ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İnsan Eksfoliasyon Zamanı Gelmiş Süt Dişi Pulpasından Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrenin Eldesi, Hücre Yüzey Belirteçleriyle (CD90, CD105, CD45) Karakterizasyonun Sağlanması ile Kisspeptin ve Nörokinin Reseptörlerinin (KISS1R, TAC3R) Gen Ekspresyonlarının Real Time PCR (RT-PCR) İle Değerlendirilmesi

Ezgi Damla YILMAZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Mayıs, 2023

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAYI

İnsan Eksfoliasyon Zamanı Gelmiş Süt Dişi Pulpasından Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrenin Eldesi, Hücre Yüzey Belirteçleriyle (CD90, CD105, CD45) Karakterizasyonun Sağlanması ile Kisspeptin ve Nörokinin Reseptörlerinin (KISS1R, TAC3R) Gen Ekspresyonlarının Real Time PCR (RT-PCR) İle Değerlendirilmesi

---

Ezgi Damla YILMAZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi 30/05/2023 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / ~~Oy Çokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ (Danışman) ……

: Prof. Dr. Gülüzar ATLI DEMİRAY ……

: Dr. Öğr. Üyesi Özgür Cem ERKİN ……

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
ÇİZELGELER DİZİNİ IV
ŞEKİLLER DİZİNİ V
SİMGELER VE KISALTMALAR VI
1. GİRİŞ 1
1.1. Kök Hücre 2
1.1.1. Kök Hücre'nin Farklılaşma (Differasyon) Özelliği 4
1.2. Kök Hücrenin Bölünmesi 5
1.2.1. Asimetrik Hücre Bölünmesi 5
1.2.3. Simetrik Hücre Bölünmesi 6
1.2.4. Kök Hücre Bölünmelerdeki İç ve Dış Kontrol Mekanizmaları 6
1.3. Kök Hücre Çeşitleri 7
1.3.1. Farklılaşma Potansiyeline Göre Kök Hücreler 8
1.3.2. Elde Edildikleri Yerlere Göre Kök Hücreler 11
1.4.Akım Sitometrisi 17
1.4.1. Akım Sitometrisi Çalışma Prensibi 18
1.4.2. İmmünfenotipleme 19
1.4.3. Akım Sitometrisinde Kullanılan Hücre Yüzey Belirteçleri 20
1.5. Diş Tabanlı Kök hücreler ve Rejenerasyon 21
1.5.1. Diş Pulpası Kök Hücresi (DPKH) 23
1.5.2. Süt Dişi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (EDPKH) 25
1.5.3. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (DF-MKH) 28
1.5.4. Apikal Papilla Kök Hücreleri (APKH) 29
1.5.5. Periodontal Ligament Kök Hücreleri (PDLKH) 30
1.6. Üreme Sistemi ile İlişkili Genler 30
1.6.1. Kisspeptinler 31
1.6.2. Taşikininler 36
2. ÖNCEKi ÇALIŞMALAR 39
3. MATERYAL VE METOT 43
3.1. Materyal 43
3.1.1. Kullanılan cihazlar 43
3.1.2. Kullanılan Malzemeler 43

3.2. Metot 45
3.2.1. Süt Dişi Pulpası Kaynaklı Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürlenmesi 45
3.2.2. Diş Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Yüzey Antijenleriyle İşaretlenmesi ve Akım Sitometrisinde İncelenmesi 46
3.2.3. RNA İzolasyonu ve Mevcut RNA'ların cDNA'ya Çevrimi 47
3.2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerde Kisspeptin, Nörokinin Reseptörlerinin Ekspresyonu 48
3.2.5. İstatiksel Analiz 48
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 49
4.1. Bulgular 49
4.2. Kisspeptin ve Taşikinin Real-Time Sonuçları 51
4.3. Tartışma 52
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 59
KAYNAKLAR 61
ÖZGEÇMİŞ 67

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İnsan Eksfoliasyon Zamanı Gelmiş Süt Dişi Pulpasından Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrenin Eldesi, Hücre Yüzey Belirteçleriyle (CD90, CD105, CD45) Karakterizasyonun Sağlanması ile Kisspeptin ve Nörokinin Reseptörlerinin (KISS1R, TAC3R) Gen Ekspresyonlarının Real Time Pcr (RT-PCR) İle Değerlendirilmesi

Ezgi Damla YILMAZ

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Bu çalışmada "İnsan Eksfoliasyon Zamanı Gelmiş Süt Dişi Mezenkimal Kök Hücrelerinin CD90+, CD105+ CD45- Hücre Yüzey Belirteçleriyle Akım Sitometrisinde Karakterizasyonun Sağlanması, Kisspeptin ve Nörokinin Reseptörlerinin (KISS1R, TACR3) RT-PCR ile İncelenmesi" adlı yüksek lisans tez projesi olup Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi destekleri ile hazırlanmıştır. Sunulan tez çalışmasının amacı, süt dişi kök hücrelerinin kisspeptin, nörokininleri ve reseptörlerini eksprese etmeleri mevcut genlerin pubertede anahtar rol üstlenmeleri nedeniyle hipogonadizm gibi üreme sistemi hastalıkları için alternatif bir kaynak olarak kullanabileceği düşünülmüştür.

Eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişi kök hücrelerinin, Çukurova Üniversitesi Etik Kurulu'ndan alınan izinler doğrultusunda 9 yaşındaki erkek hastadan izole edilmesi sağlanmıştır. İzole edilmesi sağlanan süt dişi kök hücrelerinin kültürlenmesine ÇÜ Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi de devam edilmiştir. Akım sitometrisi analizi için pozitif (CD90 ve CD105) ve negatif (CD45) belirteçler belirlenmiştir. Süt dişi kök hücrelerinin mezenkimal kök hücre karakteri sağladıkları hücre yüzey belirteçleriyle doğrulanmıştır. Mezenkimal kök hücre karakteri taşıdıkları doğrulanan süt dişi kök hücrelerinin, pasaj 3, 4 ve 5'e ulaşması sağlanmış öncelikle her pasaj için RNA izolasyonu ardından cDNA' ya dönüşümü sağlanmıştır.

Süt dişi kök hücrelerindeki genlerin (KISS1, KISS1R, TAC3 ve TACR3) ekspresyonu gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile belirlenmiştir. KISS1, KISS1R ve TAC3, TACR3 gen ekspresyonları pasaj 3, 4 ve 5 için RT-PCR'da analiz edilmiş ve gen ekspresyonlarındaki değişim pasaj sayısıyla ilişkilendirilerek incelenmiştir. KISS1 geni tarafından kodlanan kisspeptin-1 ve ligandı olduğu KISS1R'nin ve KISS1-KISS1R (GPR54) sistemine etki eden TAC3-TAC3R genleri üreme sistemiyle ilişkilendirilmiştir. KISS1, KISS1R (GPR54), TAC3 ve TACR3 genlerinin hipotalamus- hipofiz- gonad aksının etkileyerek (HHG aksı), üreme sistemindeki işleyişi kontrol etmek ve sürdürülebilir sağlanması için önemli rol üstlenmeleri üzerinde odaklanılmıştır. Üreme sistemindeki düzenleyici rolü, puberteyle olan ilişkisi ve GnRH salınımı gibi pek çok metabolik olayda görev aldığı belirlenip araştırılmıştır. KISS1, KISS1R, TAC3 ve TACR3 genlerin de meydana gelen fonksiyon kaybı, mutasyonların hipogonadizme, puberteye neden olabileceği sonucu üzerinde durulmuştur.

Elde edilen bulgular, mezenkimal kök hücre karakteri taşıyan süt dişi kök hücrelerinin pasaj sayısıyla ilişkili olarak kisspeptin, nörokinin ve reseptörlerini ekspresyonlarında artış meydana geldiği belirlenmiştir. Hem üreme sisteminde görev alan bu genlerin ifadesinin olması hem de kök hücrelerin hasarlı olan dokuya nakledildiklerinde rejenerasyonu sağlamaları nedeniyle üreme sistemi hastalıklarında alternatif bir kaynak olarak kullanabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Süt Dişi Kök Hücresi, KISS1, KISS1R, TAC3, TACR3

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MSc THESIS

Obtaining Mesenchymal Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth Pulp, Characterization With Cell Surface Markers (CD90, CD105, CD45), And Evaluation Of Kisspeptin And Neurokinin Receptor (KISS1R, TAC3R) Gene Expressions By Real-Time Pcr (RT-PCR)

Ezgi Damla YILMAZ

Advisor: Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ

Department of Biotechnology

ABSTRACT

This study is a master's thesis project named "Characterization of Human Deciduous Mesenchymal Stem Cells with CD90+, CD105+ CD45- Cell Surface Markers and Investigation of Kisspeptin and Neurokinin Receptors (KISS1, KISS1R, TAC3, TACR3) by RT-PCR". It has been prepared with the support of the Research Projects Coordination Unit. The aim of the presented thesis study is that human exfoliated decidous teeth stem cells can be used as an alternative source for reproductive system diseases such as hypogonadism, since they express kisspeptin, neurokinins and their receptors and these avaible genes play a key role in puberty.

It was ensured that the deciduous teeth stem cells, whose exfoliation time had come, were isolated from a 9-year-old male patient in accordance with the permissions obtained from the Çukurova University Ethics Committee. The culturing of decidous tooth stem cells, which were isolated, continued at Cukurova University Biotechnology Research and Application Center. Positive (CD90 and CD105) and negative (CD45) markers were determined for flow cytometry analysis. The mesenchymal stem cell character of decidous teeth stem cells was confirmed by cell surface markers. Deciduous stem cells, which were confirmed to have mesenchymal stem cell characteristics, were allowed to reach passages 3, 4 and 5, and first of all, RNA isolation for each passage and then conversion to cDNA was ensured.

Expression of genes (KISS1, KISS1R, TAC3 and TACR3) in decidous teeth stem cells was determined by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). KISS1, KISS1R and TAC3, TACR3 gene expressions were analyzed in RT-PCR for passages 3, 4 and 5, and the change in gene expression was correlated with the number of passages. Kisspeptin-1 encoded by the KISS1 gene, and KISS1R as its ligand, and TAC3, TAC3R genes that affect the KISS1-KISS1R(GPR54) system have been associated with the reproductive system. It has been focused on that KISS1, KISS1R (GPR54), TAC3-TACR3 genes play an important role in controlling and sustaining the functioning of the reproductive system by affecting the hypothalamus-pituitary-gonad axis (HHG axis). It has been determined and investigated that it plays a role in many metabolic events such as its regulatory role in the reproductive system, its relationship with puberty and GnRH release. It has been emphasized that loss of function in existing genes, mutations may cause hypogonadism and puberty.

The findings from the decidous teeth of the stem cells that carry character of, mesenchymal stem cell, associated passage number KISS1, KISS1R, TAC3, TACR3 genes to express stem cells transplanted into damaged tissue in diseases of the reproductive system are suggested as an alternative source to use it for regeneration.

Keywords: Human Exfoliated Deciduous Teeth Stem Cells (SHED) , KISS1, KISS1R, TAC3, TACR3

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince deneyim ve bilgileri ile önderlik eden, yardımlarını esirgemeyen hocam Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ'a, Prof. Dr. Gülüzar ATLI DEMİRAY, Dr. Öğretim Üyesi Merve ÇAPKIN YURTSEVER, Dr. Öğretim Üyesi Özgür Cem ERKİN, Prof. Dr. Aysel KAYIŞ TOPAKSU ve Çukurova Üniversitesi AGENTEM ekibine tezimin her türlü aşamasında yanımda olan laboratuvar çalışmalarında her türlü desteği veren Arş. Gör. Dr. Seda ILGAZ'a, Hale ÖKSÜZ, Gamze GİZİR ve yüksek lisans sürecimde bana destek olan yol arkadaşım Göksu ŞENER, Olfa TAHRİ, Buket KALFA, Ömer BÜYÜKTİPİ ve Nur Evşan ERBİL'e her türlü katkı ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Hayatımında aldığım her kararda yanımda olan desteklerini esirgemeyen, yüksek lisans süreci boyunca yanımda olan annem Gönül YILMAZ ve babam Yaşar YILMAZ'a teşekkür ederim.

Son olarak yakın dönemde kaybettiğim çocukluktan itibaren üzerimde emeği çok olan anneannem emekli öğretmen Hatice GÖNEN'e teşekkürü borç bilirim.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Kök hücre çeşitleri ve hücre yüzey belirteçleri listelenmiştir.....20
Çizelge 1.2. Oral dokulardan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin (MKH) çeşitleri ve tanımlanma zamanları.....22
Çizelge 1.3. Eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişi kök hücrelerinin (EDPKH) farklılaşabildiği kök hücre türleri ve farklılaşma sonucu ekspresyonlarının gösterimi…… 26
Çizelge 1.4. Eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişi kök hücreleri hücre belirteçleri yönünden pozitif ve negatif olarak belirtilmesi. 26
Çizelge 1.5. Genler tarafından kodlanan nörokinin çeşitlerinin türlere özgü gösterimi…… 37
Çizelge 3.1. Tez için kullanılar cihazlar aşağıdaki gibi özetlenmiştir. 43
Çizelge 3.2. Belirtilen malzemeler tez çalışmasında kullanılmıştır. 44
Çizelge 3.3. Tez çalışmasında kullanılan primelerin forward ve reverse sekanslarının gösterim. 44
Çizelge 3.4. RT-PCR için uygulanan üç aşamalı amplifikasyon prosedürü sıcaklık, döngü sayısı ve uygulama zamanlarının gösterimi. 48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kök hücre bölünme çeşitlerinin gösterilmesi. 5
Şekil 1.2. Kök hücrede gerçekleşen asimetrik ve simetrik hücre bölünmesi 6
Şekil 1.3. Kök hücre çeşitlerinin farklılaşma özelliği ve elde edildikleri yere göre gösterimi. 8
Şekil 1.4. İndüklenmiş pluripotent kök hücrenin yeniden programlandırılması 10
Şekil 1.5. Dişte yer alan kök hücre türlerinin (DPKH, EDPKH, PDLKH, DFMKH, APKH) sürmemiş diş, süt dişi ve kalıcı dişte gösterimi 23
Şekil 1.6. Eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişi kök hücreleri (EDPKH) elde edilmesi ve DMEM ya da α-MEM medyalarıyla kültürlemesi 28
Şekil 1.7. Kisspeptinlerin etki mekanizmasının gösterilmesi 34
Şekil 1.8. Kisspeptin (Kp) sinyalinin kotransmitterlerinden Dynorphin (Dyn), inhibe ederek nörokinin B (NKB) uyararak Kp/NKB/Dyn (KNDy) nöronları tarafından Kp salınımını sağlamasının gösterimi 38
Şekil 3.1. İzolasyonu sağlanan eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişi kök hücrelerinin (EDPKH) %15'lik FBS içeren medya içerisinde T75 flaskta kültürlenmesi. 46
Şekil 4.1. Pasaj 3'deki hücrelerin popülasyonu side scatter (granülüte) ve forward scatter (hücre büyüklüğü) akım sitometrisiyle analiz edildi. 49
Şekil 4.2. Pasaj 3'teki kök hücrelerin pozitif yüzey belirteçleri (CD90, CD105) ile akım sitometrisinde mezenkimal kök hücrede (MKH) olduğu saptanmıştır. 50
Şekil 4.3. Pasaj 3'teki kök hücre, CD105 (pozitif yüzey markırı) ve CD45 (negatif yüzey markırı) hücre populasyonu yönünden akım sitometrisinde bulunması gereken alanlarda yoğun olduğu belirlenmiştir. 50
Şekil 4.4. Kisspeptin-1 geni için P3 grubu referans alındığında P4 ve P5 örneklerinin katlı değişimleri. 51
Şekil 4.5. Kisspeptin-1 reseptörü için P3 grubu referans alındığında P4 ve P5 örneklerinin katlı değişimleri. 51
Şekil 4.6. Taşikinin-3 (TAC3) geni, P3 grubu referans alındığında P4 ve P5 örneğinin katlı değişimi. 52
Şekil 4.7. T aşikinin-3 (TACR3) reseptöründe P3 grubu referans alındığında P4 ve P5 örneğinin katlı değişimi. 52

SİMGELER VE KISALTMALAR

RT-PCR **:** Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
Kiss1 : Kisspeptin1
Kiss1r : KiSS1'den türetilen peptit reseptörü
Tac3 : Taşikinin-3
Tacr3 : Taşikinin-3 reseptörü
CD : Farklanma kümesi
EDPKH : Eksfoliye olmuş süt dişinden elde edilen kök hücre
GnRH : Gondotropin salgılayıcı hormon
TGF-β : Dönüştürücü büyüme faktörü beta
NKA : Nörokinin A
NKB : Nörokinin B
SP : Substrat P
PDGF : Trombosit kaynaklı büyüme faktörünün
ANG-1 : Anjiyopoietin-1
VEGF : Vasküler endotel büyüme faktörü
HGF : Hepatosit büyüme faktörü
IL-11 : İnterlökin-11
PGF-2 : Prostaglandin
SDF-1 : Stromal faktör-1
IGF-1 : İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
EKH : Embriyonik kök hücreler
ETKH : Yetişkin kök hücreler
İPKH : İndüklenmiş pluripotent kök hücreler
MS : Multiple skleroz
MKH : Mezenkimal kök hücreler
HKH : Hematopoetik Kök Hücre
IFN-gamma : İnterferon-gamma
HLA-G : İnsan lökosit antijeni
HGF : Hepatosit büyüme faktörü
PGE2 : Prostaglandin E2
SSC : Yana saçılma
FSC : Öne saçılma
DNA : Deoksiribo nükleik asit
RNA : Ribonükleik asid
PMT : Fotomultipler tüp

DPKH : Tam gömük yirmi yaş dişi kaynaklı mezenkimal kök hücre
PDLKH : Peridontal ligament kök hücreleri
APKH : Apikal papilla kök hücreleri
DF-MKH : Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücreleri
İDPKH : İnsana ait diş pulpası kök hücreleri
ml : Mililitre (1/1000 l)
µl : Mikrolitre (1/1000 ml)
FGF : Fibroblast büyüme faktörü
PBS : Fosfat tamponlu salin
MEM : Modified Eagle Medium
FBS : Fetal bovine serum
DMEM : Dulbecco's Modifiye Edilmiş Eagle's Medyası
ALP : Alkalin fosfataz
OCN : Osteokalsin
BSP : Kemik sialoproteini
ARC : Arkuat nükleus
ME : Median eminens
LH : Lütienleştirici hormon
GnIH : Gonadotropin inhibitör hormon
FSH : Folikül stimüle edici hormon
AVPV : Anteroventral periventriküler çekirdek
POA : Preoptik alan
mRNA : Mesajcı ribonükleik asit
cDNA : Komplementer deoksiriboz nükleik asit
DMSO : Dimetil sülfoksit
FACS : Floresans tarafından aktive edilmiş hücrelerin ayrılması
CT : Siklüs değeri
KİKH : Kemik iliği kök hücreleri
PH : Progenitör hücre
İPKH : İndüklenmiş pluripotent kök hücre

1. GİRİŞ

Kök hücreler; yüksek miktarda çoğalabilme kapasitesine sahip, kendinden farklı çeşit, hücre türlerine dönüşebilen, kendini yenileyebilen, hasarlı dokuya verildiğinde fonksiyonun düzelmesini sağlayıp onarımıda görev alan hücrelerdir (Ateş, 2016). Kök hücre eldesinin kolay olması, alıcıya güvenli şekilde nakledilebilmesi özellikleriyle rejeneratif tıp alanında tercih edilen kaynaklardan biri olmuşlardır.

Dental kök hücre kaynaklarından biri olan eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişleri (EDPKH), mezenkimal kök hücre çeşidi olup farklılaşma özelliğine göre multipotent kök hücre özelliği taşımaktadır. Gelişimin erken evrelerinde oluşmaları, teminin kolay olması, etik problemler oluşturmamaları nedeniyle önemli kök hücre kaynaklarından olmuştur (Martinez Saez ve ark., 2016; Tsai ve ark., 2017).

KISS1, KISS1R, TAC3 ve TAC3R üreme sistemiyle ilişkili genler olup hipotalamus-hipofiz- gonad aksını etkilemektedir. Üreme sisteminin normal fonksiyonlarını sürdürebilmeleri, gondtrophin salgılayıcı hormon (GnRH) salınımını ile dişilerde yumurtalıkları erkeklerde ise testisleri uyararak üreme sistemine etki etmektedir. Puberte başlangıcıyla ilişkilendirilip bu genlerde meydana gelen mutasyonların hipogonadizme neden olduğu belirtilmiştir (Barroso ve ark., 2019).

Yapılan tez çalışmasında, insan eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişlerinden kök hücrelerinin izole edilmesi sağlanmıştır. Akım sitometrisi analizleriyle izolasyonu sağlanan kök hücrelerin karakterizasyonu spesifik antikorlarla elde edilmiştir. Mezenkimal kök hücre (MKH) karakteri taşıyan süt dişi kök hücrelerin pasaj 3, 4 ve 5'e ulaşması sağlanmıştır. Üreme sisteminin fonksiyonunu sağlıklı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi ve puberte için son derece önemli olan genler (KISS1, KISS1R ve TAC3, TACR3) pasaj sayısıyla ilişkilendirilerek incelenmesi sağlanmıştır. Sonuçlar, puberteyle ilişkilendirilen kisspeptin ve nörokininin gen ekspresyonlarının süt dişi kök hücrelerinde ekspresyonlarının mevcut olduğu ve düzeylerinin pasaj sayısıyla arttığı doğrulanmıştır. Kisspeptin-1 ve reseptörlerinin hipofiz, pankreas, hipotalamus, gonad ve plesantada eksprese edildiğini süt dişi kök hücrelerinde de ekspresyonunun mevcut olduğu belirlenmiştir (Kafa ve ark., 2011; Yardımcı ve ark., 2019). Süt dişlerinin üreme sistemiyle ilişkili olan genleri eksprese etmeleri ve fonksiyonu bozulan alana etki edip ilgili hasarlı alana yönelip tamir etme kabiliyetleriyle üreme sisteminde meydana gelen bozukluklar için alternatif bir kök hücre kaynağı olabileceği düşünülmüştür.

1.1. Kök Hücre

Kök hücreler farklı türden hücre tiplerine dönüşebilen, kloni oluşturabilen kendini yenileyebilen farklılaşmamış hücre tipidir (Kolios ve ark., 2013; Sargın, 2003). Rejenerasyon yeteneğine sahip özelleşmemiş bu hücrelerin belli koşullar altında farklılaşma potansiyelleri de vardır.

Kök hücreler progenitör olarak kabul edilen ilkel hücreler olup farklılaşmama özelliğini koruyarak ve kendini yenilerek pek çok hücre döngüsünden geçme yetkisine sahip oldukları belirtilmiştir. Kök hücreler uygun bir sinyale maruz kaldıklarında özelleşmiş hücre tipine dönüşmeye başladıkları ifade edilmiştir (Aydin ve ark., 2019; Kaneko ve ark., 2018).

Bir hücreyi kök hücre olarak ele almak için hücrenin belli başlı ölçütler bulundurması gereklidir, bu ölçütler aşağıda sıralanmıştır (Avcı, 2022).

I. Hücrenin kendini kendini yenilemesi (self-renewal) ve uzun zaman boyunca prolifere olabilmesi.
II. Farklı hücre çeşitlerine farklılaşabilmek (differasyon, plastisite) ve özelleşmiş olan hücrelere kaynaklık etmek.
III. Normal şartlarda farklılaşmamış (özelleşmemiş) olmak
IV. *İn* vitro şartlarda dokuda hasar meydana gelmese de farklılaşmaya uğramamış kuşaklara katkıda bulunmak.
V. Hasarlı dokuya transplate edildiğinde kaynak olan dokunun yeniden görevini yapacak şekilde tekrar çoğalmasını sağlamak.

Doku ve organların oluşumunda yer alan sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonlar komşu hedef dokuya etki eder. Kök hücrelerde pek çok büyüme faktörünün salgılanması hasarlı hücrede rejenerasyonunu etkilemektedir. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), anjiyopoietin-1 (ANG-1) , hepatosit büyüme faktörü (HGF), interlökin-11 (IL-11), prostaglandin-2 (PGF-2), stromal faktör-1(SDF-1) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) örnek olarak verilebilmektedir.

Kök hücre ve vücut hücreleri incelendiğinde bu hücreler arasında temel farklılıklar bulunmaktadır. Vücuttaki her hücrenin (kas, cilt, karaciğer hücreleri vb.) belirgin görevleri olup yine bu hücrelerin bölünmesiyle kendileri gibi hücreler oluşturdukları ifade edilmiştir. Kök hücrelerin ise aldıkları sinyale göre farklı hücre tipine dönüşebilen hücrelerdir. Bu iki hücre türü arasındaki farklılıklardan biri de normal hücrelerin çoğalmaları sınırlı olup bu hücrelerin belirli bir görevi yapmak üzere özelleşmiş hücreler olmasıdır. Vücut hücrelerinin başka hücre tipine dönüşümü söz konusu olmazken kök hücreler sınırsız bölünme yetkisi ve çoğalma yeteneğine sahip olup uyaran gelip özel bir hücreye dönüşüm sağlanana kadar da şartlanmamış bir şekilde kalmaya devam eder, uygun koşullar sağlandığında da özelleşmiş (farklılaşmış) hücrelere dönüşebilme yeteneğini bulunmaktadır.

Kök hücrelerdeki sınırsız bölünme yeteneği telomeraz aktivitesiyle ilişki olmaktadır. Telomerler, kromozomların uç bölgelerinde yer alan tekrar eden DNA dizileridir. Hücreler her bölünme sonrası telomer bölgelerinde kısalma meydana getirir bu durumda hücrenin bölünme potansiyelinde azalma meydana getirir. Bölünme sonrası telomeraz kromozomun 3' ucuna telomerik dizileri ekleyerek bölünme sonrası kaybedilen DNA'yı temin eder böylede kromozomun kısalmasına engel olur. Kök hücrelerde, normal hücreden farklı olarak telomeraz enzim aktivitesi oldukça daha yüksektir bu durum bölünme sayısını etkilemektedir (Avcı, 2022).

Kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerini kavramak için "potensi" olarak kullanılan terime başvurulur. Farklılaşma özelliklerine göre kök hücreler kategorize edilirse bunlar; totipotent, multipotent, oligopotent, pluripotent ve unipotent hücreler olarak ele alınır. Sperm ve yumurtanın döllenmesiyle oluşan zigot tek başına bir organizmayı oluşturacak yetkiye sahiptir. Organizmayı oluşturacak düzeydeki potansiyele sahip bu tip hücrelere "totipotent hücre" denilmektedir. Totipotent hücreler döllenmeden sonraki 4-5 gün süresince tek bir organizmayı oluşturacak bu yetkiye sahip olmaya devam ederler. Beşinci günden itibaren blastokistin iç hücre kitlesinde kök hücreler vücutta yer alan tüm hücrelere dönüşme yetkisine sahipken totipotent hücreler gibi tek başına bir organizmayı oluşturabilecek güçte değillerdir. Bu tür hücreler "pluripotent hücre" olarak adlandırılmaktadır. Farklılaşma özelliği bakımından daha özelleşmiş olan hücreler ise "multipotent hücreler" olarak adlandırılıp bu kök hücreler bazı dokularda yer alan hücrelere dönüşebilme yetkisine sahip olması nedeniyle çok yetkili anlamında adlandırılmıştır. Oligopotent kök hücreler ele alındığında ise progenitor hücrelerin (öncü hücrelerin) sadece bir kaç hücre tipine farklılaşıp dönüşebilen türüdür. Unipotent kök hücre ise; öncü hücreler olup sadece tek bir çeşit hücre çeşitine dönüşümün, farklılaşmanın gerçekleşebildiği kök hücreler olarak ifade edilmiştir.

Kök hücreler elde edildikleri kaynağa göre ise üç ana başlıkta incelenmektedir bunlar; gelişimin erken evresinde elde edilen emriyonik kök hücreler, gelişimin ilerleyen dönemlerinde temin edilen erişkin kök hücreler ve kaynağını fetüsten almakta olan kök hücrelerdir. Döllenmiş yumurta zigot blastotsis evresinde iken iç hücre kitlesinden alınan hücrelerin her bir tanesi embriyonik kök hücre olarak tanımlanmıştır.

Bu çeşit kök hücrelerin çoğalma ve farklılaşma potansiyelleri fazla olup telomerleri uzundur. Embriyonik kök hücrenin (EKH) gerek kullanımda yaşanan etik sorunlar, gerekse hücreler yüksek genomik instabiliteye sahip olmaları kullanımı dezavantajlı hale getirmiştir. Bir başka kök hücre türü olan fetüs kök hücresine bakıldığında ise genellikle düşük doğum yapmış kadınlardan elde edilen, pluripotent hücreler olup, uygun koşullar sağlandığında farklı hücre türlerine dönüşebilen hücre çeşitidir. Erişkin kök hücrelerin (ETKH) genel özelliklerine bakıldığında ise, her yaş grubundaki insanda bulunabilen, kendini kopyalama özelliğine sahip, dokuda yer alan bazı hücrelere dönüşme yeteneğine sahip, multipotent kök hücre karakterine

sahip hücrelerdir. Mezenkimal kök hücre (MKH) kaynakları ele alındığında dental dokularda, kemik iliği, kordon kanı, adipoz doku, göbek kordon kanı, wharton jölesi, amniyon sıvısı, karaciğer dokusu, menstrüasyon kanı gibi çok sayıda dokuda kök hücre mevcuttur (Bonaventura ve ark., 2020; Ozkan ve ark., 2020; S. Lee ve ark., 2011; Ding ve ark., 2011).

1.1.1. Kök Hücre'nin Farklılaşma (Differasyon) Özelliği

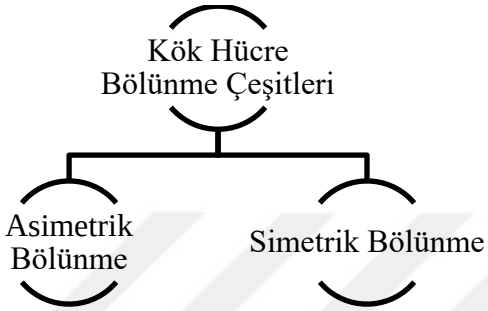
Kök hücreler normal koşullarda aynı vücut hücreleri gibi farklılaşmamış hücreler olup uygun uyaranlar (kimyasal, sinyal yolakları) ile farklı hücre türlerine dönüşebilme yeteneklerine sahip hücre çeşitleri olarak tanımlanmaktadır. Farklılaşmada, hücreler arası etkileşim sonucu oluşan farklılaşma ve büyüme faktörleri, sitokinlerin hücre dışı matriks proteinlerinin kombinasyonu etkisiyle amaca yönelik bir takım değişim işleminin gerçekleşmesi için kullanılmaktadır (Ateş, 2016).

Mevcut olan hücrenin farklı dokulardaki hücre türlerine dönüşebilme potansiyeline "plastisite" ya da "differasyon" olarak tanımlanmaktadır. Bu hücrelerdeki farklılaşma potansiyeli ise "farklılaşma kapasitesi" olarak adlandırılmaktadır. Kök hücrelere farklılaşmaları için belirli uygun ortamlar sağlanıp laboratuvar ortamında farklılaşması sağlanabilmektedir. Bu tür fiziksel ve kimyasal ortamların sağlanıp hücrenin genetik yapısının değiştirildiği farklılaşmalar "yönlendirilmiş farklılaştırma" olarak tanımlanmaktadır.

Kök hücrenin farklılaşması, dizi (lineage) değişimi için dört farklı yol mevcuttur. Bu farklılaşma yöntemleri transdeterminasyon, transdiferansiyasyon, geriye farklılaştırma olarak bilinen dediferansiyasyon ve hücre füzyonudur. Transdeterminasyon bir öncü hücrenin, özelleşmiş hücre tipine dönüşümü için planlanmış başka bir öncü (progenitor) hücreye dönüşümün sağlanması ve kök hücreye ait olan serilerin oluşması olarak belirlenmiştir. Transdiferansiyasyon ise diferansiyenin gerçekleştiği bir hücrenin yine farklılaşmış bir hücre fenotipini almasıdır. Bu durum memelilerdeki özofagusta yer alan düz kas hücrelerinin iskelet miyozinlerini oluşturması örnek olarak verilebilir. Dediferansiyon olayında ise hücre grubunda farklılaşmış ya da farklılaşamamış daha önceden planlanmamış hücrenin, öncü hallerine doğru geriye doğru gidip farklı bir hücre oluşturmak için farklı kola ayrılması işlemine verilen addır. Dediferansiyona örnek vermek gerekirse miyozinlerin ekstremite amputasyonu ile farklı çeşit hücre gruplarına semenderlerde farklılaşması örnek olarak verilebilir. Son olarak, hücre füzyonunda ise bir hücrenin yönlendirilmiş olan hücre dizileriyle füzyonun sağlanması bu şekilde yeni yönlendirilmiş hücre dizilerinin sağlanmasına olanak vermesidir. Hücre füzyonuna örnek verilmek istenirse tedavi amaçlı gerçekleştirilen klonlamalardır. Olgun, belirli bir hücre dizisini oluşturmak için programlandırılmış olan hücrenin çekirdeği, çekirdeğinin çıkarılması sağlanmış oosit içerisine aktarımı yapılıp tekrar programlanması bu şekilde sağlanabilmektedir. Yine fibroblastların miyoblastlarla füzyonu sağlandığında, fibroblast çekirdeğinde kasa özgü mRNA ekspresyonun arttırılması sağlanmıştır (Ateş, 2016).

1.2. Kök Hücrenin Bölünmesi

Kök hücrelerde sürekli hücre bölünmeleri meydana gelmekte ve mevcut hücre sayısında artma eğiliminde olmaktadır. Kendini yenileme olarak tanımlanan diğer adıyla "self renewal" kavramında kök hücrelerin belli sayıda sabit tutulması esasına dayanır. Kök hücreler kendini yenileme ve farklı soylara farklılaşma eğilimindedir (Biswas ve ark., 2007). Kök hücrelerde, iki farklı hücre bölümesi gözlemlenmiş olup bu bölünme türleri simetrik ve asimetrik hücre bölünmelerdir (Ateş, 2016).



Şekil 1.1. Kök hücre bölünme çeşitlerinin gösterilmesi.

1.2.1. Asimetrik Hücre Bölünmesi

Asimetrik hücre bölünmesinde oluşan iki hücreden birisi, kaynak olarak kullanılan hücreye ait tüm özellikleri korurken diğer hücre progenitör hücreyi (PH) oluşturur. Öncü hücreler ilerleyen dönemlerde bölünerek farklılaşmış hücrelere dönüşebilmektedir (Ateş, 2016). Asimetrik bölünme aşağıda gösterilen sistematik şekilde gerçekleşmektedir (Sağsöz ve ark., 2008).

$$\text{Kök Hücrede Asimetrik Bölünme} = \text{Kök Hücre} + \text{Progenitör Hücre}$$

Asimetrik bölünme türü için hücrede içerisinde yer alan asimetrinin, bazı protein ve organellerin, kalıtım materiyalinin meydana gelen yavru hücrelerin sadece birine aktarımının olması olarak tanımlamak mümkündür. Bölünme sonrası oluşan öncü hücre hücre bölünmesi sürekliliğinde birkaç bölünmenin ardından farklılaşmaya maruz kalarak farklılaşmış olgun kök hücreye dönüşmektedir. Bir kök hücrenin çevredeki farklılaşmış hücreler ve diğer kök hücrelerle etkileşiminde de bazı etmenler vardır. Bu etmenlere örnek verilmek gerekirse sitokinler, adezyon molekülleri, ekstrasellüer matriks bileşenleri, büyüme faktörleri, mikroçevrenin fizikokimyasal koşulları (iyonik ortam, pH, metabolitler) verilebilir (Ateş, 2016). Bahsedilen etmenler hücrenin farklılaşması ve kendi kendine çoğalması üzerinde etkili olabilmektedir. Eğer farklılaşmaya neden olan bu uyaranlar ortadan kaldırılırsa pek çok hücrenin bölünme döngüsüne tekrar girmesi söz konusudur. Asimetrik bölünmenin omurgasızlarda, tek hücrelerde gerçekleştiği yine Drosophila'ya ait yumurtalıklarda da gözlemlendiği belirtilmiştir (Sağsöz ve ark., 2008)

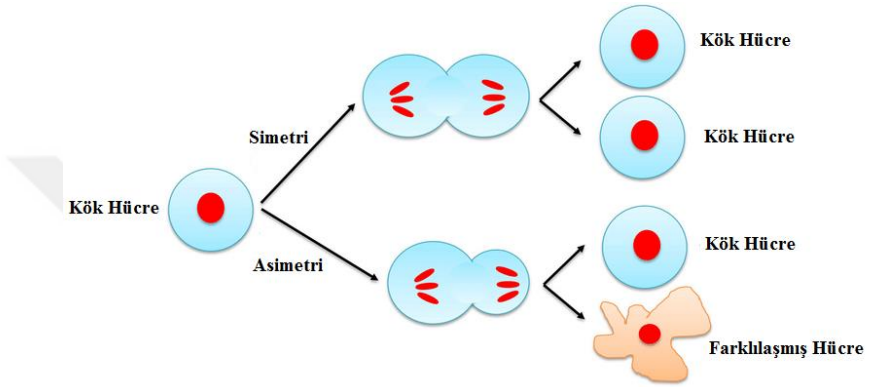
1.2.3. Simetrik Hücre Bölünmesi

Simetrik hücre bölünmesinde, kaynak olarak temin edilen hücreyle aynı karakter ve özellikte iki yavru hücre oluşumu gerçekleşmektedir (Ateş, 2016). Bu bölünmeyle hücreler de özelliklerinde herhangi bir değişme olmaksızın sayılarını coğaltabilirler. Simetrik kök hücre bölünmesi, aşağıda yer alan sistematik şekilde bölünmektedir (Sağsöz ve ark., 2008).

$$Simetrik\ Kök\ Hücre\ Bölünmesi = Kök\ Hücre + Kök\ Hücre$$

ya da

$$Simetrik\ Kök\ Hücre\ Bölünmesi = Progenitör\ Hücre + Progenitör\ Hücre$$



Şekil 1.2. Kök hücrede gerçekleşen asimetrik ve simetrik hücre bölünmesi (Chen ve ark., 2015).

1.2.4. Kök Hücre Bölünmelerdeki İç ve Dış Kontrol Mekanizmaları

Kök hücrelerin farklılaşması, bölünmesi ve mevcut özelliklerini hücre içerisinde yer alan düzenleyici mekanizmalar (hücre döngüsü düzenleyicileri), transkripsiyon faktörleri ve bulunduğu mikroçevreden edindikleri sinyaller, sinyal yolakları ile gerçekleştirebilmektedir (Avcı, 2022).

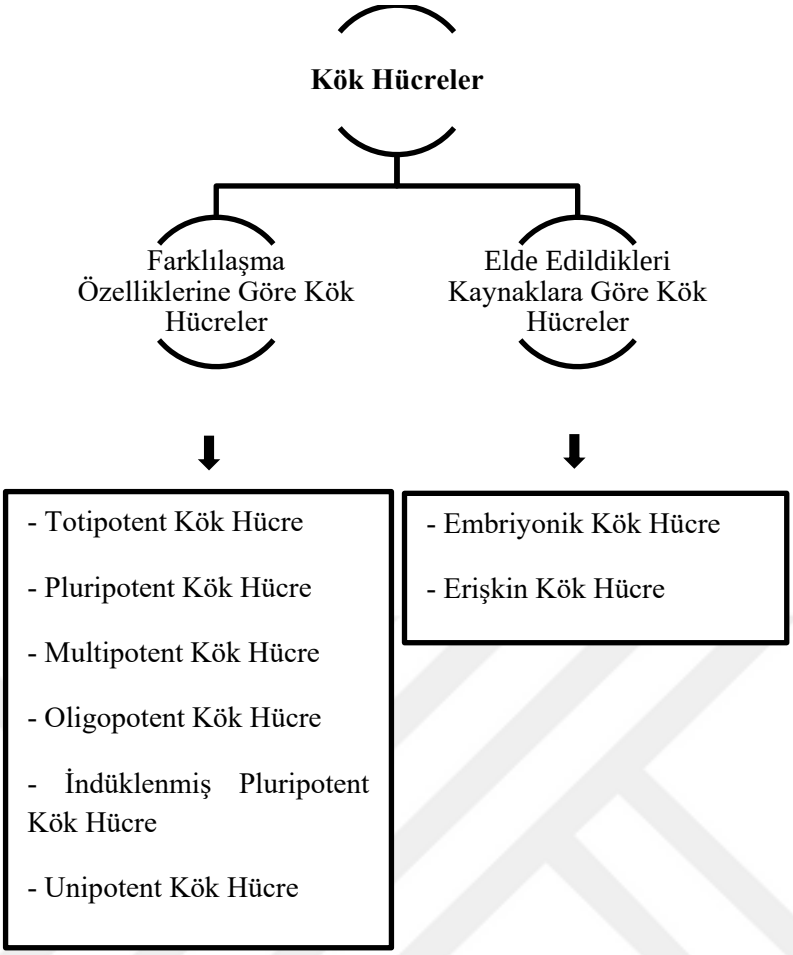
Hücre bölünmeleri gerçekleşirken hücrelerin dağılımındaki eşitsizlik ya da çevre tarafından meydana gelen farklılaştırıcı etkiler ile hücrenin kaderini belirlemektedir. Hücre kaderini belirleyen içsel faktörlerden biri yapısal proteinler olan hücre iskeletleri olup hücre kaderini belirleyen bileşenlerin bölüşülmesinde görev almaktadır. Asimetrik bölünmenin kök hücrede meydana gelmesinin "spektrozom" olarak adlandırılan hücre cisimciğinin sağladığı spektrozomların spektrin (hücre zarına bağlı hücre iskeleti proteini) ve siklin A düzenleyici proteinleri bulundurmaktadır. Spektrozomlar görev olarak mitoz mekiğine tutunarak kök hücre bölünmesini şekillendirir. Yine kök hücre kaderinin belirlenmesinde etkili olan moleküllerin yerlerini belirleyip onların progenitör hücrelere dönüşümünü gerçekleştirmektedir (Sağsöz ve ark., 2008).

Kök hücre kaderinin düzenlenmesi ve kök hücrelerin çoğalmasında dış faktörlerde etkilidir. Hücre kaderini düzenleyen salgılar ele alındığında Wnt ve TGF- β örnek verilebilir. DNA kopyalanmasında Wnt'ler β-kateninleri içeren kompleks bir yolla etkinleştiriken, TGF-β embriyodaki sinir farklılaşmasında etkili olmaktadır (Sağsöz ve ark., 2008).

1.3. Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücreler kendini yenileyebilme, farklı hücre tiplerine dönüşümünün mümkün olması, asılda özelleşmemiş olan ancak özelleşmiş olan çeşitli hücrelere (kas, sinir, kan gibi) dönüşebilen, hasarlı dokuya verildiğinde dokunun tekrar fonksiyonunu kazanmasına olanak sağlayan bu yüzden rejeneratif tıp için tercih edilen öncü hücrelerdir (Ateş, 2016; Avcı, 2022). Bu hücreler özellikle doku mühendisliğinin gelişimiyle gerek hücre iskeleleri (scaffold) gerekse büyüme faktörleri/sinyaller ile uygulanabilmektedir.

Kök hücre çeşitleri ele alındığında farklılaşma özelliğine göre kök hücreler ve elde edildikleri kaynakların çeşitlerine göre kök hücreler olmak üzere iki ana başlık altında incelenmektedir. Farklılaşma özelliklerine göre kök hücreler gruplandırıldığında oligopotent, totipotent, unipotent, pluripotent, indüklenmiş pluripotent ve multipotent kök hücreler olarak ele alınır. Elde edildikleri kaynağın çeşidine göre kök hücreler değerlendirilecek olursa bu hücreler; gelişimin erken evresinde temin edilen embriyonik kök hücreler (EKH), hematopoetik kök hücreler (HKH), mezenkimal kök hücreler (MKH) olarak ele alınmaktadır.



Şekil 1.3. Kök hücre çeşitlerinin farklılaşma özelliği ve elde edildikleri yere göre gösterimi.

1.3.1. Farklılaşma Potansiyeline Göre Kök Hücreler

Totipotent Kök Hücre

Zigot canlıda döllenme meydana gelmesiyle oluşan hücrelerdir ve bu hücreler tek başına dâhi tüm organizmayı oluşturabilecek potansiyelde genetik materyale sahiptir. Totipotent kök hücreler sınırsız farklılaşma özelliğine sahip, bir hücreden bir bireyi oluşturabilecek özelliğe sahip kök hücrelerdir (Ateş, 2016).

Totipotent kök hücreler bir hücreden bir organizmayı oluşturabilecek yetiye sahip olmaları nedeniyle her şeyi yapabilen anlamına gelen " totipotent hücre" olarak adlandırılmıştır. Totipotent kök hücre kapsamına, embriyo, embriyo gelişiminin 5. gününe kadar blastomerler de dâhil olarak totipotent hücre olarak kabul edilir (Sağsöz ve ark., 2008). Bu karaktere sahip hücreler yüksek oranda çoğalma ve farklılaşabilme geçirebilecek özelliktedir. Döllenme gerçekleştikten kısa süre sonra totipotent karakterdeki zigot bölünme geçirerek iki eşit parçaya ayrılabilmektedir. Ayrılan her hücre tek başına gelişimini tamamlayarak ayrı bir birey oluşturabilmektedir. Bu eşit parçaya ayrılmış totipotent özellikteki hücrelerden biri uterusa implante olur ise tek yumurta ikizleri oluşabilmektedir (Sağsöz ve ark., 2008). Tek yumurta

ikizi bireyler incelendiğinde genetik materyaller bakımından aynı özelliğe sahip bireyler meydana gelmektedir.

Pluripotent Kök Hücre

Pluripotent karakterdeki kök hücreler, adlarını "pluri" teriminden almaktadır, Latince de çok sayıda anlamına gelen kelime pluripotent kök hücrelerinde de pek çok hücre çeşidine dönüşebilmesini nitelemiştir. Pluripotent kök hücreler gerek gelişim döneminde gerekse in vitro ortamda bu kök hücrelerin 200 farklı hücre tipine dönüşebilme yetenekleri vardır (Sargın, 2003).

Pluripotent kök hücreler, döllenmenin beşinci günü olmak üzere birkaç bölünmenin ardından totipotent kök hücrelerin farklılşmasıyla "blastatisis" olarak adlandırılan içi boş küresel şekle dönüşmeye başlar. Blastosit içeriğinde iki çeşit hücre çeşiti vardır bunlar; iç tabaka olan endoderm ve dış tabak olan ektodermdir. Blastosistin dış katmanında bulunan trofoblast adı verilen plesata solunumu, oluşacak yavrunun beslenmesini ve koruyucu kese (chorion) meydana gelmektedir. Blastosis tabakasının iç kısmında yer alan hücrelerden kalp, kas, kemik, göz , beyin gibi organ ve doku geşilmleri sağlanırken iç tabakada yer alan hücrelerin pluripotent karakter göztermektedir (Biswas ve ark., 2007).

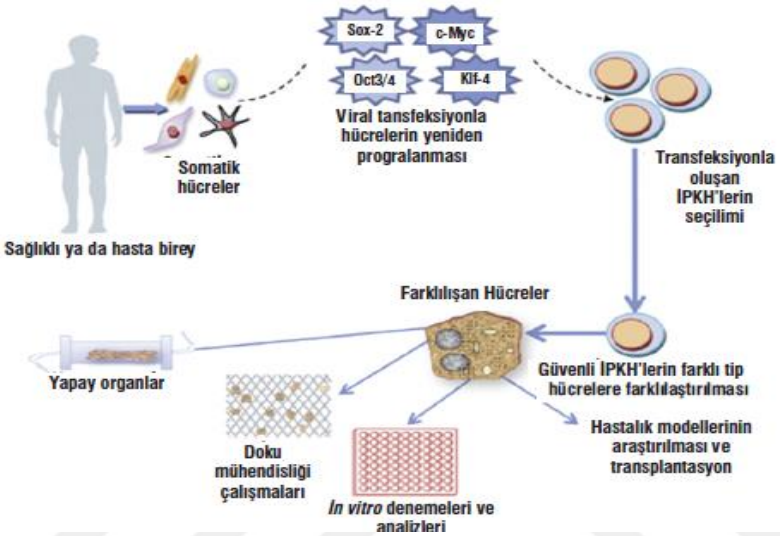
Pluripotent karakterdeki kök hücreler her üç germ tabakasında yer alan (endoderm, mezoderm, ektoderm) hücrelerine dönüşebilmektedir. (Ateş, 2016; Biswas ve ark., 2007; Kolios ve ark., 2013). Küresel şekle sahip blastositeki kök hücreler embiryonik süreçte bu üç germ tabakasından kökenli yaklaşık olarak 200 farklı hücre tipine dönüşebilecek yetkiye sahiptir. Pluripotent kök hücreler araştırıldığında bu hücrelerin totipotent kök hücrelerden farklı olarak tek başına organizmayı oluşturabilecek potansiyeldeki güce sahip olmadığı sonucuna varılmıştır ve bu tür hücreler “pluripotent hücre” olarak tanımlanmış, bu özellikleriyle totipotent kök hücrelerden ayrılmıştır (Sağsöz ve ark., 2008).

İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (İPKH)

İndüklenmiş pluripotent hücreler, gerçekte pluripotent karakter de olmayıp erişkinlerde var olan somatik hücrelerin dedifferasyon olması kazandırılarak pluripotent kök hücreye dönüştürülmesi sağlanan kök hücrelerdir. Bu yolla oluşturulmuş bu hücreler “indüklenmiş pluripotent” hücre olarak tanımlanmıştır. İlk olarak İPKH’lar farelerden 2006 yılında, insandan üretimi ise 2007 yılında gerçekleştirilmiştir (Ateş, 2016).

İndüklenmiş pluripotent kök hücreler embriyonik kök hücreler tarafından da eksprese edilen gen ve proteinleri ifade etmektedir. Yine indüklenmiş pluripotent kök hücreler, farklılaşma, teratom ve embriyonik cisimcik oluşturma kapasitesini bulundurduğu belirtilmiştir (Ateş, 2016 ; Kolios ve ark., 2013). Pluripotent bir hücrenin eldesi için belirli genlerin virüslerle transfeksiyonuyla sağlanmakta böylece transfeksiyonu sağlanan hücre bu genleri eksprese eder.

Yamaka tarafından Oct3/4, Sox2, Klf4 ve C-Myc genlerinin somatik hücre karakterdeki insan fibroblast hücrelerine retroviral aktarım ile aktarımı transfeksiyonla sağlanmıştır (Sevim ve ark., 2011; Ateş, 2016). Transfeksiyon işlemi ardından gen aktarımı gerçekleştirilip aktarılan aktif genleri bulunduran hücre kolonilerin seçimi ile indüklenmiş plurpotent kök hücrelerin eldesi gerçekleşmiştir. İPKH eldesiyle, embriyonik kök hücre kullanımında yaşanan etik sorunlarında giderilebilmesi için önemli bir kaynak olmuştur. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler hücresel tedavide organizmaya implante edildiğinde de immun cevap riski de oluşturmamıştır.



Şekil 1.4. İndüklenmiş pluripotent kök hücrenin yeniden programlandırılması (Sevim ve ark., 2011).

Multipotent Kök Hücreler

Hücreler anne karnında organizma gelişim süreci geçirirken zamanla özel görevler kazanır ve erişkin kök hücrelere dönüşebilirler. Gelişimin erken safhalarında pluripotent karakterdeki kök hücreler daha özelleşerek ve sınırlanarak multipotent kök hücreye dönüşür (Sağsöz ve ark., 2008). Multipotent hücreler kelime anlamı olarak "çok yetkili" anlamına gelip bazı dokularda yer alan hücrelere dönüşebilme potansiyeline sahip hücrelerdir.

Dönüşüm kapasitesileri karşılaştırıldığında, multipotent kök hücrelerin pluripotent kök hücrelere göre daha dönüşümü sınırlı olup farklılaşmaları tek bir yönde gelişmektedir (Ateş, 2016). Multipotent kök hücrelerde kas kök hücrelerinden farklı çeşitteki kas dokuları meydana gelirken ya da deri kök hücrelerinden deriye ait dokuların oluşması tek yöne doğru bir farklılaşmanın olduğunu söylemek mümkündür.

Erken gelişim dönemlerinde bulunan pluripotent kök hücrelere karşı multipotent kök hücreler çocuk ve yetişkinlerde mevcuttur (Sağsöz ve ark., 2008). Multipotent kök hücre karakteri taşıyan bu kök hücreler bazı dokularda bulunabilmektedir. Bu dokular; yağ doku, kemik iliği, kordon kanı, diş pulpası gibi çeşitli dokulardan mezenkimal kök hücre eldesi

yapılabilmektedir. Kültürlenme aşamasında mezenkimal kök hücreler kültür kapına yapışması ve çoğalması sağlanıp belirli pasaj sayısına ulaşınca karakterizasyonu spesifik yüzey hücre markırlarıyla sağlanabilmektedir. Mezenkimal kök hücre karakterine sahip olduğu doğrulanan bu hücreler kemik, kıkırdak, kas, yağ dokuya farklılaştırılabilmektedir.

Oligopotent Kök Hücreler

Oligopotent kök hücreler, öncül olan hücrelerin sadece birkaç hücre türüne farklılaşabilen kök hücre çeşitleridir. Bu kök hücrelere örnek vermek gerekirse miyeloid, vasküler ve lenfoid kök hücreler olarak verilebilmektedir. Oligopotent karakterdeki vasküler kök hücreler, farklılaşma özelliğine sahip olup gerektiğinde endotel gerektiğinde ise düz kas hücresine dönüşebildikleri saptanmıştır (Ateş, 2016).

Unipotent Kök Hücreler

Unipotent kök hücreler kelime anlamı olarak "unus" kelimesinden köken alıp tek anlamına gelmektedir. Bu kök hücrelerin farklılaşmaları tek çeşit dizilerde meydana gelmektedir. Erişkin kök hücreler sağlam olan dokularda unipotent karakter taşıyıp normal koşullarda tek tip hücre oluşturur (Sargın, 2003).

Öncü hücrelerden biri olan unipotent kök hücreler tek tip hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip kök hücrelerdir. Unipotent kök hücreyi örneklendirilecek olursa; insana ait deri hücreleri ve hepatositler olarak belirtilebilir. Progenitör olan bu hücreler organlarda (beyin, karaciğer gibi) organın bütünlüğünü ve fonksiyonunu korumak amacıyla ölen hücrelerin yerini almakla görevlidir (Ateş, 2016).

1.3.2. Elde Edildikleri Yerlere Göre Kök Hücreler

Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

Embriyonik kök hücreler, embriyo oluşumunun 4-5 günü içerisinde blastosis olarak adlandırılır. Blastosis olarak adlandırılan bu yapı temelde 3 yapıdan meydana gelmektedir. Bu yapılardan troblast blastosis etrafında çevreleyen yapı olup bu tabaka ‘’trofektoderm’’ olarak tanımlanır. Diğer bir yapı ise blastosöl olup blastositin içinde yer alan oyuklu kavitedir. Üçüncü temel yapı ise iç hücre grubu olup blastocoel ucunda yer alan yaklaşık 30 hücreden meydana gelen hücre topluluğudur ve EKH’ler, embriyoda yer alan bu iç hücre kitlesinden köken almaktadır (Sargın, 2003).

Döllenme sonrası oluşan zigot, blastotsis evresinde iken bu hücre topluluğundan alınan hücrelerden her birine EKH denilmektedir. İlk olarak insan embriyonik kök hücreleri 1994 yılında izole edilirken, sürekli olarak insan embriyonik hücre hatlarının eldesi 1998 yılında gerçekleşmiştir (Biswas ve ark., 2007).

Embriyonik kök hücreler eldesi blastokistin iç kütlesinden temin edilebilir olup telomeraz aktivitelerinin yüksek olması DNA sentezleme aktiviteri limitsiz olmasını sağlamakta ve farklı kök hücre türlerine farklılaşabilmektedir (Sevim ve ark., 2011; Biswas ve ark., 2007). Bu kök hücrelerde vücut hücresine oranla daha çok çekirdek-sitoplazma hacmi bulunmaktadır. Embriyonik kök hücreler kanser hücreleriyle karşılaştırıldıklarında ise benzer bir dizi bölünme gerçekleştiriken farklı olarak karyotipik bir anormalitenin olmamasıyla farklılık göstermektedir (Sağsöz ve ark., 2008). Embriyonik kök hücrelerin gelişimin erken dönemlerinde bazı genleri eksprese ettiği belirlenmiş olup bunlar; oktamer bağlayıcı protein (OCT-4) , SSEA-3, Nanog, SSEA-4 Alkalin Fosfat (ALP), CD24, TRA-1-60, CD9 olup erken dönem işaretleyecilerle immünolojik olarak belirlenebilmektedir (Ateş, 2016). Octamer-4 (Oct-4), bir transkripsiyon faktörü olup farklılaşma gerçekleştiğinde aşağı yönde regüle edildiği belirtilmiştir (Biswas ve ark., 2007).

Embriyonik kök hücrelere incelendiğinde pluripotent kök hücre özelliği taşıyan bu hücrelerin uygun sinyaller ve gerekli ortam sağlandığında pek çok hücreye embriyonik katmana farklılaşabildiği gözlemlenmiştir. (Aydin ve ark., 2019; Kaneko ve ark., 2018).

Pluripotent karakterdeki embriyonik kök hücreler üç germ tabakasınada (endoderm, mezoderm, ektoderm) dönüşebilmektedir (Sargın, 2003; Avcı, 2022). Farklılaşabilen hücreler sinir, deri, pankreas, karaciğer gibi hücreler olabilmektedir. Farklı hücrelere dönüşebilmelerindeki bu yetenekleriyle embriyonik kök hücreler hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere iyi bir kaynak olduğu ifade edilmiştir.

Araştırmalarda kültüre edilebilirliği kolay olan EKH'ler sıklıkla kullanılmaktadır. Embriyonik kök hücrelerin erişimi genellikle tüp bebek merkezlerinden sağlanmaktadır. Bu kök hücrelerin çoğalma yetenekleri oldukça fazla olup erişkin kök hücrelere göre oldukça kolay yetişmekte ve sayıları oldukça fazladır. Çoğalma çeşitliliği ve farklılaşma potansiyeline göre diğer hücrelere kıyasla oldukça geniş kapsama sahiptir. Embriyonik kök hücrelerin telomerlerine bakıldığında oldukça uzun olduğu ve bu özelliğiyle uzun süre çoğalabilmektedirler (Ateş, 2016). Laboratuvar ortamında elde edilen embriyonik kök hücrenin iki yıldan fazla yaşayabildiği belirlenmiştir.

Embriyonik kök hücrelerin kök hücre tedavisinde farklılaşma kapasitesi bakımından iyi bir kaynak olarak kullanabileceği göz önüne alınarak kök hücre tedavisinde kullanımına başvurulmuştur. Ancak bu tedavide kök hücrenin alıcıya nakledilmesiyle immun reaksiyon meydana gelebilmektedir. Bu reaksiyonu aza indirgemek için immunosupresiflerin kullanım kök hücre tedavisinde sağlanmaktadır.

Embriyonik kök hücre tedavisiyle başta MS (Multiple skleroz), parkinson, alzeimer, kemik-kıkırdak kayıpları kanseri gibi hastalıklarda kullanılması amaçlanmaktadır. Ancak emriyonin erken gelişim evresinde blastosiste müdahalenin yapılması çalışmalarda kaynak

olarak insan EKH'nin blastosisten temin edilmesi embriyoya müdahalenin olması etik sorunlara neden olmuştur (Sağsöz ve ark., 2008).

Embriyonik kök hücrelerin etik sorunlar yaratmasının hayvanlar üzerinde incelemelerin yapımasına neden olmuştur. Embriyonik kök hücrelerin farklılaşmaya uğramadan transplantasyon işlemi gerçekleştirildiğinde araştırmacılar normal sağlıklı farede embriyonik kök hücrelerin teratom oluşturduğunu belirtmiştir. Bu durum embriyonik kök hücrelerin farklılaşmaya uğramdan tedavi ve transplasyon için kullanılmayacağını sonucuna ulaştırmıştır. Ancak farklılaşmamış erişkin kök hücrelerin transplasyon sonrası teratom oluşumu belirlenmemiştir (Sargın, 2003).

Embriyonik kök hücre çalışmalarında insan embriyonik kök hücrelerinin farklı hücre türlerine dönüşümü saptanmıştır. Farklılaşma sağlanan bu hücreler; insan ve farede pankreas adacık hücresine benzer özellikte insülün salgılayabilen hücreler, yine insan ve farede yer alan kan ve kasılma özelliği gösterebilen kalp kası hücreleri olarak belirtilmiştir (Sargın, 2003).

Erişkin Kök Hücreler (ETKH)

Kök hücre tütlerinden olan erişkin kök hücreler, EKH ile karşılaştırıldığında bu kök hücreleri ayıran en önemli unsurlardan biri, erişkin kök hücrelerin ileri gelişim evrelerde ortaya çıkan çeşitli doku ve organlarda var olan farklılaşmamış hücreler olmasıdır. Hematopoietik, diş pulpası adipoz, nöral, hepatik, limbal, sinir, kas ve mezenkimal kök hücreler (MSC) erişkin kök hücre grubunda yer almaktadır (Aydin ve ark., 2019).

Erişkin hücreler kendilerini yenileyip çoğalabilirken uygun ortam sağlandığında farklı dokulara farklılaşabilmektedir. Telomeraz aktiviteleri yüksek olsa da embriyonik kök hücrelerdeki gibi sınırsız değildir. Yine embriyonik hücrenin aksine her yaş grubundaki insanda bulunabilmektedir ve multipotent karakter göstermektedir. Erişkin kök hücrelerin iki önemli özelliği bulunmaktadır. Bunlardan ilki kendi kopyalarını çok kısa sürede kopyalayabilmeleridir, bir diğer özelliği ise özelleşmiş fonksiyona sahip spesifik hücreye dönüşebilmeleridir. İhtiyaç dâhilin de bulunduğu dokudaki farklı hücre türlerine dönüşürler. Bu hücreler için bulundukları dokularda fonksiyonunu yerine getirmeyen, hasara uğramış ya da ölen hücrelerin yerine sağlıklı, yeni kök hücrelerin ürettildiği bir nevi hücreler için yedek parça işlevinde olduklarını söylemek mümkündür (Ateş, 2016). Yapılan çalışmalarda erişkin kök hücre tiplerinin kültür ortamında plastik yüzeye yapışıp burada prolifere olma hızının fazla olduğu ifade edilmiştir.

Embriyonik bir kök hücreyi yetiştirmek, erişkin bir kök hücreyi üretmekten oldukça daha kolaydır. Bu durumun asıl nedeni ise erişkin hücrelerin çoğalma ve büyümesinin uzun zaman almasından kaynaklanmaktadır. Erişebilirlik açısından bakılacak olursa erişkin kök hücreleri dokudan bulup temin etmekte oldukça zordur. Bu yüzden laboratuvar ortamında araştırmacılar tarafından daha çok embriyonik kök hücrelerle çalışmak tercih edilir. Ancak hastanın kendi hücreleri olduğu için erişkin kök hücreler de immun yanıt oluşmayacak ve

dokular reddedilmeyecektir. İmmunosupresiflerin kullanılmasına erişkin kök hücreler için gerek duyulmamaktadır. Embriyonik kök hücreler farklı olarak erişkin kök hücreler etik sorun yaratmaması ve gelişimin ilerleyen evrelerinde temin edilmesi, hastadan gerekli yasal gerekliliklerin sağlanması hem kullanımı kolay bir kaynak olmasını hem de çalışmalarda etik sorunların yaşanmamasını sağlamıştır (Prentice, 2019).

Erişkin kök hücrelerin multipotent karakterinde olması, pek çok hücre tipine farklılaşabilmesi kök hücrelerin klinikte kullanımına olanak vermektedir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda farklılaşması sağlanan bu hücrelerin tedavi amaçlı kullanılabileceği belirlenmiştir (H. S. Wang ve ark., 2004).

Erişkin kök hücrelerin mevcut olduğu alanlara örnek vermek gerekirse kemik iliği, deri, sinir hücreleri, kan (hematopoietik kök hücreler), kas gibi yaygın alanlarda bulunduğu belirtilmiştir. Bu kök hücre, büyüme veya farklılaşmaya bağlı olarak uygun koşullarda başka bir doku türü farklılaşabilir bu özellikleri 'plastisite' olarak adlandırılmaktadır (Biswas ve ark., 2007).

Erişkin mezenkimal kök hücrelerin çoğalması için dokuda yer alan stromal hücre kaynaklı faktör-1 olarak bilinen Stro-1 ve vasküler endotelyal büyüme faktörü olan VEGF büyüme faktörlerinin arttırılması sağlamakta sinyaller meydana getirdiği üzerine yoğunlaşılmıştır (Büyükkurt ve ark., 2017).

Hematopoetik Kök Hücre (HKH)

Hematopoetik kök hücreler, hematopoez teriminden köken almıştır. Hematopoez anlamı olarak gerek embriyonik gerekse yetişkin düzeyde kan hücresi oluşturulmasına verilen addır. Hematopoetik kök hücreler bütün kan hücrelerine dönüşebilen, kendini yenileyebilen, farklılaşabilen kök hücrelerdir (Ateş, 2016).

Hematopoetik kök hücrelere kemikte yer alan kemik iliğinin kaynaklık yaptığı belirtilmiştir. Hematopoetik karaktere sahip bu kök hücreler; kemik iliği, kan, vasküler sistemi oluşturmaktadır (Sağsöz ve ark., 2008). Erişkin kök hücre türlerinden olan HKH'lar kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme özellikleriyle klinikte kullanılan yaygın kök hücre türleridir. Bu kök hücreler, kordon kanı kemik iliği, fetal karaciğerinden ve periferik kandan temin edilebilmektedir. Hematopoetik kök hücrelerin bazı yüzey belirteçlerini eksprese ettikleri gözlemlenmiştir bunlar; CD34, CD14, CD45 ve CD133 olduğu belirtilmiştir (Ateş, 2016).

Embriyonik dönemde oluşmuş hematopoetik kök hücreler gerekli olan mikroçevre sağlanana kadar farklı bölgelere göç eder. Farklı bölgelerdeki farklı karakteristik özelliklerde ekspresyon ve farklılaşma özelliklerini etkilemektedir. Ancak hematopoetik kök hücre ile tedavide sıklıkla çalışılan hücre türü erişkin kök hücrelerdir. Gerek tüm kan hücrelerine dönüşebilme gerekse kendi kendini yenileyebilme özelliğine sahiptir. Kan hücreleri dışında hematopoetik kök hücreler uygun koşullar sağlanırsa in vitro oramda adiposit, kemik, kıkırdak kardiyomiyosit ve miyositlere farklılaşmanın meydana gelebileceği belirtilmiştir (Sağsöz ve ark., 2008).

Mezenkimal Kök Hücreler (MHK)

Mezankimal kök hücreler (MHK) insan ve hayvan kaynaklarından izolasyonu mümkün olan erişkin kök hücrelerdir. Kaynaktan kolay elde edilebilir olmaları ve elde edildikleri dokununlardaki çeşitlilik rejeneratif uygulamalar için umut verici bir kaynak olmalarını sağlamıştır. Mezenkimal kök hücreler ilk olarak 1950'lerde kemikte fibroblast öncüleri olarak tanımlandı daha sonra kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme özellikleri araştırılmıştır (Kaneko ve ark., 2018).

1970 yılında Friedenstein ve arkadaşları tarafından ilk olarak kemik iliğinde mezenkimal kök hücre izole edilmiştir (Aydin ve ark., 2019). Çalışmada kemik iliği FBS (Fetal Bovine Serum) içeren ortamda kültürlenmiş ve kültür sonrası hücrelerin fibroblast benzeri morfolojik yapılara sahip olduğu saptanmıştır. Bu kök hücrelerin uygun ortamlar sağlandığında kültüre edildikleri ortama adhezyon olma özellikleri vardır.

1999 yılına gelindiğinde, Pittenger ve arkadaşları kemik iliğinden kaynak alan bu hücrelere MKH olarak adlandırıken, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen, uygun koşullar sağlandığında bu kök hücrelerin adipojenik, osteojenik, kondrojenik farklılaşmanın meydana gelebildiği CD49e, CD39, CD54, CD73 ve CD105 gibi yüzey belirteçlerini eksprese eden kök hücreler olarak tanımlayıp bugünkü tanımı karşılayacak şekil de ifade etmişlerdir (Pittenger ve ark., 1999).

Mezenkimal kök hücre kaynaklarında bakıldığında ise kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin elde edildiği önemli bir kaynak olmasına karşın farklı kaynaklardan da izolasyonu mümkündür. Bu kaynaklara örnek verilmek gerekirse diş dokuları, göbek kordonu kanı, menstrüasyon kanından, fetal karaciğer, yağ dokusu, dermis, iskelet kası, sinoviyal sıvı, wharton jölesi, göbek kordonu, amniotik sıvı ve diş pulpası gibi pek çok kaynaktan elde edilebilmektedir (Aydin ve ark., 2019; Ateş, 2016; Ding ve ark., 2011).

Yakın zamanda gerçekleştirilen çalışmalarda, MKH'ler de gelişimde üç germ tabakasının etkili olduğu ifade edilip, farklı dokulara farklılaşabilen, hematopoetik olmayan ve multipotent karakterde hücreler olduğu belirlenmiştir. Bu hücreler mezodermal kökenli hücrelere farklılaşabilmelerinden dolayı mezenkimal kök hücreler olarak adlandırılmışlardır (Jiang ve ark., 2002). Mezenkimal kök hücrelerin kendini yenileyebilme kabiliyetleri in vitroda sınırlı olduğu belirtilmiştir. (Aydin ve ark., 2019) Bu hücrelere multipotent erişkin kök hücre ya da mezenkimal stromal hücreler denilebilmektedir (Nakamura ve ark., 2009).

Farklıllaşma özelliklerine bakıldığında mezenkimal kök hücrelerin kemik, kas, kıkırdak, kas ve ligamente farklılaşma kabiliyetine sahip multipotent hücreler olduğu belirtilmiştir. Farklılaşma, transkripsiyon faktörlerini içeren genetik olaylar tarafından da düzenlenir. Belirli bir fenotip yoluna farklılaşma progenitör hücrelerin belirli bir türe farklılaşmasını indükleyebilen bazı düzenleyici genler tarafından kontrol edilebilir. Büyüme faktörleri ve indüksiyon kimyasallarının yanı sıra, biyomateryal yapılı iskele ile oluşturulmuş bir mikro

ortam da MKH'lere uygun çoğalma ve farklılaşma koşulları sağlayabileceği belirtilmiştir (Ding ve ark., 2011).

Mezenkimal kök hücrelerin immünolojik açıdan hem baskılayıcı hemde arttırıcı etkileri bulunup, interferon-gamma (IFN-gamma) bir otokrin bağımlı yolak sayesinde antijen sunarak immünolojik aktiviteyi arttırıcı özellik gösterir. Eğer INF-gamma seviyesi normal seviyenin üzerine çıkarsa bu seferde immünolojik baskılayıcı etki yaratır.

Yapılan araştırmalarda çeşitli büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve kemokinlerin MKH'lerin mobilizasyonuna aracılık ettiği bulunmuştur. Hem hayvan hem de insan çalışmalarında, büyüme faktörleri VEGF, stromal türevli faktör-1 (SDF-1), granülosit koloni uyarıcı faktör (GCSF), granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF), eritropoietin (EPO), granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör, anjiyopoietin-2, fibroblast büyüme faktörü, plasental büyüme faktörü (PlGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü-CC, kök hücre faktörü (SCF), interlökin IL-1β, IL-3, IL-2, IL-6 ve IL-8 'nin MKH'leri uyardığı ve harekete geçirdiği bilinmektedir. Anjiyogenez ve vaskülogenez sürecinde, kemik iliğinden gelen hematopoietik kök hücreler (HKH) ve endotelyal progenitör hücreler (EPC), sinerjistik etkileşimlerin fizyolojik ihtiyacı nedeniyle eşzamanlı olarak mobilizasyon gösterebilmektedir. Bu bağlamda kan trombositleri ve monositler tarafından salınan VEGF-A, SDF-1, HSC, PlGF ve EPC MKH'lerin ortak mobilizasyonuna aracılık eden metalloproteinaz-9'u (MMP-9) aktive ettiği düşünülmektedir. Bu hücreler arasındaki etkileşimler revaskülarizasyon sürecine katkıda bulunabilir (Ding ve ark., 2011).

Mezenkimal kök hücrelerin tanımlanmasında bazı önemli karakteristik özellikler bulunmaktadır. Mezenkimal kök hücre karakteristik özelliği taşıyıp taşımadığı bu yüzey belirteçleriyle akım sitometrisi kullanarak saptanmaktadır. Mezenkimal kök hücreler bazı yüzey antijenlerini eksprese edebilen multipotent özellik göstererip farklı hücre tiplerine farklılaşabilen hücrelerdir. Mezenkimal hücreler için bazı kriterler bulunmaktadır. Bunlardan ilki standart kültür koşullarında plastik yüzeye yapışabilmeleri, osteoblast, adipoz ve kıkırdak hücrelerine dönüşebilmeleri yine CD105, CD73 ve CD90 gibi belirteçleri eksprese edebilirken, CD45, CD14, CD11b, CD34, CD19, CD79a ve HLA-DR yüzey belirteçlerini eksprese edememeleridir. Stro-1'in ise klonojenik mezenkimal kök hücreler için spesifik olduğu belirtilmiştir (Ding ve ark., 2011; Lv ve ark., 2014; Aydin ve ark., 2019; Matsumoto ve ark., 2005).

Ding ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı araştırmalarda mezenkimal kök hücrelerin miyofibroblastlar (düz kas aktini, düz kas miyozin ağır zinciri), nöronlar (nestin, Tuj-1) ve endotel hücreleri (CD146, CD105), dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF-beta) reseptörü ve çeşitli integrinler gibi bazı belirteçleri ifade ettiğini belirtmişlerdir.

Mezenkimal kök hücreler elde edildikleri dokudan bağımsız bir şekilde plastik kültür kabına yapışabilen kök hücreler olduğu morfolojik olarak fibroblast benzeri şekilleri olduğu

belirtilmiştir. Kültürlenmesi kolay olan mezenkimal kök hücreleri, özellikle rejeneratif tıp için önemli bir kaynak haline getirmiştir. Özellikle embriyonik kök hücre kullanımında yaşanan etik sorunlar erişkin kök hücreleri üzerine yoğunlaşılmasına neden olmuştur (Kaneko ve ark., 2018; Martinez Saez ve ark., 2016).

Mezenkimal kök hücreler hasarlı dokulara göç edebilir, hasarlı hücrelere füzyon ederek bu alanda çeşitli faktörler salgılarlar. Bu kök hücreler antiinflamatuvar, immunsüresif, anjiyonik ve antiapoptotik özellik göstermeleriyle hücresel tedavi için tercih edilen bir kaynak haline getirmiştir (Ateş, 2016).

Mezenkimal kök hücreler rejeneratif tıp ve gen terapisi yöntemleri için kullanıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır. 2005 yılında Matsumoto ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada anjiyogenezde önemli rol oynayan vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ile enfekte olan mezenkimal kök hücrelerin kalp fonksiyonunu iyileştirmek için miyokard enfarktüsünden (MI) sonra sıçanlara nakledilmiştir. Çalışma sonuçları değerlendirildiğin de VEGF eksprese eden mezekimal kök hücrelerin kullanıldığı transplantasyon, kardiyoprotektif ve anjiyogenez etkileri miyokardının onarımında rol alabileceği belirtilmiştir (Matsumoto ve ark., 2005).

Khan ve arkadaşları 1991 yılında bu kök hücrelerin farklılaşmasında kök hücrenin bulunduğu ortamın etkili olduğunu belirtmiştir. Mezenkimal kök hücreler spesifik indükleyicilerle, gerek in vitro gerekse in vivo koşullarda adipositlere, osteoblastlara ve kondroblastlara farklılaşmaya uğrayabilir. β-gliserol fosfat, deksametazon, askorbik asit gibi kimyasallar mezenkimal kök hücreler için osteojenik farklılaşmayı indüklerken, deksamatazon, TGF- β3 kondrojenik farklılaşmayı uyarmada etkili olduğunu ifade etmişlerdir (Aydin ve ark., 2019).

Mezenkimal kök hücrelerinin gerek kas gerekse kemik iliği, yağ gibi dokulara farklılabildikleri transdiferasyon gerçekleştiren kök hücre çeşitlerinden olduğu ve son dönemde yapılan çalışmalarla sinir hücrelerine de farklılaşabildikleri elirlenmiştir. Parkinson, Alzheimer gibi dejeneratif bozukluklar içinde MKH'lerin kullanılabileceği belirtilmiştir (Capkin ve ark., 2012).

1.4.Akım Sitometrisi

Akım sitometrisinin kelime anlamı incelendiğinde "sitometri" teriminin biyolojik partikül ya da hücrelerin kimyasal ve fiziksel karakterlerinin tespiti anlamına gelirken, akım sitometrisinin hücreye ait özelliklerinin akan bir sıvı içerisinde belirlenmesi olarak ifade edilebilmektedir (Taneli, 2007).

Akış sitometresi pek çok hücrenin süspansiyon halindeki akışkan boyunca tek tek geçirilerek, hücrenin granülatesi, büyüklüğü gibi parametrelere dayalı olarak sınıflandırılması temeline dayanmaktadır. Akım sitometrisi klinik ve araştırma laboratuvarlarında 1950'li

yıllardan itibaren başvurulan, immünoloji, kök hücre çalışmaları, hematoloji, onkoloji gibi alanlarda kullanılan analiz yöntemlerindendir (Taneli, 2007).

Akım sitometrisi yöntem olarak akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesine olanak sağlar. Böylece hücrenin şekili, boyutu, granüleritesi, DNA ve RNA içeriği bakımından değerlendirilmesine olanak verilebilmektedir. Analiz edilecek hücre ya da biyolojik bileşen öncelikle fluoresan içerikli madde ilaveli antikor yardımıyla işaretlenmesine olanak verilmektedir. Akım sitometrisi hızlı bir teknik olup saniyede binlerce partükülün sayımına olanak vermektedir.

Akım sitometrisinin temel bileşenleri ele alındığında en önemli bileşen akışı sağlayacak olan sıvı olup yine lazer ışın sağlanımını sağlayacak ışık kaynağı, filtre, sinyallerin algılandığı sinyal dedektörü, yazılım programları ve ayırma mekanizması bileşenlerinden oluşmaktadır (Taneli, 2007). Akış sistemi analiz edilecek partikülün lazer ışık önünden geçişişini sağlayan taşıyıcı sistemdir. Optik bileşen lazerden geçen partiküllerden meydana gelen floresan saçılımı silindirik ve çapraz filtrelerde toplayıp fotodetektöre aktarılmasında rol almaktadır. Elektronik bileşen ise mevcut olan optik sinyalin fotomultiper tüp (PMT) ile çoğaltılarak elektirik sinyalline çevrilmesinden ve analiz için bilgisayara aktarılmasında rol alır.

Merkezi kanal bulunduran akıcı sistem, örneğin cihaza ulaşmasını sağlamaktadır. Merkezde yer almakta olan sıvı, laminar akıntı olup kendini çevreleyen sıvıyla (sheath fluid) birbirine karışma işlemi gerçekleşmeden ilerlemektedir. Partiküller meydana gelen bu etki ile sıvı içerisinde tek sıra halinde dizilmiş gibi görünür ve gerçekleşen bu dizilim "hidrodinamik odaklanma" olarak tanımlanmıştır. Bu lazer, ışının eş zamanlı olarak sadece tek bir hücreye düşmesini sağlar ve tek hücre analizi yapılmasına olanak verir. Işının öne doğru yayıldığı esnada lazer ile aynı yönde 20 derecelik açıyla etrafa doğru yayılmakta olan ışınlar ileri dağılım kanalları (FSC) olarak adlandırılıp lens aracılığıyla toplanması sağlanır. İleri dağılım kanalları detektörü, hücrenin boyutu hakkında veri elde edinmesini sağlarken eksitasyon çizgisine yaklaşık 90˚ açıyla yayılan ışının ölçülmesi ise yana dağılım (SSC) olarak adlandırılır. Yana dağılım, incelenen örneğin iç yapısı ve partiküllerin içerikleri hakkında bilgi verir. Hidrolik sistem, kılıf sıvısı ile partiküllerin lazere çarpmasını sağlamaktadır. Lazerin partiküllere çarpması sonucu oluşan ışıma optik sistem ile sinyalin toplanması sağlanır. Optik sistem ile elde edilen sinyallerin elektriksel sinyale dönüştürerek elektriksel sinyallerin bilgisayar ortamında verisel analizine olanak sağlar (Taneli, 2007).

1.4.1. Akım Sitometrisi Çalışma Prensibi

Süspansiyon halindeki hücre granülaritesi, hücre büyüklüğüne bakılarak tek hücre seviyesine göre akım sitometrisi floresan yoğunluğuyla orantılı olarak ölçüm yapan cihazdır. Hava basıncına maruz bırakılan süspansiyon halindeki hücreler sıvı içinden geçmesi sağlanır. Böylece sıvının hızlı akışa sahip, yüksek hidrostatik basınca sahip olması sağlanır, elde edilen

bu basınçla cam ya da quartzdan oluşturulmuş akış kabinine hücrelerin gelmesini sağlanılır. Akış kabinin şekli ve sıvının laminer akışı sayesinde hücrelerin tek sıra halinde lazer kaynağının önünden geçmesi sağlanır. İleri dağılma, yan dağılma ve floresan dedektörleri ise FL-1,FL-2, FL-3 vb. olup hücre analizleri için sistemde bulunmaktadır. Akım sitometri cihazıyla esas olarak cihazdan ileri dağılma grafiği ile yaklaşık büyüklüğü belirlenirken yana dağılma grafiği ile ise yaklaşık olarak granülitesi, floresan grafiğiyle (belli dalga boyuna has parıldama eldesi) yaklaşık floresan miktarı hakkında sonuçlar elde edilmesini mümkün olmaktadır (Taneli, 2007).

1.4.2. İmmünfenotipleme

Akım sitometrisi, immünfenotiplemeyle özel antikorların yardımıyla saptanmak istenen antijenik yapıların varlığı ya da yokluğunu belirlenmek için kullanılmaktadır. 1970'li yıllarda immunfenotiplendirme yapılmakta iken; immunolojide ve akan hücre ölçer sistemlerindeki meydana gelen gelişmeler ve yazılım programlarının hızla ilerleyişinde aşama kaydetmesi günümüzde çok renkli immünfenotipleme analizlerinin kısa sürede sonuç alınabilmesine olanak vermiştir. İncelenecek hücrenin lazerle uyarıldığında floresan sinyaller verebilecek reaktifler ile işaretlenmesi gerekir. En yaygın kullanım alanı olan immunfenotipleme işleminde hücrenin işaretlenmesi, kullanılan çeşitli monoklonal antikorlar aracılığı ile sağlanmaktadır. Akım sitometrisinde kullanılan antikorlar "flokrom" adı verilen floresan ışımayı gerçekleştirebilen boyalarla işaretlenmiş olan antikorlardır. İşaretlenmiş olan bu antikorlar spesifik oldukları antijeni taşıyan hücreye bağlandıklarında floresans ışıkla tespiti mümkün olmaktadır.

Kullanılan boyalar, lazer ile uyarıldıklarında (eksitasyon) açığa çıkan enerji daha düşük enerjisi olan, daha yüksek dalga boyunda floresan sinyaller olarak yayılmaktadır. İmmünofenotiplemenin bazı avantajları bulunmaktadır (Taneli, 2007). Hücreler immünofenotipleme, granüler (SSC) ve büyüklük (FSC) yapılarına göre hücreler sınıflandırılabilir yine ölü hücreler çalışmadan elimine edilebilir. Hücrenin fenotipi hücre döngüsünün hangi evresinde olduğunu analizler ile saptanabilir. Akım sitometrisi ile mezenkimal kök hücrelerin eksprese ettiği pozitif belirteç CD90, CD105, CD73, CD44, CD146 ve HLA I kök hücre yüzey belirteçlerini ancak CD45 negatif belirtecini eksprese etmedikleri doğrulanabilir böylece hücrelerin, mezenkimal kök hücre karakteri taşıyıp taşımadığı hücreye özgü antikorlarla doğrulanabilmektedir (Hu ve ark., 2018).

Bazı pozitif ve negatif hücre yüzey belirteçlere mezenkimal kök hücrenin karakterizasyonu için başvurulmaktadır. Hücre yüzeylerinde bulunan bu antijenlerle konjuge olan floresan işaretli antikorlarla mezenkimal hücrenin karakterizasyonu mümkündür. Mezenkimal karakterdeki kök hücrelerde Thy-1 olarakta bilinen CD90, endoglin olarak adlandırılan CD105 antijenlerini hücre yüzeylerinde bulundurdukları CD45 olarak bilinen hematopoietik hücrelerde eksprese antijenler yönünden negatif oldukları belirtilmiştir (Martinez Saez ve ark., 2016).

1.4.3. Akım Sitometrisinde Kullanılan Hücre Yüzey Belirteçleri

Yüzey belirteçleri hücrenin yüzeyinde var olan kök hücreleri tanımlamak ya da izolasyonu için kullanılan genler ve protein ürünleri olarak tanımlanabilmektedir. Hücre yüzey belirteçleri CD (farklanma kümesi) olarak bilip, farklllı hücre türlerine göre özeldir (Avcı, 2022).

Çizelge 1.1.Kök hücre çeşitleri ve hücre yüzey belirteçleri listelenmiştir

Hücre Çeşitleri	Hücre Yüzey Belirteçleri
Embriyonik kök hücreler	Oct-4,CD9, Alkalin fosfataz, LIN28, CD24, Nanog, Sox2, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4 ve TRA-1-60
Mezenkimal kök hücreler	CD90, CD105, Stro 1, CD13, CD49a ve CD49b, CD29, CD71, CD44, CD73 ve alfa-integrinler
Hematopoietik kök hücreler	CD150, Sca-1, CD27, CD43, CD45, CD48, CD34, CD117, CD38

CD90 (Thy-1)

CD90, Thy1 olarakta bilinen bir antijendir ve immunoglobulin süper ailesinin GPI bağlantılı bir glikoprotein üyesidir. Kupffer hücrelerinde ve fibroblastlarda ifade edilmektedir. CD90, çeşitli kök hücreler ve olgun nöronların aksonal süreçleri için belirteç olarak kullanılabilmektedir. Nöronlarda, pek çok kök hücrede perifal T hücrelerinde eksprese edilebilen bir antijendir fakat bu antijenler B hücrelerinde eksprese edilememektedir. CD90 sinyal iletimiyle ilgili olup glikozil fosfotidil inositol bağlı glikoproteindir (Lv ve ark., 2014).

CD105

CD105 endoglin olarak bilinip bir membran proteinidir aynı zamanda yüksek afiniteli olup TGF beta-1 ve TGF beta-3 reseptörüdür. TGF-beta reseptör kompleksini regüle etme ve TGF beta 1'e hücresel yanıtı modüle etmektedir. Endoglin olarak bilinen CD105, kemik iliği, endotelyal ve anjiyogenik endotelyal hücrelerde ifade edilir. Anjiyogenik endotelyal hücrelerde eksprese edilmesiyle anjiyogenez için oldukça önemlidir.

CD45

CD45 antijeni lenfositlerdeki tüm yüzey proteinlerinin yaklaşık % 10'unu oluşturan, tüm çekirdekli hematopoietik hücrelerde eksprese edilen reseptör tipi bir protein tirozin fosfatazdır (Lv ve ark., 2014). 180-240 kD transmembran glikoproteindir. B ve T hücresi reseptörlerinin

aracılık ettiği aksiyonlar için kritik olduğu bilinmektedir. CD45 antijeni, hematopoietik olmayan dokularda bulunmaz bu yüzden mezenkimal kök hücreler için yüzey antijeni negatiftir.

Akım Sitometrisi'nin Kullanım Alanları ve Avantajları

Analizin gerçekleşmesi için hücre süspansiyonun analize hazırlamak amacıyla kan, beyin, omurilik sıvısı, kemik iliği, eklem sıvısı, plevral sıvı, biyopsi örnekleri, hücre kültürü örnek olarak akım sitometri için kullanılabilir. Akım sitometrisi analizleriyle kök hücrelerin karakterizasyonun sağlanması, immofenotipleme, hücre döngüleri, apoptoz, ilaç residansları ve lösemi lenfoma tiplemesi gibi pek çok alanda analizler yapılabilmektedir.

Akım sitometrisinin avantajları ele alındığında kısa zaman diliminde çok fazla miktarda hücreyi incelenmesine olanak verdiği belirtilmiştir. Akım sitometrisinin hızlı olması 1 saniye içinde 500 hücre sayarken 10.000 hücreyi yaklaşık olarak 20 saniyede sayabilmektedir.

1.5. Diş Tabanlı Kök hücreler ve Rejenerasyon

Diş, yüksek oranda mineralize mine, dentin ve sement dokularının bunun yanı sıra dental pulpa ve ilişkili periodonsiyum da dâhil olmak üzere yumuşak bağ dokularından oluşan çok yapılı bir organdır. Kompleks bir yapısının olması ve sınırlı kendi kendini iyileştirme kabiliyetinin olması nedeniyle, hasarlı diş dokusunun biyolojik onarımını teşvik etmek için çeşitli müdahalelerin gerçekleştirlmesi gerekir. Destek doku ve dişlerle ilgili yaygın olarak karşılaşılan hastalıklar periodontal hastalıklar, çürükler ve travmatik yaralanmalardır.

Kök hücre tedavileri, doku mühendisliği ve tıbbın gelişimiyle yeni terapötik stratejiler, doku veya organ fonksiyonunu iyileştirme, onarma, sürdürme ve geliştirme potansiyelleri açısından önemli katkılar sağlamıştır (Hu ve ark., 2018). Diş ve periodontal doku için kök hücre tabanlı doku mühendisliği araştırmaları, diş kökü, dentin-pulpa, diş ve periodontal dokunun rejenerasyonunu sağlamaktadır. Rejeneratif endodontik prosedürlerin amaçları aşağıda açıklanmıştır (Vishwanath ve ark., 2013).

a) Pulpa benzeri dokuyu yenilemek
b) Hasarın alanın onarımı
c) Kökün yenilenmesi
d) Apikogenezisi indüklemek

Ağız boşluğundaki kök hücrelere kolay temin edilebilir ve hasatı mümkün olmasıyla önemli bir mezenkimal kaynağı olduğu ortaya çıkmıştır (Martinez Saez ve ark., 2016). Dişte yer alan kök hücreler hızla gelişmekte olan doku mühendisliğiyle diş ve periodontal onarım için yeni terapötik stratejilerden olmuştur (Shuai ve ark., 2018). Dental kök hücrelere, süt dişleri kök hücreleri (EDPKH), periodontal ligament kök hücreleri (PDLKH), dental pulpa kök hücreleri (DPKH), dental apikal papilladan (APKH) , dental folikül kök hücreleri (DF-MKH) ve diş epitel kök hücreleri örnek verilebilir (Aydin ve ark., 2019).

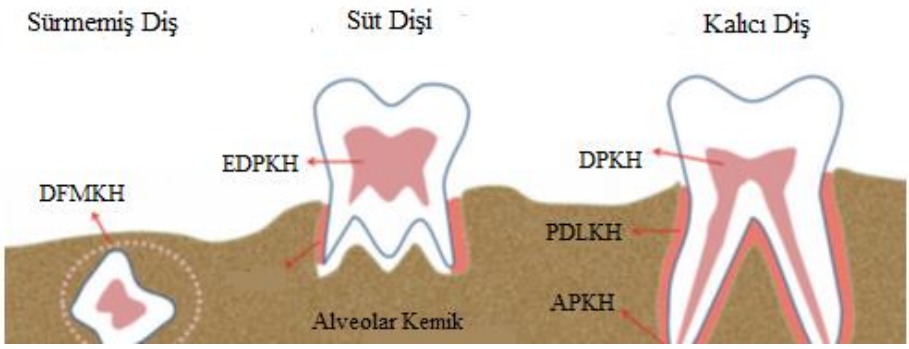
Çizelge 1.2. Oral dokulardan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin (MSCs) çeşit ve tanımlanma zamanları.

Oral Dokulardan İzole Edilen Mezenkimal Kök Hücre Tipleri	Yıl
Diş Pulpası Kök Hücresi (DPKH)	Gronthos ve ark, 2000
Eksfoliasyon Zamanı Gelmiş Süt Dişi Kök Hücresi (EDPKH)	Miura ve ark, 2003
Peridontal Ligament Kök Hücreleri (PDLKH)	Seo ve ark, 2004
Apikal Papilla Kök Hücreleri (APKH)	Sonoyama ve ark, 2006
Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (DFMKH)	Morsczeck ve ark, 2005

Dental kök hücreler dişin farklı alanlarından izole edilebilen multipotent karakter taşıyan, uygun ortam sağlandığı zaman farklı hücre türlerine dönüşebilen mezenkimal kök hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler farklı doku çeşitlerinde var olsa da organlar içerisinde erişebilirlik açısından en çok diş için uygundur. Son yıllarda rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinin gelişimi dental kök hücrelere olan ilginin artmasına neden olmuştur (Aydin ve ark., 2019; Kaneko ve ark., 2018).

Dental alanda yer alan kök hücrelerin erişiminin kolay olması, yüksek proliferasyon hızı osteoblast, sementoblastlar osteoblastlar ve odontoblastlara farklılaşabilme kapasitesiyle mezenkimal kaynaklı kök hücreler klinikte kullanım açısından önemli bir kaynak olmuştur. Diş rejenerasyonunda rol oynayan büyüme faktörlerinin ve sinyal molekülleri oldukça önemli olup, farklılaşmalarını, matris oluşumunu ve hücreler arasında etkileşimleri sağlayan doku iskelelerine ihtiyaç duyulmuştur. Dişte yer alan mezenkimal karakterdeki kök hücrelerin hastadan alınırken etik problemler yaratmaması, farklılaşma yetenekleri bu kök hücreleri önemli bir kaynak haline getirmiştir (Ding ve ark., 2011).

Dental kök hücrelerin immun sistemi düzenleyici, anti-inflamatuar etkisi vardır (Aydin ve ark., 2019). Dişte meydana gelen enfeksiyon durumlarında bağışıklık sisteminin uyarılması ve bu etkiye karşı yanıt oluşmasını sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda kök hücenin uygulandığı dokularda immünolojik olarak tolerans sağladığı bağışıklık sistemini ve T hücrelerinin artışını baskılamıştır. Dişte bulunan kök hücre kaynakları incelendiğinde EDPKH, DPKH, DFMKH ve APKH ve PDLKH yer almaktadır.



Şekil 1.5. Dişte yer alan kök hücre türlerinin (DPKH, EDPKH, PDLKH, DFMKH, APKH) sürmemiş diş, süt dişi ve kalıcı dişte gösterimi (Shuai ve ark., 2018).

1.5.1. Diş Pulpası Kök Hücresi (DPKH)

İnsan dişlerinden ilk olarak 2000 yılında mezenkimal kök hücreler olan dental pulpa kök hücrelerden izole eden Gronthos ve arkadaşlarıdır (Kaneko ve ark., 2018). İnsana diş pulpası kök hücreleri (İDPKH) nöral tüpten ağız boşluğuna göç eden ektodermal kaynaklı hücreler olup pek çok hücre türüne farklılaşabilmektedir (Aydin ve ark., 2019).

Dental pulpa hücreleri insan üçüncü azı dişlerinden izole edilmiştir ve yoğun olarak kalsifiye olan koloniler, nodüller oluşturma yeteneğine sahip fazla düzeyde klonojenite ve proliferasyona sahip hücreler olarak karakterize edilmiştir (Kaneko ve ark., 2018). Diş pulpası kök hücreleri in vitro ve in vivo olarak odontoblastlara, osteoblastlara, kondrositlere, miyositlere, adipositlere ve nörositlere farklılaşma potansiyeline sahip kök hücrelerdir (Hu ve ark., 2018).

İnsan diş pulpası kök hücreleri (İDPSCs) periodontal doku bakım ve onarım yapabilir, yüksek proliferasyon ve çoklu dizi farklılaşması ile karakterize edilir. İlk olarak dental pulpaya ait kök hücre Gronthos ve arkadaşları tarafından diş pulpasından elde edilmiştir. Dental pulpa kök hücreleri incelendiğinde yine mezenkimal kök hücre karakteri gösteren kemik iliğinden daha çok proliferasyon hızına sahiptir. Yapılan araştırmalar sonucunda çekilmiş ya da sürmekte olan dişlerden temin edilen pulpaya ait kök hücrelerin kemik iliği kök hücreleriyle kıyaslandığında daha kolay temin edilebilir olması ve daha az invaziv olduğu belirlenmiştir (Aydin ve ark., 2019; Feng ve ark., 2014). Yüksek proliferasyon hızının nedeni hücre döngüsünde aktivatör olan siklin-bağımlı kinaz-6 ekspresyonunun yüksek olmasından kaynaklanmaktadır.

Dental pulpa kök hücreleri uygun ortam sağlandığı takdirde osteoblastlara kondroblastlara, adipositlere, odontoblast ve adipositlere farklılaşabilmektedir (Aydin ve ark., 2019). Diş pulpası kök hücrelerine ortam koşulları sağlandığında mineralize doku oluşturma kapasitesi fazladır bu durum kemik onarımında kullanılabilecek kaynaklardan biri haline getirmiştir. Yetişkin insanlarda bulunan dental pulpa kök hücreleri mezenkimal kök hücre karakteri taşıyıp STRO-1, CD90, CD29, CD44, CD105 ve CD73 gibi yüzey belirteçlerini

eksprese edebilmekte ancak CD34, CD45 ve CD71 negatif yüzey belirteçlerini eksprese edemedikleri saptanmıştır (Shuai ve ark., 2018; Aydin ve ark., 2019; Kaneko ve ark., 2018).

Diş pulpası mezenkimal kök hücre belirteçlerini eksprese ettiği gibi nöral yüzey belirteçlerini (βIII-tubulin, S100, Nestin, Synaptophysin) eksprese etmektedir (Aydin ve Sahin, 2019). İnsan diş pulpası kök hücrelerinin yüzey proteinleri (CD261, CD40, CD264, CD262, CD266 ve CD120a) gibi tümör nekroz faktör reseptör süper ailesi proteinleri ve bazı integrinlerdir (alfa-4, alfa-6 ve alfa-10) ve IL reseptörleri olan (CD213a1, CD121a, CD217, CDw210b ve CD130) olarak belirtilmiştir. Yine diş pulpası kök hücrelerinde büyüme faktörü beta (TGF-β), interlökin-6 (IL-6) ve IL-10 gibi çeşitli çözünür faktörler ve sitokinleri salgılayabilmektedir (Aydin ve ark., 2019).

Ayrıca diş pulpası kök hücrelerinin endotel (vasküler hücre adezyon molekülü), düz kas (düz kas aktin), kemik (alkalin fosfataz, osteonektin, tip I kollajen, osteokalsin ve osteopontin) ve fibroblastlar (tip III kollajen ve fibroblast büyüme faktörü 2) gibi belirteçleri eksprese ettiği belirlenmiştir (Kaneko ve ark., 2018).

Diş Pulpası Kök Hücreleri (DPKH) Özellikleri

Diş pulpası kök hücrelerinin farklılaşmasında çok sayıda yolak bulunur, böylece DPKH'lerin rejeneratif kapasitelerini düzenlenir. DPKH'lerin ve EDPKH'lerin gen ekspresyon profilini analiz etmek için DNA mikrodizisi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, hücre proliferasyonu ve hücre dışı matris ile ilgili yolaklarada yer alan genlerin süt dişi kök hücrelerinde (EDPKH) diş pulpası kök hücrelerine göre (DPKH) daha yüksek oranda eksprese edildiğini ifade edilmiştir (Shuai ve ark., 2018).

Scheller ve arkadaşları , 2008' de yaptığı çalışmada kanonik Wnt sinyali diş pulpası kök hücrelerinin odontoblast farklılaşma kapasitesini inhibe ettiği saptanmıştır.

Feng ve arkadaşları ise, 2014 yılında, insülin benzeri hormon-1 (IGF-1), diş pulpası kök hücre proliferasyonunu ve mTOR yolağı osteojenik olarak farklılaşmayı artırabildiği sonucuna ulaşılmıştır (Feng ve ark., 2014).

2013'de gerçekleştirilen çalışmada Wanget ve arkadaşları, diş pulpası kök hücrelerinin osteojenik ve odontojenik farklılaşması, östrojen seviyesi, LPS uyarımı, NF-κB yolu aracılığıyla TNF-α uyarımı ile düzenlenebileceği belirlenmiştir. Östrojen eksikliği, sıçanları azalmış mineralizasyon, düşük ALP aktiviteleri, odontoblast, osteoblast belirteçlerinin (Osx/OSX, Dspp/DSP, Runx2/RUNX2, ALP ve Ocn/OCN) ekspresyonu azalmasına ve DPKH'lerin odonto/osteojenik kapasitesini aşağı regüle etmiştir. Çalışmada östrojen eksikliği olan hastalarda dental pulpa kompleksinin rejeneratif kapasitesinin, dental pulpa dokularında azalmış dentinojenik potensi nedeniyle etkilendiği belirtilmiştir (Y. Wang ve ark., 2013).

1.5.2. Süt Dişi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (EDPKH)

Eksfoliye olan süt dişi kaynaklı mezenkimal kök hücreler, pediatrik diş hekimliği alanında umut verici bir kaynak olmuştur (Tsai ve ark., 2017). Süt dişleri gelişimin erken dönemlerinde elde edilen kolay ulaşılabilir ve kaynaktan kolay elde edilebilen mezenkimal kök hücre çeşitidir. Her çocuk gelişim döneminde süt dişlerini kaybetmekte olup kaybedilen bu dişler kök hücre kaynağı olarak kullanılabilmekte ve uygun koşullar altında saklanması mümkündür.

Dişte yer almakta olan kök hücreler vücutta yer alan, diğer dokulardan temini sağlanan kök hücre hasadı ile karşılaştırıldığında ise dişteki kök hücreler daha hızlı çoğalıp replike olduğu saptanmıştır (Tsai ve ark., 2017).

Erişkin kök hücreler ile karşılaştığında ise süt dişi kök hücrelerinin kolay temin edilebiliyor olması, etik sorunların yaşanmaması, inzaviz olmamaları, zamanlamaya bağlılığın az olması ve ucuz olması gibi sebeplerden dolayı daha çok tercih edilen olan bir kaynak haline gelmiştir (Martinez Saez ve ark., 2016; Tsai ve ark., 2017). Eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişleri, insan süt dişi pulpasından izole edilmiş olup sinir, adipositler ve osteo- endüktif hücrelere farklılaşabildikleri belirtilmiştir (Kaneko ve ark., 2018; Vishwanath ve ark., 2013).

Yakın zamanda ortaya konmuş çalışmalarda, süt dişlerinden (EDPKH) alınan kök hücrelerinin, DPKH'lerden ayırt edici kimliklerinin olduğu üzerinde yoğunlaşılmıştır. Süt dişi kök hücrelerin daha yüksek oranda proliferatif oldukları ve dentin-pulpa benzeri kompleksler oluşturma yetenekleri sınırlı olduğu ifade edilmiştir (S. Lee ve ark., 2011).

Miura ve arkadaşları, 2003 yılında multipotent karaktere sahip bu kök hücreleri ilk izole eden kişilerdir (Hu ve ark., 2018). Süt dişi kök hücreleri iskelelere transplante edildiğinde pulpa doku benzeri yapıları meydana getirdiği aynı zamanda fonksiyonel odontoblastlara ve vasküler endotelyal hücrelere farkılaşmıştıkları ifade edilmiştir (Kaneko ve ark., 2018).

Mezenkimal kök hücre karakterindeki, multipotent farklılaşma yeteneğine sahip bu hücreler osteoblastlara, odontoblastlara, adipositler ve nöronlara farklılaşabildikleri ve rejenaratif tıp için kullanılabilecek bir kaynak olarak değerlendirilmiştir. (Aydin ve ark., 2019; Martinez Saez ve ark., 2016).

Çizelge 1.3. Eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişi kök hücrelerinin (EDPKH) farklılaşabildiği kök hücre türleri ve farklılaşma sonucu ekspresyonlarının gösterimi.

Eksfoliasyon Zamanı Gelmiş Süt Dişi Kök Hücreleri (EDPKH)	
Farklılaşma Kapasitesi	**Ekspresyonları**
Osteoblast	CBFA1, ALP, MEPE, bone sialoprotein, Osteocalcin ve osterix
Odontoblast	DSPP, DMP-1, MEPE
Kondrosit	SOX 9, Col 2 ve Col X
Adipositler	PPAR-γ2, Lipoprotein lipase
Nöral hücreler	Nestin, βIII tubulin, glutamic acid decarboxylase, NFM

Eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişlerinin, osteoblastlara farklılaşabilme özellikleri sonucu kemik, pulp, dentin ve orofasiyal kemik rejenerasyonunda kullanılabilmektedir (Aydin ve ark., 2019). Süt dişleri kök hücreleri (EDPKH) mezenkimal kök hücre karakteri taşıdığı için bazı yüzey belirteçlerini eksprese etmektedir bu belirteçler CD90, CD105, HLA I, CD73, CD44, CD117, CD29 ve CD166 olup ekpsrese edebilir ve pozitif yüzey markırı olarak kabul edilir. Ancak bu kök hücreler CD45, CD49d, CD49, CD18, CD31, CD133 CD184 ve CD146 gibi yüzey belirteçlerini eksprese edemez ve bu belirteçler, negatif hücre yüzey belirteci olarak adlandırılır (Martinez Saez ve ark., 2016). Bu belirteçlere ek olarakta, süt dişi kök hücrelerinin glial hücre ve nöral hücelerin belirteçlerinini eksprese ettiğide belirtilmiştir.

Çizelge 1.4. Eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişi kök hücreleri hücre belirteçleri yönünden pozitif ve negatif olarak belirtilmesi.

Eksfoliasyon Zamanı Gelmiş Süt Dişi Kök Hücreleri (EDPKH)	
Pozitif Ekspresyon Belirteçleri	**Negatif Ekspresyon Belirteçleri**
CD90	CD45
CD105	CD34
STRO-1	HLA-II/ HLA-DR
CD146	CD7
CD73	CD18
CD71	CD49e
CD44	CD63
CD29	CD133
SSEA4	CD197
CD117	CD106
CD166	CD31
CD10	CD184

Süt dişleri diğer kök hücrelerle karşılaştırıldığında benzerlikler olduğu gibi bazı farklılıklara da rastlanmıştır. Kalıcı dişlerdeki pulpa kök hücreleri ve kemik iliği kök hücreleriyle karşılaştırıldığında kök hücelerin morfolojik olarak benzer karakter taşıdığı ancak süt dişlerinin daha yüksek farklılaşma ve proliferasyon hızına sahip olduğu belirlenmiştir (Martinez Saez ve ark., 2016; Hu ve ark., 2018; Shuai ve ark., 2018; Asghari Sana ve ark., 2017). Ancak süt dişi kök hücrelerinin diş pulpası kök hücrelerindeki gibi kompleks yapıda pulpa-dentin meydana getirmediği belirlenmiştir (Miura ve ark., 2003).

Uzun vadeli çalışmalarda kullanmak üzere süt dişi kök hücrelerinin kriyoprezervasyon işlemi sonrası, hücrelerin canlılığının 2 yıl kadar etkili olduğu, diş pulpasındaki hücrelerin yüzey antijenlerini ifade etmeye devam edeceğine ve farklılaşma kapasitelerinide koruyacakları belirlenmiş dondurarak saklamanın etkili olduğu kanıtlanmıştır (Shuai ve ark., 2018; Ma ve ark., 2012).

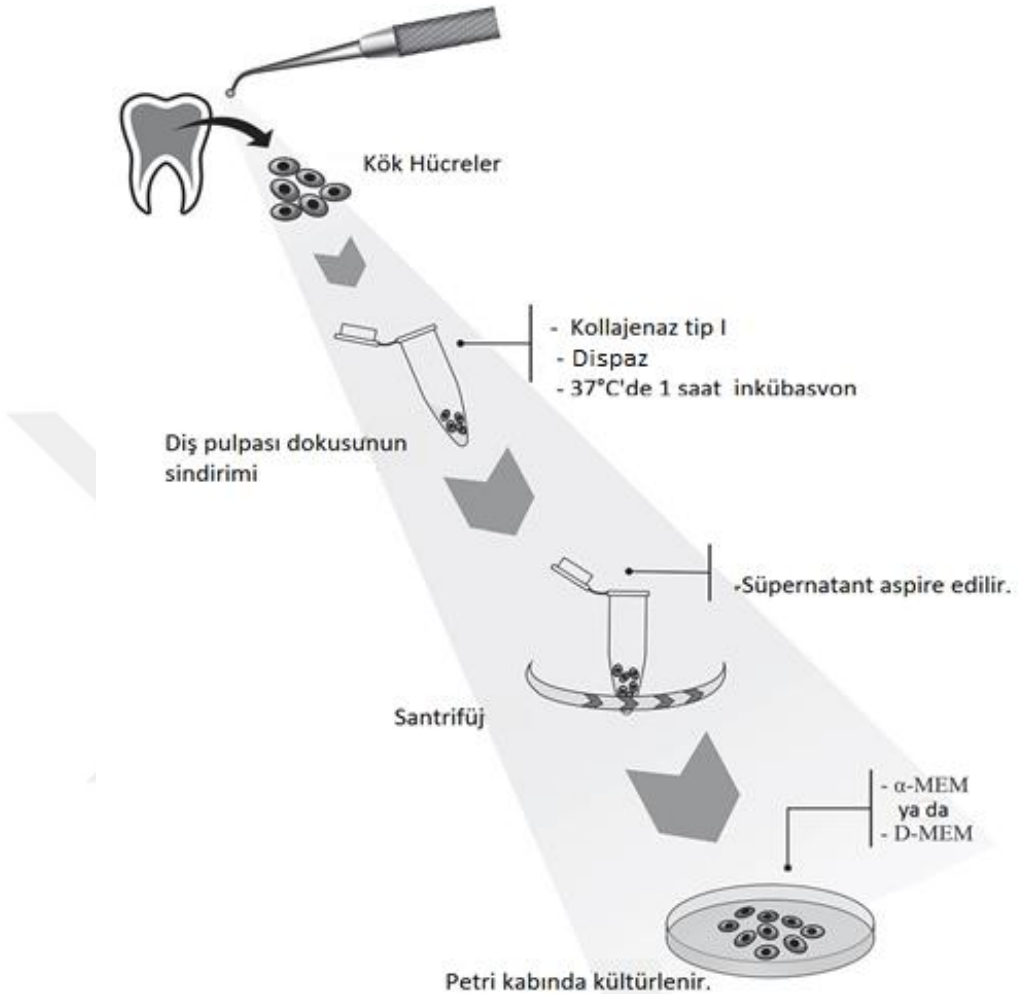
Eksfoliasyon Zamanı Gelmiş Süt Dişlerinden Kök Hücre (EDPKH) Temin Edilmesi, İzolasyonu ve Kültür Yöntemleri

Eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişi kök hücreleri (EDPKH) 7-9 yaş arası çocuklardan cerrahi işlemlerle standart koşullar altında dezenfeksiyon solüsyonu uygulandıktan sonra lokal anestezi altında elde edilmesi sağlanmaktadır. Ekskavatör yardımıyla diş pulpası, pulpa boşluğundan temin edilmesi sağlanır. Pulpa dokusu elde edildikten sonra pulpa dokusunun enzimatik sindirimi için kollajenaz tip I (3 mg/ml) ve dispaz (4 mg/ml) eklemesi yapılıp 37°C'de 1 saat inkübe edilmesi sağlanmaktadır. İnkübasyonu sağlanan süt dişi kök hücresinin santrifüjlenmesi gerçekleştirilir ve süpernatantın aspire edilmesi sağlanmaktır. Tek hücreli, hücre süspansiyonu bazal medyaya yerleşmesi sağlanıp petri kabına ekimi gerçekleştirilip kültürasyon işlemine tâbi tutulur.

Kültür ortamının, kök hücrelerin kültürlenmesi için önemli olduğu fibroblast büyüme faktörü (FGF) ilaveli kültür ortamının EDPKH'lerin koloni oluşturması ve kendi kendini yenileyebilmeleri için görev aldığı belirtilmiştir. Bazal kültür medyasına, eklenen sığır fetal serum (FBS) miktar ve kalitesi, büyüme faktörleri ve diğer faktörler kök hücrelerin farklı hücre tipine dönüşümünü indükleyebilmektedir. Literatürde süt dişi kök hücreleri (EDPKH) için yaygın olarak kullanılan iki farklı kültür ortam bulunmaktadır.

1) α-MEM içerikli kültür ortamı: α-MEM ile desteklemiş bu kültür ortamında %20 FBS (Fetal Sığır Serumu), 100 μmol/l L -Askorbik asit 2-fosfat, 2 mmol/l L –glutamin100 U/ml penisilin ve 100 μg/ml antibiyotik 37˚C 5% CO_2 hazırlanmaktadır (Ma ve ark., 2012).

2) DMEM içerikli kültür ortamı: DMEM (Dulbecco's Modifiye Edilmiş Eagle's Medyası) %10-20 (Fetal Sığır Serumu), 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml antibiyotik ve 0.25 µg/ml amfoterisin B 37˚C 5% CO_2 hazırlanmaktadır (Kerkis ve ark., 2012).



Şekil 1.6. Eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişi kök hücreleri (EDPKH) elde edilmesi ve DMEM ya da α-MEM medyalarıyla kültürlemesi (Martinez Saez ve ark., 2016).

1.5.3. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (DF-MKH)

Diş folikülü kaynaklı kök hücreler ilk olarak Morsczeck ve arkadaşları tarafından 2005 yılında ekto-mezenkimal kaynaklı bir bağ dokusu olan diş foliküllerinden izole edildi. Diş folikülü, diş germini çevrelemekte olan mine ve dental papillayı sarmakta olan mezenkimal karakterdeki dokudur. Diş folikülüne ait kök hücreler alveolar kemik, sement, periodontal ligament hücrelerini meydana getirir. Dental folikül kaynaklı kök hücrelerin kaynaktan kolay şekilde temin edilebilir, bu hücreler gelişimin ileri evresinde gelişen gömülü olan yirmilik diş çekimi sırasında diş foliküllerinden kolayca eldesi mümkün olabilmektedir (Hu ve ark., 2018). Bu kök hücreler mezenkimal kök hücre karakteri taşıdığından morfolojik olarak fibroblast benzeri yapılarda, mezenkimal kök hücre yüzey belirteçlerini eksprese edebilen ve bulundukları plastik yüzeye yapışan kök hücrelerdir. CD90, CD105, CD73, CD44, CD146 ve HLA I kök

hücre yüzey belirteçlerini eksprese eder ancak CD45 belirtecini eksprese edemezler. Kemik iliği gibi mezenkimal karakterdeki diğer kök hücre türleriyle karşılaştırıldığında diş folikül kök hücrelerinin kolay temin edilebiliyor olması, proliferasyon hızının yüksek olması, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilmeleri önemli kaynaklardan biri haline getirmiştir. Diş folikül kaynaklı kök hücreler adipojenik osteoblastik ve nörojenik soylar gibi pek çok hücre soyuna farklılaşma kapasitesine sahiptir ve in vivo olarak gerçekleşen çalışmalarda, kemik dokularının ve sement dokularının oluşturabildikleri belirtilmiştir (Hu ve ark., 2018). Cerrahi prosedürler ile kolayca temin edilebilmeleri, hücre tedavisinde rejeneratif amaçlar için önemli bir alternatif MKH kaynağı olmalarını sağlamaktadır.

1.5.4. Apikal Papilla Kök Hücreleri (APKH)

Apikal papilla kök hücreleri, 2006 yılında Sonoyama ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Ağız boşluğuna dâhil olan diğer iki hücre tipi, periodontal bağ kök hücreleri (PDLKH) ve apikal papilla kök hücreleridir. Apikal papilla kök hücreleri, kökleri ve alveolar kemiği birbirine bağlayarak diş yapısını fiziksel olarak koruyan özel bir yumuşak bağ dokusudur (Aydin ve ark., 2019). Apikal papillada yer alan kök hücreler dişlerin dental papilinden elde edilip keser ve gömülü dişlerin erken gelişim döneminde temin edilmektedir. Dental apikal papilladan (APKH) elde edilen kök hücreler, gelişmekte olan diş kökü apeksinin apikal papillalarında göç edebilen, yüksek proliferasyon hızına sahip, rejeneratif potansiyeli yüksek kök hücreler olup in vivo olarak dentin oluşumu sağladıkları saptanmıştır (Hu ve ark., 2018).

Apikal papillada yer olan bu kök hücrelerin dentin meydana getirme kapasitesi diş pulpası kök hücrelerine göre daha fazladır. Ancak apikal papilla kök hücresinin gömülü olan dişlerin erken evresinde elde edilebilir olması ve diş çekimindeki zorluk nedeni dezavantaja sebebiyet vermektedir. Papilla kök hücreleri, olgun pulpa hücresinden daha fazla kök hücre içeriğine sahiptir ayrıca papilla kök hücreleri ve periodontal ligament kök hücreleri bir arada kullanılarak bağ doku oluşumunu sağlayabildikleri belirlenmiştir (Jo ve ark., 2007).

Yüksek proliferasyon oranının mevcut olduğu, osteojenik odontojenik farklılaşmaya yatkın olan bir soy olarak hücre yüzeyinde CD24 ekspresyonu gösterir. APKH'lar fizyolojik olarak nöral belirteçleri (nestin, βIII-tubulin ve GFAP) eksprese eder. Bununla birlikte, yapılan bazı çalışmalarda da APKH'lerinin adipojenik ve nörojenik farklılaşma kapasitesini olduğu ifade edilmiştir (Aydin ve ark., 2019).

Apikal papilla kök hücreleri üzerine yapılmış olan çalışmada, bağışıklığı baskılanmış fareye dokuya sentetik olan bir iskeleye ekilmesi sağlanmış ve nakli gerçekleştirilmiştir. APKH nakli sonrası farelerde vaskülarize pulpa benzeri doku rejenerasyonu ve dentin benzeri mineral yapıların oluşumunu gözlemlenmiştir (Aydin ve ark., 2019).

1.5.5. Periodontal Ligament Kök Hücreleri (PDLKH)

Periodontal ligament kök hücre (PDLKH), dental dokuda yer alan kök hücreler olup kendi kendini yenileme kapasitesine sahip olan ve osteoblastlara, adipositlere ve kondrositlere farklılaşma yeteneğine sahip olan küçük bir mezenkimal kök hücre popülasyonu olarak tanımlanmaktadır. Nöral krestten türetilen PDLKH'ler, immünosupresif özellikler sergilediği ifade edilmiştir. İn vivo transplantasyondan sonra hücre tedavisi ve nörogenezde MKH özelliklerini koruyabildikleri belirtilmiştir (Aydin ve ark., 2019).

Çekilmiş ortodontik dişlerden veya normal gömülü üçüncü molar dişlerden elde edilebilen periodontal ligament hücreleri enzimatik sindirim ya da eksplant kültür ile izole edilebilmektedir (Shuai ve ark., 2018).

Periodontal ligament kök hücrelerinin karakterize etmek için kullanılan yüzey belirteçlerin kemik iliğine ait olan kök hücreler ve diş pulpası kök hücrelerine benzer olduğu belirtilmiştir. CD90, CD105, CD13, CD29, CD44, CD49d, CD73, pozitif yüzey belirteçleriyken CD45, CD19, CD34 negatif yüzey belirteçleri olarak belirlenmiştir (Trubiani ve ark., 2005).

Periodontal ligament kök hücreleri (PDLKH) olarak uygun kültür koşulları altında in vitro olarak osteojenik ve adipojenik hücrelere farklılaşabilir ve in vivo olarak periodonsiyumun rejenerasyonunu sağlayabilmektedir (Hu ve ark., 2018).

Süt dişlerinden elde edilen peridontal ligament kök hücreler (PDLKH) kalıcı dişlerden elde edilen peridontal ligament kök hücrelerine (PDLKH) kıyasla daha yüksek kendini yenileme yeteneği osteojenik farklılaşmanın göstermiştir (Ji ve ark., 2013).

Peridontal ligament kök hücreleri alkalin fosfataz (ALP), osteokalsin (OCN), matriks ekstraselüler fosfoglikoprotein (MEPE) ve kemik sialoproteini (BSP) gibi osteojenik indükleyicileri eksprese etmesine rağmen yeni oluşan mineralize nodüller, kemik iliği ve diş pulpası kök hücreleriyle karşılaştırıldığında hücre dışı matriste daha düşük bir kalsiyum içeriğine sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Seo ve ark., 2004).

1.6. Üreme Sistemi ile İlişkili Genler

Üreme sistemi üzerinde çeşitli genlerin etkili olduğu, bu genlerin puberte ile ilişkili olduğu bu genlerde gelişimde meydana gelen mutasyonlarında hipogonadizme neden olduğu sonucuna varılmıştır. Üreme sistemiyle ilişkilendirilen bu genler hipotalamus- hipofiz- gonad aksınını etkileyerek (HHG aksı), üreme sistemindeki işleyişi kontrol etmek ve sürdürülebilirliği için de son derece önemlidir. Üreme sistemiyle ilgili olan bu genler; GnRH salınımıyla doğrudan ilgili olan G protein bağlı reseptör 54 olarak bilinen KISS1R ve KISS1 geni tarafından kodlanan ligandı KISS1 geni ve KISS1-KISS1R (GPR54) sistemine etki eden TAC3 ve TAC3R genleri belirlenmiştir.

1.6.1. Kisspeptinler

Kisspeptinler, Kiss1 geni tarafından transkribe edilen, öncül proteinlerden türevlenen, uzunlukları farklı peptidler olarak tanımlanmaktadır (Kafa ve ark., 2011). Kiss1 geni (1q32) tarafından kodlanan, 145 aminoasitli fenil alenin amid yapıda peptit yapıdaki hormonlar olup çeşitli uzunluklardaki parçalara proteolize edilebilmektedir (Tng, 2015).

Metastin ya da Kisspeptin-54 olarak bilinen, 54 aminoasit içeren ana parça olup kisspeptin-10, kisspeptin-13 ve kisspeptin-14'ü gibi daha kısa peptitlere parçalanabilir. Peptit parçalarının (kisspeptin 10, 13, 14 ve 54) enerji metabolizması ve üreme sistemiyle ilişkilidir.

Kisspeptin kavramı ilk olarak Lee ve ark. (1995) yılında meme ve melanom kanseri üzerine yaptıkları çalışmalarda karşımıza çıkmaktadır. Çalışmada kisspeptin hormonu ve GPR54 (KISSR) metastazı baskılayıcı özelliğe sahip olduğu belirlenmiş ve bu özelliğinden dolayı gen ‘’metastin’’ olarak tanımlanmıştır (J. H. Lee ve ark., 1996).

Ayrıca çalışmada kisspeptinlerin gonadotropin hormonların salgılanmasın da pubertenin başlaması, ergenlikte cinsel olgunluğa ulaşılmasında gibi rollerin yanı sıra kanserlerde metastaz üzerinde plasental fizyolojide de etkine yönelikte çalışmalar mevcut olduğu belirtilmiştir (J. H. Lee ve ark., 1996; Barroso ve ark., 2019).

1996 yılına gelindiğinde ise, Pensilvanya’daki yer alan Hershey ünlü çikolatasından ilham alarak ön eki olan ‘’Ki’’ ve tümör baskılayıcı bir gen olmasından dolayı baskılayıcı gen dizisini temsilen ‘’SS’’ eki bir araya getirilerek bu gen ‘KISS’’ şeklinde adlandırılmıştır.Kisppetinlerin isimlendirilmesi de insan ve diğer türlerde farklılık göstermiş olup insana ait kisspeptin genleri ‘’KISS1’’ olarak gösterimi mevcutken diğer türlerde kullanımı “Kiss1” şeklinde gerçekleştirilmiştir (Gottsch ve ark., 2009).

2003 yılına gelindiğinde ise insan ve farelerle yapılan çalışmalar sonucunda KISS1R ortaya çıkan delesyon ya da mutasyonların kısırlığa neden olduğu ve pubertenin meydana gelmesini engellediği belirtilmiştir. GPR54 delesyona uğradığı homozigot mutant farelerin (GPR54 -,-) GnRH seviyelerinin az salınımından dolayı düşük olduğu ve pubertede yaşanan gelişiminin aksadığı ifade edilmiştir.

Kisppetin-GPR54 sisteminin GnRH aktifleşmesini sağlayarak GnRH bağımlı LH ve FSH salınımını sağladıkları pubertede ne kadar önemli olduğu sonucu doğrulamıştır. Delesyonun meydana geldiği dişi farelerde ovaryumda yer alan foliküller gelişimini tamamlayamamış, erkek farelerde ise testis gelişimi sağlanamamıştır. Bu durum pubertal gelişimi için kisspeptinlerin anahtar bir rol üstlendikleri sonucunu desteklemiştir (Clarkson ve ark., 2010).

İşlevini yerine getiremeyen fonksiyonu bozulmuş kisspeptinlerin puberteyi olumsuz etkisi, dışardan kisspeptin ilavesi uygulanarak gerek fare gerekse sıçan koyun ve insan gibi canlı türlerinin hem dişi hem erkek bireylerine verildiğinde gonadotropin seviyelerini arttırığı belirtilmiştir (Kafa ve ark., 2011).

Kisspeptinler ve reseptörleri, hipotalamusun anteroventral periventriküler ve arkuat çekirdeklerindeki nöronlar tarafından ifade edildiği belirlenmiştir (Tng, 2015). KISS1R reseptörü ise GPR54 reseptörü olarakta bilinip G proteini bağlantılı reseptörler ailesinde yer almaktadır. Araştırmalarda KISS1R reseptörünün hipotalamus, hipofiz, gonad , spinal kortta, karaciğer, pankreas ve plasentada fazla miktarda eksprese edildiği üzerinde durulmuştur (Tng, 2015; Yardımcı ve Keleştimur, 2019; Kafa ve ark., 2011).Ayrıca, G-protein reseptörler içerisinde yer alıp hücre çoğalması, büyümesi ve göçü gibi farklı fonksiyonları bulunduran sinyal yolaklarında aktive olmasını sağladığıda belirtilmiştir.

Merkezi sinir sistemi alanlarında bulunan GPR54 reseptörünü kodlayan genin keşfi ilk olarak Lee ve ark. (1999) yılında sıçan beyninde yaptıkları araştırmalarda keşfetmiş olup bu reseptörü insanda "AXOR12" ,"hOT7T175", ''KISS1R'' gibi çeşitli isimlerle adlandırılırken sıçanlarda ise ""Kiss1r'' ya da GPR54" olarak adlandırılmaktadır (Kotani ve ark., 2001).

2001 yılına gelindiğinde ise reseptörün metastazı baskılayıcı etkisinin mevcut olduğu belirlenmiş mensup olduğu öksüz "orphan" reseptör sınıfından çıkartılıp Kisspeptin-54 olarak isimlendirilmiştir (Kotani ve ark., 2001).

Puberte Zamanı Kisspeptinlerin Ana Rolleri

Kisspeptinler hipotalamo-hipofizer-gonadal eksen düzenlemesinde görev alarak puberte ile ilişkilendirilmiştir (Barroso ve ark., 2019). Kisspeptinlerin keşfiyle özellikle üreme sistemindeki düzenleyici olması, puberte ile ilişkilendirilmesi ve GnRH salınımı gibi pek çok metabolik olayda görev aldığı belirlenip araştırılmaya devam edilmiştir. Kiss1 ve GPR54 (KISS1R) ergenlik yaşının belirlenmesinde etkili olduğu üzerinde durulmuştur. Özellikle GPR54 ve Kiss1 ekspresyonundaki değişiklikler bu süreçle ilişkili olduğu Navarro ve arkadaşları, sıçanlar üzerinde yapmış olduğu seksüel gelişimide Kiss1 ve GPR54 mRNA düzeylerinde artışın gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir (Navarro ve ark., 2004).

Yakın zamanlarda yapılan fare ve insan genetiği araştırmalarda, kisspeptin ve reseptörü GPR54'ün, normal GnRH salgılanması ve dolayısıyla gonadotrop işlevi için gerekli olduğu belirtilmiştir (Topaloglu ve ark., 2009).

2003 yılında yapılan çalışmada kisspeptinleri kodlayan KISS1 gendeki inaktivasyona bağlı mutasyonlar ya da delesyonlar fare ve insanlarda pubertal olgunlaşmaya engel olup hipogonadotropik hipogonadizme sebebiyet verdiği belirlenmiştir (Barroso ve ark., 2019).

Memelilerde yapılan çalışmalarda Kiss1 nöronlarının pubertal olgunluşamaya ulaşıncaya kadar Kiss1 mRNA ekspresyonunda ve hipotalamustaki kisspeptin içeriğinde önemli artış meydana geldiği belirtilmiştir. Kisspeptinlerin uyarıcı etkilerine karşı duyarlılık GnRH ve dolayısıyla LH salgılanması ergenlik döneminde arttığı ifade edilmiştir.

Kisspeptinlerin akut veya kronik olarak verilmesi olgunlaşmamış hayvanlara verilmesi, yalnızca GnRH'ye bağlı bir şekilde gonadotropin salınımını uyarmakla kalmamış, aynı zamanda dişi sıçanlarda ergenlik başlangıcında farklı fenotipik belirteçlerini indükleme yeteneğine de sahip olduğu belirtilmiştir (Barroso ve ark., 2019).

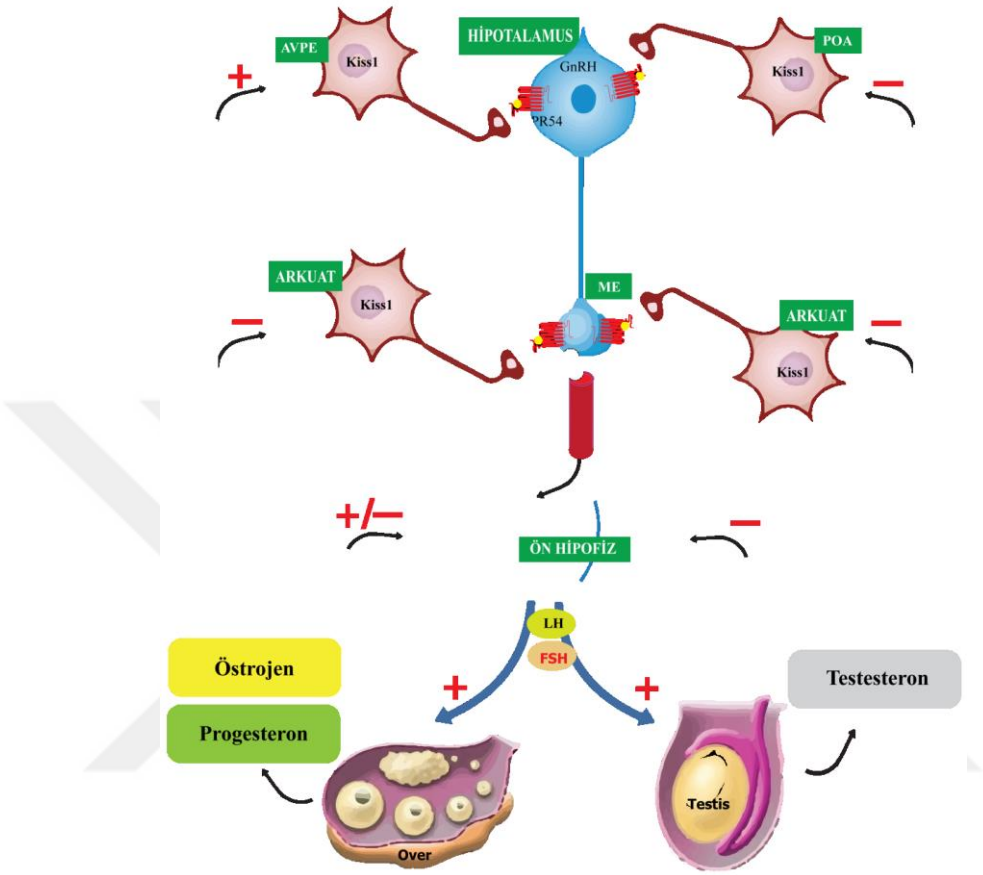
Kisspeptin reseptörlerinin blokajı veya jüvenil dönemde Kiss1 nöronlarının bozukluğu dişi kemirgenlerde puberte başlangıcını geciktirirken, kisspeptin antagonistleri prepubertal dönemde dişi maymunlarda GnRH salgısını baskıladığı üzerinde durulmuştur. Bu bulgular, Kiss1'in genetik inaktivasyonunun gerek insan gerekse kemirgenlerde ergenliğin başlamasını engel olduğu sonucunu ortaya koymuştur.

Kisspeptinlerin Etki Mekanizması

Kisspeptin kontrolünün nöroanatomik temeli puberte için araştırılıp, memeli türleri ve kemirgenlerde Kiss1 nöronal popülasyonunun hipotalamusta tanımlanmıştır. Kiss1 nöronları, her iki cinsiyette de seks steroidlerinin negatif geri beslemesine aracılık etmekte ve gonadotropinlerin pulsatil sekresyonunun kontrolünde görev almaktadır (Barroso ve ark., 2019). Bu özellikleriyle kisspeptinlerin üreme sağlığı, puberte gibi canlı gelişimini etkileyen dönemlerde görev aldıkları belirlenmiştir. Mekanizmaları incelendiğinde puberte gerçekleşirken hipotalamo-hipofizer-gonadal aksı (HHG aksı), üreme fonksiyonun edinilmesi ve üreme sistemin sürdürülebilirliğine aracı eden sistem olarak görev aldığı ifade edilmiştir. Kisspeptinler, hipotalamik salınımı sağladıkları bu durumun gonadotropin hormon aktivitelerini arttırmasına neden olup puberte başlangıcı için tetikleyici bir rolü olduğu belirlenmiştir (Jayasena ve ark., 2009).

Kiss1 geni ilk olarak 145 aminoasit içeren peptidi kisspeptin- 54 eksprese etmektedir. Bu peptitte yer alan baştaki 19 aminoasitlik dizi sinyal diziyi oluştururken prrotein 57. ve 67. konumda kesim noktası içermektedir. 121 ve 124. aminoasitlerin kesim noktasından ayrılmasıyla yeni proteinler oluşumu gerçekleşir. Oluşan kisspeptinler farklı büyüklüklerde olmasına rağmen hepsinin C terminal uçlarında Arg- Phe-NH2 (RF- amidler C terminalinde bulunan arginin- fenilalanin içeren nöropeptidler) dizilerini bulundurur. 54, 10, 13 ve 14 aminoasit uzunluğundaki protein dizilerin bu ucun amidlenmesiyle GPR54 reseptörüne bağlanması sağlanmaktadır. Reseptörler KISS1R ya da GPR54 olarak bilinip, G protein alt birimine bağlı (GPCR) reseptörler olarak tanımlanmaktadır (Tng, 2015).

Kisspeptinler ve GPR54 olarak bilinen reseptörleri arasında fonksiyonel ilişki olduğu belirlenip kisspeptin- GPR54 sistemi olarak adlandırılmıştır. Bir araya gelen bu kompleksin puberte ve üreme sistemi için önemli oldukları üzerinde durulmuştur (Durmaz A., 2007).



Şekil 1.7. Kisspeptinlerin etki mekanizmasının gösterilmesi (Pinilla ve ark. 2012).

Kisspeptinler reseptöre bağlanmaları sağlandıktan sonra fosfolipaz-C aktivasyonu, fosfatidil inositol bisfosfatın hidrolizi ve diasilgliserol (DAG) oluşumunu sağlamaktadır. Ardından diasilgliserol (DAG) protein kinaz C'yi aktive etmesinin ardından MAPK olarak bilinen mitojenle aktive olan protein kinazların fosforilasyonu gerçekleşmekte ve bu durum inositol-1, 4,5-trifosfat aktive edilmesini sağlamaktadır.

Hücre içinde kalsiyum salınması ve miktarında gerçekleşen artış hücre sinyalleşmesi için önemli olmaktadır. Meydana gelen bu artış ekstrasellüler sinyali düzenlemesinde görev alan kinaz (ERK) ile p38 mitojen ile aktive edilen protein kinaz olarak tanımlanan p38 MAPK sinyal yolaklarının aktivasyonu ile gerçekleşmektedir (Kafa ve ark., 2011).

Kisspeptin nöronları, gonadotropin salgılayan hormon (GnRH) eksprese eden nöronlarla sinapslar oluşturur. GnRH'lar hipotalamusda yer alan nöron gruplarından salınan bir hormon olup aktive olan KISS1R ile GnRH salınımınında oldukça önemli bir yer kaplamaktadır (Barroso ve ark., 2019). Sinapslaşma sonrası kisspeptin- GnRH etkileşimi hipotalomik-

hipofizer- gonadal aksın kontrolüyle pubertede için oldukça önemli rol üstlenmektedir. Kisspeptin nöronlarının depolarizasyonu, GnRH nöronlarının depolarizasyonuna neden olmakta folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinize edici hormon (LH) salınımının oluşmasını sağlamaktadır (Tng, 2015).

GnRH'ların, gonadotropların işleyişini hipotalamus-hipofiz-gonadal aksı boyunca düzenlemekle görevili olduğu belirtilmiştir. Hipotalamusun görevine bakıldığında medyan eminens olarak adlandırılan bölüm ile hipofiz arasında bağlantıyı sağladığı gonadotropin salınımının hipofizde kontrollü şekilde gerçekleştirmesine neden olduğu belirtilmiştir. GnRH nöronları puberte oluşumunda önemli görevler alırken beyinde bulunduğu lokalizasyonlar farklılık gösterdiği ifade edilmiştir. GnRH nöronlarının bulundukları alanlar incelendiğinde arkuat nükleus (ARC), hipotalamusun mediobazal alanında ve daha kaudal olarak retrokiazmatik alanda bulunurken, median eminens ve organum vaskulozum lamina terminalis (OVLT) alanlarında yoğunlaştığı gözlemlenmiştir (Yardımcı ve ark., 2019). Salınım öncesi GnRH median emines depolanıp ardından nöronal uçlardan hipotalamus- hipofiz portal sistemi kullanılarak salınmaktadır.

Gonodotripin sağlatıcı hormonlar (GnRH), GnRH nöronuna ait akson uçundan hipofizer portal dolaşımına salınınarak FSH ve LH salınımını ön hipofizde gerçekleştirir, kontrolünü sağlamaktadır (Yardımcı ve ark., 2019). Salınması sağlanan GnRH dişilerde yumurtalıkları erkeklerde ise testisleri uyararak üreme sistemine etki etmektedir (Barroso ve ark., 2019). GnRH salınımı gerçekleşmez ise gonadlar işlev kazanamaz ve üreme sistemi aktiflemesi gerçekleşmemektedir.

Lüteinleştirici hormon salınımı öncesi GnRH nöronlarından oluşan eş zamanlı etkilemekte olup bu ‘’GnRH Puls Jeneratoru’’ olarak adlandırılmıştır. Puls jeneratörü kavramı 1980'lerde Knobil'in öncü çalışmasıyla ortaya çıkmış olup, salınım ağında yer alan elementler ve sinyaller hakkındaki çalışmalar hala devam etmektedir (Barroso ve ark., 2019). Kiss1 nöronları GnRH pulsatilitesini ana rol oynayıp dolayısıyla ergenlik temposunu etkilemektedir. Beyinde farklı bölgelere dağılmış olan GnRH nöronlarının noronların koordineli olarak işlevleşmesine ve puls jeneratörü olarak çalışmasına olanak verdiği tahmin edilmektedir

Kiss1 nöronlarının kemirgenlerde temel popülasyonu anteroventral periventriküler çekirdekte (AVPV) ve komşu rostral alanlarda, primat ve koyun gibi kemirgen olmayan türlerde preoptik alanda (POA) bulmaktadır.

Anterovental periventriküler çekirdek (AVPV) Kiss1 nöronal popülasyonu kemirgenlerde, gonadotropinlerin preovulatuar artışını sağlayan östrojenlerin pozitif geri besleme kontrolünden sorumlu olduğu dişi bireylerde özel olarak geliştiriği ifade edilmiştir (Yardımcı ve ark., 2019; Barroso ve ark., 2019). Ancak anteroventral periventriküler çekirdekte ise östrojenin pozitif geri beslemede rol aldığı belirtilmiştir (Tng, 2015).

Kisppetin nöronları arkuat çekirdekte gonadal steroidlerin negatif kontrolüne maruz kalmaktadır. Yine arkuat bölgesinde yer alan kiss1 nöronlarının üretimini ifade seviyesini östrojenin baskılamasına sebebiyet vermektedir. Kisspeptin1 nöronları östrojen reseptörü sahip olmayan GnRH nöronları ve gonadlar arasında bağlantı sağlamaktadır. Arkuatta yer alan Kiss1 nöronlarının, mediyan emmiensiste (ME) yer alan GnRH nöronlarının aksonlarıyla sinapsis sağladığı ve böylece GnRH salınımasını steroid bağımlı olarak düzenlediği üzerinde durulmaktadır.

AVPV bölgesinde yer alan Kisspeptin1 nöronları ise ovulasyondan önceki süreçte östrojen seviyesinin artmasıyla kisspeptin mRNA düzeyinide arttırdığı bu durumunda östrojenin GnRH nöronları üzerine pozitif besleme etkisinin olduğu ifade edilmiştir. Testosteron ise erkeklerde GnRH salınımını kontrol eden hormon olup hem hipotalamus hemde hipofiz üzerinde negatif geri beslemeye neden olduğu ifade edilmiştir.

1.6.2. Taşikininler

Taşikiniler periferal doku ve merkezi sinir siteminde yer alan, nöromodülatör ve nörotransmitter etkileri olan, her çeşit taşikinin reseptörünü aktive edebilen peptit ailesi olarak bilinmektedir (Severini ve ark., 2002).

Von Euler ve Gaddum yaptıkları araştırmalarda 1931 yılında, ilk olarak SP olarak bilinen taşikinin memelilerde belirlenmiştir (Severini ve ark., 2002). Euler ve Gaddum, alkollü ekstrelerde bulunan tanımlanamayan bir madde, at beyni ve tavşan bağırsağın da gözlemlenen jejunumda uyarıcı etki sebep veren ve bu taşikininlere ‘’madde P’’ olarak adlandırmıştır (Almeida ve ark., 2004). At beyni ve tavşan bağırsağından yapılan çalışmalardan, 40 yıl sonra ise Chang ve Leeman tarafından (1970) P maddesi (SP) sığır hipotalamusundan saf halde izole etmişlerdir (Severini ve ark., 2002).

Kimura ve arkadaşları (1983) yaptıkları araştırmada ise peptit üyelerinden olan NKA ve NKB tanımlayıp, hem merkezi hem de periferik sinir sistemlerinde dağılımlarının olduğu belirtilmiştir (Severini ve ark., 2002). Nöropeptit ailesine mensup olan taşikinlerin C terminalindeki Phe-X-Gly-Leu-Met- NH2 dizisiyle özleştirilir. Hatta C terminalde yer alan bu dizi taşikinin ile ilişkili peptidler olarak adlandırılmaktadır (Almeida ve ark., 2004). Yapılan araştırmalar sonucunda memelilere ait altı çeşit taşikinin saptanmıştır bunlar nörokinin A (NKA), nörokinin B (NKB), substans P (SP), hemokinin 1 (HK1), nöropeptit gama ve nöropeptit K olarak ifade edilmiştir (Almeida ve ark., 2004). Taşikinin peptitlerinin ekspresyonları incelendiğinde memelilerde nöron dokularında ekspresyonlarının mevcut olduğu belirtilmiştir (Severini ve ark., 2002).

Çizelge 1.5. Genler tarafından kodlanan nörokinin çeşitlerinin türlere özgü gösterimi.

Gen	Peptit
Tac-1	Madde P (SP)
Tac-1	Nörokinin A
Tac-1	Nörokinin K
Tac-1	Nörokinin γ
Tac-3	Nörokinin B
Tac-4	Hemokinin-1(insan)
Tac-3	Hemokinin-1(sıçan, fare)

Madde P (SP), NKA ve NKB'nin aminoasit dizisi, incelendiğinde tüm memelilerde aynı olduğu belirlenirken, hemokinin-1 (HK-1) dizisinin fare, sıçan ve insan arasında değiştiği belirtilmektedir.

Madde P (SP) ve NKA, merkezi sinir sisteminde ve periferik dokularında bulunup periferik seviyede sinir uçlarından hemde omurilikten salınarak, uyarıcı nörotransmiterler olarak görev almaktadır. Madde P (SP) olarak bilinen taşikinin Tac-1 geni tarafından kodlanıp 11 aminoasit uzunluğunda nöropeptittir ve fare, sıçan ve insanda immün, endotel hücreleri ve nöral olmayan hücrelerin de eksprese edebileceği üzerinde durulmuştur (Almeida ve ark., 2004).

Nörokinin B'nin omurilik dorsal boynuzunda ve merkezi sistem sisteminde bulunduğunu belirlemiş ancak nörokinin B'ye ait mRNA ekspresyonları sıçan, fare ve insanda nöral olmayan uterus, plasenta gibi üremeye ait hücrelerde de saptanmıştır.(Almeida ve ark., 2004) İnsanda Tac3 geni tarafından kodlanan NKB'ya ait mRNA, omurilik, merkezi sinir sisteminde, plesenta, uterus varlığına rastlanmıştır.

Taşikininler, çeşitli genlerin kodlanmasıyla oluşup Tac1 geni tarafından NKA ve SP kodlanırken NKB 'nin insanda Tac3 geni tarafından kemirgenlerde ise Tac2 tarafından kodlandığı belirtilmiştir (Severini ve ark., 2002).

Endojen taşikininler tarafından seçici olarak taşikinin reseptörleri tanınır. Taşikininler, G proteini birleştirici hücre zarı reseptörleri ailesine ait olan spesifik zar proteinleri ile etkileşime girer. Tüm genomun yaklaşık %1'ini oluşturan ve hücre sinyalleşmesinde önemli bir rol oynayan büyük bir protein üst ailesi olan G proteinine bağlı reseptörlerin 1. familyasına mensuplardır (Almeida ve ark., 2004).

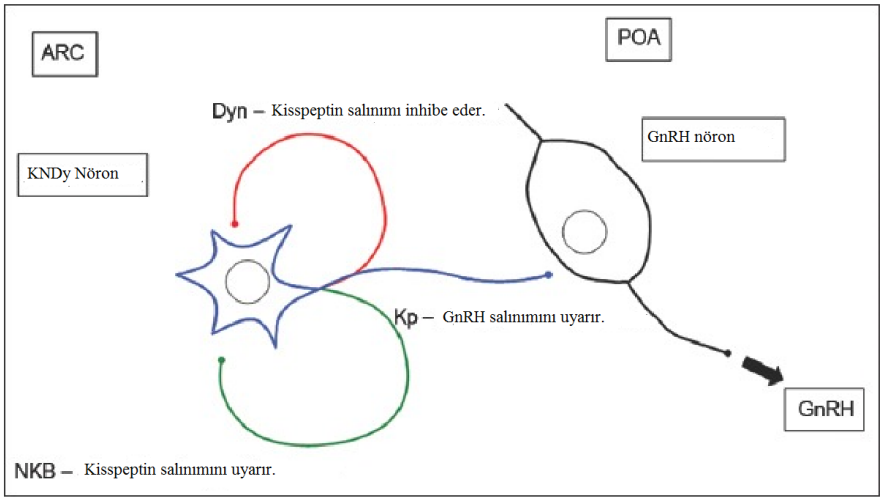
Taşikininlerin G proteinine bağlı reseptörleri, NK1R, NK2R ve NK3R belirlenmiştir ve tüm taşikininlerin NK1R, NK2R ve NK3R reseptörlerine bağlamabilmeleri mümkündür. Beyindeki dağılımları ele alındığın da NK1R ve NK3R nin yaygın olarak beyinde bulunurken NK2R'nin nispeten daha sınırlı alanda bulunduğu bildirilmiştir (Daoui ve ark., 2000).

Memelilere ait taşikinin reseptörlerinin dağılımı, tür içinde heterojen bir şekilde dağılmıştır. NK-1 reseptörünün dağılımına bakıldığında hem periferik seviyede hemde merkezi olarak nöronlarda eksprese edilirken yine kas, vasküler endotel hücrelerinde bulunabileceği ifade edilirken, NK-2 reseptörünün; özel beyin çekirdeğinde eksprese edildiği belirtilmiştir. NK-3 reseptörüne gelindiğinde temel olarak merkezi sinir sisteminde eksprese olduğu ve insan ve sıçan uterus ve plesantasında, insan iskelet kası, karaciğer ve akciğer gibi periferik dokularda saptanmıştır.

Kisspeptin Sinyali'nin Ko-transmitterleri

Ko-trasnmitterler, kisspeptinlerin sinyalinin de yer almakta olup bunlar; Nörokinin B (NKB) ve dinorfin (Dyn) olarak ifade edilmiştir. Bu kotransitmetterlerden biri olan nöronkinin B (NKB) bir taşikinin peptidi olup reseptörü NK3R' ye bağlanmaktadır. Nörokinin B'nin insanlarda karşılığı TAC3 olup reseptörüde TACR3 olarak adlandırılmaktadır (Tng, 2015).
Dinorfin ise; endojen bir opioid peptit olup kappa opioid reseptörüne bağlanmaktadır. Dinorfinler (Dyn) hipotalamusta, kisspeptin salınımını inhibe edici etkiye sahipken nörokinin B'nin salınımı uyarıcı etkiye sahip olduğu belirtilmişitir.

Bu kontransmiterlerin Kiss1 nöronlarında, NKB ve Dyn'in lokalizasyonun varlığının hayvan hipotalamusda içerildiğiyle ifade edilmişitir. Ve bu nöronlar, Kisspeptin/NKB/Dyn (KNDy) nöronları olarak isimlendirilir ve hayvan GnRH nöronlarında yansıtılmaktadır. Kisspeptinlerin GnRH salınımını kontrol etmede bu kontransmitler rol almaktadır. Ko-transmitlerden NKB, kisspeptin salınımında görev alıp üreme sistemi için oldukça önemli olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 1.8. Kisspeptin (Kp) sinyalinin kotransmitterlerinden Dynorphin (Dyn), inhibe ederek nörokinin B (NKB) uyararak Kp/NKB/Dyn (KNDy) nöronları tarafından Kp salınımını sağlamasının gösterimi (Tng, 2015).

2. ÖNCEKi ÇALIŞMALAR

Alman biyolog Haeckel, 1868 yılında yaptığı ilk çalışmalarda kök terimini kullanımıştır (Ramalho-Santos ve ark., 2007).

Brown Seuard, 1891' de yaptığı çalışmada kemik iliğine ait kök hücreleri oral yol ile insanda tedavi sağlama amacıyla uygulamıştır (Avcı, 2022).

Avrupalı bilim insanlarının 1900'lü yıllar başlarında yaptıkları beyanla kan hücrelerinin tek bir hücreden köken aldığını belirtmişlerdir (Ateş, 2016).

1959 yılına gelindiğinde, Dr. Min Chueh Chang tavşanda *in* vitro koşullarda fertilizasyon (IVF) işlemini gerçekleştirmiştir böylece uygulamayla ilk olarak in vitro ortamda tavşan meydana gelmiştir (Sağsöz, 2008; Ateş, 2016; Avcı, 2022).

1960 yılların başlarına gelindiğinde ise araştırmacılar çeşitli kan hücrelerini incelediğinde bu hücrelerin hepsinin bir tek hücreden köken aldığı üzerinde durmuşlardır. Hematopoetik kök hücrelerin keşfi bu ortak köken araştırılarak bulunmuştur (Silva ve ark., 2021).

Kanadalı araştırmacılar James Till ve Ernest McCulloch, 1963 yılında yaptıkları araştırma sonucunda fareye ait kemik iliği hücrelerinin naklinin ardından kendini yenileyebildikleri kapasiteye sahip oldukları nicel olarak belirlenmiştir (Ateş, 2016). Transplante edilen farenin yaşamına devam etmesi ve kaybedilen kan hücrelerinin, kan üretiminin yeniden sağlanmasıyla hematopoietik kök hücrelerin varlığını doğrulamıştır (Avcı, 2022).

1967 yılına gelindiğinde ise; Ordinaryüs Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün tarafından kök hücreye ait çalışmalar, embriyoya ait karsinoma hücrelerinin kültürlenmesinin sağlanmasıyla genişletilmiştir. Farelerde bulunan bu teratokarsinomaların emriyonik germ hücrelerinden kökenlendiği ve bu hücrelerin anaç hücre olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmalar pek çok fare ve insan teratokarsinomlarından farklı tür hücre dizisinin tanımlanmasına olanak vermiştir. Embriyonik kök hücrelerin gelecekte, çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılabilecekkaynak olması, bilim çevrelerinde büyük bir heyecana neden olmuştur (Şimşek, 2012).

Edwars ve Bavister 1968 yılında yaptığı çalışmada ise insan ovumunu in vitro ortamda fertizlizasyonun yapılmasını sağlamışlardır (Ateş, 2016). İn vitro koşullardaki fertilizasyon ile temin edilebilen embriyolar embriyonik kök hücre çalışmalarının yapılmasını sağlamıştır. Embriyonik kök hücrelerin varlığı pek çok hastalık tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür (Sağsöz ve ark., 2008).

1971 yılına gelindiğinde ise Türkiye'de Ord. Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün yaptığı çalışmalarda hücrenin potansiyeli üzerinde durmuş ve ilk kültür çalışmalarına bulunmuş bilim insanımız olmuştur. Süreyya Tahsin kordon ve plesanta hücrelerinin insan yaşamını uzatmayı

sağlayabilecek kaynaklar olabileceğini belirtmiştir. Yaptığı çalışmalarda hayvanlara ait kordon kanı grefleri ve fetal greflerin çeşitli hastalıklara çözüm olabileceği üzerine araştırmalar yapmıştır (Avcı, 2022).

İlk in vitro fertizlizasyon ile doğan bebek Louise Brown adlı bebek İngiltere'de 1978 yılında dünyaya gelmiştir (Sağsöz ve ark., 2008).

Türkiye'deki allojenik kemik iliği transplantasyonu ilk olarak 1978 yılında Hacettepe Ünüversitesinde Prof. Dr. Korkut Özerkan tarafından yapılmıştır (Avcı, 2022).

1981 yılına gelindiğinde Evans ve Kaufman fare embriyonik kök hücrelerinden temin edilen blastosistlerin iç hücre kitlesinden elde edilmiştir. Pluripotent hücre karakterindeki fare embriyonik kök hücrelerini çoğaltmak kültürlemek için in vitro ortamda gerekli olan şartları belirtmişlerdir. Bu çalışmalar sonucunda ilk embriyonik kök hücre Evans ve Kaufman tarafından uygun in vitro koşullarda elde edilmiştir (Sağsöz ve ark., 2008).

Türkiye'de 1984 yılına gelindiğinde ise Prof. Dr. Önder Berk önderliğinde Gülhane Askeri Tıp Akademisinde kemik iliği (otolog) transplatasyonu yapılmıştır (Tanyeli ve ark., 2014).

Dr. Atila Tanyeli, 1992 yılında multirelaps hodgkin lenfomaya sahip hastaya pediatrik kök hücre (otolog) nakli ilk olarak uygulamıştır (Tanyeli ve ark., 2014).

Rhesus maymunları ve marmosetlerden primat embriyonik kök hücreler ise 1995-1996 yılları arasında elde edilmiştir (Ateş, 2016). Maymun ve marsosetlerden in vitro koşul altında tedarik edilen bu embriyonik kök hücrelerinden yola çıkılarak insana ait embriyonik kök hücrelerininde in vitro ortamda kültürlenebileceği düşünülmüştür (Thomson ve ark., 1995).

Kordon kanı transplatasyonu ilk olarak Çukurova Üniversitesinde 1996 yılında, talasemik hastaya Prof. Dr. Atilla Tanyeli tarafından uygulanmıştır (Tanyeli ve ark., 2014).

1998 yılına gelindiğinde ise Wisconsin Üniversitesinden Thomson ve çalışma arkadaşları tarafından in vitro fertizilizyon laboratuvarından bağışlanmış 36 adet embriyodan, beş adet insan ait embriyonik kök hücre üretimi sağlanmıştır (Ateş, 2016). Elde edilen insan embriyonik kök hücreler kök hücre çalışmalarında hız kazandırmış beraberinde de etik sorunları gündeme getirmiştir. Bu kök hücrelerin eldesi pek çok hastalık için umut verici olup önemli bir kaynak olarak değerlendirebileceği üzerinde durulmuştur. Kök hücreler üzerinde yapılan çalışmalar 2003 yılında en önemli 10 tıp gelişmesi arasında belirtilmişitir (Sağsöz ve ark., 2008).

Pittenger ve çalışma arkadaşları tarafından 1999 yılında ise embriyonik kök hücre tanımlaması yapılmıştır. Embriyonik kök hücrelerin adiposit, kondrosit ve osteoblast gibi farklı hücre tiplerine dönüşebilecek fibroblastik hücreler olarak belirtilmiştir (Pittenger ve ark., 1999).

İnsan embriyonik kök hücreleri 2000 yılına gelindiğinde ise pluripotent karakter gösterdiği saptanmıştır. Pluripotent kök hücreler için vücut hücrelerinden kaynak aldıkları ve

her üç germ tabakasına da (endoderm, mezoderm, ektoderm) hücrelerine dönüşebilen hücreler olarak tanımlanmıştır (Sağsöz ve ark., 2008).

İnsan dişlerinden ilk izole edilen mezenkimal kök hücreler olan dental pulpa kök hücrelerinin ise Gronthos ve arkadaşlarınca 2000 yılında izolasyonu sağlanmıştır (Kaneko ve ark., 2018). Diş pulpası kök hücrelerinin multipotent kök hücre karakteri sağlandığı ve pek çok dokuya dönüşebileceği belirtilmiştir.

Kök hücre çalışmalarına yatırımların yapılmaya başlanması ise 2001 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde dönemin başkanı Bush tarafından sağlanmıştır. Kök hücre çalışmalarına devlet bütçesinden ayrılmıştır. Kök hücre çalışmalarında kullanılmak üzere embriyoların in vitro fertizilasyon sonrası kalan embriyolardan yapılması için yasal izni vermiştir (Sağsöz ve ark., 2008).

Miura ve ark. 2003 yılında multipotent karaktere sahip eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişlerinin kök hücreleri ilk izole eden kişilerdir (Hu ve ark., 2018).

Güney Koreli araştırmacılar 2004 yılında 30 insan embriyosunu klonlamayı başarıp embriyoları blastosist evresine kadar getirebilmişlerdir. Ancak bu embriyoların hepsinden kök hücre üretememiş sadece birinden üretmeyi başarmışlardır (Sağsöz ve ark., 2008).

Diş folikülü kaynaklı kök hücreler ilk olarak Morsczeck ve arkadaşları tarafından 2005 yılında ekto-mezenkimal kaynaklı bir bağ dokusu olan diş foliküllerinden izole edildi. Bu kök hücreler mezenkimal kök hücre karakteri taşıdığından morfolojik olarak fibroblast benzeri yapılarda olup farklı kök hücre çeşitlerine dönüşebilmekte olduğu belirtildi (Hu ve ark., 2018).

Apikal papilla kök hücreleri ise, 2006 yılında Sonoyama ve arkadaşları tarafından tanımlanması yapılmıştır. Dental kök hücre türlerinden olan apikal papilla kök hücrelerinin, yüksek proliferasyon oranına sahip olduğu, osteojenik odontojenik farklılaşma eğilimi olduğu belirtilmiştir (Hu ve ark., 2018).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Tez çalışmasında, hücre kültür çalışmaları Ç.Ü. Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarlar'ında gerçekleştirilmiş olup kök hücre karakterizasyonun tespiti ise BD FACSCalibur akım sitometri cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Pasaj sayısıyla ilişkilendirilen süt dişi kök hücrelerinin gen ekspresyon düzeyleri ise Roche gerçek zamanlı PCR cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Tez için kullanılar cihazlar aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

Kullanılan Cihazlar
İnkübatör (Heracell™ 150, Thermo Electron Corporation)
Laminar Akımlı Kabin (Kojair Tech)
Işık ve İnvert Mikroskop (Olympus CK40)
Buzdolabı (+4°C, -80°C)
Derin dondurucu (-20°C)
Otoklav
Santrifüj
Vorteks
BD FACSCalibur Akım Sitometrisi Cihazı
Roche Gerçek Zamanlı-PCR Cihazı

3.1.2. Kullanılan Malzemeler

Çalışmada kullanılmak üzere 9 yaşındaki erkek hastadan alınmış, eksfoliasyon zamanı gelmiş çürüksüz üst süt keser diş, alınan etik izinler doğrultusunda hastadan temin edilmesi sağlanıp Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsün'de izolasyonu sağlanmıştır.

Çizelge 3.2. Belirtilen malzemeler tez çalışmasında kullanılmıştır.

Kullanılan Malzemler
Eksfoliasyon Zamanı Gelmiş Süt Dişi
Bistürü
Pens
İnsülin Enjektörü
Santrifüj Tüpü
İğneler
Parafin Kabı,
Antibiyotik
PBS (Life Technologies, Gibco®)
α-MEM (Hyclone)
FBS (Atlanta Biologicals)
Tripsin (Life Technologies, Gibco®)
Trizol (Sigma)
25-75 cm^2 yüzeyli kültür kabı (SPL-Lifescience)
CD90 (PerCP-Cyanine5.5, Biolegend)
CD105 (PE, Biolegend)
CD45 (FTIC, Biolegend)
Yüksek Kapasiteli cDNA Ters Transkripsiyon Kiti (Applied Biosystems™)

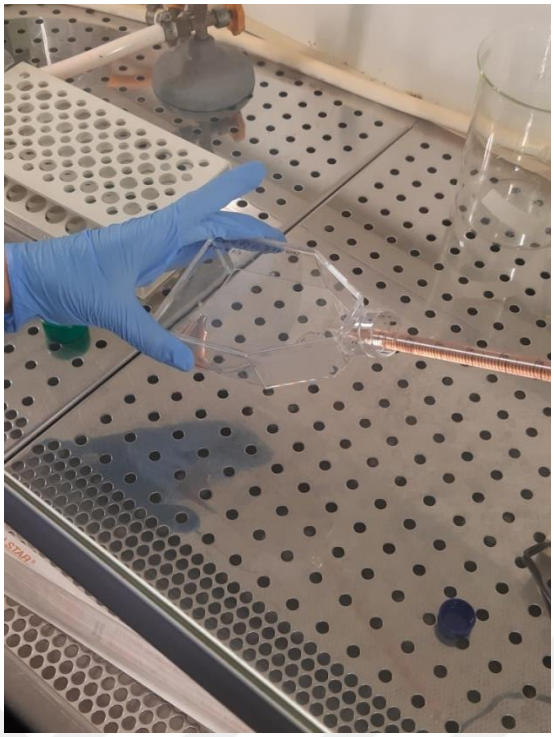
Çizelge 3.3. Tez çalışmasında kullanılan primelerin forward ve reverse sekanslarının gösterim.

Primerler	**Sequence**
İnsan Metastaz Baskılayıcı Geni (KISS1)	F: 5′-ctcactggtttcttggcagcta-3′ R: 5′-ttctagctgctggcctgtg-3′
İnsan Metastaz Baskılayıcı Gen Reseptörü (KISS1R)	F: 5′-gctggtacgtgacggtgttc -3′ R: 5′-agagcctacccagatgctgag -3′
İnsanda Taşikinin- 3Geni (TAC3)	F: 5′- cccccgagagcagaataggt-3′ R:5′-ccagggtcaggtagaaaagatgg-3′
İnsan Taşikinin-3 Reseptörü (TACR3)	F:5′- ttgcggtggacaggtatatgg-3′ R: 5′-ggccattgcacaaagcagag-3′

3.2. Metot

3.2.1. Süt Dişi Pulpası Kaynaklı Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürlenmesi

Yüksek lisans tez çalışmasında kullanılmak üzere eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişi Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden temin edildi. 9 yaşındaki erkek hastadan alınan eksfoliasyon zamanı gelmiş çürüksüz üst keser süt dişi, antibiyotik ilavesi yapılmış steril fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) içinde laboratuvara getirildi. Hastadan alınan süt dişi gerekli aseptik koşullar sağlanarak laboratuvar ortamında pulpa dokusuna 1-2 mm kalıncaya kadar steril olan keskin diskler yardımıyla vertikal yivlerin açılması sağlandı. Açılması sağlanan yiv bölgelerden davye yardımıyla ikiye ayrılması sağlanıp pulpa dokusu steril ekskavatörle çıkarıldı. Pulpa dokusu steril cam petri içine alınıp büstri kullanımıyla yaklaşık 1×1×1 mm olacak şekilde parçalandı ardından içerisine 3 mg /tip I kollejenaz ve 4 mg /ml dispaz çözeltisinin içermekte olan eppendorf tüplerine aktarılması sağlandı. Bu çözelti içerisinde pulpa dokusu 37 ˚C'de 1 saat beklenmesi sağlanıp her 10 dakikalık periyotlarda enzimin daha fazla doku yüzeyine nüfuz etmesini sağlamak amacıyla karıştırılması sağlandı. Bekleme süresinin ardından 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası süpernatantın atılması sağlanıp MEM içine %15'lik FBS, antibiyotik ilavesi yapılıp hücre kültürlenmesi sağlanmıştır (Martinez Saez ve ark., 2016; Asghari ve ark., 2017).) Hücrelerin yoğunluğuna bakılarak %70-80 doluluk oranına ulaştığında pasajlanma işlemine tâbi tutuldu. Pasajlama işlemi için öncelikle hücreler PBS ile yıkanması sağlanıp % 0.25 Tripsin- EDTA solüsyonuyla 37˚C'de kontrollü bir şekilde inkübasyonda bırakılmıştır. İlave edilmiş tripsinin etkinliğini inhibe etmek için en az iki katı kadar serumlu büyüme ortamı ilavesi yapılmıştır. Ardından 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmesi sağlanarak pellet oluşumu gerçekleştirilmiştir. Süpernatant kısmı atılarak hücrelerin büyüme ortamı içinde süspanse edilmesi sağlanmış ardından hücrelerin T75 flasklara ekimi sağlanmıştır. 10-14 günlük periyot boyunca kontrol edilerek ortamı değiştirilmiş yeterli konfluensa ulaşmış hücrelerin pasajlanması sağlanmıştır. Süt dişlerinden stok oluşturabilmek için her pasajlama sonrası %90 (v/v) FBS ve %10 (v/v) DMSO ile oluşturulan dondurma ortamında dondurulması sağlanıp - 80 ^{o}C dondurucu içerisine muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. İzolasyonu sağlanan eksfoliasyon zamanı gelmiş süt dişi kök hücrelerinin (EDPKH) %15'lik FBS içeren medya içerisinde T75 flaskta kültürlenmesi.

3.2.2. Diş Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Yüzey Antijenleriyle İşaretlenmesi ve Akım Sitometrisinde İncelenmesi

Kültürlenmesi sağlanan süt dişi kök hücrelerin, mezenkimal kök hücre karakteri sürdürüp sürdürmediğini doğrulamak için farklılaşmamış olan kök hücreler akım sitometrisinde analiz edilmesi sağlandı. Üçüncü pasaj (P3) sonrası mezenkimal kök hücreler %85 hücre yoğunluğuna ulaşınca, medya uzaklaştırılması ve PBS ile yıkanma işlemi gerçekleştirildi. (Ma ve ark., 2012) Hücreler tripsin yardımıyla flasktan kaldırılıp, trispini inaktive etmek içinde en az tripsin miktarının iki katı kadar medya ilavesinde bulunuldu. Thoma lamı ile hücre sayımı gerçekleştirildi. Kültür ortamında süspanse edilmesi sağlanıp 1,5 ml hacimli santrifüj tüplerine aktarımı sağlandı. 1000 rpm'de 5 dakika santrifügasyon yapılarak hücrelerin çökmesi sağlandı ardından üst kısımda yer alan süpernatantın çekilme işlemi gerçekleştirildi. Yıkamanın gerçekleşmesi için her tüpe 500 µl PBS eklenip ve peletin homojenize olmasına izin verilip pellet tekrar PBS ile süspanse edilmesi sağlandı. Canlılığın %95 ve üzeri olmasına dikkat edilerek en az 1.000.000 hücre olacak şekilde sayım gerçekleştirildi. FACS (Floresans tarafından aktive edilmiş hücrelerin ayrılması) tüpüne hücrelerin alımı gerçekleştirilip Monoklonal CD90 (Thy-1, PerCP-Cyanine5.5 antikoru), CD105 (SN6, PE antikoru) ve CD45 (reseptör tip tirozin protein fosfat C, FITC antkoru) antikorları tüplere aktarıldı. Hücreler homojenize edilip ve +4˚C'de 45 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Mezankimal kök hücre karakteri gösteren diş pulpası kök hücrelerinin pasaj 3'te pozitif yüzey markırı CD90 ve

CD105 ve negatif yüzey markırı CD45 seçilerek akım sitometrisinde incelemesi sağlandı (Martinez Saez ve ark., 2016).

3.2.3. RNA İzolasyonu ve Mevcut RNA'ların cDNA'ya Çevrimi

Total RNA TRIzol reaktifi ile üreticinin talimatlarına göre hücrelerden izole edilmesi sağlanmıştır. Pasaj 3, 4 ve 5 süt dişi kök hücrelerinden öncelikle TRIzol ile RNA izolasyonu sağlandı. İlk olarak hücre üzerine 500 ul TrIzol eklenmesi yapıldı. Eklemenin ardından vortex ile homojenize edilmesi sağlanıp buz üzerinde 15 dakika boyunca inkübasyona bırakılıp 10 sn olacak şekilde 5 dakikada bir vortekslenme işlemine tâbi tutuldu. Vorteks işleminin ardından 14.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjleme işlemi yapıldı. Santrifüjleme sonucu süpernatant başka bir ependorf tüpe aktarımı sağlanıp ve üzerine 100 ul kloroform eklenmesi yapıldı. Ardından 15 saniye boyunca vortekslenmes sağlanıp +4˚C'de 10 dakika boyunca buz üzerinde tutunması sağlandı ve 14.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlendi. Tüp üzerinde 3 fazın ayrımı gözlemlenip en alt kısımda DNA, orta kısımda bulutsu yapıda protein ve en üst saydam kısımda RNA yer aldığı belirlendi. Süpernatantın % 70'lik saydam kısımı başka tüpe aktarımı gerçekleştirildi. Ardından 1: 1 hacimde eşit miktarda izopropanal eklemesi yapıldı ve vortexlenmesi sağlandı. + 4˚C'de bekletildikten sonra 14.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj işlemine tâbi tutuldu. Bu işlem gerçekleştikten sonra dipteki pellet görüldükten sonra süpernatant atımı sağlandı. 1 ml % 75'lik etil alkol eklemesi gerçekleştirilmiş ve (Etil alkol % 75, Depc) hazırlanması sağlanıp vortexlenme işlem gerçekleştirilmiştir. Ardından 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüjleme tâbi tutulup santrifüjleme sonrası süpernatant atılıp, kalan süpernatantın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Vorteks üzerinde kısa dönüş yapılıp kalan süpernatant kısımının uzaklaştırılması sağlandı. Tüp 6 dakika boyunca buz üzerinde ağzı açık bir şekilde bekletildi ve DEPC'li sudan 20 ul eklendi. Son olarak ağzı açık şekilde 15 dakika buz üzerinde bekletilip, pipetajlanması sağlanıp -20 derece muhafaza edilmiştir.

Pasaj 3, pasaj 4 ve pasaj 5'te Trizol ile elde edilen süt dişi kök hücrelerine ait RNA'lar, yüksek kapasiteli cDNA ters transkripsiyon kiti (Thermo) kullanılarak cDNA'ya çevrilmesi sağlanmıştır. Öncelikle 2 µL 10X RT buffer ve random primer tüp içerisine eklenmiştir. Ardından 0,8 µL dNTP kullanılmış böylece nücleotidlerin bağlanması sağlanmıştır. 1 µL RT enzimi ve 9,2 µL Deonize su eklemesinin ardından her pasajdan 5 µL RNA alınacak şekilde tüplere eklemesi yapılmıştır böylece total hacmin 20 µL olması sağlanmıştır. Tüp içerisinde malzemeler eklenirken nazik bir şekilde pipetaj yapılmıştır. Ardından PCR'daki çoğaltma işleminin gerçekleşmesi için ısıl döngüleyicide 25 ˚C 10 dakika boyunca 37 ˚C'de 60 dakika (2 set) ve 85 ˚C'de 5 dk ayarlanıp pasajlara ait RNA'ların (Pasaj 3, 4, 5) cDNA'ya çevrilmesi sağlanmıştır.

3.2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerde Kisspeptin, Nörokinin Reseptörlerinin Ekspresyonu

Süt dişi kök hücrelerinin total RNA izolasyonu Trizol reaktifi kullanılarak izole edilmesi sağlanıp elde edilen diş pulpasına ait RNA'lar yüksek kapasiteli ters transkriptaz kiti Kiti kullanılarak cDNA'ya dönüşümü sağlanmıştır. Dönüşümü sağlanan cDNA EnTurbo™ SYBRGreen PCR Super karışım kullanılarak Roche gerçek zamanlı -PCR sisteminde gerçekleştirilmiştir. Pasaj 3, 4 ve 5'teki örnekler 20 µl reaksiyon hacminde iki tekrar olacak şeklinde gerçekleştirilmesi sağlanmıştır. RT-PCR için 20 µl reaksiyon sistemi kurulup 2 x SYBR Green PCR master karışım, ileri (forward) ve ters (reverse) primerler (Kiss1 Kiss1R, TAC3, TAC3R, Beta Actin) , RNA içermeyen su ve 2 µl kalıp olarak cDNA hazırlanmıştır. Üç aşamalı amplifikasyon prosedürü hazırlanan reaksiyon sistemine uygulanmıştır.

Çizelge 3.4. RT-PCR için uygulanan üç aşamalı amplifikasyon prosedürü sıcaklık, döngü sayısı ve uygulama zamanlarının gösterimi.

Durum	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Zaman
Pre-denaturasyon	1x	95 ˚C	30 s
Denaturasyon		95 ˚C	5 s
Bağlanma	40x	60 ˚C	60 s
Uzatma		72 ˚C	30 s

Çalışmalardaki eşik siklüs değeri (CT); reaksiyon ortamındaki floresan miktarının sabitlenmiş eşik değerini geçtiği siklusun kesirli ifadesi olarak kullanıldı. Analizde beta-aktin kontrolü kullanılarak bütün cDNA örnekleri normalize edilmesi sağlandı. Real time PCR ile elde edilen Ct değerleri mevcut formülle hesaplanarak analiz sonuçları için grafik elde edilmesi sağlanmıştır.

$$\Delta C_t = C_t(hedef\ gen) - C_t(referans\ gen)$$

$$\Delta\Delta C_t = C_t(muamele\ edilen) - \Delta C_t(kontrol)$$

$$Ekspresyon\ oranı = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

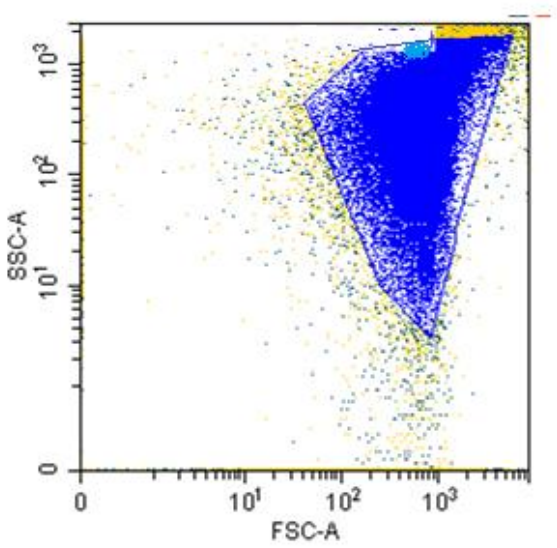
3.2.5. İstatiksel Analiz

Çalışma sonuçları istatistiksel açıdan SPPSS 17 versiyonu programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Veriler analizler için ortalama ± standart sapma değerleri ile belirtilmiştir. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için Student's t-testi kullanılmış ve p-değerinin 0.05'den az olduğu durumlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

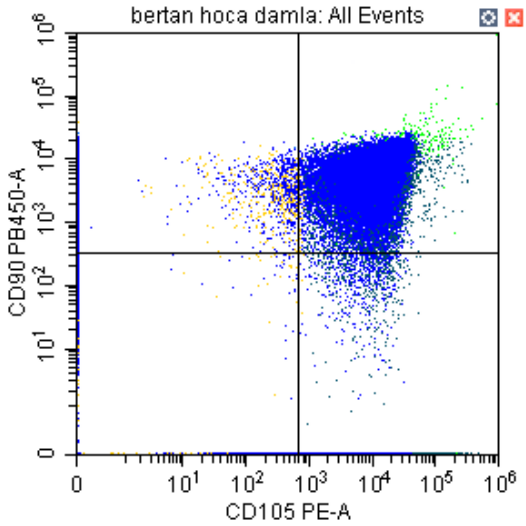
4.1. Bulgular

Uygun koşullar altında kültürlemesi sağlanan süt dişi kök hücrelerinin, akım sitometrisi cihazı kullanılarak mezenkimal kök hücre karakteri taşıdıkları doğrulanmıştır. Kök hücrelerin, mezenkimal kök hücre morfolojik analizleri Side Scatter/ Forward Scatter (SSC/FSC) grafikleriyle bulunan özelliklerin mezenkimal kök hücre karakterine sahip olduğu belirlenmiştir.

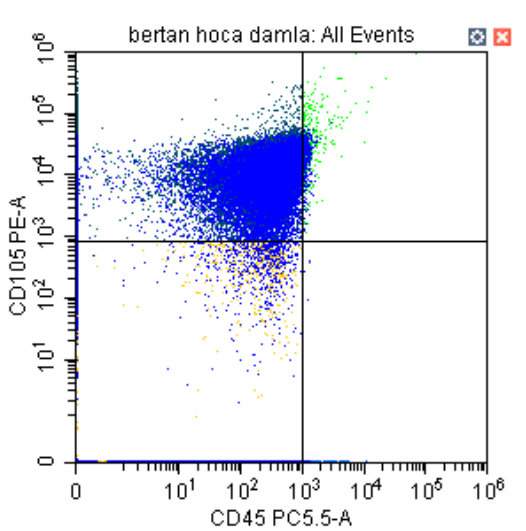


Şekil 4.1. Pasaj 3'deki hücrelerin popülasyonu side scatter (granülüte) ve forward scatter (hücre büyüklüğü) akım sitometrisi cihazıyla analiz edilmesi.

İnsan süt dişi pulpasından elde edilen kök hücrelerin, mezenkimal kök hücre karakteri taşıdığı hücre yüzey belirteçleri kullanılarak belirlenmiştir. Pasaj 3'e getirilen süt dişi kök hücreleri için CD90 (Thy-1, PerCP/ Cyanine) ve CD105 (PE) kullanılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda pozitif belirteçlerin CD90 ve CD105 yüzey belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

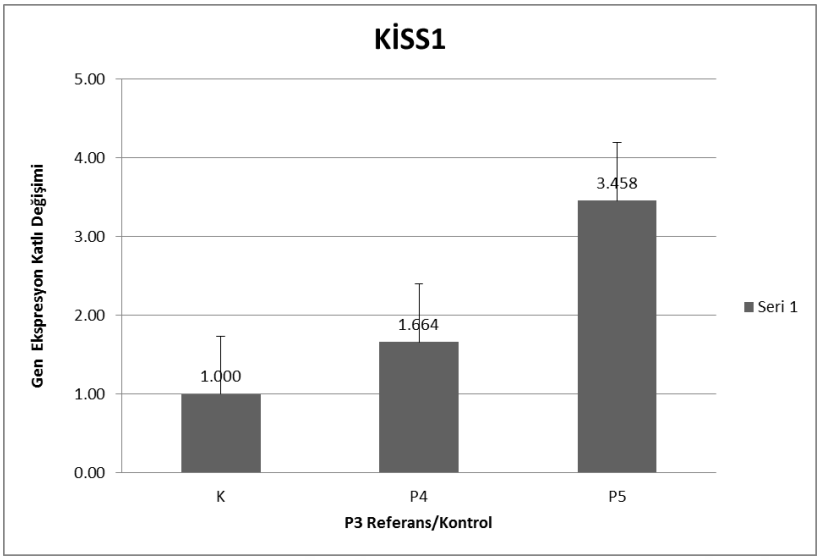


Şekil 4.2. Pasaj 3'teki kök hücrelerin pozitif yüzey belirteçleri (CD90, CD105) ile akım sitometrisinde mezenkimal kök hücrede (MKH) olduğu saptanması.

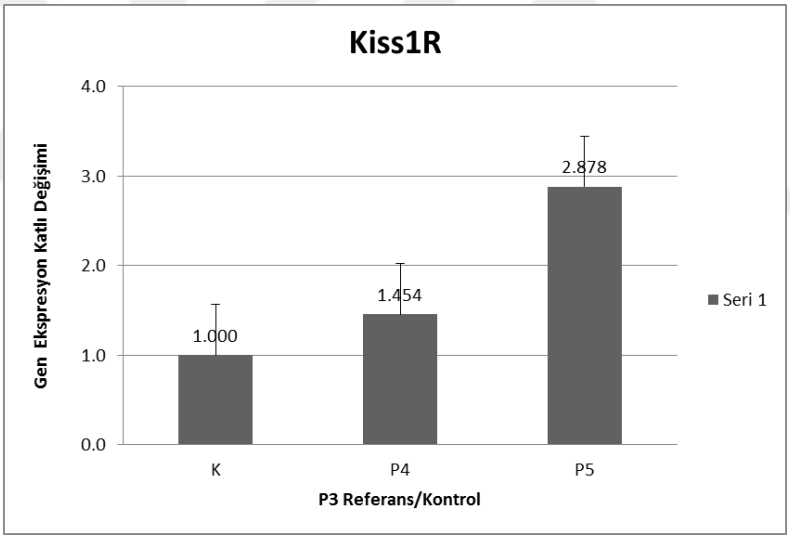


Şekil 4.3. Pasaj 3'teki kök hücre, CD105 (pozitif yüzey markırı) ve CD45 (negatif yüzey markırı) hücre populasyonu yönünden akım sitometrisinde belirlenmesi.

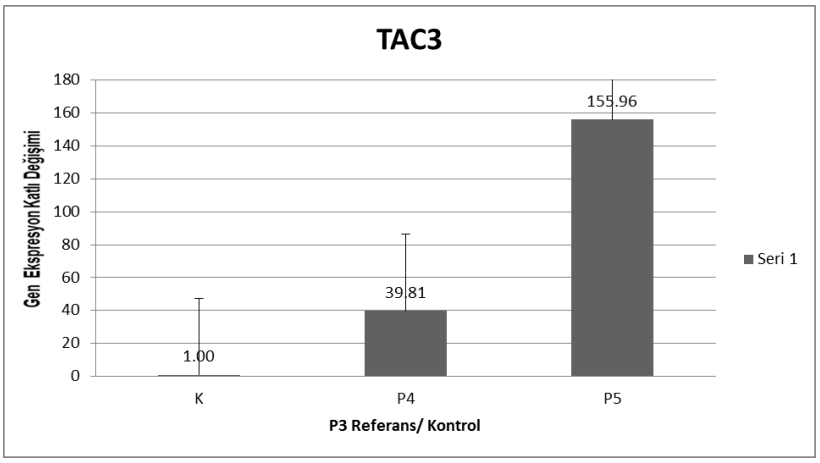
4.2. Kisspeptin ve Taşikinin Real-Time Sonuçları



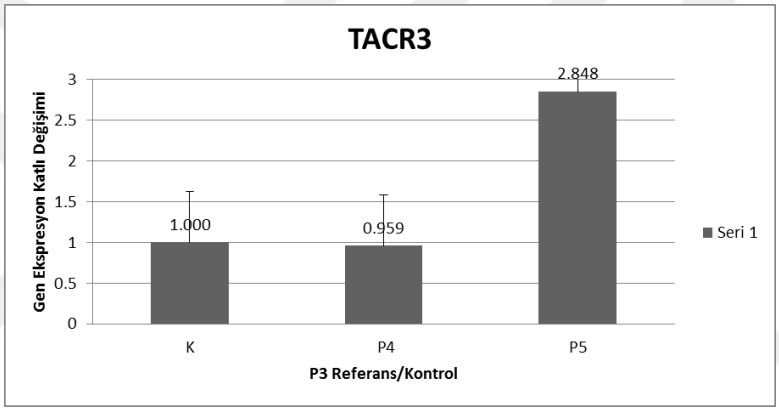
Şekil 4.4. Kisspeptin-1 geni için P3 grubu kontrol (K) olarak referans alındığında P4 ve P5 örneklerinin katlı değişimleri.



Şekil 4.5. Kisspeptin-1 reseptörü için P3 grubu referans alındığında P4 ve P5 örneklerinin katlı değişimleri.



Şekil 4.6. Taşikinin-3 (TAC3) geni, P3 grubu referans alındığında P4 ve P5 örneğinin katlı değişimi.



Şekil 4.7. Taşikinin-3 (TACR3) reseptöründe P3 grubu referans alındığında P4 ve P5 örneğinin katlı değişimi.

4.3. Tartışma

Süt dişleri gelişimin erken dönemlerinde temini kolay, ulaşılabilir, kaynaktan kolay elde edilebilen, multipotent karakterdeki mezenkimal kök hücre çeşitidir. Bu çalışmada, eksfoliye olmuş süt dişi kök hücrelerinden izole edilen mezenkimal kök hücrelerin kisspeptin ve nörokinin genlerini ve reseptörlerini eksprese etmeleri ve bu genlerin puberte, hipogonadizm gibi üreme sistemi üzerinde önemli rol üstlenmeleri nedeniyle üreme sisteminde meydana gelen hastalıklar etkisinin olabileceği araştırılmıştır. Bu amaçla süt dişi pulpasından kök hücrelerin izolasyonu gerçekleştilmiştir. Süt dişi kök hücrelerinin kültürlenmesi (α-MEM içerikli kültür ortamında, %15 FBS) sağlanıp hücrelerin mezenkimal kök hücre karakterinde olduğunu doğrulamak amacıyla akım sitometrisi analizi için hücrelerin pasaj 3'e gelmesi sağlanmıştır. Akım sitometrisinde kullanılmak üzere CD90 ve CD105 pozitif hücre yüzey belirteçleri olarak kullanırken negatif yüzey belirteci olarak CD45 belirlenmiştir. Hücre yüzey belirteçleriyle mezenkimal karakterde oldukları doğrulanan süt dişi kök hücrelerinin gen ekspresyonlarının

pasaj sayısıyla ilişkili olarak karşılaştırılması için hücrelerin pasaj 3, 4 ve 5' e ulaşması sağlanmış. Süt dişi kök hücrelerindeki, KISS1, KISS1R, TAC3 ve TACR3 gen ekspresyon düzeyleri pasaj sayısıyla ilişkilendirilerek gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) incelenmiştir.

Kök hücre ile tedavi yöntemi, fonksiyonu bozulmuş, hasarlı doku veya organın tekrar eski işlevini kazanması için hücrelerin terapötik olarak kullanılması esasına dayanmaktadır (Aydin ve ark., 2019). Bu amaçla kök hücreler çalışmalarda terapotik olarak tedavide kullanabilecek önemli kaynaklardandır. Kök hücrelerin farklı kaynaktan izolasyonu olabilmekte ve bunlar; MKH (diş, kemik, kıkırdak, kemik iliği), EKH ve HKH (periferik kan) gibi kaynaklardan mümkündür (Ding ve ark., 2011).

Kök hücre kaynaklarından olan mezenkimal kök hücrelerin, temin edilmesinin kolay olması, in vitro koşullarda çoğaltılabilmesi, multipotent özellikte, farklı hücre tiplerine differansiye olması, immun sistemindeki immunsüresif etkileri, anjiyonik ve antiapoptotik özellikliklerinin olması, tümör meydana getirme potansiyellerindeki oranın az olması ve EKH'ler gibi etik sorunlar oluşturmaması nedeniyle hücresel tedavi için önemli bir kaynak olmuştur. Göbek kordonu, plesanta ve kemik iliği gibi yapılarda bulunailen MKH'ler dental dokularda da varlığı belirlenmiştir.(Martinez Saez ve ark., 2016). Dental dokularda yer alan mezenkimal karakterdeki kök hücre kaynakları ele alınırsa, diş pulpası kök hücreleri (DPKH), eksfoliye süt dişi kök hücreleri (EDPKH), apikal papilla kaynaklı mezenkimal kök hücreler (APKH), peridonntal ligament kaynaklı (PDLKH) ve diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DFMKH) olarak tanımlanabilmektedir (Aydin ve ark., 2019). Bu çalışmada, rejenaratif tedavide kullanılmak üzere kök hücre kaynağı olarak mezenkimal kök hücre karakteri taşıyan ekfoliye olmuş süt dişi kök hücrelerinden yararlanılmıştır (Ateş, 2016; Ding ve ark., 2011). Süt dişi kök hücrelerindeki KISS1, KISS1R, TAC3 ve TACR3 gen ekspresyonları pasaj sayısıyla ilişkilendirilmesi sağlanıp puberte, hipogonadizm ve üreme sistemiyle ilgili olan bu genlerin süt dişi kök hücrelerindeki ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir (Barroso ve ark., 2019; Durmaz A., 2007; Tng, 2015). Süt dişi kök hücrelerinin KISS1, KISS1R, TAC3 ve TACR3genlerini eksprese etmeleri ve hasarlı doku ve organı verildiğinde terapötik etkisiyle fonksiyon ve biyolojik işleyişi düzenleyebileceği üzerinde durulmuştur

Sunray Lee ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada postnatal doku kaynağı olan diş dokularının kolay erişebilir olması ve yüksek kaliteye sahip olması nedeniyle kök hücre çalışmalarında önemli kaynak olması üzerinde yoğunlaşmışlardır. Eksfoliye zamanı gelmiş süt dişi ve diş pulpası kök hücrelerinin karşılaştırıldığı çalışmada yaş ve cinsiyet uyumlu hastalardan kök hücrelerin izolasyonu sağlanmıştır. EDPKH ve DPKH proliferasyon hızları, yüzey antijenleri, mezodermal ve ektodermal soy markırları, diferasyon kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca çalışmada 2 yıl boyunca dondurularak saklanan DPKH ve EDPKH'lerin hücre büyümesinde ve iki katına çıkma süreleri de incelenmiştir. Süt dişi kök

hüceleri ve diş pulpası kök hücrelerinin hücre büyümesi ve dental hücrelerin klonojenik popülasyonları karşılaştırıldığında, süt dişi kök hücrelerinin hücre proliferasyon hızlı olup popülasyonu iki katına çıkarma süresi diş pulpası kök hücrelerinden tahminen daha kısa olduğu belirtilmiştir. Uzun zaman dondurulmuş olan süt dişi ve diş pulpası kök hücreleri karşılaştırıldığında ise DPKH'lerdeki büyüme hızının EDPKH'lere oranla daha yavaş olduğu saptanmıştır. Süt dişi kök hücrelerinde diş pulpası kök hücrelerine göre daha daha yüksek koloni oluşturan birim fibroblastlar gözlemlenmiştir.

Sunray ve arkadaşları, dental kök hücrelerin kültürleme işlemini hücreler pasaj 3 gelene kadar devam ettirmiş ve mezenkimal kök hücre karakterini belirlemek için akım sitometrisi analizi gerçekleştirmiştir. Akım sitometrisinde kullanılmak üzere primer antikorlardan CD29, CD34, CD105, CD146, STRO 1 kullanılmıştır. Elde edilen bulgularda; kalıcı dişten elde edilen diş pulpası kök hücrelerinin (DPKH) ve eksfoliye süt dişi kök hücrelerinin (EDPKH) mezenkimal kök hücrelere benzer CD29+, CD34-/+, CD105+, CD146+ ve STRO-1 immünofenotipte olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Mezenkimal kök hücre karakteri sağladıkları doğrulanan dental dokuların deksametazon, b-gliserol fosfat ve askorbik asit-2-fosfat ilaveli osteojenik indüksiyon ortamında farklılaşması indüklenmesini sağlanmış, osteojenik farklılaşmayı doğrulamak alkalin fosfat boyamayla sağlanıp, kalsiyum birikimi ise Kossa boyama ile sağlanmıştır. İndüklemenin ardından RT-PCR analiziyle DPKH'ler ve EDPKH'lerin gen ekspresyonları karşılaştırılmıştır. Kalıcı dişten elde edilen DPKH'lerin, mezodermal BMP4 (kemik morfogenetik protein 4) ve ektodermal (NCAM ve nestin) kaynaklı mRNA'yı eksprese ettiği ancak endodermal kökenli belirteçlerini ifade etmediği ifade edilmiştir. EDPKH'lerin, düşük SOX17 seviyelerini ifade etmesine rağmen, mezodermal ve ektodermal köken belirteçlerini daha bol miktarda ifade ettiği saptanmıştır. DPKH'ler ve EDPKH'lerin her ikisinde de osteojenik (osteokalsin) molekülleri eksprese ettiği belirtilmiştir. Çalışma sonucunda tüm bulgular değerlendirildiğinde dental kök hücre kaynaklarından olan süt dişi kök hücrelerinin avantajlı bir kaynak olduğu belirtilmiştir.

Araştırmamızda Sunray ve arkadaşları yaptığı çalışmaya benzer şekilde eksfoliye süt dişi kök hücrelerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kültürlemede kök hücrelerin yüksek proliferasyon gösterdikleri ve bulundukları plastik yüzeye yapıştıkları gözlemlenmiştir. Kültürlemesi sağlanan kök hücrelerin mezenkimal kök hücre karakteri taşıdıkları Sunray ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer şekilde hücrelerin pasaj 3'e ulaşması sağlanıp akım sitometrisi analiziyle doğrulanmıştır. Ancak eksfoliye süt dişi kök hücrelerinin karakterizasyon için kullanılan hücre yüzey belirteçleri farklılık göstermiştir. Gerçekleştirilen tez çalışmasında pozitif hücre belirteçi olarak CD90(PerCP-Cyanine5.5) , CD105 (PE) olarak kullanılırken negatif hücre belirteci olarak CD45 (FTIC) kullanılıp FACSCalibur™ akım sitometresi, CELLQuest™ yazılımıyla analiz edilmiştir. Süt dişi kök hücrelerinin farklılaşmaları gerçekleştirilmeden pasaj sayısıyla ilişkilendirilip KISS1, KISS1R, TAC3 ve TACR3 gen

ekspresyonu gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile incelenmiştir. Bulgular sonucunda pasaj sayısıyla ilişkili olarak ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir.

Khamis ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları çalışmaya gelindiğinde ise; diyabetik infertilitenin diyabetik hastada yaşam kalitesini ciddi şekilde etkilediğini belirtilmiştir. İnsülin reseptörleri substratı (IRS), kisspeptin salgılayan nöronda glukoz alımını ve enerji üretimini düzenlediğini ifade edilmiştir. Hipo-insülinemi, kisspeptin salınımını azaltarak veya hatta durdurarak diyabetik infertilite ile ilişkili hipogonadizme neden olabileceği üzerinde durulmuştur. Araştırmada mezenkimal kök hücre kaynaklarından olan anne sütü kök hücrelerinin moleküler düzeyde diyabetik kaynaklı üreme bozukluğu için terapotik etkisinin olabileceği üzerinde yoğunlaşılmıştır.

Mezenkimal kök hüce kaynağı olan anne sütü pediatri bölümünden temin edilip anne sütü 1: 2 oranında yüksek glukozlu DMEM ve antibiyotik içeren karışımla seyreltilmiş ardından tâbi tutulan işlemlerle hücre pelletleri DMEM kültür medyası içerisinde %10 FBS ilavesiyle 37°C'de %5 CO_2 ile kültürlenmiştir. Araştırmada anne sütü kök hücrelerinin pasaj 3 gelmesi sağlandıktan sonra analizlere başlanmıştır. Pasaj 3' e ulaşan anne sütü mezenkimal kök hücrelerinin immünfenotiplemesi için mezenkimal hücre yüzey belirteçleri kullanılarak akım sitometrisi cihazında analiz edilmiştir. Anne sütü kök hücrelerin mezenkimal kök hücre özelliği taşıdığını doğrulamak için pozitif yüzey belirteçleri CD90 ve CD105, hematopoietik kök hücre yüzey belirteci olarak ise CD45, CD34 de kullanılıp hücre popülasyonu akım sitometrisi analiziyle değerlendirilmiştir. Akım sitometrisi sonucuna göre anne sütü kök hücrelerinin, diğer mezenkimal kök hücreler gibi spesifik olan yüzey belirteçlerini eksprese ettiği, mezenkimal kök hücrelerin ortak karakterlerini ifade ettiğini gözlemlenmiştir.

Çalışmada hayvan modeli oluşturmak amacıyla 45 adet yetişkin erkek Sprague Dawely sıçanı seçilip 3 gruba (n=15) ayrılması sağlanmıştır. Bu gruplar; kontrol grubu (grup 1), diyabetik grup (grup 2) ve anne sütü mezenkimal kök hücreleri ile tedavi edilen diyabetik grup (grup 3) olarak belirlenmiştir. Deneysel olarak diyabet indüklemesi, streptozotosin (STZ) enjeksiyonu ile yapılıp diyabetin gelişimi gerçekleştirilmiştir. Diyabetin, STZ ile gerçekleşmesiyle sıçanlarda hipotalamik Kiss1 mRNA seviyelerini ve gonadotropin salgısını azaltarak hipotalamik hipofiz gonadal (HPG) eksenini aşağı regüle ettiği belirlenmiştir. Hastalık modeli geliştirilen sıçanlarda kontrol grubuna ve diyabetli gruba muamele gerçekleştirlmezken, üçüncü gruba anne sütü mezenkimal kök hücresi tedavisi uygulanmıştır. Anne sütü mezenkimal kök hücreleriyle tedavi edilen diyabetik sıçanlarda, kök hücrelerin hasarlı olan sıçan testislerinde hedef arama yeteneği (homing) ile ulaştığı insana özgü bir Gapdh mRNA ekspresyon seviyesinin saptanmasıyla semi RT-PCR analizi ile doğrulanmıştır. Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR), üreticinin talimatları izlenerek Mx3005P Real-Time PCR (Agilent Stratagene, ABD) Sisteminde sentezlenen spesifik primerler (Kiss-1, Kiss-1r, GnRH1, GnIH) ile gerçekleştirilmiştir. Araştırma gruplardaki sıçanlarda, örneklerin toplanması ise hipotalamus ve

hipofiz bezi kesilip ayrılarak, semen değerlendirmesi için ise testisin epididiminin kuyruk kısmından sağlanmıştır.

Elde edilen edilen bulgularda, tip 1 diyabetik sıçanların kan şekeri seviyesinde bir yükselme meydana gelirken, vücut ağırlığında, açlık serum insülininde, LH, FSH ve toplam testosteron seviyelerinde, testis ağırlıklarında, sperm sayısında, hareketliliğinde ve canlılığında azalma meydana olduğu belirlenmiştir. Diyabetik sıçanlar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında hipotalamik kisspeptin- GnRH sistemi başta olmak üzere testiküler steroidogenez ve HHG aksının diyabetik sıçanlarda aşağı yönde regülasyon olduğu belirlenmiş. Buna karşın kontrol gruplarına kıyasla diyabetik sıçanlarada, apoptotik belirteç ve testiküler proinflamatuar belirteçlerinin mRNA ekspresyonlarının yukarı yönde düzenlendiği belirtilmiştir. Tedavi edilmeyen diyabetik grup (grup 2) kontrol grubuna (grup1) kıyasla, hipotalamik Kiss1 ve Gnrh1, hipofiz Gnrhr, testiküler kiss1r ve PPAR-y mRNA ekspresyonunda önemli ölçüde aşağı yönde regüle edilirken ve hipotalamik GnIH mRNA ekspresyonunda önemli bir yukarı regülasyon olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, tip 1 diyabette ortaya çıkan hipoinsülinemi, enerji üretimi için gerekli olan kisspeptin nöronunun glukoz alımını azaltarak, kisspeptin mRNA ekspresyonunu olumsuz etkileyebileceği ifade edilmiştir. Kontrol altına alınamayan diyabetin hipotalamik mRNA ekspresyonundaki bozulması nedeniyle hipogonadizm ile ilişkilendirilebileceği ve hipotalamik mRNA ekspresyonunun seks hormonları tarafından düzenlendiği belirtilmiştir. Ayrıca diyabetin Kisspeptin mRNA ekspresyonu üzerinde güçlü bir baskılayıcı etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir. Yine, kontrol grubuna kıyasla diyabetik tedavi edilmeyen sıçanlarda (grup 2) serum FSH, LH ve toplam testosteron seviyelerinde önemli bir azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Anne sütü mezenkimal kök hücreleri ile tedavi edilen grupta ise hipotalamik Kiss1, kiss1r, Gnrh1, hipofiz Gnrhr ve testiküler kiss1r ve PPAR-y, mRNA ekspresyonunu önemli ölçüde yukarı regüle edilirken ve hipotalamik GnIH mRNA ekspresyonunu önemli ölçüde aşağı regüle ettiği belirlenmiştir. Mezenkimal kök hücrelerden olan süt dişlerinin hasarı onararak diyabetin yarattığı olumsuz sonuçları iyileştirebileceğini üzerinde durulmuştur. Khamis ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma, anne sütü mezenkimal kök hücreleriyle tedavi edilen diyabetik sıçanlarda çoğu parametrelerin normal fizyolojik seviyeye döndüğü, artış meydana getirdiği bu yüzden de tip1 diyabetin neden olduğu infertilite için anne sütü kök hücrelerinin potansiyel bir terapötik rolün olduğu belirtilmiştir.

Araştırmamızda, Khamis ve arkadaşlarından farklı olarak mezenkimal kök hücre kaynağı olarak eksfoliye süt dişi kök hücresi kullanılmıştır. Süt dişi kök hücrelerinin kültürlemesinde α-MEM kültür medyası kullanılırken (%10 FBS ilaveli), anne sütü mezenkimal kök hücrelerinde DMEM kültür medyası (%10 FBS ilaveli) kullanılmıştır. Çalışmamızda süt dişi kök hücrelerinin mezenkimal kök hücre özelliği taşıdığını doğrulamak için pozitif yüzey belirteçleri CD90 ve CD105, hematopoietik kök hücre yüzey belirteci olarak ise CD45 belirlenip akım sitometrisi cihazında doğrulanmıştır. Anne sütü mezenkimal kök hücreleriyle

gerçekleştirilen çalışmada ise negatif belirteçlere ek olarak CD34'ün de kullanımıyla mezenkimal kök hücre karakterizasyon sağlanmıştır. Süt dişi kök hücrelerinden elde edilen bulgular sonucunda, pasaj sayısıyla ilişkili olarak KISS1, KISS1R, TAC3 ve TACR3 ekspresyonlarının olması, hasarlı olan dokuya nakledildiklerinde kök hücrelerinin rejenerasyonu sağlamaları nedeniyle tıpkı anne sütü mezenkimal kök hücreleri gibi üreme sisteminde meydana gelebilecek bozukluklarda alternatif bir kaynak olarak kullanabileceği düşünülmüştür.

Almeida ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları araştırmalarda, nörokininler üzerine olmuştur. İnsanlarda Tac3 geni tarafından kodlanan Nörokinin B'nin omurilik dorsal boynuzunda ve merkezi sistem sisteminde bulunduğunu belirlenmiştir ancak nörokinin B'ye ait mRNA ekspresyonları sıçan, fare ve insanda nöral olmayan uterus, plasenta gibi üremeye ait hücrelerde de saptanmıştır.

Memelilere ait taşikinin reseptörlerinin dağılımı ele alındığında ise; tür içinde dağılımının değişiklik gösterdiği belirtilmiştir. NK-3 reseptörüne gelindiğinde temel olarak merkezi sinir sisteminde eksprese olduğu ve insan ve sıçan uterus ve plesantasında, insan iskelet kası, karaciğer ve akciğer gibi periferik dokularda saptanmıştır. Merkezi ve periferik düzeyde cinsel steroidler tarafından taşikinin ve taşikinin reseptörlerinin ekspresyonunun bir düzenlemesi mevcut olduğu ifade edilmiştir. Nörokinin B ve nörokinin 3 reseptörünün gen ekspresyonunun östrojenler tarafından güçlü bir şekilde düzenlenmesi de bu çıkarımı doğrular nitelikte olmuştur (Almeida ve ark., 2004). Elde edilen bulgularda, taşikininlerin üreme işlevinde düzenleyici etkisi olduğu üzerinde durulmasını sağlamıştır. Taşikinin ve reseptörlerinin üreme kontrolünde görev alan hipotalamus, ön hipofiz ve gerek kadın gerekse erkek üreme sisteminde temel seviyede mevcut olduğu belirtilmiştir. Taşikininlerin hipotalamus- hipofiz aksında prolaktin seviyesi ve gonadotropinlerin kontrolü, yumurtalık ve testislerde steroid salgılanmasına etki ettiği belirtilmiştir. Merkezi ve periferik düzeyde cinsel steroidler tarafından taşikinin ve taşikinin reseptörlerinin ekspresyonunun bir düzenlemesi mevcuttur. Nörokinin B ve nörokinin 3 reseptörünün gen ekspresyonunun östrojenler tarafından güçlü bir şekilde düzenlenmeside bu çıkarımı doğrular nitelikte olmuştur.

Gerçekleştirdiğimiz çalışma sonucunda ise, TAC3 geni tarafından kodlanan Nörokinin B'ye ait mRNA ekspresyonlarının sadece sinir hücrelerde eksprese olmayıp nöral olmayan hücrelerde de eksprese olduğu saptanmıştır. Üreme sitemi üzerindeki etki mekanizmalarının oluşu ve üterus, plesanta, iskelet kası gibi farklı dokulardaki ekspresyonlarının var olduğu belirlenmiştir. Mezenkimal kök hücre kaynaklarından biri olan süt dişi kök hücrelerinde de TAC3 ve TAC3R ekspresyonun varlığı pasaj sayısıyla ilişkilendirilmiş ve bu kök hücre kaynağında da ekspresyonlarının varlığı tespit edilmiştir.

Tng E. L. 2015 yılında yaptığı araştırmada; kisspeptin1 nöronlarının nörokinin B içeren nöronlar olduğu insanda TAC3 geni nörokinin B'yi eksprese ederken TAC3R ise nörokinin B reseptörünü kodlayarak KISS sisteminin aktivasyonu sağlandığı belirtilmiştir.

Kisspeptin sinyalinin kontranmiterleri görev aldığı, kisspeptin nöronlarında lokalize olduğu ve bunları Nörokinin B (NKB) ve dinorfin (Dyn) olduğu belirtilmiştir. Kisspeptin/NKB/Dyn (KNDy) nöronları olarak adlandırılmıştır ve kisspeptinlerin GnRH salınımı modüle ettikleri belirtilmiştir. KISS-1/GPR54 sisteminde meydana gelen inaktive edici mutasyonlar hipogonadotropik hipogonadizime neden olduğu ifade edilmiştir. (Tng, 2015)

Araştırmalarda NK3 reseptörü olan NK3R'lerin hayvanlarda, hipotalamus ve GnRH nöronlarında bulunduğu NK3R agonistleri Kiss1 nöronlarını aktive ederek sıçanlarda luteinleştirici hormon (LH) salgılanmasını arttırdığı belirtilmiştir. Bu bulgular Kiss1r reseptörünün nakavt edildiği farede mevcut olmamıştır. Yine çalışmada TAC3 ve TACR3 fonksiyonunu inaktive edici mutasyonların hipogonadizme sebebiyet verdiği ve Dyn'in hayvanlarda luteinleştirici hormon (LH) salgılamasında inhibe edici etkiye sahip olduğu belirtilmiştir.

Elde edilen bulgular, çalışmada kisspeptin sinyallerinin nörokininlerin de etkisi sonucu kiss sisteminin aktifleşmesiyle üreme sisteminde yer edindiği ve bu işleyiş için KISS1, KISSR1 ve TAC3, TACR3 önemli genler olduğu belirtilmiştir.

Son olarak Topaloğlu ve arkadaşlarının 2009 yılında gerçekleştirdiği araştırmada; ailesel hipogonadizmdeki TAC3 ve TACR3 mutasyonlarının Nörokinin B'nin üreme kontrolündeki etkisi üzerinde araştırılmıştır. Pubertal yetmezlik ya da gonadotropin eksikliğin Nörokinin B' yi kodlayan TAC3'teki ve NK3R reseptörünü kodlayan TACR3'teki homozigot mutasyonların bireylerde fonksiyon kaybına neden olduğu üzerinde durulmuştur. Taşikinin ailesinin üyesi olan nörokinin B, hipotalamik nöronlarda gonadotropin salgılatıcı hormonunu düzenleyicisi olan kisspeptin1 yüksek miktarda eksprese ettiğini belirtmişlerdir. GPR54 ya da GnRH reseptöründe meydana gelen mutasyonların ailesel hipogonadotropik hipogonadizm de tespit edilmiştir (Topaloglu ve ark., 2009)

Ülkemizde gerçekleştirilen idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizmdeki tek nükleotit polimorfizm analizi ile nörokinin B'nin (NKB) ve reseptörü NK3R aracılığıyla düzenleyici etkileri olduğu belirlenmiştir.TACR3, nörokinin B için reseptör olan NK3R'yi kodlamakta, kisspeptini de ifade eden hipotalamik nöronlarda yüksek oranda ifade eden bir taşikinin peptit olduğu ifade edilmiştir.

Elde edilen bulgularda, homozigot TAC3 veya TACR3 mutasyonları, NK3R reseptörü aracılığıyla hareket eden nörokinin B'nin (NKB) insan üremesinin merkezi hormonal kontrolü için önemli olduğuna dair kanıtlar bulunmuştur. Özellikle, nörokinin 3 reseptörünün merkezi sinir sisteminde ifadesinin yaygın olduğu belirtilmiştir. TACR3' te yaşanan mutasyonlar fonksiyon kaybına neden olmakta bu durum deneklerde üreme aksını etkilediği gibi nörodavranışsal abnormalitiklere olması üzerinde durulmuştur. Nörokin B'nin, kisspeptin1 ekspresyonu için önemli etkisi olduğu üreme sistemi için son derece önemli olduğu belirtilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada 9 yaşındaki erkek hastadan alınan eksfoliasyon zamanı gelmiş çürüksüz üst süt keser süt dişi kullanılmıştır. Süt dişi kök hücrelerinin gen ekspresyonlarının cinsiyetle ilişkilendirilip ilişkilendirilemeyeceği cinsiyet ve araştırma grupları genişletilerek araştırmanın kapsamı genişletilebilir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre eksfoliye zamanı gelmiş süt dişinden elde edilen mezenkimal karakterdeki kök hücreler pasaj sayısıyla ilişkilendirilerek kisspeptin (KISS1), kisspeptin reseptörü (KISS1R), nörokinin (TAC3) ve nörokinin reseptörü (TAC3R) ekspresyonları incelenmiştir.

Kisspeptin-1 ve Kisspeptin reseptörü için P3 grubu referans alındığında P4 ve P5 örneklerinin gen ekspreseyonu katlı değişimleri incelendiğinde gen ifadesinin pasaj sayıyla birlikte süt dişi kaynaklı mezenkimal kök hücreler için artığı belirlenmiştir.

Taşikinin-3 (TAC3) ve Taşikinin-3 reseptörünün(TAC3R), P3 grubu referans alındığında P4 ve P5 örneğinin gen ekspresyonunun katlı değişimi pasajla birlikte arttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Çalışmamızda KISS1, KISS1R, TAC3 ve TAC3R gen ekspresyon düzeyleri pasaj sayısıyla ilişkilendirilerek eksfoliasyon zamanı gelmiş çürüksüz, üst süt dişlerinin farklılaştırılmadan analiz edilmiştir. Süt dişi kök hücrelerinin uygun farklılaşma ajanları kullanılarak farklı hücre tiplerine farklılaşması sağlanıp gen eksprosyonlarının farklılaşmış ve farklılaşmamış kök hücre türlerindeki ekspresyon düzeyleri karşılaştırılıp belirlenebilir.

Kisspeptin1- Kiss1r sisteminin birlikteliğinin özellikle gonadotropin salıcı hormonu aktive ederek LH ve FSH hormonlarının salınımı GnRH'a bağımlı olarak gerçekleşmektedir. Kispeptinlerde meydana gelen mutasyon ya da delesyonlarının dişilerde doğrudan ovaryumda folikül gelişimini, erkekte ise testiste gelişime engel olduğu belirtilmiştir. Bu yüzden pubertal gelişim için çok önemli görevleri olduğu üzerinde durulmuştur. Çalışma sonuçları, puberteyle ilişkilendirilen kisspeptin ve nörokininin gen ekspresyonlarının süt dişi kök hücrelerinde ekspresyon düzeylerinin pasaj sayısıyla arttığı doğrulanmıştır. Kisspeptin-KISSR reseptörü hipotalamus, hipofiz, gonad, spinal kortta, karaciğer, pankreas ve plasentada fazla olarak eksprese edildiği belirtilmiştir. Bu mezenkimal kök hücre kaynaklarına ek olarak, süt dişi mezenkimal kök hücrelerininde alternatif bir kaynak olarak kullanılabileceği hipogonadizm, puberte gibi üreme sistemiyle ilgili hastalıklar için terapotik olarak değerlendirilebileceği üzerinde durulmuştur.

KAYNAKLAR

Almeida, T. A., Rojo, J., Nieto, P. M., Pinto, F. M., Hernandez, M., Martin, J. D., & Candenas, M. L. (2004). Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr Med Chem, 11*(15), 2045-2081. doi:10.2174/0929867043364748

Asghari Sana, F., Capkin Yurtsever, M., Kaynak Bayrak, G., Tuncay, E. O., Kiremitci, A. S., & Gumusderelioglu, M. (2017). Spreading, proliferation and differentiation of human dental pulp stem cells on chitosan scaffolds immobilized with RGD or fibronectin. *Cytotechnology, 69*(4), 617-630. doi:10.1007/s10616-017-0072-9

Ateş, U. (2016). Let's familiarize ourselves with the stem cell. *Istanbul Bilim University Florence Nightingale Transplantation Journal, 1*(1), 19-28. doi:10.5606/fng.transplantasyon.2016.004

Avcı, M. (2022). *Stem cells; Definition and General Properties, Usage Areas, History, Surface Markers*.

Aydin, S., & Sahin, F. (2019). Stem Cells Derived from Dental Tissues. *Adv Exp Med Biol, 1144*, 123-132. doi:10.1007/5584_2018_333

Barroso, A., Roa, J., & Tena-Sempere, M. (2019). Neuropeptide Control of Puberty: Beyond Kisspeptins. *Semin Reprod Med, 37*(4), 155-165. doi:10.1055/s-0039-3400967

Biswas, A., & Hutchins, R. (2007). Embryonic stem cells. *Stem Cells Dev, 16*(2), 213-222. doi:10.1089/scd.2006.0081

Bonaventura, G., Incontro, S., Iemmolo, R., La Cognata, V., Barbagallo, I., Costanzo, E., . . . Cavallaro, S. (2020). Dental mesenchymal stem cells and neuro-regeneration: a focus on spinal cord injury. *Cell Tissue Res, 379*(3), 421-428. doi:10.1007/s00441-019-03109-4

Büyükkurt, N., Özsan, G. H., Özkal, S., Seydaoğlu, G., Alacacıoğlu, I., Özcan, M. A., . . . Ündar, B. (2017). Kemik iliği fibrozis ve anjiogenezisinin hematopoetik kök hücre engraftmanı üzerine etkisi. *Cukurova Medical Journal (Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi), 42*(3), 499-506. doi:10.17826/cutf.296629

Capkin, M., Cakmak, S., Kurt, F. O., Gumusderelioglu, M., Sen, B. H., Turk, B. T., & Deliloglu-Gurhan, S. I. (2012). Random/aligned electrospun PCL/PCL-collagen nanofibrous membranes: comparison of neural differentiation of rat AdMSCs and BMSCs. *Biomed Mater, 7*(4), 045013. doi:10.1088/1748-6041/7/4/045013

Chen, X., Ye, S., & Ying, Q. L. (2015). Stem cell maintenance by manipulating signaling pathways: past, current and future. *BMB Rep, 48*(12), 668-676. doi:10.5483/bmbrep.2015.48.12.215

Clarkson, J., Han, S. K., Liu, X., Lee, K., & Herbison, A. E. (2010). Neurobiological mechanisms underlying kisspeptin activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons at puberty. *Mol Cell Endocrinol, 324*(1-2), 45-50. doi:10.1016/j.mce.2010.01.026

Daoui, S., Naline, E., Lagente, V., Emonds-Alt, X., & Advenier, C. (2000). Neurokinin B- and specific tachykinin NK3 receptor agonists-induced airway hyperresponsiveness in the guinea-pig. *British Journal of Pharmacology, 130*(1), 49-56. doi:10.1038/sj.bjp.0703278

Ding, D. C., Shyu, W. C., & Lin, S. Z. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant, 20*(1), 5-14. doi:10.3727/096368910X

Durmaz A., D. N. (2007). Kimyasal Öpücük: Kisspeptin. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 16: 172*.

Feng, X., Huang, D., Lu, X., Feng, G., Xing, J., Lu, J., . . . Gu, Z. (2014). Insulin-like growth factor 1 can promote proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via mTOR pathway. *Dev Growth Differ, 56*(9), 615-624. doi:10.1111/dgd.12179

Gottsch, M. L., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2009). From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides, 30*(1), 4-9. doi:10.1016/j.peptides.2008.06.016

Saggoz, H.. (2008). Kök Hücreler. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*.

Hu, L., Liu, Y., & Wang, S. (2018). Stem cell-based tooth and periodontal regeneration. *Oral Dis, 24*(5), 696-705. doi:10.1111/odi.12703

Jayasena, C. N., Dhillo, W. S., & Bloom, S. R. (2009). Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in humans. *Peptides, 30*(1), 76-82. doi:10.1016/j.peptides.2008.06.026

Ji, K., Liu, Y., Lu, W., Yang, F., Yu, J., Wang, X., . . . Xuan, K. (2013). Periodontal tissue engineering with stem cells from the periodontal ligament of human retained deciduous teeth. *J Periodontal Res, 48*(1), 105-116. doi:10.1111/j.1600-0765.2012.01509.x

Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., . . . Verfaillie, C. M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature, 418*(6893), 41-49. doi:10.1038/nature00870

Jo, Y. Y., Lee, H. J., Kook, S. Y., Choung, H. W., Park, J. Y., Chung, J. H., . . . Choung, P. H. (2007). Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng, 13*(4), 767-773. doi:10.1089/ten.2006.0192

Kafa, İ. M., & Eyigör, Ö. (2011). Kisspeptinler ve Kisspeptin Nöronları: Üreme Sistemi Üzerine Etkileri ve Hipotalamik Yerleşimleri. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 37 (1) , 53-60*.

Kaneko, T., Gu, B., Sone, P. P., Zaw, S. Y. M., Murano, H., Zaw, Z. C. T., & Okiji, T. (2018). Dental Pulp Tissue Engineering Using Mesenchymal Stem Cells: a Review with a Protocol. *Stem Cell Rev Rep, 14*(5), 668-676. doi:10.1007/s12015-018-9826-9

Kerkis, I., & Caplan, A. I. (2012). Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Eng Part B Rev, 18*(2), 129-138. doi:10.1089/ten.TEB.2011.0327

Khamis, T., Abdelalim, A. F., Abdallah, S. H., Saeed, A. A., Edress, N. M., & Arisha, A. H. (2020). Early intervention with breast milk mesenchymal stem cells attenuates the development of diabetic-induced testicular dysfunction via hypothalamic Kisspeptin/Kiss1r-GnRH/GnIH system in male rats. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 1866*(1), 165577. doi:10.1016/j.bbadis.2019.165577

Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration, 85*(1), 3-10. doi:10.1159/000345615

Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J. M., Le Poul, E., . . . Parmentier, M. (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem, 276*(37), 34631-34636. doi:10.1074/jbc.M104847200

Koyama, N., Okubo, Y., Nakao, K., & Bessho, K. (2009). Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg, 67*(3), 501-506. doi:10.1016/j.joms.2008.09.011

Lee, J. H., Miele, M. E., Hicks, D. J., Phillips, K. K., Trent, J. M., Weissman, B. E., & Welch, D. R. (1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst, 88*(23), 1731-1737. doi:10.1093/jnci/88.23.1731

Lee, S., An, S., Kang, T. H., Kim, K. H., Chang, N. H., Kang, S., . . . Park, H. S. (2011). Comparison of mesenchymal-like stem/progenitor cells derived from supernumerary teeth with stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Regen Med, 6*(6), 689-699. doi:10.2217/rme.11.95

Lv, F. J., Tuan, R. S., Cheung, K. M., & Leung, V. Y. (2014). Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells, 32*(6), 1408-1419. doi:10.1002/stem.1681

Ma, L., Makino, Y., Yamaza, H., Akiyama, K., Hoshino, Y., Song, G., . . . Yamaza, T. (2012). Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. *PLoS One, 7*(12), e51777. doi:10.1371/journal.pone.0051777

Martinez Saez, D., Sasaki, R. T., Neves, A. D., & da Silva, M. C. (2016). Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: A Growing Literature. *Cells Tissues Organs, 202*(5-6), 269-280. doi:10.1159/000447055

Matsumoto, R., Omura, T., Yoshiyama, M., Hayashi, T., Inamoto, S., Koh, K. R., . . . Yoshikawa, J. (2005). Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol, 25*(6), 1168-1173. doi:10.1161/01.ATV.0000165696.25680.ce

Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A, 100*(10), 5807-5812. doi:10.1073/pnas.0937635100

Nakamura, S., Yamada, Y., Katagiri, W., Sugito, T., Ito, K., & Ueda, M. (2009). Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endod, 35*(11), 1536-1542. doi:10.1016/j.joen.2009.07.024

Navarro, V. M., Castellano, J. M., Fernandez-Fernandez, R., Barreiro, M. L., Roa, J., Sanchez-Criado, J. E., . . . Tena-Sempere, M. (2004). Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology, 145*(10), 4565-4574. doi:10.1210/en.2004-0413

Ozkan, S., & Koyuturk, M. (2020). Mesenchymal Stem Cell Therapy and New Approaches in Covid-19 Patients. *Cerrahpasa Medical Journal, 44*(2), 57-64. doi:10.5152/cjm.2020.20017

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., . . . Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science, 284*(5411), 143-147. doi:10.1126/science.284.5411.143

Prentice, D. A. (2019). Adult Stem Cells. *Circ Res, 124*(6), 837-839. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313664

Ramalho-Santos, M., & Willenbring, H. (2007). On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell, 1*(1), 35-38. doi:10.1016/j.stem.2007.05.013

Sağsöz, H., & Ketani, M. A. (2008). Kök Hücreler. *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*.

Sargın, D. (2003). Kök Hücre ve Kök Hücre Tedavisi. *İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı*.

Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahim, J., . . . Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet, 364*(9429), 149-155. doi:10.1016/S0140-6736(04)16627-0

Severini, C., Improta, G., Falconieri-Erspamer, G., Salvadori, S., & Erspamer, V. (2002). The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev, 54*(2), 285-322. doi:10.1124/pr.54.2.285

Sevim, H., & Gurpinar, O. A. (2011). Induced Pluripotent Stem Cells And Their Applications. *Marmara Medical Journal*. doi:10.5472/mmj.2011.01922.1

Shuai, Y., Ma, Y., Guo, T., Zhang, L., Yang, R., Qi, M., . . . Jin, Y. (2018). Dental Stem Cells and Tooth Regeneration. *Adv Exp Med Biol, 1107*, 41-52. doi:10.1007/5584_2018_252

Silva, W. N., Costa, A. C., Picoli, C. C., Rocha, B. G. S., Santos, G. S. P., Costa, P. A. C., . . . Birbrair, A. (2021). Hematopoietic stem cell stretches and moves in its bone marrow niche. *Crit Rev Oncol Hematol, 163*, 103368. doi:10.1016/j.critrevonc.2021.103368

Şimşek, Ö. (2012). Yetişkin Kök Hücrelerin Dünü ve Bugünü. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 7(3), 231–236*. doi:https://doi.org/10.17094/avbd.79188

Taneli, F. (2007). "Flow" Sitometri Tekniği ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 5(2): 75-82*.

Tanyeli, A., Aykut, G., Demirel, A. O., & Akçaoğlu, T. (2014). Hematopoetik Kök Hücre Nakli ve Tarihçesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 23*(1). doi:10.17827/aktd.66502

Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., & Hearn, J. P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A, 92*(17), 7844-7848. doi:10.1073/pnas.92.17.7844

Tng, E. L. (2015). Kisspeptin signalling and its roles in humans. *Singapore Med J, 56*(12), 649-656. doi:10.11622/smedj.2015183

Topaloglu, A. K., Reimann, F., Guclu, M., Yalin, A. S., Kotan, L. D., Porter, K. M., . . . Semple, R. K. (2009). TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet, 41*(3), 354-358. doi:10.1038/ng.306

Trubiani, O., Di Primio, R., Traini, T., Pizzicannella, J., Scarano, A., Piattelli, A., & Caputi, S. (2005). Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament. *Int J Immunopathol Pharmacol, 18*(2), 213-221. doi:10.1177/039463200501800204

Tsai, A. I., Hong, H. H., Lin, W. R., Fu, J. F., Chang, C. C., Wang, I. K., . . . Yen, T. H. (2017). Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Human Deciduous Teeth Pulp. *Biomed Res Int, 2017*, 2851906. doi:10.1155/2017/2851906

Vishwanath, V. R., Nadig, R. R., Nadig, R., Prasanna, J. S., Karthik, J., & Pai, V. S. (2013). Differentiation of isolated and characterized human dental pulp stem cells and stem cells from human exfoliated deciduous teeth: An in vitro study. *J Conserv Dent, 16*(5), 423-428. doi:10.4103/0972-0707.117509

Wang, H. S., Hung, S. C., Peng, S. T., Huang, C. C., Wei, H. M., Guo, Y. J., . . . Chen, C. C. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells, 22*(7), 1330-1337. doi:10.1634/stemcells.2004-0013

Wang, Y., Yan, M., Yu, Y., Wu, J., Yu, J., & Fan, Z. (2013). Estrogen deficiency inhibits the odonto/osteogenic differentiation of dental pulp stem cells via activation of the NF-kappaB pathway. *Cell Tissue Res, 352*(3), 551-559. doi:10.1007/s00441-013-1604-z

Yardımcı, A., & Keleştimur, H. (2019). Puberte Nöroendokrinolojisi ve Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Nöronları. *Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi*.

ÖZGEÇMİŞ

Ezgi Damla YILMAZ, Lise eğitimini Adana Dr. Feyyaz Etiz Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Üniversite eğitimini Adana Alparslan Türkeş Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nde 2019 yılında tamamladı. 2020 yılı bahar yarıyılı eğitim döneminde Adana Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansa başladı.