

# Travma Nedeniyle Kırılan Daimî Anterior Dişlerin Pulpasından Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Karakterizasyonu

## Mesenchymal Stem Cell Isolation and Characterization of Dental Pulp from Fractured Permanent Anterior Teeth Due to Trauma

Şerife Buket BOZKURT<sup>a</sup>, Sema Sezgin HAKKI<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ar-Ge Laboratuvarı, Ankara, TÜRKİYE

<sup>b</sup>Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji ABD, Konya, TÜRKİYE

Bu çalışma, Şerife Buket Bozkurt tarafından 7. Kök Hücre Sempozyumu'nda (11 Mayıs 2018, İstanbul) poster olarak sunulmuştur.

**ÖZET Amaç:** İnsan dental pulpa mezenkimal kök hücrelerin (İDPMKH) sağlıklı pulpa dokularından izole edildiğine dair çok sayıda araştırma olmakla birlikte, travma nedeniyle kırılan dişlerden İDPMKH'lerin izolasyonuna ilişkin çalışma çok sınırlı sayıdadır. Bu çalışmada, travma nedeniyle dişleri kırılmış hastanın kanal tedavisi sırasında elde edilen pulpa dokularından, mezenkimal kök hücre (MKH) izolasyonu yapıp yapılamayacağı test edildi. **Gereç ve Yöntemler:** Beş gün önce düştüğü için üst çene santral dişleri (#11, #21) kırılan 15 yaşındaki kadın hasta, ağrı şikâyetiyle pedodonti kliniğine başvurdu. Kırığı görmek, izolasyonu sağlamak ve düzgün bir şekilde restore etmek için krestal alveoler kemiğe osteotomi yapılması için flep cerrahisine karar verildi. Dişler, kanal tedavisi yapılmadan restore edilemeyeceği için pulpa dokusu ekstripe edildi. Avasküler görünümlü pulpa dokuları eksplant yöntemiyle kültür ortamına alındı ve hücre büyümesi gözlemlendi. Hücrelerin 3. pasajından sonra RNA izole edildi ve MKH'ye özgü hücre yüzey belirteçleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu [real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)] ile çalışıldı. Ayrıca hematopoietik kök hücre yüzey belirteçleri doğrulama için değerlendirildi. **Bulgular:** RT-PCR sonuçları, hücrelerin MKH spesifik yüzey belirteçlerini (CD73, CD90, CD105) ekspres ettiğini ve hematopoietik kök hücre yüzey belirteçlerinin (CD34, CD45), ekspresyonunun çok düşük düzeyde olduğunu gösterdi. **Sonuç:** Travma görmüş kırılmış dişlerden MKH izolasyonunun yapılabilmesi, otolog dental pulpa MKH izole edilerek, hücre temelli kanal tedavilerinin mümkün olabileceğini düşündürmektedir. Bu yaklaşım da diş hekimliğinde travma hastalarının tedavisinde pulpanın revaskülarizasyonu ve rejenerasyonu açısından umut vaat edici görünmektedir.

**ABSTRACT Objective:** Although many researches have been reported regarding isolation of human dental pulp mesenchymal stem cells (HDPMSCs) from healthy pulp tissues, there are limited studies on isolation of HDPMSCs from the fractured teeth due to trauma. In this study, it was tested whether mesenchymal stem cell (MSC) could be isolated from pulp tissues that were obtained during the canal treatment of fractured teeth due to trauma. **Material and Methods:** A 15-year-old woman who had fractured maxillary central incisor teeth (#11, #21) due to falling five days ago admitted to pediatric dentistry with pain. It was decided a flap surgery to do osteotomy for crestal alveolar bone to view fracture and to provide isolation and restore properly. Since the teeth can not be restored without root canal treatment, pulp tissue was extirpated. The avascular-like pulp tissues were cultured using explantation method and cell growth was observed. After third passage, RNA was isolated and cell surface markers specific for MSC were studied by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Also, hematopoietic stem cell surface markers were evaluated for confirmation. **Results:** RT-PCR analysis displayed that cells expressed specific cell surface markers of MSC (CD73, CD90, CD105) and expression of hematopoietic stem cell surface markers (CD34, CD45) of cells were determined low levels. **Conclusion:** Possibility of the MSCs isolation from fractured teeth suggested that cell based canal treatments can be possible by isolating autologous dental pulp MSCs in patient. This approach seems promising for pulp revascularization and regeneration in the treatment of trauma patients in dentistry.

**Anahtar Kelimeler:** Mezenkimal kök hücreler; diş pulpası; diş kırıkları

**Keywords:** Mesenchymal stem cell; dental pulp; tooth fractures

Kök hücreler, sahip oldukları kendi kendilerini yenileyebilme ve farklılaşma potansiyeliyle embriyonik gelişim süreci ve sonrasında doku rejeneras-

yonunda önemli roller üstlenen özelleşmiş hücrelerdir. Bu hücrelerin, bölünebilme ve farklılaşma potansiyellerini tanımlamak için totipotent, pluripotent

**Correspondence:** Şerife Buket BOZKURT

Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ar-Ge Laboratuvarı, Ankara, TÜRKİYE/TURKEY

**E-mail:** buketbozkurt@hacettepe.edu.tr



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences.

**Received:** 24 Sep 2020

**Received in revised form:** 18 Dec 2020

**Accepted:** 26 Jan 2021

**Available online:** 3 Mar 2021

2146-8966 / Copyright © 2021 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

ve multipotent tanımları kullanılmaktadır. Totipotent hücreler, embriyonik ve ekstra-embriyonik dokular da dâhil olmak üzere bireyin tüm hücrelerini oluşturabilecek sayıda sınırsız bölünme ve farklılaşma gücüne sahip hücrelerdir. Pluripotent hücreler ise kısmen bölünme yeteneğine sahip olup endoderm, mezoderm ve ektoderm olmak üzere 3 germ tabakasına farklılaşabilen hücrelerdir. Bununla birlikte, erişkin dokularda homeostaz ve rejenerasyon sağlayan multipotent hücreler, daha sınırlı hücre hatlarına farklılaşabilen hücreler olarak tanımlanmaktadır.<sup>1</sup> Ayrıca kök hücreler, pluripotent kapasitede bölünme ve farklılaşma yeteneğine sahip olan “embriyonik kök hücreler” ve multipotent kapasitede bölünme ve farklılaşma gücüne sahip olan “erişkin kök hücreler” olarak da gruplandırıldı.<sup>2</sup> Bununla birlikte dermal fibroblastlar gibi somatik hücrelere embriyonik hücrelerin çekirdekleri transfer edilip, Nanog, Oct3/4, Sox2 ve Klf4 gibi transkripsiyon faktörleriyle yeniden yapılandırılarak, “indüklenmiş pluripotent kök hücre” tanımıyla yeni bir erişkin kök hücre sentezlendi.<sup>3-5</sup> Kök hücre araştırmalarının başlangıç yıllarında, embriyonik kök hücrelerin ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin sahip oldukları pluripotent kapasiteyle hücre temelli tedavilerde etkili birer kaynak olabilecekleri düşünüldü. Fakat devam eden süreçte, hem embriyonik kök hücrelerle ilgili etik konular hem de her iki hücre hattının tümoral formlara dönüşebilme kapasitelerinin yüksek olması sebebiyle araştırmalar, her iki kaygıdan uzak olması sebebiyle içerisinde hematopoietik kök hücre ve mezenkimal kök hücre (MKH) alt gruplarını da bulunduran erişkin kök hücrelere daha fazla odaklandı.<sup>6</sup> Erişkin kök hücreler, embriyonik kök hücrelere göre daha az farklılaşma ve bölünme kapasitesine sahip olmalarına rağmen kök hücre yeteneklerini koruyan hücre hatlarıdır. Yapılan araştırmalar sonucunda MKH'nin, mezoderm germ tabakasından farklılaştığının belirlenmesiyle bu hücre hattına “MKH” ismi verildi.<sup>7</sup> Aynı zamanda MKH'nin fare kemik iliğinden izole edilip, kültüre edilmesiyle de plastik yüzeye adherens özellikleri ve fibroblast benzeri formları belirlendi.<sup>2</sup> Multipotent kapasitede olan MKH, insan ve hayvan dokularından elde edilebilmektedir. İnsan MKH'leri nonhematopoietik olup, osteosit, adiposit, kondrosit, nörosit ve hepatositlere farklılaşma yeteneğine sahip multipotent hücrelerdir.<sup>8</sup>

Bu hücre hatları ilk olarak kemik iliğinden elde edilmiş olup, sonrasında perivasküler alandaki tüm dokulardan izole edilmiştir.<sup>9,10</sup> MKH'lerin insan vücudunun farklı dokularından elde edilebilirliğinin belirlenmesiyle birlikte, bu hücreleri tanımlayıcı kriterler 2006 yılında “*Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*” tarafından;

- Plastik yüzeye adherens,
- Spesifik hücre yüzey belirteçlerine CD73, CD90, CD105 (farklılaşma belirteçleri) sahip olması,
- Hematopoietik kök hücre yüzey belirteçlerinden CD14, CD34, CD45 ve insan lökosit antijen-DR bulundurmaması,
- İn vitro ortamda adiposit, kondrosit, osteoblast farklılaşması göstermesi olarak belirlendi.<sup>11</sup>

Günümüze kadar MKH, kemik iliği, adipoz doku, amniyotik sıvı, amniyotik membran, dental dokular, bukkal yağ pediendometrium, periferik kan, plasenta ve fetal membran, tükürük bezi, deri, umbilikal kord kanı ve sinoviyal sıvı gibi birçok erişkin dokudan izole edildi.<sup>9,12-19</sup>

Dental dokulardan MKH izolasyonu, dokuya ulaşma kolaylığı olması ve çoğu zamanda çekim endikasyonu olup kullanılmadığında atık sürecine tabii tutulacak dokuları içermesi sebebiyle önemli bir araştırma alanıdır. Özellikle gingiva, periodontal ligament, apikal papilla, palatal adipoz doku ve pulpa dokusu MKH izolasyonunda nitelikli hücre izolasyonlarının sağlandığı dokulardır. Bunlardan pulpa dokusu, kranial nöral krest hücrelerinden köken alıp, hem mezenkimal hem de nöroektodermal kök hücre yüzey belirteçlerini ekspres edebilmektedirler.<sup>20</sup> Bununla birlikte, pulpa kök hücrelerin odontoblast hücrelerine farklılaşma potansiyelinin yüksek olması özellikle enfeksiyon, vitalite kaybı ve gelişimsel anomaliler sonucu kök gelişiminin durduğu dişlerde endodontik tedavi yaklaşımı olan apeksogenezis veya apeksifikasyon tedavilerinde gündemdedir.<sup>21-23</sup> Birçok tedavi yaklaşımını içerisinde bulunduran apeksifikasyon tedavisinde, revaskularizasyonla ya apikal bölgedeki vital pulpa hücrelerin odontoblastlara dönüşmesi ya da MKH'lerin odontoblast ve sementoblastlara farklılaşması üzerinden devital dişlerde kök gelişimini sağlaması hedeflenmektedir.<sup>24</sup> Pulpa içeri-

sindeki kök hücre popülasyonu, yaklaşık %1 ile çok az bir miktarı temsil etmektedir ve yaşa bağımlı olarak bu oranın daha da azaldığı bilinmektedir.<sup>21,25</sup> Pulpa MKH izolasyonu araştırmalarında 3. molar diş kullanılmakla birlikte, süpernumere dişler, süt dişi ve diş germeleri de izolasyon amaçlı çalışmalara dâhil edilmektedir. Özellikle kök hücre izolasyonu sürecinde sağlıklı ve vital dental dokunun çok kısa bir sürede hücre kültürü laboratuvarına ulaştırılıp, izolasyon aşamalarının gerçekleştirilmesi kritiktir. Travma ile gelen bir hastada, inflame/enfekte/avasküler doku görünümüne sahip olsa bile muhtemel bir pulpa resellülerizasyon ve revaskülarizasyon tedavisi için kök hücre kaynağı olup olamayacağını değerlendirilmesi önemlidir. Bu yaklaşımla düştüğü için üst çene santral dişleri (#11, #21) 5 gün önce kırılan ve ağrısı olan hastanın kanal tedavisi sırasında elde edilen avasküler görünümlü pulpa dokularından MKH izolasyonu yapıp yapılamayacağı test edildi.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### KÖK HÜCRE İZOLASYONU

Beş gün önce travma geçirdiği için üst çene santral dişleri kırılan ve ağrısı olduğu için Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesine başvuran 15 yaşındaki kadın hastadan, kanal tedavisi esnasında ekstirpe edilen pulpa dokuları, %10 *Fetal Bovine Serum* (FBS), 250 µg/mL gentamisin sülfat, 5 µg/mL amfoterisin B içeren *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) taşıma solüsyonu içerisinde hücre kültürü laboratuvarına getirildi. Bu çalışmada, Helsinki Deklarasyonu Prensipleri göz önüne alınarak ve Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar-2020/46 etik kurul onayı doğrultusunda işlemler ve alınan dokunun kullanılabilmesi için hastadan ve ebeveynlerinden bilgilendirilmiş imzalı onamları alındı. “*Laminar flow*” kabin altında pulpa dokuları üzerindeki taşıma solüsyonu aspire edilip %10 FBS DMEM (100 u/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin, %1 glutamin) ile 15 mL’lik falkon tüp içerisinde 3 kez yıkandı. Bu işlemin ardından pulpa dokuları, 60 mm’lik hücre kültürü kabı içerisinde %10 FBS DMEM (100 u/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin, %1 glutamin) ile yeniden yıkanarak, olası doku kaynaklı kontaminasyonun önüne

geçildi. Devamında pulpa dokuları eksplant yöntemine uygun olarak 15 no.lu bistüri ile küçük parçalara ayrılıp, pulpa dokusundan hücre izolasyonu sürecine başlandı. Elde edilen pulpa parçaları, yeni bir 60 mm hücre kültürü kabı içerisinde %10 FBS DMEM (100 u/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin, %1 glutamin) ile yıkanıp diğer bir 60 mm hücre kültürü kabı içerisine aktarıldı. Pulpa doku parçaları, hücre kültürü kabı içerisinde sabit kalacak şekilde 3 mL %10 FBS DMEM (100 u/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin, %1 glutamin) eklenerek %5 CO<sub>2</sub> içeren hücre kültürü inkübatörüne kaldırıldı. Bu işlemi takip eden 5. günde ilk olarak pulpa dokusundan hücrelerin 60 mm’lik hücre kültürü kabının tabanına ataçmanı *inverted* mikroskop (IM) ile görüntüledi. Devam eden süreçte hücrelerin %10 FBS DMEM ortamları gūnaşırı değiştirilerek, hücrelerin görüntüleri 10. günde de IM ile fotoğraflandı.

### İZOLE EDİLEN HÜCRELERİN PASAJLANMASI

Pulpa dokularından hücre izolasyonu işleminin 5. gününde, dokudan hücre kültürü kabı içerisine hücre ataçmanı IM altında izlendikten sonra kültür ortamı, %10 FBS, 100 U/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin içeren DMEM ile değiştirilerek idame edildi. Hücreler, kabin yaklaşık 1/4’ünü doldurduklarında hücre kültürü kabının içerisindeki 2 mL besiyeri aspire edilip, FBS içermeyen DMEM ile yıkanıp ortamın tripsin enziminin çalışması için uygun hâle gelmesi sağlandı ve 1,5 mL tripsin-etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) kültür kabına ilave edilip, hücrelerin birbirlerinden ve kap yüzeyinden ayrılması sağlandı. Sonrasında hücre kültür kabının içerisine 2 mL %10 FBS içeren DMEM ilave edilerek, tripsin-EDTA’nın aktivitesi inhibe edildi. Sonrasında petri kabından toplanan hücre süspansiyonu oda ısısında 2.500 rpm’de 3 dk santrifüj edilerek, tüpün tabanında hücre peletinin oluşması sağlandı. Oluşan hücre peleti, 2 mL %10 FBS içeren DMEM ile süspansiyon edilip, 100 mm’lik petri kabı içerisinde bulunan 6 mL %10 FBS DMEM ile karıştırıldı. Böylece pulpa hücrelerinin 1. pasajı yapıp, gūnaşırı %10 FBS DMEM ortamları değiştirildi. Devam eden süreçte pulpa hücreleri, yukarıda anlatılan işlem basamakları tekrar edilerek, RNA izolasyonun yapılacağı pasaj 3 aşamasına getirildi.

## RNA İZOLASYONU

Pasaj 3 aşamasına getirilen pulpa hücreleri, RNA izolasyonu için 60 mm'lik hücre kültürü kaplarına  $5 \times 10^4$  hücre/cm<sup>2</sup> olacak şekilde dağıtıldı. Aynı zamanda deney gruplarına daha önceki projelerimizde (insan diş pulpası ve periodontal ligament kaynaklı kök hücrelerinin osteojenik farklılaşması sürecinde miRNA'ların rolü, TÜBİTAK/SBAG/110S415) pulpa dokusundan izole edilip, MKH karakterizasyonları yapılmış pasaj 3 aşamasında 2 farklı pulpa-MKH'leri de dâhil edilerek, kontrol grupları olarak değerlendirildi. Hem pulpa dokularından izole edilen hücrelerin hem de daha önce kök hücre karakteristiği yapılmış pulpa-MKH'lerin RNA izolasyonu deneyinin 3. gününde, RNA izolasyon kitinin protokolüne uygun olarak RNA izolasyonları yapıp -80 °C'de muhafaza edildi.

## TOTAL RNA ÖRNEKLERİNİN ABSORBANSLARININ ÖLÇÜLMESİ VE COMPLEMENTARY DNA SENTEZİ

İzole edilen RNA örnekleri muhafaza edildikleri -80 °C'den çıkarıldıktan sonra 4 °C 12.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilip, dipteki RNA peletleri hareket ettirilmeden EtOH-DEPC dH<sub>2</sub>O karışımı pipetman ile toplandı. Örneklerin ağzı açık bırakılarak, içlerindeki alkol karışımının tamamen uçması sağlandı. RNA peletlerinin bulunduğu tüpler kapakları açık olarak 65 °C'de 5 dl ısıtma işlemine tabi tutuldu. Bu işlemin ardından RNA peletleri, 25 µL DEPC dH<sub>2</sub>O karışımında çözülerek "heat block" cihazında 5 dk ısıyla muamele edilip, DEPC dH<sub>2</sub>O'da homojenize edilen RNA örneklerinin 1µL'si spektrofotometrede 260 nm'de okunarak her bir gruptan elde edilen total RNA miktarları ve saflık oranları belirlendi. "Complementary DNA (cDNA)" sentezi, cDNA sentez kitinin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. RNA örneklerinin her birinden, içerisinde 1 µg RNA bulu-

nacak miktar, 1µL oligoDT ve uygun miktarda ddH<sub>2</sub>O eklenerek 12 µL'ye tamamlandı. Elde edilen bu karışım üzerine 5x "reaction buffer" 4 µL, "Ribolock RNase Inhibitör" 1 µL, 10 mm deoksiniükleosid trifosfat (dNTP) mix 2 µL, RM "Reverse Transcriptase" enzimi 1 µL eklenerek son hacim 20 µL'ye tamamlandı. Örnekler gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu [real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)] cihazında 42 °C'de 60 dk, 70 °C'de 5 dk ve 4 °C'de inkübe edilip, işlem sonunda elde edilen cDNA'lar RT-PCR deneylerinde kullanılacakları zamana kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

## GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU DENEYLERİ

İzole edilen pulpa hücreleri, MKH spesifik hücre yüzey belirteçleri (CD73, CD90, CD105) ile hematopoietik kök hücre yüzey belirteçleri (CD34, CD45) genlerinin ekspresyon düzeyleri açısından değerlendirildi (Tablo 1). Normalizasyon amacıyla glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (*house keeping gene*) kullanıldı. Deney kapsamında mRNA ekspresyonları Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) ile çalışıldı. RT-PCR deneyleri SYBR Green boyası için FAM filtresi seçilerek ve devamında "melting curve" analizi de yapılarak Stratagene MX3000P (La Jolla, CA) cihazında gerçekleştirildi.

## İSTATİSTİKSEL ANALİZ

RT-PCR sonucunda elde edilen mRNA ekspresyonları, sonuçların değerlendirmesinde karşılaştırmalı bilgisayarlı tomografi yöntemi kullanılarak normalize edildi.<sup>26,27</sup> Sonrasında normalize edilmiş değerler, ANOVA ile karşılaştırıldı. Hedef genlerin ekspresyonlarının GAPDH'ye göre artış ve azalışları

**TABLO 1:** İnsan orijinli mezenkimal ve hematopoietik kök hücre yüzey belirteçleri primer sekansları.<sup>3-5</sup>

Kalıp (Primer)	İleri (Forward)	Geri (Reverse)
CD34	TAGATTTCACTGAGCAAGAT	CTTGCCCCACCTAGCCGAGT
CD45	AATGAGAATGTGGAATGTGG	TTGCGTTAGTAAACTTGTGG
CD73	CACCAAGGTTCCAGCAGATCCGC	GTTTCATCAATGGCGACCCGG
CD90	CTAGTGGACCAGACGCTTCG	TGGAGTGCACACGTGTAGGT
CD105	TGCCACTGGACACAGGATAA	CCTTCGAGACCTGGCTAGTG
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

%95 güven aralıkları üzerinden verilip, istatistiksel olarak  $p<0,05$  değeri anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

### PULPA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN INVERTED MİKROSKOP GÖRÜNTÜLERİ

Düşmeye bağlı gelişen travma sonucunda üst çene santral dişleri (#11, #21) 5 gün önce kırılan ve ağrısı olan hastanın (Resim 1A, Resim 1B, Resim 1C, Resim 1D, Resim 1E, Resim 1F) kanal tedavisi sırasında elde edilen avasküler görünümü ekstirpe edilen pulpa dokuları (Resim 1G), hücre kültürü laboratuvarına ulaştırıldıktan ve “laminar flow” kabin altında eksplant yöntemiyle hücre izolasyonu yapıldıktan sonra uygun koşullarda inkübe edildi. Bu işlemin devamında pulpa dokularından hücre kültürü kabı tabanına hücre ataçmanı 5. günde IM ile izlendi (Resim 2A). Sonrasında hücrelerin ortamı günaşırı %10 FBS DMEM (100 u/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin, %1 glutamin) ile değiştirilerek hücreler idame edilip, 10. günde de IM ile görüntü alındı (Resim 2B).

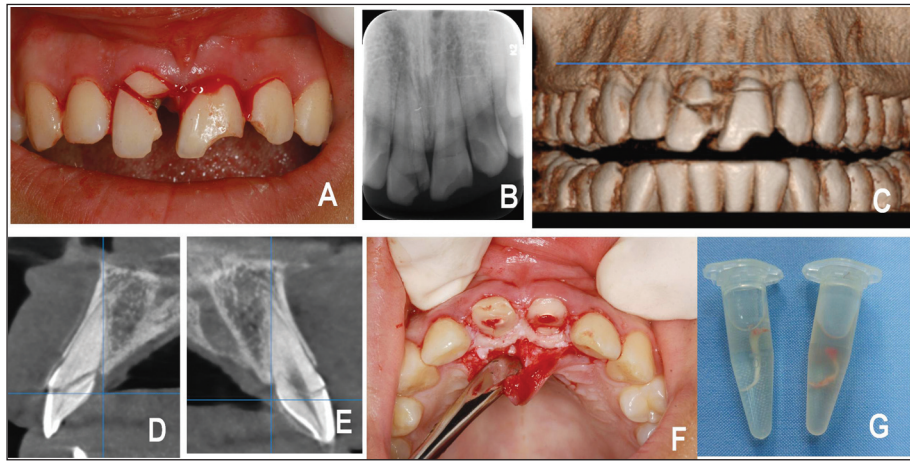
### KÖK HÜCRE YÜZEY BELİRTEÇLERİ MRNA EKSPRESYON SONUÇLARI

Travma sonucu üst çene santral dişlerin kırılıp, 5 gün boyunca kırık alanında kalan ve ekstirpe edildiğinde avasküler görünümü pulpa dokularından izole edilen hücrelerin MKH karakterizasyonlarını yapmak

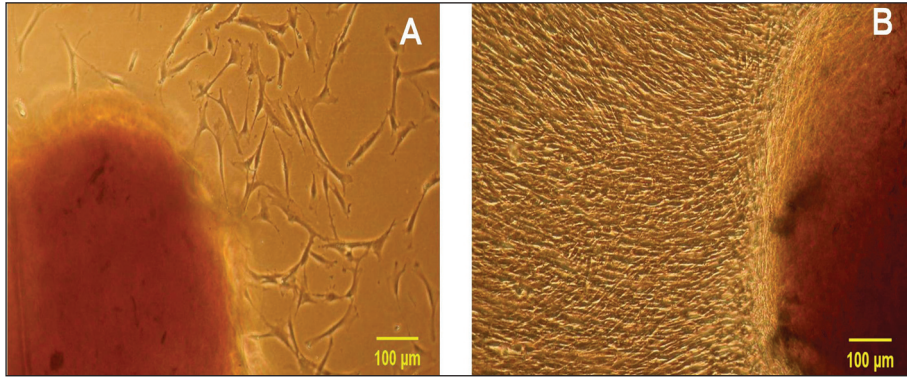
amacıyla hücrelerden pasaj 3 aşamasında RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Aynı zamanda daha önceki projemizde karakterizasyonları yapılmış 2 farklı pulpa-MKH de yüzey belirteçleri ekspresyon düzeyleri açısından kontrol grubu olarak ele alındı. Elde edilen veriler, avasküler görünümü pulpadan izole edilen hücrelerin MKH spesifik yüzey belirteçlerini (CD73, CD90, CD105) istatistiksel olarak anlamlı seviyede eksprese ettiğini ( $p<0,01$ ), bununla birlikte hematopoietik kök hücre yüzey belirteçleri (CD34, CD45) ekspresyonunun ise istatistiksel olarak anlamlı seviyede çok düşük düzeyde olduğunu gösterdi ( $p<0,01$ ) (Şekil 1). Hem MKH yüzey belirteçleri hem de hematopoietik kök hücre yüzey belirteçleri açısından daha önce karakterizasyonu yapılan pulpa-MKH’lerin de ekspresyon sonuçlarının elde edilen verilerle uyumlu olduğu görüldü.

## TARTIŞMA

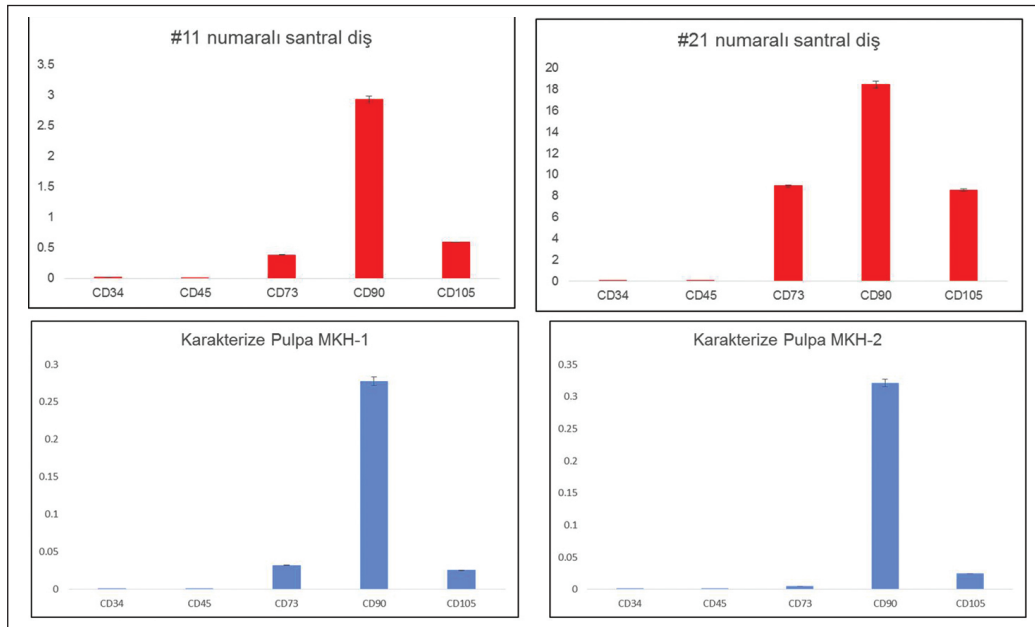
Dental MKH’ler, dişlerin homeostazını sağlayan ve çeşitli sebeplerle oluşabilecek travmalarda sahip oldukları rejenerasyon kapasiteleriyle doku replasmanı/rejenerasyonu sağlayan hücrelerdir. Bu hücrelerin, “ekto-MKH” veya “nöral krest kök hücre” orijinli olmaları bakımından fikir ayrılıkları bulunmasına rağmen nöral krestin, odontoblast, sementoblast, pulpa ile periodonsiyum, alveoler kemik gibi oral kavitedeki birçok hücre ve dokunun embriyonik orijini olması ve bu hücrelerin çoklu farklılaşma kapasiteleri,



**RESİM 1:** A) Travma sonrası hastanın klinik görüntüsü. B) Travma bölgesinin periapikal radyografisi. C) Santral dişlerde izlenen kırık hatlarının 3 boyutlu bilgisayarlı tomografi görüntüsü. D) Sağ üst santralin sagittal kesitte kırık hattının tomografik görüntüsü. E) Sol üst santral dişin sagittal kesitte kırık hattının tomografik görüntüsü. F) Kırık hattının izlenebilmesi için flap kaldırılması ve kırık parçaların çıkarılması. G) Kırık dişlerin pulparlarının çıkarılması.



**RESİM 2:** Travma üzerinden 5 gün geçtiği için kanal tedavisi yapılması uygun bulunduğundan, pulpa dokuları ekstirpe edildi. A) Ekstirpe edilen pulpa dokusundan üreyen hücrelerin 5. gün inverted mikroskop görüntüsü. B) Pulpa dokusundan elde edilen hücrelerin 10. gün inverted mikroskop görüntüsü.



**ŞEKİL 1:** Travma görmüş dişlerin pulpasından elde edilen hücrelerin CD34, CD45, CD73, CD90 ve CD105 hücre yüzey belirteçlerinin mRNA ekspresyonları.

“nöral krest kök hücre” tanımını desteklemektedir.<sup>28</sup> Özellikle odontoblastik farklılaşma potansiyeli, pulpa dokusundaki MKH’lerin en önemli özelliklerinden birisidir.<sup>29</sup> Bu özel doku oldukça vaskülarize bir yapıya sahip olup, mineralize sert bir doku tarafından çevrenmesi yönünden osteoblastları sentezleyen kemik iliği ile benzerlik göstermesine rağmen farklılaşma kapasitesinin kemik iliğine göre daha sınırlı olması bakımından ayrılmaktadır. Süt dişi ve kalıcı dişlerde bulunan dental pulpa-MKH’lerin izolasyonunda sağlıklı ve vital pulpa dokusunun hızlı bir şekilde elde edilip, hücre kültürü laboratuvarında izolasyon sürecinin başlatılması kritiktir. Bu işlemin

sonrasında izole edilen hücrelerin, klojenik özelliklerinin ve MKH spesifik hücre yüzey belirteçleri (CD73, CD90, CD105) ile hematopoietik kök hücre yüzey belirteçleri (CD34, CD45) seviyelerinin belirlenmesi, karakterizasyon için gerekmektedir. Bu belirteçlerden CD73, hücre adezyon molekülü olup dental pulpa MKH de dâhil olmak üzere MKH’lerde ekspresyonu raporlanmıştır.<sup>30,31</sup> CD90 (Thy-1), çoklu farklılaşma faktörü ise hücre-hücre/hücre-matriks etkileşiminde rol alan ve dental pulpa MKH tarafından da eksprese edildiği bilinen bir hücre yüzey belirteçidir.<sup>14,32</sup> Bir diğer belirteç olan CD105, aynı zamanda endoglin olarak da bilinen membran glikoproteini

olup, dönüştürücü büyüme faktörü-beta [transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )] reseptör kompleksinin bir parçasını oluşturur ve dental pulpa MKH'de TGF- $\beta$ 1'i bağlayarak hücrelerin yüksek proliferasyon, migrasyon aktiveleri yoluyla farklılaşma potansiyellerini destekler.<sup>33</sup> CD34, hematopoietik kök hücre yüzey belirteci olup MKH karakterizasyonunda düşük seviyelerde ekspresyonu bilinmektedir.<sup>34</sup> Travmaya bağlı oluşan kırık alanında 5 gün boyunca kalan ve ekstirpe edildiğinde avasküler görünümü olan üst çene santral dişlerden elde edilen pulpa dokularından yaptığımız kök hücre izolasyonu sonucunda, hücrelerin izolasyonun 5. gününde kabın tabanına ataçmanı IM ile izlendi. Devamında hücrelerden RNA izolasyonu yapılarak, MKH ve hematopoietik kök hücre yüzey belirteçleri ekspresyon seviyeleri RT-PCR ile değerlendirildi. Elde edilen veriler, pulpa dokularından izole ettiğimiz hücrelerin CD73, CD90, CD105 MKH yüzey belirteçlerini istatistiksel olarak anlamlı seviyede artan düzeyde eksprese ettiğini ( $p<0,01$ ), bununla birlikte CD34, CD45 hematopoietik kök hücre yüzey belirteçlerini ise istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalış yönünde eksprese ettiğini gösterdi ( $p<0,01$ ). Bununla birlikte hem 11 no.lu hem de 21 no.lu dişlerin pulpalarından izole edilen MKH'lerin istatistiksel olarak anlamlı seviyede artış olarak, en fazla CD90 ekspresyonu sergilediği belirlendi ( $p<0,01$ ). Aynı zamanda izole ettiğimiz MKH'lerin, yüzey belirteçleri ekspresyon seviyeleri daha önceki projelerimizde sağlıklı pulpa dokusundan izole edilerek, kök hücre karakterizasyonları yapılan bu çalışmada kontrol olarak kullanılan 2 farklı pulpa-MKH sonuçlarıyla da benzerlik göstermesi önemlidir. Huang ve ark., motor kazası sonucunda oluşan travma ile üst çene sol santral ve lateral kesici dişinde komplike kron kırıklarına sahip endodontik tedavi gereksinimi olan 41 yaşındaki kadının dişlerinden elde ettiği pulpa dokularından enzimatik yöntem kullanılarak, MKH izolasyonu ve karakterizasyonu yapmışlardır. İzole ettikleri hücrelerin yüzey belirteçlerini "flow cytometry" ile analiz etmeleri sonucunda MKH yüzey belirteçleri olan CD29, CD90, CD105 oranlarını yüksek bulurken, CD14, CD34, CD45 gibi hematopoietik hücre yüzey belirteçlerini düşük seviyelerde olduğunu belirlemişlerdir.<sup>32</sup> Elde ettikleri sonuçların, çalışmamızdaki sonuçlarla uyumluluk

göstermesi, MKH izolasyonu için kullanmış olduğumuz avasküler görünümü pulpa dokusu ve hastanın ağrı geçişinin olması, izolasyon sürecindeki limitasyonlar bakımından önemlidir. Dental pulpa MKH'lerin sahip oldukları gen ekspresyon profilleri ve farklılaşma kapasitelerinin kemik iliğinden elde edilen MKH ile benzerlik gösterdiğini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır.<sup>20,35</sup> Elde edilen bu bilgiler, dental pulpa MKH'lerin sadece dental doku rejenerasyonunda değil, aynı zamanda medikal terapilerde de etkin bir şekilde kullanılabilirliğini göstermektedir. Özellikle de pulpa rejenerasyonu sağlamaya yönelik revaskülarizasyon tedavisinde uygulanan konvansiyonel tekniklere bir alternatif olarak, otolog pulpa MKH'lerin uygulanabilirliği bilinmektedir. Dokulardan, iyi üretim koşullarında (*Good manufacturing practice*) hücre izole edilip, karakterize edildiği ve rekombinant hücre kültürü ürünleri ya da bireyin kendi serumu kullanılarak üretildiği takdirde, bu hücrelerin hücre-temelli dental tedavilerde kullanılabilircek olması, dişin kanal tedavisiyle devital hâle gelmesi yerine, vital korumaya çalışılması yönündeki yaklaşım için umut vaat etmektedir.

## SONUÇ

Travmaya bağlı diş kırığı sonrasında 5 gün geçmiş olmasına rağmen dişlerin pulpasından MKH izole edilebilmiş olması, diş kanal tedavisi yapılmadan hücrelerin kanal içine uygun bir taşıyıcı veya trombositten zengin fibrin ile yerleştirilebilmesi düşüncesinin mümkün olabileceğini göstermiştir. İyi üretim tekniklerinin kullanılmasıyla klinik endodontik ve pediatrik uygulamalarda bu yaklaşımın öngörülebilir uygulamaları için travma modeli oluşturulan hayvan deneylerine ihtiyaç bulunmaktadır.

### Finansal Kaynak

*Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.*

### Çıkar Çatışması

*Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya*

üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

### Yazar Katkıları

**Fikir/Kavram:** Sema Sezgin Hakki; **Tasarım:** Sema Sezgin Hakki, Şerife Buket Bozkurt; **Denetleme/Danışmanlık:** Sema Sezgin

**Hakki; Veri Toplama ve/veya İşleme:** Sema Sezgin Hakki, Şerife Buket Bozkurt; **Analiz ve/veya Yorum:** Sema Sezgin Hakki, Şerife Buket Bozkurt; **Kaynak Taraması:** Şerife Buket Bozkurt; **Makalenin Yazımı:** Sema Sezgin Hakki, Şerife Buket Bozkurt; **Eleştirel İnceleme:** Sema Sezgin Hakki; **Malzemeler:** Sema Sezgin Hakki, Şerife Buket Bozkurt.

## KAYNAKLAR

- Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. *Biotechnol Adv.* 2018;36(4):1111-26. [Crossref] [PubMed]
- Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep.* 2015;35(2):e00191. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76. [Crossref] [PubMed]
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131(5):861-72. [Crossref] [PubMed]
- Tomokiyō A, Maeda H, Fujii S, Wada N, Shima K, Akamine A. Development of a multipotent clonal human periodontal ligament cell line. *Differentiation.* 2008;76(4):337-47. [Crossref] [PubMed]
- Wada N, Gronthos S, Bartold PM. Immunomodulatory effects of stem cells. *Periodontol* 2000. 2013;63(1):198-216. [Crossref] [PubMed]
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-5. [Crossref] [PubMed]
- Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2011;20(1):5-14. [Crossref] [PubMed]
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7. [Crossref] [PubMed]
- Crisan M, Yap S, Castella L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):301-13. [Crossref] [PubMed]
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7. [Crossref] [PubMed]
- Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005;33(11):1402-16. [Crossref] [PubMed]
- Int'Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood.* 2003;102(4):1548-9. [Crossref] [PubMed]
- Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009;88(9):792-806. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Hakki SS, Kayis SA, Hakki EE, Bozkurt SB, Duruksu G, Unal ZS, et al. Comparison of mesenchymal stem cells isolated from pulp and periodontal ligament. *J Periodontol.* 2015;86(2):283-91. [Crossref] [PubMed]
- Hakki SS, Turaç G, Bozkurt SB, Kayis SA, Hakki EE, Şahin E, et al. Comparison of different sources of mesenchymal stem cells: palatal versus lipoaspirated adipose tissue. *Cells Tissues Organs.* 2017;204(5-6):228-40. [Crossref] [PubMed]
- Salehi-Nik N, Rezaei Rad M, Kheiri L, Nazeman P, Nadjimi N, Khojasteh A. Buccal fat pad as a potential source of stem cells for bone regeneration: a literature review. *Stem Cells Int.* 2017;2017:8354640. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Rotter N, Oder J, Schlenke P, Lindner U, Böhrnsen F, Kramer J, et al. Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev.* 2008;17(3):509-18. [Crossref] [PubMed]
- Morito T, Muneta T, Hara K, Ju YJ, Mochizuki T, Makino H, et al. Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47(8):1137-43. [Crossref] [PubMed]
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(25):13625-30. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Friedlander LT, Cullinan MP, Love RM. Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. *Int Endod J.* 2009;42(11):955-62. [Crossref] [PubMed]
- Loomba K, Bains R, Bains VK, Loomba A, Nadig RR, Shrivastava TV. Tissue engineering and its application in endodontics: an overview. *ENDO (Lond Engl).* 2012;6(2):105-12.
- Corbella S, Ferrara G, El Kabaney A, Taschieri S. Apexification, apexogenesis and regenerative endodontic procedures: a review of the literature. *Minerva Stomatol.* 2014;63(11-12):375-89. [PubMed]
- Namour M, Theys S. Pulp revascularization of immature permanent teeth: a review of the literature and a proposal of a new clinical protocol. *Scientific World Journal.* 2014;2014:737503. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Smith AJ, Patel M, Graham L, Sloan AJ, Cooper PR. Dentine regeneration: key roles for stem cells and molecular signalling. *Oral Biosci Med.* 2005;213:127-32.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2001;25(4):386-401. [Crossref] [PubMed]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 2001;25(4):402-8. [Crossref] [PubMed]
- Grimm WD, Giesenhagen B, Hakki S, Schau I, Sirak S, Sletov A, et al. Translational research for therapeutic applications of stem cell transplantation for periodontal regeneration. *Curr Oral Health Rep.* 2015;2:266-74. [Crossref]
- Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development.* 2016;143(13):2273-80. [Crossref] [PubMed]
- Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Sugito T, Yoshimi R, Nagasaka T, et al. A feasibility of useful cell-based therapy by bone regeneration with deciduous tooth stem cells, dental pulp stem cells, or bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for clinical study using tissue engineering technology. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(6):1891-900. [Crossref] [PubMed]
- Barry F, Boynton R, Murphy M, Haynesworth S, Zaia J. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(2):519-24. Erratum in: *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(5):1609. [Crossref] [PubMed]
- Huang AH, Chen YK, Chan AW, Shieh TY, Lin LM. Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy. *J Endod.* 2009;35(5):673-81. [Crossref] [PubMed]
- Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol.* 2012;57(11):1439-58. [Crossref] [PubMed]
- Burn TC, Satterthwaite AB, Tenen DG. The human CD34 hematopoietic stem cell antigen promoter and a 3' enhancer direct hematopoietic expression in tissue culture. *Blood.* 1992;80(12):3051-9. [Crossref] [PubMed]
- Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81(8):531-5. [Crossref] [PubMed]