TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNFLAMATUAR MEDYATÖRLERİN İN VİTRO ORTAMDA DİŞ PULPASI KÖK HÜCRELERİNİN FARKLILAŞMA POTANSİYELİ ÜZERİNE ETKİLERİ

SEMA SÖNMEZ

DOKTORA TEZİ

ENDODONTİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hesna Sazak Öveçoğlu

2017-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum	: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi	: Doktora
Anabilim Dalı	: Endodonti
Tez Sahibi	: Sema Sönmez
Tez Başlığı	: İNFLAMATUAR MEDYATÖRLERİN İN VITRO ORTAMDA DİŞ PULPASI KÖK HÜCRELERİNİN FARKLILAŞMA POTANSİYELİ ÜZERİNE ETKİLERİ
Sınav Yeri	: Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Sınav Tarihi	: 12/04/2017

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Kurumu	İmza
Danışman (Unvan, Adı, Soyadı) **Prof. Dr. Hasna Sazak Öveçoğlu**	Marmara Üniversitesi	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Prof. Dr. Mahir Gündüz	Marmara Üniversitesi	
Prof. Dr. Faruk Hazneciroğlu	İstanbul Üniversitesi	
Prof. Dr. Mehmet Bayburu Kayahan	Okan Üniversitesi	
Yrd. Doç Dr. Dilek Erbay Türkaydın	Marmara Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 20.04.2017 tarih ve 14 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Sema Sönmez

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca desteğini ve hoşgörüsünü esirgemeyen, bilgisini ve tecrübesini benimle paylaşan, her türlü problemimle yakından ilgilenen çok değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Hesna Sazak Öveçoğlu'na;

Her zaman, ilgi ve desteklerini hissettiğim, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım kıymetli hocalarım Prof. Dr. Mahir Günday, Prof. Dr. Yıldız Garip Berker, Yrd. Doç. Dr. Dilek Erbay Türkaydın, Yrd. Doç. Dr. Fatıma Betül Baştürk ve Yrd. Doç. Dr. Emre İriboz'a;

Çalışma boyunca fikir ve desteğini esirgemeyen, beni her zaman motive edip bir adım öteye taşıyan çok değerli hocam Prof. Dr. Tunç Akkoç'a;

Doktora hayatım boyunca tanımaktan mutluluk duyduğum kıymetli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Bilge Tarçın ve Yrd. Doç. Dr. Birsay Gümrü Tarçın'a;

Tez çalışmamın özellikle laboratuvar bölümünde bilgisini, imkanlarını, kıymetli zamanını ve emeğini esirgemeyen Arş. Gör. Deniz Doğan'a;

Bir arada çalışmaktan mutluluk duyduğum Dr. Burçin Arıcan Öztürk ve Dr. Koral Bayraktar başta olmak üzere tüm sevgili asistan arkadaşlarıma;

Doktora eğitimim boyunca manevi desteklerini daima hissettiğim İlper Çalışkan, Fatıma Miminovska ve Emrullah Öztürk'e;

8 yaşımdan beri yanımda olup diş hekimliği ve doktora eğitimlerim boyunca da dostluğunu, yardımını ve desteğini bir an bile eksik etmeyen, dert ortağım ve neşe kaynağım, kardeşim, dostum Miray Sütçü'ye;

Beni en iyi şekilde yetiştirip eğitim hayatım boyunca bana en büyük desteği veren, bana daima inanıp güvenen ve sonsuz seven, canımdan kıymetli annem, babam ve ablama;

Öğrencilik yıllarımdan doktora eğitimimin sonuna kadar desteğini, tecrübesini ve sevgisini benimle karşılıksız paylaşan, en büyük huzur ve mutluluk kaynağım, nişanlım Yrd. Doç. Dr. Tuna Kaplan'a;

Minnettarım ve teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....i

TEŞEKKÜR.....ii

İÇİNDEKİLER.....iii

KISALTMALAR VE SİMGELER.....vii

ŞEKİL RESİM VE TABLOLAR.....x

ÖZET.....1

ABSTRACT.....2

1. GİRİŞ VE AMAÇ.....3

2. GENEL BİLGİLER.....4

2.1. Kök Hücreler.....6

2.1.1. Kök hücrelerin tarihçesi.....7

2.1.2. Kök hücrelerin genel özellikleri.....8

2.1.2.1. Totipotent özellik.....9

2.1.2.2. Pluripotent özellik.....9

2.1.2.3. Multipotent özellik.....10

2.1.3. Embriyonik kök hücreler.....10

2.1.4. Yetişkin kök hücreler.....11

2.1.4.1. Hematopoetik kök hücreler.....12

2.1.4.2. Mezenkimal kök hücreler.....13

2.1.4.2.1. Diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler.....17

2.1.4.2.1.1. Süt dişi pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler.....17

2.1.4.2.1.2. Daimi diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler.....18

2.1.3. Mezenkimal kök hücrelerin in vitro farklılaşması.....20

2.1.3.1. Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması.....21

2.1.3.2. Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşması.....22

2.1.3.3. Mezenkimal kök hücrelerin adipojenik farklılaşması.....24

2.2. Sitokinler.....25

2.2.1. İnflamatuar sitokinler.....26

2.2.1.1. TNF-α.....27

2.2.1.2. IL-1β.....29

2.2.1.3. IL-6.....31

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....32

3.1.Tam Gömük Yirmi Yaş Dişinin Temini.....32

3.2. Tam Gömük Yirmi Yaş Dişinin Transport Solüsyonu ile İzolasyon Yapılacak Laboratuvara Getirilmesi.....33

3.3. Tam Gömük Yirmi Yaş Diş Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu.....34

3.4. DPSC'lerin Akım Sitometrik Analiz ile Karakterizasyonu.....36

3.5. DPSC'lerin İnflamatuar Proteinlerle Uyarımı.....37

3.5.1. TNF-α ile uyarım.....37

3.5.2. IL-1β ile uyarım.....37

3.5.3. IL-6 ile uyarım.....37

3.5.4. TNF-α / IL-1β / IL-6 kombine uyarım.....37

3.6. İnflamatuar Medyatörlerle Uyarılmış DPSC'lerin Kültüre Edilmeleri.....38

3.7. DPSC'lerin Osteojenik, Kondrojenik ve Adipojenik Farklılaşma Protokolleri...39

3.7.1. Osteojenik farklılaştırma protokolü.....40

3.7.1.1. Osteojenik farklılaşma besiyerinin eklenmesi.....41

3.7.1.2. Alizarin Red boyama protokolü.....41
3.7.1.3. Osteojenik farkılaşmanın değerlendirilmesi.....41
3.7.2. Kondrojenik farklılaştırma protokolü.....41
3.7.2.1. Kondrojenik farklılaşma besi yerinin eklenmesi.....42
3.7.2.2. Alcian Blue boyama protokolü.....42
3.7.2.3. Kondrojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi.....43
3.7.3. Adipojenik farklılaştırma protokolü.....43
3.7.3.1. Adipojenik farklılaşma besi yerinin eklenmesi.....43
3.7.3.2. Oil Red boyama protokolü.....43
3.7.3.3. Adipojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi.....44
4. BULGULAR.....45
4.1. DPSC İzolasyonu.....45
4.2. DPSC Karakterizasyonu.....46
4.3. DPSC'lerin Uyarımlı ve Uyarımsız Kültürleri.....46
4.3.1. Osteojenik farklılaşma.....47
4.3.2. Kondrojenik farklılaşma.....49
4.3.3. Adipojenik farklılaşma.....52
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....55
5.1. Sonuçlar.....68
6. KAYNAKLAR.....69
7. EKLER.....96
Ek-1 Etik Kurul Onayı.....96
Ek-2 Hasta Bilgilendirme Formu.....97
Ek-3 Hasta Onay Formu.....98

8. ÖZGEÇMİŞ.....99

KISALTMALAR VE SİMGELER

α: Alfa

β: Beta

γ: Gama

°C: Santigrat Derece

AF: Alkalin Fosfataz

ark.: arkadaşları

BMP: Bone Morphogenic Protein (Kemik Morfogenetik Protein)

BMSC: Bone Marrow Stem Cells (Kemik İliği Kaynaklı Kök Hücreler)

Ca: Kalsiyum

CDMEM: Minimum Essential Alpha Medium

cDNA: Complementary DNA (Tamamlayıcı DNA)

CO_2: Karbondioksit

CRF: Corticotropin Releasing Hormone (Kortikotropin Salgılayıcı Hormon)

dk.: Dakika

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

DPBS: Dulbecco's PBS

DPSC: Dental Pulp Stem Cell (Diş Pulpası Kaynakı Kök Hücre)

EDTA: Etilen Diamin Tetraasetik Asit

EKH: Embriyonik Kök Hücre

FBS: Fetal Bovine Serum

FCS: Fetal Calf Serum (Fötal Buzağı Serumu)

FITC: Fluorescein Isothiocyanate (Floresan İzotiyosiyanat)

gr: Gram

HKH: Hematopoetik Kök Hücreler

IFN: İnterferon

IL: İnterlökin

IVF: İn Vitro Fertilizasyon

kDa: Kilodalton

LAF: Laminar Flow

LCA: Leucocyte Common Antigen (Lökosit Ortak Antijen)

LPS: Lipopolisakkarit

MCAM: Melanoma Cell Adhesion Molecule (Melanoma Hücre Adezyon Molekülü)

Mg: Magnezyum

mg: Miligram

MHC: Major Histocompatibility Complex (Majör Histokompabilite kompleksi)

MHK: Mezenkimal Kök Hücre

ml: Mililitre

mm: Milimetre

NK: Natural Killer (Doğal Öldürücü Hücreler)

NO: Nitrik Oksit

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

PBS: Phosphate Buffer Saline (Fosfat Tampon Çözeltisi)

PDLSC: Periodontal Ligament Stem Cells (Periodontal Ligament Kaynaklı Kök Hücre)

PE: Phycoerythrin (Fikoeritrin)

RPM: Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)

SCAP: Stem Cells From Apical Papilla (Apikal Papilla Kaynaklı kök Hücre)

SHED: Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth (Süt Dişi Pulpası Kaynaklı Kök Hücre)

Stro1: Stromal Hücre Kaynaklı Faktör 1

TGF: Transforming Growth Factor

TNF: Tümör Nekroz Faktör

US: Uyarımsız

VCAM: Vascular Cell Adhezion Molecule (Vasküler Hücre Adezyon Molekülü)

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

RESİM ŞEKİL VE TABLOLAR

i) Resimlerin Listesi

Resim 3.1. Biosafety Cabinet Class II Laminar Flow Kabin

Resim 3.2. Cerrahi operasyonla alınmış tam gömük 38 numaralı diş

Resim 3.3. DMEM

Resim 3.4. Allegra™ X-22 santrifüj cihazı

Resim 3.5. T75 kabı

Resim 3.6. Forma Series II Water Jacket CO_2 İnkübatör

Resim3.7. İnkübasyonu yapılmakta olan kök hücreler

Resim 3.8. BD FACS Calibur akım sitometri cihazı

Resim 3.9. 6 kuyulu kültür plağı

Resim 3.10. StemPro® Osteocyte/chondrocyte, StemPro® Adipogenesis, StemPro® Chondrogenesis farklılaşma medyumları

Resim 4.1a. DPSC 0. Pasaj

Resim 4.1b. DPSC 1. Pasaj

Resim 4.1c. DPSC 2. Pasaj

Resim 4.1d. DPSC 3. Pasaj

Resim 4.2. Uyarımsız DPSC kültürünün osteojenik farklılaşmasısın 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

Resim 4.3. TNF-α uyarımlı DPSC kültürünün osteojenik farklılaşmasısın 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

Resim 4.4. IL-1β uyarımlı DPSC kültürünün osteojenik farklılaşmasısın 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

Resim 4.5. IL-6 uyarımlı DPSC kültürünün osteojenik farklılaşmasısın 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

Resim 4.6. TNF-α+IL-1β+IL-6 uyarımlı DPSC kültürünün osteojenik farklılaşmasısın 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

Resim 4.7. Uyarımsız DPSC kültürünün kondrojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

Resim 4.8. TNF-α uyarımlı DPSC kültürünün kondrojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

Resim 4.9. IL-1β uyarımlı DPSC kültürünün kondrojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

Resim 4.10. IL-6 uyarımlı DPSC kültürünün kondrojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

Resim 4.11. TNF-α+IL-1β+IL-6 uyarımlı DPSC kültürünün kondrojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

Resim 4.12. Uyarımsız DPSC kültürünün adipojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

Resim 4.13. TNF-α uyarımlı DPSC kültürünün adipojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

Resim 4.14. IL-1β uyarımlı DPSC kültürünün adipojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

Resim 4.15. IL-6 uyarımlı DPSC kültürünün adipojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

Resim 4.16. TNF-α+IL-1β+IL-6 uyarımlı DPSC kültürünün adipojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

ii) Şekillerin Listesi

Şekil 3.1. DPSC'lerin inflamatuar medyatör uyarım planı

Şekil 4.1. DPSC'lerin akım sitometri analizleri

İnflamatuar Medyatörlerin İn Vitro Ortamda Diş Pulpası Kaynaklı Kök Hücrelerinin Farklılaşma Potansiyeli Üzerine Etkisi

Öğrencinin Adı : Sema Sönmez
Danışmanı : Prof. Dr. Hesna Sazak Öveçoğlu
Anabilim Dalı : Endodonti Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: Çalışmanın amacı in vitro ortamda TNF-α, IL-1β ve IL-6 ile uyarılarak kültüre edilen diş pulpası kaynaklı kök hücre gruplarının osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmaları ile uyarım yapılmadan kültüre edilerek aynı farklılaştırma prosedürleri uygulanan diş pulpası kaynaklı kök hücrelerinin farklılaşmalarını karşılaştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Daimi diş pulpasından izole edilen kök hücreler akım sitometri analizi ile tespit edildi. Hücreler 3 grup uyarımsız, 3 grup TNF-α, 3 grup IL-1β, 3 grup IL-6 inflamatuar sitokinleri ile uyarılacak ve de 3 grup da üç inflamatuar proteinle birden uyarılacak şekilde olmak üzere toplamda 15 gruba ayrıldı. Uyarımlı veya uyarımsız kültüre edildikten sonra her hücre grubu osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma medyumlarıyla kültüre edildi. Meydana gelen farklılaşmalar doku boyama protokolleriyle biyolojik ışık mikroskobunda incelendi.

Bulgular: Uyarımsız kontrol grubundaki kök hücrelerin osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmalarının başarılı olduğu tespit edilirken inflamatuar proteinlerle uyarılmış gruplarda tam farklılaşmanın meydana gelmediği görüldü.

Sonuçlar: Bu çalışmanın sonucunda diş pulpası kaynaklı kök hücrelerin farklılaşma yeteneklerinin oldukça yüksek olduğu ancak ortamda inflamatuar sitokinlerin varlığında bu yeteneğin azaldığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: TNF-α, IL-1β, IL-6, kök hücre, inflamatuar sitokinler

The Effect of the Inflammatory Mediators on the Differentiation Potential of the Dental Pulp Stem Cells in-vitro

Student name : Sema Sönmez
Advisor : Prof. Dr. Hesna Sazak Öveçoğlu
Department : Department of Endodontics

1. ABSTRACT

Aim: This in-vitro study set out to examine the effect of inflammatory cytokines TNF-α, IL-1β and IL-6 on the differentiation of dental pulp stem cells (DPSCs), before osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation procedures.

Materials and Methods: DPSCs were isolated from the dental pulp with flow cytometry analysis. DPSCs were divided into 15 groups in total: 3 groups of unstimulated control and 3 groups each stimulated with TNF-α, IL-1β and IL-6 seperately and with a mixture of all three inflammatory cytokines. After osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation procedures, the differentiation of each group was examined with different staining procedures under a light microscope.

Results: Non-stimulated DPSCs showed a high differentiation ability while the groups stimulated with inflammatory cytokines didn't.

Conclusion: DPSC's differentiation potential decreases significantly after stimulation with inflammatory cytokines.

Key words: TNF-α, IL-1β, IL-6, DPSC, inflammatory cytokines

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda yapılan *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalar mezenkimal kök hücrelerinin birçok hastalık tedavisinde umut verici olduğunu göstermektedir. İleride yapılacak çalışmalarla birlikte gelecekte dental pulpa dokusu mühendisliğinin konvansiyonel endodontik tedavi kadar önemli bir yere sahip olabileceği öngörülmektedir (Miyagi ve ark., 2010). Günümüzde kök hücrenin biyolojisiyle ilgili yapılan çalışmalar en dikkat çekici çalışmalardır. Yapılan çalışmalarda kök hücrelerinin çeşitli tedavi ve tıbbi uygulama alanlarında hem teorik hem de pratik olarak uygulanabilir olduğu gösterilmiştir (Suchánek ve ark., 2010; Iohara ve ark., 2015; Sonoda ve ark.,2016 Dissanayaka ve ark., 2015; Yi ve ark., 2014; Demarco ve ark., 2011). Kök hücre biyolojisi ve doku mühendisliğindeki gelişmeler ileri derecede hasar görmüş veya kaybedilmiş daimi dişlerin kendi dokularıyla geri kazanılması konusunda gelecek vadetmektedir (Ulumer ve ark., 2010; Murakami ve ark., 2014; Estrela ve ark., 2011).

Yapılan çalışmalarda diş pulpasının mine ve dentin gibi sert dokular ile çevrelenmiş yumuşak bir bağ dokusu olması sebebiyle kök hücre mevcudiyeti için oldukça elverişli olduğu tespit edilmiştir (d'Aguino ve ark., 2009; Manikandhan ve ark., 2010). Daimi diş pulpası kaynaklı kök hücreler (DPSC) ilk defa 2000 yılında izole edilmiş ve bu hücrelerin odontoblastik, adipojenik ve nöral dokulara farklılaşma yetenekleri olduğu gösterilmiştir. Fakat izole edilen kök hücrelerin farkılaşma potansiyeli intrinsik genetik faktörlere ve ortamdaki büyüme faktörlerine bağlı olduğu bildirilmiştir (Gronthos ve ark., 2010; Nakashima ve ark., 2002).

Sitokinler, düşük molekül ağırlıklı, yüksek düzeyde spesifik çözünebilen proteinlerdir. Çeşitli enfeksiyon, inflamasyon ve immünolojik olaylar sonucunda immün sistem hücrelerinin gelişmesini, farklılaşmasını ve aktivasyonunu sağlamakla birlikte, hücre ölümünde ve yara iyileşmesi gibi birçok biyolojik olayda da hücreler arası ilişkileri düzenleyen proteinlerdir (Elias ve ark., 1990; Nicod, 1993; Opal ve ark., 2000). TNF-α, IL-1β ve IL-6 ise inflamasyonda rol alan sitokinlerin en

önemlileridir ve iltihap durumunda immün sistem hücreleri tarafından salgılanmaktadırlar (Bienvenu ve ark., 1995; Takabayashi ve ark., 1996; Drenth ve ark., 1995; Armstrong ve ark., 1996).

TNF-α makrofajlardan üretildiği gibi, CD4+ lenfositleri, doğal öldürücü hücreler (NK) nötrofil, mast hücreleri, eosinofil ve nöronlardan da üretilebilen, enflamasyonla ilgili hücreler arası sinyal proteinidir (Gahring ve ark., 1996; Olszewski ve ark., 2007). TNF-α'nın başlıca rolü immün sistem hücrelerinin regülasyonudur. İmmünoinflamatuar reaksiyonlarda düşük konsantrasyonlarda lokal etki gösteren güçlü parakrin ve otokrin düzenleyicilerdir. Aynı zamanda birçok hücre tipinde büyüme ve farklılaşmayı düzenler. TNF-α fibroblastların ve endotel hücrelerinin proliferasyonunu sağlayan bu özelliğiyle yara iyileşmesinde rol oynayan önemli bir sitokindir (Drenth ve ark., 1995; Armstrong ve ark., 1996).

IL-1 başlıca antijen oluşturan hücreler (monosit ve makrofajlar, langerhans hücreleri dendritik hücreler, endotelyal hücreler, T lenfositleri, NK hücreler, astrositler ve keratinositler) olmak üzere tüm çekirdekli hücrelerden sentezlenebilir (Gardner ve ark., 2003; Dinarello ve ark., 2002). İlk önce 1984 yılında IL-1 ailesinin iki üyesi IL-1α ve IL-1β monosit cDNA'sından izole edilerek tanımlanmıştır (Auron ve ark., 1984). IL-1β özellikle T hücrelerinin aktivasyonunda aktif rol oynamaktadır (Akarsu ve ark., 2005; Fang-chi ve ark. 2005).

IL-6 doğal ve adaptif immünitede yer alan bir inflamatuar mediyatördür. Mononükleer fagositler, vasküler endotelyal hücreler, fibroblastlar ve başka hücreler tarafından sentezlenir (Abbas, 2003). Yapılan çalışmalarda IL-6 inflamasyon durumunda karaciğerin akut faz proteinlerinin sentezlemesini uyaran hepatosit stimülatör 2 faktörüne benzer rol oynamaktadır (Gauldie ve ark., 1987). IL-6 aynı zamanda diğer sitokinlerle birlikte kemik iliği hemopoetik ana hücreleri için erken dönemde büyüme kofaktörü olarak etki gösterir (Hoori ve ark., 1989). İnflamatuar reaksiyonlarda IL-6 konsantrasyonu diğer inflamatuar sitokinler gibi önemli ölçüde artış göstermektedir. Ortalama 20-60 dk. kadar bir plazma ömrü vardır (Heinrich ve ark., 2003; Schummann ve Zweigner, 1999, Jones, 2005).

Çalışmamızın amacı diş pulpası kaynaklı kök hücrelerinin, iltihabi durumlarda immün sistem hücreleri tarafından salgılanan TNF-α, IL-1β ve IL-6 inflamatuar sitokin içeren ve içermeyen ortamlardaki adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşmalarını karşılaştırmaktır. Bu doğrultuda DPSC'in inflamatuar sitokinler varlığında oluşan stimülasyonuyla birlikte, rejeneratif tedavilerde kullanım potansiyelleri daha iyi anlaşılarak farklı veya daha ileri tedavi teknikleri geliştirilebilecektir. Bu geliştirilen tedavi tekniklerinin endodontide rejeneratif tedavilerde kullanılabilmesi hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler

Kök hücreler özelleşmemiş hücreler olmalarına rağmen bu hücrelerin her biri yeni spesifik hücre fonksiyonları ile özelleşmiş hücrelere dönüşebilen hücrelerdir. Bu hücreler, uygun şartlar altında farklılaşmadan sınırsız sayıda bölünebilme, kendini yenileyebilme ve doku onarımında ve homeostazda çok önemli rol oynayan en az bir farklı hücre tipine dönüşebilme yeteneklerine sahiptirler (Spangrude, 2003). Kök hücreler farklılaşabilme yeteneklerine göre totipotetnt, pluripotent ya da multipotent olarak üç farklı sınıfta ayrılırlar. Totipotent kök hücreler, gelişmiş canlı bir organizmanın uterusuna implante edildiğinde tam bir organizmayı oluşturabilecek özelliktelerdirler. Pluripotent kök hücreler, ekstra embriyonik dokular dışında bir organizmanın her hücresini oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Multipotent kök hücreler ise yetişkin kök hücrelerdir ve sadece hücrelerin belirli soylarını üretme yeteneğine sahiptirler. Bu hücreler hücresel sinyaller vasıtasıyla hasarlı dokulu bir bölgeye çağrıldığında kendilerini yenileyebilirler, hücre bölünmesine uğrarlar ve öncü bir hücrenin yanında bir de progenitör hücre oluşur (Nadig, 2009). Doku rejenerasyonu ile ilgili çalışmalar artarak konunun daha iyi anlaşılması ile kök hücre biyolojisi önemli ve birçok hastalığın tedavisi konusunda umut verici bir alan haline gelmiştir. Kök hücreler travmatik yaralanmaların ve yaşamı tehdit eden patolojik durumların (Spinal kord yaralanması, Parkinson hastalığı) tedavisinde çok güçlü bir kaynak haline gelmiştir ve yapılan çalışmalarla bu alanda başarılı bulunmuşlardır (Choi ve ark., 2012). Kök hücreler, embriyonik kök hücreler ve postnatal veya yetişkin kök hücreler olmak üzere iki ana grupta incelenebilirler. Embriyonik kök hücreler blastositi oluşturan hücrelerdir. Buna karşın yetişkin kök hücreler dokularda bulunan ve bölünerek kendilerini yenileyebilme özelliğine sahip multipotent hücrelerdir. Kök hücreleri diğer vücut hücrelerinden ayıran özelliklerden birincisi normal vücut hücreleri sınırlı sayıda bölünebilirken veya hiç bölünemezken kök hücrelerin sınırsız sayıda bölünebilmeleridir. İkincisi vücut hücreleri belli bir işi

yapmak için özelleşmiş hücrelerken kök hücrelerin özelleşmemiş hücreler olmalarıdır. Üçüncüsü ise vücut hücrelerinin kendileri dışında farklı bir hücre tipi oluşturamazken kök hücrelerin belirli hücresel sinyaller doğrultusunda farklı hücre tiplerine farklılaşarak başka hücreler oluşturabilmeleridir (Nadig, 2009).

2.1.1. Kök hücrelerin tarihçesi

1800'lü yılların başında Carl Rudolph Wirchrow "Tüm hücreler başka hücrelerden gelişerek meydana gelir." teorisini ortaya koymuştur (Pittenger ve ark., 1999) 1869 yılında gerçekleştirilen bilimsel bir çalışmada "kök hücre" teriminin geçtiği görülmektedir (Haeckel, 1868). 1 Haziran 1908 yılında Rus Alexander Maksimov hematopoetik kök hücreleri baz alarak kök hücreleri kandaki hücresel elemanların atası olarak tanıttı ve bitkiler dışında ilk kez "kök hücre" terimini kullanarak bu terimin bilimsel çalışmalarda kullanımını önermiştir (Can, 2014). 1960'lı yıllara gelindiğinde Kanada'lı bilim adamları yaptıkları çalışmalarla kök hücrelerle ilgili daha net bilgiler ortaya koymuşlardır (Becker ve ark., 1963). 1961 yılında Kanada'lı biyofizikçi Till ve hematolog McCulloch farede kök hücrelerin kemik iliğinde bulunduğunu; hematopoetik kök hücrelerin kendini yenileme özelliklerine sahip olduğunu ve herhangi bir kan hücresine dönüşebileceğini yayınladılar (Till ve McCulloch, 1961). 1978 yılına gelindiğinde ilk kez insan kordon kanında kök hücrelerin varlığı gösterilmiştir (Pindull ve ark., 1978). Kök hücre terimi kemik iliğimizde bulunan bir grup hücrenin kan sistemini oluşturan hücreleri yaptığının gösterilmesi ile ortaya çıkmıştır (Santos ve Willenbring, 2007). 1998 yılında ilk defa insan embriyonik kök hücreleri, laboratuvar koşullarında elde edilmiş embriyolardan araştırma yapılması için bağışlanmış olanlar kullanarak izole edilmiştir. Bu izolasyon sonucu elde edilen hücreler uzun süre boyunca çoğaltıldıktan sonra farklı uyaranların yardımıyla in vitro ortamda ektoderm, endoderm ve mezoderm kökenli değişik vücut hücrelerine dönüşmeleri sağlanmıştır. Sonrasında yapılan çalışmalarda da bu kök hücrelerin vücudumuzdaki neredeyse tüm hücre çeşitlerine dönüşme yeteneğine sahip oldukları bulunmuştur (Thomson ve ark., 1998). 1999 yılında ise Mezenkimal Kök Hücre (MKH) tanımını yapılarak bu hücrelerin kemik iliği kaynaklı osteoblastlara, adipositlere ve kondrositlere farklılaşabilen fibroblastik hücreler olduğunu belirtilmiştir (Pittenger ve ark., 1999).

Ülkemizde ilk hücre kültürü çalışmasını 1971 yılında Ord. Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün gerçekleştirmiştir. Aygün, yaptığı çalışmada plesanta ve kordon hücreleri ile çalışmış ve bu dokuların kök hücre kaynağı açısından önemini vurgulamıştır (Çetiner, 2006). Ancak 19 Eylül 2005'de ülkemizde Sağlık Bakanlığı'nın yayınladığı genelgeyle her türlü insan embriyonik kök hücre çalışması süresiz olarak durdurulmuştur (Can, 2014).

2.1.2. Kök hücrelerin genel özellikleri

Kök hücreler farklı tipteki hücrelere dönüşebilirler ve kendilerini yenileyebilirler. Kök hücreler; özelleşmemiş hücreler olmalarına karşın aldıkları sinyallere göre özelleşmiş hücrelere dönüşebilirler, hasarlı dokuları yeniden işlev görecek şekilde düzeltebilirler, çok fazla sayıda farklılaşmamış hücreler oluşturabilirler ve uygun olan ortama yerleşebilirler (Herzog ve ark.). Kök hücrelerin bir dokuya ait fakat işlevsel olarak farklılaşmamış ve potansiyel olarak heterojen hücreler oldukları 2001 yılında Leipzig'de buluşan Doku Kök Hücreleri Çalışma Grubu tarafından belirtilmiştir. Bir hücreyi kök hücre olarak tanımlayabilmek için beş gerekli ölçüt vardır.

Kök hücreler uzun süre boyunca kendilerini yenileyebilirler ve bölünebilirler. Hücrelerin bölünme yetenekleri kromozomlarının uç kısmında yer alan telomer adını alan DNA zincirleri tarafından belirlenir. Telomerler kromozomların yapısal bütünlüklerinin korunmasında rol oynar. Fakat her hücre bölünmesi sırasında telomerik uçlardan bir miktar DNA kaybı olur. Telomeraz enzimi bu kısalmayı önler. MKH'larda telomerlerin boyunun kısalma meydana gelmeden aynı kalmasına yetecek kadar telomeraz enzimi üretilmektedir. Somatik hücreler birçok bölünmeden sonra telomerleinde meydana gelen kısalmalar sonucunda bölünme yeteneklerini kaybederler. Embriyonik kök hücrelerin ve germ tümörü hücrelerinin telomeraz aktivitesinin bu hücrelerin sınırsız bir şekilde kendilerini yenileyebilme özelliklerinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Bayık, 2004).

Kök hücreler herhangi bir dokuya özgün olarak özelleşmemiş hücrelerdir fakat belli sinyaller doğrultusunda özelleşebilirler (Smith, 2001).

Kök hücreler farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler. Kök hücreler somatik 3 germ tabakasına farklılaşabildiklerinden totipotent, pluripotent ve multipotent olarak sınıflandırılmaktadırlar (Morst, 2006).

Kök hücreler hasarlı dokulara nakledildiklerinde çevre dokuların tekrar çoğalabilmesini sağlamaktadırlar (Weismann ve ark., 2001).

Kök hücreler in vivo olarak doku hasarının olmadığı durumda bile nakledildikleri dokularda farklılaşmamış diğer hücrelere yardımcı olabilirler (Loeffler ve Roeder, 2002).

2.1.2.1. Totipotent özellik

Sperm ve yumurta hücreleri birleştiğinde yani döllenme gerçekleşerek meydana gelen zigotta tek başına tüm organizmayı oluşturabilecek genetik bilgiye sahiptir. Bu hücrelere her şeyi yapabilen yani totipotent hücreler adı verilir. Bu hücreler zigot evresinde sekiz hücreli blastomerde bulunan sınırsız olarak farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir. Embriyo ve embriyo dışı membran ve organların kaynağını oluştururlar. Memeli canlıların gelişiminde döllenen yumurta hücresi erişkin bir vücutta bulunan tüm hücre tiplerine dönüşebilmektedir. Üstün farklılaşabilme ve çoğalabilme yetenekleri sayesinde bir organizmayı oluşturabilme yeteneğindedirler. Totipotent özellikteki embriyonik kök hücrelerin bu yetenekleri döllenmeden sonraki beşinci güne kadardır (Blau ve ark., 2001).

2.1.2.2. Pluripotent özellik

Döllenmeden sonraki beşinci günde hücreler küresel şekildeki blastosit formunu alır. Bu küre içindeki hücreler vücuttaki tüm hücrelere farklılaşabilme kapasitesine sahip olsalar bile tek başlarına tüm organizmayı oluşturamazlar. Bu hücreler pluripotent hücreler adını alır ve vücuttaki 200 kadar hücre tipine farklılaşabilirler. Pluripotent hücreler mezodermal (kemik, kas, kan, kıkırdak gibi), ektodermal (nöron, deri, saç gibi) ve endodermal (hepatositler, pankreatik beta hücreleri, sindirim sistemi hücreleri gibi) hücrelere farklılaşma özelliğine sahiptirler. Pluripotent kök hücrelerin vücuttaki tüm hücreleri oluşturabilme potansiyelinden dolayı gerçek kök hücreler oldukları düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda fare embriyolarında 3,5 günde pluripotent özellikteki hücrelerin yaklaşık 32 hücreden oluştuğu görülmüştür. Fakat

bu hücrelerin pluripotent hücre olma özellikleri çok kısa bir süre içinde kaybolmaktadır. Yaklaşık olarak 4. günde blastosel sıvı ile dolar ve iç hücre yığınında bulunan hücreler farklılaşıp endodermi oluştururlar. Bu hücrelere hipoblast denir. İlk farklılaşmadan sonra hala pluripotent olma özelliğini koruyan yaklaşık 20 hücreye epiblast hücreleri denir. Beşinci günde 20-25 tane iç hücre yığını epitelyal kılıfı oluştururkelarken, hipoblasttan viseral endoderm oluşmaktadır. Embriyonun 6,5. gününde ise arka bölgede gastrulasyon başlayarak mezoderm, endoderm ve ektoderm katmanları oluşmaktadır. Epiblast hücrelerinin yaklaşık 5,5 günlük döneme kadar pluripotent özelliklerini koruduğu bilinmektedir (Sağsöz ve Ketani, 2008).

2.1.2.3. Multipotent özellik

Anne karnında ilerleyen gelişim aşamalarında hücrelerin daha özel görevleri olur ve bu hücreler erişkin kök hücrelere dönüşürler. Bu hücreler tek bir germ tabakasına ait hücrelere farklılaşma özelliğindedirler. Erişkin bireylerin dokularında bulunan multipotent hücreler in vitro olarak çok fazla miktarda çoğaltılabilirler ve organizmada oluşan doku hasarlarında çevre dokuların hücrelerine farklılaşarak hasarın düzeltilmesini sağlayabilirler. Bu hücreler embriyonik kök hücrelerle kıyaslandıklarında farklılaşma yeteneklerinin sınırlı olduğu gösterilmiştir (Freshney ve ark., 2007).

2.1.3. Embriyonik kök hücreler

Embriyonik kök hücrelerin izolasyonu ve laboratuvar ortamında farklılaşmadan çoğalabildiği 20 yıl öncesinde yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur. İlk çalışmalar 1981 yılında Dr. Martin Evans ve Dr. Kaufman tarafından fareler ile yapılan deneyde 5 günlük blastositlerin iç hücre kitlesinden sınırsız çoğalma yeteneği olan embriyonik kök hücreler izole edilmiştir (Evans ve Kaufman, 1981). Sonrasında yapılan çalışmalarda ise insan embriyonik kök hücreleri izole edilmiştir. Fare embriyonik kök hücrelerinin izole edilmesi ile edinilen terübeler sayesinde Thomson ve arkadaşları 1998 yılında insan embriyolarının iç hücre kitlesinden embriyonik kök hücreleri izole etmişlerdir (Thomson ve ark., 1998).

Blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilirler ve yüksek telomeraz aktivitelerinden dolayı sonsuz DNA

sentezleme kapasitesine sahiptirler (Trounson, 2005). Embriyonik kök hücreler organizmanın tüm doku tiplerini oluşturma yeteneğindeki pluripotent hücrelerdir (Pera ve ark., 2000). Bu hücreler klinik olarak in vitro fertilizasyon (IVF) programına ihtiyaç duyan bireyler tarafından bilimsel çalışma için bağışlanmış fazla olan implantasyon öncesi embriyoların iç hücre kitlesinden geliştirilir. Pluripotent insan embriyonik kök hücreleri 5 veya 6 günlük blastokistin iç hücre kitlesinden geliştirilir. Embriyonik gelişim sırasında iç hücre kitlesi epiblast ve hipoblast adı verilen 2 ayrı katmanı oluşturur. Hipoblast sonrasında yumurta kesesini oluşturur. Epiblast ise 3 germ tabakasına farklılaşır; ektoderm, endoderm, mezoderm (Bongso ve ark., 2005).

İn vivo ortama nakledilen embriyonik kök hücreler normal olarak gelişimlerini devam ettirir ve tüm dokuların oluşumuna katılırlar. Blastositteki iç hücre kitlesini oluşturan embriyoblastlar pluripotent hücrelerdir. Bu hücreler gerekli sinyaller verildiğinde ve ortam oluşturulduğunda yaklaşık 200 çeşit farklı hücreye dönüşebilirler (deri, kan, pankreas, sinir, karaciğer hücreleri gibi). Bu özelliklerinden faydalanılarak embriyonik kök hücrelerin hastalıkların ve patolojilerin tedavisinde kullanılması fikri düşünülmektedir (Hatoya ve ark., 2006).

2.1.4. Yetişkin kök hücreler

Yetişkin kök hücreler gelişim sürecinin ileri evresinde görülür ve kendini yenileyebilen, özelleşmiş hücrelere farklılaşma yeteneğine sahip, doku ve organlarda bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Yüksek telomeraz aktivitesine sahiptirler fakat embriyonik kök hücreler ile kıyaslandıklarında farklılaşma potansiyelleri daha azdır (Fuchs ve ark., 2004). Bu hücrelerin insan vücudunda çok az sayıda olduğu aynı zamanda kültür ortamında çoğaltılmalarının zor olduğu düşünülmekteydi. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile bu hücrelerin plastik yüzeylere yapışabilme oranlarının yüksek olduğu gösterilmiştir (Prentice, 2004).

Yetişkin kök hücreler insan vücudunda birçok yerde bulunabilir (kemik iliği, diş pulpası, kas, sinir, karaciğer, deri). Bu hücrelerin en fazla bulunduğu bölge ise kemik iliğidir. Bu bölgelerden izole edilen hücrelerin farklılaşabildikleri birçok çalışmada ortaya koyulmuştur. Farklılaşma yeteneklerinin korunarak bu hücrelerin çoğaltılması klinik uygulamalarda kullanım alanı bulabildiklerini göstermektedir. Yapılan

deneysel hayvan modellerinde bu hücrelerin tedavi edici etkileri gösterilmiştir (Shyu ve ark., 2004).

Bazı çalışmalar ile yetişkin kök hücrelerin hasarlı dokuyu buldukları ve oraya yerleştikleri gösterilmiştir. Bu özellikleriyle kök hücreler hasarlı hücreyi hedef almaktadırlar. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve stromal hücre kaynaklı faktör-1 (Stro-1) hasarlı bölgelerde arttığı düşünülüp, bulundukları bölgede kök hücrelerin çağırılması için gereken sinyalleri oluşturdukları düşünülmektedir (Özcan ve ark., 2007).

2.1.4.1. Hematopoetik kök hücreler (HKH)

Kanın hücre elemanlarını ve immün sistem hücrelerini oluşturan ve şekillendiren hücrelere hematopoetik kök hücreler (HKH) adı verilir. HKH'ler kendilerini yenileyebilme özelliğine sahiptirler ve miyeloid ve lenfoid soyların her ikisinden de tüm kan hücrelerine farklılaşabilirler (Ratajczak, 2008). HKH'ler farklılaştıklarında ilk olarak kendilerini yenileyebilme özelliklerini kaybeden hücrelerdir (Lai ve Kondo, 2008). HKH'ler kendilerini yenileyebilmelerini ve farklılaşabilmelerini kontrol altında tutabilen özellikte kök hücrelerdir. Bu sebeple hücre sayıları azalmadan devam eder ve bu özellik sayesinde kan hücreleri yaşam boyu üretimini sürdürür. Aynı zamanda bu hücrelerin çok nadir olarak bölündükleri tespit edilmiş ve bu şekilde dokuların homeostazı sağlanırken bir yandan da onkojenik olayların oluşumunun engellendiği ortaya konulmuştur (Martinez ve ark., 2007).

Bu hücreler embriyogenesis süresi boyunca bir bölgeden başka bir bölgeye göç ederler. İstisnalar dışında vücuttaki tüm hücreler belirli bir iş için özelleşmişlerdir fakat HKH'ler belirli bir iş için özelleşmiş olan hücreler değildirler. Bu hücreler ancak bir uyarı aldıkları durumda özel bir hücreye dönüşebilirler. HKH'ler kemik iliğinden, periferik kandan ve kordon kanından izole edilebilirler (Koçyiğit ve ark., 2008). İnsanlarda yapılan in vivo çalışmalar etik nedenlerden dolayı sınırlı olduğundan HKH'lerin izolasyonunun ve karakterizasyonunun yapılması zor bir prosedür sayılmaktadır; fakat yapılan sınırlı çalışmalar sonucu bu hücrelerin yüzeylerinde CD34, CD133 ve CD150 yüzey antijenlerini eksprese ettikleri ama CD38 yüzey antijenini eksprese etmedikleri görülmüştür (Ratajczak, 2008).

HKH'lerin izolasyonunda ilk kullanılan kaynak kemik ilikleridir. Gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilen verilere incelendiğinde kemik iliği kaynaklı bu kök hücreler %24 oranında kullanılmıştır. Periferik kan ele alındığında HKH, kemik iliğine oranla daha az bulunmaktadır. Dünyada yapılan çalışmalara bakıldığında bu kök hücrelerin elde edilmesi için %70 oranında periferik kan kullanılmıştır. Kordon kanı kök hücreleri periferik kandaki hücrelere göre daha hızlı prolifere olurlar fakat yapılan bilimsel çalışmaların sadece %7'sinde kordon kanı kök hücrelerinin kullanıldığı görülmektedir.

2.1.4.2. Mezenkimal kök hücreler (MHK)

MKH'ler ilk olarak 1970 yılında tanımlanmışlardır. 1976 yılında yapılan bir çalışmada kemik iliği aspiratı fetal buzağı serumu içeren ortama yayılarak morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücrelerin var olduğu gözlemlemiştir. Aynı zamanda bu hücrelerin yüzeye yapışabilme, kemik, kıkırdak ve yağ hücrelerine farklılaşabilme yeteneğinde olduklarını tespit edilmiştir (Friedenstein ve ark., 1976). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda da bu kök hücrelerin üç germ tabakasından gelişen hücre ve dokulara farklılaşabildikleri, hematopoetik olmayan, multipotent hücreler oldukları tespit edilmiştir. Bu hücreler mezodermal kökenli hücrelere farklılaşabildiklerinden dolayı mezenkimal kök hücreler olarak adlandırılmaları uygun görülmüştür (Jiang ve ark., 2002).

Mezenkimal kök hücreler yağ, kemik, kas, kıkırdak gibi özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler, morfolojik olarak fibroblastlara benzerler ve kültürlerde plastik yüzeylere yapışabilirler. Stromal hücrelerin kökenini oluştururlar. Mezenkimal kök hücreler, bağ dokunun ana hücreleridir. Bu doğrultuda mezenkimal kök hücrelerin tanımı yapılırken, yaygın olarak bu hücrelerin plastik yüzeylere yapışmaları, stromal karakterde yüzey antijenlerini eksprese etmeleri ve multipotent farklılaşma özelliğine sahip olmaları belirtilir. Mezenkimal kök hücreler yüzeylerinde, CD29, CD73, CD90, CD105, CD146, yüzey antijenlerini eksprese ederler, fakat, CD14, CD25, CD28, CD34, CD45, yüzey antijenlerini eksprese etmezler (Dominici ve ark., 2007).

CD29, lenfosit ve monositler üzerinde eksprese edilen bir yüzey antijenidir. Granülositler üzerinde ise daha zayıf olarak eksprese edilmektedir. İntergrin ailesinin

bir üyesidir ve literatürde İntergrin-1β olarak da bilinir. Hücre-hücre ve hücre-matriks arası etkileşimlerde görev alır. Hematopoetik ve non-hematopoetik hücreler üzerinde eksprese edildiği gibi, lökositlerde, fibroblastlarda, plateletlerde, endotelyal ve epitelyal hücrelerle mast hücrelerinde de eksprese edilir (Hynes, 1992).

CD73; glikozil fosfotidilinositole bağlı olup, membrana bağlı bir proteindir (Zimmerman, 1992). Bu antijen birçok hücre tipinde bulunur. Bu hücre tiplerine mezenkimal kök hücreler, B ve T lenfositleri ve endotelyal hücreler örnek verilebilir (Barry ve ark., 2001; Thompson ve ark., 1987; Arias ve ark., 1997; Kas-Deelen ve ark., 2001). Bunlara ek olarak bu CD73 molekülü birkaç dokudan köken alan MKH'leri tanımlamak için de kullanılmaktadır (Mafi ve ark., 2011). CD73, lenfosit vasküler adezyon molekülü olarak tanımlanmıştır ve literatürde ekto-nükleotidaz olarak da adlandırılır. Olgun lenfosit belirteci olup hücre içi sinyaller, lenfosit proliferasyonu ve aktivasyonu ile de ilgilidir (Airasand ve Jalkanen, 1996). Hücre dışı nükleotid bozulmasında anahtar düzenleyicidir. CD73 damar geçirgenliğini ve iltihaplı beyin de dahil olmak üzere diğer birçok organda inflamatuar dengeyi düzenleyici bir molekül olarak görev yaptığı gösterilmiştir (Niemela ve ark., 2008).

CD90; immünoglobulin süper ailesi üyesidir, Thy-1 olarak da bilinir ve tüm timositlerde, nöronlarda, kök hücrelerde ve periferal T hücrelerinde eksprese edilir fakat B hücrelerinde eksprese edilemez. Sinyal iletimiyle ilgili rolü vardır. Glikozil fosfotidil inositol bağlı bir glikoprotein yapıdadır. Hematopoetik kök hücrelerin farklılaşmasında, lenfositlerin aktivasyonu ve proliferasyonunun kostimülasyonunda görevlidir. Yapılan çalışmalarda CD90'ın CD45 ile etkileşim içinde olduğu da tespit edilmiştir (Mayani ve Lansdorp, 1994).

CD105; membran glikoproteinidir ve TGF-β reseptör kompleksinin önem teşkil eden bir parçasıdır. Endoglin olarak da adlandırılır. Endotelyal hücrelerde aktivite monosit ve makrofajlarda, kemik iliği stromal hücrelerinde hematopoetik kök hücrelerde veya progenitör hücelerde eksprese edildiği tesipt edilmiştir fakat stromal fibroblastlarda zayıf eksprese edilirler. CD105 yüksek afiniteyle TGF-β1 ve TGF-β3 için reseptör görevi yapar. TGF-β2'ye ise bağlanmaz. Tümör ve derme linflamasyon gibi anjiyogenez oluşan dokularda aktivite endotelyal hücrelerin aşırı CD105

ekspresyonu artar (Pirelli ve ark., 2001). Anjiyogenezde önemli rolü vardır. Anjiyogenik endotelyal hücrelerde de eksprese edilirler (Duff ve ark., 2003).

CD146; cilde renk veren melanositler kaynaklı bir cilt tümörü olan melanoma hücre adezyon molekülü (MCAM) olarak da bilinir. İmmunuglobülin süper ailesine ait olan bir integral membran glikoproteinidir ve vasküler endotelyal hücrelerde güçlü olarak eksprese edildiği gösterilmiştir. Nötrofillerin yaklaşık %30'unda NK'ların da %60'ında eksprese edilir. İnsanların aksine farelerde yapılan incelemelerde monositlerde, dendritik hücrelerde, T hücrelerde, NK T hücrelerde, B hücrelerde veya düz kas hücrelerinde görülmediği gözlenmiştir. CD146 ekspresyonunundaki artış NK hücre olgunlaşmasıyla bağlantılıdır. CD146 NK hücre fonksiyonunda, anjiyogenezde, endotelyal hücre adezyonunda fonksiyonel göreve sahiptir (Bardin ve ark., 2009).

CD14; glikozil fosfatidil inositol bağlı bir membran glikoproteinidir. Ayrıca LPS reseptörü olarak da bilinmektedir. Makrofajlarda, kupffer hücrelerinde, dendritik hücrelerde, granülositlerde ve hepatositlerde eksprese edilir. LPS bağlı protein kompleksi için yüksek afinitede bir reseptördür. CD14'ün gram negatif bakterilerin temizlenmesi ile ilgili rolü mevcuttur (Liu ve ark., 1992).

CD28, immünoglobülin süper ailesinin bir üyesidir ve disülfit bağlı homodinamik tip-1 glikoprotein yapıdadır. T44 veya Tp44 olarak da bilinir. Birçok T hücresinde, NK hücrelerinin alt birimlerinde ve plazma hücrelerinde eksprese edilir. CD28 önemli bir ko-stimülatör molekülüdür. CD80 ve CD86 ile birlikte T lenfosit aktivasyonunun uyarımı, IL-2 sentezi ve hücre ölümünün önlenmesinde görev yapar (Linsey ve Ledbetter, 1993).

CD25, glikoprotein yapıdadır ve düşük afiniteli IL-2Ra olarak da bilinir. Aktive T ve B hücrelerinde, timosit alt birimlerinde, öncü B hücrelerinde ve regülatör T hücrelerinde eksprese edilmektedir. CD122 ve CD132 ile ilgilidir ve IL-2 için yüksek afiniteli reseptör oluşturmada görevlidir (Lowenthal ve ark., 1985).

CD45, transmembran glikoproteini olarak da adlandırılmakta ve ayrıca lökosit ortak antijen (LCA) olarak da bilinmektedir. Hematopoetik hücrelerde eksprese edilir. CD45'in birçok izoformu immün sistemde hücre tipleine bağlı olarak

dağınıklık gösterir. Tüm hematopoetik hücreler üzerinde eksprese edilir; sadece plateletlerde ve olgun eritrositler üzerinde eksprese edilmez. CD45 T hücre reseptörü ve B hücre reseptörü sinyal transdüksiyonunda anahtar role sahiptir. İzoformları çok spesifik olan CD45, T ve B hücrelerinin aktivasyonunda da görevlidir (Pulido ve ark., 1988).

CD34; yüksek glikolize hematopoetik progenitör bir antijendir ve iki tane izoformu mevcuttur. Hematopoetik hücreler üzerinde eksprese edildiği gibi endotelyal hücreler üzerinde, beyinde ve testislerde de eksprese edilir fakat timusta, dalakta ve kemik iliğinde düşük eksprese edilir. Hücre adezyonunda görev alan bir antijendir (Bhatwadekar ve ark., 2010).

Yapılan çalışmalarda ilk mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kemik iliği tanımlanmıştır (Kem ve ark., 2006). Sonraki çalışmalarda ise kemik iliği dışında birçok dokudan mezenkimal kök hücre izolasyonları yapılabileceği bulunmuştur. Diş pulpasından, kemikten, kas dokusundan, maksillofasial dokulardan, karaciğerden, kordon kanından, plasentadan, amniyon sıvısından ve periferik kandan da başarılı bir şekilde mezenkimal kök hücre izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar ile kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin kemik iliği mezenkimal kök hücrelerine göre biyolojik olarak daha kararlı hücreler oldukları tespit edilmiştir (Lu ve ark., 2006).

MKH'ler sınıf I MHC molekülünü eksprese ederler fakat sınıf II MHC molekülünü ve CD40, CD70, CD86 gibi yüzey antijenlerini eksprese etmezler. Sonuçta MKH'lar MHC I molekülünü eksprese etmelerinden dolayı T hücrelerini aktive etseler de diğer aktive edici molekülleri eksprese etmedikleri için T hücreleri aktivasyonlarını tamamlayamaz. MKH'ler hücre döngüsünü G_1 fazında durdurur ve bu şekilde T hücrelerin çoğalmasını engellemiş olurlar. MKH'ler ve T hücrelerin kültürü ile ilgili gerçekleştirilmiş çalışmalarda MKH'ler belli bir süre sonra kültürden alınsa bile T hücrelerinin çoğalamadıkları gösterilmiştir (Simmons ve Torok, 1991). NIKH'ler immün sistemde rol oynayan B lenfositlerinin ve dendritik hücrelerin de üstünde etki sahibidirler. Monositlerin dendritik hücrelere farklılaşmasını engelleyen MKH'ler IL-10 üreterek daha güçlü bir yanıt oluşmasına neden olurlar. MKH'lerin immün sistemi baskılayıcı bu etkilerinden dolayı immün sistemle ilgili hastalıkları

tedavi edici olarak kullanılabilecekleri düşünülmüştür (Pountos ve Giannoudis, 2005).

2.1.4.2.1. Diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler

Diş farklı türde birçok dokunun küçük bir anatomik ortam içinde bir arada bulunduğu oluşumdur. Bu da hücrelerin pluripotensi özelliği ile pulpa ve çevresindeki dokuların sürekli onarımı için onlara geniş bir yenileme yeteneği kazandırır. Farklı doku bileşenleri belli bir hızda yaşam boyu yenilenirler. Nöral krista kaynaklı kök hücrelerin doğumdan sonraki yaşamda in vivo farklılaşma yetenekleri erken embriyo dönemindeki kadar yüksek olmayabilir. Dişten elde edilen kök hücrelerden ilki Gronthos ve ark. tarafından kalıcı dişlerin pulpasından ayrıştırılan diş pulpası kök hücreleridir (DPKH, dental pulp stem cells, DPSCs) (Gronthos ve ark. 2000).

2003 yılında aynı araştırmacıların bulunduğu grup çocukluk döneminde fizyolojik olarak düşen süt dişlerinin pulpalarında da benzer özellikteki kök hücrelerin varlığını göstermiştir (süt dişi kök hücreleri, SDKH, stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED) (Miura ve ark. 2003).

2.1.4.2.1.1. Süt dişi pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler (SHED)

Klinik çalışmalarda kullanılacak olan kök hücrelerin kolay ulaşılabilir bir kaynaktan izole edilmesi gerekmektedir. Süt dişi pulpası kök hücreleri ilk olarak Miura ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir ve bu hücrelerin multipotent kök hücreler olduğu belirtilmiştir. Bu hücreler (Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth) olarak adlandırılırlar. İnsan süt dişlerinin pulpasından izole edilen mezenkimal kök hücrelerin nöronlara, adipositlere, osteoblastlara ve odontoblastlara farklılaşabildiği gösterilmiştir. İn vivo olarak yapılan deneylerde süt dişlerindeki kök hücrelerin, kemik ve dentin formasyonunu uyardığı gösterilmiştir fakat aynı zamanda bu hücrelerin dentin-pulpa kompleksini de oluşturamadığı gösterilmiştir. Süt dişi pulpası kaynaklı kök hücreler, gömük yirmi yaş dişi pulpası kök hücreleri ile karşılaştırıldığında daha yüksek proliferasyon oranı göstermişlerdir ve bu nedenle

gömük yirmi yaş dişi pulpası kök hücrelerinden ayrı olarak değerlendirilmektedirler (Bluteau ve ark., 2008; Miura ve ark., 2003).

Suchanek ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada bu hücrelerin yüzeylerinde CD44, CD90, CD73, CD105, CD117, CD166, CD29, HLA belirteçlerini eksprese ettiklerini ve CD18, CD31, CD34, CD49d, CD49e, CD106, CD133, CD146, CD184, CD197, HLA II belirteçlerini ise eksprese etmediklerini göstermişlerdir (Suchanek ve ark., 2010).

SHED hücreleri ve gömük yirmi yaş dişi kök hücreleri karşılaştırıldığında, SHED hücrelerin vitro ortamda yirmi yaş dişi kök hücrelerine göre yüksek oranda prolifere olduğunu ve yüksek farklılaşma yeteneği gösterdiği görülmüştür. SHED hücreleri in vivo transplantasyon sonrasında ise yüksek mineralizasyon kapasitesi göstermiştir. Morfolojik olarak SHED ve DPSC'lere çok benzer olduğu gösterilmiştir, yapılan çalışmalarda büyüme oranları ve farklılaşma karakteristikleri kıyaslandığında SHED hücrelerin yüksek oranda eksprese oldukları ve farklılaşabildikleri gösterilmiştir (Wang ve ark., 2012).

SHED hücreleri insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerle (BMMSC) karakterizasyon özellikleri kıyaslandığında in vitro ortamda Th17 hücreleri üzerinde belirgin inhibe edici etkileri gözlemlenmiştir. Kemik iliği kök hücrelerinin immünomodulatör fonksiyonları olduğu ve immün hastalıkların tedavisinde başarı sağladığı görülmüştür. SHED hücrelerin immünomodülatör etkisi kemik iliği kök hücreleri ile karşılaştırıldığında ise SHED hücrelerin Th17 hücre inhibisyonunda anlamlı etkisi olduğu görülmüştür. SHED transplantasyonunun Treg oranını Thi 7 yoluyla yükselttiği görülmüştür (Yamaza ve ark., 2010).

2.1.4.2.1.2. Daimi diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DPSC)

Embriyonik gelişim sırasında diş tabakası ektoderm tabakasından gelişmektedir. Ektoderm dişin germ tabakasını oluştururken, nöral kabartı ise dişin organını, papillasını ve folikülünü oluşturur. Diş pulpası gevşek bağ dokusudur, embriyonik dental papilladan (ektomezenkimal doku) meydana gelir ve dişin pulpa odasında bulunur. Diş pulpası bu sebeple mezenkimal kök hücreleri içermektedir (Mauth ve

ark., 2007). Diş pulpası kök hücreleri, plastik yüzeylere yapışabilen, prolifere olabilen multipotent hücrelerdir. Yirmi yaş diş pulpalarından kök hücrelerin izolasyonu ilk olarak Gronthos ve arkadaşları tarafından yapılmıştır sonrasında bu hücrelerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik olarak farklılaştıkları gösterilmiştir (Gronthos ve ark., 2000). Diş pulpası kaynaklı kök hücrelerin kemik iliği kaynaklı kök hücrelere kıyasla daha hızlı prolifere olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu hücrelerin izolasyonlarının daha kolay olmasından dolayı kemik iliğine göre daha çok izole edilebilmektedir (Morsczeck ve ark., 2007).

Diş pulpası kaynaklı kök hücreler tedavi amaçlı olarak gerekli olan bütün özellikleri karşılamaktadır. Bu hücrelerin izole edilmesi çok kolaydır. Bu hücrelerin farklılaşabilme potansiyelleri çok yüksektir. Pasaj sayıları çok yüksektir. Dondurma ve çözülmeleri sonrasında problem olmamaktadır (Todorevic ve ark., 2008).

Diş pulpası kök hücreleri yüzeylerinde CD13, CD44, CD71, CD146, CD29, CD73, CD90, CD105 ve CD166 belirteçlerini eksprese ederler. CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD20, CD33, CD34, CD45 CD106, CD117, CD123, CD133, CD138, HLA-G ve HLA-DR yüzey belirteçlerini ise eksprese etmezler (Doğan ve ark., 2012; Demircan ve ark., 2011).

Diş pulpası kök hücrelerinin gen ekspresyonlarının belirlenmesi ile bu hücrelerin alkalin fosfataz, dentin matriks proteini-l, dentin siyalofosfoproteinleri eksprese ettikleri gösterilmiştir. Gen ekspresyon analizleri ile bu hücrelerin eksprese ettiği genlerin nerdeyse tümünün hücre dışı matriks bileşenleri, hücre adezyon molekülleri ve büyüme faktörlerini kodladığını ortaya koymuştur (Krebsbach ve Robey, 2002). Diş pulpası ve kemik iliği kök hücreIerinİn gen ekspresyonları karşılaştırıldığında aralarında çok az farklılık olduğu gözlemlenmiştir. Diş pulpası kök hücrelerinde hücre döngüsü aktivatörünü yüksek oranda eksprese ettiği gözlemlenmiştir ve buda neden yüksek proliferasyona sahip olduğunu açıklamaktadır (Todoroviö ve ark., 2008). Diş kök hücreleri dondurulduktan sonra çözüldüğünde bu hücrelerin yüksek canlılık oranı gösterdiği görülmüştür bu sebeple bu hücrelerin çeşitli çalışmalarda kullanabilir olduğunu gerektiğinde çözülüp kullanılabileceğini göstermektedir (Daquino ve ark., 2008). Bu hücrelerin aynı zamanda anti inflamatuar ve immün sistemi düzenleyici özellikleri vardır. Diş dokularının enfeksiyonlarında, bağışıklık

sisteminin yanıt oluşturmasında rol oynamaktadırlar. Diş kök hücreleri allojenik dokulara implante edildiklerinde immunolojik tolerans gelişimini uyardıkları gösterilmiştir. Aynı zamanda bu hücrelerin bağışıklık sistemini baskılayıcı etkisi, T lenfositleri ile kültürlerinde gösterilmiştir. Bu hücreler T hücrelerinin proliferasyonunu baskılamışlardır (Graziano ve ark., 2008).

2.1.3. Mezenkimal kök hücrelerin in vitro farklılaşması

Mezenkimal kök hücrelerin multipotent tanımını kazanmaları bu hücrelerin in vitro ortamda en az üç farklı hücre tipine farklılaşmalarıyla olur. Bu işlem hücrelerin hem potensi yetkinliğini ortaya koyar; hem de hücre tanımlanmasına da önemli katkıda bulunur. Bu sebeple MKH'yi tanımlarken yüzey belirteçlerinin yanı sıra farklılaşma yetilerinin de sorgulanması gerekmektedir. Günümüzde MKH'nin mezoderm yönündeki farklılaşmasına ek olarak endoderm ve ektoderm türevi hücrelere de farklılaştırılması söz konusudur. Bu doğrultuda yapılan çalışmalarda çoğunlukla kemik iliği kaynaklı kök hücreler kemiğe, kıkırdağa ve kas hücrelerine dönüştürmüştür. Bu işlemlerde kullanılan kültür eklentileri ve koşullar çalışmalar ilerledikçe kök hücreler için en uygun biçime getirmişlerdir (Caplan ve ark., 1991).

MKH'nin özgün uyarım moleküllerine verdiği yanıtlar ile bunların fenotipleri ve içsel salgı özellikleri arasındaki ilişkiyle alakalı çalışmalar devam etmektedir. Çeşitli dokulardan ayrıştırılan mezenkimal kök hücrelerin multipotent olduğu konusunda fikir birliğine varılmış olsa da her MKH'nin belli uyarıcı moleküllere vermiş oldukları yanıtlar arasında da belirgin farklar vardır. Dolayısıyla MKH büyük olasılıkla dokunın sınırlı çevresi tarafından olgunlaştırılmakta, bu sebeple de her MKH türü farklılaşma girişimlerine birbirinden farklı yanıtlar vermektedir (Meirelles Lda ve Nardi 2003; Yoo ve ark. 1998; Estes ve ark. 2006).

Mezenkimal kök hücreler köken aldıkları germ yaprağının türevi hücreler olan osteoblastlar, adipositler, kondrositler, endotel hücreleri, miyositler ve fibroblastlara kolaylıkla farklılaşırlar. Bu dönüşümlerin özellikle ilk üçü vücut dışına alınan MKH'nin işlevini sınanıak için altın standart olarak kabul edilir. MKH mezoderm serisi hücrelerin yanı sıra ektodem ve endoderm serisi hücrelere de farklılaşarak bu hücrelerin işlevini kazanırlar (Caplan ve ark. 1991).

Kültüre edilen her hücre kültür ortamının bileşiminden etkilenir, bu nedenle farklı hücreler ve amaçlar için çok sayıda kültür ortamı tasarlanmıştır. MKH'nin çoğalma ve farklılaşma süreçlerinde kullanılan kültür ortamları genellikle MEMI DMEM, RPMI-1640 ve DMEM/F-12'dir. Çoğalma ve farklılaşma kültür ortamlarının çoğu hücrelerin yapışması ve çoğalması için fötal buzağı serumu (FCS) veya fötal sığır serumu (FBS) gerektirir. Bunların kullanılamadığı durumlarda insan serumu, plazması, plaket lizatı veya büyüme faktörleri kullanılır. Üzerinde çalışılan MKH klinik amaçla çoğaltılıyor veya farklılaştırılıyorsa bir hayvansal kaynaklı olan FCS/FBS'nin kullanımı uygun olmaz. Ticari olarak satılan bu ürünler bir dizi arındırma işlemlerinden geçiriliyor olsa da virüs ve prionlar ile bulaşan hastalıkların kaynağı olabilmektedirler. Hayvan kaynaklı ürünlerin insanda kullanılmasını sınırlayan veya engelleyen ikinci faktör immünojenik tepkimeye neden olması riskidir. Hayvan kaynaklı bazı proteinler alıcıda immün yanıtın oluşması sonucunda reddedilir ve anaflaksi oluşmasına sebep olabilir (Selvaggi ve ark., 1997). Anaflaksi durumu oluşması riskine karşı FCS/FBS ürünlerinin yerini alabilecek başka ürünlerin kullanımı gerekir. Bunun için en uygun ve genellikle kullanılan ürünler kişinin kendi (otolog) serumu, ticari olarak kullanılan ise insan serumu (AB serum) ve insan kan platelet lizatıdır (Bieback ve ark. 2009).

2.1.3.1. Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması

MKH 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 boyama yöntemiyle gösterilen bu yapılar mikroskobik ölçeklerden makroskobik ölçeğe doğru büyürler. Artan alkalin fosfataza (AF) koşut olarak kalsiyum birikimleri de ortaya çıkar. AF'nin enzim etkinliği ve kalsiyum artışı kolorimetrik analizlerle ölçülebilir (Song ve ark. 2009).

Osteojenik farklılaşmada kullanılan klasik yöntem MHK'nın tek tabakadan oluşan kültürlerinin deksametazon, β-gliserofosfat ve askorbik asit ile haftalarca kültüre etmektir. Bunlara ek olarak D3 vitamini (vitD3) TGFβ ve BMP de kullanılır. Osteojenik eklentileri 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 (Hildebrandt ve ark. 2009).

Deksametazon bir sentetik glükokortikoid 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 a5-integrin'in ifadelerini artırır. Bu iki eleman Runx-2 bağımlı gen ifadesini artırarak osteojenik dönüşümü gerçekleştirir (Hamidouche ve ark. 2009).

Askorbik asit (C vitamini) kollajen sentezinde prolin ve lizin amino asitlerinin hidroksilasyonunda bir kofaktör olarak görev yapar. Kollajen bilindiği gibi vücutta en çok bulunan proteindir. Askorbik asitin olumsuz yönü kültür ortamlarında 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 (Fernandes ve ark. 2010).

D3 vitamini sekosteroid bir hormon olarak oseoblast işlevleri için yaşamsal önemdedir. Etkin biçimi olan la-25-dihidroksi vitamin D3 hücre döngüsünde G_1-S evresi geçişini engelleyerek hücre çoğalması üzerinde negatif etki gösterir, böylece çoğalmanın engellenmesiyle osteojenik farklılaşma uyarılmış olur (Wang ve ark., 1996).

Yukarıda özetlenen dört maddeye ek olarak özelilde TGFβ'nın kemikte bulunan izoformu olan TGFβ1 hücre büyümesini uyararak kemik yapımında rol alan kollajen ve kollajen olmayan birçok matriks bileşeninin sentezinin düzenlenmesini sağlar (Centrella ve ark. 1991).

2.1.3.2. Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşması

Kıkırdak dokusu yenilenmesi az veya hiç olmayan dokulardandır, bu nedenle kıkırdak hasarlarının iyileşmesi pek mümkün değildir. Hiyalin kıkırdağın çevresindeki perikondriyum bölgesindeki kondroblastların bir miktar yenilemeye katkısı vardır, ancak kıkırdak hasarlarının birçoğu perikondriyuma kadar ulaşmaz. Büyük kıkırdak hasarlarıysa çoğunlukla fibröz kıkırdak biçiminde onarılır, ancak fibröz kıkırdak, hiyalin kıkırdağa göre çok daha işlevsizdir. Klinikte osteokondral hasarların onarımı büyük sorundur. Genelde otolog kondrositlerin bu amaçla kullanılması denenmektedir; ancak bunların elde edilmesi, sayıca azlığı ve yaşama şanslarının az olması en önemli sorunlar olarak karşımıza çıkar. Bu bağlamda MKH kıkırdak hasarının hücresel tedavisinde ümit verici bir hücre grubu olmuştur (Koga ve ark. 2009).

MKH kondrojenik farklılaşma sırasında fibroblast enzeri görünümlerinden küresel biçime dönüşürler. Hücreler kollajen tip 2'nin oluşturduğu ağsı ve bol miktarda matriks ile çevrelenir. Bunların arasında proteoglikan çökelekleri ve yüksek molekül ağırlıklı glikozaminoglikan makro molekülleri yer alır. Bu oluşumlar klasik histokimyasal boyalardan alcian mavisi, toluidin mavisi ve safranin O ile gösterilir veya özgün birtakım analizlerle miktarları belirlenir (Can ve Karahuseyinoglu 2007; Fernandes ve ark. 2010).

Bir glükokortikoid olan deksametazon kıkırdak matriksinin ana proteini olan kollajen lifi kodlayan genlerin ifadesini artırır (Derfoul ve ark. 2006).

Askorbik asit ve bunun türevi olan Asc-2-P prolin ve lizin amino asitlerinin hidroksilasyonu sağlayarak kollajen yapımını uyarır. Kültür ortamına askorbik asit eklenmesi MKH'nin çoğalmasını artırırken kıkırdak matriksinin en önemli kollajeni olan tip 2'nin sentezini uyarır (Richter ve ark., 2009).

TGFβ hücre üzerinde iki farklı reseptöre bağlanarak Smad proteinleri üzerinden etki gösterir. TGFβ deksametazon ile birlikte insan MKH'nin kondrojenik farklılaşması için kaçınılmaz büyüme faktörüdür (Richter ve ark., 2009).

BMP'ler kıkırdak oluşumunu başlatan ve sürdüren faktörlerdendir. BMP'ler kıkırdak öncüsü hücrelerin kararlanmasını ve farklılaşmalarını sağlayarak kemik şekillenmesinde rol oynarlar (Pouge ve Lyons, 2006).

2.1.3.3. Mezenkimal kök hücrelerin adipojenik farklılaşması

Omurgalıların vücudunda yağ dokusunu oluşturmak üzere adipositlerin ortaya çıkışı ve bunların gıda alımına bağımlı olmadan canlının yaşamını sürdürebilmesine olanak tanıması önemli bir evrimsel gelişmedir. Erişkinde yağ dokusu, özellikle plastik ve rekonstrüktif cerrahide yumuşak doku bozukluklarının onarımında yanıklar, travmaları tümörler ve doğum anomalileri sıklıkla kullanılır. Yetersiz damarlanma nedeniyle otolog yağ dokusu nakli her zaman istenen verimliliğe ulaşamamakta ve nakledilen doku bir süre sonra rezorbe olmaktadır. Bu bağlamda MHK'den elde edilecek yağ dokusunun doku mühendisliği yaklaşımıyla hasarlı bölgeye yamanması oldukça ilgi çekici bir gelişme olarak karşılanmaktadır (Patrick, 2001).

İn vitro adiposit farklılaşması çok basamaklı olup genellikle multiloküler yağ damlacıklarını barındıran preadipositlerin gelişmesiyle son bulur (Karahuseyinoglu ve ark. 2008).

Fibroblast biçimli bir MKH'nin yağ ücresine dönüşümünde tipik olarak yuvarlaklaşma, sitoplazmada yağ damlacıklarının ortaya çıkması ve giderek büyümesi, laminin, fibronektin ve kollajen tip 1, 3, 4, 5 ve 6 gibi hücre dışı matriks proteinlerinin sentezi gerçekleşir (Kubo ve ark. 2000).

Yağ damlacıklarının ışık mikroskobik olarak görünmesinde en yaygın Oil Red boyası kullanılır (Pairault ve Green, 1979).

Adiposite özgü üç doku faktörü olan ve PPAR ailesinden olan PARY2 (peroxisome proliferation-activated receptor Y2), C/EBP (CCAAT-enhancer-binding protein) ve SREBP1 (sterol regulatory element-binding transcription factor 1) adipojenez için gerekli genlerin ifadesini kontrol ederler (Rosen ve ark. 1999).

MKH'nin adipojenik uyarımı için öncelikle hücrelerin kültür kabında neredeyse tam yoğunluğa ulaşması gerekir. Bu süreçte FBS kullanılır, ancak MKH'yi uzun süre serum altında bırakmak adipojenezi olumsuz yönde etkiler. Bunun nedeni büyük olasılıkla serumun içindeki TNF-α ve TGFβ'dır (Hauner ve ark. 1989). Bu nedenle uzun süreli farklılaştırma protokolleri için FBS yerine insan serumunun kullanılması önerilir (Hemmrich ve ark. 2005).

2.2. Sitokinler

Sitokinler doğal ve adaptif immünitede rol alan ve hücrelerin immün fonksiyonlarını sağlayan proteinlerdir. Bu moleküller lenfositlerin büyüme ve farklılaşmasında, hematopoetik hücrelerin gelişiminde ve antijenlerin eliminasyonunda rol oynarlar (Abbas ve ark. 2003). Sitokinler embriyonik gelişim, hastalık patalojisi, enfeksiyona cevap, antijenlere spesifik yanıt ve doku yaşlanması gibi neredeyse her türlü biyolojik olayda rol sahibidir (Dinarello, 2007). Sitokinler hormona benzemekle beraber tam hormon değildirler (Norohira ve ark., 1995).

Sitokinler mononükleer fagosit, lenfosit veya lökosit kaynaklı olup hücreler arası iletişimde rol oynayan düşük molekül ağırlıklı çözünebilir protein yapıdadırlar ve genel anlamda biyolojik yanıt değiştirici şeklinde tanımlanabilirler (Watkins, 2003; Abbas ve ark, 2003). Sitokinlerin CD4+ T lenfosit ve aktive makrofajlar gibi birçok hücre tipinden meydana gelen medyatörler oldukları tespit edilmiştir. İmmatür CD4+ T hücreler (T_H0) de farklı sitokin sekrete edebilme yeteneğinde olan T_H1 ve T_H2 hücrelerine farklılaşma özelliğine sahiptirler (Park ve Barbul, 2004).

Sitokinler mikroorganizma ve diğer antijenlere karşı yanıtta salgılanan ve immün ve inflamatuar reaksiyonları düzenlerler ve sekresyonları kendini sınırlayıcı özelliktedir. Etkileri sıklıkla birbirleriyle kesişen etkilerdir (Xie ve Deng, 2006).

Sitokinler ilk olarak 1940'larda üzerinde çalışılmış ve o zamnlar çözünebilir "faktörler" olarak adlandırılmışlardır. İlerleyen çalışmalarla birlikte sitokinler en doğru şekilde "hücreler tarafından üretilip diğer hücreler üzerinde etki yaratan, protein yapıda, çözünebilir faktörler" olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde yapılan son çalışmalarda ise hücrede üretilip hiç salgılanmayan ve sadece hücre içi membran proteini olarak görev yapan sitokinlerin olduğu da tespit edilmiştir (Dinarello, 2007).

Başlangıçta sitokinler kaynak aldığı hücrelere göre ayrılmak amacıyla lenfokinler veya monokinler olarak adlandırılmaktaydılar fakat bu isimlendirme uzun ömürlü olamış ve sonrasında isimlendirme "sitokin" şeklini almıştır. Yapılan çalışmalarda kırmızı kan hücreleri istisna olmak üzere her hücrenin sitokin üretebildiği ve aynı zamanda sitokinlere yanıt verebildiği tespit edilmiştir (Mier ve Gallo, 1980; Dinarello, 2003).

Sitokinler genellikle diğer salgılanan sitokinlerin sentez veya etkilerini üzerinde değişiklik meydana getirerek lokal veya sistemik etki gösterebilirler. Bu etkiti hedef hücrelerdeki mevcut spesifik membran reseptörlerine bağlanarak gösterirler. Bu reseptörler temel olarak iki ana birimden oluşurlar. Birincisi bağlanmanın gerçekleştiği ekstraselüler bölge, diğeri ise sinyal iletiminin gerçekleştiği sitoplazmik bölgedir. Çoğu sitokinlere hücresel yanıt, hedef hürelerde gen ekspresyon değişimleri ile meydana gelir. Böylelikle hedef hücreler yeni fonksiyonlar geliştirerek prolifere olabilirler (Abbas ve ark., 2003).

Sitokinler, T hücrelerinin, B hücrelerinin ve hemato-poetik hücrelerin gelişimi ve farklılaşmasında, inflamasyonun uyarılması veya baskılanmasında önemli rol oynarlar. Bazı sitokinler bölgesel etki gösterirken bazı sitokinlerin sistemik etkileri daha belirgindir (Dalkılıç ve ark., 2012). Sitokin sekresyonu, bakteriyel ürünler, immün kompleksler, toksinler, fiziksel incinmeler ve çeşitli inflamatuar olaylarla uyarılabilirler (Bienvenu, 1995; Cheeseman, 1993).

2.2.1. İnflamatuar sitokinler

Doğal bağışıklık sisteminin inflamasyona ve doku hasarına en erken cevaplarından biri, akut inflamatuar cevap için önemli rolü olan sitokin salınımıdır (Abbas ve ark., 2003). İnflamasyon patojenlerin elimimine edilmesinde ve enfeksiyona karşı korunmada önemli bir immün cevaptır. Bu sebeple inflamatuar sitokinlerin salınımı hastalığın patalojisini kötü yönde etkileyebilecek enfeksiyon, inflamasyon ve travmaya karşı konağın yanıtında önemli rol oynamaktadır (Dinarello, 2000; Gao ve ark. 2015).

Bu grup sitokinler viral enfeksiyonlara karşı koruma sağlayan sitokinler ile bakterilere karşı korumayı sağlamak için enflamatuar reaksiyonları başlatan

sitokinlerdir. İnflamatuar sitokinler bu sebeple çalışmalarda "Doğal bağışıklığı düzenleyen sitokinler" olarak da adlandırılmaktadır (Güner ve ark., 1997).

İnflamatuar sitokinler aktive makrofajlar, lenfosit ve diğer hücre tipleri tarafından oluşturulur ve proinflamatuar sitokinler olarak da adlandırılırlar (Armstrong ve ark., 1996). Çoğunlukla makrofajlardan ve dentritik hücrelerden salgılansalar da inflamatuar sitokinlerin endotelyal veya epitelyal hücrelerden salgılandığı da tespit edilmiştir (Abbas ve ark., 2003).

İnflamatuar sitokinlerin çoğu salgılandıkları hücrelere yakın olan hücrelerde etki gösterir. Buna "parakrin etki" denir. Bazı enfeksiyonlarda ise salgılanan sitokinler yeterli miktarda olduğu taktide daha uzaktaki hücrelerde de etki gösterebilmektedirler. Bu tip etki de "endoktin etki" olarak adlandırılır (Abbas ve ark., 2003).

Farklı inflamatuar sitokinlerini benzer, ortak veya tamamen kendine özgü etkileri olabilir. Bir inflamatuar sitokin tipi diğerlerinin salgılanmasını uyarıcı ya da inhibe edici etki yaratabilir (Dinarello, 2000; Abbas ve ark., 2003).

Doğal bağışıklık sisteminin en önemli üç inflamatuar sitokinleri TNF, IL-1 ve IL-6'dır. Bunlarla birlikte doğal bağışıklık sisteminde rol alan diğer inflamatuar sitokinler IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, Tip I interferonlar (IFN) ve kemokinlerdir (Güner ve ark., 1997).

Yapılan çalışmalarda inflamatuar sitokinlerden özellikle IL-1β, IL-6 ve TNF-α'nın patalojik ağrıdan sorumlu olduğu tespit edilmiştir (Zhang ve An, 2007).

2.2.1.1. TNF-α

Ev sahibi hücrelerin gram(-) bakterilere karşı esas inflamatuar mediyatörlerinden biridir. Diğer infeksiyoz organizmalara karşı verilen hücresel yanıtta da rol oynar. TNF'lerin hücresel kaynağı LPS ile aktive olan mononükleer fagositlerdir. TNF-α, aktive monositler, makrofajlar ve daha az çoğunlukta aktive T hücreleri, B hücreleri, mast hücreleri, fibroblast, keratinosit, kupfer hücreleri, düz kas, sinovial örtü hücreleri ve bazofil gibi birçok hücre tipinden salgılanmaktadır. İnsan TNF'si

nonglikolize bir trans-membran proteindir. TNF-α aktif makrofajlardan salgılanır. Bunun haricinde bir de aktif T hücrelerinden salgılanan TNF-β mevcuttur (Nororiha ve ark.,1995; Oppenheim ve ark.,1994; Jaatela ve ark., 1991).

TNF-α'nın ana fonksiyonu enfeksiyon bölgesine nötrofil ve monositlerin çekilmesini sağlamaktır. TNF-α bu etki doğrultusunda vasküler endotel hücrelerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırır. Endotelyal hücrelerden ve makrofajlardan kemokin salınımını arttırmada rol oynar. Makrofajlardan IL-1 salınımını arttırır ve bazı hücre tiplerinin apoptozunu teşvik eder. Ciddi enfeksiyonun mevcut olduğu durumlarda TNF-α çok fazla miktarda mevcut olduğunda sistemik ve klinik olarak patalojik olaylara sebep olabilir (Abbas ve ark., 2003).

TNF-α'nın birçok özel etkisi aşırı yüksek konsantrasyonlarında ortaya çıkan öldürücü etkilerine katkıda bulunmaktadır**.** TNF-α, myokard kasılabilirliğini azaltmayı takiben doku perfüzyonunu azaltır. Bu etki, kardiak myositteki Nitrik Oksit Sentaz (NOS) diye adlandırılan enzimin etkisiyle argininin, sitrülin ve NO'ya dönüştürülmesi ve NO'nun myokard kasılabilirliğini azaltması sonucu meydana gelir. TNF-α, damar düz kaslarını gevşeterek kan basıncını düşürür ve doku perfüzyonunu azaltır. TNF-α bu etkileri, düz kas hücrelerine direkt etki ederek ve damar endotel hücreleri tarafından salgılanan prostasiklin ve NO gibi damar genişleticilerin salgılanmasını uyararak indirekt yoldan yapar. TNF-α, etki mekanizmasıyla intravasküler koagülasyona neden olur. TNF-α, yaşamı sonlandıracak düşük kan glukoz düzeyinin oluşması gibi ağır metabolik bozukluklara neden olabilir. Bu etki, glikozun kas tarafından aşırı kullanımına ve karaciğer tarafından glukozun yerine koyulamamasınyla oluşan patolojik bir tablodur (Nororiha ve ark., 1995; Farrar ve Schreiber, 1993; Vasalli, 1992).

TNF-α sistemik akut faz reaksiyonlarını tetikler. Akut faz proteinlerinin artması sonucu ateş oluşumu ve iştah kaybı gözlenir. TNF-α, endotel dokuda lökositlerin adezyonu ve prokoagülan aktiviteden sorumludur, kollagen sentezini ve fibroblast proliferasyonunu arttırdığı gibi kuvvetli bir kemoreaktif medyatör olup nötrofillerin kemotaksisi ve aktivasyonuna neden olur (Takabayashi ve ark., 1996; Cheeseman ve Slater, 1993; Haeggstorm ve ark., 2002).

TNF-α, immünoinflamatuar reaksiyonlarda düşük konsantrasyonlarda lokal etki gösteren güçlü parakrin ve otokrin bir düzenleyicidir. Aynı zamanda birçok hücre tipinde büyüme ve farklılaşmayı düzenler. Çalışmalar TNF-α'nın akut inflamasyonda ve antitümöral immünitede en önemli sitokin olduğunu göstermektedir. Nötrofil ve endotel hücrelerinin uyarılmasını sağlayarak adezyon ve kemotaksisi yönetir. Fibroblastların ve endotel hücrelerinin TNF-α aracılıklı proliferasyonu yara iyileşmesinde önemli bir elementtir. Ayrıca TNF-α, endotelyal vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM)'nün sentezinde önemli bir uyarandır (Park ve Barbul; 2004; Drenth ve ark., 1995; Armstrong ve ark., 1996).

2.2.1.2. IL-1β

Ana fonksiyonu TNF gibi enfeksiyon ve diğer inflamatuar uyaranlara karşı konak yanıtının medyatörlüğünü yapmaktır ve TNF-α ile beraber etki gösterir (Abbas ve ark., 2003). Timosit yanıtını yükseltgeyen, poliklonal aktivatör olarak mononükleer fagositlerden türeyen bir polipeptiddir (Nororiha, 1995; Dinarello, 1992; Fanslow ve ark., 1990, Dinarello, 1984).

IL-1'in temel kaynağı aktive mononükleer fagositlerdir. TNF gibi IL-1'de endokrin hormon gibi etki ederek gram (-) bakteriyel sepsisten sonra dolaşımda görülür. IL-1, mononükleer fagositlerden salgılanan 2 temel polipeptidden oluşur. Bunlardan biri IL-1α diğeri IL-1β'dır. Bu ikisi iki farklı genin ürünüdür; fakat her ikisi de aynı hücre yüzey reseptörlerine bağlanırlar ve biyolojik etkileri temelde özdeştir. Dolaşımdaki IL-1 aktivitesinin çoğu IL-1β'ya aittir (Oppenheim ve ark., 1994; Abbas ve ark., 1994; Dinarello, 1991). Kan dolaşımında da en çok IL-1β bulunmaktadır (Abbas ve ark., 2003).

IL-1β başlıca antijen sunan hücreler monosit ve makrofajlar, langerhans hücreleri, dendritik hücreler, endotelyal hücreler, T lenfositleri, doğal öldürücü hücreler (NK), astrositler ve keratinositler olmak üzere tüm çekirdekli hücrelerden sentezlenebilir (Drenth ve ark., 1995; Armstrong ve ark., 1996; Gardner ve ark., 2003; Dinarello, 2002). TNF-α'dan farklı olarak nötrofiller, epitelyal hücreler ve endotel hücreleri tarafından da çokça sentezlenir (Abbas ve ark., 2003).

IL-1β düşük konsantrasyonlarda lokal inflamasyon medyatörü olarak rol oynar.

Endotelyal hücrelerde lökosit adezyonunu düzenleyen yüzey moleküllerinin ekspresyonunu arttırır. Yüksek konsantrasyonlarda ise dolaşıma geçerek ateş, karaciğerden akut faz plazma proteinlerinin arttırılması gibi endokrin etkiler gösterir ve bu etkiler IL-1β'nın konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak artar veya azalır (Abbas ve ark., 2003).

IL-1β, romatoid artrit, septik şok, periodontitis, malignite, asbestoz, tüberküloz ve AIDS'de hastalığın aktivitesi ile ilişkili olmakla birlikte akut pankreatitte multiorgan yetmezliğinin fizyopatolojisinden sorumlu tutulmaktadır. IL-1β'nın tüberkülozda ve inflamatuar barsak hastalıklarında epitelyal hücrelerden akut faz proteinlerinin ve sitokinlerin üretimini artırdığı gösterilmiştir (Dinarello, 2002).

IL-1β'nın biyolojik etkileri TNF-α ile benzerdir ve serbestleşen sitokin miktarına bağlıdır. Düşük yoğunlukta bölgesel inflamatuar olaylara aracılık eder. Özel olarak, IL-1β, mononükleer fagositler ve damar endoteline etkiyle IL-1β'nın daha sonraki sentezini arttırır ve IL-6'nın sentezini tetikler. IL-1β aynı zamanda TNF-α'nın birçok inflamatuar özelliğini de paylaşır. IL-1β endotel hücrelerine etkiyle pıhtılaşmayı arttırır. Lökositlerin biraraya yapışmasına aracılık eden yüzey moleküllerinin ekspresyonunu arttırır. IL-1β direkt olarak nötrofil gibi inflamatuar lökositleri aktive etmez. Mononükleer ve endotel hücrelerine etki ederek lökositleri aktive eden kemokinlerin sentezine neden olur.

IL-1β daha yüksek miktarlarda salgılandığında, kan dolaşımına girer ve endokrin etkiler gösterir. Sistemik IL-1β, TNF-α ile birlikte ateşin oluşumuna neden olur. Karaciğer tarafından akut faz proteinlerinin sentezini arttırır ve metabolik zayıflamanın başlamasına neden olur (Abbas ve ark., 1994). IL-1β, hipotalamusa etki ederek CRF'ün salınmasına neden olur. CRF'de adrenal kortekse etki ederek steroidlerin salınımını arttırır. Kortikosteroidlerde IL-1β ve TNF-α'nın salınımını inhibe eder. Bu özellik TNF-α ve IL-6'da da mevcuttur (Nororiha ve ark.,1995).

IL-1β, kollagen doku üzerine etki ederek osteoklastik aktiviteyi arttırır ve böylece kemik turnoverinin artmasına neden olur. Osteoblastlarda ise alkalen fosfataz aktivitesini arttırır. Fibroblastların ve sinovial hücrelerin proliferasyonunu sağlar. IL-1β, kemik iliğinde hemopoetik hücrelere etki ederek yüksek proliferatif

kapasite gösteren kolonilerin oluşumunu sağlar, TNF-α ile birlikte nötrofiliye neden olur. IL-1β etkileri ile TNF-α etkileri büyük benzerlik gösterir (Nororiha ve ark., 1995, Pereina, 1995, Abbas ve ark., 2003).

IL-1β'nın TNF-α'dan farklı özellikleri de mevcuttur. Bu iki inflamatuar sitokinlerin reseptörleri tamamen farklıdır. IL-1β apoptozu uyarmaz ve tek başına septik şok tablosundaki patalojik değişikliklere sebep olmaz (Abbas ve ark., 2003).

2.2.1.3. IL-6

IL-6 ilk olarak 1985 yılında B hücrelerinin farklılaşma faktörü (BSF-2) olarak tanımlanmıştır (Hirano ve ark., 1985). IL-6 yaklaşık 26 kDa'luk bir antiinflamatuar sitokin olup, mononükleer fagositler, damar endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücreler ile bazı aktive T hücreleri tarafından sentez edilir (Nororiha ve ark., 1995; Abbas ve ark., 1994).

IL-6'nın doğal immünitedeki görevi hepatositlerden akut faz reaktanlarının sentezlenmesi, kemik iliği progenitörlerinden nötrofil yapımıdır. Adaptif immünitede ise antikor yapımı için farklılaşmış B hücrelerinin büyümesini uyarır ve myelomlardan köken alan monoklonal antikor yapan hibridomların gelişimini indükler (Abbas ve ark., 2003).

1990'lı yılların başında yapılan çalışmalarla IL-6'nın sadece immün sistemle ilgili olmadığı, bu özellikleri yanında hepatositler, hepatopoetik progenitör hücreler, iskelet sistemi hücreleri, kardiyovasküler sistem ile sinir ve endokrin sistem için de önemli olduğu tespit edilmiştir (Kishimoto ve ark., 1995). Bunlara ilaveten yapılan in-vitro çalışmalarda, IL-6'nın T hücreleri ve timositlerin kostimulatörü olarak görev yaptığı gösterilmiştir. IL-6 diğer sitokinlerle birlikte kemik iliği hemopoetik ana hücreleri için erken dönemde büyüme kofaktörü olarak etki gösterir (Horii ve ark., 1989).

IL-6'nın kemik yapım yıkım dengesi üzerine etkisi de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. IL-6 konsantrasyon dengesi bozulduğunda kemik dokuda rezorbsiyonlar ve kemik kayıpları gelişebilmektedir. IL-6 hemato-poetik kök hücre üzerinden osteoklastların toplanmasını arttırır, osteoblast sayısı azalır, kemik resorbsiyonu hızlanır ve hasarlı bir kemikleşme meydana gelir (Yoshitake ve ark., 2008).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Klinik Araştırma Etik Kurulu'nun 22.05.2015 tarih ve 1 sayılı raporu ile onaylanmıştır. (Ek.1) Çaışmamız Marmara Üniversitesi Bilimsel araştırmalar Proje Birimi'nin SAG-C-DRP-111115-0508 numaralı projesi ile desteklenmiştir. Kök hücre izolasyonu amacıyla kullanılan tam gömük yirmi yaş dişinin temini Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'ndan sağlandı. Kök hücre izolasyonu ve çalışmanın diğer tüm aşamaları Marmara Üniversitesi Çocuk İmmünoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Tüm hücre kültürü çalışmalarında test edilmiş, steril ve tek kullanımlık hücre kültürü malzemeleri kullanıldı ve bu işlemler laminar akışlı steril kabinde (LAF kabin) (Resim 3.1) steril koşullarda gerçekleştirildi.



Resim 3.1. Biosafety Cabinet Class II Laminar Flow Kabin

3.1. Tam Gömük Yirmi Yaş Dişinin Temini

Bu tez çalışmasında, çalışmaya dahil edilen bireylere, hazırlanmış olan "Gönüllü Bilgilendirme Formu" (Ek.2) okutuldu ve "Gönüllü Onam Formu" (Ek.3) imzalattırıldı. Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş Çene

Cerrahisi Anabilim Dalı polikliniklerinde, inflamasyonla ilgili hastalığı olmayan, sigara kullanmayan, son 6 aydır düzenli ilaç kullanmayan, diş çekim işleminden 6 hafta öncesine kadar antienflamatuar ya da antibiyotik kullanmamış olan, mezenkimal kök hücre elde edilecek olan dişi vital ve çürüksüz olan, radyografide periapikal pataloji saptanmayan gönüllülerden çekim endikasyonlu tam gömük yirmi yaş dişileri alındı (Resim 3.2).

Tam gömük yirmi yaş dişlerinin çekilmesi etik ve asepsi kurallarına uygun şekilde gerçekleştirildi.



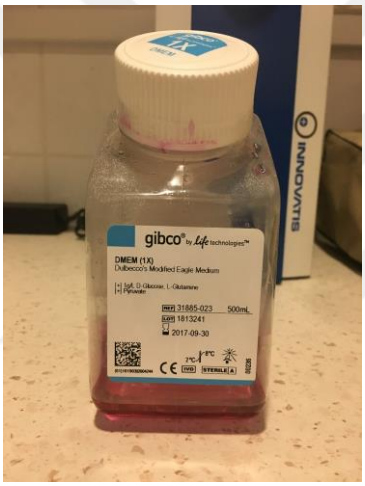
Resim 3.2. Cerrahi operasyonla alınmış tam gömük 38 numaralı diş

3.2. Tam Gömük Yirmi Yaş Dişinin Transport Solüsyonu ile İzolasyon Yapılacak Laboratuvara Getirilmesi

Girişimsel olarak zedelenmeden çene kemiğinden çıkartılan diş, sonrasında %1 Penisilin/Streptomisin içeren Phosphate Buffer Solution (PBS) ile dolu tüpe alınarak, buz kalıpları içerisinde, maksimum 4 saatlik süre zarfında çalışmanın gerçekleştirileceği Marmara Üniversitesi Çocuk İmmünoloji Laboratuvarı'na getirildi.

3.3. Tam Gömük Yirmi Yaş Diş Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

Diş uygun şartlarda laboratuvara ulaştırıldıktan sonra, aseptik ortamda LAF kabinde diş kırma aparatıyla dikey iki parçaya bölündü ve iç kısmında yer alan pulpa dokusu çıkarıldı. Pulpa önce mekanik parçalama için bistüri ile 0,1-0,5 mm'lik küçük parçalara bölündü ve enzimatik parçalama için PBS içinde 3mg/ml kollajenaz tip I içeren 2 ml'lik enzim solüsyonuna aktarıldı. Enzim solüsyonunda 45 dk. 37°C'de inkübe edilerek enzimatik doku parçalama işlemi yapıldı.



Resim 3.3. DMEM



Resim 3.4. Allegra™ X-22 santrifüj cihazı

Süre sonunda 2 ml %1 Penisilin/Streptomisin ve %10 FBS içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besi ortamı (Resim 3.3) ile enzim aktivasyonu durduruldu ve 5 dk. 1500 RPM'de santrifüj edildi (Resim 3.4). Süpernatant atılarak dipte kalan pellet 5 ml DMEM ile tekrar süspanse edildi ve T75 kültür kabında (Resim 3.5) %5 CO_2 inkübatörde (Resim 3.6) 37°C'de 7 gün boyunca besi ortamı her 2-3 günde bir taze olarak değiştirilerek inkübe edildi (Resim 3.7).



Resim 3.5. T75 kabı



Resim 3.6. Forma Series II Water Jacket CO_2 İnkübatör



Resim 3.7. İnkübasyonu yapılmakta olan kök hücreler

Üreyen ve tabana yapışan hücreler %80 taban yayılma oranına ulaştıktan sonra %0,25 tripsin-EDTA ile 4 dk. 37°C'de bekletilerek kaldırıldı; 4 dk. sonunda enzim aktivitesi DMEM ile durdurularak hücreler toplandı. Toplanan hücreler 15 ml'lik steril falkon tüpe aktarıldı, 1200 RPM'de 5 dk. santrifüjlenerek yüzeydeki süpernatant atıldı ve kalan hücre pelleti 1 ml DMEM solüsyonda süspanse edilerek hücre sayısı hesaplandı. Her $5x10^5$ hücre için 1 adet T75 kültür kabı kullanılarak

hücre sayısı artırmaya devam edildi. Bu işlem 3. pasaja kadar aynı şekilde devam ettirildi.

3.4. DPSC'lerin Akım Sitometrik Analiz ile Karakterizasyonu

Analizler, her alt-kültür işlemi sonrasında FACS Calibur akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler kültür kaplarının tabanından %0,25 tripsin-EDTA ile kaldırıldıktan sonra, hücre sayımı yapıldı ve yaklaşık olarak $1x10^6$ hücre PBS içinde homojenize edilip, belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel fluoresan izotiyosiyonat (FITC) ve fikoeritrin (PE) konjuge monoklonal antikorlar ve uygun izotip kontrollerinden 10 µl eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu olan %0.1 sodyum azid içeren PBS eklenerek 1200 RPM'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra 500 µl yıkama solüsyonu ile resüspanse edildi.



Resim 3.8. BD FACS Calibur akım sitometri cihazı

Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akım sitometri cihazında (Resim 3.6) okutuldu ve analizi BD Cell Quest TM Software programı ile yapıldı. Akım sitometri cihazında mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri ile işaretlendi. Pozitif

belirteç olarak CD29, CD105, CD146 ve CD73 kullanılırken negatif belirteç olarak CD3, CD4, CD20 ile işaretleme yapıldı.

3.5. DPSC'lerin İnflamatuar Proteinlerle Uyarımı

İzolasyonları gerçekleştirildikten sonra akım sitometri cihazı ile yüzey belirteçleri analiz edilerek mezenkimal kök hücre özelliğine sahip oldukları tespit edilen hücre gruplarından 3 farklı dişe ve gönüllüye ait hücre gruplarından rastgele bir tanesi seçilerek, biri inflamatuar proteinlerle uyarımsız kontrol grubu olacak şekilde beş gruba ayrıldı. Bu hücre grupları sırası ile TNF-α, IL-1β, IL-6 ve TNF-α, IL-1β ve IL-6 kombinasyonu ile uyarım prosedürüne sokuldular.

3.5.1. TNF-α ile uyarım

Vial içindeki konsantrasyonu 100 µg/100µl olan TNF-α rekombinant protein içeriğinden 1 µl çekilerek 999 µl CDMEM besi ortamında dilüe edildi. Bu dilüsyondan her bir 2000 µl'lik kültür kuyusuna 100 µl yani 50 µg/ml konsantrasyonunda eklendi.

3.5.2. IL-1β ile uyarım

Vial içindeki konsantrasyonu 100 µg/100µl olan IL-1β rekombinant protein içeriğinden 1 µl çekilerek 999 µl CDMEM besi ortamında dilüe edildi. Bu dilüsyondan her bir 2000 µl'lik kültür kuyusuna 100 µl yani 50 µg/ml konsantrasyonunda eklendi.

3.5.3. IL-6 ile uayrım

Vial içindeki konsantrasyonu 100 µg/100µl olan IL-6 rekombinant protein içeriğinden 1 µl çekilerek 999 µl CDMEM besi ortamında dilüe edildi. Bu dilüsyondan her bir 2000 µl'lik kültür kuyusuna 100 µl yani 50 µg/ml konsantrasyonunda eklendi.

3.5.4. TNF-α/ IL-1β/IL-6 kombine uyarım

Her bir inflamatuar protein solüsyonlarından 50'şer µl çekilerek toplamda 150 µl rekombinant karışımı her bir 2000 µl'lik kültür kuyusuna eklendi.

3.6. İnflamatuar Medyatörlerle Uyarılmış DPSC'lerin Kültüre Edilmeleri

6 kuyulu kültür plaklarındaki (Resim 3.6) plan şekildeki gibidir (Şekil 3.1).

DPSC **Uyarımsız (US)**	DPSC **TNF-α**	DPSC **IL-1β**	DPSC **IL-6**	DPSC **TNF-α/ IL-1β/IL-6**

Şekil 3.1. DPSC'lerin inflamatuar medyatör uyarım planı



Resim 3.9. 6 kuyulu kültür plağı

DPSC – US kültür kuyusu: 6 kuyulu kültür plağının bir kuyusuna 2000 µl CDMEM besi ortamı içerisinde $2x10^5$ hücre, 35 mm çaplı kollajenaz içeren lamel üzerine aktarıldı ve 48 saat boyunca lamel üzerinde yapışması için kültüre edildi. Bu kültür kuyusunda uyarım yapılmadı.

DPSC - TNF-α kültür kuyusu: 6 kuyulu kültür plağının bir kuyusuna 2000 µl CDMEM besi ortamı içerisinde $2x10^5$ hücre, 35 mm çaplı kollajenaz içeren lamel üzerine aktarıldı ve 48 saat boyunca lamel üzerinde yapışması için kültüre edildi. Tabana yayılan hücrelerin üzerinden DMEM besiyerinin tamamı çekilip atıldı ve

hücrelerin üzerine taze hazırlanmış 1900 µl DMEM besi ortamı ve 100 µl TNF-α rekombinant solüsyonu karıştırılarak 50 µg/ml konsantrasyonda eklendi ve 48 saat boyunca TNF-α uyarımı için kültüre edildi.

DPSC - IL-1β kültür kuyusu: 6 kuyulu kültür plağının bir kuyusuna 2000 µL CDMEM besi ortamı içerisinde $2x10^5$ hücre, 35 mm çaplı kollajenaz içeren lamel üzerine aktarıldı ve 48 saat boyunca lamel üzerinde yapışması için kültüre edildi. Tabana yayılan hücrelerin üzerinden DMEM besiyerinin tamamı çekilip atıldı ve hücrelerin üzerine taze hazırlanmış 1900 µl DMEM besi ortamı ve 100 µl IL-1β rekombinant solüsyonu karıştırılarak 50 µg/ml konsantrasyonda eklendi ve 48 saat boyunca IL-1β uyarımı için kültüre edildi.

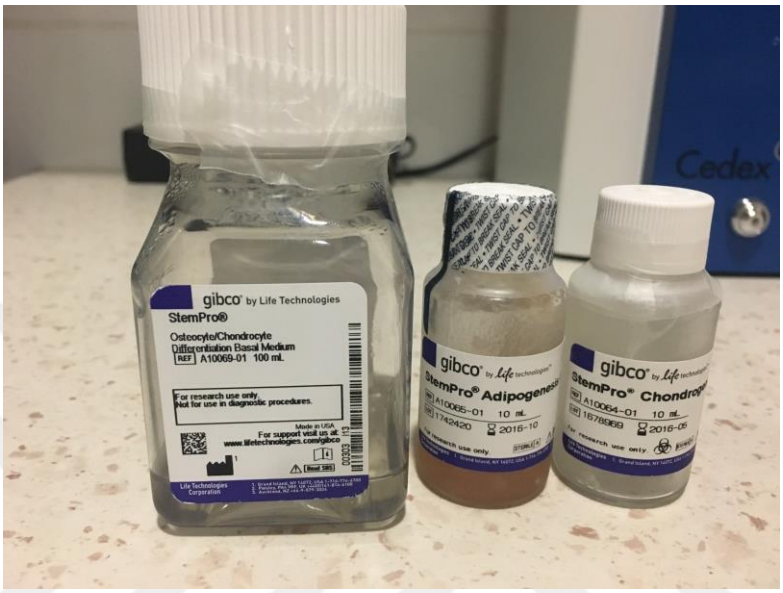
DPSC - IL-6 kültür kuyusu: 6 kuyulu kültür plağının bir kuyusuna 2000 µl CDMEM besi ortamı içerisinde $2x10^5$ hücre, 35 mm çaplı kollajenaz içeren lamel üzerine aktarıldı ve 48 saat boyunca lamel üzerinde yapışması için kültüre edildi. Tabana yayılan hücrelerin üzerinden DMEM besi yerinin tamamı çekilip atıldı ve hücrelerin üzerine taze hazırlanmış 1900 µl DMEM besi ortamı ve 100 µl IL-6 rekombinant solüsyonu karıştırılarak 50 µg/ml konsantrasyonda eklendi ve 48 saat boyunca IL-6 uyarımı için kültüre edildi.

DPSC - TNF-α/ IL-1β/IL-6: 6 kuyulu kültür plağının bir kuyusuna 2000 µl DMEM besi ortamı içerisinde $2x10^5$ hücre, 35 mm çaplı kollajenaz içeren lamel üzerine aktarıldı ve 48 saat boyunca lamel üzerinde yapışması için kültüre edildi. Tabana yayılan hücrelerin üzerinden DMEM besi yerinin tamamı çekilip atıldı ve hücrelerin üzerine taze hazırlanmış 1700 µl DMEM besi ortamı ve 100 µl TNF-α rekombinant solüsyonu, 100 µl IL-1β rekombinant solüsyonu ve 100 µl IL-6 rekombinant solüsyonu karıştırılarak her bir recombinant protein için konsantrasyon 50 µg/ml olacak şekilde eklendi ve 48 saat boyunca uyarım için kültüre edildi.

3.7. DPSC'lerin Osteojenik, Kondrojenik ve Adipojenik Farklılaşma Protokolleri

İnflamatuar medyatörlerle uyarımları gerçekleştirilip ardırdan kültüre edilen DPSC'ler uyarımsız kontrol grubu da dahil olmak üzere her grup osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaştırmaya ayrı ayrı girmek üzere 100.000 hücre

sayısına sahip toplamda 15 ayrı farklılaşma prosedür grubuna ayrıldı. Bu gruplara osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaştırma besi yerleri (Resim 3.7) eklendi. Ardından uygun boyama prosedürleriyle boyanarak oluşan dokular değerlendirildi.



Resim 3.10. StemPro® Osteocyte/chondrocyte, StemPro® Adipogenesis, StemPro® Chondrogenesis farklılaşma medyumları

3.7.1. Osteojenik farklılaşma protokolü:

T75 kabı içerisinde yüzey alanını %80 ve üzerinde kaplamış olan hücrelerin önce üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. 4 ml DBPS ile kabın tabanı yıkandı ve DPBS'in tamamı yüzeyden uzaklaştırıldı. T75 kabı içerisinde hücreler %0,25'lik 2 ml tripsin-EDTA ile 4 dk. 37°C'de bekletildi. İnkübasyon süresinin sonunda 2-3 ml DMEM ile tripsin inaktif hale getirildi. T75 kabı içindeki hücreler DMEM ile birlikte pipetle çekildi ve 15 ml'lik falkona toplandı. 1500 RPM'de 5 dk. santrifüjlendi. Ardından süpernatant atıldı ve hücre pelletin üzerine 2 ml DMEM eklendi ve pipetlenerek süspanse edilip 1500 RPM'de 5 dk. santrifüjlendi. Süpernatant atılıp, 1 ml DMEM ile dipteki hücre pelleti süspanse edildi ve thoma lamında sayım yapıldı.

6'lı kuyucuklu kültür kabının her bir kuyusuna lamel üzerine 100.000 hücre aktarıldı. 37°C de %5 CO_2 inkübatörde %80-90 oranda konfluent olana kadar inkübe edildi.

3.7.1.1. Osteojenik farklılaşma besiyerinin eklenmesi:

Konfluent hücrelerin üzerinden besi yeri çekildi ve atıldı. Hücrelerin üzerine DPBS eklendi ve 2 kere yıkama sonrasında DPBS atıldı. Hücrelerin üzerine her bir kuyuya 2 ml Osteojenik Farklılaşma Besiyeri eklendi. 37°C'de %5 CO_2 inkübatörde inkübe edildi. 3 günde bir besi yeri değiştirilerek, 21-28 gün boyunca inkübasyona devam edildi. 21-28 gün sonunda osteoblast hücrelerinin oluşumu Alizarin Red boyama protokolü uygulanarak gözlemlendi.

3.7.1.2. Alizarin Red boyama protokolü

2 gr. Alizarin Red tartıldı ve 100 ml distile su ile çözüldü. (Alizarin Red, boyama solüsyonu olarak 2 saat boyunca kullanılabilir.) 6 kuyucuklu kültür plağı içindeki besiyeri uzaklaştırıldı. 2 ml DPBS ile yüzey yıkandı ve 2 ml %10 Formalin eklenerek 45 dk. karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edildi. %10 formalin ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra 2 kere distile su ile yüzey yıkandı. 2 ml Alizarin Red solüsyonu eklendi ve 45 dk. karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda Alizarin Red ortamdan uzaklaştırıldı ve 2 kere distile su ile yüzey yıkanarak kurumaya bırakıldı. Lamel yüzeyindeki hücreler, osteojenik farklılaşma için mikroskopta incelendi.

3.7.1.3. Osteojenik farkılaşmanın değerlendirilmesi

Biyolojik ışık mikroskobunda 20X objektif ile gözlenen parlak turuncu-kırmızı renkte osteoblast hücreleri görüldü. Hücrelerarası alanda matriks bileşeni olan kalsiyum birikimleri koyu turuncu renkte görüldü. Farklılaşmayan hücreler ise silik kırmızı renkte görülmüştür ve bu hücreler osteoblast karakter göstermeyen hücre olarak tanımlanmıştır.

3.7.2. Kondrojenik farklılaşma protokolü:

T75 kabı içerisinde yüzey alanının %80 ve üzerini kaplamış olan hücrelerin önce üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. 4 ml DBPS ile kabın tabanı yıkanarak DPBS'in

tamamı yüzeyden uzaklaştırıldı. T75 kabı içerisinde hücreler %0,25'lik 2 ml tripsin-EDTA ile 4 dk. 37°C'de bekletildi. İnkübasyon süresinin sonunda 2-3 ml DMEM ile tripsin inaktif hale getirildikten sonra T75 kabı içindeki hücreler DMEM ile birlikte pipetle çekildi ve 15 ml'lik falkona toplandı. 1500 RPM'de 5 dk. santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve hücre pelletin üzerine 2 ml DMEM eklenip, pipetlenerek süspanse edilerek 1500 RPM'de 5 dk. santrifüjlendi. Süpernatant atılıp, 1 ml DMEM ile dipteki hücre pelleti süspanse edildiktan sonra thoma lamında sayım yapıldı. 6 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyusuna lamel üzerine 100.000 hücre aktarıldı. 37°C de %5 CO_2 inkübatörde %80-90 oranında konfluent olana kadar inkübe edildi.

3.7.2.1. Kondrojenik farklılaşma besiyerinin eklenmesi

Konfluent olan hücrelerin üzerinden besi yeri çekildi ve atıldı. Hücrelerin üzerine DPBS eklendi ve 2 kere yıkama sonrasında DPBS atıldı. Hücrelerin üzerinde her bir kuyuya 2 ml Kondrojenik Farklılaşma Besiyeri eklenerek 37°C'de %5 CO_2 inkübatörde inkübe edildi. 3 günde bir besi yeri değiştirilerek, 21-28 gün boyunca inkübasyona devam edildi. 21-28 gün sonunda kondrosit hücrelerin oluşumu Alcian Blue boyama protokolü uygulanarak gözlemlendi.

3.7.2.2. Alcian Blue boyama protokolü

Solüsyonu hazırlamak için 60 ml etanol (%99) ve 40 ml asetik asit karışımına 10 mg Alcian Blue 8GX eklenerek homojen olana kadar karıştırıldıktan sonra taze olarak kullanıldı. Sonrasında 120 ml etanol (%99) ve 80 ml asetik asit karışımı hazırlanarak boya çıkarma solüsyonu olarak kullanıldı.

6 kuyucuklu kültür plağı içindeki besiyeri uzaklaştırılarak 2 ml Ca^{++}/Mg^{++} içermeyen DPBS ile yüzey yıkandı. Daha sonra 2 ml %10 formalin eklendi. 45 dk. karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra %10 formalin ortamdan uzaklaştırılarak 2 kere distile su ile yüzey yıkandı. Kuyucukların her birine yüzeyi tamamen kaplayacak kadar yaklaşık 2 ml Alcian Blue solüsyonu eklendi. 1 gece oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Süre sonunda Alcian Blue solüsyon ortamdan uzaklaştırıldı ve üzerine boya çıkarıcı solüsyon eklenerek 20 dk. bekletildi. Bu işlem toplam 2 kez yapıldı. Boyacı solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra DPBS eklendi. Daha

sonra DPBS ortamdan uzaklaştırıldı ve lamel yüzeyindeki hücrelerin, kondrojenik farklılaşmasını gözlemlemek için mikroskopta incelendi.

3.7.2.3. Kondrojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi

Biyolojik ışık mikroskobunda 20X objektif ile gözlenen koyu mavi renkte kondrojenik karakterde kartilaj ekstraselüler matriks gözlendi.

3.7.3. Adipojenik farklılaşma protokolü

T75 kabı içerisinde yüzey alanının %80 ve üzerini kaplamış olan hücrelerin ilk önce üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. 4 ml DBPS ile kabın tabanı yıkanarak DPBS'in tamamı yüzeyden uzaklaştırıldı. T75 kabı içerisinde hücreler %0,25'lik 2 ml tripsin-EDTA ile 4 dk. 37°C'de bekletilerek inkübasyon süresinin sonunda 2-3 ml DMEM ile tripsin inaktif hale getirildi. T75 kabı içindeki hücreler DMEM ile birlikte pipetle çekilerek 15 ml'lik falkona toplandı. Daha sonra 1500 RPM'de 5 dk. santrifüjlenerek süpernatant atıldı. Hücre pelletinin üzerine 2 ml. DMEM eklendi ve pipetlenerek süspanse edildiktan sonra 1500 RPM'de 5 dk. santrifüjlenerek süpernatant atıldı. 1 ml DMEM ile dipteki hücre pelleti süspanse edildikten sonra thoma lamında sayım yapıldı. 6 kuyucuklu kültür plağının her bir kuyusuna lamel üzerine 100.000 hücre aktarıldı ve 37°C de %5 CO_2 inkübatörde %80-90 konfluent olana kadar inkübe edildi.

3.7.3.1. Adipojenik farklılaşma besi yerinin eklenmesi

Konfluent olan hücrelerin üzerinden besiyeri çekildi ve atıldı. Hücrelerin üzerine DPBS eklendi ve 2 kere yıkama sonrasında DPBS atıldı. Hücrelerin üzerine her bir kuyuya 2 ml Adipojenik Farklılaşma Besiyeri eklendi ve 37°C'de %5 CO_2 inkübatörde inkübe edildi. 3 günde bir besiyeri değiştirilerek, 21-28 gün boyunca inkübasyona devam edildi. 21-28 gün sonunda adiposit hücrelerin oluşumu ve yağ damlaları Oil Red boyama protokolü uygulanarak gözlemlendi.

3.7.3.2. Oil Red boyama protokolü:

Solüsyonu hazırlamak için 0,3 gr. Oil Red tartıldı ve 100 ml isopropanol ile sulandırıldı. Bu işlem karanlıkta yapılarak hazırlanan solüsyon taze olarak kullanıldı.

Direkt boyama solüsyonunu hazırlamak için 3 volum Oil Red solüsyonu, 2 volum distile su ile karıştırıldıktan sonra 2 saat içinde kullanıldı.

6 kuyucuklu kültür plağı içindeki besiyeri uzaklaştırıldı. 2 ml Ca^{++}/Mg^{++} içermeyen DPBS ile yüzey yıkanarak 2 ml %10 formalin eklendi ve 30 dk. karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra %10 formalin ortamdan uzaklaştırılarak 2 kere distile su ile yüzey yıkandı. Yüzeyden distile su uzaklaştırıldıktan sonra yüzeyi kaplayacak kadar %60'lık isopropanol eklendi ve 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında isopropanol aspire edilerek kuyucukların her birine yüzeyi tamamen kaplayacak şekilde yaklaşık 2 ml Oil Red solüsyonu eklendi ve 15 dk. bekletildikten sonra Oil Red solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldı. Boya kalıntısı kalmayana kadar yıkamaya devam edildi. Daha sonra hematoksilin boya eklenerek 1 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Hematoksilin boyası aspire edildikten sonra boya kalıntısı kalmayana kadar yıkamaya devam edildi ve üzerine PBS eklendi. Lamel yüzeyindeki hücreler, adipojenik farklılaşma için mikroskopta incelendi.

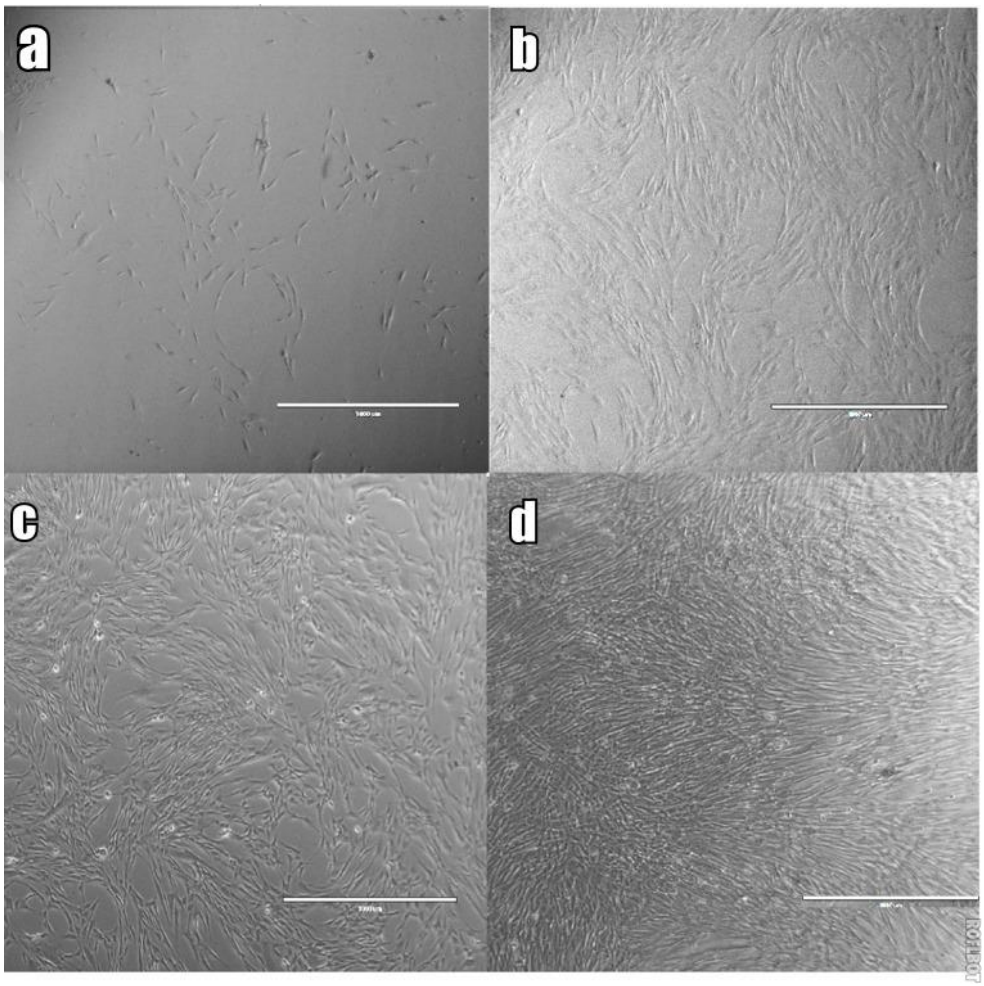
3.7.3.3. Adipojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi

Biyolojik ışık mikroskobunda 20X objektif ile gözlenen çekirdekleri mavi renkli boyanmış hücrelerin arasında parlak kırmızı renkte adipojenik karakterde lipit veziküller gözlendi.

4. BULGULAR

4.1. DPSC İzolasyonu

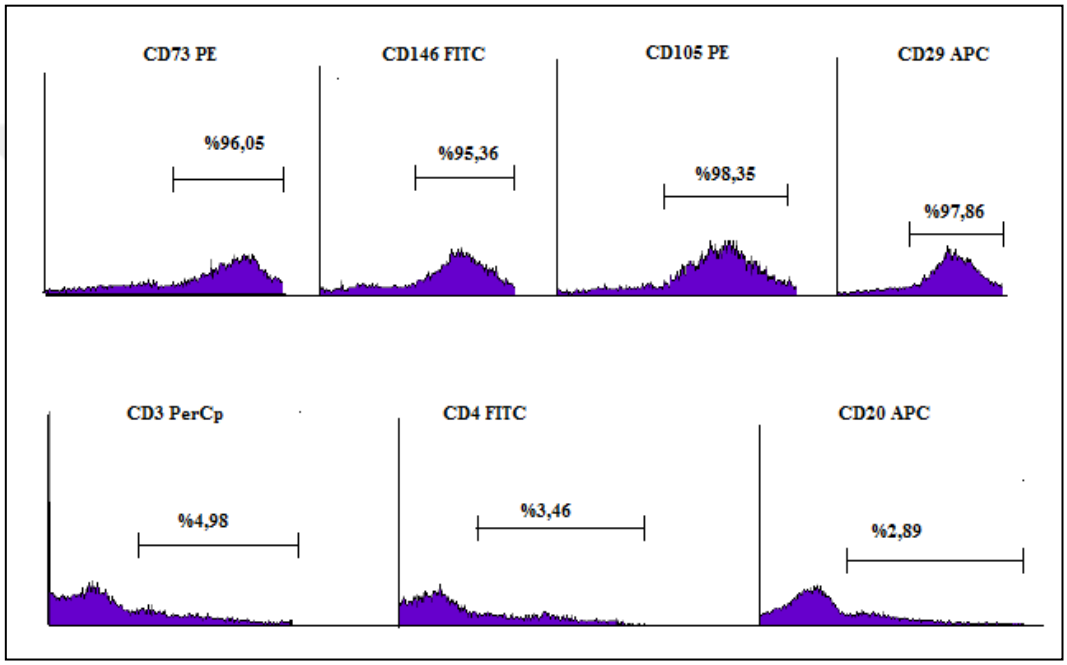
Dental pulpa dokusundan izole edilen DPSC'lerin pasaj 0, pasaj 1, pasaj 2 ve pasaj 3 invert mikroskop görüntüleri resimdeki gibi tespit edilmiştir (Resim 4a, 4b, 4c, 4d)



Resim 4.1a. DPSC 0. Pasaj, **Resim 4.1b.** DPSC 1. Pasaj, **Resim 4.1c.** DPSC 2. Pasaj, **Resim 4.1d.** DPSC 3. Pasaj

4.2. DPSC Karakterizasyonu

İzole edilen DPSC'ler pasaj 3'te tripsinize edilerek flow sitometride analiz edildi. Pozitif belirteçler CD29, CD146, CD105 ve CD73 ve negatif belirteç olarak CD3, CD4 ve CD20 ile işaretlendi. Pozitif belirteçler %95'in üzerinde ve negatif belirteçler %5'in altında eksprese olduğundan mezenkimal kök hücre karakterini taşıdığı şeklinde tanımlandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. DPSC'lerin akım sitometri analizleri

4.3. DPSC'lerin Uyarımlı ve Uyarımsız Kültürleri

DPSC'ler üçüncü pasajda içinde kollajenaz tip I lamel bulunan 6 kuyulu kültür plaklarında 48 saat süreyle inkübe edildi. 48 saat sonunda uyarımsız, IL-1β, IL-6, TNF-α ve IL-1β/IL-6/TNF-α uyarımlı kültürleri yapıldı. 14-21 gün kültür süresi sonunda hücreler %10 Formaldehid solüsyonuyla fikse edilerek, osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma boyama kitleriyle boyandı ve hücre morfolojisi ve sitokimyasal olarak mikroskobik değerlendirmeleri yapıldı.

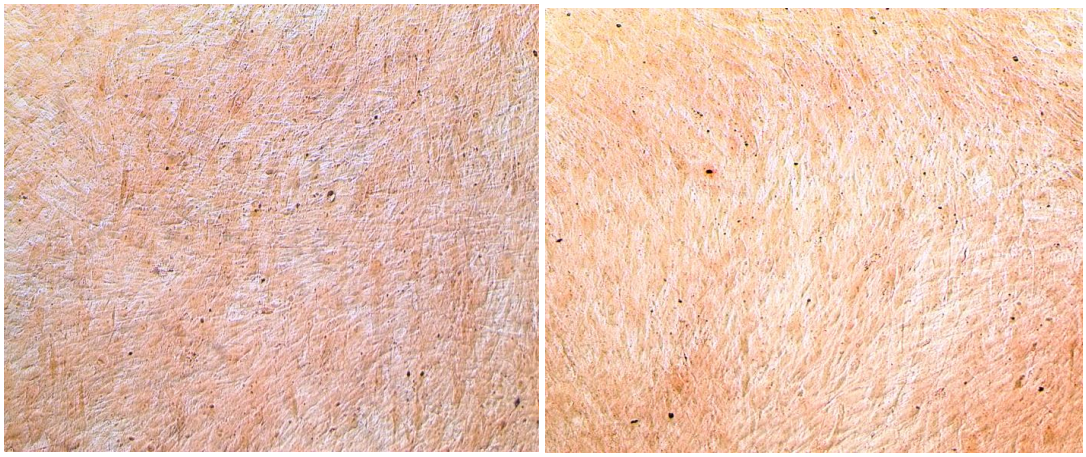
4.3.1. Osteojenik farklılaşma

Uyarımsız DPSC kültüründe osteositlerin oluştuğu, matriks bütünlüğünün korunduğu ve kalsiyum yığılımının çok fazla olduğu görüldü. Osteojenik farklılaşmanın gerçekleştiği gözlemlendi (Resim 4.2).



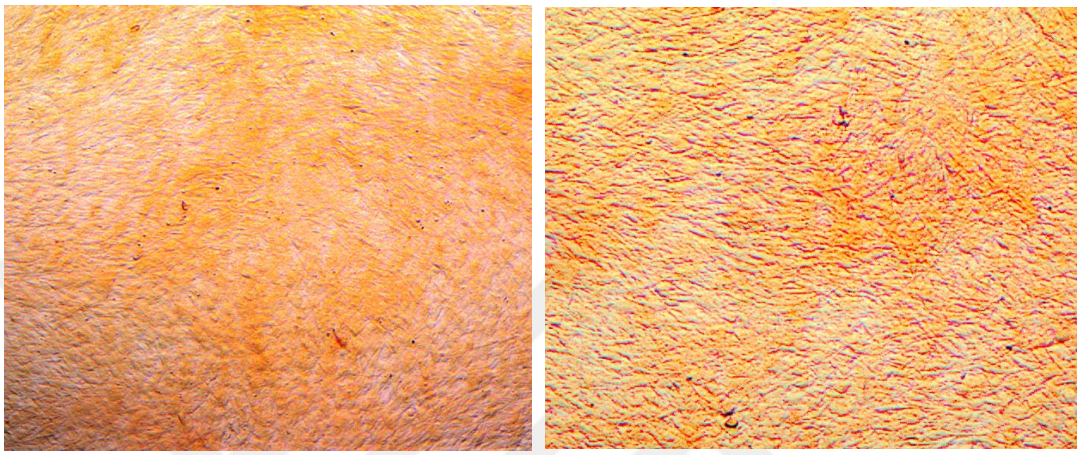
Resim 4.2. Uyarımsız DPSC kültürünün osteojenik farklılaşmasısın 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

TNF-α uyarımlı DPSC kültüründe osteositlerin oluşmadığı, matriks bütünlüğünün korunmadığı, kalsiyum yoğunluğunun az olduğu görüldü. Osteojenik farklılaşmanın gerçekleşmediği gözlemlendi (Resim 4.3).



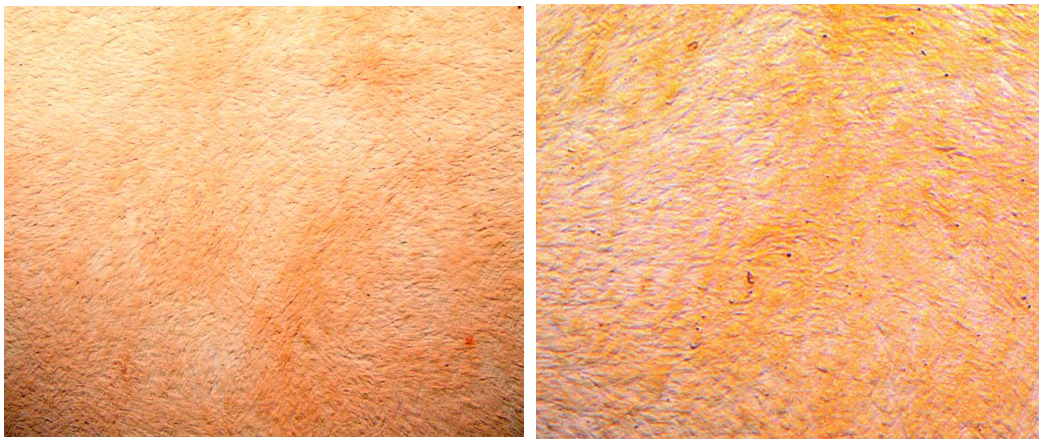
Resim 4.3. TNF-α uyarımlı DPSC kültürünün osteojenik farklılaşmasısın 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

IL-1β uyarımlı DPSC kültüründe düzensiz dizilimli osteositlerin oluştuğu, matriks bütünlüğünün kısmen korunduğu ve kalsiyum yoğunluğunun az olduğu görüldü. Osteojenik farklılaşmanın kısmen gerçekleştiği gözlemlendi (Resim 4.4).



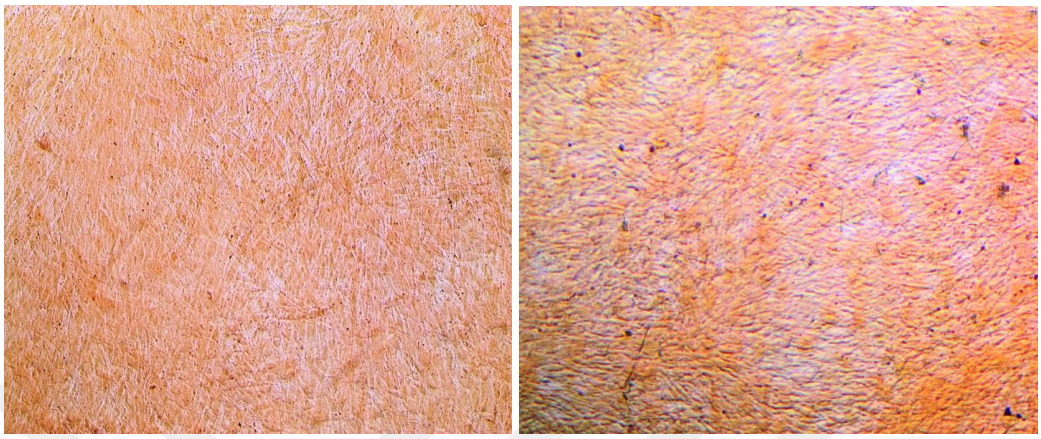
Resim 4.4. IL-1β uyarımlı DPSC kültürünün osteojenik farklılaşmasısın 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

IL-6 uyarımlı DPSC kültüründe düzensiz osteositlerin oluştuğu, matriks bütünlüğünün iyi korunduğu, kalsiyum yoğunluğunun az olduğu görüldü. Osteojenik farklılaşmanın kısmen gerçekleştiği gözlemlendi (Resim 4.5).



Resim 4.5. IL-6 uyarımlı DPSC kültürünün osteojenik farklılaşmasısın 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

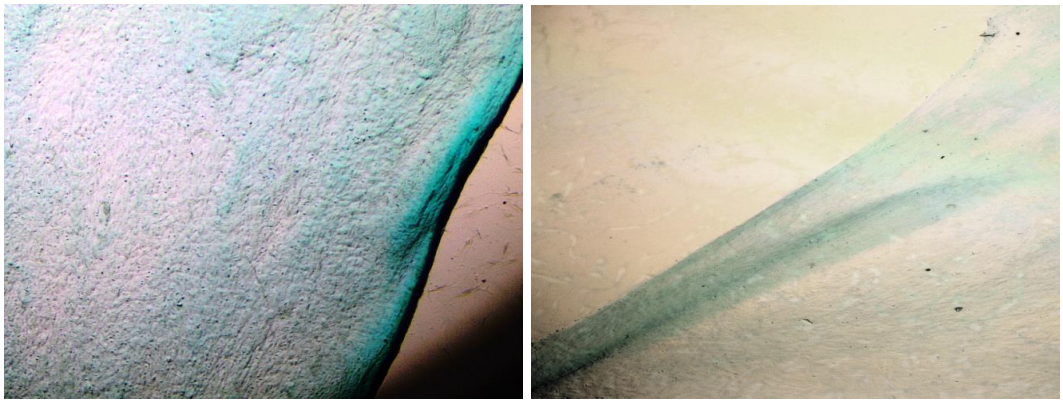
TNF-α+IL-1β+IL-6 uyarımlı DPSC kültüründe osteositlerin oluşmadığı, matriks bütünlüğünün kısmen korunduğu ve kalsiyum yoğunluğunun az olduğu görüldü. Osteojenik farklılaşmanın gerçekleşmediği gözlemlendi.



Resim 4.6. TNF-α+IL-1β+IL-6 uyarımlı DPSC kültürünün osteojenik farklılaşmasısın 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

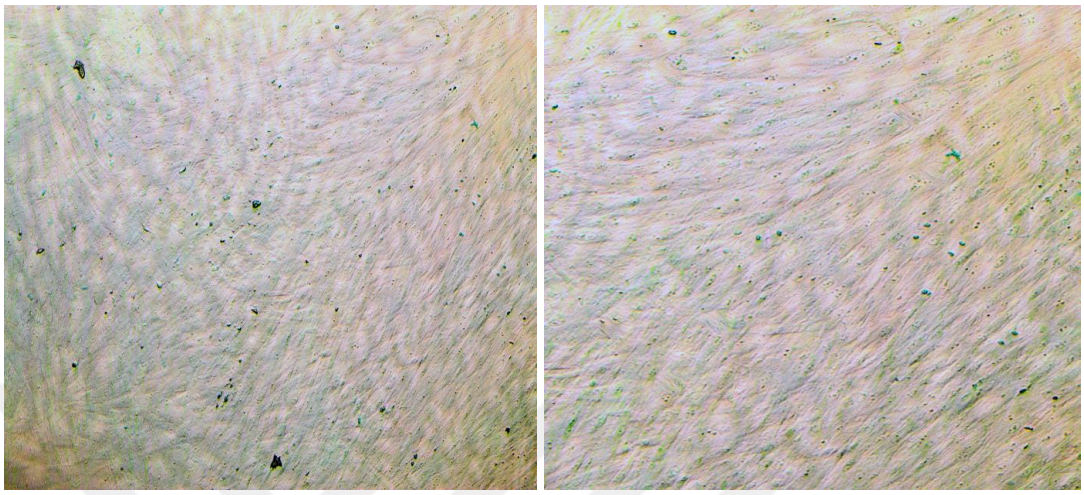
4.3.2. Kondrojenik farklılaşma

Uyarımsız DPSC kültüründe kondrositlerin ve kartilajın oluştuğu görüldü. Matriks elemanlarının bütünlüğünü koruyarak kartilaj oluşturduğu ve kondrojenik farklılaşmanın gerçekleştiği gözlemlendi (Resim 4.7).



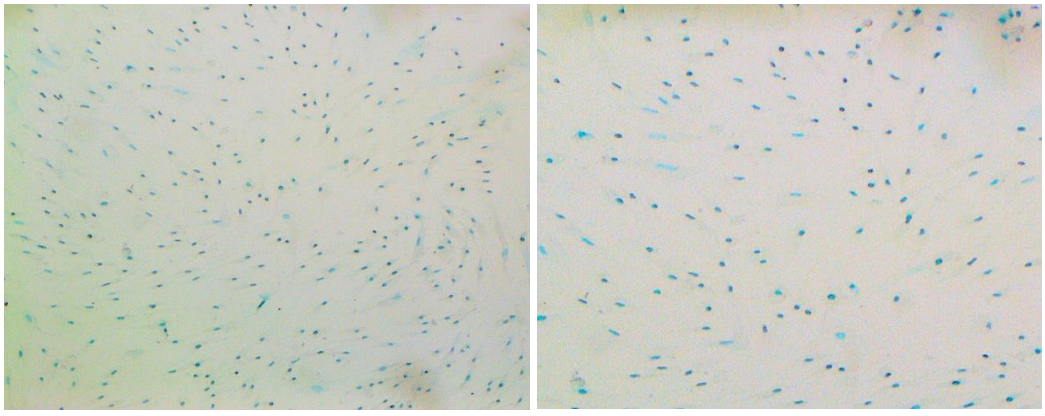
Resim 4.7. Uyarımsız DPSC kültürünün kondrojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

TNF-α uyarımlı DPSC kültüründe düzensiz kondrositlerin oluştuğu, matriks bütünlüğünün kısmen korunduğu ancak kartilaj oluşturmadığı görüldü. Kondrojenik farklılaşmanın kısmen gerçekleştiği gözlemlendi (Resim 4.8).



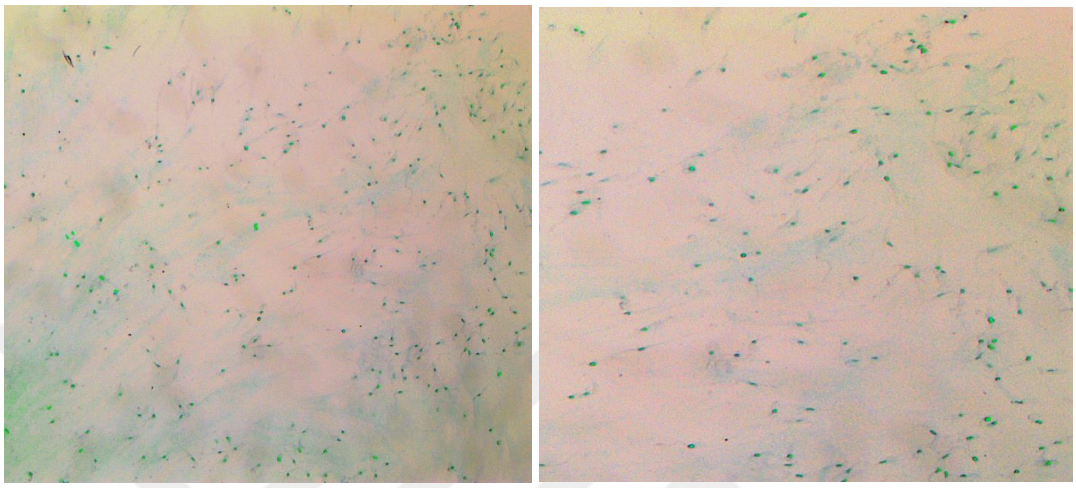
Resim 4.8. TNF-α uyarımlı DPSC kültürünün kondrojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

IL-1β uyarımlı DPSC kültüründe kondrositlerin oluştuğu ancak matriks bütünlüğünün korunamadığı görüldü. Kartilaj oluşturmadığı ve kondrojenik farklılaşmanın gerçekleşmediği gözlemlendi (Resim 4.9).



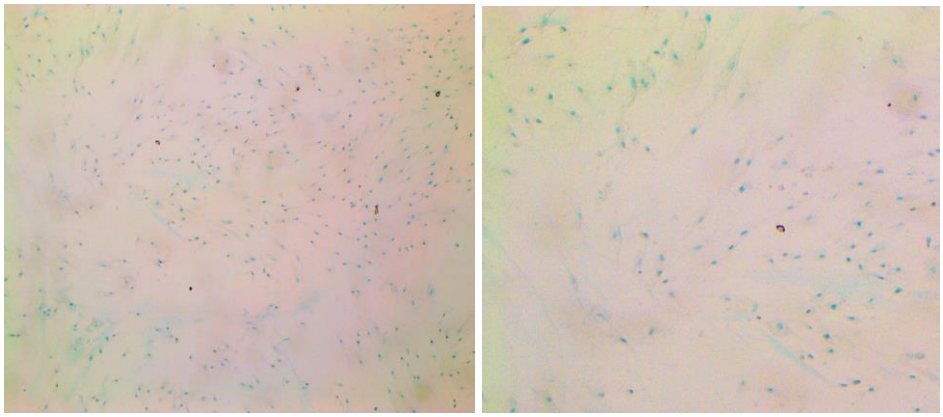
Resim 4.9. IL-1β uyarımlı DPSC kültürünün kondrojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

IL-6 uyarımlı DPSC kültüründe kondrositlerin oluştuğu ancak matriks bütünlüğünün korunamadığı görüldü. Kartilaj oluşturmadığı ve kondrojenik farklılaşmanın gerçekleşmediği gözlemlendi (Resim 4.10).



Resim 4.10. IL-6 uyarımlı DPSC kültürünün kondrojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

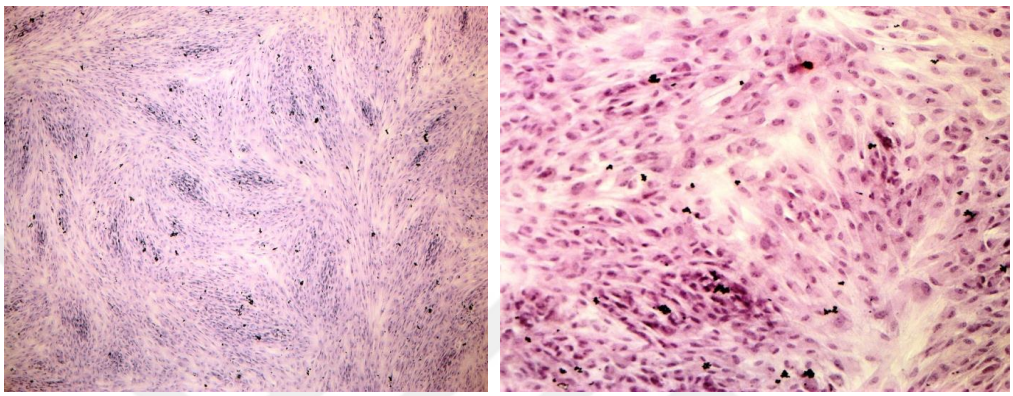
TNF-α+IL-1β+IL-6 uyarımlı DPSC kültüründe kondrositlerin oluştuğu ancak matriks bütünlüğünün korunamadığı görüldü. Kartilaj oluşturmadığı ve kondrojenik farklılaşmanın gerçekleşmediği gözlemlendi (Şekil 4.11).



Resim 4.11. TNF-α+IL-1β+IL-6 uyarımlı DPSC kültürünün kondrojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

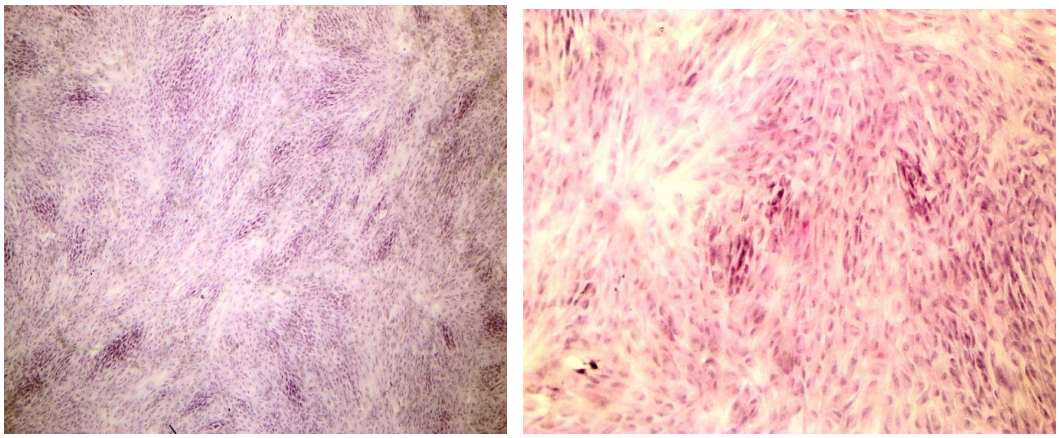
4.3.3. Adipojenik Farklılaşma

Uyarimsiz DPSC kültüründe düzenli adipositlerin oluştuğu ve çok sayıda yağ damlalarının olduğu görüldü. Adipojenik farklılaşmanın gerçekleştiği gözlemlendi (Resim 4.12).



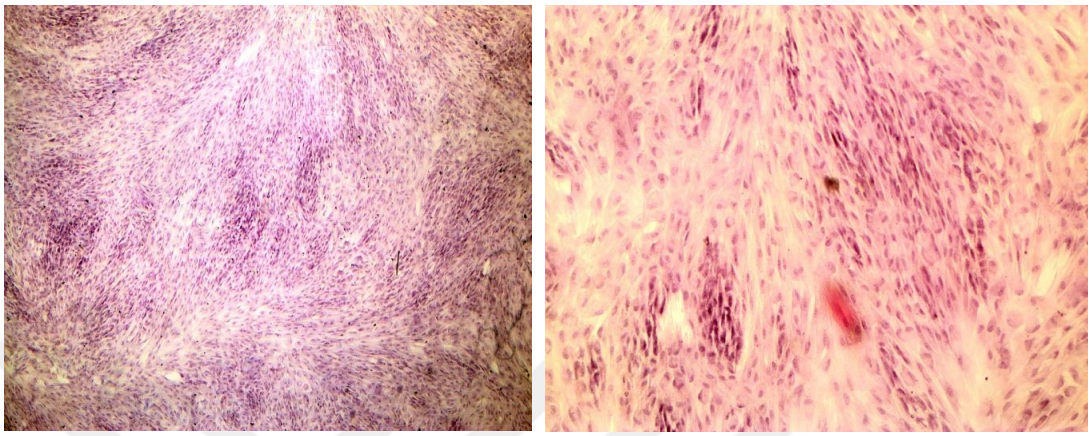
Resim 4.12. Uyarımsız DPSC kültürünün adipojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

TNF-α Uyarimli DPSC kültüründe düzenli adipositlerin oluştuğu ancak yağ damlası bulunmadığı görüldü. Tam adipojenik farklılaşmanın olmadığı gözlemlendi (Resim 4.13).



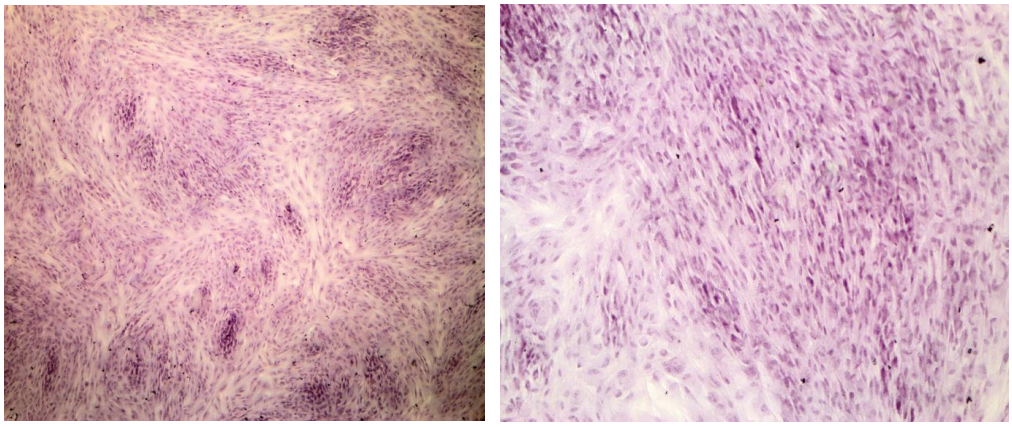
Resim 4.13. TNF-α uyarımlı DPSC kültürünün adipojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

IL-1β Uyarimli DPSC kültüründe kısmen adipositlerin oluştuğu ve az sayıda yağ damlası bulunduğu görüldü. Tam adipojenik farklılaşmanın olmadığı gözlemlendi (Resim 4.14).



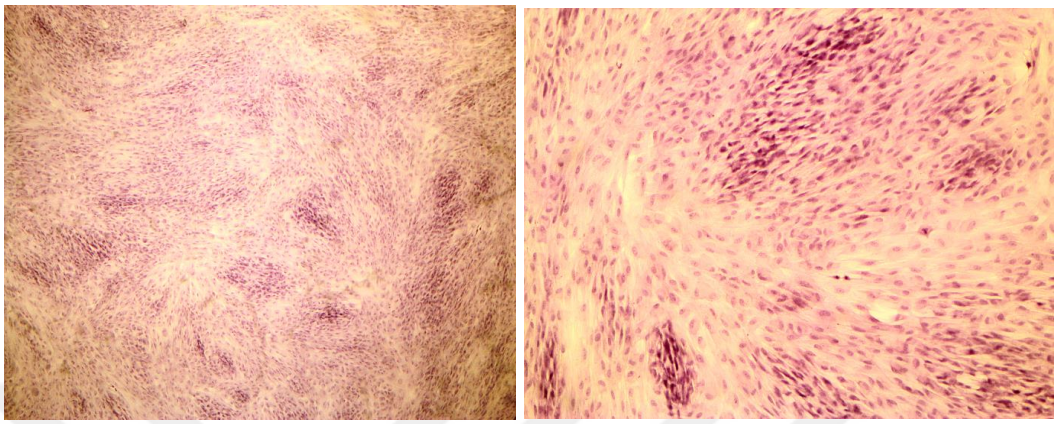
Resim 4.14. IL-1β uyarımlı DPSC kültürünün adipojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

IL-6 Uyarimlı DPSC kültüründe kısmen adipositlerin oluştuğu ve az sayıda yağ damlası bulunduğu görüldü. Adipojenik farklılaşmanın olmadığı gözlemlendi (Resim 4.15)



Resim 4.15. IL-6 uyarımlı DPSC kültürünün adipojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

TNF-α+IL-1β+IL-6 Uyarimlı DPSC kültüründe kısmen adipositlerin oluştuğu ve yağ damlası bulunmadığı görüldü. Adipojenik farklılaşmanın olmadığı gözlemlendi (Resim 4.16).



Resim 4.16. TNF-α+IL-1β+IL-6 uyarımlı DPSC kültürünün adipojenik farklılaşmasının 10X ve 20X ışık mikroskobu görüntüleri

5.TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Hücre esaslı tedavi yaklaşımlarında hasar gören bir dokunun veya organın sağlıklı bir şekilde biyolojik olarak işlevinin devam etmesi için tedavi edilmesi amaçlanır. Kök hücreleri bu doğrultuda yapılacak hücre esaslı tedavilerde kullanılabilecek en önemli hücrelerdir (Karaöz ve Ovalı, 2004). Bu alanda yapılan birçok çalışmada, farklı kaynaklardan izole edilen kök hücreleri (embriyonik kök hücreleri, kemik iliği kaynaklı kök hücreleri, hematopoetik kök hücreler vb.) in vitro ve in vivo olarak deneysel modellerde çalışmalara dahil edilerek kullanılmıştır. İnsan kaynaklı embriyonik kök hücrelerin tedaviye ve bilimsel çalışmalara yönelik kullanımında etik tartışmalar önemli bir kısıtlama oluşturmaktadır. Bu etik tartışmaların yanında bu hücrelerin teratom yani tümör oluşturma riskleri de tedavi edici kullanımını kısıtlamaktadır (Hakeri, 2009). Bu sebeple kök hücre çalışmaları son yıllarda insan vücudundaki diğer çeşitli dokulardan (kas, kıkırdak, diş pulpası, yağ dokusu, böbrek, sinir, kemik) izole edilebilen mezenkimal kök hücreler üzerine yoğunlaşmıştır (Prentice, 2006).

Mezenkimal kök hücre (MKH) tedavisi, pek çok hastalığın iyileştirilmesinde gelecek vaat eden bir tedavi yöntemidir. MKH'lerin kolay elde edilebilmesi, kültür ortamında çoğaltılabilmesi, birçok potansiyel özelliklerinin bulunması ve farklı dokulara farklılaşabilme özellikleri bu hücrelerin uygulanım alanlarını arttırmıştır (Horwitz ve ark., 2005; Brooke ve ark., 2007). Aynı zamanda bu hücreler ile yapılan birçok çalışmada MKH'lerin, immün sistemi düzenleyici etkilerininin olduğu ortaya konulmuş ve embriyonik kök hücrelere göre tümör oluşturma potansiyellerinin az olduğu gösterilmiştir (Prentice, 2006).

Orafasial bölgedeki dokular, mezenkimal kök hücrelerin elde edilebildiği dokular açısından önemli bir kaynaktır. Buradaki dokulardan izole edilen mezenkimal kök hücre tipleri birçok dokuya farklılaşabilme özelliğindedirler. Dişler ektoderm kaynaklı ağız epiteli hücreleriyle nöral kristanın (embriyonun dördüncü haftasında, sırt bölümünde ve nöral tüpün her iki yanında şerit biçiminde dizilmiş hücreler) baş bölgesinden kaynaklanan mezenkim hücrelerinin karşılıklı etkileşimi sonucunda ortaya çıkan ileri derecede mineralize yapılardır (Volponi ve ark., 2010).

Hücre izleme çalışmalarında nöral kristadan göç eden hücrelerin ilk olarak dişlerin geliştiği birinci yutak kavsine geldiği gösterilmektedir. Bu hücrelerin diğer nöral krista hücrelerinden farklılığı; temelde Hox genlerinin kontrolünde odontoblast, sementoblast, sementosit, osteoblast, kondroblast, kondrosit, adiposit, nöron, melanosit ve kas hücrelerine farklılaşmasıdır. Bu hücrelerin pluripotensi özelliği, pulpa ve çevresindeki dokuların sürekli onarımı için onlara geniş bir yenileme yeteneği kazandırmaktadır. Diş farklı türde birçok dokunun küçük bir anatomik ortam içinde bir arada bulunduğu özel bir oluşumdur ve bu farklı doku bileşenleri belli bir hızda yaşam boyu yenilenmektedir. (Can, 2014; Volponi ve Sharpe, 2013). Diş dokularından süt dişi pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler (SHED), tam gömük yirmi yaş dişi pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DPSC), diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DFSC), apikal papilla kaynaklı mezenkimal kök hücreler (APSC), periodontal ligament kaynaklı mezenkimal kök hücreler (PDLSC) izole edilebilmektedir. Süt dişlerinin daimi dişlerin sürmeye başlaması ile kendiliğinden düşmesi, tam gömük yirmi yaş dişinin ise ortodontik tedavi veya perikoronal abse oluşumu gibi çevre yumuşak dokulara zarar verebilen birçok sebep yüzünden ameliyat ile alınabilir olması, diş foliküllerinin de gömük dişleri sarıyor olması ve de periodontal ligamentin de kök sementinin üzerinden kazınarak elde edilebilmesi bu dokuları kolay ulaşılabilir kök hücre kaynağı yapmaktadır. Diş kaynaklı MKH'ler, multipotent özellikte ve kolay ulaşılabilir kaynak olmaları sebebiyle çeşitli tedavide kullanılabilecek potansiyele sahiptirler (Estrela ve ark., 2011; Aydın ve Berbercan 2010, Miura ve ark., 2003; Gronthos ve ark., 2000).

Navabazam ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmada DPSC, DFSC ve PDSC hücrelerinin karakterizasyon özelliklerini karşılaştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda DPSC hücrelerinin diğer hücrelere göre daha yüksek proliferasyon yetenekleri olduğu gösterilmiştir (Nazabazam ve ark., 2013). Yıldırım ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada ise DPSC, SHED ve DFSC hücrelerinin izolasyon ve kültür aşamaları kıyaslanmıştır. Koloni oluşturabilme ve hızlı çoğalabilme yeteneklerinin sırasıyla DFSC, SHED ve DPSC hücreleri olduğunu tespit edilmiştir. Akım sitometrik analizler sonucunda ise DPSC'nin mezenkimal kök hücre ve hematopoetik kök hücre işaretlerini diğer hücrelere göre daha yüksek oranda gösterdikleri görülmüştür. SHED ise hematopoetik kök hücre işaretlerini

DPSC ve DFSC'ye göre daha az oranda gösterirken mezenkimal kök hücre işaretlerini yüksek eksprese ettikleri gösterilmiştir. Bu hücrelerin farklılaşma kapasiteleri kıyaslandığında ise DPSC hücrelerinin diğer hücrelere oranla osteojenik olarak farklılaşmasının daha başarılı olduğu görülmüştür. DFSC hücrelerinin ise adipojenik ve kondrojenik olarak farklılaşmalarının diğer hücrelere oranla daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. (Yıldırım ve ark., 2015)

Farklılaşmaların in vivo olarak çalışıldığı Miura ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptığı çalışmada DPSC ve SHED deney farelerine nakledildiğinde işlevsel odontoblastlara farklılaştıkları görülmüştür (Miura ve ark., 2003). Bu çalışmada DPSC'nin tersine SHED'in tipik bir dentin-pulpa yapısını meydana getiremediği tespit edilmiş, buna rağmen nakledildiği canlıdaki mevcut hücreleri uyararak kemik yapımına katkıda bulunduğu gözlendiği bildirilmiştir. Huang ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptığın çalışmada ise DPSC dentin üzerinde büyütüldüğünde dentin kanallarının içine doğru uzanan hücre uzantılarıyla odontoblastlara benzer hücreler oluşturduğu saptamıştır (Huang ve ark., 2006).

Gronthos ve arkadaşlarının 2000 yılında ilk defa daimi diş pulpasından kök hücreler izole etmesinin ardından Batouli ve arkadaşlarının 2003 yılında DPSC'lerini immün sistemi baskılanmış deney farelerine iskeleler içinde naklederek pulpa benzeri bir dokunun çevresinde odontoblast benzeri bir hücre tabakası ve bu tabakanın çevresinde de dentin benzeri mineralize bir yapıyı oluşturmayı başarmışlardır. Araştırmacılar aynı zamanda DPSC'ni insan dentini üzerine ekerek farelere implante ettiklerinde tamir dentini benzeri yapı oluştuğunu bildirmişlerdir (Batouli ve ark., 2003). Bütün bu çalışmalar diş dokusu kaynaklı kök hücrelerinin kolay elde edilebilen ve bunun yanında özellikle dişle ilgili rejenaratif tedavilerde umut verici olması açısından büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir Biz de bu çalışmada tam gömük yirmi yaş dişi pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerini kullanarak bu hücrelerin kemik, kıkırdak ve yağ dokusuna farklılaşmalarını araştırdık.

Diş pulpasından elde edilen DPSC ve SHED'nin kültür yöntemleri arasında pek bir fark yoktur ancak SHED'in daha yüksek proliferasyon yeteneğine ve popülasyon katlanma sayısına sahip olması sebebiyle iki tip fibroblast görünümlü hücrenin

pasajları arasında kıyaslama yapıldığında farklı fenotipte görülmektedir (Oktar ve ark., 2011; Can, 2012). Bu fenotipik farkın yanı sıra 4386 adet genin de bu iki diş kök hücre grubu arasında iki kat veya daha fazla oranda farklı ifade ettiği belirlenmiştir (Nakamura ve ark., 2009). Bu farklılıklara rağmen her iki hücre türü de genel olarak MHK özelliklerine sahiptir (Karaoz ve ark., 2010; Kerkis ve Caplan, 2012) SHED ve DPSC üzerinde çeşitli yıllarda yapılan in vitro çalışmalarda bu hücrelerin uyarıldıklarında osteoblast, adiposit, kondrosit miyoblast ve nöron öncesi hücrelerin sahip oldukları belirteçleri kazandıkları tespit edilmiştir. (Huang ve ark., 2006; Waddington ve ark., 2009; Oktar ve ark., 2011; Kerkis ve ark., 2008 Nosrat ve ark., 2001).

Miura ve ark.'nın 2003 yılında SHED üzerinde yaptıkları çalışmada SHED'in DPSC'a göre daha yüksek proliferasyon kapasitesine sahip olduğu ve kültüre edildiklerinde daha fazla hücre popülasyon katlanma sayısına sahip oldukları bildirilmiştir (Miura ve ark., 2003). Oktar ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada da süt dişi pulpasından izole edilmiş kök hücrelerin diğer diş kökenli hücrelere göre daha yüksek çoğalma yetisine sahip oldukları saptanmıştır (Oktar ve ark., 2011). DPSC, SHED ve DFSC'nin karşılaştırıldığı çalışmada da bu üç ayrı mezenkimal kök hücrenin katlanma oranları kıyaslandığında SHED hücrelerinde diğer hücrelere oranla daha yüksek katlanma sayısına sahip olduğu tespit edilmiştir (Yıldırım ve ark., 2015).

Biz çalışmamızda, etik unsurlar sebebiyle çekim endikasyonlu dişleri kullanmak durumunda olduğumuzdan ve çekim endikasyonlu süt dişlerinin çok yüksek oranda enfekte veya nekroze pulpa dokusu ihtiva etmeleri sebebiyle tam gömük yirmi yaş dişlerinin pulpalarını çalışmaya dahil ettik. Çekim endikasyonlu tam gömük yirmi yaş dişlerinin ağız ortamına açılmamış olmaları nedeni ile patalojik bulgular taşımayan pulpaya sahip olmaları ve de süt dişlerine kıyasla çok daha fazla pulpa dokusu elde edilebilme imkanı nedeniyle çalışmaya dahil edilme konusunda tercih sebebi olmuştur. Buna karşın DPSC'nin immünomodülatör etkilere sahip olmaları neticesinde enfekte pulpadan da izole edilebilen kök hücrelerle ilgili çalışmalar da mevcuttur (Zhao ve ark., 2012; Alongi ve ark., 2010). Enfekte pulpadan izole edilen kök hücrelerin patalojisiz pulpadan izole edilen kök hücrelere kıyasla CD90 ve

CD105 gibi MKH belirteçlerini daha fazla eksprese ettikleri görülmüştür (Chen ve ark., 2011). Biz kendi çalışmamızda enfekte olmayan, normal pulpa dokusu ile çalıştık ve bu dokudan izole edip pasajladığımız kök hücrelerin %95,35 oranında CD105 belirtecini eksprese ettiğini tespit ettik.

Chen ve arkadaşları verimli bir DPSC izolasyonu gerçekleştirebilmek için dişin çekimi ile izolasyon prosedürünün başlangıcı arasındaki sürenin optimum saklama ortamını gerçekleştirmek koşuluyla maksimum 5 gün olması gerektiğini belirtmiştir Chen ve ark., 2011). Biz çalışmamızda dişlerin çekimi ile izolasyon prosedürünü aynı gün içerisinde 2-4 saatlik zaman diliminde gerçekleştirerek DPSC izolasyonu ile ilgili zaman faktörünü elimine ettik. Alternatif olarak yapılan çalışmalarda dondurma tekniği ile dişin saklanarak sonrasında potansiyel bir kök hücre kaynağı olarak kullanılabileceği gösterilmişlerdir (Lee ve ark., 2010; Gioventu ve ark., 2012). Gioventu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada diş çekildikten sonra, dondurma prosedürünün pulpaya ulaşabilmesi için lazer ile pulpaya doğru mikro kanallar açıldıktan sonra diş dondurulmuştur. Sonrasında bu pulpadan izole edilen kök hücrelerin MKH morfolojisine sahip oldukları ve dondurulmamamış taze pulpadan izole edilen kök hücrelerle benzer özellikleri olduğu tespit edilmiştir. Ma ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmada ise sadece süt dişinden çıkartılan pulpa dondurulmuş ve sonrasında izole edilen kök hücrelerin bu işlem yapılmadan izole edilmiş kök hücrelerle benzer olduğu gösterilmiştir (Ma ve ark., 2012). Alsulaimani ve arkadaşlarının 2016 yılına ait çalışmasında insan dişi pulpası kök hücreleri 2 yıl boyunca dondurma yöntemi ile muhafaza edildikten sonra osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farkılaşmalarının başarılı bir şekilde gerçekleştiği bildirilmiştir (Alsulaimani ve ark., 2016). Pereira ve arkadaşlarının 2012'de yaptığı çalışmada pulpadaki enflamasyonun DPSC'nin özelliklerini etkilemediği ancak bütünlüğü bozulmuş ve lizize uğramış pulpa dokusunun yeterli miktarda doku sağlaması açısından dezavantajlı olduğunu belirtmiştir (Pereira ve ark. 2012). Biz de çalışmamızda bu dezavantajı ortadan kaldırmak adına enfekte olmayan daimi yirmi yaş dişi pulpasından son altı ay içinde antibiyotik ve antienflamatuar ilaç kullanmamış gönüllülerden temin ettik.

Kök hücre izolasyonu için en çok kullanılan iki metod vardır. Bunlardan biri dokunun enzimatik sindirimi diğeri de explant metodudur. Explant metod MHK'ların plastik yüzeye yapışabilmeleri ile doku parçalarında mevcut hücrelerin çoğalmasını esas alırken enzimatik sindirim metodu kollajenaz tip I ve dispaz enzimleri ile pulpa dokusunun tek hücrelerden oluşan bir yapıya getirilmesini esas almakladır (Huang ve ark. 2006). İki teknik da DPSC ile yapılan çalışmalarda başarılı bulunmuştur (Gronthos ve ark., 2000; Huang ve ark., 2006). Yıldırım ve arkadaşları 2012 yılında yaptığı çalışmada DPSC'in elde edilebilmesi için dişin dikkatle kırılması veya kesilmesiyle mekanik olarak dışarı çıkartılan pulpa dokusunun kısa süreli kollagenaz ve dispaz enzimiyle sindirilmesi veya hücrelerin kendiliğinden filizlenerek tek tabaka hücre kümeleri oluşturabilmesi için küçük doku parçalarının bir süre kültüre edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir (Yıldırım ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda diş steril bir şekilde kırıldıktan sonra çıkartılan pulpa dokusu önce bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılmış, enzimatik parçalama için PBS içinde 3mg/ml kolejenaz tip I içeren 2 ml'lik enzim solüsyonuna aktarılarak 45 dk. 37°C'de inkübe ederek ve enzimatik doku parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu teknik ile kök hücreler pulpa dokusundan başarılı bir şekilde izole edilebilmiştir.

Hikens ve arkadaşlarının 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada enzimatik ve explant metod kullanılarak DPSC izolasyonu yapmış ve farklı şekillerde izole edilen kök hücrelerinin osteojenik, kondrojenik ve adipojenik doku farklılaştırma potansiyellerinde farklılık gözlemlenmediğini bildirmişlerdir (Hikens ve ark., 2013). Biz çalışmamızda bütün izolasyonlar için enzimatik sindirim metodunu kullandık. Kontrol grubu olarak kullandığımız inflamatuar sitokinlerle uyarılmamış DPSC'leri de daimi diş pulpasından enzimatik sindirim tekniği ile izole ederek osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farkılaştırma prosedürlerine tabi tuttuk ve osteojenik farklılaşmada osteositlerin oluştuğu, matriks bütünlüğünün korunduğu ve kalsiyum yığılımının gerçekleştiğini; kondrojenik farklılaşmada kondrositlerin oluştuğunu ve matriks bütünlüğü ile kartilajın oluştuğunu; adipojenik farklılaşmada da adipositlerin oluştuğunu ve yağ damlalarının göründüğünü tespit ederek DPSC'nin osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farkılaşmaların yüksek derecede başarılı olduğunu saptadık.

Embriyonik dönemde primer dentin yapımında gözlenen primer dentinogenezis olgun dişte pulpa ortamındaki tamir mekanizmasının ortaya çıkmasını sağlayan sekonder dentinogenezis şeklinde bir defa daha başlatılabilmektedir (Tziafas, 1994). Bu dokunun oluşumuna yol açan uyaran ılımlı düzeydeyse, etkilenen ancak yaşamaya devam eden mevcut odontoblastlar tarafından oluşturulan dentin matriksinin salgılanma ve depolanma hızında bir artışa neden olacaktır (Smith ve ark., 1995). Pulpa vitalitesini koruyan onarımların başarısı ile pulpa canlılığına zarar veren yaklaşımların başarısı arasındaki belirgin farklılık tedaviyi takiben pulpa vitalitesinin korunmasının ne kadar değerli bir konu olduğunu açıkça ortaya koymaktadır (Smith ve ark. 2002). Bu sebeple rejeneratif tedaviler ve iltihaplı pulpa dokusunu tedavi ederek reperatif dentinogenezisi indükleyecek kök hücre tedavileri gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Alaçam, 2012). Çalışmamızın bulguları pulpa korunması ile ilgili yapılacak tedavilerde kök hücrelerin kullanılması ile dişin ağızda sağlıklı bir şekilde kalmasını sağlanması açısından umut vericidir.

Gronthos ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada diş pulpasından mezenkimal kök hücre izolasyonu yapılmıştır. Diş pulpa mezenkimal kök hücrelerinin, mineralize matriks içinde, kan damarları içeren ve fibröz dokudan oluşan insan dişindeki pulpa kompleksine benzer bir yapıyı oluşturduğunu bulmuşlardır. İzole edilen mezenkimal kök hücre kolonilerindeki her bir hücrenin fibroblast benzeri morfolojisi olduğunu saptamışlardır. Ayrıca bu hücreler kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile kıyaslandığında da bu hücrelerin proliferasyon oranlarının kemik iliği kök hücrelerinden yüksek olduğu bildirilmiştir (Gronthos ve ark., 2000). Bizim çalışmamızda da izole edilen daimi diş pulpası kaynaklı kök hücrelerinin tipik şekilde fibroblast benzeri morfolojide olduğu ve yüksek proliferasyon kapasitesinde olduğu tespit edilmiştir.

Qin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada TNF-α'nın DPSC'nin sinyal yolaklarını düzenleyerek proliferasyonu uyardığını ve böylece farklılaşma prosedürleri için daha hızlı bir şekilde uygun sayıda hücre elde edilebileceğini tespit etmişlerdir (Qin ve ark., 2015). Biz çalışmamızda in vitro süre ile ilgili ciddi bir limitasyonumuz olmadığından ve DPSC'in proliferasyonu ve hücre katlanma sayısının diğer mezenkimal kaynaklı kök hücrelere göre halihazırda oldukça yüksek olması sebebi

ile pulpadan izole ettiğimiz kök hücreleri T25 kültür kabında %5CO_2 inkübatörde 37°C'de 7 gün boyunca besi ortamı her 2-3 günde bir taze olarak değiştirilerek 3. pasaja kadar inkübe ederek deneylerimiz için ihtiyacımız olan hücre sayısı elde edilmiştir.

Gronthos ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada DPSC hücreleri ile kemik iliği hücrelerinin proliferasyon kapasiteleri ve farklılaşabilme kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda diş pulpası kök hücrelerinin yüksek proliferasyon kapasitesi olduğu, klonojenik yani kendisinin birebir aynısı olarak çoğalabildiği gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada DPSC hücrelerinin hematopoetik kök hücre işareti olan CD14, CD34, CD45'i yüzeylerinde eksprese etmedikleri gösterilmiştir (Gronthos ve ark., 2000). Bir başka çalışmada ise izole edilen DPSC hücrelerinin 10 gün içerisinde kofluent olduğu ve fibroblast benzeri morfolojiliye sahip olduğu gösterilmiştir. DPSC hücrelerinin hematopoetik kök hücre işareti olan CD11b, CD34, CD31, CD33, CD49b ve CD45' i yüzeylerinde eksprese etmedikleri, CD44, CD73 ve CD90'ı ise yüzeylerinde eksprese ettikleri gösterilmiştir (Baghaban Eslaminejad ve ark., 2010). Doğan ve arkadaşları ile Demircan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da DPSC hücrelerinin CD13, CD44, CD71, CD146, CD29, CD73, CD90, CD105 ve CD166 belirteçlerini eksprese ettikleri, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD33, CD34, CD45 CD106, CD117, CD123, CD133, CD138 belirteçlerini eksprese etmedikleri gösterilmiştir (Doğan ve ark., 2012; Demircan ve ark., 2011). Lindroos ve arkadaşları DPSC, DFSC, PDLSC ve BMSC'lerin karakterizasyonlarını karşılaştırdıkları çalışmada DPSC'nin CD29, CD44, CD90, CD105 ve CD106 ekprese ettiğini tespit etmişlerdir (Lindroos ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda tam gömük yirmi yaş dişlerinden mezenkimal kök hücre izolasyonları Baghaban Eslaminejad ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki izolasyona benzer bir şekilde yapılmış, kültür sonrası hücrelerin 8 gün içerisinde kültür kabının yüzeyinde konfluent oldukları görülmüştür. İzole edilen hücrelerin fibroblast benzeri morfolojileri olduğu görülmüş ve izolasyon sonrası yapılan karakterizasyon aşamasında bu hücrelerin diğer çalışmalardaki sonuçlara benzer şekilde yüzeylerinde CD29, CD146, CD105 ve CD73 mezenkimal kök hücre belirteçlerini eksprese ettikleri fakat CD3, CD4, CD20 belirteçlerini eksprese etmedikleri tespit edilmiştir.

Kök hücrelerin in vitro ortamda farkılaşması spontane veya tetiklenmiş olmak üzere iki şekilde meydana gelir. Spontane farklılaşma hücrelerin yoğunlaşması veya büyüme faktörleri ile substratların ortamdan çekilmesi ile meydana gelir. Tetiklenmiş farklılaşma ise retinoik asit, farklı büyüme faktörleri veya biyolojik olarak aktif moleküller gibi kimyasal tetikleyiciler varlığında gerçekleşir (Thomson ve ark., 1988). SHED ve DPSC ile yapılan in vitro farklılaştırma çalışmalarda özel osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaştırma kültür medyumları kullanılarak kök hücreler başarılı bir şekilde kemik, kıkırdak ve yağ dokularına farklılaştırılmışlardır (Gronthos ve ark., 2000; Miura ve ark., 2003; Chadipiralla ve ark., 2010; Mendonça Costa ve ark., 2008). Biz de çalışmamızda StemPro® markasının osteogenez, kondrogenez ve adipogenez kitlerini kullanarak in vitro olarak farklılaştırmayı gerçekleştirdik. DPSC'nin başka dokulara farklılaşması, intrinsik genetik faktörlerle ve çevredeki büyüme faktörleriyle doğrudan bağlantılıdır (Deng ve ark., 2004; Nakashima ve ark., 2002; Ohlstein ve ark., 2004). Bununla beraber DPSC'nin in vitro ortamda farkılaşması için gerekli faktörler yapılan çalışmalarla birebir tespit edilebilirken bu faktörlerin tek başına veya kombine bir şekilde in vivo ortamda dentinogenezi etkileyip etkileyemeyeceklerine dair çalışmalar devam etmektedir (Tziafas ve ark., 2000; Liu ve ark., 2005; Nakashiama ve ark., 2005). Nakashiama ve Iohara'nın 2014 yılında Japonya'da yaptıkları klinik çalışmada otolog elde edilen DPSC'leri kullanarak irriversible pulpitisli evresindeki pulpa dokusunun onarımı üzerinde çalışmışlar ve 25 haftanın sonunda olumsuz bir etki tespit etmedikleri gibi hasarlı pulpa dokusunda iyileşme olduğunu saptamışlarıdır (Nakashiama ve Iohara, 2014).

Doğan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada DPSC hücrelerinin izole edip, immünositokimyasal ve Real time PCR analizlerini yaparak osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmayı araştırmışlardır. Farklılaştırması yapılan hücrelerin boyamaları Von Koşsa, Oil Red o ve Alcian Blue ile boyamaları yapılmıştır (Doğan ve ark., 2012). Jo ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları diş dokularından izole ettikleri çeşitli kök hücrelerini adipojenik ve osteojenik farkılaştırma ve kalsifikasyonun değerlendirilmesinde Alizarin Red ve Oil Red boyaları kullanılmıştır (Jo ve ark., 2007). Baghaban Eslaminejad ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda da kök hücre izole edilmiş daha sonra bu hücrelerin akım sitometrik analizleri, real

time PCR analizleri, katlanma oranları, odontojenik, kondrojenik, adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları araştırılmıştır (Baghaban Eslaminejad ve ark., 2010). Bizim çalışmamızda da yapılan bu çalışmalara benzer olarak izole edilen DPSC hücrelerinin farklılaştırma çalışmaları yapıldı. Bizim çalışmamızda farklı olarak, bu hücrelerin inflamatuar sitokinlerle uyarımlı kültürleri elde edildikten sonra osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaştırma prosedürleri uygulandı. Hücrelerin farklılaşmaları gözlendikten sonra sırasıyla Alizarin Red, Alcian Blue ve Oil Red ile boyamaları yapılarak oluşan dokular değerlendirildi. İnflamatuar sitokinlerin hiçbiriyle uyarılmayan kontrol grubunda osteositlerin oluştuğu ve matriks bütünlüğünün korunduğu, kalsiyum yığılımının çok fazla meydana gelerek osteojenik farklılaşmanın gerçekleştiği gözlemlendi. TNF-α ile uyarılarak osteojenik farklılaşmaya sokulan hücrelerde osteojenik farklılaşmanın olmadığı, IL-1β ve IL-6 ile uyarılan hücre kültürlerinde ise osteojenik farklılaşmanın kısmen meydana geldiği görüldü. Uyarımsız olarak kondrojenik farklılaşmaya sokulan hücre kültüründe matriks bütünlüğünün korunduğu ve kartilaj oluşumunun gerçekleştiği gözlenirken; TNF-α uyarımlı grupta kısmi bir kartilaj oluşumu gözlendi. IL-1β ve IL-6 uyarımlı gruplarda ise sadece kondrosit hücreleri izlenirken, kartilaj oluşumu görülmemiştir. Uyarımsız adipojenik farklılaştırmaya sokulan hücre kültüründe çok sayıda adiposit ve bol miktarda yağ damlası oluştuğu; TNF-α uyarımlı kültürde ise adiposit oluştuğu halde yağ damlası oluşmadığı; IL-1β ve IL-6 uyarımlı kültürlerde ise az sayıda adiposit ve yağ damlası oluşarak tam bir adipojenik farklılaşma meydana gelmediği görülmüştür.

Mezenkimal kök hücreler kullanılarak yapılan kök hücre bazlı tedaviler doku hasarını tamir etmede en fazla umut veren tedavi yöntemleridir. Mezenkimal kök hücreler sistemik birçok hastalıkların ve doku hasarlarının tedavilerinde kullanılabilseler de nakledilme zorlukları, tümör oluşturma potansiyelleri ve tedavide kullanım için yeterli miktarda hücre elde etme gerekliliği gibi nedenlerle ve de belli bir kültür süresine ihtiyaç duyulmasından dolayı akut yaralanmalarda kullanılmaktadırlar. Bu nedenledir ki transplantasyonları ile ilgili uygulamalar sınırlı kalmaktadır (Keating, 2012; Menasche, 2005; Marx, 2003; Sell, 2010). Bu sınırlamalar saptandıktan sonra mezenkimal kök hücrelerinin inflamatuar uyarımlarla

tedavi edici özelliklerinin arttırılabilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda, TNF-α dışında IL-1β, NO, IFN-γ, IL-1α, IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuar moleküllerin mezenkimal kök hücrelerinin immünomodülatör ve tedavi edici özellikleri üzerinde etki gösterdiklerini bildirilmiştir (Duijvestein ve ark., 2011; Ren ve ark., 2008; Gunn ve ark., 2006; Ko ve ark., 2010; Xu ve ark., 2007; Hou ve ark., 2014). Herrmann ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TNF-α ile uyarılan mezenkimal kök hücrelerin uyarılmayan kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha fazla VEGF konsantrasyonuna sahip olduğu saptanmıştır (Herrmann ve ark., 2010). Lee ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada insan adipoz dokusundan izole edilen kök hücrelerin TNF-α ile uyarıldıktan sonra birçok sitokin, ekstraselüler matriks, proteaz ve aynı zamanda proteaz inhibitörleri salgıladığını bildirmişlerdir (Lee ve ark., 2010). Heo ve arkadaşlarının yaptığı in vivo çalışmada ise TNF-α ile uyarılmış insan adipoz dokusundan elde edilen kök hücrelerin deri iyileşmesinde ve anjiyogenezde başarılı sonuç verdiği gösterilmiştir (Heo ve ark., 2011).

Kemik kırıklarının iyileşme proçesinde önce hematom ve sonrasında inflamatuar yanıt görülür (Dimitriou ve ark., 2005; Mountziaris ve ark., 2008). İnflamasyon fazı sırasında hasarlı dokuda çeşitli sitokinler salınır ve bunlar mezenkimal progenitör hücrelerini harekete geçirerek hematom ve granülasyon dokusunun yerini almasını sağlayarak iyileşmede rol oynarlar (Wu ve ark., 2013). TNF-α osteoblastların ve mezenkimal kök hücrelerin seçilimini destekler. TNF-α ve IL-6 gibi bilinen proinflamatuar sitokinler kemik kırıklarında iyileşme fazında yüksek miktarlarda tespit edilmiştir. Kon ve arkadaşları fare tibiası kırığı modelinde yaptıkları çalışmada kırık meydana geldikten 24 saat içinde yüksek miktarda TNF-α tespit etmişlerdir (Kon ve ark., 2001). Kalça kırığı olan hastalarda ise IL-6 ve IL-8 proinflamatuar sitokinlerinin ilk 24-72 saat içinde arttığı tespit edilmiştir (Cho ve ark., 2002; Kolar ve ark., 2011). IL-6 makrofaj ve T hücrelerinden salgılandığı gibi osteoblast farklılaşmasını da uyarmaktadır (Heymann ve ark., 2000).

Lacey ve arkadaşları ile Deshpande ve arkadaşlarının yaptığı in-vivo çalışmalarda sitokinlerin mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasını sağladığını,

doku hasarı sırasında oluşan immün cevabı etkilediğini tespit etmişlerdir (Lacey ve ark., 2009; Despande ve ark., 2013).

Coral ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları çalışmada plastik cerrahi operasyonu geçiren gönüllülerden elde edilen yağ dokusundan enzimatik sindirim yöntemi ile kök hücre izole ederek bunları TNF-α, IL-6, ve IL-17F ile kültüre etmelerinin sonucunda alkalen fosfataz (ALP) aktivitesinin belirgin şekilde arttırdığını fakat IL-8'in proliferasyon ve farklılaşma özelliğine etkili olmadığını tespit etmişlerdir (Coral ve ark., 2016).

Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise farenin kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreleri TNF-α, IL-1β ve NO ile uyarılarak radyasyon nedeniyle oluşan bağırsak hasarının tedavisinde kullanılmıştır. (Chen ve ark., 2015). Kwon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, insan adipoz dokusundan elde edilen kök hücreler TNF-α, IL-6 ve IL-8 ile uyarılarak doku onarımı ve anjiyogenez üzerindeki etkisine bakılmış ve başarılı bulunmuştur (Kwon ve ark., 2013). Biz de çalışmamızda TNF-α ve IL-6 uyarımlı DPSC kültürlerinde osteojenik besi yerinde 28 gün sonunda Alizarin Red boyaması ile tespit edilebilen kalsiyum yığılımı olduğunu tespit ettik

Yang ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları in vivo çalışmalarında IL-1β'nın DPSC'nin mineralizasyon potansiyeli üzerine etkilerini araştırmışlardır. 8 hafta sonrasında histolojik olarak meydana gelen hücre proliferasyonu ve kalsiyum yığılımı incelendiğinde IL-1β'nın anlamlı derecede pozitif yönde rol oynadığını bildirmişlerdir (Yang ve ark., 2011). Yang ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak biz çalışmamızı in vitro olarak gerçekleştirdik. IL-1β uyarımlı DPSC'ye osteojenik besi yeri eklendikten 28 gün sonra Alizarin Red boyamasında uyarımsız kontrol grubu ile kıyaslama yapıldığında daha az kalsiyum yığılımı gözlemledik. Bunun sebebi olarak çalışmamızın in vitro ortamda gerçekleştirilmiş olmasına bağlı olarak in vivo çalışmalarda konağın farklılaşma üzerine etkili intrinsik faktörleri, farklı büyüme faktörlerini veya çeşitli moleküller gibi kimyasal tetikleyicilerin bulunmamasına bağlı olduğunu ayrıca fare ile insan dişi pulpası gen ekspresyonları arasındaki farklardan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Liu ve arkadaşları TNF-α ile uyarılan farklılaşmamış, kısmen farklılaşmış ve tam farklılaşmış DPSC'lerin gen ekspresyonlarını incelemişler ve bunların osteojenik farklılaşmayı destekleyici yönde olduklarını tespit etmişlerdir (Liu ve ark., 2016). Biz de çalışmamızda TNF-α ile uyarılan DPSC kültürlerinin sert doku oluşumlarını desteklediğini tespit ettik. Çalışmamızda TNF-α ile uyarılan DPSC'lerin osteojenik farklılaşma besi yerinde 28 gün sonra kalsiyum yığılımı olduğu görülmekte kondrojenik farklılaşma besi yerinde ise 28 gün sonunda IL-1β ve IL-6'ya göre matriks bütünlüğünün daha fazla korunduğu saptanmıştır.

Lee ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları çalışmada insana ait irreversible pulpitis safhasındaki enfekte diş pulpalarından kök hücre izolasyonu yaparak bunlarla çalışmışlardır. Enfekte pulpadan izole edilen kök hücreleri ile, enfekte olmayan pulpadan izole edilen kök hücreleri insan monosit hücreleriyle kültüre edildiklerinde iki grupta da TNF-α'nın baskılandığını ancak IL-1β miktarın etkilenmediğini görmüşlerdir ve bu hücrelerin immünomodülatör etkileri arasında anlamlı şekilde benzerlik olduğunu belirtmişlerdir (Lee ve ark., 2016). Biz çalışmamızda kök hücre elde edilecek pulpanın bütünlüğünün bozulmamış ve miktarca fazla pulpa dokusuna sahip olması gibi avantajlarından dolayı enfekte olmayan tam gömük yirmi yaş dişi pulpası kullanmayı tercih ettik.

Çalışmamıza TNF-α, IL-1β ve IL-6 proinflamatuar sitokinlerini dahil ederek daimi yirmi yaş dişi pulpasından enzimatik sindirim tekniğiyle elde edilen mezenkimal kök hücrelerinin bu inflamatuar medyatörlerle uyarımını gerçekleştirdik. Yapılan çalışmalar doğrultusunda sert doku oluşumunu incelemek adına ostejenik ve kondrojenik, yumuşak doku oluşumunu incelemek adına da adipojenik farklılaşmaları araştırdık. Araştırmamızda Diş pulpası kaynaklı kök hücrelerin dokunun tamiri için gereken stimülasyonları oluşturduğunu gözlemledik. Mezenkimal kök hücre kültürüyle olan çalışmamız bize çok yakın bir gelecekte pulpanın tamirinin mezenkimal kök hücrelerle mümkün olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızın sonucuna bakıldığında insanda diş kayıplarının büyük ölçüde önlenebileceği öngörülmektedir.

5.1. Sonuçlar

1-Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre enfekte olmayan daimi yirmi yaş dişi pulpasından enzimetik sindirim metodu ile izole edilen kök hücreler, tipik mezenkimal kök hücre fenotipi ve özellikleri taşımaktadır.

2-DPSC kültürlerine **osteojenik** farklılaşma besiyeri eklendiğinde 28 gün sonunda uyarımsız grupta, düzenli osteositlerin oluştuğu, IL-1β ve IL-6 uyarımlı grupta düzensiz dizilimli osteositlerin oluştuğu ve TNF-α ve kombine uyarımlı grupta osteositlerin oluşmadığı tespit edildi. Uyarımsız grupta ve IL-6 uyarımlı grupta matriks bütünlüğünün iyi korunduğu, IL-1β ve kombine uyarımlı grupta matriks bütünlüğünün kısmen korunduğu ve TNF-α uyarımlı grupta matriks bütünlüğünün korunmadığı görüldü. Tüm gruplarda kalsiyum yığılımının meydana geldiği tespit edildi.

3-DPSC kültürlerine **kondrojenik** besiyeri eklendiğinde, 28 gün sonunda, uyarımsız, IL-1β, IL-6 ve kombine uyarımlı gruplarda kondrositlerin oluştuğu, TNF-α uyarımlı grupta ise düzensiz kondrositlerin oluştuğu tespit edildi. Uyarımsız grupta matriks bütünlüğünün korunduğu ve kartilaj oluştuğu görülürken uyarımlı tüm gruplarda matriks bütünlüğünün korunmadığı ve kartilaj oluşmadığı görüldü.

4-DPSC kültürlerine **adipojenik** besiyeri eklendiğinde 28 gün sonunda uyarımsız grupta ve TNF-α uyarimlı grupta düzenli adipositlerin oluştuğu, diğer tüm uyarımlı gruplarda ise kısmen adipositlerin oluştuğu tespit edildi. Uyarımsız, IL-1β ve IL-6 uyarımlı gruplarda yağ damlası oluştuğu, diğer tüm uyarımlı gruplarda ise yağ damlası oluşmadığı görüldü.

5-Diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (DPSC) endodontide pulpanın korunmasına yönelik tedavilerde başarılı ve umut verici olduğu saptandı.

6. KAYNAKLAR

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology, 5th Ed. Saunders, 2003: 243-275.

Abbas AK, Lichtman AH, Poper JS. Cytokines. Cellular and Molecular Immunology Philadelphia: WB Saunders Company. 1994:240-261.

Airas L, Niemela, M Salmi, T Puurunen, DJ Smith and S Jalkanen. Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidyl inositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. Journal of Cell Biology. 1997; 136:421-431.

Airasand L, Jalkanen S. CD73 Mediates of B cells to follicular dendritic cells. Blood. 1996;88:1755-1764.

Akarsu S, Citak Kurt N, Dogan Y, et al. The differential diagnostic values of cytokine levels in pleural effusion. Mediators of Inflalammation 2005; 1: 2-8.

Alaçam T. Rejeneratif Pulpa Tedavileri. Endodonti. 2012; 239-247.

Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. Regenerative Medicine. 2010;5:617-631.

Alsulaimani RS, Ajlan SA, Aldahmash AM, Alnabaheen MS, Ashri NY. Isolation of dental pulp stem cells from a single donor and characterization of their ability to differentiate after 2 years of cryopreservation. Saudi Medical Journal. 2016; 37(5):551-560.

Armstrong L, Jordan N, Millar A. Interleukin 10 regulation of TNF-α from human alveolar macrophages and pheripheral blood monocytes. Thorax 1996;51:143-9.

Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. Proceedings of National Academy of Sciences. 1984;(24): 7907–11.

Baghaban Eslaminejad MR, Vahabi S, Shariati M, Nazarian H. In vitro Growth and Characterization of Stem Cells from Human Dental Pulp of Deciduous Versus Permanent Teeth. Journal of Dentistry. 2010;7(4).

Bardin N, Blot-Chabaud M, Despoix N, Kebir A, Harhouri K, Arsanto JP, Espinosa L, Perrin P, Robert S, Vely F, Sabatier F, Le Bivic A, Kaplanski, G, SampolJ, Dignat-George F. CD146 and its soluble form regulate monocyte trans endothelial migration. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29(5):746-53.

Barry F, R Boynton, M Murphy, S Haynes worthand J Zaia. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. Biochemical and Biophysicial Research Communications. 2001; 289:519-524.

Bastidas-Coral AP, Bakker AD, Doulabi BZ, Kleverlaan CJ, Bravenboer N, Forouzanfar T,Klein-Nulend J. Cytokines TNF-α, IL-6, IL-17F and IL-4 differentially affect osteogenic differentiation of human adipose stem cells. Stem Cells International. 2016.

Batouli S, Mirua M, Brahim J, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. Journal of Dental Research. 2003;82:976-981.

Bayık, M. Kök Hücre: Yasamm Kaynağı. I.Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongre Kitabı. 2004; 13-23.

Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. Nature. 1963; 197: 452-454.

Bieback K, Hecker A, Kocaomer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, Kluter H. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. Stem Cells. 2009;27:2331-2341.

Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Stem Cells. 2004;22:625-634.

Bienvenu J. Exploration of cytokines in biological fluids. Comptes Rendus Des Seances De La societe De Biologie Et De Ses Filiales. 1995;189:545-55.

Can A. Kök Hücre Biyolojisi Türleri ve Tedavide Kullanımları, Akademisyen Kitabevi. 2004.

Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. Journal of Cell Physiology. 2007;213:341-347.

Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. Handbook of Stem Cells Second Edition Ed. San Diego Acedemic Press. 2013;43:493-502.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. Journal of Orthopaedic Research. 1991;9:641-650.

Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor-beta and remodeling of bone. The Journal of Bone and Joint Surgery. 1991;73:1418-1428.

Cetiner M: Hücresel Tedaviler Tarihi ve Süreyya Tahsin Aygün. 2. Ulusal Kök Hücre Kongresi Program ve Özet Kitabı, Trabzon, 2006;29-34.

Chadipiralla K, Yochim JM, Bahuleyan B, Huang CY, Garcia-Godoy F, et al. Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments

and pulp of human exfoliated deciduous teeth. Cell and Tissue Research. 2010;340:323.

Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. British Medical Bulletin. 1993;49:481-93.

Chen H, Min XH, Wang QY, Leung FW, Shi L, Zhou Y, Yu T, Wang CM, An G, Sha WH, Chen QK. Pre-activation of mesenchymal stem cells with TNF-α, IL-1β and nitric oxide enhances its paracrine effects on radiation-induced intestinal injury. Scientific Reports. 2015; 5:8718.

Chen Y-K, Huang AH-C, Chan AW-S, et al. Human dental pulp stem cells derived from different cryopreservation methods of human dental pulp tissues of diseased teeth. Journal of Oral Pathology and Medicine. 2011;10:793-800.

Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor β superfamily during murine fracture healing. Journal of Bone and Mineral Research. 2002; 17:513-520.

d'Aguino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, rullo R, Checchi V, Laino L, Tirino V, PApaccio G. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution. 2009; 312(5): 408-15.

d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. Cell Death and Differentiation. 2007;14(6):11.

d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Lanio L, Graziano A, Desidero V, Lanio G, Papaccio G. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental

pulp stem/ progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. Journal of European Cells and Materials. 2009; 18: 75-83.

Dalkılıç E, Gül CB, Alkış N. Interlökin-6: Inflamasyonda başrol oyuncularından. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2012; 38(2):157-160.

de Mendonça Costa A, Bueno DF, Martins MT, Kerkis I, Kerkis A, et al. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human DP stem cells. Journal of Craniofacial Surgery. 2008;19:204.

Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. Brazilian Dental Journal. 2011;22(1):3-13.

Demircan PC, Sarlboyacl AE, Unal ZS, Gacar G, Subaşı C, Karaöz E. Immunoregulatory effects of human dental pulp-derived stem cells on T cells: Comparison of transwell co-culture and mixed lymphocyte reaction systems. Cytotherapy. 2011;10.3109.

Deng MJ, Jin Y, Shi JN, Lu HB, Liu Y, He DW, Nie X, smith AJ. Multilineage differentiation of ectomesenchymal cells isolated from the first branchial arch. Tissue Engineering. 2004;10:1597.

Deshpande S, James AW, Blough J. Reconciling the effects of inflammatory cytokines on mesenchimal cell osteogenic differentation. Journal of Surgical Research. 2013:185:278-285.

Dimitrou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone heraling. Injury. 2005; 12:1392-1404.

Dinarello CA. Historical Review of Cytokines. European Journal of Immunology. 2007;37(1);34–45.

Dinarello CA. IL -1 and IL -1 antagonism. Blood. 1991; 77: 1627.

Dinarello CA. Interleukin -1 and the pathogenesis of the acute phase response. The New England Journal of Medicine. 1984; 311: 1413-1418.

Dinarello CA. Interleukin-1 in infectios diseases. Immunological Reviews. 1992,127:119-146.

Dinarello CA. Proin ammatory cytokines. Chest. 2000;118:503–508.

Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. Clinical and Experimental Rheumatology. 2002;20:1-13.

Dissanayaka WL, Hargreaves KM, Jin L, Samaranayake LP, Zhang C. The interplay of dental pulp stem cells and endothelial cells in an injectable peptide hydrogel on angiogenesis and pulp regeneration in vivo. Tissue Engineering Part A. 2015;21(3-4):550-563.

Dogan A, Yalvaq ME, $ahin F, Kabanov AV, Palotas A, Rizvanov AA. Differentiation of human stem cells is promoted by amphiphilic pluronic block copolymers. International Journal of Nanomedicine. 2012; 7: 4849-4860.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, ProckopDj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy. 2006; 8(4):315-317.

Drenth JP, Van Uum SH, Van Deuren M. Endurance run increased circulating IL-6 and IL-1 ra but down-regulates ex vivo TNF-α and IL-1 ß production. Journal of Applied Physiology. 1995;79:1497-503.

Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. The FASEB Journal. 2003;17(9):984.

Duijvestein M. et al. Pretreatment with interferon-gamma enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. Stem Cells. 2011; 29:1549-1558.

Egea V, von Baumgarten L, Schicor C. TNF-α respecifies human mesenchymal stem cells to a neural fate and promotes migration toward experimental glioma. Cell Death & Differentiation. 2011; 18:853-863.

Elias JA, Freundlich B, Kern JA, et al. Cytokine networks in the regulation of inflammation and fibrosis in the lung. Chest. 1990; 97:1439-1445.

Estes BT, Wu AV, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenic protein 6. Arthritis and Rheumatology. 2006;54:1222-1232.

Estrela C, Alencar AH, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. Brazilian Dental Journal. 2011;22(2):91-8.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishmend in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981; 292 (5819): 154-6.

Fang-Chi L, Yi-Chu C, Funn-Juh C, Shi-Chuan C. Cytokines and fibrinolytic enzymes and tuberculous and parapneumonic effusions. Clinical Immunology. 2005; 116(2): 166-173.

Fanslow WC, Sims JE, Sassenfeld H. Regulation of alloreactivity in vivo by soluble form of the interleukin -1 receptor. Science. 1990;248: 739-742.

Farrar MA, Schreiber RD. The moleculer cell biology of inter- feron-gamma and its receptor: Annual Review of Immunology. 1993; 11:571-611.

Fernandes H, Mentink A. Bank R, Stoop R, van Blitterswijk C, de Boer J. Endogenous collagen influences differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. Tissue Engineering Part A. 2010;16:1693-1702.

Fischer CP: Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? Exercise Immunology Review Journal. 2006;12:6-33.

Freshney IA, Stacey G, Auerbach JM. Culture of Human Stem Cells. Wiley-Liss. 2007;5-18.

Friedenstein Aj, Gorskaja JF, Kulagina NN, Fibroblast precursors in normal and grradiated mouse hematopoietic organs. Experimental Hematololgy. 1976;4,:267-274.

Fuchs E, Tumbar T, Guasch G. Socializing With the Neighbours: stem cells and their niche. Cell. 2004; 116: 769-778.

Gahring LC, Carlson NG, Kulmar RA, Rogers SW. Neuronal expression of tumor necrosis factor alpha in the murine brain. Neuroimmunomodulation. 1996; 3(5):289-303.

Gao Y, Tang J, Chen W, Li Q, Nie J, Lin F, et al. In ammation negatively regulates FOXP3 and regulatory T-cell function via DBC1. Proceedings of the National Academy of Sciences.2015;112:3246–3254.

Gardner RV, McKinnon E, Poretta C, Leiva L. Hemopoietic function after use of IL-1 with chemotherapy or irradition. Journal of Immunology. 2003;171:1202-6.

Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P and Baumann H, Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-

stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1987;84:7251-7255.
Gioventu S, Andriolo G, Bonino F, et al. A novel method for banking dental pulp stem cells. Transfusion and Apheresis Science. 2012;2:199-206.

Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. Stem Cell Rev. 2008;4(1):21-26.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey GP, Shi S. Postnatal human dental stem pulp cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000; (97) 25:13625-13630.

Gronthos S, Mankani M, Brahim 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(25): 13625-13630.

Güner İ, Özmen D, Bayındır O. Cytokines. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences. 1997;17.

Gunn WG. et al. A crosstalk between myeloma cells and marrow stromal cells stimulates production of DKK1 and interleukin-6: apotential role in the developmentat of lytic bone disease and tumor progression in multiple myeloma. Stem Cells. 2006; 24:986-991.

Haeckel, E. Natürliche Schöpfungsgeschichte (Berlin: Georg Reimer) 1868.

Haeggstrom JZ, Kull F, Rudberg PC, Tholander F, Thunnissen MM. Leukotriene A4 hydrolase. Prostaglandins and Other Lipid Mediators. 2002;68:495-510.

Hakeri H. Kök hücre çalışmaları ve hukuki boyutu. 1. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongre Kitabı. Nevşehir. 2009; 67-76.

Hamidouche Z, Fromigue O, Ringe J, Haupl T, Vaudin P, Pages JC, Srouji S, Livne E, Marie PJ. Priming integrin alpha5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. Proceedings of the National academy of Sciences. 2009;106:18587-18591.

Harumi Miyagi SP, Kerkis I, Costa Maranduba CM, Gome CM, Martins MD, Marques MM. Expression of extracellular matrix proteins in human dental pulp stem cells depends on the donor tooth conditions. Journal of Endodontics. 2010; 36: 826-31.

Hatoya S, Torii R, Kondo Y, Okuno T, Kobayashi K, Wljewardana V, Kawae N, Tamada H, Sawada T, Kumagai D, Sugmra K, Inaba T. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. Molecular Reproduction and Development. 2006;73(3):298-305.

Hauner H, entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Nergel R, Pfeiffer EF. Promoting effect of glucarticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. Journal of clinical Investigation. 1989;84:1663-1670.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. Biochemical Journal. 2003;374(1):1-20.

Hemmrich K, von Heimburg D, Cierpka K, Haydaroglu S, Paulla N. Optimization of the differentiation of human preadipocytes in vitro. Differentiation. 2005;73:28-35.

Heo SC, Jeon Es, Lee IH, Kim HS, Kim MB, Kim JH. Tumor necrosis factor-alpha-activated human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing through paracrine mechanisms. Journal of Investigative Dermatology. 2011;131:1559-1567.

Herrmann JL. Et al. Preconditioning mesenchymal stem cells with transforming growth factor-alpha improves mesenchymal stem cell-mediated cardioprotection. Shock. 2010;33:24-30.

Herzog EL, Cahi L, Krause DS. Plasticity of marrow- derived stem cells. Blood. 2003; 102:3483-3493.

Hess K, Ushmorow A, Fielder J, Brenner RE, Wirth T. TNF-α promotes osteogenic differentiation of human mesenchimal stem cells by triggering the NF-κB signaling pathway. Bone. 2009; 45:267-376.

Heymann D, Rousselle AV. gp130 Cytokine family and bone cells. Cytokine. 2000; 12:1455-1468.

Hildebrandt C, Buth H, Thielecke H. Influence of cell culture media conditions on the osteogenic differentiation of cord blood-derived mesenchymal stem cells. Anlysis of Anatomy. 2009;191:23-32.

Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, Politis C, Lambrichts I, Bronckaers A. Effect of isolation methodology an stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental puşp stem cells. Cell and Tissue Research. 2012;353:65-78.

Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, et al. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). Proceedings of National Academy of Science. 1985; 82: 5490-5494.

Horii Y, Muraguchi A, Iwano M. Involvement of IL -1 in mesengial proliferative glomerulonephritis. Journal of Immunology. 1989;143 : 3949-3955.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2005; 7: 393-395.

Hou Y. et al. IL-8 enhances the angiogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells by increasing vascular endothelial growth factor. Cell Biology International. 2014;38:1050-1059.

Huang GT, Shagramanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from culturated human dental pulp cells on dentin in vitro. Journal of Endodontics. 2006; 32: 1066-1073.

Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation metods and culturing enviroments. Cell and Tissue Research. 2006;324:225-236.

Huang, X.; Saint-Jeannet, J.P. Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. Developmental Biology. 2004; 275: 1–11.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, andsignaling in cell adhesion. Cell. 1992;69(1):11-25.

Iohara K, Fujita M, Ariji Y, Yoshikawa M, Watanabe H, Takashima A, Nakashima M. Assessment of pulp regeneration induced by stem cell therapy by magnetic resonance imaging. Journal of Endodontics. 2016;42(3):397-401.

Jaatela M. Biologic activities and mechanism of action of tumor necrosis factor - a/cachectin. Laboratory Investigation. 1991;64:724- 742.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RE, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, WC,

Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature. 2002; 418, s.41-49.

Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH. Isolation and characterization of postnatal stem cells form human dental tissues. Tissue Engineering. 2007;13(4):767-773.

Jones SA: Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. Journal of Immunology. 2005;175:3463-3468.

Karahuseyinoglu S, Kocaefe C, Balci D, Erdemli E, Can A. Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells. Stem Cells. 2008;26:682-691.

Karaoz E, Doğan BN, Aksoy A, Gacar G, Akyüz S, Ayhan S, Genç ZS, Yürüker S, Duruksu G, Demircan PC, Sarıboyacı AE. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. Histochemistry and Cell Biology. 2010; 133;95-112.

Karaöz E, Ovall E. Kök Hücreler. Ati Teknoloji Yayınları (1). Trabzon. 2004.

Kas-Deelen AM, WW Bakker, P Olinga, J Visser, EF de Maar, WJ van son, TH The and MC Harmsen. Cytomegalo virus infection increases the expression and activity of ecto-ATPase (CD39) and ecto-5'nucleotidase (CD73) on endothelial cells. FEBS Letters. 2001; 491:21-25.

Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. Cell Stem Cell. 2012;10:709-716.

Kerkis I, Caplan AI. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. Tissue Engineering Part B: Reviews. 2012; 129-138.

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. Blood. 1995; 86: 1243-54.

Ko IK. et al. Targeting improves MSC treatment of inflammatory bowel disease. Molecular Theraphy. 2010; 18:1365-1372.

Koçyigit I, Kaynar L, Cetin M. Hematopoietic stem cell Biology. Türkiye Klinikleri Journal of Hematology and Oncology Special Topics. 2008; 1 (2): 16-22.

Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. Mesenchymal stem cell-based theraphy for cartilage rapair: a review. Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy. 2009;17:1289-1297.

Kolar P, Gaber T, Perka C, Duda GN, Buttgereit F. Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoksia. Clinical Orthopaedics and Related Research. 2011; 469:3118-3126.

Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-κB lignad (osteoprotogerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. Journal of Bone and Mineral Research. 2001; 16:1004-1014.

Krebsbach PH, Robey PG. Dental and Skeletal Stem Cells: Potential Cellular Regeneration. Journal Of Dental Education. 2002; 66:6, 766-773.

Kubo Y, Kaidzu S, Nakajima I, Takenouchi K, Nakamura F. Organization of extracellular matrix components during differentiation of adipocytes in long-term culture. In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal. 2000;36:38-44.

Kwon YW, Heo SC, Jeong GO, Yoon JW, Mo WM, Lee MJ, Jang IH, Kwon SM, Lee JS, Kim JH. Tumor necrosis factor-alpha-activated mesenchymal stem cells

promote endothelial progenitor cell homing and angiogenesis. Biochemia et Biophysica Acta. 2013;1832:2136-2144.

Lacey DC, Simmons PJ, Graves SE, Hamilton JA. Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. Osteoarthritis and Cartilage. 2009; 17:735-742.

Lai AY, Kondo M. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. Seminars in Immunology. 2008; 20 (4), 207-212.

Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, Pirozzi G, Papaccio G. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologus fibrous bone tissue. Journal of Bone and Mineral Research. 2005; 1394-1402.

Lee MJ, Kim J, Kim MY, Bae YS, Ryu SH, Lee TG, Kim JH. Proteomic analysis of tumor necrosis factor-alpha-induced secretome of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Journal of Proteome Research. 2010;9:1754-1762.

Lee S-Y, Chiang P-C, Tsai Y-H, et al. Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells. Journal of Endodontics. 2010;8:1336-1340.

Lee S, Zhang QZ, Karabucak B, Le AD. DPSCs from inflamed pulp modulate macrophage function via the TNF-α/IDO axis. Journal of Dental Research. 2016; 95(11): 1274-1281.

Lindroos B, Maenpaa K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S. Characterization of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. Biochemical an Biophysical Research Communucations. 2008;368:329-335.

Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. Annual Review of Immunology. 1993; 11:191-212.

Liu H, Li W, Shi ST, Habelitz S, Gao C, Denbesten P. MEPE is downregulated as dental pulp stem cells differentiate. Archives of Oral Biology. 2005;50:923.

Liu S, Khemlani LS, Shapiro RA, Johnson ML, Liu K, Geller DA, Watkins SC, Goyert SM, Billiar TR. Expression of CD14 by hepatocytes: upregulation by cytokines during endotoxemia. Infection and Immunity. 1998;66(11):5089-5098.

Liu YK, Zhou ZY, Liu F. Transcriptome changes during TNF-α promoted osteogenic differentiation of dental pulp stem cells (DPSCs). Biochemical and Biophycal Research Communications. 2016; 476(4): 429-430.

Loeffler M, Roeder I. Tissue Stem Cells: Definition, Plasticity, Heterogeneity, self-Organization and Models- A Conceptual Approach. Cells Tissues Organs. 2002; 171:8-26.

Lowenthal JW, Corthésy P, Tougne C, Lees R, MacDonald HR, Nabholz M. High and low affinity IL 2 receptors: Analysis by IL 2 dissociation rate and reactivity with monoclonal anti-receptor antibody PC61. Journal of Immunology. 1985;135(6):3988-3894.

Lu L, Liu Y, Yang S, Zhao Q, Wang X, Gang W, Han Z, Xu Z, Lu Y, Liu D, Chen Z, Han Z. isolation and caracterization of human umblical cord mesenchymal stem cell with hematopoiesis supportive function and other potentials. Haematologica. 2006; 91:1017-1026.

Ma D, Gao J, Yue J, Yan W, Fang F, et al. Changes in proliferation and osteogenic differentiation of stem cells from deep caries in vitro. Journal of Endodontics. 2012; 38:796-802.

Ma L, Makino Y, Yamaza H, et al. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. PLoS One. 2012;12:e51777.

Mafi R, S Hindocha, P Mafi, M Griffinand WS Khan. Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculo skeletal applications - a systematic review of the literature. Open Orthopaedics Journal. 2011; 2:242-248.

Manikandhan R, Muthu M, Sunil P, Shalini R, Kannan T, Manjunath S, Murugan P, Srinivasan V, Thamaraikannan P, Tholcopiyan L, Srinivasan T, Preethy S, Abraham S. Successful isolation, in vitro expansion and characterization of stem cells from Human Dental Pulp. Journal of Stem Cells and Regenerative Medicine. 2010;30;6(3):168-169.

Martinez-Agosto JA, Mikkola HK, Hartenstein V, Banerjee U. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. Genes Dev. 2007; 21 (23), 3044-3060.
Marx J. Cancer Research. Mutant stem cells may seed camcar. Science. 2003;301:13081310.

Mauth C, Huwig A, Graf-Hausner U, Roulet JF. Restorative Applications for Dental Pulp Therapy. Topics in Tissue Engineering (Eds. N Ashammakhi, R Reis & Chiellini). 2007; 3.

Mayani H, Lansdorp PM. Thy-l expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. Blood. 1994;83(9):2410-2417.

Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation in vitro expansion and characterization. British Journal of Haematology. 2003;123:702-711.

Menasche P. stem cells for clinical use in cardiovascular medicine: current limitations and future perspectives. Thrombosis and Haemostasis. 2005; 94:697-701.

Mier JW, Gallo RC. Purification and some characteristics of human T-cell growth factor from phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte-conditioned media. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1980; 77:6134–6138.

Miura M, Ghronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proceedings of the National academy of Science. 2003;100:5807-5812.

Morsczeck C, Reichert TE, Vollner F, Gerlach T, Driemel O. The state of the art in human dental stem cell research. Mund Kiefer Gesichtschir. 2007;11(5):259-66.

Morst (Ministry of Research Science and Technology). Stem Cell Research in New Zealand; Challenges and Oppurtunities for the Research Sector. 2006;13-16.

Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. Tissue Engineering Part B: Reviews. 2008;14:179-186.

Murakami M, Hayashi Y, Iohara K, Osako Y, Hirose Y, Nakashima M. Trophic Effects and Regenerative Potential of Mobilized Mesenchymal Stem Cells From Bone Marrow and Adipose Tissue as Alternative Cell Sources for Pulp/Dentin Regeneration. Cell Transplant. 2015;24(9):1753-1765.

Na S, Zhang H, Huang F, Wang W, Ding Y, Li D, et al. Regeneration of dental pulp/dentine complex with a three dimensional and scaffold-free stem-cell sheet-derived pellet. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2013.

Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem cell proliferation pathways comparsion between human exfoliated decidious teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. Journal of Endodontics. 2009; 35:1536-1542.

Nakashima M, Mizunuma K, Murakami T, Akamine A.Induction of dental pulp stem cell differentiation into odontoblasts by electroporation-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11 (Gdf11). Gene Therapy. 2002; 9(12): 814-8.

Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic theraphy. Cytokine Growth Factor Review. 2005;16:369.

Nakashima, M and Iohara, K. Mobilized dental pulp stem cells for pulp regeneration: initation of clinical trial. Journal of Endodontics. 2014;40: 26-32.

Navabazam ER, Nodoshan FS. Sheikhha MH, Miresmaeili SM, Soleimani M, Fesahat F. Characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp periapical follicle and peripdontal ligament. Iranian Journal of Reproductive Medicine. 2013;3: 235-242.

Nicod, LP. Cytokines: Overview. Thorax 1993; 48:660-667.

Nororiha IL, Niemir Z. Stein H, Waldher R. Cytokines and grawth factors in renal disease: Nephrology Dialysis Transplantation. 1995;10: 775-786.

Nosrat IV, Widenfalk J, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. Journal of Devolopmental Biology. 2001; 238:120-132.

Ohlstein B, Kai T, Decotto E, Sprading A. The stem cell niche: theme and variations. Current Opinion in Cell Biology. 2004;16:693.

Oktar PA, Yıldırım S, Balcı D, Can A. Continual expression throught the cell cycle and downregulation upon adipogenic differentiation makes nucleostemin a vital human MSC proliferation marker. Stem Cell Reviews and Reports. 2011; 7:413-424.

Olszewski,MB, Groot AJ, Dastych J, Knol EF, TNF Trafficking to Human Mast Cell Granules: Mature Chain-Dependent Endocytosis, The Journal of Immunology, 2007;178: 5701–5709.

Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. Chest. 2000; 117:1162-1172.

Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek C. Cytokines. In: Stites DP, Terr AI, ed. Basic and Clinical Immunology.1994:105- 123.

Özcan T, Seyis S, Akçay B. Hücresel Kardiyomiyoblasti ve Kök Hücre Tedavisi, Türkiye Klinikleri Journal of Cardiovascular Sciences. 2007; 19:68-76.

Pairault J, Green H. A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. Proceedings of National Academy of Sciences. 1979;76:5138-5142.

Park EJ, Barbul A Understanding the role of immune regulation in wound healing. American Journal of Surgery 2004;187: 11-16.

Patrick CW, Jr. Tissue Engineering strategies for adipose tissue repair. The anatomical Record. 2001; 263:361-366.

Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. Journal of Cell Science. 113(1):5-10.

Pereina BJG. Implication of cytokine measurements during in vitro and clinical haematodialysis. Nephrology Dialisis Transplantation. 1995;10: 18-26.

Periera LO, rubini MR, Silva JR, et al. comparison of stem cell properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps. International Endodontic Journal. 2012;12:1080-1090.

Pierelli L, Bonanno G, Rutella S, Marone M, Scambia G, Leone G. CD105 (endoglin) expression on hematopoietic stem/ progenitor cells. Leukemia and Lymphoma. 2001;42(6):1195-1206.

Pindull G, Pindull B, Meulen N. Haematopic stem cells (CFUc) in human cord blood. Acta Paediatrica Scandinavia. 1978; 67:413-416.

Pittenger ME, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999; 284(5411): 143-147.

Pogue R, Lyons K. BMP signaling in the cartilage growth plate. Current Topics in Developmental Biology. 2006;76:1-48.

Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. Injury. 2005; 3:8-12

Prentice D. Adult stem cells in: Monitoring stem cell research: a report of the president's Council on Bioethics. Washington (DC), Government Printing Office. 2004; 309-46.

Prentice D. Current Science of Regenerative Medicine with Stem Cells, Journal Investigative Medicine. 2006; 54 (1):33-37.

Pulido R, Cebriån M, Acevedo A, de Landåzuri MO, Sånchez-Madrid F. Comparative biochemical and tissue distribution study of four distinct CD45 antigen specificities. Journal of Immunology. 1988;140(11):3851-3857.

Qin Z, Li Y, Liu G. Tumor necrosis factor alpha stimulates proliferation of dental pulp stem cells via akt/glycogen synthase kinase-3β/cyclin D1 signaling pathway. Journal of Endodontics. 2015; 41(7):1066-1072.

Ratajczak MZ. Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. Current Opinion in Hematology, 2008; 15 (4), 293-300.

Ren G. et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosupression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. Cell Stem Cell. 2008; 2:141-150.

Richter W. Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. Journal of Internal Medicine. 2009;266:390-405.

Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR gamma is required fort he differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. Molecular and Cellular Biochemistry. 1999;4:2173-2182.

Sagsöz H, Ketani MA. Kök Hücreler. Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakülte Dergisi. 2008; 1 29 – 33.

Santos MR, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". Cell stem Cell. 2007;1(1):35-38.

Schaper F: Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. Biochemical Journal. 2003;374:1-20.

Schumann RR, Zweigner J: A novel acute-phase marker: lipopolysaccharide binding protein (LBP). Clinical Chemistry and Labarotory Medicine. 1999; 37:271-274.

Sell S. On the stem cell origin of cancer. American Journal of Patalogy. 2010;176:2584-2494.

Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. Blood. 1997;89:776-779.

Shyu WC, Lin SZ, Yang HI, Tzeng YS, Pang CY, Yen PS, Li H. Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colonystimulating factor-stimulated stem cells. Circulation. 2004; 110:1847-1854.

Simmons PJ, Torok- Strob B. Identification of stromal cell precusors in human bona marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1 Blood. 1991; 78(1):55-62.

Smith AG. Embriyo-derived stem cells: of mice and men. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 2001;17:435-462.Song IH, Caplan AI, Dennis JE. In vitro dexamethasone pretreatment enhances bone formation of human mesenchymal stem cells in vivo. Journal of Orthopaedic Research. 2009;27:916-921.

Sonoda S, Yamaza H, Ma L, Tanaka Y, Tomoda E, Aijima R, Nonaka K, Kukita T, Shi S, Nishimura F, Yamaza T. Interferon-gamma improves impaired dentinogenic and immunosuppressive functions of irreversible pulpitis-derived human dental pulp stem cells. Scientific Reports. 2016;18;6:19-286.

Strong AL, Gimble JM, Bunnell BA. Analysis of the pro- and anti- inflammatory cytokines secreted by adult stem cells during differentiation. Stem Cells International. 2015.

Suchánek J, Víšek B, Soukup T, El-Din Mohamed SK, Ivančaková R, Mokrý J, Aboul-Ezz EH, Omran A. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth-isolation, long term cultivation and phenotypical analysis, Acta Medica (Hradec Králové) 2010; 53(2): 93–99.

Suchanek J, Visek B, Soukup T, Mohamed SK, Ivancakova R, Mokry J, Aboul-Ezz EHA, Omran A. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth-isolation long term cultivation and phenotypical analysis. Acta Medica. 2010;53(2):93-99.

Takabayashi T, Vannier E, Clark BD. A new biologic role for C 3a and C3a des Arg: Regulation of TNF-α and IL-1 ß synthesis. Journal of Immunology. 1996;156:570 - 83.

Thompson LF, Ruedi JM, Lowand MG, Clement LT. Distribution of ecto-5'nucleotidase on subsets of human T and B lymphocytes as detected by indirect immune fluorescence using go at antibodies. Journal of Immunology. 1987;139:4042-4048.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Jones JM. Embriyonic stem cell lines devired from human blastocysts. Science. 1998; 282:1145-1147.

Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiation Research. 1961;14:213-222.

Todorovic V, Markovic D, Milosevic-Jovcic N, Petakov M, Balint B, Colic M, Milenkovic A, Colak I, Jokanovic V, Nikolic N. Dental pulp stem cells- potential significance in regenerative medicine. Serbian Dental Journal. 2008;55:170-178.

Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. Endocrine Reviews. 2006; 27:208-219.

Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp theraphy. Journal of Dentistry. 2000;28:77.

Ulumer FL, Winkel A, Kohorst P, Stiesch M. Stem cells--prospects in dentistry. Schweiz Monatsschr Zahnmed. 2010; 120(10): 860-83.

Vasalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors : Annual Review of Immunology. 1992;10:411-452.

Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. Trends in Cell Biology. 2010; 20:715-722.

Volponi, AA. and Sharpe, PT. The tooth – a treasure chest of stem cells. British Dental Journal. 2013. 215, 353-358.

Waddington RJ, Youde SJ, Lee CP, Sloan AJ. Isolation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp. Cells Tissues Organs. 2009;184:268-274.

Wang X, Sha XJ, Li GH. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. Archives of Oral Biology. 2012;10:1016.

Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. Advences in Experimental Medicine and Biology. 2003;521:1–21.

Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments and transdifferentiations. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 2001;17:387-403.

Wu AC, Raggatt LJ, Alexander KA, Petit AR. Unrevealing macrophage contributions to bone repair. BoneKEy Reports. 2013;2:273.

Xie WR, Deng H, Li H, et al. Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia. Neuroscience. 2006;142:809–822.

Xu C. et al. Nitric Oxide donor upregulation of stromal cell-derived factor-1/ chemokine (CXC Motif) receptor 4 enhances bone marrow stroma cell migration into ischemic brain after stroke. Stem Cells. 2007; 25:2777-2785.

Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, Wang S, Shi S. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Stem Cell Research and Theraphy. 2010;1:5.

Yang X, Riccardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Pleshko Camacho N, Bostrom MPG. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. 2007; 41:928-936.

Yang XC, Zhang SY, Fan MW, Li X, Liu T, Yao Y. Effects of interleukin-1β on mineralization potential of dental pulp stem cells. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2011; 46(7): 406-411.

Yi JK, Mehrazarin S, Oh JE, Bhalla A, Oo J, Chen W, Lee M, Kim RH, Shin KH, Park NH, Kang MK. J Osteo-/odontogenic differentiation of induced mesenchymal stem cells generated through epithelial-mesenchyme transition of cultured human keratinocytes. Journal of Endodontics. 2014;40(11):1796-801.

Yıldırım S. Süt Dişi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (SHED), Tam Gömük Yirmi Yaş Dişi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (DPSCs) ve Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin (DFSCs) İmmünolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması, M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2015, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Tunç Akkoç).

Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Journal of Bone and Joint Surgery. 1998;80:1755-1757.

Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K, Ebisu S. Interleukin- 6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing re- ceptor activator of NF-kappaB signaling pathways. Journal of Biological Chemistry. 2008;283:11535–40.

Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation and pain. International Anesthesiology Clinics. 2007; 45(2): 27–37.

Zhao Y, Wang L, Jin Y, Shi S. Fas ligand regulates the immunomodulatory properties of dental pulp stem cells. Journal of Dental Research. 2012;10:948-954.

Zimmermann H. 5’-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. Biochemical Journal. 1992; 285(2):345-265.

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Etik Kurulu

PROJENİN ADI: İnflamatuar Medyatörlerin İn Vitro Ortamda Diş Pulpası Kök Hücrelerinin Farklılaşma Potansiyeli Üzerine Etkileri
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Prof.Dr. Hesna Sazak ÖVEÇOĞLU
PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR: Sema SÖNMEZ
ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI: 22.05.2015-1

Sayın Prof.Dr. Hesna Sazak ÖVEÇOĞLU

51 protokol nolu "İnflamatuar Medyatörlerin İn Vitro Ortamda Diş Pulpası Kök Hücrelerinin Farklılaşma Potansiyeli Üzerine Etkileri" isimli projeniz Enstitümüz Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve etik yönden uygunluğuna karar verilmiştir.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Komisyon Başkanı

Prof. Dr. İnci ALİCAN

Prof. Dr. Serap AKYÜZ

Prof. Dr. Hülya AŞÇI

Prof. Dr. Ufuk YURDALAN

Prof. Dr. Dilşad SAVE

Doç. Dr. Nefise BAHÇECİK

Doç. Dr. Tolga GÜVEN

Doç. Dr. Hakkı ARIKAN

Yrd. Doç.Dr. Ümit UĞURLU

Yrd. Doç. Dr. Betül OKUYAN

Marmara Üniversitesi Göztepe Kampüsü Sağlık Bilimleri Enstitüsü 34688 Kadıköy / İSTANBUL
0 (216) 414 44 23/12 (Faks)
0 (216) 414 44 23
Ayrıntılı bilgi için: M.R.ALKAN
saglik.ogrenci@marmara.edu.tr
http://saglik.marmara.edu.tr

HASTA BİLGİLENDİRME FORMU

Katılımınızdan önce size araştırma hakkında bilgi vermek istiyoruz.

Çalışmamız gönüllülük esasında dayanmaktadır. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılım kararınızı veriniz.

Çalışmamıza katılmak zorunlu değildir. İstediğiniz zaman bu çalışmadan çıkabilirsiniz. Çalışmamızda herhangi bir maddi ve manevi risk bulunmamaktadır. Yaptığımız **"İnflamatuar Medyatörlerin *İn Vitro* Ortamda Diş Pulpası Kök Hücrelerinin Farklılaşma Potansiyeli Üzerine Etkileri"** isimli çalışmamızda, çekilmiş dişlerin pulpasından izole edilen kök hücrelerin inflamatuar medyatörler varlığındaki proliferasyon potansiyelleri analiz edilerek rejeneratif tedavideki olası kullanım alanları belirlenecektir. Bu amaçla, endikasyonu uzman hekimler tarafından konulup çekilen dişinizin pulpası bu araştırmada kullanılacaktır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar bilimsel nitelikli yayınlarda ve diş hekimliği öğrencilerinin eğitimlerinde kullanılabilir. Bu amaç dışında kullanılmayacaktır ve başkalarına verilmeyecektir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size herhangi bir ek ödeme yapılmayacaktır.

Çalışma hakkında aklınıza takılan sorularınız olduğunda aşağıda iletişim bilgileri verilen araştırma hekiminizi aramaktan ve sorularınız sormaktan lütfen çekinmeyiniz.

İletişim bilgileri: Dt. Sema Sönmez

Adres: Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Nişantaşı Kampusu, Büyük Çiftlik Sk. No:6 34365 Nişantaşı / Şişli / İSTANBUL

Telefon: 0212 231 91 20 – 551

0537 262 44 27

Fax: 0212 246 52 47

E-mail: dt.semasonmez@yahoo.com

HASTA ONAY FORMU

Araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum (veya bu metin bana okundu). Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu form ile ilgili soru soracak zaman ve fırsatım oldu. Tüm sorularım cevaplandı. Çekilen dişimin **"İnflamatuar Medyatörlerin *İn Vitro* Ortamda Diş Pulpası Kök Hücrelerinin Farklılaşma Potansiyeli Üzerine Etkileri"** isimli araştırmada kullanılacağını biliyorum. Bu koşullarla, söz konusu çalışmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum. Tıbbi tarihçemi de içeren, kendim hakkımda verdiğim her türlü bilginin doğruluğunu da teyit ediyorum.

Gönüllünün:

Adı-Soyadı: İmza:

Adres: Tel:

Tarih:

Gönüllü 18 yaşından küçük ise velisinin:

Adı-Soyadı: İmza:

Görevi: Tel:

Tarih:

Olur alma işlemine başından beri tanıklık eden kuruluş görevlisinin:

Adı-Soyadı: İmza:

Görevi: Tel:

Tarih:

Açıklama yapan araştırmacının:

Adı-Soyadı: İmza:

Tarih:

ÖZGEÇMİŞ

Adı	Sema	**Soyadı**	Sönmez
Doğum Yeri	Şumnu	**Doğum Tarihi**	18.04.1988
Uyruğu	TC	**Tel**	05372624427
E-mail	dt.semasonmez@yahoo.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2011
Lisans	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2011
Lise	Kabataş Erkek Lisesi	2006

İş Deneyimi

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***
İngilizce	Çok İyi	Çok İyi	Çok İyi
Bulgarca	Orta	İyi	Orta
İtalyanca	Başlangıç seviye	Başlangıç seviye	Başlangıç seviye

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	76.250							

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	71,37089	72,45827	66,85232
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office	İyi
IBM SPSS Statistics	Orta