

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DİŞ PULPASI KÖK HÜCRELERİNİN
IN VITRO EPİTELYAL VE FİBROBLASTİK
HÜCRELERE FARKLILAŞMASI**

Belma Melda ABİDİN

Tez Danışmanı : Prof. Dr. S. İsmet Deliloğlu GÜRHAN

İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erdal KARAÖZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.02.07

Sunuş Tarihi : 20.11.2009

Bornova-İZMİR

2009

Sayın **Belma Melda ABİDİN** tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak sunulan “**Diş Pulpası Kök Hücrelerin *in vitro* Epitelyal ve Fibroblastik Hücrelere Farklılaşması**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 20 Kasım 2009 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN
Üye	: Prof. Dr. Erdal KARAÖZ
Üye	: Doç. Dr. Taner DAĞCI
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ
Üye	: Doç. Dr. Gülperi ÖKTEM

ÖZET**DİŞ PULPASI KÖK HÜCRELERİNİN
IN VITRO EPİTELYAL VE FİBROBLASTİK
HÜCRELERE FARKLILAŞMASI**

ABİDİN, Belma Melda

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. İsmet Deliloğlu GÜRHAN
İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erdal KARAÖZ
Kasım 2009, 112 sayfa

Hücrel tedavi ve doku/organ mühendisliği uygulamaları için diş pulpası kaynaklı kök hücreler (DP-KH) önemli bir potansiyele sahiptir. Bu çalışmanın amacı, önceki çalışmalarda nörojenik, adipojenik, miyojenik, odontojenik/osteojenik farklılaşmaları gösterilen iDP-MKH'lerin fibroblastik ve epitelial hücre dizilerine farklılaşma potansiyelinin belirlenmesidir.

Bu araştırmada, lokal anestezi altında çekilen gömük yirmi yaş dişleri (n=5) kullanılmıştır. Açığa çıkarılmış olan pulpa dokusu kollajenaz ile sindirilme işleminden geçirilerek ayrıştırılan hücreler uygun besi ortamında kültüre alınmıştır. Her pasaj sonrası (P1'den P5'e kadar) akış sitometri cihazında ve immunohistokimyasal (İHK) yöntemler ile immunofenotipleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, iDP-MKH'lerin hematopoetik hücre belirteçlerini (CD14, CD34, CD45, CD117, HLA-DR gibi) eksprese etmedikleri, buna karşın MKH belirteçleri CD13, CD44 ve CD90 için yüksek düzeylerde pozitif oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca, iDP-MKH'lerin vimentin, fibronektin, α -düz kas aktin, beta-tubulin, osteokalsin, osteonektin ve embriyonik kök hücre belirteci SSEA-4 eksprese ettikleri gözlenmiştir. Bununla birlikte, iDP-MKH'lerin *in vitro* koşullarda osteojenik ve adipojenik hücre serilerine

farklılaşabildikleri görülmüştür. Osteojenik farklılaşmış hücreler osteokalsin, ostenektin ve BMP4 için kuvvetli pozitif immun reaksiyon göstermiş ve adipositlere farklılaşan iDP-MKH'lerin sitoplazmalarında yağ vakuelleri tespit edilmiştir.

Epitelyal farklılaşması EGF, HGF, KGF ve IGF-2 büyüme faktörleri ile uyarılan iDP-MKH'lerin kübik morfolojik farklılaşma ve epitelyal hücre belirteçleri (sitokeratin 18 ve 19) için kuvvetli immun-reaksiyon gösterdikleri buna karşılık nestin ekspresyonlarının azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, epitel-benzeri hücrelerde vimentin ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Fibroblastik farklılaşması bFGF+TGF β ve EGF+ TGF β ile uyarılan iDP-MKH'lerde, fibronektin, fibroblast yüzey proteini, vimentin ve tenaskin-C için kuvvetli pozitif buna karşılık CD105 ve tip II kollajen için negatif immun-reaksiyon tespit edilmiştir. Nestin ekspresyonlarında ise belirgin bir azalma gözlenmiştir. Epitelyal ve fibroblastik farklılaşma gruplarının tümünde, telomeraz aktivitelerinde gerçekleşen azalma ve üremedeki yavaşlık farklılaşan iDP-MKH'lerin somatik hücre karakteristiğine sahip olduğunu göstermiş ve iDP-MKH'lerin *in vitro* epitelyal ve fibroblastik farklılaşmasını desteklemiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen veriler iDP-MKH'lerin epitelyal ve fibroblastik farklılaşmalarının *in vitro* koşullarda uygun uyaranlarla yönlendirilebileceğini ve bu hücrelerin hücre tabanlı klinik tedaviler ve doku mühendisliği uygulamaları için uygun alternatif bir kaynak olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: İnsan diş pulpası; mezenkimal kök hücre; epitelyal farklılaşma; fibroblastik farklılaşma.

ABSTRACT**IN-VITRO EPITHELIAL AND FIBROBLASTIC
DIFFERENTIATION OF DENTAL PULP STEM CELLS**

ABIDIN, Belma Melda

MSc in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. S. Ismet Deliloglu GURHAN

Co-supervisor: Prof. Dr. Erdal KARAOZ

October 2009, 112 pages

Mesenchymal stem cells derived from human dental pulp have considerable potential for cell therapies and tissue engineering. The aim of the present study is to determine fibroblastic and epithelial differentiation capacities of hDPSCs which have the ability to differentiate into neurogenic, adipogenic, myogenic, odontogenic/osteogenic cell lines according to the previous studies.

In this study, normal human impacted third molars (n=5) extracted under local anesthesia were used. The pulp tissues were digested in collagenase and cells were cultured in appropriate media. For all passages (P1-P5), immunophenotypic assays were performed with immunohistochemical methods (IHC and IF) and flow cytometry. DPSCs expressed mesenchymal cell markers (CD13, CD44 and CD90) in high levels but did not express the hematopoietic cell markers (CD14, CD34, CD45, CD117, HLA-DR). DPSCs also expressed vimentin, fibronectin, α -smooth muscle actin, beta-tubulin, osteocalcin, osteonectin and embryonic stem cell marker SSEA-4. Furthermore, DPSCs were directionally differentiated to osteogenic and adipogenic cell lineages. After induction, osteocalcin, osteonectin and BMP4 were expressed by osteogenic differentiated cells and oil vacuols were detected in the cytoplasm of adipogenic differentiated cells.

To induce epithelial differentiation, DPSCs were cultured using EGF, HGF, KGF and IGF-2 growth factors. Differentiated cells were further characterized

both morphologically and functionally by their capacity to express markers with specificity for epithelial lineage. Epithelial-like cells expressed cytokeratin 18 and 19 but did not express nestin. Also, vimentin expression was in high levels compared with untreated DPSCs. The treatment with bFGF+TGF β and EGF+TGF β on cultured DPSCs to induce fibroblastic differentiation was resulted increase in fibronectin, fibroblast surface protein, vimentin and tenascin-C (Tn-C) contents by 2 and 4 weeks while decreasing nestin expressions. In addition, CD105 and type II collagen negative fibroblast-like cells were detected. Increased telomerase activity and proliferation in both epithelial and fibroblastic differentiation groups showed that differentiated cells have the characteristics of somatic cells and supported fibroblastic and epithelial differentiation of hDPSCs.

In conclusion, DPSCs can be induced to differentiate towards epithelial and fibroblastic lineage and may serve a suitable source for cell-based clinical therapies and tissue engineering.

Key Words: Human dental pulp; human mesenchymal stem cells; epithelial differentiation; fibroblastic differentiation.

TEŞEKKÜR

Öğrenme ve tez projemin hazırlanması sürecinde, değerli bilgi ve yardımlarıyla çalışmalarımın yönlendirilmesi ve yürütülmesinde, bana sabır ve ilgiyle her türlü desteği verdiği ve katkılarını esirgemediği için danışmanım sayın Prof. Dr. İsmet Deliloğlu Gürhan'a; tez çalışmalarım süresince, engin deneyimi ve bilgi birikimi ile yol haritamın oluşmasını sağlayan, fikirleri ve yol göstericiliği ile çalışmamın gelişmesine imkân tanıyan ikinci danışmanım sayın Prof. Dr. Erdal Karaöz'e; uzun süren uğraşlarda daima yanımda olan ve manevi desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Fazilet Vardar Sukan'a sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarımı yürütebilmem için bana gerekli olanakları tanıyan Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM)'ne ve 09MUH011 no'lu proje kapsamında maddi destek sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Fonu'na teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca, hep yanımda olan, desteklerini ve güler yüzlerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarıma, tüm hocalarıma, EBİLTEM ailesine ve deneysel çalışmalarım sırasında desteklerini ve dostluklarını esirgemeyen KÖGEM çalışanlarına sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmamı, ışığıyla hayatımı aydınlatan, hayatımın her alanında beni doğru yönde etkileyen ve manevi desteğini daima kalbimde hissettiğim, sevgili anneme adıyorum.

Siz olmasaydınız eksik kalırdım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİN	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Hücresel Tedavi Uygulamaları ve “Kök Hücre” Kavramı	5
2.2. Somatik (Erişkin) Kök Hücreler	11
2.3. Somatik Kök Hücrelerin Farklılaşması (SKH <i>Plastisitesi</i>).....	13
2.3.1. SKH’lerin Farklılaşmasını Etkileyen Faktörler	16
2.4. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH).....	19
2.4.1. MKH’lerin <i>in vitro</i> Koşullarda Üretilmesi.....	21
2.4.2. MKH’lerin <i>in vitro</i> Farklılaşma Potansiyelleri	24
2.5. Diş Pulpası Kaynaklı Kök Hücreler (DP-KH).....	26
2.6. Epitelyum Dokusu ve MKH’lerin Epitelyal Farklılaşma Potansiyeli	30
2.7. Doku Fibroblastları ve Fibroblastik Farklılaşma	33
2.8. Büyüme Faktörlerinin MKH Farklılaşması ve Doku Tamiri Süreçlerindeki Etkileri	36
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER	41
3.1. Materyaller	41
3.1.1. iDP-MKH’lerin İzolasyonunda Kullanılan Materyaller	41
3.1.2. Alt-Kültür (Pasajlama) İşleminde Kullanılan Ayraçlar	43
3.1.3. Hücre Sayımında Kullanılan Ayraçlar	43
3.1.4. iDP-MKH’lerin Dondurulması İşleminde Kullanılan Kimyasallar	43
3.1.5. Akış Sitometrik Analizlerde Kullanılan Antikor ve Kimyasallar	44

3.1.6.	İmmunohistokimyasal (İHK) ve İmmunofloresan (İF) Çalışmalarında Kullanılan Antikor ve Kimyasallar	44
3.1.7.	Hücre Canlılık ve Çoğalma (Proliferasyon) Testlerinde Kullanılan Kimyasallar	45
3.1.8.	Telomeraz Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Kimyasallar	46
3.1.9.	<i>In vitro</i> Osteojenik ve Adipojenik Farklılaştırma Çalışmalarında Kullanılan Antikor ve Kimyasallar	46
3.1.10.	iDP-MKH'lerin Fibroblastik Farklılaşma Potansiyelinin Belirlenmesinde Kullanılan Büyüme Faktörleri ve Antikorlar	47
3.1.11.	iDP-MKH'lerin Epitelyal Farklılaşma Potansiyelinin Belirlenmesinde Kullanılan Büyüme Faktörleri ve Antikorlar	48
3.1.12.	Tez Çalışmasında Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri	48
3.1.13.	Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar	49
3.2.	Yöntemler.....	51
3.2.1.	iDP-MKH'lerin İzolasyonu.....	51
3.2.2.	Alt-Kültür (Sub-Kültür) İşlemi (Pasajlama).....	52
3.2.3.	iDP-MKH Kültüründe Hücre Sayımı.....	53
3.2.4.	iDP-MKH'lerin Dondurularak Saklanması.....	54
3.2.5.	iDP-MKH'lerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	54
3.2.6.	<i>In vitro</i> Farklılaştırma Çalışmaları	58
3.2.7.	iDP-MKH'lerin Fibroblastik ve Epitelyal Hücrelere Farklılaştırılması.....	59
3.2.8.	Telomeraz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	62
3.2.9.	İnsan Sünet Derisi Dokusundan Fibroblastların İzolasyonu ve Kültür İşlemleri	63
3.2.10.	İstatiksel Analizler.....	64
4.	BULGULAR	65

4.1.	iDP-MKH'lerin Morfolojik Özellikleri	65
4.2.	iDP-MKH'lerin İmmunofenotipik Özellikleri	66
4.3.	iDP-MKH'lerin Canlılık ve Üreme Özellikleri	74
4.4.	iDP-MKH'lerin Osteojenik Farklılaşma Potansiyeli	74
4.5.	iDP-MKH'lerin Adipojenik Farklılaşma Potansiyeli	76
4.6.	iDP-MKH'lerin Epitelyal Hücre Dizilerine Farklılaşma Potansiyeli .	77
4.7.	iDP-MKH'lerin Fibroblastik Hücre Dizilerine Farklılaşma Potansiyeli	81
4.8.	Telomeraz Aktivitelerinin Karşılaştırılması.....	88
5.	TARTIŞMA	89
6.	SONUÇ	95
	KAYNAKLAR DİZİNİ.....	96
	ÖZGEÇMİŞ.....	110

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Hücre kaynağına göre kök hücrelerin sınıflandırılması	8
2.2. Somatik kök hücrelerin indirekt farklılaşması	14
2.3. Reversin-bağımlı geri ve ileri yönde farklılaşma.....	15
2.4. Kök hücre farklılaşmasını açıklayan “hiyerarşik” ve “sürekli” modeller.....	17
2.5. Kök hücre mikroçevresi (niş).....	19
2.6. MKH’lerin kemik iliğinden izolasyonu ve <i>in vitro</i> koşullarda üretimi.....	22
2.7. MKH’ler ve epitelyal öncül hücrelerin proliferasyon ve farklılaşma süreçlerinin karşılaştırılması	31
2.8. Büyüme faktörlerinin kök hücre farklılaşması üzerindeki “seçici” ve “yönlendirici” etkileri	38
4.1. iDP-MKH’lerin morfolojik görünüşleri	65
4.2. iDP-MKH’lerin P3’deki immunofenotipik özelliklerinin akış sitometri sonuçları	67
4.3. Kültüre edilmiş iDP-MKH’lerin (P1) immunohistokimyasal özellikleri.....	68
4.4. iDP-MKH’lerin (P3) immunohistokimyasal özellikleri.....	69
4.5. iDP-MKH’lerin vimentin, fibronektin, miyojenin ve miyo- D immun-boyamaları	70
4.6. iDP-MKH’lerin (P4) immunohistokimyasal özellikleri.....	71
4.7. iDP-MKH’lerin Ki67 immun-boyaması	72
4.8. iDP-MKH’lerin canlılık/üreme oranlarına ilişkin grafik	74
4.9. iDP-MKH’lerin osteojenik farklılaşma kapasitesi	75
4.10. iDP-MKH’lerin adipojenik farklılaşma kapasitesi.....	76

4.11.	Epitelyal farklılaşması uyarılan iDP-MKH'ler ve uyarılmamış iDP-MKH'lerin faz kontrast mikroskobu görüntüleri	77
4.12.	Epitelyal farklılaşması uyarılmış iDP-MKH'lerin sitokeratin 18 ve sitokeratin 19 ekspresyonları.....	79
4.13.	Epitelyal farklılaşma besi ortamında kültüre edilen iDP-MKH'lerin nestin ve vimentin ile İF işaretlenmesi.....	80
4.14.	Fibroblastik farklılaşması uyarılan iDP-MKH'ler, uyarılmamış iDP-MKH'ler ve sünnet derisinden izole edilen fibroblastların morfolojilerinin karşılaştırılması	81
4.15.	Fibroblastik farklılaşması uyarılan iDP-MKH'lerin fibronektin İF görüntüleri	83
4.16.	Fibroblastik hücre dizilerine farklılaşması uyarılan iDP-MKH'lerin fibroblast yüzey proteini (FSP) ekspresyonları.....	84
4.17.	Fibroblastik farklılaşma deney gruplarında tenaskin ekspresyonları	85
4.18.	Fibroblastik farklılaşması uyarılan iDP-MKH'lerin nestin, vimentin, CD44 ve GFAP immun-boyamaları	86
4.19.	Fibroblastik farklılaşması uyarılan iDP-MKH'lerin CD31, CD105 ve tip II kollajen için immun-boyamaları.....	87

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Embriyonik ve erişkin kök hücrelerin özelliklerinin karşılaştırılması.....	10
2.2. Kİ-MKH'lerin immunofenotipik özellikleri	24
2.3. MKH ve Kİ-MKH'lerin hücre yüzey protein ekspresyonlarının karşılaştırılması.....	28
2.4. Fibroblast ve MKH'lerin özelliklerinin karşılaştırılması	35
2.5. Sık kullanılan büyüme faktörlerinin özel işlevleri ve kullanım potansiyelleri.....	37
3.1. Deneysel çalışmanın parametreleri.....	60
3.2. Deneysel çalışmalar için tasarlanan deney grupları.....	61
4.1. iDP-MKH'lerin (P1'den P5'e kadar) akış sitometri cihazında tespit edilen verileri	66
4.2. iDP-MKH'lerin immunohistokimyasal özellikleri	73
4.3. Farklılaşma ve kontrol gruplarının telomeraz aktiviteleri	88

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
BMP	Kemik morfojenik proteini
DMEM	Dulbecco'nun modifiye Eagle esansiyel vasatı
DMSO	Dimetilsülfoksit
DP-KH	Diş pulpası kaynaklı kök hücre
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FACS	Fluoresan- aktive edilmiş hücre ayırma
FBS	Fötal sığır serumu
FSP	Fibroblast yüzey proteini
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
iDP-MKH	İnsan diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücre
GFAP	Gliyal fibriler asidik protein
İF	İmmun-fluoresan
İHK	İmmunohistokimya
KGF	Keratinosit büyüme faktörü
MEM	Minimal esansiyel medyum
MKH	Mezenkimal kök hücre
MTT	Metil tetrazolyum testi
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
SKH	Somatik kök hücre
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü β

1. GİRİŞ

HücreSEL ve moleküler biyoteknoloji alanındaki yeni bilimsel gelişmeler, hücre tedavisi, somatik hücre tedavisi ve doku mühendisliği alanları gibi ileri tedavilerin gelişmesini sağlamaktadır. Günümüzde yenileyici (rejeneratif) tıp; hastalıklar, travma, kanser ve doğumsal bozukluklar sonucu hasar gören doku ve organların işlevselliğinin onarılması ve iyileştirilmesi açısından önemli bir yere sahiptir. Yenileyici tıp, medikal tedavileri destekleyen, hücre kombinasyonları, mühendislik materyalleri ve uygun biyokimyasal faktörlerin kullanımı ile biyolojik fonksiyonların yerine getirilmesi ve tedavi edilmesini amaçlayan uygulamaları kapsamaktadır (Murray and Hargreaves, 2007).

ABD'de Birleşik Organ Paylaşım Ağı'nın (*United Network for Organ Sharing, 2009*) verilerine göre 102.500 ve Türkiye'de 2008 Ulusal Organ ve Doku Nakli Koordinasyon (*Organ Nakli Koordinatörleri Derneği, 2009*) verilerine göre 48 bin organ nakli bekleyen hasta olduğu ve bu sayıya her yıl 4-5 bin hastanın eklendiği bilinmektedir. Kök hücre tedavileri, bu hastalar için oldukça umut vericidir.

Kök hücreler, uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme, kendilerini yenileyebilme, özelleşmiş hücrelere kaynaklık etme (farklılaşma) ve hasar sinyallerini algılama özellikleriyle vücuttaki diğer vücut hücrelerinden farklı, özelleşmemiş hücrelerdir. Bu hücreler, embriyonik gelişimde ve organların oluşmasında (embriyonik ve fetal kök hücreler) ve hasarlı dokuların tamir edilmesinde (doku/organlarda var olan erişkin kök hücreler) önemli rol oynamaktadır (Peterson et al., 1999). *In situ* bu özelliklerinin yanında son yıllarda bu hücrelerin kaynaklandıkları doku ve organların dışındaki hücrelere de farklılaşabilme yeteneklerinin (kök hücre plastisitesi) gösterilmiş olması, bu hücrelerin doku mühendisliği ve yenileyici tıp uygulamalarında önemli biyolojik aktörler olmalarını sağlamıştır.

Kök hücreler, elde edildikleri kaynağa göre; “embriyonel” ve “embriyonel olmayan” kök hücreler olarak sınıflandırılmaktadır (*European Molecular Biology Organization, 2006*). Embriyonik kök hücreler, *in vitro* fertilizasyon çalışmaları

ile elde edilen embriyonlarda (transfer amaçlı kullanılmayan) yapılan çalışmalarda üretilmişlerdir. Bu kök hücreler, yüksek telomeraz aktivitesine sahip, her üç germ yaprağına ait (ektoderm, endoderm ve mezoderm) doku ve organların hücrelerine dönüşebilme yeteneğindedirler (*The National Academy of Sciences*, 2002). Gerçekleştirilen hayvan çalışmalarındaki başarıların yanı sıra insan embriyonlarının kullanımlarında ciddi etik ve dinsel tartışmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte, embriyonik kök hücre (EKH) araştırmalarındaki en önemli sorun bu hücrelerin bir canlıya nakilleri sonrası “teratom” gelişim riskidir. Yenileyici amaçla uygulanan kök hücreler endoderm (barsak epiteli) ve mezoderm (diş, kemik, kıkırdak) kökenli hücre ve dokuları içeren teratomlar oluşturabilmektedirler (Stewart et al, 2006). Şimdiye kadar gerçekleştirilen çalışmalarda bu sorun aşılamamıştır. Embriyonik kök hücre çalışmalarının gerçekleştirilmesi, ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafından da yasaklanmıştır (Hakeri, 2009).

Somatik kök hücreler (erişkin kök hücreler) ise kemik iliği, kordon kanı, periferik kan başta olmak üzere vücuttaki çeşitli doku ve organlardan (kemik iliği, periferik kan, diş pulpası, iç kulak, göbek kordon kanı, nazal mukoza, amniyotik sıvı ve plasenta membranı) izole edilebilmektedir (Gronthos et al., 2000; Jiang et al, 2002; Li et al, 2003; Zhao et al, 2003; Kögler et al, 2004; Murrell et al, 2005). Ancak, somatik kök hücrelerin, EKH'lere oranla çoğalma ve farklılaşma potansiyellerinde kısıtlamalar bulunmaktadır. Bunun yanında, EKH'lerin gelecekte insanlar için tedavide kullanılabilmesinin önünde bulunan etik ve teratom oluşturma riski gibi nedenlerle somatik ya da erişkin kök hücreler önemli alternatif kaynaklardır (Morsczeck et al., 2007).

Mezodermal farklılaşma yollarının belirlenmesine yönelik yapılan kemik iliği çalışmaları, kemik iliği ve çeşitli erişkin dokularında bulunan multipotent, hematopoetik olmayan kök hücrelerin varlığını ortaya koymuştur. “mezenkimal kök hücreler (MKH)” olarak adlandırılan bu hücrelerle gerçekleştirilen canlı dışı (*in-vitro*) çalışmalar, MKH'lerin uygun ortam koşullarında ve uygun uyaranlarla farklı doku ve hücrelere farklılaşabildiğini göstermektedir.

Diş pulpasının perivasküler nişinde (yatağında) yeralan ve “diş pulpası kök hücreleri (DP-KH)” olarak adlandırılan hücre popülasyonunun izolasyonu, ilk olarak 2000 yılında Gronthos ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiş ve aynı ekip

tarafından, bu hücrelerin odontoblastik, adipojenik ve nöral hücre tiplerine farklılaşması gösterilmiştir (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002). Sonraki çalışmalarda, benzer olarak diş pulpası kaynaklı MKH'lerin *in-vitro* koşullarda düz kas (d'Aquino et al., 2007), kıkırdak (Takeyasu et al., 2004) ve sinir hücrelerine (Stevens et al., 2008) farklılaşma potansiyeline sahip oldukları rapor edilmiştir. Bu nedenlerle, son yıllarda kolay elde edilebilir bir kaynak olmaları ve diğer MKH'lerle benzer özellikler göstermeleri nedeniyle yenileyici tıp ve doku/organ mühendisliği amaçlı çalışmalarda alternatif bir kaynak oluşturmuş ve bu konuda yapılan çalışmalar artış göstermiştir.

MKH'lerinin, tanımlandığı ilk günden günümüze dek *in vitro* ve *in vivo* koşullarda mezodermal kaynaklı yağ, kıkırdak, düz kas ve ektodermal kaynaklı sinir hücrelerine farklılaşabildiğini gösteren pek çok araştırma yayımlanmıştır. Son yıllarda ise, kemik iliği-kaynaklı MKH'lerinin *in vivo* (Pereira et al., 1995; Krause et al., 2001; Kotton et al., 2001; Petersen et al., 1999;) ve *in vitro* koşullarda (Brzoska et al., 2005; P'aunescu et al., 2007) epitelyal hücrelere farklılaşma potansiyeline sahip olduklarını gösteren çalışmalar yayımlanmıştır. Bununla birlikte, MKH'lerinin morfolojik açıdan benzerlik gösterdiği fibroblastlara farklılaşma potansiyelleri konusunda daha kısıtlı veriler bulunmaktadır (Pittenger et al., 1999; Moreau et al., 2005). MKH'lerin fibroblastik farklılaşma potansiyelinin belirlenmesi, bu hücrelerin tendon, ligament, peridontal ligament ve kranial sutürlerle ilişkili doku mühendisliği çalışmaları açısından önemli kılmaktadır (Lee et al., 2006).

Şimdiye kadar gerçekleştirilen çalışmalarda Kİ-MKH'lerin epitelyal ve fibroblastik farklılaşma yeteneğini gösteren birçok rapor yayımlanmış olmakla birlikte, yapısal, immunofenotipik, çoğalma ve farklılaşma yetenekleri açısından Kİ-MKH'lerle benzer özellikler taşıyan DP-MKH'lerin epitelyal ve fibroblastik farklılaşma yeteneklerini gösteren bir rapora yapılan kaynak taramasında rastlanmamıştır. Tez kapsamındaki çalışmanın amacı, insan diş pulpası MKH'lerin *in vitro* koşullarda epitelyal ve fibroblastik hücrelere farklılaşma potansiyelinin belirlenmesidir. Bu amaçla, insan yirmi yaş gömük diş pulpalarından elde edilen ve karakterizasyon çalışmaları (yapısal, immunofenotipik, çoğalma potansiyeli gibi) tamamlanan MKH'lerin uygun farklılaşma kültür koşullarında kültüre edilerek epitelyal ve fibroblastik yönde

farklılaşabilme potansiyelleri farklı parametreler (morfoloji, immunofenotip, telomeraz enzim aktivitesi gibi) kullanılarak test edilmiştir. iDP-MKH'lerin farklılaşma potansiyelleri, kontrol olarak kullanılan farklılaşmamış iDP-MKH'ler (negatif kontrol) ve sünnet derisinden izole edilen fibroblastlar ile (pozitif kontrol) karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, morfolojik olarak ve yüzey antijenleri bakımından oldukça benzer özellikler gösterdiği bilinen MKH'ler ve fibroblastların karşılaştırmalı olarak da incelenmesi amaçlanmıştır (Haniffa et al., 2009).

2. GENEL BİLGİLER

Kök hücrelerin farklılaşma yollarının anlaşılabilmesi ve hücrel tedavi uygulamalarındaki önemlerinin kavranabilmesi için, kök hücreleri somatik hücrelere üstün kılan tanımlanma kriterlerin bilinmesi gerekmektedir. Bu bölümde, kök hücrelerin genel özelliklerinin yanında *in vitro* koşullarda çoğaltılabilmeleri için gerekli kültür koşulları ve bu çalışmada iDP-MKH'lerin tercih edilme nedenlerine ilişkin literatür bilgisine yer verilmiştir. Ayrıca, MKH'lerin farklılaşma yeteneklerini düzenleyen sinyaller ve moleküler yollar üzerinde durularak, epitelyal ve fibroblastik dokuların gelişimsel süreçlerine ilişkin literatür bilgisine değinilmiştir. Bu şekilde, gerçekleştirdiğimiz çalışmanın hedeflerinin daha anlaşılır hale gelmesi amaçlanmıştır.

2.1. Hücrel Tedavi ve “Kök Hücre” Kavramı

Hücrel tedavi iki temel teoriye dayanmaktadır. Birinci teoriye göre, “yaşlanmış hücrelerde genetik bilginin depolandığı DNA ve RNA hasarlanmıştır ve bu durum hastalıklar veya yaşlanma olarak karşımıza çıkmaktadır”. Hücre tedavilerinin uygulanması ile genç hücrelerin yaşlı hücrelere doğru genetik mesajı aktarması ve DNA'daki hataların onarımı sağlanmaktadır. İkinci teoride ise “bireylerin yaşlandıkça hücrelerinin de fonksiyonel yeteneklerini kaybettikleri” savunulmaktadır. Bu teoriye göre, hücre tedavi uygulamalarında genç hücreler, yaşlı ve hasarlı hücreleri uyarmakta ve doğru işlevsel özellik kazanmalarını sağlanmaktadır (Barrett, 2003).

Hücrel tedavi düşüncesinin ortaya çıkışı binlerce yıl önceye dayanmaktadır. M.Ö. 1600 yılında yazılan Eber Tıp Papirusları'nda insan canlılığının artırılması amacıyla gerçekleştirilen hayvan organ enjeksiyonları anlatılmakta ve ilk doku transplantasyonlarının yaklaşık 2000 yıl önce gerçekleştirildiği bilinmektedir (Niehans,1960).

1889 yılında, Parisli doktor C.E. Brown-Sequard, genç bir boğanın testislerinden hazırladığı ekstraktı kendine enjekte ederek ilk hücrel tedavi

çalışmasını gerçekleştirmiştir. 1912 yılında, Dr. Alexis Carral'ın *in vitro* koşullarda kalp dokusunu canlı tutmayı başarması ve 1930 yılında, Prof. Paul Niehans'ın ilk modern hücresel çalışmasının ardından, 1950 yıllarında tedavilerde, hücre enjeksiyonlarının uygulanması dünya bilim adamları tarafından kabul edilmiştir (Molnar, 1985; Niehans,1960). Kan ve kemik iliği çalışmalarındaki “modern kök hücre kavramı”, bu hücresel tedavi düşüncesine dayanmaktadır (Ball et al., 2000).

Ülkemizde, insan ömrünü uzatmanın yolunun doğum sonrası atılan plasentalarda ve kordon hücrelerinde olduğunu savunan araştırmacı Ord. Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün, belki de dünyada kök hücre tedavisi çalışmalarını gerçekleştiren ilk araştırmacıdır. Aygün, hayvanlarda fetal ve kordon kanı greftleri ile çeşitli hastalıkların tedavisi konusunda 1950-1960'lı yıllarda araştırmalar yapmış ve hazırladığı insan hücre kültürü preparatlarını insanlara intravenöz/intramüsküler enjeksiyonlarla uygulamıştır. Bu uygulamalarda, enjekte edilen hücrelerin ilgili oldukları organlara ulaştıkları, hızla çoğalarak hastalıklı organın yapısını düzelttikleri ve yerine getirilemeyen işlevleri üstlendikleri rapor edilmiştir (Dinçer, 1982; Şahin vd., 2005).

Sonraki yıllarda, *in vitro* fertilizasyon kliniklerinden alınan artık embriyolar kullanılarak insan embriyonik kök hücrelerinin üretilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. 1998 yılında Thomson ve ekibi ilk insan embriyonik kök hücrelerini *in vitro* koşullarda üretmiş ve aynı yıllarda insan germ hücrelerinden embriyonik germ hücre dizileri elde edilmiştir. Bu ilk çalışmalardan sonra erişkin ve embriyonik kök hücrelerle ilgili çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir (Şahin vd., 2005).

Kök hücreler, canlılarda “kendilerini yenileyebilme”, “sürekli bölünebilme” ve “farklılaşma (*plastisite*)” kabiliyetleri bulunan hücreler olarak tanımlanmaktadır (Kömürcü ve Özkan, 2006). Bu hücreler, uygun sinyallerle karşılaşmadıkları sürece, dokulara özgü işlevsellik kazanmamış (özelleşmemiş) ve farklılaşmamış hücrelerdir. Kök hücreler, yenilenebilme yeteneklerini, organizmanın yaşamı boyunca sürdürebilmektedir (Morst, 2006). Kök hücreler, *in vitro* koşullarda çoğaltılabilmelerinin yanı sıra özel biyolojik sinyallerin etkisiyle, kaynaklandıkları öncül hücrelerden farklı özelleşmiş hücrelere de

farklılaşabilmektedirler (*American Association for the Advancement of Science*,1999).

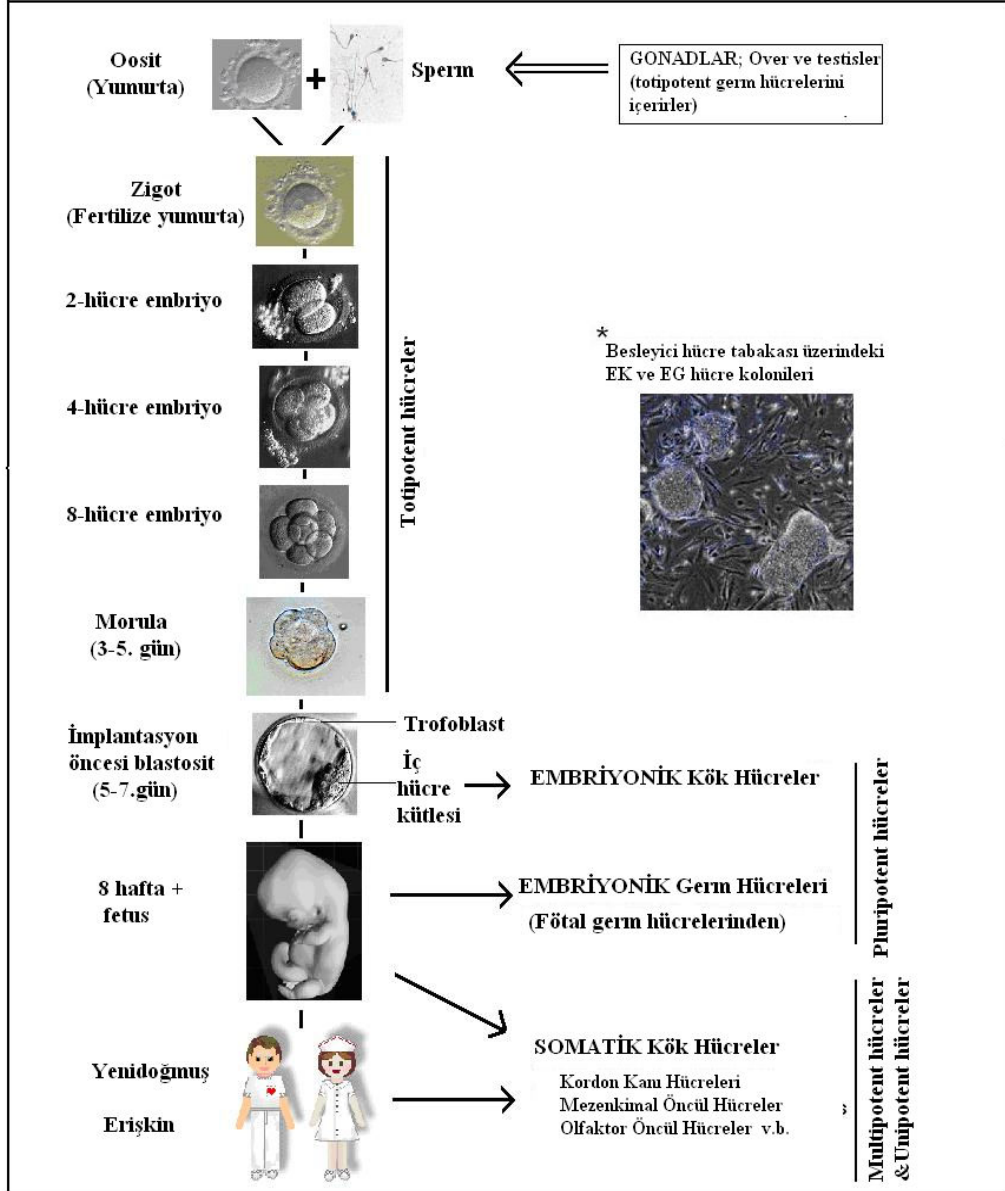
Leipzig’de 2001 yılında toplanan Doku Kök Hücreleri Çalışma Grubu kök hücreleri “bir dokuya ait kök hücre, fonksiyonel olarak farklılaşmamış ve potansiyel olarak heterojen hücrelerdir” şeklinde tanımlamıştır. Bir hücreyi, kök hücre olarak tanımlamak için beş gerekli ölçüt vardır (Bayık, 2004):

1. Kök hücreler, uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahiptirler. Hücrelerin bölünme yeteneklerini (yaşam sürelerini) belirleyen faktörlerden biri, doğrusal kromozomların ucunda yer alan ve “ telomer ” adı verilen DNA zincirleridir. Telomerler doğrusal kromozomların uçlarıdır ve binlerce kez tekrarlanan kısa DNA tekrar dizileri (insanda TTAGGG) içerirler (Hiyama and Hiyama, 2007). Telomerler, kromozom uçlarının parçalanmasını ve dağılmasını ya da diğer kromozomlarla kaynaşmasını engelleyerek, kromozomların yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlamaktadır. Ancak her çoğalmada hücre döngüsü esnasında ve oksidatif DNA hasarlanması nedeniyle kromozom kısalmaktadır. Normal bir hücrenin her bölünüşünde telomer uzunluğu 100 baz çifti kadar kısalmaktadır. Telomeraz enzimi, sayısız tekrar dizilerini kromozomun 3’ ucuna takarak kromozomun kısalmasını engellemektedir. Somatik hücrelerde, birçok bölünmeden sonra telomerde ciddi aşınmalar meydana gelmekte ve hücreler bölünme yeteneklerini yitirmektedir. Bunun yanında, insan germ tümörü ve embriyonik kök hücrelerde belirlenen telomeraz aktivitesinin, bu hücrelerin sınırsız bir şekilde kendilerini yenileyebilme kapasitesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde mezenkimal kök hücrelerde de, telomerleri sabit bir uzunlukta tutmaya yetecek seviyelerde telomeraz üretimi gerçekleşmektedir (Bayık, 2004; Karaöz ve Ovalı, 2004).

2. Kök hücreler, özelleşmemiş hücrelerdir. Bir kök hücrenin temel özelliklerinden biri de, bu hücrenin özelleşmiş işlevleri yerine getirebilecek herhangi bir dokuya özgün yapıya sahip olmayışıdır.

3. Kök hücrelerin özelleşmiş hücrelere kaynaklık etme yetenekleri “plastisite (farklılaşma)” olarak adlandırılmaktadır. Kök hücreler, somatik üç germ yaprağına doğru gösterdikleri farklılaşma yetenekleri açısından “*totipotent*”, “*pluripotent*” ve “*multipotent*” olarak sınıflandırılmaktadır (Morst, 2006) (Şekil

2.1). Totipotent hücreler, zigot evresindeki, 8 hücrelik blastomer evresindeki sınırsız farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir. Totipotent özelliği bilinen tek kök hücre tipi, embriyonun gelişim sürecinde organizmayı oluşturan tüm doku ve hücre çeşitlerine farklılaşma kapasitesine sahip, fertilize yumurta hücresidir (Bongso and Lee, 2005). Bu hücreler, embriyon ve embriyon dışı membran ve organların kaynağını oluşturmaktadır (Blau et al., 2001).



Şekil 2.1. Hücre kaynağına göre kök hücrelerin sınıflandırılması (Morst, 2006).

Pluripotent hücreler, mezodermal (kemik, kas, kan, kıkırdak vb), ektodermal (nöron, deri, saç vb) ve endodermal (hepatositler, pankreatik beta hücreleri, sindirim sistemi hücreleri) hücrelere farklılaşma göstermekte buna karşılık multipotent kök hücreler tek bir germ yaprağına ait hücrelere farklılaşabilmektedir (Karaöz ve Ovalı, 2004). Pluripotent kök hücrelerin (EKH, EC hücreleri ve embriyonik germ hücreleri) vücuttaki farklılaşmış bütün hücre tiplerini oluşturabilme potansiyeline sahip “gerçek kök hücreler” olduğu belirtilmektedir (*American Association for the Advancement of Science*,1999). Erişkin bireylerin dokularında varolan, multipotent kök hücreler ise, kültür koşullarında çok miktarda çoğaltılabilmekte ve organizmada, gerçekleşen doku ve organ hasarlarında, ilgili dokuların hücrelerine farklılaşarak tamirin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Multipotent kök hücreler, EKH’lerle karşılaştırıldığında sınırlı bir farklılaşma yeteneğine sahiptirler (Freshney et al., 2007).

4. Kök hücreler, hasarlı organların tedavisi amacıyla gerçekleştirilen nakillerde, kaynak dokunun işlevsel olarak tekrar çoğaltabilmesine olanak sağlamaktadır.

5. Kök hücreler, *in vivo* koşullarda doku hasarının gerçekleşmediği durumlarda bile farklılaşmış diğer hücrelere katkı sağlamaktadır. (Loeffler and Roeder, 2002).

“Somatik kök hücreler” ve “erişkin kök hücreleri” olarak da tanımlanan “*postnatal kök hücreler*”, farklılaşmış somatik dokularda yerleşmiş farklılaşmamış hücrelerdir. Bu hücrelerin, yeni doğmuş bebek ve çocuklarda da bulunmaları nedeniyle “somatik kök hücre (SKH)” tanımlaması tercih edilmektedir (Prentice, 2006). EKH ve SKH sınıflandırmalarının yapılması, bu iki hücre tipinin farklı plastisite özelliğinden kaynaklanmaktadır (Morst, 2006). Çizelge 2.1’de embriyonik ve erişkin kök hücreleri arasındaki farklılıklar listelenmiştir.

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar, SKH’lerin kendini yenileme özelliği olmadığı düşünülen dokularda (santral sinir sistemi gibi) da bulunduğunu ve bazı dokulardan elde edilen SKH’lerin dokuya özgü germ yaprağının dışındaki hücre tiplerine de farklılaşabildiklerini göstermiştir (Murray and Hargreaves,

2007; Mezey et al, 2000). Bu sonuçlar SKH çalışmalarının artmasına ve araştırmacıların SKH plastisitesi konusunda yoğunlaşmalarına neden olmuştur (Murray and Hargreaves, 2007).

Çizelge 2.1. Embriyonik ve erişkin kök hücrelerin karşılaştırılması (Morst, 2006)

Özellik	Embriyonik Kök Hücreler	Somatik Kök Hücreler
Farklılaşma yeteneği	Pluripotent. Üç germ yaprağına ait tüm hücrelere (potansiyel olarak tüm vücut hücrelerine) farklılaşabilirler.	Değişken etki. Çoğu multipotent özellikte iken bazıları pluripotent farklılaşma göstermektedir.
Etik uygunluk	Etik, kültürel ve dinsel tartışmalar, erken embriyonların izolasyonu ve kişiye özel EKH dizilerinin geliştirilmesi (SCNT teknolojisi) konularında yoğunlaşmaktadır.	Donörlerden bilgilendirilmiş onam alınması gerekmektedir. SKH'lerin ticari ürüne dönüştürülmesi konusu etik açıdan tartışmalıdır.
Kaynak/izolasyon	Elde edilmeleri zordur. Kişiye özel EKH dizilerinin geliştirilmesi de oldukça pahalıdır. Bir hücre EKH hücre hattının geliştirilebilmesi için 5-50 insan oositinin kullanılması gerekmektedir.	İzolasyonları kolaydır ancak elde edilebilen hücre sayısı oldukça azdır. İzolasyonlarında cerrahi işlemler (kemik iliği aspirasyonu, nazal epitelyal biyopsi gibi) gerekebilir.
<i>In vitro</i> koşullarda üretilmeleri	<i>İn vitro</i> kültür koşullarında, kendilerini yenileme yeteneklerini sürdürürler ancak stabilitelelerinin korunması zordur.	<i>İn vitro</i> kültür koşullarında kendileri yenileme ve çoğalmaları yavaş gerçekleşmektedir.
İmmunojenik özellik	Hücreyel tedavilerde, kişiye özel geliştirilmiş EKH hatlarında daha azalmış immunojenik özellik gözlenmektedir.	Otolog kaynaklar, immunojenik olarak reaktif değildir. Bazı SKH'ler daha düşük immunojenik özellik göstermektedir.
Tümör oluşumu	<i>İn-vivo</i> uygulamalarda, teratom oluşturma riski taşırlar.	<i>İn vivo</i> uygulamalarda, tümör oluşturma riskleri daha düşük veya yoktur.
Gen tedavi uygulamalarında kullanım potansiyeli	Genetiği değiştirilmiş hücre dizilerinin elde edilmesi daha kolaydır.	Genetiği değiştirilmiş hücre dizilerinin elde edilmesi daha zordur.
Hücreyel yenileyici tedavi uygulamalarında kullanım potansiyeli	Rapor edilen herhangi bir klinik tedavi veya insan uygulaması bulunmamaktadır.	Lösemi ve lenfoma tedavilerinde, klinik uygulamaları vardır. Kemik iliği nakilleri ve periferik kan veya kordon kanı nakilleri gerçekleştirilmektedir.

2.2. Somatik (Erişkin) Kök Hücreler

Somatik kök hücreler, kendilerini yenileyebilen ve dokuların özelleşmiş fonksiyonlara sahip hücrelerine farklılaşabilen, erişkin doku ve organlardaki farklılaşmamış hücrelerdir (Bongso and Lee, 2005). SKH'lerin, insan vücudunda çok az sayıda oldukları, izolasyonlarının ve kültür ortamında çoğalmalarının zor olduğu ve yeni hücre tiplerine farklılaşabilme kapasitelerinin oldukça sınırlı olduğu sanılmaktaydı. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu hücrelerin yüksek plastisite yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Prentice, 2004).

2001 yılında yapılan bir çalışma, kemik iliği kök hücrelerinin sadece kemik iliği ve kan hücrelerine farklılaşmadığı aynı zamanda karaciğer, akciğer, sindirim kanalı, deri, kalp ve kas gibi dokuların oluşumunda da rol oynadığını göstermiştir (Krause et al, 2001). Yapılan çalışmaların çoğu, kemik iliği (Jiang et al, 2002), periferik kan (Zhao et al, 2003), iç kulak (Li et al, 2003), göbek kordon kanı (Kögler et al, 2004), burun mukozası (Murrell et al, 2005), amniyotik sıvı (Prusa et al, 2003), plasenta membranı (Miki et al, 2005) ve diş pulpası (Koyama et al, 2009; Bowen et al, 2006) gibi bazı dokulardan elde edilen kök hücrelerin çok yönlü farklılaşma özelliklerini ortaya koymaktadır. Bu hücrelerin, çok yönlü farklılaşma yetenekleri korunarak, klinik uygulamalarda kullanılacak sayıda çoğaltılabilmeleri de mümkündür. Deneysel hayvan hastalık modellerinde gerçekleştirilen SKH çalışmaları, bu hücrelerin tedavi etkinliklerini göstermektedir. Örneğin; oluşturulan felç modellerinde SKH'lerin tedavi edici etkileri gösterilmiştir (Shyu et al, 2004). SKH'lerin, omurilik yaralanmalarında nöral gelişimi arttırıcı etki gösterdikleri bilinmektedir (Hofstetter et al, 2002). Bu hücreler, retinal hasarların iyileştirilmesinde etkili rol oynamakta, retina hastalıkları ve yaşlanmaya bağlı sarı nokta hasarlarında tedavi etkinliği göstermektedir (Otani et al, 2004; Tomita et al, 2004). Ayrıca kemik iliği (Oh et al, 2004) ve pankreas (Seaberg et al, 2004) gibi çeşitli dokulardan elde edilen SKH'lerin insülin-üreten hücrelere farklılaşabilmesi, bu hücrelerin şeker hastalığı tedavisinde kullanım potansiyellerini göstermektedir.

Kemik iliği kaynaklı SKH'ler, klinikte kanser hastalarında kemoterapi sonrası hematopoezin ve hematopoetik sistemin yeniden düzenlenmesi amacıyla

kullanılmaktadır. Bağımsızlık sistemi hastalıklarının tedavisinde SKH kullanıma yönelik araştırmalar da devam ettirilmektedir (Feasel et al, 2001). Ayrıca SKH'lerin, kemik hasar tamiri (Lendeckel et al., 2004) ve kalple ilgili hasarlarda (Britten et al., 2003) hücrenel tedavi uygulamalarında kullanılabileceği düşünölmektedir.

Bazı araştırmalar, bu hücrelerin hasarlı dokuya “*homing (yerleşim)*” özelliklerinin bulunduğunu göstermiştir. Yerleşim süreci kan akımının azaldığı veya hasarlanmış dokuya kök hücrelerin göç etmesi ve yerleşimini kapsamaktadır. Bu özellikleriyle kök hücreler, hasarlı hedef hücreye ulaşmaktadır. Özellikle vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve stromal hücre kaynaklı faktör-1 (Stro-1) oksijensiz kalan dokuda arttığı ve bu faktörlerin yerleşim sürecinde kök hücreler için gerekli sinyalleri sağladığı düşünölmektedir. Ancak, bu süreç tam olarak anlaşılammıştır (Ozcan vd., 2007; Henschler et al, 2008).

SKH'ler, kemik iliği (Jiang et al, 2002; Herzog et al, 2003), santral sinir sistemi (Johe et al., 1996), koku (olfaktör) epitelyumu (Barnett and Chang, 2004), diş pulpası (Gronthos et al., 2000), deri epidermisi (Niemann and Watt, 2002), sindirim kanalı (Potten, 1998), kan damarları (Asahara et al., 1997), iskelet kası (Zammit and Beauchamp, 2001), kornea (Chen et al., 2004), retina (Tropepe et al., 2000), pankreas (Bonner-Weir et al., 2000), karaciğer (Lemire et al., 1991), kalp (Laugwitz et al., 2005), yağ dokusu (Zuk et al, 2001) ve akciğerler (Wu and Wei, 2004) gibi çeşitli insan ve hayvan dokularından izole edilebilmektedir. Bazı dokularda ise SKH'lerin varlığına ilişkin bilimsel tartışmalar sürdürölmektedir.

SKH'lerin tanımlanması için cevaplanması gereken anahtar sorular; (1) bu hücrelerin kimlikleri, (2) elde edilebildikleri kaynak dokular, (3) diğer hücre ve doku tiplerine farklılaşabilme yetenekleri, (4) farklılaşmada ve diğer dokular/organlar üzerindeki etkilerinde rol oynayan mekanizmalardır. Bu önemli soruların cevaplanması ve dokularda bulunan SKH'lerin belirlenmesi ile geleneksel gelişim teorisini değiştirecek sonuçlar elde edilecektir (Loeffler and Roeder, 2002).

2.3. Somatik Kök Hücrelerin Farklılaşması (SKH *Plastisitesi*)

Üç germ yaprağının her birine ait dokularda bulunan ve yaşamları süresince buldukları germ tabakasının özelleşmesine geri-dönüşümsüz olarak yön veren SKH'lerin varlığı uzun süre bir dogma olarak kalmıştır (Wagers and Weissman, 2004). Daha sonra yapılan çalışmalar, erişkinlerde doku ve hücre yenilenmesinin, doku özelleşmesinin temelini oluşturduğunu göstermiştir. Bu çalışmalar, dokularda bulunan kök hücrelerin, kaynaklarına uygun olgun hücre tiplerini oluşturduğu ve farklı hücre tiplerini oluşturmak için diğer doku ve germ tabakalarına ilerlemedikleri teorisine dayanmaktaydı (Zammit and Beauchamp, 2001). Ancak son bilimsel yayınlar, SKH'ler ve progenitör (öncül) hücrelerin bazı durumlarda bilinenin aksine daha gelişmiş bir plastisite gösterdiğini ortaya koymuştur (Mezey et al., 2003).

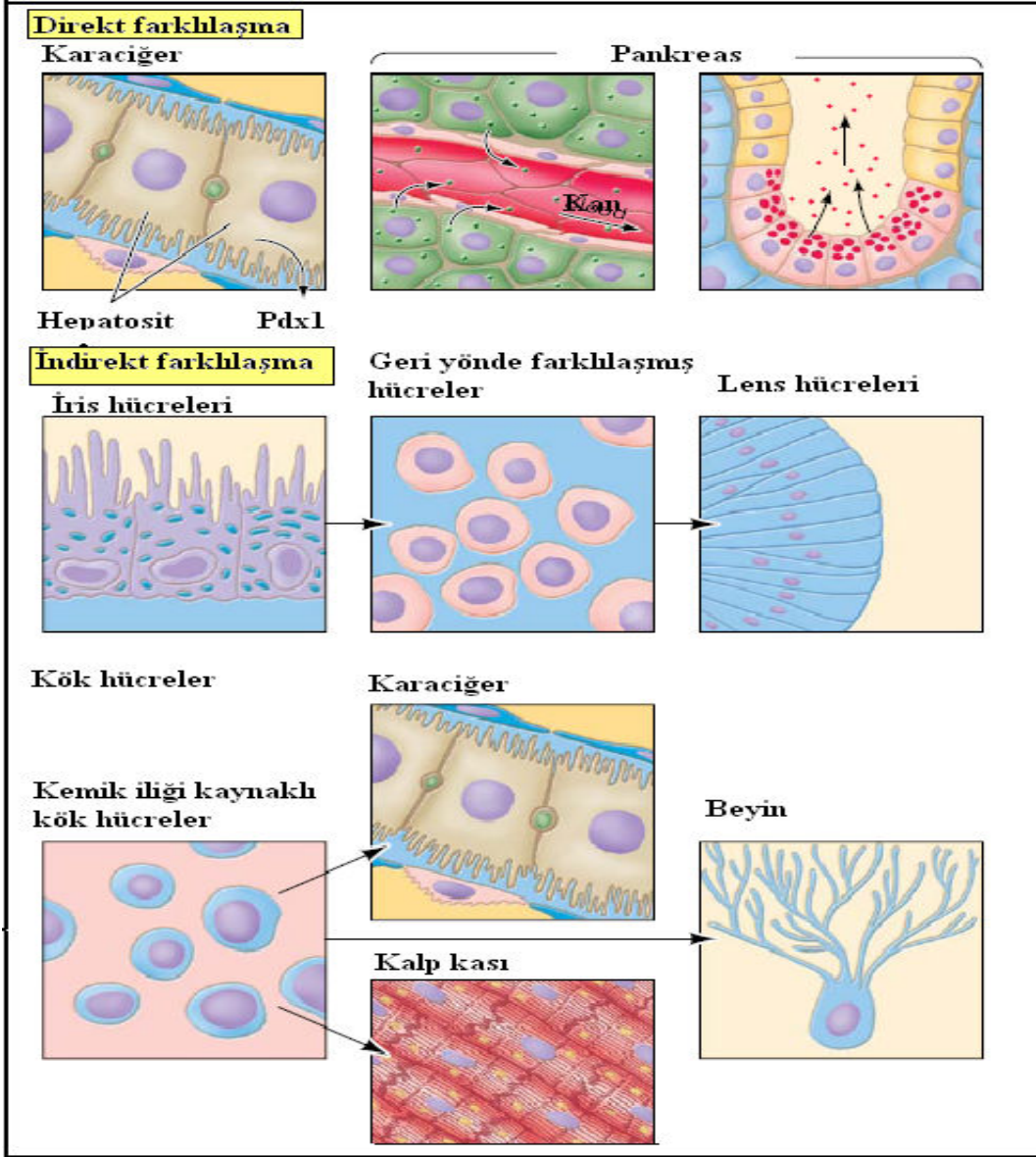
Kök hücrelerin fonksiyonel olarak düzenlenmesi altı aşamada gerçekleşmektedir; aktivasyon, kendini yenileme, proliferasyon, göç etme (migrasyon), farklılaşma ve sağkalım (veya ölüm) (Muschler et al., 2003).

SKH plastisitesi, mikroçevreyle ilişkili sinyallerle gelişmektedir. Bu durum, bu hücre soylarının kesin kurallar içinde tanımlanamayacağını ortaya koymaktadır (Blau et al., 2001). Örneğin; Kİ-KH'leri, hematopoetik doku hücreleri dışında, deri (*National Research Council*, 2001), karaciğer (Lagasse et al., 2000), santral sinir sistemi (Eglitis and Mezey, 1997), kalp ve dolaşım sistemi (Orlic et al., 2001), kas (Gussoni et al., 1999) ve pankreas (Soria et al., 2000) gibi hematopoetik olmayan doku hücrelerine de farklılaşabilmektedir.

Bu sonuçlar, gelişmekte olan bu disiplinde çeşitli tartışmalara da neden olmaktadır. Bazı araştırmacılar, bu plastisitenin artefakt ve gerçekleştirilen hatalı karakterizasyon uygulamaları sonucu ortaya çıktığını öne sürmektedir (Shamblott et al., 1998; Wagers et al., 2002). Bazı araştırmacılar ise, doku yenilenmesinin denge durumunda, bu plastisitenin SKH'lerin normal fonksiyonu olmadığını fakat bazı seçici durum ve yaralanmalarda, bu özelliğinin atipik bir fonksiyon olarak gözlemlendiğini belirtmektedir (Wagers et al., 2002).

Bir kök hücrenin dizi değiştirmesi veya farklılaşması için başlıca dört alternatif yol bulunmaktadır: indirekt (doğrudan olmayan) farklılaşma (*trans-*

diferansiyasyon) geri yönde farklılaşma (*de-diferansiyasyon*) ve ileri yönde farklılaşma (*re-diferansiyasyon*) ve hücre füzyonu.

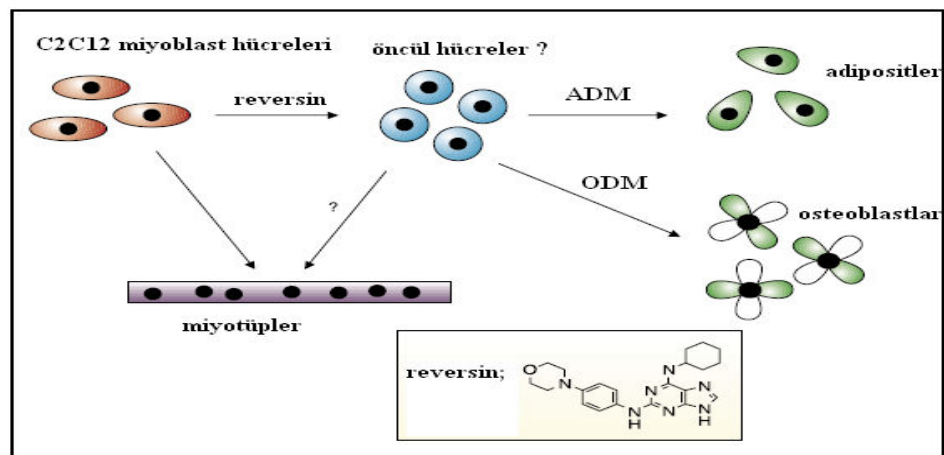


Şekil 2.2. Somatik kök hücrelerin indirekt farklılaşması (*trans-diferansiyasyon*). Şekilde üç farklı hücre tipinin indirekt farklılaşması gösterilmiştir. Direkt farklılaşma, tam olarak farklılaşmış bir hücrenin, geri yönde bir farklılaşma (*de-diferansiyasyon*) basamağı olmadan farklı bir olgun hücreye dönüşmesidir. İndirekt farklılaşma modeli birinci ile benzerdir; bu farklılaşma olayının gerçekleşmesi için geri yönde bir farklılaşma basamağı gereklidir. Kök hücrelerin indirekt olarak farklılaşması, farklılaşmış birincil hücrelerin olgun hücreleri oluşturma konusundaki kararlılığını göstermektedir (Leri et al., 2005).

Doğrudan olmayan farklılaşma, “bir farklılaşmış hücrenin diğer özelleşmiş hücrelere farklılaşması” şeklinde açıklanabilir (Slack and Tosh, 2001). Bu farklılaşma yolunun en belirgin örneği, pigment birikimi görülen iris hücrelerinin lens hücrelerine farklılaşmasıdır (Kodama and Eguchi, 1994). Bu farklılaşma

yolağı, kök hücre kaderinin belirlenmesinde, yeniden farklılaşmayı sağlayarak önemli rol oynamaktadır (Şekil 2.2). Geri yöndeki farklılaşma olayında ise kök hücreler, gelişimsel sınırlamalarından bağımsız olarak oluşan önceki fenotiplerine dönüşebilmektedir (Karaöz ve Ovalı, 2004) Bu konudaki teorilerden biri EKH'lerin SKH'lere seçici olarak farklılaşabildiği, SKH'lerin diğer hücre tiplerine farklılaştığı ve bunu takip eden SKH'lerin geri-yöndeki farklılaşmasına dayanmaktadır. Bunun nedeninin, farklılaşmanın tek yönlü ve geri dönüşümsüz gerçekleştiği ve bunu değiştirebilecek tek durumun geriye yönelik farklılaşma olduğu düşünülmektedir (Fisher, 1990).

Chen ve ekibinin gerçekleştirdiği çalışmada, küçük bir molekül olan reversin ile elde edilen sonuçlar oldukça ilgi çekicidir (Şekil 2.3). Bu çalışmada, reversin miyoblast C2C12 hücrelerine eklenmiş ve bu hücrelerin çok çekirdekli miyotüplere farklılaştığı gözlenmiştir. Reversinle muamele edilen hücreler multipotent hücrelere dönüşerek osteoblast ve adipositlere farklılaşmışlardır. Bu bulgular, küçük bir molekül muamelesinin bir hücre tipinden diğerine dönüşümü sağlayabileceğini göstermektedir (Kim et al, 2004). Araştırmacılar, geri-yöndeki kas farklılaşmasını uyararak multipotent öncül hücrelere farklılaşmayı sağlayan reversinin bu konudaki ilk basamak olduğunu düşünmektedir. Geri-yöndeki farklılaşma, kök hücre farklılaşması konusundaki en uygun cevaptır ve diğer açıklamalar bu teoriye dayandırılabilir. (Hikita et al., 2000)



Şekil 2.3. Reversin-bağımlı geri ve ileri yönde farklılaşma (Kim et al., 2004).

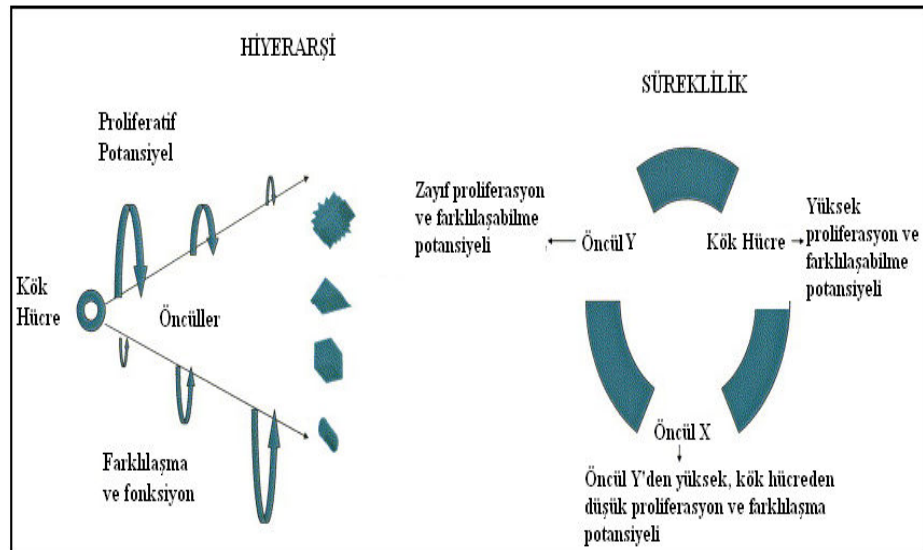
Kök hücrelerin farklılaşma yollarının anlaşılması amacıyla hücre füzyonu konusunda da çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmaları başlatan iki bilimsel yayında, nöral öncül hücreler ve EKH'ler, Kİ-KH'leri ve EKH'lerle gerçekleştirilen *in vitro* ko-kültürlerde füzyon hızının düşük sıklıkta olduğu belirtilmektedir (Terado et al, 2002; Ying et al, 2002). Bunu takip eden çalışmalarda, iskelet kası lifleri (Abedi et al, 2004), hepatosit ve kardiyomyosit (Alvarez-Dolado et al, 2003) farklılaşmasını da kapsayan *in vivo* modeller SKH farklılaşmasında füzyonun düşük sıklıkta gerçekleştiğini göstermiştir. Ayrıca, akciğer, deri, pankreatik hücreler ve nöronların farklılaşmasına dayanan diğer modellerde füzyon gelişimi görülmemiştir (Ianus et al, 2003; Newsome et al, 2003). Bu konudaki genel düşünce, hücre füzyonunun SKH farklılaşmasında yardımcı ve önemli bir faktör olduğu ancak füzyon gerçekleşmeden de farklılaşmanın sürdürülebildiğidir (Lakshmipathy and Verfaillie, 2005).

2.3.1. SKH'lerin Farklılaşmasını Etkileyen Faktörler

SKH'ler, kısa-yaşam sürecine sahip fakat yüksek oranda farklılaşmış sürekli bir hücre kaynağı sağlamak ve doku homeostazının sağlanması açısından kilit rol oynamaktadır (Smith, 2006). Kök hücrelerin kendilerini yenileme veya farklılaşması için verilen kritik kararın organizmada sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gereklidir. SKH farklılaşmasının anlaşılabilmesi için bu hücrelerin bölünme ve oğul hücreleri oluşturma yeteneklerinin bilinmesi gereklidir. Çok fazla sayıda oğul hücrenin farklılaşması durumunda, kök hücre popülasyonu tükenecektir (Lemischka, 2002). Alternatif olarak kendini yenileme yeteneğinin kontrol edilmemesi durumunda, kök hücre sayısı artacak ve tam olarak farklılaşmamış hücreler, ikincil mutasyonlara maruz kalarak tümör benzeri oluşumlar gözlenecektir. *In vitro* koşullarda, SKH'lerin, yenilenme ve farklılaşma seçimlerini etkileyen etkenlerin belirlenmesi, bu hücrelerin doku tamiri ve gen tedavilerini kapsayan klinik potansiyelleri açısından en kritik basamaktır (Lanza, 2006).

Farklılaşma sürecinde, SKH'ler çoğalma yeteneklerini kaybederek, farklılaştıkları hücrelerin karakteristik özelliklerine sahip olmaktadır. SKH farklılaşmasını açıklayan iki ana model bulunmaktadır; “*hiyerarşik model*” (Lemischka, 1997) ve “*sürekli model*” (Quesenberry et al., 2002).

Hiyerarşik modele göre; kök hücreler farklılaşmış hücreleri oluştururken, kök hücrelerden “*progenitör*” hücelere ve son olarak “*prekürsör*” hücelere doğru tek yönlü bir geçiş gerçekleştirmektedir (Şekil 2.4). En ilkel kök hücre en yüksek çoğalma ve en düşük farklılaşma yeteneğine sahip iken; *prekürsör*ler düşük çoğalma potansiyeline sahiptirler ve kolaylıkla farklılaşabilirler. Kök hücreden *prekürsör* hücreye doğru gerçekleşen geçişin her aşamasında farklılaşma kapasitesi artarken çoğalma potansiyeli azalmaktadır (Lawrence and Diegelmann, 1994). Bu modelde, en ilkel kök hücre, çevresel faktörlerin (büyüme faktörleri, sitokinler, adezyon molekülleri ve hücre-hücre etkileşimleri gibi) etkisiyle hücre siklusunun G1 fazına girene kadar G0 fazında durgun bulunmaktadır. Kök hücreler proliferasyon için ilk uyarıyı aldıklarında, *progenitör* ve *prekürsör* geçiş aşamalarına ilerleyebilmekte ve yeni bir uyarı alana kadar durgun konumlarına geri dönebilmektedir. Ancak, *progenitör* ve *prekürsör* hücrelerin tekrar kök hücre konumuna dönmesi mümkün değildir (Lemischka, 1997).



Şekil 2.4. Kök hücre farklılaşmasını açıklayan hiyerarşik ve sürekli modeller (Quesenberry et al., 2005).

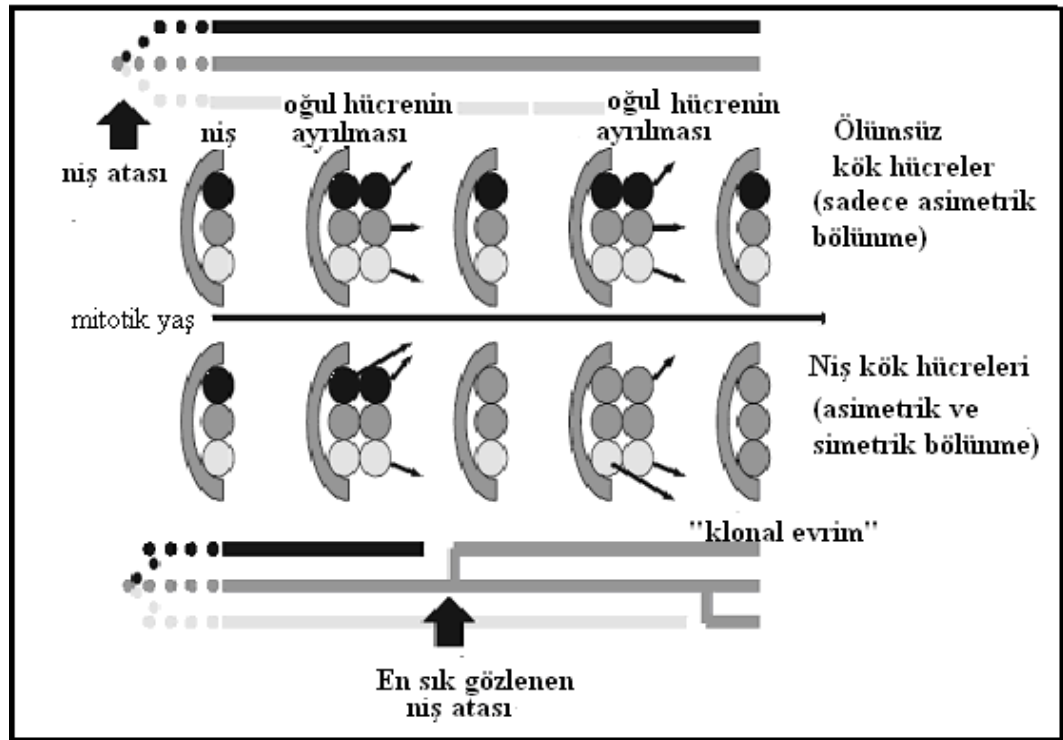
Hiyerarşik modelin aksine, sürekli model; kök hücrelerin sürekli olduğu ve tersinir şekilde konumlarını değiştirdikleri teorisine dayanmaktadır (Şekil 2.8). Bu modelde, kök hücrelerin bir konumdan diğer konuma kayabildiği ve tekrar eski konumuna dönebildiği değişken bir süreklilik görülmektedir. Konumdaki bu kaymanın nedeninin, kök hücrelerin çevresel uyarılara verdikleri yanıt olarak tanımlanan, hücre siklusuna bağlı olarak gerçekleşen kromatinin yeniden modellenmesi olduğuna inanılmaktadır. Hiyerarşik modelde olduğu gibi, bu modelde de durgun somatik kök hücreler G1 fazına girmeleri için bir uyarana ihtiyaç duymaktadırlar. Ancak, daha sonra farklılaşma yollarından ilerleyebilmekte ve tekrar G0 fazına ve durgun konuma dönebilmektedirler. Progenitör aşamaya doğru ilerleyen hücreler tekrar kök hücre konumuna dönebildiği için bir kök hücrenin mikroçevresel uyarılara bağlı olarak farklı serilerin hücrelerini oluşturabilmesi mümkün olmaktadır (Quesenberry et al., 2002).

Kök Hücre Mikroçevresi (Niş)

Kök hücrelerin, farklılaşma yetenekleri iç ortam genetik yolları ve dış ortam sinyallerinin etkisinde düzenlenmektedir. SKH'ler, kendilerine destek sağlayan ve bu düzenleyici sinyallerin iletilmesine olanak sağlayan bir çevreye ihtiyaç duyarlar. "Kök hücre nişi" olarak adlandırılan bu mikroçevre, hücrelerin düzenlenmesi ve işlevlerinin kontrol edilebilmesi için gerekli hücresel ve moleküler faktörleri içermektedir. Bazı dokularda (deri gibi) bu mikroçevre hem kök hücreleri hem de bu hücrelerin öncüllerini düzenleyici etki göstermektedir (Zhang and Li, 2008).

Kök hücre nişleri, kök hücrelere destek sağlamakta, yaşamları için uygun ortamı oluşturmakta, proliferasyonlarını düzenlemekte ve farklılaşmalarına yön vermektedir. Bu konuda gerçekleştirilen çalışmalar oldukça önemli bilgiler vermektedir. Örneğin; her niş sistemi, fiziksel etkileşimi sağlayan ve kök hücrenin asimetric veya simetric olarak bölünmesine neden olan *Notch* gibi özel moleküllerden yararlanmaktadır. Bir nişte çok yönlü kök hücreler bulunabilmektedir (Şekil 2.5). Kök hücrelerin çoğu, nişte kalacak bir oğul hücre

ve farklılaşmak için nişten ayrılacak bir oğul hücreyi oluşturmak için asimetrik olarak bölünmektedir. Bununla birlikte, simetrik bölünme de gerçekleşmektedir. Kök hücrelerin simetrik olarak bölünmesi tüm kök hücre hatlarının oluşumunu sağlayabilmekte ve kök hücre sayısı değişmeden sabit kalmaktadır. Bunun nedeni, herhangi bir eksilmenin artışla dengelenmesidir (Shibata and Tavaré, 2007). Kök hücreler, doku hasarı geliştiğinde mikroçevrelerinden ayrılarak hasarın geliştiği bölgeye göç etmektedir. Bu nedenle mikroçevredeki kök hücre sayısının dengelenmesi oldukça önemlidir.



Şekil 2.5. Kök hücre mikroçevresi (nişi). Bir kök hücre nişi çok yönlü kök hücreleri içermektedir. Kök hücreler asimetrik olarak bölündükleri sürece ölümsüz özelliktedirler ve bu hücreler asla varlıklarını yitirmezler. Buna zıt olarak, simetrik olarak bölünmeye başladıklarında, nişteki kök hücre sayısının sabit tutulması gerektiğinden yokolacaklardır. Çeşitlilik, ölümsüz kök hücre hatlarının yaşına bağlı olarak sürekli artış göstermektedir. (Shibata and Tavaré, 2007).

2.4. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezodermal farklılaşma yollarının belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen kemik iliği çalışmaları, kemik iliği ve çeşitli erişkin dokularında bulunan multipotent, hematopoetik olmayan kök hücrelerin varlığını ortaya koymuştur. Bu

hücreler “mezenkimal kök hücreler (MKH)” veya yeni isimlendirme ile “mezenkimal stromal kök hücreler” adını almaktadır (Bensinger et al., 2009).

MKH’ler, kemik iliği hücrelerinin CD45 negatif fraksiyonunda yeralan, uzantılı fibroblast benzeri hücreler olup, üzerinde en çok çalışılan hücre türlerinden birini oluşturmaktadır. MKH’ler hematopoetik kök hücrelerin stromaya tutunmasını sağlamakta, kök hücre rezervi oluşturmakta, ve doku hasarı oluştuğunda diğer dokulara göç edebilmektedir Kİ-MKH’ler, hematopoetik kök hücre farklılaşması için gerekli mikroçevreyi sağlamalarının yanı sıra, kemik, kıkırdak ve yağ dokusunu oluşturabilme potansiyeline de sahiptir (Pittenger and Marshak, 2001).

Kİ-MKH’ler, hematopoetik ve hematopoetik olmayan büyüme faktörleri, interlökinler ve kemokinler salgılamaktadır. Bu sitokinlerin bazıları devamlı, bazıları ise aktivasyon sonucu salgılanmaktadır. Buna ek olarak MKH’ler birçok sitokin ve büyüme faktörünün reseptörlerine de sahiptir. Bu hücrelerin kemik iliği mikroçevresine katılımları, proteoglikanlar, kollajen, laminin ve fibronektin gibi matriks molekülleri ile gösterilmektedir (Pittenger and Marshak, 2001). MKH’ler hücrelerarası etkileşimde önemli rolleri bulunan yapışma moleküllerini de eksprese etmektedir. Osteopontin ve hiyalüronan gibi çeşitli ligandların reseptörü olan CD44’ün MKH’lerde yüksek orandaki ekspresyonu, bu hücrelerin kemik iliği ve kemikte hücre dışı matriks organizasyonundaki rolünü göstermektedir (Bianco and Cossu, 1999).

MKH’ler, kemik iliği dışında, diğer erişkin dokulardan da izole edilebilmektedir. Literatürde, bu kök hücrelerin yağ dokusu, kemik, kıkırdak, diş pulpası, perikondrium (kıkırdak bağ dokusu), iskelet kası, kordon kanı, kordon bağ dokusu, dalak, eklem sıvısı zarı ve tendonlardan da izole edildiği görülmektedir. MKH’lerin, sağlıklı bir deney hayvanına ven içi uygulamalarında, kemik iliğine yerleştikleri gözlenmiştir. Ancak, vücutta iltihaplanma (*enflamasyon*) veya doku hasarı geliştiğinde, bu hücreler hasarın olduğu bölgeye göç etmektedir. İltihaplanma bölgesinde artmış kemokinler ve MKH’lerin yüzeyinde bulunan kemokin reseptörleri sayesinde bu hücreler, iltihap, hasar ve tümör bölgelerine göç edebilmektedir (Pittenger and Marshak, 2001).

MKH'ler, immun-düzenleyici özelliğe sahiptirler. Bu kök hücreler, T lenfosit, B lenfosit ve doğal öldürücü hücrelerin fonksiyonlarını baskılamakta ve dendritik hücre farklılaşmasını inhibe edebilmektedir. Bu nedenle MKH'ler, bağışıklık sistemindeki bozuklukların görüldüğü graft-alıcı reddi hastalığı (GVHD) ve Crohn hastalığı gibi hastalıkların tedavisine yönelik klinik uygulamalarda, kullanım potansiyeline sahiptirler. (Chen et al., 2008). MKH'ler, orta seviyede MHC-I taşımalarına rağmen, HLA-II ve yardımcı uyarıcı (ko-stimulatör) molekülleri taşımamaktadır. İmmünolojik olarak bağımsız hücreler olmaları nedeniyle, bağışıklık sisteminin baskılanmasına gerek olmadan nakillerinin gerçekleştirilebilmesi mümkündür. Bu durum, MKH'lerin sağlıklı gönüllülerden alınarak HLA-uygun ve HLA-uygun olmayan durumlarda bile akut ve kronik hastaların tedavisinde kullanılabilirlerini göstermektedir (Devine et al., 2003).

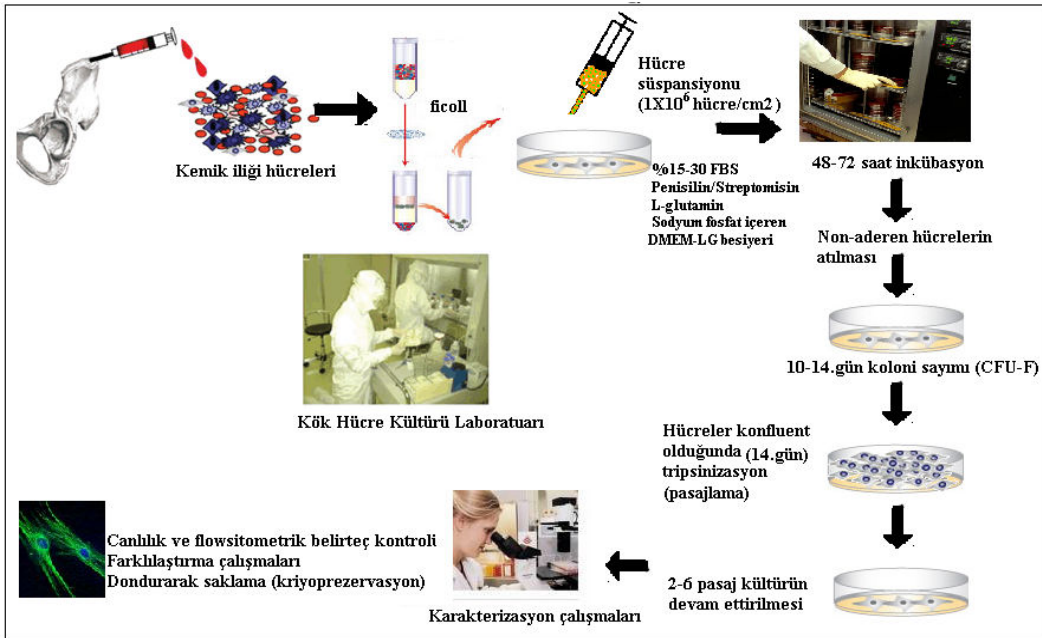
2.4.1. MKH'lerin *in vitro* Özellikleri

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT) tarafından MKH'lerin *in vitro* kültür koşullarında tanımlanmasına yönelik üç ölçüt belirlenmiştir;

1. Uygun kültür koşullarında, plastik yüzeye yapışmaları gerekmektedir.
2. Akış sitometri cihazı ile gerçekleştirilen analizlerde, hücrelerin %95'ten fazlasının, CD73 (ekto5'nükleotidaz), CD90 (Thy-1) ve CD105 (endoglin) taşıması gerekmektedir. Bunun yanı sıra; hücrelerin %98'sinden fazlası, CD45 (pan-lökosit belirteci), CD34 (primitif hematopoetik progenitör ve endotel hücre belirteci), CD11b veya CD14 (monosit belirteçleri), CD19 veya CD79a (B hücre belirteçleri) ve HLA Sınıf II antijenlerini taşımaları gerekmektedir.
3. MKH'ler, uygun farklılaştırma besiyortamına alındıklarında osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma göstermelidir (Spitkovsky and Hescheler, 2008).

Şekil 2.6'de kemik iliğinden MKH izolasyonu ve izole edilen MKH'lerin *in vitro* üretim basamakları gösterilmiştir. Diğer dokulardan (yağ dokusu, diş pulpası

gibi) elde edilen MKH'ler de Kİ-MKH'lere benzer *in vitro* koşullarda üretilmektedir. MKH'ler *in vitro* koşullarda çoğalabilmek için fetal sığır serumuna (FBS) ihtiyaç duymaktadır. Ancak, FBS viral ve prion aktarabilme riski taşımakta ve alıcıda immun reaksiyon gelişimine neden olmaktadır. Bu şartlarda üretilen MKH'lerin *in vivo* insan çalışmalarında ve tedavilerinde kullanılması uygun değildir. MKH'ler, FBS yerine insan serumu kullanılarak üretildiğinde daha düşük bir proliferasyon göstermektedir. MKH üretiminde, trombin ile aktive edilmiş, trombositten zengin insan plazmasının kullanımı ile FBS kullanımı karşılaştırıldığında 3 kat yüksek bir proliferasyon hızı gözlenmiştir. İnsan kordon kanı serumunun kullanımı da diğer bir alternatiftir (Kocaoemer et al., 2007).



Şekil 2.6. MKH'lerin kemik iliğinden izolasyonu ve *in vitro* koşullarda üretilmesi.

MKH kültür ortamında yüksek konsantrasyonda glukoz bulunması, bu hücrelerin erken yaşlanmasına neden olmaktadır. Glukoz oranının düşük konsantrasyonda bulundurulması ile proliferasyonun artırılması ve apoptozun (programlı hücre ölümü) azaltılması mümkün olmaktadır. MKH'lerin, fonksiyonel, fenotipik ve hücresel özelliklerinde bir değişiklik olmadan, uzun süreli olarak dondurularak saklanması ve gerektiğinde çözülerek kullanılabilmesi mümkündür (Stolzing et al., 2006).

MKH'lerin *in vitro* farklılaşma çalışmalarında bazı kısıtlamalar bulunmaktadır. Biyokimyasal karakterizasyon analizlerinin, *in vivo* uygulamalara dönüştürülebilmesi zordur. *In vitro* koşullarda, *in vivo* şartlarda MKH farklılaşmasını kontrol eden sinyal yolları oluşturulamamaktadır. Bu gözlem, *in vitro* ortamda tek bir sitokin MKH farklılaşması üzerindeki rolü incelenerek gerçekleştirilebilmektedir. Örneğin, literatürde BMP'lerin adipogenez ve osteogenez üzerindeki etkisi farklılıklar göstermektedir (Sell, 2003). Bu kısıtlamalara rağmen, MKH farklılaştırma çalışmaları hücre biyolojisi konusundaki bilgilerimizi arttırmaktadır. SKH ve MKH *plastisitesi*, kök hücre çalışmaları açısından en önemli yeri tutmaktadır. Bu hücrelerin, biyokimyasal ajanlar ve genetik yöntemlerle yeniden programlanabilmesi de mümkündür. Böylece, hayvan modellerinde gerçekleştirilen klinik öncesi çalışmaların cevaplayamadığı sorular, insan kök hücre biyolojisi çalışmalarıyla yanıtlanabilecektir (Wynn et al., 2004).

MKH'ler için pozitif ve negatif belirteçler saptanmış olmasına rağmen, bu hücreler için tek bir yüzey antijeni tanımlanamamaktadır. Pozitifliği belirlenen biyobelirteçler; CD90, CD73 ve CD105'tir. Hematopoetik hücre hatlarıyla ilişkili görülen ve MKH'ler için negatif olan biyobelirteçler ise; CD11b/14, CD19/ 79 α , CD45 ve HLA-DR olarak belirlenmiştir. Çizelge 2.3'de, Kİ-MKH'lerin eksprese ettiği spesifik antijenler, sitokin reseptörleri ile adezyon molekülleri ve ürettikleri sitokin ve matriks proteinleri listelenmiştir. Ayrıca, bu hücreler karakteristik olarak yüzeylere yapışma ve *in vitro* koşullarda adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşma göstermektedir. İzole edilen MKH'lerin sıklığı ve çoğalma yetenekleri, hücrelerin alındığı donörün yaşına bağlı farklılıklar göstermektedir (Gimble et al., 2000).

Çizelge 2.2. Kİ-MKH'lerin immunofenotipik özellikleri; spesifik antijenlerin, sitokin reseptörlerin ve adezyon moleküllerinin ekspresyonu ve sitokinlerin ve matriks proteinlerin üretimi (Karaöz ve Ovalı, 2004).

BELİRTEÇ TİPİ	BELİRTECİ
Spesifik antijenler	SH2, SH3, SH4, STRO-1, düz kas α -aktin, MAB1740
Sitokinler ve büyüme faktörleri	İnterlökinler: 1 α , 6, 7, 8, 11, 12, 14 ve 15, LIF, SCF, Flt-3 ligand, GM-CSF, G-CSF, M-CSF
Sitokin ve büyüme faktörü reseptörleri	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIFR, SCFR, G-SCFR, IFN γ R, TNFIR, TNFIIR, TGF β IR, TGF β IIR, bFGFR, PDGFR, EGFR
Adezyon molekülleri	İntegrinler: α v β 3, α v β 5 İntegrin zincirleri: α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α v, β 1, β 3, β 4 ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM-1, LFA-3, L-selektin, endoglin, CD44
Hücre dışı matriks	Tip I, III, IV, V, ve VI kollagen, fibronektin, laminin, hiyalüronan, proteoglikanlar

2.4.2. MKH'lerin *In vitro* Farklılaşma Potansiyelleri

Gerçekleştirilen *in vitro* MKH çalışmaları, bu hücrelerin uygun ortam koşullarında ve uygun uyarılarla farklı doku ve hücrelere farklılaşabildiğini göstermektedir. MKH'ler, kültür ortamında farklılaşırken, kültürde uygun miktarda esansiyel büyüme faktörü varlığında büyüme fazında bulunmaktadırlar. Büyüme fazının, “temas (kontakt) inhibisyonu” ile uyarılması mümkündür. Büyüme fazındaki kök hücreler, hücre siklusunun G0 fazındadır ve farklılaşmamışlardır. MKH'ler farklılaşmaya başlamadan önce farklılaşma öncesi faza geçerler. Kültür koşulları farklılaşma için uygun olduğunda iki durum gerçekleşir; hücrelerin farklılaşacakları hücre morfolojisini kazandıkları “terminal olmayan farklılaşma” ve “terminal farklılaşma” (Sell, 2003).

Terminal olmayan farklılaşma, plazma/serum içeriğindeki faktörler veya insülin ve deksametazon gibi diğer kimyasallarla uyarılabilmektedir. TGF- β ve

TPA gibi faktörler ise terminal olmayan farklılaşmayı inhibe etmektedir. Bu farklılaşma sürecinde, hücreler tam olarak farklılaşmış fenotipte değildirler (Fisher, 1990). MKH'lerin son farklılaşma basamağı "terminal farklılaşma" basamağıdır. Yapılan çalışmalar, protein kaybına bağlı olarak çoğalma yeteneğinin kaybedildiğini ve bu durumun geri dönüşümsüz olarak gerçekleştiğini göstermektedir (Hikita et al., 2000). Terminal farklılaşma, "farklılaşmış hücrelerin çoğalma yeteneklerini kaybetmeleri" şeklinde tanımlanmaktadır. Kanselerde gözlenen kontrolsüz hücre çoğalmasının, terminal farklılaşmanın kontrolünde meydana gelen hatalardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Wier and Scott, 1985).

MKH'ler, uygun uyarıların etkisiyle *in vitro* osteojenik ve adipojenik farklılaşmaya yönlendirilebilmektedir. Adipojenik farklılaşma, IBMX (fosfodiesteraz inhibitörü izometilksantin), deksametazon (glukokortikoid reseptörü), PPAR γ (peroksizom proliferatör aktive reseptör) ligandları ve insülin varlığında gerçekleştirilebilmektedir. Fibroblast-benzeri morfolojideki MKH'ler, 3-9 gün içerisinde, oval, nötral-lipit damlaları içeren hücrelere farklılaşmaktadır. Elde edilen farklılaşmış MKH'ler, olgun yağ hücrelerine özgü gen belirteçlerini eksprese etmekte ve adipokin salgılanması gibi biyokimyasal karakteristik özellikler kazanmaktadır (Diascro, 1998). Yapılan çalışmalarda, adipojenik farklılaşmayı arttıran PPAR γ gibi bazı uyarıların, osteojenik farklılaşmayı inhibe ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, kemik morfojenik proteini (BMP) gibi osteojenik farklılaşmayı yönlendiren bazı uyarılar, adipogenez üzerinde de benzer etki göstermektedir (Chen, 1998; Lecka-Czernik, 1999).

MKH'ler, askorbat, deksametazon ve TGF- β varlığında, kondrojenik bir fenotip göstermektedir. Eklem kıkırdağının iyileştirilmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda, büyüme faktörleri ve doku iskelelerinin bir arada kullanıldığı uygulamaların daha başarılı olduğu rapor edilmektedir. Ekstrasellüler matriks, mekanik olarak uyarma ve oksijen gerilimi gibi çevresel faktörler de MKH'lerin kondrojenik farklılaşmasını etkilemektedir (Estes, 2006). Bununla birlikte, erişkin dokularından elde edilen MKH'lerin çoğunun, kalp, iskelet sistemi ve düz kas hücrelerine özgü belirteçleri eksprese edebildikleri rapor edilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalarda, 5-azasitidin varlığında ve kardiyomyositlerle birlikte gerçekleştirilen kültür çalışmalarında, bu hücrelerin

kardiyomiyositlere özgü belirteçleri eksprese ettiği gösterilmiştir (Planat-Benard, 2004).

MKH'ler, serum içermeyen ve anti-oksidanların bulunduğu kültür ortamında, nöronal ve oligodendrosit hücrelerinin morfolojik biyokimyasal özelliklerini göstermektedir. Benzer uyarı, kültür ortamına indometasin, insülin ve metilizoksantin eklenmesiyle de gerçekleştirilebilmektedir. Nöral olarak farklılaşmış MKH'ler, nestin ve NeuN gibi nöral belirteçleri ve oligodendrosit hücre belirteci olan gliyal fibriler asidik protein (GFAP)'ı eksprese etmektedir. Buna karşılık, olgun nöral ve gliyal hücrelerin işlevlerini gerçekleştiren bir nöral MKH farklılaşma modeli oluşturulamamıştır (Sakaguchi, 2005). Ayrıca, MKH'lerin canlı dışı hepatik (Lee et al., 2004; Seo et al., 2005) ve pankreatik (Timper et al., 2006). farklılaşmalarına yönelik önemli bulgular bulunmaktadır.

2.5. Diş Pulpası Kaynaklı Kök Hücreler (DP-KH)

Embriyonik dönemde, diş tabakasının gelişimi ektodermden kaynaklanmaktadır. Ektodermal yapı diş germelerini oluştururken, nöral kabartı hücreleri diş organı, diş papillası ve diş folikülüne farklılaşmaktadır. Bu nedenle, diş pulpası ektodermal kaynaklı nöral kabartı hücrelerini de kapsayan mezenkimal bileşenler içermektedir (Mauth et al., 2007).

Diş pulpasının damarları çevresindeki (*perivasküler*) yatakta yer alan ve “diş pulpası kök hücreleri (DP-KH)” olarak adlandırılan hücre popülasyonunun MKH oldukları düşünülmektedir. Bu hücreler, yüksek proliferasyon gösterebilen, klonlanabilen ve yüksek plastisite yeteneğine sahip multipotent hücrelerdir (Gronthos et al., 2000). 90'lı yılların ortalarında, diş pulpasından öncül hücrelerin elde edildiği bildirilmiştir. Daha sonra, diş MKH'lerinin, gömük yirmi yaş diş pulpasından da elde edildiği belirtilmiştir. DP-KH'lerin izolasyonu ve tanımlanması, ilk olarak 2000 yılında Gronthos ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiş ve aynı ekip tarafından, bu hücrelerin odontoblastik, adipojenik ve nöral hücre tiplerine farklılaşması gösterilmiştir. Pulpa dokusundan kök hücrelerin izolasyonu oldukça etkili şekilde gerçekleştirilebilmektedir. DP-KH'lerin kemik iliği kökenli kök hücrelerden, hücre döngüsü ile ilişkili genleri

eksprese etmeleri nedeni ile ayırt edilebildiği belirtilmektedir. Bu sonuçlar, DP-KH'lerin MKH'ler ile karşılaştırıldığında yüksek proliferasyon hızına sahip olduğuna ilişkin bulgular ile uyumluluk göstermektedir. DP-KH'lerin kolay izole edilebilmesi ve daha yüksek bir proliferasyon hızı göstermeleri, bu hücreleri Kİ-MKH'lerden üstün kılmaktadır. Diş kök hücreleri, damarların çevresinde lokalize olmaktadır ve kök hücre belirteci Stro-1'i eksprese etmektedir (Krebsbach and Robey, 2002; Morszccek et al., 2007).

DP-KH'lerin başlıca farklılaşma potansiyeli dentin ya da diş kökünü saran bağ doku ile ilişkili hücrelerin oluşumunda etkili olmaktadır. Bu kök hücreler pulpa, diş çevreleyen bağ dokusu ya da diş folikülünden köken almaktadır. Diş dokularındaki kök hücrelerin farklı kaynaklardan elde edilebilmesi mümkündür; diş epiteli, diş çıkıntısı (*papilla*), diş çevreleyen bağ doku, diş folikülü. Diş epitelinden elde edilen kök hücreler (ektodermal kök hücreler) dışındaki, diş kök hücrelerinin tümü, nöral-kabartı kaynaklı ektomezenkimal hücrelerdir. Bu kök hücreler, dentin ve diş dokularının gelişiminde gelişim ve hücrel farklılaşma süreçlerine katılmaktadır. (Morszccek et al., 2007).

DP-KH'lerin gen ekspresyonlarının belirlenmesi ve bu genlerin fonksiyonel sınıflandırılmasının gerçekleştirilmesi ile bu hücrelerin alkalik fosfat, dentin matriks proteini-1, dentin siyalofosfoprotein ekspresyonları gösterilmiştir. Gen ekspresyon analizleri, eksprese edilen genlerin çoğunun ekstrasellüler matriks bileşenleri, büyüme faktörleri ve hücre adezyon moleküllerini kodladığını ortaya koymuştur. Gen ekspresyon düzeyleri, hücre sinyalleri, hücrel etkileşimler ve hücre metabolizmasını düzenleyici etki göstermektedir (Krebsbach and Robey, 2002).

DP-KH ve Kİ-MKH'lerin gen ekspresyonları karşılaştırıldığında, çok az farklılık gözlenmektedir (Çizelge 2.3). DP-KH'lerde, hücre siklusu aktivatörü siklin-bağımlı kinaz-6 yüksek oranda eksprese edilmektedir. Bu yüksek ekspresyon DP-KH'lerin neden daha yüksek bir proliferasyona sahip olduklarını açıklamaktadır. (Todorović et al., 2008).

Çizelge 2.3. DP-MKH ve Kİ MKH'lerin hücre yüzey protein ekspresyonlarının karşılaştırılması

Yüzey Antijeni	DP-KH	SHED	Kİ-KH
CD14	-	-	-
CD34	-	-	-
CD44	++	++	++
CD45	-	-	-
CD106	+	+/-	++
CD146	++/+/-	++/+/-	++/+/-
Stro-1	++/+/-	++/+/-	++/+/-
Tip I kollajen	++	++	++
Tip III kollajen	++/+	++/+/-	++/+
Osteokalsin	++/+	++/+/-	+/-
Osteonektin	++/+	++/+	++/+
Osteopontin	+/-	+/-	+/-

DP-KH; Diş pulpası kök hücresi, **SHED;** süt dişi kök hücresi, **Kİ-MKH;** kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre (Todorović et al., 2008).

Diş pulpası kök hücreleri, tedavi amaçlı uygulamalar için gerekli bütün özellikleri taşımaktadır;

- 1) bu hücrelerin elde edilmesi oldukça kolaydır,
- 2) pulpa dokusundan elde edilen kök hücre ekstraksiyonu daha yüksek etkinlik göstermektedir,
- 3) yüksek farklılaşma yeteneğine sahiptirler,
- 4) biyomateryallerle birlikte gerçekleştirilen uygulamalarda dokuların yeniden yapılandırılması için etkin olarak kullanımları mümkündür,
- 5) yaşam süreleri uzundur,
- 6) güvenli olarak kriyoprezervasyonları mümkündür (Todorović et al., 2008).

Sağlıklı insan dışından elde edilen DP-KH'lerin dondurularak saklandıktan sonra çözdürülmesiyle elde edilen yüksek hücre canlılık oranları bu hücrelerin gerektiğinde kullanılmak üzere, örnek saklama bankalarında da saklanabileceğini ortaya koymuştur (D'aquino et al., 2008). DP-MKH'ler, anti-inflamatuar ve immun-düzenleyici özelliktedir. Bu hücreler, pulpa kaynaklı ve diş destek dokularının enfeksiyonlarında, bağışıklık yanıtının oluşumunda proinflamatuar transkripsiyon faktörü NF-B aracılığıyla rol oynamaktadırlar. Allojenik dokulara transplante edildiklerinde ise immunolojik tolerans gelişimini uyardırmaktadırlar. DP-MKH'ler, bağışıklık sistemini baskılayıcı etkilerini T lenfositlerin proliferasyonunu inhibe ederek göstermektedirler (Graziano et al., 2008).

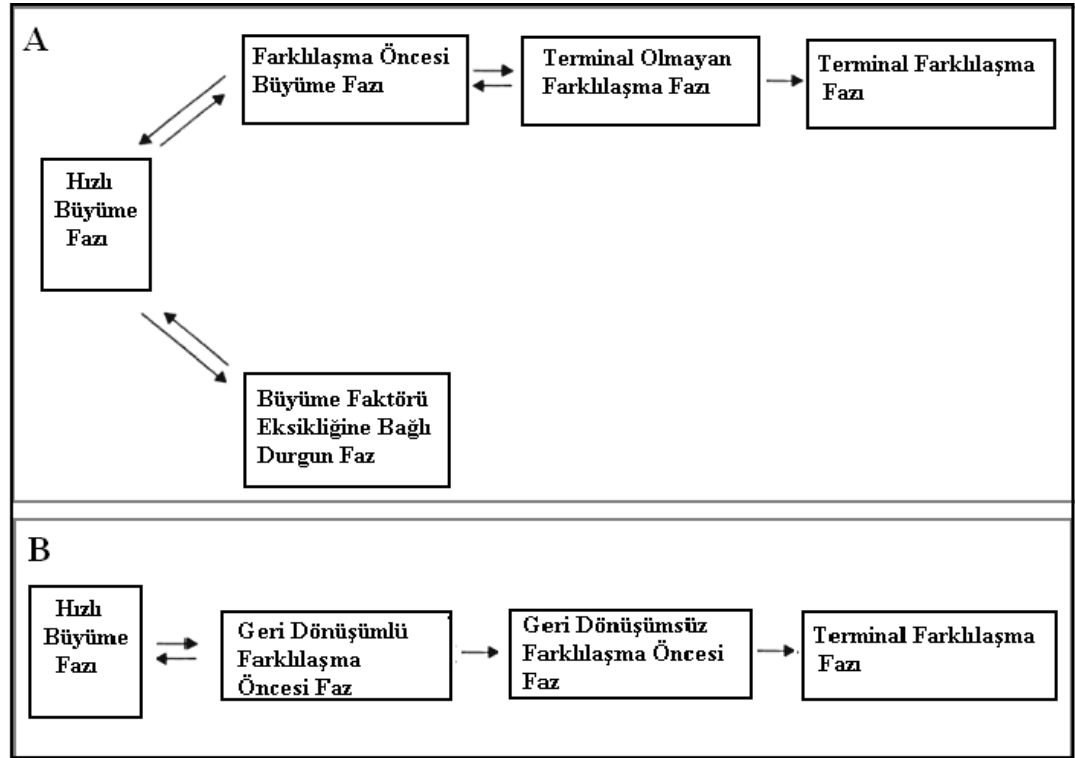
Üçüncü molar dişlerden elde edilen iDP-MKH'lerin dentin-yapıcı odontoblastlar (Gronthos et al., 2002), osteoblastlar (Laino et al., 2005), yağ hücreleri (Gronthos et al., 2002; Jo et al., 2007), iskelet/düz kas hücreleri (d'Aquino et al., 2007), endotel hücreleri (d'Aquino et al., 2007), kıkırdak hücreleri (Zhang et al., 2006) ve sinir hücrelerine (Zhang et al., 2006; d'Aquino et al., 2007) farklılaşabildiği gösterilmiştir. Aynı zamanda bu hücreler, osteoblastlara özgü karakteristik özellikler de göstermiştir. Bu çalışmalar, diş pulpası kök hücrelerinin mezenkimal ve mezenkimal olmayan dokuların hücrelerine farklılaşabildiğini göstermektedir. Yapılan son çalışmalar ise bu hücrelerin multipotent nöral kabartı kök hücreleri olabileceğine dair kanıtlar içermektedir. Ayrıca, bağışıklık sistemi baskılanmış sıçanlarda gerçekleştirilen çalışmalar, DP-MKH'lerin kafatasında gerçekleşen büyük defektlerin onarılmasında kullanılabilecek önemli bir hücre kaynağı olduğunu göstermiştir (Morszceck et al., 2007). DP-MKH'ler, bu özellikleriyle dentin, periodontal doku ve kemiksi kıkırdak dokuların onarılmasında ve bağışıklık sistemi ve kas hastalıkları ve bağ doku hasarlarının tedavisine yönelik klinik uygulamalarda önemli bir kullanım potansiyeline sahiptir (d'Aquino et al., 2008; Todorović et al., 2008).

2.6. Epitelyum Dokusu ve MKH'lerin Epitelyal Farklılaşması

Deri, gastrointestinal kanal, ürogenital sistem, göğüs kanalları gibi tüm vücut yüzeyleri ve kaviteleri, destek bariyeri olarak görev yapan epitelyum dokusu ile kaplıdır. Bu doku bariyerinde gerçekleşen doku kayıplarının, epitelyal homeostazın sağlanabilmesi için hücre proliferasyonu ile yerine konması gerekmektedir. Hastalıklar ve yaralanmalar sonucu oluşan doku kayıplarının yerine konulması oldukça zordur. Bu yenilenmenin sağlanabilmesi için en uygun ve en önemli kaynak epitelyal doku kök/öncül hücrelerdir. Bu hücreler, nöral, vasküler, hepatik, pankreatik ve epitelyal dokulardan elde edilebilmiştir. Ancak, epitel dokunun çoğalabilen bileşenleri bu açıdan yetersizdir. Diğer bir kaynak, yaralanma sırasında bu bölgeye göç eden veya enjeksiyonu gerçekleştirilebilen kemik iliği kök/öncül hücreleridir (Păunescu et al., 2007).

Epitelyumun farklılaşma ve gelişim süreci iki basamakta gerçekleşmektedir; epitelyal olmayan hücrelerin öncül-epitelyuma dönüşümü ve bunu takip eden terminal farklılaşma. Epitelyal öncül hücreler epitelyumun temel özelliklerini oluşturan, bölünebilen ve göç edebilen hücrelerdir. Terminal olarak farklılaşmış epitel ise, sabit konumdadır ve proliferasyon yeteneği yoktur. Terminal epitel, hücre şeklinin ve hücreye özgü özelliklerin korunmasını ve düzenlenmesini sağlamaktadır. Terminal farklılaşma, bağırsak, deri, prostat ve diğer organlarda da gerçekleşmektedir (Hikita et al., 2000).

Şekil 2.7 incelendiğinde MKH'ler (Şekil 2.7A) ve epitel/keratinosit öncül hücreleri (Şekil 2.7B) arasındaki fark anlaşılır hale gelmektedir. İki hücre tipi de geri dönüşümlü büyüme fazına girmekte ve çok aşamalı farklılaşma sürecine katılmaktadır. Epitelyal öncül hücreler ve MKH'ler arasındaki fark, hücre siklusu ve büyüme fazı evreleridir. MKH'lerde geri dönüşümlü farklılaşma süreci, hücre siklusunun G1 fazında gerçekleşirken, normal epitelyal öncül hücrelerde bu süreç G1 veya G2 fazlarında gerçekleşmektedir. Ayrıca, MKH farklılaşması çoğalma yeteneğinin kaybına bağlı olarak gelişmekte, epitelyal öncül hücrelerde ise çoğalma yeteneği terminal farklılaşma öncesi geri dönüşümsüz olarak kaybedilmektedir (Fisher, 1990).



Şekil 2.7. MKH'ler ve epitelyal öncül hücrelerin proliferasyon ve farklılaşma süreçlerinin karşılaştırılması. A'da görüldüğü gibi MKH'ler,, terminal farklılaşmadan önce, "farklılaşma öncesi büyüme fazı" ve geri dönüşümsüz "terminal olmayan farklılaşma süreci" ne girmektedir. Epitelyal öncül hücreler (B) ise, ilk olarak büyüme büyüme fazına, daha sonra ise geri dönüşümsüz büyüme fazına girmektedir. Geri dönüşümsüz fazda, epitelyal hücrelere özgü protein ekspresyonları gerçekleşmemektedir. Bu proteinler, terminal farklılaşma fazında eksprese edilmektedir (Fisher, 1990).

Epitelyal hücreler hakkında bilinmesi gereken bir diğer konu epitelyal-mezenkimal geçiştir. Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), epitelyal hücrelerin hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks ilişkisine bağlı olarak gelişen ve epitelyal hücrelerin diğer vücut bölgelerine göçü ile sonuçlanan, fizyolojik fenotipik bir kaymadır. EMT, embriyonik dönemde farklı dokulardaki öncül hücrelerin oluşmasını sağlamaktadır (Radisky ve LaBarge, 2008). Erişkin bireylerde EMT, doku yenilenmesi ve hasarlı dokunun tamirini kapsayan organların gelişim sürecinde görev almaktadır. MKH'lerin epitelyal farklılaşma çalışmaları, ko-kültür çalışmaları ve doku mühendisliği çalışmaları, EMT mekanizmasının daha anlaşılır hale getirilmesi ve buna yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi açısından önem taşımaktadır.

Bununla birlikte edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu (AIDS)'na neden olan HIV virüsü direkt olarak epitelyal hücreleri etkilemekte, epitelyal hücreler ile yayılım göstermekte ve epitelyal dokudaki özelleşmiş bağışıklık sistemi

hücrelerine bağlanarak etki göstermektedir. Bu durum, epitelyal doku çalışmalarını daha önemli hale getirmektedir (Dezzutti and Lal, 1998).

Erişkin kök hücrelerin epitelyal farklılaşması konusunda gerçekleştirilen çalışmalar, Kİ-MKH'ların akciğer dokusunda fibroblast-benzeri hücreler (Pereira et al., 1995) ve farklılaşmış bronş epiteli ve alveolar tip II pnömositler (Kotton et al., 2001) şeklinde konumlandığını göstermiştir. Ayrıca, bu hücreler alıcının akciğer parankiminde, morfolojik ve moleküler olarak alveolar epitele ait tip I pnömosit fenotipini göstermiştir (Kotton et al., 2001). Diğer bir deneysel çalışmada, küçük solunum yolu epitel hücreleriyle birlikte kültüre edilen insan MKH'lerinin hızlı bir şekilde epitel-benzeri hücrelere farklılaştığı ve tek katlı epitelyal tabaka oluşturdıkları rapor edilmiştir. Bu hücrelerin, immunohistokimyasal ve mikro düzeydeki analizlerinde, normal solunum yolu epitelyal hücreleri ile benzer fenotipik özellikler ve gen ekspresyonları gözlenmiştir (Spees et al., 2003). Tüm bu sonuçlar, Kİ- MKH'lerinin, bronşiyal ve alveolar hasarın gözlendiği akciğer hastalıklarının tedavisinde akciğer epitel dokusunu tamir edebilecek nitelikte olduğunu göstermektedir.

Fare Kİ-MKH'lerinin, deri dokusunu oluşturan hücrelere farklılaşma çalışmalarında, bu hücrelerin *in vivo* epidermal keratinositlere, yağ bezi hücrelerine, foliküler epitelyal hücrelere, dendritik hücrelere ve endotelial hücrelere farklılaşma yetenekleri rapor edilmiştir (Kataoka et al., 2003). Benzer şekilde, erişkin kök hücrelerin, renal epitelyal hücrelere farklılaşma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda, Kİ-MKH'lerin normal fare böbreğinde histolojik olarak epitelyal hücre belirteçlerini eksprese ettikleri gözlenmiştir (Poulsomet al., 2001). Bunun yanı sıra, sıçan glomerulonefrit modelinde, enjekte edilen MKH'lerin glomerular mezengiyal hücrelere farklılaştığı gözlenmiştir (Ito et al., 2001).

Yapılan çalışmaların çoğu, Kİ-MKH'lerin sindirim sistemi epitelyal rejenerasyonu için de önemli bir kaynak oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Klinik uygulamalarda, kemik iliği epitelyal hücrelerinin GVHD sonrası gelişen hasarlı epitel dokusunu tamir edebildiği rapor edilmektedir. Kİ-MKH'lerin epitelyal yenilenmede kullanımına ilişkin ilk rapor, bu hücrelerin gastrik ülserlerde epitel dokusunu tamir edici işlev gösterdiğini ortaya koymuştur (Okamoto and Watanabe, 2004). Bu konudaki diğer bir hipotez ise, Kİ-

MKH'lerin hepatik oval hücreler (Petersen et al., 1999) ve yassı epitel hücrelerine (Epperly et al., 2004) farklılaşmalarıdır.

Tüm bu veriler, MKH'lerinin canlı-içi enjeksiyonları ile elde edilmiştir. Bu konuda gerçekleştirilen canlı-dışı çalışmalar ise oldukça az sayıdadır. Literatürde, insan yağ dokusundan elde edilen MKH'lerin, ATRA (trans-retinoik asit) varlığında epitelyal hücrelere farklılaşabildiği bilgisi bulunmaktadır. Elde edilen farklılaşmış hücrelerde, epitelyal hücre morfolojisinin varlığı ve epitelyal hücrelere özgü bir belirteç olan sitokeratin 18 ekspresyonu gözlenmiştir (Brzoska et al., 2005). Başka bir çalışmada ise, Kİ-MKH'lerin *in vitro* koşullarda ve uygun büyüme faktörleri varlığında epitelyal hücrelere farklılaşabildiği rapor edilmiştir (Păunescu et al., 2007).

2.7. Doku Fibroblastları ve Fibroblastik Farklılaşma

Fibroblastlar, kimyasal ve mekanik uyarıların etkisiyle, ekstrasellüler matriks proteinleri ve fibröz proteinlerin salgılanmasına bağlı olarak farklılaşabilen bağ doku hücreleridir. Fibroblastlar, yağ hücreleri, osteositler, odontoblastlar, düz kas hücreleri ve kıkırdak gibi mezodermal kökenli özelleşmiş fibroblastik hücre hatlarına gelişen multipotent hücrelerdir (Kalluri and Zeisberg, 2006).

Doku fibroblastları; büyüme faktörü salınması, matriks yıkılımı ve patolojik mekanizmaların çoğunda önemli rol oynamaktadır. Örneğin; doku hasarı geliştiğinde, fibroblastlar enflamatuar cevap oluşumu ve bu cevabın kontrolünde kritik rol oynamaktadır (Moreau et al., 2005). Bu hücreler, yara oluşumunda, sitokin ve kemokinlerin salınımına cevap olarak ekstrasellüler matriks proteinlerini üretmektedir. Ayrıca, fibroblastlar miyofibroblastları oluşturmaktadır. Miyofibroblastlar, miyozin ve düz kas aktini ile yara bölgesini küçültücü kasılabilir bir güç oluşturur. Bu hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve aktivasyonu doku fibrozu ile sonuçlanmaktadır. Genel olarak, bu hücreler dokuların yapısal bütünlüğünü sağlamakta ve diğer hücre tiplerinin (epitelyal hücreler gibi) çoğalma ve farklılaşmasını desteklemektedir (Ogawa et al., 2006).

Son yıllarda, otolog fibroblast hücre tedavileri oldukça önem kazanmıştır. Fibroblastlar, kollajen, hyaluronik asit, elastinler ve doku tamiri açısından önemli diğer proteinleri eksprese etmektedirler. Otolog fibroblast enjeksiyonlarıyla, kollajen dolaşımı, dermal kollajenin sentezi ve yoğunluğu arttırılmaktadır. Bu uygulamalarda, fibroblastlar dermal yapının yeniden yapılandırılmasını, kollajen üretimini ve *in vivo* hücre sentezini uyararak daha kalın bir kollajen tabakasının oluşmasını sağlamaktadır (Rennard and Liu, 2005). Tendonlar, ligamentler ve deri gibi bağ doku çalışmaları, fibroblastların bağ doku tamiri, bağ doku ve ekstrasellüler matriksin yeniden yapılandırılması açısından önemli hücre bir kaynağı olduğunu ortaya koymuştur.

Genellikle ön çapraz bağ liflerinden (ACL) elde edilebilen fibroblastlar, yaşlanmaya bağlı olarak azalmış bir büyüme ve farklılaşma göstermektedirler. Bu durum, fibroblastların klinik kullanımları açısından kısıtlar yaratmaktadır. MKH'ler, uzun-ömürlü olmaları ve yaşamları boyunca yüksek farklılaşma ve proliferasyon göstermeleri nedeniyle işlevsel ligament ve tendon doku çalışmalarında daha avantajlı bir kaynak oluşturmaktadır (Moreau et al., 2005). Caplan ve ekibi, MKH'lerle hazırlanan hücre süspansiyonlarının bağ doku tamirinde etkili olduğunu göstermiştir (Caplan et al., 1998).

Doku fibroblastları, tendonların tamirinde ve yeniden yapılandırılması açısından da önem taşımaktadır. Ancak, otolog ve allojenik tendon fibroblastlarının kullanımı oldukça problemlidir. Bu durum, tendon dokusunda tendon hücrelerinin az sayıda bulunmasından kaynaklanmaktadır (Hampson et al., 2008). MKH'lerin tendon farklılaşmasının belirlenmesi önemli bir alternatif oluşturmaktadır. Atlarda gerçekleştirilen bir çalışmada, otolog MKH tedavisinin tendon dokusunu tamir edici etki gösterdiği gözlenmiştir (Awad et al., 1999). Benzer şekilde, *in vitro* koşullarda MKH'lerin tendon fibroblastlarına farklılaşabildiği rapor edilmektedir (Pittenger et al., 1999).

MKH'ler ve fibroblastlar benzer morfolojik ve immunofenotipik özelliklere sahiptir (Çizelge 2.4.). Gerçekleştirilen çalışmalarda, fibroblastik hücrelerin osteoblastik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma yetenekleri gösterilmiştir. Fibroblastik hücrelerin immun-baskılayıcı etkilerini gösteren veriler de mevcuttur. MKH'ler immun-düzenleyici etkilerini HGF, PDE2,IDO ve IGF aracılığıyla gerçekleştirirken, fibroblastlar bu etkiyi PDE2 ve IDO aracılığıyla

gerçekleştirmektedir. MKH'lerin, "fibroblastların yeni elbiseleri olup olmadığı" tartışmaları sürdürülürken, yapılan çalışmalar MKH'lerin üstünlüklerini göstermektedir (Haniffa et al., 2009).

Çizelge 2.4. Fibroblast ve MKH'lerin özelliklerinin karşılaştırılması (Haniffa et al., 2009)

Özellik	Fibroblast	MKH
Dağılım	Yaygın	Yaygın
Fenotip	Benzer	Benzer
Sıklık	Sık	Nadir
Farklılaşma Potansiyeli	Benzer	Benzer
İmmun-düzenleyicilik (<i>in vitro</i>)	Benzer etki	Benzer etki
İmmun-baskılayıcı etki (klinik)	Bilinmiyor	Var

MKH'ler ve deri fibroblastları karşılaştırıldığında, MKH'lerin deri fibroblastlarından farklı olarak, gelişimsel genleri yüksek oranda eksprese ettiği, embriyogenezle ilişkili bazı genlerin düzenlenmesini sağladığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, deri fibroblastlarının endoglin (CD105) ekspresyonlarının oldukça düşük seviyelerde gerçekleştiği gözlenmiştir (Brendal et al., 2005). Derin yanıkların tedavisine yönelik gerçekleştirilen bir çalışmada ise embriyonik fibroblastlar ve MKH'ler karşılaştırılmıştır. MKH nakillerinde, yara bölgesindeki iyileşmenin daha hızlı gerçekleştiği gözlenmiştir (Shumakov et al., 2003). Bağ doku mühendisliği uygulamalarında MKH'ler, ALCF fibroblastlarıyla karşılaştırıldığında daha etkili ve uygun bir hücre kaynağı olduğu rapor edilmektedir (Liu et al., 2007). Ayrıca, bağ doku fibroblastlarının vimentin ve fibroblast yüzey proteini (FSP) için güçlü immun-reaksiyon gösterdikleri buna karşılık nestin eksprese etmedikleri rapor edilmektedir.

MKH'lerin fibroblastik büyüme faktörlerine verdikleri cevap incelendiğinde, bu hücrelerin FGF1 ve FGF2 ile muamele edildiklerinde; FGF1 ve FGF2 reseptörleri için mRNA ürettikleri ve MKH proliferasyon hızına bağlı olarak FGF1 ve FGF2'nin de arttığı görülmüştür (Van den Bos et al., 1997).

Sınırlı bölünebilme yeteneğine sahip ve kültür koşullarında daha yavaş çoğalan fibroblastlarla karşılaştırıldığında yüksek proliferasyon, farklılaşma ve yüksek gen ekspresyonu düzeyleri gösteren MKH'lerin fibroblastik farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesi bu hücrelerin tendon, ligament, periodontal

ligament, kraniyal sütürlar ve tüm organlar için intersisyal bir dolgu malzemesi olarak doku mühendisliği açısından kullanılabilceğini ortaya koyacaktır. *In vitro* koşullarında bağ dokusunun oluşturulabilmesi ve bağ doku hücrelerinin homojen olarak elde edilebilmesi, cerrahi ameliyatlar sonrası bağ dokusunun yenilenmesi ve onarılması açısından da uygun ve kolay elde edilebilir bir hücre kaynağının belirlenmesini sağlayacaktır.

2.8. Büyüme Faktörlerinin MKH Farklılaşması ve Doku Tamir Süreçlerindeki Etkileri

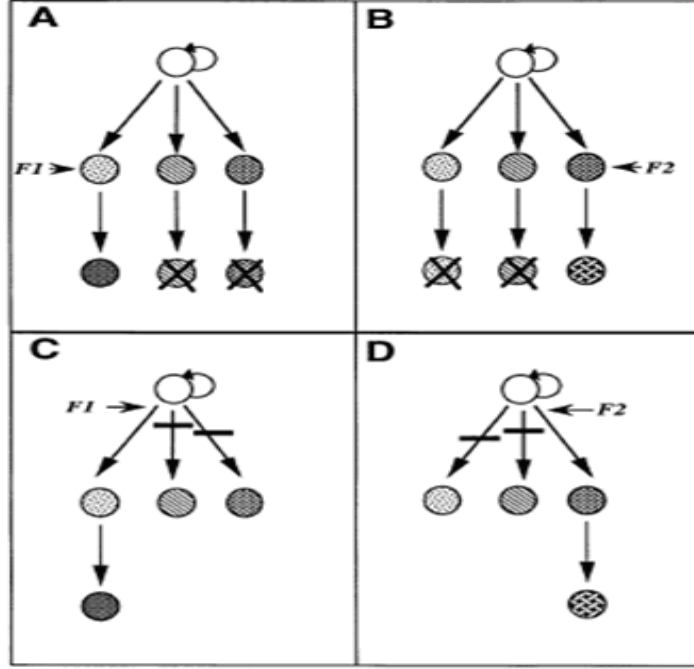
Büyüme faktörleri, hücre reseptörüne bağlanarak proliferasyon ve farklılaşmayı uyaran proteinlerdir. Büyüme faktörlerinin çoğu, hücrelerin tümünde bölünmeyi uyarmakta, bazı büyüme faktörleri ise hücre tipine özgü etki göstermektedir (Murray and Hargreaves, 2007). Örneğin; fibroblast büyüme faktörü (FGF) çoğunlukla fibroblast proliferasyonu üzerinde etkilidir. Büyüme faktörlerinin çoğunun, kök hücre ve doku mühendisliği çalışmalarındaki önemli işlevleri gösterilmiştir. Bu büyüme faktörleri, kök hücrelerin proliferasyon hızını artırarak, diğer doku hücrelerine farklılaşmalarını uyarmakta ve mineralize matriksi sentezlemelerini sağlayarak, kök hücre aktivitesini kontrol etmektedir (Moreau et al., 2005). Çizelge 2.3'de sık kullanılan büyüme faktörlerinin işlevsel özellikleri ve kullanım potansiyelleri gösterilmiştir. Epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin-benzeri büyüme faktörü-2 (IGF-2) ve transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β) gibi büyüme faktörleri kök hücre proliferasyonunu arttırıcı etki göstermektedir (Murray and Hargreaves, 2007).

Çizelge 2.5. Sık kullanılan büyüme faktörlerinin özel işlevleri ve kullanım potansiyelleri (Lawrence and Diegelmann, 1994).

Büyüme Faktörü	İşlevi	Kullanım Potansiyeli
BMP-Kemik Morfojenik Proteini	Osteojenik farklılaşma ve kemik mineralizasyonu artırır.	Kök hücrelerin mineral matriksi sentezlemelerini sağlamak için kullanılabilir.
EGF-Epidermal Büyüme Faktörü	Mezenkimal, gliyal ve epitelyal hücrelerin proliferasyonunu artırır.	Epitel hücre, fibroblast ve kök hücrelerin sayısının artırılması amacıyla kullanılabilir.
IGF-2-İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-2	Bazı hücrelerin proliferasyonunu artırır.	Kök hücre sayısının artırılması amacıyla kullanılabilir.
FGF-Fibroblast Büyüme Faktörü	Bazı hücrelerin proliferasyonunu artırır.	Fibroblast ve kök hücre sayısının artırılması amacıyla kullanılabilir.
TGF-β-Transforme Edici Büyüme Faktörü	Anti-enflamatuar özelliktedir. Yara iyileşmesini hızlandırır. Makrofaj ve lenfositlerin proliferasyonunu inhibe eder.	Fibroblast sayısının artırılması amacıyla kullanılabilir.
NGF-Sinir Büyüme Faktörü	Sinir hücrelerin <i>in vitro</i> koşullarda çoğaltılabilmeleri için uygun ortam şartlarını sağlar.	<i>In vitro</i> koşullarda nöronların kültüre edilmesi ve çoğaltılmaları amacıyla kullanılabilir.

Memelilerde multipotent öncül hücrelerden gelen sinyallerle hücre kaderinin belirlenmesinde, büyüme faktörleri oldukça önemli role sahiptir. Bu faktörler, kök hücreleri “seçici” ve “yönlendirici” iki yolla etkilemektedir. Seçici yolakta kök hücreler, büyüme faktörlerinin etkisinde özel bir şekilde hareket ederler ve hücrelerin sağ kalım ve çoğalması büyüme faktörleri tarafından kontrol edilir. (Şekil 2.8A ve B) Yönlendirici yolakta ise; büyüme faktörü kök/öncül hücrenin tek bir hücre hattını seçmesini sağlamaktadır (Şekil 2.8C ve D) (Morrison et al., 1997). Hematopoezde bu iki yol dönüşümlü olarak gerçekleşmektedir. Sitokinlerin yokluğunda, hematopoetik öncül hücrelerin bcl-2 ekspresyonuna bağlı olarak ölümsüz karakterde çok yönlü farklılaşma göstermesi, büyüme faktörlerinin seçici etkinliğini ortaya koymaktadır (Murray and Hargreaves, 2007). Nöral kabartı çalışmaları, üç değişik farklılaşma gerçekleştiğini (otonomik nöronlar, Schwann hücreleri, düz kas hücreleri) ve bu farklılaşmaların BMP-2, (GGF) ve TGF- β faktörlerinin etkisinde geliştiğini

göstermiştir. Bu sonuçlar, büyüme faktörlerinin sinir sisteminde ve hematopoetik sistemde, kök hücreleri farklı yollarla etkilediğini ortaya koymaktadır (Morrison et al., 1997).



Şekil 2.8. Büyüme faktörlerinin kök hücre farklılaşması üzerindeki “seçici” ve “yönlendirici” etkileri. (A ve B) İki farklı faktör etkisinde (F1 ve F2) gelişen ve belli bir hücre hattına bağımlı öncül hücrelerin sağ kalım ve olgunlaşmasını sağlayan seçici etki. “X” diğer öncül hücrelerin ölümünü göstermektedir. Bu yolla, eritropoetin önemli bir rol oynamaktadır (C ve D) Yönlendirici yolla kök hücrenin ilerleyeceği yol, büyüme faktörlerinin etkisi ile belirlenmektedir. Gliyal büyüme faktörü (GGF) ve kemik morfojenik proteini-2 (BMP2), nöral kabartı hücrelerinde bu şekilde etki göstermektedir (Morrison et al., 1997).

Somatik kök hücrelerin doğal doku tamir sisteminin bir parçası olduğu düşünülmektedir. Doku hasarı meydana geldiğinde oluşan ilk cevap, kök hücre ve öncül hücrelerin hasarlı dokuya göç ederek, çoğalmaları ve farklılaşmalarıdır. Büyük travma ve hastalıklarda, kök hücre havuzunun oluşmasının ardından, vücudun diğer bölgelerindeki kök hücreler de tamire katılabilmektedir. Somatik kök hücreler hasarlı doku tamirini iki yolla gerçekleştirmektedir; hasarlı dokunun iyileşmesi için gerekli sitokin ve diğer faktörlerin sağlanması ve hasarlı hücrelerin yerine yeni hücrelerin konulabilmesi için farklılaşma. Kök hücre konumunun düzenlenmesini sağlayan genlerin ve kök hücrelerin yenileyici özelliklerini etkileyen çevresel faktörlerin belirlenebilmesi için bu konudaki çalışmaların artırılması gerekmektedir (Rojas et al., 2005; Terada et al., 2002).

Doku hasarı meydana geldiğinde, dolaşımdaki trombositler hasarlanan dokuya yapışıp pıhtılaşma faktörleri ve granülleri içindeki büyüme faktörlerini (bFGF, FGF, IGF ve EGF) salgılamaktadır. Bu enflamatuar moleküller doku iyileşmesi sırasında, fibroblast ve epitel hücrelerinin yara bölgesine göç etmesi ve hücre sayısının artmasını uyarıcı etki göstererek tamir sürecini hızlandırmaktadır. Epitel hücreler, bu süreçte oluşan pıhtının altına doğru hareket etmekte ve çoğalarak epitel yüzeyi yeniden oluşturmaktadır. Makrofajlar yaradan bakterileri temizlemesi ve yara iyileşmesi için gerekli büyüme faktörlerini (TGF, PDGF, EGF, TNF, IFN gibi). ile fibroblastlar yara iyileşmesini başlatmak için yaraya göç ederler.

Yara iyileşmesinde etkili büyüme faktörlerinden olan FGF'ler, endotel proliferasyonunu artırarak damarlanmayı hızlandırmaktadır. bFGF'nin derinin yüzeysel dermis tabakası ile ilişkili olduğu ve fibroblast proliferasyonunu artırıcı etki gösterdiği rapor edilmektedir. bFGF, ayrıca kollajen sentezini de uyararak, yara bölgesinde kasılma ve epitelyum doku oluşumunu arttırmakta ve, fibronektin ve proteoglikan sentezini uyarmaktadır (Lawrence and Diegelmann, 1994). Çeşitli dokularda (deri, meme bezleri, karaciğer gibi) yara iyileşmesi ve homeostazda etkili olduğu bilinen HGF, doku hasarı sırasında keratinosit ve fibroblastları uyararak epitel dokunun yeniden yapılanmasını sağlamaktadır. Fibroblastlarda kollajen ve diğer matris yapılarının sentezini arttıran TGF- β ise fibroblastların yara bölgesine göçünü ve proliferasyonunu artırıcı etki göstermektedir (Murray and Hargreaves, 2007). Bununla birlikte ekstrasellüler matris (ECM) bileşenlerinin de yara iyileşmesinde önemli rolleri bilinmektedir. Fibroblastların hücre iskeleti ve ECM ligandları arasındaki etkileşimler yara bölgesinde kasılma ve iyileşmeye neden olmaktadır. ECM bileşenlerinden fibronektinin, fibrinle etkileşerek *in vivo* ve *in vitro* koşullarda fibroblast ve keratinositlerin proliferasyonunu artırıcı etki gösterdiği rapor edilmiştir (Terada et al., 2002).

Görüldüğü gibi büyüme faktörleri hem yara iyileşmesinde hem de MKH'lerin farklılaşmasının yönlendirilmesinde önemli bir role sahiptir. Doku hasarının tamirinde, fibroblast ve epitel hücre etkileşimlerinin en önemli basamak olduğu açıkça görülmektedir. Ancak büyük doku hasarlarında, dokuda bulunan somatik hücreler dokunun tümünün onarılması için yeterli değildir. Yenileyici tıp uygulamaları, özellikle kronik yaralarda dokulardaki öncül hücrelerin uyarılması

ve hücre/doku nakillerine yönelmiştir. MKH'ler, hücre tabanlı tedaviler için, izolasyonlarının kolay olması ve *in vitro* koşullarda çok sayıda çoğaltılabilmeleri nedeniyle önemli aday hücrelerdir. Ayrıca, MKH'lerin hasarlı dokuya göç etme yetenekleri bu hücrelerin önemini arttırmaktadır. iDP-MKH'lerin, derinin ve doku tamir mekanizmasının bileşenlerinden olan epitelyal ve fibroblastik hücrelere farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesi, KI-MKH'lere oranla daha kolay elde edilebilen ve daha yüksek çoğalma yeteneğine sahip bu hücrelerin doku tamiriyle ilişkili klinik tedavi uygulamalarında başarılı sonuçlar verebileceğini ortaya koyacaktır. Bununla birlikte MKH'lerin, yanık tedavileri başta olmak üzere deri hasarlarının geliştiği klinik vakaların tedavisi ve doku mühendisliği çalışmaları açısından da önemli bir kullanım potansiyeline sahip olduğu görülmektedir.

KI-MKH'lerle benzer immunofenotipik özellikler gösteren iDP-MKH'ler, daha kolay izole edilebilmeleri ve daha yüksek çoğalma göstermeleri nedeniyle iDP-MKH'ler, yenileyici tıp ve doku/organ mühendisliği amaçlı çalışmalarda alternatif bir kaynak oluşturmakta ve bu konuda yapılan çalışmalar artış göstermektedir. Literatürde, iDP-MKH'lerin nörojenik, adipojenik, miyojenik, odontojenik-osteojenik farklılaşmalarını gösteren çalışmalar bulunmasına rağmen yapılan kaynak taramasında bu hücrelerin epitelyal ve fibroblastik farklılaşmalarını gösteren bir rapora rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada sağlıklı vericilerden elde edilmiş gömük yirmi yaş diş pulpasından MKH'lerin ayrılması, canlı-dışı çoğaltılması, karakterizasyonu ve epitelyal-fibroblastik farklılaşma potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

Bu tez çalışmasında, kök hücrelerin diğer doku ve hücre tiplerine farklılaşmasını yönlendiren proteinler olan büyüme faktörleri varlığında, insan diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin *in vitro* koşullarda fibroblastik ve epitelyal hücre dizilerine farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu araştırmada, insan diş pulpası dokusundan MKH'lerin izolasyonu, izole edilen MKH'lerin karakterizasyon çalışmaları, fibroblastik ve epitelyal hücre dizilerine *in vitro* koşullarda farklılaştırılmasına yönelik deneme çalışmaları ve farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesi için karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Kök hücre kültürü çalışmalarında, hücre kültürü çalışmaları için uygunluğu test edilmiş steril ve tek kullanımlık hücre kültürü malzemeleri kullanılmış ve işlemler laminar akışlı steril kabinde, steril koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Kontaminasyonun önlenmesi amacıyla; yapılan çalışmalar, bone, maske ve pudrasız cerrahi eldivenler kullanılarak, asepsi koşullarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyaller

3.1.1. iDP-MKH'lerin İzolasyonunda Kullanılan Materyaller

- Diş kesme seti (aerator ve frez)
- Steril ekskavatör ve steril pensler
- Kalsiyum –magnezyum içermeyen PBS (DPBC; Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-free- Gibco Invitrogen, Grand Island, USA; 14190)
- Penisilin/streptomisin (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA; 15140-122)
- α -MEM hücre kültürü vasatı (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA; 22571020)
- Hank's dengeleyici tampon çözeltisi (HBSS; Gibco Invitrogen, Grand Island, USA;14170)
- Fötal sığır serumu (FBS; Gibco Invitrogen, Grand Island, USA; 2012-10)
- Tip I kollajenaz (Sigma-Aldrich, USA; CO130)

iDP-MKH Besiortamının Hazırlanması

Diş pulpasından izole edilen kök hücrelerin kültivasyonunda, taze olarak %15 oranında fetal sığır serumu (FBS) ve %1 oranında penisilin/streptomisin ilave edilmiş α -MEM besiyeri kullanılmıştır. FBS, besi ortamına eklenmeden önce, partikül oluşumunun önlenmesi amacıyla sırasıyla 0,45 ve 0,22 μ m gözenek çaplı filtrelerden geçirilerek sterilize edilmiştir.

Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) Hazırlanması

8g NaCl + 0,2g KCl + 1,44g Na₂HPO₄ + 0,24g KH₂PO₄, 800ml distile su içinde çözülmüştür. pH7,4 olarak ayarlanmıştır. Distile su ile 1L'ye tamamlanmış ve solüsyon küçük kısımlara bölünerek, otoklavda 20 dk 15 lb/sq sıvı döngüde sterilize edilmiştir.

Kollajenaz Solüsyonunun Hazırlanması

%0,075'lik Kollajenaz Tip I solüsyonunun hazırlanması için; PBS içine 0,0375g kollajenaz Tip I eklenmiş ve 37°C çalkalamalı su banyosunda 10 dk bekletildikten sonra 0,22 μ m'lik filtre ile filtre edilerek "enzimatik sindirim" işleminde kullanılmıştır.

3.1.2. Alt-Kültür (Pasajlama) İşleminde Kullanılan Ayraçlar

- Kalsiyum – magnezyum içermeyen PBS (DPBC; Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-free-, Gibco Invitrogen, Grand Island, USA; 14190)
- Penisilin/streptomisin (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA; 15140-122)
- α -MEM hücre kültürü vasatı (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA; 22571020)
- Fetal sığır serumu (FBS; Gibco Invitrogen, Grand Island, USA; 2012-10)

- %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu (Gibco-BRL, Paisley, UK; 25200-056)
- % 0,5 tripan mavisi solüsyonu (Biological Industries, Beit Haemek, Israel; 03-102-1B)

3.1.3. Hücre Sayımında Kullanılan Ayraçlar

- Kalsiyum – magnezyum içermeyen PBS (DPBC Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-free- Gibco Invitrogen, Grand Island, USA; 14190)
- %0,5 tripan mavisi solüsyonu (Biological Industries, Beit Haemek, Israel; 03-102-1B)
- iDP-MKH besiortamı

3.1.4. iDP-MKH'lerin Dondurulması İşleminde Kullanılan Kimyasallar

- Kalsiyum – magnezyum içermeyen PBS (DPBC Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-free- Gibco Invitrogen, Grand Island, USA; 14190)
- Fötal sığır serumu (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA; 2012-10)
- Dimetilsülfoksit (DMSO; AppliChem, Darmstadt, Germany; D64291)
- %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu (Gibco-BRL, Paisley, UK; 25200-056)
- %0,5 tripan mavisi solüsyonu (Biological Industries, Beit Haemek, Israel; 03-102-1B)

3.1.5. Akış Sitometrik Analizlerde Kullanılan Antikor ve Kimyasallar

- %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu (Gibco-BRL, Paisley, UK; 25200-056)
- iDP-MKH besi ortamı
- %0,5 tripan mavisi solüsyonu (Biological Industries, Beit Haemek, Israel; 03-102-1B)
- CD45/CD14 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA; 342408)

- CD117 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA; 332785)
- CD11b (BD Biosciences Pharmingen, California, USA; 333142)
- HLA-DR/ CD13 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA; 333180)
- CD34 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA; 333178)
- CD44 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA; 555479)
- CD 90 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA; 555596)
- IgG1 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA; 345817)
- IgG1/G2a (BD Biosciences Pharmingen, California, USA; 342409)
- Hücre yıkama solüsyonu (*cell wash*, BD Biosciences Pharmingen, California, USA; 349524)
- Soğuk fosfat tampon solüsyonu (PBS; pH7.4)

3.1.6. İmmunohistokimyasal (İHK) ve İmmunofloresan (İF)

Çalışmalarda Kullanılan Antikor ve Kimyasallar

- CD31 (Santa Cruz Biotechnology Inc., California, USA; sc-1531)
- CD44 (Thermo Scientific, Rockford, USA; MS-668)
- CD105/reseptör AB-3 (Thermo Scientific, Rockford, USA; MS-1290)
- CD34 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA; sc-7045)
- CD45 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. , California, USA; sc-25590)
- CD71 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA; sc-7088)
- Aktin (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA; sc-8432)
- Anti-SSEA4 Monoklonal Antikoru (Chemicon International Inc., Temecula, CA; MAB4304)
- Tip II kollajen Ab-2 (Thermo Scientific, Rockford, USA; MS-235)
- GFAP Ab-1 (Thermo Scientific, Rockford, USA; MS-280)
- MyoD (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA; sc-71629)
- Miyozin IIa (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA; sc-53095)
- Miyogenin Ab-1 (Thermo Scientific, Rockford, USA; MS-1113)
- Fibronektin (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA; sc-8422)
- α -düz kas aktin Ab-1 (Thermo Scientific, Rockford, USA ;MS-113-P)
- Desmin (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA; sc-14026)

- Nestin (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA; sc-23927)
- Beta-3 tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA; sc-69965)
- Vimentin (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA; sc-7557)
- Osteokalsin (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA; sc-30044)
- Hidrojen peroksit (Carlo Erba, Milano, Italy; 412072)
- Metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 34885)
- İmmunohistokimya kiti (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA; rabbit ABC staining system, sc-2018)
- İmmunohistokimya Kiti (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA; mouse ABC staining system, sc-2017)
- İmmunohistokimyasal Mayer's Hematoksilen (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA; sc-24973)
- İmmunofloresan DAPI (Santa Cruz Biotechnology Inc., California, USA; sc-24941)

3.1.7. Hücre Canlılık ve Çoğalma (Proliferasyon) Testlerinde

Kullanılan Kimyasallar

- Fosfat tampon solüsyonu (PBS)
- MTT test kiti (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) kiti (Chemicon International Inc., Temecula, CA; CT01)
- iDP-MKH besi ortamı
- İzopropil alkol/HCl çözeltisi

3.1.8. Telomeraz Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Kimyasallar

- Kalsiyum – magnezyum içermeyen PBS (DPBC Ca⁺⁺ Mg⁺⁺-free-, Gibco Invitrogen, Grand Island, USA; 14190)
- iDP-MKH besi ortamı

- TRAP TeloTAGGG PCR enzim-işaretli immunoenzimatik yöntem (ELISA) kiti (Roche, Mannheim, Germany)

3.1.9. *In vitro* Osteojenik ve Adipojenik Farklılaştırma Çalışmalarında Kullanılan Antikor ve Kimyasallar

- Fötal sığır serumu (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA; 2012-10)
- İzobutil-metilksantin (IBMX) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; I5879-1G)
- Absolu etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 012K5426)
- Deksametazon (Fluka, Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland; 31381-1G)
- İnsülin (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA; 12585-014)
- Penisilin/streptomisin (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA; 15140-122)
- Streptavidin peroksidaz (Lab Vision Corporation, CA, USA; TS-125-HR)
- Antikor dilue edici solüsyon (Invitrogen-Zymed, San Francisco, CA; 00-3118)
- Oil red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; O0625-100G)
- Askorbat-2-fosfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; A8960-5G)
- β -gliserofosfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; G9891-10G)
- Alizarin kırmızısı (Fluka-Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland; 1283485)
- Osteokalsin (Santa Cruz Biotechnology Inc. California, USA; sc-30044)
- Osteonektin (Chemicon International Inc., Temecula, CA; AB1858)
- BMP4 (Santa Cruz Biotechnology Inc. California, USA; sc-6896)

%3'lük Oil Red O Solüsyonunun Hazırlanması

%3'lük oil red O solüsyonunun hazırlanması için; 300 mg oil red O, 100 ml izopropanol (%99) içinde çözülmüştür. Çalışma solüsyonu, bu stok solüsyonun 3/2 oranında distile su ile seyreltilmesi ile hazırlanmış ve 0,22 μ m gözenek çaplı filtre ile sterilize edilmiştir.

%0,02'lik Alizarin Kırmızısı-S Solüsyonunun Hazırlanması

0,4 mg alizarin kırmızısı-S, 20 ml distile suda çözülmüş ve 0,22µm filtre ile süzülmüştür. pH'nın 4.1-4.3 olarak ayarlanabilmesi için %10 oranında hidrojen peroksit eklenmiştir.

3.1.10. iDP-MKH'lerin Fibroblastik Farklılaşma Potansiyelinin Belirlenmesinde Kullanılan Büyüme Faktörleri ve Antikorlar

- İnsan epidermal büyüme faktörü (EGF; Chemicon International Inc., Temecula, CA; GF144)
- İnsan rekombinant transforme edici büyüme faktörü-β (TGF-β; Gibco Invitrogen, Grand Island, USA; PHG9204)
- İnsan rekombinant bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF; Gibco Invitrogen, Grand Island, USA; PHG0024)
- Fibronektin (Santa Cruz Biotechnology Inc. California, USA; sc- 8422)
- Fibroblast yüzey protein antikor (Abcam, Cambridge, UK; AB11333)
- Tenaskin C (Santa Cruz Biotechnology Inc. California, USA; sc-20932)
- Sitokeratin 18 (Santa Cruz Biotechnology Inc. California, USA; sc-32329)
- Vimentin (Santa Cruz Biotechnology Inc. California, USA; sc-7557)

3.1.11. iDP-MKH'lerin Epitelyal Farklılaşma Potansiyelinin Belirlenmesinde Kullanılan Büyüme Faktörleri ve Antikorlar

- Rekombinant insan keratinosit büyüme faktörü (KGF; Chemicon International Inc., Temecula, CA; GF008)
- Rekombinant insan insülin-benzeri büyüme faktörü-II (IGF-II; Chemicon International Inc., Temecula, CA; GF007)

- Rekombinant insan hepatosit büyüme faktörü (HGF; Chemicon International Inc., Temecula, CA; GF116)
- İnsan epidermal büyüme faktörü (EGF; Chemicon International Inc., Temecula, CA; GF144)
- Ki67 antikor-proliferasyon belirteci (Abcam, Cambridge, UK; AB15580)
- Sitokeratin 18 (Santa Cruz Biotechnology Inc. California, USA; sc-32329)
- Vimentin (Santa Cruz Biotechnology Inc. California, USA; sc-7557)

3.1.12. Tez Çalışmasında Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri

- 0,22 µm filtre (Sartorius, Goettingen, Germany; 16534)
- 70 µl hücre süzgeci (*Cell Strainer*, BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA; 352340)
- 15 ml konik kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA; 352096)
- 50 ml konik kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA; 352098)
- 25cm²'lik hücre kültür flaskları (BD Biosciences Labware, Le Pont De Claix, France; 353108)
- 75cm²'lik hücre kültür flaskları (BD Biosciences Labware, Le Pont De Claix, France; 353110)
- 6 kuyucuklu plakalar (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA; 353046)
- 96 kuyucuklu mikroyuvarlak (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA; 353072)
- Poli-L-lizin kaplı 8 kuyucuklu hücre kültür odacıkları (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA; 354108)
- Tip I kollajen kaplı lameller (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA; 354089)
- Doku kültürü kapları (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA; Tissue Culture Dish-3530002)

- Pipet tutucu (200-1000 µl) ve pipet uçları (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Çok kanallı pipet ve pipet uçları (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Tek kullanımlık steril pipetler (2.5, 5 ve 10 ml'lik) (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA)
- Kriyotüpler (Greiner-bio-one, Carolina, USA; 2013-12)
- Hücre sayım kamarası (Thoma Lamı)
- Lamel (22x22mm)
- Deney tüpleri
- Alüminyum folyo
- Buz kalıpları
- Boş beher (atık için)
- Laboratuar kalemi
- %70 alkol
- Distile su
- Steril pudrasız cerrahi eldiveni
- Bone
- Maske

3.1.13. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

- CO₂ inkübatör (Sanyo, Etten Leur, The Netherlands)
- Laminar akışlı steril kabin (Class II, Heraeus, Hanau, Germany)
- Inverted mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan; CKX41)
- PCR cihazı (Takara Bio Inc., Shiga, Japan Gradient PCR)
- Monokromatik sistemli mikrolaka okuyucu (VersaMax, Molecular Device, USA)
- Binoküler mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany; CME)
- Vorteks (Labart, Berlin, Germany; MVS1)
- Soğutmalı santrifüj (Universal 320 R, Hettich, Germany)
- Masaüstü santrifüj (Sigma, Osterode, Germany; 2-16PK)
- Mikrosantrifüj (Sigma, Osterode, Germany; 1-14 ve Hettich, Gartenstr, Germany; Micro 120)

- Isıtmalı manyetik karıştırıcı (Heildoph Electro GmbH&Co., Kelheim, Germany; MR Hei-Standard)
- Hassas terazi (Shimadzu, Makati, Philippines; AW120 model)
- 37°C su banyosu (Nüve, Ankara, Türkiye; ST 402)
- Floresan mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany; DMI 4000)
- FACS *Calibur* akış sitometri cihazı (BD Biosciences, California, USA)
- BD *Cell Quest* TM *software* programı (BD Biosciences, California, USA)
- Ortam saklama dolabı (+4°C) (Sanyo, Etten Leur, The Netherlands; SRR-49FD-MEDE)
- -86 derin dondurucu (Sanyo, Etten Leur, The Netherlands; MDF-U5386S Model)
- -20 derin dondurucu (Beko, Istanbul, Türkiye; D 7210)
- Buz yapma makinesi (Scotsman, Milan, Italy; AF 80)
- Bidistile su cihazı (GFL, Burgwedel, Germany; 2104)
- pH metre (WTW Inolab, Weilheim, Germany; PH720 Set)
- Sıvı azot tankı (MVE Chart Industries, Minnesota, USA)

3.2. Yöntemler

3.2.1. iDP-MKH'lerin İzolasyonu

Bu tez çalışmasında, İstanbul Üniversitesi İAEK 14/21 no'lu etik kurulu onayı alındıktan sonra çalışmaya dahil edilen tüm bireylere, hazırlanmış olan “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” imzalatılmıştır. İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahi Anabilim Dalı polikliniklerinde, gömük, gömülü diş, basınç ağrısı, dişin pozisyonunun bozuk olması ve/veya ortodontik sebeplerle diş çekim endikasyonu uygun görülen gömük yirmi yaş dişleri, 5 sağlıklı bireyden alınmıştır. Dişlerin çekimi etik ve asepsi kurallarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Diş çekimi sonrası alınan dişlerin yüzeyleri, %70'lik alkolle temizlendikten sonra konik kapaklı tüpler içindeki %5 oranında penisilin/streptomisin içeren α -MEM besiyeri içine alınarak, buz kalıpları içinde, çalışmanın gerçekleştirildiği Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma Merkezi'ne getirilmiştir.

Pulpa dokusunun açığa çıkartılması ve MKH izolasyonu için, Gronthos ve ekibinin (2000; 2002) metodu kullanılmıştır. Pulpa dokusunun açığa çıkartılması işlemi, Kocaeli Üniversitesi Mediko Sosyal Hizmetler Ünitesi'nde gerçekleştirilmiştir. Dişlerin yüzeyindeki gingival ve periodontal dokular kazınarak uzaklaştırılmıştır. Dişler, sterilizasyon amacıyla, alkolden geçirilerek, steril gazlı beze sarılmış ve pulpa izolasyonu için dişin açılması işlemine geçilmiştir. Diş yüzeyi üç kere %5 oranında penisilin/streptomisin içeren PBS ile yıkanarak temizlenip, diş frezi kullanılarak dişin mine-sement bağlantı bölgesinden kesim yapıldıktan sonra diş kırılarak pulpa dokusu, steril pensler ve steril diş ekskavatörü ile doku zedelenmeden yavaşça ayrılmıştır. Pulpa dokuları %5 oranında penisilin/streptomisin içeren α -MEM besiyerine alınarak, Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavi Araştırma ve Uygulama Merkezi Hücre Kültürü Laboratuvarı'na getirilmiştir.

İnsan diş pulpası dokusundan MKH'lerin izolasyonu için; açığa çıkarılmış olan pulpa dokusu, 2 mg/ml'lik tip 1 kollajenaz solüsyonu içerisine koyularak (her bir pulpa için 2 ml olmak üzere), pulparlar parçalanıncaya kadar (yaklaşık 1 saat) 37°C su banyosunda bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda tüpler vortekslenerek, hücrelerin doku parçacıklarından ayrılıp, tek hücre süspansiyonu haline gelmesi sağlanmıştır. Sindirilmiş pulpa materyalini içeren solüsyon 70µm'lik gözenekleri olan hücre süzgecinden geçirilmiştir. Ayrıştırılan hücrelerin bulunduğu 15ml'lik konik tabanlı tüplere Hank's dengeleyici tampon çözeltisinden (HBSS) 5 ml eklenerek, 1300rpm'de 5dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak, 5ml HBSS eklenmiş ve tekrar 1300rpm'de 5dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Son yıkama işleminden sonra elde edilen hücreler %15 oranında FBS ve %1 oranında penisilin-streptomisin içeren α-MEM besiyerinde (T-25 kültür kaplarında) 37°C, %5 CO₂ ve nemli ortamda (CO₂ inkübatöründe) kültüre alınmıştır.

Yaklaşık 48 saat sonra besiyeri değiştirilerek kültür kabının tabanına tutunmayan hücreler uzaklaştırılmıştır. Sonraki günlerde düzenli olarak objektifleri ters çevrilmiş (inverted) mikroskopta kontrol edilmiş ve haftada 2 kez olmak üzere besi yerleri değiştirilmiştir.

3.2.2. Alt-Kültür (Sub-Kültür) İşlemi (Pasajlama)

Yaklaşık 16-18 gün sonra kültür kabının tabanı %70-80 oranında hücrelerce doldurulduğunda (%70-80 konfluente ulaşıldığında) alt-kültür işlemine geçilmiştir. Birincil kültür sıfırncı pasaj (P0) kabul edilerek, birincil kültürü takip eden her alt-kültür işlemi sonrası pasaj sayıları P1, P2, P3, P4 şeklinde belirtilmiştir.

Laminar akışlı steril kabinde gerçekleştirilen alt-kültür işleminde; besi ortamı ve içindeki tutunmayan hücreler döküldükten sonra, flask yüzeyleri 3-4 ml Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen PBS ile yıkanmıştır. 1.5-2 ml %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek, CO₂ inkübatörde 4-5dk inkübe edilmiştir. Mikroskopta hücrelerin tümünün yüzeyden ayrıldığı gözlemlendikten sonra, tripsinin inaktivasyonu için flasklara, 4ml besi ortamı eklenmiştir. Daha sonra hücreler

15ml'lik konik tabanlı tüplere alınmış ve 1300rpm'de 5dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra, pelete 1ml besi ortamı eklenip, pipetlenerek homojenizasyonun sağlanmasının ardından, hücre sayımı için eppendorf tüpüne mikropipetle 100µl hücre süspansiyonu alınmıştır. Hücre süspansiyonunun üzerine, mikropipetle 100µl tripan mavisi solüsyonu eklenmiştir. Işık mikroskopunda hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayımı gerçekleştirilen hücreler, uygun oranda besi ortamıyla seyreltilerek, 1×10^6 hücre yoğunluğunda 75cm²lik hücre kültür flasklarına (T-75 kültür kaplarına) ekilmiş ve 3 günde bir besi ortamı değiştirilerek, kültür işlemi devam ettirilmiştir (Freshney et al., 2007; Karaöz vd. 2009).

3.2.3. iDP-MKH Kültüründe Hücre Sayımı

Diş pulpasından izole edilen kök hücreler için her alt-kültür işlemi sırasında, dondurma ve çözündürme işlemleri sonrasında ve karakterizasyon işlemleri öncesinde gerçekleştirilen hücre sayımları Karaöz ve ekibinin (2009) metoduna uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Hücre sayımı için; tripsinizasyon işlemi ile tutunan hücreler yüzeyden kaldırıldıktan sonra süpernatant atılarak, pelete 1 ml besi ortamı eklenmiş ve pipetle homojenizasyon sağlanmıştır. Eppendorf tüplerine 100µl hücre süspansiyonu alınmıştır. Hücre süspansiyonunun üzerine, mikropipetle 100µl tripan mavisi solüsyonu eklenmiştir. Sayım kamarası olarak Thoma lamı kullanılmıştır. Thoma lamı, düz bir zemin üzerine alınarak, lamelin yapışması gereken sayım alanı çerçevesi üzerine lamel kapatılmıştır. Hazırlanan süspansiyondan 50µl alınarak, Thoma lamının her iki yanında bulunan kanalların ortasında kalan sayım alanında lamelin lam ile birleştiği noktaya pipetin ucu dayanarak tam orta noktasından yavaşça hücre solüsyonu sayım alanına pipetlenmiştir. Hücre sayımı, ışık mikroskopunda, 40x objektifte gerçekleştirilmiştir.

Toplam hücre sayıları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$Hs \times Do \times Ss$$

Hs : Sayılan hücre sayısı

Do : Seyreltme oranı

Ss : $0,1 \text{ mm}^3$ deki sayım sonucu 1ml'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılır. Sabit sayı 10 000'dir.

3.2.4. iDP-MKH'lerin Dondurularak Saklanması

İnsan diş pulpasından izole edilen MKH'ler, her alt-kültür işlemi sonrası dondurularak, -196°C 'de sıvı nitrojen tankına alınarak saklanmıştır. Dondurma işlemi öncesi, %60 oranında besi ortamı, %35 oranında FBS ve %5 oranında dimetilsülfoksit (DMSO) içeren dondurma besi ortamı hazırlanmıştır. Besi ortamı hazırlanırken, 15ml'lik konik vida kapaklı tüp içerisine, solüsyon hacmi 10ml olacak şekilde, 5ml FBS, 4ml α -MEM besiyeri ve 1ml DMSO eklenmiştir. İşlem sırasında, DMSO en son ve damlalar halinde eklenirken, işlem öncesi tüpler ve besi ortamı ve FBS karışımı soğutulmuştur.

Dondurma işlemi öncesi, hücre kültür flasklarının yüzeyini %70-80 oranında kaplayan hücreler, tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp santrifüj edildikten sonra, daha önce hazırlanan dondurma ortamı damla damla tüplere eklenmiş ve hücre peleti ile karıştırılarak, pipetle homojenizasyonu sağlanmıştır. Her kriyotüpe bu süspansiyondan 1ml alınmıştır. Tüpler -80°C 'de bir gece bekletildikten sonra daha önceden belirlenmiş sıvı nitrojen tankındaki yerlerine transfer edilmiştir (Karaöz vd. 2009).

3.2.5. iDP-MKH'lerin Karakterizasyon Çalışmaları

İnsan diş pulpasından izole edilen ve kültür kabının tabanına yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri çalışma süresince zıt faz mikroskobu ile incelenmiştir. İmmunofenotipik özelliklerin belirlenmesi için akış sitometrik

analizler, İHK ve İF çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kültüre edilen MKH'lerin canlılık ve çoğalma kapasitelerinin tespit edilmesi için MTT testi uygulanmıştır.

Akış Sitometrik Analizler

iDP-MKH'lerin, fenotipik karakteristiklerinin belirlenmesi için akış sitometrik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu analizler, her alt-kültür işlemi sonrasında (P1'den P5'e kadar) ve *FACS Calibur* akış sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Her alt-kültür işlemi sırasında (P1'den P5'e kadar) hücreler tirpsinizasyon işlemi ile kaldırılıp, hücre sayımı yapılarak hücre sayısı belirlendikten sonra bir kısmı bir sonraki pasaj için yeni T75 flasklara ekilirken bir kısmı da (yaklaşık olarak 8×10^6 hücre) PBS içinde homojenize edilmiştir. Daha sonra belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel fluoressan izotiyosiyonat (FITC)- ve fikoeritrin (PE)-konjuge monoklonal antikolar (CD45, CD14, CD117, CD11b, HLA-DR, CD34, CD13, CD44 ve CD 90) ve uygun izotip kontrollerinden (IgG1, IgG1/G2a) 10µl eklenerek inkübe edilmiştir (oda ısısında-karanlıkta-45 dak.). İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (%0.1 sodyum azid içeren PBS) eklenmiş ve santrifüj edilerek (5dk. 1780rpm) artefaktlardan temizlenmiş ve 400µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edilmiştir. Hazırlanan hücre süspansiyonu *FACS Calibur* akış sitometri cihazında okutulmuş ve analizi *BD Cell Quest TM software* programı ile gerçekleştirilmiştir (Gronthos et al., 2002; Lei et al., 2007; Karaöz vd. 2009).

İHK ve İF Çalışmaları

iDP-MKH'lerin immunohistokimyasal yöntemlerle karakterizasyon çalışmaları, P1, P3 ve P4'de poli-L-lizin kaplı 8 kuyucuklu hücre kültür odacıklarına ekilmiş 2×10^5 hücre/kuyucuk ile gerçekleştirilmiştir. Tutunmanın sağlanması için bir gece inkübasyonun ardından İHK ve İF işlemlerine geçilmiştir.

iDP-MKH'lerin immunohistokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için; CD31, CD34, CD45, CD71, CD105, CD44, CD105, aktin, SSEA4, tip II kollajen, GFAP, MyoD, miyozin IIa, miyogenin, nestin, vimentin, osteokalsin, osteonektin ve Ki67 proliferasyon belirteci için İHK ve fibronektin, α -düz kas aktin, desmin, nestin, beta tubulin, osteokalsin ve vimentin İF boyamaları gerçekleştirilmiştir. İmmunohistokimyasal çalışmalarda, uygun bir immunohistokimya kiti ve bu kitle uyumlu biyotinli sekonder antikorlar kullanılmıştır.

Hücreler immunohistokimyasal çalışmalar için %0.1 oranında H₂O₂ içeren metanolde endojen peroksidaz aktivitesini engellenmesi için, oda ısısında (nemli ortamda) 30dk. süreyle inkübe edilmiştir. PBS ile yıkandıktan sonra, %1.5 normal blok serum içeren PBS'de 30dk. inkübe edilmiş ve verilen uygun dilüsyon oranlarında primer antikor eklenmiş ve +4°C'de 1 gece ve oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edilmiştir. PBS ile 3 kez yıkama işleminden sonra immunohistokimyasal çalışmalar için uygun biyotinli sekonder antikorla ve immunfloresan çalışmalar için uygun floresan (FITC) işaretli sekonder antikorla oda sıcaklığında 30dk. inkübe edilmiştir. Son aşamada, immun-reaksiyon gösteren hücrelerin belirlenmesi için %0.1'lik Mayer's hematoksilen (immunohistokimyasal) çekirdek zıt boyaması ve DAB (immunfloresan) immun-boyamaları gerçekleştirilmiş ve lam üzerine kapatılmıştır. Negatif kontroller için, aynı yöntem uygulanmış fakat primer antikor yerine PBS kullanılmıştır. Örnekler, floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflanmıştır (Freshney et al., 2002; Karaöz vd., 2009).

Hücre Canlılık ve Çoğalma Testleri

iDP-MKH'lerin canlılık ve proliferasyonlarını tespit etmek için "MTT canlılık testi" uygulanmıştır. Canlı ve apoptozisin erken evresindeki hücrelerin mitokondriyalar aracılığıyla MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) solüsyonuyla oluşturduğu reaksiyonda, MTT'nin tetrazolyum halkası hücrelerin mitokondriyalarında bulunan dehidrojenaz enzimlerince parçalanarak mor renkli formazan kristalleri oluşturmakta, ölü

hücreler formazan kristalleri oluşturmamaktadır. Oluşan renk mitokondriyal aktiviteyle ilişkili olup, oluşan formazan kristalleri izopropanol/ HCl içeren çözücülerde çözülebilmektedir ve oluşan mavi/mor renk spektrofotometrik yöntemle (mikroplaka okuyucuda) 570 nm de ölçülmektedir.

P3'deki iDP-MKH'ler, hücre kültür kaplarını %70-80 oranında doldurduğunda, MTT testine alınmıştır. Alt-kültür işlemi sonrası iDP-MKH'ler (P3), 6 kuyucuklu kültür kaplarına 12.500 hücre/kuyucuk olacak şekilde ve 1., 4., 7., 11., 14., 17., 21. ve 24. gün uygulamaları için ekilmiştir. Her test günü, istenen kuyucuktaki hücreler 3-4 ml PBS ile yıkanmış ve 1dk bekletilip PBS uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, 2ml tripsin eklenmiş ve örnekler 5-6dk inkübatörde bekletilmiştir. Zıt faz mikroskobu ile hücrelerin yüzeyden ayrılıp-ayrılmadığı kontrol edilmiştir. Hücreler konik tabanlı 15ml'lik tüpe alınıp üzerine tripsinle aynı miktarda besi ortamı (FBS içeren) eklenmiştir. 1300rpm'de 5dk santrifüjasyonun ardından süpernatant atılmış ve 100µl besi ortamı eklenerek pipetlenmiştir.

MTT testi için, kör olarak hücre kültüründe kullanılmamış taze besi ortamı ve standart olarak süpernatant kullanılmıştır. Buharlaştırmanın engellenmesi için, 96 kuyucuklu plakaların en dış sıralarına serum fizyolojik pipetlenmiştir. Serum fizyolojik, besi ortamı ve hücreler 96 kuyucuklu plakalardaki yerlerine pipetlenmiştir. Karanlık ortamda üzerine 0.5mg/ml MTT solüsyonu eklenmiştir. Alüminyum folyoya sarılarak inkübatörde 4 saat bekletilmiştir (37°C'de). İnkübasyon sonrası solüsyon çıkartıldıktan sonra 100µl izopropanol-HCl her kuyucuğa eklenmiş, oda ısısında 30dk süreyle bekletilmiş ve absorbans 570nm'de dalga boyu seçicisi (monokromatör) sistemli mikroplaka okuyucuda tespit edilmiştir. Her deney 3 kez tekrarlanmıştır (Jiang et al., 2002; Karaöz vd., 2009).

3.2.6. *In vitro* Farklılaştırma Çalışmaları

In vitro Adipojenik Farklılaşma

Adipojenik farklılaştırmanın uyarılabilmesi için, üçüncü pasajdaki hücreler 3000hücre/cm² yoğunlukta, 6-kuyucuklu plakalarda yuvarlak lamellere ekilmiştir. Adipojenik farklılaştırma besi ortamı olarak, %10 oranında FBS, 0.5mM oranında isobutil-metilksantin, 10⁻⁶M oranında deksametazon, 10µg/ml oranında insulin, 200µM oranında indometazin ve %1 oranında penisilin/streptomisin eklenmiş MEM besiyeri kullanılmıştır ve besi ortamı haftada iki kez değiştirilerek hücreler 4 hafta kültüre edilmiştir. Kültürün 4. haftasının sonunda, lameller kaldırılmış ve adipojenik farklılaşmayı gösteren intrasellüler yağ damlacıklarının varlığının belirlenmesi için vimentin ve oil red O ve çekirdek boyası olarak da DAPI boyamaları gerçekleştirilmiştir.

Oil Red O boyaması için; koverslipler %4'lük paraformaldehitte 30dk muamele edildikten sonra, PBS ve distile su ile yıkanmıştır. İzopropanolda (%60) 5dk bekletilmiş ve kurumaya bırakılmıştır. Örnekler, oil red O solüsyonu ile 50dk ve daha sonra %30'lük izopropanol ile muamele edilmiştir. Distile su ve PBS ile yıkamanın ardından blok serumda 30dk bekletilmiştir. Uygun primer antikorlarla 60dk muamelenin ardından 3 kere PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Seçilen sekonder antikorlarla 20dk muamele edilmiş ve 3 kere PBS ile yıkanmıştır. Kurutulduktan sonra lam kapatılarak mikroskopta incelenmiştir. Gerçekleştirilen immun-boyamalar sonucunda, yağ damlacıklarının kırmızı renkte, vimentin ekspresyonunun yeşil renkte ve hücrelerin nükleuslarının açık mavi renkte gözlenmesi beklenmiştir (Gimble et al., 2008; Zhang et al., 2006).

In vitro Osteojenik Farklılaşma

Osteojenik farklılaşma için P3'deki iDP-MKH'ler, 3000hücre/cm² yoğunlukta, 6 kuyucuklu plakalarda tip I kollajen kaplı lamellere ekilmiştir. Farklılaştırma besi ortamı olarak, %10 oranında FBS, 100nM oranında

deksametazon, 0.05 μ M oranında askorbat-2-fosfat, 10mM oranında β -gliserofosfat, %1 oranında penisilin/streptomisin eklenmiş MEM besiyeri kullanılmış ve besi ortamı haftada iki kez değiştirilerek hücreler 4 hafta kültüre edilmiştir. Kültürün 4. haftasının sonunda lameller hücre dışı kalsifikasyonun (primer kemik nodüllerinin) histokimyasal olarak gösterilmesi amacıyla alizarin kırmızısı ile boyanmıştır. Ayrıca, osteojenik farklılaşmanın geç evrelerinin tanımlanması için osteokalsin, osteonektin ve BMP4 immun boyamaları gerçekleştirilmiştir.

Alizarin kırmızısı boyaması için; lameller, 5dk %70 alkol ile yıkanmıştır. Distile su içine 20 kez batırıldıktan sonra alizarin kırmızısı solüsyonu ile 45sn muamele edilmiştir. Örnekler, önce asetona, daha sonra ksilol-aseton karışımına ve son olarak ksilol içine 20 kez batırılıp çıkartılmıştır. Karanlık ortamda kurumaya bırakıldıktan sonra lam üzerine kapatılarak mikroskopta incelenmiştir (Jaiswal et al., 1997; Takeyasu et al., 2004; Gronthos et al., 2002).

3.2.7. iDP-MKH'lerin Fibroblastik ve Epitelyal Hücrelere Farklılaştırılması

iDP-MKH'lerin epitelyal ve fibroblastik hücre dizilerine farklılaştırma çalışmalarında, P1'de dondurulmuş (-86⁰ ve -196⁰C'de depolanmış) iDP-MKH'ler "hızlı çözdürme yöntemi" kullanılarak, çözüldükten sonra kültür kaplarına (T-75) ekilmiştir (Karaöz vd., 2009). Hücreler kültür kabı yüzeyini %80 oranında kapladığında alt-kültür işlemleri gerçekleştirilerek, üçüncü pasaja kadar kültürler devam ettirilmiştir. P3'deki iDP-MKH'ler kültür kaplarını %80 oranında doldurduğunda, kültür kabının yüzeyine tutunmuş olan hücreler %0.25 tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırıldıktan sonra kültür besi ortamı içeren tüplere aktarılıp santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası pelet besi ortamıyla homojenize edilerek, hücreler sayıldıktan sonra 6 kuyucuklu plakalarda, tip I kollajen kaplı lamellere 3x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir ve %70-80 oranında yüzeyi kapladığında (1-2 gece inkübasyonun ardından) besi yerleri boşaltıktan sonra, PBS ile iki kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Her iki farklılaştırma modeli için de, hücre sayıları, pasaj numarası (P3), inkübasyon koşulları (%5 CO₂

ve 37°C) ve temel besi ortamı (%10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren α -MEM besiyeri) sabit parametreler olarak kabul edilmiştir. Kimyasal uyarım çalışmalarında, seçilen büyüme faktörlerinin oranları, besi ortamına eklenme zamanları ve kültür süreleri çalışmanın değişken parametreleridir. Çizelge 3.1'de deneysel çalışmalar için belirlenen, değişken ve sabit parametreler gösterilmiştir.

Diş pulpasından izole edilen MKH'lerin fibroblastik hücre dizilerine farklılaştırılmasına yönelik deneysel çalışmalar, Moreau ve ekibinin (2005) gerçekleştirdikleri çalışmada uyguladıkları yöntemler incelendikten sonra değiştirilerek tasarlanmıştır. iDP-MKH'lerin (P3) fibroblastik farklılaşmalarının uyarılabilmesi için, iki farklı deney grubu tasarlanmıştır. 1. deneme çalışmasında, hücreler %10 oranında FBS, 1ng/ml oranında bFGF ve %1 antibiyotik eklenmiş α -MEM besiyerinde kültüre edilmiştir ve kültürün 7. gününde besiyerine 5ng/ml oranında TGF- β eklenerek, kültür işlemi 3-4 hafta boyunca devam ettirilmiştir. 2. deneme çalışmasında, hücreler %10 oranında FBS, 1ng/ml oranında EGF ve %1 antibiyotik eklenmiş α -MEM besiyerinde kültüre edilmiş ve kültürün 7. gününde besiyerine 5ng/ml oranında TGF- β eklenerek, 3-4 hafta kültür devam ettirilmiştir. Her iki deney grubu için negatif kontrol olarak kullanılacak olan iDP-MKH'ler, %10 oranında FBS ve %1 oranında penisilin/streptomisin içeren α -MEM besiyerinde aynı koşullarda kültüre edilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmanın parametreleri

Sabit Parametreler		Değişken Parametreler	
1. Hücre sayısı ve pasaj numarası (P3)		<u>Fibroblastik Farklılaşma Çalışmaları</u>	<u>Epitelyal Farklılaşma Çalışmaları</u>
2. Kültür kapları		1. Kültür Süresi 21 gün/28 gün	1. Kültür Süresi 21 gün/28 gün
3. Besi ortamı değiştirme sıklığı		2. TGF- β 5ng/ml, 5ng/ml (7.gün)	2. KGF 10ng/ml, 10ng/ml
4. Serum/Vasat tipi (%10 FBS içeren α -MEM)		3. bFGF 1ng/ml, 0ng/ml	3. EGF 20ng/ml, 20ng/ml
5. İnkübasyon ortamı (%5CO ₂ , 37°C)		4. EGF 1ng/ml, 0ng/ml	4. HGF 10ng/ml, 0ng/ml
			5.IGF-2 50ng/ml (1.gün,4.gün)

iDP-MKH'lerin epitelyal hücre dizilerine farklılaştırılmasına yönelik deneysel çalışmalar, Păunescu ve ekibinin (2007) gerçekleştirdikleri çalışma verileri incelendikten sonra değiştirilerek tasarlanmıştır. Bu çalışmada, kemik iliğinden izole edilen MKH'lerin büyüme faktörleri varlığında epitelyal hücre

dizilerine farklılaştırılması amaçlanmış ve olumlu veriler elde edilmiştir. iDP-MKH'lerin (P3) epitelyal farklılaşmasının uyarılabilmesi için, bu veriler göz önünde bulundurulmuş ve çalışmanın tasarımında bazı değişiklikler yapılarak, 2 farklı deney grubu tasarlanmıştır. 1. deneme çalışmasında, hücreler %10 oranında FBS, 10ng/ml oranında KGF (keratinosit büyüme faktörü), 20ng/ml oranında EGF, 10ng/ml oranında HGF ve %1 oranında antibiyotik içeren α -MEM besiyerinde kültüre edilmiş ve kültürün 4. gününde besiyerine 50ng/ml oranında IGF-2 eklenerek, kültür işlemi 3-4 hafta boyunca devam ettirilmiştir. 2. deneme çalışmasında, hücreler %10 oranında FBS, 10ng/ml oranında KGF, 20ng/ml oranında EGF, 50ng/ml oranında IGF-2 ve %1 oranında antibiyotik içeren α -MEM besiyerinde 3-4 hafta kültüre edilmiştir. Deneysel çalışmalar için tasarlanan deney grupları Çizelge 3.2'de listelenmiştir.

Çizelge 3.2. Deneysel çalışmalar için tasarlanan deney grupları

1. Fibroblastik Farklılaşma (FF) Çalışmaları
FF Deney 1: bFGF + TGF- β içeren α -MEM besiyerinde kültüre edilmiş iDP-MKH'ler
FF Deney 2: EFGF + TGF- β içeren α -MEM besiyerinde kültüre edilmiş iDP-MKH'ler
Negatif Kontrol: büyüme faktörü içermeyen α -MEM besiyerinde kültüre edilmiş iDP-MKH'ler
Pozitif Kontrol: insan sünnnet derisinden izole edilen fibroblastlar

2. Epitelyal Farklılaşma (EF) Çalışmaları
EF Deney 1: KGF + EGF + HGF + IGF-2 içeren α -MEM besiyerinde kültüre edilmiş iDP-MKH'ler
EF Deney 2: KGF + EGF + IGF-2 içeren α -MEM besiyerinde kültüre edilmiş iDP-MKH'ler
Negatif Kontrol: büyüme faktörü içermeyen α -MEM besiyerinde kültüre edilmiş iDP-MKH'ler (negatif kontrol)

Farklılaşma besi ortamlarına alınan iDP-MKH'ler, kültürün 3. ve 4. haftasının sonunda, 6 kuyucuklu plakalardaki besi ortamları boşaltıldıktan sonra, steril bir pens yardımıyla lameller kaldırılarak İHK ve İF çalışmaları için immunohistokimya laboratuvarına getirilmiştir. Ayrıca kültürün 4. haftasının sonunda, lamellerde yoğun hücre katmanlarının gözlenmesi nedeniyle her grup için, 6 kuyucuklu plakaların 2'ser gözündeki lamellerin yüzeyine tutunmuş hücreler, tripsinizasyonla kaldırılarak 8 kuyucuklu hücre kültür odacıklarına ekilmiştir. iDP-MKH'lerin fibroblastik farklılaşma potansiyellerinin

belirlenebilmesi için, CD31, CD44, CD105, tip II kollajen, fibronectin, fibroblast yüzey proteini, GFAP, β -integrin, nestin, vimentin ve tenaskin immun-boyamaları gerçekleştirilmiştir (Gronthos et al., 2000; Klein et al., 2003; Brendal et al., 2005; Chen et al., 2007; Danisovic et al., 2007; Suzdal'tseva et al., 2007). Çalışmanın bu aşamasında, morfolojik ve histokimyasal olarak benzerlik gösteren MKH'ler ve fibroblast hücrelerinin karşılaştırılması da amaçlanmıştır ve bu nedenle insan sünnet derisinden izole edilen fibroblastlar pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Epitelyal farklılaşma besi ortamında kültüre edilen iDP-MKH'lerin farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesi için ise, sitokeratin 18, sitokeratin 19, nestin, vimentin ve fibronectin immun-boyamaları gerçekleştirilmiştir (Poulsomet al., 2001; Spees et al., 2003; Brzoska et al., 2005; P˘aunescu et al., 2007). iDP-MKH'lerin hücre dizilerine farklılaştırılması çalışmalarında, kimyasal uyarana maruz bırakılmamış (kültür ortamına büyüme faktörü eklenmemiş) iDP-MKH'ler negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.8. Telomeraz Aktivitesinin Belirlenmesi

Epitelyal ve fibroblastik somatik hücre dizilerine farklılaştırılması amaçlanan iDP-MKH'lerin ve uyarılmamış iDP-MKH'lerin telomeraz aktivite ölçümleri telomerik tekrar amplifikasyonu (TRAP) metodu ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir. Telomeraz aktiviteleri, TRAP TeloTAGGG PCR enzim-işaretli immunoenzimatik yöntem (ELISA) kiti kullanılarak ve kit protokolüne uygun şekilde belirlenmiştir.

Her reaksiyon için 2×10^5 hücre eppendorf tüplerine alındıktan sonra 3000g'de 5dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak, PBS ile yıkamanın ardından tekrar 3000 g'de 5dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem üç kere tekrarlanarak, 200 μ l soğuk lizis solüsyonu soğuk buz üstünde pipetleterek eklenmiş ve buz üstünde 30dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, 16000g'de 20dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant ayrı bir tüpe aktarıldıktan sonra her çalışma için 3 μ l hücre süspansiyonu, PCR tüplerine alınmıştır. Protein tayini çalışmalarında her farklı örneğin üç kere çalışabilmesi için yeterli miktar hücre süspansiyonu (60-70 μ l) ayrılmıştır. Telomeraz aktivitelerinin gözlenebilmesi için, hücre

ekstraktları iki farklı primer (biotin-işaretli, dNTP ve Taq DNA polimeraz) içeren tampon karışımı ile 25°C 'de 20 dk inkübe edilmiştir. Bu reaksiyon, telomerazın biyotin-işaretli sentetik primerlerin sonuna telomerik tekrarları eklemesine olanak sağlamıştır. Ürünlerin çoğaltılması amacıyla PCR cihazında, 94°C'de 5dk, bunu takiben 30 siklus süresince 94°C'de 30sn, 50°C'de 30sn, 72°C'de 90sn ve son uzama aşaması için 72°C'de 10dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Ürünler denatüre edilerek, telomerik tekrar-spesifik sekansların belirlenebilmesi için digoksjenin (DIG)-işaretli bir proba karıştırılmıştır. Karışım mikropalakaların streptavidin-kaplı kuyucuklarında inkübe edilmiştir. Son olarak, DIG-işaretli hibritler peroksidazla konjuge edilmiş anti-DIG antikoru ve bir kromojenik substratla (TMB) görünür hale getirilerek 20dk sonra reaksiyon sonlandırılmıştır. Absorbans ölçümleri, ELISA mikropalaka okuyucuda ve 450nm'de fotometrik olarak gerçekleştirilmiştir.

Protein miktar tayini, "BCA yöntemi" ile gerçekleştirilmiştir (Stoscheck, 1990; Walker, 2002). BCA solüsyonu, 2ml BCA (*Bicinchoninic Asit Solüsyonu*) ve 40 µl bakır sülfat solüsyonu ile hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikropalakalara kör olarak 20µl distile su konulmuştur. Standart için, 0,5µl, 1µl, 1,5µl, 2µl, 2,5µl, 3µl standart BSA solüsyonu eklendikten sonra, distile su ile 20µl'ye tamamlanarak hazırlanan dilüsyonlar 96 kuyucuklu mikropalakalarda ayrılan gözlere konulmuştur. Örneklerin çalışılacağı gözlere 20µl örnek konulmuştur. BSA solüsyonu eklenen ve örneklerin konulduğu tüm gözlere, 200µl BCA solüsyonu eklenmiştir ve 1 saat 37°C'de inkübasyonun ardından 562nm'de mikropalaka okuyucuda absorbans değerleri okutulmuştur. Her çalışma 3 kere tekrarlanmıştır.

3.2.9. İnsan Sünet Derisi Dokusundan Fibroblastların İzolasyonu ve Kültür İşlemleri

iDP-MKH'lerin fibroblastik farklılaşmasının belirlenmesinde, sünet derisi dokusundan izole edilen fibroblastlar pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Gerekli doku, geleneksel sünet ameliyatı için velisiyle birlikte İstanbul Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı'na başvurmuş 8 yaşındaki bir erkek çocuğundan alınmıştır.

İstanbul Üniversitesi İAEK 14/21 no'lu etik kurul onayı alınmış ve hastanın velisine "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" imzalatılmıştır. Antibiyotikli besiyeri içerisinde laboratuvara getirilen doku, bistüri ve steril makaslar ile mekanik olarak parçalanmıştır. Doku parçaları, doku kültürü petrilere alındıktan sonra 5-8ml L-DMEM besi ortamı eklenerek, eksplant kültür şeklinde kültüre edilmiştir (Morgan and Yarmush, 1999). P3'deki insan fibroblastlarının fibronektin, tenaskin ve fibroblast yüzey antijeni ekspresyonunun belirlenmesi için İF çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen morfolojik ve histokimyasal veriler, fibroblastik farklılaşması uyarılan iDP-MKH'lerle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

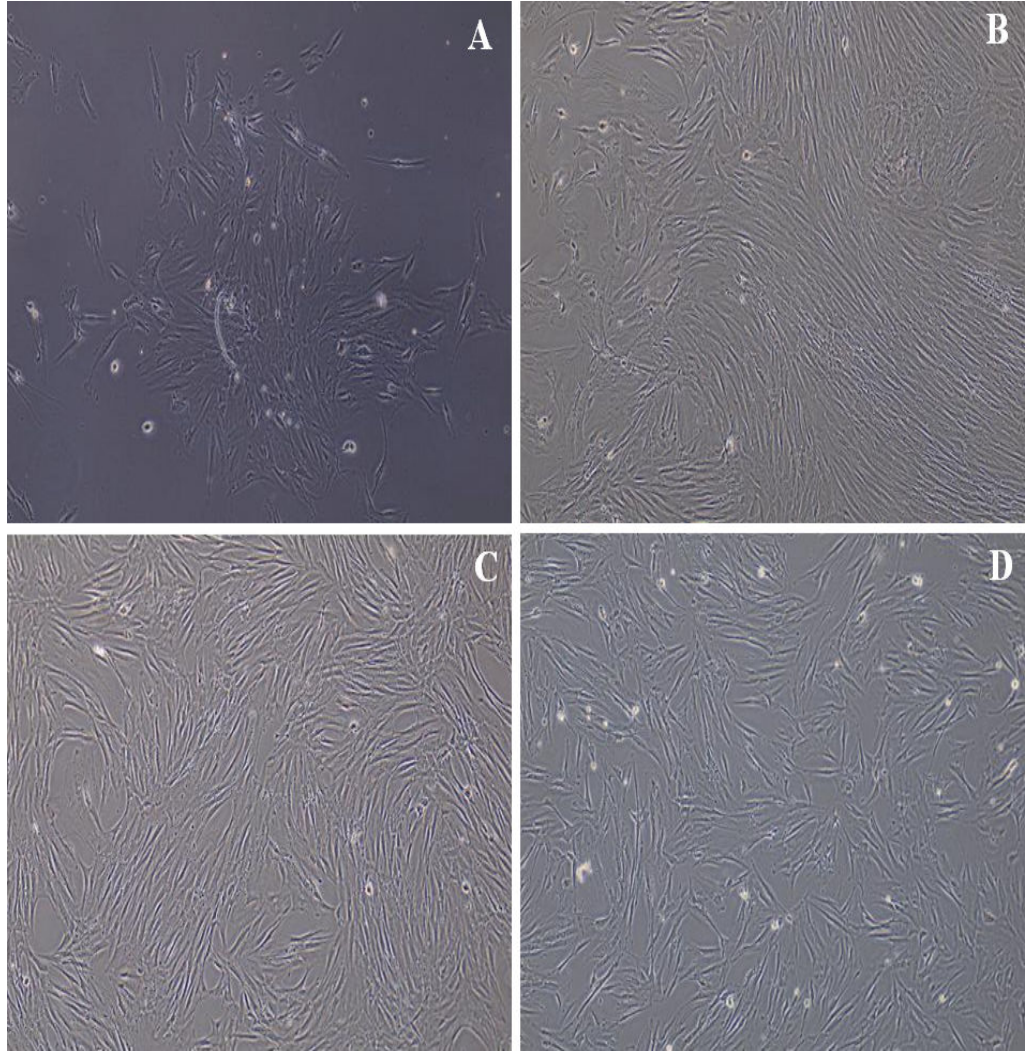
3.2.10. İstatiksel Analizler

Her deney en az üç kere tekrarlanmıştır. Çalışmaların verileri, standart sapma (\pm SD) gözönünde bulundurularak rapor edilmiştir. Tüm istatiksel analizler, SPSS 10.0 ile gerçekleştirilmiştir. Veriler, tek yönlü varyans analizi (*one-way ANOVA testi*) ve eşli *t-test* kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışma ve kontrol grupları arasındaki farklar için, $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı sayılmaktadır.

4. BULGULAR

4.1. iDP-MKH'lerin Morfolojik Özellikleri

İnsan diş pulpasından izole edilen ve kültür kabının tabanına yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri, çalışma süresince zıt faz mikroskobu ile incelenmiştir. Birincil (*primer*) kültürün ilk günlerinde gözlenen iğ şeklinde ve fibroblast benzeri hücrelerin, sonraki günlerde koloniler oluşturmaya başladığı gözlenmiştir (Şekil 4.1A). Yaklaşık 16-18'nci günlerde T25 kültür kabının yüzeyinin, %70-80 oranında hücrelerce doldurulduğu (konfluent hale geldiği) gözlenmiştir (Şekil 4.1B).



Şekil 4.1. iDP-MKH'lerin morfolojik görünüşleri. iDP-MKH'lerin birincil kültür (A- P0, 4. gün; B- P0, 18.gün) ve sonraki alt-kültürlerin farklı evrelerinde (C-P1, 4.gün; D-P3, 5.gün) faz-kontrast mikroskobu görüntülerinde, MKH'lerin fibroblast benzeri iğsi morfolojiye sahip oldukları görülmektedir (Büyütme: AX40, B-DX100).

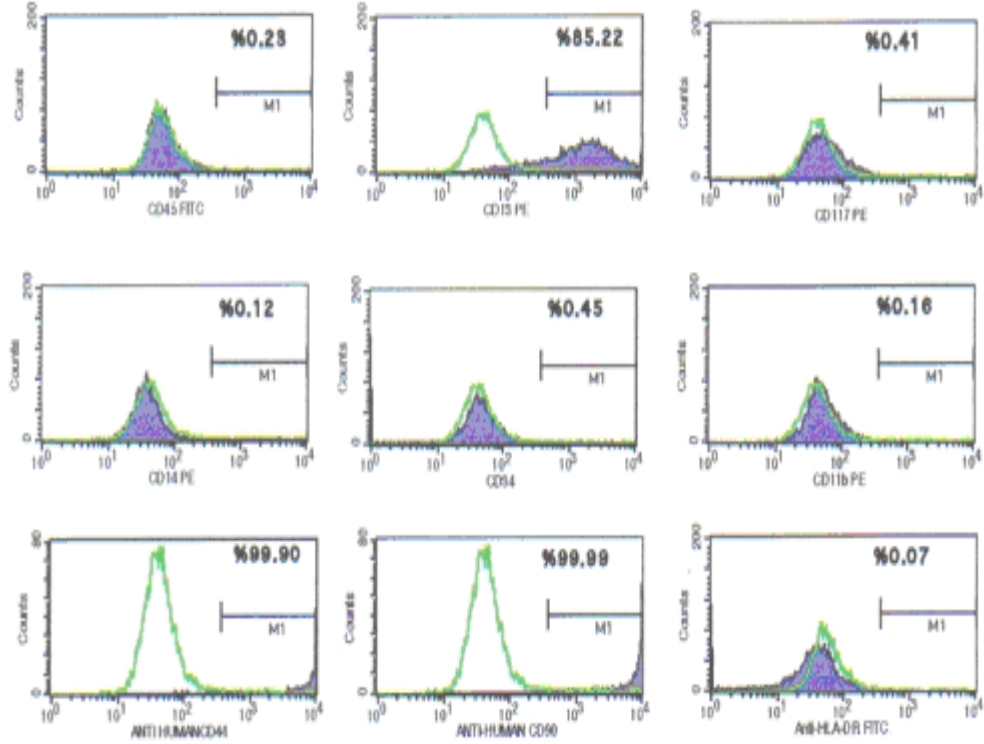
Alt-kültürleme işlemlerinden sonra, T75 kültür kaplarına ekilen hücreler (yaklaşık 1300-2000 hücre/cm²) 3-4 gün içerisinde kültür kabının yüzeyini %70-80 oranında doldurmuştur (yaklaşık 10-12x10³ hücre/cm²)(Şekil 4.1C ve D). *In-vitro* koşullarda iDP-MKH'lerin bu özelliklerini kaybetmeden en az 15 kez çoğalabildikleri gözlenmiştir.

4.2. iDP-MKH'lerin İmmunofenotipik Özellikleri

Her alt kültürleme işleminden sonra ayrılan yaklaşık 1x10⁶ hücre ile gerçekleştirilen akış sitometri incelemeleri (P1'den P5'e kadar) sonucunda, iDP-MKH'lerin ilk altkültür işleminden itibaren hematopoetik hücre belirteçlerini (CD14, CD34, CD45, CD117, HLA-DR) eksprese etmedikleri, buna karşın MKH'ler için sıklıkla kullanılan CD13, CD44 ve CD90 için yüksek düzeylerde pozitif oldukları tespit edilmiştir. Çizelge 4.1'de iDP-MKH'lerin P1'den P5'e kadar gerçekleştirilen akış sitometrik çalışma verileri listelenmiştir. P3'deki iDP-MKH kültürünün MKH'ler açısından daha homojen olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, İHK ve İF çalışmalarının çoğu ve farklılaştırma çalışmaları bu pasajdaki hücrelerle gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2'de P3'deki iDP-MKH'lerin immunofenotipik özelliklerini gösteren akış sitometri sonuçları görülmektedir.

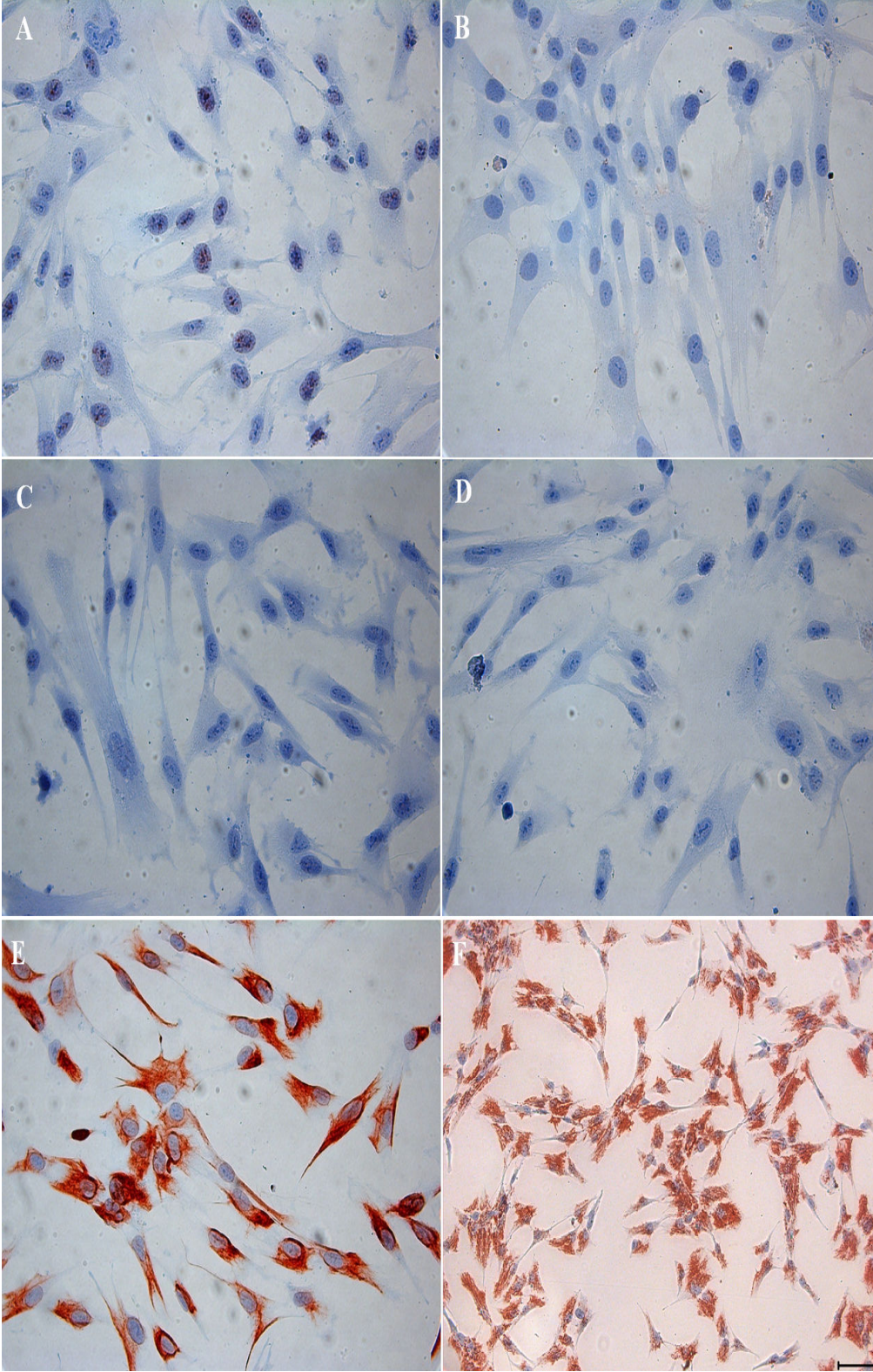
Çizelge 4.1. iDP-MKH'lerin (P1'den P5'e kadar) akış sitometri cihazında tespit edilen verileri

Antikor-Belirteç Adı	iDP-MKH				
	(P1)	(P2)	(P3)	(P4)	(P5)
CD 11b	% 6.48	% 4.28	% 0.16	% 0.74	% 0.27
CD 13	% 27.24	% 34.92	% 85.22	% 94.68	% 79.46
CD 14	% 1.7	% 1	% 0.12	% 1.16	% 0.12
CD 34	% 2.88	% 11.88	% 0.45	% 0.69	% 0.28
CD 44	% 33.77	% 99.10	% 99.90	% 99.11	% 97.24
CD 45	% 8.1	% 0.01	% 0.28	% 0.71	% 0.18
CD 90	% 34.23	% 99.59	% 99.99	% 99.84	% 97.90
CD 117	% 2.77	% 0.43	% 0.41	% 0.72	% 0.40
HLA-DR	% 5.15	% 13	% 0.07	% 1.25	% 0.54

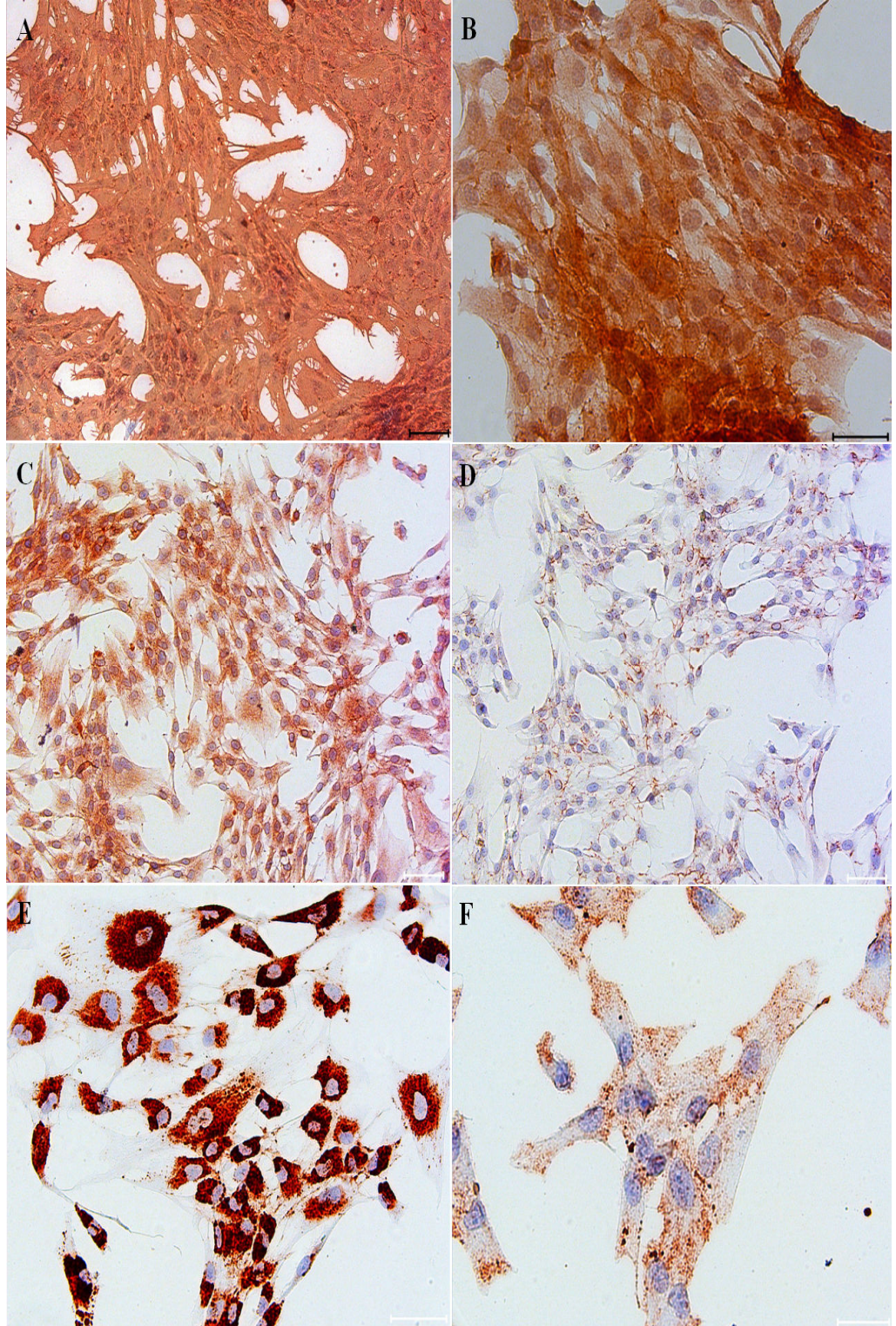


Şekil 4.2. İnsan diş pulpasından izole edilen MKH'lerin P3'deki immunofenotipik özelliklerinin akış sitometri sonuçları. CD45 (%0.28), CD14 (%0.12), CD117 (%0.41), CD11b (%0.16), HLA-DR (%0.07) ve CD34 (%0.45) negatif ekspresyon gösterirken, MKH'lere özgü CD 13 (%85.22), CD44 (%99.90) ve CD 90 (%99.99) pozitif olarak tespit edilmiştir.

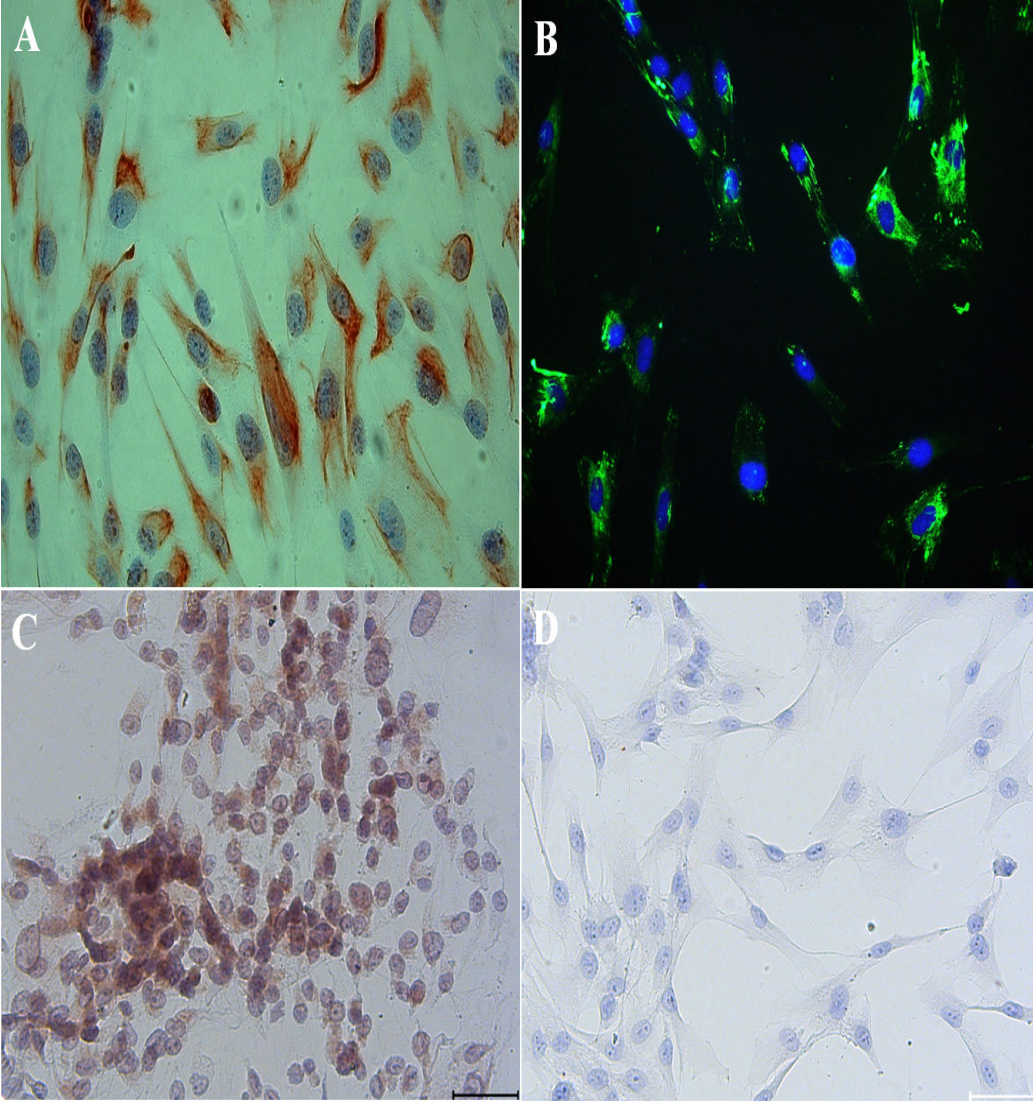
Akış sitometri cihazında gerçekleştirilen çalışmaların verileri, MKH'lerin (P1, P3 ve P4) İHK ve -İF karakterizasyon çalışmaları ile desteklenmiştir. iDP-MKH'lerde CD31, CD34, CD45 ve CD71 için pozitif immun reaksiyon gözlenmemiştir (Şekil 4.3A-D). Bununla birlikte, nöral kök hücrelerde yüksek düzeyde eksprese edilen nestin ve GFAP kuvvetli pozitif olarak izlenmiş (Şekil 4.3E ve F) ve MKH hücre belirteçleri CD44, CD105 ve aktin için pozitif immun reaksiyonlar gözlenmiştir (Şekil 4.4A-C). Embriyonik kök hücre belirteci SSEA-4 için izlenen pozitif immun-reaksiyonlar ise oldukça ilgi çekicidir (Şekil 4.4D). iDP-MKH'lerin tip II kollajen, miyozin IIa (Şekil 4.4E ve F) vimentin, fibronektin ve miyojenini (Şekil 4.5A-C) eksprese ettikleri buna karşılık miyo-D (Şekil 4.5D) ekspresyonlarının bulunmadığı gözlenmiştir. iDP-MKH'ler, MKH'ler için özgün olan α -düz kas aktini, desmin, β -tubulin ve kemik özgün proteinleri olan osteokalsin ve osteonektin için de kuvvetli pozitif reaksiyonlar göstermiştir (Şekil 4.6A-F).



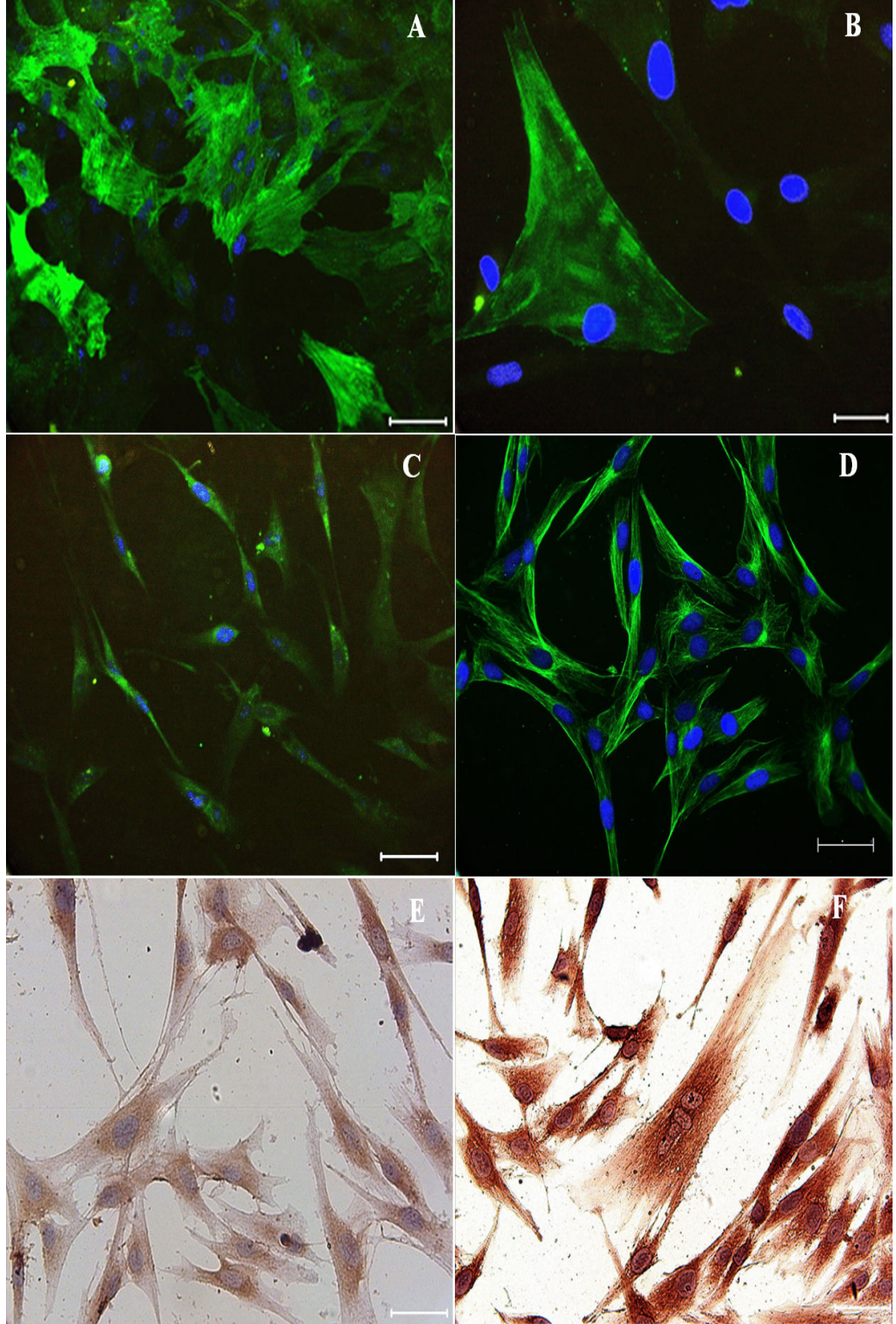
Şekil 4.3. iDP-MKH'lerin (P1) immunohistokimyasal özellikleri. İnsan DP-MKH'lerin (P1), CD31 (A), CD34 (B), CD45 (C) ve CD71 (D) monoklonal antikorları ile immunohistokimyasal olarak boyandıklarında negatif ve anti-nestin (E) ve GFAP (F) için ise pozitif immun reaksiyon gösterdikleri tespit edilmiştir. Çekirdeklere hematoxilen ile karşıt boyama yapılmıştır (bar çubukları = 50µm).



Şekil 4.4. iDP-MKH'lerin (P3) immunohistokimyasal özellikleri. IHK çalışmaları, iDP-MKH'lerin üçüncü pasaj kültürlerindeki immunoperoksidaz reaktivitelerine göre değerlendirilmiştir. iDP-MKH'lerin (P3), immunohistokimyasal boyamalarında MKH'ler için sıklıkla kullanılan CD44 (A), CD105 (B) ve aktin (C) sitoplazmik boyamaları ile pozitif ekspresyon gözlenmiştir. Ayrıca, embriyonik hücre belirteci SSEA4 (D) membransı, tip II kollajen (E) sitoplazmik, miyozin IIa (F) sitoplazmik ve membransı boyamaları ile pozitif reaksiyonlar gözlenmiştir (bar çubukları = 50µm)..

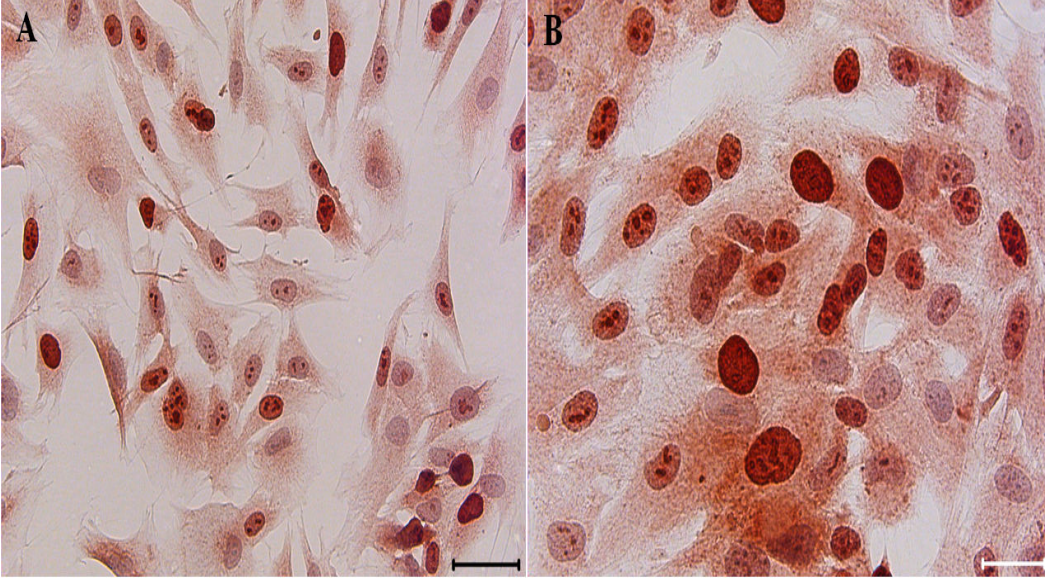


Şekil 4.5. iDP-MKH'lerin vimentin (A), fibronektin (B), miyojenin (C) ve miyo-D (D) immun-boyamaları. iDP-MKH'ler vimentin, fibronektin ve miyojenin için pozitif immun reaksiyon göstermektedir. Buna karşılık iDP-MKH'lerin myo-D eksprese etmedikleri görülmüştür (bar çubukları = 50µm).



Şekil 4.6. iDP-MKH'lerin (P4) immunohistokimyasal özellikleri. iDP-MKH'lerin (P4) İHK ve İF boyamalarında, α -düz kas aktini (A, B), desmin (C), β -tubulin (D), osteokalsin (E) ve osteonektini (F) yüksek düzeyde eksprese ettikleri gözlenmiştir. İF çalışmalarında (A, B, C, D), çekirdekler DAPI boyası ile mavi renkte gözlenmektedir (bar çubukları= 50 μ m).

iDP-MKH'lerin çoğalma belirteci olan Ki67 immun-boyamaları sonucu, yüksek ekspresyon seviyeleri saptanmıştır (Şekil 4.7A ve B). Pozitif gözlenen hücre çekirdekleri çoğalma yeteneğine sahip iDP-MKH'leri göstermektedir. Bu durum, elde edilen iDP-MKH'lerin çoğalma döneminde olduklarının göstergesidir.



Şekil 4.7. iDP-MKH'lerin Ki67 immun-boyaması. Karakterizasyonu gerçekleştirilen iDP-MKH'lerin çoğalabildiklerini gösteren Ki67 immun boyamalarında, iDP-MKH'lerin çekirdekleri pozitif olarak gözlenmiştir. Bu durum, elde edilen MKH'lerin çoğalma (*log* fazı) döneminde olduklarını göstermektedir (bar çubukları=50 μ m).

iDP-MKH'lerin karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirilen İHK ve İF çalışmalarının (P1, P3 ve P4) sonuçları Çizelge 4.2'de gösterilmektedir. Elde edilen veriler, akış sitometri sonuçlarını destekleyici niteliktedir. Bu sonuçlar, iDP-MKH'lerin Ki-MKH'lerle oldukça benzer immunofenotipik özellikler gösterdiği ortaya koymaktadır.

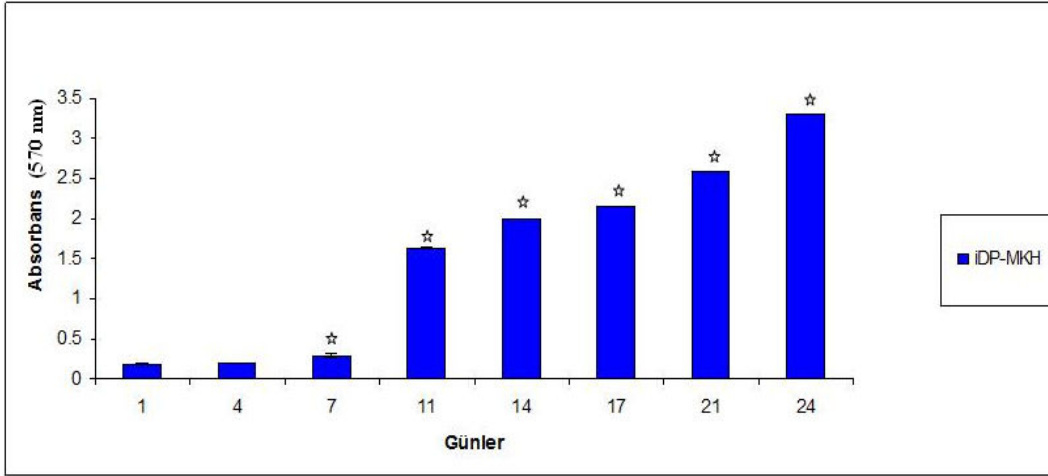
Çizelge 4.2. İnsan DP-MKH'lerin immunohistokimyasal özellikleri

Antikor/Belirteç	Dilüsyon	Kaynak	Ekspresyon
CD 34 (C-18)	1 : 150	Santa Cruz Biotechnology	Ø
CD 44/HCAM (Ab-4)	1 : 150	Thermo Scientific	+
CD 45 (H-230)	1 : 150	Santa Cruz Biotechnology	Ø
CD 71 (K-20)	1 : 150	Santa Cruz Biotechnology	Ø
CD105/Endoglin (M-20)	1:100	Santa Cruz Biotechnology	+
Tip II Kollajen Ab-2 (2B1.5)	Ön-seyreltilmiş	Thermo Scientific	+
Nestin (Rat-401)	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology	+
Vimentin (C-20)	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology	+
Desmin Ab1 (D33)	Ön-seyreltilmiş	Thermo Scientific	+ ¹
Fibronektin (EP5)	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology	+
α-Düz kas aktin Ab-1	1 : 800	Thermo Scientific	+
Aktin (C-2)	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology	+
MyoD (4H207)	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology	Ø
Miyozin IIa (A4.74)	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology	+
Miyogenin Ab-1 (F5D)	Ön-seyreltilmiş	Thermo Scientific	+
GFAP Ab1	Ön-seyreltilmiş	Thermo Scientific	+
Osteokalsin (FL-100)	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology	+
BMP-4 (N-16)	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology	+
SSEA-4 (MC-813-70)	1 : 50	Chemicon International	+

+ = Pozitif belirteç ekspresyonu; Ø = belirteç ekspresyonunun bulunmaması; +¹ = hücrelerin %10-20'sinde immün reaksiyon gözlenmesi.

4.3. iDP-MKH'lerin Canlılık ve Üreme Özellikleri

Hücre canlılığı ve üreme özelliklerinin belirlenmesi MTT testi uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma verileri, çalışmalar üç kere tekrarlandıktan sonra elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınarak ve standart sapma (\pm SD) göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar için $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi iDP-MKH'ler 1.günden 24. güne kadar yaklaşık 14 kat artmıştır. İlk günlerde üremenin yavaş gerçekleştiği ancak 7. günden itibaren hücrelerin düzenli olarak çoğalabildikleri gözlenmektedir.

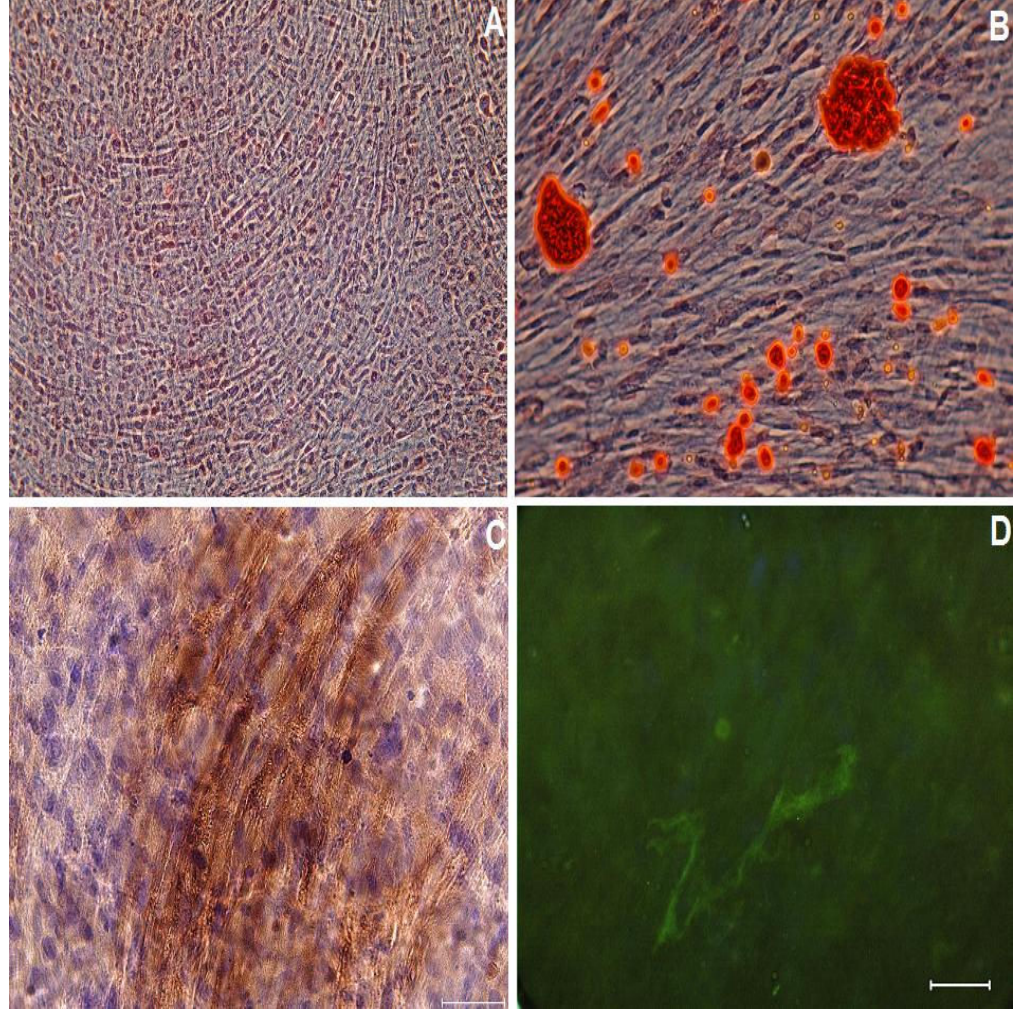


Şekil 4.8. iDP-MKH'lerin canlılık/üreme oranlarına ilişkin grafik. iDP-MKH'lerin (P3) canlılık/üreme oranları MTT testi ile değerlendirilmiştir. Veriler, her grup için gerçekleştirilen üç farklı çalışmanın ortalama \pm SH değerlerini göstermektedir. İstatistiksel açıdan önemli farklar t testi (\star , $p < 0.05$) uygulanarak elde edilmiştir (iDP-M; insan diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücre).

4.4. iDP-MKH'lerin Osteojenik Farklılaşma Potansiyeli

Osteojenik farklılaşması uyarılan iDP-MKH'lerin, bu uyarıya yanıt verdikleri ve osteoblast benzeri hücrelere farklılaştıkları gözlenmiştir. Osteojenik farklılaşma besi ortamına alınan iDP-MKH'lerin, kültürün 4. haftasının sonunda alizarin kırmızısıyla yapılan histokimyasal boyamaları sonucunda mineralize kemik nodülleri gözlenmiştir (Şekil 4.9B). Kültürün ikinci haftasından itibaren MKH'lerin kendi yapısal özelliklerini kaybettikleri ve kübik hücreler şeklinde katmanlar yaparak çoğaldıkları gözlenmiştir (Şekil 4.9B ve C).

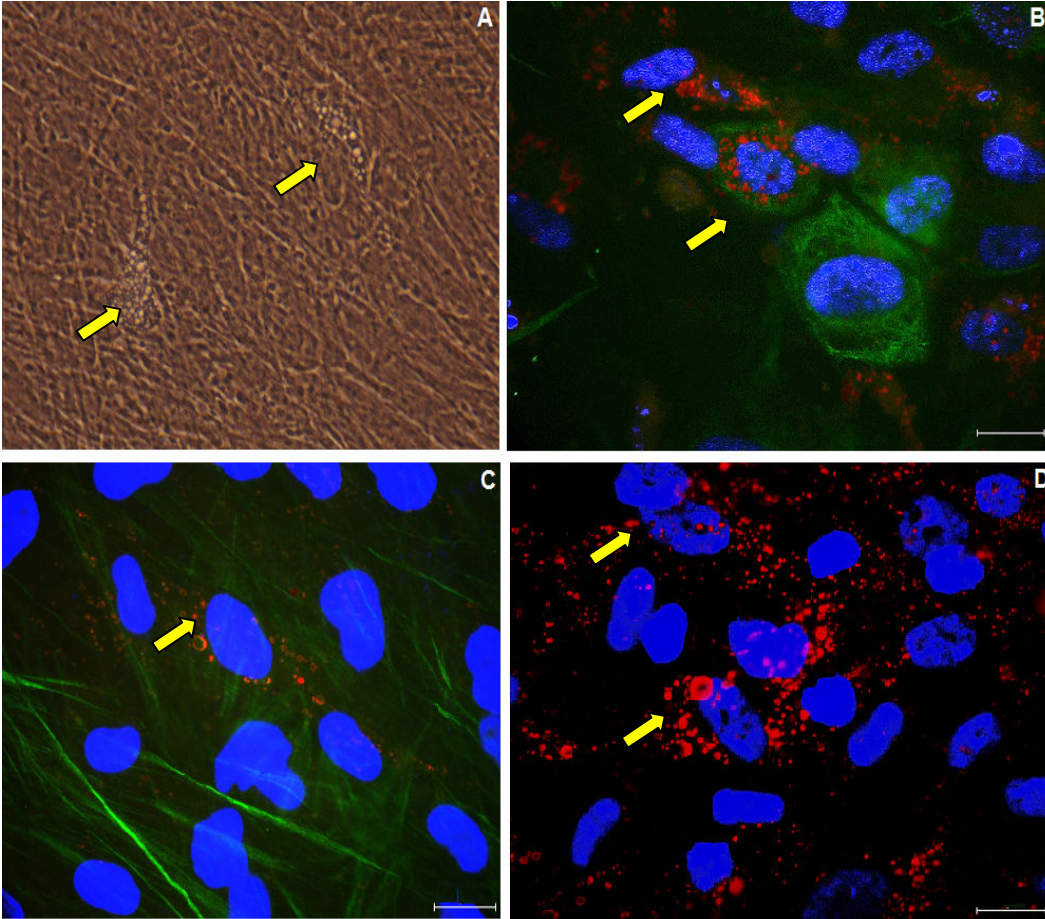
İmmunohistokimyasal boyamalar sonucunda, farklılaşmış hücrelerin kemikleşmeyle ilişkili olarak osteoblastları tanımlamada kullanılan osteokalsin ve osteonektin için kuvvetli pozitif immun reaksiyon gösterdikleri tespit edilmiştir. Farklılaşmış hücrelerin hücre dışı matriksinde, kuvvetli osteokalsin, osteonektin ve BMP4 reaksiyonları saptanmıştır (Şekil 4.9C ve D).



Şekil 4.9. iDP-MKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasitesi. A'da normal besiyerinde kültüre edilmiş iDP-MKH'lerin 38 gün sonra alizarin kırmızısı ile boyanması sonrası, kalsifiye kemik nodülleri izlenmezken, osteojenik farklılaşma ortamında kültüre edilen grupta farklı boyutlardaki parlak kırmızı renkte boyanmış nodüller görülmektedir (B). Fibroblast-benzeri yapısal özellikten kübik şekle dönüşmüş MKH'ler (osteoblastlar) ve kemik hücre dışı matriksinde eksprese edilebilen osteokalsin (C) ve yalnızca matrikste izlenen BMP4 (D) immun reaksiyonları görülmektedir (bar çubukları=50 µm).

4.5. iDP-MKH'lerin Adipojenik Farklılaşma Potansiyeli

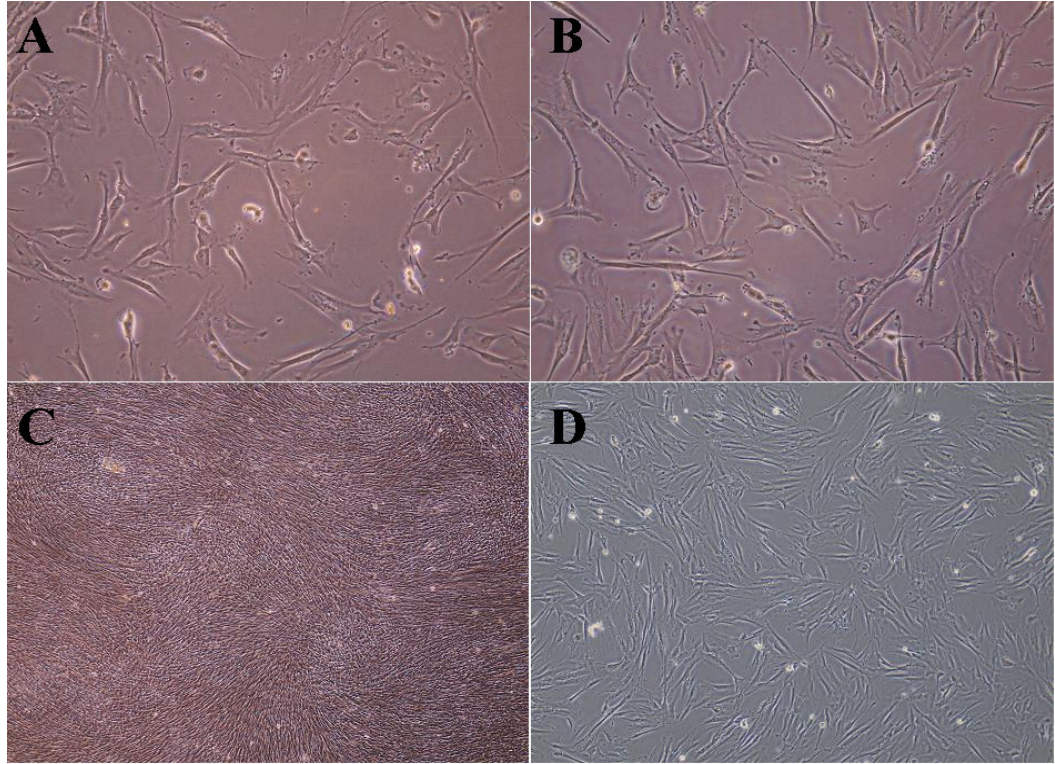
Adipojenik farklılaşma besi ortamında 4-6 hafta kültüre edilen iDP-MKH'lerin adiposit benzeri farklılaşma gösterdiği gözlenmiştir. 5. haftanın başında, adipojenik farklılaşması uyarılan iDP-MKH'lerin sitoplazmalarında, yağ hücrelerinde gözlenen yağ damlacıkları görülmüştür (Şekil 4.9A). Kültürün 32. gününde yapılan ikili boyamada, histokimyasal olarak oil red O ile yağ damlacıkları kırmızı renkte izlenirken, hücre sitoplazmasında vimentin ekspresyonu yeşil renktedir (Şekil 4.10B,C). 38. kültür gününde, adipojenik yönde farklılaşmış MKH'lerin sitoplazmalarında oil red O ile kırmızı boyanan yağ damlacıklarının daha da fazla arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.10D).



Şekil 4.10. iDP-MKH'lerin adipojenik farklılaşma kapasitesi. İnsan DP-MKH'lerin adipojenik farklılaştırma koşullarında 4-5 hafta süreyle kültürü sonrası, 28. günde faz kontrast mikroskobu (A) görüntülerinde yağ vakuelleri gözlenmektedir. 32. kültür gününde ikili boyamada, oil red O ile yağ damlacıkları kırmızı, vimentin ekspresyonu yeşil ve çekirdekler DAPI ile mavi renkte görülmektedir (B,C). 38. kültür gününde, farklılaşmış MKH'lerin sitoplazmalarında yağ damlacıklarının daha fazla arttığı gözlenmiştir (D) (bar çubukları=50 μ m).

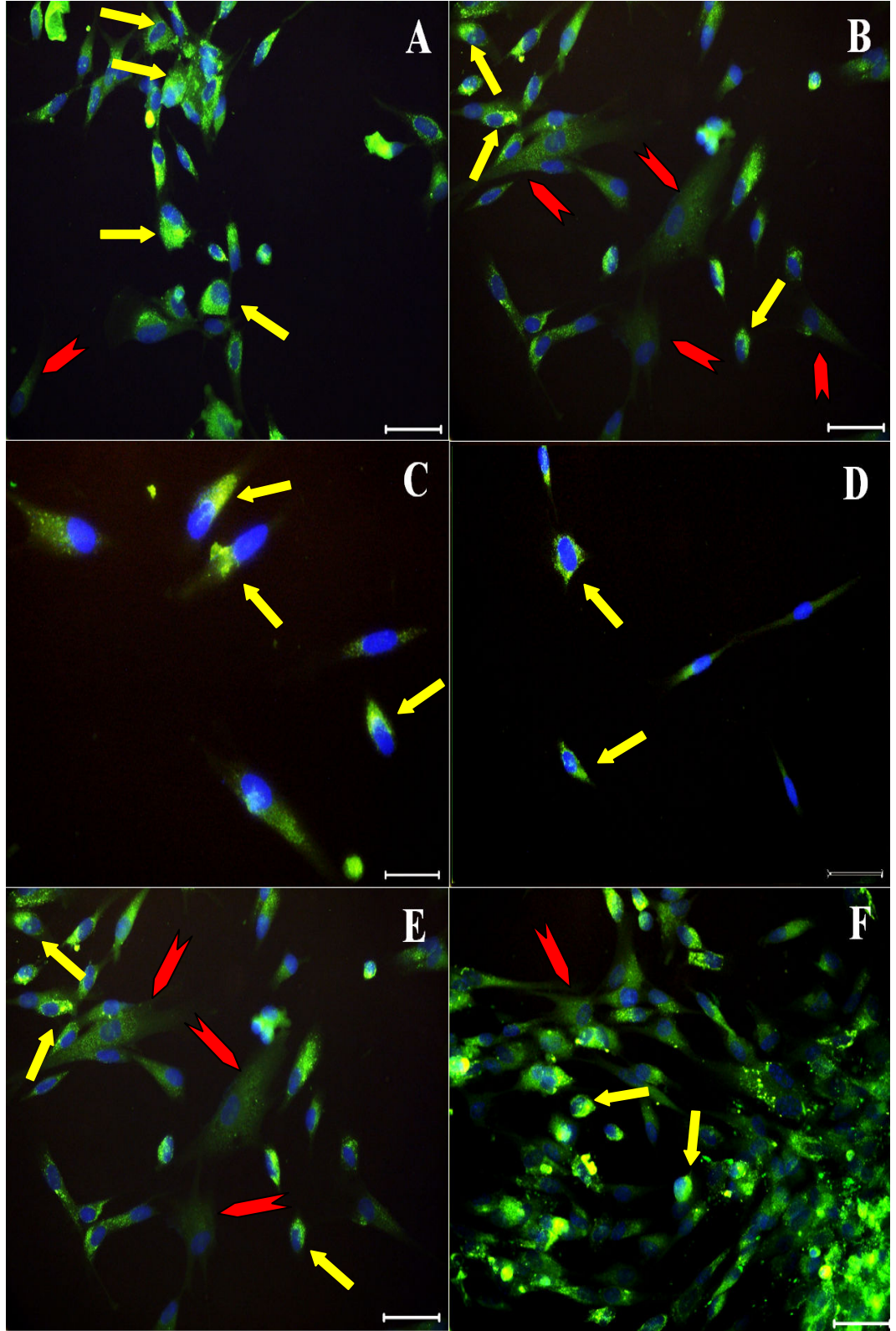
4.6. iDP-MKH'lerin Epitelyal Hücre Dizilerine Farklılaşma Potansiyeli

Epitelyal farklılaşma besi ortamında kültüre edilen iDP-MKH gruplarının tümünde, kültürün 21.günden itibaren faz kontrast mikroskop incelemelerinde kübik morfolojide epitel benzeri hücreler gözlenmiştir (Şekil 4.11A,B). Büyüme faktörleri ile farklılaşmanın uyarıldığı kültür kaplarında ilk hafta ve kültür süresince hücre üremesinde azalmanın gerçekleşmesi, buna karşılık kontrol gruplarında hızlı bir çoğalmanın gözlenmesi, uyarılan iDP-MKH'lerin farklılaşma sürecine girdiklerini düşündürmüştür.

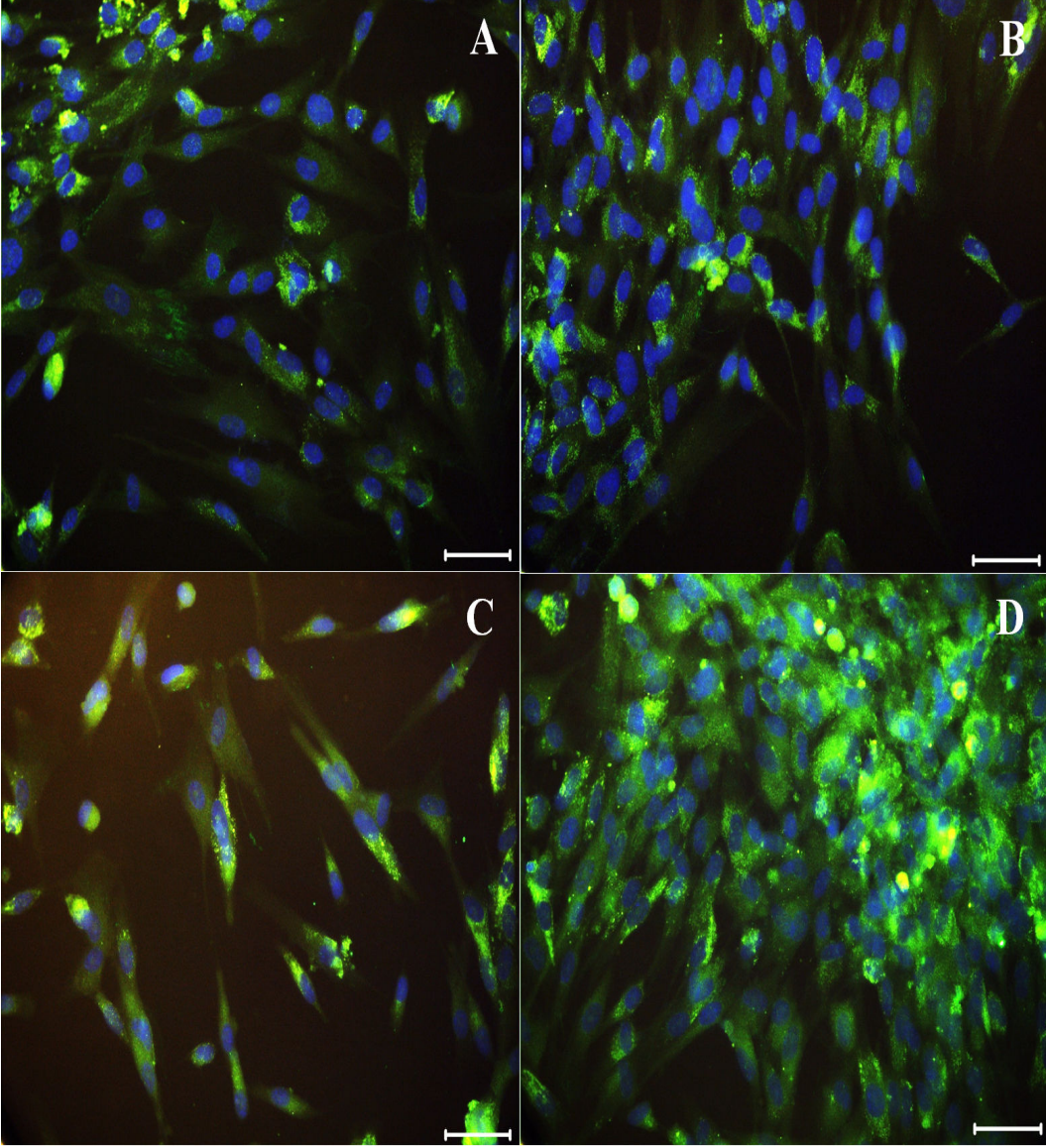


Şekil 4.11. Epitelyal farklılaşması uyarılan iDP-MKH'ler ve uyarılmamış iDP-MKH'lerin faz kontrast mikroskobu görüntüleri. Deney 1 (A) ve deney 2 (B) gruplarında, normal iDP-MKH kültürlerinde (D) gözlenmeyen, epitel-benzeri kübik hücreler görülmüştür. Farklılaşma gruplarında (A, B) hücre üremesinde azalma gözlenmesine karşılık, kontrol grubunda (C) MKH'lerin üreme hızının daha yüksek olduğu görülmüş ve çok katmanlı bir görünüm izlenmiştir (büyütme:A,B,DX100; CX20).

iDP-MKH'lerin epitelyal farklılaşma koşullarında 3-4 hafta süreyle kültürü sonrası gerçekleştirilen İHK boyamalarında, Deney 1 farklılaşma grubunda, epitel-benzeri morfolojide sitokeratin 18 (Şekil 4.12A ve C) ve sitokeratin 19 (Şekil 4.12E) pozitif hücreler görülmüştür. Deney 2 iDP-MKH'ler için de sitokeratin 18 (Şekil 4.12C ve D) ve sitokeratin 19 pozitif olarak gözlenmiştir (Şekil 4.12F). Farklılaşmakta olan MKH'lerde ise daha zayıf immun-reaksiyonlar tespit edilmiştir. Uyarıya yanıt vermeyen iDP-MKH'lerin, sitokeratin 18 ve 19 eksprese etmedikleri görülmüştür. Ayrıca, epitelyal farklılaşması uyarılan iDP-MKH gruplarında nestin ekspresyonlarında belirgin bir azalma saptanmasının yanında (Şekil 4.13A ve B), vimentin ekspresyonlarında artış gözlenmiştir (Şekil 4.13C ve D). Epitelyal hücelere özgü belirteçler olan sitokeratin 18 ve 19 pozitifliği ve iDP-MKH morfolojisindeki kübik değişim, epitelyal farklılaşmanın uygun bir göstergesidir. Bununla birlikte nestin ekspresyonundaki azalma iDP-MKH'lerin, nestin negatif ve/veya düşük pozitif olduğu bilinen epitelyal hücre dizilerine farklılaşma potansiyellerini destekleyici niteliktedir. Epitelyal farklılaşması uyarılan hücre grupları (Deney 1 ve Deney 2) karşılaştırıldığında, İF boyamalarında belirgin farklılık gözlenmemiştir.



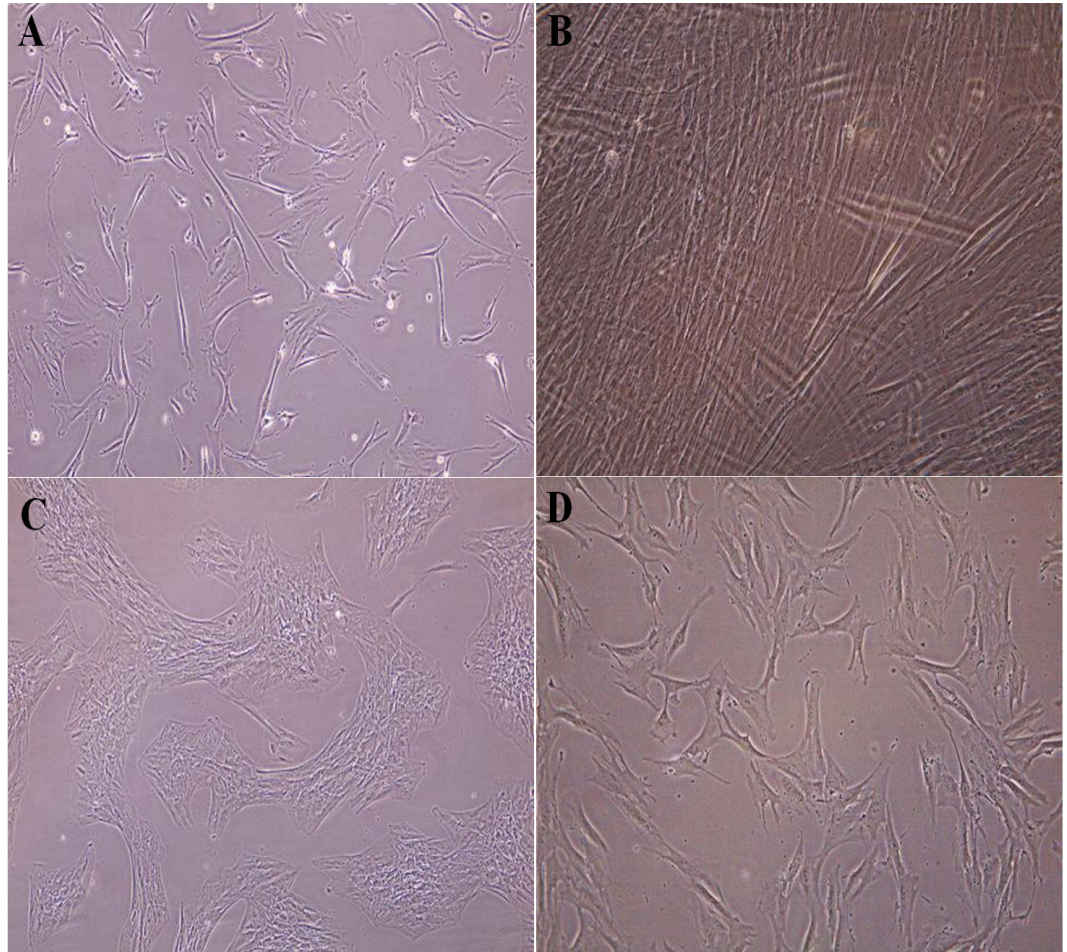
Şekil 4.12. iDP- MKH'lerin epitelyal farklılaşma koşullarında 3-4 hafta süreyle kültürü sonrası sitokeratin 18 ve sitokeratin 19 immün boyamaları. Deney 1 (**A, C, E**) ve deney 2 (**B, D, F**) farklılaşma gruplarında sitokeratin 18 (**A-D**) ve sitokeratin 19 (**E, F**) eksprese eden epitel-benzeri morfolojide hücreler gözlenmiştir. Epitel-benzeri morfoloji farklılaşmış iDP-MKH'lerde (**→**) sitokeratin 18 ve 19 ekspresyonları kuvvetli pozitif saptanırken, farklılaşmakta olan iDP-MKH'ler daha zayıf pozitif izlenmiştir. Buna karşılık farklılaşmamış MKH'lerde (**→**) sitokeratin 18 ve 19 ekspresyonu gözlenmemektedir (bar çubukları=50 µm).



Şekil 4.13. Epitelyal farklılaşma görülen iDP-MKH'lerin nestin ve vimentin ile İF işaretlenmesi. Epitelyal farklılaşma gruplarında, nestin ekspresyonunda (Deney 1, **A**; Deney 2, **B**) azalma gözlenirken, vimentin ekspresyonunda (Deney 1, **C**; Deney 2, **D**) artış gözlenmiştir. MKH morfolojisi gösteren iDP-MKH'lerde ekspresyonunun daha kuvvetli, vimentin ekspresyonunun ise daha zayıf pozitif olduğu görülmektedir (bar çubukları=50 μ m).

4.7. iDP-MKH'lerin Fibroblastik Hücre Dizilerine Farklılaşma Potansiyeli

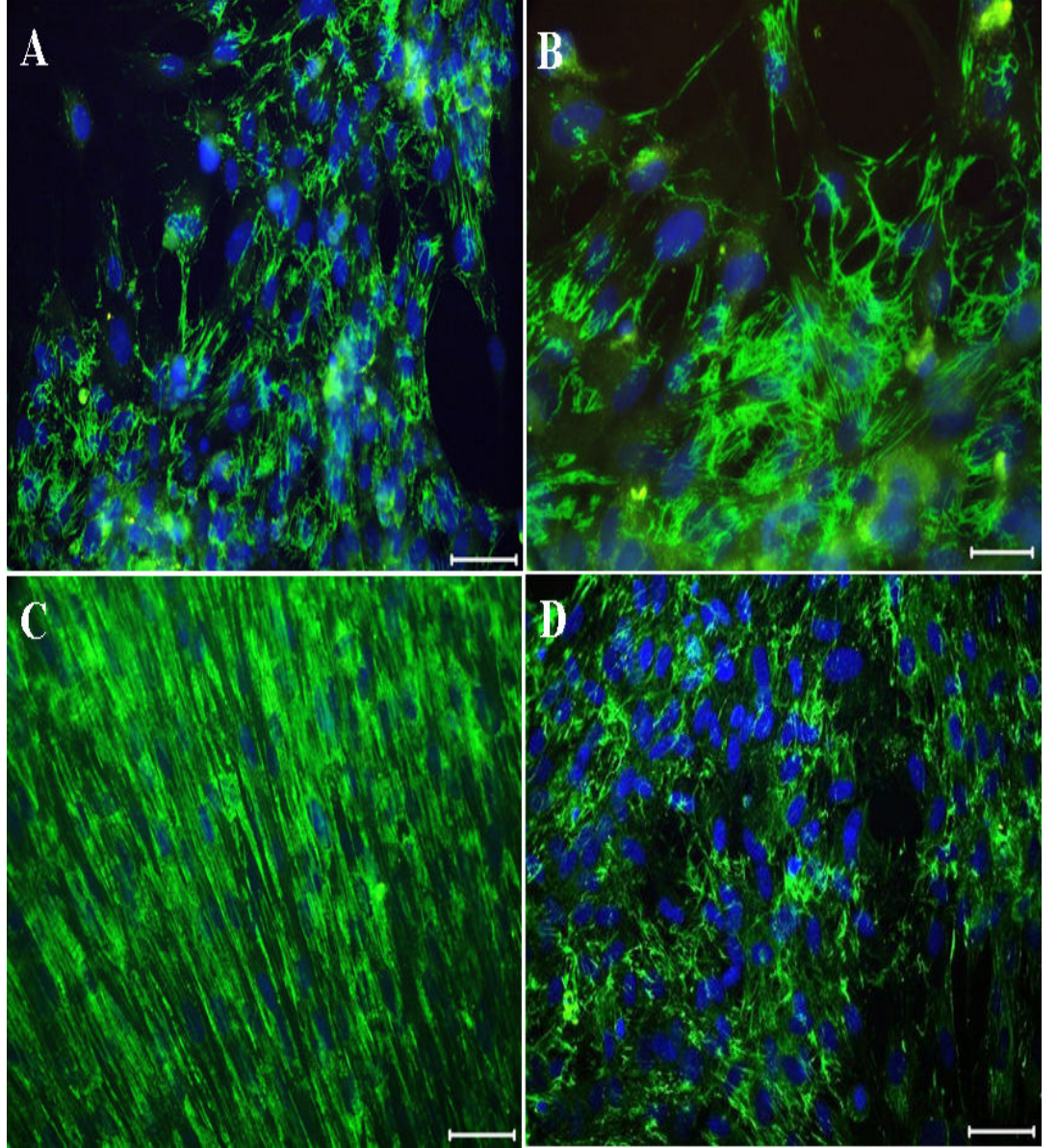
iDP-MKH'ler ve sünnet derisinden izole edilen fibroblastların morfolojik görünüşleri, faz kontrast mikroskopunda incelenerek karşılaştırılmıştır. Fibroblastların daha iğsi bir morfoloji gösterdiği ve sitoplazmalarında daha granüllü bir yapılanma olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.15B). MKH'ler ise flask yüzeyine daha yaygın bir morfolojide tutunma göstermektedir (Şekil 4.15A).



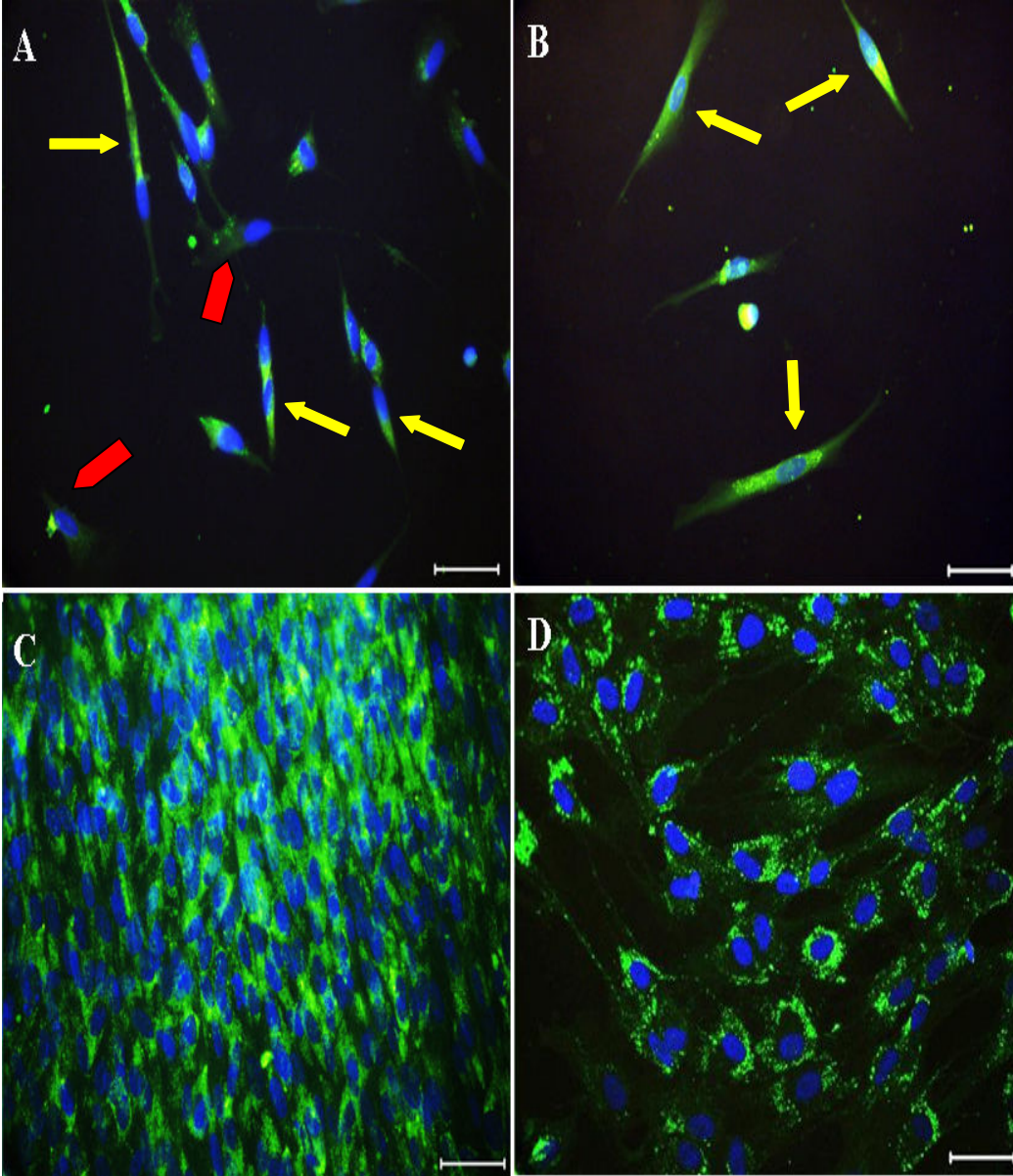
Şekil 4.14. Fibroblastik farklılaşması uyarılan iDP-MKH'ler, uyarılmamış iDP-MKH'ler ve sünnet derisinden izole edilen fibroblastların morfolojilerinin karşılaştırılması. Fibroblastik farklılaşması uyarılan Deney 2 iDP-MKH'lerin 17. gün lamel (A) ve 24.gün 8 kuyucuklu hücre kültür plakalarına (B) ekildikten sonraki faz kontrast mikroskopu görüntüleri izlenmektedir. P1 9. gündeki iDP-MKH'ler (C) daha yaygın ve koloni oluşturmaya daha yatkın morfolojide gözlenirken, fibroblastların (D) sitoplazmalarında daha granüllü bir yapılanma görülmekte ve iğsi morfoloji sergilemektedirler. Farklılaşma gruplarında fibroblast-benzeri morfolojik değişim izlenmektedir (büyütme: AX100, BX20, C-DX200).

Şekil 4.14’de görüldüğü gibi fibroblastik farklılaşma besi ortamında kültüre edilen iDP-MKH’lerin ekildiği lamellerde, kültürün ikinci haftasından sonra fibroblast benzeri morfolojide hücreler gözlenmiştir (Şekil 4.14A ve B). Kültür koşullarında iDP-MKH’ler (4.14C) daha yaygın ve koloni oluşturmaya daha yatkın morfolojide gözlenirken, fibroblastların (4.14D) sitoplazmalarında daha granüllü bir yapılanma görülmekte ve içsi morfoloji izlenmektedir. Farklılaşma gruplarında fibroblastların bu görünüme benzer bir morfolojik değişim görülmüştür. Ayrıca, hücre çoğalmasında belirgin bir azalma gözlenmiş buna karşılık kontrol grubunda hızlı üremeye bağlı daha katmanlı bir hücre tabakası oluşumu görülmüştür. Üremede gözlenen bu azalma, MKH’lerin bu fazdan farklılaşma fazına geçtiklerini düşündürmüştür.

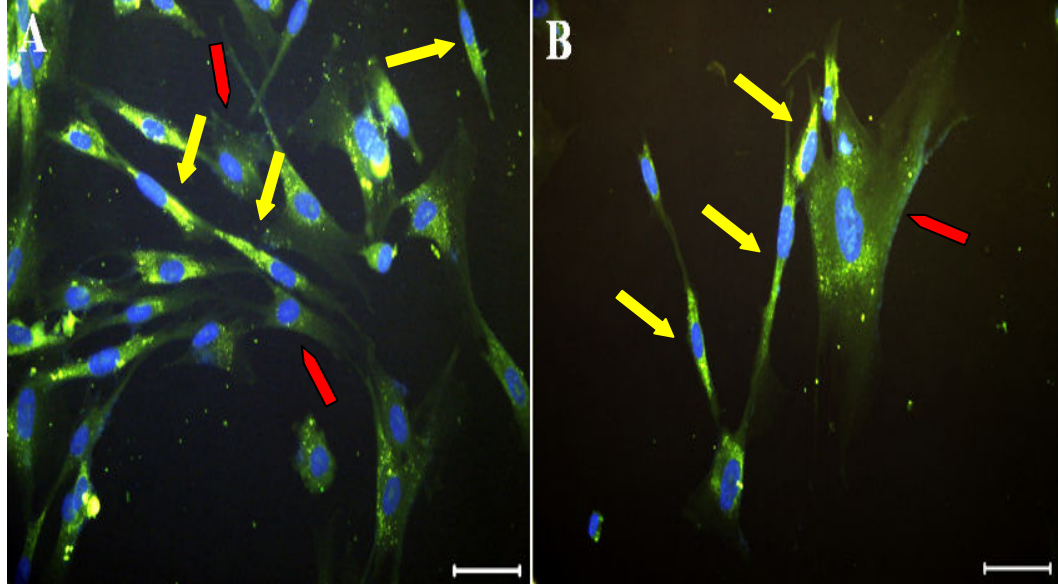
Fibroblastik farklılaşması uyarılmış iDP-MKH grupları ve kontrol grubunun fibronektin immun-boyamalarında, farklılaşmış hücrelerin fibronektin ekspresyonlarının arttığı saptanmıştır (Şekil 4.15A-C). Farklılaşmış iDP-MKH’lerin immunohistokimyasal görünümünün sünnet derisi fibroblastlarıyla (Şekil 4.15D) yüksek oranda benzerlik gösterdiği görülmüştür. Benzer şekilde, fibroblast yüzey proteini (FSP) ekspresyonlarının da farklılaşmamış iDP-MKH’lere göre artmış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.16A-C). Fibroblastik farklılaşma deneylerindeki iDP-MKH’lerin tenaskin’i de daha yüksek düzeyde eksprese ettikleri gözlenmiştir (Şekil 4.17A ve B). Deney 1 (bFGF+TGF β) ve Deney 2 (EGF+TGF β) grupları karşılaştırıldığında, Deney 2 farklılaştırma grubunda hem fibronektin (Şekil 4.15B ve C) hem de FSP (Şekil 4.16B ve C) için daha kuvvetli pozitif immun reaksiyonlar gözlenmiştir.



Şekil 4.15. Fibroblastik farklılaşması uyarılan iDP-MKH'lerin fibronektin ile İF işaretlenmesi. Fibroblastik farklılaşma için uyarılan Deney 1 (A) ve deney 2 (B,C) iDP-MKH'lerin fibronektin ekspresyonlarında belirgin bir artış gözlenmektedir. A ve B'de 8 kuyucuklu plakalara ekilen iDP-MKH'lerin görünüşleri, C'de ise lamel boyaması görülmektedir. A (deney 1) ve D (sünnet derisinden izole edilen fibroblastlar) incelendiğinde fibronektin ekspresyonlarının benzer olduğu görülmektedir (bar çubukları=50 μ m).

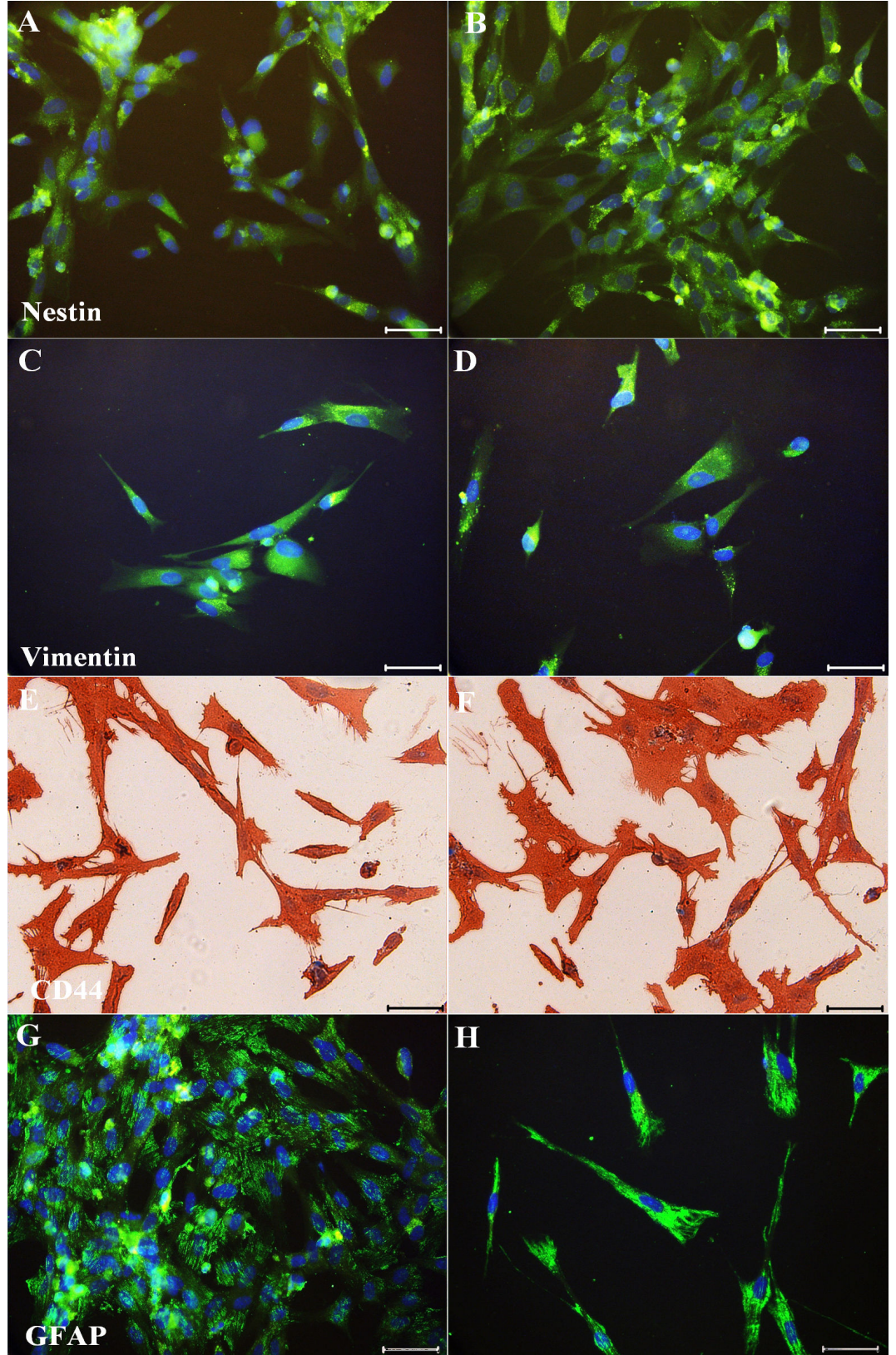


Şekil 4.16. Fibroblastik hücre dizilerine farklılaşması uyarılan iDP-MKH'lerin fibroblast yüzey proteini (FSP) ekspresyonları. Fibroblastik farklılaşma gruplarında (→) farklılaşmamış iDP-MKH'lere (→) oranla FSP ekspresyonlarında belirgin bir artış gözlenmiştir. Deney 1 (A) iDP-MKH'lerde, Deney 2 iDP-MKH'lere (B, C) oranla daha yüksek pozitiflik gözlenmiştir. Sünet derisi fibroblastlarıyla (D) karşılaştırıldığında, farklılaşma gruplarında FSP için benzer pozitif immun-reaksiyonlar gözlenmiştir (Bar çubukları=50 µm).

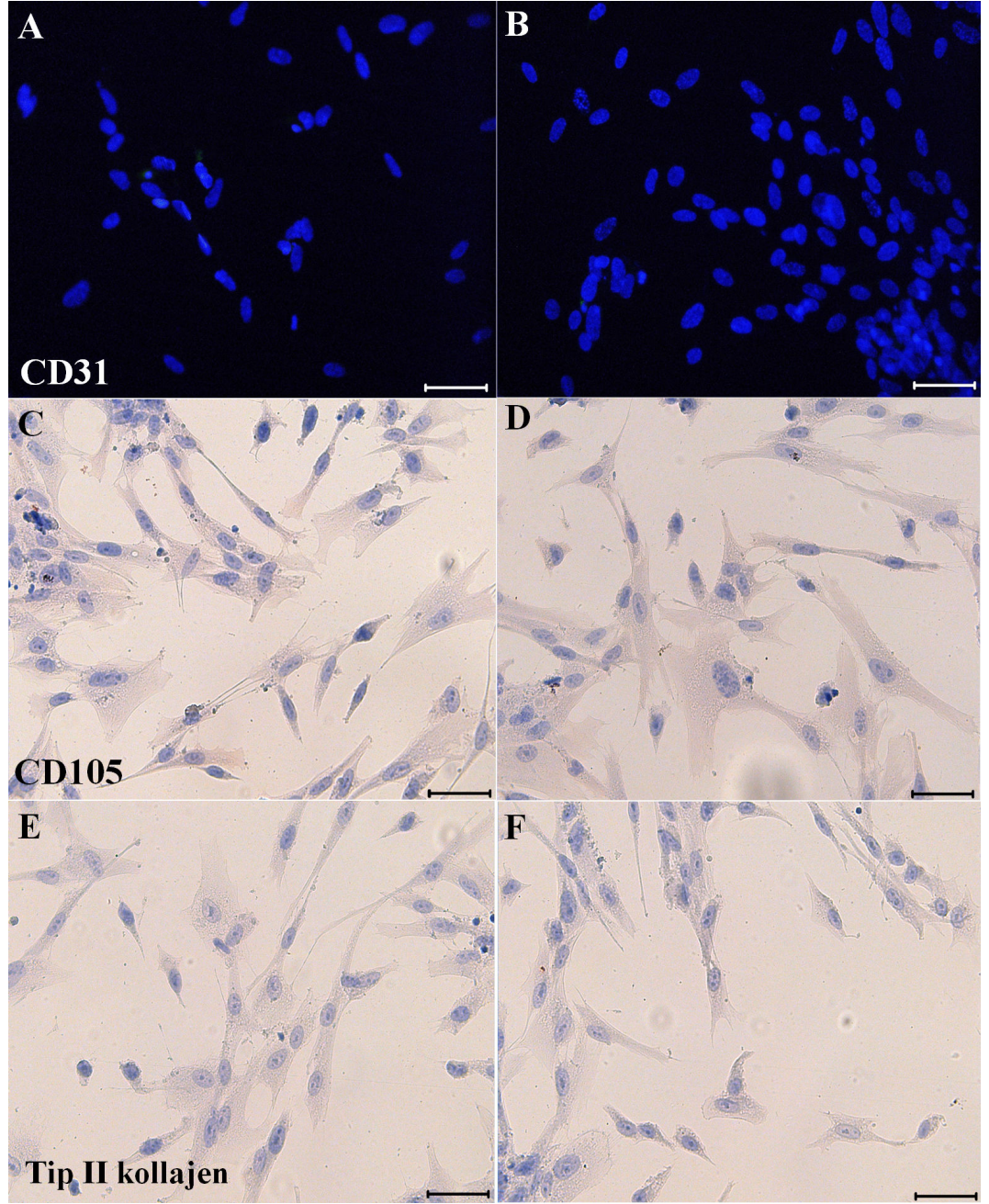


Şekil 4.17. Fibroblastik farklılaşma deney gruplarında tenaskin ekspresyonları. Fibroblastik farklılaşma için uyarılan deney 1 (A) ve deney 2 (B) iDP-MKH'lerin belirgin şekilde ekspresyonlarının arttığı gözlenmektedir. Farklılaşmış hücreler tenaskin için kuvvetli immün-reaksiyon gösterirken (→), MKH'ler daha zayıf ekspresyon (→) göstermektedir (bar çubukları=50 µm).

Fibroblast ve MKH'leri birbirinden ayıran önemli belirteçlerden olan nestin immun-boyamaları incelendiğinde, fibroblastik hücre dizilerine farklılaşmakta olan MKH'lerde nestin ekspresyonunda azalma gözlenmiştir (Şekil 4.18A ve B) Fibroblastik farklılaşma gruplarında nestin pozitifliğinde azalma gözlenirken, kontrol grubunda kuvvetli nestin pozitif immün reaksiyonlar gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, artmış vimentin ekspresyonları görülmüştür (Şekil 4.18C ve D). GFAP ekspresyonları karşılaştırıldığında, işsi fibroblast morfolojisinde pozitif hücrelerin varlığı gözlenmiş ancak farklılaşmış iDP-MKH'ler ve farklılaşmış hücreler arasında belirgin bir ekspresyon farklılığı saptanamamıştır (Şekil 4.18G ve H). Farklılaşma gruplarındaki iDP-MKH'ler, farklılaşması uyarılmamış iDP-MKH'ler ile benzer şekilde CD31 negatif (Şekil 4.19A ve B) ve CD44 pozitif (Şekil 4.18E ve F) immün reaksiyonlar göstermiştir. Farklılaşan hücrelerin CD105 (Şekil 4.19C ve D) ve tip II kollajen (Şekil 4.19E ve F) eksprese etmemeleri, gerçekleştirdiğimiz çalışmanın başarılı olduğunun en önemli göstergesidir.



Şekil 4.18. Fibroblastik farklılaşma için uyarılan iDP-MKH'lerin nestin, vimentin, CD44 ve GFAP immün-boyamaları. Fibroblastik farklılaşma deney 1 (A, C, E, G) ve deney 2 (B, D, F, H) iDP-MKH'lerin nestin, vimentin, CD44 ve GFAP ile immün-boyamaları görülmektedir. Farklılaşma gruplarında, nestin ekspresyonlarında belirgin bir azalma gözlenirken, vimentin ekspresyonlarının arttığı görülmektedir. Farklılaşmış ve farklılaşmamış iDP-MKH'ler CD44 ve GFAP için benzer immün-reaksiyon göstermiştir (bar çubukları=50 μ m).



Şekil 4.19. Fibroblastik farklılaşma için uyarılan iDP-MKH'lerin CD31, CD105 ve tip II kollajen için immun-boyanmaları. Deney 1 (A,C,E) ve deney 2 (B, D, F) deki hücrelerin, hematopoetik hücre belirteci CD31'i eksprese etmedikleri gözlenmiştir. CD105 ve tip II kollajen için pozitif immun-reaksiyon gösteren iDP-MKH'lerin aksine, farklılaşma gruplarında negatif reaksiyon gözlenmiştir. Farklılaşma deneyine alınan MKH'lerin CD105 ve tip II kollajen eksprese etmemiş olmaları, farklılaşma deneylerinin başarılı olduğunu göstermektedir (bar çubukları=50 μ m).

4.8. Telomeraz Aktivitelerinin Karşılaştırılması

Epitelyal ve fibroblastik farklılaşması uyarılan iDP-MKH'ler ve kontrol gruplarının telomeraz aktiviteleri belirlenmiştir. Bulunan sonuçlar, 1 μ g total proteine eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır. Epitelyal hücre dizilerine farklılaşması uyarılan iDP-MKH'lerin telomeraz aktiviteleri; Deney 1 için 0,064 \pm 0,01 ve Deney 2 için 0,091 \pm 0,01 olarak bulunmuştur. Fibroblastik farklılaşma gruplarında telomeraz aktiviteleri; Deney 1 iDP-MKH'ler için 0,057 \pm 0,01 ve Deney 2 iDP- MKH'ler için 0,056 \pm 0,01 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunda, telomeraz aktivitesinin 0,198 \pm 0,05 olduğu görülmüştür. Farklılaşma grupları ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında istatistiksel farklılığın belirlenmesi için *t-testi* kullanılmış ve farklılaşma grupları sadece kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Epitelyal farklılaşması uyarılan Deney 1 (p=0,022) ve Deney 2 (p=0,036) iDP-MKH'ler ile kontrol grubu hücrelerinin telomeraz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak (p<0,05) değerine göre anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Benzer şekilde, fibroblastik farklılaşma Deney 1 (p=0,023) ve Deney 2 (p=0,015) iDP-MKH'ler ve kontrol grubunun telomeraz aktiviteleri arasındaki farklar aynı istatistiksel yöntemle değerlendirilmiş ve sonuçlar arasındaki fark anlamlı olarak bulunmuştur. Farklılaşma gruplarında gözlenen telomeraz aktivitelerindeki bu düşüş, farklılaşan iDP-MKH'lerin somatik hücrelerin karakteristik özelliklerini kazanmaya başladıklarının göstergesidir.

Çizelge 4.3. Farklılaşma ve kontrol gruplarının telomeraz aktiviteleri

Deney Grubu	Protein Miktarı (1 μ g eşdeğeri)	Telomeraz Aktivitesi	p Değeri
EF DENEY 1	0,1924	0,064 \pm 0.01	0,022
EF DENEY 2	0,2746	0,091 \pm 0.01	0,036
FF DENEY 1	0,1716	0,057 \pm 0.01	0,023
FF DENEY 2	0,1695	0,056 \pm 0.01	0,015
KONTROL	0,5956	0,198 \pm 0.05	

EF; epitelyal farklılaşma grubu, FF; fibroblastik farklılaşma grubu. Her deney en az üç kere tekrarlanmıştır. Çalışmaların verileri, standart sapma (\pm SD) göz önünde bulundurularak belirtilmiştir. Veriler çift taraflı *t-test* kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışma ve kontrol grupları arasındaki farklar için, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlıdır.

5. TARTIŞMA

İnsanlardaki hastalıkların çoğu için bir sağaltım stratejisi olarak ortaya çıkan hücre esaslı tedavinin amacı, hasar gören bir dokunun veya organın biyolojik işlevinin yerine koyulması veya tamir edilmesidir. Kök hücreler, bu uygulamalarda kullanılacak en önemli biyolojik materyallerdir (Karaöz ve Ovalı, 2004). Bu alanda gerçekleştirilen çalışmalarda, farklı kaynaklardan (embriyon ve başta kemik iliği kökenli olmak üzere diğer doku ve organlardan) elde edilen kök hücreler *in vitro* ve *in vivo* deneysel modellerde kullanılmıştır. İnsan kaynaklı embriyonik kök hücrelerin tedavide kullanılmasına yönelik devam etmekte olan etik tartışmalar ve bu hücrelerin teratom oluşturmaları, gelecekte tedavi amaçlı kullanılmalarını engelleyici niteliktedir (Hakeri, 2009). Bu nedenle kök hücre çalışmaları, çeşitli hematopoietik olmayan dokuların (kas, kıkırdak, kemik, sinir, karaciğer, kalp, beyin, yağ dokusu, böbrek, akciğer ve bağırsaklar) somatik hücrelerine farklılaştıkları rapor edilen mezenkimal kök hücreler (MKH) üzerinde yoğunlaşmıştır. MKH'ler, immun düzenleyici etkileri, tümör oluşturma olasılıklarının azlığı, yüksek çoğalma kapasiteleri ve kolay elde edilebilir bir kaynak olmaları nedeniyle hücre esaslı tedavilerde kullanılacak önemli bir kök hücre kaynağı oluşturmaktadır (Prentice, 2006).

Diş pulpası kök hücrelerinin izolasyonu ve tanımlanması, ilk olarak 2000 yılında Gronthos ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiş ve aynı ekip bu hücrelerin *in vitro* koşullarda, odontoblastik, adipojenik ve nöral hücre serilerine farklılaşabildiğini göstermiştir (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002). Diş pulpası kök hücre (DPKH)'lerinin kemik iliği kökenli MKH'ler ile benzer özellikler gösterdiği tespit edilmiştir. Sonraki çalışmaların verileri incelendiğinde, immunofenotipik olarak diş pulpa dokusundan 2 ayrı kök hücre ve/veya kök hücre-benzeri hücre grubunun elde edildiği görülmektedir (Gronthos et al., 2002). Bunlardan ilk grup, CD34, CD45 ve CD14 gibi hematopoietik hücre belirteçlerini taşımayan ancak mezenkimal kök hücrelere özgün STRO-1 başta olmak üzere CD29, CD44 ve CD13 gibi belirteçleri taşıyan hücrelerden oluşmaktadır (Miura et al., 2003; Kerkis et al., 2006; Jo et al., 2007). Diğer grup hücreler, c-kit+/CD34+/CD45- hücrelerden oluşmaktadır. Bu hücrelerin *in vitro* ve *in vivo* osteojenik farklılaşma gösterdiği rapor edilmektedir (d'Aquino et al., 2007).

Bu tez çalışmasında, çekim endikasyonunun sıklığı (kolay elde edilebilir olmaları) nedeniyle gömük yirmi yaş dişleri tercih edilmiştir. Bu dişlerin gelişimin erken döneminde elde edildiklerinde pulpa dokusu açısından zengin olduğu bildirilmektedir (Gronthos et al., 2000). Bu çalışmada gerçekleştirilen akış sitometrik (CD13+, CD44+ ve CD90+; CD45, CD14, CD117, CD11b, HLA-DR ve CD34 negatif) ve immunohistokimyasal (CD31, CD34, CD71 ve CD45 negatif) çalışmaların verileri, izole edilen DP-KH'lerin ilk gruba giren MKH'ler olduğunu göstermektedir. Gerçekleştirilen immunofenotiplendirme çalışmalarında, iDP-MKH'lerin vimentin, fibronektin, alfa-düz kas aktin gibi MKH'lere özgün belirteçler için pozitif reaksiyon göstermeleri bu sonucu desteklemektedir. Elde edilen MTT test sonuçları, bu hücrelerin oldukça yüksek çoğalma kapasitesine sahip olduklarını göstermiştir. iDP-MKH'lerin tip II kollajen, miyozin IIa, miyojenin, osteonektin, osteokalsin ve nestin proteinlerini de yüksek düzeylerde eksprese ettikleri gözlenmiştir. Çoğalmakta olan hücrelerde gözlenen Ki67 çekirdek proteini, hücrelerin mitotik aktivitesinin belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Scholzen and Gerdes, 2000). Proliferasyon belirteci olan Ki67 immun boyamalarının sonucunda, iDP-MKH'lerin çekirdeklerinde gözlenen pozitif immun reaksiyonlar, hücrelerin çoğalma fazında olduğunu göstermiştir.

MKH tanımlamasının yapılabilmesi için elde edilen hücrelerin *in vitro* koşullarda farklılaşma yeteneklerinin (osteojenik, adipojenik, kondrojenik gibi) de gösterilmesi gerekmektedir (Bayık, 2004; Karaöz ve Ovalı, 2004). iDP-MKH'ler *in vitro* ve *in vivo* koşullarda osteojenik ve adipojenik farklılaşma göstermektedir (Gronthos et al., 2002; Ikedo et al., 2006; Jo et al., 2007). Bu çalışmada, iDP-MKH'lerin kimyasal uyarımlarla *in vitro* koşullarda yağ ve kemik hücrelerine farklılaşabildikleri gözlenmiştir. Osteojenik farklılaştırma deneyleri sonucunda, iDP-MKH'lerden kaynaklanan osteoblastlarda hücre-dışı matrikste artmış düzeylerde osteonektin, osteokalsin ve BMP4 dağılımı gözlenmiştir. Alizarin kırmızısı boyamaları sonucu gözlenen kalsifiye kemik nodülleri de kemikleşmenin bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (Jaiswal et al., 1997; Takayasu et al., 2004). Adipojenik farklılaştırma deneylerinde, oil red boyamaları ile iDP-MKH'lerin sitoplazmalarında yağ damlacıkları görülmüştür. Bu durum, iDP-MKH'lerin yağ hücrelerine farklılaşabildiklerini göstermiştir (Chen et al.,

1998; Gronthos et al., 2002). Tüm bu sonuçlar, literatürde tanımlandığı şekliyle, iDP-MKH'lerin KI-MKH benzeri karakteristik özelliklere sahip olduklarını göstermektedir.

Gronthos ve ekibi (2000), yirmi yaş iDP-MKH'lerde nestin ekspresyonunun gerçekleştiğini bildirmektedir. Ayrıca, erişkin DP-KH'lerin nöral kristadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada da iDP-MKH'lerin nöral kök hücrelerde yüksek düzeyde eksprese edilen nestin ve GFAP için kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdikleri tespit edilmiştir. Bununla birlikte, embriyonik kök hücre belirteci olan SSEA-4 ekspresyonları da belirlenmiştir. Bu sonuçlar, iDP-MKH'lerin embriyolojik gelişim süreçlerinin farklı olduğunu göstermektedir.

Şimdiye kadar gerçekleştirilen iDP-MKH çalışmalarında, bu hücrelerin dentin-yapıcı odontoblastlar (Gronthos et al., 2002), osteoblastlar (Laino et al., 2005), yağ hücreleri (Gronthos et al., 2002; Jo et al., 2007), iskelet/düz kas hücreleri (d'Aquino et al., 2007), endotel hücreleri (d'Aquino et al., 2007), kıkırdak hücreleri (Zhang et al., 2006) ve sinir hücrelerine (Zhang et al., 2006; d'Aquino et al., 2007) farklılaşabildiği gösterilmiştir. Ancak, yapılan kaynak taramasında iDP-MKH'lerin epitelyal ve fibroblastik hücre serilerine farklılaşmaları ile ilgili bilimsel bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, iDP-MKH'lerin *in vitro* koşullarda epitelyal ve fibroblastik hücre serilerine farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Păunescu ve ekibinin (2007) gerçekleştirdikleri çalışmada, KI-MKH'lerin büyüme faktörleri varlığında, *in vitro* koşullarda epitel-benzeri hücrelere farklılaşabildiklerini gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında, epitelyal farklılaşmanın uyarılabilmesi için KGF, HGF, EGF ve IGF-2 büyüme faktörü kombinasyonları uygulanmıştır. Literatürde, bu büyüme faktörlerinin epitel hücrelerin çoğalması ve epitelyal yenilenme açısından önemli etki gösterdiği rapor edilmektedir (Ruehl et al., 2002; Terada et al., 2002; Kanayama et al., 2007; Murray and Hargreaves, 2007). Gerçekleştirilen farklılaşma çalışmalarında, üçüncü pasaj(P3)'daki iDP-MKH'lerin kullanılması tercih edilmiştir. Bu şekilde, birincil kültürde gözlenen doku parçacıkları ve somatik hücrelerin kültür ortamından uzaklaştırılması ve farklılaşma çalışmalarında daha doğru verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır (Gronthos et al., 2002; Păunescu et al., 2007). P3 iDP-MKH'lerin akış sitometrik sonuçları bu düşüncemizi desteklemektedir. Gerçekleştirilen epitelyal farklılaşma

deneyleri sonucunda, farklılaşma gruplarında çoğalmanın azalması MKH'lerin çoğalma fazından farklılaşma fazına geçtiklerini düşündürmüştür. Keratinler, epitelyal hücrelere özgü yapısal proteinlerdir ve farklılaşma sürecinde öncelikli olarak sentez edilmektedir. Epitelyum tiplerinin tümünde sitokeratin 18 ve 19 ekspresyonu gözlenmektedir. Buna karşılık, MKH'ler sitokeratin 18 ve 19 eksprese etmemektedir (Brzoska et al., 2005; Păunescu et al., 2007). Bu çalışmada, epitelyal farklılaşması uyarılan iDP-MKH'lerde epitelyal belirteçler olan sitokeratin 18 ve sitokeratin 19 ekspresyonları tespit edilmiştir. Zıt faz mikroskopi incelemelerinde az sayıda hücrede epitel-benzeri morfolojik değişim gözlenmesine karşılık immunohistokimyasal boyamalarda kübik yöndeki morfolojik değişim daha belirgin şekilde gözlenmiştir. Uygulanan uyarın kombinasyonlarının değiştirilmesi ve kültür süresinin artırılması ile epitel hücre sayısının arttırılabileceği düşünülmüştür. Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda, sinir ve kas hücreleri ile ilişkili ara liflerden olan nestinin pulpa dokusunda sadece odontoblast ve öncül hücreler tarafından eksprese edildiği buna karşılık epitel hücrelerin çoğunun nestin için negatif olduğu rapor edilmiştir (About et al., 2000; Selander and Edlund, 2002). Bu çalışmada, iDP-MKH'lerin nestin ekspresyonundaki belirgin azalma ve vimentin ekspresyonlarındaki artış gözlenmiştir. Ayrıca, farklılaşma gruplarının telomeraz aktivitelerinde azalma saptanmıştır. Telomeraz aktivitesindeki bu azalma, farklılaşan hücrelerin somatik hücre karakteristiği kazandığını göstermektedir (Yang et al., 2008). Farklılaşması uyarılan iDP-MKH'lerin epitelyal hücre belirteçlerini eksprese etmeleri, nestin ekspresyonu, telomeraz aktiviteleri ve çoğalma yeteneklerindeki azalma iDP-MKH'lerin epitelyal farklılaşmasının göstergesi olarak kabul edilebilir.

MKH'ler işlevsel otolog ligament ve tendon doku çalışmalarında, fibroblast tedavilerinin yerini alabilecek önemli bir alternatiftir. EGF'nin fibroblastlara kasılabilirlik özelliği kazandırdığı ve bFGF+TGF β kombinasyonunun fibroblastik farklılaşma ve fibroblastların çoğalmasını olumlu yönde etkilediği bilinmektedir (Yasumi et al., 2003; Iwabu et al., 2004). Bu nedenle bu çalışmada, iDP-MKH'lerin fibroblastik farklılaşmasının uyarılması amacıyla EGF+TGF β ve bFGF+ TGF β kombinasyonları uygulanmıştır. Fibroblastlarda ekstraselüler matriks (ECM) bileşenleri olan fibronektin, fibroblast yüzey proteini (FSP) ve tenaskin C'nin yüksek düzeyde eksprese edildiği rapor edilmiştir (Palaiologou

et al., 2001; Terada et al., 2002). Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen fibroblastik farklılaşma deneylerinde, farklılaşma gruplarında fibronektin, FSP ve tenaskin ekspresyonlarının arttığı buna karşılık proliferasyonda azalmanın gerçekleştiği görülmüştür. Sünnet derisinden izole edilen fibroblastlarla karşılaştırıldığında, morfolojik ve immunohistokimyasal olarak benzerlik gözlenmiştir. Chen ve ekibi (2007) gerçekleştirdikleri çalışmada nestin⁻ vimentin⁺ deri fibroblastlarının varlığını rapor etmektedir. Bu çalışmada da kuvvetli nestin pozitif immun-reaksiyon gösteren iDP-MKH'lerin aksine, farklılaşmış hücrelerin nestin ekspresyonlarının azaldığı ancak vimentin ekspresyonlarında belirgin bir artış görüldüğü tespit edilmiştir. Bu veri, elde edilen fibroblast-benzeri hücrelerin bağ doku ile uyumlu olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, ECM proteini tenaskin-C immun-boyamalarında, farklılaşmış iDP-MKH'lerin daha kuvvetli immun-reaksiyon gösterdikleri gözlenmiştir. Literatürde, bağ doku fibroblastlarının endoglin (CD105) ekspresyonlarının oldukça düşük düzeylerde gerçekleştiği bildirilmektedir (Yasukawa et al., 2000). Bununla birlikte, dermal fibroblastların tip II kollajen ekspresyon etmedikleri ve fibröz bağ dokunun tip II kollajen için negatif olduğu rapor edilmektedir (Nicoll et al., 2000; Ono et al., 2000; Louneva et al., 2003; Chen et al., 2007) . Bu çalışmada elde edilen farklılaşmış iDP-MKH'lerde gözlenen CD105 ve tip II kollajen negatif immun-reaksiyonlar bu hücrelerin bağ doku fibroblastları özellikle dermal fibroblastlar olabileceğinin göstergesidir. Fibroblastik farklılaşması uyarılan iDP-MKH'lerde gözlenen nestin ekspresyonundaki azalma ve ECM protein ekspresyonlarının artması iDP-MKH'lerin fibroblastik farklılaşmasını destekleyici niteliktedir. Ayrıca, farklılaşma ve kontrol gruplarının telomeraz aktiviteleri karşılaştırıldığında farklılaşma gruplarında istatistiksel anlamlı bir azalma belirlenmiştir. Telomeraz aktivitesi çoğalmada genetik yapının korunmasında olduğu gibi farklılaşmada da önemli bir rol oynamaktadır. Embriyonik kök hücrelerde genetik rekombinasyon yolu ile telomeraz enzim aktivitesi yüksek düzeyde arttığında, elde edilen hücrelerin farklılaşma özelliğini tamamen yitirdiği gözlenmiştir. MKH'lerde gözlenen düşük seviyelerdeki telomeraz aktivitesinin farklılaşmaya yönelik bir eğilim olduğu düşünülmektedir (Yang et al., 2008). Bu çalışmada, hem epitelyal hem de fibroblastik farklılaşma gruplarının telomeraz aktivitelerinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Bu

veriler, farklılaşma sonrasında hücrelerin diğer somatik hücrelerin karakteristik özelliklerinden olan düşük telomeraz aktivitesi kazandığını göstermektedir.

Bu tez çalışmasında elde edilen morfolojik ve immunohistokimyasal veriler, iDP-MKH'lerin *in vitro* epitelyal ve fibroblastik farklılaşmalarının uygun uyaran kombinasyonlarıyla yönlendirilebileceğini gösteren bir adımdır. iDP-MKH'lerin farklılaşmasını uyaran farklı kimyasal uygulamaları ile gerçekleştirilecek çalışmalar bu bulguları destekleyecektir. Bununla birlikte, hücrelerde meydana gelen değişikliklerin mRNA'da da değişikliğe neden olduğu bilinmektedir (Vemuri and Chetty, 2007). Bu nedenle, çalışma verilerinin mRNA düzeyindeki analizlerle desteklenmesi gerekmektedir. mRNA veya mRNA'da transkribe edilen protein ürününün izolasyonu ve analizlerinin gerçekleştirilmesi ile elde edilen farklılaşmış hücrelerin epitelyal ve fibroblastik proteinlere özgü gen ekspresyonları belirlenmiş olacak ve iDP-MKH'lerin fibroblastik ve epitelyal hücrelere farklılaşma yetenekleri kesin olarak belirlenecektir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak; bu çalışmada erişkin insan diş pulpası dokusundan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildikten sonra *in vitro* epitelyal ve fibroblastik farklılaşma potansiyelleri araştırılmıştır. Elde edilen bu hücrelerin literatürde tanımlanmış özellikleriyle karşılaştırıldığında büyük oranda KI-MKH'ler ile benzer ortak immunofenotipik özellikler gösterdikleri görülmüştür. Farklılaşmayı uyaran büyüme faktörleri (KGF, HGF, EGF, IGF-2) varlığında, epitel-benzeri hücreler gözlenmiş ve bFGF+TGF β , EGF+TGF β kombinasyonları iDP-MKH'lerin fibroblast-benzeri morfolojik ve immunohistokimyasal değişim gösterdikleri tespit edilmiştir. Ancak, kesin bir sonuca varılabilmesi için, elde edilen verilerin mRNA düzeyinde gerçekleştirilecek çalışmalarla da desteklenmesi gerekmektedir. Fibroblastik ve epitelyal farklılaşma yeteneklerinin belirlenmesi ile iDP-MKH'ler, deri başta olmak üzere diğer organ kavitelerinde (mide iç yüzeyi, ürogenital sistem ve göğüs kanalları) gerçekleşen epitel hücre kayıplarının klinik tedavileri, bağ doku ve ekstrasellüler matriksin yeniden yapılandırılmasına yönelik klinik uygulamalar ve doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabilir önemli bir alternatif kaynağı olacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abedi, M., Greer, D.A., Colvin, G.A., Demers, D.A., Dooner, M.S., Harpel, J.A.**, 2004, Robust conversion of marrow cells to skeletal muscle with formation of marrow-derived muscle cell colonies: a multifactorial process, *Exp Hematol* 32(5):426-34.
- About, I., Laurent-Maquin, D., Lendahl, U., Mitsiadis, T.A.**, 2000, Nestin Expression in Embryonic and Adult Human Teeth under Normal and Pathological Conditions, *American Journal of Pathology* 157(1):1, 287-295.
- Aldous, W.K., Grabill, N.R.**, 1997, A fluorescent method for detection of telomerase activity, *Diagnostic Molecular Pathology*, 6(2):102-110.
- Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J.M., Fike, J.R., Lee, H.O., Pfeffer, K.**, 2003, Fusion of bonemarrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes, *Nature* 425(6961):968-73.
- American Association for the Advancement of Science**,1999. "Stem Cell Research and Applications Monitoring the Frontiers of Biomedical Research", 39p, www.aaas.org/spp/sfml/projects/stem/report.pdf (Erişim tarihi: 22 Haziran 2009)
- Anderson, D.J., Gage, F.H., Weissman, I.L.**, 2001, Can Stem Cells Cross Lineage Boundaries? *Nature Medicine* 7(4):393-395.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T.**, 1997, Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis, *Science* 275(5302):964-7.
- Awad, H.A., Butler, D.L., Boivin, G.P., Smith, F.N., Malaviya, P., Huibregtse, B., Caplan, A.I.**, 1999, Autologous Mesenchymal Stem Cell-Mediated Repair of Tendon, *Tissue Engineering* 5(3):267-277.
- Ball, E.D., Law, P., Lister, J.W.**, 2000, Hematopoietic Stem Cell Therapy, Philadelphia, Churchill Livingstone, 56p.
- Barnett, S.C., Chang, L.**, 2004, Olfactory ensheathing cells and CNS repair: going solo or in need of a friend? *Trends Neuroscience* 27(1):54-60.
- Barrett, S.**, 2003, "Cellular Therapy", <http://www.quackwatch.com/01QuackeryRelatedTopics> (Erişim tarihi: 28 Ağustos 2009)
- Bayık, M.**, 2004, Kök Hücre: Yaşamın Kaynağı, I.Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongre Kitabı, s13-23.
- Bensinger, W., DiPersio, J.F., McCarty, J.M.**, 2009, Improving stem cell mobilization strategies: future directions, *Bone Marrow Transplantation* 43:181-195.
- Bianco, P., Cossu, G.**, 1999, Uno, nessuno e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors, *Exp. Cell Res.* 251:257-263.
- Bongso, A., Lee, E.H.**, 2005. "Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources", www.worldscibooks.com/etextbook/5729/5729_chap1.pdf (Erişim tarihi: 19 Mayıs 2009)

- Bongso, A., Richards, M.,** 2004, History and perspective of stem cell research. In *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, eds. N. Fisk & J. Itskovitz, London: Elsevier Ltd.
- Blau, H.M., Brazelton, T.R., Weimman, J.M.,** 2001, The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 106:829-841.
- Bonner-Weir, S., Taneja, M., Weir, G.C., Tatarkiewicz, K., Song, K.H., Sharma, A.,** 2000, In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue, *Proc Natl Acad Sci, USA* 97 (14):7999-8004.
- Bowen, A., English, A., Jones, E., Wood, S., Kirkham, J., Yang, X.B.,** 2006, Isolation and Preliminary Characterisation of Stem Cells from Human Dental Pulp, *European Cells and Materials* 11(3): 58.
- Brendel, C., Kuklick, L., Hartmann, O., Kim, T. D., Boudriot, U., Schwell, D., Neubauer, A.,** 2005, Distinct gene expression profile of human mesenchymal stem cells in comparison to skin fibroblasts employing cDNA microarray analysis of 9600 genes, *Gene Expr* 12(4-6):245-57.
- Britten, M.B., Abolmaali, N., Assmus, B., Lehmann, R., Honold, J., Schmitt, J., Vogl, T.J., Martin, H., Schachinger, V., Dimmeler, S., Zeiher, A.M.,** 2003, Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment inpatients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): Mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging, *Circulation* 108:2212 –2218.
- Brzoska, M., Geiger, H., Gauer, S., Baer, P.,** 2005, Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells, *Biochem Biophys Res Commun* 330:142–150.
- Burns, J.S., Abdallah, B.M., Guldberg, P., Rygaard, J., Schroder, H.D., Kasem, M.,** 2005, Tumorigenic heterogeneity in cancer stem cells evolved from long-term cultures of telomerase-immortalized human mesenchymal stem cells, *Cancer Res* 65(8):3126-35.
- Caplan, A.I., Haynesworth, S.E.,** 1998, Connective tissue regeneration using human mesenchymal stem cell preparations, *United States Patent* 5811094.
- Chen, F.G., Zhang, W.J., Bi, D., Liu, W., Wei, X., Chen, F.F., Zhu, L., Cui, L., Cao, Y.,** 2007, Clonal Analysis of Nestin- Vimentin+ Multipotent Fibroblasts Isolated from Human Dermis, *Journal of Cell Science* 120:2875-2883.
- Chen, D., Ji, X., Haris, M.A., Feng, J.Q., Karsenty, G., Celeste, A.J., Rosen, V., Mundy, G.R., Haris, S.E.,** 1998, Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages, *J Cell Biol* 142:295–305.
- Chen, K.C., Minor, T.X., Rahman, N.U., Ho, H.C., Nunes, L., Lue, T.F.,** 2005, The additive erectile recovery effect of brain-derived neurotrophic factor combined with vascular endothelial growth factor in a rat model of neurogenic impotence, *BJU Int* 95:1077–1080.

- Chen, Y., Shao, J.Z., Xiang, L.X., Dong, X.J., Zhang, G.R.,** 2008, Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine, *Int J Biochem Cell Biol.* 40(5):815-20.
- Chen, Z., De Paiva, C.S., Luo, L., Kretzer, F.L., Pflugfelder, S.C., Li, D.Q.,** 2004, Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia, *Stem Cells* 22(3):355-66.
- d'Aquino, R., Graziano, A., Sampaolesi, M., Laino, G., Pirozzi, G., De Rosa, A., Papaccio, G.,** 2007, Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation, *Cell Death Differ* 14(6):1162-71.
- Devine, S., Cobbs, C., Jennings, M., Bartholomew, A., Hoffman, R.,** 2003, Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into non-human primates, *Blood* 15, 101(8):2999-3001.
- Dezzutti, C.S., Lal, R.B.,** 1998, Mechanisms of HIV transmission through epithelial cell barriers, *Int Conf AIDS* 12:545.
- Diascro, D.D., Vogel, R.L., Johnson, T.E., Witherup, K.M., Pitzemberger, S.M., Rutledge, S.J., Prescott, D.J., Rodan, G.A., Schmidt, A.,** 1998, High fatty acid content in rabbit serum is responsible for the differentiation of osteoblasts into adipocyte-like cells, *J Bone Miner Res* 13:96–106.
- Dinçer, F.,** 1982, Ord. Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün'ün Hayatı ve Bilimsel Çalışmaları, *A.Ü. Vet. Fak. Derg.* 29(1-2):256-276.
- Eglitis, M.A., Mezey, E.,** 1997, Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice, *Proc Natl Acad Sci USA* 94(8):4080-5.
- Epperly, M.W., Guo, H., Shen, H., Niu, Y., Zhang, X., Jefferson, M., Sikora, C.A., Greenberger, J.S.,** 2004, Bone marrow origin of cells with capacity for homing and differentiation to esophageal squamous epithelium, *Radiat Res* 162:233–40.
- Estes, B.T., Wu, A.W., Guilak, F.,** 2006, Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6, *Arthritis Rheum* 54:1222–1232.
- European Molecular Biology Organization,** 2006, Stem Cell Research; Status Prospects Prerequisites, 11-13.
- Feasel, A.M., Donato, M.L., Duvic, M.,** 2001, Complete remission of scleromyxedema following autologous stem cell transplantation, *Arch Dermatol* 137:1071–2.
- Freshney, I.A., Stacey, G.N., Auerbach, J.M.,** 2007, Culture of Human Stem Cells, Wiley-Liss, p5-18.
- Fisher, P.B.,** 1990, Mechanisms of Differentiation: Model cell culture systems for studying differentiation, CRC Press, 164p.
- Gimble, J.M., Guilak, F., Nuttall, M.E., Sathishkumar, S., Vidal, M., Bunnell, B.A.,** 2008, In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells, *Transfus Med Hemother* 35:228–238.

- Graziano, A., d'Aquino, R., Laino, G., Papaccio, G.,** 2008, Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration, *Stem Cell Rev* 4(1):21-6.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G., Shi, S.,** 2000, Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo, *Proc Natl Acad Sci USA* 97(25):13625-30.
- Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, L.W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P.G., Shi, S.,** 2002, Stem cell properties of human dental pulp stem cells, *J Dent Res* 81(8):531-5.
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C.D., Buzney, E.B., Flint, A.F., Khan, M.K., Kunkel, L.M., Mulligan, R.C.,** 1999, Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation, *Nature* 401:390-394.
- Hakeri, H.,** 2009, Kök Hücre Çalışmaları ve Hukuki Boyutu, *1. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongre Kitabı*, Nevşehir, 67-76.
- Hampson, K., Forsyth, N.R., Haj, A.E., Maffulli, N.,** 2008, Tendon Tissue Engineering, *Topics in Tissue Engineering* 4(3).
- Haniffa, M.A., Collin, M.P., Buckley, C.D., Dazzi, F.,** 2009, Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica* 94(2):258-263.
- Henschler, R., Deak, E., Seifried, E.,** 2008, Homing of Mesenchymal Stem Cells, *Transfus Med Hemother* 35:306–312.
- Herzog, E.L., Chai, L., Krause, D.S.,** 2003, Plasticity of marrow-derived stem cells, *Blood* 102(10):3483-93.
- Hikita, J.C., Vijayakumar, S., Takito, J., Erdjument-Bromage, H.E., Tempst, P., Al-Awqati, Q.,** 2000, Induction of Terminal Differentiation in Epithelial Cells Requires Polymerization of Hensin by Galectin 3, *The Journal of Cell Biology* 151:6.
- Hiyama, E., Hiyama, K.,** 2007, Telomere and telomerase in stem cells, *British Journal of Cancer* 96: 1020–1024.
- Hofstetter, C.P., Schwarz, E.J., Hess, D., Widenfalk, J., El Manira, A., Prockop, D.J., Olson, L.,** 2002, Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery, *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2199–204.
- Iwabu, A., Smith, K., Allen, F.D., Lauffenburger, D.A., Wells, A.,** 2004, Epidermal growth factor induces fibroblast contractility and motility via a protein kinase C delta-dependent pathway, *J Biol Chem* 279(15):14551-60.
- Ianus, A., Holz, G.G., Theise, N.D., Hussain, M.A.,** 2003, In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion, *J Clin Invest* 111(6):843-50.
- Ito, T., Suzuki, A., Imai, E., Okabe, M., Hori, M.,** 2001, Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling, *J Am Soc Nephrol.* 12: 2625–35.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., Bruder, S.P.,** 1997, Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro, *J. Cell. Biochem*, 64: 295–312.

- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R.,** 2002, Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow, *Nature* 418(6893):41-9.
- Jo, Y.Y., Lee, H.J., Kook, S.Y., Choung, H.W., Park, J.Y., Chung, J.H., Choung, Y.H., Kim, E.S., Yang, H.C., Choung, P.H.,** 2007, Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues, *Tissue Eng.* 13(4):767-73.
- Johe, K.K., Hazel, T.G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M.M., McKay, R.D.,** 1996, Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system, *Genes Dev* 10(24):3129-40.
- Kalluri, R., Zeisberg, M.,** 2006, Fibroblasts in cancer, *Nat Rev Cancer* 6(5):392-401.
- Kanayama, M., Takahara, T., Yata, Y., Xue, F., Shinno, E., Nonome, K., Kudo, H., Kawai, K., Kudo, T., Tabuchi, Y., Watanabe, A., Sugiyama, T.,** 2007, Hepatocyte growth factor promotes colonic epithelial regeneration via Akt signaling, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: 230-239.
- Karaöz, E., Ovalı, E.,** 2004, Kök Hücreler, Atı Teknoloji Yayınları (1), Trabzon.
- Karaöz, E., Doğan, B.N., Aksoy, A., Gacar, G., Akyüz, S., Ayhan, S., Genç, Z.S., Yürüker, S., Duruksu, G., Demircan, P.C., Sarıboyacı, A.E.,** 2009, Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth, *Histochem Cell Biol* doi:10.1007/s00418-009-0646-5.
- Kataoka, K., Medina, R.J., Kageyama, T., Miyazaki, M., Yoshino, T., Makino, T., Huh, N.,** 2003, Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution of skin, *Am J Pathol.* 163: 1227–31.
- Kiernan J.,** 1990, Histological and histochemical methods, Theory and Practice, Second Ed. Pergamon Pres, Oxford.
- Kim, S., Rosania, G.R., Chang, Y.T.,** 2004, Dedifferentiation? What's next? *Molecular Interventions* 4(2):83-85
- Krause, D.S., Theise, N.D., Collector, M.I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R.,** 2001, Multi-organ, multilineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell, *Cell* 105(3):369-77.
- Kotton, D.N., Ma, B.Y., Cardoso, W.V., Sanderson, E.A., Summer, R.S., Williams, M.C., Fine, A.,** 2001, Bone marrow derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium, *Development* 128:5181–8.
- Kocaoemer, A., Kern, S., Klüter, H., Bieback, K.,** 2007, Human AB Serum and Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma Are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue, *Stem Cells* 25(5):1270-1278.
- Kodama, R., Eguchi, G.,** 1994, The loss of gap junctional cell-to-cell communication is coupled with dedifferentiation of retinal pigmented epithelial cells in the course of transdifferentiation into the lens, *Int J Dev Biol* 38:357–364.

- Kotton, D.N., Ma, B.Y., Cardoso, W.V., Sanderson, E.A., Summer, R.S., Williams, M.C., Fine, A.**, 2001, Bone marrow derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium, *Development* 128: 5181–8.
- Koyama, N., Okubo, Y., Nakao, K., Bessho, K.**, 2009, Evaluation of Pluripotency in Human Dental Pulp Cells, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 67(3):501-6.
- Kögler, G., Sensken, S., Airey, J.A., Trapp, T., Müschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R.V., Fischer, J., Rosenbaum, C., Greschat, S., Knipper, A., Bender, J., Degistirici, O., Gao, J., Caplan, A.I., Colletti,**
- Kömürcü, M., Özkan, H.**, 2006, Mezenkimal Kök Hücre ve Ortopedide Kullanımı, *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi* 5:3-4.
- Krebsbach, P.H., Robey, P.G.**, 2002, Dental and Skeletal Stem Cells: Potential Cellular Regeneration, *Journal Of Dental Education* 66:6, 766-773.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I.L., Grompe, M.**, 2000, Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo, *Nat Med* 6(11):1229-34.
- Laino, G., d'Aquino, R., Graziano, A., Lanza, V., Carinci, F., Naro, F., Pirozzi, G., Papaccio, G.**, 2005, A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB), *J Bone Miner Res* 20(8):1394-402.
- Lakshmipathy, U., Verfaillie, C.**, 2005, Stem cell plasticity, *Blood Rev* 2005:19(1):29-38.
- Lanza, R.P.**, 2006, Essentials of stem cell biology, Elsevier Academic Press, San Diego, California.
- Laugwitz, K.L., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S.**, 2005, Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages, *Nature* 433(7026):647-53.
- Lawrence, W.T., Diegelmann, R.F.**, 1994,. Growth factors in wound healing, *Clinics in Dermatology*, 12:157-169.
- Lecka-Czernik, B., Gubrij, I., Moerman, E.J., Kajkenova, O., Lipschitz, D.A., Manolagas, S.C., Jilka, R.L.**, 1999, Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPARgamma2, *J Cell Biochem* 74:57–371.
- Lee, K.D., Kuo, T.K., Whang-Peng, J., Chung, Y.F., Lin, C.T., Chou, S.H., Chen, J.R., Chen, Y.P., Lee, O.K.**, 2004, In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Hepatology* 40:1275–1284.
- Lee, J.Y., Cannon, T.W., Pruchnic, R., Fraser, M.O., Huard, J., Chancellor, M.B.**, 2003, The effects of periurethral muscle-derived stem cell injection on leak point pressure in a rat model of stress urinary incontinence, *International Urogynecology Journal of Pelvic Floor Dysfunction* 14:31-37.
- Lei, Z., Yongda, L., Jun, M., Yingyu, S., Shaoju, Z., Xinwen, Z., Mingxue, Z.**, 2007, Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro, *Cell Biol Int* 31(9):916-23.

- Lemischka, I.R.**, 1997, Microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells, *Stem Cells* 15(1):63-8.
- Lemischka, I.**, 2002, A few thoughts about the plasticity of stem cells, *Exp Hematol* 30(8):848-52.
- Lemire, J.M., Shiojiri, N., Fausto, N.**, 1991, Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine, *Am J Pathol* 139(3):535-52.
- Lendeckel, S., Jödicke, A., Christophis, P., Heidinger, K., Wolff, J., Fraser, J.K., Hedrick, M.H., Berthold, L., Howaldt, H.P.**, 2004, Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report, *J Craniomaxillofac Surg* 32:370-3.
- Leri, A., Kajstura, J., Anversa, P.**, 2005, Identity Deception: Not a Crime for a Stem Cell, *Physiology* 20:162-168.
- Li, H., Liu, H., Heler, S.**, 2003, Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear, *Nat Med* 9:1293-9.
- Lindblad, W.J.**, 2004, Stem cells in Dermal Wound Healing, *Stem Cell Handbook* ed. by Sell, 101-105.
- Liu, H., Fana, H., Tohb, S.L., Goh, J.C.H.**, 2007, A comparison of rabbit mesenchymal stem cells and anterior cruciate ligament fibroblasts responses on combined silk scaffolds, *Biomaterials* 29(10):1443-53.
- Loeffler, M., Roeder, I.**, 2002, Tissue Stem Cells: Definition, Plasticity, Heterogeneity, Self-Organization and Models - A Conceptual Approach, *Cells Tissues Organs* 171:8-26.
- Louneva, N., Saitta, B., Herrick, D.J., Jimenez, S.A.**, 2003, Transcriptional Inhibition of Type I Collagen Gene Expression in Scleroderma Fibroblasts by the Antineoplastic Drug Ecteinascidin 743, *The Journal of Biological Chemistry* 278(41):40400-40407.
- Mauth, C., Huwig, A., Graf-Hausner, U., Roulet, J.F.**, 2007, Restorative Applications for Dental Pulp Therapy, *Topics in Tissue Engineering* (Eds. N Ashammakhi, R Reis & E Chiellini) 3.
- Mezey, E., Chandross, K.J., Harta, G., Maki, R.A., McKercher, S.R.**, 2000, Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow, *Science* 290(5497):1779-82.
- Mezey, E., Nagy, A., Szalayova, I., Key, S., Bratincsak, A., Baffi, J., Shahar, T.**, 2003, Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo, *Science* 299(5610):1184.
- Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D.B., Strom, S.C.**, 2005, Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells, *Stem Cells* 23:1549-59.
- Miyoshi, K., Nagata, H., Horiguchi, T., Abe, K., Wahyudi, I.A., Baba, Y., Harada, H., Noma, T.**, 2008, BMP2-induced gene profiling in dental epithelial cell line, *The Journal of Medical Investigation* 55:216-226.
- Molnar, E.M.**, 1985, Forever Young; The Practical Handbook of Youth Extension, Witkower Press, Connecticut, USA, 79-91.

- Moreau, J.E., Chen, J., Bramono, D.S., Volloch, V., Chernoff, H., Vunjak-Novakovic, G., Richmond, J., Kaplan, D.L., Altman, G.H.,** 2005, Growth factor induced fibroblast differentiation from human bone marrow stromal cells in vitro, *Journal of Orthopaedic Research* 23:164–174.
- Morgan, J.R., Yarmush, M.L.,** 1999, Methods in Molecular Medicine; Tissue Engineering Methods and Protocols, Medicine Biomed Protocols, p629.
- Morrison, S.J., Shah, N.M., Anderson, D.J.,** 1997, Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology, *Cell* 88:287–298.
- Most (Ministry of Research Science and Tecnology),** 2006, Stem Cell Research in New Zealand; Challenges and Opportunities for the Research Sector, New Zealand p13-16.
- Morszeck, C., Reichert, T.E., Völlner, F., Gerlach, T., Driemel, O.,** 2007, The state of the art in human dental stem cell research, *Mund Kiefer Gesichtschir* 11(5):259-66.
- Morszeck, C., Schmalz, G., Reichert, T.E., Völlner, F., Galler, K., Driemel, O.,** 2008, Somatic stem cells for regenerative dentistry, *Clin Oral Invest* 12:113–118.
- Murray, P.E., Hargreaves, K.M.,** 2007, Regenerative Endodontics: A Review of Current Status and a Call for Action, *Regenerative Endodontics* 33(4):377-390.
- Murrell, W., Féron, F., Wetzig, A., Cameron, N., Splatt, K., Bellete, B., Bianco, J., Perry, C., Lee, G., Mackay-Sim, A.,** 2005, Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa, *Dev Dyn* 233:496–515.
- Muschler, G.F., Midura, R.J., Nakamoto, C.,** 2003, Practical Modeling Concepts for Connective Tissue Stem Cell and Progenitor Compartment Kinetics, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2003(3):170-193.
- National Research Council,** 2001, Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine, National Academy Press, Washington DC.
- Nicoll, S.B., Nakama, L.H., Smith, N.R., Bhatnagar, R.S.,** 2000, Characterization of Tissue Engineered Cartilage Composed of Human Dermal Fibroblasts Seeded on Three-Dimensional Polymer Scaffolds: Gene Expression and Structural Organization, *Tissue Engineering* 34: 202-203.
- Niehans, P.,** 1960, Introduction to Cellular Therapy, Pagent Books, Inc., New York, p7-42.
- Niemann, C., Watt, F.M.,** 2002, Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis, *Trends Cell Biol* 12(4):185-92.
- Nielsen, H.C., Martin, A., Volpe, M.V., Hatzis, D., Vosatka, R.J.,** 2002, Growth Factor Control of Growth and Epithelial Differentiation in Embryonic Lungs, *Biochem Mol Med* 60(1):38-48.
- Newsome, P.N., Johannessen, I., Boyle, S., Dalakas, E., McAulay, K.A., Samuel, K.,** 2003, Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion, *Gastroenterology* 124(7):1891-900.

- Ogawa, M., LaRue, A.C., Drake, C.J.**, 2006, Hematopoietic origin of fibroblasts/myofibroblasts: its pathophysiologic implications, *Blood* 108:2893-2896.
- Oh, S.H., Muzzonigro, T.M., Bae, S.H., LaPlante, J.M., Hatch, H.M., Petersen, B.E.**, 2004, Adult bone marrow derived cells transdifferentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes, *Lab Invest* 84:607-17.
- Okamoto, R., Watanabe, M.**, 2004, Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia, *J Gastroenterol* 39:1-6.
- Organ Nakli Koordinatörleri Derneği**, “Organ Nakli İstatistikleri”, <http://www.onkod.org> (Erişim tarihi: 10 Ağustos 2009).
- Orlic, D., Hill, J.M., Arai, A.E.**, 2002, Stem Cells for Myocardial Regeneration, *Circulation Research* 91:1092-1102.
- Ono, M., Yamashita, Y., Minimizaki, T., Morio, Y.**, 2000, Processes of Osteophyte Formation in Guinea Pigs with Spontaneous Osteoarthritis, *Yonago Acta Medica* 43: 131-140.
- Otani, A., Dorrell, M.I., Kinder, K., Moreno, S.K., Nusinowitz, S., Banin, E., Heckenlively, J., Friedlander, M.**, 2004, Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells, *J Clin Invest* 114:765-74.
- Ozcan, T., Seyis, S., Akcay, B.**, 2007, Hücresel Kardiyomiyoblasti ve Kök Hücre Tedavisi, *Turkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci* 19:68-76.
- Palaiologou, A.A., Yukna, R.A., Moses, R., Lallier, T.E.**, 2001, Gingival, Dermal, and Periodontal Ligament Fibroblasts Express Different Extracellular Matrix Receptors, *Journal of Periodontology* 72(6):798-807.
- Păunescu, V., Deak, E., Herman, D., Siska, I.R., Tănasie, G., Bunu, C., Anghel, S., Tatu, C.A., Oprea, T.I., Henschler, R., Rüster, B., Bistran, R., Seifried, E.**, 2007, In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage, *J Cell Mol Med* 11(3):502-8.
- Pereira, R.F., Halford, K.W., O'Hara, M.D., Leeper, D.B., Sokolov, B.P., Pollard, M.D., Bagasra, O., Prockop, D.J.**, 1995, Marrow stromal cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice, *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4857-61.
- Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S., Goff, J.P.**, 1999, Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells, *Science* 284:1168-70.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R.**, 1999, Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells, *Science* 284(5411):143-147.
- Pittenger, M.F., Marshak, D.R.**, 2001, Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p349-374.

- Planat-Benard, V., Menard, C., Andre, M., Puceat, M., Perez, A., Garcia-Verdugo, J.M., Penicaud, L., Casteilla, L.,** 2004, Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells, *Circ Res* 94:223–229.
- Plomer, A.,** 2005, The Law and Ethics of Medical Research. International Bioethics and Human Rights, Cavendish Publishing Limited, Great Britain, p67-92.
- Potten, C.S., Loeffler, M.,** 1990, Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties, Lessons for and from the crypt, *Development* 110:1001–1020.
- Potten, C.S.,** 1998, Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353(1370):821-30.
- Poulsom, R., Forbes, S.J., Hodivala-Dilke, K., Ryan, E., Wyles, S., Navaratnarasah, S., Jeffery, R., Hunt, T., Alison, M., Cook, T., Pusey, C., Wright, N.A.,** 2001, Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration, *J Pathol* 195:229–35.
- Prentice, D.,** 2004, Adult stem cells in: Monitoring stem cell research: a report of the President's Council on Bioethics, Washington (DC), Government Printing Office, p309–46.
- Prentice, D.,** 2006, Current Science of Regenerative Medicine with Stem Cells, *Journal of Investigative Medicine* 54 (1):33-37.
- Prowen, K.R.,** 2002, Detection of Telomerase Activity in Neural Cells, *Methods in Molecular Biology*, 198:137-146.
- Prusa, A.R., Marton, E., Rosner, M., Bernaschek, G., Hengstschläger, M.,** 2003, Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod* 18:1489–93.
- Quesenberry, P.J., Colvin, G.A., Lambert, J.F.,** 2002, The chiaroscuro stem cell: a unified stem cell theory, *Blood* 100(13):4266-71.
- Quesenberry, P.J., Dooner, G., Colvin, G., Abedi, M.,** 2005, Stem cell biology and the plasticity polemic, *Exp Hematol* 33(4):389-94.
- Radisky, D.R., LaBarge, M.A.,** 2008, Epithelial-Mesenchymal Transition and the Stem Cell Phenotype, *Stem Cell* 2:511-512.
- Rojas, M., Xu, J., Woods, C.R., Mora, A.L., Spears, W., Roman, J.,** 2005, Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells in Repair of the Injured Lung, *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:145–152.
- Ruehl, M., Somasundaram, R., Schoenfelder, I., Farndale, R.W., Knight, C.G., Schmid, M., Ackermann, R., Riecken, E.O., Zeitz, M., Schuppan, D.,** 2002, The epithelial mitogen keratinocyte growth factor binds to collagens via the consensus sequence glycine-proline-hydroxyproline, *J Biol Chem* 277(30):26872-8.
- Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., Muneta, T.,** 2005, Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source, *Arthritis Rheum* 52:2521–2529.

- Samad, N., Masoud, S., Reza, H., Mohammad, M., Amir, A.,** 2007, An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells, *Int. J. Dev. Biol.* 51:723-729.
- Seaberg, R.M., Smukler, S.R., Kieffer, T.J., Enikolopov, G., Asghar, Z., Wheeler, M.B., Korbitt, G., Van der Kooy, D.,** 2000, Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages, *Nat Biotechnol* 22:1115–24.
- Selander, L., Edlund, H.,** 2002, Nestin is expressed in mesenchymal and not epithelial cells of the developing mouse pancreas, *Mechanisms of Development* 113:189-192.
- Seo, M.J., Suh, S.Y., Bae, Y.C., Jung, J.S.,** 2005, Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo, *Biochem Biophys Res Commun* 328:258–264.
- Shamblott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P.J., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., Gearhart, J.D.,** 1998, Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13726–13731.
- Shen, B.Q., Panos, R.J., Hansen-Guzman, K., Widdicombe, J.H., Mrsny, R.J.,** 1997, Hepatocyte growth factor stimulates the differentiation of human tracheal epithelia in vitro, *American journal of physiology* 16(6):1115-1120.
- Shihabuddin, L.S., Horner, P.J., Ray, J., Gage, F.H.,** 2000, Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus, *J Neuroscience* 20(23):8727-35.
- Shibata, D., Tavaré, S.,** 2006, Counting divisions in a human somatic cell tree: how, what and why? *Cell Cycle* 5:610–614.
- Shibata, D., Tavaré, S.,** 2007, Stem Cell Chronicles: Autobiographies Within Genomes, *Stem Cell Rev* 3:94–103.
- Shyu, W.C., Lin, S.Z., Yang, H.I., Tzeng, Y.S., Pang, C.Y., Yen, P.S., Li, H.,** 2004, Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells, *Circulation* 110:1847–54.
- Shumakov, V.I., Onishchenko, N.A., Rasulov, M.F., Krasheninnikov, M.E., Zaidenov, V.A.,** 2003, Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells More Effectively Stimulate Regeneration of Deep Burn Wounds than Embryonic Fibroblasts, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 136(2):192-195.
- Slack, J.M. and Tosh, D.,** 2001, Transdifferentiation and metaplasia—switching cell types, *Curr Opin Genet Dev* 11:581–586.
- Soria, B., Roche, E., Berná, G., León-Quinto, T., Reig, J.A., Martin, F.,** 2000, Insulin-secreting cells derived from embryonic stem-cells normalize glycaemia in streptozotocin-induced diabetic mice, *Diabetes* 49:157-16.
- Smith, A.,** 2006, Glossary A glossary for stem-cell biology, *Nature* 441:1060.
- Spees, J.L., Olson, S.D., Ylostalo, J., Lynch, P.J., Smith, J., Perry, A., Peister, A., Wang, M.Y., Prockop, D.J.,** 2003, Differentiation, cell fusion, and

nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma, *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2397–402.

- Spitkovsky, D., Hescheler, J.**, 2008, Adult mesenchymal stromal stem cells for therapeutic applications, *Minim Invasive Ther Allied Technol* 17:79-90.
- Stevens, A., Zuliani, T., Olejnik, C., LeRoy, H., Obriot, H., Kerr-Conte, J., Formstecher, P., Bailliez, Y., Polakowska, R.**, 2008, Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities, *Stem Cells and Dev* 17(6):1175-84.
- Stewart, R., Stojkovic, M., Lako, M.**, 2006, Mechanisms of self renewal in human embryonic stem cells, *European J Cancer* 42(9):1257-72.
- Stolzing, A., Coleman, N., Scutt, A.**, 2006, Glucose-Induced Replicative Senescence in Mesenchymal Stem Cells, *Rejuvenation Research* 9(1):31-35.
- Scholzen, T., Gerdes, J.**, 2000, The Ki-67 protein: from the known and the unknown, *J Cell Physiol* 182:311-22.
- Stoscheck, C.M.**, 1990, Quantitation of Proteins, *Methods in Enzymology*, 182:50-69.
- Suzdal'tseva, Y.G., Burunova, V.V., Petrakova, N.V., Vakhrushev, I.V., Yarygin, K.N., Yarygin, V.N.**, 2007, Comparative Analysis of Cytophenotypes of Cells of Mesenchymal Lineage Isolated from Human Tissues, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 143(1):147-166.
- Şahin, F., Saydam, G., Omay, S.B.**, 2005, Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi, *Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi* 1 (15):48-56.
- Takeyasu, M., Nozaki, T., Watanabe, M., Shinohara, M., Morita, J., Hidaka, A., Iwamoto, K., Takahashi, T., Nagata, S., Daito, M., Ohura, K.**, 2004, In vitro Osteogenic Differentiation Potential of Dental Pulp Stem Cells, *Journal of Oral Tissue Engineering* 2(1):25-30.
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y.**, 2002, Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion, *Nature* 416(6880):542-5.
- The National Academy of Sciences**, 2002, Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine, National Academy Press, Washington, DC, p9-12.
- Todorović, V., Marković, D., Milošević-Jovčić, N., Petakov, M., Balint, B., Čolić, M., Milenković, A., Čolak, I., Jokanović, V., Nikolić, N.**, 2008, Dental pulp stem cells - potential significance in regenerative medicine, *Stom Glas S* 55:170-8.
- Tomita, M., Adachi, Y., Yamada, H., Takahashi, K., Kiuchi, K., Oyaizu, H., Ikebukuro, K., Kaneda, H., Matsumura, M., Ikehara, S.**, 2004, Bone marrow derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina, *Stem Cells* 20:279–83.
- Tropepe, V., Coles, B.L., Chiasson, B.J., Horsford, D.J., Elia, A.J., McInnes, R.R.**, 2000, Retinal stem cells in the adult mammalian eye, *Science* 287(5460):2032-6.

- Türkiye Biyoetik Derneği**, 2009, Kök Hücre Araştırmalarının Etik ve Hukuk Boyutu, Mucize Reklam Matbaacılık Tasarım Hizmetleri, Ankara, s32-35.
- United Network for Organ Sharing**, <http://www.unos.org/> (Erişim tarihi: 1 Ekim 2009).
- Van den Bos, C., Mosca, J.D., Winkles, J., Kerrigan, L., Burgess, W.H., Marshak, D.R.**, 1997, Human mesenchymal stem cells respond to fibroblast growth factors, *Hum Cell* 10(1):45-50.
- Van der Heyden, M.A., Hescheler, J., Mummery, C.L.**, 2003, Spotlight on Stem Cells—Makes Old Hearts Fresh, *Cardiovascular Research* 58:241-245.
- Vemuri, M.C., Chetty, C.S.**, 2007, Methods in Molecular Biology; Stem Cell Assays, Humana Press, 407:p400.
- Wagers, A.J., Weissman, I.L.**, 2004, Plasticity of adult stem cells, *Cell* 116(5):639-48.
- Walker, J.M.**, 2002, The Protein Protocols Handbook; The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation, Second Edition, Humana Press.
- Walker, M.R., Patel, K.K., Stappenbeck, T.S.**, 2009, The stem cell niche, *J Pathol* 217:169–180.
- Weissman, I.L.**, 2000, Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution, *Cell* 100:157-168.
- Wu, M., Wei, Y.Q.**, 2004, Development of respiratory stem cells and progenitor cells, *Stem Cells Dev* 13(6):607-13.
- Wynn, R.F., Hart, C.A., Corradi-Perini, C., O'Neill, L., Evans, C.A., Wraith, J.E., Fairbairn, L.J., Bellantuono, I.**, 2004, A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow, *Blood* 104(9):2643-2645.
- Yasukawa, T., Kimura, H., Tabata, Y., Miyamoto, H., Honda, Y., Ikada Y., Ogura, Y.**, 2000, Active drug targeting with immunoconjugates to choroidal neovascularization, *Current Eye Research* 21 (6):952-961.
- Yasumi, S., Takashi, K., Michiyo, G., Shigehiko, S., Yasuhiko, T., Kenji, T., Shinichiro, M.**, 2003, The Effect of Basic Fibroblast Growth Factor(bFGF) Impregnated Gelatin Microspheres on Proliferation of Fibroblasts and Formation of Epithelial Layer after Grafting Cell-preconfluent Cultured Skin, *Japan Journal of Burn Injuries* 29 (1):24-30.
- Yang, C., Przyborski, S., Cooke, M.J., Zhang, X., Stewart, R., Atkinson, S., Saretzki, G., Armstrong, L., Lako, M.**, 2008, A Key Role for Telomerase Reverse Transkriptase Unit (TREP) in Modulating Human ESC Proliferation, Cell Cycle Dynamics and In Vitro Differentiation, *Stem Cells* 26(4):850-863.
- Ying, Q.L., Nichols, J., Evans, E.P., Smith, A.G.**, 2002, Changing potency by spontaneous fusion, *Nature* 416(6880):545-8.
- Zammit, P., Beauchamp, J.**, 2001, The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation* 68(4-5):193-204.

- Zhang, J., Li, L.,** 2008, Stem Cell Niche: Microenvironment and Beyond, *The Journal of Biological Chemistry* 283(15):9499–9503.
- Zhang, W., Walboomers, X.F., Shi, S., Fan, M., Jansen, J.A.,** 2006, Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation, *Tissue Eng* 12(10):2813-23.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J.,** 2001, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue Eng* 7(2):211-28.
- Zhao, Y., Glesne, D., Huberman, E.A.,** 2003, Human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2426–31.

BELMA MELDA ABİDİN

Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Ege Üniversitesi, Bornova 35100, İzmir, Türkiye

Email: meldabelma@yahoo.com
Tel: +90 554 914 07 00

KİŞİSEL BİLGİLER



T.C. Kimlik No : 17639340148

Doğum Yeri ve Tarihi: Elazığ, 14.04.1982

Medeni Hali : Bekar

Adres : Yaşam sitesi F Blok D:18 Egekent4 Torbalı İzmir

EĞİTİM

Lisans Eğitimi
(2000-2005)

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü

Bitirme Tezi: Genlerin Davranışlar Üzerindeki Rolü

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Seniha Hacıhanefioğlu

İŞ DENEYİMİ

10.2003-08.2004

Laboratuvar Personeli, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk
Biyokimya Laboratuvarı

10.2001-08.2002

Laboratuvar Personeli, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kan Merkezi

YAYINLAR

Uluslararası Yayın

**Oksuz, D.H., Beşe, N.Ş., Altug, T., Senocak, M., Abidin, B.M.,
Belder, M., Ober, A., 2005, Does Pentoxifylline Increase
Radiation Response of Ehrlich Mammary Carcinoma in Mice?
Journal of BOUN 10: 95-98.**

KONGRELERDE SUNULAN BİLDİRİLER

Yazılı Bildiri

**Dincbas, F.Ö., Öksüz, D.C., Temeloğlu, B., Altug, T.,
Abidin, B.M., Koksall, S., Gedik, N., Koca, S., Radyoterapiyle eş
zamanlı Gemzar (Gemsitabin Hidroklorür)'ün pelvis ve mesanedeki
erken ve geç toksisitesine Amifostine'in etkisi; TGF-β ile
korelasyonu, *I. Tıbbi Biyolojik Bilimler Kongresi*, 4-7 Ocak 2005,
İstanbul.**

Sözlü Bildiri Abidin, B.M., Belder, M., Oksuz, D.C., Ober, A., Bese, N.S., Altug, T., Radiosensitive Effects of Pentoxifyline on the Transplanted Ehrlich Ascites Tumors in Experimental Mouse Model, *5th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress*, 8-10 May 2003, Istanbul.

KATILDIĞI KONGRE ve SEMPOZYUMLAR

Biotech METU 2009, International Symposium on Biotechnology: Developments and Trends, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi*, Ankara, 27-30 Eylül 2009 (Tübitak kongre katılım bursu)

IV. Kök Hücre Sempozyumu, *Bilkent Otel ve Konferans Merkezi*, Ankara, 26-27 Haziran 2009.

XIV. Ege Onkoloji Günleri-Onkolojide Yenilikler Sempozyumu, *Kuşadası Pine Bay Otel*, İzmir, 7-9 Mayıs 2009.

1. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi, *Dedeman Otel*, Kapadokya, 5-8 Mart 2009.

IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, *Atatürk Kültür Merkezi*, İzmir, 15-18 Ekim 2008 (Yayın Düzenleme Komite Üyesi).

Nanobiyoteknolojik Yaklaşımlar Sempozyumu, *Ege Üniversitesi*, İzmir, 7 Mart 2008.

IV. Tıbbi Biyolojik Bilimler Öğrenci Sempozyumu, *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi*, İstanbul, 4-5 Ocak 2005.

KURS VE SERTİFİKALAR

Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu, *Gazi Üniversitesi*, Ankara, 23 Mart-1Nisan 2009.

Hücresel Tedavi Kursu, *Dedeman Otel*, Kapadokya, 5 Mart 2009.

III. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Mikroskopik Uygulamaları Kursu, *KOU- Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi*, Kocaeli, 13-17 Ekim, 2008.

Uygulamalı Flow Sitometri Kursu, *KOU- Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi*, Kocaeli, 17 Ekim 2008.

Uygulamalı Konfokal Mikroskop Kursu, *KOU- Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi*, Kocaeli, 16 Ekim 2008.

TS EN ISO 22000 Tehlike Analizi ve Kritik Noktaları Temel Eğitim Semineri, *Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Merkezi*, İzmir, 22-23 Şubat, 2008.

Uygulamalı Deney Hayvanlarının Biyolojik Araştırmalarda Kullanılması ve Etik Kursu, *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi*, İstanbul, 6-7 Ocak, 2005.