz.

Ekstrasellüler matris oluşumu doku rejenerasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Çalışmamızın *in vitro* ve *in vivo* aşamalarında odontojenik farklılaşmanın uyarıldığı gruplarda hem mine hem de dentin ile ilişkili matris komponentlerinin RT-PCR ile belirlenen ekspresyonu, embriyonal gelişimi birlikte gerçekleşen bu iki dokunun rejenerasyon sürecinin de birlikte ve paralel ilerleyeceğini düşündürmektedir.

5. BÖLÜM

SONUÇ

İnsan gömülü yirmi yaş dişlerinden elde edilen postnatal pulpa; plastik adherens gösteren, yüksek proliferasyon kapasitesi ve mezenkimal kök hücre yüzey antijenlerine sahip, indüklendiğinde çeşitli mine ve dentin spesifik transkriptlerinin ekspresyonunu gösteren ve bu özellikleri ile dental pulpa kök hücresi olarak tanımlanabilen hücreler içermektedir. Bu hücrelerin uygun *in vitro* ve *in vivo* koşullarda odontojenik farklılaşma potansiyelinin gerçekleştirilmesi mümkündür. Tek bir dişten pek çok dişin rejenerasyonunda kullanılabilir potansiyele sahip çok sayıda dental pulpa kök hücresi izole etmek ve çoğaltmak mümkündür.

Fiziksel destek gerektiren sert dokular için rijit skaffold yapıları uygundur. Mine ve dentin gibi diş sert dokularını da bu gruba dahil etmek mümkündür (49). Ancak diş organının hem sert hem de yumuşak dokudan oluşan kompleks yapısı göz önünde bulundurulduğunda skaffold olarak rijit yapılara ilaveten çoklu polimerik yapıların da araştırılması gerektiği açıktır.

Elde ettiğimiz bulgular söz konusu farklılaştırma tekniği ve taşıyıcı kompleksinin rejeneratif diş hekimliği konseptini hedef alan çalışmalarda potansiyel biyoaktif bir yöntem olarak kullanılabilirliğini göstermektedir. Ancak klinik kullanım potansiyeline ulaşabilmesi yöntemin geliştirilmesi ile mümkün olacaktır. Çeşitli moleküllerin, bileşiklerin ve hücrel faaliyetlerin dental pulpa kök

hücrelerinin proliferasyon kapasitesi ve odontojenik farklılaşmasına etkisinin incelenmesi, *in vivo* koşullarda diş dokularının oluşturulmasına yönelik çalışmaların ilerlemesi için yol katedilmesini sağlayacaktır. Dental pulpa kök hücrelerinin enflamasyon veya doku hasarı durumunda migrasyonu ve bunu takiben farklılaşması, tersiyer dentinogenezis veya rejenerasyonun ilk aşamasını oluşturmaktadır. Örneğin son dönemde pulpal fibroblastların nemosis (enflamasyon vb. durumlardaki programlı hücre nekrozu) sürecinin dental pulpa kök hücrelerinin migrasyonunu sağladığı belirlenmiştir (233). Buradan hareketle *in vitro* ve *in vivo* modellerde çeşitli molekül, bileşik ve sinyal sistemlerinin taklit edilmesi fayda sağlayacaktır.

Doku mühendisliği alanında; kök hücre biyolojisinin tam olarak anlaşılması, biyosinyaller ve farklılaşma yollarının belirlenmesi/kontrol edilmesi ve ideal skaffold üretimi gibi henüz çözümlenmemiş birtakım sorunlar mevcuttur. Deneysel başarısı pek çok çalışmada gösterilmiş olan dental pulpa kök hücrelerinin odontojenik farklılaşma potansiyelinin diş-doku mühendisliği konsepti ve ileri araştırmalar ile geliştirilerek klinik kullanım potansiyeline dönüştürülmesi, diş hekimliği alanında devrim niteliğinde ideal bir tedavi konseptinin oluşturulması açısından ümit vericidir. Bu sayede gelecekte eksoze veya ampute pulpa dokusunda sadece az bir miktarda reparatif sert doku oluşumunu indükleyebilen, kalsiyum hidroksit veya diğer materyallerle gerçekleştirilen konvansiyonel pulpa kuafajı gibi sınırlı tedavi seçeneklerine, kanal tedavisi veya dental doku ve diş kaybı gibi sorunlara alternatif çözüm oluşturabileceği görüşünderiz.

6. BÖLÜM

ÖZET

DENTAL PULPA KÖK HÜCRELERİNİN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE ODONTOJENİK FARKLILAŞMA POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ

Tez çalışmamızın amacı, dental pulpa kök hücrelerinin izolasyonu, karakterizasyonu ve odontojenik farklılaştırma sonrası *in vitro* ve *in vivo* koşullarda farklılaşma parametrelerinin tanımlanmasıdır.

Çalışmamızda kök hücre kaynağı olarak 19-29 yaş arası bireylerden gömülü yirmi yaş diş çekimi sonrası elde edilen pulpa dokusu kullanıldı. Hücreler hematopoietik ve mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri yönünden akım sitometri analizi ile incelendi ve % 98,3'lük CD73 ve CD90 ikili ekspresyon düzeyi ile mezenkimal kök hücre oldukları doğrulandı. Odontojenik farklılaştırma için kemik morfogenetik proteini 2 (BMP2) ilavesi ile modifiye edilen besi ortamı kullanıldı. Hücrelerin histolojik özellikleri incelendi ve mine-dentin matris komponentlerinin (DSPP, DMP1, enamelysin/MMP20 ve Phex) ekspresyon düzeyleri 7,14 ve 21 günlük kültür sürelerinde RT-PCR analizi ile belirlendi. Odontojenik farklılaşma sonrası mineralizasyon kapasitesinde artış ve DSPP, DMP1, enamelysin/MMP20 ve Phex düzeylerinde kültür süresi ile orantılı ekspresyon artışı belirlendi.

Çalışmamızın ikinci bölümünde dental pulpa kök hücrelerinin immun baskılanmış fare sırtına HA-TCP skaffold ile transplantasyonu gerçekleştirildi. 6 hafta sonunda odontojenik farklılaşmanın uyarıldığı grupta osteo-dentin matrisi oluştuğu belirlendi ve matris yapısının odontojenik karakteristiği histolojik inceleme ve RT-PCR analizi sonuçları ile doğrulandı.

Bulgularımız söz konusu odontojenik farklılaştırma tekniği ve taşıyıcı kompleksinin rejeneratif diş hekimliğini hedef alan çalışmalarda potansiyel biyoaktif bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak; eksiksiz bir dental doku rejenerasyonu ve klinik kullanım potansiyeline ulaşılabilmesi yöntemin geliştirilmesi ile mümkün olacaktır.

ABSTRACT

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF ODONTOGENIC DIFFERENTIATION POTENTIAL OF DENTAL PULP STEM CELLS

The aim of this study was to isolate and identify dental pulp stem cells and define the differentiation parameters after *in vivo* and *in vitro* odontogenic differentiation conditions.

Dental pulp tissue obtained from 19-29 aged individuals, after impacted third molar tooth extraction, was used as stem cell source. The cells were analysed for hematopoietic and mesenchymal clusters of differentiation with flow cytometry and determined to be mesenchymal stem cells having 98.3% CD73 and CD90 double-positive cell rate. The medium modified by the addition of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) was used for odontogenic differentiation. The histologic features were examined and expressions of enamel-dentin matrix components (DMP1, DSPP, enamelysin/MMP20 and Phex) of the cells were analysed with RT-PCR at 7, 14 and 21 culture days. The increase in mineralization capacity and DMP1, DSPP, enamelysin/MMP20 and Phex expressions proportional with culture period were determined after odontogenic differentiation.

In the second section, the dental pulp stem cells were transplanted on the back of immunocompromised mice via HA-TCP scaffold. At the end of six week period, it was determined that osteo-dentin matrix was formed in the group in which odontogenic differentiation was stimulated and the odontogenic characteristic of the matrix was confirmed by histological examination and RT-PCR analysis results.

Our findings depicted that the aforementioned odontogenic differentiation technique and scaffold complex could be used a potential bioactive method in regenerative dentistry. However, the provision of a complete dental tissue regeneration and the potential clinical usage would be possible by further developments in the technique performed.

7. BÖLÜM

KAYNAKLAR

1. Abe S, Hamada K, Miura M, Yamaguchi S. Neural crest stem cell property of apical pulp cells derived from human developing tooth. *Cell Biol Int* 2012; 36(10): 927-936 (doi: 10.1042/CBI20110506).
2. Abe S, Suzuki M, Cho KH, Murakami G, Cho BH, Ide Y. CD34-positive developing vessels and other structures in human fetuses: an immunohistochemical study. *Surg Radiol Anat* 2011; 33(10): 919-927 (doi: 10.1007/s00276-011-0854-2).
3. Abidin BM. Diş Pulpası Kök Hücrelerinin İn vitro Epitelial ve Fibroblastik Hücrelere Farklılaşması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Bornova- İzmir, 2009.
4. About I, Bottero MJ, de Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA. Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res* 2000; 258(1): 33-41.
5. About I, Laurent MD, Lendahl U, Mitsiadis TA. Nestin Expression in Embryonic and Adult Human Teeth under Normal and Pathological Conditions. *Am J Pathol* 2000; 157(1): 287-295.
6. Akgün ÖM, Polat GG, Altun C. Rejeneratif Pulpa Tedavilerinde Doku Mühendisliği Uygulamaları. *Ado Klinik Bilimleri Derg* 2008; 2: 238-244.

7. Akintoye SO, Lam T, Shi S, Brahim J, Collins MT, Robey PG. Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. *Bone* 2006; 38: 758-768.
8. Akman AC. Periodontal doku mühendisliği uygulamaları için kitosan temelli doku iskelelerinin üretilmesi, kemik morfojenik protein-2 (BMP-2), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), deksametazon (DEX) salım kinetiklerinin ve in vitro etkinliklerinin tayini. Hacettepe Üniv Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara, 2007.
9. Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev* 2004; 13: 436-448.
10. Alliot-Licht B, Hurtrel D, Gregoire M. Characterization of α -smooth muscle actin positive cells in mineralized human dental pulp cultures. *Arch Oral Biol* 2001; 46: 221-228.
11. American Association for the Advancement of Science. Stem Cell Research and Applications Monitoring the Frontiers of Biomedical Research, 1999 p39. (www.aaas.org/spp/sfrrl/projects/stem/report.pdf).
12. Aplin HM, Hirst KL, Crosby AH, Dixon MJ. Mapping of the human dentin matrix acidic phosphoprotein gene (DMP1) to the dentinogenesis imperfecta type II critical region at chromosome 4q21. *Genomics* 1996; 30(2): 347-349 (doi: 10.1006/geno.1995.9867. PMID 8586437).
13. Atari M, Gil-Recio C, Fabregat M, García-Fernández D, Barajas M, Carrasco MA, Jung HS, Alfaro FH, Casals N, Prosper F, Ferrés-Padró E, Giner L. Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *J Cell Sci* 2012 15(125): 3343-3356 (doi: 10.1242/jcs.096537. Epub 2012 Mar 30).

14. Aydın AK, Berbercan P. Biyomühendislik esasları ile diş oluşturulmasına yönelik yaklaşımlar. Selçuk Üniv Dişhek Fak Derg 2010; 19: 99-114.
15. Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ, O'Connor KC. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. Tissue Eng 2006; 12: 3007-3019.
16. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsiu TW, Fisher LW, Gronthos S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis, J Dent Res 2003; 82: 976-981.
17. Baum BJ, Mooney DJ. The impact of tissue engineering on dentistry. J Am Dent Assoc 2000; 131: 309-318.
18. Bayık M. Kök Hücre: Yaşamın Kaynağı. I.Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi, 2004, İstanbul, s 13-23.
19. Bègue KC, Krebsbach PH, Bartlett JD, Butler WT. Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. Eur J Oral Sci 1998; 106: 963-970.
20. Bensinger W, DiPersio JF, McCarty JM. Improving stem cell mobilization strategies: future directions, Bone Marrow Transplant 2009; 43: 181–195.
21. Bernard A, Boumsell L. Human leukocyte differentiation antigens. Pres Med 1984; 13(38): 2311-2316 (PMID 6239187).
22. Bianco P, Robey PG. Marrow stromal cells. Clin Invest 2000; 105(12): 1663-1668.
23. Blau HM, Brazelton TR, Weimman JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? Cell 2001; 106: 829-841.
24. Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA. Stem cells for tooth engineering. Eur Cell Mater 2008; 16: 1-9.

25. Bongso A, Lee EH. Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources. In: Stem Cells - From Bench to Bedside. Singapore: World Scientific Publishing; 2005 p1-13.
26. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(14): 7999-8004.
27. Bowen A, English A, Jones E, Wood S, Kirkham J, Yang XB. Isolation and Preliminary Characterisation of Stem Cells from Human Dental Pulp. European Cells and Materials 2006; 11(3): 58.
28. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Army M, Thomas L, Boyse EA. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 3828-3832.
29. Butler WT, Ritchie H, The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. Int J Dev Biol 1995; 39(1) :169-179.
30. Canoğlu E, Çehreli ZC. Rejeneratif pulpa tedavilerinde bir güncelleme. Hacettepe Diş Hek Fak Derg 2008; 32: 21-27.
31. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res 1991; 9: 641-650.
32. Caton J, Bostanci N, Remboutsika E, De Bari C, Mitsiadis TA. Future dentistry: cell therapy meets tooth and periodontal repair and regeneration. J Cell 2011, Mol. Med. Vol XX, No XX, 2011 pp. 1-12 doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01251.x.
33. Chen D, Ji X, Haris MA, Feng JQ, Karsenty G, Celeste AJ, Rosen V, Mundy GR, Haris SE. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. J Cell Biol 1998; 142: 295–305.

34. Chen X, Armstrong MA, Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunol Cell Biol* 2006; 84: 413-421.
35. Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40(5): 815-820.
36. Chen Z, De Paiva CS, Luo L, Kretzer FL, Pflugfelder SC, Li DQ. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells* 2004; 22(3): 355-366.
37. Colter DC, Class R, Digirolo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3213-3218.
38. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE. Dental Pulp Tissue Engineering with Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth. *J Endod* 2008; 34: 962-969.
39. Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int* 2000; 66(2): 129-138.
40. Çetin EA, Ar CM, Demirel GYİ Bilgiç S, Salman F, Deniz G. İnsan Mezenkimal Kök Hücre Fenotipik Karakterizasyonu; Yağ ve Kemik Hücrelerine Yönlendirilmesi. *Türk J Immunol* 2011; 16: 1-10.
41. Çetinkaya DU. Mezenkimal Kök Hücreler Nerede? Ne zaman? 4. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi, 2007, Bursa, s 8-14.

42. d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ* 2007; 14(6): 1162-1171.
43. Devine S, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into non-human primates. *Blood* 2003; 101(8): 2999-3001.
44. Diascro DD, Vogel RL, Johnson TE, Witherup KM, Pitzemberger SM, Rutledge SJ, Prescott DJ, Rodan GA, Schmidt A. High fatty acid content in rabbit serum is responsible for the differentiation of osteoblasts into adipocyte-like cells. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 96–106.
45. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells, The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.
46. Dualibi MT, Dualibi SE, Young CS, Barlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res* 2004; 83: 523-528.
47. Dualibi SE, Dualibi MT, Zhang W, Asrican R, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineering dental tissues grow in the rat jaw. *J Dent Res* 2008; 87: 745-750.
48. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry- Part I: Stem cell sources. *J Prosthodont Res* 2012; 56: 151–165.
49. Elisseeff J, Puleo C, Yang F, Sharma B. Advances in skeletal tissue engineering with hydrogels. *Orthod Craniofac Res* 2005; 8: 150-61.

50. Feng JQ, Luan X, Wallace J, Jing D, Ohshima T, Kulkarni AB, D'Souza RN, Kozak CA, MacDougall M. Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (Dspp) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. *J Biol Chem* 1998; 273: 9457–9464.
51. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavillio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530 (erratum in *Science* 1998; 281: 923).
52. Ferreira CF, Magini RS, Sharpe PT. Biological tooth replacement and repair. *J Oral Rehabil* 2007; 34: 933-939.
53. Fiebig H, Behn I, Gruhn R, Typlt H, Kupper H, Ambrosius H. Charecterization of a series of monoclonal antibodies against Human T cells. *Allaerg Immunol (Leipz)* 1984; 30(4): 242-250 (PMID 6240938).
54. Fisher PB. *Mechanisms of Differentiation: Model Cell Culture Systems for Studying Differentiation (Vol 1)*. Boca Raton, Fla: CRC Press; 1990 p1-164.
55. Fortier LA. *Stem Cells: Classifications, controversies and clinical applications*. *Vet Surg* 2005; 34: 452-455.
56. Freshney IA, Stacey GN, Auerbach JM. *Culture of Human Stem Cells*. New Jersey: Wiley-Liss; 2007 p5-18.
57. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403.
58. Georgakoudi I, Solban N, Novak J, Rice W, Hasan T, Lin C. In vivo flow cytometry: A new method for enumerating circulating tumor cells. *Cancer Res* 2004; 64: 5044-5047.

59. Gimble JM, Guilak F, Nuttall ME, Sathishkumar S, Vidal M, Bunnell BA. In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Transfus Med Hemother* 2008; 35: 228–238.
60. Glick BR, Pasternak JJ, Patten CL. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. 4th Ed. Washington: ASM Press; 2010.
61. Gorter de Vries I, Quartier E, Van Steirteghem A, Boute P, Coomans D, Wisse E. Characterization and immunocytochemical localization of dentine phosphoprotein in rat and bovine teeth. *Arch. Oral Biol* 1986; 31: 57–66.
62. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev* 2008; 4(1): 21-26.
63. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81(8): 531-535.
64. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo, *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(25): 13625-13630.
65. Gronthos S, Mrozik K, Shi S, Bartold PM. Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization and differentiation potential. *Calcif Tissue Int* 2006; 79: 310-317.
66. Günel T, Aydın K. “Real-Time PCR” ve Uygulama Alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2009; 2(2): 43-45.
67. Hacking SA, Khademhosseini A. Applications of microscale technologies for regenerative dentistry. *J Dent Res* 2009; 88: 409-421.
68. Hakeri H. Kök Hücre Çalışmaları ve Hukuki Boyutu. 1. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi, 2009, Nevşehir, s 67-76.

69. Handa K, Saito M, Yamauchi M, Kiyono T, Sato S, Terenaka T, Narayanan SA. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone* 2001; 31: 606-611.
70. Hart PS, Hart TC. Disorders of human dentin. *Cell Tissues Organs* 2007; 186: 70-77.
71. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Quantitative Real Time PCR. *Genome Res* 1996; 6: 986-994.
72. Henschler R, Deak E, Seifried E. Homing of Mesenchymal Stem Cells. *Transfus Med Hemother* 2008; 35: 306–312.
73. Hikita JC, Vijayakumar S, Takito J, Erdjument-Bromage HE, Tempst P, Al-Awqati Q. Induction of Terminal Differentiation in Epithelial Cells Requires Polymerization of Hensin by Galectin 3. *The Journal of Cell Biology* 2000; 151(6): 1235-1246.
74. Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *British Journal of Cancer* 2007; 96: 1020–1024.
75. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaperctortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7: 393-395.
76. Horwitz EM. Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy. *Arch Med Res* 2003; 34(6): 600-606.
77. Hu CC, Zhang C, Qian Q, Tatum NB. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod* 1998; 24(11): 744-751.
78. Hu JC-C, Chun YP, Hazzazzi TA, Simmer JP. Enamel formation and amelogenesis imperfecta. *Cells Tissues Organs* 2007; 186: 78-85.

79. Huang CY, Pelaez D, Dominguez-Bendala J, Garcia-Godoy F, Cheung HS. Plasticity of stem cells derived from adult periodontal ligament. *Regen Med* 2009; 4: 809-821.
80. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *J Dent Res* 2009; 88(9): 792-806.
81. Huang GT, Shagramanova K, Chan SW. Formation of odontoblastlike cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod* 2006; 32: 1066-1073.
82. Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, Ogawa M, Mizuno M, Kasugai S, Tsuji T. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 13475- 13480.
83. Ikeda E, Tsuji T. Growing bioengineered teeth from single cells: potential for dental regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8: 735-744.
84. Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakashima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res* 2004; 83: 590-595.
85. Iohara K, Zheng L, Ito M, Tomokiyo A, Matsushita K, Nakashima M. Side Population Cells Isolated from Porcine Dental Pulp Tissue with Self-Renewal and Multipotency for Dentinogenesis, Chondrogenesis, Adipogenesis and Neurogenesis. *Stem Cells* 2006; 24: 2493–2503.
86. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418(6893): 41-49.

87. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng* 2007; 13(4): 767-773.
88. Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RD. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* 1996; 10(24): 3129-3140.
89. Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-1147.
90. Kaigler D, Mooney D. Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ* 2001; 65: 456-462.
91. Kaneko R, Akita H, Shimauchi H, Sasano Y. Immunohistochemical localization of the STRO-1 antigen in developing rat teeth by light microscopy and electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)* 2009; 58(6): 363-373.
92. Karaöz E, Doğan BN, Aksoy A, Gacar G, Akyüz S, Ayhan S, Genç ZS, Yürüker S, Duruksu G, Demircan PC, Sarıboyacı AE. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol* 2010; 133: 95–112 (doi 10.1007/s00418-009-0646-5).
93. Karaöz E, Ovalı E. Kök Hücreler. Trabzon: Ati Teknoloji Yayınları; 2004.
94. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs* 2006; 184: 105-116.
95. Kim HW, Knowles JC, Kim HE. Development of hydroxyapatite bone scaffold for controlled drug release via poly (epsilon-caprolactone) and hydroxyapatite hybrid coatings. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004; 70(2): 240-249.

96. Kirzioğlu Z, Çiftçi ZZ. Diş Yapısı ile ilişkili genetik malformasyonlar. Süleyman Demirel Üniv Diş Hek Fak Derg 2009; 1(1): 21-30.
97. Kitamura C, Kimura K, Nakayama T, Tereshita M. Temporal and spatial expression of c-jun and jun-B proto-oncogenes in pulp cells involved with reparative dentinogenesis after cavity preparation of rat molars. J Dent Res 1999; 78(2): 673-680.
98. Kocaoemer A, Kern S, Klüter H, Bieback K. Human AB Serum and Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma Are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. Stem Cells 2007; 25(5): 1270-1278.
99. Kodama R, Eguchi G. The loss of gap junctional cell-to-cell communication is coupled with dedifferentiation of retinal pigmented epithelial cells in the course of transdifferentiation into the lens. Int J Dev Biol 1994; 38: 357–364.
100. Koga H, Muneta T, Nagase T, Nimura A, Ju YJ, Mochizuki T, Sekiya I. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. Cell Tissue Res 2008; 333: 207-215.
101. Kolf C, Cho E, Tuan R. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Res Ther 2007; 9: 204 (doi:10.1186/ar2116).
102. Koussoulakou DS, Margaritis LH, Koussoulakos SL. A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. Int J Biol Sci 2009; 5: 226-243.
103. Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K. Evaluation of Pluripotency in Human Dental Pulp Cells. J Oral Maxillofac Surg 2009; 67(3): 501-506.

104. Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ. A New Human Somatic Stem Cell from Placental Cord Blood with Intrinsic Pluripotent Differentiation Potential. *J Exp Med* 2004; 200(2): 123-135.
105. Kömürcü M, Özkan H. Mezenkimal Kök Hücre ve Ortopedide Kullanımı. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Derg* 2006; 5(3-4): 130-139.
106. Krebsbach PH, Robey PG. Dental and Skeletal Stem Cells: Potential Cellular Regeneration. *J Dent Educ* 2002; 66(6): 766-773.
107. Laberge T, Cheung HS. Multipotent Dental Stem Cells: An Alternative Adult Derived Stem Cell Source for Regenerative Medicine. In: Kallos SM. *Embryonic Stem Cells - Differentiation and Pluripotent Alternatives*. Intech; 2011 p451-472 (ISBN: 978-953-307-632-4).
108. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, Pirozzi G, Papaccio G. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res* 2005; 20(8): 1394-1402.
109. Laino G, Graziano A, D'Aquino R, Dirozzi G, Lanza V, Valiante S, De Rosa A, Naro F, Vivarelli E, Papaccio G. An approachable human adult stem cell source for hardtissue engineering. *J Cell Physiol* 2006; 206: 693-701.
110. Lanza RP. *Essentials of stem cell biology*. San Diego, California: Elsevier Academic Press; 2006.
111. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005; 433(7026): 647-653.

112. Lawrence WT, Diegelmann RF. Growth factors in wound healing. *Clin Dermatol* 1994; 12: 157-169.
113. Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ, Kajkenova O, Lipschitz DA, Manolagas SC, Jilka RL. Inhibition of *Osf2/Cbfa1* expression and terminal osteoblast differentiation by *PPARgamma2*. *J Cell Biochem* 1999; 74: 357–371.
114. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275–1284.
115. Lei Z, Yongda L, Jun M, Yingyu S, Shaoju Z, Xinwen Z, Mingxue Z. Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biol Int* 2007; 31(9): 916-923.
116. Lemire JM, Shiojiri N, Fausto N. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol* 1991; 139(3): 535-552.
117. Lemischka I. A few thoughts about the plasticity of stem cells. *Exp Hematol* 2002; 30(8): 848-852.
118. Lemischka IR. Microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 1997; 15(1): 63-68.
119. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Identity Deception: Not a Crime for a Stem Cell. *Physiology* 2005; 20: 162–168.
120. Leung AK, Robson WL. Natal teeth: a review. *J Natl Med Assoc* 2006; 98: 226-228.
121. Li H, Liu H, Heler S. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 2003; 9: 1293–1299.

122. Lindroos B, Mäenpää K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 368: 329-335.
123. Liu H, Gronthos S, Shi S. Dental Pulp Stem Cells. *Methods Enzymol* 2006; 419: 99-113.
124. Liu J, Jin T, Ritchie HH, Smith AJ, Clarkson BH. In vitro differentiation and mineralization of human dental pulp cells induced by dentin extract. *In vitro Cell Dev Biol Anim* 2005; 41(7): 232-238.
125. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
126. Loeffler M, Roeder I. Tissue Stem Cells: Definition, Plasticity, Heterogeneity, Self-Organization and Models - A Conceptual Approach. *Cells Tissues Organs* 2002; 171: 8-26.
127. MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. *J Biol Chem* 1997; 272: 835-842.
128. Majumdar KM, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998; 176: 57-66.
129. Maria OM, Khosravi R, Mezey E, Tran SD. Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications. *Oral Dis* 2007; 13: 11-16.
130. Matalova E, Fleischmannova J, Sharpe PT, Tucker AS. Tooth agenesis: from molecular genetics to molecular dentistry. *J Dent Res* 2008; 87: 617-623.

131. Mauth C, Huwig A, Graf-Hausner U, Roulet J-F. Restorative applications for dental pulp therapy. In: Ashammakhi N, Reis R, Chiellini E. Topics in Tissue Engineering. 2007 p1-31.
132. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. Science 2000; 290(5497): 1779-1782.
133. Mezey E, Nagy A, Szalayova I, Key S, Bratincsak A, Baffi J, Shahar T. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. Science 2003; 299(5610): 1184.
134. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. Stem Cells 2005; 23: 1549–1559.
135. Mitsiadis TA, Papagerakis P. Regenerated teeth: the future of tooth replacement? Regen Med 2011; 6: 135-139.
136. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 5807-5812.
137. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology. Cell 1997; 88: 287–298.
138. Morszeck C, Reichert TE, Völlner F, Gerlach T, Driemel O. The state of the art in human dental stem cell research, Mund Kiefer Gesichtschir 2007; 11(5): 259-266.
139. Morsezeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. Clin Oral Invest 2008; 12: 113-118.

140. Morst (Ministry of Research Science and Tecnology). Stem Cell Research in New Zealand; Challenges and Opportunities for the Research Sector. New Zealand: 2006 p13-16 (Science Report).
141. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod* 2007; 33: 377-390.
142. Murrell W, Féron F, Wetzig A, Cameron N, Splatt K, Bellete B, Bianco J, Perry C, Lee G, Mackay-Sim A. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev Dyn* 2005; 233: 496–515.
143. Muschler GF, Midura RJ, Nakamoto C. Practical Modeling Concepts for Connective Tissue Stem Cell and Progenitor Compartment Kinetics. *J Biomed Biotechnol* 2003; 3: 170-193.
144. Nakahara T, Ide Y. Tooth regeneration: Implications for the use of bioengineered organs in first-wave organ replacement. *Hum Cell* 2007; 20: 63-70.
145. Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saitoh M, Tomooka Y, Tsuji T. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods* 2007; 4: 227-230.
146. Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH. Regulatory role of transforming growth factor-, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev Biol* 1994; 162: 18-28.
147. Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic protein to dental tissue engineering. *Nat Biotech* 2003; 21: 1025-1031.
148. Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16(3): 369-376.

149. Nerem R, Sambanis A. Tissue engineering from biology to biological substitutes. *Tissue Eng* 1995; 1: 3-13.
150. Niemann C, Watt FM. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends Cell Biol* 2002; 12(4): 185-192.
151. Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, Heemskerk MH, Lowik CW, Falkenburg JH, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34+ cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2002; 30: 870–878.
152. Nosrat IV, Widenfalk J, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev Biol* 2001; 238: 120-132.
153. Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res* 2004; 83: 518-522.
154. Ozcan T, Seyis S, Akcay B. Hücresel Kardiyomiyoblasti ve Kök Hücre Tedavisi. *Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci* 2007; 19: 68-76.
155. Özel BH, Ozan E, Dabak DÖ. Embriyonik Kök Hücreler. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2008; 28: 333-341.
156. Parker GC, Anastassova KM, Broxmeyer HE, Dodge WH, Eisenberg LM, Gehling UM, Guenin LM, Huss R, Moldovan NI, Rao M, Srour EF, Yoder MC. Stem cells: shibboleths of development. *Stem Cells Dev* 2004; 13: 579-584.
157. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168–1170.

158. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Becchetti E, Marchionni C, Alviano F, Fossati V, Staffolani N, Franchina M, Grossi A, Bagnara GP. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* 2005; 80: 836-842.
159. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-147.
160. Pittenger MF, Marshak DR. Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001 p349-374.
161. Planat-Benard V, Menard C, Andre M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, Penicaud L, Casteilla L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* 2004; 94: 223–229.
162. Potten CS. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998; 353(1370): 821-830.
163. Prentice D. Adult stem cells in: Monitoring stem cell research: a report of the President's Council on Bioethics. Washington (DC): Government Printing Office; 2004 p309–346.
164. Prentice D. Current Science of Regenerative Medicine with Stem Cells. *J Investig Med* 2006; 54 (1): 33-37.
165. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science* 1997; 2: 71–74.

166. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschlager M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod* 2003; 18: 1489–1493.
167. Quesenberry PJ, Colvin GA, Lambert JF. The chiaroscuro stem cell: a unified stem cell theory. *Blood* 2002; 100(13): 4266-4271.
168. Quesenberry PJ, Dooner G, Colvin G, Abedi M. Stem cell biology and the plasticity polemic. *Exp Hematol* 2005; 33(4): 389-394.
169. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term “stem cell”. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 35-38.
170. Rao MS. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells, *Stem Cells Dev* 2004; 13: 452-455.
171. Reyes M, Verfaillie CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 938: 231-235.
172. Ricci JL, Terracio L. Where is dentistry in regenerative medicine. *Int Dent J* 2011; 61: 2-10.
173. Ritchie HH, Hou H, Veis A, Butler WT. Cloning and sequence determination of rat dentin sialoprotein, a novel dentin protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 3698–3702.
174. Ruch JV. Odontoblast differentiation and the formation of the odontoblast layer. *J Dent Res* 1985; 64: 489-498.
175. Ruchon AF, Marcinkiewicz M, Siegfried G, Tenenhouse HS, DesGroseillers L, Crine P, Boileau G. Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 459-468.
176. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2521–2529.

177. Sartaj R, Sharpe P. Biological tooth replacement. *J Anat* 2006; 209: 503-509.
178. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and hematopoietic stem cell. A hypothesis. *Blood Cells* 1978; 4: 7-25.
179. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 2002; 20: 530-541.
180. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149-155.
181. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 258–264.
182. Seo MS, Hwang KG, Kim H, Baek SH, Analysis of gene expression during odontogenic differentiation of cultured human dental pulp cells. *Restor Dent Endod* 2012; 37(3): 142-148.
183. Shablott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13726–13731.
184. Sharkis SJ, Jones RJ, Civin C, Jang YY. Pluripotent stem cell–based cancer therapy: Promise and challenges. *Sci Transl Med* 2012; 4(127): 127ps9. doi: 10.1126/scitranslmed.3003920.
185. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy off mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 2005; 8: 191-199.

186. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 696-704.
187. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 2001; 29: 532-539.
188. Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, Hino T, Noshiro M, Kawamoto T, Kurihara H, Kato Y. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol* 1998; 174(2): 194–205.
189. Shiba H, Nakanishi K, Rashid F, Mizuno N, Hino T, Ogawa T, Kurihara H. Proliferative ability and alkaline phosphatase activity with in vivo cellular aging in human pulp cells. *J Endod* 2003; 9(1): 9-11.
190. Shibata D, Tavaré S. Stem Cell Chronicles: Autobiographies Within Genomes. *Stem Cell Rev* 2007; 3: 94–103.
191. Simmons PJ, Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood* 1991; 78(11): 2848-2853.
192. Slack JM, Tosh D. Transdifferentiation and metaplasia—switching cell types. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 581–586.
193. Smith A. Glossary A glossary for stem-cell biology. *Nature* 2006; 441: 1060.
194. Sonoyama W, Yamaza T, Gronthos S, Shi S. Multipotent Stem Cells In Dental Pulp. In: Freshney IA, Stacey GN, Auerbach JM. *Culture of Human Stem Cells*. New Jersey: Wiley-Liss; 2007 p187-204.
195. Spitkovsky D, Hescheler J. Adult mesenchymal stromal stem cells for therapeutic applications. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2008; 17: 79-90.

196. Stem cell identification. https://en.wikipedia.org/wiki/Stem_cell#Identification.
(Erişim tarihi:08.07.2013)
197. Stem cell resources. http://www.stemcellresources.org/celltalk_lesson_2.html
(Erişim tarihi:30.06.2013)
198. Stolzing A, Coleman N, Scutt A. Glucose-Induced Replicative Senescence in Mesenchymal Stem Cells. *Rejuvenation Res* 2006; 9(1): 31-35.
199. Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J Mater Res* 1998; 13(1): 94-117.
200. Süzergöz F, Erdem AP, Sepet E, Bektaş M, Yalman N, Gürol AO. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin İzolasyonu, Koloni Oluşturma Yeteneği ve Kök Hücre İçeriğinin Belirlenmesi Üzerine Bir Ön Çalışma. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2009; 29(1): 128-133.
201. şahin F, Saydam G, Omay SB. Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi. *Türk Hematoloji-Onkoloji Derg* 2005; 15(1): 48-56.
202. Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J* 1997; 11(1): 51-59.
203. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 2007; 131(5): 861–872
204. Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Iida K, Hatekeyama D, Miyaki S, Kunisida T, Shibata T, Tezuka K. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. *J Dent Res* 2008; 87: 676-681.

205. Thesleff I. Dental papilla cells in culture comparison of morphology, growth and collagen synthesis with two other dental-related embryonic mesenchymal cell populations. *Cell Differ* 1986; 18(3): 189-198.
206. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282 (5391): 1145-1147.
207. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, Müller B, Zulewski H. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341(4): 1135-1140.
208. Todorović V, Marković D, Milošević-Jovčić N, Petakov M, Balint B, Čolić M, Milenković A, Čolak I, Jokanović V, Nikolić N. Dental pulp stem cells - potential significance in regenerative medicine. *Stom Glas S* 2008; 55: 170-178.
209. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 2000; 287(5460): 2032-2036.
210. Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 499-508.
211. Tyagi P, Dhindsa MK. Tissue engineering and its implications in dentistry. *Indian J Dent Res* 2009; 20: 222-226.
212. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004; 116(5): 639-648.
213. Waller EK, Olweus J, Lund-Johansen F, Huang S, Nguyen M, Guo GR, Terstappen LWMM. The “common stem cell” hypothesis reevaluated: Human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood* 1995; 85: 2422-2435.

214. Wei X, Sipkins D, Pitsillides C, Novak J, Georgakoudi I, Lin C. Real-time detection of circulating apoptotic cells by in vivo flow cytometry. *Mol Imaging* 2005; 4: 415-416.
215. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; 100: 157-168.
216. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. *Science* 2000; 287: 1442-1446.
217. Wier ML, Scott RE. Regulation of the terminal event in cellular differentiation biological mechanisms of the loss of proliferative potential. *J Cell Biol* 1986; 102(5): 1955-1964.
218. Wobus AM, Boheler KR. Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiol Rev* 2005; 85: 635-678.
219. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988; 242(4885): 1528-1534.
220. Wu M, Wei YQ. Development of respiratory stem cells and progenitor cells, *Stem Cells Dev* 2004; 13(6): 607-613.
221. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* 2004; 104(9): 2643-2645.
222. Yalvaç ME, Rmaazanoğlu M, Gumru OZ, Şahin F, Palotas A, Rizvanov AA. Comprasion and Optimisation of Transfection of Human Dental Folicle Cells, a Novel Source of Stem Cells with Different Chemical Methods and Electro-poration. *Neurochem Res* 2009; 34: 1272-1277.

223. Yen-AH H, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res* 2008; 331: 359-372.
224. Yıldırım S, Alaçam A. Vital pulpa tedavilerinde protein ve gen terapileri. *Hacettepe Dişhek Fak Derg* 2007; 31(2): 54-63.
225. Yildirim S, Fu SY, Kim K, Zhou H, Lee CH, Li A, Kim SG, Wang S, Mao JJ. Tooth regeneration: a revolution in stomatology and evolution in regenerative medicine. *Int J Oral Sci* 2011; 3: 107-116.
226. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 2007; 327: 449-462.
227. Young CS, Kim S-W, Qin C, Baba O, Butler WT, Taylor RR, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Developmental analysis and computer modelling of bioengineered teeth. *Arch Oral Biol* 2005; 50: 259-265.
228. Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res* 2002; 81: 695-700.
229. Yu J, Shi J, Jin Y. Current approaches and challenges in making a bio-tooth, *Tissue Eng* 2008; 14: 307-319.
230. Yuan Z, Nie H, Wang S, Lee CH, Li A, Fu SY, Zhou H, Chen L, Mao JJ. Biomaterial Selection for Tooth Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2011; 17(5): 373-388.
231. Yun YR, Jeon E, Lee S, Kang W, Kim HW, Suh CK, Jang JH. Expression, Purification and Characterization of a Dentin Phosphoprotein Produced by E.coli, and its odontoblastic differentiation effects on human dental pulp cell. *Protein J* 2012; 31: 504-510.

232. Zammit P, Beauchamp J. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation* 2001; 68(4-5): 193-204.
233. Zhai S, Wang Y, Jiang W, Jia Q, Li J, Wang W, Wang H, Ding Y, Wang P, Liu J, Ni L. Nematic human dental pulp fibroblasts promote human dental pulp stem cells migration. *Exp Cell Res* 2013; 319(10): 1544-1552.
234. Zhang J, Li L. Stem Cell Niche: Microenvironment and Beyond. *J Biol Chem* 2008; 283(15): 9499–9503.
235. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng* 2006; 12(10): 2813-2823.
236. Zhang W, Walboomers XF, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials* 2006; 27(33): 5658-5668.
237. Zhang W, Walboomers XF, Wolke JG, Bian Z, Fan MW, Jansen JA. Differentiation ability of rat postnatal dental pulp cells in vitro. *Tissue Eng* 2005; 11(3-4): 357-368.
238. Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res* 2005; 15: 301-316.
239. Zhao Y, Glesne D, Huberman EA. Human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2426–2431.
240. Zhu SJ, Choi BH, Huh JY, Jung JH, Kim BY, Lee SH. 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* 2006; 101: 164-169.

241. Zola H, Swart B, Banham A, Barry S, Beare A, Bensussan A, Boumsell L, D Buckley C, Bühring HJ, Clark G, Engel P, Fox D, Jin BQ, Macardle PJ, Malavasi F, Mason D, Stockinger H, Yang X. CD molecules 2006-human cell differentiation molecules. *J Immunol Methods* 2007; 319(1-2): 1-5.
242. Zola H, Swart B. Human leucocyte differentiation antigens. *Trends Immunol* 2003; 24(7): 353-354.
243. Zola H, Swart B, Nicholson I, Aasted B, Bensussan A, Boumsell L, Buckley C, Clark G, Drbal K, Engel P, Hart D, Horejsí V, Isacke C, Macardle P, Malavasi F, Mason D, Olive D, Saalmueller A, Schlossman SF, Schwartz-Albiez R, Simmons P, Tedder TF, Uguccioni M, Warren H. CD Molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood* 2005; 106(9): 3123-3126.
244. Zorlu S, Aren G. Kemik Morfogenetik Proteinler ve Diş hekimliğinde Kullanım Alanları. *İstanbul Üniv Dişhek Fak Derg* 2012; 46(1): 65-70.
245. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7(2): 211-228.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Kars'ta doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Kars Merkez Dikme Köyü İlköğretim Okulu'nda tamamladım. Lise öğrenimimi ise 1998-2002 yılları arasında Kars Anadolu Lisesi'nde tamamladım.

2002-2007 yılları arasında Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'ndeki yüksek lisans eğitimimi 'Restoratif Dişhekimliğinde Kompozit Lamine Vener Restorasyonların Yeri' konulu tez ile tamamladım. 2007 yılında Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Restoratif Diş Tedavisi Ana Bilim Dalı'nda doktora eğitimine başladım. 2010 yılından beri Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Restoratif Diş Tedavisi Ana Bilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım.

İZMİR 1 NO'LU KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU
ONAY BELGESİ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova/İZMİR
Tel:0 232 390 4219 - 373 78 81 Fax: 0232 390 21 34
e-mail: aetikk@mail.ege.edu.tr www.aek.ege.edu.tr

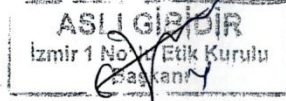
BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU					
	PROTOKOL ADI	İnsan 20 Yaş Dış Pulpasından Kök Hücrelerin İzolasyonu, Proliferasyonu ve Transplantasyonu				
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI/ ADI	Prof. Dr. Hüseyin TEZEL				
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	EÜ. Dış Hekimliği Fakültesi Dış Hastalıkları ve Tedavisi AD				
	DESTEKLEYİCİ FIRMA					
FAZİ						
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi / Değişiklik No. su	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	28.08.2009	Türkçe			
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLURU	-	Türkçe			
	OLGU RAPOR FORMU	-	Türkçe			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 09-9.1/6	Tarih : 25.11.2009				
	Ege Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi'nde yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda adı geçen araştırmaya başlanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*) Katılım (**)	İmza	
Prof. Dr. Kaan KAVAKLI Başkan	Çocuk Sağlığı Hst. ve Çocuk Kan Hst.	E.Ü.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hst.AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Aytül ÖNAL Başkan Yardımcısı	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Özdemir YARARBAŞ Üye	Genel Cerrahi	Kent Hastanesi Cerrahi Departmanı Çiğli İzmir	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Sabire KARAÇALI Üye	Genetik	E.U. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Bölümü	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Suna TOKSAVUL Üye	Protetik Dış Tedavisi	E.U. Dış Hek. Fakültesi Protetik Dış Tedavisi AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Ulus Salih AKARCA Üye	İç Hastalıkları ve Gastroenteroloji	E.U. Tıp Fakültesi İç Hast. AD	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Canan ÇOKER Üye	Biyokimya	D.E.U. Tıp Fakültesi Biyokimya AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Elif ONUR Üye	Psikiyatri	D.E.U. Tıp Fakültesi Psikiyatri AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI
Yrd. Doç. Dr. Mehmet ENGİN Üye	Elektronik Mühendisi	E.U. Mühendislik Fakültesi Elektrik-Elektronik Bölümü	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Yrd. Doç. Dr. Engin ÖNEN Üye	Sosyoloji	E.U. Edebiyat Fakültesi Sosyoloji Bölümü	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI
Yrd. Doç. Dr. Çağatay ÜSTÜN Üye		E.U. Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Deontoloji AD	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI

İZMİR 1 NO'LU KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU
ONAY BELGESİ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova/İZMİR
Tel:0 232 390 4219 - 373 78 81 Fax: 0232 390 21 34
e-mail: aetikk@mail.ege.edu.tr www.aek.ege.edu.tr

KARAR BİLGİLERİ		Karar No : 09-9.1/6				
Dr. Hayal BOYACIOĞLU Üye	İstatistik	E.U. Fen Fakültesi İstatistik Bölümü	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Dr. Serkan ÇINARLI Üye	İdari Hukuk	E.U. Ege Meslek Yüksek Okulu	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Uzm. Ecz. Ebru BEDİR Üye	Eczacı	E.U. Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Fatma BÜYÜKAKKUŞ Üye	Ziraat Mühendisi	Emekli	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	

- * Araştırma ile İlişki
- ** Toplantıda Bulunma



EGE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2009-121


28..10.8/ 2009


KONU: Onay

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL
E. Ü. Dişhekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi
Anabilim Dalı

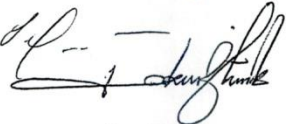
Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda “İnsan 20 Yaş Diş Pulpasından Kök Hücrelerin İzolasyonu, Proliferasyonu Ve Transplantasyonu” isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

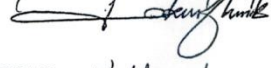
Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Rasih YILMAZ 
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

Prof. Dr. Süleyman AKKAN 


Prof. Dr. Hüseyin TEZEL

Prof. Dr. İsmet GÜRHAN 

Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK 

Doç. Dr. Gülcihan Mehtap ÇINAR *Katılmadı*

Doç. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU 

Doç. Dr. Tansel TANRIKUL 

Yrd. Doç. Dr. Gülnur SEVİN *Katılmadı*

Özcan NALBANTOĞLU 

Tingiz ÖZCAN *Katılmadı*