

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**İNSAN DIŞ PULPA MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİNİN KOŞULLU BESİYERİ ARACILIĞIYLA
OSTEOJENİK OLARAK FARKLILAŞTIRILMASI:
DENEYSEL ÇALIŞMA**

**Hazırlayan
Ergül ERGEN**

**Danışman
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL**

Yüksek Lisans Tezi

**Ocak 2017
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**İNSAN DIŞ PULPA MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİNİN KOŞULLU BESİYERİ ARACILIĞIYLA
OSTEOJENİK OLARAK FARKLILAŞTIRILMASI:
DENEYSEL ÇALIŞMA**

**Hazırlayan
Ergül ERGEN**

**Danışman
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL**

Yüksek Lisans Tezi

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2015-5938 kodlu proje ile desteklenmiş olup Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezinde (GEN-KÖK) yürütülmüştür.

**Ocak 2017
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

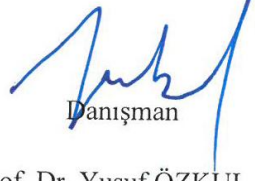
Ergül ERGEN

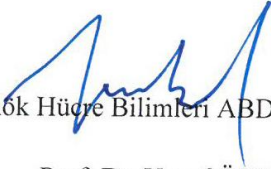
İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“İnsan Diş Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Koşullu Besiyeri Aracılığıyla Osteojenik Olarak Farklılaştırılması: Deneysel Çalışma” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.


Tezi Hazırlayan
Ergül ERGEN


Danışman
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL


Kök Hücre Bilimleri ABD Başkanı
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL danışmanlığında **Ergül ERGEN** tarafından hazırlanan “**İnsan Diş Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Koşullu Besiyeri Aracılığıyla Osteojenik Olarak Farklılaştırılması: Deneysel Çalışma**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

30 /01 /2017

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL
(Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı)



Üye : Yrd. Doç. Dr. Zeynep Burçin GÖNEN
(Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı)



Üye : Yrd. Doç. Dr. Hande KÜÇÜK KURTULGAN
(Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)



ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince her türlü bilgi ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım saygı değer hocam Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a, tezimin her aşamasında bilgi ve birikimlerinden faydalandığım değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Zeynep Burçin GÖNEN ve Yrd. Doç. Dr. Serpil TAHERİ'ye, fikir ve tecrübeleri ile bana destek olan kıymetli hocam Yrd. Doç. Dr. Korhan ARSLAN'a, her anlamda yanımda olan, maddi manevi desteğini esirgemeyen Öğr. Gör. Hasan SALKIN'a, yüksek lisans öğrenimim süresince edindiğim laboratuvar tecrübelerimde büyük emeğe sahip olan Keziban KORKMAZ BAYRAMOV ve Arş. Gör. Fadime ÖZDEMİR'e, hayatım boyunca maddi manevi desteklerini sürekli yanımda gördüğüm çok değerli aileme, deneyimlerinden faydalandığım ve her konuda yardımını gördüğüm Uz. Dilek BAHAR'a, tez savunma jüri üyelerime, çalışmamı yürüttüğüm Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya EREN Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) ve çalışanlarına, teşekkür ederim.

Ergül ERGEN
Kayseri, Ocak 2017

**İNSAN DİŞ PULPA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN KOŞULLU
BESİYERİ ARACILIĞIYLA OSTEOJENİK OLARAK
FARKLILAŞTIRILMASI: DENEYSEL ÇALIŞMA**

Ergül ERGEN

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2017
Danışman: Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL**

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, osteojenik farklılaşmış hücrelerin koşullu besiyerlerinin, farklılaşmamış mezenkimal kök hücre (MKH)'ler üzerine uygulanması sonucu bu hücreleri osteojenik farklılaşmaya yönlendireceği hipotezi üzerinden yola çıkılarak, osteojenik yönde farklılaştırılmış insan diş pulpası kaynaklı kök hücre (iDPKH)'lerin koşullu besiyerlerinin iDPKH 'ler üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

iDPKKH'ler akım sitometri, immün boyama ve farklılaşma testleri gibi analizlere tabi tutularak karakterize edildi. Klonejenik özelliklerini göstermek amacıyla CFU-F assay yapıldı. Hücreleri karakterize etmek için CD90, CD44, CD45, CD105 ve CD34 mezenkimal kök hücre belirteçleri kullanıldı. Çalışmamızda, iDPKKH'ler osteojenik farklılaşma besiyeri ile farklılaştırıldı. 14. gün sonunda farklılaşma; alizarin red boyama, osteolmage mineralization assay kit ile (Lonza, MD, USA) ve gen ekspresyonu düzeyinde RUNX2, Osteopontin ve Osteonektin genleri β - aktin'e normalize edilerek değerlendirildi. Farklılaşmış hücre hattından 3'er gün aralıklarla koşullu besiyeri ve RNA izolasyonu için hücre toplandı. Toplanan koşullu besiyerleri farklılaşmamış iDPKKH 'ler üzerine uygulandı. Bu gruptan da 3'er gün aralıklarla hücreler alınarak RNA izolasyonu yapıldı. 7. ve 14. günlerde hücrelerin senesense girip girmediklerini belirlemek amacıyla β -Gal boyama, canlılık aktivitesi ölçümü ve deney sürecinde hücrelerde oksidatif stres ve hasar olup olmadığını belirlemek için mitokondriyal aktiviteye bakıldı. 14 gün sonunda deney sonlandırıldı. Koşullu besiyeri uygulanan hücre grubundaki farklılaşma; alizarin red boyama, osteolmage mineralization assay kit ile (Lonza, MD, USA) ve gen ekspresyonu düzeyinde RUNX2, Osteopontin ve Osteonektin genleri β - aktin'e normalize edilerek değerlendirildi.

Dental pulpa dokusundan elde edilen kök hücrelerin CD90⁺, CD44⁺, CD105⁺ ve CD45⁻, CD34⁻ oldukları akım sitometri ve immünofloresan boyama ile tespit edildi. Hücrelerin klonojenik olarak çoğaldıkları CFU-F assay ile gösterildi. Ayrıca bu hücrelerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik olarak farklılaştırıldıkları adipo red, alizarin red, safranin O ve toluidin blue pozitif boyanmaları ile belirlendi. Osteojenik besiyeri ile 14 gün muamele sonrası ortamda biriken minerallerin alizarin red ve floresan tabanlı mineralizasyon boyama ile pozitif boyamaları gösterildi. İndüksiyon sonrası 14. gün sonunda toplanan hücrelerde RUNX2, Osteopontin ve Osteokalsin genlerinin ekspresyon seviyelerinin arttığı, kontrol grubunda ise değişmediği real time PCR analizi ile gösterildi. Gruplar arasında istatistiksel analizler sonucu anlamlı fark bulundu ($p<0,05$).

Osteojenik farklılaştırılmış insan diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden elde edilen koşullu besiyeri, hücrelerin osteojenik yönde indüklenmesi için alternatif bir besi ortamı oluşturabilir.

Anahtar Kelimeler: Kök Hücre; Osteojenik Farklılaşma; Diş Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre; Koşullu Besiyeri

THE OSTEOGENIC DIFFERENTIATION VIA CONDITIONED MEDIUM OF HUMAN DENTAL PULP MESENCHYMAL STEM CELLS: EXPERİMENTAL STUDY

Ergül ERGEN

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Stem Cell Sciences
Master's Thesis, January 2017
Supervisor: Assoc. Prof. Yusuf ÖZKUL**

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of conditioned media of osteogenic differentiated cells on undifferentiated mesenchymal stem cells, resulting from the hypothesis that these cells would lead to osteogenic differentiation, resulting in osteogenic differentiated human dental pulp derived stem cells (hDPSC) to investigate the effects of conditioned media hDPDSC.

hDPSCs were characterized by subjecting them to analyzes such as flow cytometry, immunostaining and differentiation assays. CFU-F assay was performed to demonstrate clonogenic properties. CD90, CD44, CD45, CD105 and CD34 mesenchymal stem cell markers were used to characterize the cells. In our study, hDPSCs were differentiated with osteogenic differentiation medium. At the end of 14 days, differentiation was assessed by alizarin red staining, osteolmage mineralization assay kit, and RUNX2, Osteopontin and Osteonectin genes normalized to β -actin at gene expression level. Cells were collected for conditional nutrient and RNA isolation at 3 day intervals from differentiated cell lines. Collected conditional media were applied on undifferentiated hDPSCs. Cells were removed from this group at intervals of 3 days and RNA isolation was performed. On days 7 and 14, β -Gal staining was assessed to determine if the cells had entered senescence, and mitochondrial activity whether oxidative stress and damage were present in the cells during the experiment. After 14 days the experiment was terminated. The differentiation in the conditioned medium group was assessed alizarin red staining, osteolmage mineralization assay kit (Lonza, MD, USA) and RUNX2, Osteopontin and Osteonectin genes by normalizing to β -actin at gene expression level.

The stem cells obtained from the dental pulp tissue were CD90 +, CD44 +, CD105 + and CD45-, CD34- by flow cytometry and immunofluorescence staining. The CFU-F

assay showed that the cells were clonogenic. In addition, these cells were identified by adipogenic, osteogenic and chondrogenically differentiated adipo-red with alizarin red, safranin O and toluidine blue-positive stains. After 14 days of treatment with osteogenic medium, minerals deposited on the media were positively stained with alizarin red and osteolmage mineralization assay. Real-time PCR analysis showed that expression levels of RUNX2, Osteopontin and Osteocalcin genes were increased in cells collected at the end of 14 days after induction but not in the control group. There was statistically significant difference between the groups ($p < 0,05$).

The conditioned medium obtained from mesenchymal stem cells derived from osteogenic differentiated human dental pulp can create an alternative medium for inducing osteogenic uptake of cells.

Key words: Stem cell; Osteogenic Differantiation; Dental Pulp Derived Stem Cell; Conditioned Medium

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	ii
ONAY :	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xv
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kök Hücreler	3
2.1.1.Mezenkimal Kök Hücreler	4
2.2.Dental Pulpa Kök Hücreleri (DPKH).....	5
2.2.1.Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Genel Özellikleri.....	5
2.2.2.Dental Pulpa Kök Hücrelerinin İmmünofenotipik Özellikleri	6
2.2.3.Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Heterojenitesi.....	7
2.2.4.Dental Pulpa Kök Hücrelerinin İzolasyonu.....	8
2.2.5.Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Kültürü.....	9
2.2.6.Dental Pulpa Kök Hücre Uygulamaları ve Doku Tamiri	10
2.3.Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaştırılması	10
2.4.Koşullu Besiyeri ve Osteojenik Farklılaşma	13

3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	15
3.1. Kullanılan Kimyasallar, Antikorlar, Primerler ve Kitler Listesi	15
3.2. Kullanılan Cam, Plastik ve Sarf Malzemeler Listesi	17
3.3. Kullanılan Aletler ve Cihazlar Listesi	18
3.4. İnsan Diş Pulpa Kaynaklı Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü	20
3.5. İnsan Diş Pulpa MKH Karakterizasyonu	20
3.5.1. Akım Sitometri	20
3.5.2. İmmüno Floresan Boyama	21
3.5.3. Koloni Oluşturan Üniteler- Fibroblastlar (CFU-F)	21
3.5.4 Farklılaşma Testleri	21
3.6. Osteojenik Medyum ile Farklılaşmanın İndüklenmesi	22
3.7. Koşullu Besiyerinin Farklılaşmamış Mezenkimal Kök Hücreler Üzerine Uygulanması.....	22
3.8. Senesens Testi için β -Galaktozidaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi	23
3.9. Canlılık Testi	23
3.10. Mitokondri Aktivitesi	23
3.11. Farklılaştırmanın Değerlendirilmesi:	24
3.11.1. Alizarin Red Boyama	24
3.11.2. Floresan Tabanlı Mineralizasyon Testi	24
3.12. Kantitatif Real Time PCR ile Osteojenik Gen Ekspresyon Analizi.....	24
3.13. İstatistiksel Analiz	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. İnsan Diş Pulpa Kaynaklı Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü	27
4.2. Akım Sitometri.....	27
4.3. İmmün-floresan boyama	28
4.4. Koloni Oluşturan Üniteler- Fibroblastlar (CFU-F) Testi	30
4.5. Farklılaşma Testleri.....	30

4.6. Osteojenik Medyum ile Farklılaşmanın İndüklenmesi	31
4.7. Canlılık Testi	31
4.8. Senesens Testi	32
4.9. Mitokondri potansiyeli testi	33
4.10. Alizarin Red Boyama	34
4.11. Floresan Tabanlı Mineralizasyon Testi	35
4.12. Osteojenik Gen Ekspresyon Profili	36
4.13. İstatistiksel analiz	39
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	40
6.KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

MKH:	Mezenkimal Kök Hücre
iDPKH:	İnsan Dental Pulpa Kök Hücreleri
CD44	: Homing Hücre Yapışma Molekülü
CD45	: Protein tirozin fosfataz, reseptör tip, C
CD105	: Endoglin
CD34	: Hematopoetik Projenitör Hücre Antijeni
CD73	: Ekto-5'-Nükleotidaz
CD11b	: Integrin alfa M
CD14	: Miyeloid Hücre-Spesifik Lösin- Zengin Glikoprotein
CD79a	: B-Hücre Antijen Reseptör Kompleks-İlişkili Protein Alfa Zincir
CD146	: Melanoma Hücre Adhezyon Molekülü
CD166	: Aktive Edilmiş Lökosit Hücre Adhezyon Molekülü
CD117	: Mast/Kök Hücre Büyüme Faktör Reseptörü
HLA	: İnsan Lökosit Antijenleri
RUNX2	: Runt ile İlişkili Transkripsiyon Faktör 2
OCN	: Osteokalsin
OP	: Osteopontin
β- AKTİN	: Beta Aktin
BSP	: Kemik Sialoprotein
Col1a1	: Kollajen Tip 1 α-1
BMP2	: Kemik Morfogenik Protein- 2
CFU-F	: Koloni Oluşturan Üniteler- Fibroblastlar
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TGF-β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü- Beta
SHED	: Eksfoliyatif Süt Dişi

ISCT	: Mezenkimal Kök Hücreler ve Hücresel Terapi İçin Uluslararası Toplum Komitesi
KİKH	: Kemik İliği Kaynaklı Kök Hücreler
POU5F1	: Oktamer Bağlayan Transkripsiyon Faktör- 4
SOX2	: Seks Belirleyici Bölge Y
NRF-2	: Nuklear Faktör (Eritroid Kaynaklı 2)- Benzeri 2
AF	: Alkalın Fosfataz
TAZ	: PDZ Bağlayan Motifi Olan Transkripsiyon Eş Etkinleştiricisi
FBS	: Fetal Bovine Serum
PBS	: Fosfat Tampon Salın
FITC	: Floresein izotiyosiyanat
P3	: Pasaj 3
qRT-PCR	: Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT	: Ters Transkriptaz
dNTP	: Nükleozid Trifosfat
dH₂O	: Distile Su
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
CO₂	: Karbondioksit
Ca	: Kalsiyum
Mg	: Magnezyum
Trizol	: Total RNA İzolasyon Solüsyonu
cDNA	: Komplementer DNA
DNA	: Deoksiribonükleikasit
RNA	: Ribonükleikasit
MgCl₂	: Magnezyum klorür

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Deney Grupları	22
Tablo 3.2. Osteojenik gen ekspresyonu için ekspresyon karışımının hazırlanması.....	25
Tablo 3.3. Ekspresyonu çalışılan genlere ait bilgiler	26

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Kök hücre çeşitleri ve farklılaşma potensileri (Salkın H, 2015).....	4
Şekil 2.2. Mezengenik Süreçler	5
Şekil 2.3. Dental pulpa kök hücreleri bu belirteçlerin tamamını eksprese etmez veya farklı seviyelerde eksprese edebilirler (27).	7
Şekil 2.4. Bugüne kadar insan dental pulpa kök hücreleri ile elde edilen sonuçlar. SHED: insan dökülen süt dişlerinden elde edilen kök hücreler.....	8
Şekil 2.5. DPKH izolasyon yöntemleri. A) Eksplant metod. Dental pulpa dokusu mekanik olarak küçük fragmentlere ayrıldıktan sonra medyum içerisinde kültür edilir. B) Enzimatik parçalanma metodu. Dental pulpa dokusu kollajenaz/dispaz ile parçalanır ve daha sonra elde edilen hücre süspansiyonu akış sitometrisi ile köklülük markırlarının ekspresyonları için ölçümleri yapılır (44).	9
Şekil 3.1. Muse Cell Analyzer Cihazı ile Canlılık Aktivitesi Ölçümü	23
Şekil 4.1. iDPMKH izolasyonu. Primer kültürdeki hücreler (A), Primer kültürde fibroblast benzeri morfoloji gösteren tutunmuş hücreler (B), ekim işleminden 7 gün sonra hücreler (C), ikinci pasaj hücreler (D). Mikroskop objektifi 10x. Skala bar: 100µm.....	27
Şekil 4.2. İnsan dental pulpa kök hücrelerinin akış sitometri ile immünfenotiplendirilmesi.....	28
Şekil 4.3. İmmünfloresan boyama. CD73, CD44, CD105, CD34 ve CD45 için mikroskop objektifi 20x, CD90 için mikroskop objektifi 10x, Skala bar: 100µm.	29
Şekil 4.4. Kristal viyole ile boyanan koloniler.....	30
Şekil 4.5. Standart besiyeri uygulanmış DPKH'lerde adipored boyama (A), Adipojenik indüksiyon besiyeri ile farklılaştırılan DPKH'lerde lipid damlacıklarının adipored boyama ile gösterimi (B), Standart besiyeri uygulanmış DPKH'lerde safranin O boyama (C), Kondrojenik indüksiyon besiyeri ile farklılaştırılan DPKH'lerinde safranin O boyama ile ekstrasellüler matriks alanlarının gösterimi (D). Mikroskop büyütmesi 10x.....	30
Şekil 4.6. Hücrelerin osteojenik olarak farklılaştırıldığıının alizarin red ve floresan tabanlı mineralizasyon boyamaları ile gösterimi. Standart besiyeri ile	

muamele edilmiş DPKH'lerinin alizarin red boyaması (A), Osteojenik besiyeri ile muamele edilmiş DPKH'lerinin alizarin red boyaması (B), Standart besiyeri ile muamele edilmiş DPKH'lerinin floresan tabanlı floresan boyaması (C), Osteojenik besiyeri ile muamele edilmiş DPKH'lerinin floresan tabanlı boyaması (D), Mikroskop objektifi 20x, Skala bar: 100 μ m.	31
Şekil 4.7. Koşullu besiyeri uygulandıktan sonra muse cell analyzer count and viability kiti ile gerçekleştirilen 7. Ve 14. gün canlılık analiz sonuçları.	32
Şekil 4.8. SA- β gal. boyama. 7. gün β gal. aktivitesi gösteren kontrol hücreleri yeşil renkte boyanmış olarak gözükmemektedir (A), 7. gün β gal. aktivitesi gösteren deney grubu hücreleri yeşil renkte boyanmış olarak gözükmemektedir (B), 7. günde kontrol ve deney grubunda senesens değerlerinin karşılaştırılması (C), 14. gün β gal. aktivitesi gösteren kontrol hücreleri mavi renkte boyanmış olarak gözükmemektedir (D), 14. gün β gal. aktivitesi gösteren deney grubu hücreleri mavi renkte boyanmış olarak gözükmemektedir (E), 14. günde kontrol ve deney grubunda senesens değerlerinin karşılaştırılması (F).....	33
Şekil 4.9. 7 ve 14. günlerde muse cell analyzer cihazı kullanılarak mitopotential assay kiti aracılığı ile kontrol ve koşullu besiyeri uygulanan hücrelerin mitokondri membranlarında % depolarizasyon değerleri.	34
Şekil 4.10. Kontrol ve deney gruplarında 7 ve 14. gün sonunda osteojenik farklılaşmanın alizarin red boyama ile değerlendirilmesi. Kırmızı alanlar osteojenik farklılaşmış bölgeleri göstermektedir.	35
Şekil 4.11. 7 ve 14. günlerde standart besiyeri, osteojenik besiyeri ve koşullu besiyeri uygulanan gruplarda osteojenik farklılaşma sırasında meydana gelen mineralizasyonun floresan mikroskopta gösterilmesi. Yeşil alanlar, mineralleşmenin olduğu bölgeleri göstermektedir. Mikroskop büyütmesi: 20x, Skala bar: 100 μ m.	36
Şekil 4.12. RUNX2, OCN ve OPN genleri için 3,6,9,12 ve 15. günlerde kantitatif real time PCR analizleri.	38

1.GİRİŞ ve AMAÇ

MKH'ler, osteojenik hücre hatlarına farklılaşma yeteneğindedirler. Bu çalışmanın konusu, osteojenik farklılaştırılmış insan dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin koşullu besiyerlerinin farklılaşmamış mezenkimal kök hücreler üzerine uygulanması sonucu bu hücreleri osteojenik yönde farklılaşmaya yönlendirip yönlendirmeyeceğinin araştırılmasıdır. Çalışmamızın kapsamı, insan diş pulpası dokularından elde edilen mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaştırılmaları, farklılaşmış hücrelerin hücre dışına saldıkları sekretomları içeren besiyerlerinin farklılaşmamış mezenkimal kök hücreler üzerine uygulanması ve uygun inkübasyon süresi sonunda bu hücrelerin osteojenik farklılaşma testlerine tabi tutularak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve boyamalar ile farklılaşmanın değerlendirilmesini içermektedir. Literatüre bakıldığında, mezenkimal kök hücrelerin osteojenik yönde farklılaştırılması için farklı bileşenlere sahip besiyeri ortamları olmasına rağmen (1,2) osteojenik farklılaşmış hücrenin koşullu besiyeri ile kademeli indüksiyonunu gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Dental pulpa kaynaklı kök hücreler, üç embriyonik germ tabakasında yer alan hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğine sahiptirler (3). Dental pulpa kök hücreleri, kemik iliği ve diğer dokulara nazaran ekstra bir cerrahi işlem gerektirmeden kolaylıkla elde edilebilmeleri ve zengin bir kök hücre popülasyonuna sahip olmaları gibi avantajlara sahiptir. iDPKH'lerinin farklılaşması, osteogenezi düzenleyen çeşitli regülatörler, TGF- β süper ailesi ve çeşitli sitokinler ile düzenlenir (4). Bununla birlikte, kök hücreler bazal medyuma çeşitli sinyal ve büyüme faktörlerinin eklenmesiyle ya da gen transfeksiyonu gibi yöntemlerle hücre farklılaştırılması artırılabilir. Bu çalışmada, kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasında koşullu besiyerinin farklılaşma ortamlarına alternatif bir kaynak olabileceği hipotezinden yola çıkıldı. Bu nedenle çalışmamızda:

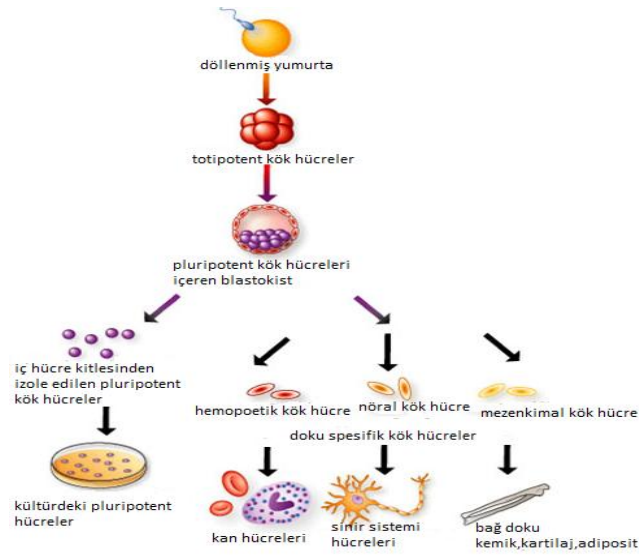
1. iDPKH'lerin osteojenik indüksiyonunun yapılabilmesi,
2. Farklılaşan hücrelerden, hücre dışına salınan sekretomları içeren koşullu besiyerlerinin toplanabilmesi,
3. Koşullu besiyerlerinin farklılaşmamış iDPKH'ler üzerine uygulanarak bu hücrelerin osteojenik yönde farklılaştırılabilmesi hedeflendi.

Dental pulpa dokusu, zengin kök hücre içeriği, kolay elde edilebilmesi ve çok yönlü farklılaşma potansiyeli ile oldukça etkili bir kök hücre kaynağıdır. Çalışmamızda, koşullu besiyeri aracılığıyla osteojenik indüksiyon gerçekleştirilebilirse; elde edilen osteojenik hücreler dejeneratif kemik hasarlarının tedavisinde ve rejeneratif tıp ve doku yenilenmesinde kullanılabileceklerdir. Ayrıca bu koşullu medyum ile hücrelerin osteojenik yönde indüklenmesi için alternatif bir besi ortamı oluşturacaktır. Bu şekilde hücreler tarafından sekrete edilen içerikle yeni bir besiyeri ortamı oluşturmak başarılı sonuçlar gösterir ise ithal edilen mevcut besiyerleri ile yapılan ileri karşılaştırmalı çalışmalar yapılması hedeflenmektedir. MKH'ler ile gerçekleştirilmiş böyle bir çalışmanın literatürde olmaması nedeni ile yapılacak olan bu çalışma literatürdeki bu eksikliği tamamlamış olacak ve bilimsel birikime katkı sağlayacaktır. Elde edilen sonuçlardan sadece MKH ile ilgilenen araştırmacılar değil aynı zamanda kemik rejenerasyonu ile ilgilenen klinik araştırmacılar da yararlanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler

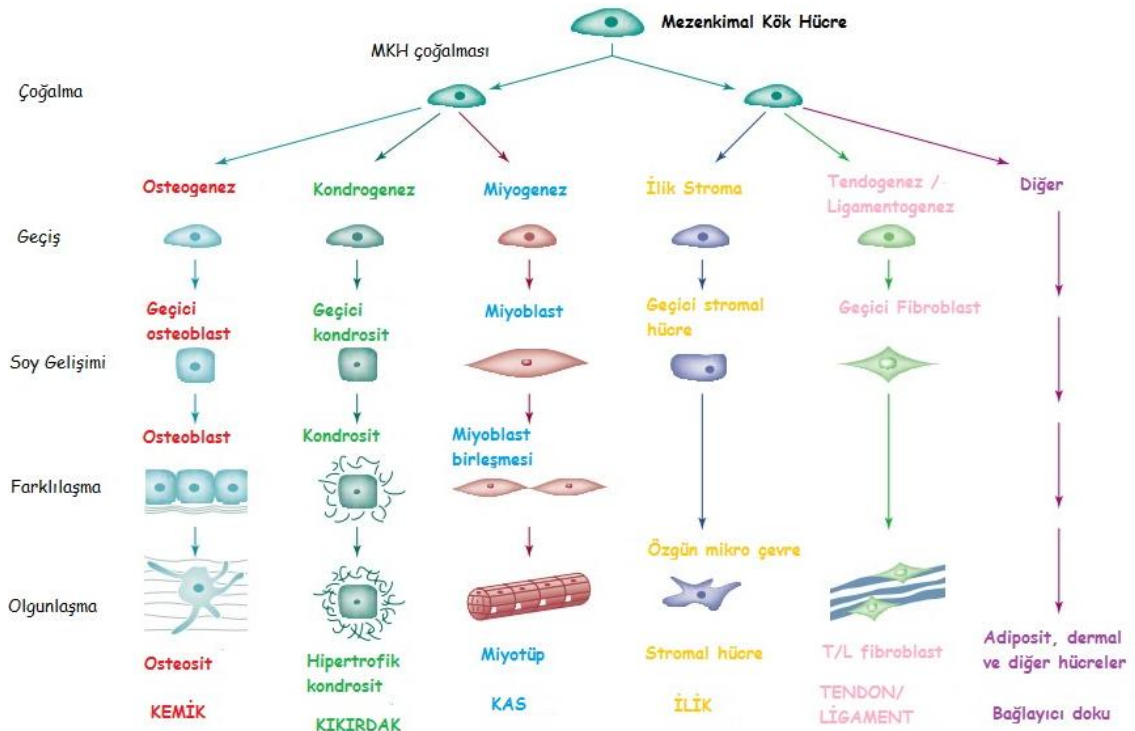
Kök hücreler klonojenik, kendini yenileyen, özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen, rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinde büyüme faktörleri/sinyaller ve hücre iskeleleri yada ekstraselüler matrikslerle birlikte uygulanabilen anahtar öncü hücrelerdir (5). Kök hücrelerin uzun periyotlar boyunca hücre bölünmesini devam ettirerek kendini yenileme potansiyelleri ve belirli fizyolojik yada deneysel koşullar altında özel fonksiyonlu hücrelere indüklenebilmeleri mümkündür (6). Bu hücreler kısaca; gelişimin blastokist aşamasındaki iç hücre kitlesi içinde yerleşen embriyonik kök hücreler ve dokularda bulunan yetişkin kök hücreler olarak sınıflandırılır (7). Embriyonik kök hücreler embriyodan köken alan ve vücuttaki tüm dokuları oluşturma yeteneğine sahip totipotent hücrelerdir. Erişkin dokulardaki kök hücreler ise farklılaşmamış hücreler olup, genellikle içinde bulundukları dokuya ait olan hücre tiplerini üretirler (Şekil 2.1). Bu hücreler aynı zamanda kendini yenileyebilir ve ait oldukları dokunun devamlılığını ve onarımını sağlarlar (8). Yetişkin kök hücreler kemik iliği, periferik kan, kordon kanı, amniyotik sıvı, adipoz doku, retina, iskelet kası ve dental dokular gibi çeşitli dokulardan izole edilebilirler (9). Yetişkin kök hücreler doku hasarı, hastalık yada dokuların devamlılığını sağlama durumlarında fizyolojik olarak daha fazla hücreye ihtiyaç duyacakları için aktif hale gelirler. Bu durum dışında genelde bölünmeden sessiz kalırlar. Bu yüzden yetişkin kök hücrelerin primer rolü bulundukları dokunun onarımı ve devamlılığının sağlanmasıdır. Bu hücrelerin kök hücre nişleri olarak adlandırılan spesifik alanlarda yani bir mikroçevre içerisinde bulundukları düşünülür (10).



Şekil 2.1. Kök hücre çeşitleri ve farklılaşma potansileri (Salkın H, 2015)

2.1.1.Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler, multipotent özelliğe sahip yetişkin kök hücrelerdir (11, 12). Bu hücreler, rejeneratif tıpta ve doku mühendisliğinde çok yaygın bir şekilde kullanılır. (13). MKH'ler adipoz doku, umbilikal kord kanı, periferik kan, dental pulpa, dermis, amniyotik sıvı ve hatta tümör gibi birçok dokudan izole edilebilirler (14). Osteoblast, adiposit, kondrosit, miyoblast ve nöronlara farklılaşabilirler (15). Özellikle osteojenik farklılaşma potansiyelleri diğer kök hücre tiplerine göre daha üstündür ve bu nedenle kemik rejenerasyonunu geliştirmek için kullanılırlar (16). Kemik dokusunun yenilenmesine gereksinim duyan hastalıklar arasında travma, tümör, enfeksiyon, dejeneratif kemik hastalıkları, doğumsal anomaliler ve periprostetik kemik kayıpları gelir. Bunun yanı sıra spinal füzyonlarda, eklemlerin revizyon amaçlı girişimlerinde, düzeltici osteotomilerde, yüz ve maksilla cerrahisinde kemik greftleri gerekir. Otolog kemik grefti uygulamalarında sıklıkla osteojenik büyüme faktörlerine, kemik yapımını gerçekleştirecek hücrelere ve bir takım destek malzemelerine gerek duyulur. Ancak otolog doku miktarının sınırlı olması, ağrı, enfeksiyon, pelvis kırıkları ve nörovasküler yaralanmalar otolog uygulamaları sınırlar. Dolayısıyla yetersiz kemik iyileşmesi en büyük sorunlardan biridir. Bu bağlamda hücre tedavisi amacıyla mezenkimal kök hücreden yararlanmak son yıllarda önemli bir seçenek olarak görülmektedir (17).



Şekil 2.2. Mezengenik Süreçler

2.2.Dental Pulpa Kök Hücreleri (DPKH)

2.2.1.Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Genel Özellikleri

Diş, epitelyal hücreler ve mezenkimal kök hücreler arasındaki etkileşimden dolayı gelişir. İlk olarak diş minesi oluşur, daha sonra da papilla ve dental folikül meydana gelir. MKH'ler; dentin, pulpa, sementum ve diğer periodontal ligamentin bileşenlerini oluştururlar (18). Dişte yer alan kök hücreler genel olarak dental kök hücreler olarak tanımlanmasına rağmen bulundukarı yere göre dental pulpa kök hücreleri, periodontal ligament kök hücreleri, apikal papilla kök hücreleri, dental folikül kök hücreleri ve gingival doku kök hücreleri gibi farklı mezenkimal kök hücre popülasyonları mevcuttur (19). Ancak dental kök hücrelerin bu geniş heterojenitesi, alt popülasyonlarının farklı çoğalma ve farklılaşma yetilerinden dolayı klinik uygulamalar için bir engel olabilir (3). Dental pulpa kök hücreleri ilk olarak Gronthos ve arkadaşları tarafından 3. molarlardan izole edildi ve yoğun kalsifik koloniler ve occasional nodüller oluşturma yeteneği, çoğalma, yüksek klonojenite seviyesine sahip hücreler olarak karakterize edildiler (7). Mezenkimal kök hücreler olarak DPKH'lerinin kimliği onların nöral ektodermal hücreler, adipositler, kondrositler, osteoblastlar, odontoblastlar ve

miyoblastlara dönüşebilme yetenekleri ile desteklenir (20). Bu hücreler pulpa olarak bilinen bağlayıcı dokuda “ niche sealing “ veya “ pulpa çemberi “nde dental taç içinde yer alırlar. Burada yerleşen hücreler aynı zamanda pulpoblastlar olarak da bilinen stromal fibroblastlar tarafından temsil edilen heterojen bir popülasyona sahiptir ve bu hücrelere odontoosteoprogenitör popülasyonlar, nöral, vasküler hücreler, granülosit ve makrofaj hücreleri gibi inflamatuvar immün hücreler eşlik eder (21). Embriyonik gelişim esnasında dental pulpa bazı araştırmacılar tarafından nöral tübün periferinde büyüyen, oral bölgeye göç eden ve mezenşim fenotipindeki hücrelere farklılaşan ektodermal hücrelerden geliştiğinden dolayı “ ektomezenşim “ olarak tanımlanan bir dokudur (22). Ameloblastlar mineyi, MKH’ler ise odontoblast, pulpa ve periyodontal ligamenti oluştururlar (23). Fonksiyonel olarak dental pulpa, periyodontal dokunun tamiri ve sürdürülmesinden sorumludur. Ayrıca çeşitli hasar tiplerine cevap verebilir ve yüksek rejeneratif kapasitesi sayesinde immün sistem ile ilişkilidir. Örneğin; pulpa progenitörleri veya odontoblast tabakalarının harabiyetine neden durumlarda veya derin çürüklere neden olan ciddi tahriş durumunda dental pulpa hücreleri odontoblastlara farklılaşarak hasarlı dokuya göç eder, çoğalır (24, 25) ve onarıcı dentinogeneze liderlik eden ana mekanizma olan onarıcı dentini meydana getirir (26).

2.2.2.Dental Pulpa Kök Hücrelerinin İmmünfenotipik Özellikleri

Mezenkimal Kök Hücreler ve Hücresel Terapi İçin Uluslararası Toplum Komitesi (ISCT) 2005 yılında, insan MKH’larının en azından CD105, CD73, CD90 yüzey antijenleri yönünden pozitif CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a ve HLA-DR yüzey antijenleri açısından ise negatif olduğunu önermişlerdir. Dental pulpada yer alan MKH’ların farklı biyolojik aktiviteler sahip çeşitli alt popülasyonlarının varlığı DPKKH’lerin yüzey antijenlerinin bariz bir şekilde farklı seviyelerde ifadesine neden olabilir.

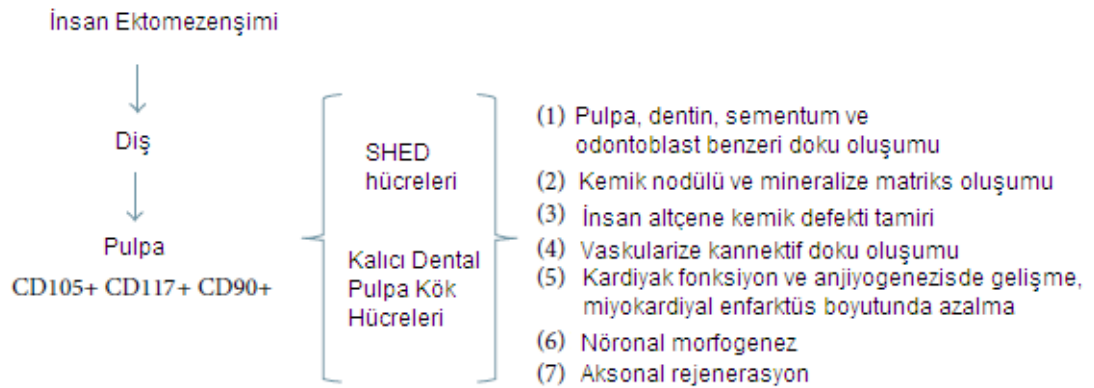
Referans	İmmünfenotip
Akpınar et al.	CD13+, CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD146+, CD166+
Suchánek et al.	CD29+, CD44+, CD63+, CD73+, CD90+, CD166+, CD45-, CD34- CD29+, CD44+, CD73+, CD105+, CD166+, CD14-, CD34-, CD45- <i>Stro-1+</i> , CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD105+, CD146+, CD166+, CD271+, CD34+, CD117+, OCT-3/4+, NANOG+
Kawashima	CD29+, CD73+, CD90+, CD14-, CD34-, CD45-, HLA-DR-
Werle et al.	CD44+, CD73+, CD90+, CD105+, CD14-, CD31-, CD45-, HLA-DR-
Bray et al.	CD44+, CD73+, CD90+, CD166+, CD34-, CD45-, HLA-DR-
Govindasamy et al.	CD73+, CD90+, CD29+, CD14-, CD34-, CD45-, HLA-DR-
Lindemann et al.	CD73+, CD90+, CD105+, CD146+, CD14-, CD34-, CD45-
Pivoriūnas et al.	CD90+, CD34+, CD45-
Laino et al.	CD90+, CD105+, CD146+, CD9+, CD10+, CD44+, CD49+, CD106+, STRO-1+
Lindroos et al.	CD90+, CD105+, CD146+, CD45-
Shoi et al.	CD117+, Oct3/4+, NANOG+
Ishkitiev et al.	CD117+, CD34+, CD45-
Yang et al.	STRO-1+, CD29+, CD44+
Jo et al.	STRO-1+, CD29+, CD34+, CD44+, CD106+, CD146+
Liu et al.	STRO-1+, CD146+, NANOG+, CD73-, CD105-, CD45-
Dissanayaka et al.	OCT-4+, NANOG+, SSEA-3+, SSEA-4+, TRA-1-60+, TRA-1-81+
Kerkis et al.	

Şekil 2.3. Dental pulpa kök hücreleri bu belirteçlerin tamamını eksprese etmez veya farklı seviyelerde eksprese edebilirler (27).

2.2.3. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Heterojenitesi

DPKH'ler insan eksofoliyatif süt dişlerinden (SHED), kalıcı sekonder diş sistemlerinden, impaksiyon veya geriye döndürülemeyen periyodontitisten dolayı ortodontist tarafından sağlanan diş ekstraktından, iltihaplanmış pulpa dokusundan elde edilen kök hücrelerdir (19,28). SHED hücreleri Miura ve ark. tarafından primer diş sistemlerinden izole edildi, yüksek çoğalma oranları, osteoblastlar, nöral hücreler, adipositler ve odontoblastlara farklılaşma yeteneklerine sahip hücreler olarak karakterize edilmişlerdir. SHED hücreleri pulpa/dentin dokusu, kemik hücre tipleri, odontoblast benzeri hücrelerin farklı seviyelerini ve mineralize dentini oluşturabilirler (29). SHED hücreleri daha fazla olgunlaşmamış kök hücre popülasyonuna sahip olmalarından dolayı; kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerden (KİKH), kesici dişler, süpernumürer dişler veya üçüncü molarlardan elde edilen DPKH'lerden daha fazla çoğalma kapasitesine sahiptir (30,31). Suchanek ve ark. yaptıkları çalışmada göstermişlerdir ki hücre döngü evreleriyle tutarlı olarak SHED hücreleri, DPKH'lerden daha yüksek doubling time süresine sahiptir. SHED hücrelerinin %69.8'i S ve G2 fazındayken DPKH'lerin sadece %52'si bu evredeydi (32). Ayrıca, SHED hücrelerinin yüzey antijenleri de DPKH'ler ve KİKH'lerden farklıdır. POU5F1 (OCT3/4), SOX2, ve NANOG gibi pluripotensi markerları, kollajen 1 ve 3 gibi molekülleri kodlayan genler, transforme edici büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü 2 gibi proliferasyon/ekstrasellüler matriks oluşumu ile ilgili genler DPKH'lerden daha yüksek seviyede eksprese edilir (33).

Ayrıca DPKH'ler ile karşılaştırıldığında SHED hücrelerinde daha zayıf bir şekilde eksprese edilen, nöroepitelyal kök hücreler için bir marker olan nestinin ekspresyonu ile ilişkili olarak nörosfer oluşturma yetenekleri azalmıştır (34,35). Süpernumürer dişlerden izole edilen DPKH'ler CD90+, CD146+, CD105+ ve CD45- olup farklı soylara farklılaşabilme kapasitesine sahiptirler. Ayrıca OCT4+ ve NANOG+ özellik taşırlar (36). Akpınar ve ark. doğuştan gelen DPKH'ler, SHED hücreleri, gömülü 3. molarlardan elde edilen DPKH'lerin heterojenitelerini analiz etmişler ve bu hücrelerin morfolojileri, çoğalma oranları, eksprese ettikleri yüzey markerları ve farklılaşma potansiyelleri bakımından benzer özelliklere sahip olduklarını bulmuşlardır. İlginç bir şekilde, bu 3 dental kök hücre tipinde de yapılan flow sitometri analizleri sonucunda CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD146, CD166 ve HLA-ABC pozitif bulunmuştur. Bu nedenle DPKH'ler ve SHED hücrelerinin birbirlerine çok benzedikleri varsayılmaktadır (3).

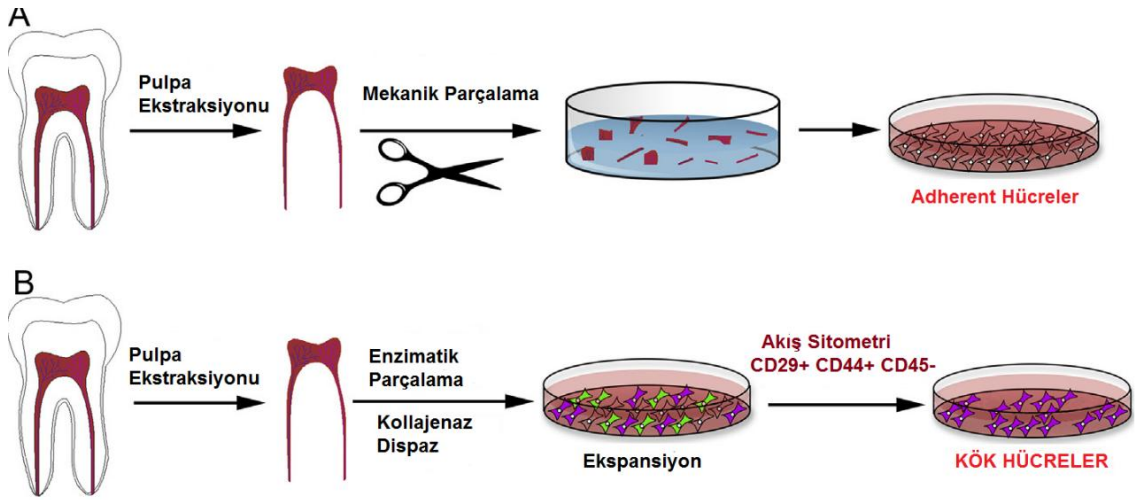


Şekil 2.4. Bugüne kadar insan dental pulpa kök hücreleri ile elde edilen sonuçlar. SHED: insan dökülen süt dişlerinden elde edilen kök hücreler

2.2.4.Dental Pulpa Kök Hücrelerinin İzolasyonu

DPKH'lerin izolasyonu için 2 temel method tanımlanmıştır: Eksplant methodu ve pulpa dokusunun enzimatik parçalanması methodu. İlk methodda; pulpa dokusu cerrahi olarak çıkarılır ve hücreler doku fragmentlerinden gelişir (37,38). İkinci methodda ise; dental pulpa kollajenaz ve dispaz kullanılarak sindirilir (39,40), sonra hücreler ekilerek proliferasyonları gözlemlenir ve spesifik markerlarla flow sitometri yöntemi kullanılarak karakterizasyon gerçekleştirilir (41). Alternatif olarak, bazı yazarlar

olgunlaşmamış kök hücreler için doku eksplant çoklu-evre süreci gerektiğini önermektedir. Bu yöntemle göre progenitör hücreler öncelikle kültürde büyütülür, daha sonra enzimatik sindirim gerçekleştirilir ve izole edilen hücreler çoğaltılır (42,43). Bugüne kadar çoğalma kapasitesi, karyotip stabilitesi veya DPKH'lerin klinik kullanımı bakımından diğerlerinden daha üstün bir izolasyon tekniği bulunmamıştır fakat çoğu protokol sistematik eksplantasyondan ziyade enzimatik sindirimi içerir.



Şekil 2.5. DPKH izolasyon yöntemleri. A) Eksplant metod. Dental pulpa dokusu mekanik olarak küçük fragmentlere ayrıldıktan sonra medyum içerisinde kültür edilir. B) Enzimatik parçalanma metodu. Dental pulpa dokusu kollajenaz/dispoz ile parçalanır ve daha sonra elde edilen hücre süspansiyonu akış sitometrisi ile köklülük markırlarının ekspresyonları için ölçümleri yapılır (44).

2.2.5. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Kültürü

Plastik bir yüzey üzerinde MKH'ların başlangıçtaki büyüme periyodu, tek bir hücreden gelen kolonilerin oluşumu tarafından karakterize edilir. Primer kültürdeki hücrelerin güçlü bir genişleme eğilimine sahip olmalarından dolayı pasajlanarak alt kültürleri devam ettirilebilir (45). Suchanek ve ark. kemik iliği için dizayn edilen kültür besiyerinde 60 pasaj boyunca DPKH'lerini kültüre edebilmişler, Laino ve ark. ise bu sayıyı 80 pasaj olarak bildirmişlerdir (32,41). Bu hücrelerin sayılarını 2 katına çıkarma periyotları 12-50 saat arasındadır fakat başlangıçtaki sayıları 50 katına çıktıktan sonra doubling time süreleri de 60-90 saate kadar artar (46). Çoğalma periyodunu uzatmanın genel olarak senesensi indükleyebileceği ve MKH'lerin bazı biyolojik aktivitelerini kaybedebilecekleri kabul edilir. Bundan dolayı DPKH'lere ilişkin en önemli konulardan biri budur ve genellikle klinikte kullanılan tüm hücrelerde in vitro pasajlama sayısı, in vivoda terapötik etkiye izin vermek için uygundur. MKH'lerin proliferasyon

oranlarının; medyum içeriği (bazal medya ve eklentiler), substrat, ekilen hücrelerin yoğunluğuna fiziksel-kimyasal çevreye (oksijen, çözülmüş karbondioksit oranı, sıcaklık, PH, osmolite ve tampon sistemi) yüksek oranda bağlı olduğu kabul edilmiştir. Olgun diş pulpa hücreleri hiperoksik bir çevreye maruz kalmazken geleneksel hücre kültürlerinde ortama ait oksijen oranı %18'den %21'e çeşitlilik gösterir. Bunun aksine bir dişte oksijenin fizyolojik seviyeleri %3 ile %6 arasındadır. El Alami ve ark. %21 ve %3 oksijen oranına sahip atmosferik basınç şartları altında kültüre edilmiş insan diş pulpa MKH'lerinin proliferasyon oranlarını karşılaştırmışlar ve hücre proliferasyonunu düzenlemede önemli role sahip hücre döngüsü ile ilişkili proteinlerle etkileşebilen oksidatif stres ve NRF-2 gibi antioksidan savunma genlerinin aktivasyonu ile proliferasyonun düştüğünü rapor etmişlerdir. Bu yüzden normal hücre kültürü oksijen konsantrasyon şartları altında gelişen DPKH'leri canlı hücrelerin yüksek sayısına erişilmesine izin vermez (47).

2.2.6. Dental Pulpa Kök Hücre Uygulamaları ve Doku Tamiri

Dental pulpa ortopedik, ağız ve maksillofasiyal rekonstrüksiyon için potansiyel bir kök hücre kaynağıdır. Bugüne kadar insan dental pulpa hücreleriyle yapılan çalışmaların çoğunda üçüncü molarlardan, kesici dişlerden veya SHED hücrelerinden izole edilen DPKH'ler kullanılmıştır. Transplante edilen bu hücrelerin mineralize doku, dentin yapıları, periyodontal ligament veya dental pulpa oluşturabildikleri rapor edilmiştir. Bu hücrelerin periyodontal doku, osteonekrozun neden olduğu kemik hasarı, karaciğer, nöronal ve iskelet kas dokusu ve diğer dokular arasındaki kan damarları ve yanıkların neden olduğu deri lezyonlarını rejenere etmede etkili oldukları gösterilmiştir (31,48,49,50,51,52).

2.3. Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaştırılması

Kemik hastalıkları ve dolayısıyla kemik dokusunun onarımı bugünün tıbbında önemli bir yer tutar. Öyle ki, Dünya Sağlık Örgütü 2000-2010 yılları arasındaki 10 yılı “Kemik ve Eklem On Yılı” olarak duyurmuştur. Kemik dokusunun yenilenmesine gereksinim duyan hastalıklar arasında travma, tümör, enfeksiyon, dejeneratif kemik hastalıkları, doğumsal anomaliler ve periprstatik kemik kayıpları gelir. Bunun yanı sıra spinal füzyonlarda, eklemlerin revüzyon amaçlı girişimlerinde, düzeltici osteotomilerde, yüz ve maksilla cerrahisinde kemik greftleri gerekir. Otolog kemik grefti uygulamalarında

sıklıkla osteojenik büyüme faktörlerine, kemik yapımını gerçekleştirecek hücelere ve birtakım destek malzemelerine gereksinim duyulur. Ancak otolog doku miktarının sınırlı olması, ağrı, enfeksiyon, pelvis kırıkları ve nörovasküler yaralanmalar otolog uygulamaları kısıtlar. Dolayısıyla yetersiz kemik iyileşmesi en büyük sorunlardan birisidir. Bu bağlamda hücrel tedavi amacıyla MKH'den yararlanmak son yıllarda önemli bir seçenek olarak görülmektedir. MKH'ler osteoblastlara farklılaşırken fibroblast benzeri yapılarını değiştirerek kübik şekle dönüşürler ve hücreler arası matriks elemanlarından özellikle tip 1 kollajeni sentezlerler. Daha sonra çöküntü ve nodüller oluşturarak kemikleşmenin başlangıcını ortaya çıkarırlar. Alizarin kırmızısı ve von Kossa boyama yöntemleriyle gösterilen bu yapılar mikroskopik ölçeklerden makroskopik ölçeğe doğru büyürler. Artan alkalın fosfataza (AF) koşul olarak kalsiyum birikimleri de ortaya çıkar. AF'nin enzim etkinliği ve kalsiyum artışı kolorimetrik analizlerle ölçülebilir (53). Osteojenik farklılaşma moleküler düzeyde bir takım hormonların birbiri arasındaki etkileşimi ve transkripsiyon faktörlerinin etkisi ile gerçekleşir. Runt ile ilişkili TF2 (Runx2) promotör bölgelerine bağlanarak kemiğe ilişkin genlerin ifadesini artırır. Bunların başında osterix (Osx), kollajen tip 1 α -1 (Col1a1), osteocalcin (OC) ve kemik sialoprotein (BSP) gelir. Genellikle Runx2, AF, Col1a1, TGF β 1, osteonectin(ON) ve BMP2 osteoblastik farklılaşmanın erken belirteçleri olarak kabul edilirken osteonectin (ON) ve osteopontin (Opn) daha ileri süreçlerde ifade edilir (54). Osteojenik farklılaşmada kullanılan klasik yöntem MKH'nin tek tabaka kültürlerini deksametazon, β -gliserofosfat ve askorbik asit ile haftalarca kültüre etmektir. Bunlara ek olarak D3 vitamini ve TGF β da kullanılır. Osteojenik eklentiler içermeyen bazal kültür ortamı ile inkübe edilen MKH'de AF düzeyi artsa da hücre dışı ortamda mineralizasyon ve kollajen sentezi gibi önemli işlevsel dönüşümler gözlenmez (55). Deksametazon, bir sentetik glukokortikoid olarak MKH'nin osteojenik farklılaşması için gerekli biyomoleküllerin başında gelir. Her ne kadar deksametazonun kök hücre farklılaşmasındaki etki mekanizması tam olarak bilinmese de transkripsiyon etkinliğini artırdığı düşünülmektedir. Öte yandan deksametazon β -catenin benzeri bir molekül olan TAZ (PDZ bağlayan motifi olan transkripsiyon eş etkinleştiricisi)'ın ve α 5-integrinin ifadelerini artırır. Bu iki eleman Runx-2 bağımlı gen ifadesini artırarak osteojenik dönüşümü gerçekleştirir (56). Walsh ve ark. MKH'yi deksametazonun 10 pM-1 μ M arasındaki dozlarında 28 gün boyunca inkübe etmiş ve kritik derişimin 10 nM olduğunu saptamıştır (57). Deksametazonun

fizyolojik dozlarının üzerine çıkılmasıyla osteoblastik etkinlik baskılanır ve glükokortikoide bağlı osteoporoz ortaya çıkar (58). Ayrıca deksametazon kollajen sentezi üzerine olan negatif etkisiyle hücre çoğalmasını olumsuz yönde etkiler. Bu etki, ortama askorbik asit eklenmesiyle giderilir. Bir başka deyişle, askorbik asit deksametazonun kollajen sentezi üzerine olan olumsuz etkilerini maskeler. 100 nM deksametazon ile 5 hafta süresince inkübe edilen MKH'nin SCID farelere verilmesi, kemik dokusu yapımını inkübe edilmeyenlere oranla önemli ölçüde artırır (53). MKH'nin in vitro ortamda tam anlamıyla kemik yapımını gerçekleştirmesi için en az 3 hafta süresince deksametazon ile inkübe edilmesi gerekir (56,57,58). In vitro dexamethasone pretreatment enhances bone formation on human mesenchymal stem cells in vivo. Hücreler arasındaki matriksin mineralizasyonu için kalsiyum ve fosfat iyonlarının varlığı yaşamsaldır. Enzimatik olarak AF tarafından hidrolize edilen β -gliserofosfat, inorganik fosfat kaynağı olarak görev yapar (59). Osteoblast benzeri hücrelerin β -gliserofosfat ile kültüre edilmesi matriks minerallerinin yapımına, laktat oluşumuna, AF etkinliğinin, protein ve fosfolipid sentezinin artmasına neden olmakta, bu da osteojenik uyarımı başlatmaktadır (60). İn vitro osteojenik farklılaşma için kullanılan hücrelerin β -gliserofosfat dozu 5-10 mM'dir (59,60). Askorbik asit (C vitamini) kollajen sentezinde prolin ve lizin aminoasitlerinin hidroksilasyonunda bir kofaktör olarak görev yapar. Kollajen bilindiği gibi vücutta en çok bulunan proteindir. Askorbik asitin olumsuz yönü kültür ortamında sabit düzeyde tutulamamasıdır. O nedenle C vitamininin uzun etkili şekli olan askorbik asit 2-fosfatın kullanımı tercih edilir ki, bu kültür koşullarında daha uzun süre etki göstermeyi başarır. Askorbik asitin varlığında hücre döngüsü ve mitoz ile ilişkili genlerin ifadesi artarken askorbik asitin yokluğunda AF etkinliği azalır, kalsiyum birikimi baskılanır (61). Askorbik asitin bu mitojenik etkisi büyüme faktörlerinin biriktiği bölge olan hücre dışı matriksini artırmasıyla veya doğrudan mitojenik yolları uyarmasıyla olur. Kollajenlerin olmadığı durumlarda integrin sinyalleri olumsuz etkilenerek hücre içinde protein kinaz etkisiyle ortaya çıkan mitojenik etki kaybolur. Askorbik asitin kullanım dozu 50-500 μ M arasındadır. Aşırı dozda uygulandığında hücrelerarası ortamda aşırı kalsiyum okalat kristallerinin ortaya çıkması dikkat çekicidir (61). D3 vitamini sekosteroid bir hormon olarak osteoblast işlevleri için yaşamsal önemdedir. Etkin biçimi olan $1\alpha,25$ -dihidroksi vitamin D3 hücre döngüsünde G1-S evresi geçişini engelleyerek hücre çoğalması üzerinde negatif etki gösterir, böylece çoğalmanın engellenmesiyle osteojenik farklılaşma uyarılmış olur (62).

Ayrıca hücre zarı üzerindeki özgün reseptörüne bağlanarak c AMP yolağı üzerinden kalsiyum kanallarının açılmasını sağlar, çekirdek zarındaki reseptörü üzerinden kemik ile ilişkili TF'nin ve osteojenik farklılaşma belirteci olan proteinlerin ifadesini artırır (62). Yukarıda özetlenen dört maddeye ek olarak özellikler TGFβ'nın kemikte bulunan izoformu olan TGFβ1 hücre büyümesini uyararak kemik yapımında rol alan kollajen ve kollajen olmayan birçok matriks bileşeninin sentezinin düzenlenmesini sağlar (63). TGFβ1, Runx-2'nin ifadesini artırırken ileri evrelerde osteoblast farklılaşmasını baskılar (63).

2.4.Koşullu Besiyeri ve Osteojenik Farklılaşma

Mezenkimal kök hücrelerin in vitro ortamda osteojenik farklılaşmaları 3 evre içine ayrılır (64). İlk evre 1-4 gün arası sürer ve hücre sayısı bu evrede maksimuma ulaşır. Bunu takiben 5-14 gün arası süren erken hücre farklılaşması meydana gelir. Bu evre, alkalın fosfatazın transkripsiyon ve protein ekspresyonu ile karakterize edilir (65). İkinci evre, AF'nin baştaki ekspresyon seviyesinin azalması ile başlar. Bu evrede; matriks içerisinde mineral depolanır ve erken evrede kollajen tip 1 ekspresyonu gözlenir (66). Son evre ise 14-28 gün arası sürer. Bu aşamada, kalsiyum ve fosfat birikimini takiben OCN ve OP genlerinin yüksek ekspresyonu saptanır (64,67). Kök hücreler, sekretom olarak bilinen trofik ve immünmodülatör faktörlerin geniş bir repertuarını sekerete ederler (68). Koşullu besiyeri; kültüre edilmiş hücrelerden salınan çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler, eksozomlar, farklılaşmayı düzenleyici faktörler, mikro RNA'ları taşır ve ortamda bulunan diğer hücrelerin farklılaşma yetilerini etkileyebilir (69, 1). Ekstrasellüler matriks içine salınan eksozomlar hücrelerarası iletişimin araçları olarak fonksiyon yaparlar (1). Yuji Ando ve ark. (2014) serum içermeyen insan MKH koşullu besiyerinin yüksek hızlı distraksyon osteogenezis fare modelinde; kallus oluşumu, osteoblast farklılaşması, damarlanma ve hücre çoğalmasını artırdığını, apoptoz ve iltihabı ise inhibe ettiğini bildirmişlerdir (70). Carbone A. ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada kültüre edilmiş kondrosit ve dental pulpa kök hücrelerinden elde etikleri koşullu besiyerini adipoz kaynaklı kök hücreler üzerine uyguladıktan sonra bu hücrelerin glikozaminoglikan ve mineralize matriks ürettiğini gözlemlemişlerdir (71). Heino ve ark. osteosit koşullu besiyerinin fare kemik iliği osteoblastlarının alkalın fosfataz aktivitesi ve osteokalsin ekspresyonunda, kemik oluşumu ve hücre çoğalmasında önemli bir artış meydana getirdiğini 2003 yılında yaptıkları çalışmada

göstermişlerdir (72). Benzer bir çalışmada Ilmer ve ark. 2009'da insan osteoblast koşullu besiyerinin insan MKH'ları üzerinde alkalın fosfataz, kemik sialoprotein 2, leptin reseptörü, dekorin ve katepsin K gibi erken osteojenik belirteçleri indüklemeye etkili olduğunu bildirmişlerdir (73). Jin Z. Ve ark. 2016 yılında insan periyodontal ligament hücrelerini 10 ve 15 günlük osteojenik indüklenmiş kemik iliği stromal hücrelerinden elde ettikleri koşullu besiyerinde kültüre ettiklerinde proliferasyonun ve osteogenezin önemli derecede hızlandığını göstermişlerdir. Osteojenik indüklenme uygulanmayan gruptan elde edilen koşullu besiyerinin ise böyle bir etkisi gözlemlenmemiştir (74). Lee TJ. ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları benzer bir çalışmada insan MKH'larından elde edilen koşullu besiyeri ile insan embriyonik kök hücrelerini kültüre etmişler ve bu grubu koşullu besiyeri uygulanmayan grup ile karşılaştırdıklarında; osteojenik ve kondrojenik farklılaşmanın hızlandığını, ALP, OPN, ON, OC gibi osteojenik farklılaşma genlerinin ekspresyon düzeylerinin arttığını ve ortamda kalsiyum birikiminin hızlandığını bildirmişlerdir (69). Wang KX. ve ark. ise 2015 yılında insan umbilikal kord MKH kültüründen topladıkları koşullu besiyerinden izole ettikleri sekretomları, insan kemik iliği MKH kültürüne ilave etmişler ve osteojenik indüksiyon besiyeri olmaksızın bu hücrelerde osteojenik farklılaşmanın başladığını, kalsiyum birikiminin kayda değer biçimde arttığını ve yine osteogenez ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin yükseldiğini kaydetmişlerdir (1). Yu F. ve ark. 2011 yılında insan periferik kanından osteoklast benzeri hücreler elde ettiler . Bu hücrelerden topladıkları koşullu besiyerini fibroblastlar üzerine uyguladıklarında fibroblastların alkalın fosfataz ve mineralizasyon seviyelerinin önemli derecede arttığını göstermişlerdir (2). Literatürde hipotezimizi destekleyen bu olumlu çalışmalar rapor edilmesine rağmen; MKH'ların osteojenik olarak farklılaştırılıp, her 3 günde bir toplanan farklılaşmış hücrelerin koşullu medyumları ile MKH' lerin osteogeneze yönlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürdeki bu eksikliği gidermek için bu tez çalışmasında; DPKH'lerin osteojenik yönde indüklenmesi, farklılaşmış hücrelerden 3'er gün aralıklarla koşullu besiyerlerinin toplanması ve farklılaşmamış DPKH'ler üzerine uygulanması sonucu bu hücrelerin osteojenik yönde farklılaşması değerlendirildi.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar, Antikorlar, Primerler ve Kitler Listesi

- Dispaz (*Stem Cell Technologies-07913*)
- Kollajenaz tip 1 (*Serva-17454*)
- %20 FBS (Fötal Bovine Serum) (*Biological Industries 04-001-1A*)
- 100 IU/ml penisilin-100 µg streptomisin (*Biological Industries- 03-031-1C*)
- L-Ascorbik acid 2-phosphate sesquimagnesium (*Sigma-A8960*)
- Apha MEM with nucleoside (*Biochrom-F0915*)
- PBS (Phosphate-buffer-saline) w/o Ca, Mg (*Biological Industries 02-023-1A*)
- % 0,25 Tripsin- EDTA (*Biological Industries 03-046-5B*)
- PBS (Phosphate-buffer-saline) with Ca, Mg (*PAA - H15-001*)
- CD44 Primer antibody
- CD45 Primer antibody
- CD73 Primer antibody
- CD90 Primer antibody
- CD105 Primer antibody
- Negatif Yüzey belirteç kokteyli
- % 4 Paraformaldehid
- % 0,3 Triton x100

- Mouse-anti keçi sekonder antibody
- DAPI
- β - aktin gen ekspresyonu için primer
- Trizol
- Kloroform
- İzopropanol
- % 70 Etanol
- Nükleazsız su
- Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche)
- Ters transkriptaz
- Adipojenik indüksiyon besiyeri
- Adipojenik devam besiyeri
- Adipo Red
- % 0,1 Jelatin
- Osteojenik farklılaşma besiyeri
- Alizarin Red
- % 10 Formalin
- 100mM Tris
- 2 mM glutamin
- Muse Hücre Sayım ve Canlılık Kiti MCH100102
- Muse Mitopotential Assay Kit
- Kondrojenik farklılaştırma kiti (Lonza PT-4121)
- 10 ng/ml TGF-B3 (*Lonza PT-4124*)
- %8,4 Sodyum-Bikarbonat (*Gibco 25080-094*)
- Safranin O (*Sigma-S2255*)

- Prolong Gold antifade reagent (*Invitrogen-P36930*)
- RUNX2 gen ekspresyonu için primer
- Osteopontin gen ekspresyonu için primer
- Osteokalsin gen ekspresyonu için primer
- β - aktin gen ekspresyonu için primer
- Gen ekspresyonu için Roche Master Mix
- CryoSure-DMSO (*WAK-Chemie Medical GmbH, D-61449*)

3.2. Kullanılan Cam, Plastik ve Sarf Malzemeler Listesi

- 5 ml disposable serolojik pipet
- 10 ml disposable serolojik pipet
- 25 ml disposable serolojik pipet
- 10 μ l mikropipet tip
- 100 μ l mikropipet tip
- 200 μ l mikropipet tip
- 1000 μ l mikropipet tip
- 1.5 ml mikrosantrifüj ependorf tüp
- 2 ml mikrosantrifüj ependorf tüp
- 0.2 ml PCR tüp
- 0.5 ml mikrosantrifüj ependorf tüp
- 15 ml Polipropilen falcon tüp
- 50 ml Polipropilen falcon tüp
- 55 cm² Hücre kültür petri kabı
- 6 kuyucuklu kültür kabı
- 12 kuyucuklu kültür kabı
- 24 kuyucuklu kültür kabı

- 96 kuyucuklu kültür kabı
- 25 cm² Hücre kültür flaskı
- 75 cm² Hücre kültür flaskı
- 175 cm² Hücre kültür flaskı
- 225 cm² Hücre kültür flaskı
- Cam Şişe
- Beher
- 5 ml enjektör
- 10 ml enjektör
- 20 ml enjektör
- 50 ml enjektör
- Steril eldiven
- 70 µm naylon filtre
- 0,22 µm enjektör filtresi
- 0,45 µm enjektör filtresi
- Bisturi ucu
- Lam
- Lamel
- Thoma Lamı
- Steril tirnerf

3.3. Kullanılan Aletler ve Cihazlar Listesi

- Cerrahi El Aletleri
- Pipette Aid (Gilson)
- Mikropipet seti (Gilson, Eppendorf)
- -80 C° Derin dondurucular 720 Lt (Sanyo Panasonic VIP/ Binder)

- CO₂ İnkübatörleri (Sanyo, Panasonic)
- Multiplate Reader Promega Glomax
- Termocycler PCR Cihazı (C1000Biorad)
- Steril Kabin Lamin Air Class II (Clean Air)
- Soğutmalı Santrifüj (Becman Coulter)
- Kar-Buz makinası (Scotman AF 100)
- Termomikser Ependorf
- Açılır başlık Sanrifüj (Hetich 380)
- İnvirt mikroskop (Nicon Eclips Ti Floresan ataçmanlı)
- Leika DMI 3000 Mikroskop
- ELGA Pure Pack saf su sistemi
- pH metre (Hanna)
- Agaroz jel elektroforez cihazı (Thermoscientific)
- Buzdolapları (Sanyo, Siemens)
- Hassas terazi (Sartorius Bp100S)
- Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001)
- Mikrofüj (Sigma aldrich Sogutmalı / Hetich 220)
- Çalkalamalı inkübatör
- Muse Cell Analyzer
- -196°C Sıvı azot tankı
- Vortex
- Light cyciler-480 (Roche)
- Bilgisayarlar
- FACS Canto 2 Flow Sitometri Cihazı (BD, Biosciences)
- Çeker ocak

- Su banyosu
- Isıtıcı tabla

3.4. İnsan Diş Pulpa Kaynaklı Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü

DPKH Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezinden (GENKÖK) temin edildi. Hücreler %20 Fötal Bovine Serum (FBS) (*Biological Industries, Israel Beit Haemek*) ve 100 IU/ml penisilin-100 µg streptomisin içeren askorbat-2-fosfat ile takviye edilmiş nükleozidli Alpha MEM (*Biochrom, America*) içerisinde kültüre alındı. Hücrelerin yoğunluğu %70-80 olduğunda pasajlandı. Pasajlama için hücreler Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen PBS (Phosphate Buffer Saline) ile yıkandı ve % 0.25 Trypsin- EDTA solüsyonu ile 37°C'de 3 dk inkübe edildi. Trypsini inhibe etmek için en az iki katı kadar serumlu büyüme medyumunu ilave edildi. Daha sonra hücreler 350 x g'de 5 dk santrifüj edilerek pellet oluşması sağlandı. Süpernatant atılarak hücreler medyum ile resüspanse edildi ve Thoma lamında sayıldı. Daha sonra 75 cm² doku kültür flasklarında 1x10⁶ hücre/flask yoğunlukta olacak şekilde ekildi. 10-14 günlük periyotta her üç günde bir büyüme medyumunu değiştirildi ve hücreler konfluensiye ulaştıkça pasajlandı.

3.5. İnsan Diş Pulpa MKH Karakterizasyonu

3.5.1. Akım Sitometri

Dental pulpa kök hücrelerinin kültürde büyüdüktan sonra fenotipik özelliklerini sürdürdüklerini doğrulamak için farklılaşmamış kök hücreler akım sitometri analizine tabi tutuldu. 3. pasaj (P3) sonrası kök hücreler bulunduğu flasklardan tripsinizasyon ile kaldırıldı ve 2 defa Ca^{2+} ve Mg^{2+} içeren PBS ile yıkandı. CD44, CD73, CD90, CD105 ve Negatif yüzey markır kokteyli (*BD Biosciences, San Diego, USA-562245*) antikorlarını çalışmak için hücreler 1x10⁶ hücre/ml yoğunlukta Ca^{2+} ve Mg^{2+} içeren PBS içerisinde tüplerde toplandı. Hücreler %4 paraformaldehit ile fikse edildi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler Ca^{2+} ve Mg^{2+} içeren PBS ile iki defa yıkandı. Hücreler üzerine 1:100 dilüsyon ile CD44, CD73, CD90, CD105 ve Negatif yüzey markır kokteyli antikorları eklendi ve 1 saat karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. İnkübasyon sonrası primer antikorlar ile muamele edilen hücreler santrifüj edildi ve sekonder antikorları eklendi. Hücreler 30 dk karanlıkta işaretli sekonder

antikor ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler 2 defa yıkandı. FACS Canto II (BD Biosciences, San Diego, USA) cihazı kullanılarak akım sitometri gerçekleştirildi.

3.5.2. İmmünofloresan Boyama

Alternatif yöntem olarak karakterizasyon esnasında, immunboyama da gerçekleştirildi. İmmunfenotipleme yapılan hücreleri boyama için örnekler, PBS ile kısa bir süre durulandı ve soğuk metanolde 10 dakika fiks edildi ve sonra tamamen kurumaya bırakıldı. 37 derecede 30 dk PBS de immunoglobulinlerin nonspesifik bağlanmasını bloke edilmesi amacıyla inkübe edildi. PBS ile hücreler üç kez yıkandıktan sonra hücreler primer antikorlar ile +4 derecede tüm gece inkübe edildi. Sonra 3 kez PBS ile tekrar yıkanarak FITC ve Texas kırmızısı ile etiketlendikten sonra uygun sekonderleri ile karanlıkta 25 dk inkübe edildi. Sonra 3 kez PBS ile yıkandı ve hücreler DAPI içeren destek besiyeri ile muamele edildi.

3.5.3. Koloni Oluşturan Üniteler- Fibroblastlar (CFU-F)

Kök hücrelerin klonojenik özelliklerini göstermek amacıyla CFU-F assay yapıldı. Hücreler 50 hücre/cm², 100 hücre/cm² ve 150 hücre/cm² olacak şekilde petri kaplarına ekildi ve 2 hafta MKH büyüme besiyerinde kültür edildi. İki hafta sonunda hücreler kristal viyole ile boyanarak meydana gelen koloniler gösterildi.

3.5.4 Farklılaşma Testleri

Hücrelerin MKH olduğunu göstermek amacıyla osteojenik farklılaşmanın yanısıra adipojenik ve kondrojenik farklılaşmasına da bakıldı. Adipojenik farklılaşma için MKH'ler 3-izobütil-1- metil ksantin, İnsülin ve İndometazin ile takviye edilmiş besiyeriyle 2 hafta inkübe edildi ve oluşan yağ damlacıkları adipo red assay (Lonza, MD, USA) ile boyanarak gösterildi. Kondrojenik farklılaşma için ise deksametazon, insulin transferrin, sodyum selenit, askorbik asit, prolin, sodium pirüvat içeren besiyeri ile inkübe edildi. Ayrıca besiyerine TGFβ3 takviye edildi. Bu bileşenleri içeren farklılaşma besiyerinde hücreler 15 ml polipropilen tüplerde 250 000 hücre olacak şekilde pellet kültür halinde 21 gün inkübe edildi. 21. günün sonunda pellet parafine gömülüp 5 µm kalınlığında kesitler alınarak safranin-O ile boyanarak kondrojenik farklılaşma gösterildi.

3.6. Osteojenik Medyum ile Farklılaşmanın İndüklenmesi

Pasaj 3'deki iDPKH 'ler 5×10^3 hücre/cm² olacak şekilde jelatinle kaplanmış 6 well plate'lere ekildi. Hücreler 24 saat %50-70 konfluensiye gelene kadar standart büyüme besiyerinde inkübe edildi. Besiyeri, %10 FBS, %1 penisillin-streptomisin, 10 mM L-glutamin, 50 µM L-askorbik asit, 10 mM β-gliserofosfat ve 100 nM deksametazon içeren osteo indüksiyon besiyeri ile değiştirildi. Her 3 günde bir osteojenik indüksiyon besiyeri değiştirilerek 14 gün inkübe edildi. Farklılaşma, alizarin red boyama ve RUNX2, OCN ve OP için gen ekspresyonu ile değerlendirildi.

3.7. Koşullu Besiyerinin Farklılaşmamış Mezenkimal Kök Hücreler Üzerine Uygulanması

iDPKH ler osteojenik farklılaştırma besiyeri ile 14 gün farklılaştırıldıktan sonra, farklılaşma besiyeri kesildi , bu hücreler üzerine bazal besiyeri (serum içermeyen) eklenerek her 3 günde bir koşullu besiyeri ve hücre toplandı (grup 1) ve farklılaşmamış hücreler üzerine (grup 2) uygulandı. Kontrol grubu için iDPKH 'ler complete besiyerinde 14 gün boyunca kültüre edildikten sonra besiyeri kesildi, bu hücreler üzerine bazal besiyeri (serum içermeyen) eklenerek her 3 günde bir koşullu besiyeri ve hücre toplandı (grup 3) ve farklılaşmamış hücreler üzerine (grup 4) uygulandı.

Tablo 3.1. Deney Grupları

Grup 1 (POZİTİF KONTROL)	Grup 2 (DENEY)	Grup 3 (KONTROL)
iDPKH + Osteojenik İndüksiyon Besiyeri	iDPKH + Koşullu besiyeri	iDPKH + Standart Besiyeri Kültür

3.8. Senesens Testi için β -Galaktozidaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Osteojenik farklılaşma sırasında kontrol grubundaki (Grup 3) ve koşullu besiyeri uygulanan gruptaki (Grup 2) iDPKH'ler β -Gal ile boyandı ve senesense girip girmediklerine bakıldı. Analizler, 7. ve 14. Günlerde gerçekleştirildi. Deneyler β -Galactosidase assay kit (Promega, USA) ürün protokolüne göre yapıldı. Hücre lizatları 1x raportör lisis buffer (RLB) ile hazırlandı. Her kuyucuğa 150 μ l hücre lizatı eklendi ve daha sonra her kuyucuğa 150 μ l assay 2x buffer takviye edildi. 37°C'de sarı bir renk oluşana kadar reaksiyon inkübe edildi. Daha sonra reaksiyon 150 μ l 1M sodyum karbonat ile durduruldu ve 420nm de absorbans ölçüldü.

3.9. Canlılık Testi

Kontrol grubunda (Grup1) ve koşullu besiyeri uygulanan grupta (Grup4) yer alan iDPKH 'ler 7. Ve 14. Günlerde muse cell analyzer cihazı ile viability&count kiti (Millipore, USA) kullanılarak ürün protokolüne göre canlılık analizine tabi tutuldu. Deneyler 3 tekrarlı gerçekleştirildi ve standart prosedüre göre Muse EasyCyte yazılımı kullanılarak analiz edildi.



Şekil 3.1. Muse Cell Analyzer Cihazı ile Canlılık Aktivitesi Ölçümü

3.10. Mitokondri Aktivitesi

Kontrol grubunda (Grup1) ve koşullu besiyeri uygulanan grupta (Grup4) yer alan iDPKH'lerinde deney sürecinde hücrelerde oksidatif stres ve mitokondriyel depolarizasyon gibi hasar olup olmadığını belirlemek için 7. ve 14. günlerde, muse cell analyzer mitopotential kit (Millipore, USA) kullanılarak mitokondriyal aktivite

değerlendirildi. Deneyler Millipore Muse Mitopotential Assay kit prosedürüne göre 3 tekrarlı çalışıldı ve standart prosedüre göre Muse EasyCyte yazılımı kullanılarak analiz edildi.

3.11. Farklılaştırmanın Değerlendirilmesi:

Çalışmamızda yer alan deney gruplarında osteojenik farklılaşma, alizarin red boyaması (Sigma, USA) ve osteolmage mineralization assay kit (Lonza, MD, USA) kullanılarak gruplar arasında kalitatif ve kantitatif olarak karşılaştırıldı.

3.11.1. Alizarin Red Boyama

7 ve 14. gün sonunda osteojenik farklılaştırılan hücreler üzerinden medyum uzaklaştırıldı. PBS ile bir kez yıkandı. Well başına soğuk %70 lik etanolden 2-3 ml eklendi. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS ile 3 kez yıkandı. Her bir well'e %1 lik Alizarin Red ilave edildi. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Tekrar PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra hücreler mikroskop altında gözlemlendi.

3.11.2. Floresan Tabanlı Mineralizasyon Testi

Osteojenik indüklenmiş hücrelerden toplanan koşullu besiyeri ve kontrol grubu hücrelerinden toplanan koşullu besiyeri ile kültüre edilen grup 2 ve grup 4 hücrelerine 7 ve 14. günlerde floresan tabanlı mineralizasyon testi yapıldı. Mineralizasyonu saptanmaya hazır hücreler, inkübatörden alınarak oda ısısına gelene kadar bekletildi. Kültür besiyeri uzaklaştırılarak hücreler bir kez PBS ile yıkandı. 20 dakika ethanol ile inkübasyon yapılarak hücrelerin fiske olması sağlandı. Fiksasyon sonrası 1X olacak şekilde sulandırılmış yıkama solüsyonu ile 1-2 kez hücreler yıkandı. Her kuyucuğa uygun oranda dilüe edilmiş boya solüsyonu eklendi. 30 dakika boyunca hücreler karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda boya uzaklaştırıldı. Yıkama solüsyonu ile her kuyucuk yaklaşık 5 dakika 3 kez yıkandı. Boyanan mineraller floresan mikroskop altında gözlemlendi.

3.12. Kantitatif Real Time PCR ile Osteojenik Gen Ekspresyon Analizi

Deney gruplarındaki, kontrol hücreleri ve farklılaştırılan hücrelerden 3 günde bir RNA izolasyonu yapıldı ve RUNX2, OCN ve OP gen ekspresyonları β -aktin'e normalize edilerek değerlendirildi. Bu amaçla Roche protokolüne göre kısaca, farklılaştırma gerçekleştirilen 4. pasajdaki 1×10^6 MKH'den Trizol ile total RNA izole edildi.

İzolasyondan sonra RNA konsantrasyonu bir nano drop spektrofotometre kullanılarak 260 nm’de ölçüldü. 1 µg total RNA, oligo (dT) ve random heksamerler ile Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit kullanılarak cDNA’ya ters transkribe edildi. cDNA sentez reaksiyonu RNA izolasyonundan hemen sonra uygulandı ve reaksiyon karışımı 5 µg RNA, 1 mM dNTPs, 0,23 µg primerler, 20 ünite riboblock inhibitör ve 200 ünite M-MuLV ters transkriptazdan oluşmaktadır. RNA primeri ve dNTP karışımı 90 °C’de 1 dk denatüre edildi. Sıcaklık M-MuLV RT enzim plus riboblok inhibitörünün eklenmesinden önce 42 °C ye düşürülüp, Reaksiyon 1 saat 42 °C’de çalıştırıldı. İkincil strand sentezi için bir PCR reaksiyon karışımı (PCR buffer, her dNTP’den 0,2 mM, her primerden 0,5 µM, 1,25 mM MgCl₂, 1,5 Ünite Taq DNA polimeraz, 2 µl birincil strandcDNA) ile gerçekleştirildi. Başlangıç 5 dk 94 °C’de denatürasyon adımı olup daha sonra sıcaklık 54 °C’ye getirilerek primerlerin bağlanması sağlandı. PCR reaksiyonları son olarak 72 °C’de primerlerin uzaması adımı ile son buldu. Deneyler iki defa tekrarlandı.

Ekspresyon aşaması: LightCycler 480 II (Roche) Real-Time PCR cihazında çalışılmıştır.

1. cDNA’sı hazırlanan örnekler (20µl) 80µl Nükleaz Free Water ile sulandırılır. Örnekler ile çalışırken, buz üzerinde olmalarına dikkat edilir. cDNA’dan 5’er µl kullanılır.
2. Her bir çalışılacak gen için mix hazırlanır. B-aktin house keeping gen olarak kullanılmıştır.
3. Tablo 3.2’ deki protokol uygulanıp ekspresyon çalışması için cihaza alınır.

Tablo 3.2. Osteojenik gen ekspresyonu için ekspresyon karışımının hazırlanması

Prob master mix	10µl
Prob gen	1 µl
PCR Grade H ₂ O	4µl

4. Hazırlanan mix multichannel pipet yardımıyla 96'lık plate'ye (Roche) 15'er µl dağıtılır. NTC olarak nükleaz free water kullanılır.
5. Veriler delta ct metodu kullanılarak hesaplanmıştır.
6. Veriler normalize edilmiştir.

Tablo 3.3. Ekspresyonu çalışılan genlere ait bilgiler

Gen Adı	Primer Prob Dizisi
RUNX2	<i>TGCCACCTCTGACTTCTGCAAAGGGCCCAGTTCTGAG</i>
OCN	<i>CCAGCCCTATGGATGTGGTTTTTCAGATTCCTCTTCTGGAGTT</i>
OPN	<i>CGCAGACCTGACATCCAGTAGGCTGTCCCAATCAGAAGG</i>
B-actin	<i>TCCTCCCTGGAGAAGAGCTACGTGGATGCCACAGGACT</i>

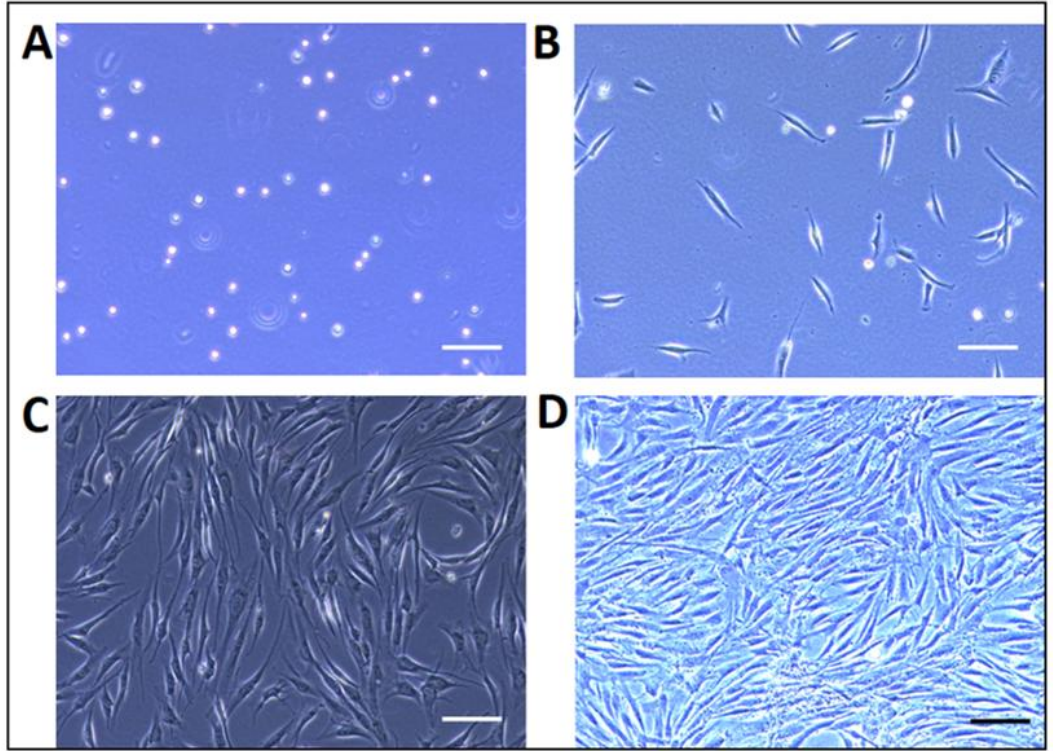
3.13. İstatistiksel Analiz

Gruplar arasında boyamalar, canlılık, senesens ve mitokondri potansiyeli verileri ve mRNA ekspresyon deneyleri sonucunda elde edilen veriler istatistiksel olarak Graph Pad Prism Version 6.00 kullanılarak analiz edildi. $p < 0,05$ olan veriler anlamlı kabul edildi. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ve *** $P < 0.001$.

4. BULGULAR

4.1. İnsan Diş Pulpa Kaynaklı Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü

Kültüre alınan dental pulpa kaynaklı kök hücrelerin kültürün ilk günlerinde yüzeye tutunduğu, ilerleyen günlerde fibroblastik morfoloji gösterdikleri ve koloni halinde çoğaldıkları gözlemlendi. İlerleyen pasajlarda da hücrelerin morfolojilerini korudukları tespit edildi.

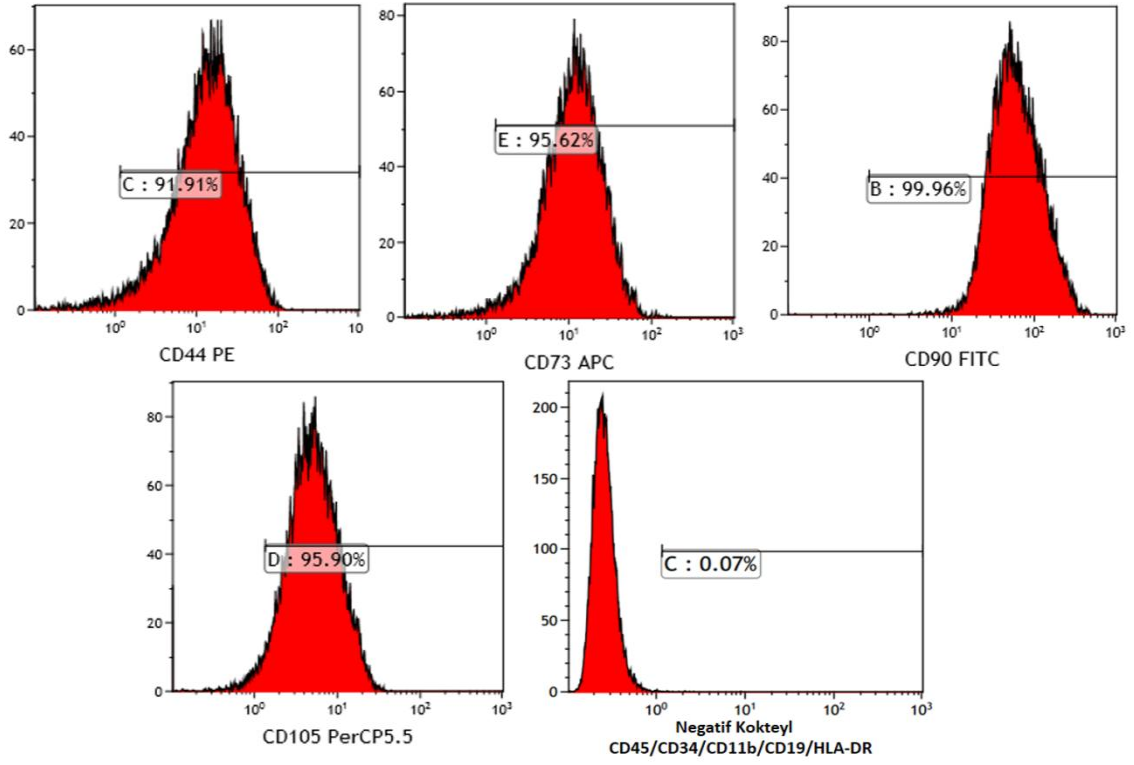


Şekil 4.1. iDPMKH izolasyonu. Primer kültürdeki hücreler (A), Primer kültürde fibroblast benzeri morfoloji gösteren tutunmuş hücreler (B), ekim işleminden 7 gün sonra hücreler (C), ikinci pasaj hücreler (D). Mikroskop objektifi 10x. Skala bar: 100µm

4.2. Akım Sitometri

Mezenkimal kök hücrelerin yüzey markeri ekspresyonları akım sitometri ile değerlendirildiğinde %91.91 CD44, %95.62 CD73, %99.96 CD90 ve %95.90 CD105

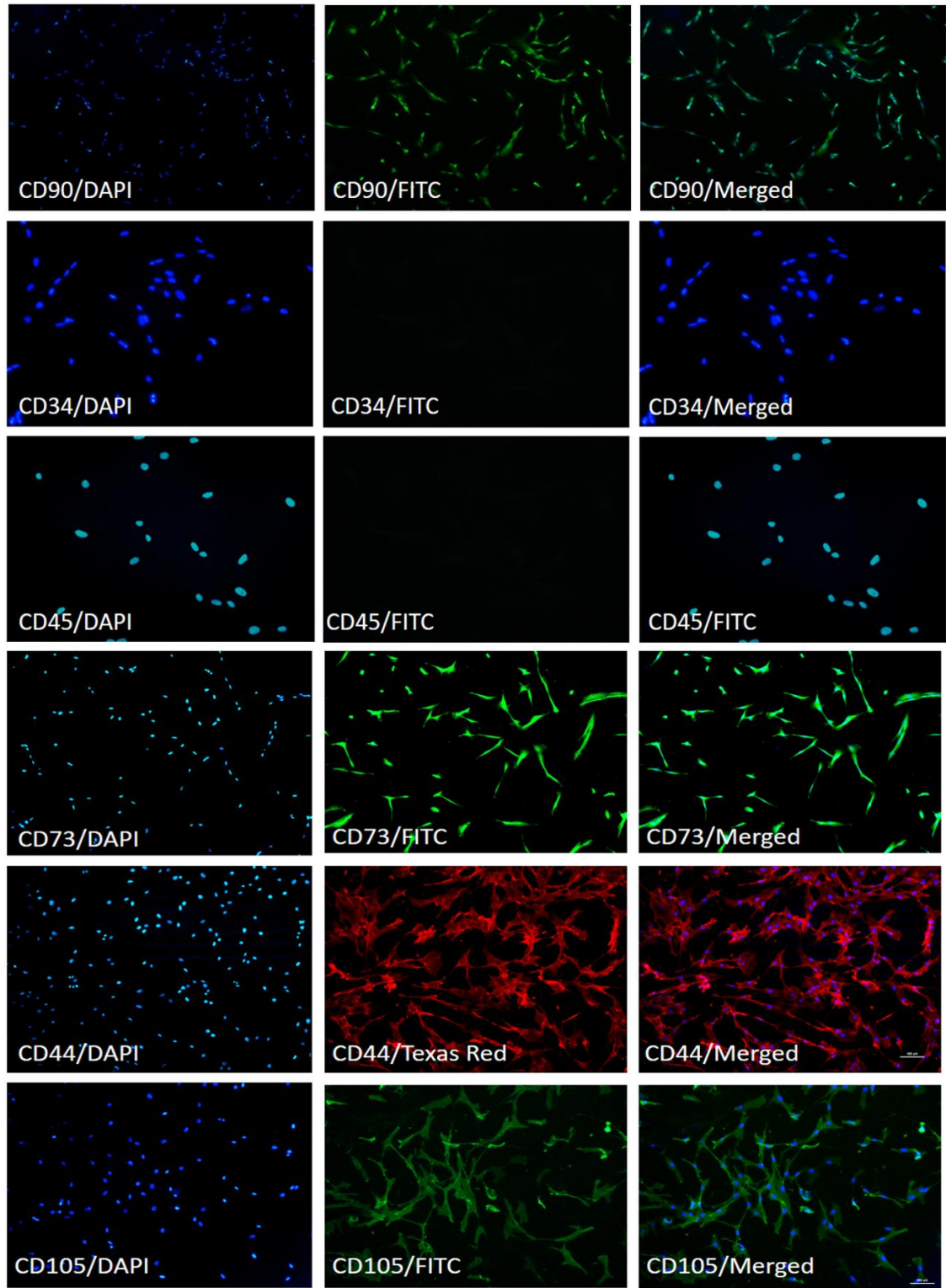
markerlarını pozitif bir şekilde eksprese ettiği CD45, CD34, CD11b, CD19 ve HLA-DR negatif kokteyl markerlarını ise bulundurmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. İnsan dental pulpa kök hücrelerinin akım sitometri ile immünfenotiplendirilmesi

4.3. İmmün-floresan boyama

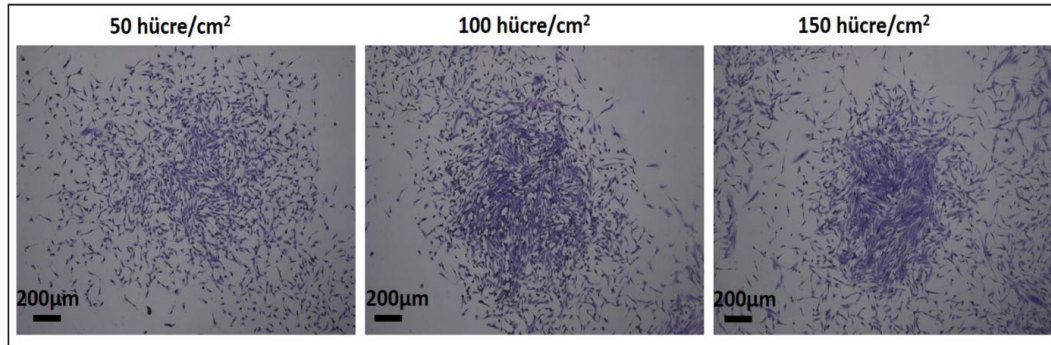
Akım sitometri ile bakılan CD markerlarının pozitifliği immünsitokimyasal boyamalar ile de doğrulanmıştır. Floresan mikroskop altında yapılan gözlemler sonucunda hücrelerin CD90, CD73, CD44 ve CD105 markerlarını güçlü bir şekilde eksprese ederken CD34 ve CD45 açısından negatif oldukları tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. İmmünfloresan boyama. CD73, CD44, CD105, CD34 ve CD45 için mikroskop objektifi 20x, CD90 için mikroskop objektifi 10x, Skala bar: 100µm.

4.4. Koloni Oluşturan Üniteler-Fibroblastlar (CFU-F) Testi

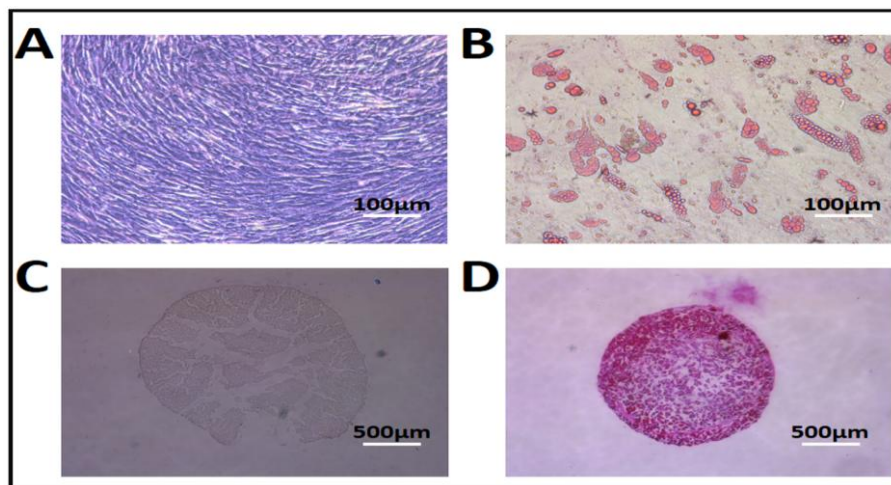
İnsan dental pulpa kaynaklı kök hücreler normal kültür besiyerinde cm^2 'ye 50 hücre olacak şekilde ekildikten 10 gün sonra mezenkimal kök hücrelerin koloni oluşturdıkları ve kolonilerin düzgün morfoloji gösterdikleri, cm^2 'ye 100 ve 150 hücre ekildiğinde ise koloni morfolojisinin bozulduğu, kolonilerin birleştiği gözlemlendi.



Şekil 4.4. Kristal viyole ile boyanan koloniler.

4.5. Farklılaşma Testleri

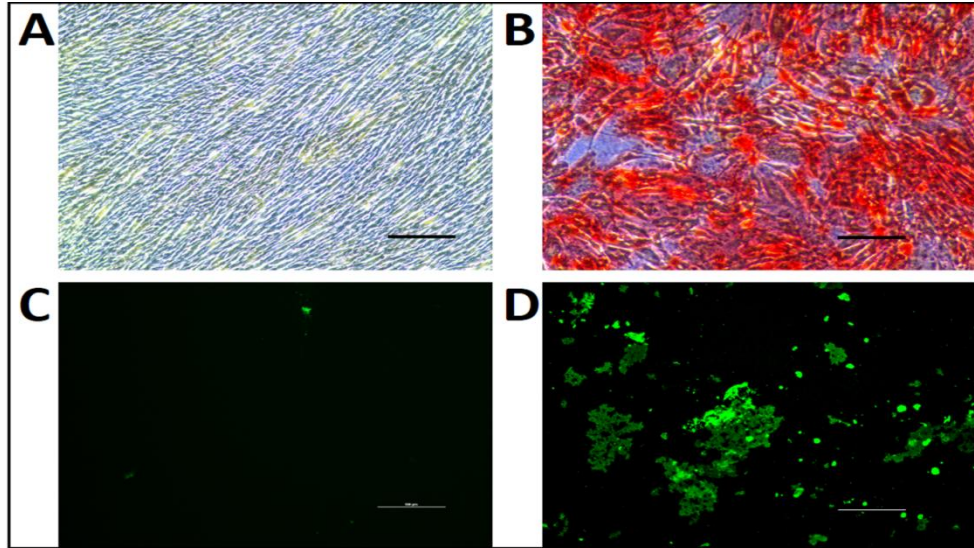
Mezenkimal kök hücreler adipojenik ve kondrojenik farklılaşma besiyerinde indüklendiklerinde hücrelerin sitoplazmalarında lipid damlacıkları biriktirerek yağ hücrelerine farklılaştıkları ve 3 boyutlu pellet kültürlerde bu hücrelerin glikozaminoglikan ve proteoglikanlarca zengin ekstrasellüler matriks ürettikleri sırasıyla adipo red ve safranin O boyamaları ile kırmızı renkte gösterildi.



Şekil 4.5. Standart besiyeri uygulanmış DPKH'lerde adipored boyama (A), Adipojenik indüksiyon besiyeri ile farklılaştırılan DPKH'lerde lipid damlacıklarının adipored boyama ile gösterimi (B), Standart besiyeri uygulanmış DPKH'lerde safranin O boyama (C), Kondrojenik indüksiyon besiyeri ile farklılaştırılan DPKH'lerinde safranin O boyama ile ekstrasellüler matriks alanlarının gösterimi (D). Mikroskop büyütmesi 10x.

4.6. Osteojenik Medyum ile Farklılaşmanın İndüklenmesi

Osteojenik besiyeri ile indüksiyondan sonra kültürün başlarında proliferasyonun iyice arttığı, ilerleyen günlerde çöküntüler halinde nodül ve agregatların oluşmaya başladığı, kültürün son günleri olan 13 ila 14. günlerde ise hücrelerin kalsiyum biriktirdiği gözlemlendi. Hücrelerdeki bu kalsiyum- mineral depozitleri alizarin red ile boyandı. Osteojenik farklılaşmış hücreler ve mineralleşme kırmızı renkte gösterildi. Aynı zamanda osteojenik farklılaşma floresan tabanlı mineralizasyon testi ile kalsiyum depozitlerinin biriktiği floresan mikroskop altında doğrulandı. Bu sonuçlar, osteojenik indüksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini bize gösterdi ve bu aşamadan sonra hücrelerin koşullu besiyeri toplanmaya hazır hale geldiğine karar verildi.

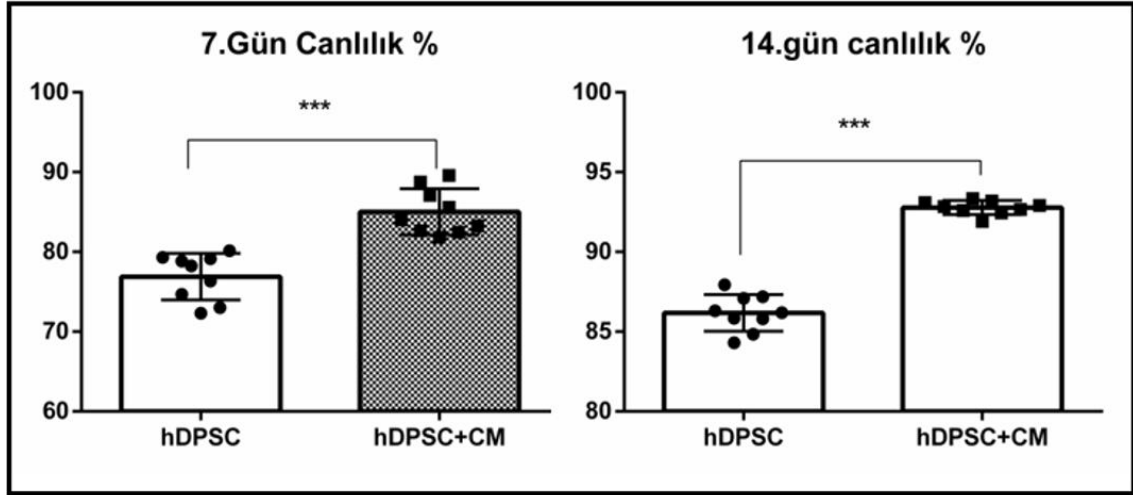


Şekil 4.6. Hücrelerin osteojenik olarak farklılaştırıldığının alizarin red ve floresan tabanlı mineralizasyon boyamaları ile gösterimi. Standart besiyeri ile muamele edilmiş DPKH'lerinin alizarin red boyaması (A), Osteojenik besiyeri ile muamele edilmiş DPKH'lerinin alizarin red boyaması (B), Standart besiyeri ile muamele edilmiş DPKH'lerinin floresan tabanlı boyaması (C), Osteojenik besiyeri ile muamele edilmiş DPKH'lerinin floresan tabanlı boyaması (D), Mikroskop objektifi 20x, Skala bar: 100 µm.

4.7. Canlılık Testi

Farklılaştırılan DPKH'lerin koşullu besiyerleri farklılaşmamış DPKH'ler üzerine uygulandığında, hücrelerin canlılığını olumsuz yönde etkilemediğini göstermek için yapılan canlılık testi sonucunda 7. günde kontrol grubunda $76,89 \pm 0,975$, $n=9$ koşullu besiyeri uygulanan grupta ise canlılık $85,02 \pm 0,959$, $n=9$ ($p<0,0001$) olarak ölçülmüştür. 14. Gün analizleri sonucunda ise kontrol grubunun canlılık oranı

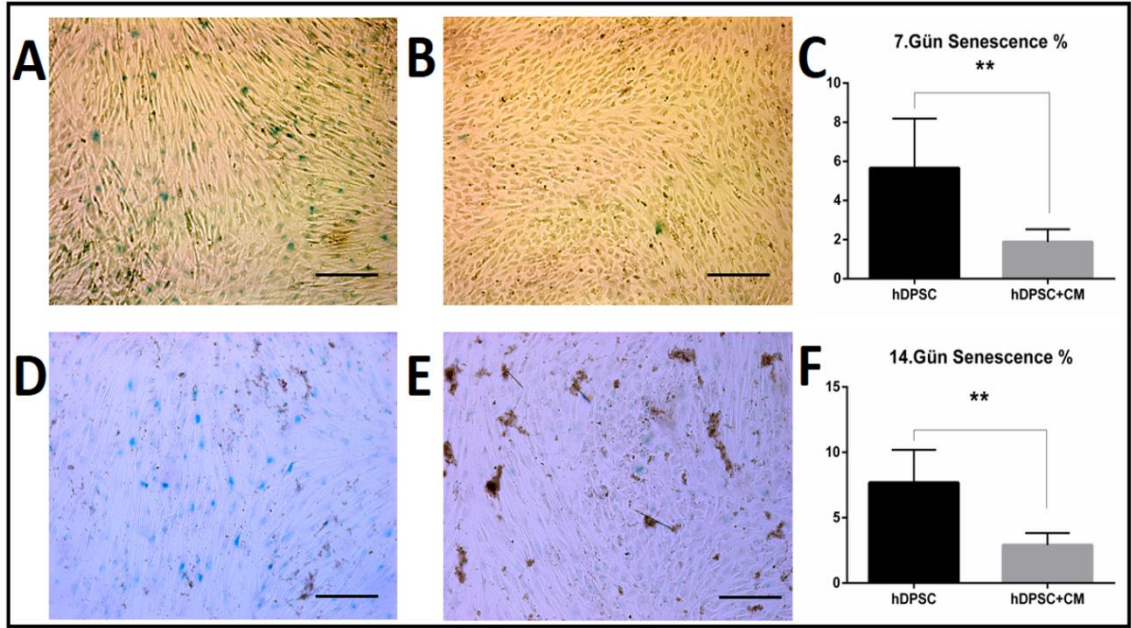
$\%86,17 \pm 0,38$, $n=9$ deney grubunun canlılık oranı ise $\%92,78 \pm 0,147$, $n=9$ ($p<0,0001$) olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. Koşullu besiyeri uygulandıktan sonra muse cell analyzer count and viability kiti ile gerçekleştirilen 7. Ve 14. gün canlılık analiz sonuçları.

4.8. Senesens Testi

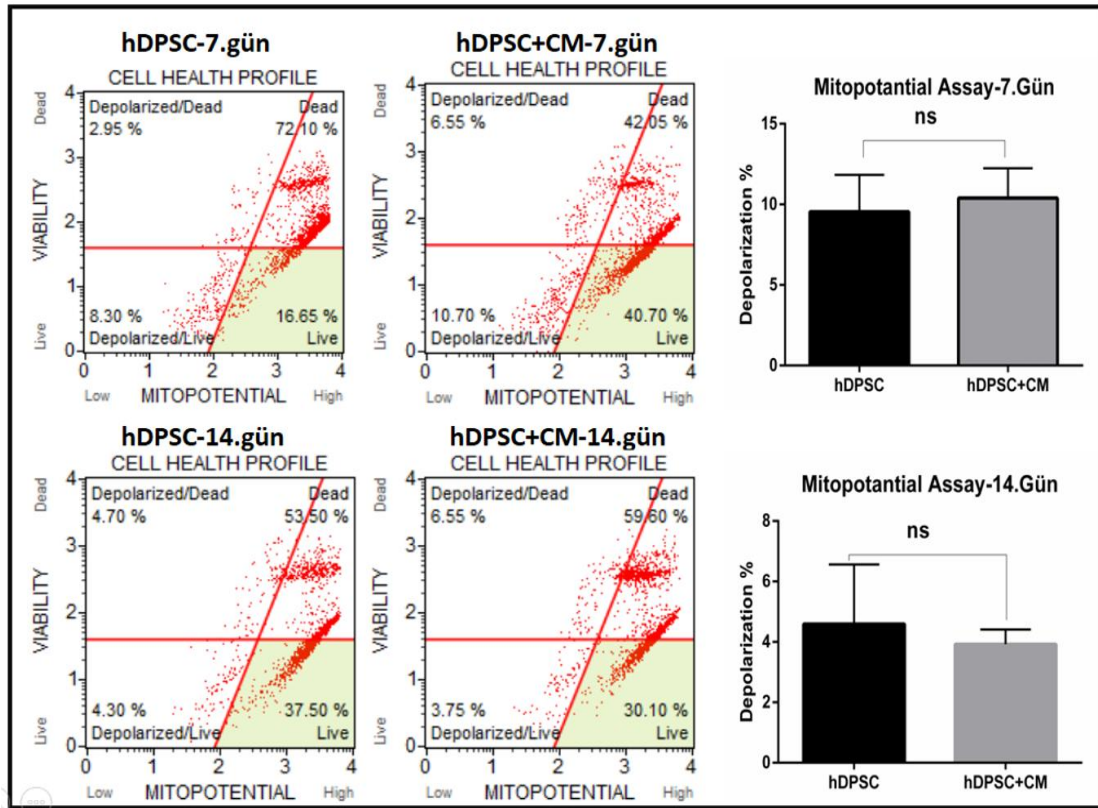
Koşullu besiyerinin hücrelerin senesensini nasıl etkilediğini belirlemek amacıyla yapılan analizler sonucunda 7. günde kontrol grubunun $\%5,65 \pm 1,035$, $n=6$ deney grubunun ise $\%1,875 \pm 0,2686$, $n=6$ β galaktozidaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir ($p=0,0054$). 14. gün analizleri sonucunda ise kontrol grubunun $\%7,68 \pm 1,124$, $n=5$ deney grubunun ise $\%2,909 \pm 0,414$, $n=5$ β galaktozidaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır ($p=0,0040$).



Şekil 4.8. SA- β gal. boyama. 7. gün β gal. aktivitesi gösteren kontrol hücreleri yeşil renkte boyanmış olarak gözükmemektedir (A), 7. gün β gal. aktivitesi gösteren deney grubu hücreleri yeşil renkte boyanmış olarak gözükmemektedir (B), 7. günde kontrol ve deney grubunda senesens değerlerinin karşılaştırılması (C), 14. gün β gal. aktivitesi gösteren kontrol hücreleri mavi renkte boyanmış olarak gözükmemektedir (D), 14. gün β gal. aktivitesi gösteren deney grubu hücreleri mavi renkte boyanmış olarak gözükmemektedir (E), 14. günde kontrol ve deney grubunda senesens değerlerinin karşılaştırılması (F).

4.9. Mitokondri potansiyeli testi

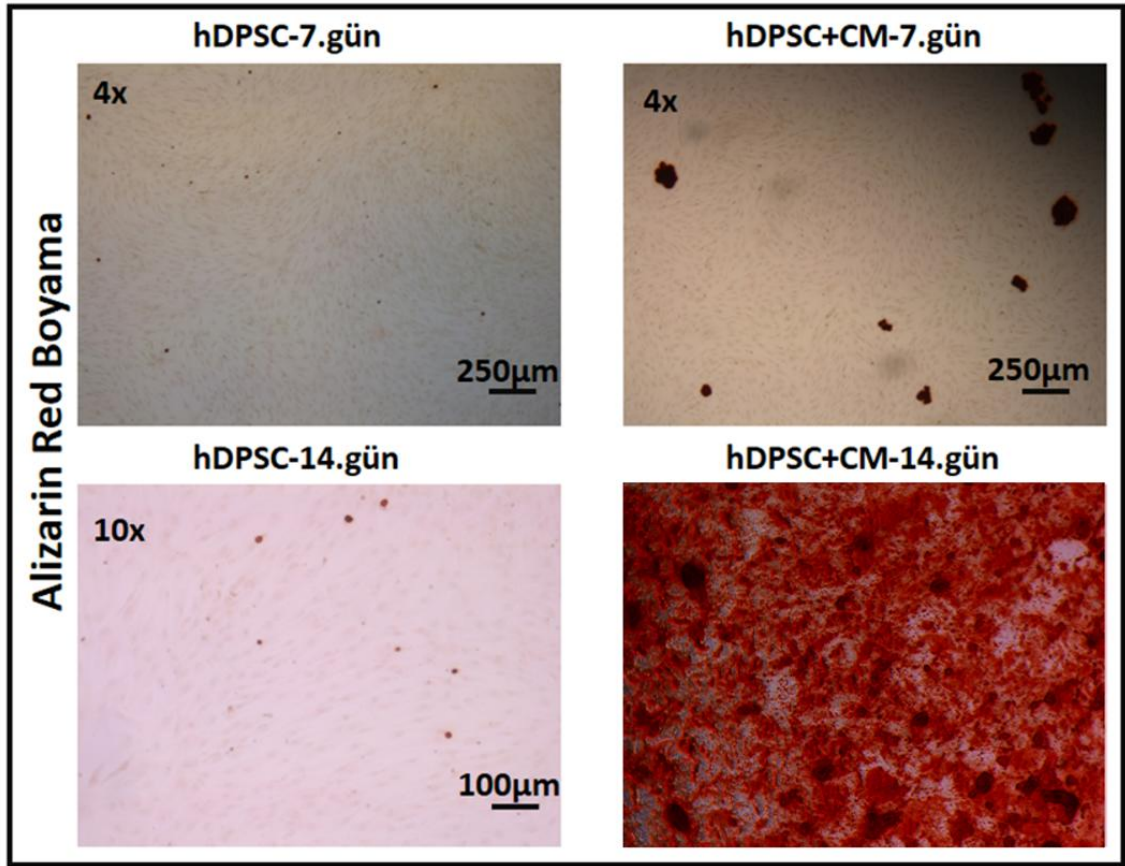
Koşullu besiyeri uygulandıktan sonra 7. günde kontrol grubunda mitokondri depolarizasyonu $9,5 \pm 1.14$, $n=4$ deney grubunda ise mitokondri depolarizasyonu $10,4 \pm 0.62$, $n=9$ olarak ölçülmüştür ($p=0,4865$). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. 14. gün analizlerinde ise kontrol grubunda mitokondri depolarizasyonu $4,59 \pm 0.74$, $n=7$ deney grubunda ise mitokondri depolarizasyonu $3,92 \pm 0.2$, $n=6$ olarak ölçülmüştür ($p=0,4386$). Yine gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 4.9. 7 ve 14. günlerde muse cell analyzer cihazı kullanılarak mitopotential assay kiti aracılığı ile kontrol ve koşullu besiyeri uygulanan hücrelerin mitokondri membranlarında % depolarizasyon değerleri.

4.10. Alizarin Red Boyama

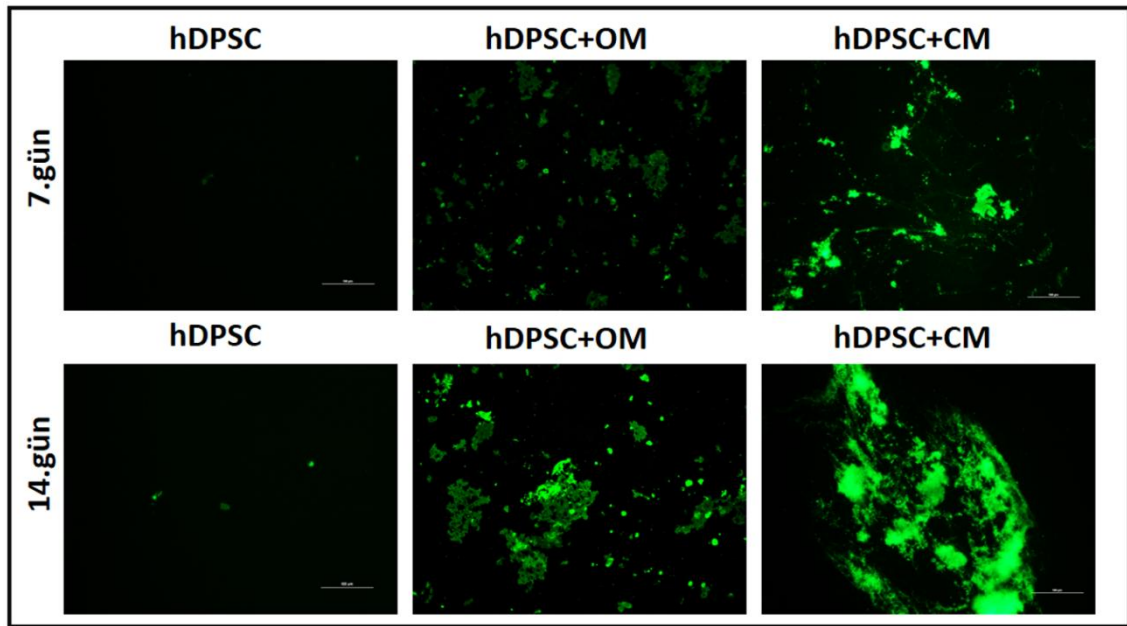
7. gün sonunda koşullu besiyeri uygulanan grupta mineralleşmenin yavaş yavaş başladığı ve nodüller halinde kemik doku agregatlarının oluştuğu gözlenmiştir. 14. Gün sonunda ise koşullu besiyeri uygulanan grupta hücrelerin tamamen osteojenik farklılaştığı ve kalsiyum depozitleri biriktirdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. Kontrol ve deney gruplarında 7 ve 14. gün sonunda osteojenik farklılaşmanın alizarin red boyama ile değerlendirilmesi. Kırmızı alanlar osteojenik farklılaşmış bölgeleri göstermektedir.

4.11. Floresan Tabanlı Mineralizasyon Testi

Osteojenik farklılaşma esnasında biriken mineralize matriks alanları floresan tabanlı mineralizasyon testi (Lonza,USA) ile pozitif boyanarak gösterilmiştir.



Şekil 4.11. 7 ve 14. günlerde standart besiyeri, osteojenik besiyeri ve koşullu besiyeri uygulanan gruplarda osteojenik farklılaşma sırasında meydana gelen mineralizasyonun floresan mikroskopta gösterilmesi. Yeşil alanlar, mineralleşmenin olduğu bölgeleri göstermektedir. Mikroskop büyütmesi: 20x, Skala bar: 100µm.

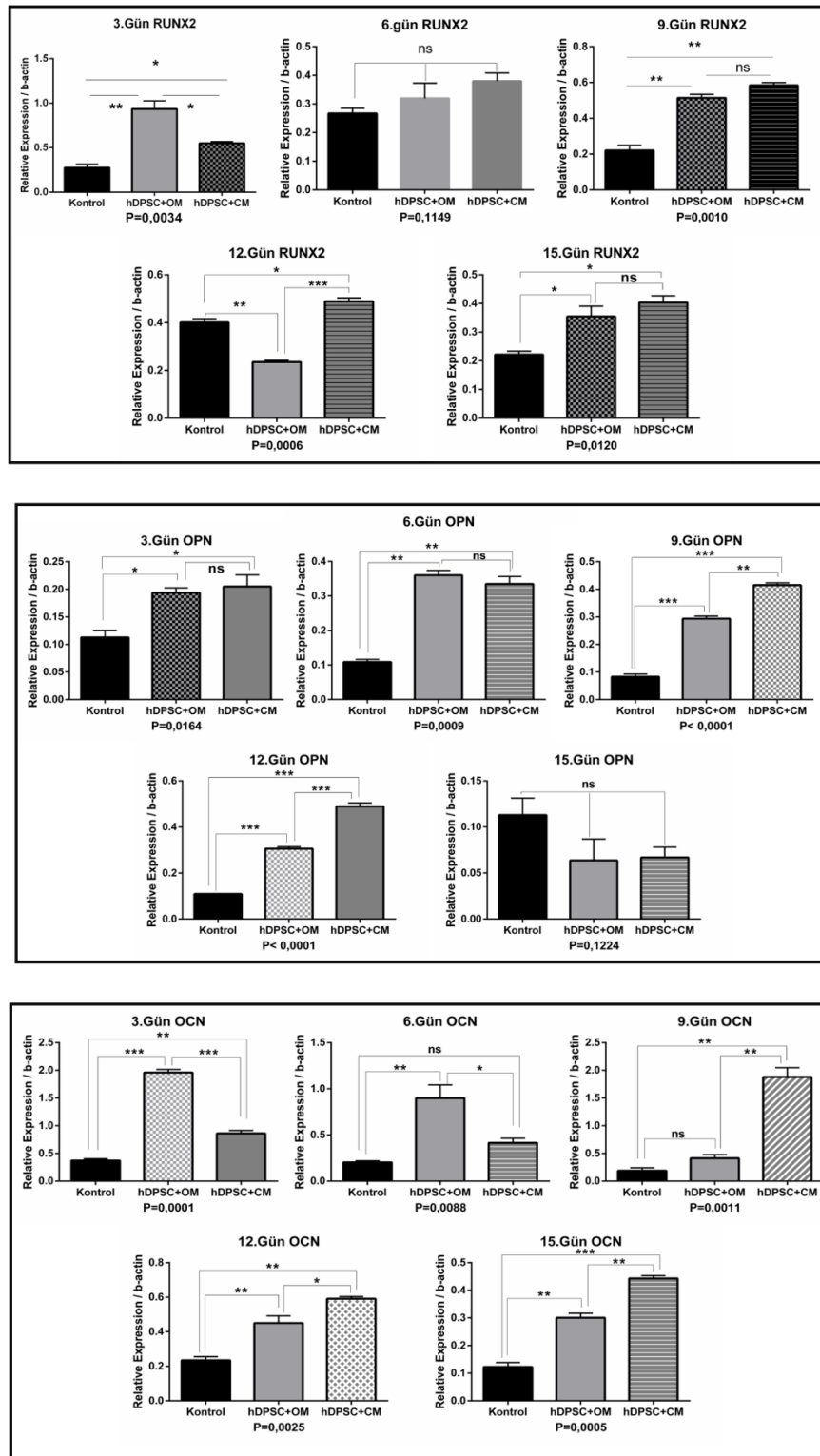
4.12. Osteojenik Gen Ekspresyon Profili

Şekil 4.12’de RUNX2, OPN ve OCN genlerine ait ekspresyon sonuçları gösterilmektedir. 3. gün verilerine göre RUNX2 ekspresyonu osteojenik besiyeri uygulanan grupta, kontrol ve koşullu besiyeri uygulanan gruba göre daha yüksek bulunmuştur ($p=0,034$). Koşullu besiyeri uygulanan grupta ise kontrol grubuna artmıştır. 6. gün ekspresyon sonuçları her 3 grupta da RUNX2 ekspresyonunun artmış olduğunu göstermiş olup, en yüksek artış sırasıyla; koşullu besiyeri uygulanan grupta, osteojenik besiyeri uygulanan grupta ve en son kontrol grubunda gözlenmiştir. Fakat aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,1149$). 9. günde RUNX2 ekspresyonu osteojenik besiyeri ve koşullu besiyeri uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla kayda değer biçimde artmıştır ($p=0,0010$). Osteojenik besiyeri ve koşullu besiyeri uygulanan gruplar arasında ise RUNX2 ekspresyon değerleri birbirlerine çok yakın olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. 12. günde RUNX2 ekspresyonunun osteojenik besiyeri uygulanan grupta düşmesine rağmen koşullu besiyeri uygulanan grupta sabit bir şekilde devam ettiği tespit edilmiştir ($p=0,0006$). 15. günde ise osteojenik besiyeri uygulanan grupta

RUNX2 ekspresyonunun bir miktar artmış olduğu, koşullu besiyeri grubunda ise sabit şekilde devam ettiği tespit edilmiştir ($p=0,0120$).

Osteojenik besiyeri ve koşullu besiyeri uygulanan gruplarda OPN ekspresyonları kontrol grubuna göre artış göstermiştir ($p=0,0164$). Koşullu besiyeri uygulanan grupta OPN ekspresyonu osteojenik besiyeri uygulanan gruptan fazla olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. 6. günde hem osteojenik besiyeri hem de koşullu besiyeri uygulanan gruplarda OPN ekspresyon artışı devam etmiştir ($p=0,0009$). 9. günde OPN gen ekspresyon seviyesi osteojenik besiyeri uygulanan grupta bir miktar düşmesine rağmen koşullu besiyeri uygulanan grupta bir miktar artmaya devam etmiştir ($p<0,0001$). 12. gün sonunda OPN ekspresyonu osteojenik besiyeri uygulanan grupta sabit şekilde devam ederken koşullu besiyeri uygulanan grupta bir miktar artış göstermiştir ($p<0,0001$). 15. günde osteojenik ve koşullu besiyeri uygulanan gruplarda OPN gen ekspresyon ifadesi düşmüş olup, kontrol grubunda artmıştır ($p=0,1224$).

OCN gen ekspresyonu 3. günde en fazla osteojenik besiyeri uygulanan grupta gözlenmiştir ($p=0,0001$). 6. günde osteojenik ve koşullu besiyeri uygulanan gruplarda OCN ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşüş meydana gelmiştir. 9. günde ise OCN ekspresyonu koşullu besiyeri uygulanan grupta kayda değer biçimde artış göstermiştir ($p=0,0011$).



Şekil 4.12. RUNX2, OCN ve OPN genleri için 3,6,9,12 ve 15. günlerde kantitatif real time PCR analizleri.

4.13. İstatistiksel analiz

Canlılık, senesens ve mitokondri potansiyeli testleri “ GraphPad Prism 6 ” programı kullanılarak “ Student T ” testi ile karşılaştırılmış olup istatistiksel olarak gruplar arasında $p < 0,05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir. Gen ekspresyonu verileri ise gruplar arasında “ One Way ANOVA ” ile karşılaştırılmış olup “ TUKEY ” testi ile de çoklu karşılaştırma yapılmıştır. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Elde edilen p değerleri ve istatistiki veriler sonuçlar bölümünde her grup için ayrıntılı bir şekilde belirtilmiştir.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Kök hücreler, kendini yenileyebilme ve farklı hücre tiplerine dönüşebilme yetenekleriyle tanımlanan hücrelerdir. Yetişkin organizmalarda bu hücreler, içinde bulundukları dokunun homeostazisini sürdürmeden sorumludurlar (75). Kök hücreler elde edildikleri kaynaklara göre embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreleri olmak üzere iki grupta toplanırlar. Embriyoda blastositin iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler embriyonik kök hücreler olarak adlandırılırlar. Bu hücreler embriyonun tüm hücre tabakalarını ve ondan köken alacak olan organ sistemlerini oluşturma yeteneğine sahiptir. Differensiye olmuş bir dokuda farklılaşmamış halde bulunan ve kendini yenileyip köken aldığı organın spesifik hücrelerine dönüşebilen hücrelere yetişkin (erişkin) kök hücreler denir. Bu hücreler somatik kök hücreler olarak da adlandırılırlar ve özel koşullar altında diğer dokulara ait hücre tiplerine de dönüşebilirler (76). Erişkin dokulardan elde edilen kök hücre kaynaklarından birisi de mezenkimal kök hücrelerdir.

1976 yılında Fridenstein mezenkimal kök hücreleri ilk kez tanımlamıştır (77). Uluslararası Hücresel Terapi Topluluğu (ISCT), mezenkimal kök hücre tanımı için minimal kriterleri belirtmişlerdir. Bu tanımlamaya göre bir hücre topluluğunun MKH sayılabilmesi için; standart kültür şartları altında plastik yüzeye tutunmaları (I), CD90, CD73, CD105 hücre yüzey markerlarını eksprese etmeleri CD14, CD34, CD45, CD79, CD19 ve HLA-DR hücre yüzey markerlarını ise eksprese etmemeleri (II) ayrıca adiposit, kondrosit ve osteoblast hücrelerine farklılaşabilme kapasitelerine (III) sahip olmaları gerekmektedir (78,79). Çalışmamızda dental pulpa dokusundan elde ettiğimiz hücrelerin belirtilen 3 kriteri de sağladığını in vitro kültür, akım sitometri analizi ve farklılaşma testleri ile gösterdik. MKH'ler adipoz doku, eklem kıkırdığı, beyin, deri,

ebdometriyum, diş pulpası, amniyotik sıvı gibi birçok kaynaktan izole edilebilirler (80,81,82,83,84,85,86,87). Fakat farklı kaynaklardan izole edilen MKH'lerin kalitesi, karakteri ve farklılaşma potansiyelleri hala tartışmalıdır. Kök hücre çalışmalarında hücre kaynağı çok önemli rol oynayabilir. Seçilecek olan kaynağın avantajları ve dezavantajları önceden düşünülmelidir. Son zamanlarda dental pulpadan kök hücreler üretilmeye başlanmış olup çok sayıda çalışma bu hücrelerin multipotansilerinin yanında nöron, dentin ve kas hücreleri gibi hücrelere de farklılaştığını ortaya çıkarmıştır (88).

Dental pulpa kök hücreleri ilk kez Gronthos ve ark. tarafından 2000 yılında izole edilmiştir (89). ISCT 2006 yılında dental pulpa kök hücreleri için 3 minimal kriter belirlemiştir. (I) Plastik kültür kaplarına hızlı biçimde yapışabilme, (II) uygun indüksiyon şartları altında adiposit, kondrosit ve osteoblastlara dönüşebilme potansiyeli, (III) yaygın MKH markerları olan CD105, CD73 ve CD90'ı pozitif eksprese ederken CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 ve HLA-DR markerlarını eksprese etmezler (90,91,92). En büyük avantajları herhangi bir cerrahi işlem gerektirmeden ve hiçbir etik problemi olmadan üretilebilmeleridir. Bu gibi avantajların yanında zengin kök hücre popülasyonu ve çok sayıda hücre tipine farklılaşmaları sayesinde günümüzde dental pulpa dokusuna olan ilgi giderek artmaktadır. Biz çalışmamızda bu gibi avantajları göz önünde bulundurarak kök hücre kaynağımızı insan diş pulpası olarak seçtik. DPKKH'lerin izolasyonu için 2 temel method tanımlanmıştır: Eksplant methodu ve pulpa dokusunun enzimatik parçalanması methodu. İlk methodda; pulpa dokusu cerrahi olarak çıkarılır ve hücreler doku fragmentlerinden gelişir (37,38). İkinci methodda ise; dental pulpa kollajenaz ve dispaz kullanılarak sindirilir (39,40), sonra hücreler ekilerek proliferasyonları gözlemlenir ve spesifik markerlarla flow sitometri yöntemi kullanılarak karakterizasyon gerçekleştirilir (41). Biz çalışmamızda pulpa dokusunu kollajenaz ve dispaz enzimleriyle parçalayarak izolasyonu gerçekleştirdik. Enzimatik yöntemi tercih etmemizin sebebi hücrelerin tek tek düşürülerek flasklara daha hızlı tutunmasını sağlamak ve kültür sürecini hızlandırmaktır. Eksplant ekimde ise hücrelerin ayrışması nispeten daha zordur. Çalışmamızda dental pulpa dokusundan elde ettiğimiz hücrelerin 2006 yılında ISCT tarafından belirtilen dental pulpa kaynaklı MKH olarak tanımlanması için gerekli 3 minimal kriteri de sağladığını in vitro kültür, akım sitometri analizi ve farklılaşma testleri ile gösterdik.

Akım sitometri analizini MKH yüzey markırlarının ekspresyonlarının varlığını göstermek amacıyla gerçekleştirdik. CD44, CD105, CD90 ve CD73 markerlarını hücrelerimizin kuvvetli biçimde eksprese ettiğini CD34, CD45, CD11b, CD19 ve HLA-DR markerlarını ise bulundurmadığını gösterdik. Çünkü CD45, CD34 temelde hematopoetik kök hücre markırlarıdır. Ancak birçok çalışma dental pulpa kök hücrelerinin bir alt grubunun aynı zamanda CD34 pozitif olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum, dental pulpa kök hücrelerinin multipotensiden daha üstün olan pluripotent özelliğe sahip olabileceğini düşündürmektedir. Akım sitometriye ek olarak dental pulpa kök hücrelerinin karakterizasyonu için immünfloresan boyama yaptık. Hücrelerimizin CD90, CD73, CD44 ve CD105 markerlarını güçlü bir şekilde eksprese ederken CD34 ve CD45 açısından negatif olduklarını tespit ettik. MKH'ların adiposit, kondrosit ve osteoblastlara farklılaşabilmeleri bu hücrelerin tipik özelliklerindendir. Biz de çalışmamızda hücrelerimizin bu 3 hatta farklılaşabildiklerini farklılaşma testleri ile saptadık. Ayrıca hücrelerimizin klonojenik özelliklerini göstermek amacıyla CFU-F testi yaparak koloni halinde çoğaldıklarını gösterdik.

MKH'lerin osteojenik farklılaştırılması için ticari olarak temin edilebilen kitler veya manuel olarak hazırlanabilen indüksiyon besiyerleri mevcuttur. Biz çalışmamızda dental pulpa kök hücrelerini osteojenik farklılaştırmak için kendi hazırladığımız ve daha önce laboratuvarında çalışırılığını test ettiğimiz %10 FBS, %1 penisillin-streptomisin, 10 mM L-glutamin, 50 µM L-askorbik asit, 10 mM β-gliserofosfat ve 100 nM deksametazon içeren indüksiyon besiyeri kullandık. Literatüre bakıldığında kök hücrelerin osteojenik indüklenmesinde son zamanlarda alternatif bir ortam olarak koşullu besiyerleri kullanıldığı görülmektedir. Koşullu besiyeri; kültüre edilmiş hücrelerden salınan çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler, eksozomlar, farklılaşmayı düzenleyici faktörler, mikro RNA'ları taşır ve ortamda bulunan diğer hücrelerin farklılaşma yetilerini etkileyebilir (69, 1).

2014 yılında Yuji Ando ve ekibi serum içermeyen insan MKH'larından elde ettikleri koşullu besiyerlerini osteoblastlar üzerine uyguladıklarında osteoblast farklılaşmasını artırdığını göstermişlerdir (70). Carbone A. ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada kültüre edilmiş dental pulpa kök hücrelerinden elde ettikleri koşullu besiyerini adipoz kaynaklı kök hücreler üzerine uyguladıktan sonra bu hücrelerin mineralize matriks ürettiğini gözlemlemişlerdir (71). Lee TJ. ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları

benzer bir çalışmada insan MKH'larından elde edilen koşullu besiyeri ile insan embriyonik kök hücrelerini kültüre etmişler ve bu grubu koşullu besiyeri uygulanmayan grup ile karşılaştırdıklarında; osteojenik ve kondrojenik farklılaşmanın hızlandığını, ALP, OPN, ON, OC gibi osteojenik farklılaşma genlerinin ekspresyon düzeylerinin arttığını ve ortamda kalsiyum birikiminin hızlandığını bildirmişlerdir (69). Yu F. ve ark. 2011 yılında insan periferik kanından osteoklast benzeri hücreler elde ettiler . Bu hücrelerden topladıkları koşullu besiyerini fibroblastlar üzerine uyguladıklarında fibroblastların alkalik fosfatase ve mineralizasyon seviyelerinin önemli derecede arttığını göstermişlerdir (2). Literatürde yer alan bu çalışmalarda koşullu besiyeri toplanan hücrelere osteojenik indüksiyon uygulanmamıştır. Fakat bizim çalışmamızın amacı; farklılaşan hücrelerden, hücre dışına salınan sekretomları içeren koşullu besiyerlerinin, farklılaşmamış diş pulpa kök hücrelerini osteojenik indüksiyona yönlendirmesidir. Bizim çalışmamıza benzer olarak Jin Z. ve ark. 2016 yılında insan periyodontal ligament hücrelerini 10 ve 15 günlük osteojenik indüklenmiş kemik iliği stromal hücrelerinden elde ettikleri koşullu besiyerinde kültüre ettiklerinde proliferasyonun ve osteogenezin önemli derecede hızlandığını göstermişlerdir. Osteojenik indüklenme uygulanmayan gruptan elde edilen koşullu besiyerinin ise böyle bir etkisi gözlemlenmemiştir (74). Literatürde bildirilen bu rapor çalışmamızı desteklemektedir. Ancak bu çalışmada koşullu besiyeri, kemik iliği stromal hücrelerinden toplanmıştır. Kemik iliğinin, osteoprogenitör hücrelerin temel kaynağı olduğu bilinmektedir. Ancak kemik iliği izolasyonu donör için invaziv bir işlem gerektirir ve ağırlı bir süreçtir. DPKH'leri cerrahi işlem gerektirmeksizin basit bir diş çekimi operasyonu ile elde edilebilir ve elde edilen kök hücreler osteojenik olarak indüklenebilir, rahatlıkla koşullu besiyeri toplanabilir. Bu açıdan çalışmamız özgündür.

Koşullu besiyeri uygulanan hücrelerin biyolojik aktivitelerinin olumsuz yönde etkilenmediğinin de yapılan çalışmada test edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla biz çalışmamızda koşullu besiyeri uyguladığımız deney ve kontrol gruplarında canlılık, senesens ve mitokondri potansiyellerini karşılaştırdık. 7. ve 14. günlerde ölçülen canlılık sonuçlarına bakıldığında osteojenik farklılaşmış hücrelerden toplanan koşullu besiyerinin, uygulandığı DPKH'lerinin canlılık yüzdelerini kontrol grubuyla karşılaştırıldığında artırdığı saptanmıştır. 7 ve 14. günlerde yapılan senesens testi sonuçları da canlılık testi sonuçlarını desteklemektedir. Farklılaşmış hücrelerden elde

edilen koşullu besiyerinin, uygulandığı hücrelerin β -galaktazidaz aktivitesini kontrol grubuna oranla azalttığı tespit edilmiştir. Mitokondri potansiyeli testi sonuçlarında ise kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu sonuç, koşullu besiyerinin uygulandığı hücrelerin mitokondri depolarizasyonunu etkilemediğini göstermektedir.

RUNX2 osteoblastik farklılaşmada önemli bir role sahiptir (74). Eksikliği veya mutasyonu kemik anomalileriyle sonuçlanabilir. Runx2, osteojenik farklılaşma sırasında erken bir osteojenik marker olarak kabul edilmektedir. Dolayısıyla erken günlerde kemik oluşumu esnasında ekspresyon seviyesi artmaktadır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler sonucunda osteojenik besiyeri ve koşullu besiyeri uygulandıktan sonra 3. günde Runx2 ekspresyonlarının anlamlı derecede arttığı, 6 ve 9. günlerde sabit bir şekilde devam ettiği, ilerleyen günlerde ise ekspresyon seviyelerinin giderek azaldığı deney gruplarında tespit edilmiştir. Kontrol grubunda Runx2 ekspresyonu deney gruplarına nazaran düşük bir şekilde ifade edilmiş olup, sabit seviyede devam etmiştir. Ancak 12. günde kontrol grubunda Runx2 ekspresyonunun bir miktar arttığı gözlenmiştir. Bunun sebebi, DPKH'lerinin kültürün ilerleyen günlerinde osteojenik yolağa girme eğilimi gösterdiğinden erken osteojenik marker olan Runx2 ifadesi artmış olabilir. OP kemik dokuda yüksek bir şekilde eksprese edilen genlerden biridir. Osteoblast farklılaşmasını takiben OP'in ekspresyon seviyesinde artış gözlenir (74). OCN ise olgun osteoblastlar tarafından sentezlenen osteoblast ilişkili majör bir üründür. Osteoblast farklılaşmasını takiben OP gen ekspresyonu 3-6 ve 9. günlerde osteojenik ve koşullu besiyeri uygulanan gruplarda artmış olup, kontrol grubunda ise ekspresyon seviyesinin düşük olduğu görülmüştür. 12 ve 15. günlerde osteojenik besiyeri uygulanan grupta OP ekspresyonu bir miktar azalsa bile koşullu besiyeri uygulanan grupta sabit bir şekilde devam etmiştir. Normal bir farklılaşma senaryosunda, farklılaşmayı indükleyecek ajanın ekspresyonları erken günlerde artırdığı ilerleyen günlerde ise ekspresyon sonucu oluşan transkriptlerin proteine kodlandığı için ekspresyon seviyelerinin düştüğü kabul edilebilir. Bu gibi durumlarda, ilerleyen günlerde gen ekspresyon seviyesinin değil protein seviyesinin artması beklenir. Yaptığımız çalışmada da osteojenik besiyeri uygulanan grupta hem OP hem de OCN gen ekspresyonlarının bu senaryoya uyduğu görülmüştür. Ancak koşullu besiyeri uygulanan grupta erken günlerde pik yapan osteojenik genlerin ekspresyonları ilerleyen

günlerde de yüksek seviyede devam etmiştir. Bu bize koşullu besiyeri uygulanan grupta osteojenik farklılaşmanın kök hücre havuzunda sürekli bir şekilde devam ettiğinin açıkça bir göstergesidir.

Sonuç olarak, DPKH'leri etik problemi olmaksızın elde edilebilmeleri, kolay bir şekilde üretilibilmeleri ve çoklu hücre hatlarına farklılaşabilme yeteneklerine sahiptir. Bu nedenle çalışmamızda iDPKH hattı kullanmayı tercih ettik. Bu hücreler klinik anlamda, özellikle de diş hekimliği, rejeneratif tıp ve doku mühendisliği gibi alanlarda önümüzdeki birkaç yıl içerisinde kullanılabilecek özel hücrelerdir. Klinik uygulamalarda günümüzde yapılan çalışmalarda hastaya hücre yerine, sekretom verilmeye başlanmıştır. Osteojenik farklılaşmış hücrelerden elde edilen koşullu besiyerinin in vitroda MKH'leri osteojenik yolağa indüklediğini çalışmamızda gösterdik. İn vivo'da hasarlı kemik bölgesine koşullu besiyeri verilmesi sonucu bölgede bulunan MKH'leri indükleyip kemik dokusunun tamirini sağlayıp sağlayamayacağı yeni bir araştırma konusu olabilir. MKH'lerin farklılaştırılmaları besiyerine eklenen indüksiyon bileşenleri ile sağlanabilse de her hücrenin in vivo ortamda yer aldığı nişi bu indüklenmede etkilidir. DPKH'leri de kemik hücrelerine dönüşme eğilimindedirler. Bu nedenle farklı bir hücre hattıyla da bu çalışma tekrarlanabilir.

6.KAYNAKLAR

1. Wang K, Xu L, Rui Y, et al. The Effects of secretion factors from umbilical cord derived mesenchymal stem cells on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Plos One 2015;1-16.
2. Yu F, Cui Y, Zhou X, Zhang X, Han J. Osteogenic differentiation of human ligament fibroblasts induced by conditioned medium of osteoclast-like cells. BioScience Trends 2011;5:46-51.
3. Martínez E, Núñez V, Osorio E. Mesenchymal stem cells derived from dental pulp: A review. Stem Cells International 2015;2016:1-12.
4. Lee UL, Jeon SH, Park JY, Choung PH. Effect of platelet-rich plasma on dental stem cell derived from impacted third molars. Regen Med 2011;6:67-79.
5. Moraleda J, Blanquer M, Bleda P, et al. Adult stem cell therapy: Dream or reality? Transplant Immunology 2006;17:74-77.
6. Verma K, Bains R, Bains VK, et al. Therapeutic potential of dental pulp stem cells in regenerative medicine: An overview. Dental Research Journal 2013;11:302-308.
7. Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res 2002;81:531-5.
8. Suzergoz F, Erdem DAP, Sepe E, et al. A pilot study on the isolation of dental pulp stem cells, potential of forming colonies and defining the content of stem cells. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2009;29:128-33.
9. Weissman I. Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. Cell 2000;100:157-168.
10. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. Nature 2006;441:1075-9.

11. Friedenstein AJ, Piatetzky S, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966;16:381-390.
12. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
13. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994;21:429-435.
14. FH Chen, Tuan RS. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Research & Therapy* 2008;223-235.
15. Almalki SG, Agrawal DK. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation* 2016;92:41-51.
16. Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone* 2006;39: 678–683.
17. Can A. Kök hücre biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları, Akademisyen tıp kitabevi, Ankara, 2014:720.
18. Sedgley C, Botera TM. Dental stem cells and their sources. *Regenerative Endodontics* 2012;56:549-561.
19. Chen FM, Sun HH, Lu H, Yu Q. Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials* 2012;33:6320-6344.
20. Zhang N, Li JH, Wang JA, Zhang HK. The effect of bone marrow stem cell transplantation on diabetic cardiomyopathy. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2008;36:1115-1119.
21. Goldberg M. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: A biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2014;15:13-27.
22. Chang CC, Chang KC, Tsai SJ, Chang HH, Lin CP. Neurogenic differentiation of dental pulp stem cells to neuron-like cells in dopaminergic and motor neuronal inductive media. *Journal of the Formosan Medical Association* 2014;113:956-965.
23. Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends in Cell Biology* 2010;20:715-722.
24. Dimitrova-Nakov S, Baudry A, Harichane Y, et al. Pulp stem cells: implication in reparative dentin formation. *J Endod* 2014;40:13-18.
25. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *Journal of Dentistry* 2000;28:77-92.

26. About I. Dentin–pulp regeneration: the primordial role of the microenvironment and its modification by traumatic injuries and bioactive materials. *Endodontic Topics* 2013;28:61-89.
27. Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration?. *Archives of Oral Biology* 2012;57:1439–1458.
28. Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med.* 2010;5:617-631.
29. Shi S, Bartold PM, Miura M, et al. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthodontics & Craniofacial Research* 2005;8:191-199.
30. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *Journal of Dental Research* 2010;89: 791–796.
31. Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, et al. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *Journal of Endodontics* 2009;35: 1536–1542.
32. Such'aneck J, Visek B, Soukup T. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth—isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica* 2010;53: 93–99.
33. Bray AF, Cevallos RR, Gazarian K, Lamas M. Human dental pulp stem cells respond to cues from the rat retina and differentiate to express the retinal neuronal marker rhodopsin. *Neuroscience* 2014;280: 142–155.
34. Nekanti U, Rao VB, Bahrivani AG, et al. Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development* 2010;19:117-130.
35. Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U. Nestin Mrna expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Developmental Brain Research* 1995;84: 109–129.
36. Shoi K, Aoki K, Ohya K, Takagi Y, Shimokawa H. Characterization of pulp and follicle stem cells from impacted supernumerary maxillary incisors. *Pediatric Dentistry* 2014;36:79-84.

37. Roozafzoon R, Lashay A, Vasei M. Dental pulp stem cells differentiation into retinal ganglion-like cells in a three dimensional network. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015;457: 154–160.
38. Hilkens P, Gervois P, Fanton Y. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell and Tissue Research* 2013;353:65–78.
39. Sun HH, Chen B, Zhu QL. Investigation of dental pulp stem cells isolated from discarded human teeth extracted due to aggressive periodontitis. *Biomaterials* 2014;35: 9459–9472.
40. Paschalidis T, Bakopoulou A, Papa P, et al. Dental pulp stem cells secretome enhances pulp repair processes and compensates TEGDMA induced cytotoxicity. *DentalMaterials* 2014;30:405-418.
41. Laino G, d'Aquino R, Graziano A. Dental pulp stem cells can be detected in aged humans: an useful source for living autologous fibrous bone tissue (LAB). *Journal of Bone and Mineral Research* 2005;20: 1394–1402.
42. Jung S, Panchalingam KM, Rosenberg L, Behie LA. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells in defined serum-free media. *Stem Cells International* 2012;2012:1-21.
43. Kerkis I, Caplan AI. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Engineering Part B* 2012;18: 129–138.
44. Salkın H, TGF-B1 İle Transfekte Edilmiş Pulpal Kök Hücre ve PRP Uygulamasının Kondrojenik Diferensiasyon Üzerine Etkileri, Yüksek lisans, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2015: 101.
45. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J. Assessment of the impact of two different isolation methods on the osteo/odontogenic differentiation potential of human dental stem cells derived from deciduous teeth. *Calcified Tissue International* 2011;88:130-141.
46. Choi MR, Kim HY, Park JY. Selection of optimal passage of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for stem cell therapy in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters* 2010;472: 94–98.

47. El Alami M, Viñna-Almunia J, Gambini J. Activation of p38, p21, and NRF-2 mediates decreased proliferation of human dental pulp stemcells cultured under 21%O₂. *Stem Cell Reports* 2014;3: 566–573.
48. Lu D, Chen B, Liang Z. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2011;92: 26–36.
49. Rasulov MF, Vasilchenkov AV, Onishchenko NA. First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2005;139:141-144.
50. Kadar K, Kiraly M, Porcsalmy B. Differentiation potential of stem cells from human dental origin-promise for tissue engineering. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2009;60: 167–175.
51. Ratajczak J, Zuba-Surma E, Paczkowska E, et al. Stem cells for neural regeneration—a potential application of very small embryoniclike stem cells. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2011;62:3-12.
52. Racz GZ, Kadar K, Foldes A. Immunomodulatory and potential therapeutic role of mesenchymal stem cells in periodontitis. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2014;65: 327–339.
53. Song IH, Caplan AI, Dennis JE. In vitro dexamethasone pretreatment enhances bone formation of human mesenchymal stem cells in vivo. *J Orthop Res* 2009;27:916-921.
54. Zhu JX, Sasano Y, Takahashi I, Mizoguchi I, Kagayama M. Temporal and spatial gene expression of major bone extracellular matrix molecules during embryonic mandibular osteogenesis in rats. *Histochem J* 2001;33:25-35.
55. Hildebrandt C, Buth H, Thielecke H. Influence of cell culture media conditions on the osteogenic differentiation of cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Ann Anat* 2009;191:23-32.
56. Hamidouche Z, Fromigue O, Ringe J, et al. Priming integrin $\alpha 5$ promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:18587-18591.

57. Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C, Stewart K, Beresford JN. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro:relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology(Oxford)* 2001;40:74-83.
58. Hong D, Chen HX, Xue Y, et al. Osteoblastogenic effects of dexamethasone through upregulation of TAZ expression in rat mesenchymal stem cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;116:86-92.
59. Chang YL, Stanford CM, Keller JC. Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization:implications for hydroxyapatite (HA)-enhanced bone formation. *J Biomed Mater Res* 2000;52:270-278.
60. Chung CH, Golub EE, Forbes E, Tokuoka T, Shapiro IM. Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int* 1992;51:305-311.
61. Fernandes H, Mentink A, Bank R, et al. Endogenous collagen influences differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part A* 2010;16:1693-1702.
62. Wang QM, Jones JB, Studzinski GP. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a mediator of the G1-S phase block induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in HL60 cells. *Cancer Res* 1996;56:264-267.
63. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor-beta and remodeling of bone. *J Bone Joint Surg Am* 1991;73:1418-1428.
64. Huang Z, Nelson ER, Smith RL, Goodman SB. The Sequential Expression Profiles of Growth Factors from Osteroprogenitors to Osteoblasts In Vitro. *Tissue Engineering* 2007;13:2311-2320.
65. Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2001;2:81-94.
66. Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 1992;7:683-692.
67. Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathologie Biologie* 2009;57: 318–323.

68. Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the Mesenchymal Stem Cell Secretome for the Treatment of Cardiovascular Disease. *Cell Stem Cell* 2012;10:244-258.
69. Lee TJ, Jang J, Kang S, et al. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Enhances Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Human Induced Pluripotent Stem Cells by Mesodermal Lineage Induction. *Tissue Engineering* 2014;7:1306-1313.
70. Ando Y, Matsubara K, Ishikawa J, et al. Stem cell-conditioned medium accelerates distraction osteogenesis through multiple regenerative mechanisms. *Bone* 2014;61:82-90.
71. Carbone A, Valente M, Annacontini L, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal (stem) cells differentiate to osteoblast and chondroblast lineages upon incubation with conditioned media from dental pulp stem cell-derived osteoblasts and auricle cartilage chondrocytes. *J Biol Regul Homeost Agents* 2016;30:111-122.
72. Heino TJ, Hentunen TA, Väänänen HK. Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. *Experimental Cell Research* 2004;294: 458– 468.
73. Ilmer M, Karow M, Geissler C, Jochum M, Neth P. Human Osteoblast–Derived Factors Induce Early Osteogenic Markers in Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering* 2009;15:2397-2409.
74. Jin Z, Feng Y, Liu H. Conditioned media from differentiating craniofacial bone marrow stromal cells influence mineralization and proliferation in periodontal ligament stem cells. *Human Cell* 2016;29:162-175.
75. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008;9:11–21.
76. Özen A, Gül Sancak İ. Mezenkimal kök hücreler ve veteriner hekimlikte kullanımı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2014;61:79-84.
77. Friedenstein AJ, Gorskaja U, Kalugina NM. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4:267-274.
78. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008;9:11-21.

79. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2006;8:315-317.
80. Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology* 2005;33: 1402–1416.
81. Zhang X, Yang M, Lin L, et al. Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose—derived stem cells in vitro and in vivo. *Calcified Tissue International* 2006;79:169-178.
82. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis & Rheumatism* 2004;50:1522–1532.
83. Appaix F, Nissou MF, van der Sanden B, et al.. Brain mesenchymal stem cells: the other stem cells of the brain?. *World Journal of Stem Cells* 2014;6: 134–143.
84. Schüring AN, Schulte N, Kelsch R, et al. Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertility and Sterility* 2011;95: 423–426.
85. Bartsch G, Yoo JJ, De Coppi P, et al. Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells and Development* 2005;14: 337–348.
86. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol,. *Human Reproduction* 2004;19: 1450–1456.
87. Seifrtová M, Havelek R, Cmielová J, et al. The response of human ectomesenchymal dental pulp stem cells to cisplatin treatment. *International Endodontic Journal* 2012;45: 401–412.
88. Karaoz E, Dogan BN, Aksoy A, et al. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochemistry and Cell Biology* 2010;133:95–112.
89. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97:13625–30.

90. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97: 13625–13630.
91. Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100: 5807–5812.
92. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, et al. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *Journal of Endodontics* 2008;6: 645–651.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Ergül ERGEN

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 28 Ocak 1991, SAMSUN

Medeni Durumu: Bekar

Tel: +90 536 207 86 93

Email: ergenergull@gmail.com

Yazışma Adresi: Mevlana Mah. Cemil Baba Cad. Şehr-i Kınaş Apt. No:17 Talas / KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	İstanbul Ü. Fen Fak. Biyoloji	2013
Lise	Vezirköprü Lisesi	2009

YABANCI DİL

İngilizce