

T.C.

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ, DİŞ, ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ ANABİLİM
DALI



**DİŞETİ VE DENTAL FOLİKÜL DOKULARINDA MEZENKİMAL
KÖK HÜCRE ARAŞTIRILMASI VE PLASTİSİTELERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Dt. Tamer EROĞLU

Ankara-2008

T.C.

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ, DİŞ, ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ ANABİLİM
DALI



**DİŞETİ VE DENTAL FOLİKÜL DOKULARINDA MEZENKİMAL
KÖK HÜCRE ARAŞTIRILMASI VE PLASTİSİTELERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Dt. Tamer EROĞLU

DANIŞMAN

Prof. Dr. İ. Sina UÇKAN

TÜBİTAK Proje No: 108S107

Ankara-2008

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Dalında Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:25/08/2008

“Dişeti ve Dental Folikül Dokularında Mezenkimal Kök Hücre Araştırılması ve Plastisitelerinin Karşılaştırılması”

TEZ DANIŞMANI: PROF.DR.SİNA UÇKAN

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof.Dr. Kenan Araz

Prof.Dr.Celal Tümer

Prof.Dr.Sina Uçkan

Doç.Dr.Özgür Pektaş

Yrd.Doç.Dr.Firdevs Veziroğlu

ONAY:Bu tez Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu’nun ..11../9../2008.. tarih SABA /2008/079 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.


Prof.Dr.Rengin Erdal
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Mezenkimal kök hücreler, rejeneratif potansiyelleri, immünsupresif özellikleri ve destek doku oluşturma potansiyelleri nedeniyle hücresel tedavi için ilgi çekmektedir. Kemik iliği, göbek kordonu, çevre kanı, amniotik sıvı, periost, yağ dokusu, sinovial membran ve kas gibi birçok kaynaktan elde edilebildiği gibi maksillofasiyal bölgede de MKH izolasyonu ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Ağız ortamında en kolay ulaşılan bölgelerden biri olan ve sürekli yenilenmekte olan dişetin MKH'ler için potansiyel bir kaynak olabileceğiyle ilgili bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Ayrıca dental folikül dokusundan MSC izolasyonu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmada, çekim endikasyonu konulmuş gömülü 20 yaş dişi olan 6 hastada insizyon esnasında çıkarılan dişetinden ve dental folikül dokusundan alınan doku örneklerinden hücre kültürü yapılmış ve tüm örneklerden adezyon özelliği gösteren MKH'lerin izolasyonu yapılmış ve kültürde çoğaltılmıştır. Akım sitometri yöntemi ile hücrelerin immünofenotipleri tanımlanmış ve adiposit, osteosit, kondrosit ve nöronal hücrelere farklılaşabilme potansiyelleri araştırılmıştır. Her iki dokudan da geliştirilen MKH'lerin CD105, CD 73, CD 90 gibi stromal antijenleri yüksek oranda (%60-98) taşıdığı gösterilmiştir. Hücreler kültürde 8. pasajla kadar ilerletilmiş ve analizler 2, 5 ve 8. pasajlarda yapılmıştır. Pasajlar arasında yüzey antijen ekspresyonları yönünden farklılık saptanmamıştır. Kültürde çeşitli uyaranlar kullanılarak yapılan farklılaşma deneylerinde dişeti ve folikülden elde edilen hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitelerinin bulunduğu gösterilmiş, kondrojenik farklılaşma elde edilmemiştir. Ayrıca, uygun uyaranlar ile nöronal hücre morfolojisine değişme olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmalarda dişeti ve dental folikül dokularından elde edilen MKH lere ait farklılık gözlenmemiştir. Fibroblastlar ile birçok ortak özellik taşıyan MKH'lerin fibroblasttan ayrımı için, kültürde hücre yoğunluğunun, adezyon özelliklerinin, yüzey antijen ekspresyonlarının ve farklılaşma özelliklerinin detaylı karşılaştırması yapılmıştır. Başlangıç hücre yoğunluğu, erken veya geç adezyon göstermeleri ve yüzey antijenleri yönünden fibroblast ve MKH'lerin ayırt

edilmesine katkıda bulunacak bir farklılık saptanmamıştır. Hücrelerin kök/projenitör özelliğini göstermesi açısından en önemli özellik olan çok yönlü farklılaşma kapasiteleri test edildiğinde (8. pasaj kadar), ileri pasajlarda da farklılaşma kapasitesinin korunmasının hücrelerin kök/projenitör özellikleri ile uyumlu olduğu, böylelikle genellikle 3.pasajdan sonra farklılaşma özelliği bulunmayan fibroblastlardan ayırt edilebileceği düşünüldü. Elde edilen sonuçlar, dişeti dokusunun noninvaziv metodla elde edilebilmesi ve defekt bölgesine yakın olması ile bilinen ağız içi kaynaklara ek bir MKH kaynağı olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, dişeti, folikül, farklılaşma, fibroblast

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells draw attention for cell based therapy with their regenerative, and tissue supporting potential and immunosuppressive characteristics. MSCs can be isolated from several tissues such as bone marrow, umbilical cord, peripheral blood, amniotic fluid, periosteum, fat, synovial membrane and muscle. Like in different tissues, suitable MSC resources at the maxillofacial region have been investigated and related reports are published in the literature. No studies have been published in the literature about the gingival tissue which is the most easiest approachable site in the oral cavity with a high regeneration potential. Furthermore, isolation of MSCs from dental follicle tissues have been described in a few number of studies. In this study, impacted third molars of 6 patients were extracted in a routine surgical procedure and gingival/ dental follicle tissue samples was obtained during the incision and extraction period. Along all samples, MSCs with an adhesion property have been isolated and expanded in culture. Immunophenotyping was performed by flow cytometry and adipocyte, osteocyte, chondrocyte, and neuronal differentiation potential of these stem cells were tested and the characteristics of gingival and follicle stem cells were compared. It has been demonstrated that MSCs obtained from both tissues have a high frequency of specific stromal antigens (%60-98) such as CD105, CD 73, CD 90.

Cells have been expanded through passage 8 and characterized at 2. 5. 8. passages. No difference have been determined about surface antigen expression speciality between the passages. Differentiation assays with various stimulants in the culture points out that dental follicle and gingiva derived cells have adipogenic and osteogenic differentiation capacity however there was no evidence of chondrogenic differentiation. Furthermore, with suitable stimulants alteration to neuronal cell morphology was observed. In this study there was no difference between the differentiation potentials of MSCs derived from gingival and dental follicle tissue. Because of their similarities, the detailed comparison of plating density, adhesion properties, surface antigen expressions and differentiation potentials have been performed to distinguish

MSCs from fibroblasts. Initial plating density, early or late adhesion properties and surface antigen expressions did not contribute to distinguish MSCs from fibroblasts. Multilineage differentiation potential through the late passages is one of the most important criteria to distinguish MSCs from fibroblasts. The differentiation potential of gingiva and dental follicle derived cells through passage 8 denoted the MSC/progenitor specialities of these cells. Besides the differentiation potential of fibroblasts usually ends at the passage 3. In this study MSCs continuing differentiation through passage 8 was the most important criteria to separate these cells from fibroblasts which has a differentiation potential through passage 3.

Obtained results suggest that the gingival tissue is considered as an alternative source of stem cells to the other intraoral stem cell sources with it is in close proximity to the recipient site and can be obtained easily by a non-invasive method.

Key Words: Mesenchymal stem cells, gingiva, dental follicle, differentiation, fibroblasts

İÇİNDEKİLER

İç kapak

Kabul ve onay

Özet.....iv

Abstract.....vi

İçindekiler.....viii

Kısaltmalar ve Simgeler.....ix

Şekiller.....x

Tablolar.....xiii

1. GİRİŞ.....1

2. GENEL BİLGİ.....3

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....23

4. BULGULAR.....33

5. TARTIŞMA.....47

6. SONUÇ.....56

7. KAYNAKLAR.....58

KISALTMALAR VE SİMGELER

ALP: Alkalen Fosfataz

bFGF: Basic Fibroblast Growth Factor

BHA: Butylated Hydroxyanisole

DMEM-LG: Dulbecco's Modified Eagle Medium With Low Glucose

DMEM-HG: Dulbecco's Modified Eagle Medium With High Glucose

DMSO: Dimetilsülfoksit

DNA: Deoksi-ribo-nükleik Asid

EDTA: Etilendiamintetraasetikasid

FITC: Floresan izothiosiyanat

FSK: Forskolin

FCS: Fetal Calf Serum

FBS: Fetal Bovine Serum

ITS+Premix: İnsulin Transferin Selenium

ISCT: International Society of Cellular Therapy

IBMX: İsobutylmethylxanthine

KCl: Potasyum Klorür

MKH: Mezenkimal kök hücre

MSCs: Mesenchymal Stem Cells

PBS: Phosphate Buffer Saline

PE: Phycoerythrin

TGF β 3: Transforming Growth Factor Beta 3

VA: Valproic Acid

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 2.1. Blastosist ve iç hücre kitlesi.....	4
Şekil 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin sahip oldukları farklılaşabilme potansiyellerinin şematik olarak gösterilmesi.....	9
Şekil 2.3. Ağız kavitesinin erken embriyolojik dönemdeki gelişimi. Taralı alanlar primer epitelyal banda işaret etmektedir.....	14
Şekil 2.4. Gelişmekte olan kafa bölgesinin anterior kısmından alınan koronal yöndeki kesit. A , dental ve vestibuler laminanın kesitteki pozisyonu okla gösterilmiştir. B , Belirtilen kısmın büyütülmüş hali.....	15
Şekil 2.5. Embriyolojik dönemde gelişmekte olan kafa bölgesinin sagittal yöndeki kesiti. A , Primer epitelyal bandın ektomezenkimal bağ dokusuna doğru kalınlaşması görülmektedir. B , Belirtilen bölgenin büyütülmüş hali	15
Şekil 2.6. Diş gelişiminin erken dönem çan aşamasındaki histolojik görünümü. Dental laminadan gelişen mine (enamel) organ ve ektomezenkimal dokudan köken alan dental papilla gelişmeye devam etmekte ve dental folikül dokusunun bu dokuları çevrelediği görülmektedir. Ayrıca dental lamina uzantısından gelişen daimi diş germinin de yavaş yavaş şekillendiği görülmekte.....	16
Şekil 2.7. Dişeti dokusunun morfolojisi.....	19
Şekil 2.8. Oral epitelin elektron mikroskobu altındaki görüntüsü.....	19
Şekil 3.1. Gömülü 20 yaş diş etrafında bir kese gibi bulunan dental folikül dokusunun (kesikli çizgiyle belirtilmiş) elde edilmesi ve insizyon esnasında çıkarılan dişeti.....	23

Şekil 3.2. Kültür çalışmalarının yapıldığı laminar flow (biosafety cabinet classII) cihazı.....	24
Şekil 3.3. Doku örneklerinin bistüri ucu ile mekanik olarak parçalanması.....	25
Şekil 3.4. Fiziksel olarak parçalanmış dokular kollojenaz tip-1 (3 µg/ml) ve dispaz (4 µg/ml) karışımı ile 37° C 'lik çalkalamalı su banyosunda 1 saat süresince enzimatik olarak parçalanmaya bırakılması.....	25
Şekil 3.5. Fiziksel ve enzimatik olarak parçalanmış doku örneklerinin 70 µm çapındaki steril nylon mesh'lerden (BD, USA) geçirilmesi.....	26
Şekil 3.6. Hücre sayımı ve canlılık analizi için trypan mavisi ile boyanan hücre solüsyonu thoma lamına konuldu ve inverted mikroskobu altında değerlendirildi.....	27
Şekil 3.7. Hücre kültürleri %5 CO ₂ , 37°C'lik ve %95 nem içeren inkübatörler içerisine yerleştirilerek inkübasyona alındı.....	27
Şekil 3.8. Fazla olan hücreler, sıvı nitrojen tankı içerisinde muhafaza edildi....	28
Şekil 3.9. Hücre kültür çalışmalarını özetleyen şematik çizim.....	29
Şekil 4.1. Hücre kültüründe , (a) iğsi fenotip hücre popülasyonunun oluşturduğu kolonilerin inverted mikroskop ile alınan görüntüleri (x4). (b) Koloni oluşturan hücre popülasyonunun yakından görüntüsü(x20).....	34
Şekil 4.2. İğsi yapıda olmayıp farklı morfolojiye sahip hücre popülasyonu (okla belirtilmiştir). Kesikli çizgilerle işaretlenen alanda farklı morfolojideki hücre popülasyonu ile iğsi hücrelerin oluşturduğu kolonilerin iç içe geçtiği görülmekte.....	35

- Şekil 4.3.** İnverted mikroskobu altında, **(a)** düşük hücre yoğunluğunda yapılan kültürlerde, hücrelerin daha çok basit koloniler oluşturarak çoğaldıkları, **(b)** yüksek yoğunlukta hücrelerin doku kültür kabı yüzeyine geniş bir şekilde dağıldıkları ve bazı bölgelerde kolonilerin iç içe geçtikleri görüldü.....37
- Şekil 4.4.** Kültür örneklerinin, hücre büyüklüğü ve granülitesine göre homojen bir hücre popülasyonu içerdikleri görüldü.....38
- Şekil 4.5.** Bakılan yüzey antijenlerinin dişeti, dental folikül ve geç yapışan hücre örneklerindeki sonuçlar.....39-41
- Şekil 4.6.** Üzerinde herhangi bir işlem yapılmamış, dokudan izole edilip kültüre ekilmeden incelenen hücrelerin yüzey antijen ekspresyonu.....42
- Şekil 4.7.** Adipojenik vasat içinde uyarılan dişeti dokusu kaynaklı hücrelerin, kültürün ilerleyen günlerinde yuvarlak, yağ damlacıkları oluşturmaları ve Oil Red O boyası ile pozitif boyanmaları görülmekte.....44
- Şekil 4.8.** Dişeti dokusu kaynaklı hücrelerin, osteojenik vasat içerisinde kültür edildiklerinde Alizarin red S boyası ile boyanan çok sayıda amorf kalsiyum fosfat depolanmalarının görüntülenmesi.....45
- Şekil 4.9.** Dişeti dokusuna ait hücrelerin nörojenik vasatta indüksiyonundan sonra elde edilen görüntüler. Hücrelerin morfolojisinde saatler içerisinde nöronal morfolojiye uyumlu şekilde yuvarlaklaşmalar, akson ve dendirit benzeri sitoplazmik uzantıyla uyumlu değişiklikler gözlemlendi.....46

TABLÖLER

Sayfa No

Tablo 2.1. ISCT (International Society of Cellular Therapy) tarafından MKH tanımlaması için gerekli kriterlerin özeti.....7

Tablo 4.1. Farklı hücre yoğunluklarında gerçekleştirilen kültür örneklerinin, elde edilen ortalama hücre sayılarına ve hücrelerin çoğalması için gerekli ortalama sürelerle göre kıyaslanması.....36

Tablo 4.2. Akım sitometri ile yüzey markerlarına bakılan örneklerden elde edilen sonuçlar.....43

1. GİRİŞ

Kök hücreler insan vücudunda bütün dokuları ve organları oluşturan ana hücrelerdir. Henüz farklılaşmamış olan bu hücrelerin, sınırsız bölünebilme, kendini yenileyebilme, organ ve dokulara dönüşebilme yeteneğine sahip oldukları gösterilmiştir (1-5). Bilim ve teknolojideki son gelişmeler doğrultusunda kök hücrelerin kanser, sinir sistemi hastalıkları ve hasarları, metabolik hastalıklar, romatizmal hastalıklar, kalp hastalıkları, kemik hastalıkları ve daha birçok alanda kullanılması gündeme gelmiştir. Rejeneratif tıp açısından büyük umutlar beslenen kök hücrelere ilişkin araştırmalar gerek laboratuvar gerekse klinik düzeyde hızla devam etmektedir (6, 7).

Embriyonik kök hücreler sahip oldukları farklılaşma potansiyeli açısından çok iyi bir kaynak olsa da embriyoya ait dokuların kullanımı ile ilgili etik sorunlar ve neoplastik potansiyel taşımaları (teratoma) nedeniyle kullanımına kısıtlamalar getirilmiş (8-11) ve alternatif olarak erişkin kök hücre diye adlandırılan ve somatik dokulardan elde edilen kök hücre kaynakları, özellikle de mezenkimal kök hücreler (MKH) önem kazanmıştır (5).

Mezenkimal kök hücreler, başta konnektif doku hücreleri olmak üzere çeşitli dokulara farklılaşma potansiyeli taşımaları (5, 12-15) , solubl faktörler salgılayarak, aynı zamanda ekstraselüler matriks ile ve hücreler arası adeziv bağlantılar sağlayarak diğer hücrelere destek sağlamaları (16-18) , immünmodulator, çoğunlukla immünsupresif etki göstermeleri (19-21) , in-vitro ortamda kolay çoğaltılabilir olmaları, gen transferi kolaylığı olması ve defekt bölgelerine mobilizasyon göstermeleri nedeniyle klinik kullanım için ilgi çekmektedir (22-25).

Mezenkimal kök hücreler insan vücudunda kemik iliği, göbek kordonu, çevre kanı, amniotik sıvı, periost, yağ dokusu, sinovial membran ve kas gibi birçok kaynaktan elde edilebilmektedir. Oral ve maksillofasiyal bölgede de

alternatif MKH kaynakları araştırılmaktadır. Bu bölgede dental pulpa, eksfoliye süt dişi, dental folikül, periodontal ligament gibi farklı dokulardan MKH'ler elde edilmesine ait çalışmalar bildirilmiştir (26-35). Oral ve maksillofasiyal defektlerde, bölgesel dokulardan elde edilen kök hücrelerin, elde edilme kolaylığı yanında lokal mikro çevre ortamında olmaya bağlı olarak bölgeye spesifik patolojilerin giderilmesi için avantaj sağlayacağı düşünülmektedir (36). Bu çalışmanın amacı, ihtiyaç duyulan her yaşta invaziv bir yöntem gerektirmeden kolaylıkla elde edilebilir ve proliferasyon özellikleri düşünüldüğünde avantajlı olabilecek dişeti dokusundan, pratik, alternatif bir MKH kaynağı elde edebilmektir. Dişeti dokusunun proliferasyon ve rejenerasyon yeteneğinin yüksek olması (37) bu doku içinde kök/projenitör hücrelerin varlığına işaret etmektedir. Dişeti kaynaklı MKH'lerin osteoblast, adiposit, kondrosit gibi diğer mezenkimal dokulara farklılaşma kapasiteleri incelenerek, dişeti dokusunun lokalizasyon olarak defekt bölgesine yakın olması ve invaziv bir yöntem gerektirmeden kolaylıkla elde edilebilmesi nedeniyle bu bölgedeki defektlerin tamirinde öne çıkan bir MKH kaynağı olabileceği yetenekleri değerlendirilecektir. Fibroblasttan zengin bir doku olan dişetin (37) , fibroblastların da köken aldığı kök hücreler olan MKH'leri barındıracağı düşünülmüştür. Böyle bir dokunun incelenmesiyle fibroblastoid morfolojide olan MKH'lerin fibroblasttan farklı özelliklerinin araştırılması da planlanmıştır. Literatürde, dişeti dokusundan MKH elde edilmesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Dental folikül dokusu da bir MKH kaynağı olarak maksillofasiyal bölgedeki kaynaklar arasında yerini almış (29, 30, 38, 39) olmasına rağmen üzerinde ancak birkaç çalışma yapılmıştır. Bu sebeple, dişeti dokusundaki MKH araştırmasını kapsayan çalışmamıza dental folikül dokusu da dahil edilmiştir.

Planlanan bu çalışma ile hem literatüre yeni bir MKH kaynağı sunulması, hem de maksillofasiyal bölgedeki bu iki farklı dokudan elde edilen hücrelerin, proliferasyon yetenekleri ve farklılaşma kapasiteleri değerlendirilerek birbiriyle karşılaştırılmasının yapılması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

Kök hücre, bir canlının vücudunda çok uzun bir süre bölünmeye devam ederek kendini yenileyebilen (self-renewable) ve bu sayede en az 2 farklı hücre tipine farklılaşabilen (multi-lineage differentiation) hücrelere verilen addır (1, 2). Bu iki özellik, bir hücrenin kök hücre olarak adlandırılabilmesi için mutlaka gereklidir.

2.1.1. Kendini Yenileyebilme (Self-Renewable)

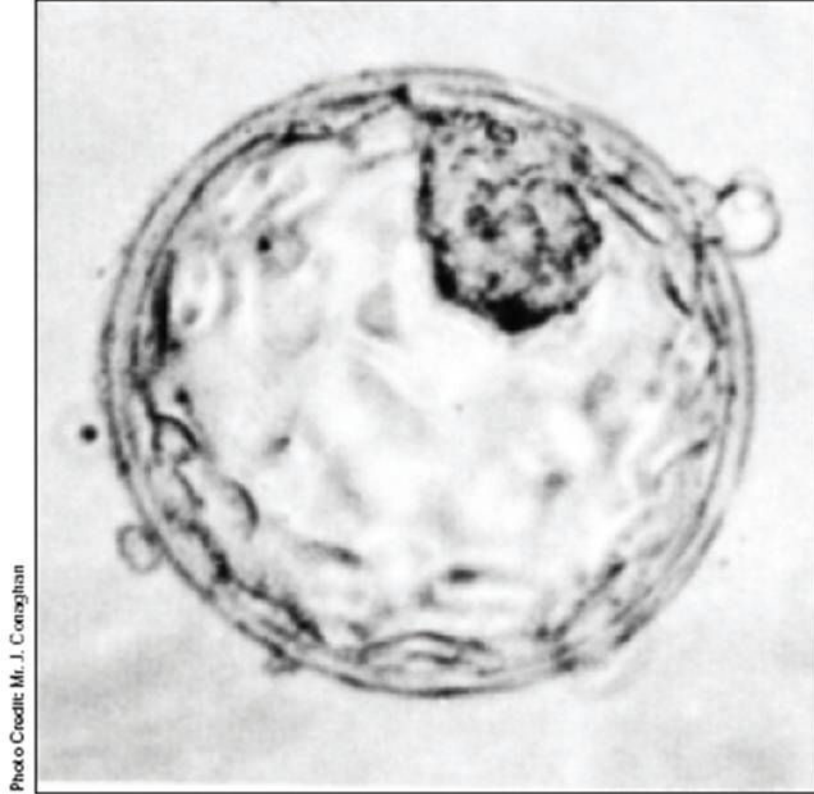
Kendini yenileyebilme, hücrelerin orijinal karakteristik özelliklerini kaybetmeden ve doğru şekilde çok sayıda bölünebilmesini ifade eder (3, 4).

2.1.2. Farklı Hücre Dizilerine Farklılaşma (Multi-lineage Differentiation)

Basit bir kök hücre popülasyonunun en az 2 farklı hücre tipine farklılaşabilme kapasitesi olarak tanımlanır (1, 4). Kök hücreler köken aldıkları kaynağa göre embriyonik ve erişkin kök hücreleri olmak üzere temelde 2 gruba ayrılmaktadırlar. Erişkin kök hücrelerin farklılaşmaları embriyolojik kök hücrelere göre daha kısıtlı olmakla birlikte, farklı kaynaklardan elde edilen erişkin kök hücrelerin de farklılaşma potansiyellerinin birbirinin aynısı olmadığı yapılan çalışmalarda görülmüştür (36, 40-43). Kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri arasındaki bu farkı tanımlamak için multipotent, pluripotent, totipotent gibi bazı terimler kullanılmaktadır.

Sperm ile ovumun birleşmesi ile ortaya çıkan zigot tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Bu, tüm hücrelere dönüşebilme potansiyeline sahip ilk embriyonel hücreye “totipotent” hücre denilir (44). Döllenmeyi takiben ilk 4-5 gün içerisinde bu hücreler aynı güce sahip olup her biri tek başına bir organizma meydana getirebilme

yeteneğinde olan hücrelerdir. Yaklaşık 5 gün sonrasında oluşan hücre kitlesine de “blastosist” denir ve bu kitle içindeki hücreler (Şekil 2.1) vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahiptir (44). Ancak bu hücreler tek başlarına bir organizmayı oluşturmazlar. Bu nedenle bu hücrelere “pluripotent” hücre denir (44).



Şekil 2.1. Blastosist ve iç hücre kitlesi (44).

Bu aşamadan sonra hücreler daha özel fonksiyonlara sahip olmakta ve erişkin kök hücreleri oluşturmaktadırlar. Biraz daha özelleşmiş olan bu kök hücrelere ise “multipotent” hücre denmektedir (44). Embriyonik kök hücrelerin in vitro fertilizasyon çalışmalarının başlamasının ardından elde edilen embriyolarda yapılan çalışmalarda üretilmişlerdir. Bu kök hücreler yüksek telomeraz aktivitesine sahip olup ektoderm, endoderm ve mezoderm kaynaklı hücrelere dönüşebilme yeteneğindedirler. Bu nedenle başta teratoma olmak üzere malign

transformasyon potansiyeli taşımaktadırlar (8, 9). Özellikle hayvan çalışmalarındaki başarıların yanı sıra kullanımlarında ciddi tıbbi, etik ve dinsel tartışmalar vardır (10, 11). Embriyonik kök hücreler sahip oldukları farklılaşma potansiyeli açısından çok iyi bir kaynak olsa da kullanılmalarıyla ilgili kısıtlamalar getirilmiş ve erişkin kök hücre kaynakları alternatif olarak sunulmuştur.

2.2. Mezenkimal Kök Hücreler

Son yıllarda erişkin kök hücre çalışmalarında MKH'ler öne çıkmıştır. Gelişim sırasında, nöral ark (neural crest) orijin alan mezenkimal hücrelerin göç edip (migration) farklılaştığı (differentiate) ve daha sonra kemik, kıkırdak, periyodonsiyum, ligamentler, kraniyal süturlar, kas sistemi, tendonlar ve dişler gibi hemen hemen bütün kraniyofasiyal yapıların morfogenezisinde mezodermal hücrelerle birlikte sinerjistik olarak çalıştıkları bilinmektedir (45). Mezodermal kökenli olan mezenkimal kök hücreler asimetric bölünmeye uğradıklarında ikiye bölünerek bir öncül hücre (progenitor/precursor cell) bir de mezenkimal hücre verir (45). Bölünmenin sonucu olarak ortaya çıkan mezenkimal hücreler, morfogenezin tamamlanmasıyla çeşitli kraniyofasiyal dokular içinde yer almaya devam eder ve fizyolojik olarak gerekli olan doku yenilenmesi ve tamirinde görev alırlar.

ISCT (International Society of Cellular Therapy) tarafından mezenkimal kök hücre yerine "multipotent mezenkimal stromal hücre" (46, 47) denilmesi önerilmişse de çok yönlü (multilineage) farklılaşma özellikleri bulunan bu hücreleri "mezenkimal kök hücre" olarak isimlendiren araştırmacılar çoğunluktadır (4).

Mezenkimal kök hücrelerin karakteristik özelliklerini tanımlamada araştırmacılar arasında bazen çelişkiler yaşanmaktadır. Birçok laboratuvar, birbirinden çok da önemli farklılıklar içermeyen protokolleri izleyerek MKH izolasyonu ve bu hücrelerin çoğaltılması için metotlar kullanmaktadır. Çeşitli

dokulardan morfolojik olarak benzer özelliklere sahip MKH'ler izole edilebilmektedir. Bununla birlikte hücrelerin birçok biyolojik özelliği, in-vivo etkinliği gibi konularda hücrelerin geliştirildiği çevre koşullarına bağlı değişiklikler bildirilmektedir (48-51). Özellikle hücre esaslı bir tedavi ya da doku mühendisliğinde kullanılmak üzere en uygun hücre kaynağının seçilmesi söz konusu olduğunda, mevcut hücre kaynaklarının birbiriyle kıyaslanarak en uygun olanının seçilmesi önemlidir. Böyle bir durumda, çeşitli yöntemlerle izole edilmiş ve farklı kıstaslara göre kök hücre olarak adlandırılmış bu hücrelerin, birbirleriyle biyolojik özellikleri ve deney sonuçları açısından doğrudan bir kıyaslamanın yapılabilirliği ile ilgili karşıt görüşler ileri sürülmüştür (47). Elde edilen hücrelerin kıyaslanması ile ilgili bu gibi tartışmalar kısmen, MKH'yi tanımlayan uluslararası olarak kabul edilmiş kriterlerin eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Yine bu nedenle, farklı kaynaklardan elde edilen MKH'lerin birbirleriyle karşılaştırma çalışmalarının yapılamaması, bu konudaki gelişmeleri yavaşlatmaktadır. Bu nedenlerden ötürü ISCT, hem laboratuvar hem de pre-klinik çalışmalar için insan MKH' sini tanımlamada gerekli kriterleri önermiştir (47) (Tablo 2.1).

Halen MKH tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan başlıca özellikler;

- ❖ Plastik yüzeye yapışması (plastik adherens)
- ❖ Spesifik yüzey antijenlerinin ekspresyonu
- ❖ Multipotent farklılaşma potansiyelidir.

2.2.1. Plastik Adherens

MKH'ler standart kültür koşulları altında plastik doku kültür kaplarına yapışmaktadır. Kemik iliği kaynaklı MKH'lerinin ilk izolasyonu bundan yaklaşık 40 yıl önce Friedenstien ve arkadaşları (52, 53) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada aspire edilen kemik iliğinin in vitro kültüründe, diğer hücrelerden farklı olarak plastik kültür kabına yapışarak koloni oluşturabilen fibroblast benzeri hücre kolonilerini rapor etmişlerdir. Günümüzde de MKH'lerin izolasyonu için bu basit protokol yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Standart

koşullar altında plastik doku kültür kaplarına yapışma özelliğinde olan hücrelerin mezenkimal hücre popülasyonuna ait olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte MKH'ler, çok özel koşullar sağlanarak doku kültür flasklarına yapışma sağlanmadan da çoğaltılabilmektedirler (54).

1. Standart kültür koşullarında plastik adherensi olması		
2. Fenotip	<u>pozitif (%95≤, +)</u>	<u>negatif (%2≥, +)</u>
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 veya CD11b
		CD79α veya CD19
		HLA-DR
3. İn vitro diferansiasyon: osteoblast, adiposit, kondroblast		

Tablo 2.1. ISCT (International Society of Cellular Therapy) tarafından MKH tanımlaması için gerekli kriterlerin özeti (46).

2.2.2. Spesifik Yüzey Antijenlerinin Ekspresyonu

Bir hücre popülasyonunun hızlı bir şekilde tanımlanmasına imkan tanıyan yüzey antijeni ekspresyonu, immünoloji ve hematolojide çok yaygın olarak kullanılmaktadır. ISCT'nin kriterlerine göre bir MKH popülasyonunun %95 veya daha fazlasının CD105 (endoglin olarak bilinir ve orijinal olarak MAb SH2 şeklinde tanımlanmıştır), CD73 (ekto-5'-nükleotidaz olarak bilinir ve orijinal olarak MAb SH3 ve SH4 şeklinde tanımlanmıştır), CD90 (Thy-1 olarak da bilinir) antijenleri için pozitif olması gerekmektedir (47, 55). Ayrıca, heterojen MKH popülasyonunu diğer hücre popülasyonlarından ayırt etmek için hematopoetik kök hücreler veya hücrelerin izole edildiği dokuya ait spesifik antijenlerin negatif

olması gerekmektedir. Buna göre hücre popülasyonunda CD45, CD34, CD14 veya CD11b, HLA sınıf II, CD79 α veya CD19 ve gibi hematopoetik antijenlerdeki pozitiflik oranının %2'yi geçmemesi gerekmektedir (47).

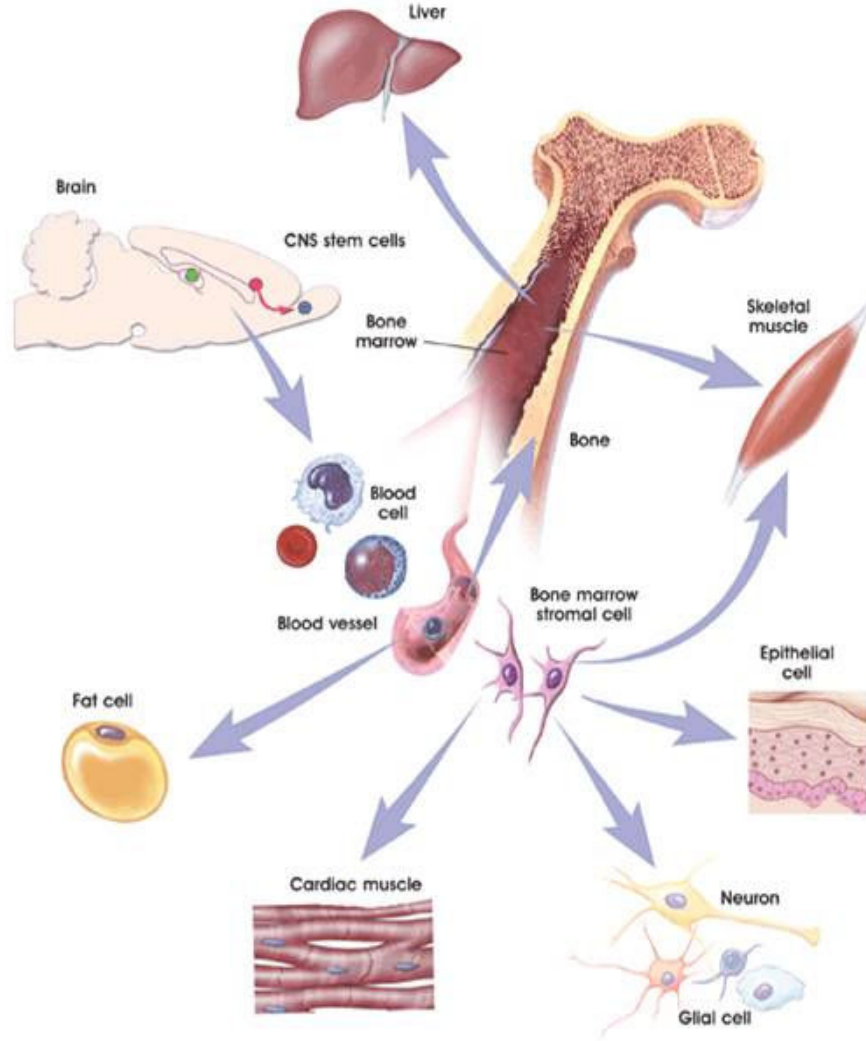
2.2.3. Çok Yönlü (multipotent) Farklılaşma Potansiyeli

MKH'ler, in vitro doku kültür farklılaşma koşulları altında osteoblast, adiposit ve kondroblastlara farklılaşmaktadır (53, 5). Osteojenik farklılaşma uyarılması için ortama dexamethasone, beta glycerophosphate, askorbik asid gibi maddeler eklendikten sonra Alizarin Red veya von Kossa boyaması ile kültür ortamında kalsiyum depozitleri geliştiği görülebilmektedir (5). Adipojenik farklılaşma uyarılması için ise dexamethasone, indomethacine, ve insulin eklenip Oil Red O boyaması ile hücre içinde lipid birikimi gösterilmekte (5), kondrojenik farklılaşma için de dexamethasone, TGF β 3 gibi maddeler eklendikten sonra Alcian Blue veya kollajen tip 2'ye spesifik immünohistokimyasal boyama ile kıkırdak gelişimi gösterilebilmektedir (56) .

Mezenkimal kök hücreler kemik iliği (57), göbek kordonu, çevre kanı, amniyotik sıvı (58) , periost (59) , yağ dokusu (60, 61) , sinoviyal membran (62) ve kas (63) gibi birçok kaynaktan elde edilebilmektedir.

Her ne kadar yetişkin kök hücrelerin genel olarak kendi kökenlerindeki hücrelere farklılaşma eğiliminde oldukları düşünülse de son yıllarda, belli bir dokudan alınan kök hücrelerin farklı bir dokuya farklılaşabilme özelliği gösterdiğini bildiren çalışmaların sayısı giderek artmıştır ve bu çalışmalar, "kök hücre plastisitesi" adı altında toplanmıştır (64-66). Kök hücre plastisitesi, bir hücrenin köken aldıkları dokuların dışındaki dokulara farklılaşma özelliğini tanımlamaktadır (64). Mezenkimal kök hücreler, kendi kendilerini yenileyebilir ve mezenkimal ve konnektif dokuları oluşturan bütün hücre dizilerine farklılaşabilmelerinin yanı sıra farklı hücre dizilerine de farklılaşabilirler (3-5, 67). Kemik iliği kökenli kök hücreler ile yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin myoblast

(68) , endotel (69-71) , hepatik (72-74) , kardiyak (75) , renal (76) ve hatta nöral (12, 77, 78) hücrelere farklılaşabildiği gösterilmiştir. Kemik iliği kökenli MKH ve hematopoetik kök hücrelerin sahip oldukları bu farklılaşabilme özellikleri Şekil 2.2' de şematik olarak gösterilmektedir (44).



© 2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk, Caitlin Duckwell

Şekil 2.2. Kemik iliği kökenli hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerin sahip oldukları farklılaşabilme potansiyellerinin şematik olarak gösterilmesi (44).

Mezenkimal kök hücrelerin en önemli dezavantajı ise bu hücrelerin dokularda sayıca çok az olmaları ve gerek in-vivo kullanım için gerekse in-vitro araştırmalarda yeterli sayıya ulaşabilmek için kültür ortamında çoğaltılmaları gereğidir (5). Bu nedenle literatürde bildirilen araştırmaların hemen tamamı kültürde çoğaltılan MKH çalışmalarını kapsamaktadır. İn-vitro ortamda işlemlerden geçirilen hücrelerin biyolojik özelliklerinde değişiklikler olması sonucu, yapılan çalışmalar in-vivo ortamdaki patoloji veya fizyolojiyi tam olarak yansıtmamaktadır. Klinik uygulamalarda MKH tedavileri ile doku rejenerasyonunda iyileşmeler gözlenirse de bu hücrelerin farklı doku hücrelerine dönüşmesine nadir olarak ve çok az sayıda hücrede rastlanmaktadır. Doku rejenerasyonunda MKH'lerin farklılaşma özelliğinden ziyade destek doku olarak solubl faktörler, hücre-ekstraselüler matriks ilişkileri sağlayarak iyileşmeye katkı sağladığı düşünülmektedir (5, 12-14, 79-82).

Mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanım için en cazip özelliklerinden birisi de immünmodülatuar/çoğunlukla immünsupresif özellikte olmaları nedeniyle tedavi amaçlı verilişte rejeksiyona uğramamalarıdır (19-21). Bununla birlikte allojenik kullanımda, özellikle tekrarlayan verilişlerde immün cevap gelişebilmesi mümkündür. İmmün rejeksiyon riski, allojenik hücre tedavileri ve kök hücre terapilerinin evrensel olarak uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır (83). Konak immün cevabı ve implantın reddi gibi allojenik kök hücre transplantasyonu ile ilişkili bu problemler otolog kök hücrelerin kullanılmasıyla önlenabilir. Kemik iliği veya yağ dokusu kaynaklı kök hücreler gibi otolog kök hücrelerin klinik olarak rejeneratif hücre tedavilerinde kullanılabilmesi ancak yeterli miktarlarda elde edilebildiklerinde mümkün olmaktadır.

Kemik iliği, kök hücre elde edilişi için elverişli bir kaynak teşkil etmektedir. Ancak yine de invaziv ve hasta için rahatsızlık verici bir işlem olması, lokal anestezi altında ancak kısıtlı miktarlarda alınabilmesi (84), daha fazla miktarlar için genel anestezi altında işlemin yapılması gerekmesi ve bunun

da donör saha morbiditesi riskini arttırması (85, 86) nedeniyle rejeneratif tıpta kullanılmaları sıkıntı yaratmaktadır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda yağ dokusu kaynaklı MKH'ler elde edilmiş (60) ve bu MKH'lerin kemik iliği kaynaklı MKH'lerdeki gibi birçok hücre dizisine farklılaşabildiği gösterilmiştir (61, 87). Yağ dokusu kaynaklı kök hücreler "liposuction" yöntemi ile kolaylıkla elde edilebilir ve çok çeşitli rejeneratif tıp terapilerinde kullanılmak üzere önemli miktarlarda multipotent kök hücre sağlayabilirler.

2.3. Maksillofasiyal Bölgedeki MKH Kaynakları

Diğer alanlarda olduğu gibi maksillofasiyal bölgede de uygun MKH kaynakları araştırılmakta ve son yıllarda bunlarla ilgili raporlar yayınlanmaktadır. Bu bölgede süt dişi (26) , dental pulpa dokusu (27, 28) , dental folikül (29, 30) , periodontal ligament (31, 32) ve oral mukozada (33) MKH'ler ve/veya progenitör hücreler olduğu rapor edilmiştir.

2.3.1. Dental Pulpa

Gronthos ve arkadaşları (27) , gömülü 3. molar dişlerden elde ettikleri insan dental pulpa dokusundan klonojenik ve yüksek proliferasyon yeteneğine sahip MKH'ler elde etmiş ve bunları kemik iliği kaynaklı MKH'lerle karşılaştırmışlardır. Dental pulpa dokusunda koloni oluşturabilen hücrelerin (22-70 koloni/ 10^4 hücre), kemik iliği dokusundakine göre (2.4-3.1 koloni/ 10^4 hücre) daha fazla olduğu, hidroksiapatit / trikalsiyum fosfat taşıyıcı matriks ile in vivo transplantasyonunda dentin-pulpa benzeri bir doku rejenerasyonu sağlayabildiği, kemik iliği kaynaklı MKH'leriyle farklılaşma potansiyelinin farklılıklar gösterdiğini rapor etmişlerdir (27).

2.3.2. Süt Dişı Pulpası

Masako Miura ve arkadaşları (26) , çocukların eksfoliye süt keser dişlerinden elde ettikleri pulpa dokusunda MKH'ler olduğunu rapor etmişlerdir. Süt dişlerinde, kemik iliği ve yetişkin dental pulpa dokusu kaynaklı MKH'lere kıyasla, proliferasyon oranı ve kendini eşleyen popülasyon sayısının daha fazla olduğu görülmüştür. İn vivo ortamda, taşıyıcı matriks olarak hidroksiapatit / trikalsiyum fosfat toz ile karıştırılıp immün deprese farelere transplantasyonlarında odontoblastlara farklılaşabilme yetenekleri olduğu ve bunların da dentin benzeri yapılar oluşturduğu bildirilmiştir. Yetişkin dental pulpa kaynaklı MKH'lerin ise eksfoliye süt dişi kaynaklı MKH'lerden farklı olarak dentin-pulpa benzeri kompleks bir yapı oluşturabildiği gösterilmiştir (26).

2.3.3. Periodontal Ligament

Seo ve arkadaşları (31) yaptıkları çalışmada, insan periodontal ligament dokusunun periodontal doku rejenerasyonunda kullanılabilecek kök hücreler içerip içermediğini araştırmışlardır referans. Gömülü 3. molar dişlerden elde ettikleri periodontal ligament dokusunda klonojenik, hızlıca proliferen olan ve bazı MKH'lere spesifik antijenleri ekspres edebilen hücrelerin olduğunu belirtmişler ve taşıyıcı matriks olarak hidroksiapatit / trikalsiyum fosfat toz ile karıştırılıp immün deprese farelere implante edildiklerinde, Sharpey liflerine benzeyen dens kollajen liflerle komşu, ince bir tabaka sement olmak üzere doğal periodontal ligamente benzeyen sement/periodontal ligament benzeri yapılar oluştuğunu rapor etmişlerdir.

2.3.4. Alveol Kemiği

Matsubara ve arkadaşları (34) , alveoler kemik iliği dokusundan izole edilen MKH'leri iliak kemik kaynaklı olanlarla kıyaslamışlardır. Her iki farklı dokudan elde edilen kök hücrelerin klonojenik, kendini yenileyebilen, plastiğe yapışan hücreler olduğu ve bakılan yüzey antijenlerine göre birbirlerine

benzerlik gösterdikleri belirtilmiştir. Bu hücrelerin, in vitro ortamda osteojenik farklılaşma ve in vivo ortamda osteojenik rejenerasyon yeteneklerine sahip oldukları görülmüştür. Bununla birlikte, alveoler kemik iliği kaynaklı MKH'lerin iliak kemik kaynaklı olanlardan farklı olarak adipojenik ve kondrojenik farklılaşma kapasitelerinin çok kısıtlı olduğu rapor edilmiştir (34).

2.3.5. Periost

Cicconetti ve arkadaşları (35) , insanlarda intraoral olarak maksiller tuber bölgesindeki kemik iliği stromasının ve maksilla ile mandibula periost dokusunun doku mühendisliğinde kullanılabilecek osteoprogenitör hücreler içerdiğini rapor etmişlerdir. Maksiller tuber bölgesinden aldıkları 1 cm³'lik kemik dokusu içerisindeki kemik iliği stromasında ve maksilla/mandibula periost dokularından izole ettikleri osteoprogenitör hücrelerin in vitro olarak plastik adherent olan, klonojenik, proliferere olabilen hücreler olduğu ve in vivo ortamda hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat matriks içerisinde trasnplante edildiklerinden 8 hafta sonra osteojenik formasyonun oluştuğu belirtilmiştir. Periost kaynaklı hücrelerin CD61, CD133 ve CD117 yüzey markerlarında çeşitlilik göstermesi dışında farklı kaynaklardan elde edilen bu iki hücrenin birbirlerine benzer özellikler gösterdiği belirtilmiştir (35).

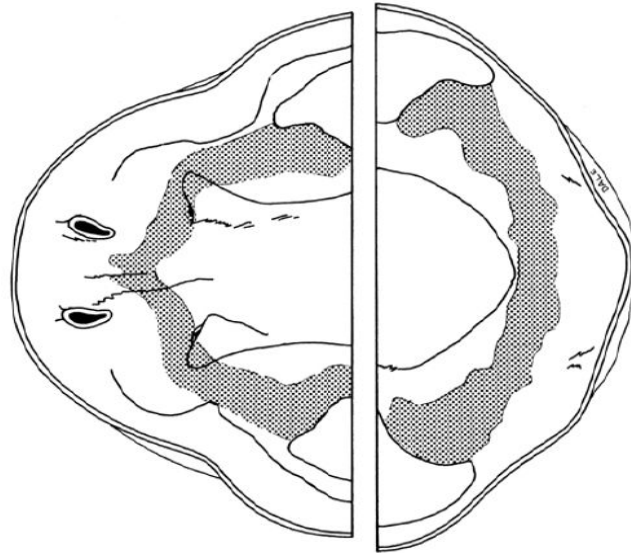
2.3.6. Oral Mukoza

Izumi ve arkadaşları (33) , insanlarda intraoral greftlemeye elverişli, in vitro ortamda oral mukozanın eş değerinin üretmede kullanılabilecek progenitör/kök hücreden zengin bir popülasyon içerip içermediğini araştırmak üzere oral keratinosit popülasyonunu fiziksel olarak izole ve karakterize etmek amacıyla bir çalışma yapmıştır. İzole ettikleri oral mukoza progenitör/kök hücre subpopülasyonu fonksiyonel analizlere tabii tutulmuş ve epitelyal farklılaşmada nükleer transkripsiyon faktör içeren peroksizom proliferatör-aktif reseptör-gama olup olmadığı değerlendirilmiştir. Elde edilen fonksiyonel hücrelerin uygun antijenik yapıda olup kendini yenileyebilme yeteneğine sahip, intraoral

rekonstrüktif işlemlerde oral mukozanın eşdeğerini üretmede kullanılabilecek önemli bir kaynak olabileceğini belirtmişlerdir (33).

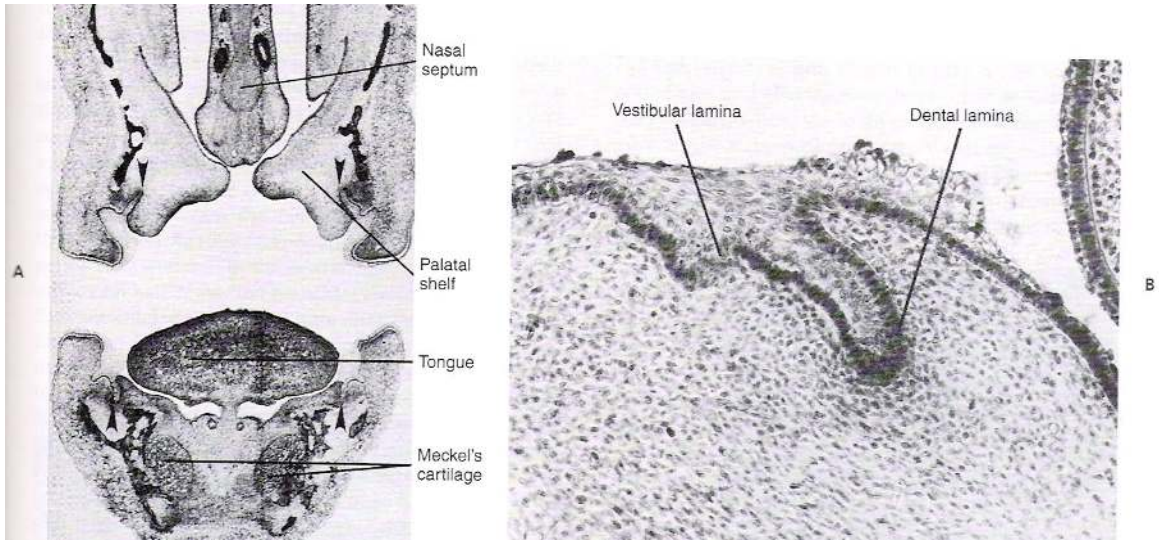
2.3.7. Dental Folikül

Işık mikroskobu altında yeni yeni gelişmekte olan ilkel ağız boşluğu (stomatodeum), ektomezenkimal bağ dokuyu saran 2-3 hücre kalınlığında primitif bir epitelyum tabakası şeklinde görülebilir. Embriyolojik gelişimin yaklaşık olarak 37'inci günlerinde ağız çevresinde muhtemel olarak üst ve alt çeneye denk gelen yerlerde kalınlaşmış bir epitelyal bant oluşur (Şekil 2.3).

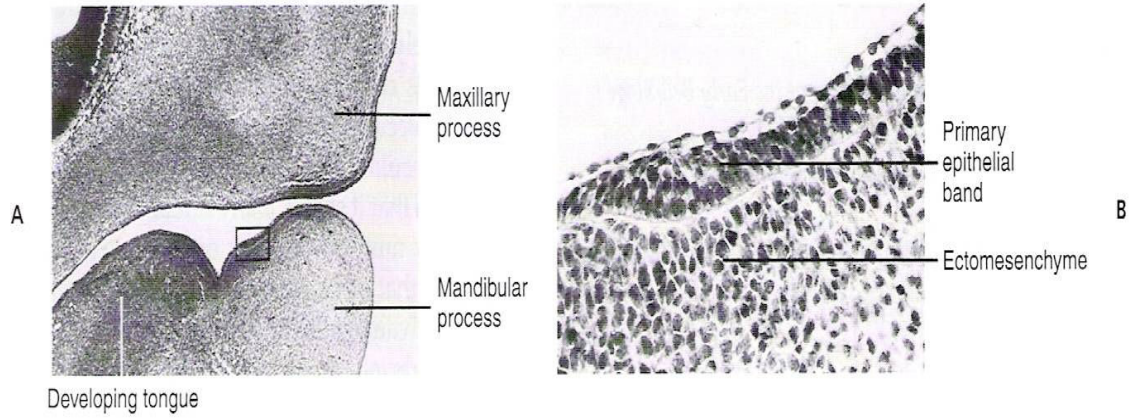


Şekil 2.3. Ağız kavitesinin erken embriyolojik dönemdeki gelişimi. Taralı alanlar primer epitelyal banda işaret etmektedir (88, 89).

Bu bantlar şekil olarak at nalına benzerler ve ileride oluşacak alt ve üst çene dental arklarına karşılık gelirler. Primer epitelyal bant olarak da adlandırılan bu yapı ileride vestibuler lamina ve dental lamina olmak üzere ikiye ayrılır (Şekil 2.4). Dental laminanın, hemen altında embriyolojik bir bağ dokusu olan ektomezenkimal doku yer alır (Şekil 2.5). Ektomezenkimal denilmesinin sebebi, nöral krest hücrelerinin buraya göç etmesinden kaynaklanmaktadır (89).



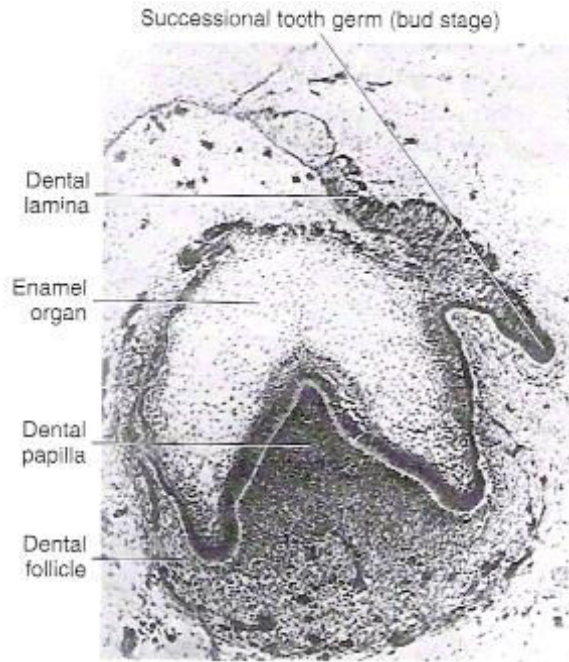
Şekil 2.4. Gelişmekte olan kafa bölgesinin anterior kısmından alınan koronal yöndeki kesit. **A**, dental ve vestibuler laminanın kesitteki pozisyonu okla gösterilmiştir. **B**, Belirtilen kısmın büyütülmüş hali (89).



Şekil 2.5. Embriyolojik dönemde gelişmekte olan kafa bölgesinin sagittal yöndeki kesiti. **A**, Primer epitelyal bandın ektomezenkimal bağ dokusuna doğru kalınlaşması görülmektedir. **B**, Belirtilen bölgenin büyütülmüş hali (88, 89).

Erken embriyogenezis döneminde, üzerindeki ektoderm tabakasının invajinasyonu ile nöral tüpün oluşmasından hemen sonra, migratör pluripotent nöroepitelyal hücreler yani nöral krest hücreleri nöral tüpün dorsal orta hat bölgesinden göç ederler (90). Nöral krest hücreleri nöral tüpten çıktıklarında epiteloïd karakteristiklerini kaybeder ve yönlendirilmiş hücre migrasyonu yeteneğinde olan bir mezenkimal fenotip özelliği kazanırlar. Bu nedenle esasında ektoderm kaynaklı olan bu doku ektomezenkim olarak adlandırılır. Ektomezenkimal bağ dokusu, jelatinöz bir ara madde ile ayrılan birkaç iğsi şekilli hücre içermektedir.

Dental folikül dokusu, dişin etrafında bir kese gibi bulunan ve gelişmekte olan dişin mine (enamel) ve dental papilla organlarını çevreleyen ektomezenkim kaynaklı gevşek bir bağ dokusudur (Şekil 2,6).



Şekil 2.6. Diş gelişiminin erken dönem çan aşamasındaki histolojik görünümü. Dental laminadan gelişen mine (enamel) organ ve ektomezenkimal dokudan köken alan dental papilla gelişmeye devam etmekte ve dental folikül dokusunun bu dokuları çevrelediği görülmektedir. Ayrıca dental lamina uzantısından gelişen daimi diş germinin de yavaş yavaş şekillendiği görülmekte (89).

Dental folikülün, dişi destekleyen periodontal ligament, alveoler kemik ve mineralize kemik benzeri bir doku olan sement için progenitör hücreler ihtiva ettiği ve dişin ağız içine sürmesi sürecinde önemli bir biyolojik görev üstlendiği düşünülmektedir (89, 91).

Dental folikül dokusu kaynaklı kök hücreler ilk olarak sığır kaynaklı diş germelerinden Handa ve arkadaşları (38, 39) tarafından izole edilmiştir. Bu hücrelerin farklılaşma kapasiteleri immün deprese farelerde in vivo olarak gösterilmiş ve sığır kaynaklı fibroblastlar veya alveoler osteoblastlarının aksine bu hücrelerin sement benzeri matriks bir yapı oluşturduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte farklılaşma kapasiteleri ile ilgili in vivo olarak elde edilen bu sonuçların aksine deksametazon ile uzun dönem kültürlerde herhangi bir farklılaşma sonucuna ulaşılamamıştır.

Morsczeck ve arkadaşları (29) , insanlarda gömülü 3. molar dişlerden elde ettikleri dental follikül dokusunda prekürsör hücreler olduğunu rapor etmişlerdir. Bu fibroblast benzeri, koloni oluşturabilen ve plastik adherent hücrelerin kök hücre marker'ları olduğu varsayılan Notch-1 ve Nestin eksprese ettiği belirtilmiş, taşıyıcı matriks olarak hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat toz ile karıştırılıp immün deprese farelere implante edildiklerinden 8 hafta sonraki incelemelerde, rijid veya fibröz konnektif dokuların oluştuğu, osteoblastik antijen ekspresyonunun arttığı, fakat sement veya kemik formasyonu oluşmadığı görülmüştür.

Özetle, intraoral/maksillofasiyal bölgeden elde edilen kök/projenitör hücreler, bölgedeki sert ve yumuşak doku defektlerinin rejenerasyonunda ve doku mühendisliğinde kullanılmak için kaynak teşkil etmektedir. İntraoral bölgede MKH kaynağı olarak düşünülen gömülü 20 yaş/ eksfoliye süt dişleri umut verici olsalar da gerektiği anda hemen elde edilememeleri bir problem oluşturmaktadır. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak amacıyla, Avrupa'da sayıları gittikçe artan süt dişi bankalarında olduğu gibi (92) MKH bankaları kurulmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin dondurularak bu gibi kök hücre

bankalarında depolanması ve gerektiğinde kullanıma sunulması otolog uygulama için avantaj sağlasa da yüksek maliyet gerektirmesi önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır. İntraoral/maksillofasiyal bölgede, defekte yakın ancak sağlam dokulardan köken alan multipotent hücrelerin elde edilmesi amacıyla dişetinin kullanılmasının, hem invaziv yaklaşım gerektirmemesi hem de elde ediliş kolaylığı nedeniyle bir alternatif doku kaynağı sağlama açısından avantajlı olacağı düşünülmüştür.

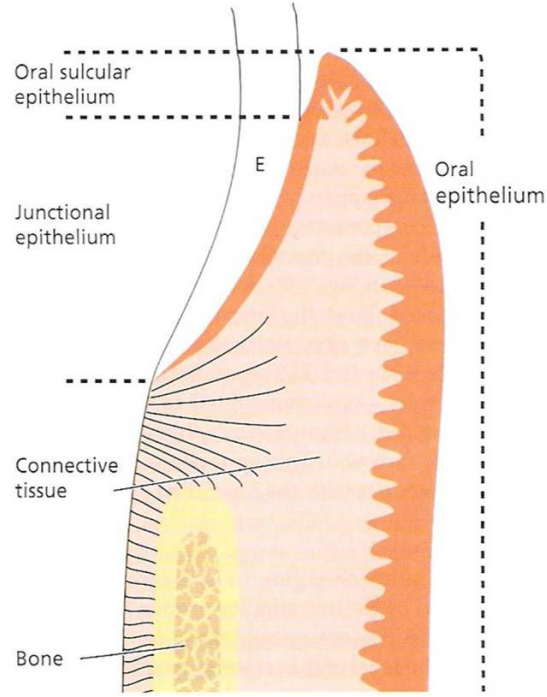
Dişeti dokusu kendini sürekli olarak yenileyen aktif bir dokudur. Dişeti kalınlığı kişiden kişiye, fenotipe bağlı olarak farklılık gösterse de, devamlı olarak yeni hücrelerin yapılması ve ölü hücrelerin doku yüzeyinden atılması ile bir denge hali söz konusudur (37). Mitotik aktivite ve doku turnoverı dikkate alındığında intraoral olarak en aktif bölgelerden biri olan dişeti dokusunun intraoral olarak MKH kaynağı olabileceği öngörülmüştür. Ayrıca, defekt olan bölgeye doku içinden ve başta kemik iliği olmak üzere diğer dokulardan kök/projenitor hücrelerin migrasyon gösterdiği ileri sürülmektedir (22-24). Patoloji olan bölgeyi çevreleyen dokuların multipotent hücrelerden zengin olacağı varsayıldığında işlem yapılan bölgeye komşu dişetinin kök hücre izolasyonu için bir kaynak teşkil edeceği düşünülmüştür.

2.4. Dişeti Morfolojisi ve Histolojisi

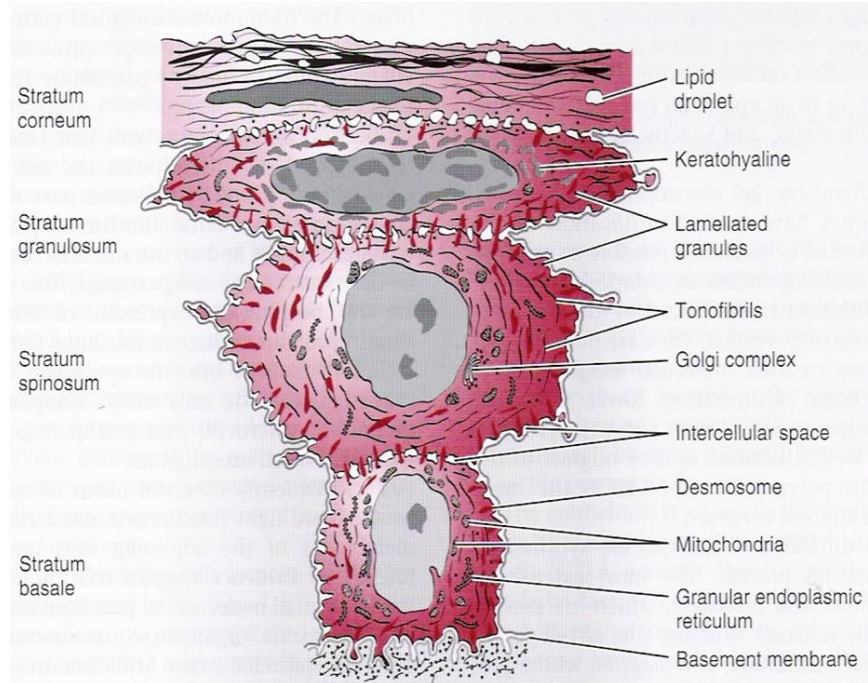
Dişeti, çenelerin alveoler proseslerini örten ve dişleri kolelerinden saran oral mukoza parçasıdır. Dişeti epiteli oral epitel, sulkuler epitel ve birleşim epitelinden oluşur (Şekil 2.7) (93).

2.4.1. Oral Epitel

Yapışık dişeti ve serbest dişetinin ağız boşluğuna bakan yüzeyini örter. Keratinize veya parakeratinizedir. Oral epitel, histolojik olarak, stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum ve stratum korneumdan oluşur (Şekil 2.8) (37).



Şekil 2.7. Dişeti dokusunun morfolojisi (93).



Şekil 2.8. Oral epitelin elektron mikroskobu altındaki görüntüsü (37).

2.4.2. Stratum Basale

Bağ dokusuna komşudur. Genellikle küboidal hücrelerden oluşur ve bazal lamina ile bağ dokusuna tutunur. Bazal hücrelerin stoplazmalarında yaygın şekilde dağılmış sitokeratin de denilen tonofilament'ler bulunur. Bunlar keratin öncüleridir. Bazal tabaka hücreleri son derece aktiftir ve epitelde mitozun sık görüldüğü tabakadır. Hücrelerde çekirdekler belirgindir ve DNA sentezi yapılmaktadır (37).

2.4.3. Stratum Spinosum:

Epitelin major tabakasıdır, geniş, yıldızsı hücrelerden oluşur. Bu tabakadaki hücreler mitoz özelliğini koruyabilir. Ancak bazal tabakadaki hücelere göre daha az aktiftirler (37).

2.4.4. Stratum Granulosum:

Bu tabakada, karakteristik olarak, hücrelerin stoplazmalarında keratohyalin granülleri gözlenir. Hücre çekirdekleri yassılaştırmış ve organellerinde dejenerasyon başlamıştır. Keratohyalin tonofilamentlerin üzerine çökelmiş ve hücre aktivitesi son derece düşmüştür (37).

2.4.5. Stratum Korneum:

Bu tabaka son derece yassılaştırmış, çekirdek ve organellerini kaybetmiş hücrelerden oluşur. Hücre membranı kalınlaştırmış, hücre içi tonofilamentler ve izole lipid damlacıklarıyla dolmuştur. Artık hücre tamamiyle keratinize olmuş, hücreler arası bağlantılar bozulmuş ve hücre yaşamını yitirmiştir. Bu duruma ortokeratinizasyon denir. Keratinizasyonun tam olmadığı durumlarda hücre çekirdeği ve izole organeller izlenebilir. Bu duruma parakeratinizasyon denir. Bu tabakadaki hücreler sonuçta ağız boşluğuna atılırlar (deskuamasyon) (37).

2.4.6. Sulkuler Epitel

Genelde keratinize olmayan fakat parsiyel keratinizasyon gösterebilen çok katlı yassı epiteldir. Dişeti kenarında oral epitel ile devamlıdır ve sulkusun yan duvarını oluşturur. Sulkusun tabanında ise birleşim epiteli bulunur. İnsanda sulkuler epitelyum sürekli bakteriler ile karşı karşıyadır, dolayısıyla en sağlıklı dişetinde bile bir miktar enflamatuvar reaksiyon gözlenir. Enflamasyonda epitelyal turn-over hızlanmakta ve epitelyum hücreleri keratinize olmaya fırsat bulamamaktadır. Bu nedenle sulkuler epitelde stratum korneum bulunmaz (37).

2.4.7. Birleşim Epiteli

Keratinize olmayan çok katlı yassı epiteldir. Oral ve sulkuler epitelden farklı olarak eksternal ve internal bazal lamina olmak üzere iki farklı bazal lamina mevcuttur. Birleşim epiteli eksternal bazal lamina ile bir tarafta bağ dokusuna, internal bazal lamina ile diğer tarafta dişe tutunur. Sulkus tabanına yakın bölge, en kalın olduğu yer olup yaklaşık 10-30 hücre kalınlıktadır. Apikale doğru daralma gösterir, apikal uçta ise birkaç hücre kalınlığındadır.

Birleşim epiteli turn-over'ı en hızlı olanıdır. Dişeti epitelinin turn-over hızı 1-2 haftayken birleşim epitelinde bu süre bir hafta veya daha azdır. Oral epitelin ki ise daha yavaştır. Yeni hücreler bazal hücrelerin bölünmesi ile oluşurken, yüzeydeki eski hücreler deskuamasyon ile ağız boşluğuna dökülürler (37).

2.4.8. Dişeti Bağ Dokusu

Dişeti bağ dokusu temelde yoğun şekilde kollajen ve retiküler fibrillerden oluşmaktadır. Nadir şekilde elastik ve oksitalan fibriller içerir. Fibriller, proteoglikan ve glikoproteinlerden oluşmuş ara madde içinde yer alırlar (37).

Dişeti bağ dokusunda birkaç tip hücre bulunur. Fibroblastlar sağlıklı dişeti bağ dokusunun temel hücreleridir. Dişeti bağ dokusunun idamesinde, değişik

kollajen fibrillerin ve ara maddenin yapısında bulunan proteoglikan ve glikoproteinlerin sentezinde rol oynarlar. Ayrıca, kollajen yapıdaki iskeletin rezorbsiyon ve yeniden şekillenmesinde de aktiftirler.

Mast hücreleri, genelde perivasküler olarak bulunurlar. Ürünlerinden olan histamin ile enflamasyonun erken safhalarında rol oynarlar. Ayrıca serotonin ve heparin de içerirler.

Enflamatuar hücreler, sağlıklı bağ dokusunda birkaç tane de olsa izlenirler. Genelde birleşim epiteline komşu bölgelerde bulunurlar. Monositler, lenfositler, plazma hücreleri immün cevapta mediatör rolünü oynarken, makrofajlar doku yıkım ürünleri ve artık maddeleri ortadan kaldırır.

Bu çalışma, mitotik aktivite ve doku turnoverı dikkate alındığında intraoral olarak en aktif bölgelerden biri olan dişeti dokusunun, intraoral olarak yeni bir MKH kaynağı olabileceği hipotezi üzerine kurulmuştur. Ayrıca, literatürde çok az değinilmiş olan dental folikül dokusu kaynaklı MKH'ler de çalışmaya dahil edilmiştir. Bu hücreler üzerinde karakterizasyon çalışmaları ve dişeti kaynaklı MKH'ler ile karşılaştırılması yapılmıştır. Ayrıca, fibroblasttan zengin bir doku olan dişetinin incelenmesiyle morfolojik olarak birbirine çok benzer olan MKH'ler ile fibroblastların farklı özelliklerinin araştırılması amacıyla da çalışmalar yapılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmalar, Başkent Üniversitesi klinik araştırmalar etik kurulu onayını takiben başlamış ve hastalardan doku örneği alınmadan önce bilgilendirilmiş onam formu okutularak imzalatılmıştır.

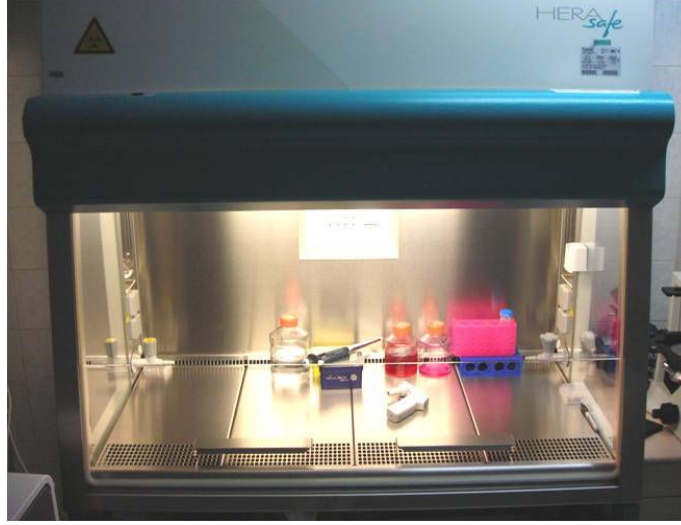
Proflaktik ve ortodontik amaçlı çekim endikasyonu konulmuş gömülü 20 yaş dişi olan 6 hastayı (16-28 yaş) kapsayan çalışmamızda, zarf insizyonu takiben diş çekimi gerçekleştirilmiştir. İnsizyon esnasında çıkarılan yaklaşık 2 mm' lik küçük üçgen şeklindeki bir dişeti dokusu ile 20 yaş dişinin etrafındaki dental folikül dokusundan (Şekil 3.1) alınan örnekler, MKH araştırılmasında kullanılmak üzere Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji/ Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi/PEDI-STEM Araştırma Laboratuvar' ına getirilmiş ve bir saat içerisinde işleme alınmıştır.



Şekil 3.1. Gömülü 20 yaş diş etrafında bir kese gibi bulunan dental folikül dokusunun (kesikli çizgiyle belirtilmiş) elde edilmesi ve insizyon esnasında çıkarılan dişeti.

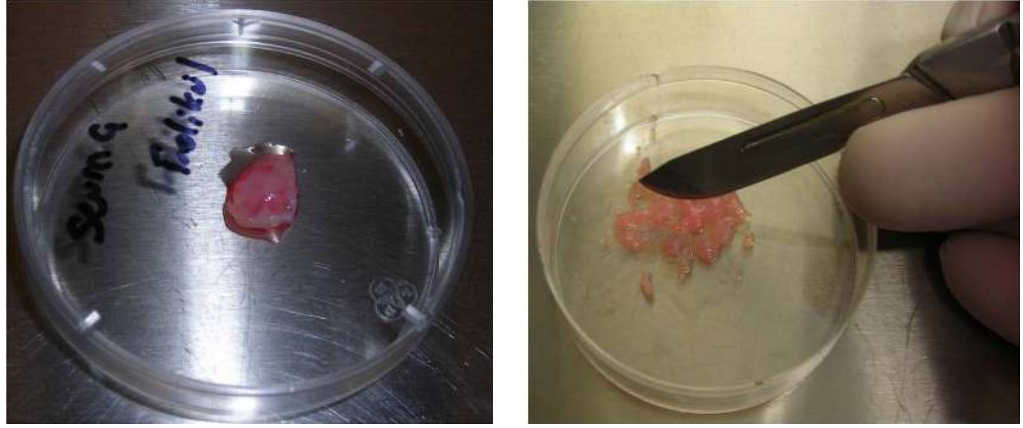
3.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültür Çalışmaları

- a. Dişeti ve folikül dokuları kültür çalışmaları kontaminasyonun önlenmesi amacı ile laminar flow (biosafety cabinet classII) cihazı içerisinde çalışıldı (Şekil 3.2). Dokular serum fizyolojik içerisinde çıkarılarak petri kaplarına konuldu.



Şekil 3.2. Kültür çalışmalarının yapıldığı laminar flow (biosafety cabinet classII) cihazı.

- b. Petri kabı içerisindeki dişeti ve folikül dokuları ilk olarak bistüri ucu ile fiziksel olarak küçük parçalara bölündükten sonra kollajenaz tip-1 (3 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma, USA) ve dispaz (4 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma, USA) karışımı ile 37° C 'lik çalkalamalı su banyosunda 1 saat süresince enzimatik parçalanmaya bırakıldı (94) (Şekil 3.3, Şekil 3.4) .



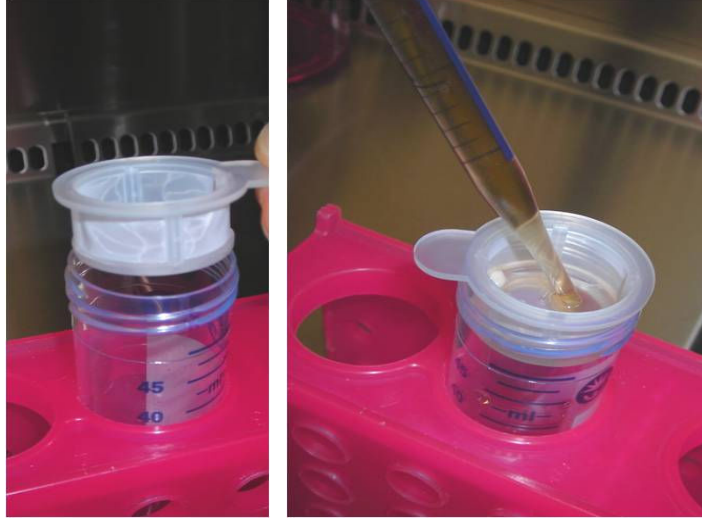
Şekil 3.3. Doku örneklerinin bistüri ucu ile mekanik olarak parçalanması.



Şekil 3.4. Fiziksel olarak parçalanmış dokular kollojenaz tip-1 (3 µg/ml) ve dispaz (4 µg/ml) karışımı ile 37° C 'lik çalkalamalı su banyosunda 1 saat süresince enzimatik olarak parçalanmaya bırakılması.

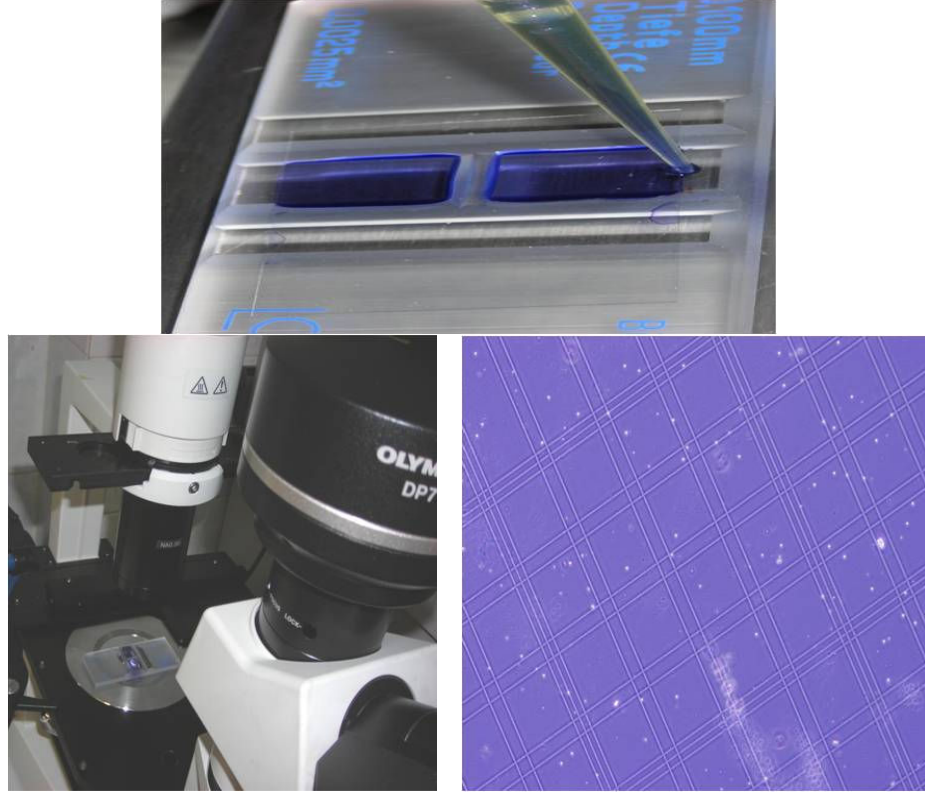
- c. Tek hücre süspansiyonu elde etmek amacıyla, fiziksel ve enzimatik olarak parçalanmış doku örnekleri 70 µm çapındaki steril filtrelerden (BD, USA) geçirildi (Şekil 3.5). Filtre edilen hücre süspansiyonu daha sonra 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Tekrar PBS (Sigma, USA) ile süspanse edilerek hücre sayımı ve canlılık analizi yapıldı. Hücre sayımı ve canlılık için, hücre süspansiyonundan 50 µl alındı ve 50 µl trypan mavisi (%0,4) ile boyanarak thoma lamına konuldu. Steril tüp içerisinde

toplanan hücre solüsyonundan, inverted mikroskobu altında hücre sayımı yapıldı (**Şekil 3.6**).



Şekil 3.5. Fiziksel ve enzimatik olarak parçalanan doku örneklerinin 70 µm çapındaki steril nylon mesh'lerden (BD, USA) geçirilmesi.

- d. Sayım yapıldıktan sonra hücreler 25 cm² lik kültür kapları (T25) (Greiner Bio-One, Germany) içerisine 5x10³ ve 5x10⁴ hücre/cm² yoğunluğunda iki ayrı kültüre konuldu ve 5 ml kültür vasatı ilave edildi. Kültür vasatı DMEM-LG (Biochrom, Germany), %10 fetal bovine serum (FBS) (GIBCO-BRL, Germany) ve %1 penisilin/streptomisin' den (Biochrom, Germany) hazırlandı. Hücre kültürleri %5 CO₂ içeren 37°C' lik ve %95 nemli inkübatörde inkübasyona bırakıldı (**Şekil 3.7**).
- e. Erken ve daha geç yapışan hücreler arasında herhangi bir fark olup olmadığını değerlendirmek amacıyla 2 günün sonunda kültür kabına yapışmayan hücreler toplandı ve farklı kültür flasklarında taze kültür vasatı içerisinde inkübasyona bırakıldı. Kültür kabı yüzeyine daha geç yapışan bu hücrelere “geç yapışan hücreler” adı verildi. İlk kültür kabına yapışmış olan hücreler üzerine taze kültür vasatı eklenerek yapışan hücrelerin gelişmesine devam edildi.



Şekil 3.6. Hücre sayımı ve canlılık analizi için trypan mavisi ile boyanan hücre solüsyonu thoma lamına konuldu ve inverted mikroskobu altında değerlendirildi.



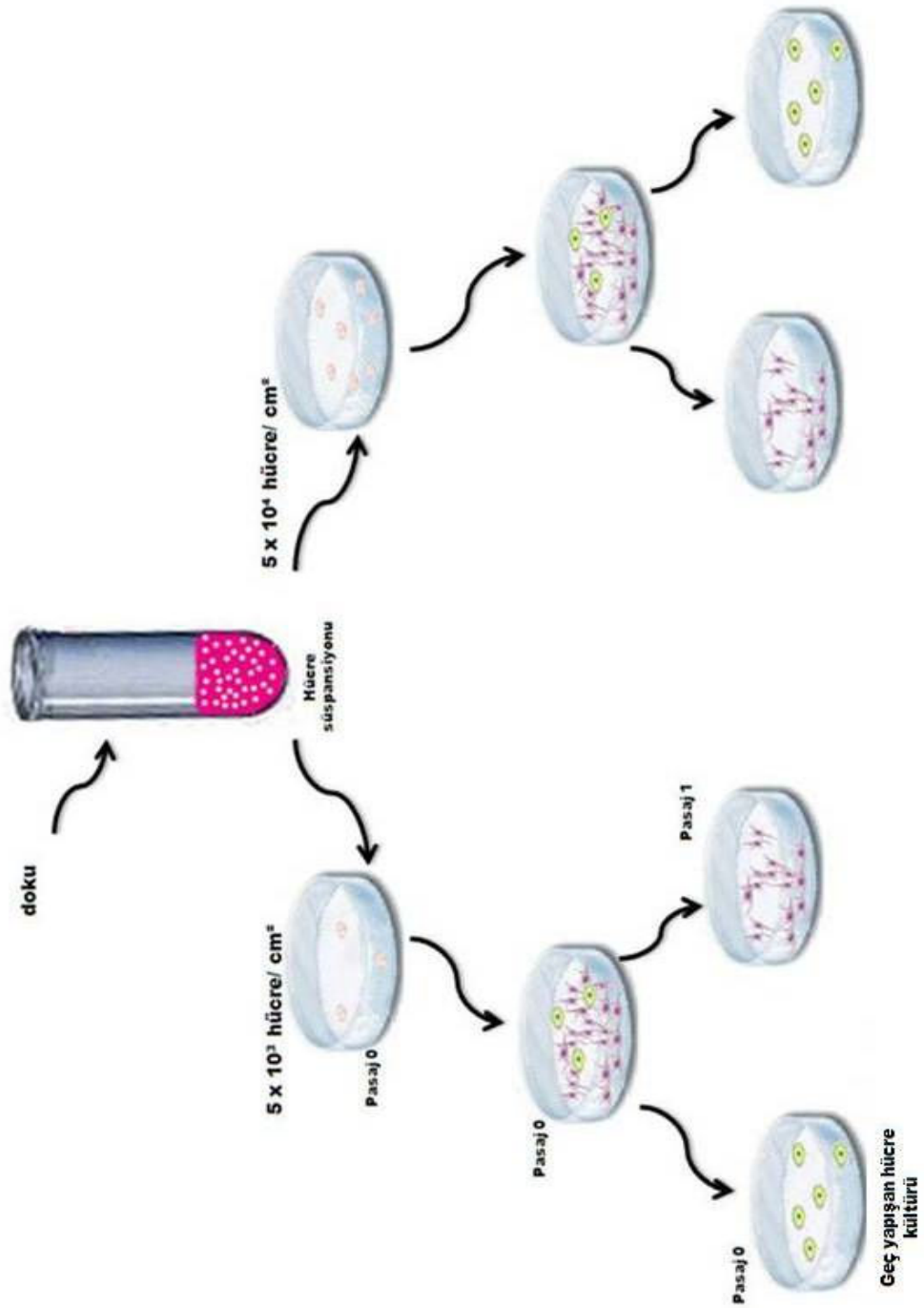
Şekil 3.7. Hücre kültürleri %5 CO₂, 37°C'lik ve %95 nem içeren inkübatörler içerisine yerleştirilerek inkübasyona alındı.

- f. Üç-dört günde bir vasat değiştirilerek kültüre devam edildi.
- g. Hücreler kültür kabı yüzeyinin %70-80'ını kaplayana kadar kültür vasat değişimine devam edildi.
- h. Kültür kabı içerisindeki yapışan hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıklarında %0.25 tripsin-EDTA ile tripsinize edilerek yapışan hücreler kaldırıldı ve solüsyon içerisine alındı. Hücre sayımı yapıldıktan sonra ileri pasajlar için hücreler yeniden kültüre konuldu. Fazla sayıda hücre elde edilmiş ise artan hücreler $1-1,5 \times 10^6$ hücre/ml yoğunluğunda dondurma vasatı ile cryovial (Greiner Bio-One, Germany) içerisine konuldu. Cryovialler önce -80°C ' de 24 saat sonra da sıvı nitrojene konularak saklandı. Dondurma vasatı DMEM-LG (Biochrom, Germany), %20 FBS (GIBCO-BRL, Germany) ve %10 dimetilsülfoksit (DMSO) (Applichem, Germany) ile hazırlandı (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Fazla olan hücreler, sıvı nitrojen tankı içerisinde muhafaza edildi.

- i. Kültürlere 8. pasaja kadar devam edildi. Karakterizasyon çalışmaları 2, 5 ve 8. pasajlarda gerçekleştirildi. Hücre kültür çalışmaları, Şekil 3.9' daki şematik çizimle özetlenmiştir.



Şekil 3.9. Hücre kültür çalışmalarını özetleyen şematik çizim.

3.2. İzole Edilen Hücrelerin Akım Sitometri İle Tanımlanması

Dişeti ve folikülden izole edilen hücreler akım sitometri cihazı ile yüzey antijenlerine göre uygun antikorlar ile tanımlandı. Stromal kökenli hücrelere özgü CD105 (PE) (e-bioscience, USA), CD44 (PE) (e-bioscience, USA), CD90 (PE) (BD, USA), CD106 (FITC) (BD, USA), CD166 (PE) (BD, USA), CD146 (PE) (BD, USA), CD73 (PE) (BD, USA) ve CD29 (FITC) (e-bioscience, USA) antikorları yanında, hematopoietik hücrelere özgü CD45 (FITC) (BD, USA), CD34 (FITC) (BD, USA), CD14 (PE) (BD, USA), CD3 (FITC) (BD, USA) ve HLA-ABC (PE) (BD, USA) ile HLA-DR (FITC) (Chemicon, USA) antikorları kullanıldı (55). Çalışmalar kültürde hücrelerin çoğaltılması sonrası yapıldı. Bir iki örnekte ise kültür öncesi, bir işlem uygulanmadan da analizler yapıldı. Çalışmalar BD FACSAria Cell-Sorting Sistemi ile analiz edildi.

3.3. İzole Edilen Hücrelerin Yağ, Kemik, Kıkırdak Ve Sinir Hücrelerine Farklılaşma Potansiyelinin Araştırılması

Çoğaltılan MKH' nin yağ, kıkırdak, sinir, kemik hücre tiplerine farklılaşma kapasiteleri farklılaşma vasatları içinde gerçekleştirildikten sonra histokimyasal, immünohistokimyasal metotlar ile farklılaşma kapasitesi değerlendirildi. Dişeti ve dental folikül dokularının kontrol grubu olarak Hacettepe Üniversitesi TBK 05/5-16 numaralı Etik Kurulu izni ile alınmış insan kemik iliği örneklerinden PEDI-STEM Laboratuvarında çoğaltılan ve tanımlanan MKH' ler kullanıldı.

3.3.1. Yağ farklılaşması:

Altı kuyucuklu (3,9 cm²) doku kültür kaplarında %90-100 oranında konfluent olana kadar geliştirilen MKH'ler üzerine, büyüme vasatı yerine DMEM-LG içerisinde %10 fetal calf serum (FCS), 1 µM dexamethasone, 60 µM indomethacine, 500µM isobutylmethylxanthine (IBMX) ve 5µg/ml insulin (Sigma, USA) ile hazırlanan adipojenik farklılaşma vasatı konularak farklılaşma yapıldı. Otuz gün süresince 3–4 gün aralıklarla farklılaşma vasatı değiştirilerek takip

edildi. Bu süre sonunda hücreler, oda sıcaklığında %10'luk formalin solüsyonu ile 10 dakika fikse edildi ve hücrelerdeki nötral lipidler için spesifik olan Oil Red O boyası ile 10 dakika boyanarak farklılaşan hücreler tespit edildi (5). Farklılaşan bu hücreler, Olympus mikroskop CKX41 (Japan) ile görüntülendi.

3.3.2. Kemik Farklılaşması:

Altı kuyucuklu (3,9 cm²) doku kültür kaplarında %50-60 oranında konfluent olana kadar geliştirilen MKH'ler üzerine, büyüme vasatı yerine DMEM-LG içerisinde %10 FCS, 100 nM dexamethasone, 10 mM beta glycerophosphate ve 0.2 mM askorbik asid (Sigma) ile hazırlanacak olan farklılaşma vasatı konularak farklılaşma yapıldı. Otuz gün süresince 3–4 gün aralıklarla vasat değiştirilerek takip edildi. Bu süre sonunda hücreler, oda sıcaklığında %10'luk formalin solüsyonu ile 10 dakika fikse edildi ve farklılaşan hücreler Alizarin Kırmısı S boyası (Sigma) ile boyanarak tespit edildi (5). Kültürdeki ekstraselüler matriks kalsifikasyonu, Alizarin Kırmısı S boyası ile boyanan kalsiyum fosfat depolarının tespiti ile belirlendi ve bu alanlar Olympus mikroskop CKX41 (Japan) ile görüntülendi.

3.3.3. Kıkırdak Farklılaşması:

Hücreler, bir hücre pelletinde kültür edilerek 3 boyutlu bir kültür sistemi elde edildi. Hücre peleti oluşturmak için, 2.5×10^5 hücre 15 ml' lik bir polipropilen tüp içerisine konuldu ve 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti üzerine DMEM-HG (Biochrom, Germany) içerisinde 100 nM dexamethasone, 10 ng/ml TGF β 3 (Peprotech, USA), NaPyr, 50 μ g/ml askorbik asid ve 50 mg/ml ITS+Premix (Becton Dickinson, USA) ilave edilerek hazırlanmış olan kıkırdaklaşma vasatı konularak 37°C ve %5 CO₂ koşullarında farklılaşmaya bırakıldı. Otuz gün süresince 3–4 gün aralıklarla vasat değiştirilerek takip edildi. Bu süre sonunda farklılaşması beklenen hücre peleti %10 formalin solüsyonu ile oda sıcaklığında 24 saat fikse edildi ve sonrasında

histolojik incelemeler için 5 µm kalınlığında frozen kesitler alındı. Alınan kesitler Alsiyan mavisi ile boyanarak farklılaşma potansiyeli belirlendi (56).

3.3.4. Sinir Hücre Farklılaşması:

Doku kültür kapları içindeki hücreler üzerine DMEM-LG içerisinde 200 µM butylated hydroxyanisole (BHA), 10 µM forskolin (FSK), 20 mM valproic acid (VA), 2% DMSO, 25 mM KCl, 1 µM Hydrocortisone, 5 µg/ml insulin ve %1 penisilin/streptomisin ile hazırlanan farklılaşma vasatı konularak farklılaşma yapıldı. Kırkbeşinci dakika ile 24. saat arasındaki morfolojik değişiklikler takip edildi (95).

4. BULGULAR

Dişeti kaynaklı hücreler ile dental folikül MKH'leri fiziksel özelliklerine, kültürde başlangıç hücre yoğunluğunun etkisine, immünofenotipik ve farklılaşma özelliklerine göre tanımlandılar.

4.1. Fiziksel Özellikleri:

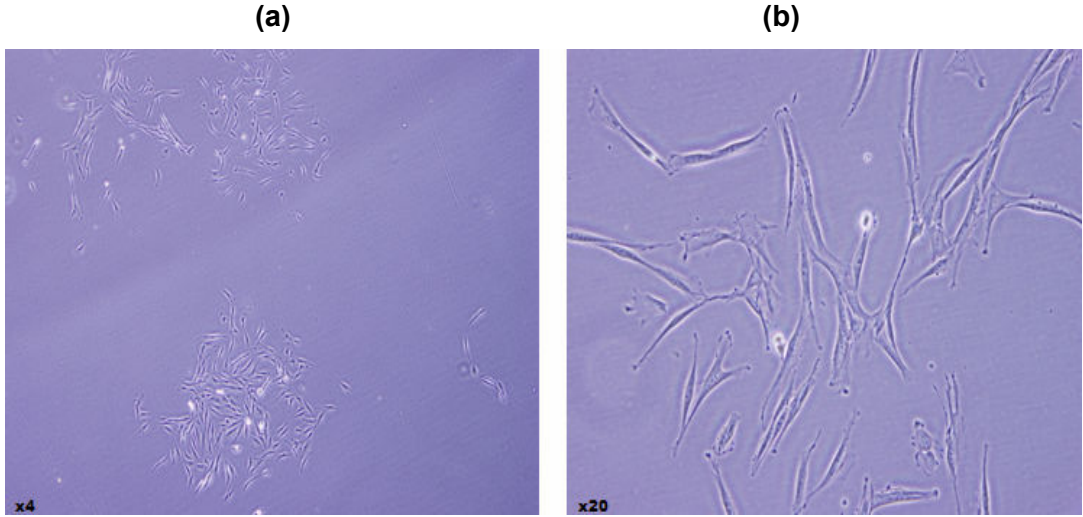
4.1.1. Hücre Morfolojisi ve Çoğalma Özellikleri:

Bütün hasta (n=6) örneklerinde dişeti ve dental folikül dokusu kaynaklı hücreler, en az 8 pasaj boyunca başarılı bir şekilde çoğaltıldı.

Dişeti dokusundan izole edilen çekirdekli hücre sayısı ortalama $2,3 \times 10^6$ ($1,2 \times 10^6 - 4 \times 10^6$) ve dental folikül dokusundan ise $10,1 \times 10^6$ ($6,25 \times 10^6 - 15,75 \times 10^6$) bulundu.

Pasaj 0 sonunda 25 cm^2 lik flasklarda (T25) dişeti dokusundan ortalama 1×10^6 ($0,7 \times 10^6 - 1,5 \times 10^6$), dental folikül dokusundan ise $1,23 \times 10^6$ ($1,1 \times 10^6 - 1,8 \times 10^6$) adezyon gösteren iğsi yapıda hücre elde edildi. Pasaj 0'da, kültürlerin %70-80 konfluent olmasına kadar geçen ortalama zaman dişeti için 13 gün (9-20) dental folikül için 14 (10-17) gün olarak gözlemlendi. Sonraki pasajlarda, hücrelerin % 70-80 oranında konfluent olması için geçen süre 4-7 gün olarak gözlemlendi. Pasaj 8' e kadar ilerletilen kültürlerde her pasaj sonunda elde edilen fazla hücreler donduruldu.

Dişeti ve dental follikül dokularından elde edilerek kültürde çoğaltılan aderan hücrelerin inverted mikroskobu altındaki morfolojik değerlendirmesinde, fibroblast benzeri iğsi fenotipte hücrelerin oluşturduğu popülasyonlar gözlemlendi (Şekil 4.1).



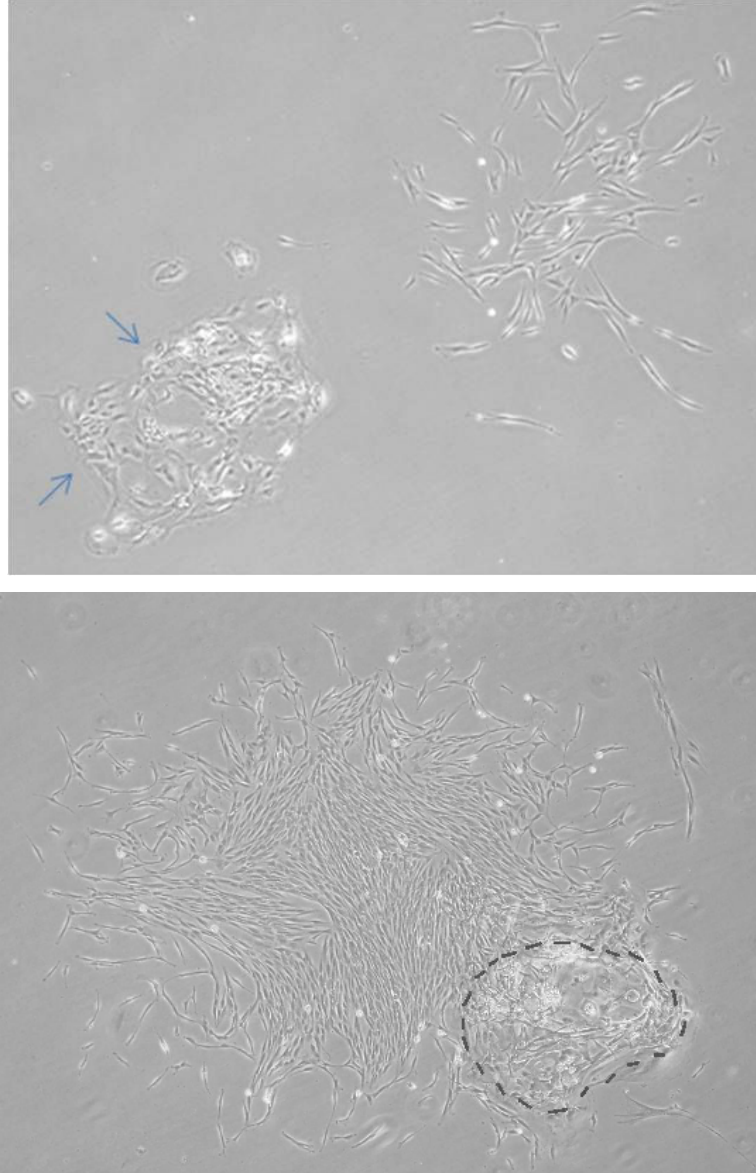
Şekil 4.1. Hücre kültüründe , **(a)** iğsi fenotipte hücre popülasyonunun oluşturduğu kolonilerin inverted mikroskop ile alınan görüntüleri (x4). **(b)** Koloni oluşturan hücre popülasyonunun yakından görüntüsü(x20).

Özellikle ilk pasajlarda, sadece bazı örneklerde sınırlı olmak üzere, daha farklı bir morfolojiye sahip, düzensiz şekilli ve koloni oluşturan ayrı bir hücre popülasyonu daha belirlendi (Şekil 4.2). Ancak, bu hücre popülasyonunda en geç ilk pasajın sonlarına doğru tutundukları flask yüzeyinden ayrılarak hücre ölümlerinin gerçekleştiği görüldü. Dişeti ve dental folikülden geliştirilen hücre kültürlerinde, hücrelerin fiziksel özellikleri yönünden aralarında herhangi bir farklılık görülmedi.

4.1.2. Adezyon Özellikleri:

Enzimatik yöntemle izolasyon sonrası in-vitro kültür yapılan hücreler 48 saat sonra incelendiğinde flask tabanına yapışmış hücreler yanında yapışma özelliği göstermeyen, kültür vasatı içinde yüzen, yuvarlak hücreler de bulunduğu gözlemlendi. Standart MKH kültür şartlarında, yapışma göstermeyen hücrelerin MKH olmadığı varsayılarak atılmakta olan geç yapışabilme özelliği taşıyan bu hücreleri tanımlamak için, kültür vasatı içinde yüzmekte olan hücreler toplandı ve yeniden kültüre ekim yapıldı. Kültür örnekleri, 48 saat sonra yeniden

değerlendirildiğinde bu popülasyon içinde de plastik doku kültür kaplarına yapışma gösteren hücreler olduğu saptandı. Bu hücreler “geç yapışan hücreler” olarak adlandırıldı. Geç yapışan hücrelerin çoğalma, farklılaşma ve immünofenotipik özelliklerinin incelendiği az sayıda örnekte, bu özellikler yönünden erken yapışan hücreler ile aralarında bir fark saptanmadı.



Şekil 4.2. İğsi yapıda olmayıp farklı morfolojiye sahip hücre popülasyonu (okla belirtilmiştir). Kesikli çizgilerle işaretlenen alanda farklı morfolojideki hücre popülasyonu ile iğsi hücrelerin oluşturduğu kolonilerin iç içe geçtiği görülmekte.

4.2. Başlangıç Hücre Yoğunluğunun Etkisi:

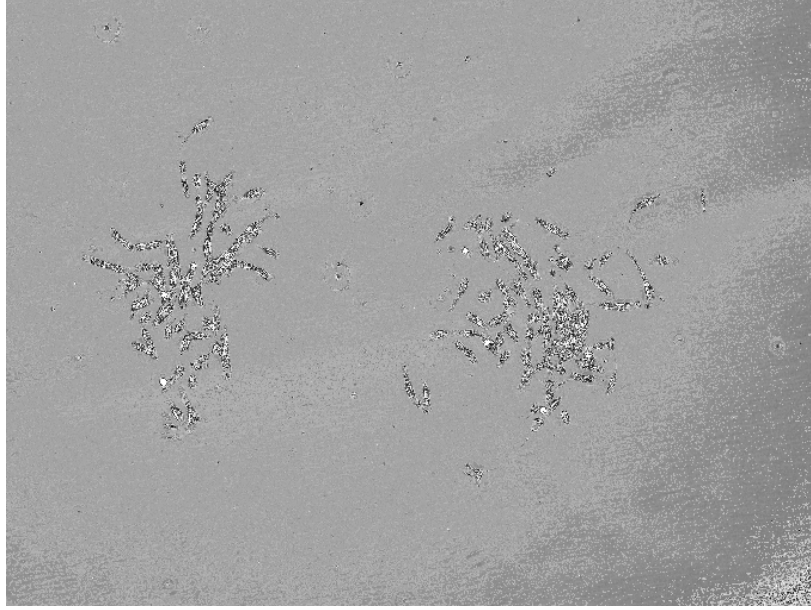
Başlangıç hücre yoğunluğunun izole edilen hücrelerin gelişimi ve tanımlanması üzerine etkisini araştırmak amacı ile kültür çalışmaları, düşük (5×10^3 hücre/cm²) ve yüksek (5×10^4 hücre/cm²) hücre yoğunluğunda olmak üzere iki farklı şekilde yapıldı.

Inverted mikroskobu altında, hücre kültürlerinin gelişimi izlendiğinde, düşük hücre yoğunluğunda yapılan kültürlerde, hücrelerin daha çok koloniler oluşturarak çoğaldıkları, yüksek yoğunlukta ise koloni oluşturan hücre kümelerinin daha az sayıda olduğu, hücrelerin flask yüzeyine geniş bir şekilde dağıldıkları ve bazı bölgelerde iç içe geçmelerin olduğu görüldü (Şekil 4.3). Hücre kültürlerinin konfluent olarak pasaj atlama süreleri dikkate alındığında, her iki farklı hücre yoğunluğuna sahip hücre kültürleri arasında önemli bir farklılık görülmedi. (Tablo 4.1).

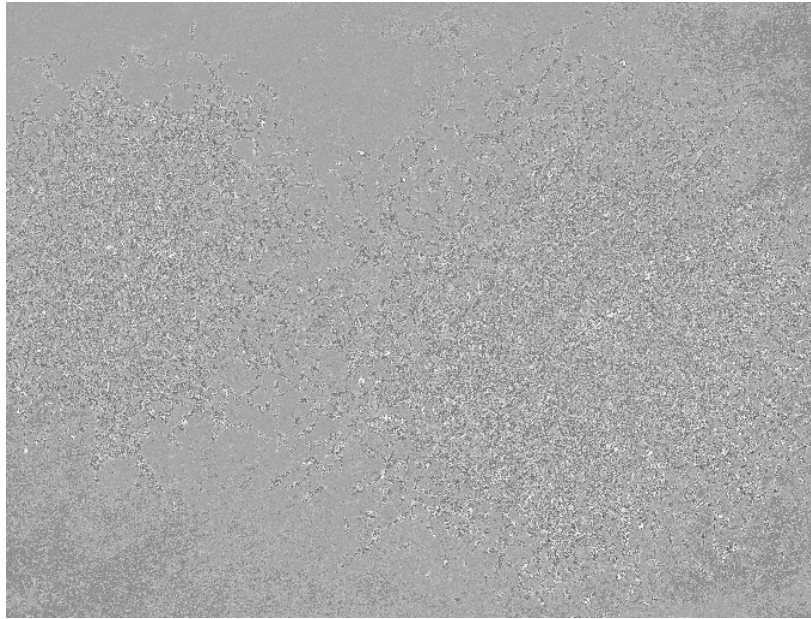
	<i>DİŞETİ (n=6)</i>		<i>FOLİKÜL (n=6)</i>	
<i>Toplam hücre sayısı (heterojen hücre topluluğu)</i>	2,3 X 10 ⁵		10,1 X 10 ⁵	
<i>Başlangıç hücre yoğunluğu</i>	<u>5×10^3 hücre/cm²</u>	<u>5×10^4 hücre/cm²</u>	<u>5×10^3 hücre/cm²</u>	<u>5×10^4 hücre/cm²</u>
<i>P0-1 süresi</i>	13 gün	13 gün	16 gün	12 gün
<i>P0'da elde edilen aderan hücre sayısı (25 cm²'lik bir doku kabı için)</i>	0,7 X 10 ⁵	1,3 X 10 ⁵	1,06 X 10 ⁵	1,4 X 10 ⁵
<i>P1-2 süresi</i>	7 gün	7 gün	6 gün	6 gün
<i>P1'de elde edilen aderan hücre sayısı (25 cm²'lik bir doku kabı için)</i>	1,23 X 10 ⁵	1 X 10 ⁵	1,8 X 10 ⁵	2.01 X 10 ⁵

Tablo 4.1. Farklı hücre yoğunluklarında gerçekleştirilen kültür örneklerinin, elde edilen ortalama hücre sayılarına ve hücrelerin çoğalması için gerekli ortalama sürelerle göre kıyaslanması.

(a)



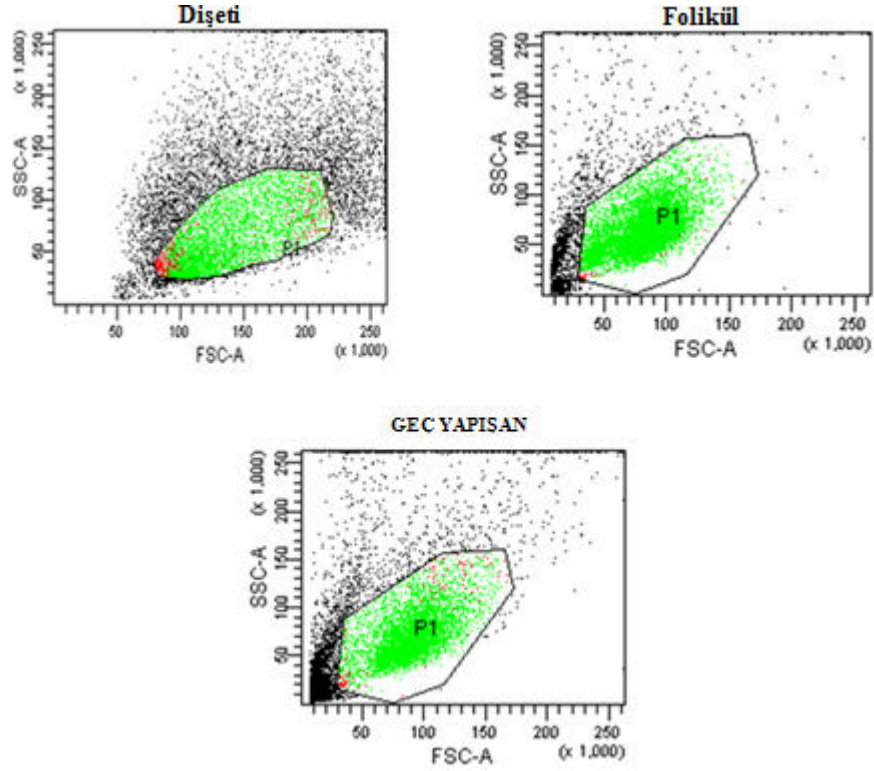
(b)



Şekil 4.3. İnverted mikroskobu altında, **(a)** düşük hücre yoğunluğunda yapılan kültürlerde, hücrelerin daha çok basit koloniler oluşturarak çoğaldıkları, **(b)** yüksek yoğunlukta hücrelerin doku kültür kabı yüzeyine geniş bir şekilde dağıldıkları ve bazı bölgelerde kolonilerin iç içe geçtikleri görüldü.

4.3. İmmünofenotipik Özellikleri:

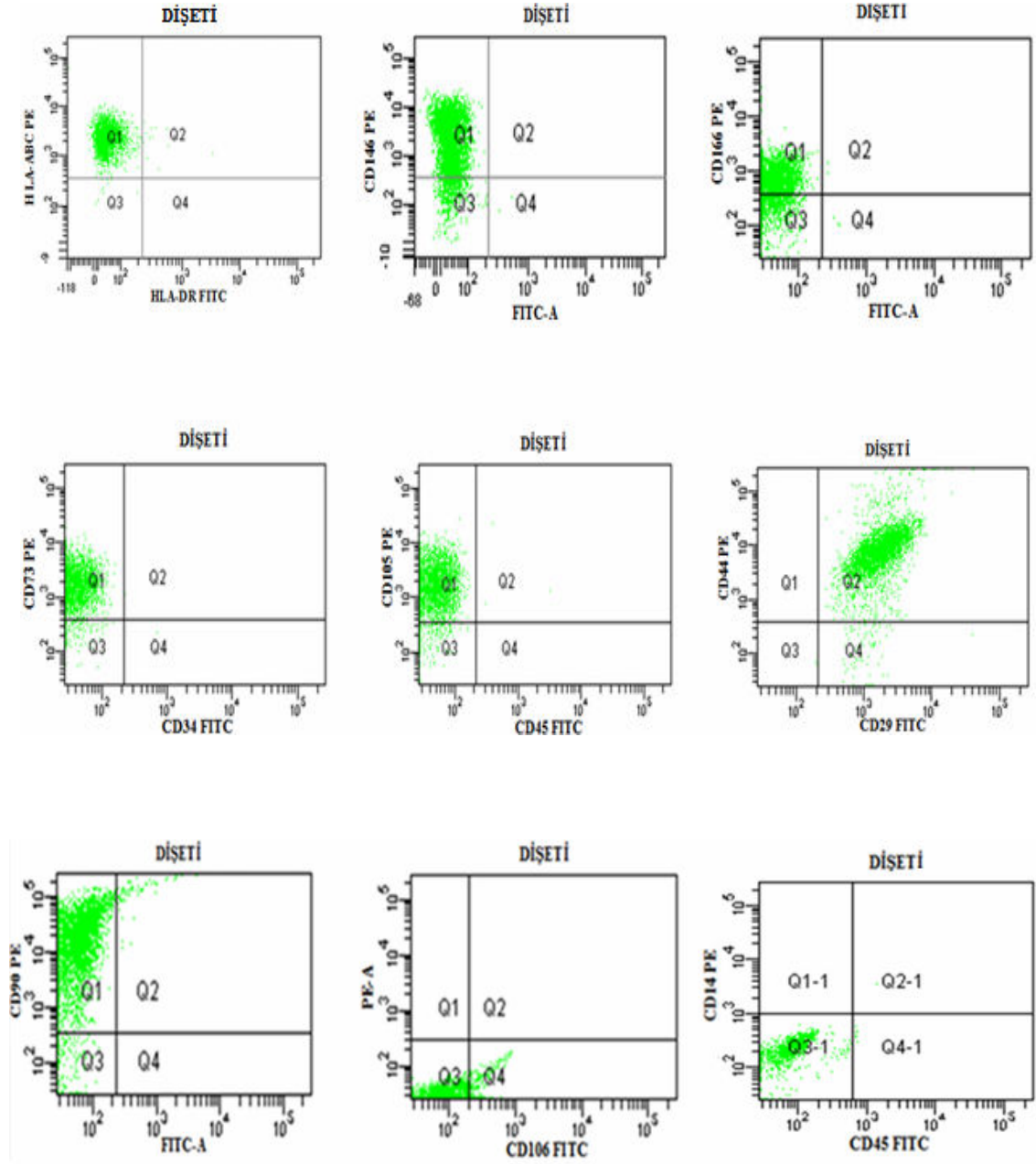
Dişeti ve dental folikül kültürleri ile geç yapışan hücre kültürlerinin 2. pasaj (P2) veya sonraki incelemelerinde, akım sitometri ile hücre büyüklüğü ve granülaritesine göre çoğu örnekte homojen bir hücre popülasyonu elde edildi. Bazı örneklerde ise dağınık bir görüntü elde edildi (Şekil 4.4).

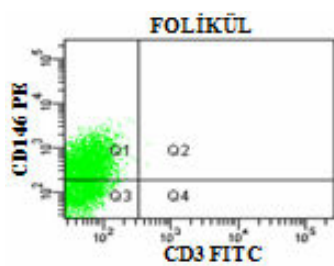
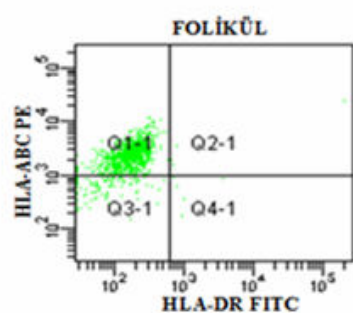
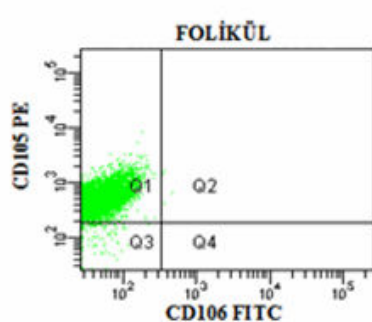
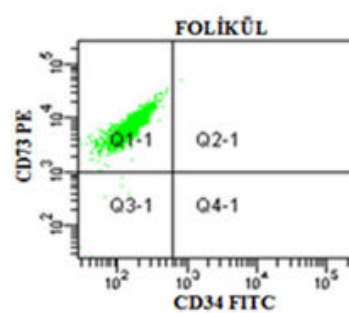
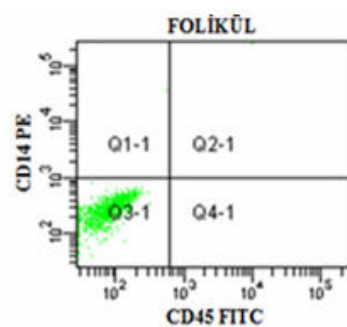
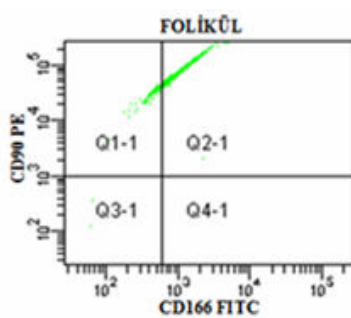
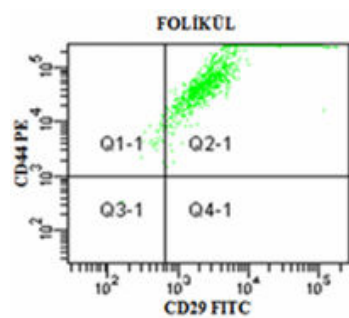


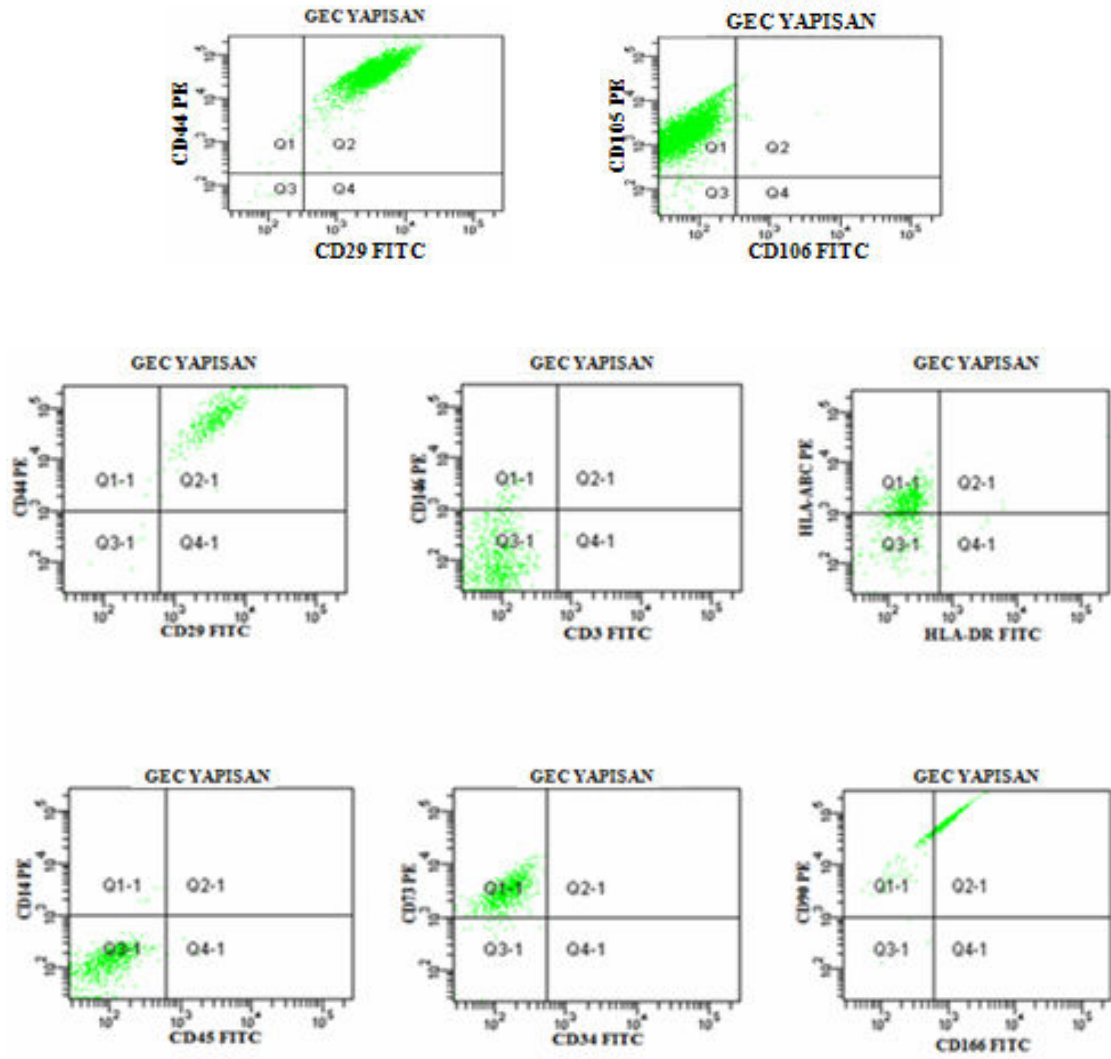
Şekil 4.4. Kültür örneklerinin, hücre büyüklüğü ve granülitesine göre homojen bir hücre popülasyonu içerdikleri görüldü.

Kültür edilen hücrelerin immünofenotipinde, diş eti veya folikül doku örnekleri arasında farklılık saptanmadı. Erken ve geç yapışan hücrelerin incelenmesinde de hücrelerin immünofenotipik özellikleri benzer bulundu. Tüm örneklerde stromal kökenli hücrelere özgü CD166 (PE), CD105 (PE), CD73 (PE), CD29 (FITC), HLA-ABC (PE), CD146 (PE) ve CD44 (PE) yüzey antijenlerinin pozitif olduğu ve hematopoetik kökenli hücrelere özgü CD45

(FITC), CD14 (PE), CD3 (FITC), HLA DR (FITC), CD34 (FITC) yüzey antijenlerinin de negatif olduğu görüldü (Şekil 4.5).

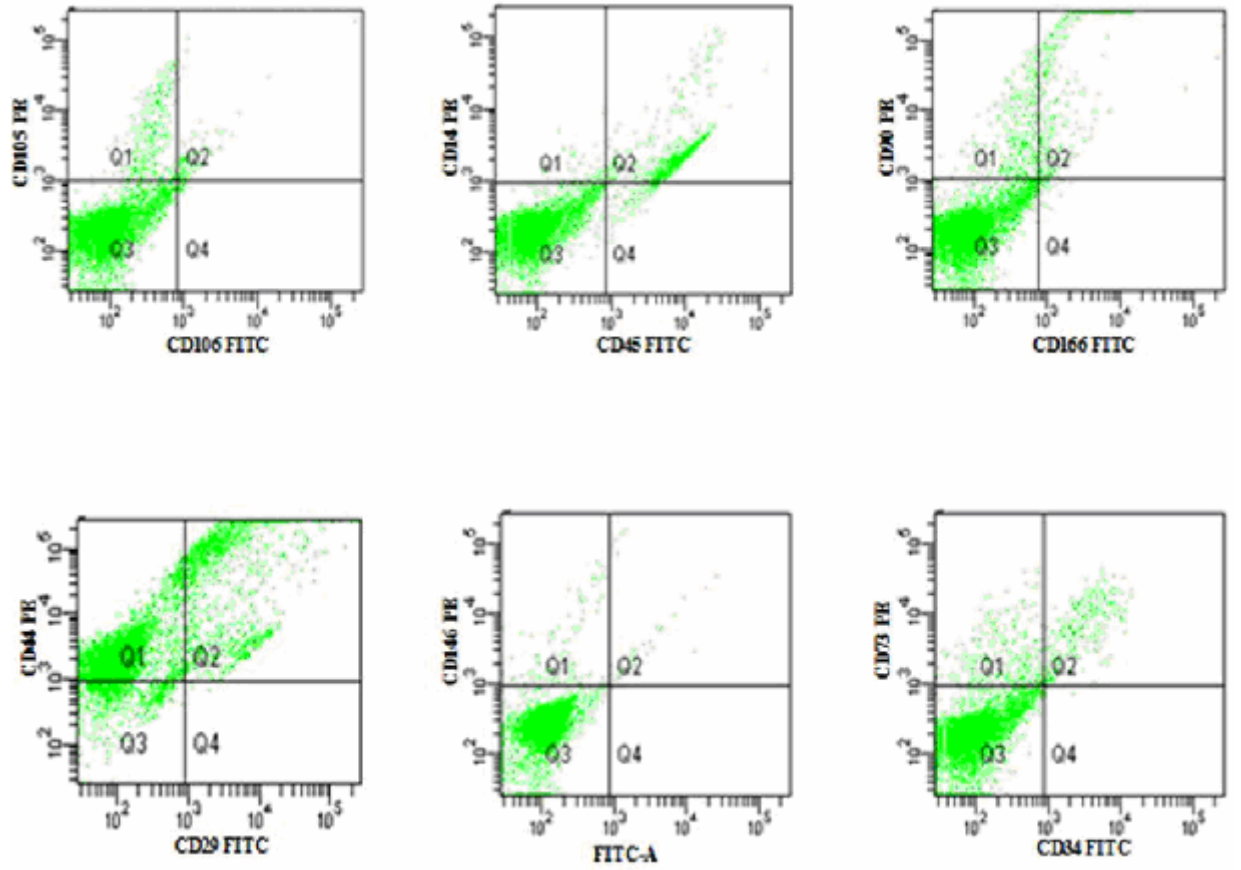






Şekil 4.5. Bakılan yüzey antijenlerinin dişeti, dental folikül ve geç yapışan hücre örneklerindeki sonuçlar.

Üzerinde herhangi bir işlem yapılmamış, sadece dokudan izole edilerek elde edilen hücre örneklerinin yüzey antijenlerinin incelenmesinde ise kültürde geliştirilen diğer örneklerle göre bazı farklılıklar saptandı (Şekil 14.6) (Tablo 4.2).



Şekil 4.6. Üzerinde herhangi bir işlem yapılmamış, dokudan izole edilip kültüre ekilmeden incelenen hücrelerin yüzey antijen ekspresyonu.

Yüzey Markerları	Dental Folikül	Dişeti	Geç yapışan	İşlem yapılmamış
HLA-ABC PE	96,3 ± 2,7	95,9 ± 4	94,7 ± 3,4	---
HLA- DR FITC	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,2 ± 0,2	---
CD14 PE	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,5 ± 0,1	11,5
CD29 FITC	98,4 ± 0,7	97,4 ± 1,2	99,2 ± 0,2	15,6
CD34 FITC	0,3 ± 0,3	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	3,3
CD44 PE	98,4 ± 0,7	97,4 ± 1,2	99,2 ± 0,2	72,8
CD45 FITC	0,6 ± 0,4	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1	11,5
CD73 PE	98,3 ± 0,3	98,2 ± 0,5	98,2 ± 1,1	3,1
CD90 PE	97,8 ± 0,9	96,1 ± 1,9	96,4 ± 2,7	4,7
CD105 PE	98,1 ± 0,7	92,6 ± 2,6	95,8 ± 2	4
CD106 FITC	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,7 ± 0,7	0,2
CD146 PE	42 ± 19,4	67 ± 29,6	42,9 ± 16,9	1
CD166 PE	91,6 ± 5,2	95,4 ± 1,5	96,3 ± 2,7	3,6

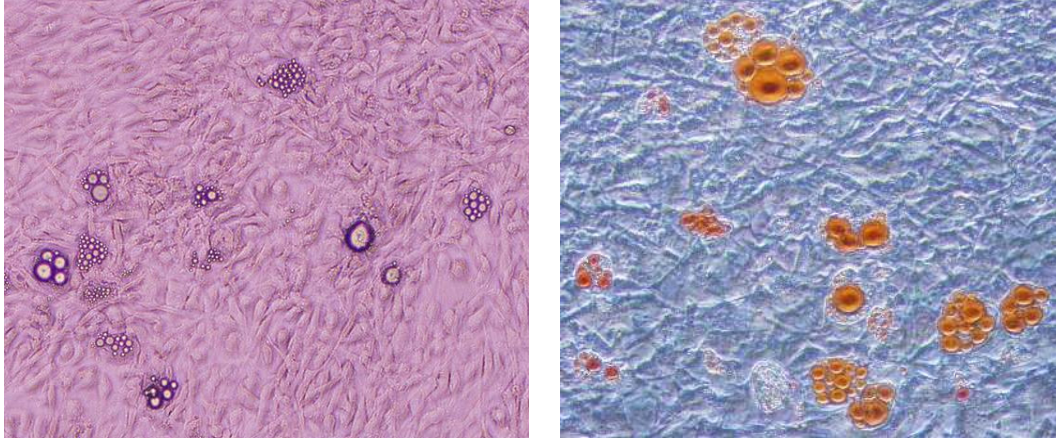
Tablo 4.2. Akım sitometri ile yüzey markerlarına bakılan örneklerden elde edilen sonuçlar.

4.4. Dişeti ve Dental Folikül Dokusu Kaynaklı MKH'lerin Farklılaşma Özellikleri:

Dişeti ve dental folikül dokularının farklılaşma kapasiteleri değerlendirildiğinde, aralarında belirgin olarak bir farklılık olmadığı gözlemlendi. Kontrol grubu olarak kemik iliği kaynaklı MKH' ler kullanıldı. Bu hücrelerle kıyaslandığında kemik iliği kaynaklı MKH'lerin dental dokulara göre daha erken farklılaşmaya başladığı ve oran olarak daha fazla hücrede farklılaşma gözlemlendiği tespit edildi. Kemik iliği MKH' lerinde yaklaşık 4-5 gün içerisinde farklılaşmaya ait morfolojik değişiklikler gözlenmeye başlanırken, dişeti ve dental folikül dokularında bu süre 8-14 gün olarak belirlendi.

4.4.1. Adipojenik farklılaşma

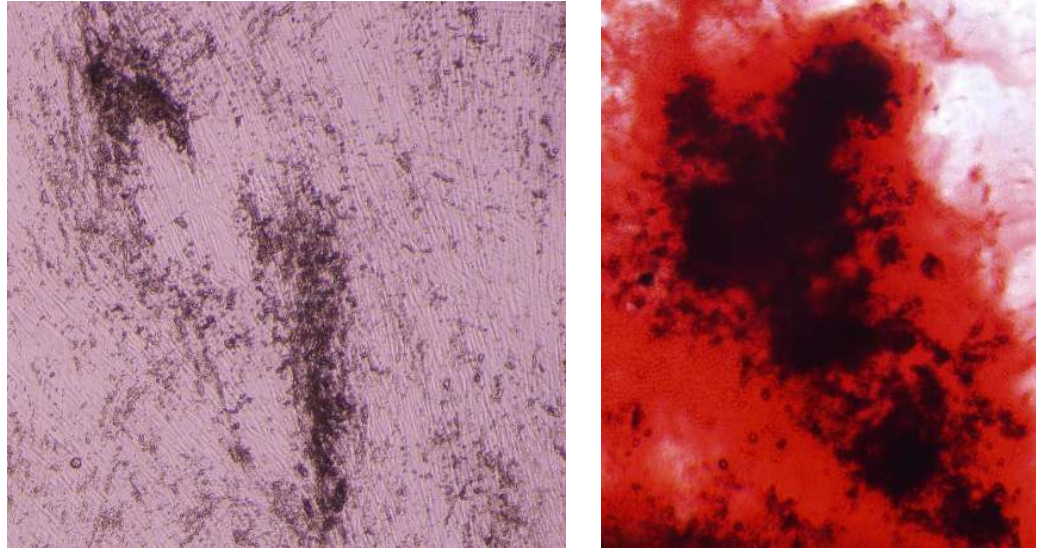
Adipojenik vasat konulduktan ortalama 5 gün sonra kontrol insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal hücrelerin büyük çoğunluğunda, inverted mikroskop ile açık bir şekilde görülebilen küçük yağ damlacıkları gözlemlendi. Dişeti ve dental folikül dokuları için bu sürenin yaklaşık olarak 10 gün olduğu görüldü. Kültürün ilerleyen günlerinde, hücreler yuvarlaklaşmaya başladı ve yağ damlacıklarının boyutları büyüdü. Kültürler, adipojenik vasat içinde farklılaşmaya konulduktan 30 gün sonra Oil Red O boyası ile boyandılar ve kırmızıya boyanan çok sayıda homojen lipid damlacıkları görüldü (Şekil 4.7). Dental folikül ve dişeti dokusu kaynaklı hücreler ile kontrol grubu olarak kullanılan insan kemik iliği MKH'lerinin adipojenik indüksiyonu başarılı oldu ve hücrelerin adipojenik yönde farklılaştıkları gözlemlendi. Hücrelerin çoğu preadiposit fenotipte morfolojiye sahipti. Farklılaşma vasatında kültür süresi uzatıldığında (>40 gün), bazı hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrıldığı ve yüzmeye başladığı görüldü. Adipojenik indüksiyon vasatı konulmayan örneklerde lipid damlacıkları görülmedi.



Şekil 4.7. Adipojenik vasat içinde uyarılan dişeti dokusu kaynaklı hücrelerin, kültürün ilerleyen günlerinde yuvarlak, yağ damlacıkları oluşturmaları ve Oil Red O boyası ile pozitif boyanmaları görülmekte.

4.4.2. Osteojenik farklılaşma

Kültür kaplarında yaklaşık olarak 7 gün sonra küçük koyu renkte depolanmalar görüldü ve kültürün ilerleyen günlerinde bunlar giderek arttı. Otuz günün sonunda, kültür kabı çok sayıda amorf depolanmalar ile kaplandı ve hücreler açıkça görülmekteydi. Dişeti ve dental folikül dokusu kaynaklı hücreler ile insan kemik iliği kaynaklı MKH'lerinin in-vitro osteojenik potansiyelleri 30 günün sonunda Alizarin red S boyası ile boyanan kalsiyum mineralizasyonu ile görüldü (Şekil 4.8). İndüksiyon vasatı konulmayan kontrol örneklerinde kalsiyum fosfat kümelenmesi görülmedi ve Alizarin red S boyama negatif sonuçlandı.



Şekil 4.8. Dişeti dokusu kaynaklı hücrelerin, osteojenik vasat içerisinde kültür edildiklerinde Alizarin red S boyası ile boyanan çok sayıda amorf kalsiyum fosfat depolanmalarının görüntülenmesi.

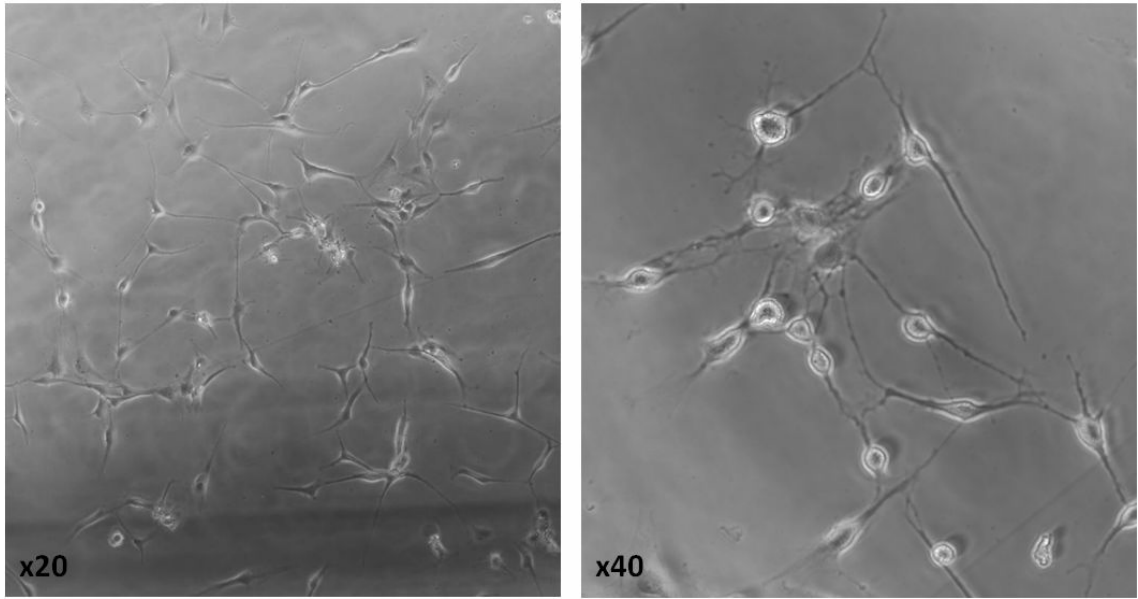
4.4.3. Kondrojenik farklılaşma

Dişeti ve dental folikül dokusu kaynaklı hücrelerden 2-3 mm çapında stabil yuvarlak pelletler oluşturuldu. Peletler 30 gün boyunca kondrojenik medyumda tutuldu ve alcian blue boyama kesitlerinde hücrelerin kondrojenik

potansiyellerini doğrulayan ekstraselüler matriks mukopolisakkaritlerine ilişkin pozitif bir sonuç alınamadı.

4.4.4. Nörojenik farklılaşma

İndüksiyon öncesi aşamada 24 saat süresince bFGF e maruz bırakılan hücreler daha sonrasında nöronal indüksiyon vasatına konuldu. Hem dişeti hem de dental folikül dokusu hücreleriyle yapılan çalışmalarda, hücrelerin morfolojisinde değişim gözlemlendi ve saatler içerisinde hücreler nöronal morfolojiye uyumlu şekilde yuvarlaklaştılar ve kültür kabında bir iletişim ağına benzer bir yapı oluşturacak şekilde akson ve dendirit benzeri birçok sitoplazmik uzantı geliştirdiler (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Dişeti dokusuna ait hücrelerin nörojenik vasatta indüksiyonundan sonra elde edilen görüntüler. Hücrelerin morfolojisinde saatler içerisinde nöronal morfolojiye uyumlu şekilde yuvarlaklaşmalar, akson ve dendirit benzeri sitoplazmik uzantıyla uyumlu değişiklikler gözlemlendi.

5. TARTIŞMA

Mezenkimal kök hücreler farklı doku kaynaklarından elde edilse de çok yönlü farklılaşabilme, plastik doku kültür kaplarına yapışma ve spesifik bazı yüzey antijenleri taşıma gibi birçok ortak özellik taşımaktadırlar (1-5, 46, 47). Bulundukları mikro-çevreye göre ve organizmada ihtiyaç olma haline bağlı olarak MKH'lerin biyolojik özellikleri ve fonksiyonlarında önemli değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Bununla ilişkili olarak da bu hücrelerin izole edildikleri bölgeye göre değişik özellikler taşıyacağı ileri sürülmüş (36, 40-43) ve spesifik bir dokunun onarımı için o bölgeden elde edilen kök hücrelerin kullanımı gündeme gelmiştir (36).

Oral ve maksillofasiyal bölge için de alternatif kök hücre kaynakları araştırılmıştır (26-35). Bu çalışmada, artmış mitotik aktivite ve doku turnover' ı göstermesi yanında, elde edilme kolaylığı dikkate alındığında dişeti dokusunun da bölgesel patolojilerde kullanılabilecek bir MKH kaynağı olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca, dişetin fibroblasttan zengin bir doku olması nedeniyle (37) , MKH'leri barındıracağı (fibroblastların da köken aldığı hücreler olmaları nedeniyle) düşünülmüştür. Böyle bir dokunun incelenmesiyle, fibroblastoid morfolojide olan MKH'lerin fibroblasttan farklı özelliklerinin de araştırılması planlanmıştır. Literatürde, dişeti dokusundan MKH elde edilişi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Sunulan çalışmada, hastalardan invaziv yaklaşım gerektirmeden alınan dişeti ve folikül dokuları incelenmesi sonucunda, her iki dokudan da hücre kültüründe çoğaltılabilen, fiziksel ve immünolojik özellikleri stromal karakterde olup in-vitro ortamda indüklendiğinde adiposit, osteositlere farklılaşabilen, nöronal indüksiyon vasatına maruz bırakıldığında ise nöronal morfolojide hücrelere dönüşen MKH' ler geliştirildi.

Dişeti dokusundan izole edilen ve kültürde çoğaltılan hücrelerin yüzey antijenleri analizlerinden elde edilen sonuçlar, bu hücrelerin MKH' ler için tanımlanmış yüzey antijenlerine (46, 47) sahip olduğunu gösterdi. Dişeti ve dental folikül dokusu kaynaklı hücrelerin yüzey antijenleri değerlendirmelerinde, birbirine yakın sonuçlar elde edildi. Buna karşılık, dokudan izole edilip, üzerinde hiçbir işlem yapılmayarak incelenen bir örnekte ise diğerlerinden farklı olarak, MKH'lere ait yüzey antijen ekspresyonlarının düşük olduğu görüldü. Bu da, in-vitro çoğaltılma öncesi dokuda, beklenildiği üzere, homojen bir topluluk olmamasına, stromal hücreler yanında epitel, endotel ve hematopoetik gibi farklı hücre popülasyonlarının bulunmasına bağlandı.

Dişeti ve dental folikül hücrelerinin yüzey antijen ekspresyonları, Lindroos ve arkadaşlarının (96) insan dental pulpa, periodontal ligament, dental folikül dokusu kaynaklı MKH ve bukkal mukoza kaynaklı fibroblastlar üzerinde yaptıkları karakterizasyon çalışmalarıyla da uyum göstermektedir.

Dominici ve arkadaşları (47) MKH'lerin tanımlanması için CD73,90,105 antijeni pozitif hücre popülasyonunun %95 'in üzerinde olması gerektiğini fakat bu yüzey antijenlerinin homojen bir MKH popülasyonu elde etmede tam olarak yeterli olamayacağını, spesifik yüzey antijenlerinin araştırılması gerektiğini belirtmişlerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda CD146 yüzey antijenine dikkat çekilmektedir (97, 98). CD 146 pozitif hücre popülasyonunun özellikle osteojenik farklılaşma potansiyeli olarak daha üstün olduğu belirtilmiştir (97). Çalışmamızda da yüzey marker sonuçları arasındaki en fazla çeşitlilik CD146' da görülmüştür. İncelenen birkaç örnekte, dişeti dokusunda CD146 ekspresyonunun diğerlerinden yüksek olması, bu dokunun farklılaşma potansiyelini destekleyici bir bulgu olarak kabul edilmiştir. Hücre popülasyonu içerisindeki CD146 pozitif olanların seçilerek üzerinde çalışılmasının, ortaya çıkan bu sonucun kişisel farklılığa mı yoksa farklılaşma potansiyelleri farklı olan alt hücre popülasyonlarına mı bağlı olduğu hakkında kesin bir yorum yapılabilmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir.

Literatürde sıkça tartışılan bir konu da MKH'leri tanımlamak için belirlenen kriterlerin spesifik olmadığı, stromal karakterde diğer hücrelerle benzerlik gösterebileceğidir. Bu çalışmada, hücre karakterizasyon çalışmalarının yapıldığı dişeti ve dental folikül dokusu fibroblast hücrelerinin yoğun olarak bulundukları dokulardır. Her iki hücre tipi (MKH ve fibroblast) de mezoderm kökenlidir ve birçok dokudan izole edilebilmektedirler. Son zamanlarda yapılan çalışmalar fibroblastların fenotip (morfoloji ve spesifik yüzey antijenleri) veya büyüme kapasitelerine göre MKH den ayırt edilmelerinin zorluğuna işaret etmektedir. Bu ayrımada MKH'lerin fibroblastlardan farklı olarak geniş bir farklılaşma kapasitesine sahip olmasının önemli olduğu bildirilmiştir (99, 101). Ancak bazı çalışmalar, fibroblastların da MKH gibi osteosit (102-107) , kondrosit (108, 109) ve adiposit (110) gibi mezodermal kökenli dokulara farklılaşabilme yeteneğinde olduklarını göstermiştir. Hatta yakın zamanda yapılan bir çalışmada, fibroblastların hepatosit gibi endoderm kökenli dokulara da farklılaşabildiği gösterilmiştir (111).

Lysy ve arkadaşlarının (111) gerçekleştirdiği çalışmada cilt biyopsisinden elde edilen dokudan fibroblast izolasyonu yapılmış ve bu hücrelerin farklılaşabilme potansiyelleri değerlendirilmiştir. Ayrıca kontrol grubu olarak sağlıklı donörlerden elde edilen kemik iliği kaynaklı MKH'leri kullanılmış ve bu iki farklı hücre grubunun birbirleriyle karşılaştırılmasında hem fiziksel özellikler hem de bakılan spesifik yüzey antijen sonuçlarına göre birbirine benzer sonuçlar olduğu gösterilmiştir. İn-vitro kültürlerde fibroblast popülasyonunun daha hızlı çoğaldığı, çoğalmalarının ileri pasajlarda durduğu ve kendini eşleyen popülasyon sayısının daha yüksek olduğu sonuçlarına ulaşılmıştır. Buna karşılık, fibroblast hücre popülasyonu ile 3. pasajdan sonra osteojenik ve adipojenik farklılaşma kapasitesinin azaldığı, MKH'lerin ise ileri pasajlarda da farklılaşma yeteneğini korudukları bildirilmiştir (111).

Dişeti ve dental folikül dokularıyla yapılan çalışmamızda, ileri pasajlarda da osteojenik, adipojenik ve nöronal farklılaşma kapasitesinin korunması

nedeniyle bu dokularda MKH popülasyonuna ait hücrelerin bulunduğu düşünülmüştür.

Hücrelerin çeşitli özelliklerinin kültür koşullarıyla değişim gösterdiği bilinmektedir (112-115). Özellikle başlangıç hücre yoğunluğu, konfluent duruma kadar geçen süre ve hücrelerin çoğaltılma süresi ile ilgili standart bir yöntem bulunmamakla birlikte mikroçevre koşullarındaki farklılıkların hücrelerin farklılaşma potansiyeli ve çoğalma hızları gibi özellikleri üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir. Bazı çalışmalar, MKH'lerin düşük yoğunlukta kültür edilmesi ile proliferasyon hızının arttığını ve daha fazla multi-potent hücre elde edildiğini göstermişlerdir (112, 113). Başka araştırmacılar, çoğaltma boyunca hücre yoğunluğunun çok düşük seviyelerde tutulmasının, yüksek proliferasyon ve farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerin homojen bir alt popülasyonundan oluşan kültürlerinin seçimi için gerekli olduğunu önermişlerdir (114, 115).

Sunulan çalışmada, dişeti ve dental folikül dokularından izole edilen hücrelerin karakterizasyon çalışmaları üzerine etkisini araştırmak amacı ile başlangıç hücre yoğunluğu düşük (5×10^3 hücre/cm²) ve yüksek (5×10^4 hücre/cm²) olmak üzere iki farklı şekilde yapıldı. İnverted mikroskobu altında hücre kültürlerinin gelişimi izlendiğinde, düşük hücre yoğunluğunda yapılan kültürlerde, hücrelerin daha çok koloniler oluşturarak çoğaldıkları, yüksek yoğunlukta ise bu tarz koloni oluşturan hücre kümelerinin daha az sayıda olduğu, hücrelerin flask yüzeyine geniş bir şekilde dağıldıkları ve bazı bölgelerde iç içe geçmelerin olduğu görüldü. Yüksek hücre yoğunluğuna sahip kültürlerin daha kısa sürede gelişip, pasaj atlamalarının daha hızlı olacağı düşünülmesine rağmen aralarında herhangi bir farklılık görülmedi. Bu sonuç, düşük yoğunlukta kültür edilen hücrelerin daha çabuk çoğaldıklarını göstermekteydi. Farklılaşma çalışmalarında ise hücre yoğunluğuna bağlı olarak bir farklılık saptanmadı.

Sıçan kemik iliği kaynaklı MKH ile yapılan bir çalışmada Neuhuber ve arkadaşları, düşük ve yüksek hücre yoğunluğunun büyüme kinetiğini ve farklılaşma potansiyeline etkisi araştırılmıştır. Çalışmaya göre 200 hücre/cm² yoğunluğunda kültür edilen örneklerin 2000 hücre/cm² yoğunluktaki örneklerle kıyasla büyüme kinetiklerinin daha yüksek olduğu, fakat hücre yoğunluğunun farklılaşma potansiyelleri üzerine önemli bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir (116). Çalışmamızdan elde edilen bu sonuçlar bahsedilen çalışmayla örtüşmektedir, ancak o çalışmada kullanılan hücre dozları çok daha düşüktür.

Pasaj sonlarında elde edilen canlı hücre sayılarına ve hücrelerin konfluent olup pasaj atlamalarına kadar geçen sürelerle bakıldığında dişeti ve dental folikül dokusu örneklerinin birbirine yakın sonuçlar verdiği görüldü. Buna göre, dişeti ve dental folikül dokularından izole edilen hücrelerin proliferasyon oranları açısından karşılaştırıldığında aralarında bir fark olmadığı sonucuna varıldı.

Dişeti ve dental folikül dokusu kültürler örneklerinde, hücrelerin inverted mikroskobu altındaki morfolojik özellikleri dikkate alındığında aralarında herhangi bir farklılık görülmedi. Bununla birlikte, fibroblast benzeri içsi fenotipte hücrelerin oluşturduğu genel görünümün aksine bazı dişeti ve dental folikül dokusu kültür örneklerinde özellikle erken pasajlarda farklı morfolojiye sahip, düzensiz şekilli kolonilerin olması, kültür örneklerinin epitelyal hücreler ile kontaminasyonunu düşündürdü. Dişeti dokusundan alınan örnekler için epitelyal kontaminasyonun olması beklenen bir sonuçtu. Aynı şekilde dental folikül dokusundan izole edilen primer kültürler de bazen in vivo olarak dental folikül dokusunun hemen yanında yer alan stallet retikulumdan köken alan epitelyal hücreler ile kontamine olabilmektedirler. Bununla birlikte, kullanılan kültür koşullarının sadece fibroblast benzeri dental folikül dokusu hücrelerinin büyümesine olanak verip epitelyal hücre büyümesine imkan tanıması nedeniyle epitelyal hücrelerin en fazla pasaj 3'e kadar canlılığını sürdürebildikleri belirtilmektedir (117). Çalışmamızda da bu farklı morfolojiye

sahip hücre popülasyonunun sadece erken pasajlarda görülmesi ve en geç pasaj 1'de bu hücrelerin canlılıklarını yitirmesi epitelyal kontaminasyon olduğunu düşündürdü. Bununla birlikte, karakterizasyon çalışmalarının ileri pasajlarda yapılmasıyla olası epitelyal kontaminasyonun elde edilen sonuçlar üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı şeklinde yorumlandı.

Pasaj 2, 5 ve 8'de yapılan farklılaşma çalışmalarında, dişeti dokusu kaynaklı kültür örneklerinin osteojenik, adipojenik ve nörojenik indüksiyonu ile hücrelerin osteosit ve adipositlere farklılaşabildikleri, ayrıca morfolojik olarak nöronal hücrelerin geliştiği görüldü. Elde edilen bu sonuç, dişeti kaynaklı hücrelerin kemik iliği kaynaklı MKH' ye benzer şekilde geniş bir farklılaşma potansiyeline sahip mezenkimal kök ve/veya progenitör hücre popülasyonu içerdiğini göstermekteydi. Osteojenik, adipojenik ve nörojenik farklılaşmalarda elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, dişeti ve dental folikül dokularından izole edilen hücreler arasında farklılık olmadığı görüldü. Her iki dokunun da kontrol grubu olarak kemik iliği kaynaklı MKH kıyaslandığında aralarında farklılaşma kapasiteleri ve hızlarına göre farklılık olduğu görüldü. Kemik iliği kaynaklı MKH'lerde yaklaşık 4-5 gün içerisinde farklılaşmaya ilişkin morfolojik değişiklikler gözlenmeye başlanırken, dişeti ve dental folikül dokularında bu süre 8-14 gün olarak değişiklik gösterdi. Ayrıca kemik iliği kaynaklı örneklerde osteojenik ve adipojenik farklılaşmaların daha iyi olduğu görüldü. Bu sonuç, kemik iliği kaynaklı MKH' nin farklılaşma potansiyeli bakımından dental folikül dokusundan ve dişetinden daha üstün olduğu şeklinde yorumlandı. Kondrojenik farklılaşmaya, dişeti ve dental folikül hücrelerine ait örneklerin hiçbirinde rastlanmadı. Kondrojenik farklılaşma için kemik iliği MKH' lerinde kullanılan yöntem uygulandı. Hücrelerin köken aldıkları kaynağa ve mikroçevreye göre farklı özellikler taşıdığı göz önüne alınırsa, kondrojenik farklılaşmanın olmamasının uygulanan yöntem ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

Dental folikül dokusu kaynaklı MKH ile yapılan farklılaşma çalışmalarında da, daha önceden literatürde belirtildiği gibi bu hücrelerin osteosit ve

adipositlere farklılaşabilme yeteneğine sahip oldukları görüldü. Dental folikül hücre kültürlerinin osteojenik kültür vasatı ile indüksiyonda, kültür kabı boyunca dağılan tek tek mineralize alanlar veya bazı örneklerde membran benzeri yapışık bir tabaka şeklinde kalsiyum kümelenmeleri izlendi.

Morsczeck ve arkadaşları (29) insanlarda 20 yaş dişlerinden elde ettikleri dental folikül dokusundaki prekürsör hücreleri ilk olarak izole etmeyi başarmışlardır. Aynı araştırmacılar izole ettikleri bu hücreleri tanımlamak için bir çalışma daha sunmuşlardır (30). Bu çalışmada, 20 yaş dişlerinden elde ettikleri dental folikül dokusundan izole ettikleri hücrelerin farklılaşma potansiyelini değerlendirmek için pasaj 6 ve 17'deki örnekler kullanılmış ve 4-5 haftalık uzun dönem kültürlerde farklılaşma potansiyelleri değerlendirilmiştir. Pasaj 6'daki hücrelerde, indüksiyondan 5 hafta sonra transparan, esnek, bir kısmı tarafından doku kültür kabına sıkıca yapışmış membran benzeri bir yapı olduğu görülmüştür. Bunun aksine, pasaj 17'deki hücrelerin farklılaşmasında indüksiyondan 4 hafta sonra kompakt kalsifiye nodüllerin olduğu belirtilmiştir. Kalsifikasyonun, kompakt kalsifiye nodüllerde membran benzeri yapılara göre daha yoğun olduğu ve bu nodüler yapıların Von Kossa boyası ile boyanabildiği görülmüştür. Bağ dokularının Alsiyan mavisi ile yapılan boyamalarının membran benzeri yapılarda yani pasaj 6'daki örneklerde çok az veya olmadığı, kalsifiye nodüler yapıların olduğu pasaj 17'deki örneklerde ise daha fazla olduğu rapor edilmiştir (30).

Lindroos ve arkadaşları (96), insan dental pulpa, periodontal ligament, dental folikül dokusu kaynaklı MKH ve bukkal mukoza kaynaklı fibroblastlar üzerinde karakterizasyon çalışmaları yapmışlardır. Bütün tanımlama çalışmaları için dental kaynaklı hücrelerde pasaj 2-5, bukkal mukoza fibroblastları için ise pasaj 4-6'daki hücreler alınmıştır. Örnekler, 14 gün boyunca farklılaşma vasatında inkübasyonda tutulmuştur. Dental pulpa, folikül ve periodontal ligament dokusundan izole edilen kök hücrelerin osteojenik farklılaşma gösterdiği ve ALP aktivitelerinin yüksek olduğu, bukkal mukoza kaynaklı

fibroblastların ise osteojenik farklılaşma potansiyeline sahip olmadığı ve ALP aktivitelerinin yok denecek kadar az olduğu belirtilmiştir. Osteojenik farklılaşmada, 14 günün sonunda yapılan değerlendirmeye göre dental kaynaklı doku örneklerinin yüksek seviyede ALP aktivitesi gösterdiği, pulpa ve ligamentin morfolojik olarak birbirine benzer karakterde olduğu, folikülün ise bunlara kıyasla daha küçük boyutlarda kaldığı belirtilmiştir. Örneklerin hiçbirinde adipojenik farklılaşma görülmezken, kondrojenik farklılaşma ise sadece dental pulpa ve periodontal ligament doku kaynaklı MKH' lerde görülmüştür (96).

Bir başka çalışmada, Jo ve arkadaşları (51) insan dental dokularından ve mandibular kemik iliğinden izole ettikleri postnatal kök hücreleri birbiriyle karşılaştırmışlar ve çalışmalarını optimum kültür koşulları sağlamak amacıyla 3 farklı vasatta gerçekleştirmişlerdir. Proliferasyon kapasitelerini değerlendiren çalışmalar pasaj 3'de yapılmış ve periapikal folikül dokusunun proliferasyon oranları ve kendini eşleyen popülasyon sayısı bakımından diğer dental kök hücre örneklerine göre üstünlükleri rapor edilmiştir. Periapikal folikül dokusunun koloni oluşturan hücre popülasyonu sayısının diğer örneklerin 2 katı olduğu belirtilmiştir. Bütün dental kök hücre örneklerinin %10 FCS, 100 µM askorbik asid, 2 mM/L glutamin, 100 U/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin içeren alpha-MEM vasatında, periapikal folikül dokusunun ise farklı olarak %20 FCS ve 50 µM askorbik asid içeren alpha-MEM'de optimum büyüme gösterdiği rapor edilmiştir. Farklılaşma potansiyelleri değerlendirildiğinde bütün örneklerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma yeteneğinde olduğu görülmüştür. Örnekler farklılaşma vasatında 21 gün boyunca inkübe edildikten sonra boyama işlemi yapılmıştır. Periodontal ligament ve mandibular kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin, ALP aktiviteleri ve Alizarin kırmızısı boyanma miktarına göre çökelen kalsiyum seviyesini gösteren değerlendirmelere göre diğerlerinden daha iyi bulunmuştur. Dental pulpanın periapikal folikül dokusuna göre daha yüksek ALP aktivitesine sahip olmasına karşın çökelen kalsiyum miktarı seviyesinin periapikal folikül dokusunda daha fazla olduğu görülmüştür (51).

Dental folikül dokusu kaynaklı hücrelerle yaptığımız farklılaşma potansiyelini belirlemeye yönelik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, literatürdeki benzer çalışmalarla genel olarak bir uyum göstermektedir. Kondrojenik farklılaşma ile ilgili elde edilen olumsuz sonuç, Lindroos ve arkadaşlarının (96) sundukları çalışmayla örtüşmektedir. Elde edilen bu sonuç, Morsczeck ve arkadaşlarının (30) sundukları çalışmaya dayanarak, dental folikül dokusu kaynaklı kültür örneklerinin sadece ileri pasajlarda kondrojenik farklılaşmaya uğrayabildikleri şeklinde yorumlanabilir. Dental folikül dokusuyla yapılan adipojenik farklılaşmaya ait sonuçlar, Jo ve arkadaşlarının (51) yaptıkları çalışmayla uyum göstermektedir. Fakat, Lindroos ve arkadaşlarının (96) yaptıkları çalışmada farklı bir sonuç olarak dental folikül dokusu kaynaklı örneklerde adipojenik farklılaşmanın olmadığı belirtilmiştir. Bu sonucun sadece dental folikül dokusu için olmayıp daha önceden pek çok çalışmada adipojenik farklılaşma yeteneğinde oldukları gösterilen dental pulpa ve periodontal ligament kaynaklı örnekleri de kapsamı, farklılığın çalışmada kullanılan adipojenik medyumun içeriğinden ya da indüksiyon süresinin 14 günle sınırlı tutulmasından kaynaklandığı şeklinde yorumlanabilir. Çalışmamızda, hem dişeti hem de dental folikül dokusu örneklerinde farklılaşmaya ait morfolojik değişiklikler indüksiyondan 8-14 gün sonra izlenmeye başlanmıştır.

Çalışmamızda, dental folikül kaynaklı kök hücrelere ait literatürdeki sonuçlara ek olarak bu hücrelerin nöronal farklılaşma da gösterebildiği sonucu elde edildi. Nöral krestten köken alan ektomezenkimal hücre kaynaklı dental folikül dokusunun nörojenik farklılaşma gösterebilmesi, belki de migrasyonları sırasında epiteloid karakterlerini kaybettikleri düşünülen nöral krest kaynaklı hücrelerden en azından bir kısmının bu özelliklerini koruduğu şeklinde yorumlanabilir. Dişeti ve dental folikül dokularının farklılaşma kapasitesinin değerlendirilmesinde ise, aralarında belirgin olarak bir farklılık olmadığı ve dişeti kaynaklı hücrelerin de dental folikül dokusu kaynaklı MKH gibi farklılaşabilme yeteneğine sahip oldukları gözlenmiştir.

6. SONUÇ

Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre dişeti dokusu kaynaklı hücreler, MKH'lere spesifik yüzey antijenlerine sahip olması, çeşitli hücre dizilerine (osteosit, adiposit ve nöronal morfolojide hücreler) farklılaşabilmesi ve plastik yüzeylere yapışabilen iğsi fenotipte, koloni oluşturabilen hücre popülasyonu içermesi nedeniyle MKH olarak tanımlanabilmek için gerekli kriterlerin hepsine sahiptir. Bu sonuçlar doğrultusunda, dişeti dokusunun MKH ve/veya progenitör hücreler ihtiva ettiği gösterilmiştir.

Folikülden de benzer özellikte MKH diye tanımlanabilecek hücreler elde edilmiş ve her iki doku kaynaklı MKH'lerin birbiri ile kıyaslamasında farklılık gözlenmemiştir.

Fibroblastlar ile birçok ortak özellik taşıyan MKH'lerin fibroblasttan ayrımı için, kültürde hücre yoğunluğunun, adezyon özelliklerinin, yüzey antijen ekspresyonlarının ve farklılaşma özelliklerinin detaylı karşılaştırması yapıldı. Başlangıç hücre yoğunluğu, erken veya geç adezyon göstermeleri ve yüzey antijenleri yönünden fibroblast ve MKH'lerin ayırt edilmesine katkıda bulunacak bir farklılık saptanmadı. Ancak osteojenik farklılaşma ile ilişkisi olduğu bildirilen ve çalışmamızda da en fazla değişkenlik gösteren CD146 ekspresyonunun bu ayırmada önemli olacak bir yüzey antijeni olabileceği düşünüldü.

Hücrelerin kök/projenitör özelliğini göstermesi açısından en önemli özellik olan çok yönlü farklılaşma kapasiteleri test edildiğinde (8. pasaja kadar), ileri pasajlarda da farklılaşma kapasitesinin korunmasının hücrelerin kök/projenitör özellikleri ile uyumlu olduğu, böylelikle genellikle 3.pasajdan sonra farklılaşma özelliği bulunmayan (111) fibroblastlardan ayırt edilebileceği düşünüldü.

6.1. Dişeti Dokusunda MKH/Progenitör Hücrelerin Olmasının Getireceği Avantajlar

- ❖ Dişeti dokusu, lokalizasyonu düşünüldüğünde ulaşılması çok kolay bir kaynaktır.
- ❖ İnvaziv bir yöntemle gerek olmadan çok rahatlıkla elde edilebilir. Biyopsiye benzer biçimde minör bir cerrahi işlemle veya gingivoplasti/gömülü 20 yaş diş çekimi gibi rutin bir cerrahi işlem sırasında ek bir yöntemle gereksinim olmadan alınabileceği için hasta ve hekim açısından herhangi bir ek risk taşımaz.
- ❖ Diğer kaynaklarda olduğu gibi, gerektiğinde kullanılmak üzere saklanmasına ihtiyaç yoktur. Çünkü her yaşta kolaylıkla elde edilebilir. Doku bankalarında saklanmasına gerek olmadığı için maliyet açısından avantajlı bir kaynaktır.

6.2. Literatüre Sağlanan Katkı:

- ❖ Dişeti dokusunda kök/projenitör hücrelerin bulunduğu dair bir literatüre rastlanmamıştır. Sunulan çalışmada, MKH popülasyonuna ait hücrelerin dişeti dokusunda da bulunduğu gösterildi.
- ❖ Maksillofasiyal bölgede yer alan MKH kaynakları arasında diğerlerine göre üzerinde daha az çalışmanın olduğu dental folikül dokusuyla ilgili karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu hücrelerin nöronal morfolojide hücrelere de farklılaşabildikleri gösterilmiştir.
- ❖ Dişeti dokusu, hücrelerin homojen bir şekilde ayrılmasını sağlayacak teknikler geliştirildikten sonra rejeneratif amaçlı kullanılmak üzere öncelikli olarak maksillofasiyal bölgede ve hatta diğer bölgelerde doku mühendisliğinde kullanılmak üzere yeni bir hücre kaynağı olabilir.
- ❖ Dişeti MKH' leri, her yaş grubunu etkileyen, diş dokusunu destekleyen çevre yapıların yıkımı ve hatta diş kaybı ile sonuçlanan periodontal hastalıkların hücresel esaslı tedavi yöntemlerinde kullanılabilirler. Periodontal hastalıkların ortaya çıkması ve ilerleyiş süreçlerinde, dişetinde yer alan bu hücrelerin rolünü esas alan bilimsel çalışmalar yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. PARKER GC, ANASTASSOVA-KRISTEVA M, BROXMEYER HE, DODGE WH, EISENBERG LM, GEHLING UM, GUENIN LM, HUSS R, MOLDOVAN NI, RAO M, SROUR EF, YODER MC. (2004) Stem cells: shibboleths of development. *Stem Cells Dev.* **13**:579-84.
2. WEISSMAN IL. (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. *Science.* **287**:1442-1446.
3. ALHADLAQ A, MAO JJ. (2004) Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev.* **13**:436-48.
4. CAPLAN AI. (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* **9**:641-50.
5. PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* **284**:1168-70.
6. KASSEM M, KRISTIANSEN M, ABDALLAH BM. (2004) Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **95**:209-14.
7. ABDALLAH BM, KASSEM M. (2008) Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* **15**:109-16.
8. YANG S, LIN G, TAN YQ, ZHOU D, DENG LY, CHENG DH, LUO SW, LIU TC, ZHOU XY, SUN Z, XIANG Y, CHEN TJ, WEN JF, LU GX. (2008)

Tumor progression of culture-adapted human embryonic stem cells during long-term culture. *Genes Chromosomes Cancer*. **47**:665-79.

9. BLUM B, BENVENISTY N. (2008) The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res*. **100**:133-58.
10. THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS, JONES JM. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. **282**:1145-7.
11. STEWART R, STOJKOVIC M, LAKO M. (2006) Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *Eur J Cancer*. **42**:1257-72.
12. KRAUSE DS, THEISE ND, COLLECTOR MI, HENEGARIU O, HWANG S, GARDNER R, NEUTZEL S, SHARKIS SJ. (2001) Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. **105**:369-77.
13. VERFAILLIE CM, PERA MF, LANSDORP PM. (2002) Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 369-91.
14. LAKSHMIPATHY U, VERFAILLIE C. (2005) Stem cell plasticity. *Blood Rev*. **19**:29-38.
15. KRAUSE DS. (2002) Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther*. **9**:754-8.
16. WILSON A, TRUMPP A. (2006) Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. **6**:93-106.

17. AVECILLA ST, HATTORI K, HEISSIG B, TEJADA R, LIAO F, SHIDO K, JIN DK, DIAS S, ZHANG F, HARTMAN TE, HACKETT NR, CRYSTAL RG, WITTE L, HICKLIN DJ, BOHLEN P, EATON D, LYDEN D, DE SAUVAGE F, RAFII S. (2004) Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med.* **10**:64-71.
18. ALVAREZ-DOLADO M, PARDAL R, GARCIA-VERDUGO JM, FIKE JR, LEE HO, PFEFFER K, LOIS C, MORRISON SJ, ALVAREZ-BUYLLA A. (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature.* **30**;425:968-73.
19. LE BLANC K, RASMUSSEN I, SUNDBERG B, GÖTHERSTRÖM C, HASSAN M, UZUNEL M, RINGDÉN O. (2004) Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* **363**:1439-41.
20. LE BLANC K, RINGDÉN O. (2005) Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* **11**:321-34.
21. BARTHOLOMEW A, STURGEON C, SIATSKAS M, FERRER K, MCINTOSH K, PATIL S, HARDY W, DEVINE S, UCKER D, DEANS R, MOSELEY A, HOFFMAN R. (2002) Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol.* **30**:42-8.
22. WYNN RF, HART CA, CORRADI-PERINI C, O'NEILL L, EVANS CA, WRAITH JE, FAIRBAIRN LJ, BELLANTUONO I. (2004) A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally

active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. **104**:2643-5.

23. RATAJCZAK MZ, KUCIA M, RECA R, MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK J. (2004) Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia*. **18**:29-40.
24. RATAJCZAK MZ, RECA R, WYSOCZYNSKI M, YAN J, RATAJCZAK J. (2006) Modulation of the SDF-1-CXCR4 axis by the third complement component (C3)--implications for trafficking of CXCR4+ stem cells. *Exp Hematol*. **34**:986-95.
25. CHAN J, O'DONOGHUE K, DE LA FUENTE J, ROBERTS IA, KUMAR S, MORGAN JE, FISK NM. (2005) Human fetal mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Stem Cells*. **23**:93-102.
26. MIURA M, GRONTHOS S, ZHAO M, LU B, FISHER LW, ROBER PG, SHI S. (2003) SHED: stem cells from human exfoliated deciduous tetth. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**:5807-12.
27. GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J, ROBEY PG, SHI S. (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**:13625-30.
28. SHI S, ROBERY PG, GRONTHOS S. (2001) Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*. **29**:532-9.
29. MORSCZECK C, GÖTZ W, SCHIERHOLZ J, ZEILHOFER F, KÜHN U, MOEHL C, SIPPEL C, HOFFMANN KH. (2005a) Isolation of precursor

cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* **24**:155–65.

30. MORSCZECK C, MOEHL C, GÖTZ W, HEREDIA A, SCHAFFER TE, ECKSTEIN N, SIPPEL C, HOFFMANN KH. (2005b) Differentiation in vitro of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol Int.* **29**:567–75.
31. SEO BM, MIURA M, GRONTHOS S, BARTOLD PM, BATOULI S, BRAHIM J. (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* **364**:149-55.
32. NAGATOMO K, KOMAKI M, SEKIYA I, SAKAGUCHI Y, NOGUCHI K, ODA S, MUNETA T, ISHIKAWA I. (2006) Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodont Res.* **41**:303–10.
33. IZUMI K, TOBITA T, FEINBERG SE. (2007) Isolation of human oral keratinocyte progenitor/stem cells. *J Dent Res.* **86**:341-6.
34. MATSUBARA T, SUARDITA K, ISHII M, SUGIYAMA M, IGARASHI A, ODA R, NISHIMURA M, SAITO M, NAKAGAWA K, YAMANAKA K, MIYAZAKI K, SHIMIZU M, BHAWAL UK, TSUJI K, NAKAMURA K, KATO Y. (2005) Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* **20**:399-409.
35. CICCONE A, SACCHETTI B, BARTOLI A, MICHENZI S, CORSI A, FUNARI A, ROBEY PG, BIANCO P, RIMINUCCI M. (2007) Human maxillary tuberosity and jaw periosteum as sources of osteoprogenitor cells for tissue engineering. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **104**:618.e1-12.

36. AKINTOYE SO, LAM T, SHI S, BRAHIM J, COLLINS MT, ROBEY PG. (2006) Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. *Bone*. 38:758-68.
37. ITOIZ ME, CARRANZA FA. (2002) The Gingiva. *Caranza's Clinical Periodontology*. NEWMAN MG, TAKEI HH, CARRANZA FA. 9th ed. WB Saunders Co. Chapter 1.
38. HANDA K, SAITO M, YAMAUCHI M, KIYONO T, SATO S, TERANAKA T, SAMPATH NARAYANAN A. (2002a) Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone*. **31**: 606-11.
39. HANDA K, SAITO M, TSUNODA A, YAMAUCHI M, HATTORI S, SATO S, TOYODA M, TERANAKA T, NARAYANAN AS. (2002) Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo. *Connect Tissue Res*. **43**:406-8.
40. ZHU SJ, CHOI BH, HUH JY, JUNG JH, KIM BY, LEE SH. (2006) A comparative qualitative histological analysis of tissue-engineered bone using bone marrow mesenchymal stem cells, alveolar bone cells, and periosteal cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. **101**:164-9.
41. KOGA H, MUNETA T, NAGASE T, NIMURA A, JU YJ, MOCHIZUKI T, SEKIYA I. (2008) Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res*. **333**:207-15.
42. YOSHIMURA H, MUNETA T, NIMURA A, YOKOYAMA A, KOGA H, SEKIYA I. (2007) Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res*. **327**:449-62.

43. SAKAGUCHI Y, SEKIYA I, YAGISHITA K, MUNETA T. (2005) Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* **52**:2521-9.
44. National Institutes of Health. Stem Cells: Scientific progress and future research directions. Terese Winslow, 2001.
45. MAO JJ, GIANNOBILE WV, HELMS JA, HOLLISTER SJ, KREBSBACH PH, LONGAKER MT, SHI S. (2006) Craniofacial tissue engineering by stem cells. *Dent Res.* **85**:966-79.
46. HORWITZ EM, LE BLANC K, DOMINICI M, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC, DEANS RJ, KRAUSE DS, KEATING A. (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* **7**:393-5.
47. DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI F, KRAUSE D, DEANS R, KEATING A, PROCKOP DJ, HORWITZ E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* **8**:315-7.
48. BOTH SK, VAN DER MUIJSENBURG AJ, VAN BLITTERSWIJK CA, DE BOER J, DE BRUIJN JD. (2007) A rapid and efficient method for expansion of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* **13**:3-9.
49. SOTIROPOULOU PA, PEREZ SA, SALAGIANNI M, BAXEVANIS CN, PAPAMICHAIL M. (2006) Characterization of the optimal culture

conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. **24**:462-71.

50. MEULEMAN N, TONDREAU T, DELFORGE A, DEJENEFFE M, MASSY M, LIBERTALIS M, BRON D, LAGNEAUX L. (2006) Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. *Eur J Haematol*. **76**:309-16.
51. JO YY, LEE HJ, KOOK SY, CHOUNG HW, PARK JY, CHUNG JH, CHOUNG YH, KIM ES, YANG HC, CHOUNG PH. (2007) Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng*. **13**:767-73.
52. FRIEDENSTEIN AJ. (1980) Immunology of bone marrow transplantation. Berlin: Springer.
53. OWEN M, FRIEDENSTEIN AJ. (1988) Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. **136**:42-60.
54. BAKSH D, DAVIES JE, ZANDSTRA PW. (2003) Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion independent survival and expansion. *Exp Hematol*. **31**:723-32.
55. MAJUMDAR MK, THIEDE MA, MOSCA JD, MOORMAN M, GERSON SL. (1998) Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*. **176**:57-66.

56. SHIZUKO I, MOTOKI T, TAKESHI M, ICHIRO S. (2005) Morphological examination during in vitro cartilage formation by human mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* **322**:217-26.
57. PROCKOP DJ. (1997) Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science.* **276**:71–4.
58. TSAI MS, LEE JL, CHANG YJ, HWANG SM. (2004) Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod.* **19**:1450-6.
59. FUKUMOTO T, SPERLING JW, SANYAL A, FITZSIMMONS JS, REINHOLZ GG, CONOVER CA, O'DRISCOLL SW. (2003) Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor- β 1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage.* **11**:55–64.
60. ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, HUANG J, FUTRELL JW, KATZ AJ, BENHAIM P, LORENZ HP, HEDRICK MH. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7**:211-28.
61. ZUK PA, ZHU M, ASHJIAN P, DE UGARTE DA, HUANG JI, MIZUNO H, ALFONSO ZC, FRASER JK, BENHAIM P, HEDRICK MH. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* **13**:4279–95.
62. DE BARI C, DELL'ACCIO F, TYLZANOWSKI P, LUYTEN FP. (2001) Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* **44**:1928–42.

63. CAO B, ZHENG B, JANKOWSKI RJ, KIMURA S, IKEZAWA M, DEASY B, CUMMINS J, EPPERLY M, QU-PETERSEN Z, HUARD J. (2003) Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat Cell Biol.* **5**:640–6.
64. KELLER R. (2002) Stem cells on the way to restorative medicine. *Immunology Letters.* **83**:1-12.
65. JAHAGIRDAR BN, VERFAILLIE CM. (2005) Multipotent adult progenitor cell and stem cell plasticity. *Stem Cell Rev.* **1**:53-9.
66. LAKSHMIPATHY U, VERFAILLIE C. (2005) Stem cell plasticity. *Blood Rev.* **19**:29-38.
67. CONGET PA, MINGUELL JJ. (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* **181**:67-73.
68. FERRARI G., CUSELLA-DE ANGELIS, COLETTA M., PAOLUCCI E, STORNAIUOLO A, COSSU G, MAVILIO F. (1998) Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. *Science.* **279**:1528-30.
69. RAFII S, SHAPIRO F, RIMARACHIN J, NACHMAN RL, FERRIS B, WEKSLER B, MOORE MA, ASCH AS. (1994) Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells hematopoietic progenitor cell adhesion. *Blood.* **84**:10-9.
70. ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, SILVER M, VAN DER ZEE R, LI T, WITZENBICHLER B, SCHATTEMAN G, ISNER JM. (1997)

Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. **275**:964-7.

71. LIN Y, WEISDORF DJ, SOLOVEY A, HEBBEL RP. (2000) Origins of circulating endothelial cells and endoyhelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*. **105**:71-7.
72. PETERSEN BE, BOWEN WC, PATRENE KD, MARS WM, SULLIVAN AK, MURASE N, BOGGS SS, GREENBERGER JS, GOFF JP. (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. **284**:1168-70.
73. THEISE ND, BADVE S, SAXENA R, HENEGARIU O, SELL S, CRAWFORD JM, KRAUSE DS. (2000) Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*. **31**:235-40.
74. LAGASSE E, CONNORS H, AL-DHALIMY M, REITSMA M, DOHSE M, OSBORNE L, WANG X, FINEGOLD M, WEISSMAN IL, GROMPE M. (2000) Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med*. **6**:1229-34.
75. ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, JAKONIUK I, ANDERSON SM, LI B, PICKEL J, MCKAY R, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. **410**:701-5.
76. POULSOM R, ALISON MR, COOK T, JEFFERY R, RYAN E, FORBES SJ, HUNT T, WYLES S, WRIGHT NA. (2003) Bone marrow stem cells contribute to healing of the kidney. *J Am Soc Nephrol*. **14**:S48-54.

77. MEZEY E, CHANDROSS KJ, HARTA G, MAKI RA, MCKERCHER SR. (2000) Turning blood into brain cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. **290**:1779-82.
78. BRAZELTON TR, ROSSI FM, KESHER GI, BLAU HM. (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. **290**:1775-9.
79. POMERANTZ J, BLAU HM. (2004) Nuclear reprogramming: a key to stem cell function in regenerative medicine. *Nat Cell Biol*. **6**:810-6.
80. ANDERSON DJ, GAGE FH, WEISSMAN IL. (2001) Can stem cells cross lineage boundaries?. *Nat Med*. **7**:393-5.
81. LEMOLI RM, BERTOLINI F, CANCEDDA R, DE LUCA M, DEL SANTO A, FERRARI G, FERRARI S, MARTINO G, MAVILIO F, TURA S. (2005) Stem cell plasticity: time for a reappraisal?. *Haematologica*. **90**:360-81.
82. LEE JW, KIM YH, KIM SH, HAN SH, HAHN SB. (2004) Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Med J*. **45** Suppl:41-7.
83. DICKINSON AM, CHARRON D. (2005) Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol*. **17**:517-25.
84. BACIGALUPO A, TONG J, PODESTA M, PIAGGIO G, FIGARI O, COLOMBO P, SOGNO G, TEDONE E, MORO F, VAN LINT MT. (1992) Bone marrow harvest for marrow transplantation: effect of multiple small (2 ml) or large (20 ml) aspirates. *Bone Marrow Transplant*. **9**:467-70.

85. AUQUIER P, MACQUART-MOULIN G, BLAISE D, FAUCHER C, VIENS P, MARANINCHI D. (1995) Comparison of anxiety, pain and discomfort in two procedures of hematopoietic stem cell collection: leukapheresis and bone marrow harvest. *Bone Marrow Transplant.* **16**:541-7.
86. NISHIMORI M, YAMADA Y, HOSHI K, AKIYAMA Y, HOSHI Y, MORISHIMA Y, TSUCHIDA M, FUKUHARA S, KODERA Y. (2002) Health-related quality of life of unrelated bone marrow donors in Japan. *Blood.* **99**:1995-2001.
87. DE UGARTE DA, MORIZONO K, ELBARBARY A, ALFONSO Z, ZUK PA, ZHU M, DRAGOO JL, ASHJIAN P, THOMAS B, BENHAIM P, CHEN I, FRASER J, HEDRICK MH. (2003) Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* **174**:101-9.
88. NERY EB, KRAUS BS, CROUP M. (1970) Timing and topography of early human tooth development. *Arch Oral Biol.* **15**:1315-26.
89. TEN CATE AR, SHARPE PT, ROY S, NANJI A. Development of the tooth and its supporting tissues. In: Nanji A, editor. Ten Cate's oral histology. Development, structure, and function. 6th ed. St. Louis: Mosby; 2003. p. 79-110
90. BRONNER-FRASER M. (1995) Origins and developmental potential of the neural crest. *Exp Cell Res.* **218**:405-17.
91. WISE GE, FRAZIER-BOWERS S, D'SOUZA RN. (2002) Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **13**:323-34.

92. Bioeden Tooth Cell Bank. (Eriřim: www.bioeden.com)
93. JAN LINDHE, THORKILD KARRING, NIKLAUS P. LANG. Anatomy of the periodontium. Clinical periodontology and implant dentistry. 4th ed. Blackwell. Chapter 1.
94. YANG XC, FAN MW. (2005) Identification and isolation of human dental pulp stem cells. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. **40**:244-7.
95. WOODBURY D, REYNOLDS K, BLACK IB. (2002) Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res*. **69**:908-17.
96. LINDROOS B, MÄENPÄÄ K, YLIKOMI T, OJA H, SUURONEN R, MIETTINEN S. (2008) Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. **368**:329-35.
97. SACCHETTI B, FUNARI A, MICHIEZI S, DI CESARE S, PIERSANTI S, SAGGIO I, TAGLIAFICO E, FERRARI S, ROBEY PG, RIMINUCCI M, BIANCO P. (2007) Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. **131**:324-36.
98. XU J, WANG W, KAPILA Y, LOTZ J, KAPILA S. (2008) Multiple Differentiation Capacity of STRO-1+/CD146+ PDL Mesenchymal Progenitor Cells. *Stem Cells Dev*. [Epub ahead of print]
99. BARRY FP, MURPHY JM. (2004) Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. **36**:568-584.

100. GILGENKRANTZ H. (2004) Mesenchymal stem cells: an alternative source of hepatocytes?. *Hepatology*. **40**:1256-1259.
101. JAVAZON EH, BEGGS KJ, FLAKE AW. (2004) Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. **32**:414-25.
102. KREBSBACH PH, GU K, FRANCESCHI RT, RUTHERFORD RB. (2000) Gene therapy directed osteogenesis: BMP-7-transduced human fibroblasts form bone in vivo. *Hum Gene Ther*. **11**:1201-1210.
103. RUTHERFORD RB, MOALLI M, FRANCESCHI RT, WANG D, GU K, KREBSBACH PH. (2002) Bone morphogenetic protein-transduced human fibroblasts convert to osteoblasts and form bone in vivo. *Tissue En*. **8**:441-452.
104. SHUI C, SCUTT AM. (2002) Mouse embryo-derived NIH3T3 fibroblasts an osteoblast-like phenotype when treated with 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) and dexamethasone in vitro. *J Cell Physiol*. **193**:164-172.
105. HIRATA K, TSUKAZAKI T, KADOWAKI A, FURUKAWA K, SHIBATA Y, MORISHI T, OKUBO Y, BESSHO K, KOMORI T, MIZUNO A, YAMAGUCHI A. (2003) Transplantation of skin fibroblasts expressing BMP-2 promotes bone repair more effectively than those expressing Runx2. *Bone*. **32**:502-512.
106. HEE CK, JONIKAS MA, NICOLL SB. (2006) Influence of three-dimensional scaffold on the expression of osteogenic differentiation markers by human dermal fibroblasts. *Biomaterials*. **27**:875-884.

107. PHILLIPS JE, HUTMACHER DW, GULDBERG RE, GARCIA AJ. (2006) Mineralization capacity of Runx2/Cbfa1-genetically engineered fibroblasts is scaffold dependent. *Biomaterials*. **27**:5535-5545.
108. MIZUNO S, GLOWACKI J. (1996) Chondroinduction of human dermal fibroblasts by demineralized bone in three-dimensional culture. *Exp Cell Res*. **227**:89-97.
109. RUTHERFORD RB, GU K, RACENIS P, KREBSBACH PH. (2003) Early events: the in vitro conversion of BMP transduced fibroblasts to chondroblasts. *Connect Tissue Res*. **44**(Suppl 1):117-123.
110. FELDON SE, O'LOUGHLIN CW, RAY DM, LANDSKRONER-EIGER S, SEWERYNIAK KE, PHIPPS RP. (2006) Activated human T lymphocytes express cyclooxygenase-2 and produce proadipogenic prostaglandins that drive human orbital fibroblast differentiation to adipocytes. *Am J Pathol*. **169**:1183-1193.
111. LYSY PA, SMETS F, SIBILLE C, NAJIMI M, SOKAL EM. (2007) Human Skin Fibroblasts: From Mesodermal to Hepatocyte-Like Differentiation. *Hepatology*. **46**:1574-85.
112. COLTER DC, CLASS R, DIGIROLAMO CM, PROCKOP DJ. (2000) Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl Acad Sci USA*. **97**:3213-18.
113. SEKIYA I, LARSON BL, SMITH JR, POCHAMPALLY R, CUI JG, PROCKOP DJ. (2002) Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*. **20**:530-41.

114. JIANG Y, JAHAGIRDAR BN, REINHARDT RL, SCHWARTZ RE, KEENE CD, ORTIZ-GONZALEZ XR, REYES M, LENVIK T, LUND T, BLACKSTAD M, DU J, ALDRICH S, LISBERG A, LOW WC, LARGAESPADA DA, VERFAILLIE CM. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. **418**:41-9.
115. REYES M, VERFAILLIE CM. (2001) Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. **938**:231-5.
116. NEUHUBER B, SWANGER SA, HOWARD L, MACKAY A, FISCHER I. (2008) Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp Hematol*. [Epub ahead of print]
117. WISE GE, LIN F, FAN W. (1992) Culture and characterization of dental follicle cells from rat molars. *Cell Tissue Res*. **267**: 483.