

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE

**TGF-beta1, TGF-beta2 VE FGF2 BÜYÜME
FAKTÖRLERİNİN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
KONDROGENEZ SÜRECİNE ETKİSİ**

Melike UÇAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2022-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE

TGF-beta1, TGF-beta2 VE FGF2 BÜYÜME
FAKTÖRLERİNİN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
KONDROGENEZ SÜRECİNE ETKİSİ

Melike UÇAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr.Üyesi Özlem ÖZBEY ÜNLÜ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2020-5419 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2022-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Kök Hücre Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖZBEY ÜNLÜ
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Gökhan AKKOYUNLU
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hakan SOYLU
Düzce Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../..... tarih ve .../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrencinin

Melike UÇAK

İmza

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖZBEY ÜNLÜ

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca akademik ve bilimsel gelişimime önemli katkılarından dolayı değerli danışman hocam Dr. Öğr.Üyesi Özlem ÖZBEY ÜNLÜ'ye

Bilimsel bilgi ve tecrübe donanımı ile bana yön veren maddi ve manevi her zaman yanımda olan sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Gökhan ERTOSUN'a,

Yüksek lisans eğitimimin ilk yılında bana bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren sayın hocam Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER'e,

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli öğretim üyelerine, asistan arkadaşlarıma ve teknik ekibe,

Yüksek lisans tez sürecimde tüm soru ve sorunlarıma içtenlik ve sabırla yardımcı olan Sibel ÖZER'e,

Güler yüzleri ve samimiyetleri ile her zaman yardıma hazır olan Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tüm kıymetli çalışanlarına,

Tüm hayatım boyunca hayallerim ve eğitimim için bana güç veren, inanan, her daim güvenen, maddi ve manevi destek olan çok değerli kıymetli annem Nazmiye UÇAK ve babam Nihat UÇAK'a,

Sonsuz inançları, en güzel dilekleriyle maddi ve manevi her zaman yanımda olan ablalarım Müberra AKÇALIOĞLU, Ayşe YÜCESAN ve abim Mustafa UÇAK'a,

Bana her daim yürekten inanıp bu süreçte yanımda olan ve desteğini esirgemeyen sevgili Enes DEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: TGF β 1, TGF β 2 ve FGF2 büyüme faktörleri mezenkimal kök hücrelerin *in vitro* kondrogenezi sürecinde oldukça etkilidirler. Bu çalışmanın amacı, TGF β 1, TGF β 2 ve FGF2 büyüme faktörlerinin belirli gün ve kombinasyonlarının Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin (AKMKH) kondrogenez sürecine olan etkisinin araştırılmasıdır.

Yöntem: Tek tabaka kültür sisteminde AKMKH'ler; 3 gün boyunca I. grup-ITS, II. grup-ITS, III. grup-FGF2+TGF β 1 ve IV. grup-FGF2+TGF β 1 olacak şekilde kültüre edildiler. Bu 3 günün sonunda medyum değiştirilerek, 3 gün boyunca I. grup-ITS, II. grup-TGF β 2, III. grup-ITS ve IV. grup-TGF β 2 olacak şekilde tek tabaka kültür sistemine devam edildi. 3B pellet kültür sisteminde 3 gün boyunca I. grup-ITS, II. grup-ITS, III. Grup-FGF2+TGF β 1, IV. grup-FGF2+TGF β 1, V. grup kondrojenik medyum ve VI. grup DMEM+FBS ile muamele edildi, üç günün sonunda medyum değiştirilerek bu kez I. grup-ITS, II. grup-TGF β 2, III. grup-ITS, IV. grup-TGF β 2, V. grup kondrojenik medyum ve VI. grup DMEM+FBS olacak şekilde uygulandı. 6. günün sonunda 3B pellet kültür gruplarına kondrojenik medyum eklenerek 21 gün boyunca kültüre edildiler. Tek tabaka kültür sistemleri ile oluşturduğumuz gruplarda kültürün 6. gününde alsiyan mavisi boyaması ve Dimethylmethylen Blue (DMMB) analizi gerçekleştirildi. 3B pellet kültür sistemleri ile oluşturduğumuz gruplarda alsiyan mavisi boyaması, DMMB analizi, ve immünohistokimya yöntemi ile COL2A1-ACAN ekspresyonları belirlendi.

Bulgular: AKMKH kondrogenezi modelleri olan hem tek tabakalı kültür, hemde 3B pellet kültür sistemlerinde, TGF β 1, TGF β 2 ve FGF2'nin birlikte kullanımı kıkırdak matriksinin oluşumunda pozitif bir etki yaratmıştır.

Sonuç: AKMKH kültür sistemlerine; TGF β 1, TGF β 2 ve FGF2'nin belirli süre ve kombinasyonlarının uygulanması *in vitro* kondrogenez modelini olumlu yönde desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: AKMKH, TGF β 1, TGF β 2, FGF2, *in vitro* kondrogenez.

ABSTRACT

Objective: TGF β 1, TGF β 2 and FGF2 growth factors are highly effective in the in vitro chondrogenesis of mesenchymal stem cells. The aim of this study is to investigate the effects of certain days and combinations of TGF β 1, TGF β 2 and FGF2 growth factors on the chondrogenesis process of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (ADSCs).

Method: ADSCs were cultured in monolayer culture system for 3 days as group I-ITS, group II-ITS, group III-FGF2+TGF β 1 and group IV- FGF2+TGF β 1. After 3 days, the medium was changed, and monolayer culture system was continued for 3 days as group I-ITS, group II-TGF β 2, group III-ITS and group IV- TGF β 2. ADSCs were treated in 3D pellet culture system for 3 days, as group I-ITS, group II-ITS, group III-FGF2+TGF β 1, group IV-FGF2+TGF β 1, group V-Chondrogenic Medium and group IV-DMEM+%10FBS. After 3 days, the medium was changed and this time groups were formed as group I-ITS, group II-TGF β 2, group III-ITS, group IV- TGF β 2, group V-chondrogenic medium and group VI-DMEM+FBS. After 6 days, all groups of the 3D pellet culture system were cultured with a chondrogenic medium for 21 days. Alcian blue staining and Dimethylmethylen Blue (DMMB) analysis were established on the 6th day of monolayer culture systems. In 3D pellet culture systems, we performed alcian blue staining and Dimethylmethylen Blue (DMMB) analysis besides were determined COL2A1- ACAN expressions by immunohistochemistry method.

Results: In both monolayer culture and 3D pellet culture systems, which are models of ADSCs chondrogenesis, the combined use of TGF β 1, TGF β 2 and FGF2 had a positive effect on the formation of the cartilage matrix.

Conclusion: The application of TGF β 1, TGF β 2 and FGF2 of certain durations and combinations to ADSCs culture system positively supports the in vitro chondrogenesis model.

Key words: ADSCs, TGF β 1, TGF β 2, FGF2 *in vitro* chondrogenesis

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
2.2. Eklem Kıkırdağının Yapısı	4
2.2.1. Kondrosit	5
2.2.2. Su	6
2.2.3. Kollajen	7
2.2.4. Proteoglikanlar	7
2.3. Eklem Kıkırdağı Tabakaları	8
2.3.1. Yüzeyel Zon	8
2.3.2. Geçiş Zonu (Orta Zon)	9
2.3.3. Derin Zon	9
2.3.4. Tidemark	10
2.3.5. Kalsifiye Zon	11
2.4. Eklem Kıkırdağı Ekstraselüler Matriksi ve Kondrosit Mikroçevresi	11
2.4.1. Periselüler Matriks	11
2.4.2. Territorial Matriks	11
2.4.3. İnterterritoryal Matriks	12
2.5. Günümüz Tedavi Yöntemleri	12
2.6. Kök Hücre	16
2.6.1. Mezenkimal Kök Hücre	17
2.6.2. Mezenkimal Kök Hücre Belirteçleri	18
	iii

2.6.3. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları	18
2.7. Adipoz Doku	19
2.7.1. Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler	19
2.7.2. Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü	20
2.7.3. Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu	20
2.7.4. Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrenin Kondrosite Farklanması	21
2.8. Büyüme Faktörleri	22
2.8.1. Dönüştürücü Büyüme Faktörü – beta (TGF β)	23
2.8.2. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	24
2.9. Hipotez	25
GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler Çoğaltılması	28
3.2. AKMKH’lerin 12 Kuyucuklu Petri Kültür Kaplarına Ekim ve Kültürü	29
3.3. AKMKH’lerin 12 Kuyucuklu Kültür Kaplarında Büyüme Faktörleri ile Kültürü	29
3.4. Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde Hücre- Matriks Kompozisyonunun Alsiyan Mavisi ile Belirlenmesi	31
3.5. Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde Hücre- Matriks Kompozisyonunun Dimethylmethylen Blue (DMMB) Yöntemi ile Belirlenmesi	32
3.6. Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinden Pellet Kültürlerin ve Grupların Oluşturulması	34
3.7. Pellet Kültürlerinde Hücre- Matriks Kompozisyonunun Dimethylmethylen Blue (DMMB) Yöntemi ile Belirlenmesi	36
3.8. Kondrojenik Yönlendirmeden Sonra Pellet Kültürlerinin Fiksasyonu ve Takibi	37
3.9. Kondrojeniz Süreci Sonrasında Fiksasyonu ve Takibi Yapılan Pellet Parafin Bloklarında Alsiyan Mavisi ile Boyanması Yöntemi	38

3.10. Kondrojeniz süreci sonrasında oluşacak pellet paraffin bloklarda COL2A1 ve ACAN proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin immnhistokimyasal yöntem ile belirlenmesi	39
3.10. İstatistik Analizler	40
BULGULAR	42
4.1. Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü ve Morfolojisi	42
4.2. Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde Hücre- Matriks Kompozisyonunun Alsiyan Mavisi ile Belirlenmesi	43
4.3. Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde Hücre- Matriks Kompozisyonunun Dimethylmethylen Blue (DMMB) Yöntemi ile Belirlenmesi	45
4.4. Pellet Kültürlerinde Hücre- Matriks Kompozisyonunun Dimethylmethylen Blue (DMMB) Yöntemi ile Belirlenmesi	45
4.5. Kondrojenize Yönlendirilen Pellet Kültür Kesitlerinde Alsiyan Mavisi boyanması	46
4.6. Kondrojenize Yönlendirilen Pellet Kültür Kesitlerinde Hemotoksilen-eozin boyanması	49
4.7. Kondrojenize Yönlendirilen Pellet Kültür Kesitlerinde COL2A1 ve ACAN proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin immnhistokimyasal yöntem ile belirlenmesi	52
TARTIşMA	57
SONUÇ ve ÖNERİLER	64
KAYNAKLAR	66
ZGEÇMİř	73

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. AKMKH'lerin büyüme faktörleri kombinasyonları ile 6 gün boyunca tek tabaka kültüründe oluşturulan gruplar **28**

Tablo 3.2. AKMKH'lerin büyüme faktörleri kombinasyonları ile 21 gün boyunca pellet kültüründe oluşturulan gruplar **28**



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Eklem kıkırdağı moleküler yapısı. Kıkırdak toplam kütlesinin %2-5'ni kondrositler oluşturur iken %95-98 ekstraselüler matriks oluşur. Bu ekstraselüler matriksin %20-25 makromolekülleri içerir. Geriye kalan %70-80 interselüler su ve küçük moleküler ağırlıklı iyonlardan oluşur 5

Şekil 2.2. Metabolik aktif kondrositin hücreiçi yapısı (endoplasmik retikulum, ribozom, mitokondri) ve hücre dışı yapısı (matriks, kapsül) elektron mikroskop görüntüsü 6

Şekil 2.3. Eklem kıkırdağı makromolekül organizasyonu; A. Kollajen-agrekan arasındaki etkileşim ve organizasyon B. Pek çok proteoglikan monomeri bağlantı protein ile hyaluronan molekülüne tutunur. Proteoglikan monomeri (agrekan), merkezi protein bağlı kretan sülfat ve kondroitin sülfat monomerlerinden oluşan glikozaminoglikanları oluşturur 8

Şekil 2.4. Yetişkin eklem kıkırdağı zonlarında, kondrosit morfolojisi, kollajen organizasyonu ve matriks kompozisyonu 10

Şekil 2.5. Yetişkin eklem kıkırdağı matriksi ve kondrosit mikroçevresi. Kondrositlerin hemen çevresi periselüler matriks, periselüler matriksin çevresi ise territorial matriks adı verilir. İnterterritoryal matriks boşluklar arasındaki territorial matriksi doldurur 12

Şekil 2.6. Eklem kıkırdağı dejenerasyon tedavisinde klinikte kullanılan ve geliştirilmeye çalışılan prosedürler 13

Şekil 2.7. Eklem kıkırdağı hasarında; mikrokırık, mozaikplasti, OKİ klinikte uygulanan terapiler ve MKH implantasyonu, MKH+ indükleyici faktörleri, MKH+ indükleyici faktörler + Scaffold MKH temelli terapiler şematize edilmiştir 15

Şekil 2.8. Mezenkimal kök hücreler üzerinde yapılan çalışmaların kökeni 17

Şekil 2.9. AMKH'lerin farklanma potansiyeli. Uyarıcı koşullar altında AMKH'ler çeşitli epitelyal, mezenkimal ve endotelyal hücrelere farklanabilir 22

Şekil 2.10. Büyüme faktörlerinin kondrosite farklanmada mezenkimal kök hücre üzerine etkisi gösterilmiştir. Bu şekil, BioRender programı (BioRender, Toronto, Kanada) kullanılarak oluşturulmuştur **23**

Şekil 3.1. Adipoz kaynaklı kök hücrelerin immüno Floresan yöntemi kullanılarak CD29, CD90, CD105, CD45 ve CD34 biyobelirteçleri ile işaretlenmiş görüntüleri (DAPI: mavi; CD29, CD90, CD105, CD45, CD34: kırmızı sinyal) **27**

Şekil 3.2. AKMKH'lerin 12 kuyucuklu kültür kaplarında büyüme faktörleri kombinasyonları ile oluşturulan gruplar ve büyüme faktörü uygulama süreleri. Bu şekil, BioRender programı (BioRender, Toronto, Kanada) kullanılarak oluşturulmuştur **30**

Şekil 3.3. Tek tabakalı hücre kültüründe ilk 6 günlük deney sonunda alsiyan mavisi boyaması yapılan gruplar ve deney düzeneği. Bu şekil, BioRender programı (BioRender, Toronto, Kanada) kullanılarak oluşturulmuştur **32**

Şekil 3.4. Tek tabakalı hücre kültüründe ilk 6 günlük deney sonunda DMMB analizi yapılan gruplar ve deney düzeneği. Bu şekil, BioRender programı (BioRender, Toronto, Kanada) kullanılarak oluşturulmuştur **33**

Şekil 3.5. Tek tabakalı hücre kültüründen pellet kültürlerinin ve gruplarının oluşturulması diyagramı. Bu şekil, BioRender programı (BioRender, Toronto, Kanada) kullanılarak oluşturulmuştur **35**

Şekil 3.6. Pellet kültürü fiksasyonu, pellet kültür takibi ve parafine gömme işlemi gerçekleştirilerek paraffin blok oluşturma diyagramı. Bu şekil, BioRender programı (BioRender, Toronto, Kanada) kullanılarak oluşturulmuştur **38**

Şekil 4.1. AKMKH'lerin pasaj 2 de (a) 24, (b) 48, (c) 72, (d) 96 saatlerde hücre morfolojisi ve çoğalma süresi gösterildi **43**

Şekil 4.2. Tek tabaka kültürde büyüme faktörleri ile oluşturulan grupların 6 günlük kültür sonunda alsiyan mavisi ile boyanmış görüntüleri. Grup4 diğer gruplara göre daha yoğun bir boyanma tespit edildi **44**

Şekil 4.3. Tek tabaka kültürde büyüme faktörleri ile oluşturulan grupların 6 günlük kültür sonunda DMMB analizi	45
Şekil 4.4. Pellet kültürde büyüme faktörleri ile oluşturulan grupların 21 günlük kültür sonunda DMMB analizi	46
Şekil 4.5. 3B Pellet kültürü 21. gün kesitlerinde alsiyan mavisi boyanması görüntüleri	48
Şekil 4.6. 3B Pellet kültürü 21. gün kesitlerinde alsiyan mavisi histolojik boyama yoğunluğu ile ilişkili Image-J analizi bulgularına ait grafik	49
Şekil 4.7. 3B Pellet kültürü 21. gün kesitlerinde hemotoksilen-eozin boyanması görüntüleri	51
Şekil 4.8. 3B Pellet kültürü 21. gün kesitlerinde COL2A1 ifadesinin immünohistokimyasal görüntüleri	52
Şekil 4.9. 3B Pellet kültürü 21. gün kesitlerinde COL2A1 immunoboyanması yoğunluğu ile ilişkili Image-J analizi bulgularına ait grafik	53
Şekil 4.10. 3B Pellet kültürü 21. gün kesitlerinde ACAN ifadesinin immünohistokimyasal görüntüleri	54
Şekil 4.11. 3B Pellet kültürü 21. gün kesitlerinde ACAN immunoboyanması yoğunluğu ile ilişkili Image-J analizi bulgularına ait grafik	55

SİMGELER ve KISALTMALAR

ECM	: Ekstraselüler Matriks
OKİ	: Otolog Kondrosit İmplantasyonu
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
AKMKH	: Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
AMKH	: Adipoz Mezenkimal Kök Hücre
KİMKH	: Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
3B	: Üç Boyut
PG	: Proteoglikan
YZ	: Yüzeyel Zon
GAG	: Glikozaminoglikan
PRP	: Tromposit Zengin Plazma
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
OA	: Osteoartrit
CFU-F	: Fibroblast Koloni Oluşturan Birim
ISCT	: Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği
TGF-β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü – Beta
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
kDa	: Kilo Dalton

MAPK	: Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinaz
SPK/ JNK	: Protein Kinaz/ c-jun NH2 Terminal Kinaz
ERK	: Hücre Dışı Sinyal Düzenleyen Kinaz
DMMB	: Dimethylmethylen Blue



GİRİŞ

Eklem kıkırdağı, eklemleri oluşturan kemiklerin uçlarını örten ince, parlak ve kaygan bir doku olup, eklem hareketi sırasında sürtünmeyi en aza indiren bir yapıdır. Diz eklem kıkırdağı ise vücudun tüm yükünü taşıyan, diz eklem bölgesinde yer alan iki uzun kemiğin birleştiği alanda yer almaktadır. Diz eklem kıkırdağı hiyalin tip kıkırdak yapısına sahip olup dokuya özgü kondrosit adı verilen hücrelerden ve bu hücreler tarafından üretilen ekstraselüler matriksten (ECM) oluşmaktadır. Kondrosit hücreleri ve ECM yapısı kıkırdak dokuya özel bir mimari kazandırmaktadır. Eklem kıkırdağının kan damarları, lenf kanalları ve sinir sistemi ile bağlantısı bulunmamaktadır. Hücrelerin besin ve oksijen alışverişinin difüzyon yolu ile sağlanmasından dolayı oldukça düşük bir çoğalma kapasitesine sahiptirler. Buna bağlı olarak yaşlanma, hastalık, aşırı mekanik yüklenme, travma gibi çeşitli nedenlerden dolayı oluşan hasarlarda eklem kıkırdağının kendini yenileme kapasitesi oldukça sınırlıdır.

Eklem kıkırdağı yüzeyinde oluşan travmatik lezyonlar kronik dejenerasyonlara ve zamanla kıkırdağın tamamen ortadan kalkmasına sebep olabilmektedir [1]. Eklem kıkırdağı tedavisi için klinikte uygulanan yöntemler oldukça kısıtlıdır. Klinikte en sık kullanılan cerrahi yöntemlerden bir tanesi mikrokirik yöntemidir. Bu prosedürde, uyarılan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri defektli eklem kıkırdağı yüzeyine göç ederek farklanırlar. Fakat bu farklanma sonucunda hiyalin tip kıkırdak yerine fibröz tip kıkırdak meydana gelir [2]. Oluşan fibröz tip kıkırdak, hiyalin tip kıkırdak fonksiyonlarını tam olarak yerine getirememekte ve zamanla kıkırdak kaybı yaşanmaktadır. Hücre temelli tedavi yöntemleri arasında ise oldukça tercih edilen otolog kondrosit implantasyonu (OKİ) tekniği birkaç aşamalı bir prosedüre sahiptir. Hem donör alanının kısıtlı olması hem de izole edilen hücrelerin farklanma süreçlerinin kontrolünün zorluğu sebebi ile tedavi prosedürleri için farklı kök hücre kaynaklarına yönelilmiştir [3]. Eklem kıkırdağı tedavisinde kullanılan *in vivo* / *in vitro* yöntemlerin amacı *in vivo*'ya benzer şekilde bir kıkırdak elde etmektir. Fakat literatürde bugüne kadar yapılan çalışmalar arasında fonksiyonel bir kıkırdak henüz elde edilememiştir. Buna bağlı olarak hücre temelli yaklaşımlar (özellikle mezenkimal kök hücreler), doğal ve doğal olmayan polimerlerle kurulan hücre iskeleleri ve doğal kıkırdak mikroçevresi taklitleri halen geliştirilmekte olan temel çalışmalar arasında yer

almaktadır [4]. Hücre temelli kıkırdak yenilenmesi protokollerinde, mezenkimal kök hücre (MKH) tedavileri gelişmekte olan önemli bir tedavi yöntemidir.

MKH'ler erişkin hücreler olup, multipotent hücreler olarak tanımlanmaktadırlar. MKH'ler *in vitro* da; morfolojik olarak fibroblastlara benzerler, kemik, yağ ve kıkırdak gibi üç temel dokuya farklılıklar ve plastik yüzeye yapışma özelliği gösterirler. Mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kemik iliği, yağ dokusu, periferik kan, diş pulpası, perinatal ve fetal kaynaklar gösterilmektedir [5].

Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AKMKH), ağır invaziv cerrahi yöntemler kullanılmadan elde edilebilmektedir. Bu sebeple AKMKH'lerin uygulama protokollerinde etik sınırlamalar yoktur ve ciddi risk komplikasyonları düşüktür [6]. AKMKH'lerin telomeraz aktiviteleri de yüksektir buna bağlı olarak bölünme safhalarında DNA stabilitesi korunur. Aynı zamanda immünsüpresif özellikleri de mevcuttur [6]. AKMKH'ler ile yapılan *in vitro* deneyler bu hücrelerin kondrosite farklılaşma kapasitesinin kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelere (KMKH) benzer olduğunu göstermiştir. Bu sebeplerle, klinikte kıkırdak doku hücresel tedavi yaklaşımları alanında oldukça önemli bir kaynağı oluşturmaktadırlar.

Eklem kıkırdağı homeostazısı, hidrostatik basınç, gerilim kuvveti; proenflamatuar sitokinler ve birçok büyüme faktörü tarafından düzenlenir. Mezenkimal kök hücrelerin *in-vitro* kondrogeniz kültür prosedürleri, *in-vivo* süreçteki embriyonik gelişimin farklılaşma süreci taklit edilerek oluşturulmaya çalışılmaktadır. Örneğin büyüme faktörleri kullanılarak, kıkırdak doku oluşumu sürecindeki basamaklar olan öncül hücrelerin çoğalması, göçü, farklılaşması ve olgunlaşması taklit edilerek *in-vivo*'ya en yakın kıkırdak doku oluşumu sağlanmaya çalışılmaktadır [7-9]. Büyüme faktörlerinden, TGF- β süper ailesi embriyonik kıkırdak doku gelişimi sürecinde immatür hücrelerin kıkırdağa farklılaşmasını tetiklemektedir. Benzer şekilde FGF büyüme faktörü sinyalleride embriyonik gelişimde önemli bir rol alarak MKH'lerin kendini yenilemesini destekleyerek, proliferasyonunu arttırmaktadırlar. Yapılan çalışmalarda farklı büyüme faktörlerinin etkileri test edilmiş olsa da etkin büyüme

faktörleri kombinasyonları dolayısıyla uygun mikroçevre içeriği literatürde halen tanımlanmış değildir.

İnsan eklem kıkırdağı hücrel tedavi süreçlerinde AKMKH'lerin hücre kaynağı olarak kullanımları, farklı kaynaklardan elde edilen MKH'lere göre daha kaliteli bir eklem kıkırdağı matriksi elde edilmesi sürecine katkı sağlayabilir. AKMKH'lerin kıkırdak dokuya farklanması ile ilgili çalışmalar literatürde yer almakla birlikte, bu çalışmalar genel olarak diğer kök hücre kaynakları ile karşılaştırma ve büyüme faktörleri denemesi şeklindedir. Ancak AKMKH'lerin TGF- β 1, TGF- β 2 ve FGF2 büyüme faktörlerinin kombinasyonları ile uygun bir mikroçevre oluşturularak daha iyi kalitede kıkırdak matriksi eldesi ile ilgili bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, TGF β 1, TGF β 2 ve FGF2 büyüme faktörlerinin farklı kombinasyonlarının bu hücreler üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma ile adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler TGF β 1, TGF β 2 ve FGF2 ile belirli süre ve kombinasyonlarda muamele edilerek tek tabakalı hücre kültürü ve 3B (3 boyutlu) pellet kültürü grupları oluşturuldu. 6. gün tek tabakalı hücre kültüründe oluşturulan gruplarda alsiyan mavisi boyaması ve DMMB analizi ile kıkırdak matriks bileşeni olan GAG miktarları belirlendi. 21. gün 3B pellet kültüründe; DMMB analizi ve alsiyan mavisi boyaması yöntemleri ile GAG ve immünohistokimyasal yöntem ile COL2A1 ve ACAN protein ekspresyon düzeyleri değerlendirildi. Bu çalışmanın sonuçları doğrultusunda; farklı büyüme faktörlerinin kombinasyonlarının *in vitro* kondrojeniz sürecindeki etkinliğini ortaya koyarak, tek tabakalı hücre kültürü ve 3B pellet kültür sisteminde hücre organizasyonundaki moleküler süreçlerin aydınlatılması ve kaliteli bir kıkırdak matriksi üretimi için uygun kültür ortamlarının geliştirilmesi için yeni araştırmalara önemli katkılar sağlayacaktır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Kıkırdak Doku

Kıkırdak, kondrosit hücrelerinden ve ekstraselüler matriksten oluşan bir bağ dokusu formudur. Kıkırdak doku damarsız, sinirsiz ve matriks/hücre hacim oranı yüksek bir dokudur. Kondrositler, dokunun mimari yapısına bakıldığında az bir kısmını oluştururken, matriksin devamlılığı için oldukça önem taşımaktadırlar.

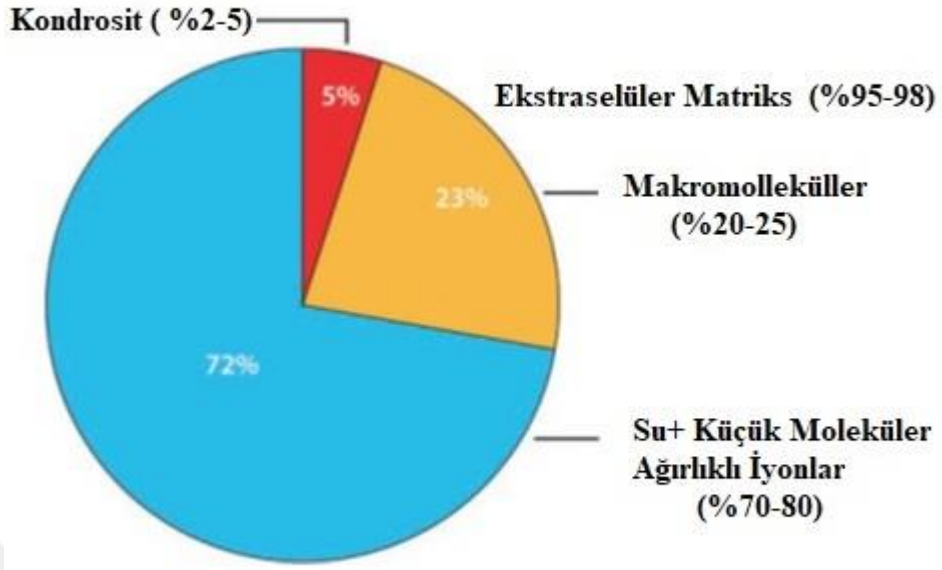
Matriks miktarına ve matriks içerisinde gömülü olan kollajen ve elastik fibrillerin yoğunluğuna göre insan vücudunda; elastik, fibröz ve hiyalin kıkırdak olmak üzere 3 ana tip kıkırdak dokusu mevcuttur. İnsan vücudu anatomik olarak incelendiğinde iki uzun kemiğin birleştiği bölgede kemik uçları hiyalin tip kıkırdak ile kaplı olup özel bir terim olan 'eklem kıkırdağı' adını alır.

2.2. Eklem Kıkırdağının Yapısı

İki uzun kemiğin birleştiği yerde kemik uçlarını kaplayan ince, kaygan ve parlak bir dokudur Diz eklem kıkırdağı ise vücudun tüm yükünü taşıyan dizlerde bulunur, damarsız, sinirsiz ve alenfatik bir yapıya sahiptir [10, 11]. Eklem kıkırdağı, oldukça özelleşmiş ekstraselüler matriks ve kondrosit hücrelerinden oluşur. Eklem kıkırdağında damar ağı bulunmaması nedeni ile ekstraselüler matriksin yapısı kondrositlerin hayatta kalması için çok önemlidir.

Kondrositleri çevreleyen ekstraselüler matriks bileşenleri ise; su, proteoglikanlar, kollajenler, ve kollajen olmayan proteinlerden oluşur Eklem kıkırdağının moleküler yapısı ise, ıslak ağırlığının %70-80'i proteoglikan kümelerine bağlı interselüler su içermektedir. Toplam hacminin yaklaşık %20-25'i kollajen, proteoglikan ve glikoproteinler gibi makromoleküllere aittir. Kondrositler, eklem kıkırdağının toplam hacminin sadece %2-5'ini oluşturur (Şekil 2.1).

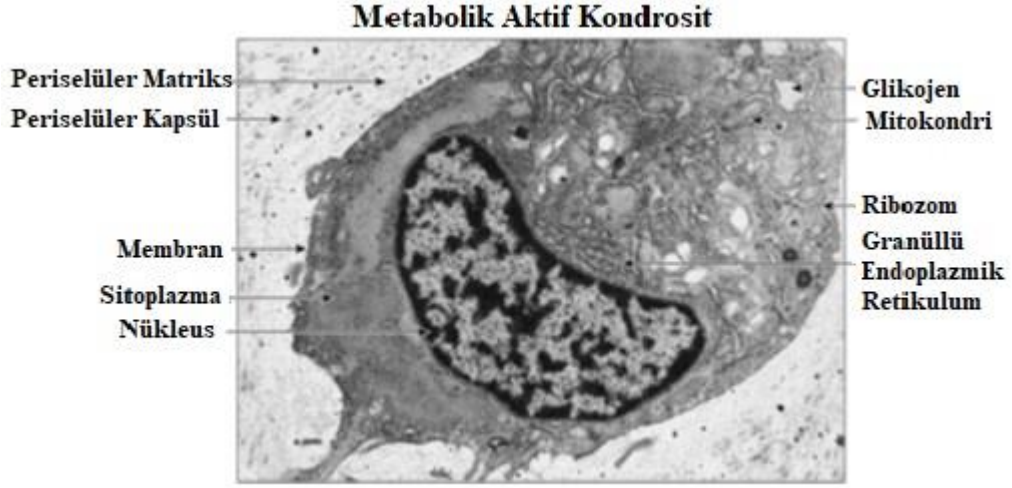
Eklem Kıkırdağı Moleküler Yapısı



Şekil 2.1. Eklem kıkırdağı moleküler yapısı. Kıkırdak toplam kütleinin %2-5’ni kondrositler oluşturur iken %95-98 ekstraselüler matriks oluşur. Bu ekstraselüler matriksin %20-25 makromolekülleri içerir. Geriye kalan %70-80 interselüler su ve küçük moleküller ağırlıklı iyonlardan oluşur [12].

2.2.1. Kondrosit

Kondrositler, kıkırdak matriksi boyunca laküna adı verilen boşluklar içerisine yerleşmişlerdir. Kondrositler, ekstraselüler matriksin devamlılığı, yenilenmesi ve gelişiminde önemli rol oynayan metabolik olarak aktif hücrelerdir [11]. Kondrositler mezenkimal kök hücrelerden köken alırlar ve eklem kıkırdağının total hacminin %2’sini oluştururlar [13]. Kondrositler eklem kıkırdağının, anatomik bölgelerine bağlı olarak farklı şekilde, sayıda ve büyüklükte olabilirler (**Şekil 2.2.**).



Şekil 2.2. Metabolik aktif kondrositin hücre içi yapısı (endoplasmik retikulum, ribozom, mitokondri) ve hücre dışı yapısı (matriks, kapsül) elektron mikroskop görüntüsü [12].

Her bir kondrosit özel bir mikroçevre oluşturur ve yakın çevresindeki ekstraselüler matriksin üretiminden de sorumludur. Bu mikroçevre kondrositin, kendi matriksi içinde, farklı kıkırdak zonları arasında göçünü sağlar [11]. Böylece, kondrositler hücreler arası iletişimi ve direk sinyal bağlantısını bu şekilde sağlamış olurlar.

Kondrositlerin metabolik ihtiyaçları kıkırdak zonlarına göre farklılık göstermektedir. Yüzeyel zon kondrositleri derin zon kondrositlerinden farklı oranlarda proteoglikan ve agrekan sentezi gerçekleştirirler.

2.2.2. Su

Su, kıkırdak dokunun yaş ağırlığının %80'nini oluşturmaktadır. Bu suyun yaklaşık %30'u kollajen içerisindeki intrafibriller boşlukla ilişkili olmasına rağmen hücre içi boşluklarda çok az miktarda su bulunur. Suyun geri kalan kısmı ise ekstraselüler matriksin boşluklarını doldurur [14, 15]. Sodyum, kalsiyum, klorid ve potasyum gibi inorganik iyonlar kıkırdak dokusundaki suda çözünür. Su konsantrasyonu, derin zonda %65 iken, yüzeyel zonda %80 kadardır. Bu sebeple yük-bağımlı deformasyonlar önlenabilir. Eklem kıkırdağı boyunca kıkırdak yüzeyine doğru sıvı akışı ile kondrositlerin beslenmesi sağlanır.

2.2.3. Kollajen

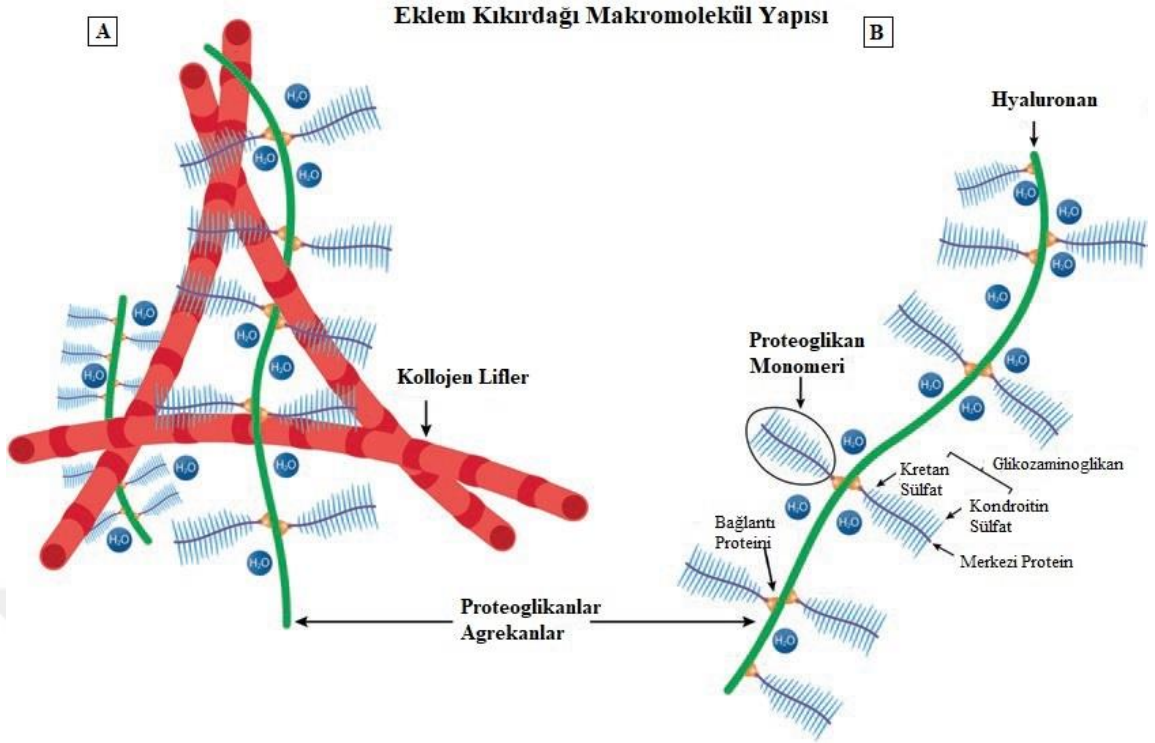
Kollajenler bir prokollajen molekülü olarak kondrositlerden tarafından salgılanan ana matriks proteinlerinden biridir. Kıkırdak dokunun kuru ağırlığının %60'nı oluşturur. Ekstraselüler matrikste yer alan kollajen ağın %90-95'ni TipII kollajen temsil etmektedir. Doku boyunca uzanan bu TipII kollajen ağı proteoglikan agregatlarını sararak dokunun bütünlüğünü sağlamak üzere fibriller ve fiberler oluşturmaktadır [11]. Tip I, IV, V, IX, ve XI kollajen türleri, tipII kollajen fibril ağının üç boyutlu yapısını ve devamlılığını korumayı sağlar.

Kıkırdak bütünlüğü ve gerilim kuvvetine dayanıklılığı kollajenlerin sahip olduğu yaygın çapraz bağlar ve fibriller mimari sayesinde sağlanır. Bu fibriller mimari, en az 29 farklı polipeptid zincirinden 15 farklı kollajen türünden oluşmaktadır. Kollajen fibriller üç α zincirinin heliks yaparak oluşturduğu yapılardır. Bu şekilde oluşturulan çatı kıkırdak matriksinin temel mimarisini oluşturur (**Şekil 2.3.**).

2.2.4. Proteoglikanlar

Proteoglikanlar (PG) yüksek oranda glikozillenmiş protein monomerleridir. Eklem kıkırdağında, ekstraselüler matriksin ikinci büyük makromolekölüdür ve kuru ağırlığının %10-%15'ni oluştururlar [11]. Proteoglikanlar, bir veya daha fazla doğrusal glikozaminoglikanın (kondroidin-4 sülfat, kondroitin-6 sülfat) proteinler ile kovalent bağ kurması sonucu oluşurlar. Eklem kıkırdağı, agrekan, dekorin, biglikan ve fibromodulin gibi çeşitle proteoglikan monomerlerini de içerir.

Eklem kıkırdağının en önemli proteoglikanı agrekandır. Moleküler ağırlığı 250 kilodaltondur. Her molekül yaklaşık 100 kondroitin sülfat zinciri ve 60'a yakını keratan sülfat molekülü içermektedir. Agrekan molekülleri sülfat gruplarının bulunması nedeni ile yüksek negatif yüklüdür ve su moleküllerine afinite gösterirler. Doğrusal hyaluronan molekülü yüksek sayıda agrekan molekülü ile ilişkilidir. Agrekan monomerleri (proteoglikan monomeri) hyaluronan molekülüne bağlantı proteinleri ile molekülün N-terminalinden bağlanarak proteoglikan kümelerini oluşturur [12]. Bu proteoglikan kümeleri elektrostatik etkileşim ile kollajen matriks fibrillerine ve çoklu yapışkan glikoproteinlerine bağlanır (**Şekil 2.3.**).



Şekil 2.3. Eklem kıkırdağı makromolekül organizasyonu; A. Kollajen-agrekan arasındaki etkileşim ve organizasyon B. Pek çok proteoglikan monomeri bağlantı protein ile hyaluronan molekülüne tutunur. Proteoglikan monomeri (agrekan), merkezi protein bağlı kretan sülfat ve kondroitin sülfat monomerlerinden oluşan glikozaminoglikanları oluşturur [12].

Dekörin, biglikan, fibromodulin gibi matrikste bulunan diğer proteoglikanlar küme oluşturmazlar. Bu proteoglikanlar diğer moleküllere bağlayarak matriksin stabil hale getirilmesini sağlarlar [11].

2.3. Eklem Kıkırdağı Tabakaları

Eklem kıkırdağı, eklem boşluğuna bakan eklem yüzeyinden, tidemark yapısına kadar mikroskopik olarak farklı bölgeler içerir (**Şekil 2.4.**). Eklem kıkırdağı incelendiğinde; ECM makromolekül bileşenleri, kollajen mimarisi, kondrosit büyüklüğü, şekli ve metabolik aktivitesi, hücresel yoğunluğun düzenlenişine göre dört farklı bölgeye ayrılır: (a) yüzeysel zon, (b) orta ya da geçiş zonu, (c) derin ya da radial zon. (d) kalsifiye zon.

2.3.1. Yüzeysel Zon

Yüzeysel zon (YZ), lamina splendens veya zon-1 olarak da adlandırılan bölgedir. YZ 200µm kalınlığındadır ve total eklem kıkırdağının %10-20'sini oluşturur (**Şekil 2.4.**).

YZ, eklem yüzeyine paralel konumlanmış küçük, düz veya elips şekilli kondrositlerle karakterizedir. TipII kollajen fiberler yüzeye paraleldir. Eklem kıkırdağı YZ kondrositleri tarafından proteoglikan bileşenleri daha az üretilir.

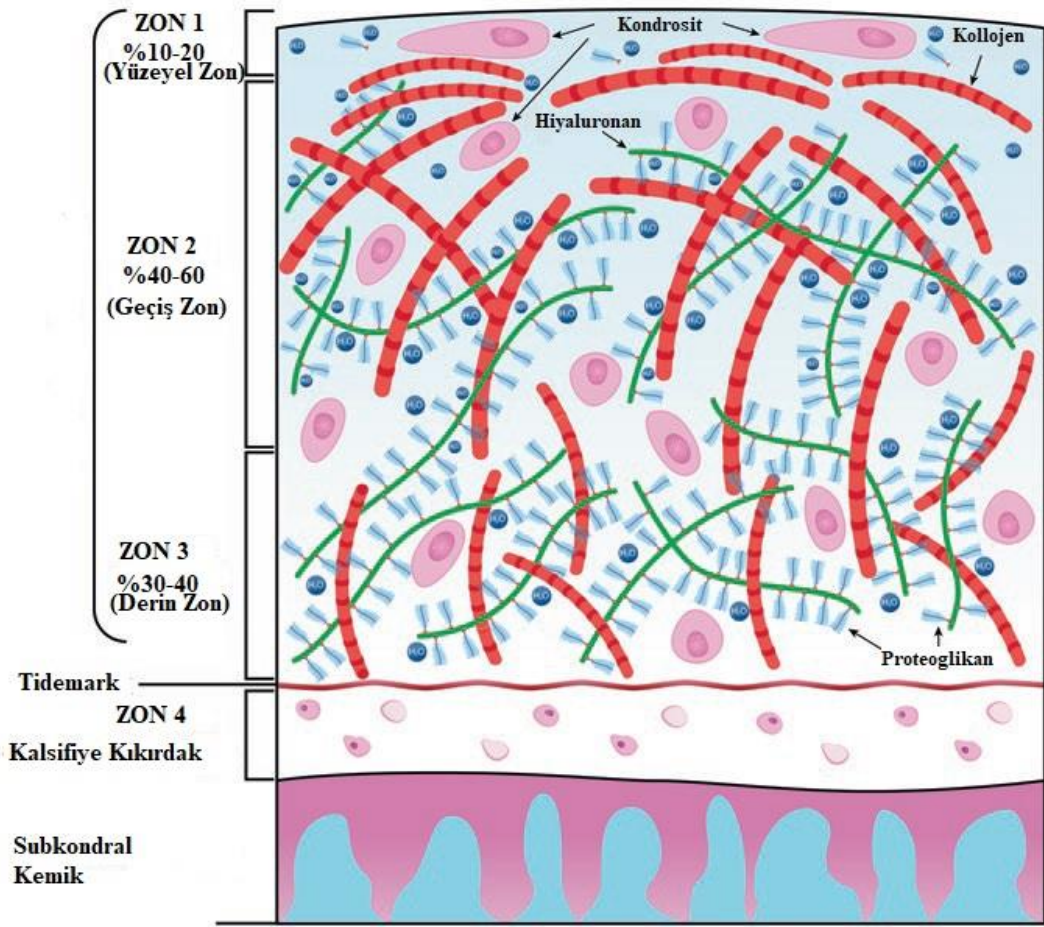
Normalde YZ iki alt tabakadan oluşur. Kondrosit içermeyen lamina eklem yüzeyini oluşturmakta iken altta ince bir kollajen ağı ile glikozaminoglikan (GAG) molekülünden oluşur. Bu alt laminanın özelliği düz kondrositler ve kollajen liflerinden (%80 tipII, %10 tipIX ve %10 tip XI kollajen) meydana gelmektedir [16] [17] [18].

2.3.2. Geçiş Zonu (Orta Zon)

Geçiş zonu, yüzeyel zonun hemen altında yer alır. Eklem kıkırdağı kalınlığının %40-60'nı oluşturur. Geçiş zonunda kondrosit hücreleri daha yuvarlak ve kıkırdak yüzeyine dik uzun eksen boyunca rastgele dağılmıştır (**Şekil 2.4.**). TipII kollajen fibril demetleri geçiş zonunda eğik bir geçiş ağı (oblik ağ) oluşturur [12]. ECM daha az kollajen fiber içerirken daha çok proteoglikan içerir.

2.3.3. Derin Zon

Derin zon veya radial zon olarak adlandırılır. Bu zon, geçiş zonunun altında yer alır ve tidemark adı verilen düzgün olmayan dalgalı bir yapıyla sonlanır. Eklem kıkırdak kalınlığının %30-40'nı oluşturur. Kondrosit hücreleri geçiş zonundaki gibi yuvarlaktır fakat eklem kıkırdağı yüzeyine dik konumda sütunlar şeklinde dizilmiştir (**Şekil 2.4.**). Bu zon geniş çaplı kollajen fibrilleri (40-80 nm) ve bol miktarda proteoglikan içermektedir.



Şekil 2.4. Yetişkin eklem kıkırdağı zonlarında, kondrosit morfolojisi, kollajen organizasyonu ve matriks kompozisyonu [12].

2.3.4. Tidemark

Kalsifiye olmayan kıkırdak ile kalsifiye kıkırdak arasında yer alan 2-5 μm kalınlığında, yoğun bazofilik kalsifiye çizgi “tidemark” olarak adlandırılır (**Şekil 2.4.**). Tidemark çizgisi genellikle iskelet gelişimi ile gözlemlenir olgunlaşmamış kıkırdak yapısında bulunmamaktadır. Yetişkinlerde tidemark çizgisi, kondrosit hücrelerinin aktivitesinden (yükleme ve çekme) köken almaktadır [19]. Tidemark yapısı, kalsifiye olmamış kıkırdak matriksi ve tipII kollajen yapısından oluşan dinamik bir yapıdır [20].

2.3.5. Kalsifiye Zon

Kalsifiye kıkırdak zonu aynı zamanda 4. zon olarak adlandırılır ve yaklaşık olarak 100-250 µm kalınlığındadır. Kalsifiye kıkırdak tidemark ve subkondral kemik arasında yer alır (**Şekil 2.4.**). Konumu sayesinde kalsifiye olmayan kıkırdak ve kemik arasında sıkı bir bağ oluşturur [20]. Kalsifiye kıkırdak, yoğun kalsifiye matriks içine gömülmüş yuvarlak ve oldukça küçük kondrositler ile karakterizedir. Bu kondrositler kollajen liflerle çevrelenmiştir ve alkalen fosfataz pozitif hücrelerdir [19]. Kalsifiye kıkırdak yapısal olarak tipII kollajen yanında osteoid dokudaki osteoblastlar tarafından tipI kollajende içermektedir.

2.4. Eklem Kıkırdağı Ekstraselüler Matriksi ve Kondrosit Mikroçevresi

Eklem kıkırdağı ECM'si, kondrosit hücreleri tarafından üretilir ve devamlılığı sağlanır. ECM içinde laküna adı verilen boşluklarda bulunan kondrositler tek tek ya da izogen gruplar adı verilen kümeler halinde dağılmışlardır. Yeni bölünen kondrositler kendini çevreleyen matriks materyalini ürettikçe birbirinden uzaklaşır. Kondrosit hücresinin mikroçevresindeki matriks boyanma özelliklerine göre kapsüller (periselüler) matriks, teritoryal matriks ve interteritoryal matriks olmak üzere üç alana ayrılmıştır (**Şekil 2.5.**).

2.4.1. Periselüler Matriks

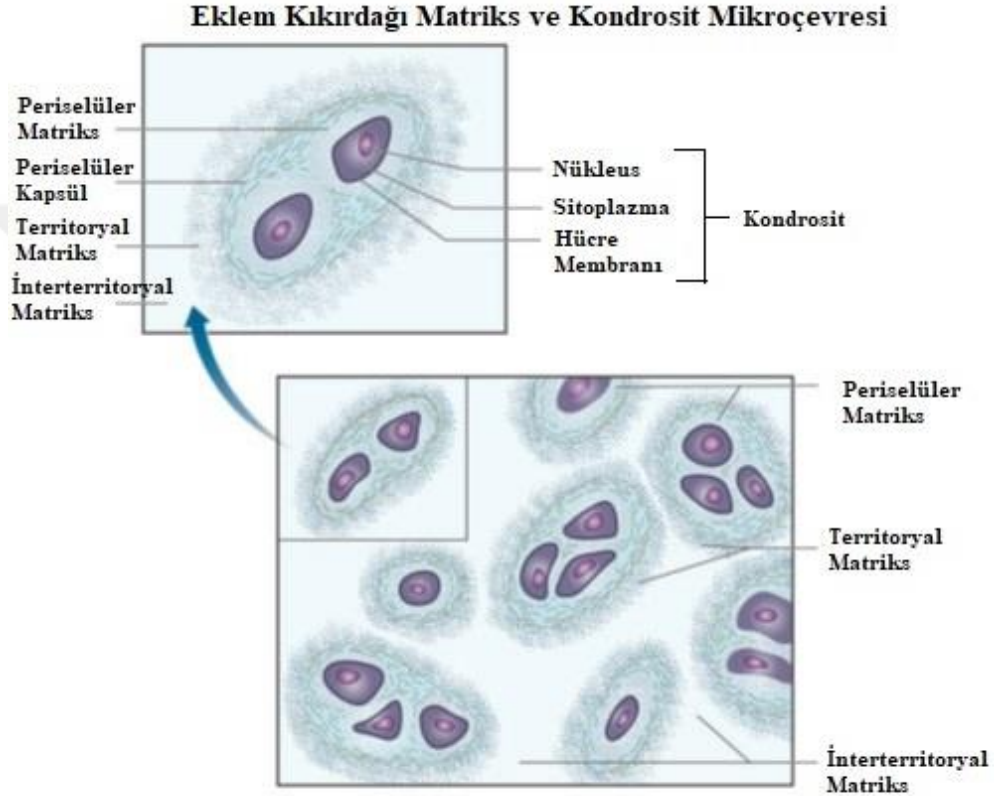
Kondrositlerin hemen çevresini saran matrikstir. Periselüler matriks proteoglikanlar, tipVI fibriller kollajen ile karakterizedir. Aynı zamanda perlekan, hyaluronan, agrekan monomerleri, biglikanları da içerir. Periselüler matriksteki tipVI fibriller kollajen kondrosit etrafını sararak bir kapsül oluşturur. TipVI kollajen kondrosit yüzeyindeki integrin moleküllerine bağlanarak hücreyi matrikse sabitlet (**Şekil 2.5.**).

2.4.2. Territorial Matriks

İzogen gruplarını çevreleyen matrikstir. Territorial matriks, tipII kollajen fiberleri ağı, proteoglikanlar ve fibronektin ile karakterizedir. Territorial matrikste PG'lar ve kollajen lifleri dairesel konumlanmıştır. Böylece kondrositler, ince sitoplazmik alanları genişleterek teritoryal kollajen lifleri ile bağlantı kurar. Tip IX kollajen sülfatlanmış proteoglikanları azda olsa içermektedir (**Şekil 2.5.**).

2.4.3. İnterteritoryal Matriks

İnterteritoryal matriks, teritoryal matriksi çevreleyen ve arasındaki boşlukları kaplayan matrikstir. Bu sebeple eklem kıkırdağı ECM'nin en büyük alanını oluşturur. İnterteritoryal matrikste paralel uzunlamasına konumlanmış kollajen lifleri arasında çeşitli konsantrasyonda agrekan, versikan, PG'lar, bağlantı proteinleri ve ECM'nin diğer elemanları bulunmaktadır (Şekil 2.5.).

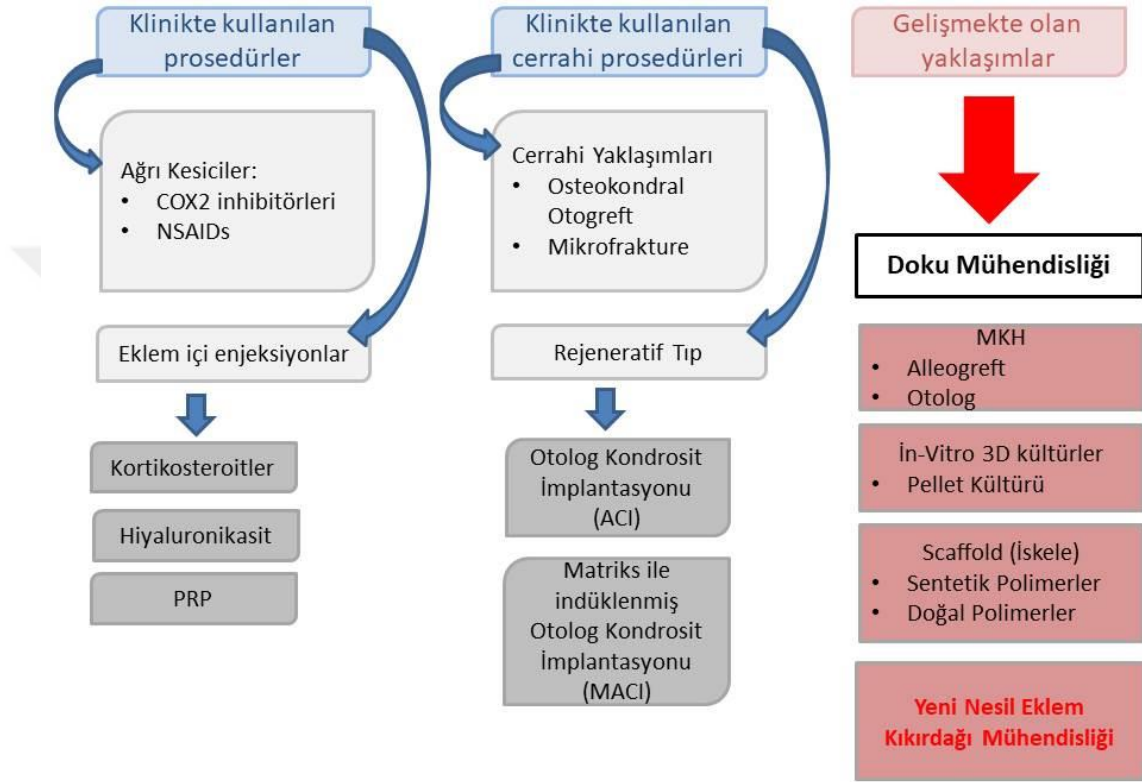


Şekil 2.5. Yetişkin eklem kıkırdağı matriksi ve kondrosit mikroçevresi. Kondrositlerin hemen çevresi periselüler matriks, periselüler matriksin çevresi ise territorial matriks adı verilir. İnterteritoryal matriks boşluklar arasındaki territorial matriksi doldurur [12].

2.5. Günümüz Tedavi Yöntemleri

Kıkırdak dejenerasyonu, eklem ağrılarının en büyük sebebidir. Kıkırdak dejenerasyonu özellikle yaşlanma (65 yaş üstü bireylerde) ile birlikte artmaktadır [21]. Yaşlanmanın yanı sıra, kalıtsal faktörler, yıpranma/aşınma gibi mekanik etkiler ve kemik/eklemleri etkileyen hastalıklar kıkırdak dejenerasyonunun sebeplerindendir. Kıkırdak dokunun, kondrositlerin düşük metabolik aktiviteleri, kompleks yapısı, aşırı hidrate olması, damarsız ve sinirsiz bir doku olmasından dolayı kendini yenileme

kapasitesi oldukça sınırlıdır. Bu nedenle, eklem kıkırdağının *in vivo* ve *in vitro* yeniden yapılanması sayısız tedavi yaklaşımlarının amaçlarından birisidir fakat bugüne kadar başarı sınırlıdır. Tedavi yaklaşımları üç ana katagoriye ayrılabilir; i) semptomatik tedavi, ii) klinikte kullanılan cerrahi prosedürler iii) gelişmekte olan prosedürler (Şekil 2.6.) [4].



Şekil 2.6. Eklem kıkırdağı dejenerasyon tedavisinde klinikte kullanılan ve geliştirilmeye çalışılan prosedürler [4].

Klinikte kullanılan semptomatik tedaviler ağrı kesici ilaçlar ve eklem içi enjeksiyonlardır. Ağrı kesici olarak; COX2 inhibitörleri, seçici olmayan nonsteroid anti-inflamatuar içerikli ilaçlar kullanılmaktadır. Eklem içi enjeksiyonlardan; kortikosteroid, hyaluronik asit, trombosit zengin plazma (PRP) tedavileri yer almaktadır. Eklem içine enjekte edilen kortikosteroidin, çalışmalarda eklem ağrıları üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir [22]. Eklem içi hyaluronan enjeksiyonu yirmi yıl önce Amerike Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Daire (FDA) tarafından onaylanmıştır. Fakat osteoartritli (OA) bireylerde yapılan çalışmalarda hyaluronan tedavisinin çok etkili olmadığı ortaya konmuştur [23]. PRP, çeşitli büyüme faktörleri, proteazlar, doku

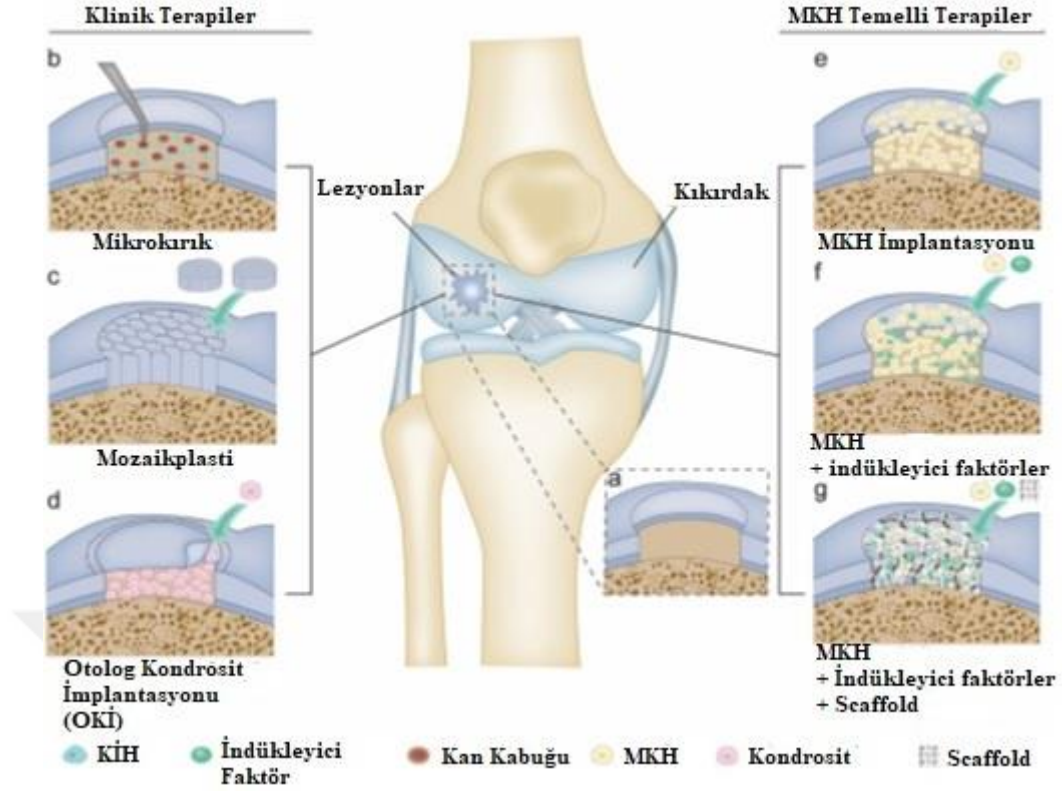
onarımını destekleyen sinyal yollarını aktifleştiren sitokinler ve yüksek oranda trombositleri içeren otolog bir kan ürünüdür [24, 25]. Eklem içi PRP enjeksiyonu hastalarda kısa vadede ağrıyı hafifletse de uzun vadede kesin ve güvenilir klinik kanıt eksikliğinden FDA tarafından OA tedavisi için önerilmemektedir [25].

Kemik iliği sitümülasyonu olan “Mikrokırık” tekniği klinikte sıklıkla kullanılan cerrahi bir yöntemdir [26]. Bu teknikte 3-4 mm aralıklarla 4mm derinlikte tüm eklem kıkırdığı lezyonu boyunca kemiğe kadar küçük deliklerin açıldığı yaygın bir prosedürdür. Böylece kemik iliği mezenkimal kök hücreleri bu defektli bölgeye göç ederek farklanırlar. Fakat bu farklanma sonucunda hiyaline/fibröz kıkırdak karışımı bir doku oluşur ve kıkırdak doku fonksiyonunu yerine getirememektedir [2, 26].

Mozaikplasti veya Osteokondral Graft olarak adlandırılan yöntem 1990’ların başında geliştirilmiştir [27]. Eklem bölgesinde ağırlık binmeyen alanlardan alınmış küçük silindirik parçaların defektli bölgeye transplantasyonunu içeren bir yöntemdir. Bu yöntem kıkırdak yaralanmaları için etkili bir tedavidir, ancak sınırlı kıkırdak alanı, donör komplikasyonları ve enfeksiyon gibi çeşitli komplikasyon riskleriyle ilişkilidir.

Otolog kondrosit implantasyonu (OKİ) eklem kıkırdığı yaralanmalarında klinikte kullanılan hücresel tedavilerdendir. Teknik iki ayrı cerrahi prosedür içerir; İlk olarak eklem kıkırdığının ağırlık binmeyen bir bölgesinden kondrosit izolasyonu gerçekleştirilir, daha sonra *in vitro* ortamda hücrelerin çoğaltılması söz konusudur ve sonrasında yeterli sayıya ulaşan hücreler defektli bölgeye transplante edilirler [28]. Hem donör alanının kısıtlı olması hem de izole edilen hücrelerin farklanma süreçlerinin kontrolünün zorluğu sebebi ile tedavi prosedürleri için farklı kök hücre kaynaklarının elde edilmesinin yolu açılmıştır [3].

Kıkırdak hasarı için etkili klinik tedavilerdeki sınırlamalar rejeneratif tıbbi tedavilerin gelişimini tetiklemiştir. Kök hücreler proliferasyon ve farklanma yeteneklerinden dolayı rejeneratif tıbbın çeşitli alanlarında kullanılmaktadır [29].



Şekil 2.7. Eklem kıkırdığı hasarında; mikrokırık, mozaikplasti, OKİ klinikte uygulanan terapiler ve MKH implantasyonu, MKH+ indükleyici faktörleri, MKH+ indükleyici faktörler + Scaffold MKH temelli terapiler şematize edilmiştir [30].

Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) kondrojenik potansiyelinin yüksek olması kıkırdak yenilenme tedavileri için potansiyel bir kaynak olarak görülmektedir. MKH dokudan kolaylıkla izole edilebilmekte ve hem otolog hem de allojenik hücre kaynağı oluşturmaktadır. MKH, farklanma süreci boyunca kıkırdak fonksiyonlarını yerine getirebilecek ekstraselüler matris bileşenlerini de üretirler [31]. Hedeflenen onarım alanlarında, MKH'ler çeşitli sitokinleri, büyüme faktörlerini ve kemokinleri serbest bırakarak endojen MKH lezyon alanlarına girmeye yönlendirebilir. Böylece kıkırdak dokunun onarımını sağlarken uygun bir rejeneratif mikroortam oluşturur [29]. MKH'lerin eksojen biyokimyasal ve biyomekanik uygulamalarının yanısıra scaffold (iskele) tedaviler geliştirmeye çalışılmaktadır. MKH terapileri kıkırdak yenilenmesi için oldukça önemli, gelişmekte olan bir tedavi yöntemidir.

2.6 Kök Hücre

Kök hücreler, kendini yenileyen, farklı hücre türlerine farklılaşabilen (potensi) ve aynı kök hücreden çoğalarak klon oluşturabilen (klonalite), farklılaşmamış hücreler olarak tanımlanmaktadır [32]. Özelleşmemiş ya da farklılaşarak özel işlev kazanmamış hücrelerdir.

Kök hücrenin kendini yenilemesi, kök hücre havuzunu yenilenmesi anlamına gelir. Kök hücre havuzunun yenilenmesi için her bölünen kök hücrenin en az bir yedeğinin ortaya çıkması ve hücre havuzuna ekleniyor olması gerekir. Bir kök hücre bölündüğünde en az iki farklı fenotipe sahip hücre ortaya çıkar; hücrelerden birisi kök hücrenin yedeği niteliğinde iken diğeri farklılaşan hücredir. Bu bölünme asimetric hücre bölünmesi olarak adlandırılır. Asimetric hücre bölünmesi ise ya çevre asimetrisi ya da bölünme asimetrisi olmak üzere iki farklı yolla gerçekleşir [33].

Kök hücreler vücutta bulundukları yere göre veya farklılaşma potansiyeline göre sınıflandırılırlar. Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre totipotent, pluripotent, multipotent, tripotent, bipotent ve unipotent olarak sınıflandırılırlar. Totipotent kök hücreler, bir organizmayı tamamen oluşturabilme kapasitesine sahip hücrelerdir. Pluripotent kök hücreler, her üç germ yaprağı (ektoderm, mezoderm, endoderm) kökenli tüm dokuları oluşturabilirler. Multipotent kök hücreler, yetişkin kök hücrelerdir ve köken bakımından birbirine yakın farklı hücre tiplerini oluşturabilirler. Tripotent, bipotent ve unipotent kök hücreler ise köken bakımında yakından ilişkili en az üç, iki ve bir hücre tipini oluşturabilme yeteneğine sahiptirler [34, 35].

Kök hücreler elde edilme kaynaklarına göre embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler olarak sınıflandırılmaktadır. Embriyonik kök hücreler blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilirler. Yetişkin kök hücreler ise dokularda bulunan kendini yenileyebilen multipotent hücreler olarak tanımlanırlar.

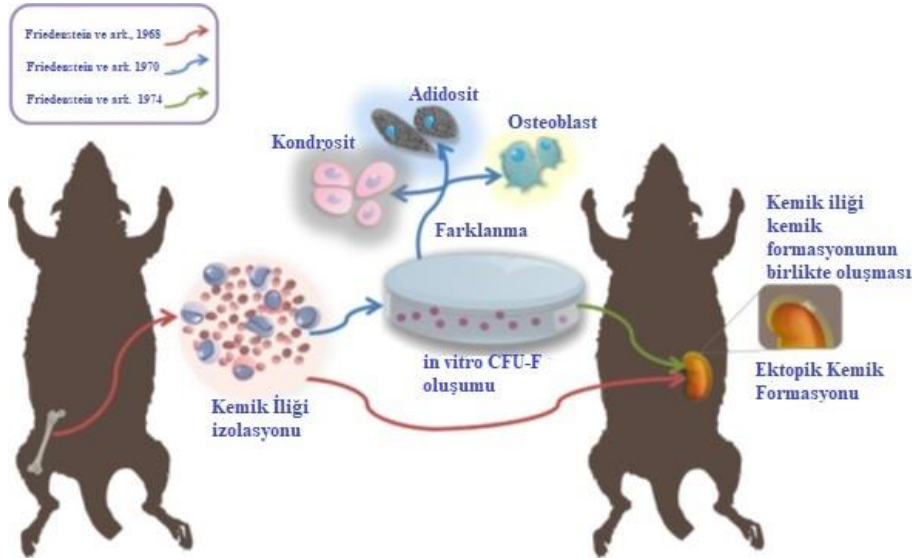
Kök hücreleri diğer vücut hücrelerinden ayıran bazı özellikler mevcuttur,

- i) Normal vücut hücreleri sınırlı sayıda çoğalırlar veya çoğalmazlar, kök hücreler ise sınırsız sayıda çoğalabilme özelliğine sahiptirler.

- ii) Vücut hücreleri bir görevi yapmak üzere özelleşmişlerdir fakat kök hücreler özelleşmemiş hücrelerdir.
- iii) Vücut hücreleri terminal hücrelerdir, bir başka hücre tipine farklılaşamazlar fakat kök hücreler çevreden aldıkları sinyaller ile farklı hücre tiplerine farklılaşabilirler ve özelleşebilirler [36].

2.6.1. Mezenkimal Kök Hücre

Friedenstein ve ark., farede kemik iliği stromasını başka bir dokuya naklettiklerinde kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaştığını göstermişlerdir [37]. Bu çalışma ile kemik iliğinde hematopoetik olmayan bir grup öncü hücrenin bulunduğunu ortaya koyulmuştur. Daha sonra, fibroblast kolonisi oluşturan birim (colony- forming unit-fibroblast, CFU-F) etkinliği ile ölçülmüş ve bu hücrelerin fibroblastın öncüsü hücreler olduğu öne sürülmüştür (**Şekil 2.8**) [38]. Bu hücreler temel olarak plastik yüzeye yapışmaları ve *in vitro* da çoğaltılabilmeleriyle tanımlanmışlardır. *Pittenger ve ark.* 1999'da bu hücreleri tek bir koloniden ayrıştırarak *in vitro*'da osteoblast, adiposit ve kondrosite farklılaştırmışlardır [39]. Birden fazla hücre türüne farklılaşmaları (multipotensi) ve *in vitro* çoğalabilmeleri (kendini yenileme) özellikleri göstermeleri nedeniyle bu hücrelere **mezenkimal kök hücre (MKH)** olarak adlandırılmıştır [40].



Şekil 2.8. Mezenkimal kök hücreler üzerinde yapılan çalışmaların kökeni [41].

MKH'ler, kendini yenileyebilen ve fonksiyonel hücre türlerine farklılaşabilen multipotent kök hücrelerdir. Diğer kök hücre kaynaklarına göre; i) kolay izole

edilebilir, ii) yüksek migrasyon kapasitesi, iii) hızlı çoğalma, iv) immün moderatör, v) transplantasyon sonrası allojenik yanıtlardan kaçınma gibi özelliklere sahiptirler [42-46]. MKH'ler mesoderm tabakalarında köken alan çeşitli doku ve organlardan izole edilebilirler. MKH'ler fibroblast benzeri bir morfoloji, *in vitro*'da plastik yüzeye yapışma ve osteosit, adiposit ve kondrosite farklılaşma yetenekleri ile karakterizedir.

2.6.2. Mezenkimal Kök Hücre Belirteçleri

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society for Cellular Therapy, ISCT), *in vitro* çoğaltılan ve farklılaştırılan MKH için “multipotent mezenkimal stroma hücresi” ismini önermektedir [47]. Daha sonra ISCT, multipotent mezenkimal stromal hücreleri tanımlamak için; plastik yüzeye yapışık olmaları, CD73, CD90, CD105 ve CD11b gibi yüzey belirteçlerini eksprese ederlerken; CD79a, CD34, CD45 ve HLA-DR belirteçleri için negatif özellik göstermeleri ve *in vitro*'da osteoblast, adiposit ve kondrosite farklılaşmaları gibi minimum kriterlerdir [48]. Ancak bu hücreler, vücudun farklı bölgelerinde elde edilmeleri sebebiyle bu yukarıda bahsedilen kriterler farklılıklar da gösterebilir. Günümüzde MKH'nin elde edilmesi ve tanımlanması; CD yüzey belirteçlerinin yüksekliği, bazılarının ise yok denecek kadar azlığı veya yokluğu, plastik kültür yüzeyine yapışarak büyümeleri/çoğalmaları ve *in vitro*'da en az üç seriye farklılaşmaları altın standart olarak kabul edilir.

2.6.3. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları

MKH'ler insan vücudunun farklı dokularından ve özellikle damardan zengin bağ dokusu içeren dokulardan elde edilebilir. MKH'ler köken aldıkları kaynağa göre; kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler, adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler, kordon kanı kaynaklı mezenkimal kök hücreler, Wharton jeli kaynaklı mezenkimal kök hücreler, plasental doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler, dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücreler, periferik kan kaynaklı mezenkimal kök hücreler, amniyotik sıvı kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve sinoviyum kaynaklı mezenkimal kök hücreler olarak sınıflandırılır.

2.7. Adipoz Doku

Adipoz doku (yağ dokusu), mezodermden köken alan, enerji homeostazında önemli rol oynayan özelleşmiş bağ dokusudur. Adipoz dokuyu preadipositler, olgun adipositler, vasküler düz kas hücreleri, fibroblastlar, yerleşik monositler, endotelial hücreler, makrofajlar ve lenfositler gibi birçok hücre türü oluşturur [49]. Bağışıklık, endokrin, üreme ve hematopoetik sistemlerin fonksiyonları adipoz dokudan etkilenir [50]. Yetişkin bireylerde baskın olan beyaz adipoz doku ve fetal hayatta baskın olan kahverengi adipoz doku olmak üzere iki tip türü bulunmaktadır.

Beyaz adipoz dokunun fonksiyonları, enerji depolamak, yalıtım, vital organlara yastıklama görevi ve hormon salgılamaktır. Beyaz adipoz doku deri altındaki bağ dokunun içinde hipodermis adı verilen bir tabaka oluşturur. Bu tabaka vücut yüzeyi boyunca farklı depolar oluşturarak dağılır [51, 52]. Kahverengi adipoz doku yaşamın başlangıcında büyüme sırasında yetişkinliğe kadar (ilk on yıl) bulunur ve zamanla beyaz adipoz dokusuna dönüşür. Kahverengi adipoz doku ısı kaybını dengeleme ve lethal hipotermiyi önlemeye yardımcı olur.

2.7.1. Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

2001 yılında ilk olarak Zuk. ve ark. adipoz kaynaklı stromal/kök hücrelerin (AKMKH) kondrosite, adiposite ve osteoblastlara farklandırılabilirliğini göstermiştir [53]. Adipoz mezenkimal kök hücreler (AMKH) güçlü bir hücre popülasyonu içeren bir nişten izole edilir. Bu güçlü hücre popülasyonu; proliferasyon kapasitesi ve köksüzlük yanı sıra vücuttaki niş ortamının farklılığı, genetik kompozisyonu ve çevre tarafından da etkilenirler [54]. Dolayısıyla bu zengin hücre nişi sayesinde aynı adipoz dokudan birkaç farklı tip AKMKH elde edilebilir [55]. Adipoz dokunun zengin bir hücre nişine sahip olmasının sebebi yüksek doku vaskülarizasyonu ve çeşitli hücre tiplerinin varlığıdır [55]. Adipoz doku preadipositler, olgun adipositler, vasküler düz kas hücreleri, fibroblastlar, yerleşik monositler, endotelial hücreler, makrofajlar, lenfositler ve AMKH içermektedir. Kök ve progenitor hücreler tüm hücre popülasyonunun %3'nü oluşturur [56].

AKMKH'ler kendini yenileme, proliferasyon kapasitesi ve telomeraz aktivitesi yüksek hücrelerdir. AKMKH'ler büyüme faktörleri, sitokinler, anjiyogenik faktörler

salgılayarak doku fonksiyonunun yenilenmesi uyarır ve hasarı azaltır [54]. AKMKH tarafından salgılanan moleküller diğer hücrelerin ve merkezi sinir sistemi, bağışıklık sistemi, kalp ve kaslarla ilişkili mekanizmaların canlılığında da önemli rol oynar [57]. AKMKH'lerin immünsüpresif özelliği indoleamine-2, 3-dioksijenaz ve prostaglandin salınımından kaynaklanabilir [58, 59]. AKMKH'lerin immünfenotipi köksüzlük, kendini yenileme ve CD146, CD271 gibi farklılaşma potansiyellerini içeren gerekli faktörleri ifade edebilir.

2.7.2. Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü

Adipoz dokusu lipoplasti veya lipotomi gibi cerrahi yöntemler uygulanarak vücuttan çıkarılır. Adipoz dokunun damardan zengin stromasından yağ hücreleri uzaklaştıktan sonra elde edilen hücre AKMKH'dir. Günümüzde yetişkin organizmadan alınan MKH'ler arasında kemik iliğinden sonra gelir. Ağır invaziv cerrahi yöntem gerektirmeden insan vücudundan kolaylıkla istenilen miktarlarda alınabilir. Bu sebeple istenilen sayıda hücre izolasyonu yapmak mümkündür.

Zengin hücre popülasyonuna sahip adipoz dokusundan saf AKMKH'leri elde edebilmek için damarca zengin stromasından yağ ve kan hücrelerini uzaklaştırılmalıdır. Uzaklaştırmak için, kollajenaz enzimi ile adipoz doku muamele edilir ve belirli süre sonunda santrifüj edilir. Bu santrifüj işleminden sonra süpernatantta yani üstte kalan kısımda yağ hücreleri bulunurken pellet yani çöken kısımda adipoz dokunun vasküler ve stromal kısmı bulunur [53]. Pellet kısmı PBS ile yıkadıktan sonra eritrositlerden ayırmak için NH_4Cl ile muamele edilir. $100\mu\text{m}$ çaplı filtreden geçirilerek hücre artıklarından ayrıştırılır. Bu izole edilen hücreler $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ yoğunlukta kültür kaplarına ekilir. 72 saat sonra kültür besiyeri değiştirilir. Hücre yoğunluğu %70-80 'e ulaştığında hücreler pasajlanarak yeni kültür kaplarına alınarak hücre sayısı giderek arttırılabilir. Ayrıca sıvı nitrojende (-270°C) kolaylıkla saklanabilir. Böylece AKMKH *in vitro* ve *in vivo* çeşitli çalışmalarda kullanılabilir.

2.7.3. Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu

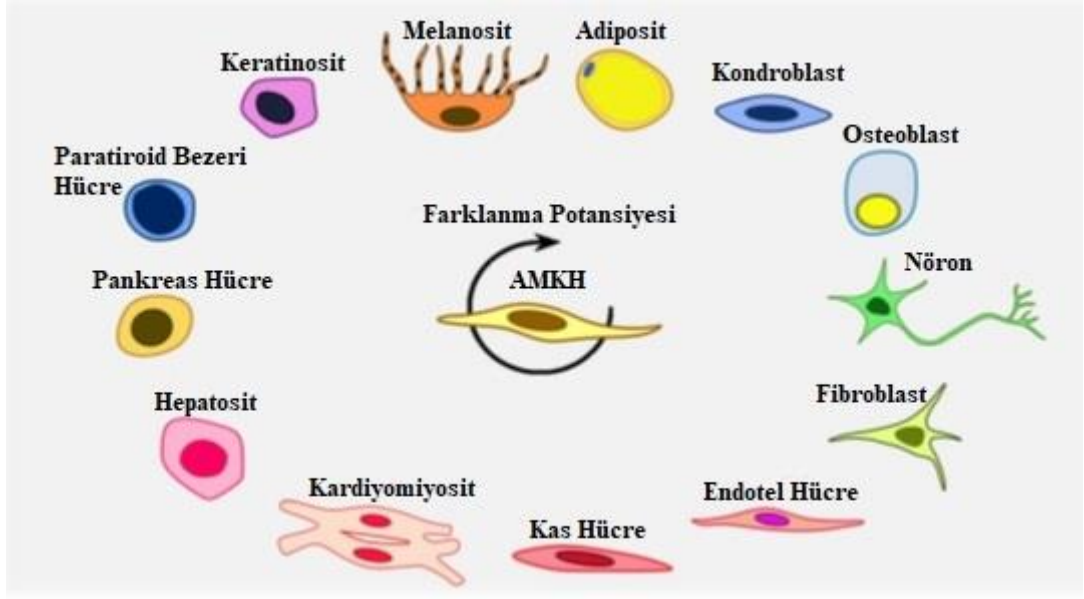
AKMKH'ler mezenkimal kök hücreler olarak sınıflandırılması için; CD44, CD105 ve CD90 gibi hücre yüzey belirteçlerini ifade etmeleri aynı zamanda hematopoetik hücre yüzey markırları olan CD45, CD34 ve CD 133 ifade etmemeleri beklenir [48]. Ancak

bununla birlikte AKMKH'ler POU5F1, NANOG ve KLF4 gibi köksüzlük ilişkili hücre yüzey belirteçlerinin ifade edebilir [60-62]. AKMKH'ler elde edildikleri donörler arasında veya vücuttaki kaynak yağ birikintisine bağlı olarak vücutta konumlarına göre bu yüzey belirteçlerinde çeşitlilik gösterebilir [63].

2.7.4. Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrenin Kondrosite Farklanması

AKMKH'ler ektoderm, mesoderm ve endoderm kökenli hücre soylarına farklanma potansiyeline sahiptir (**Şekil 2.9.**). Çeşitli kimyasallar biyomekanik yöntemler ya da hücreye bağımlı (ko-kültür, şartlandırılmış medyum) farklanma strateji yöntemleri AKMKH'lerin morfolojisinde, gen ekspresyonunda ve işlevinde kalıcı değişiklikleri desteklemiştir. Kimyasal temelli stratejiler, kök hücre farklanması için gerekli spesifik sinyal yollarının küçük moleküllerle aktivasyonuna dayanır. Bu yöntemin uygulanması kolaydır. Ayrıca farklanma verimliliğini arttıran ekstra manipülasyonlar veya ara basamakları yapmaya gerek kalmadan tamamen farklanmış hücre popülasyonu elde etmemizi sağlar [64].

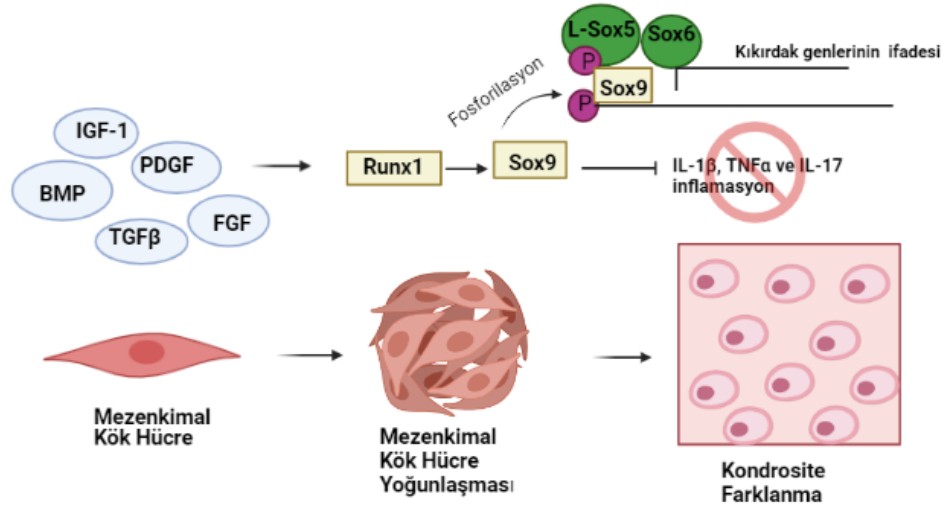
Kondrosite farklanma kültür medyumunu temel olarak insulin transferrin selenöz asit (ITS) ve TGF β 1 içermelidir [65]. Yapılan çalışmalar göstermiştir; kültür medyumunda BSA, TGF β 3, dexametason, askorbik asit ve resveratrol AKMKH'lerin kondrosite farklanması için yeterlidir [66]. BMP6, TGF β 1 reseptörünü indükler ve AKMKH'lerin TGF β bağımlı kondrosite farklanmasını uyarır [67]. EGF, FGF2 ve TGF β 1 birlikte kültür ortamına eklenmesi BMP6'nın konrogenik etkisini artırır [68]. BMP7 ile kısa süre indüksiyon kondrojenezi teşvik ederken osteogenezi inhibe eder [69]. AKMKH'lerin kondrosite farklanma kapasitesi KİMKH göre daha düşüktür fakat kültür medyumuna TGF β 2 ve IGF-1 eklenerek telafi edilebilir [70].



Şekil 2.9. AMKH'lerin farklanma potansiyeli. Uyarıcı koşullar altında AMKH'ler çeşitli epitelyal, mezenkimal ve endotel hücelere farklanabilir [71].

2.8. Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri, hedef hücre üzerinde bulunan transmembran reseptöre bağlanarak proliferasyon, göç ve farklanmayı sağlayan bir grup peptiddir. Sinyal molekülü reseptöre bağlandığında sinyal iletim süreci başlar ve bir dizi hücrel aktiviteyi tetikler. Kıkırdak gelişim sürecinde; dönüştürücü büyüme faktörü – beta ($TGF\beta$) ailesi, insulin benzeri büyüme faktörü-1, fibroblast büyüme faktörü ailesi (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü gibi büyüme faktörleri kondregenezde önemli rol oynarlar (**Şekil 2.10.**). Büyüme faktörleri kıkırdak dokunun oluşumundaki öncül hücrelerin çoğalmasını, göçünü, farklılaşmasını ve olgunlaşmasını arttırmak amacıyla *in vitro* çalışmalarda kullanılmaktadır. Mezenkimal kök hücrenin kıkırdak farklanma *in vitro* kültür prosedürleri, *in vivo* 'da embriyonik gelişimin farklanma prosesi taklit edilerek oluşturulmuştur [7-9].



Şekil 2.10. Büyüme faktörlerinin kondrosite farklanmada mezenkimal kök hücre üzerine etkisi gösterilmiştir. Bu şekil, BioRender programı (BioRender, Toronto, Kanada) kullanılarak oluşturulmuştur.

2.8.1. Dönüştürücü Büyüme Faktörü – beta (TGFβ)

TGFβ molekülü, özdeş zincirden oluşan moleküler ağırlığı 25 kilo Dalton (kDa) olan bir dimerdir. TGFβ, tipII kollajen sentezleme ve proteoglikan indüklemeye işlevi ile kondrojenin tüm basamaklarını güçlü uyarıcıları olarak kabul edilen TGF-β1, TGF-β2 ve TGF-β3 olmak üzere üç izoformuna sahiptir [72]. TGFβ sinyal iletimi zara bağlı heteromerik reseptörlere (Tip I ve Tip II) bağlıdır. Sinyal molekülünün tipII reseptöre bağlanması tipI reseptörünü fosforillere ve böylece sinyal kaskatında TGFβ'ya özgü Smad (Smad 2 ve 3) proteinleri fosforillenecek şekilde aktifleştirir [73]. Ayrıca Smad bağımsız yolda, p38 mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (Erk) ve stresle aktive olan protein kinaz / c-Jun NH2 terminal kinaz (SPK/JNK) gibi yollarda TGFβ ile aktive edilebilir [74].

TGFβ mezenkimal öncü hücrelerin kondrojeninin; MKH'nin kondrosite farklanması için gerekli olan ana başlatıcılarından birisidir. Çok sayıda araştırma; TGFβ ailesinin eklem kıkırdagı yenilenmesi ve homeostazında düzenleyici etkileri olduğunu göstermiştir. TGFβ yolağının aktifleşmesi ile N-kaderin ekspresyonu indükler bunun sonucunda artan adezyon ve agregasyon molekülleri hücre proliferasyonu, farklanması ve kıkırdaga özgü ECM proteinlerinin depolanmasını teşvik eder [75]. TGF-β1 ve TGF-β3 kıkırdak defekti sonrası kıkırdak onarmasına etkisi çok sayıda çalışmada test edilmiştir. TGF-β2 ve TGF-β3 kıkırdak farklanması

alışmalarında TGF-β1'den daha etkili olduğunu söylemesine rağmen bu üç isoform arasında kıkırdak farklanmasını teşvik etme yeteneklerinde önemli bir fark yoktur [76] [77]. TGF-β1, 2 ve 3'ün, MKH 'lerde Sox-9 ekspresyonunu indüklediği ve kıkırdak ECM üretimini arttırdığı gösterilmiştir [78, 79]. Fan H. ve ark, *in vitro* alışmalarında, TGF-β3 ile çapraz bağlanmış bir yapı iskelesinin MKH proliferasyonunu ve bol miktarda ECM üretimini kolaylaştırdığı gösterilmiştir ve ayrıca *in vivo* hayvan modeli çalışmaları da doku iskeleleri üzerinde kondrojenik farklanmayı desteklemektedir [80].

TGF-β2 eksikliğinin, kraniyofasiyal, uzuv, omurga, iç kulak anomalileri dahil olmak üzere birçok gelişimsel patolojiye yol açtığı görülmüştür [81]. Ayrıca TGF-β sinyali bloke edildiğinde (TGF-β reseptör inhibisyonu 1 kinaz), otonom kıkırdak benzeri doku oluşumu azalmıştır [82]. *İn-vitro* alışmalarda TGF-β2'nin kollajen yıkımını baskıladığı ve kıkırdak matriksinin korunmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir.

2.8.2. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Fibroblast büyüme faktörü (FGF), 1974 yılında fibroblastları çoğaltan molekül olarak tanımlanmıştır [83]. FGF'ler, doku yenilenmesini teşvik etme potansiyeline sahip olan 22 yüksek homolog polipeptidlerin oluşturduğu bir ailedir. Her birinin farklı etkisi olan bu üyelerin ortak yönü heparin bağlayan bölgelerinin olması ve hücre üzerinde heparan sülfatlı proteoglikan moleküllerine bağlanarak kendilerine özgü sinyal yollarını uyarmalarıdır. FGF1 ve FGF10 arasındaki tüm üyeler FGF reseptörüne bağlanarak etki gösterirler. FGF11, FGF12, FGF13 ve FGF14, FGF homolog faktör olarak bilinir, bunlar FGF reseptörlerine bağlanmaz ve hücre içinde diğer FGF'lerden daha farklı etkilere sahiptir. Aynı reseptör üzerinde farklı etkilere sahip olabilir. Bu etkiler özetle;

- Mezodermin uyarılması,
- Gövdenin ön ve arka ekseninde şekillenmesi,
- Ekstremitelerin gelişmesi,
- Sinir sistemi gelişmesi,

- Anjiyogenez,
- Keratinositlerin gelişmesi ve yara iyileşmesidir.

FGF'ler; kıkırdak matriksi homeostazı, eklem gelişimi ve kondrosit proliferasyonu ile yakından ilişkilidir. FGF2, kondrositler ve MKH üzerindeki etkisi en çok çalışılan üyesidir. FGF2 sinyalleri, *in vitro* kültür şartlarında MKH'lerin kendini yenilemesini, çoğalmasını destekleyerek immatür hücrelerin devamlılığı sağlamaktadır [84, 85]. *In-vitro* kültür şartlarında FGF2 sinyallerine maruz kalan MKH hücre sayısı zamanla artmaktadır; ancak moleküler mekanizması tam olarak açıklanamamıştır [86]. İnsan kaynaklı MKH'ler, *in vitro*'da FGF2 ile muamele edildiğinde erken dönem kondrosit farklanmasına sebep olarak kondrosit belirteci olan SOX9 ekspresyonunu arttırmıştır [87].

2.9. Hipotez

Kıkırdak dejenerasyonları her yaştan bireyin sıklıkla karşılaştığı, yaşa bağlı olarak ilerleme gösterdiği ve hayat kalitesini düşürdüğü bilinen bir olgudur. Kıkırdak tedavisi için kullanılan klasik tedavilerin (mikrokırık, otolog kondrosit implantasyonu v.b.) yanı sıra mezenkimal kök hücre temelli tedaviler ile ilgili çalışmalar literatürde yer almaktadır. Bu çalışmalarda uygun hücre kaynağı seçimi, daha başarılı klinik sonuçlar elde etmek için önemli bir basamağı oluşturmaktadır. Adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kıkırdak farklanmasında başarılı sonuçlar verdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Kıkırdak yenilenmesi ve *in vitro* farklanma çalışmalarında AKMKH'lerin alternatif bir hücre kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Bu hücreler ile yapılan yönlendirme deneylerinde oldukça etkin sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen halen *in vitro* yönlendirme sürecinde temel eksiklikler mevcuttur. Yapılan çalışmalarda farklı büyüme faktörlerinin etkileri test edilmiş olsada etkin büyüme faktörü kombinasyonları dolayısı ile uygun mikroçevre içeriği literatürde halen tanımlanmış değildir.

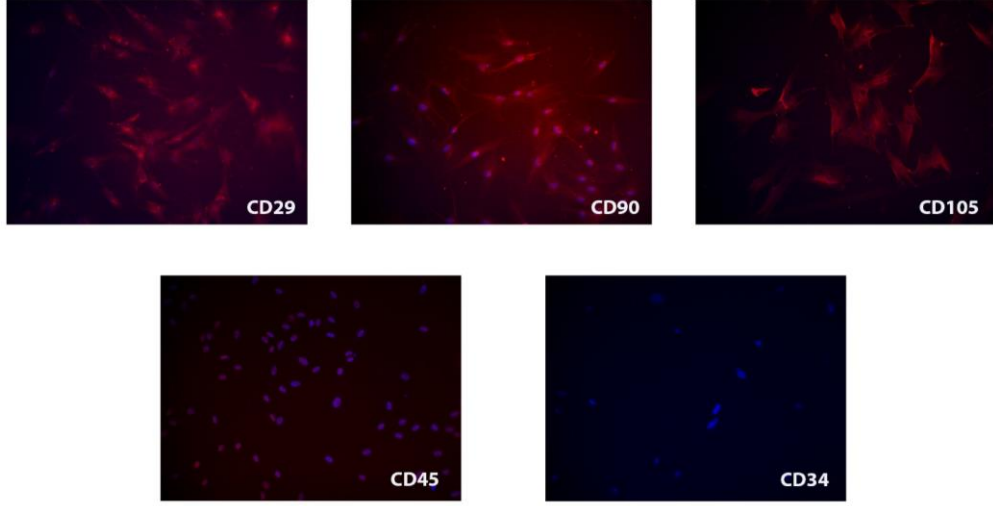
Bu projedeki hipotezimiz, Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin *in vitro* yönlendirme süreçlerinde, TGFβ1, TGFβ2 ve FGF2 büyüme faktörlerinin etkileri ile daha iyi kalitede bir kıkırdak matriksi elde etmemizi sağlayabilir şeklindedir.

Bu çalışmada amacımız, TGF β 1, TGF β 2 ve FGF2 büyüme faktörlerinin kombinasyonlarının belirlenen sürelerde adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin *in vitro* yönlendirme süreçlerinde tek tabaka ve 3B pellet kültür sistemlerinde incelemektir. Planlanan çalışma ile, adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler öncelikle tek tabaka kültür sisteminde FGF2 ve TGF β 1 ile ardından TGF β 2 ile muamele edilmiştir. Sonuçta oluşturulan tek tabaka ve 3B pellet kültür sistemlerinde histokimyasal olarak alsiyan mavisi ve dimetilmetlen mavisi (DMMB) yöntemleri ile dokunun kalitesi, hücre-matriks kompozisyonu ve 3B pellet kültür sistemlerinde COL2A1 ve ACAN gibi proteinlerin ekspresyon düzeyleri immunohistokimyasal yöntem ile belirlenmiştir.



GEREÇ ve YÖNTEM

Bu proje kapsamında kullanılan “Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler” 250-300 g arası Wistar sıçanların kasık deri altı bölgesindeki yağ dokudan daha önce izole edilmiş olup literatüre kazandırılmış olan çalışmada bu hücrelerin mezenkimal kök hücre karakterizasyonları tanımlanmıştır (Şekil 3.1.) [88].



Şekil 3.1. Adipoz kaynaklı kök hücrelerin immüno Floresan yöntemi kullanılarak CD29, CD90, CD105, CD45 ve CD34 biyobelirteçleri ile işaretlenmiş görüntüleri (DAPI: mavi; CD29, CD90, CD105, CD45, CD34: kırmızı sinyal) [88].

İzolasyonu gerçekleştirilen bu hücreler pasaj 4’de deneye dahil edilerek oluşturulan tek tabaka ve 3B pellet kültür grupları aşağıda sunulan tablolarda özetlenmiştir (Tablo 3.1.-Tablo 3.2.).

Tablo 3.1. AKMKH’lerin büyüme faktörleri kombinasyonları ile 6 gün boyunca tek tabaka kültürde oluşturulan gruplar

	Hafta 1 <i>Gün 0 - 3</i>	Hafta 1 <i>Gün 3 - 6</i>
Grup 1	ITS	ITS
Grup 2	ITS	TGFβ2
Grup 3	FGF2/TGFβ1	ITS
Grup 4	FGF2 / TGFβ1	TGFβ2

Tablo 3.2. AKMKH'lerin büyüme faktörleri kombinasyonları ile 21 gün boyunca 3B pellet kültüründe oluşturulan gruplar

	Hafta 1 <i>Gün 0 - 3</i>	Hafta 1 <i>Gün 3 - 6</i>	Hafta 2 <i>Gün 7 - 14</i>	Hafta 3 <i>Gün 14 - 21</i>
Grup 1	ITS	ITS	Kondrojenik Medyum	Kondrojenik Medyum
Grup 2	ITS	TGFβ2	Kondrojenik Medyum	Kondrojenik Medyum
Grup 3	FGF2 / TGFβ1	ITS	Kondrojenik Medyum	Kondrojenik Medyum
Grup 4	FGF2 / TGFβ1	TGFβ2	Kondrojenik Medyum	Kondrojenik Medyum
Grup 5	Kondrojenik Medyum	Kondrojenik Medyum	Kondrojenik Medyum	Kondrojenik Medyum
Grup 6	DMEM+%10FBS	DMEM+%10FBS	DMEM+%10FBS	DMEM+%10FBS

3.1. Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler Çoğaltılması

AKMKH'lerin tamamı %10 Fetal Dana Serum (FBS-Thermo cat. No: 10270106), Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin (10000U/ml & 10mg/ml & 25ug/ml) (Biological Industries, cat. No: 03-033-1B), eklenmiş DMEM (Capricorn, cat. No: DMEM-HPA) içerisinde tek tabaka kültür sistemleri oluşturularak, %5 CO₂'lik atmosfer, %95 nem ve 37 °C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

AKMKH'lerin Çoğaltılması:

- 1) Sıvı nitrojen (- 196°C) saklanan AKMKH Pasaj2'deki hücreler çıkarıldı ve su banyosunda yaklaşık 36.5 °C'de ısıtılarak eritildi.
- 2) %10 Fetal Dana Serum ve %1 Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin ile hazırlanan yüksek glikoz içeren DMEM besiyeri su banyosunda ısıtıldı.
- 3) Çözünen hücreler, yaklaşık 5ml ısıtılmış DMEM içerisine 15ml falkona aktarıldı.
- 4) 1600 rpm'de 5dk santrifüj edildi.
- 5) Santrifüj sonrası hücre üzerindeki süpernatant uzaklaştırıldı.

- 6) Hücre pellet kısmı 1ml DMEM ile süspanse edildi.
- 7) 75cm² 'lik kültür kabına dağıtıldı.
- 8) %5 CO₂'lik atmosfer, %95 nem ve 37°C'lik inkübatörde yeterli yoğunluğa ulaşana kadar kültüre edildi.

3.2. AKMKH'lerin 12 Kuyucuklu Petri Kültür Kaplarına Ekim ve Kültürü

Bu bölümde, AKMKH'lerin kültürü gerçekleştirilip 4. pasajı takiben 12 kuyucuklu kültür kaplarına ekimi gerçekleştirildi;

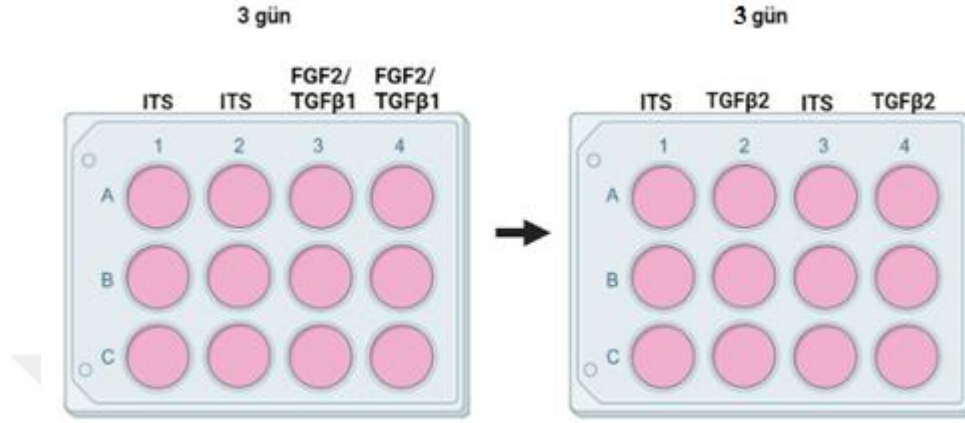
- 1) Flasklarda bulunan medyumlar uzaklaştırıldı.
- 2) Ardında tripsin (Gibco, cat. No:25200056) eklenerek, 5 dakika 37°C'de bekletildi.
- 3) Flask içerisinde bulunan tripsin+hücreler steril bir tüpe alındı.
- 4) Flask içerisine DMEM+%10 FBS eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi ve bu solüsyonda steril tüp içerisine ilave edildi.
- 5) Steril tüp içerisindeki solüsyon 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 6) Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre'lerin üzerine 1 ml DMEM eklendi. Hücre'ler süspanse edilerek sayımı gerçekleştirildi (İhtiyaç halinde dilüe edildi).
- 7) Ardında 12 kuyucuklu kültür kablarna, her bir kuyucukta 0.05x10⁶ hücre olacak şekilde ekimleri gerçekleştirildi.

Ekim işleminden sonra ilk 1 gün boyunca hücreler DMEM içinde tek tabaka kültürler %5 CO₂'lik atmosfer, %95 nem ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

3.3. AKMKH'lerin 12 Kuyucuklu Kültür Kaplarında Büyüme Faktörleri ile Kültürü

Ekim işleminden 1 gün sonra 3 gün boyunca kültüre I. grup-ITS, II. grup-ITS, III. grup-FGF2+TGFβ1 ve IV. grup-FGF2+TGFβ1 olacak şekilde kültürasyona 37° C'de

%5 CO₂ konsantrasyonunda nemli ortamda devam edildi. Bu aşamadan sonra 12 kuyucuklu kültür kaplarında bulunan hücreler 3 gün süre ile yine 12 kuyucuklu kültür kaplarında I. grup-ITS, II. grup-TGFβ2, III. grup-ITS ve IV. grup-TGFβ2 olacak şekilde kültüre edildi (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. AKMKH'lerin 12 kuyucuklu kültür kaplarında büyüme faktörleri kombinasyonları ile oluşturulan gruplar ve büyüme faktörü uygulama süreleri. Bu şekil, BioRender programı (BioRender, Toronto, Kanada) kullanılarak oluşturulmuştur.

Deney içeriğini daha ayrıntılı şekilde anlatacak olursak;

Uygulama 1 (3Gün):

- 1) 12 kuyucuklu kültür kaplarında bulunan medyumlar uzaklaştırıldı.
- 2) PBS ile yıkandı.
- 3) Ardından ITS, FGF2 ve TGFβ1 büyüme faktörleri ile hazırlanan medyumlar **Şekil 3.2** gösterildiği gibi 1ml kuyucuklara eklendi.

Medyum değişimi işleminden sonra 3 gün boyunca hücreler %1 ITS (İnsülin transferrin selenyum 100x- Thermo-41400045), 50ng/ml FGF2 (Fibroblast büyüme faktörü- Proteintech-HZ1285) ve 10ng/ml TGFβ1 (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta1- Proteintech-HZ1011) içeren DMEM içinde tek tabaka kültürler %5 CO₂'lik atmosfer, %95 nem ve 37 °C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

Uygulama 2 (3GÜN):

- 1) 12 kuyucuklu kültür kaplarında bulunan medyumlar uzaklaştırıldı.

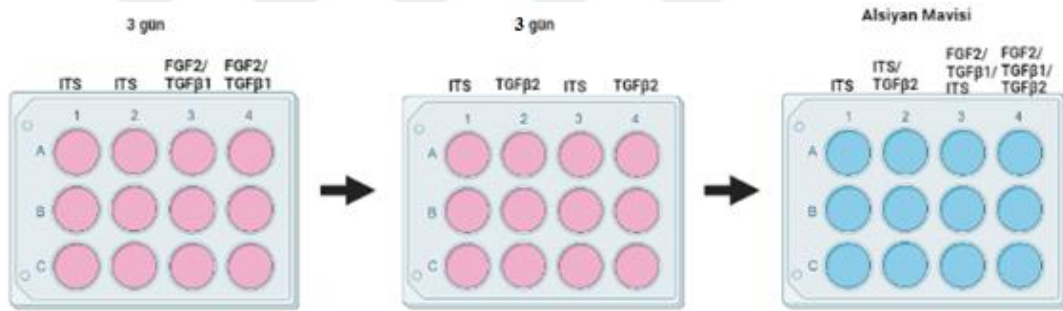
2) PBS ile yıkandı.

3) Ardından ITS ve TGF β 2 büyüme faktörleri ile hazırlanan medyumlar **Şekil 3.2**'de gösterildiği gibi 1ml kuyucuklara eklendi.

Medyum değişimi işleminden sonra 3 gün boyunca hücreler %1 ITS ve 10ng/ml TGF β 2 (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta2- Proteintech-HZ1092) içeren DMEM içinde tek tabaka kültürler %5 CO₂'lik atmosfer, %95 nem ve 37 °C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

3.4. Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde Hücre-Matriks Kompozisyonunun Alsiyan Mavisi ile Belirlenmesi

Bu işlem ile planlamış olduğumuz ilk 6 günlük deney sonucunda oluşan tek tabakalı hücre kültüründe alsiyan mavisi boyanmasını gerçekleştirdik (**Şekil 3.3.**).



Şekil 3.3. Tek tabakalı hücre kültüründe ilk 6 günlük deney sonunda alsiyan mavisi boyaması yapılan gruplar ve deney düzeneği. Bu şekil, BioRender programı (BioRender, Toronto, Kanada) kullanılarak oluşturulmuştur.

Hazırlanan Solüsyonlar:

%3'lük asetik asit solüsyonu:

Asetik asit (Merck, 1000632500) 3 ml,

Distile Su 97 ml

Alsiyan mavisi solüsyonu (pH2.5):

Alcian blue 8GX (Serva, SE1202101) 1 g,

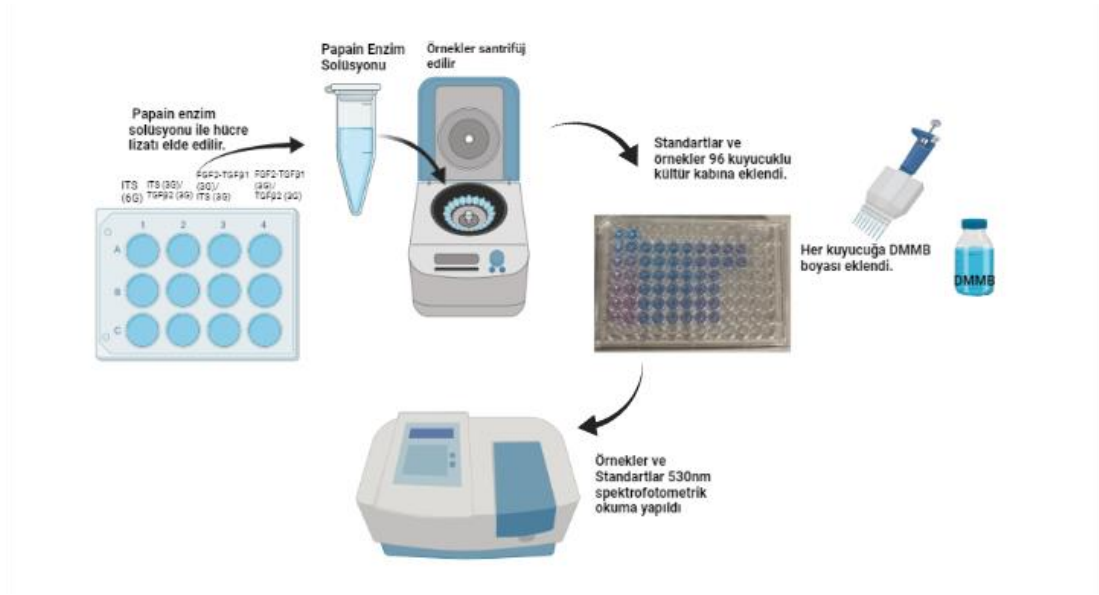
Asetik asit 3% solüsyonu 100 ml

Uygulama:

- 1) Tek tabakalı hücre kültürü ortamından medyum uzaklaştırıldı.
- 2) PBS ile 2x5 dakika olacak şekilde yıkandı.
- 3) Ardından 10% Nötral tamponlu formalin (NBF) ile 30 dakika oda ısısında muame edilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirildi.
- 4) Ardından 10% Nötral tamponlu formalin (NBF) uzaklaştırıldı.
- 5) Alsiyan mavisi solüsyonu uygulandı (3 saat)
- 6) 12 kuyucuklu kültür kabı kuyucukları su ile yıkandı.
- 7) Alsiyan mavisi boyaması ile oluşturulan gruplar arasındaki proteoglikan farkı histokimyasal olarak belirlendi invert (Olympus 1X71) mikroskopta fotoğraflandırıldı.

3.5. Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde Hücre-Matriks Kompozisyonunun Dimethylmethylen Blue (DMMB) Yöntemi ile Belirlenmesi

Bu işlem ile planlamış olduğumuz ilk 6 günlük deney sonucunda oluşan tek tabakalı hücre kültürlerinde Dimetilmetilen Mavisi (DMMB) boyanması (**Şekil 3.4.**) ile tek tabaka kültürde gruplar arasındaki GAG içeriği spektrofotometrik ölçüm sonuçları elde edilerek karşılaştırıldı.



Şekil 3.4. Tek tabakalı hücre kültüründe ilk 6 günlük deney sonunda DMMB analizi yapılan gruplar ve deney düzeneği. Bu şekil, BioRender programı (BioRender, Toronto, Kanada) kullanılarak oluşturulmuştur.

Hazırlanan Solüsyon:

DMMB Solüsyonu:

Distile su 1L,

DMMB (Sigma, cat. No: 341088) 16mg,

Polivinilalkol (Sigma, cat. No:341584-25G) 3g,

Glisin (Serva, SE2339004) 3.04g,

NaCl (Serva, SE3018301) 2.37g,

HCl (Sigma, 1758-100ml) 95ml 0.1M

Papain Enzim Solüsyonu:

NaAc (Sigma, S7670-250G) 20mM pH 6.8,

EDTA (Serva, SE11278001) 1Mm,

DTT (VWR, VWRV0281-5G) 2Mm,

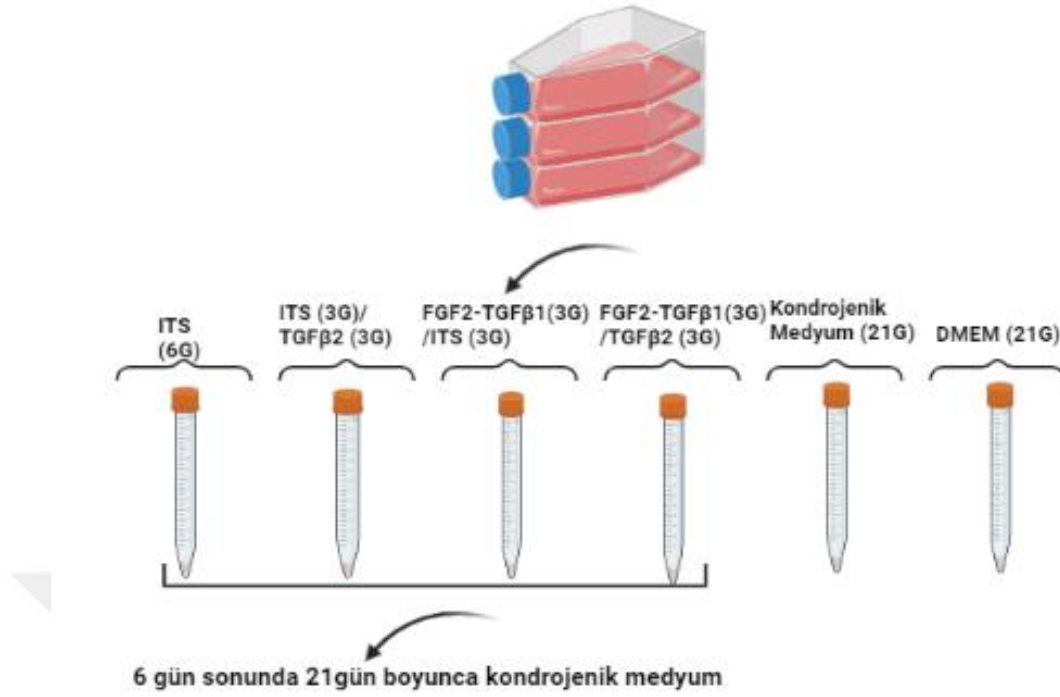
Papain (Sigma, P5306-25MG) 300 µg/ml

Uygulama:

- 1) Tek tabakalı hücre kültürü ortamından medyum uzaklaştırıldı.
- 2) PBS ile yıkama yapıldı
- 3) 1ml Papain enzim solüsyonu solüsyonu 37°C’de 60dk inkübe edildi.
- 4) İnkübasyondan sonra örnekler mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 1600rpm’de 5dk santrifüj yapıldı.
- 5) Üstte kalan süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.
- 6) 1mg/ml GAG içeren örnekten 50µg, 40µg, 30µg, 20µg, 10µg, 5µg, 0µg standartlar hazırlandı.
- 7) 96’lı mikropalte hazırlanan 50µl standart solüsyonu ve hücre kültürü örnekleri eklendi.
- 8) Üzerlerine 200µl DMMB solüsyonu ile karıştırıldı.
- 9) Spektrofotometre (EPOCH, BioTek. Reader) okuyucuda 530nm absorbans oranında spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

3.6. Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinden Pellet Kültürlerin ve Grupların Oluşturulması

Tek tabakalı hücre kültüründe çoğaltılan hücrelerden 3B pellet kültürleri hazırlandı (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Tek tabakalı hücre kültüründen pellet kültürlerinin ve gruplarının oluşturulması diyagramı. Bu şekil, BioRender programı (BioRender, Toronto, Kanada) kullanılarak oluşturulmuştur.

Uygulama:

- 1) Tek tabakalı hücre kültürü ortamından medyum uzaklaştırıldı.
- 2) PBS ile 2x5 dakika yıkandı.
- 3) Ardında tripsin eklenerek, 10 dakika 37⁰ C’de bekletildi (kontrollü aşama)
- 4) T75 flaskta bulunan tripsin+hücreler steril bir tüpe alındı. Üzerine DMEM-FBS içeren medyum eklendi.
- 5) Steril tüp içerisindeki solüsyon 1600 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi.
- 6) Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı.
- 7) Hücrelerin üzerine 1ml DMEM eklendi.
- 8) Hücreler resüspanse edilerek sayımı gerçekleştirildi.
- 9) Ardından 1x10⁶ hücre olacak şekilde steril 15’lik santrifüj tüplerine ekimleri gerçekleştirildi.

- 10) 1ml DMEM+ FBS içeren medyum tüm pellet kültürlerine eklendi.
- 11) 1600rpm’de 5 dakika santrifüj edildi.
- 12) %5 CO₂’lik atmosfer, %95 nem ve 37 °C’lik inkübatörde inkübe edildi. 2 gün DMEM+ FBS içeren medyumunda kültüre edildi.
- 13) 2 gün sonra medyum uzaklaştırıldı.
- 14) 3 gün boyunca I. grup-ITS, II. grup-ITS, III. grup-FGF2+TGFβ1 ve IV. grup-FGF2+TGFβ1 V.grup kondrojenik medyum VI. grup DMEM+FBS olacak şekilde kültürasyona 37°C’de %5 CO₂ konsantrasyonunda nemli ortamda devam edildi.
- 15) 3 gün sonunda ilk 4 gruptan medyumlar uzaklaştırıldı.
- 16) I. grup-ITS, II. grup-TGFβ2, III. grup-ITS ve IV. grup-TGFβ2 olacak şekilde kültürasyona 37° C’de %5 CO₂ konsantrasyonunda nemli ortamda devam edildi.
- 17) 6 günün sonunda ilk 4 gruba kondrojenik medyum eklenerek 21 gün kültüre devam edildi.

3.7. Pellet Kültürlerinde Hücre-Matriks Kompozisyonunun Dimethylmethylen Blue (DMMB) Yöntemi ile Belirlenmesi

Bu bölümde 21 gün boyunca kondrojenik medyumda kültüre edilen 3B pellet kültür sistemlerinde DMMB analizi ile GAG miktarları gruplar arasındaki farklar spektrofotometrik ölçüm sonuçları elde edilerek karşılaştırıldı.

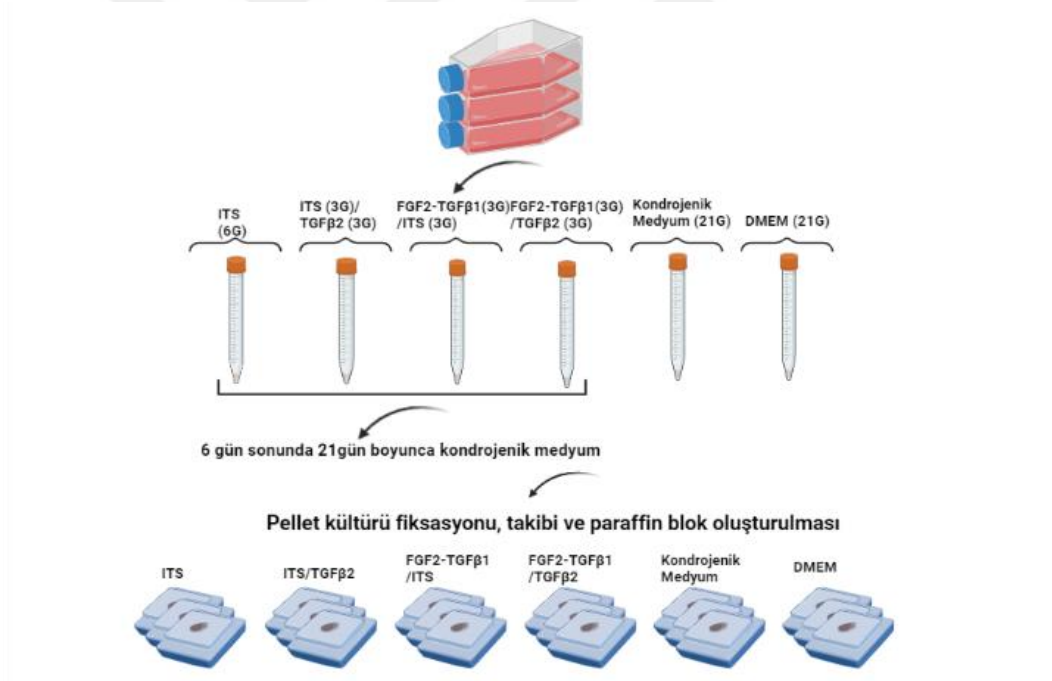
Uygulama:

- 1) Pellet kültürü üzerindeki kondrojenik medyum uzaklaştırıldı.
- 2) Pellet kültürü üzerine 1ml Papain solüsyonu ile 37 °C’de 60dk inkübe edildi.
- 3) İnkübasyondan sonra örnekler mikrosantrifüj tüpüne alındı ve santrifüj yapıldı.
- 4) Üstte kalan süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.

- 5) 1mg/ml GAG içeren örnekten 50µg, 40µg, 30µg, 20µg, 10µg, 5µg, 0µg standartlar hazırlandı.
- 6) 96'lı mikropalte, hazırlanan 25-50 µl standart solüsyonu ve hücre kültürü örnekleri kuyucuklara eklendi.
- 7) 200µl DMMB solüsyonu ile karıştırıldı.
Spektrofotometre (EPOCH, BioTek. Reader) okuyucuda 530nm absorbans oranında spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

3.8. Kondrojenik Yönlendirmeden Sonra Pellet Kültürlerinin Fiksasyonu ve Takibi

3B Pellet kültürleri 21. günün sonunda pellet kültürü fiksasyonu, pellet kültür takibi ve parafine gömme işlemi gerçekleştirilerek bloklar oluşturuldu (Şekil 3.6.)



Şekil 3.6. Pellet kültürü fiksasyonu, pellet kültür takibi ve parafine gömme işlemi gerçekleştirilerek paraffin blok oluşturma diyagramı. Bu şekil, BioRender programı (BioRender, Toronto, Kanada) kullanılarak oluşturulmuştur.

Uygulama:

- 1) Pellet hücre kültürlerinden medyum uzaklaştırıldı.
- 2) PBS ile 2x5 dakika olacak şekilde yıkandı.

- 3) Ardından %4'lik formalin ile 15 dakika fikse edildi.
- 4) %70'lik soğuk alkol ile 30 dakika muamele edildi.
- 5) %95'lik soğuk alkol ile 30 dakika muamele edildi.
- 6) %100 'lük soğuk alkol ile 30 dakika muamele edildi.
- 7) %100 'lük oda ısısında alkol ile 30 dakika muamele edildi.
- 8) Ksilol (Merck, 1082972500) ile 1-2 sn muamele edildi.
- 9) Ardından 1 saat parafinde tutuldu.
- 10) Gömme işlemi gerçekleştirilerek parafin bloklar oluşturuldu.

3.9. Kondrojeniz Süreci Sonrasında Fiksasyonu ve Takibi Yapılan Pellet Parafin Bloklarında Alsiyan Mavisi ile Boyanması Yöntemi

Uygulama:

- 1) Hazırlanan parafin bloklardan 5µm kalınlığında kesitler hazırlanarak incelemeye hazır hale getirildi.
- 2) Kesitleri (5µm kalınlıkta) içeren lamalar, 60 °C'lik etüvde 1 saat bekletilerek kesitlerin lam yüzeyine iyi bir şekilde yapışması sağlandı.
- 3) Daha sonra, preparatlar 10 dakika ksilol (Merck, 1082972500) I ve ksilol II aşamalarından geçirildi.
- 4) Preparatlar, azalan etanol serilerinde (%100, %90, %80 ve %70'lik etanol) beşer dakika tutularak rehidratasyonları gerçekleştirildi.
- 5) Ardından kesitler 5 dakika suya alındı.
- 6) PBS ile 2x5 dakika yıkandı.
- 7) Ardından alsiyan mavisi solüsyonu 1 saat uygulandı.
- 8) Su ile 5 dakika yıkama yapıldı.

9) Nüklear fast red (Sigma, N3020-100M) 5 dakika uygulandı.

10) Su ile yıkama yapıldı.

11) Kaiser (Merck, 1001651000) kapatma solüsyonu ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda (ZEISS, Primo Star) incelemeye hazır hale getirildi.

3.10. Kondrojeniz süreci sonrasında oluşacak pellet paraffin bloklarda COL2A1 ve ACAN proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin immünohistokimyasal yöntem ile belirlenmesi

Protein ifadelerinin özgül olduğunu belirlemek için pozitif kontrol ACAN (Agrekan) için; insan akciğer dokusu, COL2A1 (TipII Kollajen) için; insan eklem kıkırdığı dokusu kullanıldı ve sekonderin özgül olduğunu belirlemek için negatif kontrol yapıldı.

Uygulama:

- 1) Hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler hazırlanarak incelemeye hazır hale getirildi.
- 2) Kesitleri (5µm kalınlıkta) içeren lamalar, 60°C'lik etüvde 1 saat bekletilerek kesitlerin lam yüzeyine iyi bir şekilde yapışması sağlandı.
- 3) Daha sonra, preparatlar 10 dakika ksilolI ve ksilolIII aşamalarından geçirildi.
- 4) Preparatlar, azalan etanol serilerinde (%100, %90, %80 ve %70'lik etanol) beşer dakika tutularak rehidratasyonları gerçekleştirildi.
- 5) Ardından kesitler 5 dakika suya alındı.
- 6) Kesitler, antijenik maskenin giderilmesi için sitrik asitte kaynatıldı.
- 7) Ardından kesitler 3x5 PBS ile yıkandı.
- 8) Normal Goat Serum Blocking Solution (Vectorlab, S1000) ile 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Bu şekilde özgün olmayan antikor bağlanmalarının önüne geçilmeye çalışıldı.

- 9) Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı.
- 10) Primer antikorlar; Aggrecan (ACAN) 1/600 (Proteintech, 13880-1-AP), Col2A1 (TipII Kollojen) 1/400 (Proteintech, 28459-1-AP) dilüsyon oranları belirlendi PBS içerisinde dilüe edildi.
- 11) Hazırlanan antikorlar pellet parafin kesit üzerine damlatıldı.
- 12) Gece boyu +4°C'de inkübasyon gerçekleştirilecektir.
- 13) Ertesi gün primer antikor uzaklaştırıldı.
- 14) PBS ile 3x5 dakika olacak şekilde kesitler yıkandı.
- 15) Goat anti-rabbit (Vector, BA1000) sekonder antikor 1/400 oranında PBS içerisinde dilüe edildi.
- 16) Hazırlanan sekonder antikorlar pellet parafin kesit üzerine damlatıldı.
- 17) 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirildi.
- 18) 1 saat sonra sekonder antikor uzaklaştırıldı.
- 19) PBS/T ile 3x5 dakika olacak şekilde kesitler yıkandı.
- 20) DAB (Sigma, D8001) aşaması uygulanarak reaksiyonlar görünür hale getirildi.
- 21) Ardından zıt boyama olan hematoksilin (Merck, 1051740500) 5sn uygulandı.
- 22) Entellan kapatma solüsyonu ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda (ZEISS, Primo Star) incelemeye hazır hale getirildi.

3.10. İstatistik Analizler

AKMKH tek tabaka ve 3B pellet kültürlerinde alsiyan mavisi ve DMMB bulguları tek yönlü Anova ve student t- testi yöntemi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Çalışılan belirteçlerin immunoboyanma yoğunlukları, imagej programı ile analiz edilip, istatistiksel olarak karşılaştırılmaları tek yönlü Anova ve student-t testi yöntemi

ile gerçekleştirildi (* $P < 0,05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Imagej programı ile boyanmış olan hücrelerin yoğunlukları belirlenerek yine aynı yazılım ile grafiklendirilerek şematize edildi.

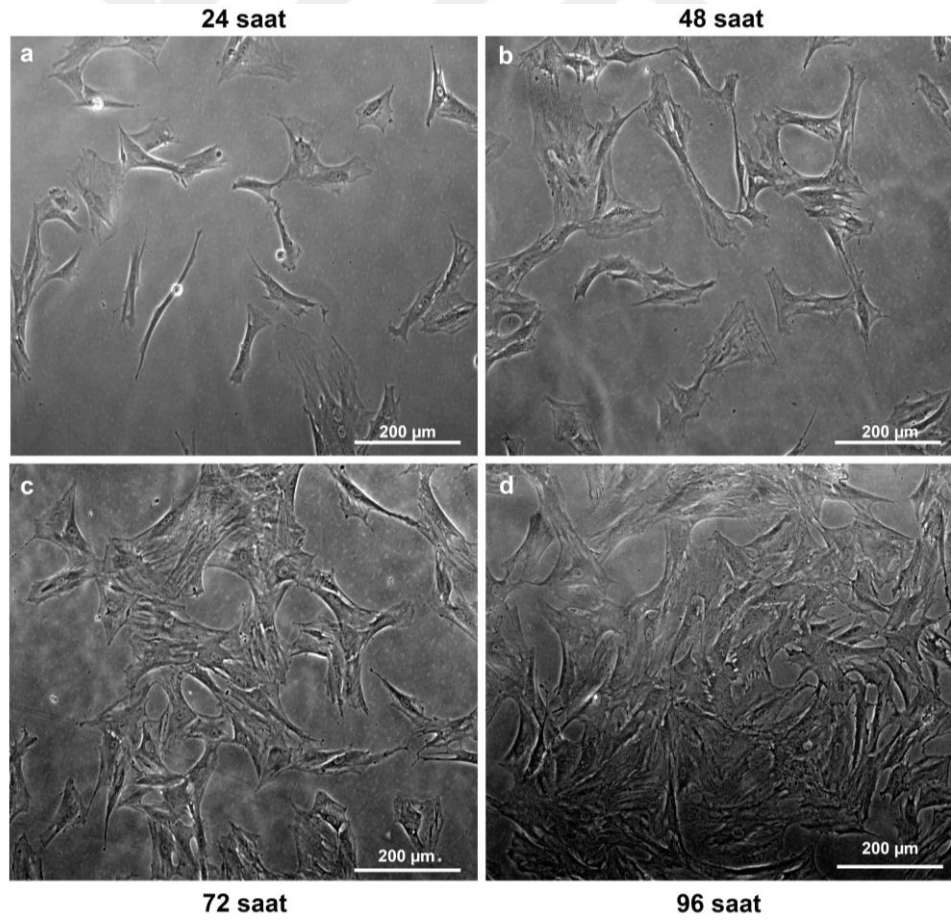


BULGULAR

Bu çalışmada, farklı büyüme faktörlerinin (TGF β 1, TGF β 2, FGF2) farklı süre ve kombinasyonlarının uygulanması ile oluşturulan tek tabaka ve 3B pellet kültür modellerinde; alsiyan mavisi, DMMB analizi yapılarak kıkırdak matriks kompozisyonları değerlendirildi. Ayrıca oluşturulan 3B pellet kültürlerinde her grup için COL2A1 ve ACAN proteinleri immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Elde edilen veriler istatistiksel açıdan karşılaştırıldı.

4.1. Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü ve Morfolojisi

AKMKH'ler %10 FBS içeren DMEM medyumunda tek tabaka kültür ortamında kültüre edildi. Hücrelerin 24., 48., 72. ve 96. saatlerinde fibroblast benzeri bir morfoloji sergilediği belirlendi. Ayrıca pasajdan 4 gün sonra hücrelerin istenilen yoğunluğa ulaştıkları gösterildi (Şekil 4.1.).

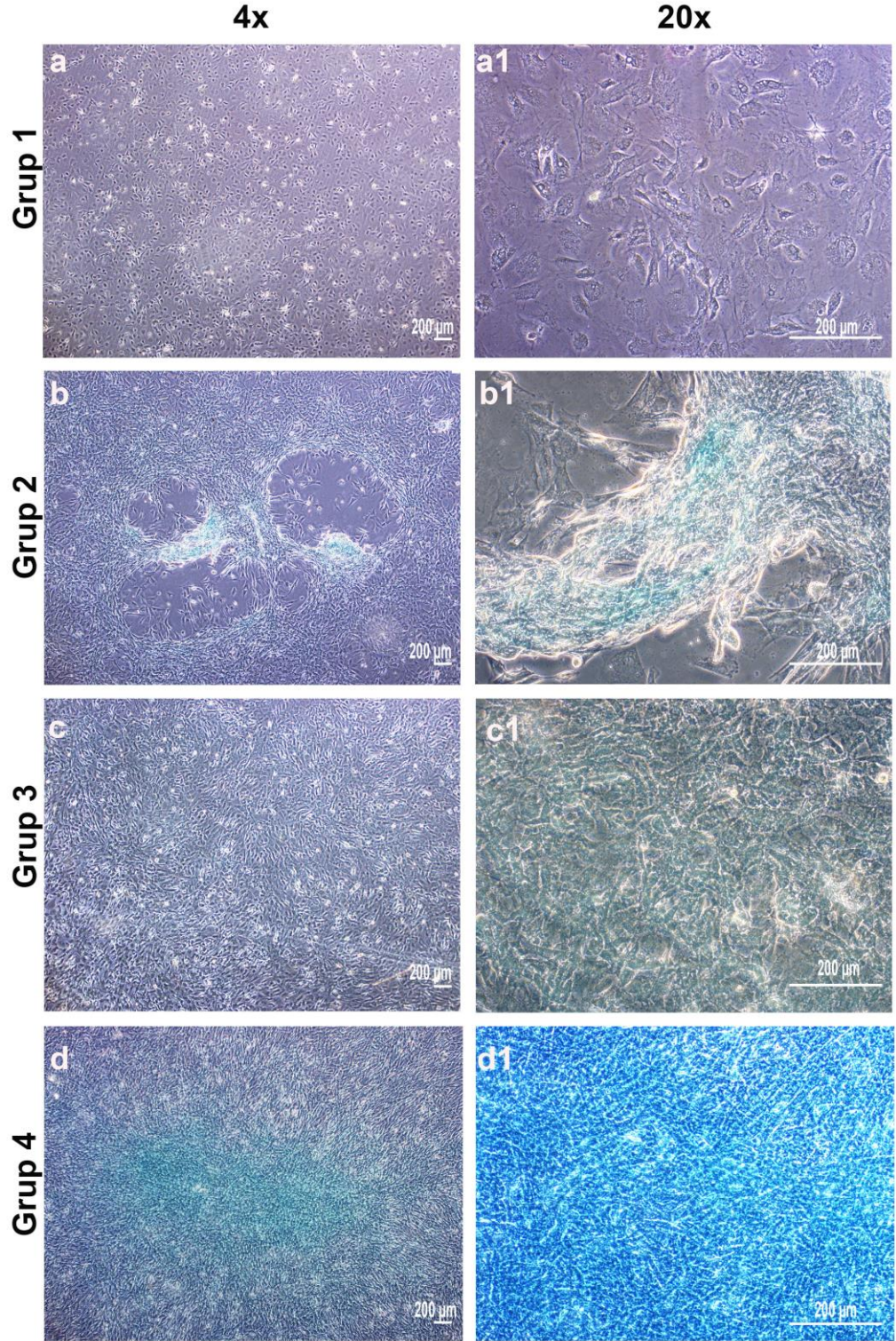


Şekil 4.1. Pasaj2 AKMKH'lerin (a) 24., (b) 48., (c) 72., (d) 96. saatlerindeki hücre morfolojileri (20X) skala bar: 200µm.

4.2. Tek Tabakalı Hücre Kùltürlerinde Hücre-Matriks Kompozisyonunun Alsiyan Mavisi ile Belirlenmesi

Tek tabakalı kùltür ekimi yapılan ve Tablo 3.1 ‘de özetlendiği gibi oluşturulan gruplar 6. günün sonunda kıkırdak matriks elemanı olan GAG birikiminin değeriendirilmesi için alsiyan mavisi ile muamele ederek incelemeler gerçekleştirildi. Bu deney sonucuna göre sadece ITS ile muamele edilen ve kontrol grubu olarak oluşturduğumuz Grup1; Grup2, Grup3 ve Grup4’e göre daha az boyandı. Grup2 ve Grup3 benzer yoğunlukta boyanırken, Grup4 ise diğer gruplara kıyasla en yoğun boyanma gösteren grup oldu (şekil 4.2.).



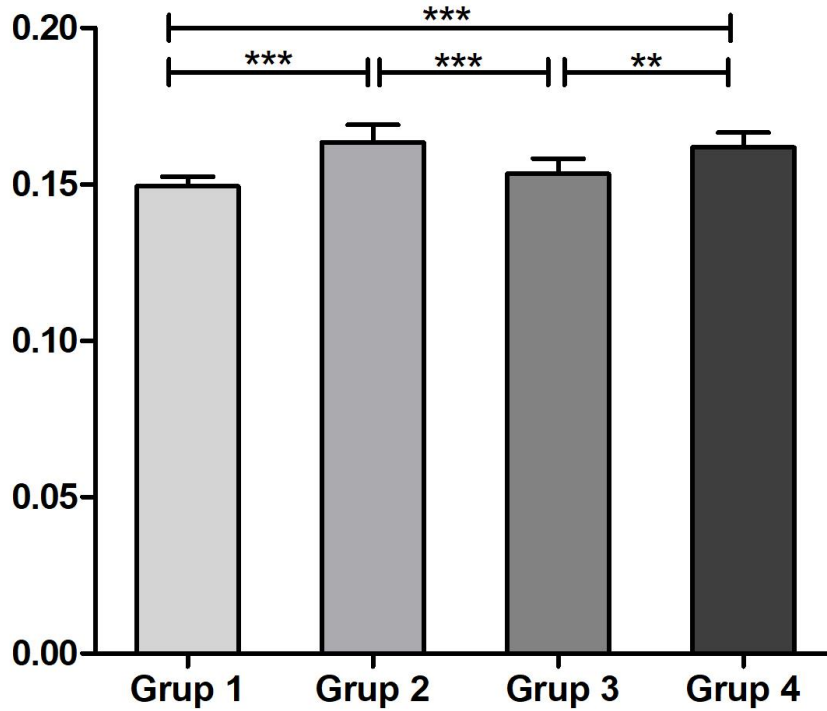


Şekil 4.2. Tek tabakalı kültürde büyüme faktörleri ile oluşturulan grupların 6 günlük kültür sonunda alsiyan mavisi ile boyanmış görüntüleri. Grup4'ün diğer gruplara göre daha yoğun bir şekilde boyandığı tespit edildi (4X,20X) skala bar: 200µm.

4.3. Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde Hücre-Matriks Kompozisyonunun Dimethylmethylen Blue (DMMB) Yöntemi ile Belirlenmesi

Tek tabakalı kültür ekimi yapılan ve Tablo3.1 'de özetlendiği gibi oluşturulan gruplarda 6. günün sonunda kıkırdak matriksinin temel elemanı olan sülfatlanmış GAG miktarları bir spektrofotometrik analiz olan DMMB tekniği ile belirlendi. Bu parametre sonucunda elde edilen veriler tek yönlü Anova testi ve Tukey testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Elde edilen veriler incelendiğinde özellikle Grup4'ün Grup1'e göre anlamlı olduğu Grup2 ve Grup4 arasında bir anlamlılık olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca Grup4 ve Grup2'nin Grup3'e göre anlamlı olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.3.; $P < 0.01$)

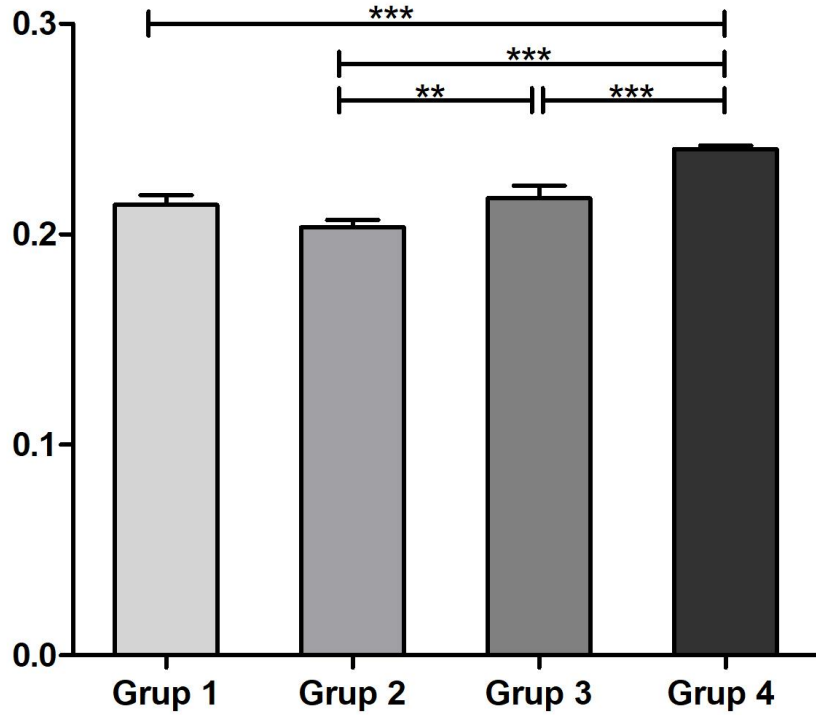


Şekil 4.3. Tek tabaka kültürde büyüme faktörleri ile oluşturulan grupların 6 günlük kültür sonunda DMMB analiz tek yönlü ANOVA ve Tukey testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. * işareti istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir. $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

4.4. Pellet Kültürlerinde Hücre-Matriks Kompozisyonunun Dimethylmethylen Blue (DMMB) Yöntemi ile Belirlenmesi

AKMKH'ler ile 3B pellet kültürü oluşturduğumuz ve 21 gün boyunca büyüme faktörlerinin farklı kombinasyonları ile kültüre ettiğimiz (Tablo 3.2.) tüm gruplarda

DMMB analizi sonuçlarına göre; Grup4'ün Grup1, Grup2 ve Grup3'e göre kıyaslandığında anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.4.). Ayrıca Grup3'ün Grup2 'ye göre de yüksek anlamlı olduğu görüldü (Şekil 4.4.; $P < 0.01$).



Şekil 4.4. Pellet kültürde büyüme faktörleri ile oluşturulan grupların 21 günlük kültür sonunda DMMB analizi tek yönlü ANOVA ve Tukey testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. * işareti istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir. $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

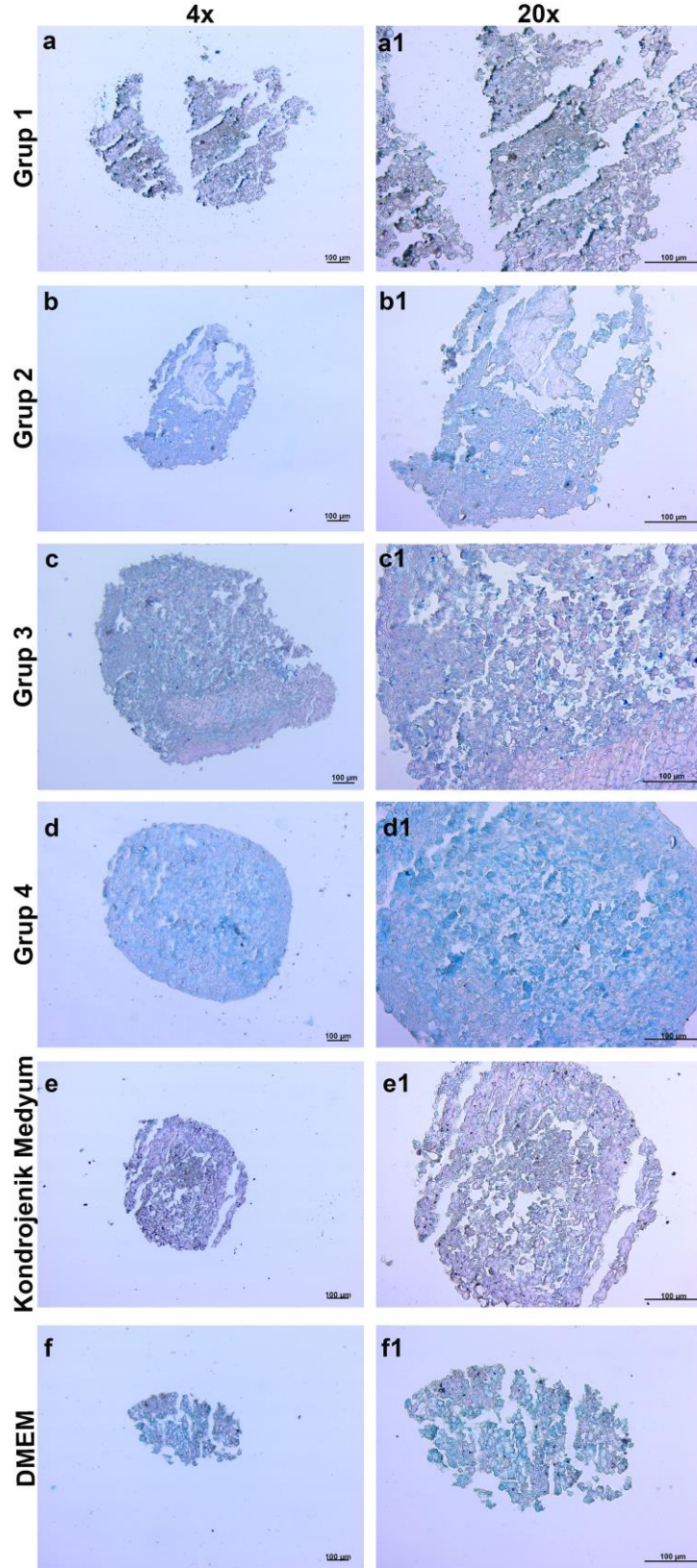
4.5. Kondrojeneze Yönlendirilen Pellet Kültür Kesitlerinde Alsiyan Mavisi Boyanması

21 gün boyunca kültüre edilen 3B kültür pelletlerinden elde edilen paraffin kesitlerde kıkırdak matriks kompozisyonunda yer alan GAG miktarının belirlenmesi için alsiyan mavisi boyanması gerçekleştirildi. 21 gün sonunda elde edilen pellet kültür gruplarda alsiyan mavisi sonuçları Şekil 4.5. gösterilmiştir. Alsiyan mavisi boyanmaları , Grup4'ün (Şekil 4.5. d-d1); Grup1 (Şekil 4.5.a-a1), Grup2 (Şekil 4.5. b-b1), Kondrojenik Medyum (Şekil 4.5.e-e1) ve DMEM (Şekil 4.5. f-f1) gruplarına kıyasla histolojik boyamada belirgin bir yoğunluk farkı gözlemlendi. Grup3'ün (Şekil 4.5. c-c1); Grup2 (Şekil 4.5. b-b1), Kondrojenik Medyum (Şekil 4.5.e-e1) ve DMEM (Şekil 4.5. f-f1) grubuna göre daha yüksek anlamlı bir olduğu gözlemlendi. Aynı zamanda DMEM

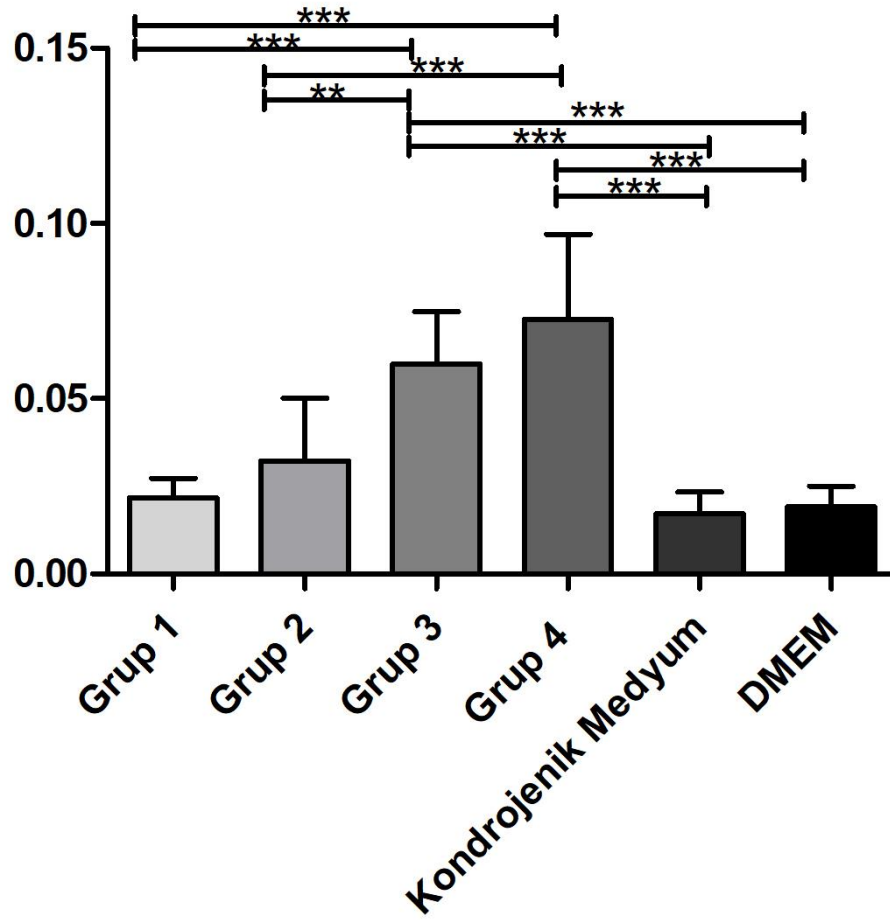
(Şekil 4.5. f-f1) grubu Kondrojenik Medyum (Şekil 4.5.e-e1) grubuna göre daha yoğun boyanmıştır.

Elde edilen görüntüler Image J analiz programı ile değerlendirilmiş olup; yoğunluk artışı istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4.6.; $P < 0.01$).





Şekil 4.5. 3B Pellet kültürü 21. gün kesitlerinde alsiyan mavisi boyanması görüntüleri. Grup1 (a-a1), Grup2 (b-b1), Grup3 (c-c1), Grup4 (d-d1), Kondrojenik Medyum (e-e1) ve DMEM (f-f1) (10X,20X) skala bar: 100µmdir.



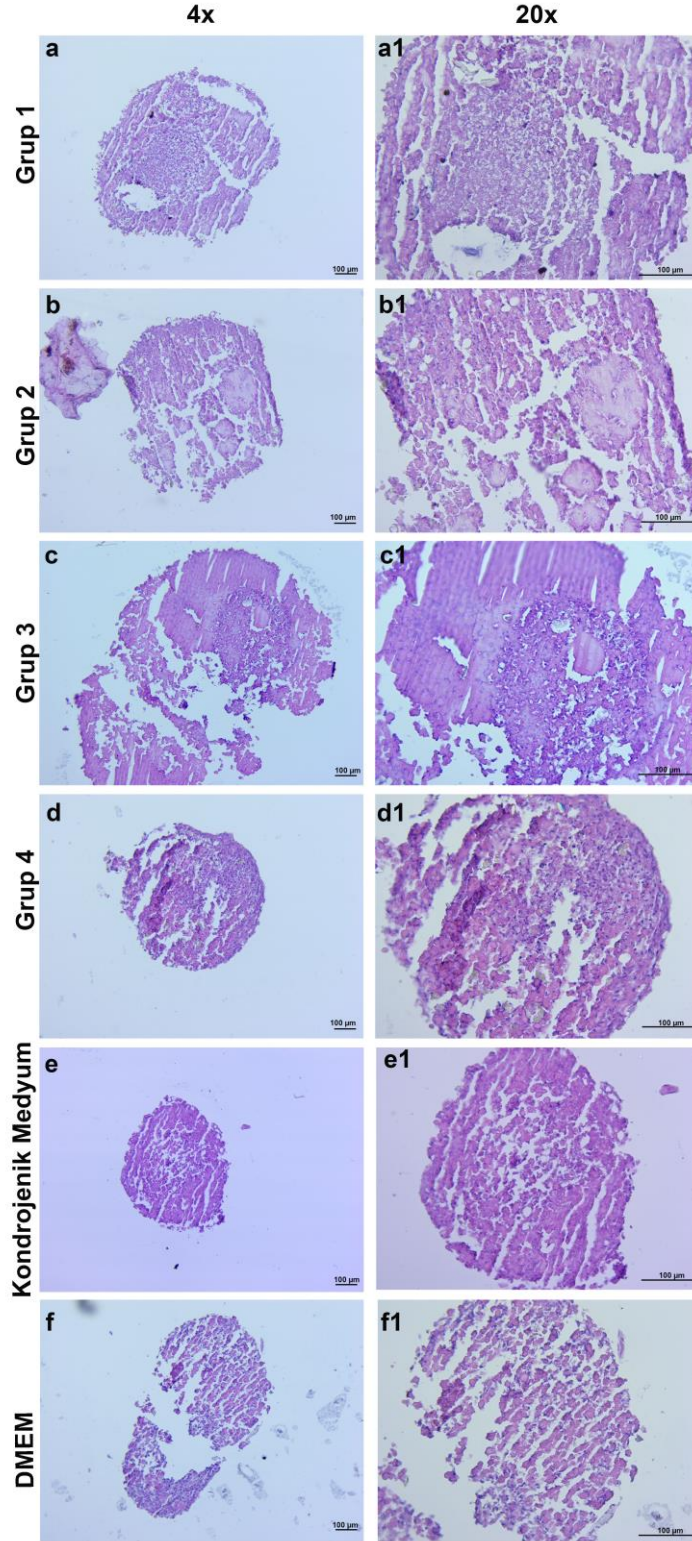
Şekil 4.6. 3B Pellet kültürü 21. gün kesitlerinde alsiyan mavisi histolojik boyama yoğunluğu ile ilişkili Image-J analizi bulgularına ait grafik (**p<0.01, ***p<0.001).

4.6. Kondrojeneze Yönlendirilen Pellet Kültür Kesitlerinde Hematoksilen-eozin boyanması

21 gün boyunca kültüre edilen 3B kültür pelletlerinden elde edilen paraffin kesitlerde hücrel organizasyonun belirlenebilmesi amacı ile hematoksilen-eozin boyanması yapıldı (Şekil 4.7.). Pellet kültür sistemlerinde matris üretiminin yoğunluğuna bağlı olarak; pelletlerin sıkı, düz, yuvarlak, parlak üç boyutlu bir yapıya sahip olmaları standart bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır. Oluşturulan gruplarda 21 gün kültüre edilen pelletlerde Grup4 diğer gruplara göre daha kompakt sıkı bir yapı oluşturmuştur (Şekil 4.7. d-d1). Grup3'ün (Şekil 4.7. c-c1) boyutsal olarak Grup4'e (Şekil 4.7. d-d1) yakın olduğu fakat sıkı kompakt bir yapıya sahip olmadığı gözlenmiştir. Grup2'nin (Şekil 4.7. b-b1) ise hücrel dağılımı ve kompakt yapısı

Grup4'e (Şekil 4.7. d-d1) benzer şekilde iken boyutsal olarak değerlendirildiğimizde oldukça küçük olduğu belirlenmiştir. Kondrojenik Medyum (Şekil 4.7. e-e1) ile muamele edilen kontrol grubunda ise beklenen pellet büyüklüğü elde edilememiştir. DMEM (Şekil 4.7. f-f1) grubu ise diğer gruplarla karşılaştırıldığında hücresel organizasyonu, kompakt yapısı ve büyüklüğü oldukça düşüktür.





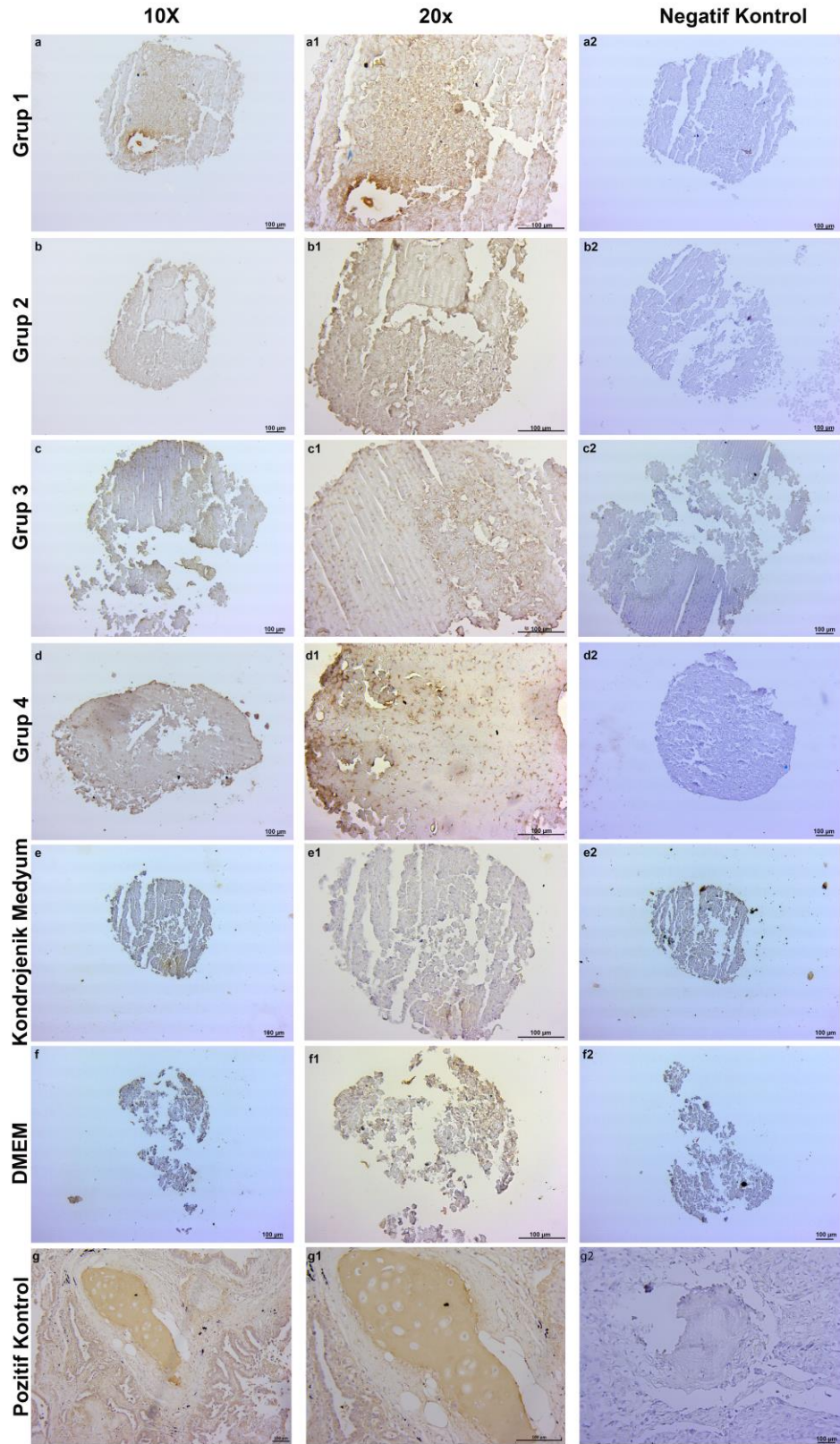
Şekil 4.7. 3B Pellet kültürü 21. gün kesitlerinde hemotoksilen-eozin boyanması görüntüleri. Grup1 (a-a1), Grup2 (b-b1), Grup3 (c-c1), Grup4 (d-d1), Kondrojenik Medyum (e-e1) ve DMEM (f-f1) (10X,20X) skala bar: 100µmdir.

4.7. Kondrojeneze Yönlendirilen Pellet Kùltürler Kesitlerinde COL2A1 ve ACAN proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin immünühistokimyasal yöntem ile belirlenmesi

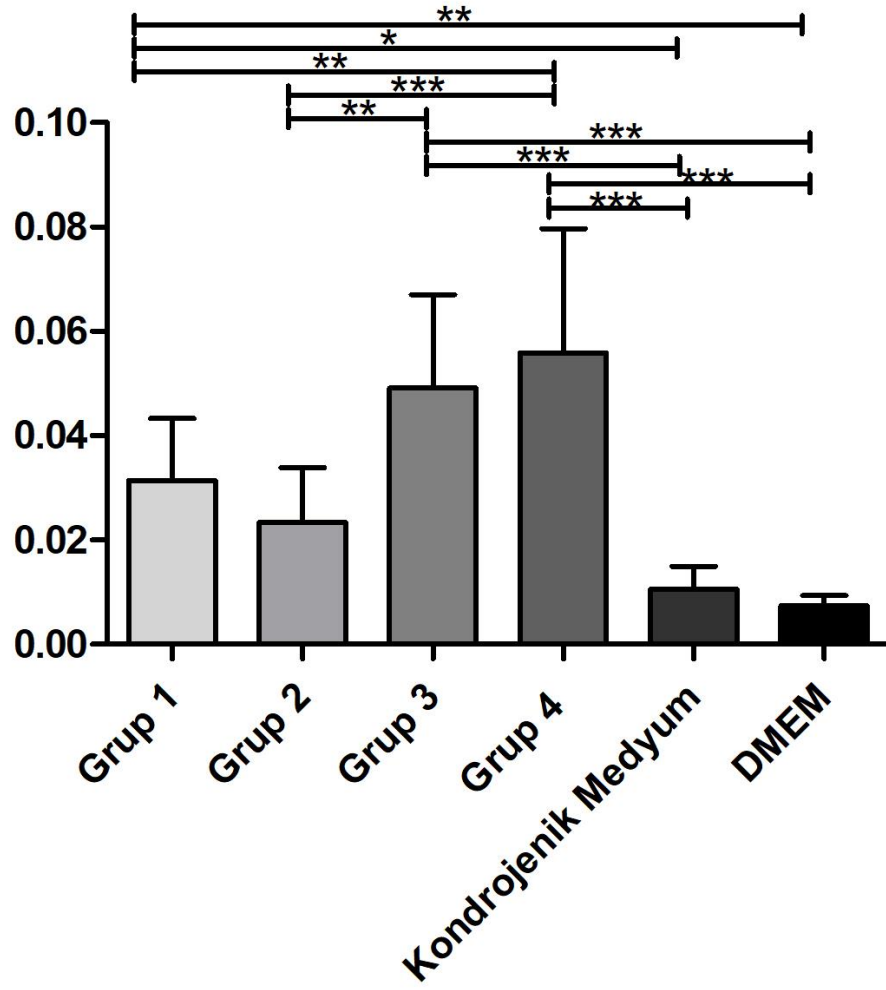
21 gün boyunca kùltüre edilen 3B kùltür pelletlerinden elde edilen paraffin kesitlerde (Tablo 3.2.) immünohistokimyasal olarak sırasıyla Col2A1 ve ACAN reaksiyonları belirlendi.

Col2A1 reaksiyonları, Grup4'ün (Şekil 4.8.d-d2); Grup1 (Şekil 4.8.a-a2), Grup2 (Şekil 4.8. b-b2), Kondrojenik Medyum (Şekil 4.8.e-e2) ve DMEM (Şekil 4.8. f-f2) gruplarına kıyasla immünboyamasında belirgin bir yoğunluk farklı olduğu gözlemlendi. Grup1 (Şekil 4.8.a-a2) ve Grup3'ün Kondrojenik Medyum (Şekil 4.8.e-e2) ve DMEM'e (Şekil 4.8. f-f2) göre anlamlı düzeyde yoğun olduğu gözlemlendi. Aynı zamanda Grup2 (Şekil 4.8. b-b2) ve Grup3 (Şekil 4.8. c-c2) arasında anlamlı bir fark gözlenirken Grup3 (Şekil 4.8. c-c2) ve Grup4 (Şekil 4.8.d-d2) arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Elde edilen görüntüler Image-J analiz programı ile değerlendirilmiş olup; yoğunluk artışı istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4.9.; $P < 0.05$).



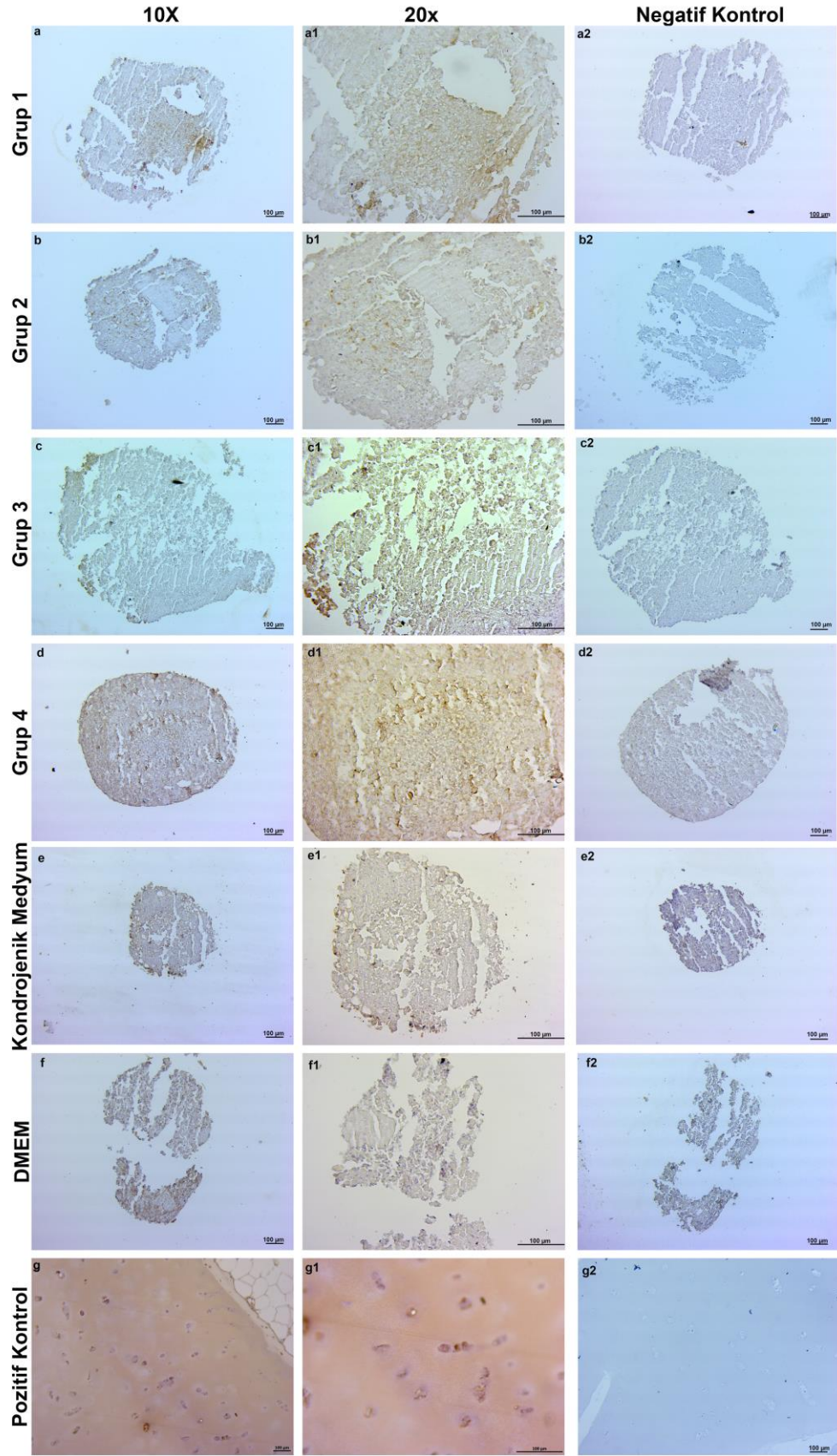
Şekil 4.8. 3B Pellet kültürü 21. gün kesitlerinde COL2A1 ifadesinin immünohistokimyasal görüntüleri. Grup1 (a-a2), Grup2 (b-b2), Grup3 (c-c2), Grup4 (d-d2), Kondrojenik Medyume (e-e2), DMEM (f-f2) ve insan akciğer dokusu pozitif kontrol (g-g2)) (10X,20X) skala bar: 100µmdir.



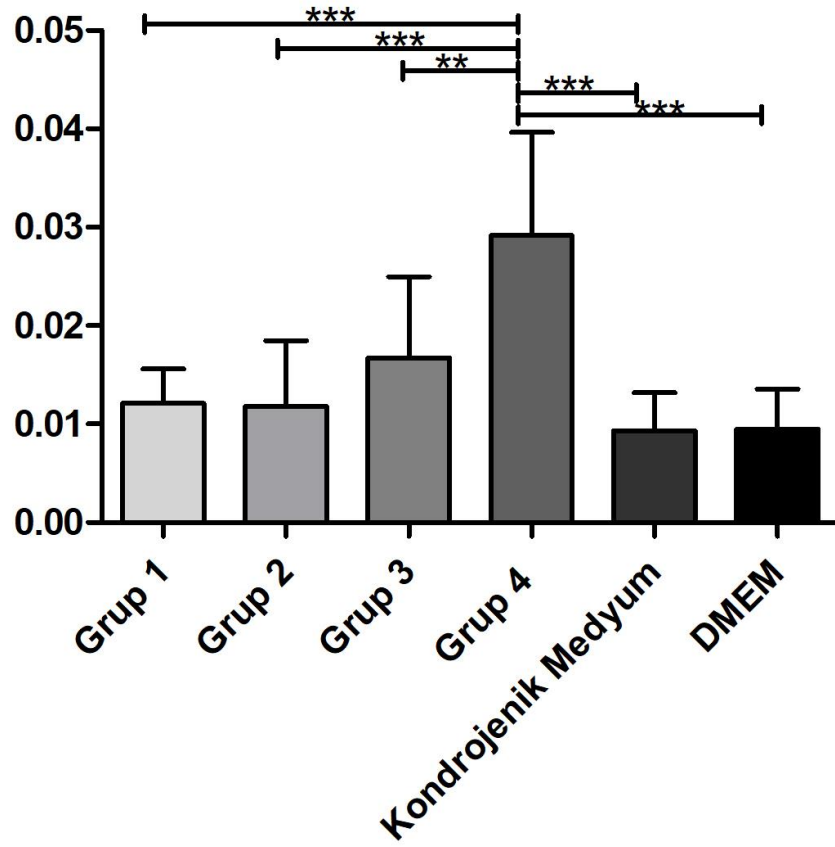
Şekil 4.9. 3B Pellet kültürü 21. gün kesitlerinde COL2A1 immunoboyanması yoğunluğu ile ilişkili Image-J analizi bulgularına ait grafik (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

ACAN reaksiyonları, Grup4 (Şekil 4.10. d-d2); Grup1 (Şekil 4.10. a-a2), Grup2 (Şekil 4.10. b-b2), Grup3 (Şekil 4.10. c-c2), Kondrojenik Medyum (Şekil 4.10. e-e2) ve DMEM (Şekil 4.10. f-f2) gruplarıyla kıyaslandığında diğer gruplara göre immünohistokimyasal boyamada anlamlı bir yoğunluk farkı gözlemlendi. Ayrıca diğer gruplar arasında anlamlı bir yoğunluk farkı gözlenmedi.

Elde edilen görüntüler Image-J analiz programı ile değerlendirilmiş olup; yoğunluk artışı istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4.11.; $P < 0.01$).



Şekil 4.10. 3B Pellet kültürü 21. gün kesitlerinde ACAN ifadesinin immünohistokimyasal görüntüleri Grup1 (a-a2), Grup2 (b-b2), Grup3 (c-c2), Grup4 (d-d2), Kondrojenik Medyume (e-e2), DMEM (f-f2) ve insan eklem kıkırdığı dokusu pozitif kontrol (g-g2) (10X,20X) skala bar: 100µmdir.



Şekil 4.11. 3B Pellet kültürü 21. gün kesitlerinde ACAN immunoboyanması yoğunluğu ile ilişkili Image-J analizi bulgularına ait grafik (**p<0.01, ***p<0.001).

TARTIŞMA

Eklem kıkırdağı hasarlanması yaşlanma ile birlikte artan dejeneratif bir hastalıktır. Son verilere göre, 52.2 milyon Amerikalıya eklem kıkırdağı dejenerasyonu teşhisi konulmuştur [89]. Bu rakamların 2040 yılında 78.4 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Eklem kıkırdağı dejenerasyonunu önlemek için henüz tanımlanmış etkili bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır [90]. Hücre terapileri çeşitli hastalıkların tedavilerinde özellikle eklem kıkırdağı rejenerasyon süreçlerinde gelişmekte olan yaklaşımlardan biridir. Bu alanda mezenkimal kök hücreler, hücre terapilerinde en uygun hücre kaynağı olarak gösterilmektedir.

Bu çalışmada; 250-300g arasında Wistar sıçanların kasık deri altı bölgesindeki yağ dokusundan izole edilmiş olan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AKMKH) kullanılmıştır. Bu hücrelerin, ISCT'nin belirlemiş olduğu mezenkimal kök hücre belirteçlerini eksprese etmelerinin yanı sıra hem morfolojik hem de fonksiyonel olarak AKMKH karakterine sahip oldukları daha önce gösterilmiştir [88]. Deri altı adipoz dokudan elde edilen AKMKH'lerin farklanma potansiyellerinin yüksek olmalarından dolayı kıkırdak farklanma çalışmalarında kullanılmaktadırlar. Ayrıca ağır invaziv bir cerrahi gerektirmeden diğer mezenkimal kök hücre kaynaklarına göre daha kolay izole edilebilmeleri sebebi ile kıkırdak araştırma çalışmalarında değerlidirler. Çalışmamızın yaygın etkilerinden biri de, *in vitro* kondroenez sürecini ve kültür ortamını geliştirmek amacı ile kullanılabilirliği klinik açıdan da daha kolay olan AKMKH seçilmiş olmasıdır. 2. Pasaj AKMKH'nin *in vitro* koşullar altında 96 saat boyunca belirli aralıklarla görüntüleri elde edildi. 24., 48., 72. ve 96. saatlerde invert mikroskop kullanılarak 20X büyütmedeki görüntüleri incelendiğinde, hücre morfolojilerinin literatüre uygun olduğu belirlendi [91, 92].

Hücre temelli tedavi yaklaşımlarının temel prensibi olarak, *in vitro* kondroenez, embriyonik kıkırdak gelişimini taklit ederek geliştirilmeye çalışılmaktadır [79]. Bu süreçte TGF β ve FGF ailesi büyüme faktörleri, öncü kök hücrelerin çoğalmasında, farklanmasında ve olgunlaşmasında etkili olan SOX9 ve Rux1 gibi transkripsiyon faktörlerini aktive etmektedirler [78, 87]. Bu transkripsiyon faktörleri kıkırdak genlerinin gen ifadelerini sağlarlar. İlgili literatür incelendiğinde, TGF β ve FGF

büyüme faktörlerinin mezenkimal kök hücrelerin kıkırdağa farklanma deney modellerinde oldukça etkili olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir [92-94].

FGFR1-3'ün *in vitro*'da yetişkin mezenkimal kök hücre kondrojenik farklanmasında ve embriyonik uzuv gelişimde eksprese edildiği gösterilmiştir [8]. Geun Soon Yoo ve ark. yaptığı çalışmada FGF büyüme faktörünün, AKMKH'nin kondrojenik farklanmasını etkilediğini göstermektedir [92]. Başka bir çalışmada ise, FGF2, FGF9 ve FGF18'in insan kaynaklı mezenkimal kök hücrede kondrojenezi değerlendirildiğinde, FGF2'nin hücre proliferasyonunda etkiliyken, FGF9/FGF18'in kondrojenik farklanmada kritik belirleyici bir rol oynadığı belirtilmiştir [87]. Kök hücre temelli eklem kıkırdağı yenileme stratejilerini geliştirmek amacı ile, AKMKH'lerin *in vitro* da hiyalin kıkırdağa farklandırma çalışmasında TGFβ3 kullanımı hipertrofiyi önlemiştir [94]. Aynı çalışmanın *in vivo* deneylerinde ise kıkırdak yenilenmesini desteklediği ortaya konmuştur. IGF-1 ve TGFβ3 birlikte kullanıldığında hipertrofi önlenmiş ve daha kaliteli bir hiyalin kıkırdak elde edilmiştir [95]. Başka bir çalışmada ise FGF18 ve TGFβ3'ün birlikte kültüre edildiğinde matriks birikimi ve kondrojenik farklanmada pozitif etkisi gösterilmiştir [96]. Ayrıca AKMKH'ler ile oluşturulan pellet kültür modeli kondroenez sürecinde FGF18 ve TGFβ3'ün etkisi incelendiğinde; kıkırdak matriks elemanlarının gen ve protein ekspresyon düzeylerinde büyüme faktörlerinin sinerjistik etkisinin, tek tek uygulanan gruplara göre daha anlamlı olduğu orataya konulmuştur [96]. Literatüre kazandırılan birçok çalışmada, kök hücrelerin *in vitro* kondroenez modellerinde, büyüme faktörlerinin birlikte kullanımının tek başına kullanımına göre daha etkili olduğu gösterilmiştir [97-99]. Yapılan yönlendirme deney modellerinde oldukça etkin sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen halen *in vitro* kondroenez sürecinde etkin bir büyüme faktörü kombinasyonu literatürde mevcut değildir. Bu tez projesi kapsamında daha önce literatürde denenmemiş olan, TGFβ1, TGFβ2 ve FGF2 büyüme faktörlerinin farklı kombinasyonlarının belirli sürelerde sıçan AKMKH'leri tek tabaka ve 3B pellet kültür modeli kondroenezine etkisi araştırılmıştır.

Bu tez projesi kapsamında, *in vitro*'da TGFβ1, TGFβ2 ve FGF2 büyüme faktörlerinin sıçandan elde edilmiş AKMKH'lere uygulanmasının kondroenez sürecine olan etkisi araştırılmıştır. AKMKH'lerin tek tabakalı ve 3B pellet kültürlerinde TGFβ1, TGFβ2 ve FGF2 uygulamaları kıkırdak matriks birikimini belirli düzeylerde arttırmıştır.

Hücre kültürünün tek tabakalı sisteminin 6. gününde ve 3B pellet kültürünün 21. gününde alsiyan mavisi boyanmalarında total GAG miktarının büyüme faktörlerini belirli gün ve sürelerde uyguladığımız gruplar içerisinde özellikle Grup4'te (FGF2/ TGFβ1+ TGFβ2) diğer gruplara oranla daha yoğun bir boyanma sergilediği gözlemlendi. Yine benzer şekilde DMMB analizi ile sülfatlanmış GAG miktarı Grup4 (FGF2/ TGFβ1+ TGFβ2) için diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, 3B pellet kültür kesitlerinde hiyalin kıkırdak matriksinin bir göstergesi olan COL2A1 ve ACAN immünohistokimya boyanmalarının yine Grup4'te istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Alsiyan mavisi boyası, kıkırdak matriksinin temel elemanı olan GAG gibi asidik polisakkaritleri (ph: 2.5) boyar. Dokunun boya ile muamelesinden sonra ortaya çıkan mavi renk reaksiyonu GAG birikimlerini gösterir. Bogdanova, A., ve ark *in vitro* tek tabaka kültürde adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre farklanmasını sağlayarak kıkırdak matriks temel elemanı olan GAG birikimini alsiyan mavi boyası ile göstermişlerdir [100]. Bulgularıyla uyumlu olarak çalışmamızda, tek tabaka kültürde alsiyan mavisi pozitif boyanmalar elde ettik. Bununla birlikte, tek tabaka kültürde 3 gün TGFβ1/ FGF2 uygulayıp ardından 3 gün boyunca da TGFβ2 (Grup4) ile kültüre ettiğimiz grubun diğer gruplar ile kıyaslandığında en yoğun GAG birikimini ihtiva ettiğini gözlemledik. Ayrıca 3 gün boyunca ITS ve 3 gün boyunca TGFβ2 uyguladığımız (Grup2) hücrelerin birbiri üzerine birikimler yaparak yuvarlak farklanma alanları oluşturduğunu gözlemledik. Literatür bilgisine dayanarak TGFβ2'nin kondrogenezi destekleme özelliğine bağlı olarak proliferasyon sürecine kıyasla farklılaşma adımı desteklediği ve buna bağlı olarak yuvarlak farklılaşma alanlarının oluşturulduğunu söyleyebiliriz.

DMMB yöntemi, biyolojik örneğin ekstraselülmatriksinde yer alan sülfatlanmış-GAG'ları belirlemek için kullanılır. Temel olarak 1.9-dimetilmetilen mavisi (DMMB) boyası doku içerisindeki GAG'lara bağlanarak DMMB-GAG kompleksleri oluştururlar. Bu komplekslerin oluşumuyla bir renk reaksiyonu ortaya çıkar ve bu sonuçlar spektrofotometrik olarak okunarak analiz edilir [101]. Böylece örnekteki sülfatlanmış GAG miktarı belirlenmiş olur. Tek tabaka kültürde TGFβ kullanımı proteoglikan üretimini desteklemektedir [102]. İpek scaffold ile oluşturulan 3B kültür

modellerinde TGF β 1 uygulanan grup incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla GAG içeriğinin daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. Hyeran Cho ve ark., insan AKMKH'lerini büyüme faktörleri ile kültüre ettiklerinde, DMMB analiz sonuçlarına göre kıkırdak matriks birikiminin diğer gruplara göre daha anlamlı olduğunu belirlemişlerdir [103]. Mezenkimal kök hücreler, 3B kültür ortamında 21 gün boyunca kültüre edildiğinde, TGF β 1 uygulanan gruplarda GAG birikiminin arttığı gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada 2B kültür ile 3B kültürde karşılaştırıldığında, GAG birikiminin 3B kültür sisteminde 2B kültüre göre daha anlamlı olduğu vurgulanmıştır [102].

Gerçekleştirmiş olduğumuz bu çalışmada, GAG standardı kullanılarak örnekler standardize edilmiştir. Bulgularımıza göre, 6 gün boyunca tek tabaka hücre kültüründe TGF β 1, FGF2 ve TGF β 2 (Grup4) kombinasyonunu uyguladığımız grup istatistiksel olarak diğer gruplar ile karşılaştırıldığında en yüksek sülfatlanmış GAG ihtiva etmekteydi. Tek tabaka hücre kültürü modelinde sadece son 3 gün boyunca TGF β 2 uyguladığımız Grup2, Grup4 yakın düzeyde sülfatlanmış GAG içermekteydi. Bu verilere göre tek tabaka hücre kültür modelinde TGF β 2' nin kondrojenezi desteleyici özelliğine bağlı olarak benzer nitelikte sülfatlanmış GAG içeriği sentezine neden olabileceği düşüncesindeyiz. Benzer şekilde 6. gün tek tabaka hücre kültür modelinde alsiyan mavisi boyanması sonuçlarımızda paralellik göstermektedir. 3B pellet kültürleri 21 gün kültüre edildikten sonra papain enzim solüsyonuna maruz bırakılmış ve lizatlar hazırlanmıştır. Ardından bu lizatlar DMMB analizi ile değerlendirilmiştir. DMMB sonuçlarımıza göre Grup4 yine diğer gruplar ile kıyaslandığında en yoğun düzeyde GAG içerdiği bulundurmaktaydı. Tek tabakalı hücre kültür modelinde Grup3'e göre Grup2 istatistiksel olarak daha anlamlı iken 3B pellet kültüründe Grup3'ün Grup2'ye göre daha anlamlı olduğunu gözlemledik. Bu sonuçlar doğrultusunda, tek tabakalı hücre kültür modelinde TGF β 2'nin kondrojeniz destekleyici özelliği daha yüksek iken 3B pellet kültür sisteminde yapının üç boyutlu özelliğine bağlı olarak , hücreler arası etkileşim düzeyinin değişmesi ile farklanmayı pozitif yönde etkilediği kanaatindeyiz. Ayrıca, 3B pellet kültür sisteminde büyüme faktörlerinin belirlediğimiz süre ve kombinasyonlarda uygulanması kıkırdak matriks birikimini arttırmıştır.

İnsan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kondrojeniz sürecinde FGF2' ye maruz kalmaları Sox9 ekspresyonunun aktivasyonunu arttırmaktadır [87]. Bu çalışmanın verileri incelendiğinde, 3B pellet kültür sistemine FGF2 ve TGFβ'nın birlikte uygulanması, immünohistokimyasal olarak tipII kollajen ekspresyonunu artırmıştır. AKMKH kültüründe FGF2'nin kondrojenize olan etkisi mRNA seviyesinde incelendiğinde tipII kollajen, agrekan ve SOX9 ekspresyonu artarken, hipertrofik belirteç olan tip X kollajen ekspresyonu azalmıştır [104]. TGFβ3, BMP6 ve FGF2 büyüme faktörlerinin 3B pellet kültüründe kondrojenize etkisinin incelendiği çalışmada, TGFβ3 ve BMP6'nın birlikte uygulandığı grupta diğer kombinasyonlara göre DMMB analizi, alsiyan mavisi boyası, immünohistokimyasal analizlerinde daha anlamlı olduğu gösterilmiştir [105]. TGFβ sinyalleri kondrojenizde TGF reseptör-1 kinaz ile inhibe edildiğinde pellet kültür sisteminde kıkırdak matriks proteinlerinin yoğunluklarının değiştiği gösterilmiştir [82]. TGFβ1 ve BMP2'nin kondrojenik farklılaşma üzerine etkisinin incelendiği başka bir çalışmada ise TGFβ1'in kondrojenik farklılaşmada kondrojenik gen ifadesini artırırken, BMP2'nin sinerjistik etkisinin olmadığını gösterilmiştir [106]. FGF2'nin kondrojenizde mezenkimal kök hücreyi erken farklılaşmaya götürdüğü, buna bağlı olarak kültürün ilerleyen zamanlarında farklılaşmayı kontrol eden genlerin ekspresyon seviyelerinin değiştiği gösterilmiştir [107]. 3B kültür sistemlerinde TGFβ etkisinin incelendiği bir çalışmada oluşturulan pelletlerde alsiyan mavisi boyanmalarının daha yoğun olduğu gösterilmiştir [102]. Tüm bu bilgiler ışığında AKMKH'nin kondrojenizinde 3B pellet kültür sistemlerinin oluşturulması ve kültüre büyüme faktörlerinin eklenmesi kıkırdak matriksinin temel elemanları olan tipII kollajen, agrekan ve GAG miktarını arttırmaktadır.

Bu çalışmada 21 günlük pellet kültür modelinden elde ettiğimiz pelletler arasında; Grup 4 'ün şekil, boyut ve kompakt yapısının diğer gruplara göre daha iyi olduğu gözlemlendi. Literatüre uygun olarak, daha pürüzsüz daha yuvarlak sıkı bir yapıya sahiptiler. Çalışmamızın pellet kültür modelinden elde edilen parafin kesitlerinde yapılan hematoxilen-eozin boyanması sonuçlarında Grup4'ün boyutunun daha büyük olduğu daha kompakt sıkı bir yapıya sahip olduğu gösterilmiştir. Grup1 ve Grup2'nin boyutsal olarak benzer olduğu fakat yapısal olarak karşılaştırıldığında Grup2 'nin daha sıkı bir yapıya sahip olduğu gösterilmiştir. Grup3'ün de boyutsal olarak Grup4'e benzer olduğu fakat Grup4 gibi düzgün bir şekle sahip olmadığı gözlenmiştir.

Kondrojenik Medyum grubunun boyutsal olarak küçük olduğu fakat hücresel dağılımının Grup4'e benzer olduğu gözlenmiştir. DMEM grubu ise hücresel bir bütünlük sağlayamayıp, dağıldığı gösterilmiştir. Bu verilere dayanarak, TGFβ1, TGFβ2 ve FGF2'nin pellet kültür sistemlerinde üç boyutlu yapı kazanmasına katkı sağladığını söyleyebiliriz.

İnsandan elde edilen kondrosit hücreleriyle oluşturulan 3B pellet kültüründen elde edilen parafin kesitlerde alsiyan mavisi yöntemi ile GAG miktarları gösterilmiştir [108]. Bu bulgulara uyumlu olarak çalışmamızda, parafin kesitlerde alsiyan mavi boyanmasında Grup4'te diğer gruplara göre daha yoğun boyanma gözlenmiştir. Kondrojenik Medyum ve DMEM grubu ise daha az boyanmıştır. Değerlendirmelerimiz sonucu; Grup4 de parafin kesitlerinde GAG birikiminin olduğu adacıklar gözlenmiştir. Sonuç olarak büyüme faktörlerinin birlikte kullanımı GAG birimini arttırmıştır.

Proje kapsamında büyüme faktör kombinasyonlarının rollerini belirleyebilmek amacı ile tüm gruplarda COL2A1, ACAN immünohistokimyasal yöntemi ile değerlendirildi. İmmünohistokimyasal olarak COL2A1 Grup4'te diğer gruplara kıyasla yoğun bir boyanma gösterdi. Grup3 Grup4'e ve Grup1 ise Grup2'ye benzer bir reaksiyon gösterilmiştir. Kondrojenik Medyum ve DMEM grupları değerlendirildiğinde ise yakın reaksiyonlar elde edilmiştir. Çalışmamızda oluşturduğumuz Grup4 ile pozitif kontrol olarak oluşturduğumuz Kondrojenik Medyum grubu kıyaslandığında büyüme faktörlerinin kondrojenik üzerine pozitif etkisi olduğu gözlenmiştir. Değerlendirmeler sonucunda, TGFβ1, TGFβ2 ve FGF2'nin birlikte kullanımı kıkırdak matriks temel elemanı olan COL2A1 ekspresyonunu arttırmıştır. Aynı şekilde TGFβ1 ve FGF2 kullanımının sadece TGFβ2 kullanımına göre daha etkili olduğu pellet kültüründe gösterilmiştir. Parafin kesitlerde ACAN boyanmasında da Grup4'ün diğer gruplara göre daha yoğun boyanması gözlenmiştir. Diğer gruplar arasında ise birbiriyle kıyaslandığında bir anlamlılık gözlenmemiştir. Sonuçlarımız değerlendirildiğinde, büyüme faktörlerinin birlikte kombinasyon olarak verilmesi AKMKH'nin kondrojenikini arttırmaktadır.

Sonuç olarak , TGFβ1, TGFβ2 ve FGF2'nin AKMKH üzerinde kondrojenik sürecine tek tabakalı ve 3B pellet kültür sistemlerinde kaliteli bir kıkırdak matriks üretimine

etkisi ilk defa detaylı bir şekilde ortaya konulmuştur. TGF β 1, TGF β 2 ve FGF2'nin belirlenen süre ve günlerde kültür sistemlerine uygulanmasının kondrojeniz sürecini manüple edebileceğini düşünmekteyiz. Bu büyüme faktörlerinin AKMKH'lerin tek tabaka ve 3B pellet kültür sistemlerinin geliştirilmesi; sinyal yollarının moleküler alt yapısının aydınlatılması, kırıkta dejenerasyonunun önlenmesi, yavaşlatılması ya da kırıkta doku mühendisliği tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.



SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, AKMKH kullanılarak, tek tabaka kültür sistemlerinde; ITS-ITS, ITS-TGF β 2, TGF β 1/FGF2-ITS ve TGF β 1/FGF2-TGF β 2 grupları, 3B pellet kültür sistemlerinde; ITS-ITS, ITS-TGF β 2, TGF β 1/FGF2-ITS, TGF β 1/FGF2-TGF β 2, Kondrojenik Medyum ve DMEM grupları oluşturulmuştur. Tek tabaka kültür sistemleri ile oluşturduğumuz gruplarda kültürün 6. gününde alsiyan mavisi boyanması ve DMMB analizi yapılmıştır. 3B pellet kültür sistemlerinde ise tüm gruplarda DMMB analizi, alsiyan mavisi boyanması ve immünohistokimya yöntemi ile COL2A - ACAN ekspresyonları gösterilmiştir. Özetle;

- 1) Tek tabakalı kültürün 6. gününde alsiyan mavisi boyanması sonuçlarına göre GAG birikimi en fazla TGF β 1/FGF2-TGF β 2 (Grup4) grubuna aittir.
- 2) Tek tabakalı kültürün 6. gününde DMMB analizi, spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre sülfatlanmış GAG birikimi en fazla TGF β 1/FGF2-TGF β 2 (Grup4) grubuna aittir.
- 4) 3B pellet kültür sisteminin 21. gününde DMMB analizi, spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre sülfatlanmış GAG birikimi en fazla TGF β 1/FGF2-TGF β 2 (Grup4) grubuna aittir.
- 5) 3B pellet kültür sisteminin 21. gününde alsiyan mavisi boyanması sonuçlarına göre GAG birikimi en fazla TGF β 1/FGF2-TGF β 2 (Grup4) grubuna aittir.
- 6) 3B pellet kültür sisteminin 21. gününde immünohistokimyasal yöntem sonuçlarına göre COL2A1 ve ACAN ekspresyon seviyeleri en fazla TGF β 1/FGF2-TGF β 2 (Grup4) grubuna aittir.
- 7) TGF β 1/FGF2 ve TGF β 2 nin belirli süre ve kombinasyonlarının AKMKH'in tek tabaka ve 3B kültür sistemlerine uygulanmaları kondrojenizi arttırmıştır.
- 8) Büyüme faktörlerinin belirli sürelerde ve farklı kombinasyonlarda kültüre eklenmesinin mezenkimal kök hücrelerin kondrojenizini manüple edebileceğini düşünmekteyiz. Bu kombinasyonların ve sürelerin daha detaylı araştırılması ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılması *in vitro* kültür sistemlerini geliştirecektir.
- 9) TGF β 1, FGF2 ve TGF β 2'nin AKMKH kondrojeniz kültüründe birlikte kullanılması *in vitro* kondrojeniz sürecinin aydınlatılması ve ileride

AKMKH'lerin klinikte eklem kıkırdağı tedavisinde kullanılabilmeleri için uygun kültür ortamının geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.



KAYNAKLAR

1. Lacey, R.J., et al., *Gender difference in symptomatic radiographic knee osteoarthritis in the Knee Clinical Assessment--CAS(K): a prospective study in the general population*. BMC Musculoskelet Disord, 2008. 9: p. 82.
2. Armiento, A.R., M. Alini, and M.J. Stoddart, *Articular fibrocartilage-Why does hyaline cartilage fail to repair?* Advanced Drug Delivery Reviews, 2019. 146: p. 289-305.
3. Wakitani, S., et al., *Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage*. J Bone Joint Surg Am, 1994. 76(4): p. 579-92.
4. Medvedeva, E.V., et al., *Repair of damaged articular cartilage: current approaches and future directions*. International journal of molecular sciences, 2018. 19(8): p. 2366.
5. Hatakeyama, A., et al., *Isolation and Characterization of Synovial Mesenchymal Stem Cell Derived from Hip Joints: A Comparative Analysis with a Matched Control Knee Group*. Stem Cells Int, 2017. 2017: p. 9312329.
6. Câmara, D.A.D., et al., *Adipose tissue-derived stem cells: the biologic basis and future directions for tissue engineering*. Materials, 2020. 13(14): p. 3210.
7. Barry, F., et al., *Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components*. Experimental cell research, 2001. 268(2): p. 189-200.
8. Hellingman, C.A., et al., *Fibroblast growth factor receptors in in vitro and in vivo chondrogenesis: relating tissue engineering using adult mesenchymal stem cells to embryonic development*. Tissue Engineering Part A, 2010. 16(2): p. 545-556.
9. Pelttari, K., et al., *Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice*. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 2006. 54(10): p. 3254-3266.
10. Kuettner, K.E., M.B. Aydelotte, and E.J. Thonar, *Articular cartilage matrix and structure: a minireview*. J Rheumatol Suppl, 1991. 27: p. 46-8.
11. Sophia Fox, A.J., A. Bedi, and S.A. Rodeo, *The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function*. Sports Health, 2009. 1(6): p. 461-8.
12. Gahunia, H.K., et al., *Articular Cartilage of the Knee: Health, Disease and Therapy*, 2018, Springer.
13. Alford, J.W. and B.J. Cole, *Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options*. Am J Sports Med, 2005. 33(2): p. 295-306.
14. Maroudas, A., et al., *The effect of osmotic and mechanical pressures on water partitioning in articular cartilage*. Biochim Biophys Acta, 1991. 1073(2): p. 285-94.
15. Torzilli, P.A., *Influence of cartilage conformation on its equilibrium water partition*. J Orthop Res, 1985. 3(4): p. 473-83.

16. Rucklidge, G.J., G. Milne, and S.P. Robins, *Collagen type X: a component of the surface of normal human, pig, and rat articular cartilage*. Biochemical and biophysical research communications, 1996. 224(2): p. 297-302.
17. WEISS, C., L. ROSENBERG, and A.J. HELFET, *An ultrastructural study of normal young adult human articular cartilage*. JBJS, 1968. 50(4): p. 663-674.
18. Jeffery, A., et al., *Three-dimensional collagen architecture in bovine articular cartilage*. The Journal of bone and joint surgery. British volume, 1991. 73(5): p. 795-801.
19. Havelka, S., et al., *The calcified-noncalcified cartilage interface: the tidemark*. Acta biologica Hungarica, 1984. 35(2-4): p. 271-279.
20. Hoemann, C.D., et al., *The cartilage-bone interface*. The journal of knee surgery, 2012. 25(02): p. 085-098.
21. Hinton, R., et al., *Osteoarthritis: diagnosis and therapeutic considerations*. American family physician, 2002. 65(5): p. 841.
22. Hochberg, M.C., et al., *American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee*. Arthritis care & research, 2012. 64(4): p. 465-474.
23. Lo, G.H., et al., *Intra-articular hyaluronic acid in treatment of knee osteoarthritis: a meta-analysis*. Jama, 2003. 290(23): p. 3115-3121.
24. Sakata, R. and A.H. Reddi, *Platelet-rich plasma modulates actions on articular cartilage lubrication and regeneration*. Tissue Engineering Part B: Reviews, 2016. 22(5): p. 408-419.
25. Shahid, M. and R. Kundra, *Platelet-rich plasma (PRP) for knee disorders*. EFORT open reviews, 2017. 2(2): p. 28-34.
26. Makris, E.A., et al., *Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage*. Nature Reviews Rheumatology, 2015. 11(1): p. 21.
27. Hangody, L. and Á. Berta, *Surgical techniques in cartilage repair surgery: osteochondral autograft transfer (OATS, Mosaicplasty)*, in *Techniques in Cartilage Repair Surgery* 2014, Springer. p. 131-140.
28. Brittberg, M., et al., *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*. N Engl J Med, 1994. 331(14): p. 889-95.
29. Djouad, F., et al., *Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases*. Nature Reviews Rheumatology, 2009. 5(7): p. 392-399.
30. Le, H., et al., *Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration*. Journal of Tissue Engineering, 2020. 11: p. 2041731420943839.
31. Mastbergen, S.C., D.B. Saris, and F.P. Lafeber, *Functional articular cartilage repair: here, near, or is the best approach not yet clear?* Nature reviews rheumatology, 2013. 9(5): p. 277.
32. Smith, A.G., *Embryo-derived stem cells: of mice and men*. Annual review of cell and developmental biology, 2001. 17(1): p. 435-462.
33. Watt, F.M., C.L. Celso, and V. Silva-Vargas, *Epidermal stem cells: an update*. Current opinion in genetics & development, 2006. 16(5): p. 518-524.
34. Young, H.E. and A.C. Black, Jr., *Adult stem cells*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. 276(1): p. 75-102.

35. Tarnowski, M. and A.L. Sieron, *Adult stem cells and their ability to differentiate*. Med Sci Monit, 2006. 12(8): p. RA154-63.
36. Nadig, R.R., *Stem cell therapy - Hype or hope? A review*. J Conserv Dent, 2009. 12(4): p. 131-8.
37. Friedenstein, A., I. Piatetzky-Shapiro, and K. Petrakova, *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*. Development, 1966. 16(3): p. 381-390.
38. Friedenstein, A., R. Chailakhjan, and K. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Proliferation, 1970. 3(4): p. 393-403.
39. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. science, 1999. 284(5411): p. 143-147.
40. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. Journal of orthopaedic research, 1991. 9(5): p. 641-650.
41. Andrzejewska, A., B. Lukomska, and M. Janowski, *Concise review: mesenchymal stem cells: from roots to boost*. Stem Cells, 2019. 37(7): p. 855-864.
42. Chen, S.L., et al., *Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2004. 94(1): p. 92-5.
43. Fouillard, L., et al., *Infusion of allogeneic-related HLA mismatched mesenchymal stem cells for the treatment of incomplete engraftment following autologous haematopoietic stem cell transplantation*. Leukemia, 2007. 21(3): p. 568-70.
44. Le Blanc, K. and O. Ringden, *Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2005. 11(5): p. 321-34.
45. Ripa, R.S., et al., *Bone marrow derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor after acute myocardial infarction: results from the Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI) trial*. Circulation, 2007. 116(11 Suppl): p. I24-30.
46. Sekiya, I., et al., *Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality*. Stem Cells, 2002. 20(6): p. 530-41.
47. Horwitz, E., et al., *Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2005. 7(5): p. 393-395.
48. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. 8(4): p. 315-317.
49. Lennarz, W.J. and M.D. Lane, *Encyclopedia of biological chemistry* 2013: Academic Press.
50. Pellegrinelli, V., S. Carobbio, and A. Vidal-Puig, *Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues*. Diabetologia, 2016. 59(6): p. 1075-1088.
51. Frayn, K., et al., *Integrative physiology of human adipose tissue*. International journal of obesity, 2003. 27(8): p. 875-888.

52. Silva, K.R. and L.S. Baptista, *Adipose-derived stromal/stem cells from different adipose depots in obesity development*. World journal of stem cells, 2019. 11(3): p. 147.
53. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue engineering, 2001. 7(2): p. 211-228.
54. Bajek, A., et al., *Adipose-derived stem cells as a tool in cell-based therapies*. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 2016. 64(6): p. 443-454.
55. Rondini, E.A. and J.G. Granneman, *Single cell approaches to address adipose tissue stromal cell heterogeneity*. Biochemical Journal, 2020. 477(3): p. 583-600.
56. Tsuji, W., J.P. Rubin, and K.G. Marra, *Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration*. World journal of stem cells, 2014. 6(3): p. 312.
57. J Salgado, A., et al., *Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine*. Current stem cell research & therapy, 2010. 5(2): p. 103-110.
58. Yañez, R., et al., *Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells*. Experimental cell research, 2010. 316(19): p. 3109-3123.
59. Davis, T.A., et al., *Adipose-derived stromal cells promote allograft tolerance induction*. Stem cells translational medicine, 2014. 3(12): p. 1444-1450.
60. Dudakovic, A., et al., *High-resolution molecular validation of self-renewal and spontaneous differentiation in clinical-grade adipose-tissue derived human mesenchymal stem cells*. Journal of cellular biochemistry, 2014. 115(10): p. 1816-1828.
61. Lv, F.-J., et al., *Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells*. Stem cells, 2014. 32(6): p. 1408-1419.
62. Camilleri, E.T., et al., *Identification and validation of multiple cell surface markers of clinical-grade adipose-derived mesenchymal stromal cells as novel release criteria for good manufacturing practice-compliant production*. Stem cell research & therapy, 2016. 7(1): p. 1-16.
63. Yang, H.J., et al., *The stem cell potential and multipotency of human adipose tissue-derived stem cells vary by cell donor and are different from those of other types of stem cells*. Cells Tissues Organs, 2014. 199(5-6): p. 373-383.
64. Li, W., et al., *Chemical approaches to stem cell biology and therapeutics*. Cell stem cell, 2013. 13(3): p. 270-283.
65. Awad, H.A., et al., *Effects of transforming growth factor β 1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells*. Tissue engineering, 2003. 9(6): p. 1301-1312.
66. Keshavarz, G., et al., *Resveratrol effect on adipose-derived stem cells differentiation to chondrocyte in three-dimensional culture*. Advanced pharmaceutical bulletin, 2020. 10(1): p. 88.
67. Hennig, T., et al., *Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGF β receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6*. J Cell Physiol, 2007. 211(3): p. 682-91.

68. Diekman, B.O., B.T. Estes, and F. Guilak, *The effects of BMP6 overexpression on adipose stem cell chondrogenesis: Interactions with dexamethasone and exogenous growth factors*. Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 2010. 93(3): p. 994-1003.
69. Knippenberg, M., et al., *Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2006. 342(3): p. 902-908.
70. Kim, H.J. and G.I. Im, *Chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Greater doses of growth factor are necessary*. Journal of Orthopaedic Research, 2009. 27(5): p. 612-619.
71. Khazaei, S., et al., *Adipose tissue-derived stem cells: A comparative review on isolation, culture, and differentiation methods*. Cell and tissue banking, 2021: p. 1-16.
72. Madry, H., et al., *Transforming growth factor beta-releasing scaffolds for cartilage tissue engineering*. Tissue Engineering Part B: Reviews, 2014. 20(2): p. 106-125.
73. Coricor, G. and R. Serra, *TGF- β regulates phosphorylation and stabilization of Sox9 protein in chondrocytes through p38 and Smad dependent mechanisms*. Scientific reports, 2016. 6(1): p. 1-11.
74. Derynck, R. and Y.E. Zhang, *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling*. Nature, 2003. 425(6958): p. 577-584.
75. Kim, I.G., et al., *Mesenchymal cells condensation-inducible mesh scaffolds for cartilage tissue engineering*. Biomaterials, 2016. 85: p. 18-29.
76. Richter, W., *Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration*. Journal of internal medicine, 2009. 266(4): p. 390-405.
77. Patil, A., R. Sable, and R. Kothari, *An update on transforming growth factor- β (TGF- β): Sources, types, functions and clinical applicability for cartilage/bone healing*. Journal of cellular physiology, 2011. 226(12): p. 3094-3103.
78. Cals, F., et al., *Effects of transforming growth factor- β subtypes on in vitro cartilage production and mineralization of human bone marrow stromal-derived mesenchymal stem cells*. Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 2012. 6(1): p. 68-76.
79. Fortier, L.A., et al., *The role of growth factors in cartilage repair*. Clinical Orthopaedics and Related Research®, 2011. 469(10): p. 2706-2715.
80. Fan, H., et al., *TGF- β 3 immobilized PLGA-gelatin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid hybrid scaffold for cartilage regeneration*. Journal of biomedical materials research Part A, 2010. 95(4): p. 982-992.
81. Van Der Kraan, P.M., *Differential role of transforming growth factor-beta in an osteoarthritic or a healthy joint*. Journal of bone metabolism, 2018. 25(2): p. 65-72.
82. Tekari, A., et al., *Transforming growth factor beta signaling is essential for the autonomous formation of cartilage-like tissue by expanded chondrocytes*. PLoS One, 2015. 10(3): p. e0120857.

83. Gospodarowicz, D., *Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth*. Nature, 1974. 249(5453): p. 123-127.
84. Benavente, C.A., et al., *Subcellular distribution and mitogenic effect of basic fibroblast growth factor in mesenchymal uncommitted stem cells*. Growth Factors, 2003. 21(2): p. 87-94.
85. Tsutsumi, S., et al., *Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF*. Biochemical and biophysical research communications, 2001. 288(2): p. 413-419.
86. Cleary, M.A., et al., *FGF, TGF β and Wnt crosstalk: embryonic to in vitro cartilage development from mesenchymal stem cells*. Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 2015. 9(4): p. 332-342.
87. Correa, D., et al., *Sequential exposure to fibroblast growth factors (FGF) 2, 9 and 18 enhances hMSC chondrogenic differentiation*. Osteoarthritis and Cartilage, 2015. 23(3): p. 443-453.
88. Ertosun, M.G. and Ö. Özkan, *Effects of Different Tacrolimus Doses on Adipose-Derived Stem Cells*. Experimental and clinical transplantation: official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation, 2020.
89. Hootman, J.M., et al., *Updated projected prevalence of self-reported doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation among US adults, 2015–2040*. Arthritis & rheumatology, 2016. 68(7): p. 1582-1587.
90. Bijlsma, J.W., F. Berenbaum, and F.P. Lfeber, *Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice*. The Lancet, 2011. 377(9783): p. 2115-2126.
91. Latief, N., et al., *Adipose stem cells differentiated chondrocytes regenerate damaged cartilage in rat model of osteoarthritis*. Cell biology international, 2016. 40(5): p. 579-588.
92. Yoo, G.S., et al., *The chondrogenic stimulating effect of fibroblast growth factor-2 on adipose-derived stem cells*. Tissue Eng Regen Med, 2010. 7(1): p. 93-100.
93. Augustyniak, E., et al., *The role of growth factors in stem cell-directed chondrogenesis: a real hope for damaged cartilage regeneration*. International orthopaedics, 2015. 39(5): p. 995-1003.
94. Zhu, S., et al., *Programmed application of transforming growth factor β 3 and Rac1 inhibitor NSC23766 committed hyaline cartilage differentiation of adipose-derived stem cells for osteochondral defect repair*. Stem cells translational medicine, 2014. 3(10): p. 1242-1251.
95. Van de Walle, A., et al., *Role of growth factors and oxygen to limit hypertrophy and impact of high magnetic nanoparticles dose during stem cell chondrogenesis*. Computational and structural biotechnology journal, 2018. 16: p. 532-542.
96. Huang, L., et al., *Synergistic effects of FGF-18 and TGF- β 3 on the chondrogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells in the pellet culture*. Stem cells international, 2018. 2018.
97. Endo, K., et al., *Comparison of the effect of growth factors on chondrogenesis of canine mesenchymal stem cells*. Journal of Veterinary Medical Science, 2019: p. 18-0551.

98. Jakobsen, R.B., et al., *Analysis of the effects of five factors relevant to in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells using factorial design and high throughput mRNA-profiling*. PloS one, 2014. 9(5): p. e96615.
99. Mastrogiacomo, M., R. Cancedda, and R. Quarto, *Effect of different growth factors on the chondrogenic potential of human bone marrow stromal cells*. Osteoarthritis and Cartilage, 2001. 9: p. S36-S40.
100. Bogdanova, A., et al., *Adipose-derived stem cells cultured in autologous serum maintain the characteristics of mesenchymal stem cells*. Latv Zinat Akad Vestis A Humanit Zinat Section B, 2010. 64: p. 106.
101. Templeton, D.M., *The basis and applicability of the dimethylmethylene blue binding assay for sulfated glycosaminoglycans*. Connective tissue research, 1988. 17(1): p. 23-32.
102. Prosser, A., et al., *Integrated multi-assay culture model for stem cell chondrogenic differentiation*. International journal of molecular sciences, 2019. 20(4): p. 951.
103. Cho, H., A. Lee, and K. Kim, *The effect of serum types on Chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells*. Biomaterials research, 2018. 22(1): p. 1-10.
104. Kabiri, A., et al., *Effects of FGF-2 on human adipose tissue derived adult stem cells morphology and chondrogenesis enhancement in Transwell culture*. Biochemical and biophysical research communications, 2012. 424(2): p. 234-238.
105. Hildner, F., et al., *FGF-2 abolishes the chondrogenic effect of combined BMP-6 and TGF- β in human adipose derived stem cells*. Journal of biomedical materials research Part A, 2010. 94(3): p. 978-987.
106. Zeiter, S., P. Lezuo, and K. Ito, *Effect of TGF β 1, BMP-2 and hydraulic pressure on chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stromal cells*. Biorheology, 2009. 46(1): p. 45-55.
107. Cheng, T., et al., *Fibroblast growth factor 2 enhances the kinetics of mesenchymal stem cell chondrogenesis*. Biochemical and biophysical research communications, 2012. 426(4): p. 544-550.
108. Rikkers, M., et al., *Importance of timing of platelet lysate-supplementation in expanding or redifferentiating human chondrocytes for chondrogenesis*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020. 8: p. 804

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Melike	Uyruğu	Türk
Soyadı	UÇAK	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Şehit Abdullah Ümit Sercan Anadolu Lisesi	2013
Lisans	Yıldız Teknik Üniversitesi	2018
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2022
Doktora		

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
Yökdil (Sağlık)	İngilizce	76,25

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Varikozel Oluşturulmuş Sıçan Testisinde Apelin-APJ Sisteminin PARP Aracılı Apoptoz Üzerine Etkisinin İncelenmesi	TUBİTAK	2019-2021
TGF beta1, TGF beta2 ve FGF2 Büyüme Faktörlerinin Sinoviyal Sıvı Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Mikroçevresi Üzerine Etkisi	BAP	2021- 2023

Ulusal Bildiri

Simla Su AKKAN, **Melike UÇAK**, Merve Kübra ÖZKILIÇ, Özlem ÖZBEY ÜNLÜ, İlknur BİRSEN, Vecihe Nimet UYSAL, Mustafa Faruk USTA, İsmail ÜSTÜNEL, Varikozel Oluşturulmuş Sıçan Testis Dokusunda Apelin/APJ Sistminin PARP Aracılı Apoptoz Üzerine Etkisinin İncelenmesi. 9. Üreme Sağlığı ve İnfertilite Kongresi, 11-14 Kasım 2021, Antalya.

