

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI

YAŞLANMANIN VE İNFLAMASYONUN DENTAL PULPA HÜCRELERİNİN
KÖK HÜCRE ÖZGÜLLÜĞÜ ÜZERİNE ETKİSİ

Dt. Nurab Deniz PEDERSEN

UZMANLIK TEZİ

ANKARA

2020

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI

YAŞLANMANIN VE İNFLAMASYONUN DENTAL PULPA HÜCRELERİNİN
KÖK HÜCRE ÖZGÜLLÜĞÜ ÜZERİNE ETKİSİ

Dt. Nurab Deniz PEDERSEN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Hatice DOĞAN BUZOĞLU

ANKARA

2020

ONAY SAYFASI

24/01/2020

Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığına

Dt. Nurab Deniz Pedersen'in 24/01/2020 tarihinde jürimiz önünde yaptığı savunmasında "Yaşlanmanın ve İnflamasyonun Dental Pulpa Hücrelerinin Kök Hücre Özgüllüğü Üzerine Etkisi" başlıklı çalışması jürimiz tarafından Diş Hekimliğinde Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Tayyip Alaşam

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Hatice Doğan Buzoğlu

Üye Prof. Dr. Özgür Uyanık

ONAY : Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıda jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. A. Rüya YAZICI
Dekan

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü/Dekanlık tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

03 /02/2020



Öğrencinin Adı SOYADI

Nurab Deniz Pedersen

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Hatice DOĞAN BUZOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Nurab Deniz PEDERSEN

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bana çok emeği geçen, bu tez çalışmasını yapmamı sağlayan, çok şeyler öğrendiğim, her zaman yanımda olan ve çok sevdiğim tez danışmanım Prof. Dr. Hatice Doğan Buzoğlu'na,

Asistanlık hayatımda bana çok şey katan, çalışkanlığı ile bana örnek olan ve çok değer verdiğim Doç. Dr. Emel Uzunoğlu Özyürek'e,

Tezimin her aşamasında katkıları olan Prof. Dr. Sevda Müftüoğlu'na ve tezimde çok emeği geçen Dr. Öğr. Üyesi Elif Bilgiç'e,

Bana her zaman destek olan ve bilgilerini bana aktaran ve hepsinin yeri bende ayrı olan Hacettepe Endodonti Bölümü'ndeki sayın hocalarıma,

Yüzümü devamlı güldüren ve dört senemin harika geçmesini sağlayan sevgili asistan arkadaşlarıma,

Beni bugünlere getiren annem Elif Nur Kocakaya, babam Karl Edvin Pedersen, rahmetli anneannem Emine Nurab Kocakaya, rahmetli babaannem Synnove Pedersen, dedem Mehmet Metin Kocakaya, ablalarım Kine Bruksas ve Beate Langfeldt ile biricik kardeşlerim Haktan Efe Özgür ve Carla Devine Pedersen'e,

İyi günümde ve kötü günümde her zaman yanımda olan, hayatımın anlamı, sözlüm Erik Hjelkrem'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Pedersen ND. Yaşlanmanın ve inflamasyonun dental pulpa hücrelerinin kök hücre özgülüğü üzerine etkisi. Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti Anabilimdalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2020. Bu çalışmanın amacı sağlıklı, geri dönüşümlü pulpitisli ile geri dönüşümsüz pulpitisli genç ve yaşlı bireylere ait diş pulpasında mezenkimal kök hücre varlığı, sayısı ve proliferasyon kapasitesinin incelenmesidir. Bu çalışmada, sağlıklı diş pulpaları çekilen yirmi yaş dişlerinden, inflame diş pulpaları da kök kanal tedavisi sırasında uzaklaştırılan pulpalardan elde edildi. Çalışma grupları: Genç sağlıklı pulpa dokuları(n=2), genç geri dönüşümlü pulpitisli pulpa dokuları(n=2), genç geri dönüşümsüz pulpitisli pulpa dokuları(n=2), yaşlı sağlıklı pulpa dokusu(n=1), yaşlı geri dönüşümlü pulpa dokusu(n=1). Elde edilen pulpalardan primer hücre kültürü hazırlandı. Çoğalan fibroblast hücrelerinin mezenkimal kök hücre özgülüğü akış sitometri yöntemi ve immünofloresan boyama yöntemi ile incelendi. Elde edilen kök hücrelerin proliferasyon potansiyeli lateral proliferasyon yöntemi ile incelendi. Yaşlı sağlıklı pulpadan elde edilen kök hücreler genç sağlıklı pulpadan elde edilenlere göre daha yavaş proliferasyon gösterirken, genç geri dönüşümlü pulpitisli kök hücreleri, genç sağlıklı pulpa kök hücrelerine göre daha hızlı proliferasyon gösterdi. İmmünohistokimyasal işaretleme yöntemine göre tüm örneklerin hücre stoplazmalarında pozitif mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri olarak CD73, CD90 ve CD105 antikorlarının yaygın olarak işaretlendiği, negatif yüzey belirteci olarak da CD34 ve CD45 in hiç işaretlenmediği gözlemlendi. Akış sitometri sonuçlarına göre, gruplar arasında fark olmaksızın tüm grupların mezenkimal kök hücre özgülüğü %98-%100 arasında bulundu. Sonuç olarak inflamasyon ve yaşa bağlı olarak dental pulpanın mezenkimal kök hücre özgülüğü değişmezken, proliferasyon kapasitesinde yaşa bağlı azalma gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: akış sitometri, dental pulpa, immünohistokimya, mezenkimal kök hücre, proliferasyon

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Pedersen ND. The effect of aging and inflammation on stem cell specificity of dental pulp cells. Hacettepe University, Dental Faculty, Dept. of Endodontics, Specialization Thesis, Ankara, 2020. The aim of this study is to investigate the presence, number and proliferation capacity of mesenchymal stem cells in the dental pulp of young and old individuals with healthy, reversible pulpitis and irreversible pulpitis. In this study, healthy pulps were obtained from extracted wisdom teeth and inflamed pulps were obtained during root canal treatment. Study groups as follow; Young healthy pulp tissues(n=2), young pulp tissues with reversibl pulpitis (n=2), young pulp tissues with irreversibl pulpitis(n=2), old healthy pulp tissues(n=1), old pulp tissues with irreversibl pulpitis(n=1). Primer cell culture were set up with obtained pulp. Mesenchymal stem cell specificity of proliferating fibroblast cells was examined by flow cytometry method and immunofluorescence staining method. The proliferation potential of the obtained stem cells was analyzed by lateral proliferation method. Stem cells from old healthy pulp proliferate more slowly than those from young healthy pulp, while young reversible pulpitis stem cells proliferated faster than young healthy pulp stem cells. According to the immunohistochemical marking method, it was observed that CD73, CD90 and CD105 antibodies were commonly labeled as positive mesenchymal stem cell surface markers in the cell stoplasmas of all samples, and CD34 and CD45 were not marked as negative surface markers. According to the flow cytometry results, the mesenchymal stem cell specificity of all groups was found between 98% and 100%, without any difference between the groups. As a result, while mesenchymal stem cell specificity of the dental pulp did not change due to inflammation and age, age-related decrease in proliferation capacity was observed.

Key words: dental pulp, flow cytometry, immunohistochemistry, mesenchymal stem cell, proliferation.

This thesis study was supported by Hacettepe University Scientific Research Foundation

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Dental Yapıların Fizyolojisi	3
2.1.1. Diş Pulpası	4
2.1.2. Yaşlanma ile Beraber Pulpa Dokusunda Görülen Değişimler	6
2.2. Kök Hücreler	7
2.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler	9
2.2.2. Orofasiyal Kök Hücreler	12
2.2.3. Dental Pulpa Kök Hücreleri	14
2.2.4. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Dental Doku Mühendisliğinde Kullanımı	16
2.2.5. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Farklılaşma Potansiyeli	17
2.2.6. Rejeneratif Endodontide Kök Hücre Uygulamalarından Yararlanması	21
2.3. İnflamasyon	23
2.3.1. Pulpada İnflamasyon	24
2.3.2. Pulpa Hastalıkları	24
2.3.3. Geri Dönüşümsüz Pulpa Hasarı Olan Dişlerde Kök Hücre	26

2.4. Dental Pulpa Kök Hücresi Eldesi.....	27
2.5. Kök Hücre Belirleme Yöntemleri.....	28
2.5.1. Akış Sitometrisi	28
2.5.2. İmmünofloresans	30
2.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction,PCR)	30
2.5.4. Protein Ekstraksiyonu ve Immunoblotlama	30
2.5.5. Koloni Oluşturan Ünit	31
2.6. Amaç ve Hipotez	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Diş Pulpa Çalışma Grupları ve İzolasyon Yöntemleri.....	32
3.1.2. Çalışma Grupları	32
3.2. Sağlıklı ve İnflame Dişlerden Doku Temini.....	33
3.3. İzole Edilen Pulpa Dokularının Kültüre Edilmesi	35
3.4. Hücrelerin Bir Sonraki Deneyler İçin Dondurulması	38
3.5. Lateral Proliferasyon Deneyi.....	39
3.6. İmmünofloresan Yöntemi ile Mezenkimal Belirteçlerinin İşaretlenmesi	40
3.7. Akış Sitometrisi (Flow Sitometri) ile Mezenkimal Belirteçlerin İşaretlenmesi... 42	
4. BULGULAR	46
4.1. Lateral proliferasyon sonuçları.....	46
4.2. İmmünofloresan İşaretleme Sonuçları.....	49
4.3. Akış Sitometrisi Analiz Sonuçları	53
5.TARTIŞMA	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	76
7. KAYNAKLAR	78

SİMGELER VE KISALTMALAR

α-MEM	α -Minimum Essential Medium
ALS	Amniyotrofik Lateral Skleroz
Ark.	Arkadaşları
CD	Cluster of differentiation
CFU-f	Colony-forming unit fibroblasts
DFSC	Dental Folikül Kök Hücreleri
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMP1	Dentin matrix protein1
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DPSC	Dental Pulpa Kök Hücreleri
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
FGF2	Fibroblast büyüme faktörü 2
HLA-DR	İnsan lökosit antijen – antijen D'ye bağlı
LPS	Lipopolisakkarit
MTA	Mineral trioxide aggregate
PBS	Phosohate buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PDLSC	Periodontal Ligament Kök Hücreleri
pMS	Premezenkimal kök hücre
SEM	Scanning electron microscope
SHED	Düşen süt dişi kök hücreleri
TGF-β1	Transforming growth factor- β 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Diş gelişim süreçleri. Diş gelişimi ektomezenkim ve oral epitel arasındaki etkileşim sonucunda başlamaktadır ve altı evresi vardır; kalınlaşma, tomurcuk, kep, çan, skretuar ve sürme evreleri (16).	3
2.2. (A)Matür pulpanın tabakalarını gösteren kesit ve (B) Pulpanın tabakalarını ve odontoblastların dentin tübüllerinin içerisine olan uzantılarını gösteren şekil (21).	5
2.3. Dentin pulpa kompleksinin çürük lezyonuna yanıt olarak yanıtının şematik olarak gösterilmesi. Reksiyoner dentin hafif düzeyli uyarılara karşı oluşur (örneğin, pulpa ekspozu olmayan minör çürükler sonucunda meydana gelen dentin hasarı) ve potansiyel olarak iritanlara karşı immün cevabı aktive eden proanflimatör medyatörler içerir. Reperatif dentin oluşumu daha şiddetli bir hasara cevap olarak kök hücre/progenitör hücrelerden yeni odontoblast benzeri hücrelerin oluşturulması sürecidir (25).	6
2.4. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerine göre sınıflandırılması.	8
2.5. Germ yaprakları ve dönüştükleri yapılar.	9
2.6. Çeşitli mezenkimal hücre kaynakları	10
2.7. <i>In vivo</i> ortamda perisitlerin hasar/tamir cevabı. Hasar durumunda ya da doku hemostazının sağlanması amacıyla perisitler kan damarından kopar. pMS: premezenkimal kök hücre. pMSC'ler hasar bölgesine göç edip dokuya özgü hücrelere dönüşüp tamiri sağlamaktadırlar (55).	12
2.8. Dental kök hücre kaynakları. SHED: Düşen süt dişi kök hücreleri, DPSC: Dental Pulpa Kök Hücreleri, PDLSC: Periodontal Ligament Kök Hücreleri, SCAP: Apikal Papilla Kök Hücreleri DFSC: Dental Folikül Kök Hücreleri (4).	13
2.9. Oral mezenkimal hücrelerin farklılaşma kapasitesi (14).	14
2.10. Yaşlanmanın dental pulpa kök hücrelerine etkisi (25).	16
2.11. İnflamasyonun sebepleri ile fiziksel ve patolojik sonuçları.	24

- 3.1.** A) Hacettepe Üniversitesi Cerrahi Bölümü'nde çekilen dişlerin Hacettepe Üniversitesi Endodonti bölümüne salın içerisinde taşınması B) Taşınan diş örneği C) Çekilen dişin ikiye ayrılması için fissür frez ile çevresel olarak prepare edilmesi D) Çekilen dişten çıkarılmış olan pulpa örneği E) ikiye ayrılmış olan diş F) Steril mikrotüpe yerleştirilmiş olan pulpa 34
- 3.2.** A) Geri dönüşümlü pulpitisi dişten elde edilen pulpa dokusu B) Geri dönüşümlü pulpitis dokusundan elde edilmiş pulpanın antibiyotik solüsyonu ile yıkanması işlemi C) Geri dönüşümlü pulpitisi dişten elde edilmiş pulpanın Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı'na teslim edilmek üzere besiyeri içeren eppendorf tüpüne yerleştirilmiş görüntüsü. 35
- 3.3.** Pulpa dokularının santrifüj edilmesi için kullanılan santrifüj cihazı (35
- 3.4.** A) Hücrelerin saklandıkları kültür flaskları (T 25 flask, İsviçre) ve B) inkübatörde (Heraeus HERA cell, Türkiye) saklanma ortamları C) VE D) Kültür flasklarının saklandıkları inkübatör (Heraeus HERA cell, Türkiye) 37
- 3.5.** A) Hücrelerin kültür aşaması ve beslenmesi için kullanılan BIOAMFTM-3(Biological, Inc., Kibbutz Beit Haemek, İsrail) B) Besiyeri ve hücrelerin beslenmesi aşaması C) Hücre kültür kaplarının incelenmesi için kullanılan mikroskop (Nikon HFX-IIA, Japonya) ve hücre kültür kaplarının mikroskopta incelenmesi işlemi. 37
- 3.6.** A) Pasajlama, dondurma ve sayım öncesinde hücreleri yıkamak için kullanılan DPBS (Biological Industries, İsrail) ve B) Bu solüsyonun hücre kültür kaplarına uygulanması. 38
- 3.7.** A) Hücrelerin kültür kaplarından (T 25 flask, İsviçre) kaldırılması için kullanılan solüsyon (Trypsin EDTA Solution A, Biological Industries, İsrail) B) kültür kaplarına bu solüsyonun hücreleri kaldırmak için uygulanması 38
- 3.8.** A) Dimethyl sulfoxide (SERVA, Heidelberg, Almanya) B) Kriyoprezervasyon tüplerinin yerleştirildikleri... C) dondurulmuş pulpa içeren kriyoprezervasyon tüpü D) Dondurma tankı (DF 290, nüve, Türkiye) 39
- 3.9.** Hücrelerin lateral migrasyon kapasitelerini incelemek için ekildikleri 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarının görüntüsü. 39
- 3.10.** A) Lateral migrasyon incelemek için kullanılan mikroskop B) Lateral migrasyon izlemek için GSP, GRP ve YSP örneklerinde oluşturulan yara yüzeleri 40
- 3.11.** İmmünohistokimyasal inceleme için kullanılan kuyucuklu lamlar 41
- 3.12.** A) Normal Serum Block ile yapılan blocking işlemi B) Kullanılan Normal Serum Block ajanı, C) Normal Serum Block Uygulanmış olan kuyucuklu lamlar 41
- 3.13.** A) İmmünofloresan boyama için kullanılan antibodyler B) Antibody eklenen kuyucuklu lamlar 42

3.14. A) Hücre sayım işlemi için Triphan Blue ve hücre içeren solüsyonun Thoma lamina aktarılması ve B) Solüsyonun lamdaki görüntüsü	43
3.15. Akış sitometrisi analizi için götürülen tüp	43
3.16. A) Akış stometreye götürülen örneklerin santrifüj edildiği santrifüj cihazı(eppendorf Centrifuge 5810, Hamburg, Almanya)ve B) santrifüj ayarı	44
3.17. Akış sitometri analizi yapılan akış sitometri cihazı (BECKMAN COULTER, NAVIOS FLOW CYTOMETER, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri)	45
3.18. Akış sitometrisi analizi için kullanılan antikorlar	45
4.1. GS1 ve GS3 gruplarının yara iyileşmesi görüntüleri.	47
4.2. GS1 ve YS gruplarının yara iyileşmesi görüntüleri.	48
4.3. A) GSP ile GRP gruplarının yara iyileşme mesafesinin zamana göre karşılaştırıldığı grafik B) GSP ile YSP gruplarının yara iyileşme mesafesinin zamana göre karşılaştırıldığı grafik	49
4.4. GS1 için yapılan İF boyaması sonucunda elde edilen görüntüler	51
4.5. GS2 için yapılan İF boyaması sonucunda elde edilen görüntüler	51
4.6. GRP1 için yapılan İF boyaması sonucunda elde edilen görüntüler	51
4.7. GRP2 için yapılan İF boyaması sonucunda elde edilen görüntüler	52
4.8. GİP1 için yapılan İF boyaması sonucunda elde edilen görüntüler	52
4.9. GİP2 için yapılan İF boyaması sonucunda elde edilen görüntüler	53
4.10. YSP için yapılan İF boyaması sonucunda elde edilen görüntüler	53
4.11. YRP için yapılan İF boyaması sonucunda elde edilen görüntüler	53
4.12. (A) GS1 ve (B) GS2'ye akış sitometrisi analizi yapılmadan önce yapılan canlılık deneyi sonuçları.	55
4.13. A) GS1 için akış sitometri analiz grafikleri B) GS2 için akış sitometri analiz grafikleri.	56
4.14. GSP1 ve GSP2 için yapılan akış sitometrisi analiz sonuçları	57
4.15. A) GRP1 için akış sitometri analiz grafikleri B) GRP2 için akış sitometri analiz grafikleri	58
4.16. GRP1 ve GRP2 için yapılan akış sitometrisi analiz sonuçları.	59
4.17. A) GİP1 için akış sitometri analiz grafikleri ve B) GİP2 için akış sitometri analiz tablosu	60
4.18. GİP1 için yapılan akış sitometrisi analiz sonuçları.	61
4.19. A) YSP için akış sitometri analiz tablosu B)YRP için akış sitometri analiz tablosu	62
4.20. YSP ve YRP için yapılan akış sitometrisi analiz sonuçları	63

5.1. Yara iyileşmesini incelemek için kullanılan iki yöntem. A) Hücre tabakasının yüzeyinde bir pipet ile çizik oluşturularak yara yüzeyi eldesi B) İki bölmeli alet ile yara bölgesi oluşturulması (211).

66



TABLolar

Tablo	Sayfa
3.1. Mezenkimal kök hücre özgülüğü belirlemek için kullanılan antikorlar.	41
3.2. Akış sitometrisi için kullanılan antikorlar.	44
4.1. İncelenen örneklerdeki hücre sayısı ile akış sitometrisi aşamasında okunan hücre sayısı ve hücrelerde yüzde oranlarına göre antikor işaretlenmesi sonuçları.	54



1. GİRİŞ

Diş kuron ve kök olmak üzere iki yapısal elemandan oluşmaktadır. Matür bir dişin sert dokularını mine, dentin ve sement oluştururken, yumuşak dokusunu ise diş pulpası oluşturur (1). Diş pulpasının esas fonksiyonu dişte dentin oluşumunu sağlamak ve dişin canlılığını korumak olan dokudur (2). Diş pulpası konnektif bağ bir bağ dokusudur ve dentin yapımından sorumlu odontoblastlar, kollajen yapımından sorumlu fibroblastlar, savunma hücreleri ve farklılaşmamış kök hücreler gibi çeşitli hücreler içerir (3). Diş pulpası mezenkimal kökenli olması nedeniyle progenitör kök hücresi içerir. Yapılan çalışmalar diş pulpa kök hücrelerinin pek çok hücreye farklılaşma kapasitesinin olduğunu ve hasarlı dokuların onarılmasında kullanılabileceğini göstermektedir (4-7). Diş pulpasının en büyük dezavantajı kolateral dolaşıma sahip olmaması ve bunun neticesinde enfeksiyon geliştiği durumlarda geri dönüşümsüz olarak hasara uğrama riskinin yüksek olmasıdır (2). Diş pulpası geri dönüşümsüz hasara uğradığı zaman başlangıçta damar geçirgenliğinin bozulmasına bağlı olarak gelişen vazodilatasyonla geri dönüşümlü (reversible) bir iflamasyon gelişirken, tedavi edilmediği durumlarda, şiddetli ağrılara sebep olan geri dönüşümsüz irreversible pulpitis dediğimiz patolojik durum ortaya çıkabilir ve de diş pulpası canlılığını yitirerek devamında dişin periapikal bölgesinde patoloji gelişimi görülebilir. Bu durumda kök kanal tedavisi yapılması gerekmektedir. Kök kanal tedavisi işlemleri sırasında diş pulpası tamamen uzaklaştırılır ve şekillendirilme aşamasında kanallardan belli miktarda doku kaldırılır; bu durum dişin zayıflaması ile sonuçlanır (8). Pulpanın uzaklaştırılması işlemi sonucunda faydalı olabilecek kök hücreler de elimine edilmektedir. Literatürde inflame dental pulpanın da kök hücre içeriğine sahip olduğunu gösteren çalışmalar rapor edilmiştir (9, 10). Diğer taraftan yaşlanmayla beraber dentin yapımının devam etmesiyle pulpa odasında daralma, odontoblast, fibroblast ve mezenkimal hücre sayısında azalma gibi hücresel ve yapısal değişiklikler meydana gelmektedir(11, 12). Bu değişimlere rağmen yaşlı bireylerin azalarak da olsa kök hücre kapasitesinin devam ettiği gösterilmiştir(7).

Buradan yola çıkarak, bu çalışmada 15-30 yaş aralığındaki ve 60 yaş üstü olan bireylerde geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz pulpitisli dişler ile sağlıklı pulpalı dişlerdeki kök hücre varlığı, miktarı ve yara iyileşme kapasitelerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Hastalardan onam alındıktan sonra genç ve yaşlı bireylerin sağlıklı diş pulpaları çekilen yirmi yaş dişlerinden, geri dönüşümlü pulpitis vakaları çürük temizlenirken pulpa odası açılan ve kanal tedavisi yapılmasına karar verilen dişlerden, geri dönüşümsüz pulpitisli diş pulpaları ise kök kanal tedavisi sırasında uzaklaştırılan pulpalardan elde edilmesi planlanmıştır. Elde edilen fibroblast hücrelerinin çoğalma kapasitesi lateral migrasyon yöntemiyle, mezenkimal kök hücre özgülüğü akış sitometri ve immünofloresan boyama yöntemi ile incelenecektir.

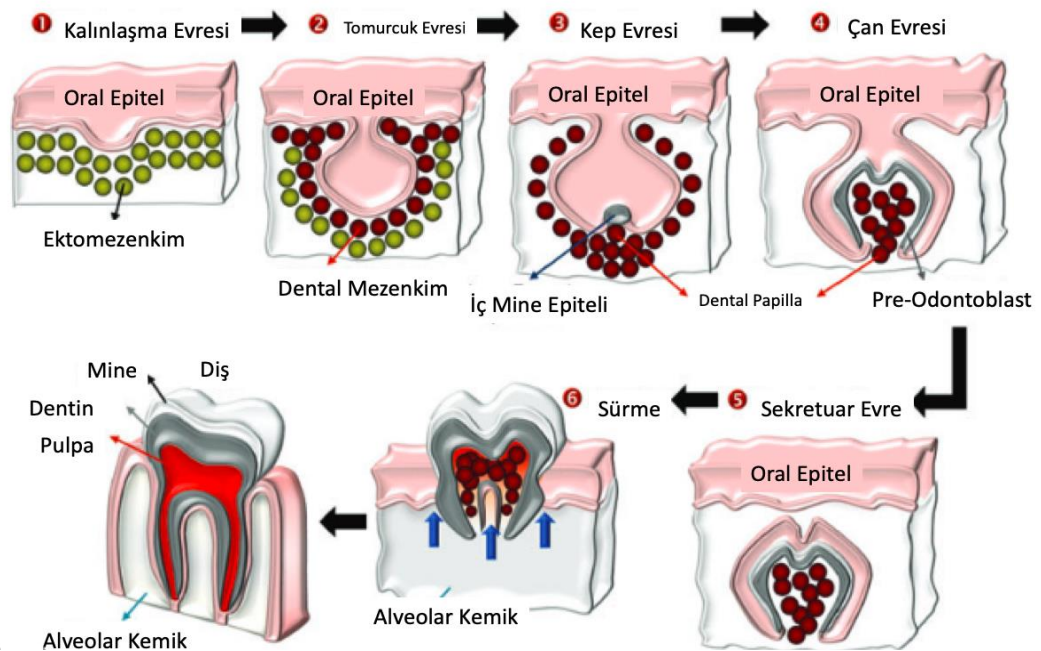
Çalışma grupları:

1. Genç sağlıklı pulpa dokuları (n=2)
2. Genç geri dönüşümlü pulpitisli pulpa dokuları (n=2)
3. Genç geri dönüşümsüz pulpitisli pulpa dokuları (n=2)
4. Yaşlı sağlıklı pulpa dokusu (n=1)
5. Yaşlı geri dönüşümlü pulpa dokusu (n=1)

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dental Yapıların Fizyolojisi

Diş gelişimi uterusun 6. haftasında başlamaktadır ve birinci brankiyal ark ektodermi (epiteli) ve nöral krest kaynaklı mezenkim arasındaki etkileşimler sonucunda meydana gelmektedir. Tomurcuk evresi diş gelişiminin ilk morfolojik belirtisidir; oral epitel kalınlaşır ve altında bulunan nöral krest kökenli mezenkime doğru uzanır (13, 14). Epitel mezenkime doğru derinleşmeye başlayıp kep şeklini aldığı kep evresi ve ardından da çan evresi görülmektedir (Şekil 2.1)(15). İlerleyen dönemlerde ise diş gelişim süreçleri tamamlandıkça diş sürmesi gerçekleşir (16)



Şekil 2.1. Diş gelişim süreçleri. Diş gelişimi ektomezenkim ve oral epitel arasındaki etkileşim sonucunda başlamaktadır ve altı evresi vardır; kalınlaşma, tomurcuk, kep, çan, sekretuar ve sürme evreleri (16).

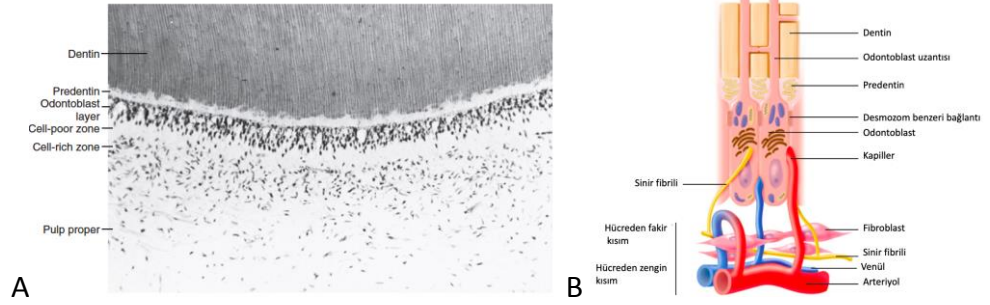
Dental epitelyum ile çevrelenen mezenkim dokusu dental papilla olarak adlandırılır ve diş pulpası ile odontoblastlar bu yapıdan meydana gelmektedir. Diş minesini oluşturan ameloblastlar ise epitel kökenlidir (13). Kron formasyonu tamamlandıktan sonra ameloblastlar programlanmış hücre ölümü ile ortadan kalkar ve böylece minenin tamir şansı kalmamış olur. Ameloblastlarla etkileşim sonrasında

odontoblastlar primer dentini oluştururlar ve sitoplazmik uzantıları dentin túbülleri içinde kalacak şekilde yeni oluşmuş olan dentin tabakasına doğru sıralanırlar (17, 18).

2.1.1. Diş Pulpası

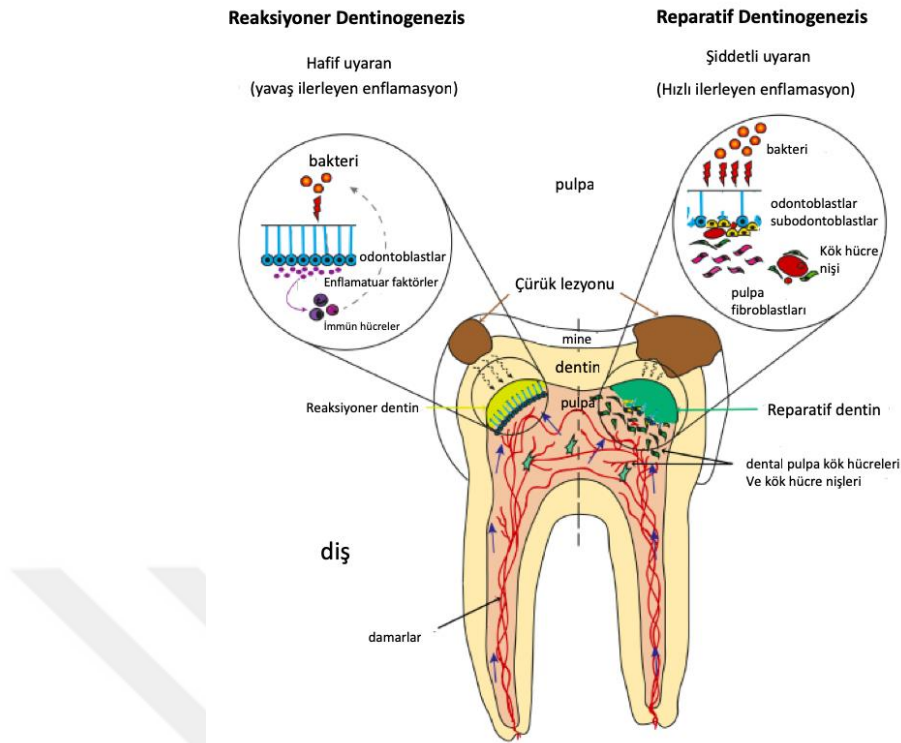
Diş pulpası sert dentin ile çevrelenmiş olan bir bağ dokusudur (19). Bu bağ dokusu ekstrasellüler matriks, pek çok hücre, damar ve sinir içeren bir damar sinir paketidir. Apikal foramenden geöen damar sinir paketi ile kan dolaşımı minimal de olsa sağlanır ve diş canlılığını bu şekilde devam ettirir. Kan damarları diş pulpasının beslenmesini sağlar. Diş pulpasının yapısındaki sinir ağı ise ağrı yoluyla zarar veren bir uyaran olduğu zaman bunu iletmekten sorumludur. Pulpa yapısında dendritik hücreler, makrofajlar ve lenfositler gibi immün sistem hücreleri mikroorganizmaların ve yabancı antijenlerin pulpa dokusuna geömesine engel olurlar. Diş pulpasında yüksek miktarda kollajen ve fibroblast bulunur, fibroblastlar ekstrasellüler matriksin yapımından sorumludur ve diş hasarı meydana geldiği zaman da görev alırlar(20, 21)

Odontoblastlar ve preodontoblastlar dental pulpa ile dentini birbirinden ayırmaktadır. Bu hücreler reaksiyoner dentin oluşumundan sorumludurlar (22). Bu tabakanın yakınında pulpa dokusu kolajen fibrinleri aöısından zenginken hücre aöısından fakirdir. Daha derinde ise progenitör hücreler ve farklılaşmamış hücreler bulunmaktadır. Bu hücrelerin bazılarının kök hücre özelliğine sahip olduğu düşünölmektedir. En içteki tabaka dental pulpanın merkezidir ve vasküler pleksus ile sınırları içerir. Ancak bazı sinir dalları ve kapiller damarlar odontoblast tabakasına uzanır(şekil 2.2) (23).



Şekil 2.2. (A) Matür pulpanın tabakalarını gösteren kesit ve (B) Pulpanın tabakalarını ve odontoblastların dentin tübüllerinin içerisine olan uzantılarını gösteren şekil (21).

Diş fonksiyonel hale gelip üst ve alt çene dişleri arasındaki temaslar oluşana kadar primer dentin oluşumu devam eder. Ardından hayat boyu devam eden sekonder dentin oluşumu başlar (3, 23). Tersiyer dentin oluşumu fizyolojik değildir ve lokal uyaranlara karşı oluşmaktadır. Bu durumda ya odontoblastlar reaksiyoner dentin oluştururlar ya da odontoblast hücreleri ölür ve bölünme yetenekleri olmadığından yerlerine pulpada yer alan progenitör/kök hücreler geçip reparatif dentin oluştururlar (Şekil 2.3) (23, 24).



Şekil 2.3. Dentin pulpa kompleksinin çürük lezyonuna yanıtının şematik olarak gösterilmesi. Reaksiyoner dentin hafif düzeyli uyarılara karşı oluşur (örneğin, pulpa ekspozu olmayan minör çürükler sonucunda meydana gelen dentin hasarı) ve potansiyel olarak iritanlara karşı immün cevabı aktive eden proanflimatör sitokinleri içerir. Reparatif dentin oluşumu daha şiddetli bir hasara cevap olarak kök hücre/progenitör hücrelerden yeni odontoblast benzeri hücrelerin oluşturulması sürecidir (25).

2.1.2. Yaşlanma ile Beraber Pulpa Dokusunda Görülen Değişimler

Diş pulpası da vücudun diğer dokuları gibi yaşa bağlı değişimlere uğramaktadır ve bunun sebebinin kök hücrelerinde görülen senescence (yaşlanma) olabileceği düşünülmektedir (26).

Yaşlanmaya bağlı dentin tübüllerindeki sklerozis ve pulpa odasının genişliğinin azalması da yaşlılarda pulpa duyarlılığının azalmasına sebep olur (27). Bunun yanı sıra yaşlı hastalarda daha az sinir dallanmaları ve bu sinir dokusunda daha fazla mineralizasyon görülür. Bu durum termal uyarılara karşı azalmış ve gecikmiş cevap alınmasına bunun sonucu olarak pulpa testlerine yanlış cevap oluşumuna neden olabilir (28-30)

Yaşla beraber pulpa hücreleri değişime uğrar, pulpanın hacmi azalır, innervasyonunda düşüş olurken kan akışı ve fibroblast sayısı da azalır (26, 31), hücrelerinin morfolojisi değişir ve daha iğsi (spindle like) bir şekil alır (32). Otofajik aktivitelerinde azalma sonucunda hücre içi lipit birikimi ve neticesinde fonksiyon kaybı görülür (33). Pulpadaki hücre yoğunluğundaki değişimler ve azalmış pulpa kök hücre aktivitesi diş zedelenmesi karşısında pulpanın rejeneratif kapasitesinin azalmasına sebep olsa da (34) yaşlı bireylerden elde edilen pulpa dokularında Alkalen fosfataz (ALP) aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (35). Gerçekte, dental pulpa dokusundan elde edilen kimi hücrelerin kendini yenileme ve rejenerasyon kapasitesinin olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Dental pulpanın rejeneratif kapasitesinin olması yapısında bulunan kök hücreler sayesinde (5, 36, 37). Dental pulpa kök hücrelerinin işleyişini anlayabilmek için öncelikle kök hücrelerle ilgili genel bilgilere göz atmamız gerekir.

2.2. Kök Hücreler

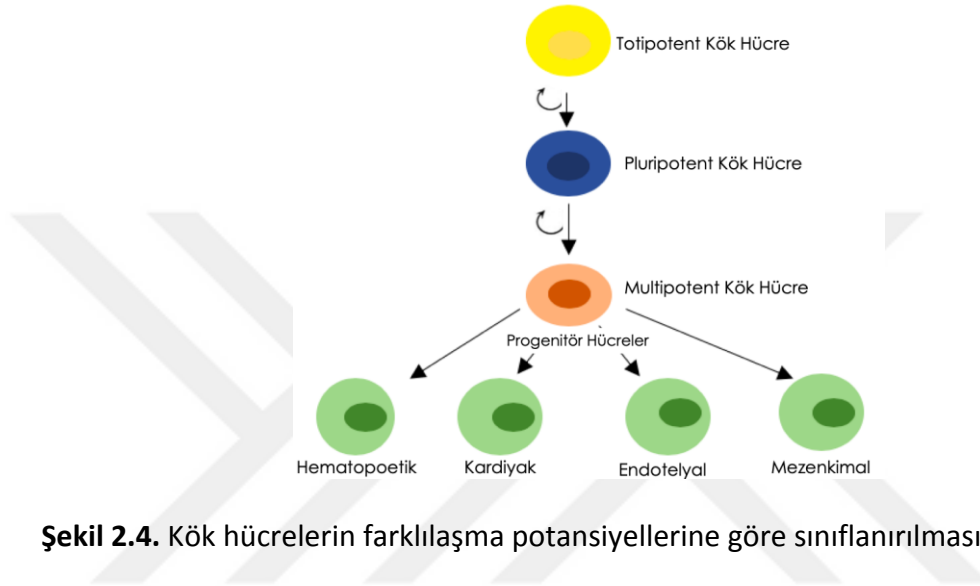
Kök hücreler; kendini yenileme ve çeşitli fiziksel ve deneysel koşullar altında özelleşmiş olgun hücrelere dönüşme özelliği bulunan hücrelerdir (38). Bu tip hücreler kemik iliği, kan, kalp, bağırsak, adipoz doku, karaciğer, pankreas ve dişler gibi birçok organ ve dokudan izole edilmiştir (39).

Kök hücreler;

1. Embriyonik kök hücreler
2. İndüklenen plüripotent kök hücreler
3. Post-natal(yetişkin) kök hücreler olmak üzere üç gruba ayrılmışlardır (14).

İndüklenen plüripotent kök hücreler belirli transkripsiyon faktörleri tarafından embriyonik kök hücre benzeri hücreler oluşturmak üzere yeniden programlanmaktadır (40). Embriyonal kök hücreler 3 germ tabakasına

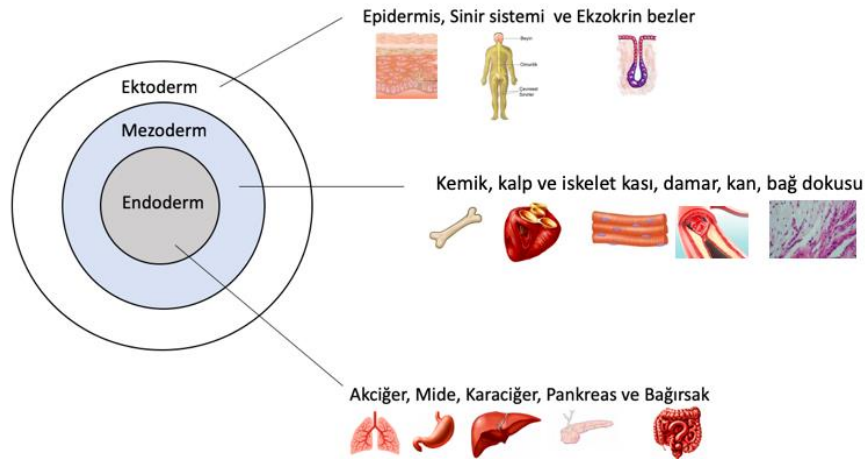
farklılaşabilirken, yetişkin kök hücreleri sadece belirli hücre çeşitlerine dönüşebilirler. Dolayısıyla Embriyonal kök hücrelerin doku rejenerasyonu için kullanılma potansiyelleri yetişkin kök hücrelerden daha fazladır. Ancak bu tarz hücrelerin klinik olarak kullanımı etik ve yasal olarak uygun değildir. Yetişkin kök hücrelerinin esas görevi buldukları dokunun devamlılığını ve tamirini sağlamaktır (41).



Şekil 2.4. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerine göre sınıflandırılması.

Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olmak üzere sınıflandırılırlar (Şekil 2.4). Totipotent kök hücreler organizmanın bütün hücre tiplerine dönüşebilir, pluripotent kök hücreler bütün germ tabakalarının hücrelerini oluşturabilirlerken, multipotent kök hücreler ise buldukları germ yaprağındaki tiplerine (unipotent hücrelere) dönüşme yeteneğine sahiptirler ve unipotent kök hücreler sadece tek bir hücre tipine dönüşebilirler (42).

Embriyogenez sırasında hücreler germ tabakaları olarak adlandırılan agregatlar oluşturur. Germ tabakaları; endoderm, mezoderm ve ektoderm olmak üzere üçe ayrılmaktadırlar (43). Endodermden akciğer, mide, karaciğer, pankreas ve bağırsak gibi solunum ve sindirim sistemi organları gelişir (44). Mezoderm tabakasından kemik, kalp kası ve iskelet kası, kan, damar ve ürogenital sistemler ile bağ dokusu gelişmektedir (45). Ektoderm epidermis, sinir sistemi ve ekzokrin bezlerin geliştiği germ tabakasıdır (Şekil 2.5)(46).



Şekil 2.5. Germ yaprakları ve dönüştükleri yapılar.

Birçok yetişkin doku travma, hastalık ya da yaşlanma gibi durumlarda kendini yenileme özelliği olan bu kök hücreleri bulundurur (47). Böylece kan, kemik, epitel ve sinir sistemi gibi dokulara hayat boyunca yeni hücreler sağlanabilir. Yetişkin kök hücreler niş (niche) denilen küçük bölgelerde bulunur; bu bölgelerde kök hücre davranışı ve hücre ölümü ile kendini yenileme arasındaki denge düzenlenir (48).

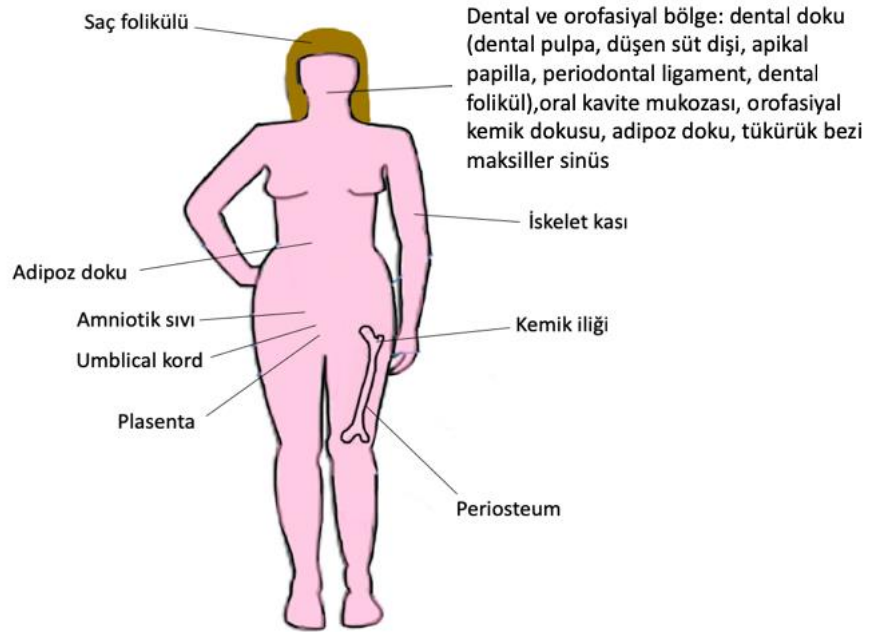
Kök hücrelerinin Parkinson, Amiyotrofik Lateral Skleroz(ALS), Alzheimer, inme, omurilik hasarı, Multipl Skleroz, radyasyona bağlı bağırsak hasarı, enflamatuar bağırsak hastalığı, karaciğer rahatsızlıkları, Duchenne kas distrofisi, diyabet, kalp hastalığı, kemik hastalıkları, böbrek hastalıkları, kronik yaralar, Graft-versus-host hastalığı ve solunum yolu hastalıklarında kullanılabileceği yapılan çalışmalar neticesinde bildirilmiştir (43).

2.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal terimi mezodermal orijinli dokuyu tanımlamaktadır. Gelişimsel olarak bakıldığı zaman mezodermal orijinli dokular; orta embriyolojik germ tabakasından oluşurlar ve kas-iskelet, kan, damar ve ürogenital sistemler ile bağ dokusu bu tabakadan gelişmektedir. Mezenkimal kök hücreler; kan dokusu hücrelerinden farklı olan ve bağ dokusundan izole edilen, in vitro ortamda kök hücre özelliği gösteren hücreler olarak tanımlanmaktadır (49-51). İlk olarak kemik iliğinde

1974 yılında Friedenstein ve ark. tarafından keşfedilmiştir (51). Mezenkimal kök hücreleri iğ şeklinde, fibroblast benzeri yapışkan (adherent) hücrelerdir ve farklılaşmamış hücrelere replike olabilirler (52). Her ne kadar kemik iliği kök hücreleri mezenkimal kök hücreler için asıl kaynak olarak görülse de bilimsel ve prelinik çalışmalarda; plasenta, umbilikal kord (göbek bağı), kan, adipoz doku, dermis, saç folikülü, periosteum, kemik iliği, iskelet kası, amniyotik sıvı ve orofasiyal bölgelerde de mezenkimal kök hücre saptanmıştır (Şekil 2.6)(53). Mezenkimal kök hücreler bütün mezodermal hücre çeşitlerine dönüşebilmelerinin yanı sıra; ektodermal ve endodermal hücre çeşitlerine de dönüşebilmektedirler (54). Kemik, kırıkta, yağ, tendon, kas ve kemik iliği stroması gibi birçok mezenkimal kökenli dokuya farklılaşabilmektedirler (47).

Bağ dokusu tüm vücutta bulunmaktadır ve bu durum bağ doku hücrelerinin preküsörlerinin birçok dokuda bulunabileceğini ve bu bölgelerde homeostaz ve tamir için mezenkimal kök hücre olarak görev alabileceklerini düşündürmektedir (55).



Şekil 2.6. Çeşitli mezenkimal hücre kaynakları

Mezenkimal kök hücrelerinin tanımlanması için kök hücre reseptörlerine bağlanan antikordardan faydalanılır. Tek başına bir belirteç(marker) bulunmamasına

rağmen bu tür hücrelerin tanımlanması için belirli kriterler bulunmaktadır. Bu kriterler Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği bildirisinde (The International Society for Cellular Therapy position statement) belirtilmiştir (56);

1. Mezenkimal kök hücreler plastik adherent (yapışan) özellik göstermektedirler ve standart kültür koşullarında doku kültür flasklarında buldukları zaman *colony-forming unit fibroblasts (CFU-f)* olarak anılmaktadırlar.

2. Mezenkimal kök hücre popülasyonları CD105, CD73 ve CD90 gibi belirteçleri eksprese ederlerken (>%95), CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 ve insan lökosit antijen – antijen D'ye bağlı (HLA-DR) yüzey belirteçlerini eksprese etmezler (<%2).

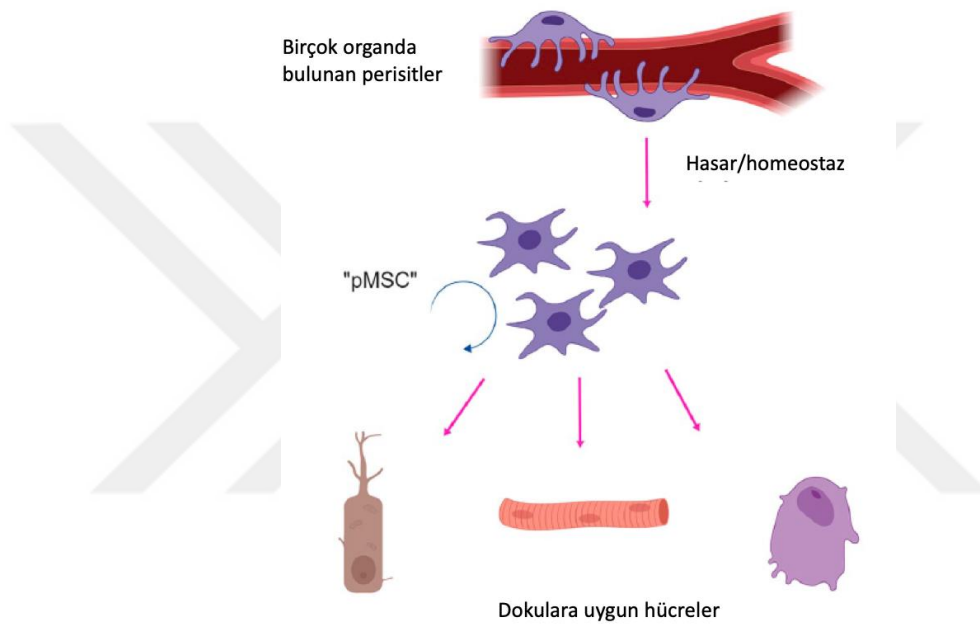
3. Bu hücrelerin belirli koşullarda osteoblast, adiposit ve kondrositlere dönüşme özelliklerinin bulunması zorunludur.

Mezenkimal kök hücrelerinin bölünme dengesi, uygun sayıda kök hücre ve farklılaşmış hücre oluşturmak için gelişimsel ve çevresel sinyallerle kontrol edilir (57). Aslında farklılaşmış hücrelerin çoğalma kapasiteleri her bölünmeden sonra azalan telomer uzunluğundan dolayı sınırlıdır. Fakat mezenkimal kök hücreleri telomeraz eksprese ettikleri için diğer somatik hücrelere göre daha uzun telomerlere sahiptirler ve bu sayede çoğalma kapasiteleri oldukça yüksektir (41). Sonuç olarak mezenkimal kök hücreleri özgün özelliklerini kaybetmeden *in vitro* olarak 10 pasajdan daha fazla çoğalabilme yeteneğine sahiptirler (58). Her ne kadar birçok dokunun mezenkimal kök hücrelerinin osteoblast benzeri, kondrosit benzeri ve adiposit benzeri hücrelere dönüşme kapasitesi olsa da bunu homeostas sırasında *in vivo* olarak yapmazlar (55).

Mezenkimal kök hücrelerinin fibroblastlardan ya da perisitlerden geliyebileceği düşünülmektedir. Fibroblastlar kollajen sentezleyen hücrelerdir ve vücudun bütün organlarında bulunmaktadırlar (59). Mezenkimal kök hücreleri plastik adherent özellikleri ve morfolojik yapıları bakımından fibroblastlar ile benzerlikler göstermektedirler (60). Perisitler kapillerlerin etrafında kontraksiyonu sağlayan hücre

popülasyonudur (Şekil 2.7). Yapılan bazı çalışmalarda perisitlerin mezenkimal kök hücre belirteçlerini eksprese ettiği ve adipozit, osteoblast, odontoblast, miyoblast ve kondrosit benzeri hücelere dönüşebileceği bildirilmiştir (61-64)

Mezenkimal kök hücreler ile perisitler arasındaki bu ortak özellikler (61, 65) perisitlerin birçok dokuda mezenkimal kök hücre öncüsü olabileceğinin göstergesi olarak kabul edilmektedir (66, 67).



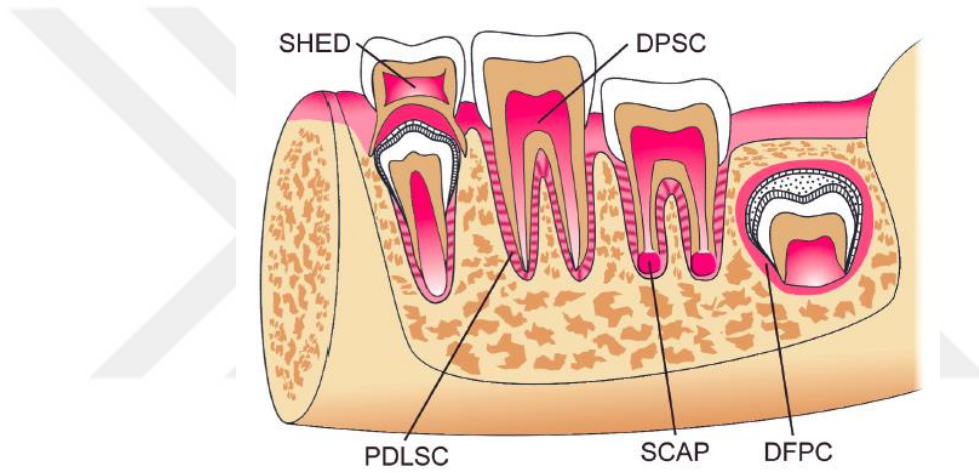
Şekil 2.7. *In vivo* ortamda perisitlerin hasar/tamir cevabı. Hasar durumunda ya da doku homeostazının sağlanması amacıyla perisitler kan damarından kopar. pMS: premezenkimal kök hücre. pMSC'ler hasar bölgesine göç edip dokuya özgü hücelere dönüşüp tamiri sağlamaktadırlar (55).

2.2.2. Orofasiyal Kök Hücreler

Orofasiyal mezenkimal kök hücrelerinin kendini yenileme ve birçok hücre türüne dönüşebilme özelliği, doku rejenerasyonu için ideal bir seçenek haline gelmelerini sağlamıştır. Orofasiyal dokulardan elde edilmiş olan mezenkimal kök hücreleri kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ile karşılaştırıldıklarında üstün olan özellikleri sayesinde sert doku rejenerasyonunda önerilmektedir (41). Aynı zamanda bu kök hücrelerin nöral krest orijinli olmaları nöral krest kökenli kraniofasiyal dokuların rejenerasyonunda kullanılmaları için uygun olmalarını sağlamaktadır (68).

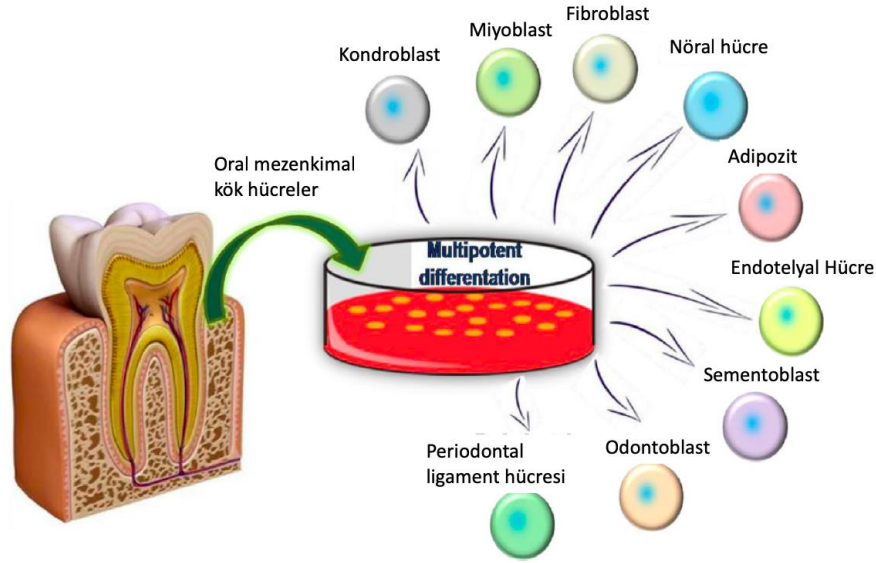
Dental ve orofasiyal bölge kök hücrelerinin sınıflandırılması

1. Dental doku mezenkimal kök hücreleri (şekil 2.8)
2. Oral kavite mukozası mezenkimal kök hücreleri
3. Orofasiyal kemik dokusu mezenkimal kök hücreleri
4. Adipoz doku ve tükürük bezi mezenkimal kök hücreleri
5. Maksiller sinüs kök hücreleri



Şekil 2.8. Dental kök hücre kaynakları. SHED: Düşen süt dişi kök hücreleri, DPSC: Dental Pulpa Kök Hücreleri, PDLSC: Periodontal Ligament Kök Hücreleri, SCAP: Apikal Papilla Kök Hücreleri DFSC: Dental Folikül Kök Hücreleri (4).

Orofasiyal mezenkimal kök hücreler odontoblast, osteoblast, nöral hücreler, kondrosit, adiposit, miyoblast, fibroblast ve endotelial hücrelere farklılaşabilirler (Şekil 2.9) (69).



Şekil 2.9. Oral mezenkimal hücrelerin farklılaşma kapasitesi (14).

Dental kök hücreler ektomezenkimial orijinli oldukları için hem mezoderm hem de ektoderme ait özellikler taşıyabilmektedirler (68). Yumuşak dental dokular multipotent postnatal kök hücreler için kolay ulaşılabilir kaynaklardır (4). Aynı zamanda kemik iliği ve adipoz dokulardan kök hücre alınması gibi girişimsel yöntemler içermediği gibi embriyonik kök hücrelerdeki etik sorunlar da söz konusu değildir (39).

2.2.3. Dental Pulpa Kök Hücreleri

Dental pulpa kök hücreleri ilk defa Gronthos ve ark. tarafından 2000 yılında üçüncü molar dişlerin pulpa dokusundan elde edilmiştir (5). Dental pulpa kök hücreleri kemik iliği kök hücreleri ile benzer karakteristik özelliklere sahiptir. Her iki doku benzer kök hücre belirteçlerini eksprese etmektedirler ve mineralize doku formasyonundan sorumlu matriks proteinlerine (alkalin fosfataz, osteokalsin ve osteopontin) sahiptirler (70-72).

Yetişkin diş dokusunda kök hücreler genel olarak pulpa kavitesinin perivasküler bölgelerinde ve odontoblastik tabaka yakınındaki hücreden zengin tabakada bulunmaktadır ve hasar bölgesine burarlardan göç ederler. Yapılan bir çalışmada hasar gören odontoblastların yerine geçen odontoblast benzeri hücrelerin perivasküler fibroblastlardan kaynağını aldığı gösterilmiştir. Aynı şekilde

preodontoblastların kökeninin kapillerlerin duvarlarında bulunan perivasküler hücreler olduğunu rapor eden çalışmalar bulunmaktadır (73-76).

Dental pulpa kök hücrelerinin morfolojik özellikleri incelendiğinde dental pulpa kök hücrelerinin fibroblast benzeri bir morfolojiye sahip olduğu gözlenmiştir (9, 77, 78). Ancak değişik morfolojiler tek bir dental pulpa kök hücre kolonisinde gözlenebilir. Bu durum yetişkin dental pulpasında çeşitli progenitör kök hücre popülasyonlarının bulunduğunu göstermektedir (5).

Literatürde dental pulpa kök hücrelerinin çoğalma potansiyelleri, yara iyileşmesi (10), metabolik aktiviteleri (79) ve hücre sayım deneylerinin yapıldığı çalışmalar vardır (10, 80-82). Yapılan çalışmalarda Dental pulpa kök hücrelerinin hızlı proliferasyon gösterdiği ve bu çoğalma kapasitesinin kemik iliği kök hücrelerinden daha fazla olduğu gözlenmiştir (83, 84).

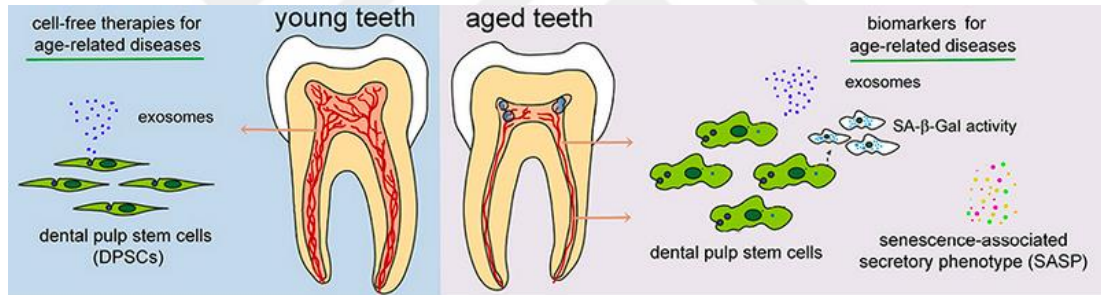
Dental pulpa kök hücreleri osteojenik, kondrojenik, adipojenik, nörojenik ve miyojenik farklılaşma yetenekleri de olan hücrelerdir (5, 68). Aynı zamanda dental pulpa kök hücrelerinin melanoma hücrelerine (85), endotelial hücrelere (86), hepatositlere (71, 87, 88) ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelere (iPSC) de *in vivo* ortamda dönüşebileceği gösterilmiştir (54, 89).

Literatürde yapılan çalışmalarda öncelikle pulpa hücrelerinin kök hücre özgülüklerinin karakterizasyonu üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda çeşitli yüzey belirteçlerinin ekspresyon edilip edilmediğine göre kök hücrelerin özgülükleri tayin edilir (5, 7, 79, 90-92).

Chmielewsky ve ark. yaptıkları çalışmada gram negatif bakteri ürünü olan lipopolisakkarit (LPS)'nin fibroblast aktivasyon neticesinde kompleman sistemini aktive ettiğini ve böylece dental pulpadaki progenitör hücrelerin LPS salgılanan bölgeye göçünün gerçekleştiğini bildirmişlerdir (90). Ayrıca yapılan hayvan deneyleri ile de dental pulpa kök hücrelerinin davranışsal özellikleri incelenmiştir (5, 93, 94).

Dişlerin dondurulduğu (kriyopreserve) edildiği bir çalışmada dental pulpa kök hücrelerinin mezenkimal kök hücre morfolojisi, immunofenotipi, canlılığı ve proliferasyonunun kriyopreserve edilmemiş dişlerden alınan pulpa dokusu ile benzer olduğu sonucuna varmışlardır (95). Başka bir çalışmada diş bütünlüğü bozulmadan kriyopreserve edilmiş ekfoliyeye süt dişlerinin de dental kök hücre kaynağı için uygun olduğu bulunmuştur (96).

Yaşlanma ile beraber dental pulpa kök hücreleride artmış hücre boyutu, azalmış proliferasyon ve diferansiyasyon potansiyeli ile mineralizasyon sürecinin etkilenmesi gibi tipik senesence belirtileri görülür (Şekil 2.10) (25). Literatürde yapılan çalışmalarda yaşa bağlı disfonksiyonların dental pulpa kök hücrelerinin adiopojenik, nörojenik ve osteojenik diferansiyasyon kapasitelerinin ve proliferasyon yeteneklerinin azaldığını rapor etmişlerdir (25, 97-99).



Şekil 2.10. Yaşlanmanın dental pulpa kök hücrelerine etkisi (25).

2.2.4. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Dental Doku Mühendisliğinde Kullanımı

Hasar görmüş olan kraniyofasiyal dokuların tamiri ve yeniden oluşturulması zorlayıcı bir klinik durumdur. Çünkü kraniyofasiyal bölge kemik, kıkırdak, ligamenter doku, yumuşak doku ve nörovasküler içeriği olan kompleks bir yapıya sahiptir. Rejeneratif tıpta mezenkimal kök hücre kullanımı umut vericidir (100, 101).

Rejeneratif tıbbın ve doku mühendisliğinin esas amacı insan hücrelerinin, dokularının ya da organlarının normal fonksiyonlarını kazanmalarını ya da tamir edilmesini sağlamaktır (102). Doku mühendisliğinin 3 esas komponenti kök hücreler, hücre iskeletleri ve büyüme faktörleridir (103).

Dental pulpa kök hücrelerinin yüksek düzeyde proliferasyon, kendini yenileme ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme özelliklerine sahip olması rejeneratif endodonti dahil diğer doku rejenerasyonlarında kullanılabilmelerinin yolunu açmıştır (4, 14, 104).

2.2.5. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Farklılaşma Potansiyeli

Odontoblastlar dental papilladan diferansiye olan post-mitotik hücrelerdir (105). Dental pulpa hasarı sebebiyle odontoblastlar öldüğü/hasar gördüğü zaman, odontoblastların bölünme kapasitesi olmadığı için, ölen odontoblastların yerine pulpal kaynaklı kök hücreler geçer ve odontoblast benzeri hücelere dönüşüp tersiyer dentin salgılanmasını sağlarlar (23). Bu sebeple odontoblastik diferansiyasyon potansiyeli dental kök hücreler için önemli bir özelliktir.

Pulpa çeşitli sebeplerle ekspoz olduğu zaman uygun bir pulpa kaplama ajanı ile pulpa hücrelerinin farklılaşması ve dental pulpa dokusunun canlılığının devamını sağlamak amaçlanmaktadır (106, 107).

Mineral trioxide aggregate (MTA) ve Biodentine perforasyon tamiri, kök ucu dolgu maddesi, apeksifikasyon materyali ile pulpa kaplama ajanı olarak kullanılmaktadır (108). Yapılan çalışmalarda MTA'nın ve Biodentine'in odontoblastik farklılaşmayı sağladığı gösterilmiştir (106, 108).

Daha sonraki yıllarda non-kollajen ekstraselüler matriks protein ekstraktı olan dentin matrix protein1 (DMP1)'in ve transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) tek başına ya da fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF2) ile kombine kullanıldığı zaman dental pulpa kök hücrelerinin odontoblastlara farklılaştığını ve ekspoz olmuş pulpa dokusunda reperatif dentin oluşumunu sağladığını göstermiştir (105, 109). Bunların yanı sıra çalışmalarda hücre iskeletleri dental pulpa kök hücreleri ile beraber kullanıldığında odontoblastik farklılaşmalar ve dentin yapımının olduğu gösterilmiştir (110-114).

Huang ve ark. 2006 yılında yaptıkları çalışmada izole edilmiş dental pulpa kök hücrelerini mekanik ve kimyasal olarak işlem görmüş dentin yüzeylerine *in vitro* olarak ektikleri zaman bu hücrelerin dental tübüllere uzanan sitoplazmik uzantıları olan odontoblast benzeri hücreler oluşturduklarını *scanning electron microscope (SEM)* analizi ile göstermişlerdir (115).

Gronthos ve ark. yaptıkları çalışmada immünosüprese farelere dental pulpa kök hücreleri implante etmişlerdir. Ardından yaptıkları incelemelerde dental pulpa kök hücrelerinin insan dişlerinde olduğu gibi bir bağ dokusu oluşturduğunu bulmuşlardır. Bu bağ dokusunda odontoblastların sıralandığını ve bu dokunun dentin tübülleri ile kan damarları içerdiği bulunmuştur (5).

Literatürde dental pulpa kök hücreleri *ex vivo* olarak çoğaltıldıktan sonra hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat ile beraber immün sistemi baskılanmış farelere implante edildiğinde pulpa ve dentine benzer yapı oluştuğunu, oluşan bağ dokusunda odontoblastların sıralandığını ve bu dokunun dentin tübülleri ile kan damarları içerdiği gösterilmiştir (5, 116).

Dental pulpa kök hücrelerinde alkaline fosfataz, osteokalsin ve osteopontin gibi mineralize dokulara benzer belirteçler ve matriks proteinleri bulunmaktadır. Kültür besiyerine ilave edilen çeşitli maddeler (örneğin; gliserolfosfat, deksametazon, L-askorbik asit) ile osteojenik değişim sağlanabilir (9, 117). Literatürde yapılan pek çok çalışmada dental pulpa kök hücrelerinin osteojenik değişim kapasitesinin olduğu gösterilmiştir (118-121).

Laino ve ark. 2005 yılında yaptıkları çalışmada dental pulpa kök hücrelerinden *in vitro* ortamda canlı otolog fibröz kemik oluştuğunu gözlemişlerdir. Bu kemik dokusu immün sistemi baskılanmış farelere transplante edildiği zaman osteosit içeren lamellar kemik dokusu oluştuğu belirtilmiştir (122).

Dental pulpa kök hücrelerinin osteoblast/osteosit farklılaşması bakımından bir kaynak oluşturabileceği ve böylece kraniyofasiyal dokuların rejenerasyonunda kullanılabileceği düşünülmektedir (14, 16).

Yapılan çeşitli çalışmalardan dental pulpa kök hücrelerinin kondrojeik değişim kapasitesinin olduğu gösterilmiştir. Kondrojenik değişimin gerçekleşmesi için besiyerine (α -MEM) fetal bovine serum, transforming growth factor- β , dekstametazon, insülin, askorbat-2-fosfat ve sodyum pirüvat gibi maddeler eklenerek ve 3 haftalık inkübasyon sürecinden sonra farklılaşmanın görülebileceği belirtilmektedir (123). Westin ve ark. yaptıkları çalışmada kitosan-ksantan matriksli iskelet kullanarak dental pulpa kök hücrelerinin kondrositlere farklılaştığını göstermişlerdir (124). Osteoartritin dental pulpa kök hücrelerinin kondrojenik farklılaşma potansiyellerinden faydalanarak tedavi edilebileceği düşünülmektedir (14).

Nörodejeneratif hastalıklar, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, inme, omurilik yaralanması ve periferik sinir yaralanması; nöronların dejenerasyonu ve fonksiyon kaybı ile karakterize durumlardır (125). Bu tarz hastalıklarda tedavi yaklaşımı, nöron ve diğer nöronal hücre çeşitlerinin kaybindan kaynaklanan etkileri ertelemektir (126). Kök hücreler kullanılarak bu tür hastalıkların önüne geçilmesi hedeflenmektedir (14). Nöronal kök hücreler vücutta ulaşılması zor alanlarda bulunmaktadır ve ancak beyin ameliyatı ile elde edilebilirler (14, 127).

Nöral krest hücrelerinden baş ve boyun bölgesindeki iskelet ve bağ dokusu gelişir ve aynı zamanda kranyal gangliyondaki nöron ve glial hücreler meydana gelir(128). Dental pulpa kök hücreleri nöral krest orijinlidir ve bu sebeple çeşitli nöral krest gelişimsel genlerine ait mRNA ve nöral kök hücre belirteci olan nestin ekspresyonu görülmektedir(58, 128). Rafiee ve ark. 2019 yılında yaptıkları çalışmada epidermal büyüme faktörü (EGF), FGF2 ve heparin gibi büyüme faktörlerini kullanarak dental pulpa kök hücrelerinin nöron benzeri hücrelere dönüştüklerini rapor etmişlerdir (129). Bunun yanı sıra Zhang ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada

nöronal farklılaşma faktöleri içeren kitosan iskeletler kullandıkları zaman dental pulpa kök hücrelerinin nöronal farklılaşmaya uğradığını ve bu durumun omurilik hasarı için umut veren bir durum olduğunu bildirmişlerdir (130).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda dental pulpa kök hücrelerinin uygun besiyerlerinde dopaminerjik ve motor nöronal farklılaşma gösterdiğini (131), kriyoprezervasyon işleminden sonra dahi dental pulpa kök hücrelerinin nöronal değişim kapasitelerini koruduğu belirtilmiştir (132-134). Diğer taraftan dental pulpa kök hücrelerinin aktif nöronlara dönüştüğünü bildiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (14, 129).

Zou ve ark. 2019 yılında yaptıkları çalışmada dental pulpa kök hücrelerinin endotelial değişim kapasitesinin olduğunu göstermişlerdir (135). Aksel ve ark. yaptıkları çalışmada dental pulpa kök hücrelerinin anjiogenezisi arttırıcı etki gösterebileceğini belirtmişlerdir (136).

Yapılan çalışmalarda dental pulpa kök hücrelerinin adipojenik farklılaşma kapasitesinin olduğu gösterilmiştir (58, 132, 137, 138). Kültür besiyerine isobutilmetilksantin, deksametazon, insulin, indometaksin, gentamisin gibi maddeler ilave edilerek pulpa kök hücrelerinin adipozitelere dönüşebileceği gösterilmiştir (5, 14, 132, 137).

Dental pulpa kök hücrelerinin adipojenik farklılaşmasından faydalanarak kardiyometabolik hastalıklar, diyabet ve obezite kaynaklı hastalıklarda kullanılabileceği düşünülmektedir (139, 140).

Bunların yanı sıra dental pulpa kök hücrelerinin ameloblastik (141), sementoblastik (16), miyoblastik (142) ve epitelyal farklılaşma (143, 144) kapasitesinin olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. Son yıllarda dental pulpa kök hücreleri iskemik hastalıklarda kullanıldığında kan akışında ve kapiller formasyonda

artış olduğu ve gelecekte umut vadeden bir alan olarak çalışmaların yürütülmesi gerektiği vurgulanmıştır (140, 145).

2.2.6. Rejeneratif Endodontide Kök Hücre Uygulamalarından Yararlanılması

Pulpa revaskülarizasyonu nekrotik pulpalı dişlerin yeniden canlandırılmasını (revitalizasyonunu) sağlayan bir yöntem olarak tanıtılmıştır(146). Bu yöntemde kök gelişiminin devamlılığı ve kök duvarlarının kalınlaşması sert doku birikimi ile sağlanmaktadır (147). Vaka raporlarında nekrotik pupalı ve apikal periodontitisli dişerde periapikal iyileşme sağlandıktan sonra kök formasyonunda artış olduğu gösterilmiştir (148, 149).

Pulpa revaskülarizasyonu ile pulpa rejenerasyonu arasında bazı farklılıklar vardır (147). Rejenerasyon, dokunun yapısının ve biyolojik fonksiyonunun orjinal doku ile benzer şekilde restore edilmesi olarak tanımlanmaktadır (150). Tamir/revaskülarizasyon ise, hasarlı dokunun esas dokudan farklı bir doku ile yer değiştirmesi ve biyolojik özelliklerini yitirmesidir (150).

Pulpa boşluğunda doku rejenerasyonunu indüklemek için uzun zamandır çalışmalar yapılmaktadır. Başta araştırmacılar kan pıhtısı oluşumu ile matur dişlerde doku tamirini denemişlerdir (41). Fakat kanal boşluğunda bağ dokusu gelişimi sınırlı kalmıştır ve oluşan dokunun gerçek pulpa dokusu olmadığı gözlenmiştir (151, 152). Bu nedenle rejeneratif endodontik tedavi, rejeneratif değil reperatif bir tedavi olarak görülmektedir (153, 154). Günümüzde uygulanan rejeneratif endodonti çalışmalarında kanal içinde oluşan dokunun sement ve kemik benzeri doku olduğu histolojik incelemelerle gösterildiği için bu işlem sırasında indüklenen kök hücrelerinin apikal papilladan ziyade peridontal ligament ve kemik iliği kaynaklı olduğu düşünülmektedir (150, 155, 156). Aynı zamanda birçok çalışmada revaskülarizasyon sonrasında kanal içinde kalsifikasyonların oluştuğu ve bu durumun, revaskülarizasyonun pulpa fonksiyonlarının restorasyonunda yetersiz olduğunu düşündürmektedir (148, 157).

Dental pulpa kök hücreleri rejeneratif endodonti için önemli bir potansiyele sahiptirler (158). Postnatal pulpal mezenkimal kök hücre popülasyonlarının *in vivo* ortamda transplantasyonu pulpa-dentin kompleksini yapı ve fonksiyon olarak andıran rejenerer doku oluşumu açısından olumlu sonuçlar vermiştir (159, 160). Dental pulpa kök hücreleri hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat partikülleri ile beraber immün sistemi baskılanmış farelere subkutanöz olarak transplante edildiği zaman *in vivo* ortamda dentin-pulpa-benzeri bir yapı oluşumu görülmüştür (5). Iohara ve ark. 2009 yılında köpekler üstünde yaptıkları çalışmada pulpa-dentin kompleksinin rejenerasyonunu göstermişlerdir (161). 2011 yılında aynı araştırmacılar gene köpeklerde yaptıkları bir çalışmada mezenkimal kök hücre içeren dental pulpayı pulpa boşluğuna transplante ettikleri zaman pulpa dentin kompleksinin oluştuğunu görmüşlerdir (162). Bu çalışma ile dezenfekte edilmiş kanal boşluğunda pulpa-dentin rejenerasyonunun elde edilmesi için pulpa hücresine ihtiyaç duyulduğu ilk defa gösterilmiştir (162).

Eksfoliyeye olmuş süt dişi (biodegradable) iskeleler ile insan dişi kesitlerine ekildiği zaman dentin yüzeyinde başarılı bir şekilde odontoblast benzeri hücrelere dönüşme gerçekleştiği görülmüşken (163, 164), bu yaklaşım pulpa boşluğuna uygulandığı zaman yetersiz kanlanmadan ötürü pulpa-benzeri doku oluşumu görülmemiştir (41). Kanlanmadan kaynaklı endişelerden ötürü istenilen pulpa rejenerasyonunun elde edilmesi için aşamalı olarak doku mühendisliği ile elde edilmiş pulpanın klinik olarak uygulanması gerekebilir(165). Yapılan hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar büyüme faktörlerini TGF- β ve DMP1 içeren dentin matriks ekstraktları ile benzer şekilde dentin-pulpa kompleksi rejenerasyonunu indükleyebileceğini öne sürmektedirler (166, 167). Temizleme ve şekillendirme işlemlerinin ardından laboratuvarında yapılmış olan dental pulpa dokusu yapılarının implantasyonu gelecekteki rejeneratif endodontik tedaviler için önerilmektedir (41)

Pulpal mezenkimal kök hücrelerin transplantasyon için çoğaltılmaları gerekmektedir ancak bu hücreler *in vitro* olarak kültüre edildikleri zaman çok sayıda bölünme meydana gelir ve bir süre sonra senescense yani hücrelerin yaşlanması durumu ortaya çıkar ve hücrelerdeki odonto/osteojenik değişim kapasitesi azalmaya

başlar (168). Bu durumun önüne geçebilmek için Zhangrui ve ark. kültür hazırlama ihtiyacını ortadan kaldıracak şekilde ezilerek küçültülmüş (mins edilmiş) pulpa dokusunun direkt transplante edilebileceği bir yöntem üzerinde çalışmışlardır (147). Bu yöntemin özellikle endodontik tedavi ihtiyacı olan vital dişler (örneğin parsiyel pulpotomi ya da pupektomi) için faydalı olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada ezilerek küçültülmüş pulpa dokusunda kök hücre özellikleri ve multipotent özellik gösteren mezenkimal hücrelerin var olduğu, üç boyutlu hücre iskelelerine doğru büyüyebildikleri ve mineralize doku oluşturmak üzere diferansiye olabileceği gösterilmiştir (147).

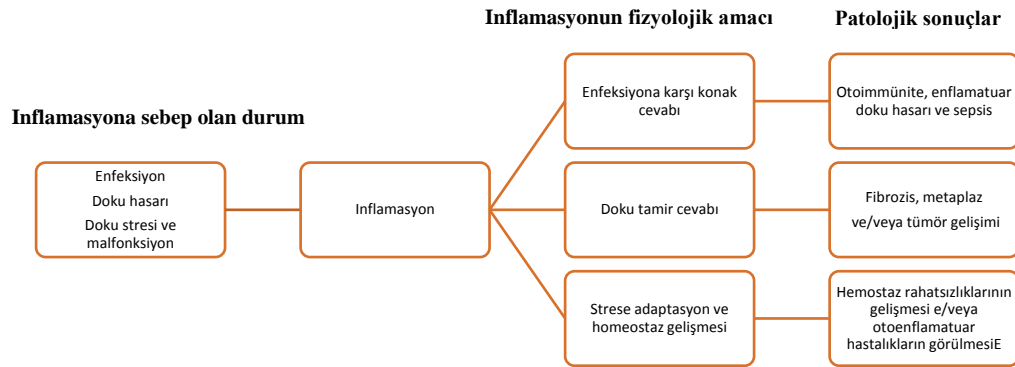
Diş pulpasında çürük, travma, mekanik irritasyon gibi bazı dışsal uyarılara karşı inflamasyon gelişebilmektedir (21). Son yıllarda sağlıklı dental pulpa dokusunun yanı sıra inflame pulpa dokusunun da kök hücre kapasitesine ve farklı hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahip olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (9, 169).

2.3. İnflamasyon

Inflamasyon: dokuların enfeksiyon ve doku hasarına karşı vermiş oldukları hücresel ve damarsal yanıtıdır (Şekil 2.11) (170, 171).

Akut inflamasyon: Başlangıçta ani olarak gelişen bir yanıtıdır ve kısa sürelidir; bu süreçte sıvının, serum proteinlerinin, enflamatuar mediyatörlerin ve hücrelerin, özellikle polimorfonükleer lölositlerin, hasar alanına doğru göç ettikleri bir durumdur ve hasar verici durum devam ederse kronikleşebilir (170).

Kronik İnflamasyon: Fibroblastların ve vasküler endotelyumun proliferasyonu, lenfositlerin, plazma hücrelerinin, makrofajların ve enflamatuar medyatörlerin ortama gelmesiyle karakterize yavaş gelişen, uzun süreli bir cevaptır(170). Primer olarak ya da akut inflamasyona yanıt olarak gelişebilir (170).



Şekil 2.11. Inflamasyonun sebepleri ile fiziksel ve patolojik sonuçları.

2.3.1. Pulpada Inflamasyon

Diğer dokularda olduğu gibi pulpa dokusu da patojenleri elimine edip tamiri stimüle etmek adına enflamatuvar yanıt vermektedir. Pulpa inflamasyonu dentin pulpa kompleksinin tamiri ve rejenerasyonu için gereklidir, aksi takdirde pulpa nekrozu gelişebilir (172).

2.3.2. Pulpa Hastalıkları

Normal/Sağlıklı Pulpa

Amerikan Endodonti Derneği'nin Endodontik Terimler Sözlüğü'nde (*American Association of Endodontists: Glossary of endodontic terms, ed 8, Chicago, 2012*) anlatıldığı şekilde normal, sağlıklı pulpalı dişler semptomsuzdur ve elektrikli pulpa testi, soğuk testi, sıcak testi gibi vitalite/canlılık testlerine normal yanıt vermektedirler Sağlıklı pulpalı dişler spontan semptomlar göstermezler. Pulpa testlerine yanıt hafiftir ve saniyeler içinde kaybolan bir hassasiyet hissedilebilir. Radyografik olarak değişen düzeylerde kalsifikasyon görülebilir fakat rezorpsiyona, çürüğe ya da mekanik

faktörlere bağı pulpa ekspo zu görölmez. Bu dişler için endodontik tedavi endike değıldir (173).

Pulpitis

Dental pulpanın inflamasyonunu tarif eden klinik ve histolojik bir terimdir. Klinik olarak geri dönüşümlü (reversible) ya da geri dönüşümsüz (irreversible) olarak tanımlanmaktayken, histolojik olarak ise akut, kronik ya da hiperplastik olarak tanımlanmaktadır (173).

Klinik diyagnozu objektif ve sübjektif bulgulara dayanıp inflamasyonun ortadan kalkarak pulpanın normale dönebileceğı bir duruma geri dönüşümlü pulpitis denilmektedir. Pulpa dokusu uyarılar ile irrite olur ve uyarı ortadan kalktığı zaman tekrardan eski semptomsuz haline geri döner. Reversible pulpitis sebepleri arasında çürük, ekspo z olmuş dentin, yeni yapılmış dental tedavi ve hasar görmüş restorasyonlar gösterilebilir. İrritanın konservatif olarak ortadan kaldırılması semptomların ortadan kalkmasını sağlar. Pulpada patolojisi olmadığı halde dentin ekspo zunun görüldüğü durumlarda kafa karışıklığı olabilir; termal, taktil, mekanik, osmotik ya da kimyasal uyarılara karşı gelişen keskin geri dönüşümlü bir ağrı görülebilir. Dentin hassasiyeti ya da hipersensitivite olarak bilinir. Bu durum dentin tübüllerindeki sıvı akışından ötürü meydana gelmektedir ve tanı koyarken reversibl pulpitis ile ayırımını doğru yapmak önemlidir (173, 174).

Pulpadaki inflamasyon durumu ilerledikçe geri dönüşümsüz bir hal alır. Bu evrede pulpanın uzaklaştırılıp kalan boşluğun kanal tedavisi ile tedavi edilmesi gerekmektedir. Bu duruma geri dönüşümsüz pulpitis denilmektedir. Semptomatik ve asemptomatik olmak üzere iki çeşit geri dönüşümsüz pulpitis vardır. Semptomatik pulpitis durumunda aralıklı ya da spondan ağrılar görülebilmektedir. Isı değışikliklerine (özellikle soğuk uyarılar) abartılı ve uzamış ağrı oluşumuna sebebiyet verir. Bu vakalarda ağrı keskin ya da künt, lokalize veya diffüz olarak görülür. İlerlemiş irreversible pulpitis vakalarında çekilen radyograflarda genişlemiş

periodontal ligament görülebilir. Bu tür dişlerde derin restorasyonlar, çürük, pulpa ekspozu ya da yakın dönemde veya daha önceden pulpanın hasara uğramış olduğu gözlenebilir (174).

Dental pulpadaki şiddetli hasar geri dönüşümsüz pulpitis durumunu tetikleyebilir. Bu durumda kan akışı değişir, vazodilatasyon görülür ve yüksek vasküler geçirgenlik söz konusudur; neticede pulpa basıncı artar, immün hücreler etkinleştirilip ve ciddi ağrıya sebep olan bir sinirsel aktivite görülür (175-177). Bu inflamasyonun geri dönüşümsüz olması vücudun savunma mekanizmasının etken ortadan kaldırılrsa bile bu süreci geri dönüştürememesidir. Geri dönüşümsüz durum iyileştirilemediği için bu tarz durumlarda pulpanın tamamen uzaklaştırılıp kök kanal tedavisi yapılması gerekmektedir. Doku hasarı meydana geldiği zaman farklılaşmamış hücreler iyileşmeden sorumludur (169).

Zanini ve ark. 2017 yılında yayımladıkları derlemede klinik olarak muayene edildiğinde geri dönüşümsüz pulpitis olarak teşhis konulan vakalarda interlökin-8 (IL-8), TNF- α ve MMP-9'in protein ve gen ekspresyonunun arttığını belirtmişlerdir (172).

2.3.3. Geri Dönüşümsüz Pulpa Hasarı Olan Dişlerde Kök Hücre

Genel sağlığın korunmasında dental pulpa inflamasyonunun ve enfeksiyonun yönetimi çok önemlidir. Güncel endodontik tedaviler pulpa canlılığını ortadan kaldırabilir ya da hasar verebilir. Bu yüzden pulpa vitalitesini ve diş ömrünü uzatmaya yönelik biouyumlu tedaviler geliştirmek önemlidir. Dental pulpada geri dönüşümsüz pulpitis tanısı konduğunda pulpa dokusunun inflame veya enfekte olduğuna inanılmaktadır. Wang ve ark. yaşları 6-40 arasında değişen 8 sağlıklı pulpalı ve 8 geri dönüşümsüz pulpitisli dişi olan hastada yaptıkları çalışmada geri dönüşümsüz pulpalı dişlerde kök hücre bulunabileceğini tespit etmişlerdir. Hastalıklı gruptan elde edilen kök hücreler daha düşük koloni formasyonu ve proliferasyon kapasitesi göstermişlerdir (9). Pereira ve ark. 2012 yılında yaptıkları çalışmada sağlıklı ve inflame pulpa karşılaştırıldığı zaman dental pulpa kök hücrelerinin morfoloji, proliferasyon ve

differentiasyon kapasitesi açısından benzer olduğunu göstermişlerdir; sonuç olarak inflamatuvar sürecin kök hücre özelliklerini etkilemediği gösterilmiştir (169). İnflametal pulpalardan hücre kültürü elde edilmesi sağlıklı dişlerden hücre kültürü edilmesinden daha zor olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur (6, 169). Alongi ve ark. inflametal pulpalardan elde ettikleri dental pulpa kök hücrelerinin normal pulpalara kıyasla daha yüksek seviyelerde mezenkimal hücre markerları olan CD90 ve CD105'i eksprese ettiklerini bulmuşlardır (6). Malekfar ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada geri dönüşümsüz pulpitis görülen dişler dondurulduğunda (cryopreservation) normal karakteristik özelliklerini kaybetmediklerini göstermişlerdir (10).

Odontoblastlar dental pulpada bulunan osteoblast benzeri hücrelerdir. Ancak her iki hücre de sert doku oluşturmaktan sorumlu olsa da odontoblastlar son derece differansiye olmuş hücrelerdir ve çoğalamazlar. Aynı zamanda kimyasal benzerliklerine rağmen oluşturdukları dentin dokusu yapısal olarak kemik dokusundan oldukça farklıdır. Dişe gelen hasarlar sonucunda odontoblastlar zarar gördüğü zaman pulpa dokusunda bulunan farklılaşmamış mezenkimal hücrelerden gelişen odontoblastlar bunların yerine geçer (6). Bu değişime uğramamış mezenkimal kök hücrelerinin dental pulpa kök hücreleri oldukları düşünülmektedir (58, 178).

Alongi ve ark. 2010 yılında yaptıkları çalışmada geri dönüşümsüz pulpitis tanısı konan inflametal pulpadan alınan dental pulpa kök hücrelerini farelere implante ettikleri zaman pulpa-dentin benzeri bir yapı oluştuğunu bulmuşlardır (6).

2.4. Dental Pulpa Kök Hücresi Eldesi

Dental pulpa kök hücrelerinin rejeneratif tedavilerde kullanılabilmesi için izole edilmeleri ve çoğaltılmaları gerekmektedir. Dental pulpa kök hücrelerinin çoğalmaları için, transplante edilmeden önce kültürleme ve pasajlama yapılması gereklidir. Hücre çoğalması sırasında kök hücrelerin özellikleri kültür şartlarından

kolaylıkla etkilenebilir (179). Bunlar; sıcaklık, nem, ortamın asidik olması ve ortamın oksijen konsantrasyonu gibi faktörlerdir (39).

Dental pulpa kök hücreleri eksplant kültür, enzimatik ve mekanik yöntemlerle izole edilebilir. En sık kullanılan yöntemin enzimatik yöntem olduğu bildirilmiştir (180). Birinci sırada kollajenaz tip I'in dispaz ile beraber kullanımının olduğu ifade edilmiştir (181, 182). İkinci sırada ise en çok görülen yöntem kollajenaz tip I'in tek başına (139) kullanımıdır (183). Eksplant kültür tekniğinde doku parçalarının boyutu önemlidir ve mekanik teknikte genellikle bir filtrasyon aşaması uygulanmaktadır (183). Enzimatik teknikle benzer olarak eksplant teknikte de birçok hücre çeşidine dönüşebilen hücreleri izole etmek mümkündür (184).

Ferrua ve ark. yaptıkları derlemede en sık kullanılan besiyeri olarak α -minimum essential medium (α -MEM) (185, 186) ikinci en sık kullanılan Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ,üçüncü en sık kullanılan besiyeri ise DMEM/12 olarak belirtilmişlerdir (183).

2.5. Kök Hücre Belirleme Yöntemleri

1. Akış Sitometrisi (Flow Sitometre)
2. İmmünofloresans
3. Koloni Oluşturan Ünit
4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction,PCR)
5. Protein Ekstraksiyonu ve immünoblotlama (91)

2.5.1. Akış Sitometrisi

Akış sitometrisi, bir hücre veya parçacık popülasyonunun lazer ile fiziksel ve kimyasal özelliklerini tespit etmek ve ölçmek için kullanılan bir tekniktir (187, 188). Hücre veya partikül içeren bir numune bir sıvı içinde süspansiyon haline getirilir ve

akış sitometre aletine enjekte edilir (189). Numune ideal olarak bir hücreyi bir lazer ışını içinden bir seferde akıtmaya odaklanır ve saçılan ışık hücrelere ve bileşenlerine özgüdür. Hücreler genellikle floresan işaretleyicilerle etiketlenir, böylece ışık önce absorbe edilir ve daha sonra bir dalga boyu bandında yayılır (189). On binlerce hücre hızlıca incelenebilir ve toplanan veriler bir bilgisayar tarafından işlenir (189).

Akış Sitometrisi Kullanım Alanları:

- Hücre sayımı
- Hücre sınıflandırma
- Hücre karakteristiklerinin ve fonksiyonunun belirlenmesi
- Mikroorganizma tespiti
- Biyobelirteç (biyomarker) tespiti
- Protein mühendisliği tespiti
- Kan kanserleri gibi sağlık bozukluklarının teşhisi (189).

Dental Pulpa Kök Hücre Belirteçleri

Bağışıklıkta görev alan hücreler ve kök hücreler gibi birçok hücre çeşidini karakterize etmek için CD (cluster of differentiation) belirteçleri geliştirilmiştir (190)

Dental pulpa kök hücrelerinde görülen yüzey belirteçleri; CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, CD271

Dental pulpa kök hücrelerinde görülmeyen yüzey belirteçleri; CD14, CD19, CD24, CD31, CD34, CD45, CD117, CD133 (54).

CD29 (integrin $\beta 1$) *in vivo* mezenkimal kök hücre migrasyonu ile ilgili bir belirteçtir (191), CD73 (ecto-5'-nucleotidase), ve CD90 (Thy-1) immün sistemde hücre-hücre ve hücre matriks etkileşimlerinden sorumlu olan belirteçlerdir (192), CD105 (endoglin) ise bir integrin ve TGF- β bağlayıcı bir moleküldür (193).

Mezenkimal kök hücreler hematopoetik belirteçleri eksprese etmezler. CD45 bir hematopoetik hücre belirteçidir, CD34 primitiv hematopoetik progenitörleri ve endotelyal hücreleri belirtmektedir. CD14 ve CD11b monositler ve makrofajlar tarafından eksprese edilmektedirler. CD79 α ve CD19 B lenfosit belirteçleridir. HLA-DR mezenkimal kök hücreler stimüle edilmediği sürece ekspres edilmemektedir (56).

2.5.2. İmmünofloresans

İmmünofloresan veya flüoresan antikor boyaması, öncelikle donmuş doku kesitleri, hücre "smear'ları" veya kültürlenmiş hücreler üzerinde kullanılan bir antijen tespit testidir. Antijen, özel olarak modifiye edilmiş, ajana özgü antikorların örnek matrisine bağlanmasıyla tespit edilir (194).

2.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction,PCR)

DNAların, DNA polimeraz enzimi ile belirli sayılarda çoğaltılıp belirli şekilde dizilmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem sayesinde genlerin fonksiyonu, genetik ya da enfeksiyonel hastalıkların incelenmesi, genetik parmak izlerinin incelenmesi gibi çeşitli incelemeler yapılabilmektedir (195).

2.5.4. Protein Ekstraksiyonu ve Immunoblotlama

Western blotlama, belirli bir doku homojenatı veya ekstraktı örneğindeki spesifik proteinleri saptamak için kullanılan analitik bir tekniktir. Doğal veya denatüre proteinleri polipeptidin uzunluğuna (denatüre edici koşullar) veya proteinin 3-D yapısına (doğal / denatüre edici olmayan koşullar) ayırmak için jel elektroforezini kullanır. Daha sonra proteinler bir membrana (tipik olarak nitroselüloz veya PVDF)

aktarılır, burada hedef proteine özgü antikorlar kullanılarak tespit etmektedir (196). Southern Blotlama DNA blot hibridizasyon tekniğidir (197). Northern Blotlama ise bir RNA blot tekniğidir (197).

2.5.5. Koloni Oluşturan Ünit

Koloni oluşturan birim (CFU), CFU / mL cinsinden yaşayabilir kolonojenik hücre sayılarının bir ölçüsüdür. Bunlar, çoğalmaya ve küçük koloniler oluşturmaya yetecek kadar canlı kalan hücre sayısının bir göstergesidir (198). Mezenkimal kök hücrelerin özelliği in vitro ortamda CFU oluşturmalarıdır (199).

2.6. Amaç ve Hipotez

Yapılan tez çalışmasında sağlıklı, geri dönüşümlü pulpitisli ile geri dönüşümsüz pulpitisli dişlerde genç ve yaşlılarda kök hücre varlığı, sayısı ve yara iyileşme kapasitesinin incelenmesi amaçlanmaktadır. İnflame pulpalı dişler sağlıklı dişlerle karşılaştırıldığı zaman mezenkimal kök hücre varlığının inflame pulpalı dişlerde daha az sayıda olacağı ve lateral migrasyon yeteneğinin daha düşük olacağı düşünülmektedir. Aynı zamanda yaşlılarda gençlere göre mezenkimal kök hücre varlığının ve lateral migrasyon kapasitesinin daha düşük olacağı öngörülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, GO 18/574-07 Kayıt numaralı ve 12.06.2018 tarihli T.C. Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu raporu ile Tıbbi etik açıdan uygun bulunmuştur (Ek...)

Yapılan tez çalışmasında sağlıklı, geri dönüşümlü pulpitisli ile geri dönüşümsüz pulpitisli dişlerde genç ve yaşlılarda kök hücre varlığı, sayısı ve yara iyileşmesi incelenmesi amaçlanmaktadır.

3.1. Diş Pulpa Çalışma Grupları ve İzolasyon Yöntemleri

Çalışmada öncelikle 15-30 yaş aralığındaki sistemik hastalığı olmayan ve son 3 haftalık dönemde antibiyotik kullanmamış olan hastalardan diş pulpaları elde edilmiştir. Çalışmaya başlama aşamasında yaşlı bireylerden elde edilen sağlıklı ve inflame pulpa dokularıyla, genç bireylerden elde edilen dokulardan elde edilen kök hücrelerin karşılaştırılması hedeflenmekteydi. Fakat yaşlı bireylerden pulpa dokusunun elde edilmesindeki zorluklar nedeniyle 60 yaş üstü bireylerden elde edilen pulpa örneklerinden kök hücre eldesi bu çalışmada pilot çalışma olarak düzenlenmiştir. Bu amaçla yaşlı hastalardan elde edilen sağlıklı ve geri dönüşümlü pulpitisli pulpalardan birer örnekle ön çalışma yapılmıştır.

3.1.2. Çalışma Grupları

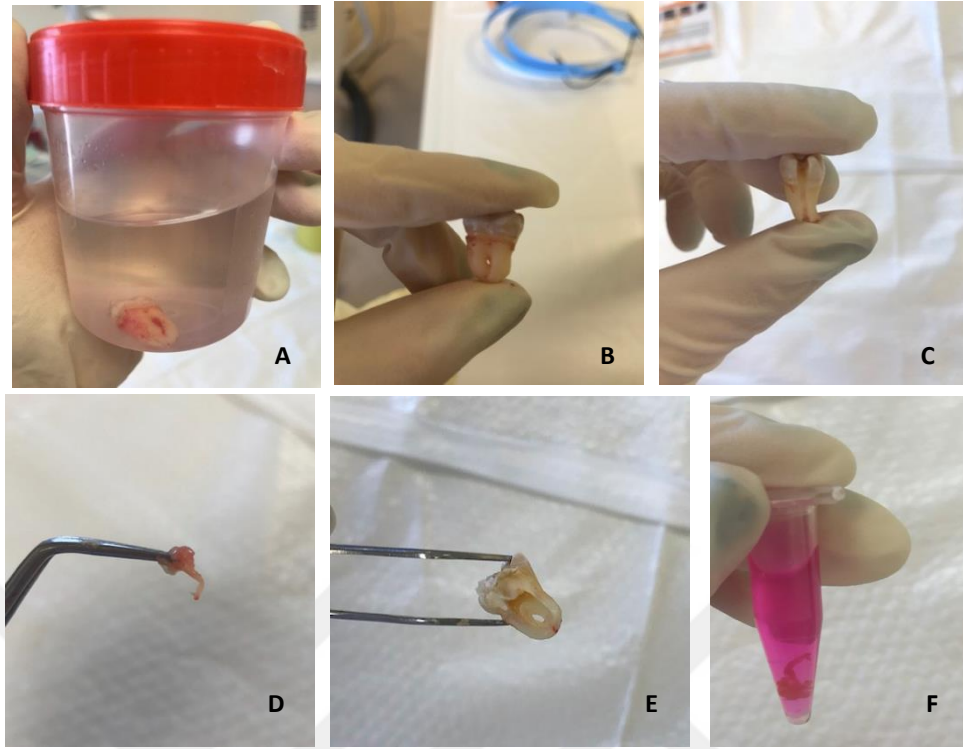
Hücre Kültürü İçin Kullanılan Gruplar

- 1.Grup: Genç sağlıklı pulpa (GSP) grubu (n=2)
- 2.Grup: Genç reversibl pulpitisli pulpa (GRP) grubu (n=2)
- 3.Grup: Genç irreversibl pulpitisli pulpa (GİP) grubu (n=2)
- 4.Grup: Yaşlı sağlıklı pulpa (YSP) grubu (n=1)

5.Grup: Yaşlı reversibl pulpitisli (YRP) pulpa grubu (n=1)

3.2. Sağlıklı ve İnflame Dişlerden Doku Temini

Sağlıklı pulpalar için Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Cerrahi Bölümü'nde çekilmiş olan gömük yirmi yaş dişleri hastalardan ve gerekli durumlarda hastaların ebeveynlerinden yazılı onam alındıktan sonra pulpa izolasyonu için kullanıldı. Dişler salin içerisinde Hacettepe Üniversitesi Endodonti Bölümü'ne getirildi. Dişler %70 etil alkol ile silinip, salinle temizlendikten ve tüm periodontal artıklar uzaklaştırıldıktan sonra steril bir fissür frez ile dikey olarak tüm dişin etrafından dolaşılacak şekilde oluklar hazırlandı. Pulpaya yeterli yakınlık sağlandıktan sonra frez ile açılan kısma steril elevatör yerleştirildi ve steril davye ile elevatöre vurarak dişin ikiye ayrılması sağlandı. İkiye ayrılan dişten pulpa dokusu ekskavatör yardımı ile çıkarılıp streptomisin ve penisilin içeren DMEM taşıma besiyeri bulunduran steril mikrotüplere yerleştirildi (Şekil 3.1).

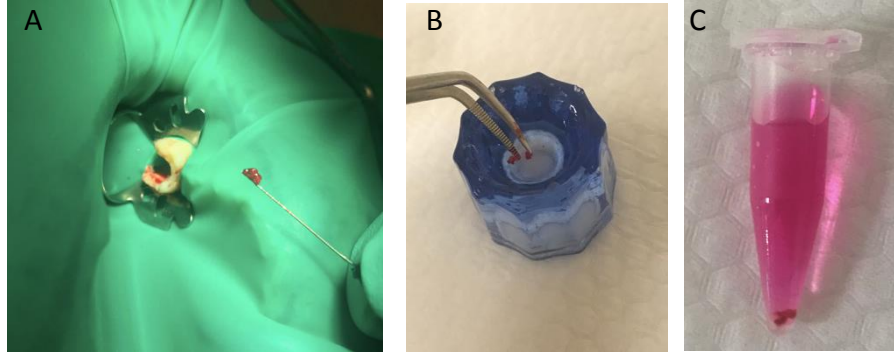


Şekil 3.1. A) Hacettepe Üniversitesi Cerrahi Bölümü'nde çekilen dişlerin Hacettepe Üniversitesi Endodonti bölümüne salın içerisinde taşınması B) Taşınan diş örneği C) Çekilen dişin ikiye ayrılması için fissür frez ile çevresel olarak prepare edilmesi D) Çekilen diştten çıkarılmış olan pulpa örneği E) ikiye ayrılmış olan diş F) Steril mikrotüpe yerleştirilmiş olan pulpa

Mikrotüpler alkolle dezenfekte edilip Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Bölümü'ne en kısa zamanda ulaştırıldı.

Kliniğimize gelen hastalara vitalite testleri uygulandıktan, detaylı anamnez alınıp onam formu imzalatıldıktan sonra; geri dönüşümsüz pulpitis tanısı olup protetik amaçlı ya da geniş ekspoz alanları sebebi ile kök kanal tedavisi yapılmasına karar verilen dişlerden alınan pulpa dokuları ile geri dönüşümsüz pulpitis tanısı olan hastalarda ise direk uzaklaştırılan pulpa dokuları çalışmamızda kullanıldı. Anamnez ve teşhis aşamalarından sonra hastalara gerekli anestezi uygulanıp ardından rubberdam uygulandı. Giriş kavitesi oluşturulup tirnerf ve ekskavatör yardımıyla pulpa dokuları diştten uzaklaştırıldı. Uzaklaştırılan pulpa dokuları antibiyotik ile yıkandıktan sonra %10 antibiyotik (penisilin-streptomisin) içeren DMEM içeren taşıma besiyeri bulunduran steril eppendorf tüplerine yerleştirilip eppendorf tüplerinin dışı alkolle

dezenfekte edildikten sonra Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı'na teslim edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. A) Geri dönüşümlü pulpitisli dişten elde edilen pulpa dokusu B) Geri dönüşümlü pulpitis dokusundan elde edilmiş pulpanın antibiyotik solüsyonu ile yıkanması işlemi C) Geri dönüşümlü pulpitisli dişten elde edilmiş pulpanın Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı'na teslim edilmek üzere besiyeri içeren eppendorf tüpüne yerleştirilmiş görüntüsü.

3.3. İzole Edilen Pulpa Dokularının Kültüre Edilmesi

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Bölümü'e götürülen eppendorf tüplerindeki pulpa örneklerinin taşıma besiyeri akış kabini (Metisafe, Ankara, Türkiye) içerisinde pipet ile uzaklaştırıldı. Daha sonra 5dk 1200rpm'de santrifüj edildi (#NF 800R, Nüve NF, TR) (Şekil 3.3).



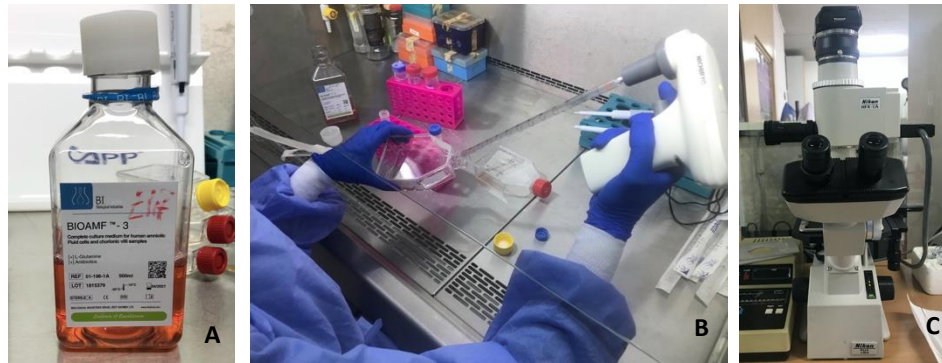
Şekil 3.3. Pulpa dokularının santrifüj edilmesi için kullanılan santrifüj cihazı (#NF 800R, Nüve NF, TR)

Santrifüj edilen eppendorf tüplerinde dibе çöken pulpa dokusu üst kısımda kalan süpernatanttan ayrılıp 2-3 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)

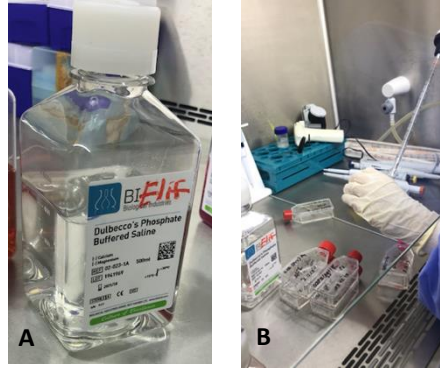
(Biological Industries, İsrail) ile yıkandıktan sonra pulpalar steril bistüriler ile küçük parçalara ayrıldı. Önceden kültür flasklarına (sarstedt Inc T25 FLASK CN VENT CAP/CS300) besiyeri (#01-196-1A, BIOAMF™-3 Complete Medium, BI, ABD) ile oluşturulan yolaklar üzerine doku parçaları yerleştirildi. Doku parçalarının tutunması için yaklaşık 30 dk beklendikten sonra kültür flasklarına besiyeri eklendi. Hücre kültürüne uygun koşullarda 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde (Şekil 3.4) takip edilen eksplant kültürler doku parçacıkları flask tabanına tutunduktan sonra her 3 günde bir beslendi. Doku eksplantlarından hücre atımı, faz kontrast mikroskop (Nikon HFX-IIA, Japonya) ile kontrol edildi (Şekil 3.5). Doku eksplantlarından hücre eldesi yaklaşık 6 hafta içerisinde gerçekleşti. Hücre yoğunluğu yaklaşık %70-80 konfluensiye ulaştığı tespit edilen örnekler pasajlamaya hazır olarak kabul edildi. Pasajlama işlemi için öncelikle besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve hücreler DPBS ile yıkandı (Şekil 3.6). Sonra Trypsin ve Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Trypsin EDTA Solution A, Biological Industries, İsrail) içeren solüsyon ile 37°C'de %5 CO₂ inkübatör ortamında 5 dakika boyunca bekletildi (Şekil 3.7). Mikroskop altında incelenip, flask tabanından kalktığı onaylanan hücrelere sonra Trypsin EDTA solüsyonunun nötrlenmesi için besiyeri eklendi. Ardından hücreler 5 dk 1200 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant uzaklaştırılıp hücreler yeni besiyeri ile hazırlanmış olan kültür kaplarına aktarıldı. Böylece 0. Pasajdan (P0), 1. Pasaja geçen hücrelere ait kültür kaplarına grup ismi, pasaj numarası ve tarih not edildi.



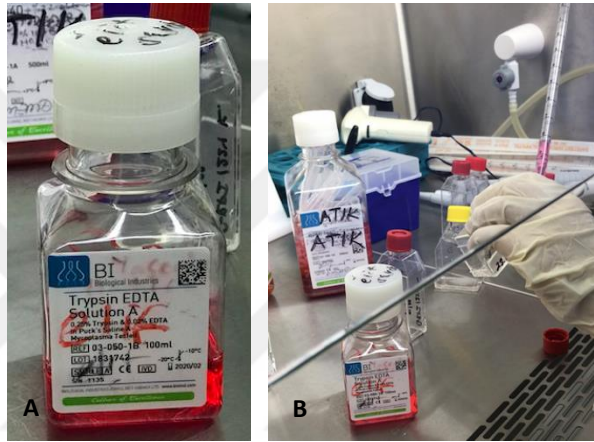
Şekil 3.4. A) Hücrelerin saklandıkları kültür flaskları (T 25 flask, İsviçre) B) inkübatörde (Heraeus HERA cell, Türkiye) saklanma ortamları C) VE D) Kültür flasklarının saklandıkları inkübatör (Heraeus HERA cell, Türkiye)



Şekil 3.5. A) Hücrelerin kültür aşaması ve beslenmesi için kullanılan BIOAMF™-3 (Biological, Inc., Kibbutz Beit Haemek, İsrail) B) Besiyeri ve hücrelerin beslenmesi aşaması C) Hücre kültür kaplarının incelenmesi için kullanılan mikroskop (Nikon HFX-IIA, Japonya) ve hücre kültür kaplarının mikroskopta incelenmesi işlemi.



Şekil 3.6.A) Pasajlama, dondurma ve sayım öncesinde hücreleri yıkamak için kullanılan DPBS (Biological Industries, İsrail) ve B) Bu solüsyonun hücre kültür kaplarına uygulanması.

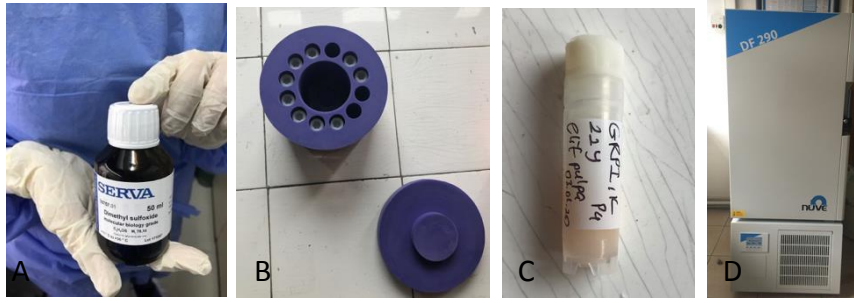


Şekil 3.7. A)Hücrelerin kültür kaplarından (T 25 flask, İsviçre) kaldırılması için kullanılan solüsyon (Trypsin EDTA Solution A, Biological Industries, İsrail) B)kültür kaplarına bu solüsyonun hücreleri kaldırmak için uygulanması

3. pasaja ya da 4.pasaja gelen hücreler deneylerde kullanılmıştır ve geriye kalanlar donduruldu.

3.4. Hücrelerin Bir Sonraki Deneyler İçin Dondurulması

Hücreler daha önceden belirtilmiş olan yöntemlerle hücre kültür kaplarından izole edildi. Elde edilen hücre pelleti üzerine (5:4:1) uygun oranda besiyeri: fetal bovine serum: kriyoprotektif ajan (BIOAMF-3:FBS (FBS, PAN Biotech, Almanya) Dimetil sülfoksit (DMSO, SERVA, Almanya)) eklenerek -80oC'de (DF 290, nüve, Türkiye) yavaş olarak donduruldu (Şekil 3.8).



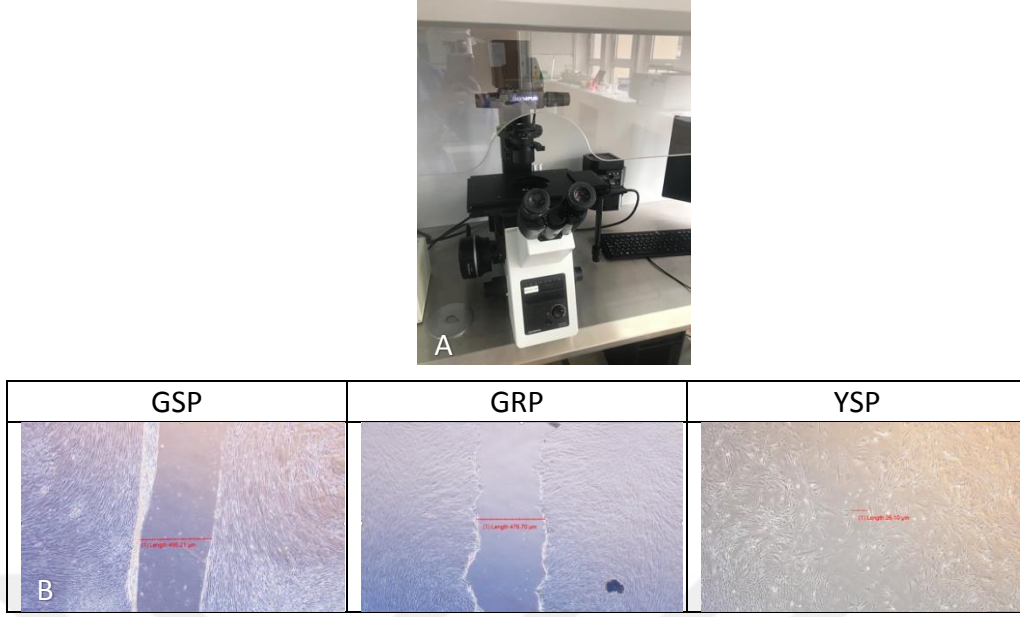
Şekil 3.8. A) Dimethyl sulfoxide (SERVA, Heidelberg, Almanya) B)Kriyoprezervasyon tüplerinin yerleştirildikleri... C) dondurulmuş pulpa içeren kriyoprezervasyon tüpü D) Dondurma tankı (DF 290, nüve, Türkiye)

3.5. Lateral Proliferasyon Deneyi

Mezenkimal kök hücrelerin lateral migrasyon kapasitesinin belirlenmesi için yara iyileşmesi deneyi yapıldı. Bu amaçla 3. Veya 4. Pasaja gelmiş olan hücreler 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına (#NC0506, Starstedt, ABD) (Şekil 3.9) ekildi. Kültür kaplarındaki hücrelerin besiyeri 2-3 günde bir değiştirildi. Mikroskop incelemesi ile konfluense ulaştıkları tespit edilen hücreler deney için hazır kabul edildi. Bu hücre kültürlerine bir pipet yardımı ile yara bölgeleri oluşturuldu. Oluşturulan yara bölgeleri 0.,6.,24. Ve 48. Saatlerde mikroskop (Olympos, Japonya) altında incelendi ve fotoğraflandı. Fotoğrafların üstünde yara bölgesi mesafesi 0., 6.,24. Ve 48. Saatlerde ölçüldü (Şekil 3.10).



Şekil 3.9. Hücrelerin lateral migrasyon kapasitelerini incelemek için ekildikleri 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarının görüntüsü.



Şekil 3.10. A) Lateral migrasyon incelemek için kullanılan mikroskop B) Lateral migrasyon izlemek için GSP, GRP ve YSP örneklerinde oluşturulan yara yüzeleri

3.6. İmmünofloresan Yöntemi ile Mezenkimal Belirteçlerinin İşaretlenmesi

Hücre kültüründe 3-4. Pasaja gelmiş olan hücreler kuyucuklu lamlara (#30108, SPL, GüneyKore) (Şekil 3.11) ekilip konfluense ulaşmaları beklendi. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra DPBS ile hücre yıkaması yapıldı. Sonrasında Aseton (ice cold) ile 4°C’de 5 dakika boyunca fiksasyon ve permeabilizasyon yapıldı. Aseton ortamdan uzaklaştırıldı ve 10 dakika hava ile kurutuldu. Kuyucuklu lamlar, daha sonra immünofloresan işaretleme optimizasyonu yapılmaya kadar etrafı sarılı şekilde -20°C’de muhafaza edildi. İmmünofloresan işaretleme yapılmadan 30 dakika önce oda ısısında kurutulan lamlar PBS ile iki kere 5’er dk yıkandı. Spesifik olmayan bölgelerin hücrelerle boyanmasını bloke etmek Normal Serum Block (BioLegend, Amerika Birleşik Devletleri) ile 1 saat boyunca oda ısısında hücreler muamele edildi (Şekil 3.12). Daha sonra blokaj solüsyonu uzaklaştırılan hücrelere primer antikolar blokaj solüsyonunda dilüe edilerek damlatıldı (Tablo 3.1) (Şekil 3.13). Primer antikolar ile gece boyunca 40°C’de inkübe edilen hücreler PBS ile 3x5 dk yıkandı. Sekonder antikoları da blokaj solüsyonunda dilüe ederek 1 saat boyunca karanlıkta inkübe edildi. PBS ile 3x5 dk yıkanan lamlara, çekirdek işaretleyici olan 4’,6 diamidino-2-

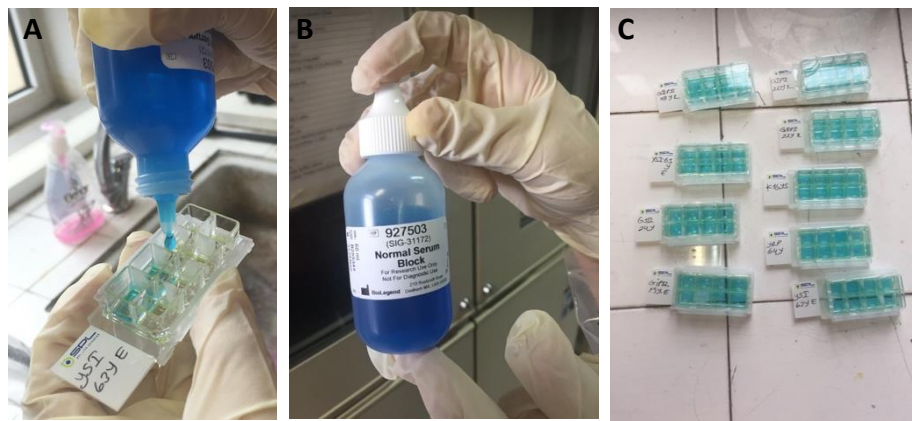
fenilindol (DAPI) uygulandı. Yıkanan lamalara floresan ile uyumlu kapama mediumu damlatıldı ve lameller ile kapatıldı. Hücrelerin belirteçler ile işaretlenmesi (Leica, DM6B, Almanya) floresan mikroskopla incelendi. Hücrelere ait mikrograflar, x400 büyütmede elde edildi.

Tablo 3.1. Mezenkimal kök hücre özgüllüğü belirlemek için kullanılan antikorlar.

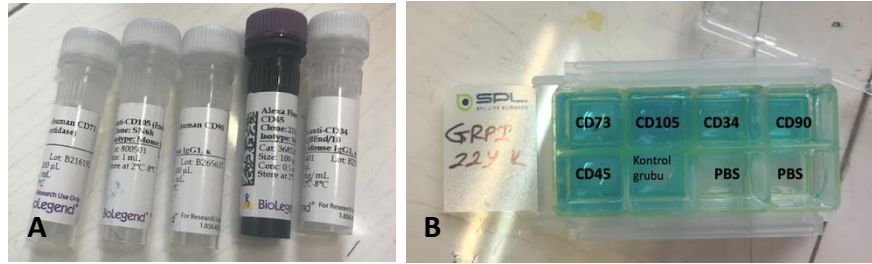
Kullanılan Antikorlar	Miktar
Purified anti-human CD73 (Biolegend, ABD)	10ug/mL
Purified anti-human CD90 (Biolegend, ABD)	10 ug/mL
Purified anti-CD73 (Biolegend, ABD)	1/40
Purified anti-CD34 Antibody (Biolegend, ABD)	1/1000
Alexa Flour® 594 anti-human CD45 Antibody	5 ug/mL



Şekil 3.11. İmmünohistokimyasal inceleme için kullanılan kuyucuklu lamalar



Şekil 3.12. A) Normal Serum Blok ile yapılan bloklama işlemi B) Kullanılan Normal Serum Block ajanı, C) Normal Serum Block Uygulanmış olan kuyucuklu lamalar



Şekil 3.13. A) İmmüno Floresan boyama için kullanılan anttbodyler B) Atibody eklenen kuyucuklu lamlar

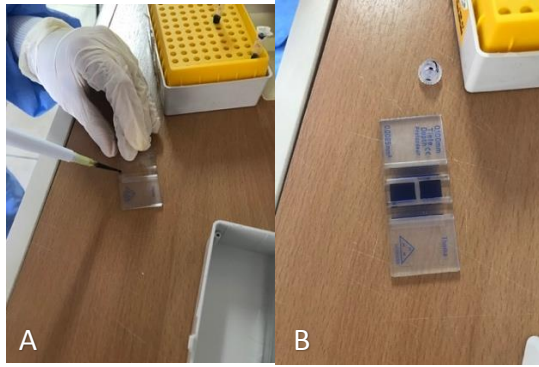
3.7. Akış Sitometrisi (Flow Sitometri) ile Mezenkimal Belirteçlerin İşaretlenmesi

Akış sitometrisi yöntemi ile mezenkimal belirteçlerin işaretlenmesi için elde edilen 3. Ya da 4.pasaja gelmiş olan hücreler daha önce belirtilen yöntemlerle hücre kaplarından izole edildi. Daha sonra santrifüjlenip PBS solüsyonu içeren tüplere taşınıp pipetaj işlemi yapıldı. Bu işlemden sonra 5 ml DPBS ile sulandırılan tüplerden 100µl örnek alınarak mikrotüpe aktarıldı. Canlı hücre sayısı tayini için üzerine 100µl de Tripan mavisini eklendi. Thoma lamı (#409026078, Thoma, Marienfeld Superior, İngiltere) (Şekil 3.14) üzerine yayılan hücrelerin sayımı (3.1. ve 3.2.) formüllerine göre büyük kareye denk gelen boya almamış canlı hücreler tespit edildi. Toplam sayılan hücre sayısı; dilüsyon oranları ve total volüm dikkate alınarak 5 ml’de kaç hücre olduğu belirlendi.

Sayılan örneklerdeki toplam hücre miktarı aşağıda belirtilen formüle göre belirlenmiştir:

$$\text{Hücre /ml} = \text{bir kare başına düşen ortalama sayı} \times 10^4 \quad (3.1)$$

$$\text{Toplam hücreler} = \text{hücre/ml} \times \text{seyreltme faktörü} \times \text{örneğin alındığı hücre çözeltisinin toplam hacmi} \quad (3.2)$$



Şekil 3.14. A) Hücre sayım işlemi için Triphan Blue ve hücre içeren solüsyonun Thoma lamına aktarılması ve B) Solüsyonun lamdaki görüntüsü



Şekil 3.15. Akış sitometrisi analizi için götürülen tüp

Sayımı tamamlanmış olan tüplerdeki hücreler akış sitometrisi analiz yapılması üzere en kısa sürede Ankara Üniversitesi İbni Sina Hastahanesi Merkez Laboratuvarı Hematoloji Bölümü'ne götürüldü (Şekil 3.15).

Akış sitometri analizi için getirilen tüpler ilk olarak 300 rpm'de 10 dk (Şekil 3.16) santrifüjlendi (Eppendorf Centrifuge 5810, Hamburg, Almanya). Santrifüj sonrasında üstte kalan fosfat ile tamponlanmış salin (phosphate buffered saline, PBS) uzaklaştırıldı ve tüplere 300µl RPMI-1640 (ATCC, ABD) eklenerek ve ardından nazikçe vortekslendi.

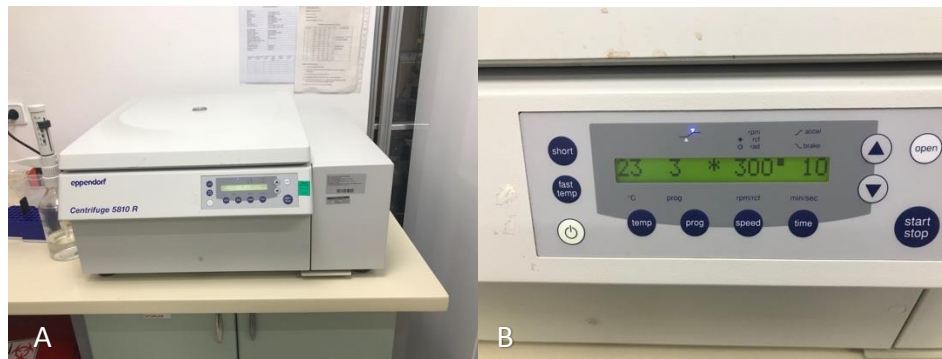
Çalışmada kullanılan tüplerin üzerine grup ismi, kurulacak panel ve kullanılacak antikorlar yazıldı. Antikorlar çalışma tüpünün en alt kısmına gelecek şekilde yerleştirilip dağıtıldı. Antikor ve 100µl örnek eklenmiş çalışma tüpleri 15 dakika karanlıkta bekletildi. Çalışma tüpleri 1070 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Tüpler tek hamlede ters döndürülerek süpernatant atıldı. Çalışma tüplerine 1500µl Sheath fluid eklendi. Çalışma tüpleri 1070 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Tüpler tek hamlede ters çevrilip süpernatant atıldı. Çalışma tüplerine 1500µl Sheath fluid

(LeincoTechnologies Inc., ABD) ilave edildi. Akış sitometrisi cihazına ait dairesel tüp taşıma tablasına örnekler okumak üzere dizildi (Şekil 3.17) . Veri toplama işlemi en geç 4 saat içinde tamamlandı.

Çalışmamızda kullanılan pozitif belirteç antikoları; CD 29 (Beckman Coulter, Ref:IM0791U), CD73 (Beckman Coulter, Lot:200018, ABD), CD90 (Beckman Coulter, Lot:200038, ABD), CD105 (Beckman Coulter, Lot: 200026, ABD) iken negatif belirteç antikolar olarak; CD31 (Beckman Coulter, Ref: B13035, ABD), CD34 (Beckman Coulter, Ref IM2473, ABD), Anti-HLA-DR-ECD (Beckman Coulter, Ref: IM3636) ve LIN (CD11b, CD16, CD45, CD66b ve CD19 karışımı) kullanıldı (Şekil 3.18).

Tablo 3.2. Akış sitometrisi için kullanılan antikolar.



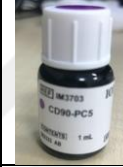



Kullan Antikor	Kullanılan Antikorum Rengi	100 µl için kullanılan miktar
CD73	PE	5µl
DR	ECD	3µl
CD90	PC5.5	1µl
CD105	PC7	5µl
CD34	APC	1µl
CD29	FİTCH	5µl
LIN (CD11b, CD16, CD45, CD66b, CD19)	A750	1µl
CD31	PB	1µl



Şekil 3.16. A) Akış stometreye götürülen örneklerin santrifüj edildiği santrifüj cihazı(eppendorf Centrifuge 5810, Hamburg, Almanya)ve B) santrifüj ayarı



Şekil 3.17. Akış sitometri analizi yapılan akış sitometri cihazı (BECKMAN COULTER, NAVIOS FLOW CYTOMETER, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri)

Pozitif Belirteç Antikorları			Negatif Belirteç Antikoarları		
					
CD29	CD105	CD90	CD31	CD34	DR

Şekil 3.18. Akış sitometrisi analizi için kullanılan antikorlar

Elde edilen verilerin analiz edilmesi için yazılım olarak Kaluza (Beckman Coulter, ABD) kullanıldı.

4. BULGULAR

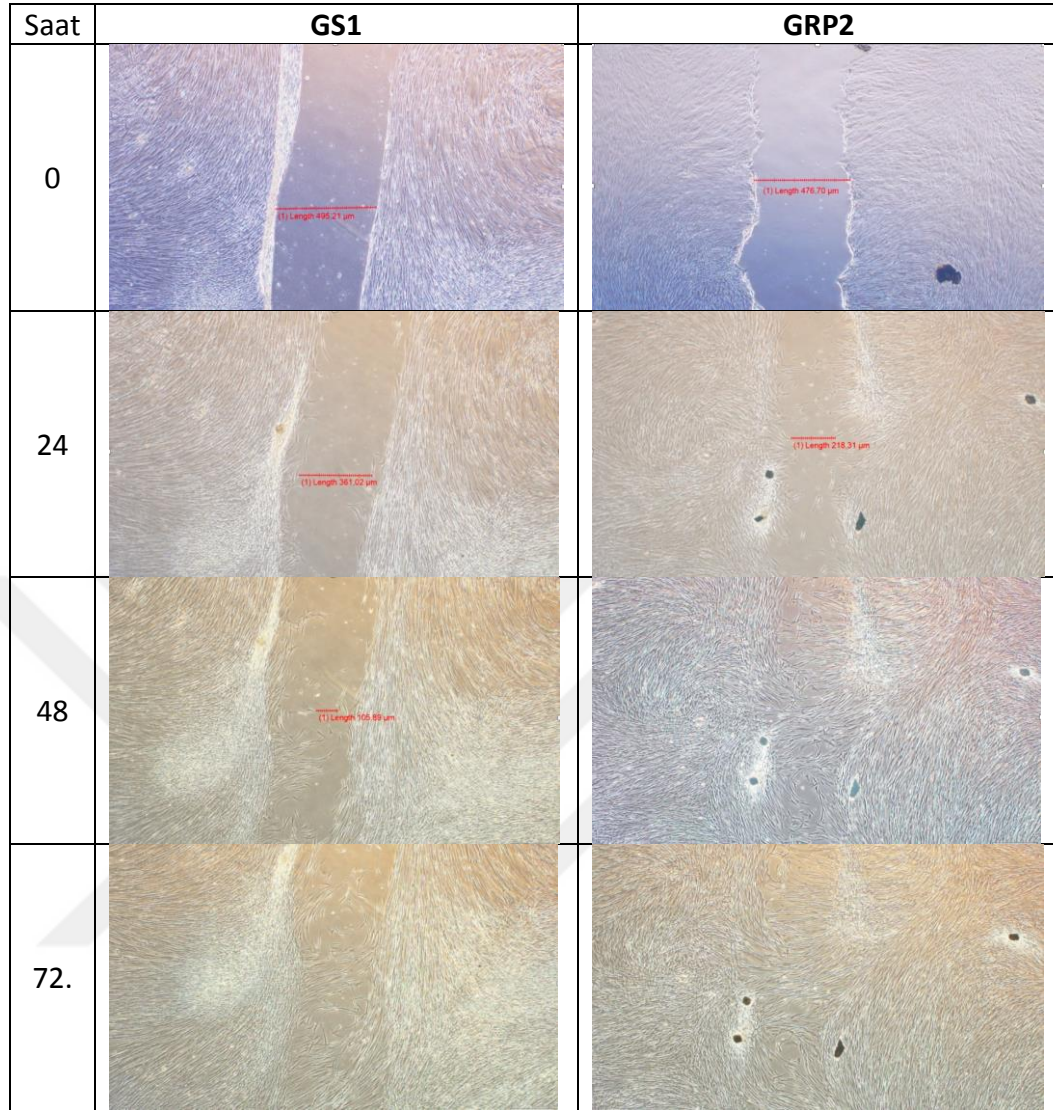
4.1. Lateral proliferasyon sonuçları

Bu çalışmada genç sağlıklı, geri dönüşümlü pulpitisli ve geri dönüşümsüz pulpitisli pulparlarla yaşlı sağlıklı ve yaşlı geri dönüşümlü pulpitisli hastaların pulparlarından elde edilen kök hücrelerin proliferasyon kabiliyetleri ve kök hücre özgüllüğü incelendi. Örnek sayılarının azlığından dolayı lateral proliferasyon ve akış sitometre sonuçlarında istatistiksel inceleme yapılmadı.

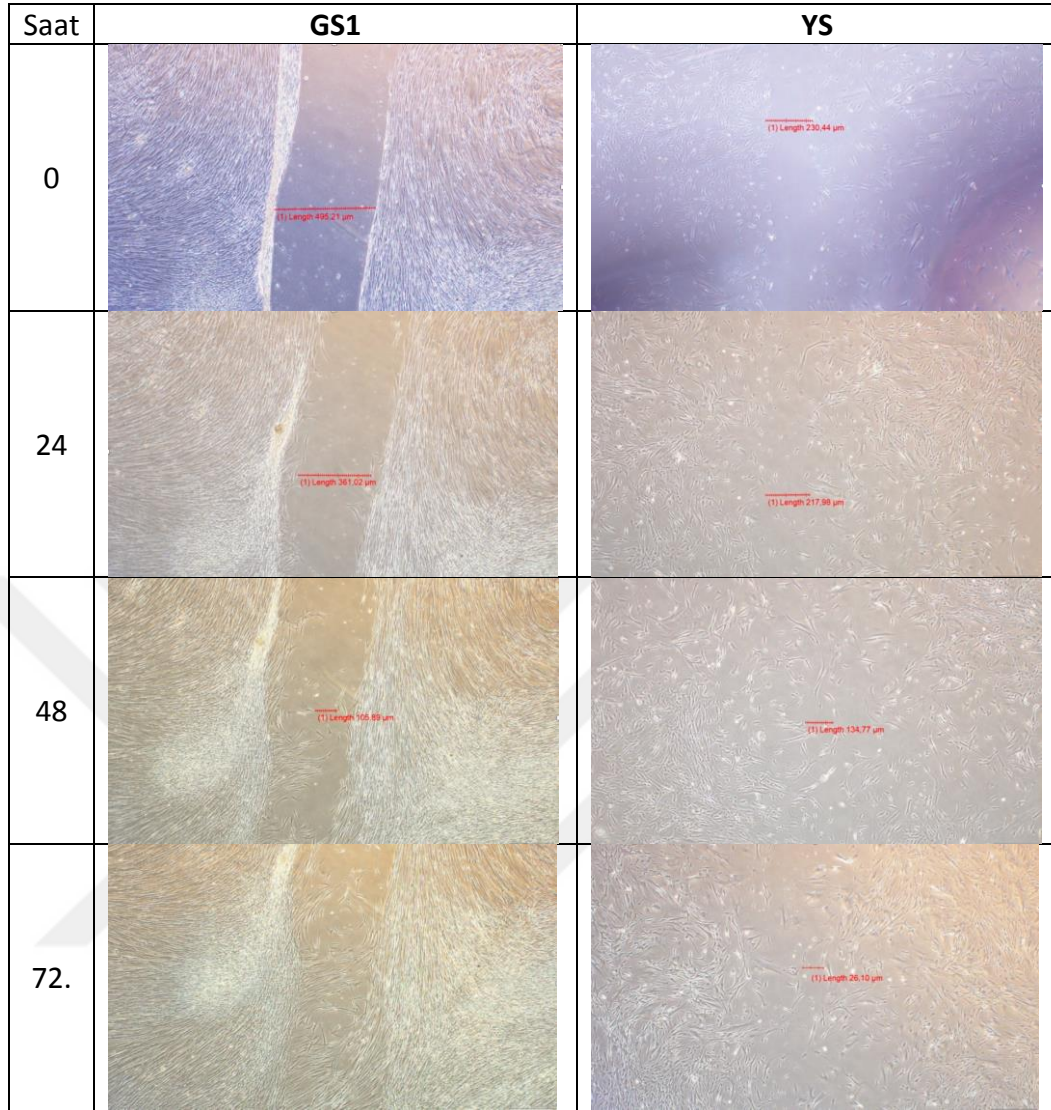
Genç sağlıklı, genç geri dönüşümlü pulpitis ve yaşlı sağlıklı diş pulpa kök hücrelerinden 1'er örnek proliferasyon kabiliyetleri açısından 0., 24., 48. ve 72. saat dilimlerinde 3 günlük süre ile gözlemlendi.

Genç geri dönüşümlü pulpitisli kök hücrelerin proliferasyon potansiyeli incelendiğinde genç sağlıklı pulpa kök hücrelerine göre daha hızlı iyileşme göstererek 48. Saatte yara yüzeyinin tamamen yeni hücrelerle kaplandığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.1)(Şekil 4.3).

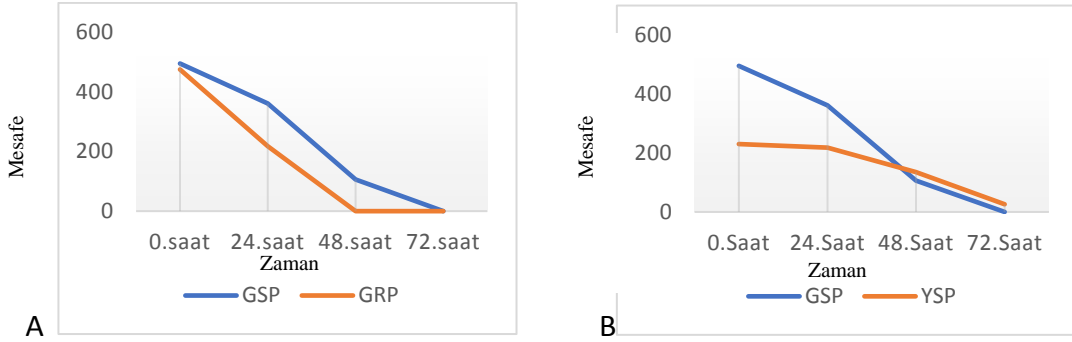
Genç sağlıklı pulpa kök hücrelerinin 72. Saatte tam olarak proliferasyon olarak yara bölgesini doldurduğu gözlemlendi. Yaşlı sağlıklı pulpadan elde edilen kök hücreler genç sağlıklı pulpadan elde edilenlere göre daha yavaş proliferasyon olsa da oluşturulan boşluğu 72. Saat sonunda lateral yönde proliferasyon olarak başarıyla kapatmışlardır (Şekil 4.2)(Şekil 4.3). Yaşlı sağlıklı hücrelerin daha düşük konfluans gösterdiği gözlemlenmiştir .



Şekil 4.1. GS1 ve GS3 gruplarının yara iyileşmesi görüntüleri.



Şekil 4.2. GS1 ve YS gruplarının yara iyileşmesi görüntüleri.



Şekil 4.3. A) GSP ile GRP gruplarının yara iyileşme mesafesinin zamana göre karşılaştırıldığı grafik B) GSP ile YSP gruplarının yara iyileşme mesafesinin zamana göre karşılaştırıldığı grafik

4.2. İmmünfloresan İşaretleme Sonuçları

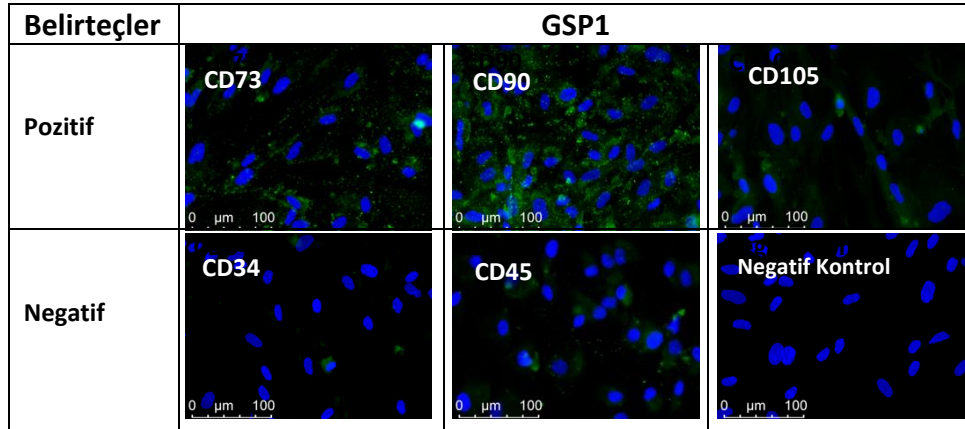
Bu çalışmada immünofloresan boyamada CD73, CD90 ve CD 105 dental pulpa mezenkimal kök hücre pozitif yüzey belirteci olarak kullanıldı. CD34 ve CD45 ise negatif yüzey belirteci olarak kullanıldı. Sonuçlar incelendiğinde, tüm örneklerde dental pulpa hücre çekirdeklerinin DAPI boyasıyla yoğun bir şekilde boyandığı ve hücre stoplazmalarında pozitif mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri olarak CD73, CD90 ve CD105 antikorlarının farklı yoğunlukta olduğu gözlemlendi. Genç sağlıklı pulpa kök hücreleri incelendiğinde, 1. Örnekte özellikle CD90 yüzey belirtecinin çok yoğun olarak boyandığı gözlenirken CD105 antikorunun ise yaygın boyandığı gözlemlendi (Şekil 4.4). CD73 ise CD90 dan daha az yoğunlukta boyandığı gözlemlendi. 2. Örnekte ise CD90 ve CD105'in yaygın şekilde boyama oluşturduğu, CD73 ise daha az yoğunlukta olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5). Diğer taraftan negatif yüzey belirteçlerinin hiç birinde belirgin bir boyama gözlenmedi.

Genç geri dönüşümlü pulpitisli pulpa örnekleri incelendiğinde, tüm pozitif yüzey belirteçlerinin her iki örnekte yoğun bir şekilde boyandığı gözlenirken CD73'ün her iki örnekte de yoğunluğunun diğer 2 antikora göre daha fazla olduğu saptandı. Negatif yüzey belirteçlerini gösteren CD34 ve CD45 ise herhangi bir boyama gözlenmedi (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).

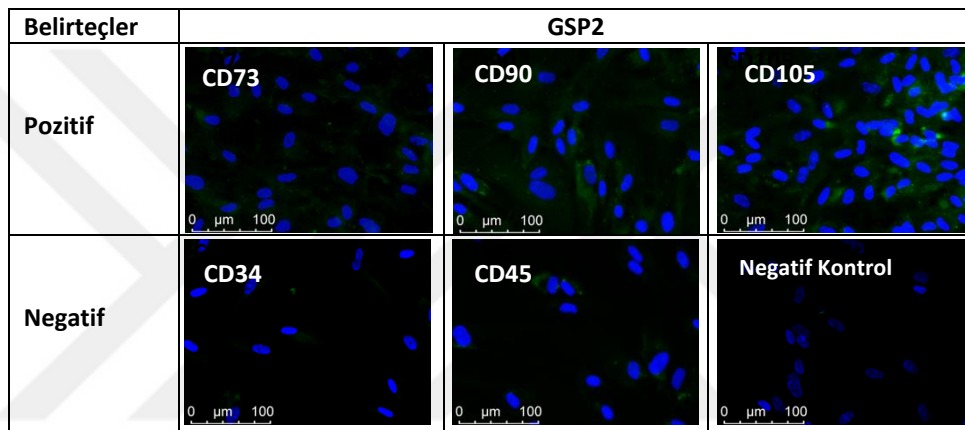
Genç geri dönüşümsüz pulpa örneği incelendiğinde ise, CD73, CD90 ve CD105 antikorlarının yoğun bir şekilde eksprese olduğu, ikinci örnekte CD73 antikorunun daha hafif düzeyde eksprese olduğu gözlenmişti. Negatif yüzey belirteçlerinin her iki örnekte de eksprese olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.8 ve 4.9).

Yaşlı sağlıklı pulpa örnekleri incelendiğinde CD73, CD90 ve CD105 antikorlarının çok yaygın şekilde eksprese olduğu, negatif yüzey belirteçlerinin ise herhangi bir boyamaya neden olmadığı gözlendi (Şekil 4.10).

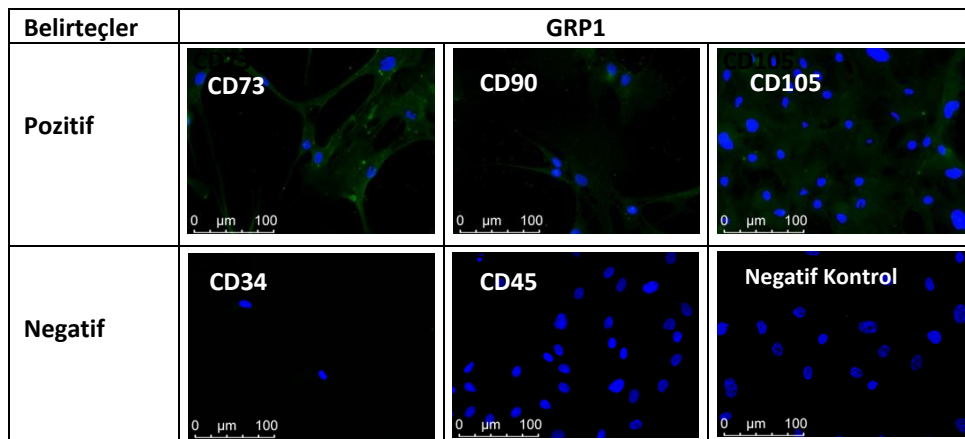
Yaşlı geri dönüşümlü pulpitis örneği incelendiğinde de özellikle CD73 ve CD105'in yoğun bir şekilde eksprese olduğu, CD90'ın ise daha az yoğunlukta eksprese olduğu, CD34 antikor boyaması gözlenmezken çok hafif düzeyde CD45 ekspresyonu gözlendi (Şekil 4.11).



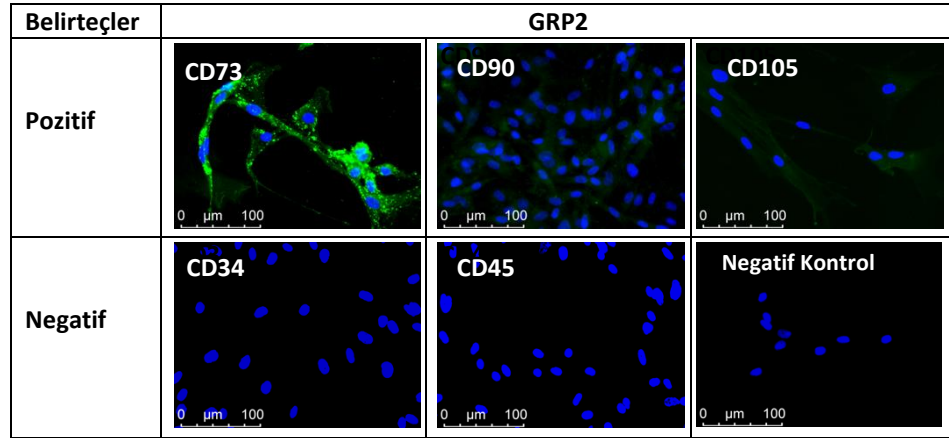
Şekil 4.4. GS1 için yapılan İF boyaması sonucunda elde edilen görüntüler



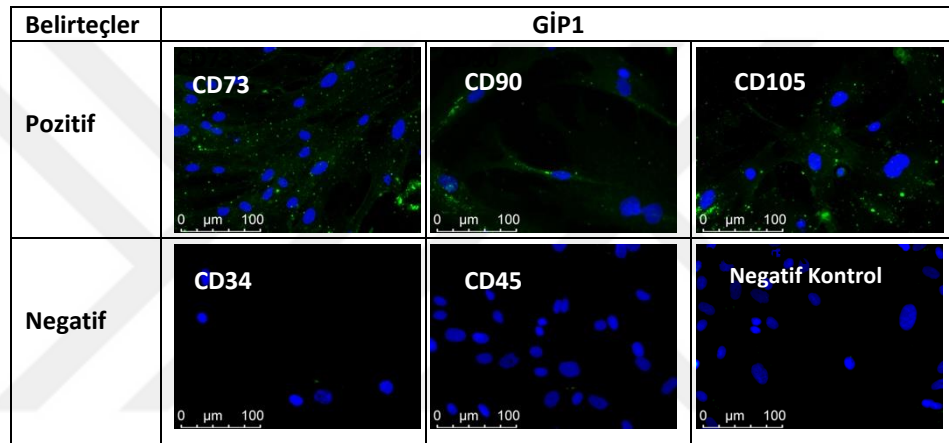
Şekil 4.5. GS2 için yapılan İF boyaması sonucunda elde edilen görüntüler



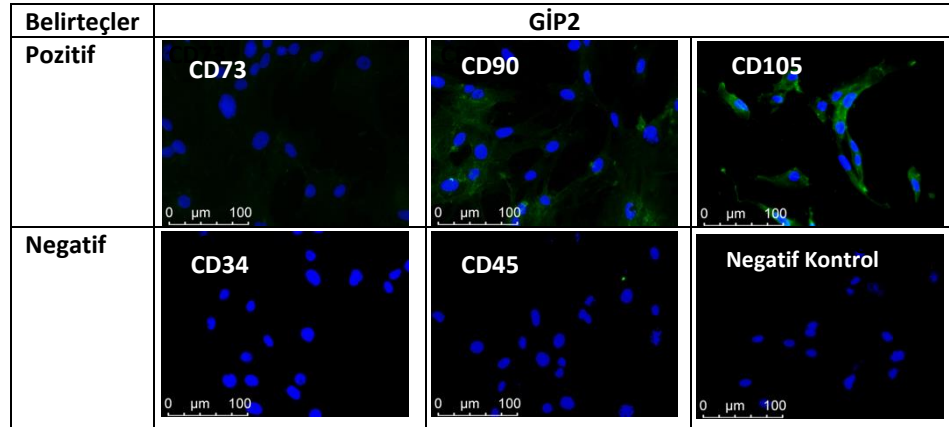
Şekil 4.6. GRP1 için yapılan İF boyaması sonucunda elde edilen görüntüler



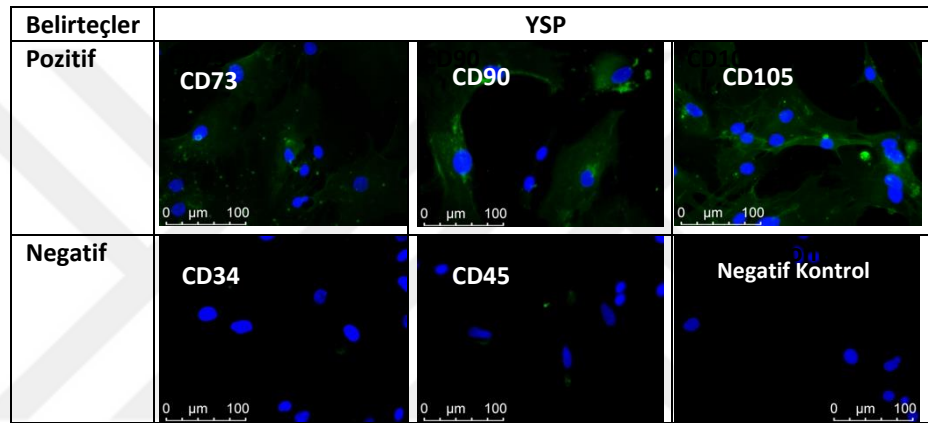
Şekil 4.7. GRP2 için yapılan İF boyaması sonucunda elde edilen görüntüler



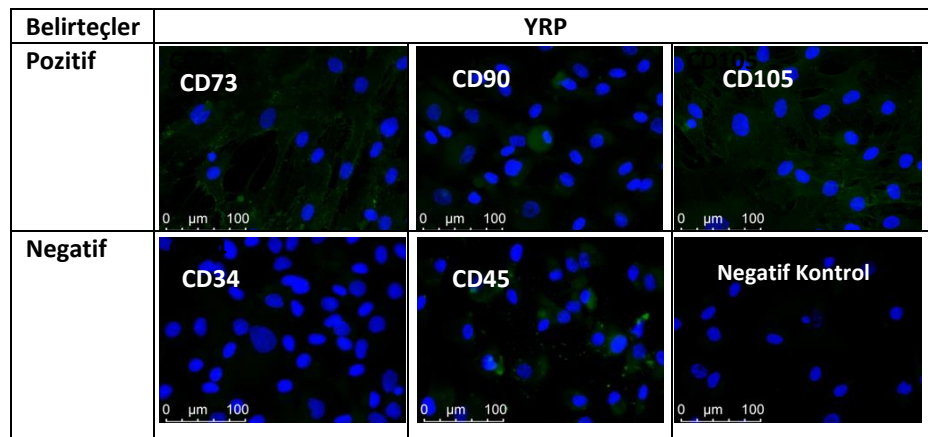
Şekil 4.8. GİP1 için yapılan İF boyaması sonucunda elde edilen görüntüler



Şekil 4.9. GİP2 için yapılan İF boyaması sonucunda elde edilen görüntüler



Şekil 4.10. YSP için yapılan İF boyaması sonucunda elde edilen görüntüler



Şekil 4.11. YRP için yapılan İF boyaması sonucunda elde edilen görüntüler

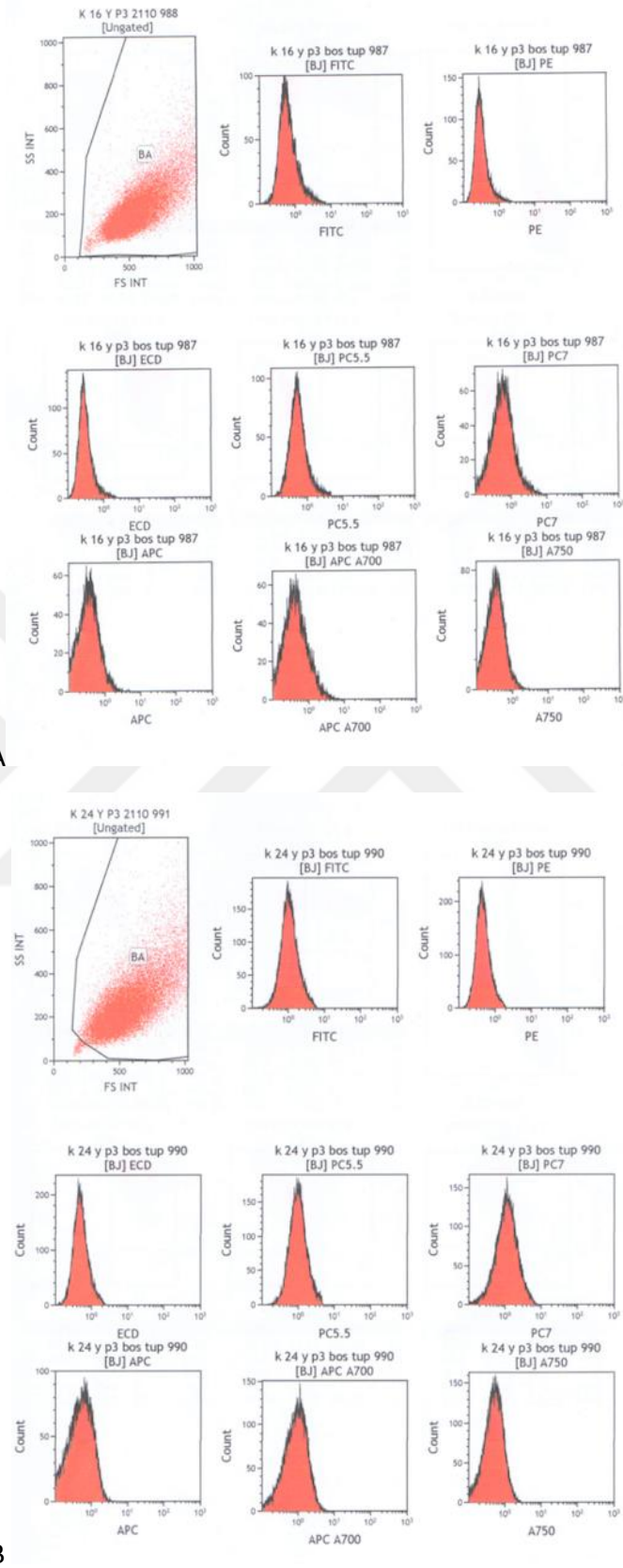
4.3. Akış Sitometrisi Analiz Sonuçları

Bu çalışmada diş pulpa mezenkimal kök hücre özgülüğü akış sitometri yöntemi ile ölçüldü. Tablo 4.1.'de kültür flasklarındaki dental pulpa kök hücre sayısı

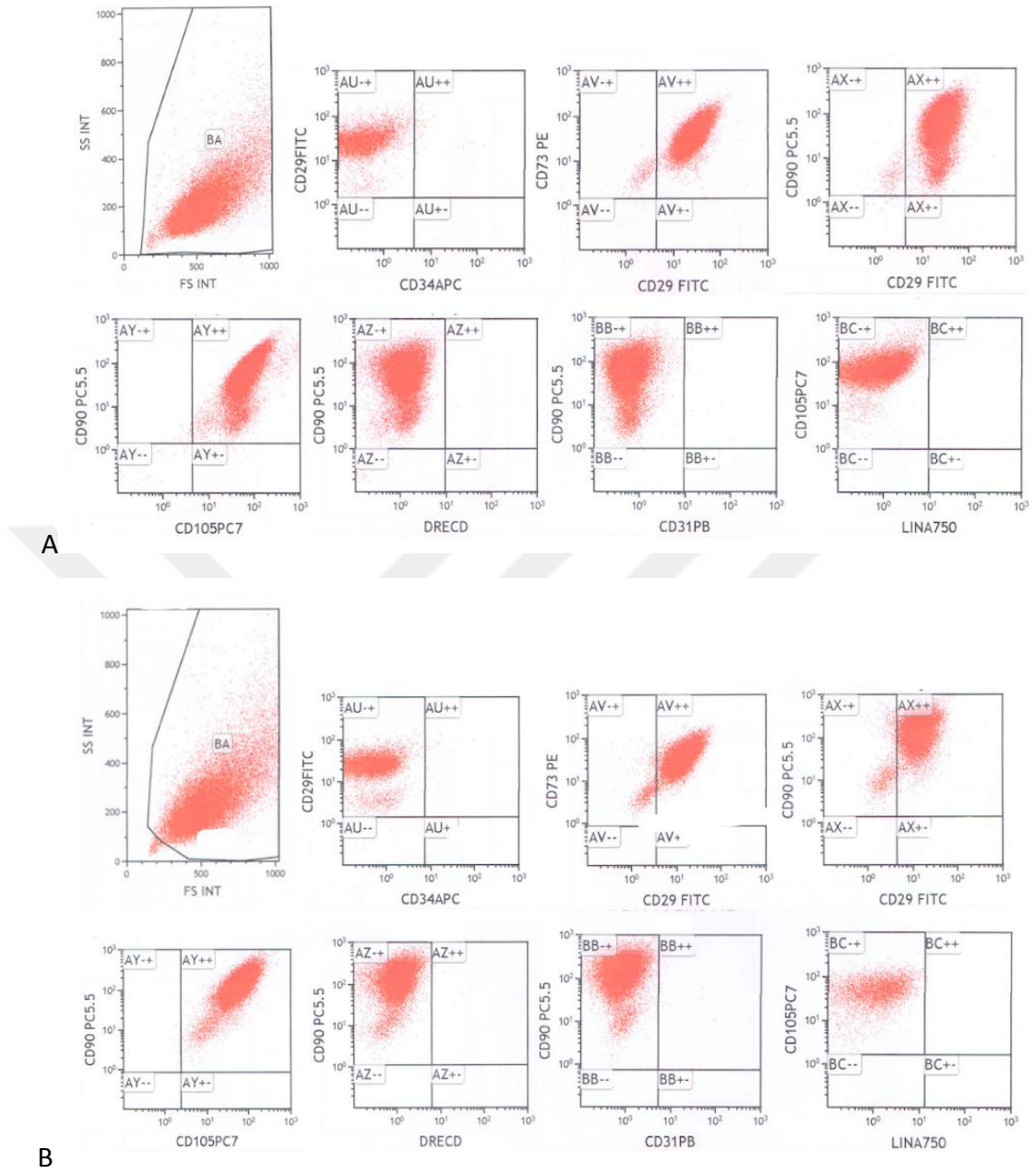
ile akış sitometri cihazında ölçülen hücre sayısının yanı sıra akış sitometride pozitif ve negatif kök hücre belirteçlerine göre dental pulpadaki kök hücre yoğunluğu yüzde olarak gösterilmiştir. Bu çalışmada mezenkimal kök hücre varlığını tespit etmek için CD 29, CD73, CD90 ve CD105 yüzey belirteçleri pozitif, CD31, CD34, DRECD ve LIN de negatif belirteçler olarak kullanılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, dental pulpalarda mezenkimal kök hücre varlığı pozitif belirteçlere göre yaklaşık % 98 ile %100 arasında idi. Negatif belirteçler incelendiğinde ise bu oranların yaklaşık %3,75 ile 0 arasında olduğu gözlemlendi. Mezenkimal kök hücre özgülüğü açısından gruplar arasında bir fark gözlemlenmedi. Yaşlı sağlıklı pulpa ve yaşlı geri dönüşümlü pulpitis örneklerinde de mezenkimal kök hücre varlığı gençler le aynı düzeyde gözlemlendi. Tüm negatif yüzey belirteçlerinin her grupta kullanılmadığı gözlemlendi. Burada elde edilen pulpa hücre sayısının etkili olduğu gözlemlendi. Düşük hücre sayısında ölçümler sağlıklı bir şekilde gerçekleştirilemedi.

Tablo 4.1. İncelenen örneklerdeki hücre sayısı ile akış sitometrisi aşamasında okunan hücre sayısı ve hücrelerde yüzde oranlarına göre antikör işaretlenmesi sonuçları.

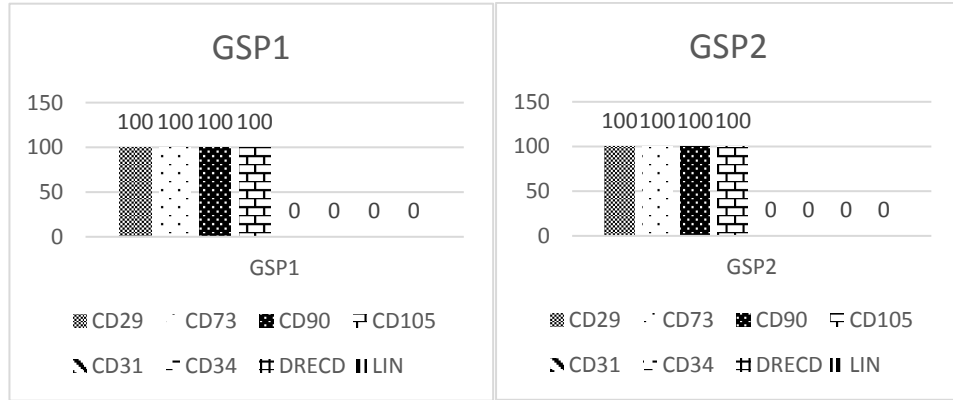
Örnek	Akış sitometrisine 100µl'deki hücre sayısı	Total Hücre Sayısı	Pozitif Belirteçler				Negatif Belirteçler			
			CD29	CD73	CD90	CD105	CD31	CD34	DRECD	LIN
GSP1	27883	2,2x10 ⁶	99.83	99.88	99.81	99.92	0.04	0.25	0.01	0.11
GSP2	26703	4x10 ⁶	99.96	99.99	100	99.99	0.16	0.11	0.10	0.10
GRP1	8014	3,5x10 ⁶	99.95	99.84	99.77	99.91	0.6	0.77	0.18	0.01
GRP2	5049	4x10 ⁵	98.84	99.92	99.84	99.76	1.42	1.67	0.2	0.52
GİP1	4892	3,5x10 ⁵	99.80	99.98	99.39	99.98	0.16	0	0.15	0
GİP2	23645	1,4x10 ⁶	99.98	99.98	99.81	99.98	0.24	0	0.17	0
YSP	865	4x10 ⁵	100	99.88	99.88	99.88	0	0	2.95	3.75
YRP	7633	3x10 ⁵	99.52	99.96	99.94	99.97	2.48	2.57	1.47	1,67



Şekil 4.12. (A) GSP1 ve (B) GSP2'ye akış sitometrisi analizi yapılmadan önce yapılan canlılık deneyi sonuçları.

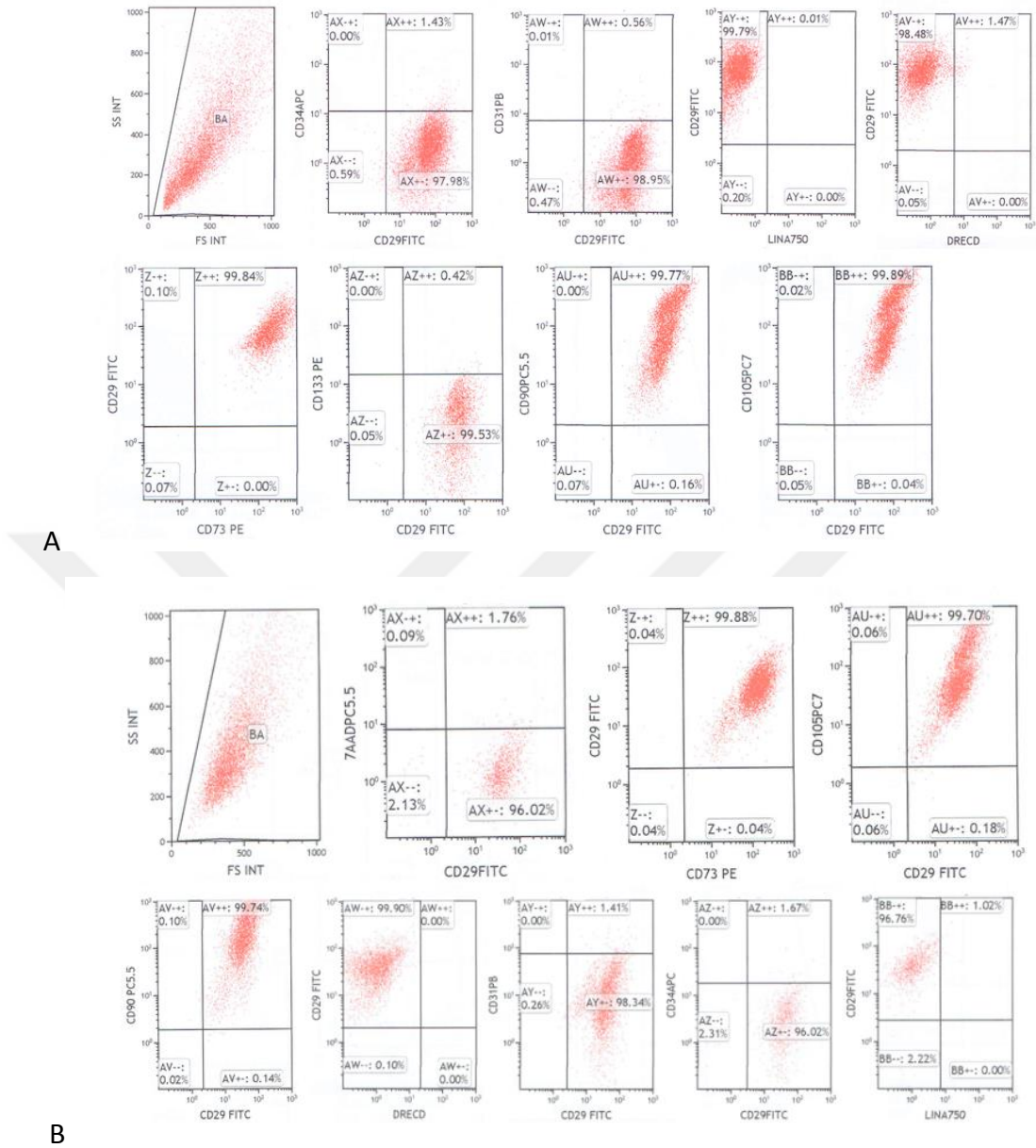


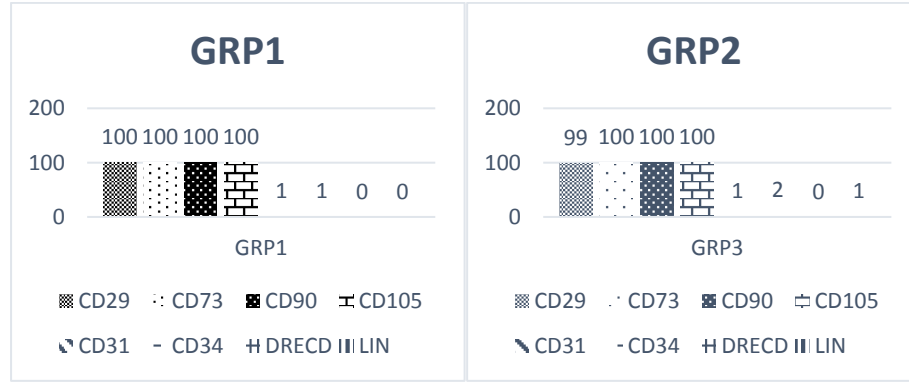
Şekil 4.13. A) GSP1 için akış sitometriSi analiz grafikleri B) GSP2 için akış sitometri analiz grafikleri.



Şekil 4.14. GSP1 ve GSP2 için yapılan akış sitometrisi analiz sonuçları

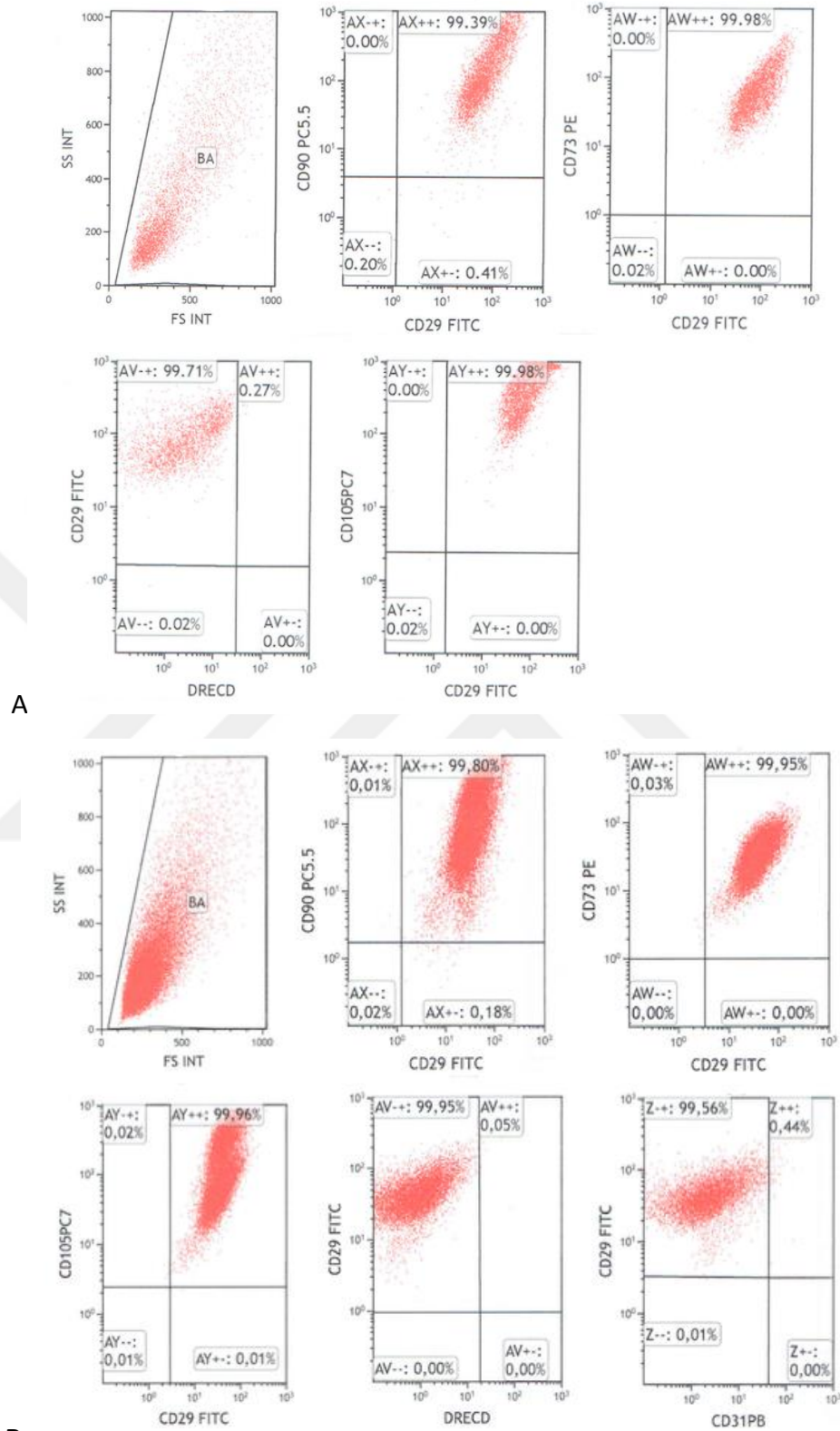




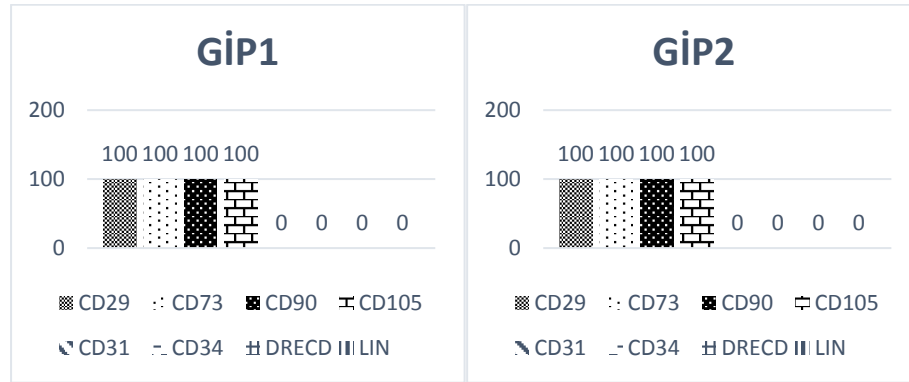


Şekil 4.16. GRP1 ve GRP2 için yapılan akış sitometrisi analiz sonuçları.



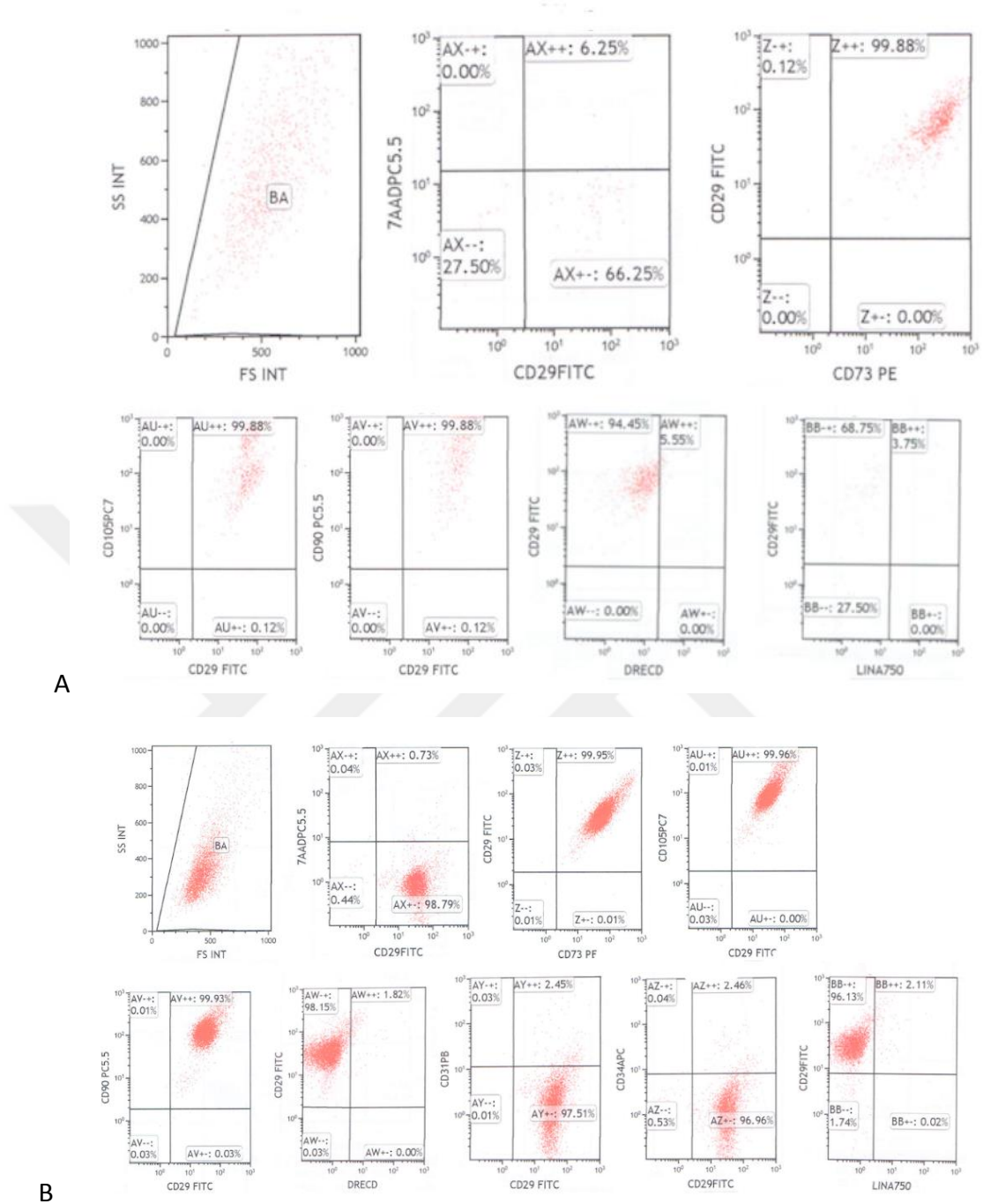


Şekil 4.17. A) GiP1 için akış sitometri analiz grafikleri ve B) GiP2 için akış sitometri analiz grafikleri

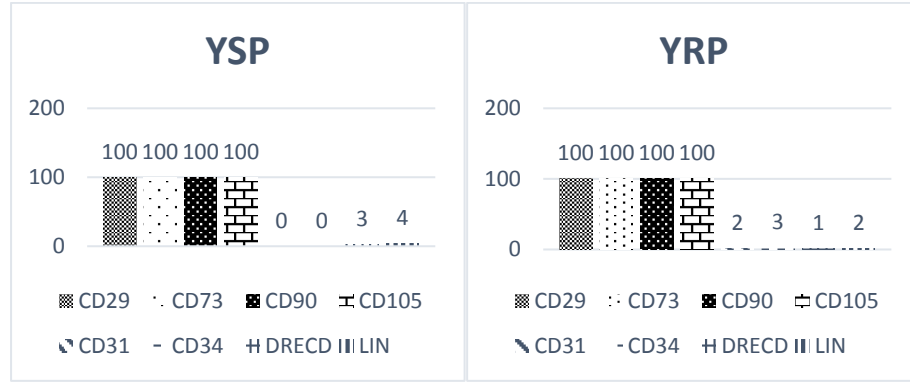


Şekil 4.18. GİP1 için yapılan akış sitometrisi analiz sonuçları.





Şekil 4.19. A) YSP için akış sitometri analiz grafikleri B) YRP için akış sitometri analiz grafikleri



Şekil 4.20. YSP ve YRP için yapılan akış sitometrisi analiz sonuçları



5.TARTIŞMA

Dental pulpa endotel hücreler, fibroblastlar, nöronlar, immün hücreler ve odontoblast benzeri çeşitli hücreler içeren dentin ve matriksiyle çevrili konnektif bir bağ dokusudur. Dental pulpaya kan akışı apikal foramen yoluyla sağlanır. Apikal foramenin çapı yaklaşık 250 µm olduğu için, dental pulpanın oksijen ve besin miktarı kısıtlıdır(200). Bu durum kök hücrelerin devamlılığı için avantajlı bir durumken enfeksiyon kontrolü açısından dezavantaj oluşturmaktadır (201). Dental pulpa travma veya çürük yoluyla patojenlerle bir kez enfekte olduğunda, antimikrobiyal tedavilerle patojenleri ortadan kaldırmak zordur ve sıklıkla tüm pulpanın ekstirpe edilmesiyle sonlanır. Dental pulpa dişlerin korunmasını, beslenmesini, tamir ve sinirsel fonksiyonlarının yerine getirilmesini üstlendiği için dental pulpanın rejenerasyonu klinik öneme sahiptir (200).

Gronthos ve ark. 2010 yılında yaptıkları çalışmada 19-29 yaş aralığındaki hastaların üçüncü molar dişlerinden topladıkları pulpalarda ilk defa dental pulpa kök hücrelerini tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada dental pulpa kök hücreleri immün sistemi baskılanmış farelere implante edildiği zaman pulpa benzeri bir dokuyu çevreleyen odontoblast benzeri hücreler oluşturduğu ve bu hücrelerin de dentin benzeri doku oluşturarak, bu doku boyunca dizildiklerini göstermişlerdir (5). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda dental pulpa kök hücrelerinin yüksek proliferasyon potansiyeline sahip mezenkimal kök hücreler olduğu ve odontoblastlar, osteoblastlar, kondroblastlar, nöral hücreler, adipositler, endotel hücresi, sementoblast, periodontal ligamet hücresi, miyoblast, ve fibroblastlar gibi pek çok hücreye farklılaşabildiği gösterilmiştir (4, 14, 202).

Dental pulpa dokusu kök hücrelerinin elde edilmesi kolay olduğu için ilgi çekmektedir. Çünkü dokunun rejenerasyonu ve devamlılığı mezenkimal kök hücrelere bağlıdır (10, 203). Dental pulpa kök hücrelerinin izolasyonu ve ayrıntılı karakterizasyonu sayesinde kök hücrelerin kullanıldığı doku mühendisliği ve rejeneratif endodontik tedaviler (revaskülarizasyon/rejenerasyon) umut

vadetmektedir (167). Dental pulpa kök hücrelerinin en umut verici uygulaması pulpa-dentin kompleksinin rejenerasyonudur. Çünkü bu yöntemle hem diş dokularının endodontik ve konservatif tedavilerle zayıflamasının önüne geçilir hem de dişin canlılığının kazanılması sağlanır (204). Rejeneratif tedavinin amacı dentin, kök yapısı ve dentin pulpa kompleksi hücrelerinin yerine, damarlanma, immünite, innervasyon, tübüler dentin formasyonu gibi orijinal dokuya histolojik ve fizyolojik olarak benzeyen dokular oluşturmaktır (204, 205). 2010 yılında Huang ve ark. yaptıkları çalışmada insan dişinin kök kanal boşluğunun bir tarafını MTA ile kapatıp, polilaktik koglolik asit iskeleti ve dental pulpa kök hücreleri ile doldurup farelere transplante etmişlerdir. Üç aylık sürenin sonunda vaskülarize dentin-pulpa kompleksinin oluştuğunu görmüşlerdir (160). Ancak hayvan deneyleri ile yapılan çalışmalar genellikle immün sistemi baskılanmış hayvanlara yapılmaktadır ve çürük, apikal lezyon gibi gerçeği yansıtan durumlar her zaman simüle edilmemektedir (204).

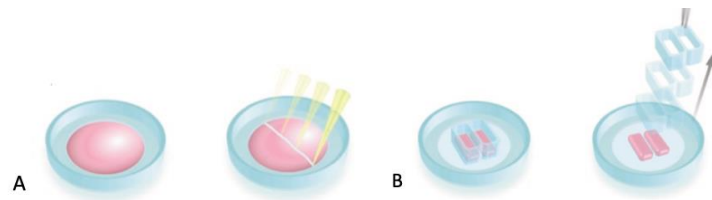
Dental pulpa kök hücrelerinin in vitro izolasyonu için doku kaynağı genellikle sağlıklı veya gömülü 20 yaş dişleridir. Literatürde 20 yaş dişlerinden izole edilerek başarıyla kültüre edilmiş dental pulpa kök hücrelerinin kullanıldığı pek çok çalışma vardır (5, 206-208). Dental pulpa dokularının başarılı bir şekilde mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kullanılması ve pek çok farklı hücre çeşidine dönüşebilmesi üzerine süt dişi pulpaları ve son yıllarda da inflame dental pulpalar kök hücre kaynağı olarak incelenmeye başlamış ve sağlıklı dental pulpalarla benzer sonuçlar elde edilmiştir(6, 9, 209).

Buradan yola çıkarak, bu çalışmada inflamasyonun ve de yaşlanmanın dental pulpanın kök hücre proliferasyonu ve özgülüğü üzerine etkileri, lateral proliferasyon, akış sitometrisi ve immünfloresan işaretleme yöntemi ile pilot çalışma olarak incelenmiştir. Çalışmamızdaki hipotezimize göre; inflame veya yaşlı bireylerden elde edilen pulpa kök hücrelerinin proliferasyon kapasitesi ve mezenkimal kök hücre özgülüğü sağlıklı pulpalardan elde edilen pulpa kök hücrelerine göre daha düşük düzeyde olduğu varsayılmıştır. Tüm çalışma gruplarımızda, mezenkimal kök hücre özgülüğü incelendiğinde hem akış sitometresi hem de immünfloresan işaretleme

yöntemlerinde benzer sonuçlar alınmıştır. Yaşlı sağlıklı pulpa kök hücrelerinin sağlıklı pulpalı genç bireylerden elde mezenkimal kök hücrelerine göre hücre proliferasyonunun daha az olduğu görülmüştür. Genç geri dönüşümlü pulpalı dişlerden elde edilen kök hücreler genç sağlıklı pulpalı dişlerin kök hücrelerinden daha hızlı proliferasyon olarak yara yüzeyini 48. Saatte doldurmuştur. Buradan yola çıkarak hipotezimizin kısmen doğrulandığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızda lateral proliferasyon deneyinde, pipet yardımıyla kök hücre kültür flaskı boydan boya çizilerek bir yara yüzeyi oluşturulmuş ve 0., 24.,48. ve 72. saatlerde hücrenin lateral yönde proliferasyonu ölçülmüştür (Şekil 5.1A)

Yara iyileşmesi kolektif hücre göçüdür. Bu deneyin dezavantajlarından biri yara bölgesine bakan hücrelerin diğer hücreler tarafından itilerek yara bölgesine doğru yaklaştırılması ihtimalidir. Çizik oluşturulması yönteminin avantajı fizyolojik bir cevap oluşmasıdır. Ancak hücrelere zarar verilebilir, yara genişliğinde değişiklik gözlenebilir ve hücreler yer değiştirebilir. Aynı zamanda yara yüzeyi oluşturulurken kalkan hücreler yara yüzeyine yapışarak bias oluşmasına sebep olabilirler. Bir diğer yöntem ise iki bölmeli bir aletin hücre üremesi için kullanılmasıdır (şekil 5.1B). Literatürde yara alanında proliferasyon olan hücrelerin sayılarak proliferasyon kapasitesini ölçen çalışmaların yanısıra MTT proliferasyon değerini ve koloni oluşturma potansiyelini ölçen çalışmalar da vardır (210).



Şekil 5.1. Yara iyileşmesini incelemek için kullanılan iki yöntem. A) Hücre tabakasının yüzeyinde bir pipet ile çizik oluşturularak yara yüzeyi eldesi B) İki bölmeli alet ile yara bölgesi oluşturulması (211).

Dandan ve ark. tarafından 2012 yılında yayınlanan bir çalışmada genç sağlıklı pulpa dokularından elde edilen kök hücrelerle, derin çürüklü akut semptom

içermeyen pulpalardan elde ettikleri kök hücrelerin koloni oluşturma ve MTT yöntemi ile hücre proliferasyon kapasitesini kıyaslamışlar ve bizim çalışmamızın kök hücre proliferasyon sonuçları ile benzer şekilde, derin çürüklü pulpalardan elde edilen kök hücrelerde daha fazla koloni oluşturma ve çoğalma kapasitesi olduğunu rapor etmişlerdir. Kök hücre elde ettikleri pulpaların tamamen inflame olmayıp proinflame bir pulpa olduğu için daha kolay proliferere olarak odontoblastlara dönüştüğünü ve rejeneratif dentin yapımını stimüle edebildiğini belirtmişlerdir(212). Bunun yanı sıra semptomatik geri dönüşümsüz pulpitisli dişlerden elde edilen pulpa kök hücrelerinin proliferasyon değerinin daha düşük olduğunu rapor eden çalışmalar da vardır (6, 9). Bu sonucun, inflame pulpadaki potansiyel proinflamatuvar sitokinler olan (TNF)- α ve İnterleukin-1 β daki artışın dental pulpa kök hücresinin proliferatif kapasitesini zayıflatmasından dolayı olabileceğini ifade etmişlerdir. Diğer taraftan Yang ve arkadaşları ise (TNF)- α ve İnterleukin-1 β 'daki artışın dental pulpa kök hücrelerinin erken inflamasyon döneminde dental pulpa kök hücre proliferasyonunu artırabileceğini ifade etmişlerdir (213).

Hafif derecede pulpa inflamasyonu odontoblastik ve osteoblastik farklılaşmayı ve matrix formasyonunu arttırırken şiddetli inflamasyonun kök hücrelerinin apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (214, 215). İnflamatuvar cevap NF- κ B ve MAPK benzeri hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunu gerektirir. Çok sayıda pro ve anti-inflamatuvar moleküller (interlökinler ve TNF- α) enfeksiyona karşı pulpa cevabının oluşmasında sinyal molekülü olarak görev yapar (215, 216).

Mezenkimal kök hücrelerin yaralanma alanında toplanması tamir sürecini kolaylaştırır. Bununla beraber Fouad ve Huang inflamasyona uzun süre maruz kalırsa kök hücrelerin hücresel fonksiyonlarının ve sayısının azaldığını göstermiştir. Mezenkimal kök hücreler, inflamatuvar ortamdan yüzey reseptörleri yoluyla sinyalleri alma kapasitesine sahiptirler. İnflamatuvar ortamdaki sitokinler hem inflamatuvar hücrelerle ve hem de kök hücrelerle iletişim halindedir (217). Kök hücreler de çok sayıda sitokin, büyüme faktörleri ve kemokinleri salgılar. Bu sitokinlere uzun süre maruz kalması, mezenkimal kök hücrelerin aktivitesini etkiler (218). Bu da

mezenkimal kök hücrelerin antiinflamatuvar rollerini zayıflatır ve de farklılaşma potansiyelini baskılar (217). Yapılan bu çalışmalar inflame kök hücrelerin dental pulpa rejenerasyonunu bozabileceğini göstermektedir. Ancak 2010 yılında yayınlanan iki çalışmada geri dönüşümsüz pulpitisli inflame dental pulpadan elde edilen kök hücrelerin odonto/osteojenik farklılaşma kapasitesinin artmamasına rağmen in vivo ortamda dentin-pulpa kompleksini oluşturabildiklerini belirtmişlerdir (6, 9). Pulpa dokusuna ulaşmak her zaman kolay değildir. Yirmi yaş dişlerinin çekilmesi ve ortodontik sebeplerle yapılan çekimler dışında sağlıklı dişleri çekmek etik ve mantıklı değildir. Yapılan bir vaka çalışmasında geri dönüşümsüz pulpitisli diştten elde edilen kök hücrelerin üretilip hastaya ait lökosit trombosit zengin fibrin (Leukocyte Platelet-rich Fibrin , L-PRF) ile beraber kök kanalına yerleştirilerek dişin tedavi edilebileceği gösterilmiştir. (219). Ayrıca literatürde geri dönüşümsüz pulpitisli vakalarda amputasyon sonrası Biodentine uygulanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (220).

Yapılan çalışmalar geri dönüşümsüz pulpitislerde pulpa-dentin kompleksinin oluşabileceğini, en büyük sıkıntının yetersiz damar gelişiminin olabileceğini göstermektedir. Anjiogenezis yeni kan damarlarının oluşumuyla ilgili hücresel bir süreçtir ve farklı büyüme faktörlerinin rol aldığı karmaşık bir moleküler mekanizmaya sahiptir (221).Dental pulpa tamir ve rejenerasyonu sırasında VEGF, FGF ve PDGF anjiogenezisi stimüle etmede, VEGF endotel hücre proliferasyonu, migrasyonu ve canlılığının sürdürülmesinde temel rol oynar. Geçmiş yıllarda inflame dental pulpanın yeni damarların oluşmasında VEGF ve FGF in büyüme faktörü olarak etkisini gösteren çalışmalar rapor edilmiştir (221, 222). LPS ile inflame edilen sağlıklı dental pulpa kök hücrelerine uygulanan insan trombosit lizat veya simvastatinin (lipid düşürücü ilaç) hücre proliferasyonunu ve vaskülogenezisi artırarak sitokinleri inhibe ettiğini ve anjiogenezis-damar gelişimini indüklediğini gözlemlenmiştir (221, 223). Biodentine ve MTA'nın da pulpa kök hücrelerini stimüle ederek büyüme faktörlerinin salınımını artırdığı ve de sonuç olarak pulpa dentin rejenerasyonunu indüklediği rapor edilmiştir (224). Dental pulpa kök hücrelerinin osteojenik farklılaşma potansiyeli yüksek olduğu için kemik doku mühendisliğinde kullanılabileceği belirtilmektedir (225-229). Aynı

zamanda nörovasküler yetenekleri sayesinde dental doku mühendisliğinde de kullanılabileceği rapor edilmiştir (230-232). Dental pulpa kök hücrelerinin nöronal rahatsızlıkların iyileştirilmesinde damarlanmayı sağlayarak ve nöronal rejenerasyonu indüklemeye özellikleri sayesinde nörolojide de kullanılabileceği belirtilmektedir (233-236). Bu kök hücrelerin ileride Parkinson ve Alzheimer hastalıklarında kullanılabilmesi için umut verici olduğu belirtilmektedir (237). Dental pulpa kök hücrelerinin iskemik alanlarda anjiogenezisi indüklediği ve bu sayede iskemik rahatsızlıklarda kullanılabileceği belirtilmektedir (231). Dental pulpa kök hücrelerinin pankreatik hücrelere farklılaşma yeteneği olduğu için diyabette kullanılabileceğini belirten çalışmalar da mevcuttur (139, 238, 239).

Bu çalışmada, sağlıklı pulpa kök hücrelerinin yanısıra geri dönüşümlü ve semptomatik geri dönüşümsüz pulpitisli dişlerden elde edilen kök hücrelerinin özgülüğü akış sitometresi ve immunofloresans işaretleme yöntemleriyle incelendi. Akış sitometri sonuçları incelendiğinde sağlıklı ve inflame dental pulpalarda mezenkimal kök hücre özgülüğü birbirine benzer sonuçlar göstermiştir. Mezenkimal kök hücre özgülüğünü işaret eden CD29, CD73, CD90 ve CD105 pozitif yüzey belirteçlerinin hepsi %99 ile %100 oranında eksprese olmuştur. Bir hücrenin mezenkimal kök hücre olarak belirlenebilmesi için hücrelerin CD73,CD90 ve CD105 yüzey belirteçlerini pozitif olarak eksprese etmeleri gerekmektedir(56). Bizim akış sitometri sonuçlarımızla benzer şekilde diğer inflame pulpa kök hücre çalışmalarında da %99 ve üzeri pozitif yanıt alınmıştır(6, 9)

Akış sitometrisi ilk defa 1960 yılında kullanılmaya başlanmıştır ve hücrelerin tek tek incelenmesini ve hücreler ile yüzey antijenlerinin tanımlanması gibi yüzey özelliklerinin incelenmesini sağlamaktadır (240, 241). Bu yöntem yıllardır kök hücre çalışmaları için kullanılmaktadır (242). Geleneksel akış sitometrisi tekniklerinde verilerin işlenmesi genellikle manuel olarak yapılmaktadır ve analiz eden kişide yeterli bilgisayar ve istatistik becerilerin bulunması gerekir. Akış sitometrede düşük sayıda hücre varlığında, yüzey belirteçlerinin ölçümlerinin daha uzun sürdüğü, bu nedenle yeterli hücre sayısının sağlıklı akış sitometresi sonucu eldesi için önemli olduğu

vurgulandı (240). Yaptığımız çalışmada da kimi örneklerde 100 µl'deki hücre sayısı yetersiz kaldığı için okuma yapmakta zorlanıldı. Bu durum hücrelerin akış sitometrisi yapılması için belirli bir konfluyensiye ulaşmalarının önemini vurgulamaktadır.

Dental pulpa kök hücreleri Stro-1, CD146, CD106, CD29, CD13, CD44, CD73, CD90, CD105 ve CD271 gibi mezenkimal kök hücre belirteçlerini eksprese etmektedir (83, 243). Ancak dental pulpa kök hücreleri için spesifik bir belirteç bulunmamaktadır (83). CD73 lenfositlerin endotele yapışmasını sağlar ve aynı zamanda mezenkimal kök hücrelerde de bulunur (244). CD90 (Thy-1) aslında lökositlerde görülen bir belirteçtir ve hücreler arası ve hücre matriks arasındaki etkileşimlerden sorumludur (245). Endoglin olarak bilinen CD105, insan vasküler endoteli ile bağlantılı bir membran glikoproteinidir (246). CD29 integrin beta-1 olarak ya da fibronektin reseptör alt üniti olarak bilinmektedir, integrin ailesinin bir üyesidir (247).

Bu çalışmada negatif yüzey belirteçleri olarak CD31, CD34, HLA-DR ve LIN kullanılmıştır. Burada hedef bu yüzey belirteçlerinin %2-3 aralığını geçmemesidir. Çünkü normal koşullarda mezenkimal kök hücrelerde bu belirteçlerin düşük olması beklenir. CD31 endotelyal progenitör hücrelerden ve endotelyal hücrelerde eksprese olmaktadır (235). CD45, CD34 ve CD11b hematopoetik kök hücre belirteçleridir. Yaptığımız çalışmada akış sitometrisinde deney gruplarımızda CD45 ve CD11b içeren LIN parametresi %0 ile %4 arasında bulunmuştur. CD34 oranı ise %3 ve altında bulunmuştur. En yüksek CD34 oranı yaşlı geri dönüşümlü pulpitis örneğinde görülmüştür. En düşük oran ise genç sağlıklı pulpa grubunda tespit edilmiştir. HLA-DR molekülleri indüklenmediği sürece mezenkimal kök hücrelerde eksprese olmaz (56). Yaptığımız çalışmada da HLA-DR içeren DRECD preparatı %0-3 aralığında eksprese olmuştur.

Bu çalışmada yüzey belirteçlerinin protein ifadeleri immünfloresan işaretleme yöntemiyle incelendi. İmmünfloresan işaretleme yöntemi birçok hücre çeşidinde bulunan antijenlerin floroforlarla boyanmış antikolar kullanılarak tespit ve lokalize edilmesini sağlamaktadır. Kültüre edilmiş hücreler, hücre süspansiyonları ya da doku

örneklerindeki belirli hedeflere veya bütün bir organizmaya uygulanabilen bir yöntemdir. İmmünofloresan incelemelerde otolizi, çürümeyi ve morfolojinin antijen özelliklerini kaybetmeden koruyabilmesi için fikse edilmesi gerekmektedir (248). İmmünofloresans tekniğinin diğer yöntemlere göre daha ucuz olması bir avantaj sağlamaktadır (249). İmmünofloresans okuma zordur ve teknik yeterlilik gerektirir (250).

Çalışmamızda CD73, CD90 ve CD 105 dental pulpa mezenkimal kök hücre pozitif yüzey belirteci olarak, CD34 ve CD45 ise negatif yüzey belirteci olarak kullanıldı. Sonuçlar incelendiğinde, CD73, CD90 ve CD105 antikörlerinin tüm deney gruplarının kök hücrelerinin hücre stoplazmalarında farklı yoğunlukta işaretlendiği gözlemlendi. CD34 yüzey belirtecinin hemen hemen hiç immün işaretleme göstermediği gözlemlendi. GSP1 ve YRP örneklerinde CD45 antikoru ile hafif boyanma gözlenmektedir. Ancak bu boyanmanın deneysel aşama sırasında bir artefaktan kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar diş çürüğünün yanı sıra yaşlanmanın da dental pulpadaki kök hücrelerin özelliklerini değiştirebildiğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda yaşlı sağlıklı ve geri dönüşümlü pulpitisten elde edilen 1'er kök hücre örneği pilot çalışma olarak incelenmiştir. Yaşlı sağlıklı pulpadan elde edilen kök hücreler genç sağlıklı pulpadan elde edilenlere göre daha yavaş proliferasyon göstermektedir. Yaşlı sağlıklı hücrelerin lateral yönde proliferasyon olarak başarıyla kapatmışlardır. Yaşlı sağlıklı hücrelerin daha düşük konfluens gösterdiği gözlemlenmiştir. İmmünofloresan işaretleme yönteminde yaşlı sağlıklı bireyden elde edilen pulpa kök hücrelerinin pozitif yüzey belirteçleri ile (CD73, CD90 ve CD105) stoplazmik olarak çok yaygın şekilde işaretlendiği, negatif yüzey belirteçlerinin ise herhangi bir boyamaya neden olmadığı gözlemlendi. Yaşlı geri dönüşümlü pulpitis örneği incelendiğinde de özellikle CD73 ve CD105'in yoğun bir şekilde ekspresyon gösterdiği, CD90'un ise daha az yoğunlukta ekspresyon gösterdiği, CD34 antikoru boyaması gözlenmezken çok hafif düzeyde CD45 ekspresyonu gözlemlendi. Akış sitometresi sonuçlarında pozitif yüzey belirteçlerinin yaşlı bireylerden elde edilen mezenkimal kök hücrelerinde %99'in üzerinde olduğunu, negatif yüzey belirteçlerinin

ise bazılarında %2 den büyük olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak proliferasyon yeteneği azalsa da mezenkimal kök hücre özgüllüğünün genç bireylerden elde edilen kök hücrelerle arasında belirgin bir farklılık gözlenmedi.

Pasaj sayısının artması neticesinde mezenkimal kök hücrelerde mitotik aktivite sınırlanır ve hücrel debris birikimi gözlenir. Bu duruma hücrel senescence denilmektedir(251). Senescence ile beraber azalmış telomeraz aktivitesi ve senescence belirteci olan p16'da artış görülmektedir (168). Yaşlanma ile beraber dental pulpa kök hücrelerinde proliferasyon kapasitesinin ve odontojenik farklılaşmanın azaldığı gösterilmiştir (97).

Yi ve arkadaşları yaşlı bireylerden elde edilen dental pulpa kök hücrelerinin proliferasyon ve osteojenik, adipojenik farklılaşma potansiyelinin azaldığını, kondrojenik farklılaşma potansiyelinin ise yaşa bağlı olarak değişmediğini, bunun da pulpa-dentin rejenerasyonunu etkileyebileceğini belirtmişlerdir (97). Bressan ve ark. uygun ekstraselüler koşullar hazırlandığında, yaşlı bireylerden izole edilen dental pulpa kök hücrelerinin gençlerden izole edilenlerle benzer rejeneratif özellikler barındırdığını göstermişlerdir (7). Diğer taraftan Horibe ve ark. yaşlı daha büyük olan gruptaki kök hücrelerin sayısının, çoğalma hızının, göç etme ve antiapoptotik kapasitesinin genç gruptakine göre daha yüksek olduğunu gözlemişlerdir. Bu durumun hasta donör yaşının dental pulpa kök hücre rejenerasyon potansiyeline etkisinin olmadığını gösterebileceğini belirtmişlerdir (206). Buna ilaveten Ning ve arkadaşları yetişkin ratlarda LPS stimülasyonuna bağlı olarak ALP aktivitesinin arttığını(252), Aslantaş ve arkadaşları da yaşlı bireylerden elde edilen inflame pulpa dokularında ALP aktivitesinin yüksek olduğunu bulmuşlardır(35). Bu durum yaşlı kök hücrelerinde de osteojenik farklılaşmanın devam ettiğinin göstergesi olabilir. Sonuç olarak yaşlanma ile kök hücre proliferasyonunu azaltsa da hala rejeneratif kapasitesiye sahip olduğu ve pulpa-dentin rejenerasyonunda bundan yararlanılabileceği düşünülebilir.

Diğer taraftan yaşlı hastalarda pulpa dokusunun sekonder ve tersiyer dentin oluşumu, pulpa taşı formasyonu, dentikeller sebebi ile hacimce azalması bu bireylerden dental pulpa kök hücresi eldesini zorlaştırmaktadır. Aynı zamanda farklılaşma ve rejeneratif kapasitelerinde de azalma görülmektedir (49, 253). Bunun yanında diyabet, sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit gibi sistemik hastalığı olan bireylerde mezenkimal kök hücre fonksiyonları geri dönüşümsüz olarak değişir . Bu problemlerin önüne geçebilmek için allojenik trasplantasyonun bu problemi aşmaya yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu yöntemle patojen taşınması ya da hücrelerin sensence olması ve tümör gelişim ihtimali gibi riskler söz konusudur (204). Diğer bir faktör de yaşlı bireylerde pulpitislerin teşhisinde bazı zorluklar vardır. Yaşlı bireylerde tüm organ ve dokularda düşük yoğunlukta bir kronik inflamasyon süreci vardır. Ağrı stimülanlara karşı uyarı mekanizması yavaşlamıştır. Bu nedenle bakteriyel stimülanlara karşı yeterli cevap oluşmadığı için klinikte her zaman başarılı teşhis yapmak mümkün olmayabilir. (ALP ref)

Bu çalışmada eksplant yöntemiyle pulpa dokusundan primer kültür elde edildi. Eksplant yöntemde küçük doku parçalarından hücrelerin dışarıya doğru büyümesi gerçekleşmektedir ve son derece saf bir kök hücre popülasyonu elde edilmektedir (254). Eksplant tekniğini uygulamanın maaliyeti enzimatik yöntemle kıyasla daha düşüktür. Ve daha kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Bu yöntem çok tercih edilen bir yöntem değildir. Çünkü bu yöntemin uygulanması uzun zaman almaktadır ve hücrelerin pulpa dokusundan dışarı doğru büyümeleri en az 1 ila 2 hafta arasında bir zaman aldığı belirtilmiştir (183). Ancak bizim yaptığımız çalışmada eksplant kültür yöntemi uygulandığı zaman hücrelerin 6 hafta sonra atmaya ve çoğalmaya başladıkları görülmüştür. Spath ve ark. 2009 yılında yaptıkları çalışmada eksplant kültür yöntemi ile dental pulpa kök hücrelerde artmış proliferasyon kapasitesi olduğunu göstermişlerdir. Bu durum bizim çalışmamızda eksplant kültür yöntemini tercih etme sebeplerimizden biri olmuştur (255). Aynı çalışmada fare miyoblastları ile kokültüre edildiği zaman dental pulpa kök hücrelerinin miyojenik genlerinin aktive olduğu görülmüştür. Hilkens ve ark. yaptıkları çalışmada enzimatik ya da eksplant kültür yöntemi ile yapılan hücre izolasyon yöntemlerinin ikisinde de

aynı büyüme oranı ve koloni formasyon kapasitesinin olduğunu ve başarılı bir şekilde adipojenik, kondrojenik ve osteojenik hücre çeşitlerine farklılaşma görülebildiğini; dolayısıyla her iki izolasyon yönteminde yeterli otolog dental pulpa kök hücre elde edilebildiğini göstermişlerdir(208). inflame pulpalı dişlerden elde edilen pulpalarda enzimatik sindirim yönteminde iğsi yapıdaki fibroblast benzeri hücrelerin yapışması 4 gün sonra görülürken, eksplant yöntemi uygulanan örneklerden hücre atımı 7. günde görülmüştür (79). Huang ve ark. 2006 yılında yaptıkları çalışmada farklı izolasyon metodlarının kollajen gen ekspresyon paternlerine bakıldığı zaman farklı pulpa kök hücre çeşitlerinin oluşumuna sebep verdiğini ve enzimatik yöntemle izole edilen hücrelerin proliferasyon kapasitesinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (256).

Rejeneratif tıpta son yıllardaki çalışmalar baş döndürücü bir hızla devam etmekte ve her geçen gün dental pulpa kök hücresinin farklılaşma potansiyelinden faydalanarak yeni bir tedavi alanı ortaya çıkmaktadır. Bu durum ileride yapılacak araştırmalarla pulpa kök hücresinin gelecekte hangi hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği sorusunu akla getirmektedir. Buradan yola çıkarak son yıllarda doku veya hücrelarımızın gelecekte karşılaşacağımız hastalıkların tedavisi amaçlı kullanılabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Biyobanka(biobank) terimi, biyolojik numuneleri saklayan çeşitli tesisleri tanımlamaktadır (257). Biyobankacılık sayesinde genetik ve tıbbi araştırmalar ile uygulamalarıyla ilgili çalışmalar yapılabilir; yeni ilaçlar ve tedaviler geliştirilebilir (258).

Dental pulpa kök hücreleri genç bireylerde diş çekimi yapıldığı zaman ya da süt dişleri düştüğü zaman kolaylıkla elde edilebilmektedir. Ancak bu tarz durumlar genellikle hastanın hayatında kök hücre tedavisine ihtiyaç duymadığı bir dönemde gerçekleşmektedir. Bu sebeple kök hücrelerin daha sonraki dönemler için saklanabilmesi önemlidir (259).

Pilbauerova ve ark. yaptıkları çalışmada dental pulpa kök hücre elde edilmesi amacıyla dişleri bir bütün olarak da dondurdukları zaman kristal oluşumunu engelleyen ajan dişin içine penetre olamadığı için elde edilen başarılı kök hücrelerin

dişlerden izole edilip dondurulmasından sonra elde edilen başarıya göre daha düşük olduğunu bulmuşlardır (259).

Lee ve ark. 2010 yılında yaptıkları çalışmada taze dişlerle karşılaştırıldığı zaman manyetik olarak dondurulan premolarlarda %73 oranında dental pulpa kök hücre canlılığının (viability/yaşayabilirlik) olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda morfolojide, kök hücre belirteçlerinin ekspresyonunda, osteojenik ve adipojenik potensiyelde taze dişlere göre görülebilir bir farklılık olmadığı bulunmuştur (260).

Papaccio ve ark 2 yıllık kriyoperzervasyon sürecinden sonra dondurulan dental kök hücrelerinin in vitro ortamda kemik dokusuna farklılaşabildikleri ve transplantasyon deneyleri için kullanılacak durumda olduklarını göstermişlerdir(207). Son yıllarda inflame pulpadan elde edilen kök hücrelerin de dondurularak muhafaza edildiği ve çözündükten sonra proliferasyon ve farklılaşma gücünde bir değişiklik olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (6, 10)

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Bu çalışmada genç ve yaşlı, sağlıklı ve pulpitisli dental pulpalardan kök hücre izolasyonu başarıyla tamamlandı. Çalışmamız bir ön çalışma niteliğinde olup deneysel aşamadaki sıkıntılara bağlı olarak revize edilecektir.

2. Yaşlı bireylerden pulpa doku eldesinin daha zor olduğu ve duyuşal sinir iletimindeki azalmaya bağlı olarak teşhislerde yanılma olabileceği bildirilmiştir.

3. Genç geri dönüşümlü pulpitislerden elde edilen kök hücrelerin proliferasyon kabiliyeti sağlıklı genç pulpalara göre daha hızlı iken, sağlıklı genç pulparlar da yaşlı sağlıklı pulpalardan elde edilen mezenkimal kök hücrelere göre daha hızlı olduğu gözlemlendi.

4. Kök hücre özgüllüğü akış sitometri yöntemiyle belirlendi. Mezenkimal kök hücre özgüllüğünün tüm örneklerde benzer şekilde pozitif olduğu gözlemlendi.

5. Mezenkimal kök hücre özgüllüğünün protein ifadesi ise immünfloresan işaretleme yöntemi ile yapıldı. Tüm örneklerde pozitif yüzey belirteçlerinin (CD73, CD90 ve CD105) immünfloresan işaretlemesi başarılı bir şekilde gerçekleşti.

6. Sonuç olarak inflamasyon ve donör yaşı pulpalarda mezenkimal kök hücre özgüllüğünü önemli derecede etkilemezken, asıl hücrenin sayısını ve proliferasyon kapasitesini etkileyebilir.

7. Gelecekte yapılacak çalışmalar geri dönüşümsüz pulpitisli pulpalardaki mezenkimal kök hücrelerin kullanılarak in vivo ortamda pulpa-dentin rejenerasyonunun gerçekleştirilmesinin yanısıra bu pulpalardan elde edilen kök hücrelerin in vitro olarak hazırlandığında rejeneratif endodonti vakalarında kullanılarak dişlerin canlılığının nasıl sürdürülebileceği üzerine olmalıdır.

8. Bunların yanısıra rejeneratif tıptaki gelişmeler gelecekte pulpa dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerinin pek çok hastalığın iyileştirilmesinde kullanılabileceği bu nedenle diş çekimi veya kanal tedavisi nedeniyle uzaklaştırılan pulpalardan üretilcek pulpa kök hücrelerinin doku bankalarında saklanarak daha sonra kullanılabileceği unutulmamalıdır.



7. KAYNAKLAR

1. Liu H, Gronthos S, Shi S. Dental Pulp Stem Cells. *Adult Stem Cells. Methods in Enzymology* 2006. p. 99-113.
2. Haug SR KS, Heyeraas KJ. Structure and Function of the Pulp–Dentin Complex. In: Ilan Rotstein JII, editor. *Ingle’ Endodontics* 7. North Carolina: PMPH USA, Ltd.; 2019.
3. Hargreaves KM, Goodis H. E., Tay F.R. . Seltzer and Bender’s Dental Pulp Second Edition. Hannover Park, IL: Quintessence Publishing Co, Inc; 2012.
4. Bojic S, Volarevic V, Ljubic B, Stojkovic M. Dental stem cells--characteristics and potential. *Histology and histopathology*. 2014;29(6):699-706.
5. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-30.
6. Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S, et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med*. 2010;5(4):617-31.
7. Bressan E, Ferroni L, Gardin C, Pinton P, Stellini E, Botticelli D, et al. Donor age-related biological properties of human dental pulp stem cells change in nanostructured scaffolds. *PLoS One*. 2012;7(11):e49146.
8. Peters OA PC, Basrani B. Cleaning and Shaping the Root Canal System. In: Kenneth M. Hargreaves LHB, editor. *Cohen’s Pathways of the Pulp Eleventh Edition*. Missouri: Elsevier Inc; 2016.
9. Wang Z, Pan J, Wright JT, Bencharit S, Zhang S, Everett ET, et al. Putative stem cells in human dental pulp with irreversible pulpitis: an exploratory study. *J Endod*. 2010;36(5):820-5.
10. Malekfar A, Valli KS, Kanafi MM, Bhonde RR. Isolation and Characterization of Human Dental Pulp Stem Cells from Cryopreserved Pulp Tissues Obtained from Teeth with Irreversible Pulpitis. *J Endod*. 2016;42(1):76-81.
11. Morse DR. Age-related changes of the dental pulp complex and their relationship to systemic aging. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1991;72(6):721-45.
12. Murray PE, Stanley HR, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. Age-related odontometric changes of human teeth. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2002;93(4):474-82.
13. Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mechanisms of development*. 1997;67(2):111-23.

14. Nuti N, Corallo C, Chan BM, Ferrari M, Gerami-Naini B. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem cell reviews and reports*. 2016;12(5):511-23.
15. Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nature reviews Genetics*. 2004;5(7):499-508.
16. Kim BC, Bae H, Kwon IK, Lee EJ, Park JH, Khademhosseini A, et al. Osteoblastic/cementoblastic and neural differentiation of dental stem cells and their applications to tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2012;18(3):235-44.
17. Slavkin HC, Diekwisch TG. Molecular strategies of tooth enamel formation are highly conserved during vertebrate evolution. *Ciba Foundation symposium*. 1997;205:73-80; discussion 1-4.
18. Thesleff I, Aberg T. Molecular regulation of tooth development. *Bone*. 1999;25(1):123-5.
19. Ingle's Endodontics 7. Ian Rotstein JII, editor. North Carolina: PMPH USA, Ltd.; 2019.
20. Shimabukuro Y, Ueda M, Ozasa M, Anzai J, Takedachi M, Yanagita M, et al. Fibroblast growth factor-2 regulates the cell function of human dental pulp cells. *J Endod*. 2009;35(11):1529-35.
21. Fristad I BE. Structure and Functions of the Dentin-Pulp Complex. In: Kenneth M. Hargreaves LHB, editor. *Cohen's Pathways of the Pulp Eleventh Edition*. Missouri: Elsevier Inc; 2015.
22. Goldberg M, Smith AJ. CELLS AND EXTRACELLULAR MATRICES OF DENTIN AND PULP: A BIOLOGICAL BASIS FOR REPAIR AND TISSUE ENGINEERING. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 2004;15(1):13-27.
23. Larmas M, Sandor GK. Enzymes, dentinogenesis and dental caries: a literature review. *Journal of oral & maxillofacial research*. 2014;5(4):e3.
24. Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *The International journal of developmental biology*. 1995;39(1):51-68.
25. Iezzi I, Pagella P, Mattioli-Belmonte M, Mitsiadis TA. The effects of ageing on dental pulp stem cells, the tooth longevity elixir. *European cells & materials*. 2019;37:175-85.
26. Iezzi I, Cerqueni G, Licini C, Lucarini G, Mattioli Belmonte M. Dental pulp stem cells senescence and regenerative potential relationship. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(5):7186-97.
27. Carvalho TS, Lussi A. Age-related morphological, histological and functional changes in teeth. *Journal of oral rehabilitation*. 2017;44(4):291-8.

28. Jespersen JJ, Hellstein J, Williamson A, Johnson WT, Qian F. Evaluation of dental pulp sensibility tests in a clinical setting. *J Endod.* 2014;40(3):351-4.
29. Jafarzadeh H, Abbott PV. Review of pulp sensibility tests. Part I: general information and thermal tests. *International endodontic journal.* 2010;43(9):738-62.
30. Farac RV, Morgental RD, Lima RK, Tiberio D, dos Santos MT. Pulp sensibility test in elderly patients. *Gerodontology.* 2012;29(2):135-9.
31. Burke FM, Samarawickrama DY. Progressive changes in the pulpo-dentinal complex and their clinical consequences. *Gerodontology.* 1995;12(12):57-66.
32. Daud S, Nambiar P, Hossain MZ, Rahman MR, Bakri MM. Changes in cell density and morphology of selected cells of the ageing human dental pulp. *Gerodontology.* 2016;33(3):315-21.
33. Couve E, Schmachtenberg O. Autophagic activity and aging in human odontoblasts. *J Dent Res.* 2011;90(4):523-8.
34. Veerayutthwilai O, Byers MR, Pham TT, Darveau RP, Dale BA. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral microbiology and immunology.* 2007;22(1):5-13.
35. Aslantas EE, Buzoglu HD, Karapinar SP, Cehreli ZC, Muftuoglu S, Atilla P, et al. Age-related Changes in the Alkaline Phosphatase Activity of Healthy and Inflamed Human Dental Pulp. *J Endod.* 2016;42(1):131-4.
36. Morsczeck C, Reichert TE. Dental stem cells in tooth regeneration and repair in the future. *Expert opinion on biological therapy.* 2018;18(2):187-96.
37. Nakashima M, Iohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Arijji Y, et al. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):61.
38. Brignier AC, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S336-44.
39. Rodas-Junco BA, Villicana C. Dental Pulp Stem Cells: Current Advances in Isolation, Expansion and Preservation. *Tissue engineering and regenerative medicine.* 2017;14(4):333-47.
40. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76.
41. Mao X, Liu Y, Chen C, Shi S. Mesenchymal Stem Cells and Their Role in Dental Medicine. *Dent Clin North Am.* 2017;61(1):161-72.
42. Zakrzewski W, Dobrzynski M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):68.
43. Larijani B, Esfahani EN, Amini P, Nikbin B, Alimoghaddam K, Amiri S, et al. Stem cell therapy in treatment of different diseases. *Acta medica Iranica.* 2012;50(2):79-96.

44. Luo X, Wang H, Leighton J, O'Sullivan M, Wang P. Generation of endoderm lineages from pluripotent stem cells. *Regen Med.* 2017;12(1):77-89.
45. Koh PW, Sinha R, Barkal AA, Morganti RM, Chen A, Weissman IL, et al. An atlas of transcriptional, chromatin accessibility, and surface marker changes in human mesoderm development. *Scientific data.* 2016;3:160109.
46. Jadalannagari S, Aljitawi OS. Ectodermal Differentiation of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Tissue engineering Part B, Reviews.* 2015;21(3):314-22.
47. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
48. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell.* 2008;132(4):598-611.
49. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing research reviews.* 2006;5(1):91-116.
50. Yianni V, Sharpe PT. Perivascular-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Dent Res.* 2019;98(10):1066-72.
51. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3(4):393-403.
52. Friedenstein AJ PK, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6(2):230-247.
53. Liu Y, Wang S, Shi S. The role of recipient T cells in mesenchymal stem cell-based tissue regeneration. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(11):2044-50.
54. Liu J, Yu F, Sun Y, Jiang B, Zhang W, Yang J, et al. Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2015;33(3):627-38.
55. Yianni V, Sharpe PT. Perivascular-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Dent Res.* 2019;22034519862258.
56. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy.* 2006;8(4):315-7.
57. Hocking DC. Therapeutic Applications of Extracellular Matrix. *Advances in wound care.* 2015;4(8):441-3.
58. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81(8):531-5.

59. Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2014;32(6):1408-19.
60. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*. 2009;94(2):258-63.
61. Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell stem cell*. 2008;3(3):229-30.
62. Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1998;13(5):828-38.
63. Crisan M, Huard J, Zheng B, Sun B, Yap S, Logar A, et al. Purification and culture of human blood vessel-associated progenitor cells. *Current protocols in stem cell biology*. 2008;Chapter 2:Unit 2B..1-2B..13.
64. Crisan M, Corselli M, Chen WC, Peault B. Perivascular cells for regenerative medicine. *J Cell Mol Med*. 2012;16(12):2851-60.
65. Feng J, Mantesso A, Sharpe PT. Perivascular cells as mesenchymal stem cells. *Expert opinion on biological therapy*. 2010;10(10):1441-51.
66. Schwab KE, Gargett CE. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2007;22(11):2903-11.
67. Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA, Jr., Orellana MD, Freitas MC, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental hematology*. 2008;36(5):642-54.
68. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009;88(9):792-806.
69. Ebrahimi M, Botelho M. Adult Stem Cells of Orofacial Origin: Current Knowledge and Limitation and Future Trend in Regenerative Medicine. *Tissue engineering and regenerative medicine*. 2017;14(6):719-33.
70. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthodontics & craniofacial research*. 2005;8(3):191-9.
71. Ferro F, Spelat R, D'Aurizio F, Puppato E, Pandolfi M, Beltrami AP, et al. Dental pulp stem cells differentiation reveals new insights in Oct4A dynamics. *PLoS One*. 2012;7(7):e41774.
72. Ranganathan K, Lakshminarayanan V. Stem cells of the dental pulp. *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research*. 2012;23(4):558.
73. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of bone and mineral research : the*

official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003;18(4):696-704.

74. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*. 2001;29(6):532-9.

75. Tecles O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J, et al. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch Oral Biol*. 2005;50(2):103-8.

76. Fitzgerald M, Chiego DJ, Jr., Heys DR. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol*. 1990;35(9):707-15.

77. Daniela Ferreira Araujo B, Luciana Oliveira P, Izabel Cristina Rodrigues da S, Ricardo Bentes A, Ana Cristina Barreto B. Culture of human dental pulp cells at variable times post-tooth extraction. *Braz Oral Res*. 2018;32:e003.

78. Mochizuki M, Nakahara T. Establishment of xenogeneic serum-free culture methods for handling human dental pulp stem cells using clinically oriented in-vitro and in-vivo conditions. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):25.

79. Gopinath VK, Soumya S, Jayakumar MN. Osteogenic and odontogenic differentiation potential of dental pulp stem cells isolated from inflamed dental pulp tissues (I-DPSCs) by two different methods. *Acta odontologica Scandinavica*. 2019:1-9.

80. Yu S, Diao S, Wang J, Ding G, Yang D, Fan Z. Comparative analysis of proliferation and differentiation potentials of stem cells from inflamed pulp of deciduous teeth and stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Biomed Res Int*. 2014;2014:930907.

81. Piva E, Tarle SA, Nor JE, Zou D, Hatfield E, Guinn T, et al. Dental Pulp Tissue Regeneration Using Dental Pulp Stem Cells Isolated and Expanded in Human Serum. *J Endod*. 2017;43(4):568-74.

82. Sun HH, Chen B, Zhu QL, Kong H, Li QH, Gao LN, et al. Investigation of dental pulp stem cells isolated from discarded human teeth extracted due to aggressive periodontitis. *Biomaterials*. 2014;35(35):9459-72.

83. Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol*. 2012;57(11):1439-58.

84. Kunimatsu R, Nakajima K, Awada T, Tsuka Y, Abe T, Ando K, et al. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;501(1):193-8.

85. Stevens A, Zuliani T, Olejnik C, LeRoy H, Obriot H, Kerr-Conte J, et al. Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem cells and development*. 2008;17(6):1175-84.

86. d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell death and differentiation*. 2007;14(6):1162-71.
87. Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B, Nakahara T, Ishikawa H, Mitiev V, et al. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. *J Endod*. 2010;36(3):469-74.
88. Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Tanaka T, Nakahara T, Ishikawa H, et al. High-purity hepatic lineage differentiated from dental pulp stem cells in serum-free medium. *J Endod*. 2012;38(4):475-80.
89. Yan X, Qin H, Qu C, Tuan RS, Shi S, Huang GT. iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem cells and development*. 2010;19(4):469-80.
90. Chmilewsky F, Jeanneau C, Laurent P, About I. LPS induces pulp progenitor cell recruitment via complement activation. *J Dent Res*. 2015;94(1):166-74.
91. Avinash K, Malaippan S, Dooraiswamy JN. Methods of Isolation and Characterization of Stem Cells from Different Regions of Oral Cavity Using Markers: A Systematic Review. *International journal of stem cells*. 2017;10(1):12-20.
92. Toth F, Gall JM, Tozser J, Hegedus C. Effect of inducible bone morphogenetic protein 2 expression on the osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in vitro. *Bone*. 2019;132:115214.
93. Graham CM, Kremer KL, Koblar SA, Hamilton-Bruce MA, Pyecroft SB. Dental Pulp Stem Cells - Exploration in a Novel Animal Model: the Tasmanian Devil (*Sarcophilus harrisii*). *Stem cell reviews and reports*. 2018;14(4):500-9.
94. Fernandes TL, Shimomura K, Asperti A, Pinheiro CCG, Caetano HVA, Oliveira C, et al. Development of a Novel Large Animal Model to Evaluate Human Dental Pulp Stem Cells for Articular Cartilage Treatment. *Stem cell reviews and reports*. 2018;14(5):734-43.
95. Gioventu S, Andriolo G, Bonino F, Frasca S, Lazzari L, Montelatici E, et al. A novel method for banking dental pulp stem cells. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2012;47(2):199-206.
96. Ma L, Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Hoshino Y, Song G, et al. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. *PLoS One*. 2012;7(12):e51777.
97. Yi Q, Liu O, Yan F, Lin X, Diao S, Wang L, et al. Analysis of Senescence-Related Differentiation Potentials and Gene Expression Profiles in Human Dental Pulp Stem Cells. *Cells Tissues Organs*. 2017;203(1):1-11.
98. Zhang H, Fazel S, Tian H, Mickle DA, Weisel RD, Fujii T, et al. Increasing donor age adversely impacts beneficial effects of bone marrow but not smooth muscle

myocardial cell therapy. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2005;289(5):H2089-96.

99. Feng X, Xing J, Feng G, Sang A, Shen B, Xu Y, et al. Age-dependent impaired neurogenic differentiation capacity of dental stem cell is associated with Wnt/beta-catenin signaling. *Cellular and molecular neurobiology*. 2013;33(8):1023-31.

100. Brivanlou AH, Gage FH, Jaenisch R, Jessell T, Melton D, Rossant J. Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. *Science*. 2003;300(5621):913-6.

101. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25(11):2739-49.

102. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med*. 2008;3(1):1-5.

103. Sedgley CM, Botero TM. Dental stem cells and their sources. *Dent Clin North Am*. 2012;56(3):549-61.

104. Rodriguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Meseguer L, Ramirez MC, Blanquer M, et al. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *International endodontic journal*. 2011;44(9):800-6.

105. Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene therapy*. 2006;13(7):611-20.

106. Min KS, Park HJ, Lee SK, Park SH, Hong CU, Kim HW, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin sialoprotein and heme oxygenase-1 in human dental pulp. *J Endod*. 2008;34(6):666-70.

107. Qureshi A, E S, Nandakumar, Pratapkumar, Sambashivarao. Recent advances in pulp capping materials: an overview. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2014;8(1):316-21.

108. Chang SW, Lee SY, Ann HJ, Kum KY, Kim EC. Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells. *J Endod*. 2014;40(8):1194-200.

109. He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J, et al. Effects of FGF2 and TGFbeta1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell biology international*. 2008;32(7):827-34.

110. Wang J, Ma H, Jin X, Hu J, Liu X, Ni L, et al. The effect of scaffold architecture on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Biomaterials*. 2011;32(31):7822-30.

111. Yang X, Yang F, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, Jansen JA. The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2010;93(1):247-57.

112. Kwon YS, Lee SH, Hwang YC, Rosa V, Lee KW, Min KS. Behaviour of human dental pulp cells cultured in a collagen hydrogel scaffold cross-linked with cinnamaldehyde. *International endodontic journal*. 2017;50(1):58-66.
113. Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nor JE. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2013;29(1):97-102.
114. Park SJ, Li Z, Hwang IN, Huh KM, Min KS. Glycol chitin-based thermoresponsive hydrogel scaffold supplemented with enamel matrix derivative promotes odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod*. 2013;39(8):1001-7.
115. Huang GT, Shagramanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod*. 2006;32(11):1066-73.
116. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*. 2003;82(12):976-81.
117. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical biochemistry*. 2004;329(1):77-84.
118. Alipour M, Aghazadeh M, Akbarzadeh A, Vafajoo Z, Aghazadeh Z, Raeisdasteh Hokmabad V. Towards osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells on PCL-PEG-PCL/zeolite nanofibrous scaffolds. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2019;47(1):3431-7.
119. Winning L, El Karim IA, Lundy FT. A Comparative Analysis of the Osteogenic Potential of Dental Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells and development*. 2019;28(15):1050-8.
120. Song D, Xu P, Liu S, Wu S. Dental pulp stem cells expressing SIRT1 improve new bone formation during distraction osteogenesis. *American journal of translational research*. 2019;11(2):832-43.
121. Trivedi S, Srivastava K, Saluja TS, Shyam H, Kumar S, Singh A, et al. Hydroxyapatite-collagen augments osteogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Odontology*. 2019.
122. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2005;20(8):1394-402.
123. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod*. 2007;33(6):703-8.
124. Westin CB, Trinca RB, Zuliani C, Coimbra IB, Moraes AM. Differentiation of dental pulp stem cells into chondrocytes upon culture on porous chitosan-xanthan scaffolds in the presence of kartogenin. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2017;80:594-602.

125. Ibarretxe G, Crende O, Aurrekoetxea M, Garcia-Murga V, Etxaniz J, Unda F. Neural crest stem cells from dental tissues: a new hope for dental and neural regeneration. *Stem cells international*. 2012;2012:103503.
126. Ross JJ, Verfaillie CM. Evaluation of neural plasticity in adult stem cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2008;363(1489):199-205.
127. Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature*. 2001;411(6833):42-3.
128. Janebodin K, Horst OV, Ieronimakis N, Balasundaram G, Reesukumal K, Pratumvinit B, et al. Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PLoS One*. 2011;6(11):e27526.
129. Rafiee F, Pourteymourfard-Tabrizi Z, Mahmoudian-Sani MR, Mehri-Ghahfarrokhi A, Soltani A, Hashemzadeh-Chaleshtori M, et al. Differentiation of dental pulp stem cells into neuron-like cells. *The International journal of neuroscience*. 2019:1-10.
130. Zhang J, Lu X, Feng G, Gu Z, Sun Y, Bao G, et al. Chitosan scaffolds induce human dental pulp stem cells to neural differentiation: potential roles for spinal cord injury therapy. *Cell Tissue Res*. 2016;366(1):129-42.
131. Chang CC, Chang KC, Tsai SJ, Chang HH, Lin CP. Neurogenic differentiation of dental pulp stem cells to neuron-like cells in dopaminergic and motor neuronal inductive media. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2014;113(12):956-65.
132. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue engineering*. 2006;12(10):2813-23.
133. Majumdar D, Kanafi M, Bhonde R, Gupta P, Datta I. Differential Neuronal Plasticity of Dental Pulp Stem Cells From Exfoliated Deciduous and Permanent Teeth Towards Dopaminergic Neurons. *Journal of cellular physiology*. 2016;231(9):2048-63.
134. Bonnamain V, Thinard R, Sergent-Tanguy S, Huet P, Bienvenu G, Naveilhan P, et al. Human dental pulp stem cells cultured in serum-free supplemented medium. *Front Physiol*. 2013;4:357.
135. Zou T, Jiang S, Dissanayaka WL, Heng BC, Xu J, Gong T, et al. Sema4D/PlexinB1 promotes endothelial differentiation of dental pulp stem cells via activation of AKT and ERK1/2 signaling. *Journal of cellular biochemistry*. 2019;120(8):13614-24.
136. Aksel H, Huang GT. Human and Swine Dental Pulp Stem Cells Form a Vascularlike Network after Angiogenic Differentiation in Comparison with Endothelial Cells: A Quantitative Analysis. *J Endod*. 2017;43(4):588-95.
137. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, et al. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue engineering*. 2007;13(4):767-73.

138. Lei M, Li K, Li B, Gao LN, Chen FM, Jin Y. Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation. *Biomaterials*. 2014;35(24):6332-43.
139. Govindasamy V, Ronald VS, Abdullah AN, Nathan KR, Ab Aziz ZA, Abdullah M, et al. Differentiation of dental pulp stem cells into islet-like aggregates. *J Dent Res*. 2011;90(5):646-52.
140. Gandia C, Arminan A, Garcia-Verdugo JM, Lledo E, Ruiz A, Minana MD, et al. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells*. 2008;26(3):638-45.
141. Coppe C, Zhang Y, Den Besten PK. Characterization of primary dental pulp cells in vitro. *Pediatric dentistry*. 2009;31(7):467-71.
142. Jiang W, Wang D, Alraies A, Liu Q, Zhu B, Sloan AJ, et al. Wnt-GSK3beta/beta-Catenin Regulates the Differentiation of Dental Pulp Stem Cells into Bladder Smooth Muscle Cells. *Stem cells international*. 2019;2019:8907570.
143. Garzon I, Martin-Piedra MA, Alaminos M. Human Dental Pulp Stem Cells. A promising epithelial-like cell source. *Medical hypotheses*. 2015;84(5):516-7.
144. Karaoz E, Demircan PC, Saglam O, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochemistry and cell biology*. 2011;136(4):455-73.
145. Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, et al. A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells*. 2008;26(9):2408-18.
146. Moreno-Hidalgo MC, Caleza-Jimenez C, Mendoza-Mendoza A, Iglesias-Linares A. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis. *International endodontic journal*. 2014;47(4):321-31.
147. Liang Z, Kawano S, Chen W, Sadrkhani MS, Lee C, Kim E, et al. Minced Pulp as Source of Pulpal Mesenchymal Stem Cells with Odontogenic Differentiation Capacity. *J Endod*. 2018;44(1):80-6.
148. Chueh LH, Ho YC, Kuo TC, Lai WH, Chen YH, Chiang CP. Regenerative endodontic treatment for necrotic immature permanent teeth. *J Endod*. 2009;35(2):160-4.
149. Jeeruphan T, Jantararat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves KM. Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: a retrospective study. *J Endod*. 2012;38(10):1330-6.
150. Kim SG, Malek M, Sigurdsson A, Lin LM, Kahler B. Regenerative endodontics: a comprehensive review. *International endodontic journal*. 2018;51(12):1367-88.
151. Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta odontologica Scandinavica*. 1961;19:324-53.

152. Myers WC, Fountain SB. Dental pulp regeneration aided by blood and blood substitutes after experimentally induced periapical infection. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1974;37(3):441-50.
153. Lin LM, Rosenberg PA. Repair and regeneration in endodontics. *International endodontic journal*. 2011;44(10):889-906.
154. Simon SR, Tomson PL, Berdal A. Regenerative endodontics: regeneration or repair? *J Endod*. 2014;40(4 Suppl):S70-5.
155. Becerra P, Ricucci D, Loghin S, Gibbs JL, Lin LM. Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. *J Endod*. 2014;40(1):133-9.
156. Martin G, Ricucci D, Gibbs JL, Lin LM. Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *J Endod*. 2013;39(1):138-44.
157. Chen MY, Chen KL, Chen CA, Tayebaty F, Rosenberg PA, Lin LM. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *International endodontic journal*. 2012;45(3):294-305.
158. Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJ, Cooper PR. Epigenetic modulation of dental pulp stem cells: implications for regenerative endodontics. *International endodontic journal*. 2016;49(5):431-46.
159. Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcified tissue international*. 2000;66(2):129-38.
160. Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(2):605-15.
161. Iohara K, Zheng L, Ito M, Ishizaka R, Nakamura H, Into T, et al. Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31(-)/CD146(-) side population cells from a canine tooth. *Regen Med*. 2009;4(3):377-85.
162. Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, Watanabe A, Nabekura J, Ito M, et al. Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with stromal cell-derived factor-1. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(15-16):1911-20.
163. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008;34(8):962-9.
164. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res*. 2010;89(8):791-6.

165. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.* 2008;34(6):645-51.
166. Sloan AJ, Perry H, Matthews JB, Smith AJ. Transforming growth factor-beta isoform expression in mature human healthy and carious molar teeth. *The Histochemical journal.* 2000;32(4):247-52.
167. Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod.* 2008;34(4):421-6.
168. Mehrazarin S, Oh JE, Chung CL, Chen W, Kim RH, Shi S, et al. Impaired odontogenic differentiation of senescent dental mesenchymal stem cells is associated with loss of Bmi-1 expression. *J Endod.* 2011;37(5):662-6.
169. Pereira LO, Rubini MR, Silva JR, Oliveira DM, Silva IC, Pocas-Fonseca MJ, et al. Comparison of stem cell properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps. *International endodontic journal.* 2012;45(12):1080-90.
170. American Association of E. Glossary of endodontic terms. Chicago, Ill.: American Association of Endodontists; 2003.
171. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):428-35.
172. Zanini M, Meyer E, Simon S. Pulp Inflammation Diagnosis from Clinical to Inflammatory Mediators: A Systematic Review. *J Endod.* 2017;43(7):1033-51.
173. Eleazer P. D. GGN, CmClanahan S.B., Webb T. D., Justman B. C. Glossary of Endodontic Terms. Chicago, IL: American Association of Endodontists; 2015. p. 41.
174. Fouad AF, Levin L. G. Pulpal Reactions to Caries and Dental Procedures. In: Hargreaves KM, Berman L. H., editor. *Cohen's Pathways Of The Pulp.* Eleventh Edition. St. Louis, Missouri: Elsevier Inc; 2016.
175. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists.* 1998;9(2):179-200.
176. Di Nardo Di Maio F, Lohinai Z, D'Arcangelo C, De Fazio PE, Speranza L, De Lutiis MA, et al. Nitric oxide synthase in healthy and inflamed human dental pulp. *J Dent Res.* 2004;83(4):312-6.
177. Hahn CL, Liewehr FR. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *J Endod.* 2007;33(3):213-9.
178. Garcia-Castro J, Trigueros C, Madrenas J, Perez-Simon JA, Rodriguez R, Menendez P. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. *J Cell Mol Med.* 2008;12(6b):2552-65.

179. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*. 2002;20(6):530-41.
180. Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*. 2008;26(7):1787-95.
181. Gay I, Cavender A, Peto D, Sun Z, Speer A, Cao H, et al. Differentiation of human dental stem cells reveals a role for microRNA-218. *Journal of periodontal research*. 2014;49(1):110-20.
182. Niu LN, Sun JQ, Li QH, Jiao K, Shen LJ, Wu D, et al. Intrafibrillar-silicified collagen scaffolds enhance the osteogenic capacity of human dental pulp stem cells. *Journal of dentistry*. 2014;42(7):839-49.
183. Ferrua CP, Centeno EGZ, Rosa LCD, Amaral CCD, Severo RF, Sarkis-Onofre R, et al. How has dental pulp stem cells isolation been conducted? A scoping review. *Braz Oral Res*. 2017;31:e87.
184. Pisciotta A, Carnevale G, Meloni S, Riccio M, De Biasi S, Gibellini L, et al. Human dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. *BMC developmental biology*. 2015;15:14.
185. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Proto A, Giuliano MT, Pirozzi G, et al. Human CD34+ stem cells produce bone nodules in vivo. *Cell proliferation*. 2008;41(1):1-11.
186. Luo Z, Kohli MR, Yu Q, Kim S, Qu T, He WX. Biodentine induces human dental pulp stem cell differentiation through mitogen-activated protein kinase and calcium-/calmodulin-dependent protein kinase II pathways. *J Endod*. 2014;40(7):937-42.
187. Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CM. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*. 2012;64(2):109-30.
188. Jaroszeski MJ, Radcliff G. Fundamentals of flow cytometry. *Molecular biotechnology*. 1999;11(1):37-53.
189. Givan AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2011;699:1-29.
190. Dawson HD, Lunney JK. Porcine cluster of differentiation (CD) markers 2018 update. *Research in veterinary science*. 2018;118:199-246.
191. Ip JE, Wu Y, Huang J, Zhang L, Pratt RE, Dzau VJ. Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Molecular biology of the cell*. 2007;18(8):2873-82.
192. Hunsucker SA, Mitchell BS, Spychala J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacology & therapeutics*. 2005;107(1):1-30.
193. Eliceiri BP. Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circulation research*. 2001;89(12):1104-10.
194. J.W. G. *Monoclonal Antibodies* Melbourne: Elsevier Ltd.

195. Delong R. K. ZQ. *Introductory Experiments on Biomolecules and their Interactions*. United States of Amerika: Elsevier Inc.; 2016.
196. Eslami A, Lujan J. Western blotting: sample preparation to detection. *J Vis Exp*. 2010(44).
197. Blevins T. *Northern Blotting Techniques for Small RNAs*. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2017;1456:141-62.
198. R S. *Electroporation-Based Therapies for Cancer: From basics to clinical applications* United Kingdom: Elsevier; 2014.
199. Arnon R. MA. *Translational Neuroimmunology in Multiple Sclerosis*. London, San Diego, Cambridge, Oxford: Elsevier Inc. ; 2016.
200. Xiao L, Nasu M. From regenerative dentistry to regenerative medicine: progress, challenges, and potential applications of oral stem cells. *Stem cells and cloning : advances and applications*. 2014;7:89-99.
201. Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivotto M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993;82(7):2031-7.
202. Ferro F, Spelat R, Baheney CS. Dental pulp stem cell (DPSC) isolation, characterization, and differentiation. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2014;1210:91-115.
203. Kumar S, Chanda D, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells. *Gene therapy*. 2008;15(10):711-5.
204. Shi X, Mao J, Liu Y. Concise review: Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: Biological characteristics and therapeutic applications. *Stem cells translational medicine*. 2020.
205. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*. 2007;33(4):377-90.
206. Horibe H, Murakami M, Iohara K, Hayashi Y, Takeuchi N, Takei Y, et al. Isolation of a stable subpopulation of mobilized dental pulp stem cells (MDPSCs) with high proliferation, migration, and regeneration potential is independent of age. *PLoS One*. 2014;9(5):e98553.
207. Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *Journal of cellular physiology*. 2006;208(2):319-25.
208. Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, et al. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res*. 2013;353(1):65-78.
209. Wang H, Zhong Q, Yang T, Qi Y, Fu M, Yang X, et al. Comparative characterization of SHED and DPSCs during extended cultivation in vitro. *Molecular medicine reports*. 2018;17(5):6551-9.

210. Boyle M, Chun C, Strojny C, Narayanan R, Bartholomew A, Sundivakkam P, et al. Chronic inflammation and angiogenic signaling axis impairs differentiation of dental-pulp stem cells. *PLoS One*. 2014;9(11):e113419.
211. Molinie N, Gautreau A. Directional Collective Migration in Wound Healing Assays. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2018;1749:11-9.
212. Ma D, Cui L, Gao J, Yan W, Liu Y, Xu S, et al. Proteomic analysis of mesenchymal stem cells from normal and deep carious dental pulp. *PLoS One*. 2014;9(5):e97026.
213. Yazid FB, Gnanasegaran N, Kunasekaran W, Govindasamy V, Musa S. Comparison of immunomodulatory properties of dental pulp stem cells derived from healthy and inflamed teeth. *Clinical oral investigations*. 2014;18(9):2103-12.
214. Ma D, Gao J, Yue J, Yan W, Fang F, Wu B. Changes in proliferation and osteogenic differentiation of stem cells from deep caries in vitro. *J Endod*. 2012;38(6):796-802.
215. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *Journal of dentistry*. 2010;38(9):687-97.
216. da Rosa WLO, Piva E, da Silva AF. Disclosing the physiology of pulp tissue for vital pulp therapy. *International endodontic journal*. 2018;51(8):829-46.
217. Strojny C, Boyle M, Bartholomew A, Sundivakkam P, Alapati S. Interferon Gamma-treated Dental Pulp Stem Cells Promote Human Mesenchymal Stem Cell Migration In Vitro. *J Endod*. 2015;41(8):1259-64.
218. Tran-Hung L, Laurent P, Camps J, About I. Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch Oral Biol*. 2008;53(1):9-13.
219. Meza G, Urrejola D, Saint Jean N, Inostroza C, Lopez V, Khoury M, et al. Personalized Cell Therapy for Pulpitis Using Autologous Dental Pulp Stem Cells and Leukocyte Platelet-rich Fibrin: A Case Report. *J Endod*. 2019;45(2):144-9.
220. Taha NA, Abdelkhalder SZ. Outcome of full pulpotomy using Biodentine in adult patients with symptoms indicative of irreversible pulpitis. *International endodontic journal*. 2018;51(8):819-28.
221. Bindal P, Gnanasegaran N, Bindal U, Haque N, Ramasamy TS, Chai WL, et al. Angiogenic effect of platelet-rich concentrates on dental pulp stem cells in inflamed microenvironment. *Clinical oral investigations*. 2019;23(10):3821-31.
222. Mullane EM, Dong Z, Sedgley CM, Hu JC, Botero TM, Holland GR, et al. Effects of VEGF and FGF2 on the revascularization of severed human dental pulps. *J Dent Res*. 2008;87(12):1144-8.
223. Xue D, Gong Z, Zhu F, Qiu Y, Li X. Simvastatin increases cell viability and suppresses the expression of cytokines and vascular endothelial growth factor in inflamed human dental pulp stem cells in vitro. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*. 2018;27(12):1615-23.

224. Tomas-Catala CJ, Collado-Gonzalez M, Garcia-Bernal D, Onate-Sanchez RE, Forner L, Llena C, et al. Biocompatibility of New Pulp-capping Materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. *J Endod.* 2018;44(1):126-32.
225. Yang X, van der Kraan PM, Bian Z, Fan M, Walboomers XF, Jansen JA. Mineralized tissue formation by BMP2-transfected pulp stem cells. *J Dent Res.* 2009;88(11):1020-5.
226. Yamada Y, Ito K, Nakamura S, Ueda M, Nagasaka T. Promising cell-based therapy for bone regeneration using stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow. *Cell transplantation.* 2011;20(7):1003-13.
227. Mangano C, De Rosa A, Desiderio V, d'Aquino R, Piattelli A, De Francesco F, et al. The osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells and bone formation on different titanium surface textures. *Biomaterials.* 2010;31(13):3543-51.
228. Ikeda H, Sumita Y, Ikeda M, Ikeda H, Okumura T, Sakai E, et al. Engineering bone formation from human dental pulp- and periodontal ligament-derived cells. *Annals of biomedical engineering.* 2011;39(1):26-34.
229. Sevari SP, Shahnazi F, Chen C, Mitchell JC, Ansari S, Moshaverinia A. Bioactive glass-containing hydrogel delivery system for osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Journal of biomedical materials research Part A.* 2020;108(3):557-64.
230. Ratajczak J, Bronckaers A, Dillen Y, Gervois P, Vangansewinkel T, Driesen RB, et al. The Neurovascular Properties of Dental Stem Cells and Their Importance in Dental Tissue Engineering. *Stem cells international.* 2016;2016:9762871.
231. Bronckaers A, Hilkens P, Fanton Y, Struys T, Gervois P, Politis C, et al. Angiogenic properties of human dental pulp stem cells. *PLoS One.* 2013;8(8):e71104.
232. Hilkens P, Fanton Y, Martens W, Gervois P, Struys T, Politis C, et al. Pro-angiogenic impact of dental stem cells in vitro and in vivo. *Stem cell research.* 2014;12(3):778-90.
233. Martens W, Bronckaers A, Politis C, Jacobs R, Lambrichts I. Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: an update. *Clinical oral investigations.* 2013;17(9):1969-83.
234. Yamamoto A, Sakai K, Matsubara K, Kano F, Ueda M. Multifaceted neuro-regenerative activities of human dental pulp stem cells for functional recovery after spinal cord injury. *Neuroscience research.* 2014;78:16-20.
235. Nakashima M, Iohara K, Sugiyama M. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytokine & growth factor reviews.* 2009;20(5-6):435-40.
236. Wang Y, Pan J, Wang D, Liu J. The Use of Stem Cells in Neural Regeneration: A Review of Current Opinion. *Current stem cell research & therapy.* 2018;13(7):608-17.

237. Apel C, Forlenza OV, de Paula VJ, Talib LL, Denecke B, Eduardo CP, et al. The neuroprotective effect of dental pulp cells in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Journal of neural transmission* (Vienna, Austria : 1996). 2009;116(1):71-8.
238. Carnevale G, Riccio M, Pisciotta A, Beretti F, Maraldi T, Zavatti M, et al. In vitro differentiation into insulin-producing beta-cells of stem cells isolated from human amniotic fluid and dental pulp. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2013;45(8):669-76.
239. Kanafi MM, Rajeshwari YB, Gupta S, Dadheech N, Nair PD, Gupta PK, et al. Transplantation of islet-like cell clusters derived from human dental pulp stem cells restores normoglycemia in diabetic mice. *Cytotherapy*. 2013;15(10):1228-36.
240. Galkowski D, Ratajczak MZ, Kocki J, Darzynkiewicz Z. *Of Cytometry, Stem Cells and Fountain of Youth*. *Stem cell reviews and reports*. 2017;13(4):465-81.
241. Stoner SA, Duggan E, Condello D, Guerrero A, Turk JR, Narayanan PK, et al. High sensitivity flow cytometry of membrane vesicles. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2016;89(2):196-206.
242. Adams V, Challen GA, Zuba-Surma E, Ulrich H, Vereb G, Tarnok A. Where new approaches can stem from: focus on stem cell identification. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2009;75(1):1-3.
243. Aydin S, Sahin F. Stem Cells Derived from Dental Tissues. *Advances in experimental medicine and biology*. 2019;1144:123-32.
244. Airas L, Hellman J, Salmi M, Bono P, Puurunen T, Smith DJ, et al. CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *The Journal of experimental medicine*. 1995;182(5):1603-8.
245. Rege TA, Hagood JS. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(8):1045-54.
246. Rius C, Smith JD, Almendro N, Langa C, Botella LM, Marchuk DA, et al. Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood*. 1998;92(12):4677-90.
247. Kawashima N, Noda S, Yamamoto M, Okiji T. Properties of Dental Pulp-derived Mesenchymal Stem Cells and the Effects of Culture Conditions. *J Endod*. 2017;43(9s):S31-s4.
248. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. *An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2019;1897:299-311.
249. Yang WZ, Yu WY, Chen T, Wang XF, Dong F, Xie ME, et al. A Single-Cell Immunofluorescence Method for the Division Patterns Research of Mouse Bone

Marrow-Derived Hematopoietic Stem Cells. *Stem cells and development*. 2019;28(14):954-60.

250. Rossdale PD, Ricketts SW. *Equine stud farm medicine*. London: Bailliere Tindall.; 1980. ix + 564pp. p.

251. Hayflick L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Experimental cell research*. 1965;37:614-36.

252. Ning T, Shao J, Zhang X, Luo X, Huang X, Wu H, et al. Ageing affects the proliferation and mineralization of rat dental pulp stem cells under inflammatory conditions. *International endodontic journal*. 2020;53(1):72-83.

253. Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Iida K, Hatakeyama D, et al. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. *J Dent Res*. 2008;87(7):676-81.

254. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*. 2006;184(3-4):105-16.

255. Spath L, Rotilio V, Alessandrini M, Gambará G, De Angelis L, Mancini M, et al. Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. *J Cell Mol Med*. 2010;14(6B):1635-44.

256. Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*. 2006;324(2):225-36.

257. Collart-Dutilleul PY, Chaubron F, De Vos J, Cuisinier FJ. Allogenic banking of dental pulp stem cells for innovative therapeutics. *World journal of stem cells*. 2015;7(7):1010-21.

258. Hewitt RE. Biobanking: the foundation of personalized medicine. *Current opinion in oncology*. 2011;23(1):112-9.

259. Pilbauerova N, Suchanek J. Cryopreservation of Dental Stem Cells. *Acta medica (Hradec Kralove)*. 2018;61(1):1-7.

260. Lee SY, Chiang PC, Tsai YH, Tsai SY, Jeng JH, Kawata T, et al. Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells. *J Endod*. 2010;36(8):1336-40.