

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANILMAK ÜZERE
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER İLE
POLİ (ε-KAPROLAKTON) SCAFFOLD ARASINDAKİ
ETKİLEŞİMİN İNCELENMESİ VE 3D DOKU
MODELİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

HİLAL TOPTAŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ADİL ALLAHVERDİYEV**

İSTANBUL, 2014

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANILMAK ÜZERE MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELER İLE POLİ (ε-KAPROLAKTON) SCAFFOLD ARASINDAKİ ETKİLEŞİMİN
İNCELENMESİ VE 3D DOKU MODELİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Hilal TOPTAŞ tarafından hazırlanan tez çalışması 13.06.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

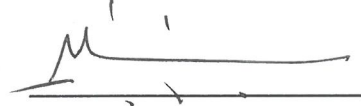
Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Mehmet Veli KARAALTIN
Acıbadem Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA
Yıldız Teknik Üniversitesi



Bu tez çalışması, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Proje Koordinatörlüğü 2013-07-04-KAP02 numaralı proje desteği ile gerçekleştirilmiştir. Desteklerinden dolayı BAP Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Burs Programında tez konumun TÜBİTAK'ın öngördüğü öncelikli alanlara seçilmesi ile 2013 yılı 2. Dönem bursiyeri olarak şahsımı destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

ÖNSÖZ

Tez sürecim boyunca beni doğru bir şekilde yönlendiren, engin bilgi ve tecrübesi ile bilim yolunda ilerlememde yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e,

Bilgi, tecrübe, disiplin, çalışma aşkı ile düzgün iş ahlakının bende sağlamlaşmasına anne şefkatiyle her zaman yanımda olarak destek olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA'ya,

Bu tez çalışması için her türlü imkânı sağlayan Fen Bilimleri Enstitüsüne, Kimya-Metalürji Fakültesi Dekanlığına, Biyomühendislik Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK'a, bölümümüzün değerli öğretim üyeleri ile asistanlarına,

Tez çalışmasında kullanılan biyomalzemenin hazırlanması ve temini konusunda yardımları için Abdullah Gül Üniversitesi Öğretim Üyeleri Yrd. Doç. Dr. İ. Alper İŞOĞLU ve Doç. Dr. Sevil İŞOĞLU'na,

Tez çalışmasının değerlendirilmesin de jüri üyesi olan Acıbadem Üniversitesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı'nda Öğretim Üyesi Doç. Dr. Mehmet Veli KARAALTIN'a,

Tüm çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Melike ERSÖZ, Olga Nehir ÖZTEL, Arş. Gör. Emrah Şefik ABAMOR, Serap YEŞİLKIR BAYDAR, Ayça AKSOY, Yrd. Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ, Yrd. Doç. Dr. Serhat ELÇİÇEK, Serkan YAMAN, Gökçe ÜNAL, Özlem Ayşe ÖZYILMAZ, Aslı Pınar ZORBA'ya,

Hayatın tüm zorlu süreçlerinde sığınılacak en güzel limanın ailem olduğu gerçeğini tez dönemimde eşsiz anlayışlarıyla bana gösteren isimlerini tek tek anmaktan mutluluk duyduğum annem Zeliha TOPTAŞ, babam Mehmet Ali TOPTAŞ, abilerim Ramazan TOPTAŞ, Nihat EMİNOĞLU, Ali İhsan AKBULUT, ablalarım Necla TOPTAŞ EMİNOĞLU, Hümevra TOPTAŞ AKBULUT, kardeşim Enes TOPTAŞ, yeğenlerim; Zeynep Sude, Yağız Akif, Sümeyye Ecrin, Yusuf Ensar'a ve Can dostum Şafak UZUN'a

Tüm samimiyetim ile teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Haziran, 2014

Hilal TOPTAŞ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	x
KISALTMA LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÇİZELGE LİSTESİ	xv
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xix
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	4
1.3 Hipotez	4
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	6
2.1 KIKIRDAK	6
2.1.1 Kıkırdak Dokusunun Gelişimi	6
2.1.2 Perikondrium (Kıkırdak Zarı).....	7
2.1.3 Kondrositler	8
2.1.3.1 Kondrositlerde Anabolizma ve Katabolizma	9
2.1.3.2 Kondrogenesis.....	10
2.1.4 Hücre Dışı Matrisi	11
2.1.4.1 Proteoglikanlar	12
2.1.4.2 Glikozaminoglikanlar (GAG)	13
2.1.4.3 Kollajen Lifler.....	14
2.1.4.4 Tip II Kollajenin Biyosentezi	15
2.2 Kıkırdak Tipleri	17
2.2.1 Hyalin Kıkırdak	17
2.2.1.1 Eklem Kıkırdağı.....	17

2.2.2	Elastik Kıkırdak.....	19
2.2.3	Fibröz Kıkırdak	19
2.3	Kıkırdak Hasarları	21
2.3.1	Osteoartrit (OA).....	22
2.4	Kıkırdak Hasarlarında Tedavi	22
2.4.1	Konservatif Yöntemler İle Tedavi	23
2.4.2	Cerrahi Yöntemler İle Tedavi	23
2.4.2.1	Debridman Artroskopi – Artroskopik Lavaj.....	24
2.4.2.2	Mikrokirik – İlik Uyarılması (Microfracture).....	24
2.4.2.3	Osteokondral Ototogreft Nakli.....	25
2.4.2.4	Osteokondral Allogreft Nakli.....	26
2.5	Doku Mühendisliği	27
2.5.1	Kıkırdak Doku Mühendisliği	29
2.6	Kıkırdak Doku Mühendisliği Esaslarına Dayalı Kıkırdak Hasarlarının Hücre Kaynaklı Tedavi	31
2.6.1	Kondrosit Kaynaklı Kıkırdak Tedavisi	32
2.6.1.1	Otolog Kondrosit İmplantasyonu (ACI)	33
2.6.1.2	Kollajen-Kaplı Otolog Kondrosit İmplantasyonu (CACI).....	33
2.6.1.3	Matrise İndüklenmiş Kondrosit İmplantasyonu (MACI)	33
2.6.1.4	Kıkırdak Tedavisinde Kondrosit Kullanımının Avantajları ve Dezavantajları	34
2.6.2	Kök Hücre Kaynaklı Kıkırdak Tedavisi	35
2.6.2.1	Kök Hücrelerin Genel Özellikleri	36
2.6.2.2	Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli	37
2.6.2.3	Farklılaşma Potansiyellerine Göre Kök Hücreler.....	38
2.6.2.4	Kök Hücrelerin Elde Edildiği Kaynaklar	39
2.6.2.4.1	Embriyonik Kök Hücreler	39
2.6.2.4.2	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler	40
2.6.2.4.3	Erişkin Kök Hücreler	41
2.6.3	Mezenkimal Kök Hücreler	43
2.6.4	Mezenkimal Kök Hücrelerin Genel ve Fenotipik Özellikleri	43
2.6.5	Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşması.....	44
2.6.6	Adipoz (Yağ) Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler.....	45
2.6.7	Wharton Jeli (Kordon Matris) Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler ...	46
2.6.8	Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler.....	48
2.6.8.1	Kıkırdak Doku Mühendisliğinde Mezenkimal Kök Hücre Çalışmalarının Avantajları ve Dezavantajları	49
2.6.9	Kök Hücrenin Kondrojenik Farklılaşması	50
2.6.10	Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünmodülasyonu	53
2.7	Scaffoldlar (Doku İskelesi).....	54
2.7.1	Scaffold Kullanımında İki Basamaklı Prosedürler	58
2.7.2	Scaffold Kullanımında Tek Basamaklı Prosedürler	59
2.7.3	Poli (ε-Kaprolakton) (PCL)	61
2.7.3.1	Elektrospinnig (Elektroçirgirme) Metodu İle PCL Scaffold Hazırlanması.....	65
2.7.3.2	PCL Scaffoldların Sterilizasyonu	67

2.8	Büyüme Faktörleri.....	67
2.8.1	Kondrojenik farklılaşmada <i>Transform Büyüme Faktörü- β (TGF- β) Ailesi, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I (IGF-I), Fibroblast Büyüme Faktörü Ailesi, Trombosit Türevli Büyüme Faktörü (PDGF)</i>	68
2.8.2	Büyüme Faktörleri Kombinasyonu <i>Tromposit Bakımından Zengin Plazma (PRP), Otolog Serum (ACS), Kemik İliği Konsantresi (BMC)</i>	69
2.9	Gen Transferi	70
2.10	Hücre Kültür Besiyeri Bileşenleri	71
2.11	Hücrelerde MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid) Testi İle Canlılık/Toksisitenin Gösterilmesi	71
2.12	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	72
2.12.1	Ters (Reverse) Transkripsiyon PZR (RT-PZR)	73
2.12.2	Real-Time PZR (Eş Zamanlı PZR).....	74

BÖLÜM 3

MATERYAL ve METOD.....	76	
3.1	MATERYAL.....	76
3.1.1	Ekipmanlar.....	76
3.1.2	Kimyasallar.....	78
3.1.3	Deneyleerde Kullanılan Tampon, Kültür Ortamları ve Kimyasalların Hazırlanışı.....	79
3.2	METOD	84
3.2.1	Hücre Kültürü ve Doku mühendisliği Laboratuvarı Kriyobankından Adipoz Doku, Kordon Matris ve Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Hatlarının Çözülmesi	84
3.2.2	Adipoz Doku, Kordon Matris ve Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Hatlarının Devamlı Kültürü	85
3.2.3	Adipoz Doku, Kordon Matris ve Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Hatlarının Kriyoprezervasyonu	86
3.2.4	Poli (ϵ -kaprolakton) (PCL) Scaffold "spiral wounding" şeklinde elde edilmesi.....	86
3.2.5	Farklı doku kaynaklı kök hücrelerin poli (ϵ -kaprolakton) scaffold üzerinde üç boyutlu kültür modelinin geliştirilmesi ve optimizasyonu.....	87
3.2.5.1	Scaffold yüzeyinde hücrelerin belirlenmesi için farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin CM-Dil ile İşaretlenmesi.....	88
3.2.5.2	CM-Dil ile İşaretlenen Farklı Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin PCL Scaffold da Ekimi.....	88
3.2.5.3	Farklı Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin üç boyutlu kültür Modellerinde MTT Analizi.....	88
3.2.5.4	Farklı Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Üç Boyutlu Kültür Modellerinde Canlı/Ölü Boyaması	89
3.2.5.5	Farklı Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin PCL Scaffold Üzerinde 12. gününde SEM ile Görüntülenmesi için Örnek Hazırlama Optimizasyonu ..	89
3.2.6	Optimize Edilen Üç Boyutlu Kültürlerin Kondrojenik Farklılaşma Besiyeri İle Kültürünün Devam Ettirilmesi	89

3.2.6.1	Kondrojenik Farklılaşma Süreci Boyunca (1., 7., 14. ve 26. Günlerinde) Canlı/Ölü Boyaması	90
3.2.6.2	Kondrojenik Farklılaşma Süreci Boyunca (1., 7., 14. ve 26. günlerinde) MTT Analizi	90
3.2.6.3	Kondrojenik Farklılaşma Süreci Boyunca (7., 14., 21. ve 26. günlerinde) RNA İzolasyonu.....	91
3.2.6.4	Kondrojenik Farklılaşma Süreci Boyunca (7., 14., 21. ve 26. günlerinde) Total RNA Miktarının ve Kalitesinin Belirlenmesi	91
3.2.6.5	Kondrojenik Farklılaşma Süreci Boyunca (21. ve 26. günlerinde) İzole Edilen RNA Örneklerinden cDNA Sentezi	92
3.2.6.6	Kondrojenik Farklılaşma Süreci Boyunca (26. günlerinde) cDNA'ların PZR İle Çoğaltılması ve Jel Elektroforezde Görüntülenmesi.....	92
3.2.6.7	Kondrojenik Farklılaşma Süreci Boyunca (21. ve 26. günlerinde) cDNA'ların Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi	93
3.2.6.8	Kondrojenik Farklılaşmalarının 14. ve 26. günlerinde SEM ile görüntülenmesi için optimize edilen proses ile örnek hazırlanması	94
3.2.6.9	İmmünohistokimyasal Boyamalar İçin Doku Takibi Optimizasyonu	94
3.2.6.9.1	Safranin O/Fast green (Sciencell) ve Alcian Blue/Nuclear fast red (Sciencell) boyanması	95
3.2.6.9.2	Anti-Collagen Type II Antibody (Milipore) ile Tip II kollajen oluşumu gözlenmesi	96
3.2.6.10	Üç Boyutlu Kültürlerin Kondrojenik Farklılaştırma Mediumu ile Kültüre Edilmesi Sonucunda Oluşan Süpernatantlardan Nitrik Oksit (NO) Analizi	96

BÖLÜM 4

DENEYSEL SONUÇLAR	98
4.1 SONUÇLAR.....	98
4.1.1 Kriyobanktan Adipoz Doku Kaynaklı, Kordon Matrisi Kaynaklı ve Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Hatlarının Çözülmesi, Devamlı Kültürünün Yapılması ve Kriyoprezervasyonu	98
4.1.2 Poli (ε-kaprolakton) Scaffoldun "spiral wounding" Şeklinde Hazırlanması.....	100
4.1.3 Farklı Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Üzerinde Üç Boyutlu Kültür Modelinin Oluşturulması, Geliştirilmesi ve Optimizasyonu	102
4.1.3.1 MTT Analizi Sonuçları.....	105
4.1.3.2 SEM Görüntüleri.....	107
4.1.3.3 Canlı/Ölü Boyama Yöntemi İle İncelenmesi.....	108
4.1.4 PCL Scaffold Üzerinde Mezenkimal Kök Hücre Kültürlerin Kondrojenik Farklılaşması.....	109
4.1.4.1 MTT Analizi Sonuçları.....	116
4.1.4.2 SEM Görüntüleri.....	118
4.1.5 Üç Boyutlu Kültürlerden Elde Edilen RNA'ların Nanodrop ile RNA Miktarlarının Kantitatif Tayini, cDNA Elde Edilmesi.....	122

4.1.5.1	Kondrojenik Farklılaşmasının 26. günün de cDNA'ların PZR ile Çoğaltılması ve Jel Elektroforez de Görüntülenmesi	123
4.1.6	Eş Zamanlı PZR ile Sox9, Col2A1 ve Col1A1 gen bölgeleriyle Kondrosit oluşumunun moleküler düzeyde tespit edilmesi	124
4.1.7	SafraninO/Fast Green, Alcian Blue/Nuclear Fast Red ve Anti-Collagen Type II Antibody (Milipore) Boyama Sonuçları	126
4.1.8	Nitrik Oksit (NO) Analizi	128

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER	131
KAYNAKLAR	139
ÖZGEÇMİŞ	161

SİMGE LİSTESİ

Bp	Baz çifti
cm	santimetre
cm ²	santimetre kare
M	molar
Mg	miligram
ml	mililitre
mM	milimolar
nm	nanometre
α	alfa
β	beta
ϵ	epsilon
μ	mikro
μg	mikrogram
μl	mikrolitre
μm	mikrometre
$^{\circ}\text{C}$	santigrat derece

KISALTMA LİSTESİ

ADKMKH	Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
A260	260 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri
A280	280 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri
CD	CD hücre yüzey antijeni bulunduran hücre
CO ₂	Karbondioksit
dH ₂ O	distileSu
dk	dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
cDNA	Komplementer DNA
RNA	Ribonükleik asit
FBS	Siğir Fetal Serum (Fetal Bovine Serum)
FDA	Food and Drug Administration
KMKMKH	Kordon Matrisi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
MKH	Mezenkimal kök hücre
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
OBKMKH	Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate buffered saline)
PCL	Poli epsilon- kaprolakton
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
Ph	Potansiyel hidrojen
RT-PZR	Eş zamanlı PZR Reaksiyonu
TNF- α	Tümör nekroz faktör alfa
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Hiyalin kıkırdak da bol ekstraselüler matrisi ve kollajen mikrofibriller (1). Lakün içerisinde izojenik kondrositler (2). Perikondrium ile çevrili kıkırdak yüzeyi (3) [23].	8
Şekil 2.2 Kıkırdak Dokunun Anabolizması ve Katabolizması [47]	10
Şekil 2.3 Kondrositlerde ki matris metalloproteinaz13 (MMP13) gen transkripsiyonu üzerindeki sinyal yolları [51].	11
Şekil 2.4 Normal Kıkırdağın Moleküler Organizasyonu [54].	12
Şekil 2.5 Proteoglikanlar ve Glikozaminoglikanlar [60].	14
Şekil 2.6 COL2A1 geni üzerinde bulunan GC kutuları (Kahverengi-Kırmızı) ve Transkripsiyon için bağlantı yerleri olan Sp1/Sp3 (A). Eklem kıkırdağında Tip II kollajenin gen regülasyonunu şematik hali (B) [47].	16
Şekil 2.7 Normal İnsan Eklemi ve Bileşenleri [20].	18
Şekil 2.8 Eklem Kıkırdağının Bölgeleri [76].	19
Şekil 2.9 Kıkırdak Dokunun Farklı Tiplerinin İnsan Vücutunda Dağılımı [77]	20
Şekil 2.10 Kıkırdak Dokunun Çeşitleri [78].	20
Şekil 2.11 Kıkırdak Hasarları [80].	22
Şekil 2.12 Mikrokırık Yöntemi [96].	25
Şekil 2.13 Osteokondral otogreft ile iyileşen hasarlı bölge alanı A. Sağlıklı dokudan greft alınımı B. Hastaya post implantasyon olarak greftlerin nakli C. [103].	26
Şekil 2.14 Doku Mühendisliğinin temelleri [114].	29
Şekil 2.15 Kıkırdak Doku Mühendisliği Temelleri.	31
Şekil 2.16 Otolog kondrositlerin bir zemin üzerinde (CACI/MACI) çalışılmasının şematik gösterimi [130].	34
Şekil 2.17 Kök hücrelerin genel özellikleri	36
Şekil 2.18 Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli [23].	37
Şekil 2.19 Farklılaşma Potansiyellerine Göre Kök Hücreler [153].	38
Şekil 2.20 İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler [164].	40
Şekil 2.21 Kök Hücrelerde Plastisite [174].	42
Şekil 2.22 Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklı Hücrelere Dönüşüm Yetenekleri [186].	45
Şekil 2.23 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler İle Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Yüze Belirteçlerinin Karşılaştırılması [180].	46
Şekil 2.24 Kordon Matrisi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler İle Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Yüze Belirteçlerinin Karşılaştırılması [19].	47
Şekil 2.25 Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler İle Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Yüze Belirteçlerinin Karşılaştırılması [202]	49

Şekil 2.26 Kök Hücrenin Kondrojenik Farklılaşmasında Etkili Sinyal Molekülleri [37]. ...	51
Şekil 2.27 Kök hücrelerin Kondrojenik Farklılaşması [20].	52
Şekil 2.28 Epsilon kaprolakton kimyasal yapısı	62
Şekil 2.29 PCL kimyasal yapısı [271].	62
Şekil 2.30 Şırınga, Yüksek Gerilim Kaynağı ve Kollektör Plakası Gösterilen Elektroegirme İşleminin Şematik Diyagramı [272].	66
Şekil 2.31 MTT Analizi Prensibi (A), MTT ve Formazan Kimyasal Yapısı (B) [279].	72
Şekil 2.32 Eş Zamanlı PZR Çalışma Akışı [280].	74
Şekil 3.1 Eş zamanlı PZR döngüsü	94
Şekil 4.1 Farklı Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Flask Tabanını Kaplamış Görüntüsü (10X).....	99
Şekil 4.2 Elektro-egirme Yöntemi ile Hazırlanmış PCL Membranlar [282].	100
Şekil 4.3 Membranlara ait FTIR ve H-NMR Spekturumu [282].	100
Şekil 4.4 Membranlara ait DSC termogramları ve ait çekme-uzama grafiği [282].	101
Şekil 4.5 Membranların 1000 ve 5000 büyütmede SEM görüntüleri [282].	101
Şekil 4.6 Mikro Gözeneklere ve Makro Kanallara Sahip Scaffold 50 Ve 2500 Büyütmede SEM Görüntüleri [282].	102
Şekil 4.7 CM-Dil ile Boyanmış Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Üzerindeki Görünümü (10X)	103
Şekil 4.8 CM-Dil ile Boyanmış Kordon Matris Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Üzerindeki Görünümü (10X)	104
Şekil 4.9 CM-Dil ile Boyanmış Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Üzerindeki Görünümü (10X)	105
Şekil 4.10 Farklı Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin SEM ile 12.gününde Üç Boyutlu Kültürde Morfolojileri.....	108
Şekil 4.11 Farklı Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Yüzeyindeki 12. Gününde Canlı/Ölü Boyaması (10X)	108
Şekil 4.12 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Yüzeyinde Kondrojenik Farklılaşmasının Takibi (10X)	110
Şekil 4.13 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Yüzeyinde Kondrojenik Farklılaşmasının Canlı/Ölü Boyası ile Takibi (10X).....	111
Şekil 4.14 Kordon Matrisi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Yüzeyinde Kondrojenik Farklılaşmasının Takibi (10X)	112
Şekil 4.15 Kordon Matrisi Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL scaffold Yüzeyinde Kondrojenik Farklılaşmasının Canlı/Ölü Boyası ile Takibi (10X).....	113
Şekil 4.16 Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Yüzeyinde Kondrojenik Farklılaşmasının Takibi (10X)	114
Şekil 4.17 Olfaktör Bulb Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Yüzeyinde Kondrojenik Farklılaşmasının Canlı/Ölü Boyası ile Takibi (10X).....	115
Şekil 4.18 Altın ile Kaplanmış Üç Boyutlu Numuneler	119
Şekil 4.19 14. ve 26. günlerinde Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold ile Üç Boyutlu Kültürde Morfolojileri	119
Şekil 4.20 14. ve 26. günlerinde Kordon Matris Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold ile Üç Boyutlu Kültürde Morfolojileri	120
Şekil 4.21 14. ve 26. Günlerinde Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold ile Üç Boyutlu Kültürde Morfolojileri	121

Şekil 4.22 Col2A1 (210 bp) Geninin Jel Elektroforezde Görüntülenmesi	124
Şekil 4.23 Eş zamanlı PZR şeması	126
Şekil 4.24 Frozen Kesitler ve Safranin O / Fast Green Boyama (Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre 26.gün) (10X)	127
Şekil 4.25 Hücre Pelletlerinden Yayma preparatların Alcian Blue / Nuclear Fast Red (A) ve Safranin O / Fast Green (B) boyaması (Kordon Matris Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre 7.gün) (10X)	127
Şekil 4.26 Parafin Blok Kesiten Alcian Blue / Nuclear Fast Red Boyaması (Olfaktör Bulb Mezenkimal Kök Hücre 14.gün) (10X)	127
Şekil 4.27 96'lık plakda NO analizi	128

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Proteoglikanların Lokasyonları [57], [58].	12
Çizelge 2.2 Glikozaminoglikanların Özellikleri [60].	13
Çizelge 2.3 Kıkırdak Dokuda Yer Alan Kollajenler [47].	14
Çizelge 2.4 Kıkırdak Hasarları Tedavisinde Kullanılan Hücre Tipleri	32
Çizelge 2.5 İki Basamaklı Kullanılan Scaffoldlar	58
Çizelge 2.6 Tek Basamaklı Kullanılan Scaffoldlar	60
Çizelge 2.7 PCL Scaffold Hazırlama Metotları	64
Çizelge 2.8 Kıkırdak Doku Mühendisliğinde Gen Transferi	70
Çizelge 3.1 Eş Zamanlı PZR de kullanılan gen bölgeleri ve primerler	93
Çizelge 4.1 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold ile Üç Boyutlu Hücre Kültür Modelinde MTT Sonucu	106
Çizelge 4.2 Kordon Matris Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold ile Üç Boyutlu Hücre Kültür Modelinde MTT Sonucu	106
Çizelge 4.3 Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold ile Üç Boyutlu Hücre Kültür Modelinde MTT Sonucu	107
Çizelge 4.4 Farklı Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold ile Üç Boyutlu Hücre Kültür Modelinde MTT Sonucu	107
Çizelge 4.5 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler ve PCL Scaffoldun Kondrojenik Farklılaşmasında MTT Sonucu	117
Çizelge 4.6 Kordon Matrisi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler ve PCL Scaffoldun Kondrojenik Farklılaşmasında MTT Sonucu	118
Çizelge 4.7 Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler ve PCL Scaffoldun Kondrojenik Farklılaşmasında MTT Sonucu	118
Çizelge 4.8 RNA miktarları	122
Çizelge 4.9 cDNA miktarları	123
Çizelge 4.10 Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin eş zamanlı PZR ön çalışması sonucu (n=3)	125
Çizelge 4.11 Olfaktör bulb kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin eş zamanlı PZR ön çalışması sonucu (n=3)	125
Çizelge 4.12 Kordon matrisi kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin eş zamanlı PZR ön çalışması sonucu (n=3)	125
Çizelge 4.13 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre ve PCL Scaffoldun Üç Boyutlu Kültürün NO Sonucu	129
Çizelge 4.14 Kordon Matris Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre ve PCL Scaffoldun Üç Boyutlu Kültürün NO Sonucu	129

Çizelge 4.15 Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre ve PCL Scaffoldun Üç Boyutlu Kültürün NO Sonucu	130
--	-----

**KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANILMAK ÜZERE MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELER İLE POLİ (ε-KAPROLAKTON) SCAFFOLD ARASINDAKİ
ETKİLEŞİMİN İNCELENMESİ VE 3D DOKU MODELİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Hilal TOPTAŞ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV

İnsanlarda kıkırdak hasarı, Dünyada ve Türkiye’de görülme sıklığı gün geçtikçe artan sağlık problemlerinden biridir. Sağlık Bakanlığı tarafından 2010 yılında 15 yaş üstü bireylerde yapılan bir araştırmaya göre; ülkemizde 4,7 milyon kişinin kıkırdak dejenerasyonu hastası olduğu rapor edilmiştir. Kıkırdak tedavisinde çeşitli yöntemler (konservatif ve cerrahi) uygulanmasına rağmen, problemlerin giderilmesinde halen ciddi sorunlar mevcuttur. Bu nedenle son yıllarda kıkırdak doku mühendisliğine yönelik çalışmalar oldukça önem kazanmıştır. Özellikle doku mühendisliğinde kök hücre (KH) ve biyomalzeme alanındaki gelişmeler kıkırdak hasarlarının giderilmesinde yeni umutlara yol açmıştır. Biyomalzemeler arasında kıkırdak doku mühendisliğinde en çok kullanılan scaffoldlardan (doku iskelesi) bir tanesi poli epsilon kaprolakton (PCL)’dur. Son yıllarda PCL ve mezenkimal kök hücreler (MKH) arasında yapılan çeşitli çalışmalar bulunmasına rağmen, şimdiye kadar PCL’nin hangi doku kaynağından elde edilen mezenkimal kök hücreler ile daha iyi etkileşime girdiğini gösteren çalışmalar oldukça yetersizdir. Bununla birlikte PCL scaffold ile mezenkimal kök hücrelerden oluşan üç boyutlu kültürlerin kondrosit farklılaşması üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalar da az sayıdadır. Ayrıca, kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılmak amacıyla; PCL scaffold ile olfaktör bulbul kaynaklı mezenkimal kök hücreler arasındaki etkileşimle ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buna göre de bu tez çalışmasının amacı; adipoz, kordon matrisi ve olfaktör bulbul gibi farklı kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücreler ile

PCL scaffold arasındaki etkileşimi karşılaştırmalı olarak incelemek, sonrasında oluşturulan üç boyutlu kültürler üzerinde kondrojenesisin gerçekleştirilmesi sonucunda hangi mezenkimal kök hücre kaynağının kondrosite daha iyi farklılaştığını belirlemek ve bu sonuçlar doğrultusunda kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılmak üzere mezenkimal kök hücre kaynağı olarak en uygun kök hücre kaynağını önermektir.

Tez kapsamında amaca ulaşmak için; adipoz, kordon matrisi ve olfaktör bulbul dokularından elde edilmiş mezenkimal kök hücrelerin PCL scaffold yüzeyinde üç boyutlu hücre kültür modelleri 12 gün boyunca MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) ve Canlı/Ölü boyaması ile canlılık analizleri, CM-Dil boyaması ve SEM (Taramalı Elektron Mikroskop) görüntüleri takip edilerek optimize edilmiştir. Hazırlanan üç boyutlu hücre kültür modellerinde ki kondrojenik farklılaşma; MTT, Canlı/Ölü boyaması, NO (Nitrik Oksit) analizi, SEM görüntüleri, RNA izolasyonu ve cDNA eldesini takiben yapılan PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve Eş zamanlı PZR ve histolojik analizler ile 26 gün boyunca takip edilmiştir.

Yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda; kordon matrisi ve PCL scaffold ile hazırlanan üç boyutlu hücre kültür modelinin kondrojenik farklılaşmasının, adipoz doku ve olfaktör bulbul kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile hazırlanan hücre kültür modelinin kondrojenik farklılaşmasına göre daha hızlı gerçekleştiği tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan eş zamanlı PZR ön çalışması sonucuna göre; olfaktör bulbul kaynaklı mezenkimal kök hücre ve PCL scaffold ile hazırlanan üç boyutlu hücre kültür modelinde hiyalin kıkırdak gen ekspresyon özelliklerine benzer en yakın yapının elde edildiği görülmüştür. MTT ve NO analizi sonuçları istatistiksel olarak parametrik yöntemler olan ANOVA ve student t test ile belirlenmiştir. Tüm veriler Statistical Packages of Social Sciences (SPSS, version 19.0 for Windows) programı ile çalışılarak ve $p < 0,05$ değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında ilk kez olarak; kondrojeniz aşamasında adipoz, kordon matrisi ve olfaktör bulbul gibi farklı kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücreler ile PCL scaffold arasındaki etkileşim karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; PCL'nin her üç kaynaktan elde edilen mezenkimal kök hücreler ile etkileşime girdiği, fakat en etkin sonucun olfaktör bulbul kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ilk defa olarak; kıkırdak doku mühendisliğinde, olfaktör bulbul kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin PCL scaffold ile hazırlanan üç boyutlu kültür üzerinde kondrositlere farklılaştığı saptanmıştır. Bu sonuçlar; gelecekte kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılmak üzere yeni bir mezenkimal kök hücre kaynağının kullanım potansiyelini ortaya çıkarmıştır.

Anahtar Kelimeler: Scaffold, kıkırdak doku mühendisliği, mezenkimal kök hücreler

ABSTRACT

INVESTIGATION OF INTERACTIONS BETWEEN MESENCHYMAL STEM CELLS-POLYCAPROLACTONE (ϵ -CAPROLACTONE) SCAFFOLDS AND IMPROVEMENT OF 3D TISSUE MODEL FOR THE USE OF CARTILAGE TISSUE ENGINEERING

Hilal TOPTAŞ

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Advisor: Prof.Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Human cartilage damage is one of the most important health problems that increasing with each passing day in the world and Turkey. According to a study conducted by Turkish ministry of health in 2010, there are 4.7 million people who are above 15 have the cartilage degeneration illness. Although, wide varieties of treatments (conservative and surgery) are being applied, crucial problems in the field are still waiting to be solved. For this, the importance of cartilage tissue based studies have been grown in recent years. Especially, stem cell and biomaterial based technology development in tissue engineering field has caused to open new horizons and hopes to solve these problems. Poly-epsilon caprolactone (PCL) is one of the scaffolds that is being used widely among the biomaterials in tissue engineering. Although there are some researches has been studied with poly-epsilon caprolactone (PCL) and mesenchymal stem cells (MSC), these studies are not enough to explain which stem cell source better interacting with PCL scaffold. Besides, there are only a few research studied the effect of three dimensional culture (which is formed from PCL and mesenchymal stem cells) on the chondrocyte differentiation. Furthermore, we couldn't find any research about the PCL scaffold and olfactory bulb sourced mesenchymal stem cell interactions to use in cartilage tissue engineering. According to the information above, the goal of this thesis study is investigation of the interaction between PCL scaffold and different

sourced mesenchymal stem cells (such as adipose, umbilical cord matrix, and olfactory bulb), identification of which mesenchymal stem cell source better for differentiation to cartilage tissue on the three dimensional tissue cultures and suggestion of optimum stem cell source to use in cartilage tissue engineering according to these studies.

To reach the goal in the scope of this thesis; three dimensional culture models of adipose, umbilical matrix and olfactory bulb tissue sourced mesenchymal stem cells on PCL scaffold have been optimized along 12 days with the MTT (3-(4,5-dimethyltriazol-2-il)-2,5- diphenyltetrazolium bromide), aliveness analyzes with alive/death dying, CM-Dil dying and SEM (Scanning Electron Microscope) analyzes. The chondrogenic differentiation in three dimensional culture models has been investigated along 26 days with; MTT, alive/death dying, NO (Nitric Oxide) analyzes, SEM images, real-time PCR analyzes following RNA isolation and cDNA obtainment and histological analyzes.

As results of all these studies, chondrogenic differentiation of umbilical matrix-PCL scaffold based three dimensional culture model is faster than the adipose tissue and olfactory bulb sourced mesenchymal stem cell-PCL based cell culture models. According to real time-PCR results, olfactory bulb sourced mesenchymal stem cell-PCL scaffold based three dimensional culture model showed the most closest expression pattern of the hyaline cartilage tissue gene expression pattern. ANOVA and Student T tests are applied to MTT and NO analyse results to determine their statistical significance. All data statistics conducted with Statistical Packages of Social Sciences (SPSS, version 19.0 for Windows) program and $p < 0,05$ value assumed as significance threshold.

As a result, in the scope of this thesis for the first time; the interaction between PCL scaffolds and different sourced mesenchymal stem cells (such as adipose umbilical matrix and olfactory bulb tissue) has been investigated comparatively. According to obtained results; it is determined that the PCL can interact with all three different sourced mesenchymal stem cells but the most optimal result has been obtained from the olfactory bulb sourced mesenchymal stem cell-PCL interaction model. Furthermore, for the first time in cartilage tissue engineering, it is searched out that olfactory bulb sourced mesenchymal stem cells can differentiate into chondrocytes on the three dimensional culture model prepared with the PCL scaffolds. These results indicate that usage potential of a new mesenchymal stem cell source in cartilage tissue engineering has been risen.

Keywords: Scaffold, cartilage tissue engineering, mesenchymal stem cells

1.1 Literatür Özeti

Kıkırdak hasarı, Dünya’da ve Türkiye’de yaygınlığı gün geçtikçe artan ciddi sağlık problemlerinden biridir. Yaşlanan dünya nüfusu ve obezitenin artmasıyla birlikte kıkırdak hasarlarının yaygınlığının 2030 yılına kadar %25’e ulaşması beklenmektedir [1]. 2010 yılında Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan 15 yaş üstü insanlardaki araştırmaya göre; ülkemizde 4,7 milyon kişinin kıkırdak dejenerasyonu hastası olduğu rapor edilmiştir. Bu da Türkiye nüfusunun %8,4 oranını oluşturmaktadır [2].

Kıkırdak; embriyonun mezoderm tabakasından gelişen, kemik ile yakın temas halinde bulunan, elastik, esnek, yarı şeffaf, vasküler, nöral ve lenfatik sistemden yoksun bir bağ dokusu türüdür [3]. Olgunlaşmış kıkırdak hücrelerine kondrosit adı verilir [4], [5]. Ömür boyu çalışmaktan ötürü gelişen travmalar ve dejeneratif süreçler; kıkırdak dokunun kendine has eşsiz mekanik özelliğinde ve yeniden şekillenme fonksiyonunda hasarlara yol açmaktadır [6], [7], [8]. İskelet sistemiyle ilişkili en baskın kıkırdak hasarı hiyalin kıkırdak dejenerasyonudur. Vücudumuzda kıkırdak dejenerasyonun en sık görüldüğü bölgeler hiyalin kıkırdaktan oluşan eklemlerdir. Günümüzde kıkırdak hasarlarının tedavisinde konservatif veya cerrahi gibi yöntemler kullanılmasına rağmen, halen ciddi sorunlar mevcuttur. Kıkırdak hasarları için mevcut cerrahi yöntemler birinci nesil tedaviler ve ikinci nesil tedaviler olmak üzere iki grup altında toplanabilir [9], [10], [11].

Birinci nesil tedavi yöntemleri;

- ✓Palyatif amaçlı; debridman artroskopi,
- ✓İçsel onarım iyileştirme amaçlı; mikrofraktür (Mikrokırık),
- ✓Tüm doku nakli amaçlı; osteokondral allogreft, osteokondral otogreft gibi işlemleri içermektedir.

İkinci nesil tedavi yöntemleri ise;

- ✓Hücre temelli onarım (kondrosit (otolog kondrosit implantasyonu (ACI)) veya kök hücreler kullanarak),
- ✓Scaffold temelli onarım,
- ✓Hücre, scaffold ve büyüme faktörleri temelli onarım gibi işlemleri içermektedir.

Mikrokırıklama, otolog kondrosit implantasyonu, osteokondral otogreft veya allogreft gibi kırıldak tedavisinde kullanılan cerrahi yöntemler kısa ya da orta vadede çözüm oluşturmalarına rağmen bu tedavilerin hiçbiri eklem kırıkdağına normal kompozisyonunu tamamen geri kazandıramamaktadır [9]. Otolog kondrosit nakli yönteminde donör eksikliği ve Food and Drug Administration (FDA) tarafından delaminasyon, doku şişlikleri gibi yaygın yan etkiler bildirilmiştir. Bu yöntemin %15-30 arasında tekrar ameliyat sıklığı ile sonuçlanan bir tedavi yöntemi olduğu tespit edilmiştir [12]. Osteokondral otogreft veya allograft de ise greft sınırlarını çevreleyen bölgede doğal dokunun genellikle oluşmaması, sık sık çatlaklar meydana gelmesi ve sterilite hakkında endişeler, karşılaşılan diğer problemler arasındadır [9]. Tüm bu tedavi stratejilerinin genel dezavantajı; yeni oluşturulan dokunun kırıkdağın yapısal organizasyondan yoksun olması ve doğal kırıldak doku ile karşılaştırıldığında düşük mekanik özelliklere sahip olmasıdır [13]. Böylece kırıldak dejenerasyonunda mevcut sorunların giderilmesi için günümüzde çeşitli klinik yaklaşımlar mevcut olmasına rağmen, henüz problemin çözülmesinde sorunlar ciddiliğini korumaktadır. Son yıllarda doku mühendisliği alanındaki gelişmeler aynı zamanda kırıldak doku mühendisliğinde de yeni ümitlere yol açmıştır. Bu nedenle *in vitro* koşullar altında kırıldak dokunun gerçek işlevini taklit edebilecek yapay bir doku oluşturabilmek için kırıldak doku mühendisliği alanında çalışmalar giderek yoğunlaşmaktadır [10], [14]. Son yıllarda kök hücre ve biyomalzeme alanındaki gelişmeler doku mühendisliğinin tüm alanlarında

olduğu gibi kıkırdak doku mühendisliği alanında da büyük önem kazanmaktadır [15], [16]. Kök hücreler; organizmanın çeşitli organ ve dokularında bulunan, yaşam boyunca birçok hücre tipine farklılaşabilme, kendini yenileyebilme ve çoğalabilme yeteneğine sahip özel hücrelerdir [17], [18]. Bu zellikleri ile farklı kaynaklardan elde edilebilen kök hücreler hücresele tedavi ve doku mühendisliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Embriyonik, indüklenmiş pluripotent ve erişkin kök hücreler (kemik iliği, adipoz doku, periferik kan, kas doku, periost doku, sinovyal zar, kordon kanı, kordon matrisi, amnion sıvısı, plasenta) kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan kök hücrelerdir [19].

Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan kök hücrelerin kondrositlere farklılaşmasında hem iki boyutlu kültürleri hem de scaffoldlar üzerine ekilerek üç boyutlu kültürleri yapılmaktadır. Literatürde hem iki boyutlu hemde üç boyutlu hücre kültürleri ile ilgili çalışmalar bulunmasına rağmen, yapılan iki boyutlu hücre kültürlerindeki çalışmalarda; farklı doku kaynaklarından elde edilen kök hücrelerin kondrojenize göre karşılaştırılması ya da kıyaslanması ile ilgili yetersiz bilgiler bulunmaktadır. Ayrıca üç boyutlu hücre kültürlerinde hangi scaffoldun hangi kök hücre ile daha iyi etkileşime gireceği ve yapay kıkırdak geliştirilmesinde daha uygun sonuç vereceğine ait çalışmalar da oldukça yetersizdir. Bununla birlikte scaffold üzerinde hazırlanan üç boyutlu kültürlerin iki boyutlu kültürlere oranla daha iyi kondrositlere farklılaştığı rapor edilmiştir [20], [21]. Scaffoldların kullanımı kondrojeniz de ekstrasellar matris elemanlarının üretilmesinde ve kondrosit hücrelerinin gelişiminde önemli rol oynamaktadır [22], [23]. Scaffoldlar temelde doğal ve sentetik biyomalzemeden yapılmalarına göre ikiye ayrılır. Ayrıca iyi bir scaffold; biyoyumlu ve biyobozunur olmalı, toksik olmamalı, geçirgenliğe sahip olmalı ve yeniden üretilip, tekrarlanabilirliği olmalıdır [18]. Kıkırdak doku mühendisliğinde scaffoldların çeşitli türevleri kullanılmaktadır [24], [25], [26]. FDA onaylı ve biyobozunur [27] bir polimer olan PCL den çeşitli yöntemler ile hazırlanan PCL scaffold diğer sentetik polimerlerden hazırlanan scaffoldlara göre daha iyi çözünürdür, düşük erime noktasına sahiptir (59-64°C), hidrofilik yüzeyi sayesinde hücrelerin tutunmasını sağlar ve hücrelerin proliferasyonunu arttırır [28], [29]. Elektrospinnig (Elektroeğirme) yöntemiyle hazırlanan PCL scaffold diğer yöntemlere oranla çok fazla miktarda fiber yapılar

içermektedir ve bu da ekstraselüler matrisi çok iyi taklit edebilen, kök hücrelerin iyi bir şekilde proliferere olabileceği bir destek oluşturmaktadır. Kordon matrisi ve PCL scaffoldun kullanıldığı literatürde tek bir çalışma bulunurken, olfaktör kök hücrelerin PCL scaffold ile kullanılmasına yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Diğer yandan İšoğlu ve arkadaşları tarafından elektroğirme metoduyla hazırlanan mikro gözenekli fiber membranlara ve makro kanallara sahip olan PCL scaffold, kraniyal bölgede meydana gelmiş kritik büyüklükteki defektlere yönelik *in vitro* ve *in vivo* incelenmiş ve bu scaffoldun doğal hücre dışı matrisi taklit ederek kemik doku mühendisliğinde hücrelerin büyümesini ve yayılmasını sağladığı rapor edilmiştir [30]. Bu çalışmada İšoğlu ve ekibinin hazırlamış olduğu PCL scaffoldun şimdiye kadar kırık doku mühendisliğinde kullanımı incelenmemiştir. Ayrıca kırık doku mühendisliğinde günümüze kadar farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (adipoz, kordon matrisi, olfaktör) PCL scaffold ile etkileşimi ve kondrogenezinin kıyaslanarak incelenmesine yönelik herhangi bir çalışmaya da rastlanmamıştır.

1.2 Tezin Amacı

Tez çalışmamızın amacı; farklı kaynaklardan elde edilen adipoz, kordon matris ve olfaktör bulbul kökenli mezenkimal kök hücreler ile PCL scaffold arasındaki etkileşimi kıyaslı olarak incelemek, oluşturulan üç boyutlu kültürler üzerinde kondrogenezi gerçekleştirmek, ayrıca hangi mezenkimal kök hücre kaynağının kondrosite daha iyi farklılaştığını belirlemek ve kırık doku mühendisliğinde kullanılmak üzere daha uygun kök hücre – PCL scaffold modelini önermektir.

1.3 Hipotez

Literatür de ilk defa adipoz, kordon matrisi ve olfaktör olmak üzere farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin, elektroğirme metoduyla hazırlanmış, gözeneklere sahip Poli (ϵ -kaprolakton) scaffold yüzeyinde üç boyutlu kültür modellerinde kondrogenezinin kıyaslanarak incelenmesi ve kondrositelere daha uygun farklılaşan kök hücre kaynağının belirlenmesi bu tez çalışmasının esas hipotezini oluşturmaktadır. Tez kapsamında amaca ulaşmak için aşağıdaki hedefler belirlenmiştir:

- ✓ Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği laboratuvarımız da bulunan Kriyobanktan adipoz doku, kordon matrisi ve olfaktör bulbul kaynaklı mezenkimal kök hücre hatlarının çözülmesi, devamlı kültürünün yapılması ve kriyoprezervasyonu
- ✓ Farklı doku kaynaklı kök hücrelerin poli (ϵ -kaprolakton) scaffold üzerinde üç boyutlu kültür modelinin geliştirilmesi ve optimizasyonu,
- ✓ Scaffold yüzeyinde hücrelerin belirlenmesi için farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin CM-Dil ile İşaretlenmesi ve poli (ϵ -kaprolakton) scaffold da Ekimi
- ✓ MTT Analizi ve Canlı/Ölü boyaması
- ✓ SEM ile görüntülenmesi
- ✓ Optimize edilen üç boyutlu kültürlerin kondrojenik farklılaşma besiyeri ile kültürünün yapılması ve kondrojenik farklılaşmanın takibi
 - Canlılık Analizi; Canlı/Ölü boyaması ve MTT Analizi
 - Gen ekspresyonu Analizi; RNA izolasyonu, Total RNA Miktarının ve Kalitesinin Belirlenmesi, RNA örneklerinden cDNA Sentezi, cDNA'ların tek basamaklı PZR'si ve Jelde Görüntülenmesi
 - cDNA'ların Eş Zamanlı PZR Analizi
 - SEM ile görüntülenmesi
 - Nitrik Oksit (NO) Analizi
 - Üç boyutlu Yapıların İmmünohistokimyasal Boyamalar İçin Doku Takibinin Optimizasyonu
- ✓ Hangi mezenkimal kök hücrenin PCL scaffold ile birlikte kondrosite daha iyi farklılaştığını belirlenmesi ve kırıldak doku mühendisliğinde kullanılmak üzere daha uygun mezenkimal kök hücre – PCL scaffold modelinin önerilmesi

2. GENEL BİLGİLER

2.1 KIKIRDAK

Kıkırdak embriyonun mezoderm tabakasından gelişen kemik ile yakın temas halinde bulunan elastik, esnek, yarı şeffaf ve vasküler, nöral, lenfatik sistemden yoksun bir bağ doku türüdür [3]. Olgunlaşmış kıkırdak hücrelerine kondrosit adı verilir ve bu hücreler lakün adı verilen boşluklar içerisinde bulunurlar. Kondrositler biraraya gelerek izogen gruplar oluşturabilirler (Şekil 2.1). Ayrıca kondrosit matrisi de dağılık olarak bulunmakta ve kıkırdak doku % 5'den az kondrosit, %60-85 arası interstisyel sıvı, yaklaşık %15-22 hücre dışı matris, yoğun miktarda Tip II kollajen ve az miktarda Tip IX, X, XI kollejen, %4-7 oranında proteoglikanlar ve diğer makromoleküllerden oluşmaktadır [4], [5]. Kıkırdak dokusunun genel fonksiyonları; eklem ek yerlerinde sürtünmeyi azaltmak, trakea ve bronş yapılarına destek olmak, omurlar arasında amortisör görevi görmek, kulak ve burunda şekli koruyarak esnekliği sağlamaktır. Kıkırdak doku perikondrium ile örtülüdür ve kan damarları içermediği için perikondriumdan difüzyonla veya eklem boşluklarında sinovyal sıvı ile beslenir [31]. Kıkırdak dokusunun farklı türleri vücudun çeşitli bölgelerinde bulunmaktadır. Bunlar hiyalin, elastik ve fibröz kıkırdak olarak sınıflandırılırlar [32], [33].

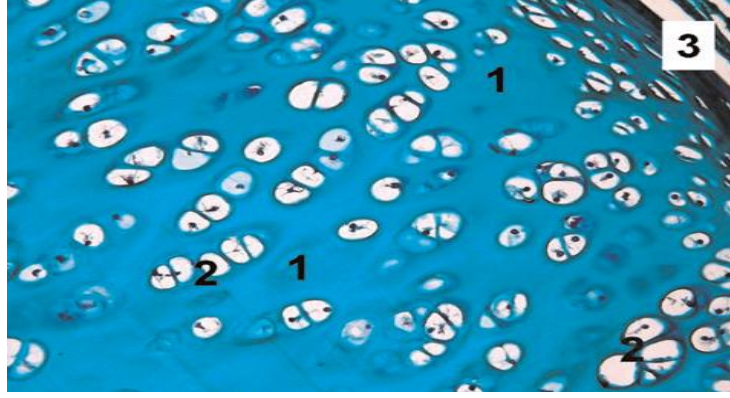
2.1.1 Kıkırdak Dokusunun Gelişimi

Embriyonik dönemde mezenşimden gelişen kıkırdak için öncelikle mezenşim hücreleri bir araya gelir ve kıkırdaklaşma merkezini (protokondral doku) oluşturur. Burada

bulunan hücreler kondroblastlara farklılaşırlar. Kondroblastlar ise hem kıkırdak matrisini sentezlerek matrisin korunmasından sorumludur hem de kondrositlere farklılaşmaktadır [31], [34]. Memeli embriyolarının ilk formlarında iskelet yapı kıkırdak bir model olarak görülmektedir bu yapıya geçici kıkırdak doku denilmektedir ve canlının gelişmesiyle yavaş yavaş iskelet sistemi de gelişerek kemik ağırlıklı bir yapı halini almaktadır. Bu gelişim; interstisyel büyüme ve apozisyonel büyüme olmak üzere iki yolla olmaktadır. İçten dışa doğru büyüme olarak tanımlanan interstisyel büyümede kondrositler mitoz bölünmeler geçirir ve kardeş kondrositler ile birlikte yeni zemin maddesi salgılar bu şekilde içten büyümektedir. Dıştan içe doğru büyüme olarak tanımlanan apozisyonel büyümede ise perikondriumun kondrojenik tabakasındaki hücreler kondrositlere farklılaşırken etraflarına yeni zemin maddesi salgırlar bu şekilde de dıştan içe doğru büyüme olayı gerçekleşmiş olmaktadır [31], [34]. İnterstisyel büyüme yalnızca hiyalin kıkırdağın oluşumu sırasında, perikondriyum olmayan eklem kıkırdağı ve epifizyel plaklarda (kemik boyuna büyümesi) meydana gelir. Bunlar dışındaki vücut bölgelerinde büyüme çoğunlukla apozisyoneldir, bu kontrollü bir süreç olup kıkırdağın yaşamı boyunca devam etmektedir [31], [34].

2.1.2 Perikondrium (Kıkırdak Zarı)

Perikondrium kılcallarına gelen besin maddesi difüzyon ile doku içerisine alınır. Perikondrium yoğun ve düzensiz bir bağ dokusu türüdür ve Tip I kollajen varlığı çok fazladır [31]. Dış fibröz kat ve iç kondrojenik kat olmak üzere iki katmandan oluşur. Dışta fibröz olan tabaka da Tip I kollajen, az fibroblast ve kan damarlarından oluşur. İç tabaka ise çoğunlukla kondrojenik hücrelerden oluşur. Kondrojenik hücreler bölünerek kondroblastlara farklılaşırlar ve dolayısıyla hücre dışı madde yapımı gerçekleşir. Hali hazırda bu bölgede kıkırdağın dıştan içe doğru büyümeside (apozisyonel) gerçekleşmektedir [31].



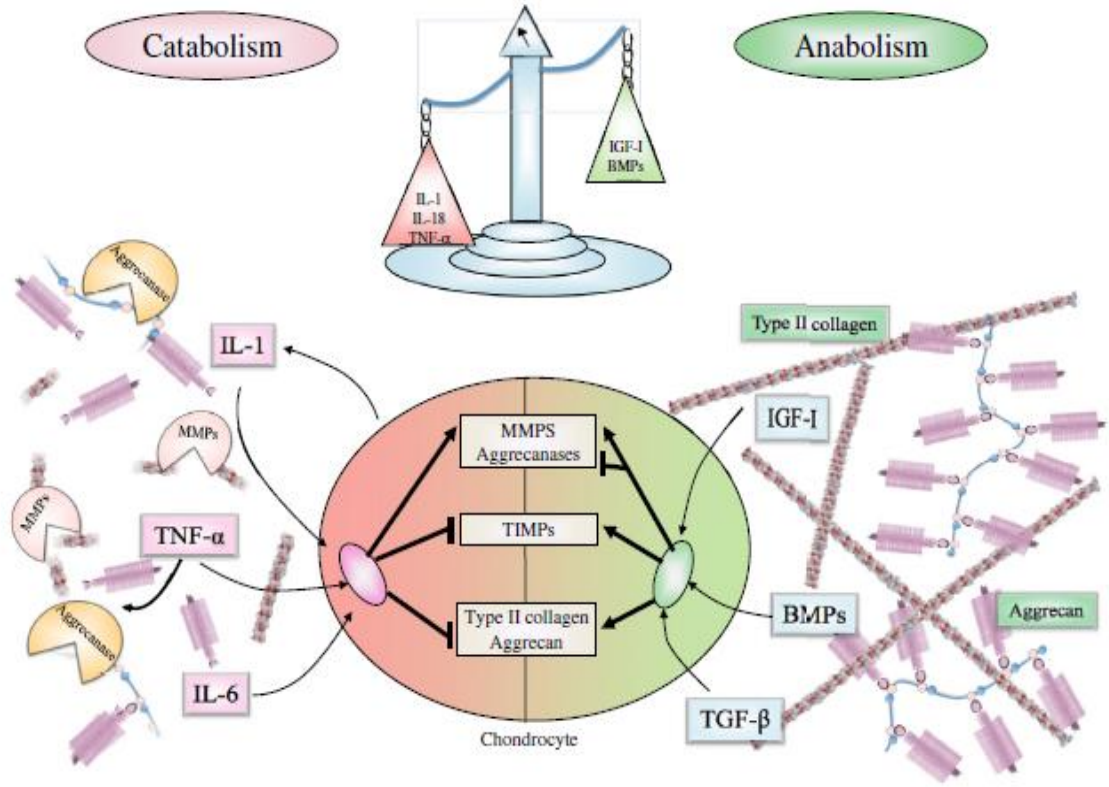
Şekil 2.1 Hiyalin kıkırdak da bol ekstraselüler matrisi ve kollajen mikrofibriller (1). Lakün içerisinde izojenik kondrositler (2). Perikondrium ile çevrili kıkırdak yüzeyi (3) [23].

2.1.3 Kondrositler

Sağlıklı kıkırdak doku içerisinde tek hücre tipi kondrositler olup kıkırdak da %1 -5 oranında ekstraselüler matrisi bileşenleri, tip II kollajen, proteoglikan sentezinden ve matrisi onarımından sorumludur [35]. Kıkırdağın içerisindeki kondrositlerin yoğunluğu hacmin yaklaşık %1,7'sine karşılık gelmektedir, bu da yaklaşık olarak mm^3 başına 10.000 hücre etmektedir [36]. Kondrositler hücre dışı matrisin (ECM); agregan, kollajen II ve sülfatlanmış glikozaminoglikan (sGAG) gibi bileşenleri üretimini yaşam boyu sağlar ve bu şekilde kıkırdak dokunun fonksiyonunu korur [37]. Embriyonik gelişim esnasında kondrosit mezenkimal progenitör hücreleri endokondral kemikleşmenin yanı sıra eklem dış alanın doldurulmasından da sorumludur. Eklemi oluşturan kondrositler büyüme plağında bulunan kondrositlerden yapısal ve işlevsel farklılıklar göstermektedir. Uzun kemiklerin büyümeye devam ettiği süre boyunca burada bulunan kondrositler dinamik değişikliklere uğrasa da eklem kıkırdağında bulunan kondrositler yaşam boyunca sürekli fonksiyonunu korumak zorundadır. Eklem kondrositlerinin büyüme farklılaşma faktörü 5 (GDF5) pozitif progenitör hücrelerin ve büyüme plağı kondrositleri GDF5 negatif hücre popülasyonlarından türetilen bir havuzdan kaynaklandığına dair kanıtlar vardır [38]. Yapılan moleküler çalışmalar İnterzon bölgesinde bulunan kondrosit hücrelerinin GDF5, Wnt5a, WNT4, GLI3, CD44, ERG ve NOGGINE gibi genlerin ifadesiyle kontrol edildiğini ortaya koymuştur [39].

2.1.3.1 Kondrositlerde Anabolizma ve Katabolizma

Kondrositler hücre dışı matrisin ve spesifik kıkırdak matrisi belirteçlerinden örneğin tip II kollajen ve proteoglikanların sentezinden sorumludur. Ancak bu hücreler tüm matrisin sadece %1-5'ni oluşturmaktadır [40]. Fakat bu büyük ve yuvarlak hücreler yetişkinliklerinde artık postmitotik aşamaya gelirler. İşte bu yüzden kıkırdak kendini yenileme özelliği düşük bir doku halini gelir. Kıkırdak kan damarları bulundurmadığından kondrositler hipoksik bir foksiyona sahiptir. Yani besin ve oksijen önce subkondral kemiklerden ve sinoviyal sıvıdan difüzyonla alınmaktadır. Hipoksi koşullarında, kondrositler anaerobik glikoliz yolu ile glikozu metabolize ederler [41]. Glikoz hücre mekanizmasının düzgün işlemesi ve özellikle kıkırdak için gerekli GAG sentezi (agregan ana bileşeni) için gerekli bir besindir. Glikoz tıpkı oksijen gibi sinoviyel sıvıdan difüze olan ve GLUT (GLUT 1, 3, 5, 9, 10 ve 11) denilen glikoz taşıyıcıları aracılığıyla kondrosit içine yayılır [42]. Kondrositler fizyopatolojik durumlarda çevresindeki matrisi bileşenlerini korumak için çeşitli bileşenlerinin parçalanmasında ve sentezinde çok ince bir şekilde dengeyi korumaya çalışır. Bu denge kıkırdak veya sinoviyal sıvıda sitokinler ve büyüme faktörlerinin nispi miktarları ile kontrol edilir. Kondrositler tarafından hücre dışı matrisin bileşenleri sentezlenirken aynı zamanda bu bileşenlerin bozunmasını sağlayan metaloproteinaz (MMP) [43], hiyalüronidazlar [44] ve agreganazlar [45] gibi faktörlerde sentezlenmektedir. Sonuç olarak kondrositler kıkırdak dokuda anabolizma ve katabolizma reaksiyonlarını dengede tutarak hemaostazı sağlamaktadır (Şekil 2.3.). Ancak hücrelerin mikroçevresinde bu denge üzerinde etkilidir örneğin vitaminler, sitokinler, büyüme faktörleri, inflamasyon, yada farklılaşma faktörleri, oksijen seviyesi, mekanik stres bu mikroçevreyi oluşturan etmenler arasında sıralanabilir [46]. Bu da kondrositlerin hücre dışı matrisi ile direk ilişki içerisinde değil de mikroçevre ile daha hassas bir ilişki içerisinde olduğunu göstermektedir.

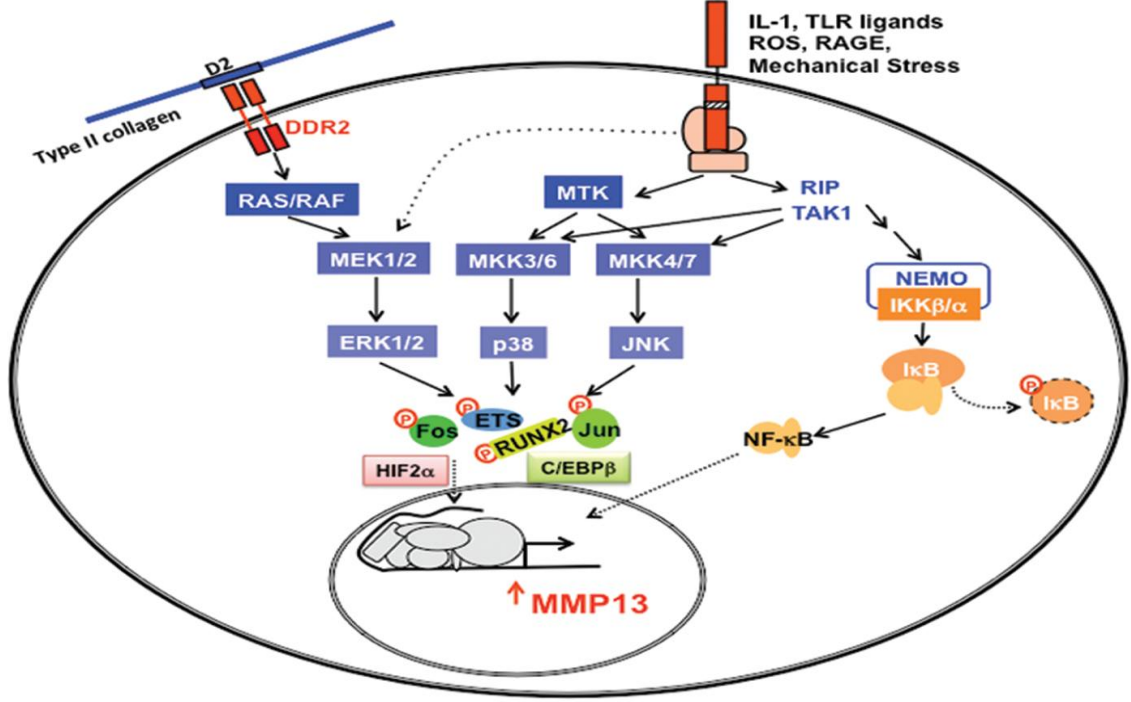


Şekil 2.2 Kıkırdak Dokunun Anabolizması ve Katabolizması [47].

2.1.3.2 Kondrojenesis

İskelet gelişimi sırasında kondrositler kemik ya da kıkırdak taslaklarının sentezlenmesi için mezenkimal öncü hücrelerden meydana gelir [48]. Bu mezenkimal kök hücrelerin kollajen I, III ve V ekspresyonu ile kondroprogenitor hücrelerin farklılaşarak kıkırdağa özel kollajen II, IX ve XI ekspresyonunu gerçekleştirmesine neden olurlar. Prolifere olan kondrositler PTHrP / Ihh kontrolü altında kollajen VI ve matrilin 1 ekspresyonu ederler. Matris metalloproteinaz (MMP) 9, 13, 14, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), VEGF reseptörleri, osteoklastların ve osteoblastların eylemleri aracılığıyla kemiğe nonvaskülerize ve hipoksik doku oluşturmak için ortam sağlarlar. Olaylar benzer bir süreç ile devam ederek iskeletin hızlı büyümesine yol açan, postnatal büyüme plakasında gerçekleşir [49]. Bu süreçler büyüme faktörü β (TGF β), kemik morfogenetik protein (BMP) ve Wnt sinyal yolağı, fibroblast büyüme faktörlerinde (FGF) devrede olduğu karmaşık düzenlemeye tabidir [50], SOX9 ve Runx2 kıkırdak olgunlaşması için gerekli iki önemli transkripsiyonel düzenleyicidir. TGF β ve BMP sinyallerin diferansiyel olarak Runx2 aktivasyonu yoluyla Wnt sinyal yolağını düzenler.

Son çalışmalar, epidermal büyüme faktörü reseptörünün sinyalleme ile gelişmekte olan büyüme plakasında endokondral kemikleşmenin düzenlenmesinde yer aldığını göstermektedir. Bu epidermal büyüme faktörü ve TGF α ligandı Rho/ROCK ve MEK/Ekstraselüler Regüle Kinaz (ERK) sinyal yollarını harekete geçirerek, kondrosit fenotipini oluşturur [51].

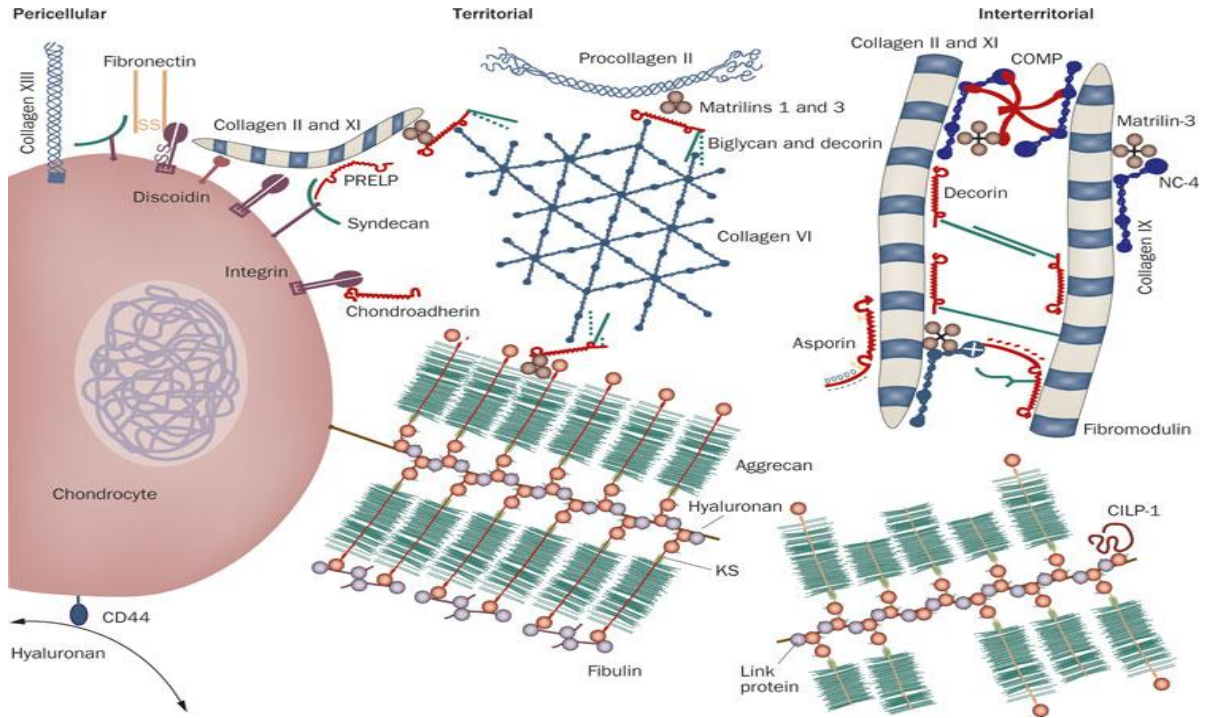


Şekil 2.3 Kondrositlerde ki matris metalloproteinaz13 (MMP13) gen transkripsiyonu üzerindeki sinyal yolları [51].

2.1.4 Hücre Dışı Matrisi

Çoğu bağ dokusu gibi kıkırdak dokunun işlevine ve türüne bağlı olarak farklı miktarlarda; elastin, glikoproteinler ve proteoglikanlardan oluşan ağısı bir hücre dışı matrisi mevcuttur. Matrisi; çeşitli fibriller, proteoglikanlar ve pek çok glikoprotein molekülünü içeren yapısal ve işlevsel bir ağıdır. Kondrositlerin yüzeyinde CD44 ve integrinler gibi çeşitli yüzey reseptörleri bulunmaktadır ve bunlar proteoglikan ailesi üyeleriyle bağ kurarlar [52]. Kıkırdağın yapısındaki proteoglikanlar kıkırdağa sertlik kazandırır. Bu dokuda bulunan başlıca proteoglikan yapı kondroitin sülfattan oluşan agregandır. Diğer proteoglikanlar ise sindekanlar, glipikan, dekorin, biglikan, fibromodulin, lumikan, epifikan ve perlekan olarak sıralanabilir [53], [54]. Hücre dışı

matrisin kuru ağırlığının %60'ını kollajenler, %5-10'unu proteoglikanlar oluşturmaktadır [55].



Şekil 2.4 Normal Kıkırdığın Moleküler Organizasyonu [54].

2.1.4.1 Proteoglikanlar

Proteoglikan (PG) molekülü; merkezde bulunan protein molekülüne kovalent bağlar ile bağlanmış glikozaminoglikanlardan (GAG) meydana gelmektedir. %95 polisakarit ve %5 de proteinden oluşmaktadır. PG'ler hücre göçünde, adezyonda aynı zamanda çeşitli sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri ile bağlanarak morfogenez de önemli rol oynamaktadır [56].

Çizelge 2.1 Proteoglikanların Lokasyonları [57], [58].

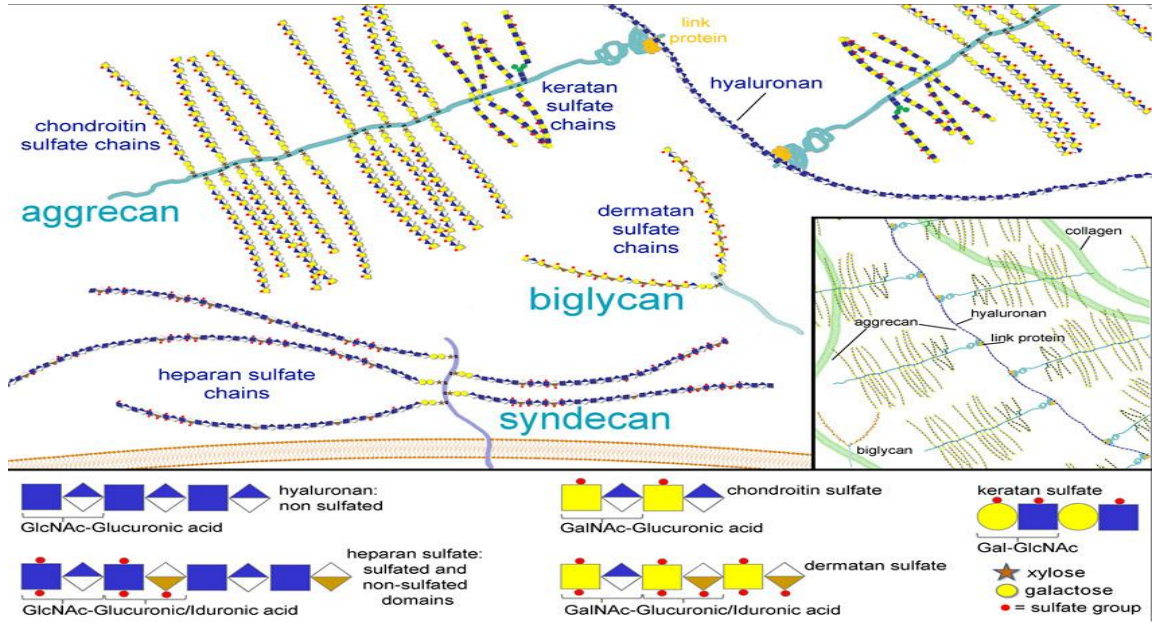
Proteoglikanın Lokasyonu	Proteoglikan İsmi
Ekstrasellüler Matrisi	Dekorin, biglikan, agrekan, versikan, nörokan, brevikan, leprekan, perlekan, agrin, kollajen tip XVIII
Membrana bağlı	NG ₂ , CD ₄₄ , betaglikan, sindekanlar ₁₋₄
intraseküller	Glipikanlar ₁₋₆ , serglisin

2.1.4.2 Glikozaminoglikanlar (GAG)

Glikozaminoglikanlar OH^- , COOH^- , SO_4 gruplarınca zengin olup polianyonik ve hidrofilik yapılardır. Proteoglikan agregatları bir hiyaluronik asit zincirine proteoglikan eklenmesiyle oluşan yapılardır ve kıkırdak dokuda görülmektedir. Hiyaluronik asit (hiyaluran), kondroitin 4-sülfat, kondroitin 6-sülfat, dermatan sülfat, heparan sülfat, heparin, keratan sülfat GAG çeşitleri arasındadır. GAG çeşidi hücre tipini belirlemede önemli rol oynamaktadır örneğin; kondrositler kondroitin 4 sülfattan tanımlanabilir [59].

Çizelge 2.2 Glikozaminoglikanların Özellikleri [60].

Glikozaminoglikanlar	Özellikleri
Hiyaluronik asit (hyaluran)	Tek başına bulunur. Sülfatsızdır. Kıkırdakta eklem sıvılarında bulunur. Çok yüksek derecede akışkandır ve suyun dokudan kaybını engeller. Çok uzun ve ağır bir moleküldür.
Kondroitin 4-sülfat	Sülfat ve karboksil grupları nedeniyle eksi yüklüdür. Daha çok Tip II kollajen ile yüksek seviyede etkileşime girmektedir.
Kondroitin 6-sülfat	Jel kıvamında matrisi oluşumunda görevlidir. Tip II kollajen ile etkileşim halindedir.
Dermatan Sülfat	Tip I kollajen ile etkileşim halindedir.
Keratan Sülfat	Omurlar arası disklerde mevcuttur.



Şekil 2.5 Proteoglikanlar ve Glikozaminoglikanlar [60].

2.1.4.3 Kollajen Lifler

Zincir biçiminde polimerleşmiş kollajen proteinlerden oluşmaktadır. Yapısal işlevleri yerine getirmek için evrimleşmiş proteinlerden oluşan bir ailedir. İnsan vücudunda en bol bulunan protein olan kollajen kuru ağırlığın %30'unu oluşturmaktadır [47] (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3 Kıkırdak Dokuda Yer Alan Kollajenler [47].

Kollajen Tipi	Bulunduğu Yer	Görevi
Tip I	Fibröz kıkırdak	Gerilmeye karşı direnç
Tip II	Hiyalin-Elastik Kıkırdak	Basınca karşı direnç
Tip VI	Kondrositlerin Etrafı	Hücrelerin matris ile tutunması için zemin
Tip IX	Hiyalin Kıkırdak	Glikozaminoglikanları bağlama tip II kollajenle ilişki
Tip X	Hiyalin Kıkırdak	Matrisin üç boyutlu yapısını düzenler
Tip XI	Hiyalin Kıkırdak	Tip II kollajen işlevine katılır
Tip XII	Fibröz Kıkırdak	Tip I kollajen ile etkileşim

2.1.4.4 Tip II Kollajenin Biyosentezi

İnsanlarda, tip II kollajen 53 ekson içeren bir gendir ve COL2A1 tarafından kodlanır. Bu geni etkinleştirici ve inhibe edici birçok transkripsiyon faktörü tanımlanmaktadır. SOX9, L-SOX5 ve SOX6 gibi genler Col2A1 geninin transkripsiyonel aktivitesini uyararak kondrojenizde artırıcı görev oynarlar [61]. L-SOX5 ve SOX6 az ölçüde SOX9 ise yoğun ölçüde Col2A1 geninin transkripsiyonel aktivitesini uyarırlar. Fakat genellikle tek başlarına ele alındığında, önemli ölçüde SOX9'un tip II kollajen ekspresyonunu arttırdığı gözlenmektedir [62]. Farklılaşmış ve dediferansiye kondrositlerde bulunan kollajen de Kruppel kutusu (C-Krox) adı verilen kısa bir promotör bölgesi aracılığıyla tip II kollajen ekspresyonunu inhibe eden "zinc finger" ve BTB domain içeren 7B proteini bulunmaktadır [63]. Sp1 ve Sp3 COL2A1 geninin her yerinde bulunan zinc finger proteindir. Sp1 ile Sp3 %90 benzerdir ama Sp1 farklı olarak ayrı transkripsiyonel aktivitesine sahip dört protein izoformu kodlar. SP3 ise transkripsiyon için hem aktivatör ve hem de inhibitör olarak işlev görebilir [64]. Sp1 ve SP3, COL2A1 geninin transkripsiyonel aktivitesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar ve bunların oranı kondrosit farklılaşması durumuna göre farklılık göstermektedir. Sp1/Sp3 oranı tip II kollajen ifadesini baskılanması ile ilişkilidir kondrosit dedifransiyasyon sırasında azalır. Buna ek olarak, kondrosit farklılaşmasında Sp1 ve SP3 engellenir ise COL2A1 genin ekspresyonu uyarılır [65]. Ayrıca mezenkimal kök hücrelerin kondrositlere farklılaşması sırasında COL2A1 geninin transkripsiyonu esnasında alternatif bağlanmalardan kaynaklanan iki yeni gen izoformu olan tip IIC ve IID rapor edilmiştir [66].

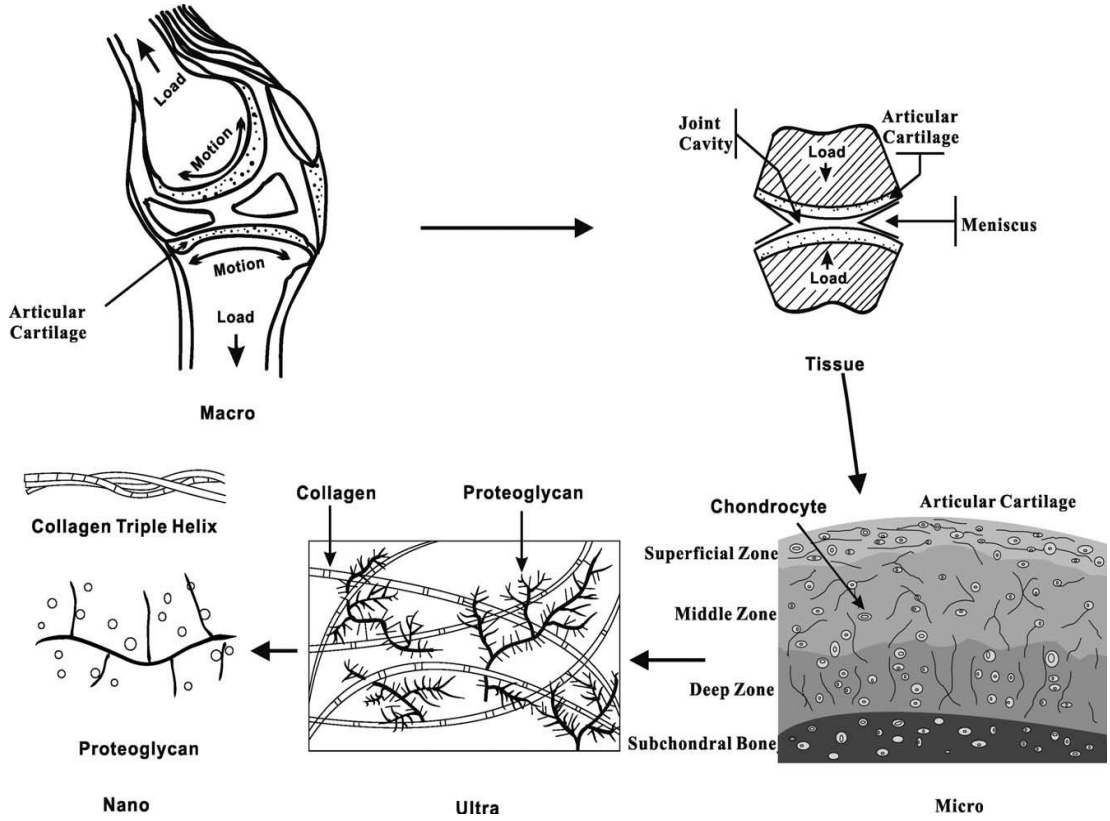
2.2 Kıkırdak Tipleri

2.2.1 Hiyalin Kıkırdak

En fazla bulunan kıkırdak türüdür. Yüzeyi makroskopik olarak yumuşaktır ve mavi-beyaz renktedir. Embriyonik safhadaki iskelet sistemi, kaburgaların göğüs kemiğine tutunma yerindeki kıkırdaklar, burun, trakea, bronşlar hiyalin kıkırdaktan oluşur. Hiyalin kıkırdak iskelet sistemi gelişimi boyunca yerini kemik dokuya bırakır. Hücre dışı matrisi tip II kollajence zengindir ve proteoglikanlar ile kaplı ağı yapıya sahiptir. Basınca dayanıklıdır fakat bükülemez [31], [33], [34], [67].

2.2.1.1 Eklem Kıkırdağı

Sinoviyal eklem yüzeyi hiyalin (eklem) kıkırdağı ile kaplıdır. Burada eklem kıkırdağı sürtünme stresini düşürerek kaymayı sağlar. Eklem kıkırdağının temel yapı taşları kondrositler, kollajen, proteoglikanlar, nonkollagenöz proteinler ve sudur [68]. Hareket nedeniyle oluşan yük için bir amortisör görevi görür. Sinoviyal sıvıyla birlikte bireyin ömrü boyunca aşınma direnci, yağlama ile acısız hareket etmesini sağlar [69]. Eklem kıkırdağı vücutta bulunduğu yere bağlı olarak farklı kalınlıkta olabilir ancak sıkıştırma kuvvetlerine dayanacak şekilde tasarlanmış bir dokudur. İnsanlarda, eklem kıkırdağı eklemle ilgili olarak 1-4 mm kalınlıkta olabilir. Eklem kıkırdağında bulunan kondrositler %1-5 oranında matrisi bileşenlerini sentezleyerek matrisin korunmasından da sorumludurlar ayrıca yoğun olarak Tip II kollajenden oluşmuştur. Eklem kıkırdağı strese cevap olarak gevşemesi, kendi viskoelastik özelliklerinin bir göstergesidir, ayrıca uygulanan yüke karşı da eşsiz bir hasar direnci göstermektedir. Sıkıştırma ve kesme kuvvetlerine karşı bir direnç üreten eklem kıkırdağının işlevi, hücre dışı matris makro moleküllere bağlıdır. Özellikle, kollajen fiber düzeneği ve yönlendirme, büyük ölçüde deformasyon engel olabilmek için stres uygulamaktadır [70].



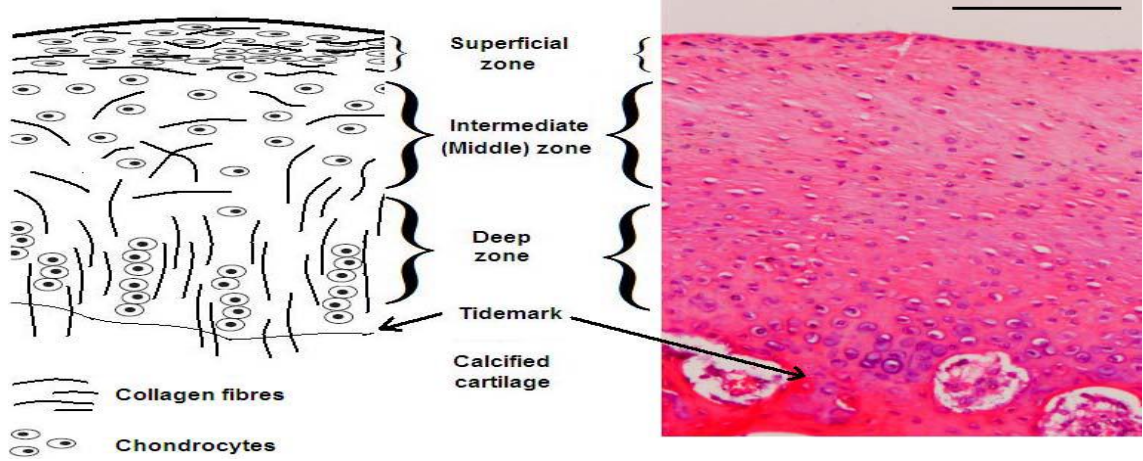
Şekil 2.7 Normal İnsan Eklemi ve Bileşenleri [20].

Eklem kıkırdığı superfisyel zon, tranzisyonel zon, radial zon ve irregüler kalsifiye zon kıkırdak bölgesi olmak üzere dört zona ayrılır [69], [71], [72].

- ✓ Superfisyel Zon (Zon I): En yüzeyde yer alan ve eklem boşluğuna komşu zondur. Bu zonda kollajen ve hücrelerin ara maddeye oranı göreceli olarak daha yüksektir.
- ✓ Tranzisyonel (Geçiş Zonu) (Zon II): Hücreler daha seyrek ve daha yuvarlak şekilde görülürler.
- ✓ Radial zon (Zon III): Tüm eklem kıkırdığının 2/3'ünü oluşturan en geniş zondur. Bu zonda hücre boyları uzar ancak dizilim eklem yüzüne dik olacak biçimdedir.
- ✓ Irregüler Kalsifiye Zon (Zon IV): Subkondral kemiğe en yakın, yani eklem boşluğuna göre en derinde olan zondur. Hücresel dizilim radyal zondaki gibidir. Bu tabaka subkondral kemiğe sıkıca tutunur.

Bu zonlar farklı kollajen ağlarından ve proteoglikan yapılarından dolayı karakterize edilebilirler. Tip II kollajen sağlıklı kıkırdakta daha fazla bulunmakla birlikte tip III, VI, IX, X, XI, XII ve XIV da olgun kıkırdak bileşeninde az miktarda bulunmaktadır [73], [74],

[75]. Eklem boşluğuna bakan yüzeysel eklem kıkırdağı tabakasındaki kondrositler sitolojik ve biyosentetik olarak subkondral kemiğe yakın orta ve derin tabakadaki kondrositlerden farklılık gösterir. Her zonda kondrosit grupları birbirlerinden bölgelere ait ve bölgeler arası matrisi tarafından ayrılırlar [37].



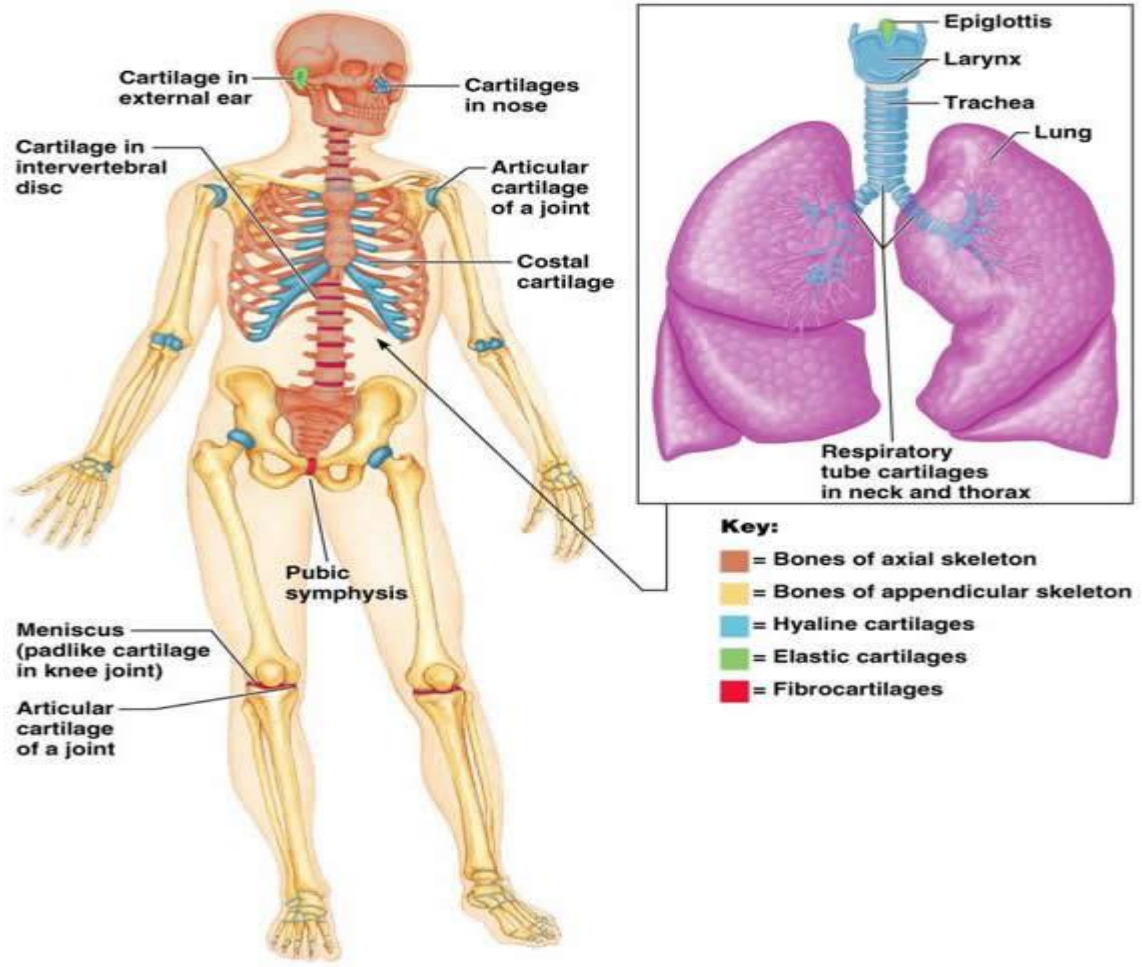
Şekil 2.8 Eklem Kıkırdağının Bölgeleri [76]

2.2.2 Elastik Kıkırdak

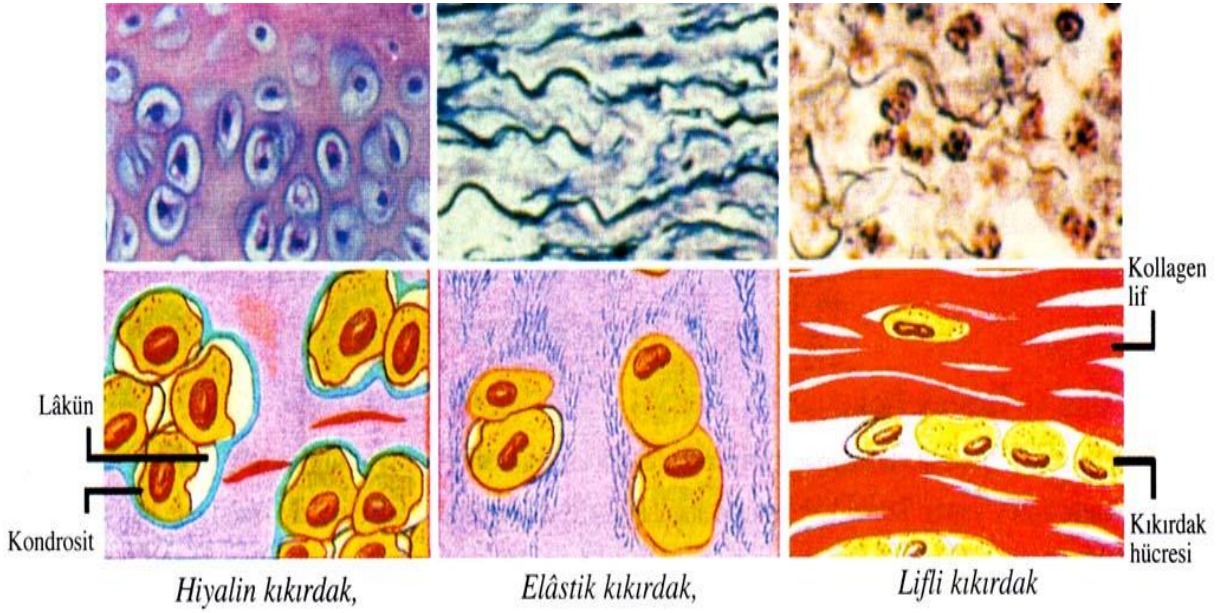
Yapısal olarak hiyalin kıkırdağa benzer olmasına rağmen bu doku da kondrositlerin etrafında bol miktarda elastik fibriller bulunmaktadır. Bu nedenle eğilip bükülebilme oranı daha yüksektir. Basınca karşı daha çok dayanıklıdır. Ayrıca kondrositlerin sitoplazmalarında daha az yağ ve glikojen bulunmaktadır. Perikondriyumu vardır ve kemikleşmeyen bir kıkırdak türüdür. Vücudumuzda epiglottis, kulak kepçesi, küçük bronşiyollerde bulunmaktadır [68], [33], [34], [31].

2.2.3 Fibröz Kıkırdak

Kondrositlerinin etrafında çok yoğun miktarda Tip I kollajen bulunmaktadır. Bu nedenle gerilmeye karşı çok dayanıklıdır. Sıkı bağ dokusu ve hiyalin kıkırdak arasında bir geçiş formu gibidir. Bu kıkırdak doku türünde tam anlamıyla bir perikondrium görülmez. Vücudumuzda omurlar arası diskler, simfisis pubis, eklemlerin meniscus ve discuslarında görülmektedir [68], [33], [34], [31].



Şekil 2.9 Kıkırdak Dokunun Farklı Tiplerinin İnsan Vücudunda Dağılımı [77]



Şekil 2.10 Kıkırdak Dokunun Çeşitleri [78].

2.3 Kıkırdak Hasarları

Yaşlanan Dünya nüfusu ve obezitenin artmasıyla birlikte kıkırdak hasarlarının yaygınlığının 2030 yılına kadar % 25 ulaşması beklenmektedir [1]. Türkiye’de 2010 yılında Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan 15 yaş üstü insanlardaki araştırma verilerine göre; ülkemizde %8,4 oranında eklem hastası bulunmaktadır. Bu da popülasyonda yaklaşık 4,7 milyon vatandaşımızın kıkırdak hasarı şikâyeti olan hasta anlamına gelmektedir [2]. İskelet sistemiyle ilişkili en baskın kıkırdak defektleri hiyalin kıkırdak hasarıdır. Hiyalin kıkırdağında büyük bir kısmını eklem kıkırdağı oluşturmaktadır. Eklem kıkırdağı defektleri doğal seyri çok iyi bilinmemekle birlikte günümüzde halen tartışmalı bir konudur [68], [79]. Eklem kıkırdak defektlerinin nedenleri genel olarak üç grup altında toplanabilir. Bunlar; direkt incinme, kronik hasarlar (mekanik olarak fazla yüklenmiş yük), subkondral kemik anomalisi (avasküler nekroz, osteokondritis dissekans) [11]. Bu hasarlar eklem kıkırdağında anabolik ve katabolik mekanizmalarda dengesizliğe neden olmaktadır. Kıkırdak yüzeyinde olan tahribattan sonuç itibariyle tüm eklem kıkırdağı etkilenecektir [73]. Uluslararası kıkırdak onarım derneğine (ICRS) ve Outerbridge’in yapmış olduğu artroskopik sınıflandırmaya göre kıkırdak tahribatlarının orijinal sınıflandırılması aşağıdaki gibidir [11].

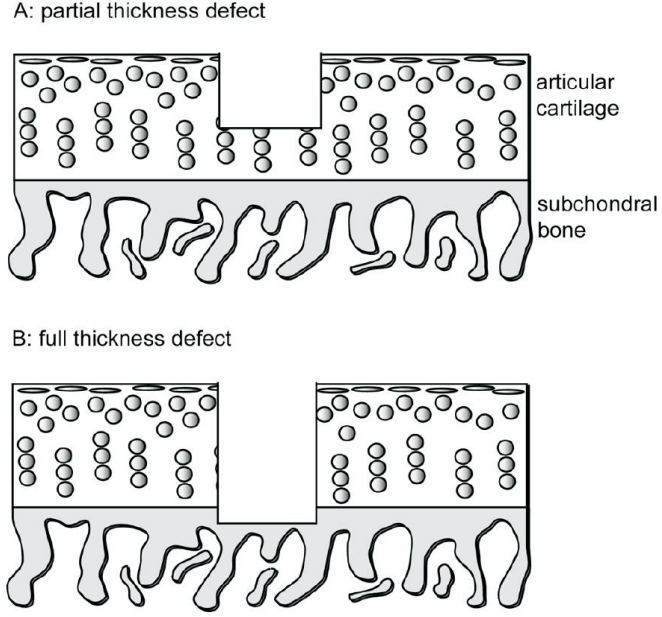
Evre 0: Bozulmamış kıkırdak

Evre I: Yüzeysel lezyonlar (yumuşak girinti veya yüzeysel fissür ve çatlaklar)

Evre II: Eklem kıkırdağının yarısından daha ince lezyonlar

Evre III: Eklem kıkırdağının yarısından daha kalın lezyonlar

Evre IV: Subkondral kemiğe kadar uzanan lezyonlar



Şekil 2.11 Kıkırdak Hasarları [80].

Tam kalınlıkta oluşan bir kıkırdak lezyonu yaşa, lezyon büyüklüğüne ve lokalize olduğu yere göre onarılabilir. Küçük bir kıkırdak defekti hiyalin kıkırdak sentezi ile kendiliğinde iyileşebilir. Bazı durumlarda ise oluşan dejenerasyon osteoartrite ilerleyebilir [10].

2.3.1 Osteoartrit (OA)

Osteoartrit (OA); oksidatif stres ve destabilizasyona bağlı yaşlanma gibi mekanik ve biyolojik olaylar sonucunda eklem kıkırdağındaki homeostazın bozulmasıdır [81], [82]. Eklemlerde ağrı ve hareketlerde kısıtlılık ile karakterize edilmektedir [69]. Her yaşta insanda görülebilmemesinin yanı sıra Osteoartrit hastalarının %70'i 65 yaş üstü insanlardır [83].

2.4 Kıkırdak Hasarlarında Tedavi

Kıkırdak defektleri travma ve aşırı kullanımdan ötürü 200 yıldan fazladır tam anlamıyla tedavi edilemeyen büyük bir tıbbi problemdir. İskoç Doktor William Hunter, 1743 yılında Royal Society yayınlanan makalesinde kıkırdak dokunun bir kere tahrip olduğunda yeniden düzeltilmesi zor olan baş belası bir hastalık olduğunu söylemiştir [84]. Günümüzde son derece yaygın olan kıkırdak defektleri ortopedik cerrahlar için tedavi edilmesi zor olan bir hastalık olmaya devam etmektedir ve tedavi olmayan bu hastalığın kendiliğinden iyileşme potansiyeli ya çok azdır ya da hiç yoktur. Çünkü

kıkırdak doku kondrositlerin az çoğalması ve kan damarlarının olmayışından ötürü kendiliğinden iyileşmesi oldukça zor olan bir dokudur [8], [36], [85]. Uygun bir tedavi yöntemi seçerken aşağıdaki parametrelere önemle dikkat edilmesi gerekmektedir [86].

- ✓ Etiyoloji
- ✓ Hasta özel amaçlar (ağrı azalma, fonksiyonel iyileştirme)
- ✓ Hastanın yaşı
- ✓ Vücut kitle indeksi
- ✓ Fiziksel aktivite
- ✓ Mekanik bacak eksen
- ✓ Ek hastalık (bağ yaralanmaları, menüsküs yaralanmaları)
- ✓ Boyut ve defekt yeri

Kıkırdak defektleri konservatif veya cerrahi yöntemler ile tedavi edilebilir. Konservatif tedavideki amaç ağrıyı azaltmak ve hastalarda rahatlamayı sağlamaktır [87]. Cerrahi tedavideki amaç ise ağrıyı azaltarak, kıkırdağın fonksiyonunu iyileştirmek ve hiyalin kıkırdak onarımını sağlayarak eklemdeki dejenerasyonu önlemektir [88].

2.4.1 Konservatif Yöntemler İle Tedavi

Non-steroid, anti-enflamatuar ilaçlar (NSAID) sık sık ağrı gidermek için konservatif tedavisinde kullanılmaktadır [88]. Ayrıca uzun vadede etkileri bilinmemesine rağmen kondroitin sülfat, glukozamin, hyaluronik asit içeren gıda takviyeleri, kilo kaybı için diyetler, fizik tedavi, rehabilitasyon ve korse de ağrıyı gidermek için kullanılmaktadır [86]. Konservatif tedavilerin lezyonlarda herhangi bir yapısal iyileşme yaptığı bu güne kadar kanıtlanmamıştır [69].

2.4.2 Cerrahi Yöntemler İle Tedavi

Günümüzde kıkırdak dejenerasyonları için mevcut cerrahi yöntemler birinci nesil tedaviler ve ikinci nesil tedaviler olmak üzere iki sınıfa ayrılır [9].

Birinci nesil tedavi yöntemleri;

- ✓ Palyatif amaçlı; debridman artroskopi,

- ✓İçsel onarım iyileştirme amaçlı; mikrofraktür,
- ✓Tüm doku nakli amaçlı; osteokondral allogreft, osteokondral otogreft gibi işlemleri içermektedir.

İkinci nesil tedavi yöntemleri;

- ✓Hücre temelli onarım (kondrosit veya kök hücreler kullanarak),
- ✓Scaffold temelli onarım (sentetik yeniden yapılanma),
- ✓Hücre, Scaffold ve Büyüme Faktörleri temelli onarım gibi işlemleri içermektedir.

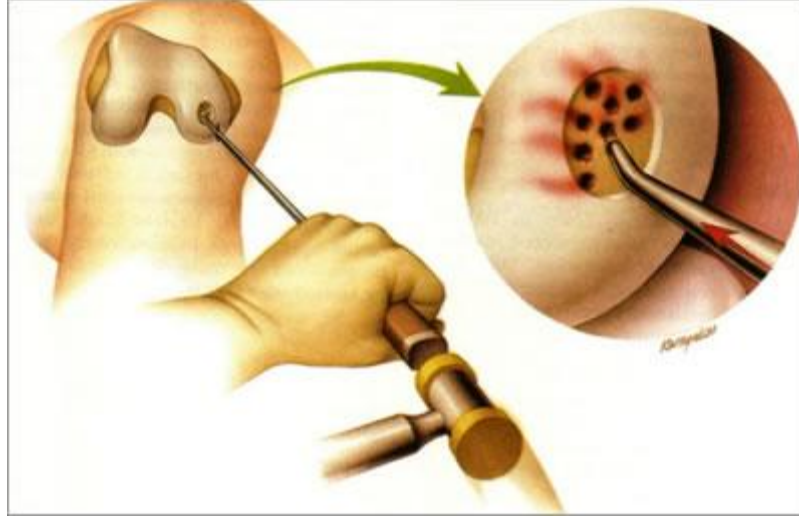
2.4.2.1 Debridman Artroskopisi – Artroskopik Lavaj

Magnusson tarafından ilk kez kullanılan bu popüler yöntem, kalsifiye kıkırdak yüzeyinde aşınmaya maruz kalmış stabil olmayan kıkırdağı yeniden stabil hale getirmek için uygulanmaktadır [89]. Artroskopik lavaj ve debridmanın faydalı etkilerinin mekanizması tam olarak ortaya konulmamıştır. Ancak artroskopik lavaj ve debridmanın olumlu etkileri ile sinovite sebep olan debrislere, indirgeyici enzimlerin, ağrıdan sorumlu olduğu bilinen etmenlerin uzaklaştırılması, serum fizyolojik ile eklemin yıkanmasının anestetik etkisi, sinir iletisini yavaşlatarak ağrıyı azalttığı tahmin edilmektedir [90]. Ancak her artroskopik lavaj ve debridman yapılan hastada şikâyetlerin azalmaması artroskopik lavaj ile tedavide başka faktörlerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. Debridmanın amacı gevşemiş kıkırdak parçalarının mekanik olarak üzerine vurularak eklem ve inflamasyonu ortadan kaldırmaktır. Yapılan bir çalışmada debridman tedavi uygulanan hastalarda 1 yıl sonra %80'e yakın ağrı azalma gözlemlenmiştir [91].

2.4.2.2 Mikrokırık – İlik Uyarılması (Microfracture)

Mikrokırık yöntemi kalsifiye olmuş kıkırdağın bir küret ile sistematik olarak kaldırılması yönteminin tüm basamaklarını içerir ve bu yöntem fibröz kıkırdak oluşumunu kolaylaştırır [18]. Ancak oluşan bu fibröz kıkırdak dokunun sürekli takibe ihtiyacı vardır [10]. Mikrokırık ile subkondral kemiğe kadar delinen defektli dokuya kemik iliği elementlerinin gelen kan pıhtısı ile dolması sağlanır "*well shouldered*" [92], [93].

Yapılan çalışmalarda mikrokirik yöntemi ile tedavi edilen hastaların %1'inde hiyalin kıkırdak oluşumu, %69'unda da ağırlıklı fibröz kıkırdak oluşumu gözlenmiştir [94]. Bu tedavi yöntemiyle normal kıkırdaktan daha kalın bir yapı oluştuğunu gözlemleyen araştırmacılar zamanla bu dokunun daha istikrarlı bir hale geleceğini savunmuşlardır [95].



Şekil 2.12 Mikrokirik Yöntemi [96].

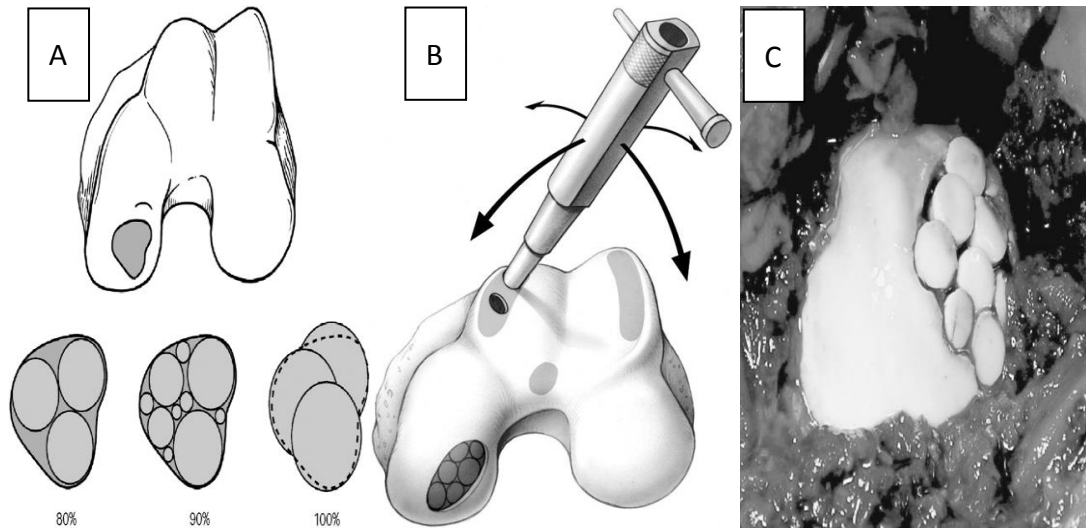
2.4.2.3 Osteokondral Otogreft Nakli

Outerbridge ve arkadaşları tarafından 1995 yılında ilk defa rapor edilmiştir [97]. Osteokondral otogreft nakli, diz bölgesinin nispeten ağırlık taşımayan kısmından alınan parçaların hasarlı bölgeye naklini içeren bir yöntemdir. Bu teknik ile 1cm^2 - 4cm^2 arasında lezyonların tedavi edildiğine yönelik raporlar bulunmaktadır. Donör sayısının yeterli olmaması en büyük dezavantajını oluşturmaktadır [69]. Mikrokirik yöntemi ve Osteokondral otogreft nakli yönteminin kıyaslandığı bir çalışmada bir yılsonunda alınan biyopsi örneklerinde mikrokirik yöntemiyle tedavi edilen grupta fibröz kıkırdak gözlenirken Osteokondral otogreft nakli ile tedavi edilen grupta hiyalin kıkırdak oluşumu gözlenlenmiştir. Ayrıca atletlerden seçilen hastaların Osteokondral otogreft nakli ile tedavi olan grubunun 6 ay sonra spora yeniden başladıkları da rapor edilmiştir [98]. Osteokondral otogreft nakli tek kademeli bir cerrahi işlemdir yani hastalar ikinci bir cerrahi operasyon geçirmezler. Mikrokirik yöntemde fibröz kıkırdak oluşumu gözlenirken bu yöntemde hiyalin kıkırdak oluşumu gözlenmektedir. Düşük maliyetli bir sistemdir ve graft ya da implant siparişi gerektirmez. Fakat osteokondral otogreft veya

allograftde greft sınırlarını çevreleyen bölgede doğal dokunun genellikle oluşmaması, sık sık çatlaklar meydana gelmesi ve sterilite hakkında endişeler karşılaşılan problemler arasında sayılabilir [9], [69].

2.4.2.4 Osteokondral Allogreft Nakli

Gross ve arkadaşları tarafından kullanılmaya başlanmış bu yöntem; bazı özel durumlarda örneğin belirgin büyük kırıkta defektlerinde ya da kemik kayıplarında uygulanması olası olan bir tedavi şeklidir [99], [100]. Osteokondral allogreft nakli de hiyalin kırıkta oluşumunu sağlamaktadır ve kırıkta kalitesi daha iyi olduğundan genç donörlerden greft alınması daha iyi sonuçlar sağlayabilir [101]. Fakat bu tedavi şeklinde immün reaksiyon oluşturabilme ve enfektif hastalık bulaşabilmesi gibi riskler bulunmaktadır. Dondurulmuş allogreftlerde zamana bağlı olarak kondrosit kaybı söz konusu olmaktadır [102].



Şekil 2.13 Osteokondral otogreft ile iyileşen hasarlı bölge alanı A. Sağlıklı dokudan greft alınımı B. Hastaya post implantasyon olarak greftlerin nakli C. [103].

Şimdiye kadar kırıkta hasarlarının tedavisinde mevcut olan yaklaşımların avantajları yanında ciddi dezavantajlara da sahip olduğu görülmektedir. Bu tedavi stratejilerinin genel dezavantajı; yeni oluşturulan dokunun kırıkta yapısı organizasyondan yoksun olması ve doğal kırıkta doku ile karşılaştırıldığında düşük mekanik özelliklere sahip olmasıdır [13]. Ayrıca kullanılan geleneksel tedavi yöntemlerinin yetersizliği, uzun zamanlarda sonuçlanmaları klinik olarak hala kırıkta hasarlarının onarımına alternatif

ve tedaviye hızlı yanıt verebilen yaklaşımların doğal bir ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Bunun için doku mühendisliği çalışmaları kıkırdak hasarlarının tamirinde umut vericidir [104], [105]. Doku mühendisliği, doku fonksiyonu iyileştirilmesi veya dokunun yenilenmesini teşvik etmek için uygun biyolojik bileşenleri biraraya getirerek biyouyumlu özelliklere sahip bir araç olarak kabul edilmiştir. Ayrıca başarılı yenileme veya hasarlı doku rejenerasyonu için biyomalzeme bilimini ve hücre biyolojisini bir araya getiren multidisipliner bir bilim dalıdır. Doku mühendisliği temelini oluşturan 3 bileşen; scaffoldlar, hücreler ve biyolojik sinyal molekülleri olarak tanımlanır. Bu nedenle araştırmacılar *in vitro* koşullar altında kıkırdak dokunun gerçek işlevini taklit edebilecek yapay bir doku oluşturabilmek için kıkırdak doku mühendisliği alanında çalışmalar üzerinde yoğunlaşmaktadırlar. Bu çalışmaların amacını ise kıkırdak dokuya yapısal anlamda benzer, mekanik davranışlarında verimli, ekonomik yapay bir kıkırdak doku geliştirmektir. Bu nedenle kıkırdak doku mühendisliği alanındaki gelişmeleri yeni nesil tedavi yaklaşımları başlığı altında toplamak mümkündür [10], [11].

2.5 Doku Mühendisliği

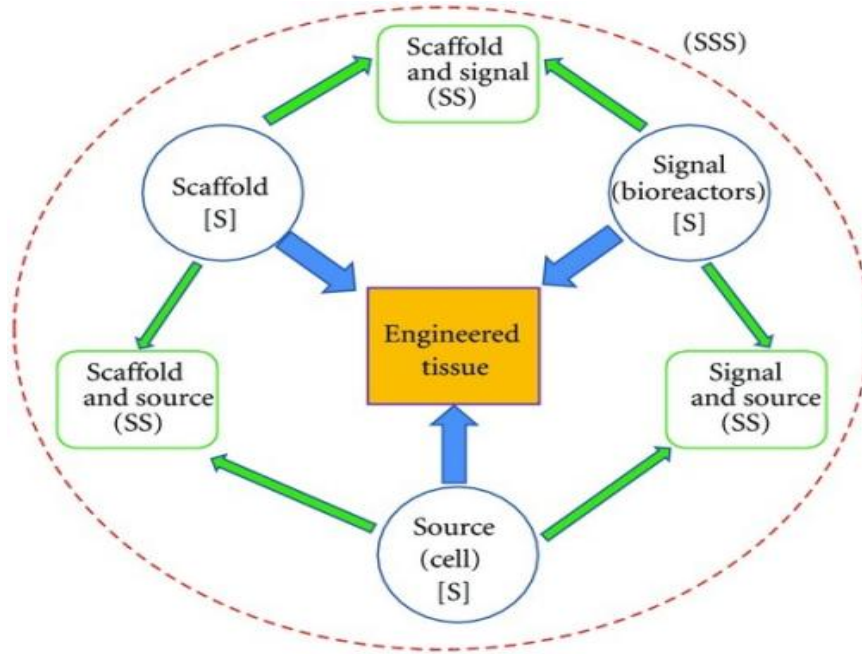
Doku mühendisliği doku benzeri yapıları oluşturmak amacıyla canlı hücreleri, biyouyumlu malzemeleri ve uygun biyokimyasal (örneğin, büyüme faktörleri) ve fiziksel faktörleri kullanan multidisipliner yeni bir alandır [106], [107]. Son zamanlarda, bu teknolojinin nihai hedefi, oluşturulan bu doku iskelelerini yaralanmış dokuların tedavisi veya hasarlı organların işlevini yerine getirmeleri amacıyla vücuda implantasyonları olmuştur [106], [107]. "Her doku yeniden şekillenir" felsefesini benimseyen araştırmacılar; izole edilmiş her hücre uygun ortam sağlandığı müddetçe uygun yapay dokuyu oluşturabilir düşüncesine odaklanmışlardır [106], [107]. Rejeneratif tıp terimi sıklıkla doku mühendisliği ile eşanlamlı olarak kullanılmasına rağmen rejeneratif tıp kök hücreleri tedavi sırasında hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır [106], [107]. İlk sentetik deri ve doku bileşenleri birden fazla araştırmacı tarafından 1962 yılında kullanılsa da ilk başarılı doku mühendisliği ile geliştirilmiş ürünler 1970 sonları ve 1980 başlarında ortaya çıkmıştır. Bilim çevreleri bu tarihleri doku mühendisliğinin başlangıcı olarak kabul etse de "Doku Mühendisliği" terimi

literatüre 1987 yılı civarında girmiştir. 1990'lı yıllara gelindiğinde, deri ve kıkırdak gibi birkaç doku mühendisliği ürünü başarılı bir şekilde ticarileştirilmiştir [108]. Birçok yeni şirket büyük bir yarış içerisinde 15 yıl önce tahmin edilen doku mühendislerinin ileride karmaşık vücut parçalarını yapabilecekleri hedefine ulaşmışlardır [107], [109] .

Doku mühendisliğinin önünde henüz çözülmemiş büyük problemler olarak, fonksiyonel damar ağlarının doku içerisine oluşturulması, değişik hücre tiplerinin 3 boyutlu doku içerisinde yerleşimi ve yayılımının kontrol edilmesi ile bu dokuları elde edilmesi için uygun hücre kaynaklarının kalitatif ve kantitatif olarak tiplendirilip tanımlanması gibi sorunlar sayılabilir [110]. 2000'lerin başlarında, yüksek teknoloji balonunun patlaması ve yorgun yatırımcıların doku mühendisliği alanında içerisinde bulunduğu yüksek risk içeren sektörlere yatırımlarını durdurması ile sektörde bir düşüş görülmüştür [111].

Kök hücre çalışmalarının artışı ile birlikte sektör tekrar kendine gelmeye başlamış fakat bu canlanma da geçici kalmış ve 2008 yılından bu yana faaliyet başlangıç finansmanları çok sınırlı olmuştur. Bazı alanlarda kaydedilen önemli gelişmeler olsa da (mesane, kornea ve bronş geliştirilmesi gibi), sektör uzun yıllar alan araştırma çabalarına rağmen kan damarları, kalp ve karaciğer gibi dokular için hala klinik olarak kabul edilebilir bir çözüm sunmaktan epey uzaktadır. Son otuz yıl içerisinde doku mühendisliğinin olgunlaşması zarfında moleküler ve hücreyel biyoloji ile mikro ve nanosistem mühendislik tabanlı onlarca teknoloji geliştirilmiştir. Bu teknolojiler genelde sorunları basite indirgeme yönelimi bulunan ve klinik olguların her zaman farkında olmayan bilim adamları tarafından geliştirilmiştir. Fakat yine de, bu teknolojilerin bazıları 2002 yılı itibariyle 3 milyar dolar gibi bir pazar payına ve yılda yaklaşık %25 oranında [112] büyüme oranına sahip moleküler teşhis endüstrisi gibi çığır açan bir pazarın oluşumunu sağlamıştır. Doku mühendisliğinin non-terapötik uygulamalarında gerçekleşen atılımlar nihai hedef olarak doku mühendisliği ürünü ve geliştirilmesi hevesli savunucularının düşündüğünden çok daha zor olan terapötik ürünlerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Bu inceleme sonunda yineleyeceğimiz gibi, nihai hedefleri olarak bu alanın gerçek bir etkiye sahip olması için doku mühendisleri kendi enerjilerini klinik problemlerin çözümüne odaklamaları gerekmektedir [113].

Doku mühendisliğindeki yaklaşımları başlıca dört grupta toplayabiliriz. Bunlardan birincisi biyomateryallerden hazırlanan scaffoldların (Doku İskelesi) uygulanmasıdır. Bu scaffoldlar yapay hücre dışı matrisi oluşturmaktadır. İkincisi ortamda scaffoldla olmaksızın yapay doku veya organ oluşturmak için canlı hücrelerin kullanımına dayanmaktadır. Üçüncü ise sadece scaffoldların ve biyosinyal moleküllerinin kullanımınıdır. Sonuncusu, yapay ve hücre ortam arasındaki farklılıkları en aza indirmek için scaffoldların, biyosinyal moleküllerin ve canlı hücrelerin üçünün bir arada kullanımını hedefler. Sonuç olarak tüm bu yaklaşımları bir araya getirdiğimizde ise doku mühendisliğinin temellerini 3 husus altında birleştirebiliriz. Bunlar; hücreler, scaffoldlar ve biyosinyal moleküller (büyüme faktörleri) dir [114].



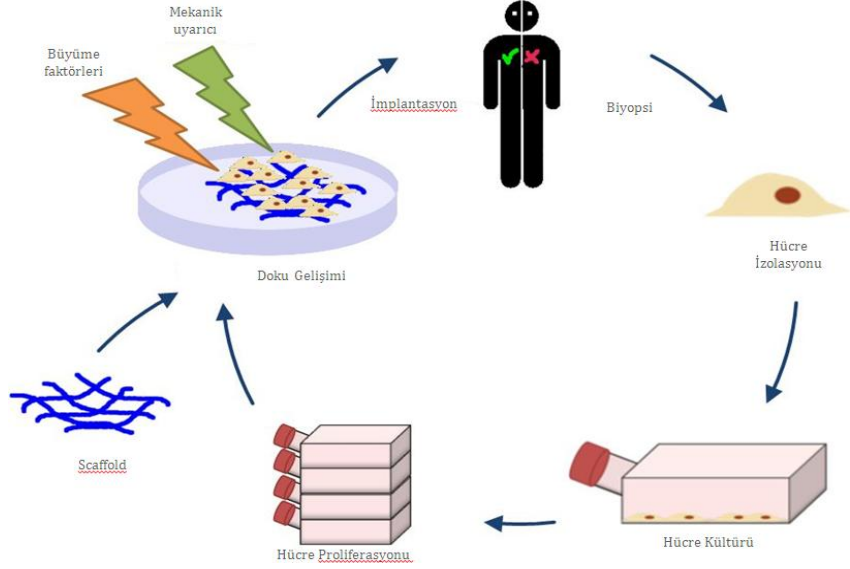
Şekil 2.14 Doku Mühendisliğinin temelleri [114].

2.5.1 Kıkırdak Doku Mühendisliği

Kıkırdak doku mühendisliği kıkırdak hasarlarını tamir etme amaçlı gelişen doku mühendisliğinin alt bilim dalıdır. Kıkırdak doku mühendisliği son yirmi yılda çok hızlı gelişmesine rağmen tedavi için klinik seçenekler hala yetersizdir ve yeni biyolojik çözümler geliştirmek için yoğun çalışmalar devam etmektedir. Kıkırdağın başarılı bir şekilde tamimiyle tamiri halen önemli bir klinik sorundur [115]. Son yirmi yılda biyomalzeme teknolojileri ve hücre kaynağı çeşitliliği büyük bir gelişme göstermiştir.

Hatta moleküler ve genetik manipölasyonlar ile işlevsel bir yapay kıkırdak üretimi yolunda kıkırdak doku mühendisliği çalışmaları oldukça umut vaat edici bir hal almıştır [116]. Kıkırdak doku mühendisliğinde *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarının birçoğu otolog izole edilmiş kondrositler ile yapılmaktadır. Fakat otolog kondrositlerin neden olduğu dezavantajlar hızlı bir şekilde alternatif hücre kaynaklarına yönelime neden olmuştur [21]. Bu hücre kaynaklarından kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreleri yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Fakat daha sonraki yapılan çalışmalarda başka dokulardan da mezenkimal kök hücrelerin izole edilebileceğini ve kıkırdak doku mühendisliğinde kullanımının daha pratik olabileceğini ortaya konulmuştur [117]. Daha yakın bir zamanda ise embriyonik kök hücrelerin ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerinde kıkırdak hasarlarını tedavi amaçlı kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılabilecek potansiyelde olduğu ortaya konmuştur [118]. Biyomalzemeler açısından bakıldığında ise 1990'ların başlarından itibaren biyolojik olmayan hidrojel malzemeleri (agaroz, alginat ve PEG) [119], biyolojik olarak parçalana bilen doğal ve sentetik yapılar [120] yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Biyomalzemelerin kıkırdak dokuda en yaygın kullanımı scaffoldlar ile olmaktadır [115]. Scaffoldlar sentetik, doğal ya da kompozit polimerlerden oluşabilir. Ayrıca eğrilmiş, dokuma şeklinde, nanolif ya da hidrojeller olarak da yapılandırılabilirler. Kondrogenезisin gelişmesi için kök hücreleri indükleyen büyüme faktörleri kullanılabilir. Günümüzde artık kıkırdak doku mühendisliği çalışmaları geniş çapta hücresel ve biyomalzemesel yelpazeye ek olarak moleküler terapötik faktörlerce (çözünür faktörler ya da viral transdüksiyon ile) zenginleştirilmektedir. Yapay kıkırdak gelişiminde kullanılan bioreaktörler ile besin iletimi artırılarak *ex vivo* koşullarda kıkırdağın mekanik uyarılması için kullanılabilir. Kıkırdak doku mühendisliğinin de temelini doku mühendisliğinin temelini oluşturan parametreler oluşturmaktadır. Burada hücre kaynaklarını kondrositler ve çeşitli dokulardan elde edilen kök hücreler oluşturur. Biyomalzeme kaynakları da oldukça çeşitlidir. Sentetik ya da doğal polimerlerden oluşan scaffoldlar ya da zarsı matrisler kullanılmaktadır [116]. Ayrıca kondrogenезisde etkili olan kıkırdak dokunun anabolik ve katabolik reaksiyonları da göz önünde bulundurularak kullanılan büyüme faktörleri de kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarının en can alıcı

unsurlarından biridir. Tüm bu parametreler aşağıdaki bölümlerde detaylı bir şekilde anlatılacaktır.



Şekil 2.15 Kıkırdak Doku Mühendisliği Temelleri

2.6 Kıkırdak Doku Mühendisliği Esaslarına Dayalı Kıkırdak Hasarlarının Hücre Kaynaklı Tedavi

Kıkırdak doku mühendisliğinin en önemli esaslarından biri kıkırdak dokuya gerçek işlevini yeniden kazandırabilecek uygun hücre tipinin belirlenmesidir. Kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında hücre kaynakları çok geniş bir yelpazede ele alınmıştır. Kondorsitlerin *in vitro* kullanımıyla ilgili karşılaşılan problemler nedeniyle araştırmacıları farklı hücre kaynakları aramaya mecbur bırakmıştır. Bu kaynaklar ise çeşitli kaynaklardan elde edilmiş kök hücreleridir ve kıkırdak hasarının tedavisinde umut vadetmektedirler (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4 Kıkırdak Hasarları Tedavisinde Kullanılan Hücre Tipleri

Hücre Tipi	Avantajları	Dezavantajları
Otolog Kondrosit	Doğal fenotip İmmünolojik minimal risk problemi	Başlangıç için çok az hücre sayısı Dediferansiyon üzerinde genişleme
Allojenik Kondrosit	Geniş hücre sayısı Kullanıma hazır solüsyon	Sınırlı bir donör durumu Hastalık bulaşma riski
Yetişkin Mezenkimal Kök Hücre	Büyük ölçekte hücre üretebilme Çok farklı dokulardan hücre izole edebilme	Hipertrofisi potansiyeli Heterojen hücre popülasyonu Kararlı ve tekrarlanabilir farklılaşma sorunu
İndüklenmiş pluripotent kök hücre (iPKH)	Hastaya spesifik hücreler büyük kaynak Birden çok hücre tipleri üretilme	Kararlı ve tekrarlanabilir farklılaşma sorunu Teratom potansiyeli
Embriyonik Kök Hücre	Birden çok hücre tipleri üretilme Kullanıma hazır solüsyon	Kararlı ve tekrarlanabilir farklılaşma sorunu Teratom potansiyeli Etik Problemler

2.6.1 Kondrosit Kaynaklı Kıkırdak Tedavisi

Kondrositlerin genel özelliklerinden yukarıda bahsetmiştik. Kısaca özetlemek gerekirse hücre dışı matrisin sentezinden sorumlu olan bu hücreler hasarlı kıkırdığa eski işlevini kazandırmak için makul bir tercih olmaktadır. Ayrıca *in vitro* koşullar altında kültüre edilmesi ve kıkırdak dokudan kolaylıkla elde edilmesi de kullanımını kolaylaştıran diğer etmenlerdendir [121], [122]. Bu alandaki çalışmaları; otolog kondrosit implantasyonu (ACI), kollajen-kaplı otolog kondrosit implantasyonu (CACI) ve matrise indüklenmiş kondrosit implantasyonu (MACI) şeklinde 3 sınıfa ayırabiliriz.

2.6.1.1 Otolog Kondrosit İmplantasyonu (ACI)

İlk olarak, kıkırdak lezyonlarının onarımında kullanılan kondrositler otolog kondrosit implantasyonu (ACI) tekniği ile çalışılmıştır [123]. Bu yöntem ile 2-10cm²'lik kıkırdak defektleri tedavi edilebilir [11], [94]. Kondrositler sağlıklı kıkırdağın ağırlık taşımayan bir bölgesinden alınmış ve *ex vivo* olarak çoğaltılmıştır. Başka bir cerrahi operasyon ile çoğaltılan kondrositler kollajen ihtiva eden bir süspansiyon ile kondral hasarın olduğu yere enjekte edilir ve fibrin bir yapıştırıcıyla bölge kapatılır. Bu prosedür küçük lezyonlar için şişmeye neden olsa da ağrıyı azaltmaktadır [12]. Yapılan araştırmalar sonucunda ACI yöntemiyle tedavi edilen hastalarda mikrokirik yöntemiyle tedavi edilen hastalara göre onarılan dokunun daha dayanıklı ve biyomekanik özelliklerinin doğal kıkırdağa daha çok benzediği gözlenmiştir [124]. ACI ya da mikrokirik yöntemlerinin hangisinin klinik de daha etkin bir sonuca ulaştıracak yöntem olduğu günümüzde halen tartışılmakta olan bir konudur. Çünkü klinik sonuçların değerlendirmesi söz konusu olduğunda bir dizi faktörün devreye girmesi bu durumu tam bir kaosa sokmaktadır. ACI yönteminde FDA tarafından da delaminasyon ve doku şişlikleri gibi yaygın yan etkiler bildirilmiş üstelik %15-30 arasında tekrar ameliyat sıklığı ile sonuçlanan bir tedavi yöntemi olduğu tespit edilmiştir [12].

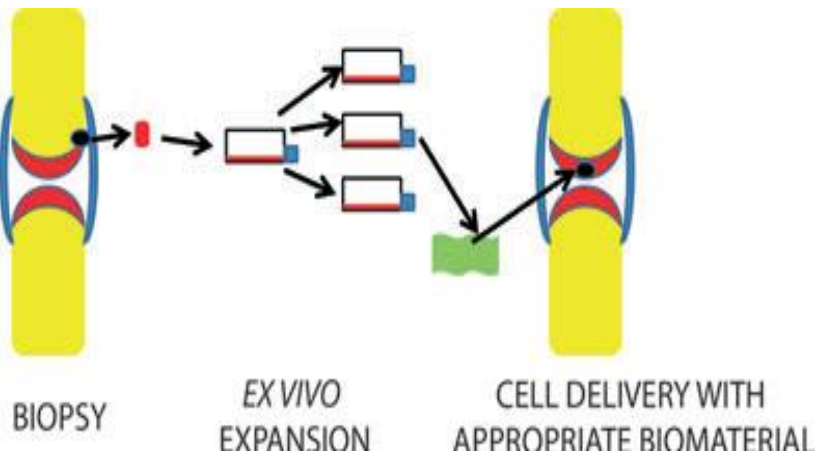
2.6.1.2 Kollajen-Kaplı Otolog Kondrosit İmplantasyonu (CACI)

İkinci nesil ACI tekniği, kollajen kaplı ACI olarak bilinmektedir (CACI) ayrıca bu yönteme otolog matrise indüklenen kondrosit (AMIC) adı da verilmektedir. Bu yöntem ile sadece kıkırdaktaki lezyonlar üzerine hastadan otolog alınarak laboratuvar ortamında çoğaltılmış kondrositler kollajen bir matris üzerinde çoğaltılarak hastaya nakledilir böylece kondrositlerin kıkırdak üzerinde istenmeyen bölgelere göç etmesi engellenir [125]. Piyasada Geistlich Biomaterials (Wolhusen, İsviçre) tarafından Chondro-Gide® ya da Bio-Gide® adıyla pazarlanmaktadır.

2.6.1.3 Matrise İndüklenmiş Kondrosit İmplantasyonu (MACI)

Üçüncü nesil ACI tekniği ise matrise indüklenmiş kondrosit implantasyonu (MACI) tekniğidir. Scaffoldlar üzerine kondrositlerin yerleştirilmesiyle bu yöntem geliştirilmiştir [126]. Diğer tekniklere göre avantajı kondrositlerin korunmasını sağlamasıdır.

Scaffoldların üzerine kondrositlerin de implante edilmesiyle elde edilen yapay doku, kıkırdığın doğal matrisine benzer karakteristik hücre dışı alanına sahiptir [127], [128]. Scaffoldların kullanılması ile kondrosit adezyonu, proliferasyonu daha iyi sağlanırken, dedifransiyasyon kısıtlanması gibi sınırlayıcı tüm durumlardan kondrositler muhafaza edilmektedir. MACI yönteminden ACI yöntemine göre kıkırdak hasarlarının tamirinde daha iyi sonuçlar alınmasına rağmen bu yöntemde diğer kondrosit kaynaklı tedavi yöntemleri gibi en büyük dezavantajı çok büyük kıkırdak hasarlarının tedavisinde kullanılamıyor olması ve donör morbiditesidir [129].



Şekil 2.16 Otolog kondrositlerin bir zemin üzerinde (CACI/MACI) çalışılmasının şematik gösterimi [130]

2.6.1.4 Kıkırdak Tedavisinde Kondrosit Kullanımının Avantajları ve Dezavantajları

Tüm bu tekniklerde (ACI, CACI, MACI) kondrosit naklinin hastanın kıkırdak fonksiyonunda iyileşmeye etkisi olduğu tespit edilmiştir. Ancak kondrositlerin *in vitro* çoğaltılması dedifferensiyon ve ya fenotip kaybına yol açmaktadır. Bu da kıkırdak rejenerasyonunda kullanımlarını faydasız kılmaktadır [7], [131]. Bu sorunun üstesinden gelmek için; büyüme faktörü beta 1 (TGF- β 1), fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF-2) ve insülin 1 büyüme faktörlerinin (IGF-1) içerisinde bulunduğu kültür ortamı takviyesi ile dedifferensiyon işlemi geciktirilir ama tamamen bu hücresel olayı durdurmak mümkün değildir [132]. Ayrıca agaroz jel, aljinat taneleri ya da fibrin yapıştırıcılar ile hazırlanmış üç boyutlu kültür sistemleri üzerinde kondrosit ekilmesi ile kondrosit fenotipi korunabilir [116]. Yetişkin kondrositlerinden daha uygun bir seçenek olarak yeni doğan veya fetal kondrositler mevcuttur. Bunlar önemli ölçüde hızlı büyüyen ve daha

yüksek proteoglikan, kollajen tip II, kollajen IX içeriğine sahiptir. Fakat yeni doğan veya fetal kondrositlerin de kullanılabilirliği hem etik kısıtlamalar içerir hem de yetişkin kondrositlerin kullanımında karşılaşılan dezavantajlara sahiptir [133].

Kondrositlerin kırıldak doku mühendisliği temelleri esas alınarak kırıldak hasarlarında kullanılacak makul bir yöntem olmasına karşın bu kullanımlarını engelleyen dezavantajları da bulunmaktadır. Örneğin ACI yönteminde ancak 2-10 cm² çapa sahip dokuların tadilatı yapılabilir. Büyük kırıldak hasarları çok daha fazla kondrosit hücresi gerektirecektir (mikro litreye 10.000 hücre) bu da yöntemde büyük bir dezavantaj sağlamaktadır. Yani otolog kondrositlerin izole edildiği kırıldak doku, daha öncede bahsettiğimiz gibi donör de kırığa yük binmeyen sağlıklı bir bölgeden alınmaktadır eğer kondrositlerin izolasyonu için büyük doku alınırsa bu da donör de sekonder bir hasar meydana getirebilir [134]. Bir diğer dezavantaj ise elde edilen kondrositlerin pasaj esnasında fenotiplerini uzun süre boyunca koruyamamasıdır [12], [135]. Bu dezavantajlarından dolayı araştırmacılar kondrositlere alternatif olarak kullanılacak farklı doku ve organlardan izole edilebilen ve istenilen dokuya farklılaşabilme yeteneğine sahip olan kök hücreler üzerine odaklanmışlardır.

2.6.2 Kök Hücre Kaynaklı Kırıldak Tedavisi

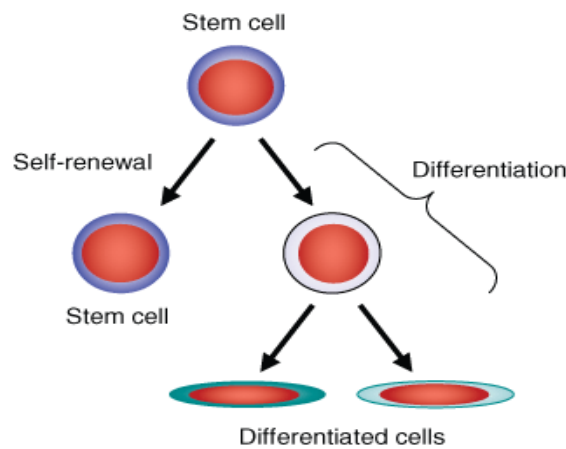
Günümüzde, kök hücrelerin çeşitli hücrelere farklılaşabilme özelliği ile dejenere olmuş doku ve organların tedavisinde rejeneratif tıp ve doku mühendisliği için ümit vericidir [21], [136]. Son zamanlarda kök hücre alanındaki gelişmeler kırıldak dokuya yeni işlevini kazandırmaya yönelik tedavilerde karşılaşılan problemlerin giderilmesinde yeni umutların doğmasını sağlamıştır. Kök hücreler kullanılarak yapılan kırıldak doku mühendisliği uygulamaları ile istenilen özelliğe yakın yapay kırıldak doku oluşturulmasına yönelik başarılı sonuçlar azımsanmayacak düzeydedir [130]. Kök hücreler; bölünerek kendini yenileyebilen ve farklılaşarak kan, karaciğer, kemik iliği, kas, kırıldak, yağ, kemik gibi özelleşmiş görev yapan organları oluşturan hücrelerdir [23], [137].

Kırıldak tedavisinde kullanılan kök hücre kaynakları; embriyonik kök hücreler, indüklenmiş kök hücreler dışında erişkin kök hücre kaynaklarından kemik iliği, adipoz doku, periferik kan, kas doku, periost doku, sinovyal zar, kordon kanı, kordon matrisi,

amniyon sıvısı, plasenta kıkırdak doku mühendisliği esaslarına dayalı literatür de kullanılan kök hücrelerdir [19]. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda olfaktör kök hücrelerinin de osteositlere, kondrositlere ve adipositlere farklılaşması rapor edilmiştir [138].

2.6.2.1 Kök Hücrelerin Genel Özellikleri

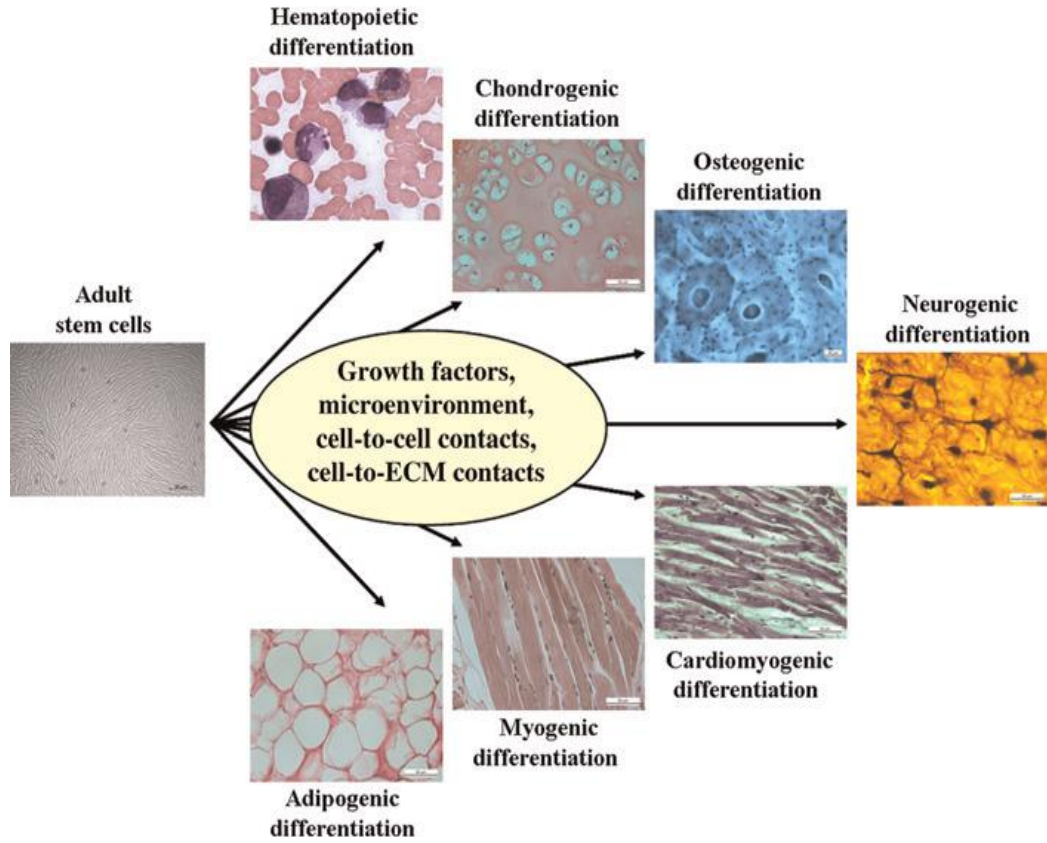
Kendini yenileme (self-renewal), klonlaşarak kendi kopyasını oluşturabilme ve farklı hücre hatlarına farklılaşabilme yeteneğine sahip olan özel hücrelerdir [139], [140]. Kök hücrelerin kendini yenilemesi; hücrenin çoğalma yeteneğini yani kök hücrelerin ölümsüz, sürekli ve sınırsız bölünme yeteneğini belirler [141]. Kök hücreler uzun süre bölünebilme ve kendi kendini yenileme yeteneğine sahiptirler. Bölünebilmelerini sağlayan faktörler arasında kromozomların ucunda bulunan ve binlerce kez tekrarlanan kısa DNA tekrar dizileri (TTAGGG) olan telomerler bulunmaktadır. Kök hücreleri klonlaşma özelliği ile kendi özelliklerini taşıyan yeni hücreler üretebilme kapasitesini sahip olmaktadır [142]. Hücrelerin bölünme kapasitesini kromozomların ucunda bulunan ve telomer adı verilen DNA zincirleri belirler. Bir hücrenin telomeri ne kadar uzun olursa, bölünme kapasitesi de o kadar fazla olur. Telomer zincirlerinin uzun kalması ise telomeraz enzim aktivitesini belirler ki kök hücrelerde telomeraz enzimi çok yüksektir ve bu sayede kök hücreler tekrar tekrar bölünerek kendilerini kopyalarlar. Telomeraz enzim aktivitesi insan germ, tümör, embriyonik ve erişkin kök hücre serilerinde yüksek bulunmuştur [143].



Şekil 2.17 Kök hücrelerin genel özellikleri

2.6.2.2 Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli

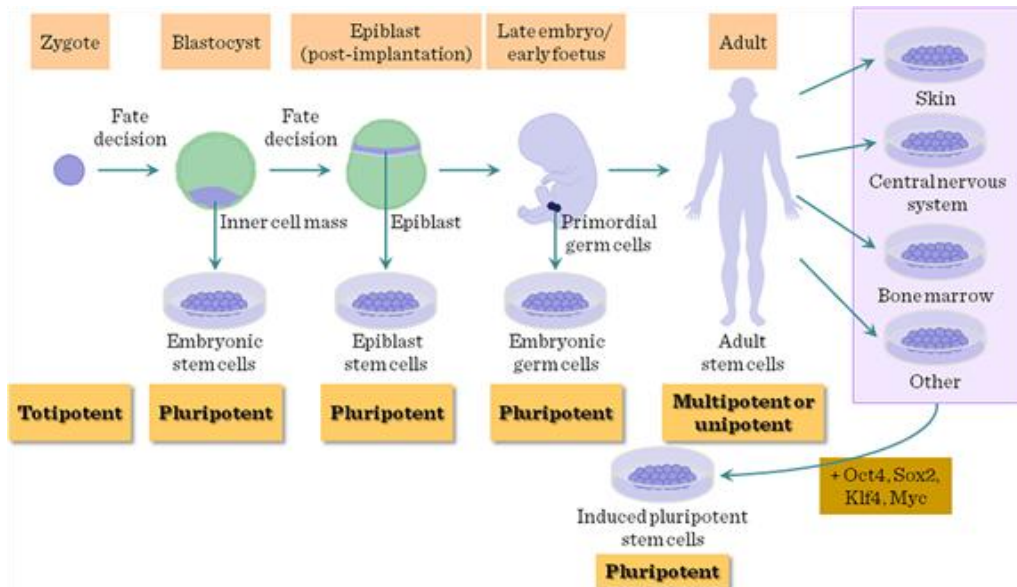
Vücut hücrelerimiz embriyonik dönemin endoderm, mezoderm ve ektoderm olmak üzere üç germ tabakasından oluşturmaktadır. Endoderm tabakasından; timus, tiroid, akciğer, karaciğer, pankreas gibi doku ve organlar farklılaşırken, mezoderm tabakasından; kemik iliği, kan, kemik, kıkırdak gibi doku ve organlar farklılaşır, ektoderm tabakasından ise; deri, hipofiz bezi, kulak, göz gibi doku ve organlar farklılaşır [144], [145]. Kök hücreler özel büyüme faktörleri ve sitokinlerin kullanılmasıyla özelleşmiş hücrelere farklılaşabilirler. Embriyonik kök hücreler; sinir büyüme faktörü (NGF) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) ile her üç embriyonik germ tabakasına farklılaşabilirken, fibroblast büyüme faktörü (FGF-2), retinoik asit ve kemik morfojenik protein (BMP-4) ile ektodermal ve mezodermal belirteçleri gösteren progenitörlere farklılaşabilirler [146].



Şekil 2.18 Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli [23].

2.6.2.3 Farklılaşma Potansiyellerine Göre Kök Hücreler

Farklılaşma potansiyellerine göre; totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak adlandırılan 4 farklı kök hücre grubu vardır [147]. Totipotent hücreler embriyonun 4. ve 5. günlerine kadar oluşan hücrelerdir. Organizmanın gelişimini takiben farklılaşma potansiyellerine göre pluripotent, multipotent, unipotent özellik gösterebilirler [148]. Pluripotent hücreler; fertilizasyondan 4. ve 5. günden sonra oluşan blastosist evresindeki embriyoda bulunan hücrelerdir. Bu hücreler, *in vivo* embriyonik gelişim sırasında ve *in vitro* koşullar altında embriyonun üç germ tabakası olan endoderm, mezoderm ve ektodermden meydana gelen her türlü hücre tipini (yaklaşık 200 farklı hücre) oluşturabilme potansiyeline sahip hücrelerdir [149], [150]. Unipotent hücreler, Embriyonik gelişimin daha ileri evresinde görülen hücreler olup sadece kendi kökeninde bulunan özelleşmiş hücre ve doku gruplarına farklılaşabilirler. Bu hücreler sınırlı farklılaşabilme kapasitesine sahip olmalarına rağmen çok sayıda hücre türüne farklılaşabilmektedir. Unipotent hücreler, sadece bir çeşit hücre grubuna farklılaşabilen hücrelerdir. Bu hücreler, erişkin organizmada, tek bir seri boyunca farklılaşabilirler. Ayrıca, doku yenilenmesinde de rol oynarlar. Ancak daha geniş doku hasarlarında, hasarlı bölgenin tamiri için pluripotent kök hücreler devreye girer [151], [152].



Şekil 2.19 Farklılaşma Potansiyellerine Göre Kök Hücreler [153].

2.6.2.4 Kök Hücrelerin Elde Edildiği Kaynaklar

Kök hücrelerin sınıflandırmasında birçok farklı görüş olmasına rağmen kök hücreler temelde, kendini yenileme ve farklılaşma yeteneğine göre; embriyonik kök hücreler (EKH) ve erişkin kök hücreler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Fakat son zamanlarda bunların dışında indüklenen pluripotent kök hücreler de (iPKH) üçüncü bir grup olarak bu sınıflandırmaya dâhil edilmektedir [154]. Embriyoda; erken embriyon dönemindeki blastositin iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler, embriyonel yapraklar ve fetal dokular da ki kök hücreler embriyonik kök hücreler olarak adlandırılır [155]. Differensiye olmuş bir dokuda farklılaşmamış halde bulunan ve kendini yenileyerek kaynağında ki dokunun özelleşmiş hücrelerine farklılaşabilen hücrelere erişkin kök hücreler denir. Erişkin kök hücre kaynakları; çeşitli hücrelere farklılaşma potansiyelleri ve etik açıdan uygun olmaları nedeniyle en çok çalışılan kök hücre kaynaklarıdır [156].

Erişkin kök hücreleri; kemik iliği, kas dokusu, spongios kemik, dermis, göz, kalp, noral krista, yağ dokusu, periost, perisit, sinovyal zar, kan, amniyon sıvısı, Wharton jeli, göbek kordon kanı, göbek kordon stroması, diş pulpası, olfaktör bulb olmak üzere birçok farklı erişkin dokudan izole edilir [157]. Ayrıca izole edilen bu erişkin kök hücreler *in vitro* koşullar altında diğer dokuların özelleşmiş hücrelerine farklılaşabilirler [158].

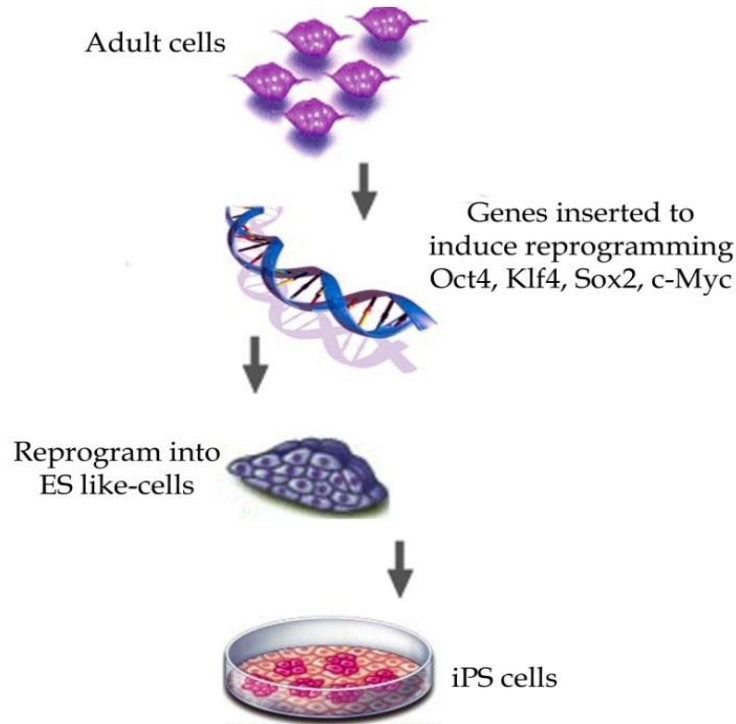
2.6.2.4.1 Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler; embriyonun 4-5 günlük erken dönem formu olan blastokistin yaklaşık olarak 64-200 arası hücreden oluşan iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent kök hücrelerdendir. Tüm yetişkin hücre tiplerine dönüşebilme ve sonsuza dek çoğalabilme özelliklerine sahip hücre grubudur [159]. Genellikle OCT4, NANOG ve SOX2 genleriyle karakterize edilir [130], [160]. Yapılan çalışmalarda EKH'ların kondrosit farklılaşmasında kullanılabilecek alternatif bir kaynak olduğu ve mezenkimal kök hücrelere göre farklı avantajlara sahip olduğu ortaya konmuştur [161]. Embriyonik kaynaklardan kök hücrelerin izolasyonu, sahip oldukları zorluklar yanında elde edilmesinin çeşitli etik sorunlara yol açması nedeniyle günümüzde halen tartışılmakta olan bir konudur [150], [152]. Embriyonik kök hücrelerin en büyük dezavantajı; bu

hücrelerin tüm hücre tiplerine farklılaşma kapasitelerinden dolayı tümör gelişimine meyilli olmaları ve *in vivo* çalışmalarda teratom oluşumuna neden olmalarıdır [162].

2.6.2.4.2 İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler

Kök hücrelerin farklılaşması, hücreler daha pluripotent hücre safhasında iken sayısız epigenetik faktörün genetik materyal üzerinde etki göstermesiyle gerçekleşen bir prosedürdür. Günümüze kadar erken embriyo ve EKH'lerde pluripotensinin elde edilmesini sağlayan Oct3/4, Sox2 ve Nanog gibi birçok faktör tanımlanmıştır. Yamanaka ve ark. (2006) ise EKH tanımlanmasında kullanılan bu çok sayıdaki faktörün kritik bir kısmının aynı zamanda somatik hücrelerde pluripotensiyi sağlayabileceğini hipotez olarak öne sürmüşler ve kurdukları deney sisteminde önceden tanımlanmış bu faktörlerin somatik hücrelerde pluripotensiyi indükleyip indüklemediklerini araştırmışlardır. Ortaya koyulan hipotez sonucu EKH'ların tanımlanmasında kullanılan 24 farklı gen ürünü ile yapılan çalışmada araştırılan bazı gen ürünlerinin pluripotensiyi indüklediğini belirlenmiştir. Deneyler boyunca araştırılan bu 24 faktör tek tek incelenmiş ve adım adım indirgenerek sadece 4 genin (Sox2, Oct3/4, Klf4 ve cMyc) kendi kendilerine EKH indüklenmesinde etkili olduğunu ortaya çıkarmışlardır [163]



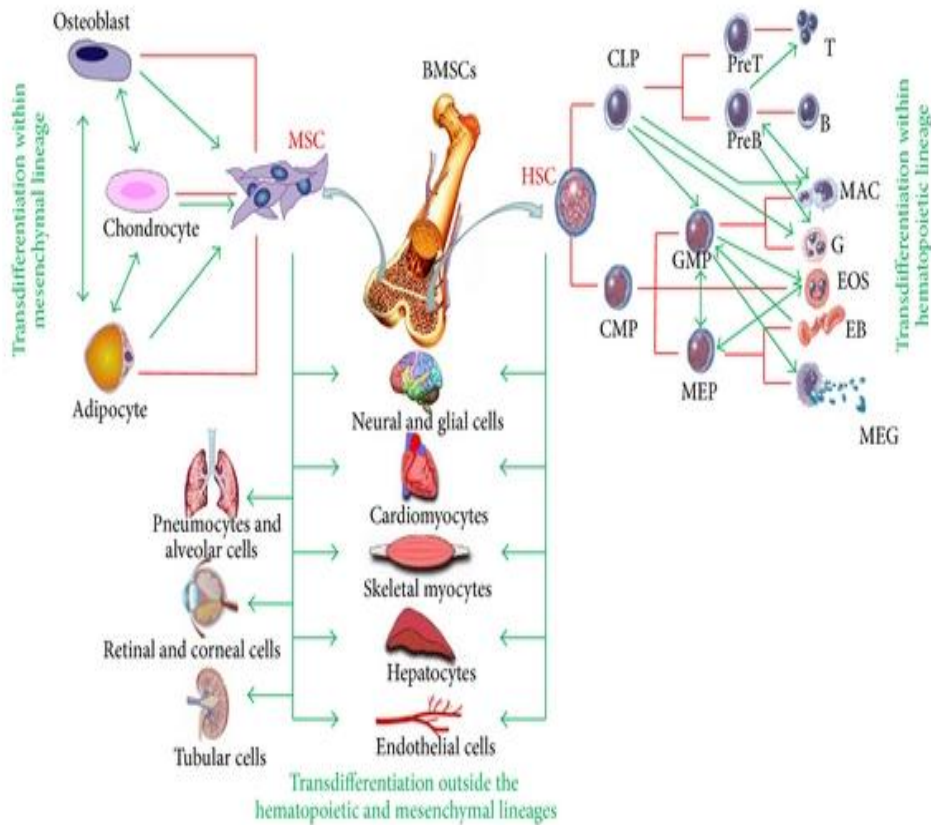
Şekil 2.20 İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler [164]

Bunun sonucunda İPKH kavramı bilim literatürüne girmiştir ve bu teknolojinin hücre tedavisi için büyük bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir. Fakat bununla birlikte yapılan çalışmalarda tümör gelişimi riski nedeni olabilecek pro-onkogen ve c-myc varlığı İPKH programlanmış hücrelerde tespit edilmiştir. Bundan yola çıkarak İPKH'ların tümörejenik özelliklerini tanımlayabilmek için kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılmasının alternatif bir yaklaşım sağlayabileceği düşünülmüştür. Çünkü kıkırdak dokunun benzersiz homojen morfolojisi hücre farklılaşmasını veya herhangi bir anormal hücre büyümesini histolojik analizlerle belirlemeye yardımcı olmaktadır. Bu nedenle; İnsan EKH ve İPKH'larının kondrojenik farklılaştırmaları yapılarak farklılaşan hücreler *in vitro* ve *in vivo* olarak karşılaştırılmış ve İPKH'ların kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılmasının farklılaşma esnasında anormal hücre hatları belirlenmesi için mükemmel bir yöntem olduğu rapor edilmiştir. EKH ve İPKH günümüzde kıkırdak defektlerinde kullanıma uygun olduğu düşünülse de klinik de uygulanması halen araştırma konusudur [165].

2.6.2.4.3 Erişkin Kök Hücreler

Erişkin ya da somatik kök hücreler; erişkin vücudunda bulunan öncü hücre gruplarına farklılaşma yeteneğinde ve uzun süre kendini yenileyebilme özelliğine sahip hücrelerdir. Kemik iliği, yağ, periferik kan, kas, göbek kordonu vb. erişkin dokulardan özel yöntemler ile erişkin kök hücreler elde edilir [166]. Yetişkin kök hücreler embriyonik kök hücrelerden farkı multipotent özellikle, kısıtlı farklılaşma özelliğine sahip bunun yanında kök hücre kriterleri olan farklılaşma, kendi kendini yenileme ve klonlaşma özellikleri gösteren hücrelerdir [155]. Kemik iliği, kordon kanı, periferik kan, yağ, böbrek, beyin, deri, karaciğer gibi kök hücre kaynaklarından elde edilen kök hücre türleri erişkin kök hücreleri olarak tanımlanmıştır [167]. Bu kök hücreleri doku yenilenmesini ve doğal hücre ölümünde ya da yaralanmalarda hasara uğrayan hücrelerin yerini alarak, doku homeostazını sağlayan en önemli hücre grubudur. Erişkin kök hücrelerin, uygun ortam şartları altında hedefe yönelik uyarılarla çeşitli özelleşmiş hücrelere dönüşebilme yetenekleri plastisite olarak tanımlanır [168]. Erişkin kök hücreleri kendi mikroçevrelerin de farklılaşmamış ya da özelleşmemiş olarak bulunurken, sinyaller aracılığıyla kendi aralarında ki iletişimi düzenlediği bildirilmiştir

[169]. Farklılaştıkları dokulara göre erişkin kök hücreleri; hematopoetik kök hücreler, organlardaki kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler olmak üzere 3 gruba ayrılırlar [170]. Mezenkimal kök hücreler (MKH) en çok çalışılan erişkin kök hücrelerdir. Bu nedenle araştırmacılar erişkin dokulardan elde edilen MKH çalışmalarına yönelmiş ve bu MKH'ların, kondrojenik hücrelere farklılaşma potansiyeli de göz önünde bulundurularak kırık doku mühendisliğinde kullanılmak üzere alternatif bir kaynak olduğu düşünülmüştür [171]. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalar sonucunda MKH'ların yaklaşık olarak tüm doku ve organlardaki varlığı tespit edilmiş, bu hücrelerin böylece doku mühendisliğinde kullanımına yaygın olarak başlanmıştır [172]. Farklı kaynaklardan elde edilebilen MKH'ların hücresel tedavi ve kırık doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmasına, özellikle 1988 yılında Hallmark tarafından transforming growth factor-beta (TGFβ) etkisinde MKH'ların kondrositlere farklılaştığının keşfedilmesiyle odaklanılmıştır [173].



Şekil 2.21 Kök Hücrelerde Plastisite [174].

2.6.3 Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler; bugünkü anlamda ilk kez 1999 yılında, Pittenger ve arkadaşları tarafından, “Kemik iliğinden köken alan ve uygun uyaranlarla osteoblast, adiposit ve kondrosit hücre serilerine farklılaşabilen fibroblastoid hücreler” olarak tanımlanmıştır [21], [140]. Aynı zamanda mezenkimal kök hücreler ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalarından köken alan hücre veya dokulara farklılaşabilen non-hematopoetik multipotent kök hücrelerdir [175]. Mezenkimal kök hücreler; başlıca kemik iliğinde bulunan ve kemik, kas, kıkırdak, tendon, yağ, kemik iliği stromal hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olan multipotent progenitör hücrelerdir [157]. Çeşitli hücrelere farklılaşabilen ve ilk olarak kemik iliğinden izole edilen MKH, sonraki çalışmalarda periosteum, perikondrium, adipoz doku, fetal karaciğer, fetal akciğer, fetal dalak, tendonlar, amnion sıvısı, amniyotik membran, diş pulpası, göbek kordon kanı, plasenta, wharton jeli olfaktör bulb ve periferik kan gibi birçok farklı dokulardan da elde edilebilir [176], [177]. Son zamanlarda endometriyum ve adet kanından da mezenkimal kök hücre izole edildiği bildirilmiştir [178]. Çeşitli yetişkin dokulardan izole edilen mezenkimal kök hücreler geniş çoğalma potansiyeli vardır ve kolayca birkaç pasaj içinde kendi multilinaj farklılaşma potansiyelini kaybetmeden çoğaltılabilir [10].

2.6.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin Genel ve Fenotipik Özellikleri

Uluslararası Hücre Tedavileri Topluluğu (ISCT) Mezenkimal Kök Hücreleri tanımlamak için 3 özellik bildirmiştir [179], [180].

✓Mezenkimal kök hücreler standart bir kültür ortamında plastik yüzeye tutunabilen hücrelerdir

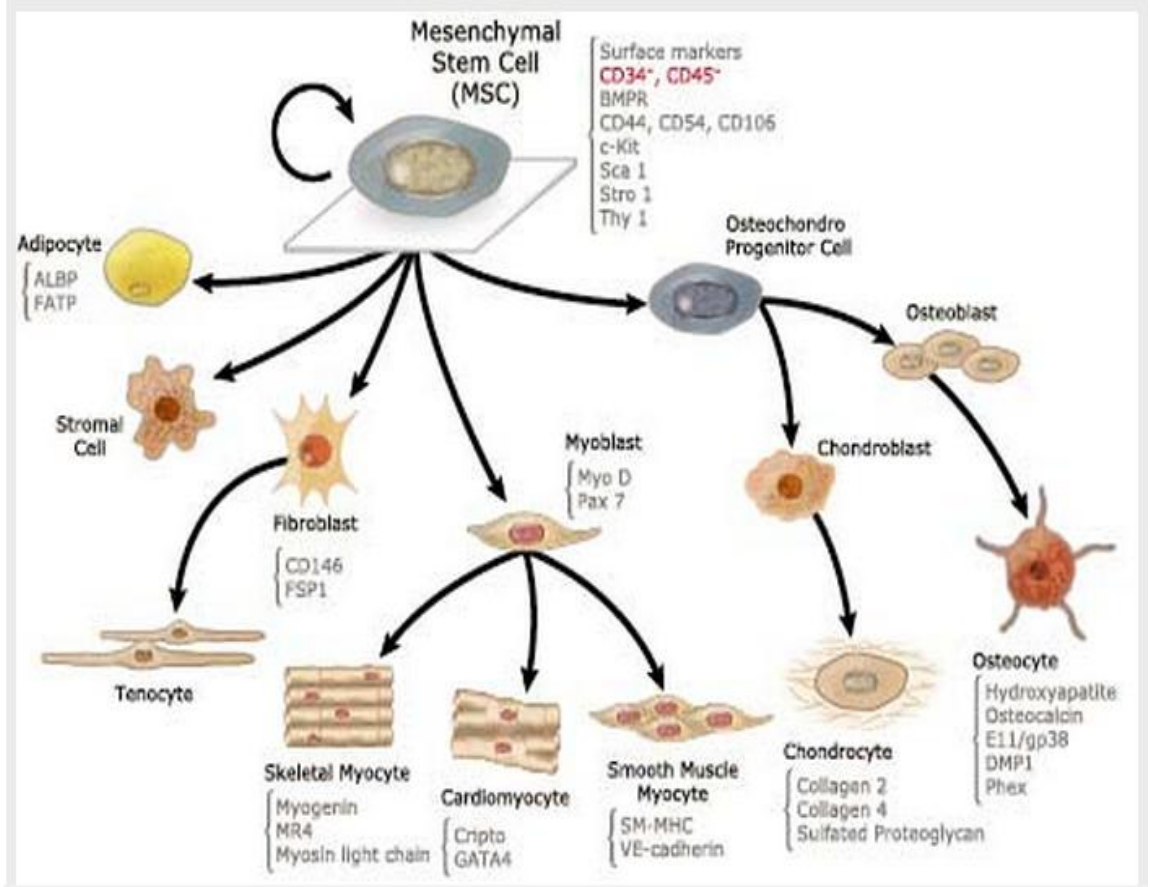
✓Mezenkimal kök hücreler yüzeylerinde; %95 civarında CD105 (SH2), CD73 (SH3/4) ve CD90 gibi non-hematopoetik hücre yüzey belirteçlerini eksprese etmelerine rağmen, % 2 civarında CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 veya CD19 ve HLA-DR gibi tipik hematopoetik belirteçleri gösterirler

✓Bu hücreler *in vitro* koşullarda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilirler

Mezenkimal kök hücreler fibroblast yüzey belirteci olan STRO-1 eksprese ederler. Farklı kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücreler de bazı farklılıklar olsa da genellikle benzer fenotipik özelliklere sahiptirler [21], [181], [182].

2.6.5 Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşması

Kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinde iki temel düzenleyici mekanizma görev alır. Bunlardan ilki intrinsek unsur olarak adlandırılan hücrenin genetik yapısı ve buna bağlı olarak sentezlediği proteinler sonucunda oluşturduğu fenotiptir. İkincisi ise ekstrinsek unsur olarak tanımlanmış çevresel düzenleyicilerdir. Bir kök hücrenin farklılaşması için belirleyici olan iki unsurun da bir arada olması gerekir [145]. Embriyonik gelişim süresince mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasını belirleyen en önemli faktörlerden biri bulunduğu mikro çevredir. Hücre bulunduğu bu mikroçevrede etkileşime girdiği sinyal moleküllerine göre farklılaşmaya başlar. Hücreler, mikroçevresindeki faktörlere bağlı olarak çoğalabilir, farklı hücre hatlarına dönüşebilir veya programlı hücre ölümüne gidebilirler. Kök hücrelerin mikroçevresini oluşturan sinyal molekülleri arasında; nöronal farklılaşma için retinoik asit [183], kardiyomyosit farklılaşması için 5-aza-2' deoksitidin [184], hepatosit farklılaşması için sodyum butirat [185] ve kondrosit hücrelere farklılaşması için çeşitli sitokinler [146] sayılabilir. Mezenkimal kök hücrelerin, özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için en çok ilgi çeken özelliği, uygun mikro çevre koşullarında başta bağ doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyelidir. Mezenkimal kök hücreler adipositler, osteoblastlar, kondrositler gibi mezoderm kaynaklı dokulara, nöronlar gibi ektodermal kaynaklı ve hepatositler gibi endodermal kaynaklı dokulara farklılaşabilirler.



Şekil 2.22 Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklı Hücelere Dönüşüm Yetenekleri [186].

2.6.6 Adipoz (Yağ) Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Vücudun hemen hemen her bölgesinde yağ dokusu bulunur. Diğer doku ve organlardan farklı olarak çok geniş bir lokalizasyona sahiptir. Olgunlaşmış yağ dokusu hücrelerine adiposit denir. Adipositler mikroskopik olarak incelendiklerinde içerdikleri lipid granülleri ile karakterize olurlar [187]. Son yıllarda hasar görmüş ya da kaybedilmiş kıkırdak dokusunun onarılması için yağ doku özellikleri doku mühendisliği ve rejeneratif tıp çalışmaları esas alınarak incelenmeye başlanmıştır. Yağ dokusu tıpkı kemik iliği gibi mezenkimden köken alır ve kemik iliği gibi zengin bir stroma içerir [188]. Bu doku kaynağından elde edilen kök hücrelerin adipojenik, kondrojenik, myojenik ve osteojenik farklılaşma yetenekleri gösterilmiştir [141]. İnsan vücudundan liposipirasyon işlemi ile elde edilen yağ dokusuna 'işlenmiş lipoaspirat' (İLA, processed lipoaspirate (PLA)) denir. Bu lipoaspiratlar üzerine kısa süreli kollajenaz muamelesi uygulandıktan sonra santrifüj ile mononükleer hücrelerine ayrıştırılabilmektedir.

Embriyonun aynı mezoderm tabakasından orjinlendikleri için kemik iliğinden elde edilen kök hücrelere benzer yüzey belirteçleri bulunmaktadır [188], [189], [190]. Hem kemik iliği hem de adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ikisi de Stro-1, SH-3 içerirler, her ikisi de hematopoetik marker olan CD31 ve CD45 içermezler ve *in vitro* kültürlerde CD34 miktarı gittikçe azalır. CD105/endoglin-TGF β reseptör tip III MKH'ların TGF β bağımlı kondrojenik diferansiyasyonunu gösterir [21], [191], [192]. İnsan da adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin tüm yüzey belirteçleri aşağıdaki tabloda kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile karşılaştırılarak verilmiştir.

Surface marker	ASC (8, 9, 11, 13-15, 73-75)	BSC (10, 14, 15, 74, 75)	
	Human	Human	
Positive marker	CD13	+	+
	CD29	+	+
	CD44	+	+/-
	CD49e	+	+
	CD54	+	+
	CD55	+	+
	CD63	+	+
	CD73	+	+
	CD90	+	+/-
	CD105	+	+
	CD106	-	+/-
	CD144	+	+
	CD146	+	+
	CD166	+	+
	HLA ABC	+	+
MHC1	-	-	
Negative Markers	CD11b	-	-
	CD14	-	-
	CD19	-	-
	CD31	+/-	-
	CD34	+/-	+/-
	CD45	-	-
	CD79 α	-	-
	HLA-DR	-	-
	Stro-1	+/-	+/-
	CD3	-	-
	CD117	-	-
	CD62L	-	-
	CD95L	-	-

Şekil 2.23 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler İle Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Yüzey Belirteçlerinin Karşılaştırılması [180].

2.6.7 Wharton Jeli (Kordon Matris) Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Wharton jeli; plasenta ve fetüs ile bağlantılı olan kordonu korumaya yardım eden fiziksel özelliklere sahiptir. İlk defa 1991 yılında ilkel wharton jeli hücrelerin kültürü Thomas Wharton tarafından tarif edilen insan göbek kordonu bağ dokusu olarak ortaya çıkmıştır [193]. Wharton jeli, amniyotik epitel ve kordon damarları arasını saran bölgede bulunan özel bir embriyonik mukuslu bağ dokusundan oluşur ve göbek kordonu içinde miyofibroblast benzeri stromal hücreler içeren jelatinli bir dokudur.

Benzersiz bir hücre popülasyonu gösteren Wharton jeli mezenkimal stromal kök hücreleri fenotipini gösteren hücreler olarak önerilmiştir [194]. Wharton jeli mezenkimal kök hücreler; intravasküler ve alt amniyondan olmak üzere iki bölgeden izole edilebilir [195] ya da perivasküler bölge, intervasküler bölge ve alt amniyon olmak üzere 3 bölgeden izole edilebilir [196]. İnsan göbek kordonu perivasküler hücreler bir kök hücre popülasyonu olarak kordon damarları çevresinde izole edilmişlerdir [197]. Wharton jeli mezenkimal kök hücrelerin amniyon yüzeyinde çoğalıp geliştiği söylenebilir de, kordon bağında kordon damarlarına yakın daha çok çoğalıp geliştiği ortaya konmuştur [198]. Wharton jeli mezenkimal kök hücreleri; kemik iliği mezenkimal kök hücrelerine benzer yüzey belirteçlerine sahiptir [199], [200].

Markers	BMSC	WJSC
CD9	+	+
CD10	+	+
CD11b	-	-
CD13	+	+
CD14	-	-
CD18	+	-
CD19	-	-
CD29	+	+
CD31	-	-
CD34	-	-
CD44	+	+
CD45	-	-
CD49b	+	-
CD49d	-	-
CD49e	+	-
CD51	+	+
CD54	+	-
CD58	-	-
CD73	+	+
CD90	+	+
CD105	+	+
CD117	-	-
CD133	+	-
CD144	+/-	-
CD166	+	+
CD349	+	-
HLA-ABC	+	+/-
HLA-DR	-	-
STRO-1	+	-

Şekil 2.24 Kordon Matrisi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler İle Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Yüzey Belirteçlerinin Karşılaştırılması [19].

Wharton jeli mezenkimal hücrelerin özellikleri, SMA ve vimentin gibi spesifik soyu niteleyen sitoskeletal belirteçler ve ekspresyonu ile teyit edilmiştir. Ayrıca embriyonik kök hücre belirteçleri olan Oct-4 ve SSEA4 ihtiva etmedikleri, diğer hücrelerde bulunan CD59 ve CD146 yüzey belirteçleri de eksprese etmedikleri ortaya konmuştur. Ayrıca Wharton jeli mezenkimal hücrelerin IL-6 ve VEGF eksprese ettikleri, son zamanlarda da immüno baskılayıcı yeteneklerinin önemli olduğu gösterilmiş olup yüksek orandaki immüno düzenleyici etkisi de gözlenmiştir [19].

2.6.8 Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılabilecek potansiyeline sahip bir diğer kök hücre grubu olfaktör bulb kaynaklı kök hücrelerdir [200]. Bunlar; çok küçük miktarlarda nazal biyopsi örneklerinden kolaylıkla elde edilebilir ve sinir, kemik, yağ gibi hücre tiplerine farklılaşabilmektedir [201]. Fakat Delorme ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada iki boyutlu kültür ortamında kondrojenik farklılaşmasının gerçekleşmediği rapor edilmiş olsa da [202] olfaktör bulb kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin osteositlere farklılaşmasının kondrositlere ve adipositlere farklılaşmasından daha yüksek olduğu da yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur [147]. Erişkin olfaktör epitelin de nöral ve nöral olmayan kök hücre hattı topluluğu bulunmaktadır. Burada bulunan yatay bazal hücreler yavaş çoğalırlar ve kendilerini yenileyerek ve *in vivo* - *in vitro* olarak tüm olfaktör epitelyum hücre tiplerini oluştururlar. Bu hücreler multipotenttirler ve epitelyal ve nöral hatların yanında embriyonik mezodermal ve endodermal hatları da oluşturabilirler [203]. Erişkin insan olfaktör lamina propiyasından kültürü yapılan hücreler CD 19/32 ve insan mezenkimal kök hücre yüzey belirteçlerini eksprese etmektedir [204]. Ayrıca Sox2, Pax6, ASCL-1/MASH, TrkA, p75, NT4, sito-keratin, EGFR, ICAM-1 (CD54), tubulinIII, β 1-integrin, β 4-integrin, α 1-(CD49a), α 3-(CD49c) ve α 6-integrinler (CD49f), farklılaşma durumuna bağlı olarak eksprese edilen genlerdir [206].

CD	Symbol	Olfactory stem cells	Bone marrow stem cells
		rMFI (mean ± SEM)	rMFI (mean ± SEM)
CD9	TSPAN29	11.5 ± 7.4*	6.2 ± 0.5
CD13	ANPEP	312.0 ± 158.4	425 ± 50.4
CD15	CD15	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
CD18	ITGB2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2
CD26	DPP4	5.2 ± 3.1	3.4 ± 0.4
CD29	ITGB1	109.3 ± 47.1	115.7 ± 17.3
CD31	PECAM	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.2
CD34	CD34	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
CD38	CD38	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.2
CD44	PGP1	175.2 ± 17.35	138.7 ± 16.37
CD45	PTPRC	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1
CD47	IAP	21.3 ± 7.8	32.3 ± 4.2
CD49a	ITGA1	4.2 ± 1.0	3.4 ± 0.4
CD49e	ITGA5	72.0 ± 9.8	60.9 ± 7.4
CD51	ITGAV	42.6 ± 3.192	59.46 ± 1.179
CD54	ICAM1	12.7 ± 8.7	7.2 ± 0.4
CD56	NCAM	1.4 ± 0.4	1.2 ± 0.2
CD61	ITGB3	2.4 ± 0.4	3.9 ± 0.3
CD63	TSPAN30	32.9 ± 16.3	25.5 ± 6.5
CD73	NTSE	172.7 ± 36.4	169.5 ± 23.2
CD81	TSPAN28	183.3 ± 14.4	156.3 ± 11.4
CD90	THY1	334.8 ± 82.1	542.3 ± 71.2
CD105	ENG	54.9 ± 21.5	133.8 ± 10.1
CD106	VCAM1	3.5 ± 2	6.5 ± 2.9
CD109	CD109	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2
CD117	KIT	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.3
CD126	IL6R	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.4
CD133	PROM1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2
CD146	MCAM	2.3 ± 0.6*	19.1 ± 3.4
CD151	TSPAN24	70.3 ± 26.7	138 ± 17.6
CD166	ALCAM	14.0 ± 2.7	19.6 ± 1.7
CD200	CD200	1.4 ± 0.3*	4.9 ± 0.7
VEGFR1	FLT1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1
VEGFR2	KDR	1.1 ± 0.0	1.1 ± 0.1

Şekil 2.25 Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler İle Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Yüzey Belirteçlerinin Karşılaştırılması [202].

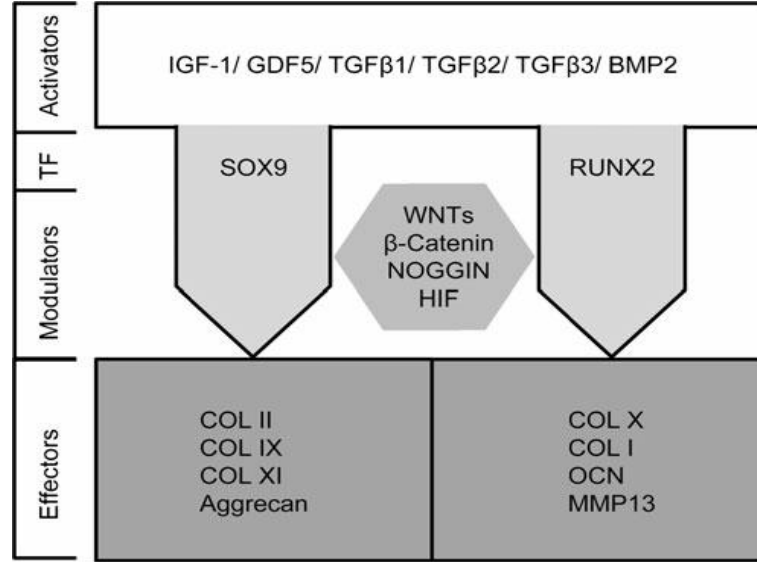
2.6.8.1 Kıkırdak Doku Mühendisliğinde Mezenkimal Kök Hücre Çalışmalarının Avantajları ve Dezavantajları

Kıkırdak hasarlarında mezenkimal kök hücreler ile çalışmanın kondrositlere göre bazı avantajları olarak; Mezenkimal kök hücreler, sağlıklı eklem kıkırdağında morbiditeye neden olmadan çeşitli dokulardan izole edilebilir. Ayrıca kolayca ve erken pasajlar sayesinde hücrelerin kondrojenik potansiyeli kaybedilmeden çoğaltılabilir [10]. Örneğin 2ml kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücreler 3 hafta içerisinde 500 kat çoğaltılabilir. Bu hücreler 6-10 pasaj ve daha sonrasında da pluripotensi özelliklerini koruyabilirler [207]. Donörden kolayca izole edilebilmeleri, ilgili genler ile tedavi yapılmasına uygun olabilmeleri, göç edebilmeleri, çeşitli mekanizmalarla doku hasarlarını onarabilmeleri gibi özellikleri insan mezenkimal kök hücrelerinin hücresele tedaviler için kullanılmasına olanak sağlamaktadır [208]. Canlılarda hasarlı dokular tarafından salınan sitokin, kemokin ve diğer büyüme faktörlerinin uyarısı ile

mezenkimal kök hücrelerin hasarlı doku bölgesine göç ettikleri, çoğaldıkları ve ihtiyaç duyulan hücreye farklılaşabileceği bildirilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanımında sahip olduğu en büyük avantajlarından bir tanesi immünojenitelerinin düşük olması ve hücre sel tedavi açısından immünsüpresif olmalarıdır [209]. Ancak tüm avantajlarının yanında kök hücre çalışmalarının da hücrelerin hipertrofiye neden olan genleri ifade ettiğini ortaya koymuştur. Bu durumu iyileştirmek içinde kök hücrelerin scaffoldlar üzerine ekilip 3 boyutlu kültürleri yapılmaya başlanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir [140]. Diğer dezavantajı ise mezenkimal kök hücrelerin malign oluşumuna meğilli olmalarıdır. Kemik iliği kaynaklı kök hücrelerle yapılan 44 haftalık bir çalışmada tüm süre zarfı boyunca kök hücrelerin karyotiplerini koruduğu ve belirli bir pasaj sayısından sonra telomerazlarında kısalma meydana geldiği yani yaşlanmaya başladıkları rapor edilmiştir [210]. Mezenkimal kök hücrelerin elde edildiği dokuların dönerlerinin yaşı hücrelerin miktarını, kalitesini, farklılaşma potansiyelini ve proliferasyonunu etkilemektedir. 80 yaşındaki kişilerden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin yeni doğmuş bir bebekten elde edilen mezenkimal kök hücrelere göre 3 kat az olduğu yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir [211], [212], [213].

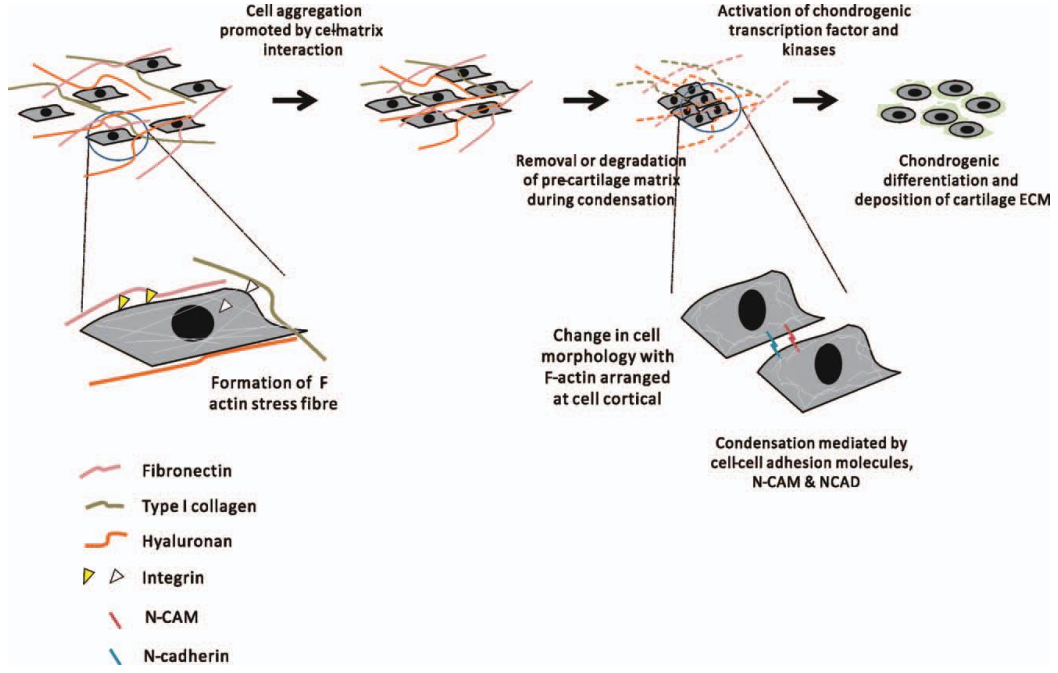
2.6.9 Kök Hücrenin Kondrojenik Farklılaşması

Kök hücreler uygun hücre kültürü koşullarında ve uygun sinyal molekülleri ile kültüre edildiğinde (BMP2 ve TGF β gibi aile üyeleri ile GDF5, TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3 ve IGF-1 ile kombinasyon halinde) kondrojenik farklılaşma başlamış olur. Yapılan çalışmalarda transkripsiyon faktörü Sox9'un kollajen tip 2, 9, 11 ve agregan üretimi ile fonksiyonel kondrosit farklılaşmasına yol açtığı kanıtlanmıştır. Diğer bir transkripsiyon faktörü Runx2 kolajen tip 10, 1, osteokalsin ve MMP13 üretimi ile kondrosit hipertrofisine yol açtığı da yapılan çalışmalar ile ortaya koyulmuştur [214], [215], [216], [217], [218], [219], [220]. WNT sinyal yolları, β -katenin, NOGGIN ve HIF kondrojenik farklılaşmayı literatürde olumlu ve olumsuz düzenlediğini gösteren çalışmalar da rapor edilmiştir [221], [222].



Şekil 2.26 Kök Hücrenin Kondrojenik Farklılaşmasında Etkili Sinyal Molekülleri [37].

Aynı zamanda farklılaşma süreci boyunca kök hücreler hücre matrisi etkileşimi aracılığıyla kümeleşir. Artan hücre sayısına bağlı olarak hücre iskeleti üzerinde oluşan stres ile aktin fibrilleri salgılanır. Artık hücre morfolojilerinde farklılaşma başlar ve bu durumdan nöral kaderin (NCAD) ve nöral adhezyon molekülü (NCAM) sorumludur [223]. Kıkırdak dokunun hücre dışı matrisinin oluşmasını sağlayan lokal adhezyon kinaz ve paksilin moleküllerinin rol aldığı sinyal yolları ile transkripsiyon faktörleri ve kinazlar aktive olur. Artık kondrojenez için öncül kondrosit hücreleri oluşmaya başlamış olur [20].



Şekil 2.27 Kök hücrelerin Kondrojenik Farklılaşması [20].

Scaffoldlar üzerinde kök hücreler pellet haline getirilip üç boyutlu kültürler oluşturulduğunda kondrojenik farklılaşmanın yüksek oranda artığı görülmektedir [21]. Bu kültür koşulları kullanılarak *in vivo* şartlarda kıkırdak geliştirilmeye çalışılır. Mezenkimal kök hücreler scaffoldu ekstraselüler matris gibi kullanarak kondregenezi gerçekleştirir ve sonucunda kollajen I ve kollajen II'ye benzer ürünler oluştururlar. Klinik koşullar göz önünde bulundurulduğunda pellet kültürlerin hastaya nakli zordur bu nedenden dolayı da scaffold tabanlı üç boyutlu kültürlerle çalışmak daha avantajlıdır. Ayrıca kök hücrelerin büyümesinde, farklılaşmasında, geliştirilen yapay kıkırdığın biyomekanik istikrarın korunmasında etkili olan çok farklı scaffoldların mevcut olması da normal iki boyutlu kültürlerden üç boyutlu kültürleri ayıran bir avantajdır. Genelde scaffoldlar kök hücrelere kondrojenik farklılaşma boyunca canlıklarını koruyabilecekleri ve ekstraselüler matrisi gibi kullanılabilecek bir zemin sağlamaktadırlar. Kök hücreler uygun büyüme faktörlerinden oluşan kondrojenik farklılaşma besiyeri ile kültüre edildiğinde kondrojenik farklılaşma başlar. Bu aşamada scaffoldların kullanımı ekstraselüler matris elemanlarının üretilmesinde ve kondrosit hücrelerinin gelişimine katkıda bulunur. Ayrıca hipertrofinin önlenmesine destek olur. Hipertrofi kalsifikasyona neden olacağı için ortamda kondrosit hücreleri azalacaktır. Bu durumu önleyebilmek için anti kondrojenik işlemlerden geçirilen kültürde kondrosit

fenetopini koruyabilmek için otofaj uyarılır [37]. Mezenkimal kök hücreler, elde edildiği kaynak çeşitliliğinin yanı sıra, her MKH'nın kondrosit hücrelerine farklılaşma potansiyeli farklıdır. Yapılan çalışmalar da kas kaynaklı ve sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin adipoz ve periost kaynaklı mezenkimal kök hücrelere kıyasla daha iyi kondrojenik farklılaşma gösterdiği görülmüştür [189], [224], [225]. Ancak kemik iliği ile adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşma potansiyelleri arasında çok büyük bir fark bulunmamıştır [141]. Normal koşullarda kondrojenik farklılaştırma sonrasında elde edilen hücreler ile üç boyutlu kültürleri sonucunda elde edilen hücreler arasında farklılıklar olduğu rapor edilmiştir. Örneğin Xie ve ark. trombosit açısından zengin plazması (PRP) olan biaktif bir scaffold üzerinde adipoz ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreleri üç boyutlu kültüre ederek yapmış oldukları bir çalışmada; endojen büyüme faktörleri serbest halde bulunan PRP scaffold üzerinde kemik iliğinin adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden daha yüksek kondrojenik farklılaşma yeteneği olduğunu rapor etmişlerdir [226]. Ayrıca son yapılan çalışmalarda kordon matrisinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerinde kırıldak doku mühendisliği çalışmalarında kullanıldığı görülmektedir. Kordon matrisi kaynaklı mezenkimal hücrelerin elde edilmesindeki kolaylık ve mezenkimal kök hücre saflığının çok yüksek olması nedeniyle kırıldak doku mühendisliğinde kullanım potansiyeli oldukça yüksek bir kök hücre grubu olduğu öngörülmüştür [227], [228]. Kordon matrisi kaynaklı mezenkimal hücreler ile kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin karşılaştırılması ile yapılan bir çalışmada; Kordon matrisi kaynaklı mezenkimal hücrelerin kondregenezinin kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden daha yüksek potansiyelde olduğu görülmüştür [229], [230].

2.6.10 Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünmodülasyonu

Mezenkimal kök hücreler güçlü bir bağışıklık düzenleyici etkiye sahiptir. T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin proliferasyonunu inhibe ederler [231], [232], [233]. Mezenkimal kök hücre aracılı immün baskılama spesifik olmayan bir çoğalmaya karşı cyclin D2 tarafından gerçekleştirilir. Prostaglandin E2, nitrik oksit, doku uyumu lokus antijen-G, insüline benzer büyüme faktörü bağlayıcı proteini, tolerojenik antijen sunan hücreler ve indolamin 2,3-dioksijenazın bu mekanizmada rol oynadığı

bildirilmiştir [234]. Bunun tam olarak fizyolojisi bilinmemekle birlikte altında yatan nedenin stromal hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca immünomodülatör etki kök hücrelerin hayatta kalmasını ve popülasyonunu artıran bir durum olarak da yorumlanabilir. Bu mekanizmayı açıklayabilmenin gelecekte transplante edilen yapay dokularda karşılaşılan problemlere ışık tutacağı düşünülmektedir [176].

2.7 Scaffoldlar (Doku İskelesi)

İnsan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacı ile kullanılan ve sürekli olarak vücut akışkanları ya da canlı dokuyla temas eden doğal ya da sentetik malzemelere biyomalzeme denir. Biyomalzeme kullanımında kişinin sağlığı iyileştirilirken canlı doku ve organların işleyişi korunmalıdır. Bu yüzden, biyomalzeme geliştirilirken, biyolojik sistem, biyomalzeme ve bunların vücut ortamında etkileşimi üzerinde durulmalıdır. Ayrıca; Bir biyomalzemenin başarısı malzemenin özellikleri ve biyouyumluluğu, hastanın sağlık durumu (yaşı, metabolik, immünolojik durumu), cerrahın yeterliliğine bağlıdır [235]. Günümüzde; Biyomalzemeler ile ilgili etik ve diğer sorunlar için cevaplandırılması gereken; Hayvanların kullanımı haklı gösterilebilir mi? Özellikle deney iyi dizayn edilmiş mi? ve elde edilen veriler bir canlının yaşamını kurban etmeye ya da acı çekmesini haklı gösterebilecek kadar önemli mi? İnsanları kullanan araştırmalarda risk nasıl minimize edilmeli ve makul bir risk/fayda oranı nasıl önerilmeli? Hastanın ihtiyaçları ile şirketin finansal amaçları nasıl bir denge oluşturacak? Devletin, biyomalzeme biliminin bu cevaplandırılmayan sorulara cevap verebilecek ve uygun/gerekli testleri gerçekleştirebilecek bilgiye sahip düzenleme kurumları var mı? Sorular mevcuttur [235]. Biyomalzemenin alt ürünü olan scaffoldlarda; hücreler arası matris bileşenleri gibi davranarak hücrelerin mikroçevresini taklit edebilen doku iskelelerdir [22]. Scaffoldlar sayesinde yapay doku oluşturulmak istenen bölgeye özel büyüme faktörleri ve hücreler kullanılarak üç boyutlu hücre kültürleri hazırlanabilir [23]. Biyomateryal bir malzeme olan scaffold (doku iskelesi), üç boyutlu yapısal çerçeve ile dokunun rekonstitüsüyonu etkinleştirmek için kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır [236]. Scaffold temelli prosedürler kıkırdak hasarlarının tedavisinde kullanılacak tercihler olarak ortaya

çıkıştırma ama iyi tasarlanmış çalışmalar azınlıktadır [237]. Scaffoldların kullanım temeli üç boyutlu geçici bir yapıya sahip biyobozunur polimerlerden oluşması ve bunun içinde *in vitro* ortamda hücrelerin yaşaması ve hasarlı bölgeye implante edilmesidir [238]. Kondrosit implantasyonunda hücrelerin başka yerlere sızması riskini azalttığı, daha homojen dağılım sağladığı ve kondrosit fenotipinin farklılaşmasının sürdürülmesini desteklediği için kırıkta hasarlarında üç boyutlu hücre kültürleri temeli oluşturulan scaffoldların kullanıldığı görülmüştür. Bu aynı zamanda kırıkta tedavisinde cerrahi avantajda sağlamaktadır [239]. Bu tekniklerin ve randomize çalışmaların, tedavi yaklaşımındaki potansiyelini doğrulamak için sistematik ve uzun zamanlı çalışmalar gerekmektedir [240]. Özellikle de hali hazırda var olan çalışmalarla karşılaştırılmak scaffold temelli tedavinin prosedürlerini kolaylaştırmak ve fiyatı düşürmek için tek basamaklı stratejiler ortaya çıkmasını kolaylaştıracaktır [124]. Bu prosedürlerin amacı hiyalin benzeri bir dokuyu yeniden oluşturarak eklem yüzeyini fizyolojik özelliklerine olabildiğince benzer şekilde yenilemektir. Scaffold yapısı, biyoyumlu ve mekanik olarak dayanıklı olmalıdır. Başarılı bir infiltrasyon için uygun hücre kaynağı, uygun biyolojik aktif molekül ile hücreler farklılaşmaya ve olgunlaşmaya teşvik eden hücreye geçici destek veren scaffoldlar ayrıca biyobozunur olmalıdır [241]. Biyobozunurluk; *in vivo* uygulamada katı polimerik malzemelerin vücuttan kalkması için gerçekleşen makromoleküler bozunmadır. Scaffoldlarda tercihen toksik olmayan bir yan ürünün kontrollü bir şekilde kullanılması gerekir bunun içinde bu yan ürünün biyolojik olarak bozunabilir olması gerekir. Besin ve atık difüzyonunu sağlamak için gözenekli scaffoldlar hücre canlılığı için destek, proliferasyon, diferansiyasyon ve hücre dışı matrisi üretimi, tamir etme ve hasar yerine doku gibi entegre olabilmek için dokuya mekanik destek vermek amacıyla kırıkta doku mühendisliğinin de kullanılır [242]. Scaffoldların gözenekli yapıda olması sayesinde hücreler oksijen, besin, atık ürünler, sinyal molekülleri, hücre göçü ve difüzyon gibi özelliklerini yerine getirir [243]. Proliferasyonunu teşvik etmek için scaffoldların gözenek boyutunun 100 ve 500 mikron arasında olması en uygundur [244]. Scaffoldun gözeneklilik ve mimari özelliği topografik organizasyonu indüklemek için kullanılabilir. Homojen olmayan bir hücre dağılımını destekleyen GAG, tip II kollajen ile %100 birbirine bağlı olan scaffold üretilmiştir [245]. Scaffoldların rijitlik özelliği ise hücrelerin mekanik ortamını

etkileyerek sırayla hücre farklılaşması ve üç boyutlu hücre kültüründe büyümeyi etkileyebilir [246]. Tüm scaffoldların ortak özelliklerine bakacak olursak herhangi bir immünolojik reaksiyon oluşturmamak için biyouyumlu olmalı, hücrelere ve çevresindeki dokulara zarar vermemek için toksik olmamalı, hücrelerin dağılımına izin verecek şekilde, proliferasyon ve ekstrasellüler matris üretimine katkıda bulunacak permeabiliteye sahip olmalıdır. İmplant edilen hücrelerin gelişmesi için hücreleri tutup onlara destek olmalı, yeniden üretilip, kolaylıkla tekrar kullanılmalıdır. Tam veya parçalı katmanlardan oluşmalı ve en önemlisi biyobozunur olmalıdırlar [247]. Scaffoldların yapısı, biyouyumlu ve mekanik olarak dayanıklı olmalıdır. Başarılı bir infiltrasyon için uygun hücre kaynağı, uygun biyolojik aktif molekül ile hücreler farklılaşmaya ve olgunlaşmaya teşvik eden hücreye geçici destek verebilen ayrıca biyobozunur biyomalzemelerden oluşturulmalıdır [241]. Sonuç scaffold'da bulunması gereken genel özellikleri sıralayacak olursak; biyouyumlu olmalı, biyobozunur olmalı, toksik olmamalı, permeabiliteye sahip olmalı, yeniden üretilip, kolaylıkla tekrar tekrar kullanılmalıdır [248]. Hücreler ile çalışmak için seçilen uygun bir scaffold aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olmalıdır.

- ✓ Hücrelerin tutunmasını ve göç etmesini sağlamalı,
- ✓ Retensiyon ve biyokimyasal maddeleri tanımalı,
- ✓ Besinlerin, eksprese ürünlerin ve atığın uygun difüzyonu için gözenekli ortama sahip olmalı,
- ✓ Mekanik sertliğe ve esnekliğe sahip olmalıdır.

Scaffoldlar genel olarak doğal ve sentetik polimerlerden yapılmalarına göre ikiye ayrılırlar. Fakat son birkaç yıldır bunlara ek olarak kıkırdak doku mühendisliğinde, kompozit scaffoldlarında [249], [250], [251] kullanımının yaygınlaşmasıyla scaffoldları üç grupta toplayabiliriz. Sentetik polimer tabanlı scaffoldlarda FDA onaylı polimerlerin kullanımına özen gösterilmektedir. Bir ürünün FDA onayı alabilmesi için insanda ya da hayvanda bir hastalığı teşhis, tedavi, yatıştırma, önleme amaçlı, vücudundaki herhangi bir fonksiyonu ya da yapıyı değiştirme amaçlı, bir alet, düzenek, makina, donanım, icat, vücuda konulan madde veya benzeri ürün olabilmesi gerekmektedir. Sentetik scaffoldlara; polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), poli (ϵ -kaprolakton) (PCL), poli (laktik-koglikolik asid) (PLGA), poli (etilen glikol) (PEG) ve bunların türevleri

gösterilebilir. Sentetik scaffoldlar ile ilgili birçok çalışma başarı ile tamamlanmıştır. Biyobozunur oldukları için immünojenik olmamalarının en önemli avantajı olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir. Fakat bu malzemeler potansiyel inflamasyon, dev hücre reaksiyonu ve kondrosit ölümleri ile sonuçlanan hidroliz reaksiyonundan sorumlu oldukları için en önemli sorunun biyoyuymululuk olduğu düşünülmektedir [252]. Doğal malzeme scaffoldları da karbohidrat ve protein türevli olmak üzere ikiye ayrılırlar. Protein yapılı olanlar; kollajen, fibrin, jelatin ve ipek türevlilerdir. Karbohidrat yapılı olanlar ise hyaluronan, agaroz, alginat, kitosan türevlidir [247], [253]. Sonuçta Biyolojik olarak üretilmiş doğal scaffoldlar yapı olgunlaşması ile doğal hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesine olanak sağladığı düşünülmektedir [247], [253]. Fakat doku mühendisliğinde doğal scaffoldlar ile yapılan çalışmalara rağmen, immün yanıt oluşturabilme yeteneklerine sahip olmaları, sentetik polimerlerden daha karmaşık yapıya sahip olduklarından teknolojik manipülasyonlarının zorluğu, biyolojik ortamdaki enzimlerle degrade olmaları kalıcı uygulamalar için dezavantaj oluşturmaktadır. Özellikle proteinler yüksek sıcaklıkta bozunurlar ve bu nedenle yüksek sıcaklıktaki işleme teknikleri ile şekillendirilemezler. Doğal polimerlerle çalışmayı zorlaştıran başka bir etmen ise elde edildikleri kaynağa bağlı olarak bileşimlerinin değişmesidir. Birçok scaffold kıkırdak tedavisi prosesinin gereksinimlerini gidermek amacıyla geliştirilmiştir. Burada kullanılan biyomalzemenin seçimiyle ilgili önemli değişiklikler mevcuttur. Bunlar doğal, sentetik, kompozit formlarda ve farklı fiziksel şekillerde olabilir. Kıkırdak tedavisinde; agaroz, kalsiyum alginat, kitosan, hiyaluran jel, fibrin yapıştırıcı, PGA, PLGA-polyvinyl, PLGA-kollajen kafes, kollajen jeller ya da süngerler, peptid glisin-fenilalanin, hidroksipropilen-glisin, glutamat-arjinin, ipek, PCL türevli scaffoldlar kullanılmaktadır [251], [254], [255], [256], [257], [258], [259], [260], [261], [262], [263], [264], [265], [266], [267], [268].

Normal doku özellikleri ile bir hiyalin benzeri kıkırdağı yenilemek amaçlandığında hem ameliyathanedeki cerrahlar hem de laboratuvardaki temel bilimciler eklem yüzeyinin yenilenmesi sorunuyla karşı karşıya gelirler. Dolayısıyla bu konuda *in vitro* testlere, klinik öncesi hayvan araştırmalarına ve klinik uygulamalara odaklanılmıştır. Bu da kıkırdak doku mühendisliği araştırmaları kıkırdak lezyonları için yeni teknoloji ve yeni cerrahi tedavi seçeneklerinin gelişmesine yol açmıştır. Üç boyutlu yapıların hücre

büyümesinde kullanılması klinik sonuçların kıyaslanabilirliğinin sunulduğu ama birçok biyolojik sonuç ve cerrahi endişelerin ilk nesil yöntemlerden yüksek olduğunu göstermiştir [247], [253].

2.7.1 Scaffold Kullanımında İki Basamaklı Prosedürler

Klinikte ilk kullanıma giren matrisler kollajen ve hyaluronik asit temelli olmuştur. Bu bileşikler olgun hiyalin kıkırdak bileşenleridir ve kıkırdağa kolayca entegre olabilirler. On yılı aşkın süredir transplantasyon tekniklerinde yaygın olarak otolog kondrositler kullanılmıştır. İlk otolog kondrosit transplantasyonu domuzlarda kollajen tip I / III membran kullanılarak (Chondro-Gide; Geistlich Biomaterials, Wolhusen, İsviçre) 1998 yılında yapılmıştır. Domuzdan elde edilen otolog kondrosit hücrelerin kültürü, domuza implante edilmeden dört gün önce bu kollajen matrisi üzerinde kültüre edildikten sonra domuza transplantasyonu yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda oluşan düzgün kıkırdak doku yapısının %75 kıkırdak defektleri tedavisinde kullanılacağı öngörülmüştür [128]. Kollojenin yanı sıra hyaluronik asidin kullanıldığı Hyolograft C, fibrin, polilaktik, poliglikosit asit ve polidioksanonun kullanıldığı Bioseed C, tip 1 kollojenin kullanıldığı NeoCart ve CaReS, agaroz ve aljinatın kullanıldığı Cartipatch ile yıllar içerisinde birçok çalışma yapılmıştır [269]. Bu çalışmalar aşağıdaki tabloda özetlendiği gibidir;

Çizelge 2.5 İki Basamaklı Kullanılan Scaffoldlar

Ürün	Özellikleri-Tedavi Olan Lezyon Büyüklükleri
MACI	<ul style="list-style-type: none">✓ Hastaların %81'inde sağlıklı kıkırdak oluşumu, 5 yılda, 1.5-17.7 cm² lezyon✓ MRI sonuçlarında hiyalin kıkırdak benzeri yapı görüntülendi, 2 yılda, 5cm² lezyon✓ Osteokondral otogreftten daha iyi sonuç, 42 ayda, 2.3-6.3 cm² lezyon✓ Patellar hasarlarda hastaların %93'üne yakın iyileşme, 3 yılda, 4cm² lezyon✓ Mikrokirik yöntemine göre daha iyi sonuç, 2 yılda 4cm² lezyon✓ Patellar hasarlarda ACI yöntemine göre %53 daha iyi sonuç, 40 ayda, 4.7 cm² lezyon

Çizelge 2.5 İki Basamaklı Kullanılan Scaffoldlar (devamı)

Hyalograft C	<ul style="list-style-type: none"> ✓%95.7 oranında iyileşme, 38 ayda, 3.5 cm² lezyon ✓Devamlı iyileşme, 3 yılda, 1.5-8 cm² lezyon ✓%90.7 normale yakın kıkırdak, 2 yılda, 4.7 cm² lezyon ✓Hyalograft C ve ACI karşılaştırıldı Hyalograft C de daha iyi sonuç, 5 yılda, 6.4-5.9 cm² lezyon ✓Hyalograft C ve mikrokirik yöntemi karşılaştırıldı Hyalograft C daha iyi sonuç, 5 yılda, 2.2-2.5 cm² lezyon ✓Hyalograft C ve MACI karşılaştırıldı Hyalograft C de %20 başarısız sonuç, 5.1-4.8 yılda, 2.6-3.1 cm² lezyon
Hyalograft C/CaReS	<ul style="list-style-type: none"> ✓Klinik farklılık yok, 2 yılda, 4.8cm² lezyon ✓CaReS ve Hyalograft C karşılaştırıldı her 2 grupta daha iyi sonuçlar fakat CaReS'de daha iyi kıkırdak oluşumu gözlemlendi, 2 yılda, 4.6 cm²-4.9 cm² lezyon
CaReS	<ul style="list-style-type: none"> ✓Hastalarda %80'ne yakın olumlu gelişme, 12-60 ay, 5.4 cm² lezyon
Bioseed C	<ul style="list-style-type: none"> ✓Osteoartritli hastalarda düzelme, 2 yılda, 4.6 cm² lezyon ✓Kıkırdak hasarlarında belirgin iyileşme, 4 yılda, 4 cm² lezyon ✓Bioseed C ve ACI karşılaştırıldı ve her iki grupta da kronik lezyonlarda olumlu sonuçlar elde edildi, 2 yılda, 2-17.5 / 2-15 cm² lezyon
Novocart	<ul style="list-style-type: none"> ✓MACI ve ACI karşılaştırıldı her iki grupta daha iyi sonuçlar, 37.5 ay, 6.5cm² lezyon
Atelocollagen	<ul style="list-style-type: none"> ✓Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılabilir, 2 yılda, 5+3 cm² lezyon
Chondron	<ul style="list-style-type: none"> ✓%92 normale yakın artroskopik görünüm, 2 yılda, 3.2 cm² lezyon ✓Artroskopik görünümde ve MRI da önemli klinik gelişme, 2yılda, 5.8 cm² lezyon ✓2 yıldan biraz fazla dönemde artroskopik görünümde anlamlı gelişme, 5.2 cm² lezyon
Cartipatch	<ul style="list-style-type: none"> ✓MRI sonuçlarına göre %81 kıkırdak görünümünde anlamlı düzelme, 2 yılda, 3cm² lezyon

2.7.2 Scaffold Kullanımında Tek Basamaklı Prosedürler

Hem scaffoldları hem de hücreleri tek bir cerrahi aşamada çalışabilmek için son zamanlarda farklı çözümler önerilmektedir. Sağlıklı kıkırdak doku, mekanik olarak parçalarına ayrılmış ve yaralanmış eklemin bozulmamış bölgesinden elde edilebilir, sonrasında üç boyutlu polimerik tekrar absorblanabilir scaffoldların (%35 polikaprolakton ve %65 poliglikolik asit, polidioksanon ağıyla desteklenmiş) içine

gömülerek ve hasarlı eklemsele kırıkdağa implante edilebilir. Günümüzde, hücrelerle kırıkda rejenereyonunu desteklemenin yanı sıra, kondrosit ya da mezenkimal kök hücre destekli üç boyutlu scaffoldlar ilgi çeken yeni tedavi yaklaşımları olmuştur. Bu yaklaşımlar scaffoldların özelliklerinden faydalanıp kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşmasını başlatarak "in situ" ortamda kırıkda tamiri için çeşitli biyomateryallerin implantasyonunu içermektedir [269].

Bir basamaklı scaffold temelli stratejiler son zamanlarda prosedürü kolaylaştırmak, bulguları genişletmek ve sonuçları daha fazla iyileştirmek için geliştirilmiştir. Klinik uygulamalarda farklı tipteki scaffoldların kullanımıyla kısa, orta zamanlı takiplerinden umut verici sonuçlar elde edilmiştir ama yinede iyi tasarlanmış çalışmalar yetersizdir. Özellikle mevcut geleneksel tedavi yöntemleri ile karşılaştırıldığında kırıkda doku mühendisliği yaklaşımının potansiyelini doğrulamak için randomize edilmiş kontrollü çalışmaların ve bu tekniklerin sistematik uzun süreli değerlendirmelerinin yapılması gerekmektedir. Bunların başında ise scaffold üzerine ekilmiş kök hücreler gelmektedir. Bu çalışmaları da aşağıdaki tabloda özetleyecek olursak;

Çizelge 2.6 Tek Basamaklı Kullanılan Scaffoldlar

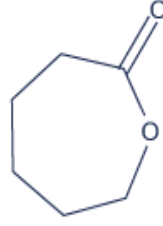
Ürün	Özellikleri
AMIC	%87 hasta memnuniyeti, 37 ayda, 4.2 cm ² lezyon
Chondrotissue	Dolgularda tam klinik iyileşme, 2 yılda, 6 cm ² lezyon
Alginate Beads	Allojenik kondrositlerde önemli klinik gelişme, 2 yılda, 2.6cm ² lezyon
CAIS	CAIS ve mikrokırık yöntemi karşılaştırıldı CAIS daha iyi sonuç, 2 yılda, 2.7-3.5 cm ² lezyon
Hyalofast	%70'e yakın greftlarda iyileşme, 2 yılda, 4 cm ² lezyon
TruFit	Klinikte anlamlı sonuç, 2 yılda, 2.7 cm ² lezyon
MaioRegen	%70 e yakın önemli klinik gelişme, 2 yılda, 2.9 cm ² lezyon

Rejeneratif teknikler hiyalin benzeri bir doku ile eklemel kıkırdak yerine tedavi yaklaşımını daha iyi geliştirmek ve doku iskelesi kullanımını basitleştirmeyi önerebilirler ama sağlıklı bir kıkırdak dokunun özellikleriyle uyum sağlayan bir yapı şu an yapılamamıştır. Literatürde çelişkili ve kesin olmayan bulguların açıklanması rejeneratif prosedürlerin hiyalin benzeri doku yeniden modellenmesi sonucunu ortaya çıkarabilir. Üstün klinik sonuçlar en az 2-3 yıllık bir takibin sonucunda saptanabilir. Böylece, orta ve uzun zamanlı karşılaştırmalı çalışmalar, daha az iddialı ve geleneksel prosedürlere nazaran kıkırdak doku mühendisliği yaklaşımının gerçek potansiyelini görmek için zorunludur. Doku iyileşmesinin düzenlenmesi ve yenilenmesi karışık bir süreçtir ve ileri biyolojik çalışmaların yanı sıra mevcut tedavi seçeneklerinin uzun zamanlı sistematik değerlendirilmesi, hücreler, büyüme faktörleri ve başka biyomateryal özellikleri ve scaffold temelli stratejinin potansiyelini doğrulayan ve umut verici ön bulgularının bulunması birçok değişkenin rolünü açıklamak için gereklidir. Tüm bu problemlere günümüzde halen bir çözüm bulunamaması hem doğal hemde sentetik scaffoldlar ile ilgili araştırmaların ve geliştirmelerin ya da klinikte uygulanmasına yönelik çalışmaların giderek artmasına neden olmaktadır. Kıkırdak doku mühendisliği yaklaşımının klinik uygulamalarının kısa ve orta zamanlı takiplerdeki klinik çıktılarının gelişimi ile scaffoldların farklı tiplerinin gelişimi ile tanımlanmıştır. Aslında, biyolojik ve cerrahi stratejilere bağlı olarak polimerlerin geniş bir özellik aralığına sahip ve kolayca modifiye edilebilen tasarımlarından dolayı bu denli çok scaffold geliştirilmektedir [247], [269].

2.7.3 Poli (ϵ -Kapolakton) (PCL)

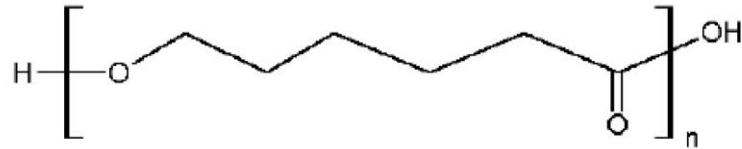
ϵ -Kapolakton veya sadece kaprolakton siklik ester olan lakton ailesinin bir üyesidir. $(CH_2)_5CO_2$ formülüne edilir. Renksiz bir sıvıdır ve çoğu organik çözücüde çözülmemektedir [270].

ϵ -caprolactone



Şekil 2.28 Epsilon kaprolakton kimyasal yapısı

Günümüzde FDA onaylı PCL'nin 1930'ların başlarında keşfedilmesine ve 1985 yılında biyobozunur olduğunun anlaşılmasına polikaprolakton (PCL) ya ϵ -kaprolakton'un çeşitli anyonik, katyonik ve koordinasyonlu katalizörlerin halka açılma polimerizasyonunun da kullanılmasıyla ya da 2-metilen-1-3-dioksepan serbest radikal halka açılma polimerizasyonu ile hazırlanır. PCL bir hidrofobik, cam geçiş sıcaklığı (T_g) -60°C olan yarı kristalin polimer olup, molekül ağırlığı artıka kristalliği azalma eğilimindedir. PCL iyi çözünürlük, düşük erime noktası ($59-64^\circ\text{C}$) ve olağanüstü bir karışım potansiyeli olduğundan biyomedikal alandaki potansiyel uygulama çalışmalarında kapsamlı araştırmaları teşvik etmiştir. PCL'nin ortalama moleküler ağırlığı genellikle 3000 ile 80000 g/mol arasında değişebilir ve moleküler ağırlığına göre tasnif edilebilir.



Şekil 2.29 PCL kimyasal yapısı [271].

PCL oda sıcaklığında; kloroform, diklorometan, karbon tetraklorid, benzen, toluen, sikloheksanon, 2-nitropropen de çözünebilir. Aseton, 2-bütanon, etil asetat, dimetilformamid, asetonitril içerisinde düşük çözünürlüğe sahipken, alkol, petrol eter ve dietil eter içinde çözünmez. Fiziko-mekanik özellikleri, termal özellikleri (T_g , kristalizasyon, erime ve ayrışma noktası) ve gerilme özellikleri, gerilme mukavemeti ve uzama verimleri açısından karşılaştırılarak incelenmiş birçok biyobozunur polimerlerden PCL'nin daha avantajlı olduğu rapor edilmiştir. PCL'nin *in vivo* ortamda

bozunması poli α -hidroksi asit'ten daha yavaş olduğu için ilaç salım sistemlerinde kullanıma uygun bir polimer olduğunu göstermektedir. PCL'nin günümüzde bu denli popülerliğinin artmasının en önemli nedeni doku mühendisliği çalışmalarınıdır. 1990'lı ve 2000'li yıllarda PCL'ye duyulan ilginin bu denli artmasının en büyük nedeni bu polimerle çok kolay bir şekilde hazırlanan scaffoldların diğer muadillerine göre üstün reolojik ve viskoelastik özelliklere sahip olmasından kaynaklanmıştır. Ayrıca diğer sentetik scaffoldlara göre daha ucuz bir şekilde üretilmesinde başka bir avantajı olarak ön görülmektedir. Yapay deri üretimi (düz film halinde), üretal stentlerin kaplanması, kas-iskelet doku mühendisliği uygulamaları ve en önemlisi osteoblast ve fibroblast hücre üretmesi için scaffold olarak kullanılmıştır. Dondurarak kurutma tekniğiyle üretilen PCL scaffoldlarının kondrosit hücre kültüründe kullanımı şu an için dikkat çeken doku mühendisliği uygulamaları arasındadır. Son zamanlarda yumuşak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere elektro-eğirme tekniği ile PCL fiberler üretilmiştir. PCL scaffold bozulurken lokal asit üretmesi, sınırlı biyoaktivitesi, hidrofobik ve yüksüz oluşu, bakteri-aracılığıyla bozunurluğa hassasiyeti gibi dezavantajlara sahiptir. Diğer sentetik tabanlı scaffoldlara göre avantajları ise PCL'nin iyi çözünür olması, düşük erime noktasına sahip olması (59-64°C), hidrofilik yüzeyi sayesinde hücrelerin tutunmasını sağlaması, proliferasyonunu artırması ve blendlerinde başarılı bir şekilde uyum sağlaması ile doku mühendisliği alandaki kapsamlı uygulamalar içerisinde yüksek potansiyel taşıyarak araştırmalara yön vermesidir. Aynı zamanda PCL inanılmaz çok yönlü bir biyoçözünür polimer olması ve üstün reolojik özellikleri sayesinde scaffold materyali olarak üretiminin kolay oluşu herhangi bir polimer işleme teknolojisine sahip merkez tarafından rahatlıkla işlenebilmesini sağlamaktadır. İmalat teknolojileri kullanarak üç boyutlu PCL scaffold üretiminde bir dizi yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler aşağıdaki tabloda özetlendiği gibidir [24], [26], [25].

Çizelge 2.7 PCL Scaffold Hazırlama Metotları

Kullanılan Yöntem	Gözenekliliği /Boyutu	Avantajları/Dezavantajları
Partikül Ayrıştırma	Gözenek küçük Gözenek boyutu 5-100um	Avantajı; basit ve kullanıcı dostu bir yöntemdir. Hiçbir özel ekipman gerektirmeden hazırlanabilir. Dezavantajı; Yoğunluk farkı eşit olmayan gözenek dağılımı oluşur. Tam ve geniş gözenek bağlantıları elde etmek zordur. Scaffoldların dış yüzeyinde kabuklanma meydana gelir. Tipik organik çözücüler gerekmektedir.
Termal Başlatılan Faz Ayrırma	Gözenek küçük Gözenek boyutu 5-100um	Avantajı; hiçbir özel ekipman gerekmeden basitçe hazırlanabilir. Spinodal ayrışma sağlanır ise büyük gözenek bağlantıları imal edilebilir. Dezavantajı; Scaffoldların dış yüzeyinde kabuklanma meydana gelir. Tipik organik çözücüler gerekmektedir.
Elektrospinnig (Elektroeğirme)	Gözenek küçük Gözenek Boyutu 1-10um	Avantajı; Polimerlerden çok fazla miktarda fiber yapılar üretmek için oldukça ucuz bir yöntemdir. Hücre ve kök hücreler için mükemmel bir doku uyumu vardır. Toparlayıcı olarak buz kristallerinin kullanılması da büyük gözeneklere sahip scaffold üretimini sağlamaktadır.
Buz kristalleri üzerinde Elektroeğirme	Gözenek küçük Gözenek Boyutu 20-200um	Dezavantajı; Tipik organik çözücüler gerekmektedir. Mekanik özellikleri genellikle kötüdür.
Kendiliğinden birleşen nanolifler	Gözenek büyük Gözenek boyutu 200-800nm	Avantajı; tipik olarak su içerisinde hücrelerin biyoaktif işlevselliği ile birlikte oluşturulabilir. Dezavantajı; Üretimi pahalıdır. Zayıf mekanik özellikleri ile yumuşak dokularda scaffold olarak kullanımı kısıtlıdır.
3 boyutlu Basım (3 boyutluP)	Gözenek küçük Gözenek boyutu 45-1600um	Avantajı; karmaşık ve anatomik şekilli yapıların imalatını sağlar. Dezavantajı; makinelerin pahalı oluşu ve düşük gözenek boyutlarında çözünürlük sıkıntısıdır.

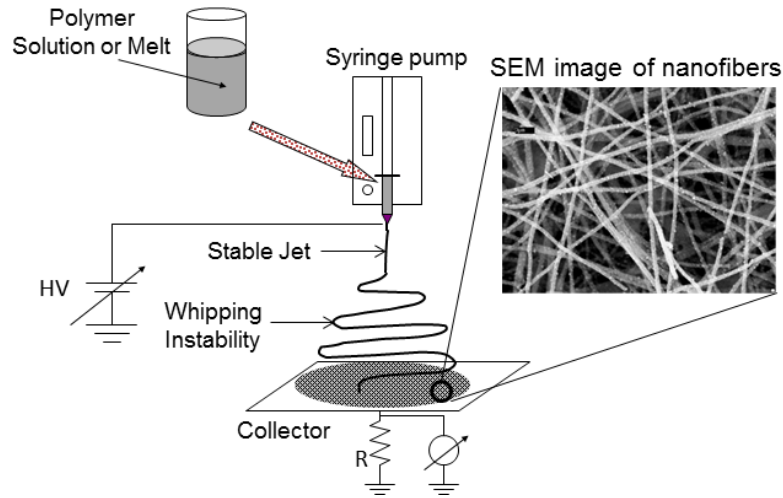
Çizelge 2.7 PCL Scaffold Hazırlama Metotları (devamı)

Stereolitografi	Gözenek küçük	%90'dan	Avantajı; gözenek boyutu ve bağlantıları üzerinde hassas kontroller yapılabilir. Karmaşık ve anatomik şekilli yapıların imalatını sağlar. Dezavantajı; makinelerin pahalı oluşu ve UV'nin polimerler ile uyumlu olması gerekir.
	Gözenek boyutu 175+um	boyutu	
Seçici bir lazer ile sinterleme (SLS)	Gözenek küçük	%25'den	Avantajı; gözenek boyutu ve bağlantıları üzerinde hassas kontroller yapılabilir. Karmaşık ve anatomik şekilli yapıların imalatını sağlar. Dezavantajı; makinelerin pahalı oluşu, düşük gözenek boyutlarda çözünürlük sınırlamaları vardır. Çalışılacak biyomalzemenin toz halinde olmalıdır.
	Gözenek boyutu 2500um	boyutu 30-	
Kaynaşmış tortulanma ile Modelleme/3 boyutlu Grafikleme	Gözenek küçük	%90'dan	Avantajı; gözenek boyutu ve bağlantıları üzerinde hassas kontroller yapılabilir. Karmaşık ve anatomik şekilli yapıların imalatını sağlar. Dezavantajı; Eriyik polimerler kullanıldığından sadece termoplastikler ile sınırlıdır. Düşük gözenekli ürün elde etmek zordur.
	Gözenek boyutu 200um	boyutu 100-	
Doğrudan yazım	Gözenek küçük	%90'dan	Avantajı; gözenek boyutu ve bağlantıları üzerinde hassas kontroller yapılabilir. Karmaşık ve anatomik şekilli yapıların imalatını sağlar. Dezavantajı; Kullanılan biyomalzemelere polielektrik yüklü mürekkep oluşturmak gerekir.
	Gözenek boyutu 5-100um	boyutu	

2.7.3.1 Elektrospinnig (Elektroçirime) Metodu ile PCL Scaffold Hazırlanması

Elektroçirime polimer çözeltilerin veya eriyiklerin alt-mikron ve mikron çapındaki liflerinin üretilmesi için oldukça pahalı tekniktir. 1930'lardan bu yana bilinen bir teknik olmasına rağmen doku mühendisliği ile birlikte popülerliği artmıştır. Bu metot özellikle nanometre mikron altında çapa sahip fibrilleri oluşturarak hücre dışı matrisi çok yakın bir şekilde taklit edebildiği için scaffold imalat tekniği olarak yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Literatürde elektroçirime yöntemi ile en yaygın olarak hazırlanan scaffold polimeri PCL'dir. Fakat birçok doğal ve sentetik polimerden de bu metot ile scaffold hazırlanmıştır. Polimer çözeltisi başlık/uç kısımda polimer damlacığı

oluşacak şekilde kapiler boyunca gönderilir. Uç kısım topraklanmış toplama bölgesi arasına yüksek voltaj uygulanır. Eğer elektrik alan gerilimi damlacığın yüzey geriliminin üzerindeyse polimer çözelti püskürtme ucu toplama bölgesine doğru hızlandırılır. Püskürtme ucu havada yol aldıkça yapıdan çözücü uzaklaşır ve toplama bölgesinde dokunmamış yapı oluşur. Eğer yönlendirilmiş ve tübüler yapılar hazırlanmak istenirse toplama bölgesi olarak topraklanmış döner silindir kullanılabilir. Kollajen ve fibrinojen gibi doğal makromoleküller ve polikaprolakton, poliglikolik asit, polilaktik-ko-glikolik asit ve sentetik polipeptitler gibi sentetik polimerler kullanılarak doku mühendisliği uygulamaları için dokunmamış fibröz yapıları elde etmek mümkündür. Yöntemde proses parametrelerine (uygulanan voltaj, polimer akış hızı, vb.) ve çözelti parametrelerine (polimer konsantrasyonu, çözücünün uçuculuğu vb.) bağlı olarak fiber oryantasyonu (düzenli ve rastgele dizilmiş), gözeneklilik/gözenek çapı (hücre infiltrasyonu) ve fiber çapı (nanometre/mikrometre boyutunda) değiştirilebilmektedir [24], [25].



Şekil 2.30 Şırınga, Yüksek Gerilim Kaynağı ve Kollektör Plakası Gösterilen Elektroeğirme İşleminin Şematik Diyagramı [272].

Elektroeğirme sistemi üç temel birimden oluşmaktadır. İlk birim, doğru akımla 500 μ A ve maksimum 50 kV gerilim elde edilen yüksek güç kaynağıdır. İkinci birim, polimer çözeltisinin bulunduğu plastik enjektördür. Düzgün bir akış sağlamak için plastik enjektör bir peristaltik pompaya yerleştirilir ve ucuna sistemdeki elektrotlardan biri takılmıştır. Bu elektroda güç kaynağından yüksek gerilim uygulanır. Son birim ise toplayıcıdır. Sözü geçen birim metalden yapılmış, üzeri alüminyum folyo ile

kaplanmıştır. Toplayıcı birimi enjektörün ucuna yerleştirilen elektrotun zıttı yüklü elektrot görevini üstlenir ve topraklanmıştır. Gerilimin istenen ölçüde sisteme uygulanmasıyla polimer çözeltisi enjektörün ucundan buhar jeti şeklinde zıt yüklü elektroda yani toplayıcıya doğru püskürür. Çözücünün yol boyunca buharlaşmasıyla katılan polimer toplayıcıya nanofiber şeklinde ulaşır ve membran oluşturacak şekilde birikir. Fiberler toplayıcı yüzeyinde birikirken birbirlerine dokundukları noktada yapışır ve bir film şeklinde örgüsüz fibröz bir yapı oluşturur [24], [25].

2.7.3.2 PCL Scaffoldların Sterilizasyonu

PCL scaffoldların etilen oksit gazı sterilizasyon ve radyasyon sterilizasyon genellikle yaygın olarak kullanılan yöntemler arasına girmektedir. PCL scaffoldun gamma ışınması (2.5 Mrad doz) sterilizasyona etkisini incelerken; bozulma oranı (lipaz tarafından kataliz edilen), mekanik özellikleri ve hücrelerin scaffold yüzeyine tutunma oranı incelenmelidir. Yapılan bir çalışmada gamma sterilizasyon sonucunda PCL scaffold yüzeyine kondrosit hücrelerin bağlanmasında herhangi bir problem olmadığı rapor edilmiştir [273]. Etilen oksit ile sterilizasyonunda ısıya ve neme hassas PCL scaffold için ideal bir sterilizasyon yöntemidir. Ayrıca etilen oksit sporlar dâhil bütün mikroorganizmalara (Creutzfeldt-Jakob hastalığı (CJD) hariç) karşı etkilidir, uygulanması çok kolay ve pahalı bir yöntemdir [24].

2.8 Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri ile vücut tarafından üretilen bir grup biyolojik olarak aktif polipeptidlerin hücreler bölünme, büyüme ve farklılaşmasını teşvik edebilirsiniz. Kıkırdak hayatı boyunca gelişimini düzenleyen ve homeostazı uyum içinde olmasını sağlayan çok sayıda büyüme faktörleri ile çalışır. Bu nedenle, büyüme faktörleri kıkırdak hasarlarında kıkırdağa yeniden işlevini kazandırmak için uygulanmakta ve tedavide ümit verici seçenekler sunmaktadır. Birçok anabolik büyüme faktörü kondrosit sentezi için proteoglikanları, agrekan, Tip II kolajeni, sinoviyositleri ve mezenkimal kök hücrelerinde proliferasyonunu uyarır, mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşması için ise interlökin-1 (IL-1) gibi sitokinleri ve matris metaloproteinaz (MMP) kataliz etkilerini azaltır. Büyüme faktörlerine ilaveten

kondrosit gelişimine destek verecek en önemli diğer bileşende scaffoldlardır. Tabii burada büyüme faktörlerinin yanında scaffoldların büyüklüğü, kullanılan malzeme, scaffoldun hazırlanışında hücrelerin tutunup gelişmesi için oldukça önemlidir [146], [274].

2.8.1 Kondrojenik farklılaşmada *Transform Büyüme Faktörü- β* (TGF- β) Ailesi, *İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I (IGF-I)*, *Fibroblast Büyüme Faktörü Ailesi*, *Trombosit Türevli Büyüme Faktörü (PDGF)*

Transform Büyüme Faktörü- β (TGF- β) ailesi yapısal olarak tek bir disülfür bağıyla birbirine bağlanmış ya tek başına homo ya da heterodimerler halinde bulunur. Kıkırdak tamirinde üç önemli TGF- β ailesi üyesi görev almaktadır. Bunlar; TGF- β 1, kemik morfogenetik protein-2 (BMP-2) ve BMP-7 dir. BMP-7 osteojenik protein-1 (OP-1) olarak da bilinir. Anabolik ve antikatabolik faaliyetler karşılaştırıldığında BMP-2, -4, -6 -7 ve CDMP-1,-2'nin (Kıkırdak kaynaklı morfogenetik faktör 1, 2) proteoglikan sentezini büyük ölçüde uyardığı görülmüştür. TGF- β 1 kondrosit sentezinin aktivitesini uyarırken IL-1 katabolik aktivitesini azaltır. TGF- β 1 sinoviyal zardan ve kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kondrogenezini aktive ettiği rapor edilmiştir. *In vitro* veriler BMP-2'nin de hücre dışı matris sentezini uyardığını göstermektedir. Mezenkimal kök hücreler üzerinde BMP-2 etkisi TGF- β 1 ile benzer olup hücre dışı matrisi üretimi arttırarak kollajen tip1 ifadesini düşürür. BMP-7 ya da OP-1 kıkırdak gelişiminde altın standart büyüme faktörüdür. IL-1, IL-6, IL-8, MMP-1 ve MMP-13 de dâhil olmak üzere çok sayıda katabolik sitokinlerin katabolik aktivitesini azaltarak diğer anabolik büyüme faktörleri gibi BMP-7 de kıkırdak matris sentezini uyarıcı etki görür [146], [275].

Monolayer ya da eksplant kültürlerde IGF-I'nin anabolik aktiviteyi artırdığı ve katabolik aktiviteyi azalttığı rapor edilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşması IGF-I tarafından indüklenirken IGF-I ve TGF- β 1 kombinasyonu ile aktifleşir [146], [275].

Fibroblast Büyüme Faktörü ailesinin iki üyesi olan FGF-2 ve FGF-18'nin kıkırdak homeostazındaki rolleri araştırılmıştır. FGF-2 kıkırdak hücre etrafındaki matrisi içinde bol miktarda bulunur. FGF-2 hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanır ve agrekanaz aktivitesinde azalmaya neden olan anabolik yollarını aktive eder fakat proteoglikan miktarında hiçbir belirgin bir değişikliğe neden olmaz. FGF-18 ve kıkırdak

homeostazisinin rolü ile ilgili literatürde çok az bilgi olmasına rağmen, kondrositlerde çeşitli anabolik etkileri ortaya çıkardığı rapor edilmiştir [146], [275]. Trombositten türevli büyüme faktörü (PDGF) ya homodimer (PDGF-AA / PDGF-BB) ya da heterodimer (PDGF-AB) olarak bulunmaktadır. Kondrositlerde matris sentezini uyardığı rapor edilmiştir [146], [274].

2.8.2 Büyüme Faktörleri Kombinasyonu Tromposit Bakımından Zengin Plazma (PRP), Ototolog Serum (ACS), Kemik İliği Konsantresi (BMC)

Yukarıda belirtilen büyüme faktörlerine ek olarak kondrogenesis de önemli olan başka faktörlerde vardır. Bunlar; VEGF, BMP-12, BMP-13, FGF-4, FGF-8, Wnt3a ve Wnt7a olarak sıralanabilir [146], [274].

Büyüme faktörleri kombinasyonlarını, tromposit bakımından zengin plazma (PRP), otolog serum (ACS) ve kemik iliği konsantresi (BMC) olmak üzere üç grup altında toplayabiliriz [146], [274].

Tromposit bakımından zengin plazma (PRP), mikro litrede $1,1 \times 10^6$ trombosit içermektedir. PRP uygulamalarının kırık tedavisinde kullanımı yara iyileşmesinde trombositlerin fizyolojik rolüne dayanmaktadır. PRP içerisinde 1500 protein bulunmaktadır. Bunların arasında PDGF, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), TGF- β , FGF ve EGF de dahil olmak üzere bir çok yara iyileşmesinde görev alan büyüme faktörleri bulunmaktadır. PRP'nin kırık tedavisinde kullanımına yönelik çok sınırlı yayınlar bulunmaktadır. PRP'ye maruz kalmış mezenkimal kök hücreler kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, hücre çoğalmasını, hücre dışı matrisi sentezinin artışı, proteoglikanların ve tip II kollajenin miktarında artma görülmüştür [146], [274].

Yapılan araştırmalarda otolog serum içerisinde yüksek miktarda PDGF ve TGF- β bulunduğu bazı kaynaklarda ise IL-1 varlığından da bahsedilmektedir. Kırık hasarlarını tedavi amaçlı yapılan *in vitro* çalışmalar bulunmasına karşın *in vivo* çalışmalar henüz rapor edilmemiştir [146], [274].

BMC'de aynı PRP gibidir fakat BMC'nin PRP'ye göre en büyük avantajı yapısında mezenkimal kök hücre içermesidir. Biyoaktif büyüme faktörleri, şu anda kırık hasarlarında tedaviyi geliştirmek için alternatif olarak kabul edilmektedir. Dolayısıyla

klirik de kıkırdak tedavisinde kullanılabilmesi için büyüme faktörlerinin rollerini ve potansiyellerini iyi bir şekilde incelemek gerekmektedir. Kısaca büyüme faktörlerinin etkilerini özetlemek gerekirse BMP-7 bugüne kadar yapılmış olan tüm çalışmalarda altın standart olarak kullanılmaktadır. IGF hayvan modellerinde yapılan çalışmaya göre IGF'nin kondrosit iyileşmesinde sınırlı bir etkisi olduğu görülmüştür. FGF ve TGF- β ailesinin ise kıkırdak çevresinde şüpheli etkileri olduğu rapor edilmiştir. Günümüzde büyüme faktörü kombinasyon tedavisinde en yaygın olarak kullanılan formlar PRP, Otolog serum ve Kemik iliği konsantresi şeklindedir [146].

2.9 Gen Transferi

Kas-iskelet sistemi hastalıklarını iyileştirmek için kullanılan gen tedavisi ilk kez romatoid artrit tedavisi için önerilmiştir. Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve IL-1 β gibi sitokinleri engellemek için uygulanan biyolojik faktörler, romatizmal artrit tedavisinde etkili olmuştur. *In vivo* veya *ex vivo* olarak viral veya non-viral vektörler aracılığıyla kıkırdak hasarlarını tedavi etmek için kullanılabilecek terapötik hedefler klinik araştırmalar halen devam etmektedir [154].

Çizelge 2.8 Kıkırdak Doku Mühendisliğinde Gen Transferi

Kıkırdak Rejenerasyonunda Kullanılan Gen Taşıyıcı Sistemlerin Hedefleri		
Kategori	Hedef Gen	
Büyüme Faktörü	TGF- β , BMP, FGF, IGF-1 β , EGF	
Transkripsiyon Faktörü	SOX9 (Sry ilgili HMG kutusu)	
Sinyal Molekülleri	Transdüksiyon	SMAD
Proenflamatuar inhibisyonu	sitokin	TNF- α , IL-1(interlökin 1)
Apoptozis	Bcl-2 (B lenfoma hücresi 2), Bcl-XL, iNOS (indüklenbilir nitrik oksit sentezi)	

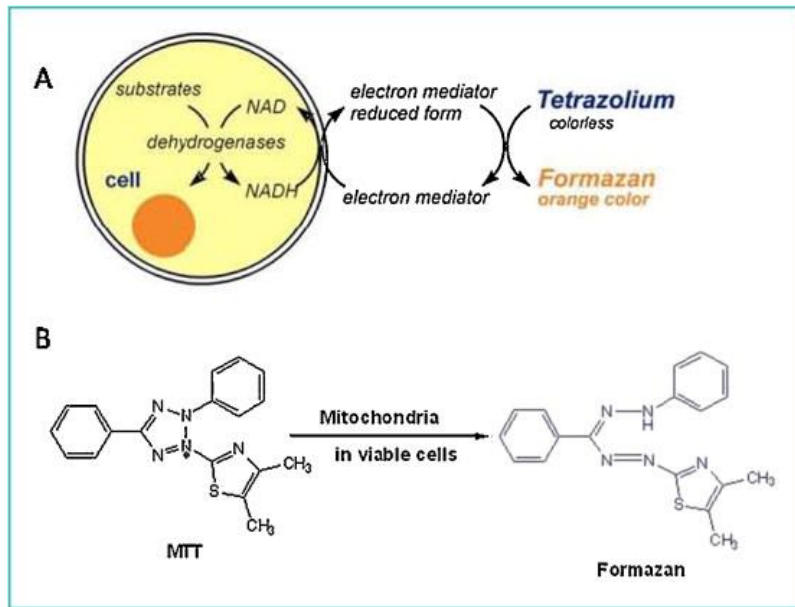
2.10 Hücre Kültür Besiyeri Bileşenleri

Hücre kültürü *in vitro* da hücrelerin proliferasyonu ve canlılığının devam etmesini sağlayan özel bir ortamdır. Bu ortamda canlı bir hücrenin ihtiyacı olan çeşitli tuzlar, tampon maddeler, aminoasitler, vitaminler, dana veya at serumu içeren besiyerlerinde özel ısılarda CO₂ li yada CO₂ siz ortamlarda steril koşullarda saklanırlar. Hücre çeşitliliğinin çok fazla olması ve her hücrenin başka özel hücre besiyerlerine ihtiyaç duyması çeşitliliği oldukça artırmıştır. Bunlar; 1000mg/L glikoz içeren Dulbecco' nun Modifiye ettiği Eagle Medyumu (DMEM), 4500ml/L glikoz içeren Dulbecco' nun Modifiye ettiği Eagle Medyumu (DMEM), sodyum piruvat ve selenyum Iscove' un modifiye ettiği Dulbecco Medyumu (Iscove's Modified Dulbecco's Media) (IMDM) gibi ticari olarak temin edilebilen özel hücre besiyerleridir. Hücrelerin kültür ortamında; genellikle yüksek düzeydeki büyümeyi hızlandırıcı ve düşük düzeydeki büyümeyi yavaşlatıcı faktörleri içeren Fetal sığır ya da dana serumu (FBS ve FCS) ya da IgG düzeyi düşük HyClone Süper Düşük IgG Fetal Bovine Serum (FBS) kullanılır. Ayrıca kültür ortamına; enerji üretimi ile protein ve nükleik asit sentezi için gerekli L-Glutamin ya da L-L-Glutamine alternatif olarak büyüme miktarını ve verimi arttıran Glutamax L-alanyl-L-L-Glutamine eklenir. Temel hücre besiyeri içerisinde fizyolojik şartlarda osmotik basınç ve pH'nın devam ettirilebilmesi için izotonik çözeltiler olarak Dengeli Tuz Solüsyonu (Balanced Salt Solution; BSS) kullanılır. Kültür ortamındaki bakteri ve mantar kontaminasyonunu önlemek için besiyerine sıklıkla geniş spektrumlu antibiyotikler özellikle de streptomisin, penisilin ve amfoterisin B (fungizone) ya da gentamisin, ampoterisin B ve Nystatin (10U/ml) kombinasyonları kullanılmaktadır [276], [277], [278].

2.11 Hücrelerde MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid) Testi İle Canlılık/Toksisitenin Gösterilmesi

MTT testi 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid indirekt olarak hücre büyümesi veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir Canlılık/Toksisitenin gösterilmesi testidir. Hücre canlılığını ve ölümünü ölçen bu yöntemin, diğer sitotoksik test yöntemlerine göre daha hassas ve tekrarlanabilir olması, uygulamasının kolay, hızlı ve sayılabilir olması en büyük

avantajdır. Bu yöntem ile bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kalorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Artan formazonun yoğunluğunun direkt olarak yaşayan hücrelerin sayısıyla bağlantılı olduğunu ve sağlam hücrelerde mitokondirinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon frajil bir mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlı olarak absorbe olmuş MTT'nin mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır [276].



Şekil 2.31 MTT Analizi Prensibi (A), MTT ve Formazan Kimyasal Yapısı (B) [279].

2.12 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Laboratuvar şartlarında spesifik bir DNA parçasının primerler aracılığıyla enzimatik olarak çoğaltılması işlemine Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) denir. PZR'in gerçekleşebilmesi için; amplifiye (çoğaltılacak) hedef DNA dizisini içeren kalıp DNA molekülü, amplifiye edilecek kalıp DNA'nın komplementeri olacak şekilde seçilmiş yaklaşık 15-20 bazlık sentetik kısa tek zincirli DNA molekülleri olan iki oligonükleotid primerler, termostabil karakterli Taq DNA polimeraz enzimi, enzimin tamponu,

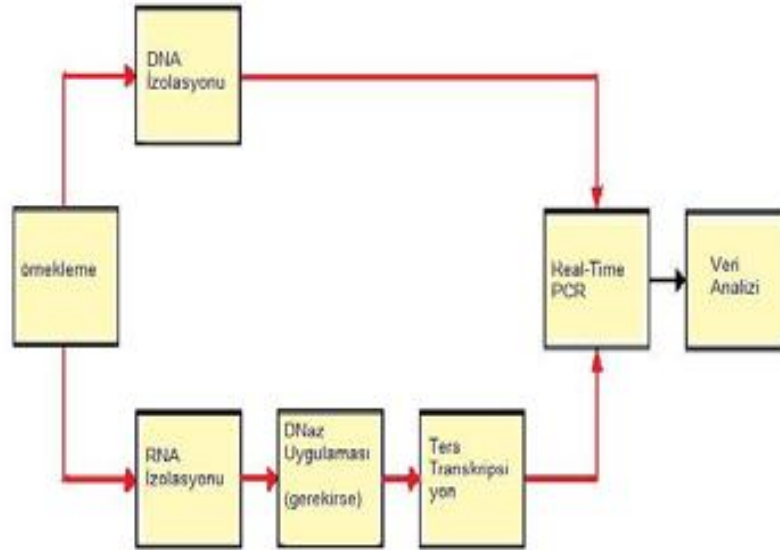
deoksiribonukleotid trifosfatlar (ATP, GTP, TTP, CTP) \approx (dNTP) karışımı ve her primer için konsantrasyonları belli oranlar da olan magnezyum klorid ($MgCl_2$) tamponu kofaktör olarak önemlidir. *In vitro* DNA çoğaltması için gerekli sıcaklık kontrolü “thermal cycler” denilen otomatize ısı kontrol cihazlarında gerçekleştirilmektedir. PZR işleminde hedef DNA'nın çoğaltılması 20-40 döngü arasında gerçekleşir. Bir PZR döngüsü denatürasyon, primerlerin bağlanması ve uzama aşamaları olmak üzere 3 aşamadan meydana gelmektedir. İlk basamak denatürasyondur ve $95^\circ C$ 'e kadar ısıtılan çift iplikli DNA molekülünün zincirlerinin birbirlerinden ayrılarak tek iplikli şekle dönüşmesiyle gerçekleşir. İkinci basamak bağlanmadır (annealing) ve reaksiyon sıcaklığı primerler baz alınarak $50-65^\circ C$ olarak ayarlanmaktadır. Bu aşamada 15-20 nükleotid uzunluğunda primerlerin çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanıyarak hidrojen bağları ile birleşmemektedir. Üçüncü basamak uzama ya da sentez aşamasıdır. Sıcaklık bu evreden sonra taq polimeraz çalıştığı optimum sıcaklık olan $72^\circ C$ 'ye getirildiğinde primerlere bağlanan enzim molekülleri dizinin 3' ucuna kalıp DNA'ya uygun nükleotitleri ekleyerek DNA sentezi yaparlar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışta iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının birer kopyası çıkartılarak başlangıçtaki DNA miktarı her döngüde geometrik olarak çoğaltılır [276].

2.12.1 Ters (Reverse) Transkripsiyon PZR (RT-PZR)

Bu yöntemde hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirilmesi sonucu, gen ekspresyonu analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. RT-PZR iki aşamada gerçekleşir. Birinci aşamada ribonükleik asit (RNA)'ten komplementer DNA (cDNA)'nın sentez edilmesidir. cDNA sentez reaksiyonları için random-hegzamer primerler, oligo (dT) primerler veya gen spesifik primerler (GSP) kullanılabilir. Sentez için Retrovirüslerden elde edilen AMV (Avian Myeloblastosis Virus) ve MMLV (moloney murine leukemia virus) virüse ait DNA polimeraz aktivitesine sahip revers transkriptaz enzimleri kullanılır. İkinci aşamada da sentezlenen cDNA'nın standart PZR ile çoğaltılması gerçekleşir. [276].

2.12.2 Real-Time PZR (Eş Zamanlı PZR)

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Eş zamanlı PZR) özellikle gen ekspresyonu çalışmalarında kullanımı yerleşmiş bir yöntemdir. Eş zamanlı PZR döngüler sırasında reaksiyonlardan floresan sinyal toplayarak hızlı ve sürekli olarak ürünlerin birikiminin gerçek zamanlı izlenebilmesinin analizine olanak verir. Eş Zamanlı PZR de PZR sonucu oluşan nükleik asit ürünlerin çift zincirli DNA arasına giren floresan bir boya ya da floresan ile işaretli proplar aracılığıyla reaksiyon sırasında izlenebilir. Floresan kaynağı olarak en sık hidroliz propları, hibridizasyon propları, TaqManR propları ve SYBRR Green I kullanılır. SYBRR Green I boyası reaksiyonda çoğalan her türlü çift zincirli DNA'ya nonspesifik olarak bağlanır ve çift zincirli DNA'nın artışıyla orantılı olarak floresan sinyal verir. PZR yöntemi ile nükleik asit çoğaltılması ile eş zamanlı olarak artan floresan sinyalin ölçülmesi kantitatif olarak sonuç verebilir.



Şekil 2.32 Eş Zamanlı PZR Çalışma Akışı [280].

Real-Time PZR de gen ekspresyonu analizlerinde kullanılan referans genler mevcuttur. Bunlar hücrelerin tümünde eksprese olan ve ekspresyon seviyesi dokudan dokuya değişmeyen housekeeping genlerdir. Ayrıca analizlerde eşik döngü değeri (threshold cycle = Ct) Real Time PZR uygulamalarında önemli bir parametredir. Ct değeri, amplifikasyon sırasında tespit edilen floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısıdır. Başka bir ifade ile üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. Treshhold cycle (CT) (eşik) değeri; PZR ürünlerinin toplam sinyalinin arka plan sinyalini

geçtiği anda ki değer olarak eş zamanlı PZR'de rölafif miktar tayininde, çeşitli doku ve hücre tiplerinde farklı koşullarda ekspresyon düzeyi değişmeyen referans bir gen (housekeeping gen, kontrol gen) kullanılır. Bu amaçla en yaygın kullanılan genlerden birisi gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH)'dir. Farklı PZR reaksiyonlarında yer alan kalıp örneklerin miktarı Ct değerleri karşılaştırılarak hedef gen kontrol gene göre normalize edilerek hesaplamalar yapılır [276].

3. MATERYAL ve METOD

3.1 MATERYAL

3.1.1 Ekipmanlar

- ✓pH Metre (Inolab WTW Level 1)
- ✓Hassas terazi (Precisa Gravimetrics AG)
- ✓Santrifüj (Eppendorf, Thermo Micromax RF)
- ✓Vorteks (Heidolph REAX top)
- ✓Bidistile Su Cihazı
- ✓Isıtıcıli Manyetik Karıştırıcı (Heidolph MR 3001)
- ✓Laminar-Hava Akışlı Kabin
- ✓İnkübatör (37°C %5 CO₂'li Binder Etüv)
- ✓İnverted mikroskop (Olympus CKX41)
- ✓Işık mikroskobu (Olympus)
- ✓Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR3000)
- ✓-45°C Derin Dondurucu
- ✓Flow sitometre Becman Coulter Cell Lab Quanta SC
- ✓Buz makinesi (Scotsman AF100)
- ✓Vortex (LMS(laboratory medical supplies) VTX-3000L)
- ✓Su banyoları (GFL (gessellschaft für labortechnik) mbH, Kerman)
- ✓Isıtıcıli karıştırıcı (Heidolph instruments)

- ✓ ELISA çoklu plak yıkama cihazı (Thermo)
- ✓ ELISA çoklu plak okuyucusu (spektrometre) (Thermo)
- ✓ Dondurucular (Beko(+4,-20°C), Arçelik(+4,-20°C), GFL(-40°C))
- ✓ -195°C Azot Tankı ve Azot taşıma tankları (DMC air liquid systems)
- ✓ Otoklav (Kerman, HIRAYAMA)
- ✓ UV spektrofotometre (Jasco V-530)
- ✓ 10, 50, 100, 1000 µl 'lik mikropipetler (Thermo, Pippetman)
- ✓ 100, 300 µl 'lik çok kanallı pipetler (Thermo)
- ✓ 1-10, 10-100, 100-1000 µl 'lik Tek Kullanımlık Pipet Uçları (AxyGen)
- ✓ Santrifüj tüpleri 1, 2, 15, 50 ml. (Eppendorf , IsoLAB)
- ✓ 96 kuyulu plakları (TPP)
- ✓ 24 kuyulu plakları (TPP)
- ✓ 6 kuyulu plakları (TPP)
- ✓ Hücre kültür flaskları 25cm², 75cm² (TPP, Corning)
- ✓ Serolojik Pipet Tabancası (Thermo)
- ✓ Serolojik pipetler 2 ml, 5 ml, 10 ml (Corning)
- ✓ Kriyotüpler 2ml (TPP)
- ✓ 50-1000ml'lik otoklavlanabilir cam şişeler (ISOLAB, SCHOTT)
- ✓ 1,2,5,10,50 cc'lik enjektör (Ayset)
- ✓ 0,22 µm ve 0, 45 µm'lik şırınga filtreleri (MILLIPORE, TPP, Sartorius)
- ✓ Lateks eldiven (Broche, ISOLAB)
- ✓ PCR cihazı (Techne)
- ✓ UV jel görüntüleyicisi
- ✓ Güç Kaynağı (Hoefler)
- ✓ Mikrodalga Fırın (Beko)
- ✓ Elektroforez tankı (Thermo)

3.1.2 Kimyasallar

Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) 1.0 g/L D-Glucose(1X)	Gibco	11880
Glutamax™-I (100x)	Gibco	35050-079
Antibiotic-Antimycotic (100x)	Invitrogen™	15240-062
Tripan blue (%0,5)	Biological Industry	628255
Trypsin, 0.05% (1X) with EDTA 4Na, liquid	Gibco	25300-054
FBS	Gibco	10270-106
LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit	Invitrogen™	MP 03224
MTT	Sigma-Aldrich	M2003-1G
CM-Dil	Invitrogen™	C-7001
STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit	Gibco	A10071-01
Safranin O/Fast Green FCF	Sciencell™	8348
Alcian Blue/Nuclear Fast Red	Sciencell™	8378
Anti-Collagen Type II Antibody	Millipore	AB761
Gentamisin	Sigma-Aldrich	G1272
cDNA Synthesis Kit Manual	Takara	6130
PerfeCta® SYBR® Green Supermix	Quanta Biosciences™	95054-100
AccuStart™ II PCR Supermix (2X)	Quanta Biosciences™	95137-100
Ethidium Bromide Solution	Invitrogen™	15585-011
Nuklease-free water	Fermentas	R0582
Loading Dye	Fermentas	R0611
DNA leader	Fermentas	SM0311
Moleküler Biyoloji Saflığında Agarose	Sigma-Aldrich	A0576

3.1.3 Deneyleerde Kullanılan Tampon, Kültür Ortamları ve Kimyasalların Hazırlanışı

TAE tamponu

40mM Tris-asetat, 1mM EDTA ile pH 8,0'de hazırlandı.

%5 Agaroz Jel Hazırlanması

Doku takibi sürecinde PCL scaffoldan oluşan 3 boyutlu yapıları %5 agaroz içerisine gömme işlemi için %5 agaroz jel hazırlandı. 5gr moleküler agaroz, 100ml TAE tampon zeltisi (1X) içerisinde mikrodalga fırında ısıtılarak çözündürüldü ve sıcak bir şekilde kullanıldı.

%3 Agaroz Jel Hazırlanması

PZR amplikonlarını jel elektroforezde yürütmek için %3 agaroz jel hazırlandı. 3gr moleküler agaroz, 100ml TAE tampon çözeltisinde (1X) içerisinde mikrodalga fırında ısıtılarak çözdürüldü. içerisine 2µL +4°C de muhafaza edilen etidyum bromür konuldu ve iyice pipetlendi. Tarakları yerleştirilmiş jel elektroforez tankına döküldü ve jelin oda ısısında katılaşması beklendi.

PBS (Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu) zeltisi

Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (PBS) tamponu hücre içi ve dışındaki ozmotik basıncı dengede tutan bir solüsyondur. İçeriğindeki inorganik tuzlar ve su, hücre metabolizmasını destekler. Ortamın pH'ını tamponlayarak hücreler için uygun bir ortam sağlar.

1x PBS zeltisinin Hazırlanması

NaCl	4g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,44g
KH ₂ PO ₄	0,24g

olacak şekilde tartıldı. Distile deiyonize su ile 800ml'ye tamamlandı. Çözelti pH 7.4 olacak şekilde ayarlandı. Son hacim 1 litreye de iyonize su ile tamamlandı. Otoklav 'da

1atm basınçta 121°C de 20 dakika tutularak steril edildi. Steril PBS tamponu 4°C de saklandı.

Tripsin-EDTA Solüsyonunun Hazırlanması

Tripsin hücre pasajlamaların da kullanılan serin proteaz tipi temel bir enzimdir. Tripsin, lizin ve arjinin aminoasitlerinden peptidleri yıkararak hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılmalarını sağlar. Tez çalışmalarımızda literatürde farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin pasajında %0,25 EDTA'lı tripsin solüsyonu kullanıldı. Tripsin-EDTA ticari solüsyonu (Gibco), enzim aktivitesinin azalmaması için 100ml'lik stok şişesi 15ml steril falkon tüplerine bölünerek -20°C de saklandı.

Fetal Sığır Serum (FBS)

Fetal Sığır Serum (FBS) içeriğindeki yüksek düzeydeki büyümeyi hızlandırıcı ve düşük düzeydeki büyümeyi yavaşlatıcı faktörler nedeniyle, hücre kültüründe en sık kullanılan bileşenlerden biridir. Ticari olarak satın alınan 500ml lik FBS (Gibco) içeriğindeki protein yapının bozulmaması için 15ml'lik falkonlara bölünerek -20 °C de saklandı.

Tripan Mavisi (TB) solüsyonunun hazırlanması

Tripan Mavisi (TB) canlı hücrelerde fagositoz olayını incelemek için kullanılan vital bir boyadır. Canlı hücreler boyanmazken, ölü hücreler hücre zarından boyayı geçirerek mavi renkte görülür. 100ml'lik ambalajlarda %0,5 konsantrasyon şeklinde Tripan mavisi solüsyonu (Biological Industry) ticari olarak satın alındı. Hücre sayımı için 10µL Tripan mavisi boya, 90µL distile su ile seyreltilerek sayım solüsyonu hazırlandı.

Dondurma Solüsyonu (Kriyoprotektan) Hazırlanması

Kriyoprezervasyon (dondurarak saklama) hücreleri özel koruyucu maddelerle (kriyoprotektan) -196°C'lik sıvı azot tanklarında saklamaktır. *In vitro* devamlı kültür yapılan hücreler laboratuvar şartlarına adapte edildikten sonra kriyoprezerve edilerek uzun zaman boyunca muhafaza edilirler [281]. Dimetilsülfoksit (DMSO) (AppliChem) intrasellüler bir ajan olarak ekstrasellüler elektrolit dengesini sağlamaktadır. İnasellüler ve ekstrasellüler osmolarite farkını azaltarak dehidratasyon hasarını önler. DMSO oda sıcaklığında hücrelere toksiktir. Bu nedenle 4°C de sabit bir hızda eklenmeli ve hemen dondurma aşamasına geçilmelidir. Tez çalışmasında kullanılan farklı kaynaklı

mezenkimal kök hücreler için her defasında bir defa kullanılacak %20'lik 5ml'lik dondurma solüsyonu hazırlandı. Bunun için 4ml FBS içerisinde sabit bir hızla 1ml DMSO çözeltisi 15ml'lik falkon tüp içerisinde çözülerek iyice homojen hale gelmesi sağlandı. Daha sonra kriyoprezervasyon işlemi öncesine kadar -20°C de saklandı.

DMEM Besiyerinin Hazırlanması

DMEM (Dulbecco Modifiye Eagle Medyum), içeriğinde 1000mg/L glikoz içeren aminoasit, vitaminlerinin ve bunların yanında diğer destekleyici bileşiklerin de fazla bulunduğu bir besiyeridir. Ticari olarak satın alınan 500ml lik DMEM'in (Gibco) çalışmaya hazır hale gelebilmesi için içerisine 2.5ml Anti-anti (İnvitrogen) ve 5ml Glutamax (Gibco) konularak bir stok hazırlandı. Bu stokdan 44ml alınarak 50ml'lik bir falkon içerisine konuldu ve üzerine %10 FBS konularak çalışmaya hazır hale getirildi. Farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin hazırlanan %10'luk besiyeri ile kültürleri yapılabilmek için 4°C de muhafaza edildi. Çalışma öncesinde hücreler üzerinde negatif bir etki oluşturmaması için 37°C de ısıtılarak kullanıldı.

STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco) (Kondrojenik Farklılaşma Besiyerinin) Hazırlanması

İçerisinde mezenkimal kök hücrelerin kondrosite farklılaşmasını sağlayan transforming growth factor- β 1, ascorbate-2-phosphate, dexamethazone, sodium pyruvate, proline, ITS premix gibi uyarıcı faktörler bulunan ve ticari olarak satın alınan kondrojenik farklılaşma besiyeri kitinde; STEMPRO® Chondrogenesis Supplement (Gibco) ve STEMPRO® Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium (Gibco) olmak üzere iki bileşen bulunmaktadır. Chondrogenesis Supplement (Gibco) karanlık ortamda 1,5 μ L lik steril ependorf tüplere 1 μ L olacak şekilde bölündü, ışık almaması için alüminyum folyo ile sarılarak çalışma zamanına kadar -20°C de saklandı. STEMPRO® Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium (Gibco) içerisine karanlık ortamda 2 μ L Gentamisin (Sigma) antibiyotiğinden konularak alüminyum folyo ile sarılıp 4°C de çalışma zamanına kadar saklandı. Daha sonra üç boyutlu hücre kültür modellerimizde kullanılan kondrojenik farklılaşma besiyerini hazırlarken; 15ml steril falkona 1 μ L Chondrogenesis Supplement (Gibco) ve 9 μ L STEMPRO® Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium (Gibco) konuldu ve iyice

homojen hale gelmesi sağlandı. Hazırlanan besiyeri ışık almaması için alüminyum folyo ile sarıldı. Çalışmadan hemen önce 37°C ye gelmesi sağlandı.

LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (İnvitrogen) (Canlı/Ölü Boyası) Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

Canlı/Ölü boyası içeriğinde bulunan Calcein/Etidyum-bromür homodimer-1 ile hücreleri flask ya da scaffold üzerindeyken canlılıklarını incelememizi sağlar. Calcein, canlı hücrelerin plazma zarından hücre içine nüfuz etme yeteneğine sahiptir ve hücre içerisinde bulunan esterazlar tarafından parçalanarak yeşil floresans verir. Etidyum-bromür homodimer-1, plazma zarındaki hasar sayesinde hücre içine girerek ölü hücrelere nüfuz eder, nükleik asitlere bağlanır ve kırmızı floresans verir. Ticari olarak satın alınan ve soğuk zincir ile gelen Canlı/Ölü boyası (İnvitrogen) floresan aktivitesinin bozulmaması için tek kullanımlık olacak şekilde Calcein'den 5µL, Etidyum-bromür homodimer-1'den 20µL olacak şekilde bölündü. Canlı/Ölü boyası boyama solüsyonunu hazırlarken sırasıyla 15ml'lik steril bir falkon içerisine 10ml PBS çözeltisi, 20µL Etidyum-bromür homodimer-1 ve 5µL Calcein konuldu, vorteks ile homojen bir şekilde karışması sağlandı ve kısa bir santrifüjden geçirildi. Hazırlanan çalışma solüsyonunda Etidyum-bromür homodimer-1 son konsantrasyonunun 4mM, Calcein ise 2mM olması gerekmektedir. Hazırlanan boya solüsyonu tek seferlik ve 100µL hücre peleti üzerine 100µL çalışma solüsyonu kullanıldı. Belirgin bir görüntü için 45 dakika beklenmesi gerekti.

CM-Dil Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

CM-Dil güçlü, fotostabil floresan özelliğe ve minimal sitotoksositeye sahip, uzun süreli olarak intrasellüler membranlar, lipozomlar, virüsler ve lipoproteinleri işaretlemeye imkân veren bir Dil türevidir. Stok solüsyonun hazırlanmasında dimetilsulfoksit (DMSO) kullanıldı. Steril 15ml falkon tüpü içerisinde 1mg CM-Dil, DMSO ile 1-2 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Karanlık ortamda hazırlanan stok solüsyon pipetaj ile homojenize edildikten sonra küçük miktarlarda bölünerek ve ışık görmeyecek şekilde ambalajlanıp -20°C da kullanılıncaya kadar muhafaza edildi. CM-Dil ve benzeri diğer karbosiyaninlerin moleküler ağırlıkları 1'e yakın olduğundan 1 |iM ~ 1 |ig/ml olarak kabul edilir. Boyama solüsyonunun hazırlanması için CM-Dil, PBS içinde 1ml de 5 |iL olacak şekilde hazırlandı

(Sülfonatlanmış karbosiyaninler 20µM'nin üzerindeki konsantrasyonlarda çözünürdüler).

MTT (Mitokondriyel dehidrogenaz aktivitesi) (Sigma) Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

MTT tuzu (Sigma) son konsantrasyonu 10mg/ml olacak şekilde steril PBS ile çözüldü iyice vortekslenerek çözeltinin homojen olması sağlandı. Bu şekilde hazırlanan MTT süspansiyonu, bir filtre yardımıyla süzülerek steril ve tek kullanımlık hazırlandı.

NO (Nitrit Oksit) Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

Griess reaktifi'nin hazırlanması:

20ml distile suya 2,5ml fosforik asit eklenir. Bu çözeltiliye sırasıyla 0,1 g N-(1-Naphthyl) Ethylenediamine ve 1g Sulfanilamide eklenerek karıştırıcıda çözünmesi sağlanır. Son olarak çözelti distile su ile 100ml ye tamamlanır.

Standartların hazırlanması:

10ml distile su içinde 0,345g sodyum nitrit 500µM olacak şekilde çözülür (stok). Daha sonra bir seri oluşturacak şekilde standart hazırlanır.

Safranin O/Fast Green FCF (Sciencell™) Çalışma Solüsyonu Hazırlanması

Safranin O katyonik bir boyadır ve kıkırdak dokuda asidik proteoglikanları boyar. Safranin O glikozaminoglikanlara bağlanarak turuncu-kırmızı arasında bir renk gösterir. Çalışma solüsyonu hazırlamak için içerisinde 20mg toz Safranin O (Sciencell™) boyası üzerine köpürtmeden 20ml dH₂O ilave edildi, iyice homojen hale getirildikten sonra 100ml kapaklı bir çam şişe içerisinde oda ısısında muhafaza edildi. 20mg toz Fast Green FCF (Sciencell™) boyası üzerine köpürtmeden 20ml dH₂O ilave edildi, iyice homojen hale getirildikten sonra 100ml kapaklı bir cam şişe içerisinde oda ısısında muhafaza edildi.

Anti-Collagen Type II Antibody (Millipore) (Tip II Kollajen Antikor) Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

Kıkırdak doku matrisi özellikle Tip II kollajen fibrillerden çok az miktarda da Tip IX, X, XI kollajen fibrillerden oluşmaktadır. Bu nedenle tez çalışmasında Tip II kollajen tespiti

tanısı için Anti-Collagen Type II Antibody (Milipore) 1:1000 oranında dilüye edilerek bir çalışma solüsyonu hazırlandı. Çalışma zamanına kadar -20°C de saklandı.

3.2 METOD

3.2.1 Hücre Kültürü ve Doku mühendisliği Laboratuvarı Kriyobankından Adipoz Doku, Kordon Matris ve Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Hatlarının Çözülmesi

Kriyobankta (sıvı azot tankında) kriyotüpler içerisinde bulunan [284], [285], [283] ve pasaj sayısı 4 olan Adipoz Doku, Kordon Matris ve Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök hücre hatları hızlı bir şekilde sıvı azottan çıkarılarak içerisinde 37°C su bulunan behere konuldu. Tüplerin beherin çeperlerine çarpmasına dikkat edilerek hafif bir şekilde su içerisinde karıştırılarak donmuş hücreler çözdürüldü. Kriyotüp içerisindeki hücreleri %20 DMSO dan hızlıca uzaklaştırabilmek için çözdürülen hücreler hızlıca içerisinde 2ml %10 FBS li DMEM 15ml'lik falkon içerisine alındı ve homojen bir şekilde karışması sağlandı. Daha sonra 25°C de 1200rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelleti üzerine 1ml %10 FBS li DMEM konuldu ve iyice homojen hale getirildi. Thoma lamında sayımı yapılabilmesi için tripan mavisini ile boyandı. Bunun için; 1ml ile süspansiyon edilen hücre pelletinden 2µL alındı ve 50µL DMEM besiyerinde iyice homojen hale getirildi daha sonra tripan mavisini çalışma solüsyonundan 48µL alınarak toplamda 100µL karışım içerisinde yaklaşık 20µL alındı ve üzerinde lamel bulunan Thoma lamı kamaralarına pipet yardımıyla konuldu. Hücre sayımı yapılmak üzere mikroskopa yerleştirilen Thoma lamında canlı hücreler boyanmazken, ölü hücreler hücre zarından boyayı geçirerek mavi renkte görüldü.

Hücre sayısını hesaplamak için; **Thoma lamı sabiti (10.000) × Hücrelerin ortalama sayısı** (Tripan mavisini ile boyanmamış parlak renkli kalan hücrelerin) × **50** (DMEM besiyeri ile sulandırma katsayısı) formülünden faydalanıldı.

Tripan mavisini solüsyonu ile boyanan canlı hücrelerin sayımı yapılarak canlılık oranı belirlendi. Pellet 150.000 hücre düşecek şekilde içerisinde 5ml %10 FBS li DMEM bulunan 25cm²'lik steril flasklara (hücre kültür kabı) konuldu. Hücreler 37°C, %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. Mikroskopta yapılan gözlemler sonucunda 2-3 gün

içerisinde flask yüzeyi kaplanan hücrelerin bir kısmının pasajına devam edilirken bir kısmında tekrar kriyoprezervasyonu yapıldı.

Olfaktör Bulb kaynaklı mezenkimal kök hücreler; 2012-07-04KAP02 numaralı proje kapsamında Türkiye’de ilk defa Uzm. Dr. Ayşegül KARAALTIN tarafından donörlerin olfaktör bulb bölgesinden alınan biyopsilerin Msc. Olga Nehir ÖZTEL tarafından izole edilmesi, karakterizasyonun ve fenotiplendirilmesinin yapılmasıyla kriyobankı oluşturulan bir mezenkimal kök hücre hattıdır.

3.2.2 Adipoz Doku, Kordon Matris ve Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Hatlarının Devamlı Kültürü

Kriyobankta mevcut ve karakterizasyonları yapılmış olan farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin devamlı kültürü %10 FBS içeren DMEM ile yapıldı. Hücrelerin flask tabanını kaplamaları her gün ters mikroskop altında takip edildi. Flask yüzeyini kaplayan hücreler tripsinize işlemine tabi tutuldu. Bu işlemde Tripsin EDTA kullanıldı. Öncelikle üzerlerinde 5ml %10 FBS li DMEM bulunan flaskların süpernantları atıldı ve flask yüzeyine yapışmış olan hücreler 2ml PBS tamponuyla iki kez yıkandı burada amaç FBS’yi hücre yüzeyinden iyice uzaklaştırmaktır. Çünkü FBS tripsin aktivitesini inhibe etmektedir. Daha sonra 1ml tripsin EDTA hücrelerin üstüne kondu ve yaklaşık 5 dakika 37°C de flasklar bekletildi. Hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrıldığı ters mikroskopda gözlemlendi ve tripsin aktivitesini inhibe etmek için üzerlerine 2ml %10 FBS li DMEM besiyeri konuldu iyice flask yüzeyi içerisindeki besiyeri ve tripsin karışımıyla yıkanarak tüm sıvı 15ml’lik falkon tüplere alındı. 1200rpm de 5 dakika santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırılıp, 15ml’lik falkon tüpünün dibinde kalan hücrelerin 1ml yeni hazırlanmış %10 FBS içeren besiyeri ile süspanse edildi ve Thoma lamında sayımı yapılabilmesi için tripan mavisi ile boyandı. Yaklaşık 1000µL’lik hücre peletindeki hücre sayıları hesaplanıp içerisinde 5ml taze besiyeri bulunan 25cm²’lik flask içerisine 150.000 hücre olacak şekilde ekimi yapılan farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kültürüne devam edildi. Farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler 37°C’lik %5 CO₂ içeren etüvde steril şartlar altında inkübe edildi. 2-3 günde bir hücreler flask yüzeyini kaplayana kadar eski besiyeri uzaklaştırıp yerine 5ml’lik taze besiyeri konuldu.

3.2.3 Adipoz Doku, Kordon Matris ve Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Hatlarının Kriyoprezervasyonu

Kültürde bulunan hücreler tripsinize işleminden sonra %10 FBS içeren DMEM ile süspanse edilerek 15ml santrifüj tüpüne alındı. 1200rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve elde edilen yaklaşık 250µL'lik pellet 1ml ye tamamlanarak pipetlendi ve hücre süspanسیونunun tripan mavisini ile sayımı yapıldı. Sayım sonucunda 1ml de 500.000 hücre olacak şekilde 250µL'lik bir hücre süspanسیونu kriyotüp içerisine alındı ve üzerine aynı hacimde %20 DMSO içeren dondurma solüsyonu ilave edilerek karıştırıldı. Dondurma solüsyonu hücre süspanسیونunun üzerine damla damla alındı ve nazikçe pipetlenerek hücre/kriyoprotektan karışımı elde edildi. İçerisinde farklı doku kaynaklarından elde edilen hücrelerin bulunduğu kriyotüp **yavaş dondurma** yöntemiyle dondurularak kriyobanka alındı. **Yavaş dondurma** yönteminde oda sıcaklığında fazla bekletilmeden +4°C de 1 saat, -20°C de 2 saat ve -40°C de tüm gece bekletilen içerisinde hücre bulunan kriyotüp ertesi gün kriyobankta belirlenen raflara yerleştirildi.

3.2.4 Poli (ε-kaprolakton) (PCL) Scaffold "spiral wounding" şeklinde elde edilmesi

Elektro-eğirilmiş mikro gözenekli membranlardan oluşan, biyobozunur, FDA (Food and Drug Administration) onaylı PCL scaffold tasarlanmasında ilk olarak; kalay oktoat katalizörlüğünde ε-kaprolakton monomerinden düşük molekül ağırlıklı (10 kDA) ve yüksek molekül ağırlıklı (85 kDA) poli(ε-kaprolakton) (PCL) sentezlendi. Sentezlenen PCL'ler ağırlıkça %80 düşük - %20 yüksek molekül ağırlıklı polimer içerecek şekilde karıştırıldı. Hazırlanan karışım elektro-eğirme yöntemi kullanılarak örgüsüz nanofiber yapıda mikro gözenekli membranlar üretildi. Elde edilen membranların, molekül ağırlıkları **GPC (Jel Geçirgenlik Kromatografisi)**, kimyasal ve yapısal analizleri **FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi)** ve **H-NMR (Proton Nükleer Manyetik Rezonans)**, termal davranışları ise **DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre)** ile incelendi. Morfolojik yapıları ise **SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu)** kullanılarak gösterildi. Karakterizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra elektro-eğirilmiş mikro gözenekli membranlardan dairesel olarak katlama yöntemi ile makro kanallara sahip üç boyutlu, biyobozunur scaffoldlar hazırlandı [282]. Hazırlanan scaffoldlar 8mm çaplı ve

1mm kalınlığında olacak şekilde dizayn edilip, etilenoksit gazı ile steril edildikten sonra 3 boyutlu kültür çalışmaları için hazır hale getirildi.

3.2.5 Farklı doku kaynaklı kök hücrelerin poli (ϵ -kaprolakton) scaffold üzerinde üç boyutlu kültür modelinin geliştirilmesi ve optimizasyonu

Farklı doku kaynaklı kök hücrelerin steril edilmiş PCL scaffold üzerinde üç boyutlu kültürünün optimizasyonu için öncelikle PCL scaffold üzerine mezenkimal kök hücrelerimizin proliferasyonu için besiyeriyle (%10 FBS li DMEM) kültürü takip edildi. Burada amaç PCL scaffold yüzeyine farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin tutunup tutunmadığını gözlemlemektir. PCL scaffold üzerine ekilecek hücre sayısının tespiti için ise bir çok makaleden yararlanıldı [15], [16], [283], [284], [285] ve scaffoldun toplam yüzey alanına göre hücre sayısı tespit edildi bulunan sayı ile optimizasyon çalışmaları yapıldı.

Optimizasyon çalışmalarının kapsamında 12 gün boyunca üç boyutlu hücre kültür modelinin hücrelerin gelişiminin takibi için farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin bir kısmı CM-Dil ile işaretlenerek PCL scaffold üzerine ekilirken, bir kısmı ise MTT analizi, SEM ve canlı/ölü boyasıyla boyanmak için direkt olarak PCL scaffold üzerine ekildi.

PCL Scaffoldun Alanına Göre Hücre Hesabı: [15], [16], [283], [284], [285]

$$PCL\ Scaffold\ Alanı = \pi \times r^2$$

$$(R = 8mm, r = 4mm, kalınlık = 1mm, \pi \cong 3)$$

$$0,5 \cong 3 \times (0,4)^2$$

0,5cm² alana sahip PCL scaffoldun 0,1 cm² sine 10⁵ hücre düşecek şekilde her mezenkimal kök hücre için geliştirilen üç boyutlu hücre kültür modelinde 100µL de 5.10⁵ hücreye ihtiyaç vardır.

3.2.5.1 Scaffold yüzeyinde hücrelerin belirlenmesi için farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin CM-Dil ile İşaretlenmesi

Bunun için CM-Dil ile işaretlenen hücreler PCL scaffold yüzeyine ekildi. CM-Dil ile işaretlemek için flask yüzeyinin yaklaşık %90'nını kaplayan farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile 2 kez yıkandı. 5ml PBS içinde hazırlanan CM-Dil (invitrogen) hücrelerin üzerine eklendi. Hücreler 37°C de 4 dakika, ardından 4°C de 15 dakika inkübe edildi. Düşük sıcaklıktaki inkübasyon boyanın plazma membranında görünür olmasını sağlarken endositozisi yavaşlatır. Böylece boyanın sitoplazmik veziküllere yerleşmesini engeller. Böylelikle boya sadece membranda görünür halde kalmaktadır.

3.2.5.2 CM-Dil ile İşaretlenen Farklı Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin PCL Scaffold da Ekimi

Boyama işlemi tamamlandığında flasttaki boya uzaklaştırıldı, hücreler PBS ile yıkandı ve tripsinize işleminden sonra tripan mavisini ile sayılan kök hücreler PCL scaffoldlar üzerine 100µL de 500.000 olacak şekilde ekildi, 37°C %5 CO₂ içeren steril etüvde 2-4 saat boyunca PCL scaffoldun hücreleri emmesi beklendi. Daha sonra CM-Dil ile boyanan farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin PCL scaffold üzerinde proliferasyonları ters mikroskopta yeşil filtrede 12 gün boyunca takip edildi.

3.2.5.3 Farklı Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin üç boyutlu kültür Modellerinde MTT Analizi

On iki gün boyunca devam ettirilen kültürde 3., 6., 9. ve 12. günlerde PCL scaffold üzerine CM-Dil ile işaretlenmemiş farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile hazırlanmış yapılar 2ml steril PBS ile 2 kez yıkandı. Daha sonra bu yapılar steril bir şekilde 5 parçaya bölündükten sonra 96 kuyucuklu plakların 5 kuyucuğuna yerleştirildi. Her kuyucuğa 10µL MTT solüsyonu eklenerek 4 saat 37°C de inkübe edildi. Daha sonra reaksiyonun durması için her bir kuyucuğa 100µL DMSO eklenerek yarım saat sonra canlılıkla orantılı miktarda oluşan formazan kristalleri çözündürüldü. 96'lık plaka da ELISA Reader'de 570nm de ölçümü yapılarak canlılık analizi yapıldı.

3.2.5.4 Farklı Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Üç Boyutlu Kültür Modellerinde Canlı/Ölü Boyaması

PCL scaffold üzerindeki hücrelerin canlılıklarını koruyup korumadığını anlayabilmek için CM-Dil ile işaretlenmemiş farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile hazırlanmış üç boyutlu yapıların 12 gün boyunca proliferatif besiyeri ile kültürü devam ettirildi. Bu yapılar 2ml PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra üzerlerine 100µL PBS konuldu. Daha sonra üzerine 100µL canlı/ölü boyası çalışma solüsyonu ilave edildi ve 45 dakika karanlık ortamda oda ısısında bekletildi. İnvert mikroskopta mavi filtrede farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin PCL scaffold üzerindeki görüntüsü gözlemlendi.

3.2.5.5 Farklı Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin PCL Scaffold Üzerinde 12. gününde SEM ile Görüntülenmesi İçin Örnek Hazırlama Optimizasyonu

SEM (taramalı elektron mikroskop); yüksek enerjili elektronlar ile yüzeyi tarayarak aldığı sekonder ışınlar sonucunda yüzeyin topografik yapısı hakkında bilgi almamızı sağlar. Ayrıca SEM ile hücrelerin morfolojileri de incelenebilir. Bu çalışma için de iki farklı protokol incelendi. Birinci prosesinde; %2,5 glutaraldehit ile 3 saat fikse edilen üç boyutlu yapılar %60, 70, 80, 90, saf alkol serilerinden 15'şer dakika geçirildikten sonra iyice kuruması için 37°C de çalışma gününe kadar bekletildi. İkinci protokolde %2,5 glutaraldehit ile 4°C de tüm gece bekletilen numuneler daha sonra aseton ile yıkandı. İyice kuruması için 37°C de çalışma gününe kadar bekletildi. Jeol JSM-5410LV SEM cihazıyla 20kV de 750X de numuneler incelendi.

3.2.6 Optimize Edilen Üç Boyutlu Kültürlerin Kondrojenik Farklılaşma Besiyeri İle Kültürünün Devam Ettirilmesi

Üç boyutlu kültürlerin üzerindeki farklı kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşması için hazırlanmış kondrojenik farklılaşma besiyeri (Gibco) kullanıldı. Tripan mavisi ile boyanarak Thoma lamında sayılan hücre peleti her bir PCL scaffold üzerinde 100µL 5×10^5 adet hücre peleti olacak şekilde küçük damlacık halinde PCL scaffoldda koyuldu. 37°C de 2-4 saat farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin PCL scaffoldda yapışmaları için beklendi. Daha sonra üzerine 500µL özel olarak hazırlanmış kondrojenik farklılaşma besiyeri ile kültüre edildi. Hazırlanan üç

boyutlu kültür kondrojenik farklılaşma besiyeri ile 26 gün boyunca kültüre edildi [15]. Kondrojenik farklılaşma besiyeri üç boyutlu kültüre zarar vermeden hafta da 2-3 defa eski besiyerinin yarısı atılarak taze besiyerinden de 300µL konularak değiştirildi. 3 boyutlu hücre kültürlerinin 26 gün boyunca kondrojenik farklılaşmaları esnasında canlılıkları (Canlı/Ölü Boyası ve MTT), gen ekspresyonları, NO analizleri, Scaffold yüzeyinde SEM ile morfolojileri ve histolojik gelişimleri takip edildi.

3.2.6.1 Kondrojenik Farklılaşma Süreci Boyunca (1., 7., 14. ve 26. Günlerinde) Canlı/Ölü Boyaması

PCL scaffold üzerine ekilmiş farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşma süreci boyunca belirli periyotlar da (birinci, yedinci, on dördüncü ve 26. günlerinde) optimize edilen üç boyutlu yapılar 2ml PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra üzerlerine 100µL PBS konuldu. Daha sonra üzerine 100µL canlı/ölü boyası çalışma solüsyonu ilave edildi ve 45 dakika karanlık ortamda oda ısısında bekletildi. Ters mikroskopta farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin PCL scaffold üzerindeki görüntüsü gözlemlendi.

3.2.6.2 Kondrojenik Farklılaşma Süreci Boyunca (1., 7., 14. ve 26. günlerinde) MTT Analizi

PCL scaffold üzerine ekilmiş farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşma süreci boyunca (birinci, yedinci, on dördüncü ve 26. günlerinde) üç boyutlu yapılar, 2ml steril PBS tamponu ile 2 kez yıkandı. Steril bir şekilde 5 parçaya bölündükten sonra 96 kuyucuklu plakların 5 kuyucuğuna yerleştirildi bu sayede her bir kuyucukda yaklaşık 100.000 hücre olması sağlandı. Her kuyucuğa 10µL MTT solüsyonu eklenerek 4 saat 37°C de inkübe edildi. Reaksiyonun durması için her bir kuyucuğa 100µL DMSO eklenerek yarım saat sonra canlılıkla orantılı miktarda oluşan formazan kristalleri çözündürülmüş oldu. Daha sonra 96'lık plakda ELISA Reader'de 570nm de ölçümü yapılarak canlılık analizi yapıldı.

3.2.6.3 Kondrojenik Farklılaşma Süreci Boyunca (7., 14., 21. ve 26. günlerinde) RNA İzolasyonu

PCL scaffold üzerine ekilmiş farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşma süreci boyunca belirli periyotlarda (yedinci, on dördüncü ve 26. günlerinde) optimize edilen 3 boyutlu yapılardan RNA izolasyonu için RNA izolasyon kiti (IDPURE™ Spin Column Total RNA Miniprep Kit) kullanıldı. RNA izolasyonu için inkübasyon sonrasında 3 boyutlu yapılar üzerinde bulunan farklılaştırma besiyeri uzaklaştırıldı. 2ml PBS 2 kez 3 boyutlu yapılar yıkandı. 3 boyutlu yapılar üzerine 600µl RLT solüsyonu eklendi ve iyice vortekslenerek 50°C de RNase free tübe içerisinde 15 dakika inkübe edildi. Eşit miktarda %70 etanol ile pipetle karıştırılarak homojenize edildi. 2 ml toplama tüpü kolona yerleştirildi. Etanol karışımı kolona yerleştirildi. 8000 rpm de (6000 g) 1 dakika santrifüj edildi. 500µl RW solüsyonu kolona eklendi. 8000 rpm de (6000 g) 1 dakika santrifüj edildi. Spin kolona yeni bir toplama tüpü yerleştirildi. RPE solüsyonu 22ml + 88ml %100 etanol eklenerek 4:1=1/5 oranında olacak şekilde hazırlandı. Kolona 500µl RPE eklendi. 8000 rpm de 1 dk santrifüj edildi. Sıvı atılıp bir kez daha RPE atıkları için spin edildi. 1,5ml RNase free tübe spin kolonu yerleştirildi. Daha önceden 50°C de ısıtılmış olan DEPC'li su kolonun tam orta merkezine 30µl olacak şekilde eklendi. 2 dakika oda ısısında inkübe edildi. 10.000 rpm de (8000 g) 1 dakika santrifüj edildi. RNA -70°C de muhafaza edilmesi gerekirken laboratuvarımızda olmadığı için -40°C de saklandı.

3.2.6.4 Kondrojenik Farklılaşma Süreci Boyunca (7., 14., 21. ve 26. günlerinde) Total RNA Miktarının ve Kalitesinin Belirlenmesi

İzole edilen total RNA örneklerinin nanodrop spektrofotometresi kullanılarak 260nm ve 280nm dalga boyundaki okumalarla RNA miktarları ve saflık kontrolleri belirlendi. 2µl DEPC'li su ile blank alınarak her örnek için 1µl alınıp cihazda okutulan total RNA örneklerinin konsantrasyonları ng/µl cinsinden belirlendi. Ölçüm 2µl RNA kullanılarak 280, 260, 230nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak saflık ve konsantrasyon incelemeleri yapıldı. 260/280 ve 260/230 oranları saflık açısından uygun olan RNA'lar çalışmaya kabul edildi. Saflık oranları (OD 260/OD 280) 1,60-2,00 arasında değerleri anlamlı kabul edildi.

3.2.6.5 Kondrojenik Farklılaşma Süreci Boyunca (21. ve 26. günlerinde) İzole Edilen RNA Örneklerinden cDNA Sentezi

cDNA sentezi *cDNA Synthesis Kit Manual* (Takara) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir örnek için ayrı ayrı bir mikro tüp içerisine; 1 µl Random primer, 1µl dNTP karışımı ve RNA eklenerek ve son hacim 10µl ye RNase free dH₂O ile tamamlandı. 65 °C de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası buz üzerine örnek tüpleri alındı. Sonrasında her bir tüpün üzerine 4µl RNA Primer karışımı, 0.5µL RNase İnhibitör ve 1 µl PrimeScript Rtase ve 4.5µl RNase free dH₂O eklendi. Tüpler yavaşça karıştırıldı. Sonrasın da örnekler 30°C de 10 dakika, 42°C de 60 dakika ve enzim aktivasyonu için 95°C de 5 dakika inkübe edildi ve buz üzerine alındı. Oluşturulan cDNA örnekleri sonradan kullanılmak üzere -40°C ye kaldırıldı.

3.2.6.6 Kondrojenik Farklılaşma Süreci Boyunca (26. günlerinde) cDNA'ların PZR İle Çoğaltılması ve Jel Elektrofrezde Görüntülenmesi

Üç boyutlu yapılardan elde edilen 26. güne ait cDNA lar Col2A1 gen varlığının belirlenmesi (F- CCGCGGTGAGCCATGATTCGC, R- GTCGTCGCAGAGGACAGTCCCAG, 210 bp) için AccuStart™ II PCR Supermix (2X) (Quanta Biosciences™) PZR karışımı kullanılarak hazırlandı. Bu karışımda 12,5µL AccuStart™ II PCR Supermix (2X), 500nM Col2A1 geninin forward ve reverse primerleri, 5µL cDNA ve son hacim 25µL olacak şekilde nuclease free water kullanıldı. PZR karışımı 95°C de 3 dakika, 95°C 30 saniye ve 55°C de 30 saniye olmak üzere 45 tekrar, son olarak 72°C 2 dakikadan sonra 4°C sonsuzda olacak şekilde bir PZR reaksiyonu kuruldu. Reaksiyon sonucu elde edilen ampliconlar %3 agaroz jel de yürütüldü. Jel, Elektrofrez kalıbına dökülerek uygun kalınlıktaki taraklar ile kuyucuklar hazırlandı her kuyucuğa; 1µl Loading Dye (Fermentas) ve 5µl amplicon yüklendi. Örneklerin DNA uzunluğunu ölçebilmek için 100 bp uzunluğunda 1µl DNA Ladder, 1µl Loading Dye ile yüklendi. Pozitif ve negatif kontrollerinde kuyucuklara eklenmesiyle, Jel 55 mA ve 110 V ile yürütüldü.

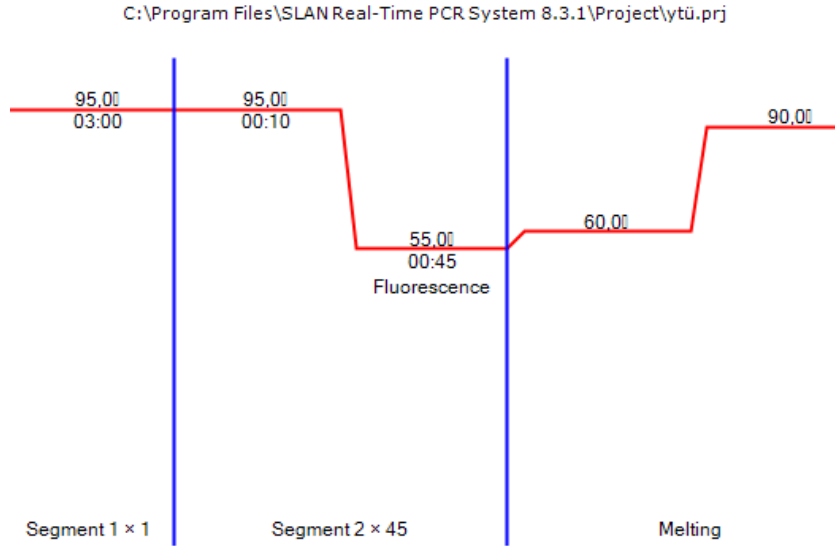
3.2.6.7 Kondrojenik Farklılaşma Süreci Boyunca (21. ve 26. günlerinde) cDNA'ların Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi

Üç boyutlu yapılardan elde edilen mRNA seviyelerindeki değişiklikler eş zamanlı Montania® 4896 cihazında incelendi. Sox9, Col2A1 ve Col1A1 gen bölgeleri bulunduran DNA fragmanının PZR ile amplifikasyonu yapıldı ve spesifik allel PZR varlığı syber green ile belirlendi. Kontrol gen olarak GAPDH kullanıldı (Çizelge 3,1.) [15].

Çizelge 3.1 Eş Zamanlı PZR de kullanılan gen bölgeleri ve primerler

Gen Adı	Primer Dizisi	Accession Numarası	Primer Boyu (bp)
Sox9 (P3)	F- AGCCGAAAGCGGAGCTCGAAACT R- GCACTTAGGAAGGCGCGGGGT	NM000346.3	215 bp
Col2A1 (P2)	F- CCGCGGTGAGCCATGATTCGC R- GTCGTGCGAGAGGACAGTCCCAG	NM001844.4	210 bp
Col1A1 (P1)	F- CCCTCCCAGCCACAAAGAGTCT R- GGGTGACTCTGAGCCGTCGG	NM000088.31	348 bp

PerfeCta® SYBR® Green Supermix (Quanta Biosciences™) kullanılarak hazırlandı. Eş Zamanlı PZR için 25µL PerfeCta® SYBR® Green Supermix den, 500nM belirlenen gen bölgelerine özel forward ve reverse primerleri, cDNA'dan 5µL ve son hacim 50µL olacak şekilde nuclease free water kullanıldı. Hazırlanan karışım ile aşağıdaki gibi eş zamanlı PZR reaksiyonu kuruldu.



Şekil 3.1 Eş zamanlı PZR döngüsü

3.2.6.8 Kondrojenik Farklılaşmalarının 14. ve 26. günlerinde SEM ile görüntülenmesi için optimize edilen proses ile örnek hazırlanması

Farklı doku kaynaklı kök hücrelerin poli (ϵ -kaprolakton) (PCL) scaffold üzerinde kondrojenik farklılaşmalarının 14. ve 26. günlerinde SEM ile görüntülenmesi için %2.5 gluteraldehit ile +4°C de tüm gece bekletilen numuneler daha sonra aseton ile yıkandı. Sonra iyice kuruması için 37°C de çalışma gününe kadar bekletildi. Jeol JSM-5410LV SEM cihazıyla numuneler incelendi.

3.2.6.9 İmmünohistokimyasal Boyamalar İçin Doku Takibi Optimizasyonu

PCL'den hazırlanan scaffoldların -60°C ve +60°C de bozulmaları ve ksilen, toluen gibi organik çözücülerde ise oda ısısında bile çözünmesinden dolayı hazırlanan 3 boyutlu yapılar parafin bloklara gömülmek için doku takibine girmeden önce %5'lik agaroz jellere gömüldü. Bu sayede parafinde erimedi. Bunun için hazırlanan %5'lik agaroz jel daha sıcakken temiz bir lam üzerine pastör pipeti yardımıyla bir damla damlatıldı, üstüne oda ısısında temiz bir filtre kâğıdının üzerinde biraz kuruması beklenen üç boyutlu yapı kondu ve onunda üzerine tekrar %5'lik agaroz jelden damlatılarak üç boyutlu yapının her yerinin jel ile kapanması sağlandı. Agaroz jel sıcak olduğu için üç boyutlu yapıda biraz çözülme gözlemlendi. Kuruyan jelle sarı üç boyutlu yapı bir gece +4°C de %10 formalin çözeltisi içerisinde bekletildi. Ertesi gün oda ısısında el ile doku takibi

yapıldı. Bunun için; %70 Alkol 15 dakika, %95 Alkol 15 dakika, %95 Alkol 15 dakika, Saf Alkol 15 dakika, Saf Alkol 15 dakika, Ksilen 15 dakika, Ksilen 15 dakika, Sıvı parafin 15 dakika, Sıvı parafin 15 dakika, Parafine gömme işleminden geçirilen agarozu sarılı üç boyutlu yapılar -20°C de parafinlerin donması beklendi ve daha sonra Leica® RM 2125 RT mikrotom cihazı ve Leica marka mikrotom bıçakları kullanılarak 8µm-15µm arasında kesitleri alınmaya çalışıldı.

PCL'den hazırlanan scaffoldlar doku takibindeki problemlerden ötürü frozen kesitleri alınmak istendi. Bunun için oda ısısında temiz bir filtre kâğıdının üzerinde biraz kuruması beklenen 3 boyutlu yapılar özel kriyoprotektan jeller ile kriyostat cihazında Leica® CM 1850 kriyostat cihazında -30°C da dondurulup kullanılarak 8µm-10µm arasında kesitleri alınmaya çalışıldı. Her iki yöntemle de alınan kesitler pozitif şarjlı lamalar üzerine kesitlerin boya çalışmaları boyunca düşmemesi için yapıştırıldı.

3.2.6.9.1 Safranin O/Fast green (Sciencell) ve Alcian Blue/Nuclear fast red (Sciencell) boyanması

Belirlenen periyotlarda (7., 14., 26. günlerde) Safranin O/Fast Green (Sciencell) ve Alcian Blue/Nuclear fast red (Sciencell) histolojik boyama işlemleri için frozen kesitlerden veya/ve parafin kesitlerden 8µm-15µm arasında kesitler alındı. Üç boyutlu yapıları ksilen de çözünmesinden ötürü frozen boyama prosedürü takip edildi. Bunun için +37°C de kuruması için bir gece beklenen örneklerden parafin kesit olan örnekler daha sonra +70°C de parafinin erimesi için bekletildi ama bu süreçte PCL scaffold erimemesi için sürekli doku kesitleri gözlemlendi. Safranin O/Fast green (Sciencell) boyaması için hazırlanan boyama solüsyonları kullanıldı. PCL scaffoldun özel durumundan ve kesitlerinde çok zor alınmasından ötürü yatay düzlemde pasteur pipetiyle boyaların damlatılmasıyla gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle 2ml saf alkol pasteur pipetiyle lamın üzerine damlatıldı ve 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra pasteur pipeti yardımıyla 2ml dH₂O ile alkolün yıkanması sağlandı. 2ml %0.1 Fast Green solüsyonu ile 5-10 dakika arasında kesit üzerine damlatılarak boyandı. Daha sonra boya uzaklaştırıldı ve üzerine %1 asetik asit (Sciencell™,8348c) 10-15 saniye duracak şekilde pasteur pipetiyle damlatıldı. Asetik asitte uzaklaştırıldıktan sonra 2ml %0,1 Safranin O boyası damlatılarak 20-30 dakika boyanması sağlandı ve boya

uzaklaştırılarak dH₂O ile yıkanan kesitler kuruması için 37°C'lik etüve kaldırıldı. Kuruyan lamaların üstüne enterlan damlatılarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskobuyla preparatlar incelendi.

Alcian Blue/Nuclear Fast Red (Sciencell, 8378) boyaması için kit kullanıldı. PCL scaffoldun özel durumundan ve kesitlerinde çok zor alınmasından ötürü yatay düzlemde pastör pipetiyle boyaların damlatılmasıyla gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle 2ml saf alkol pastör pipetiyle lamın üzerine damlatıldı ve 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra pastör pipeti yardımıyla 2ml dH₂O ile alkolün yıkanması sağlandı. Pastör pipeti yardımıyla kesitlerin üzerine 2ml %3'lük asetik asit (Sciencell, 8378c) damlatıldı ve 3 dakika bekletildi. Asetik asit uzaklaştırılarak 2ml %1 Alcian Blue (pH: 2,5) ile 30-60 dakika boyandı. Boya uzaklaştırılarak 2 dakika 2ml dH₂O ile yıkanarak üzerine %0,1'lik Nuclear Fast Red 10-20 dakika uygulandı ve boya uzaklaştırılarak dH₂O ile yıkanan kesitler kuruması için 37°C'lik etüve kaldırıldı. Kuruyan lamaların üstüne enterlan damlatılarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskobuyla preparatlar incelendi.

3.2.6.9.2 Anti-Collagen Type II Antibody (Milipore) ile Tip II kollajen oluşumu gözlenmesi

Belirlenen periyotlarda (1., 7., 14., 26. günlerde) Anti-Collagen Type II Antibody (Milipore) immünolojik boyama işlemleri için frozen kesitlerden veya/ve parafin kesitlerden 8µm-15µm arasında kesitler alındı. Anti-Collagen Type II Antibody (Milipore) 1:1000 oranında çalışmaya hazırlandı, fakat hem frozen kesitlerin hem de parafin blok kesitlerin lama yapışmaması yüzünden bu immün boyama prosesi uygulanamadı.

3.2.6.10 Üç Boyutlu Kültürlerin Kondrojenik Farklılaştırma Mediumu ile Kültüre Edilmesi Sonucunda Oluşan Süpernatantlardan Nitrik Oksit (NO) Analizi

NO analizi için üç boyutlu yapıların belirlenen periyotlarda (1., 7., 14., 26. günlerinde) süpernatantları alındı ve çalışma zamanına kadar -20°C de saklandı. NO ölçümü yapılacak üç boyutlu yapılar kültürlerinin süpernatantlarından 50µl alınarak 96'lık plakaya konuldu. Üzerlerinde 50µl Griess reaktifi eklenerek oda sıcaklığında karanlık

ortamda 10 dakika bekletildi. Son olarak 540nm'de ELISA Reader da absorbans alındı [286].

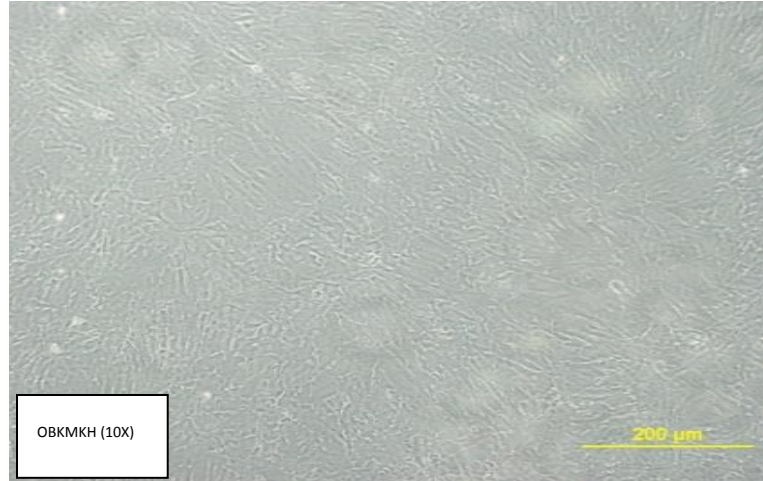
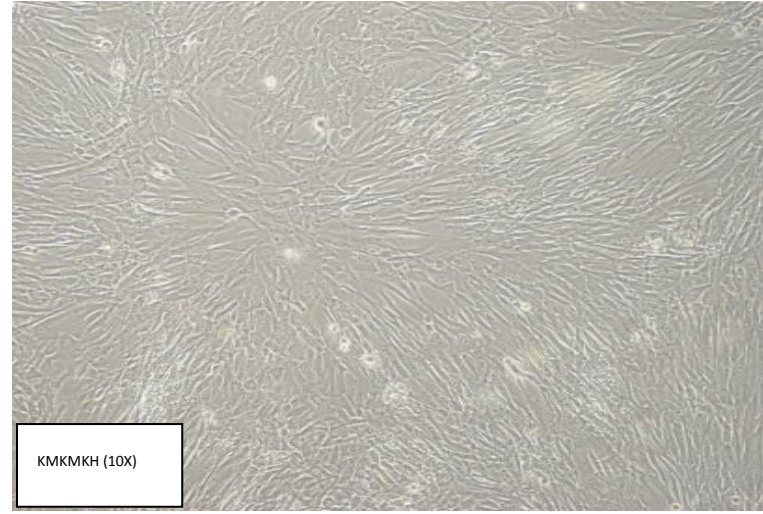
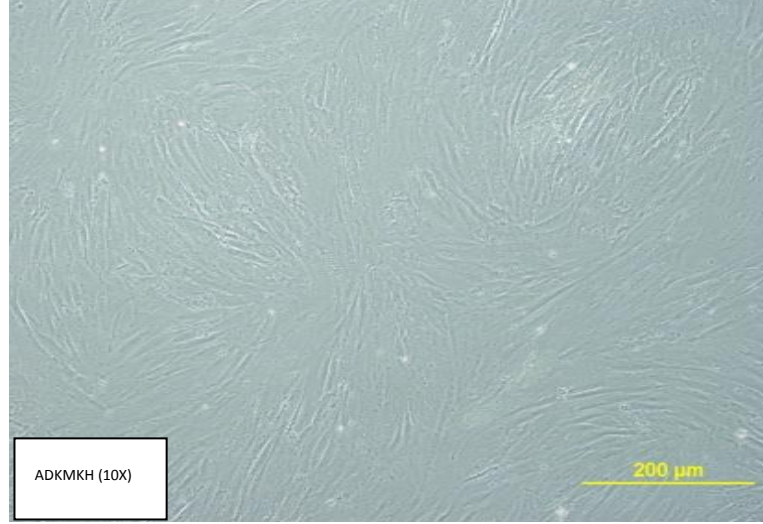
DENEYSEL SONUÇLAR

4. DENEYSEL SONUÇLAR

4.1 SONUÇLAR

4.1.1 Kriyobanktan Adipoz Doku Kaynaklı, Kordon Matrisi Kaynaklı ve Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Hatlarının Çözülmesi, Devamlı Kültürünün Yapılması ve Kriyoprezervasyonu

Kriyobanktan çıkarılan farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler %10 FBS içeren DMEM besiyeri ile kültüre edildi. Kültürde üçüncü günlerinde tamamıyla flaskı kaplayan kök hücrelerin her deney grubu için 10^5 hücre olacak şekilde çoğalması sağlandı. Elde edilen sonuçların morfolojik görüntüsü ve kültür alanının kaplaması aşağıdaki şekilde sunulmuştur (Şekil4.1). Şekilde görüldüğü gibi kriyoprezervasyon sonrası farklı doku kaynaklarından elde edilen mezenkimal kök hücrelerin normal şekilde proliferasyon olduğu ve mikroskopik alanda hiçbir atipik hücreye rastlanmadığı saptanmıştır. Elde edilen bu hücreler daha sonraki aşamalarda PCL scaffold ile etkileşimi için kullanılmıştır.



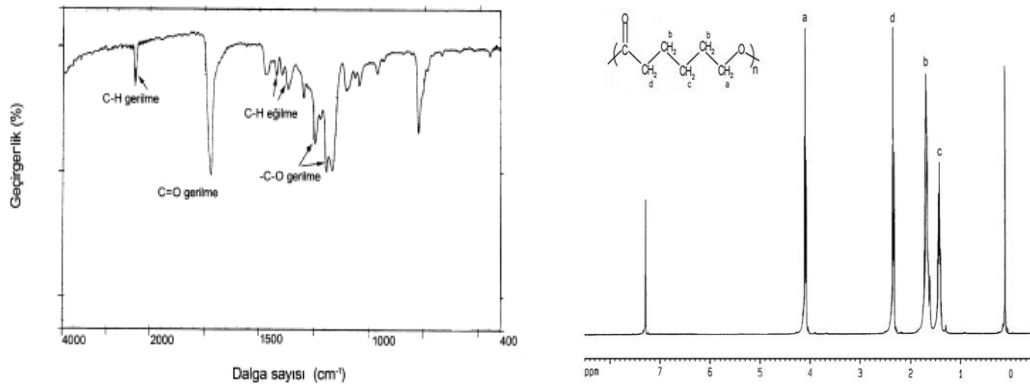
Şekil 4.1 Farklı Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Flask Tabanını Kaplamış Görüntüsü (10X)

4.1.2 Poli (ϵ -kaprolakton) Scaffoldun "spiral winding" Şeklinde Hazırlanması

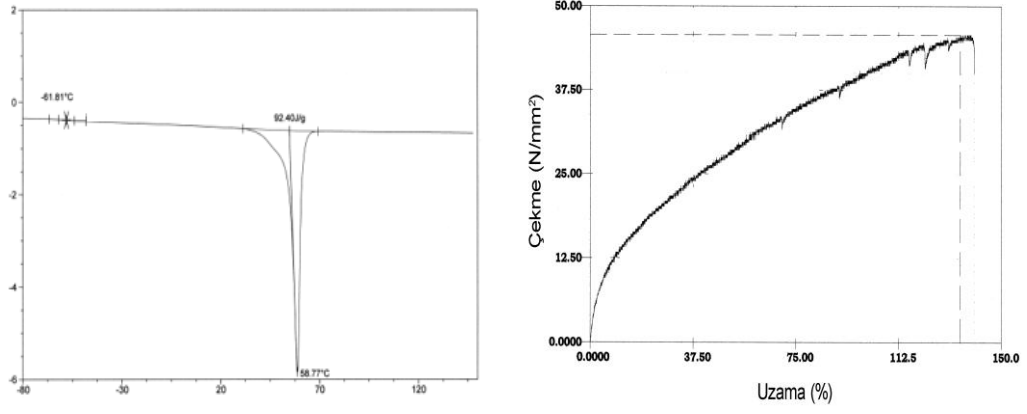
Alper İşoğlu tarafından hazırlanan polimer çözeltisinden elektro-eğirme ile nanofiber üretiminde; çözeltinin iletkenliği, viskozitesi, dielektrik sabiti ve yüzey gerilimi, yapının kimyasal ve fiziksel özelliklerini doğrudan etkileyen en temel parametrelerdir. Bu parametreler göz önünde bulundurularak optimum elektro-eğirme koşullarının belirlenmesi için, sunulan çalışmada öncelikle sentezlenen yüksek (85 kDa) ve düşük (15 kDa) molekül ağırlıklı PCL'lerden scaffoldlar hazırlanmıştır.



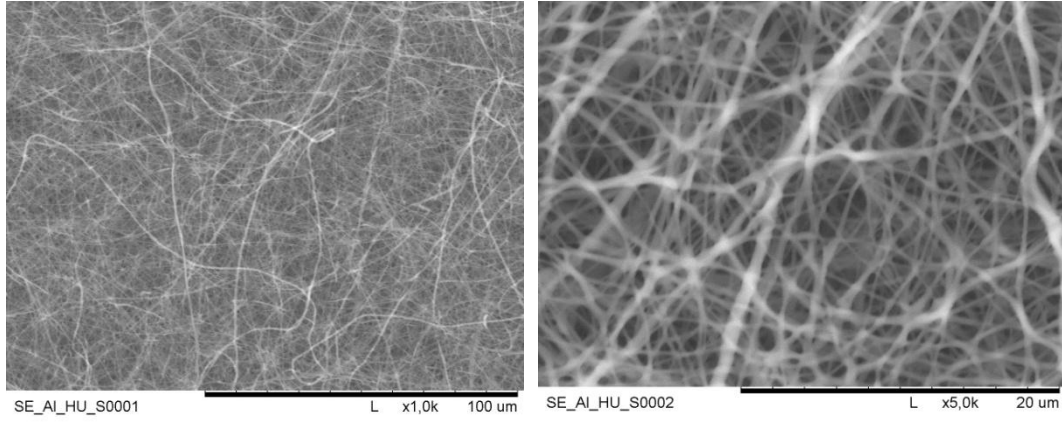
Şekil 4.2 Elektro-eğirme Yöntemi ile Hazırlanmış PCL Membranlar [282].



Şekil 4.3 Membranlara ait FTIR ve H-NMR Spekturumu [282].

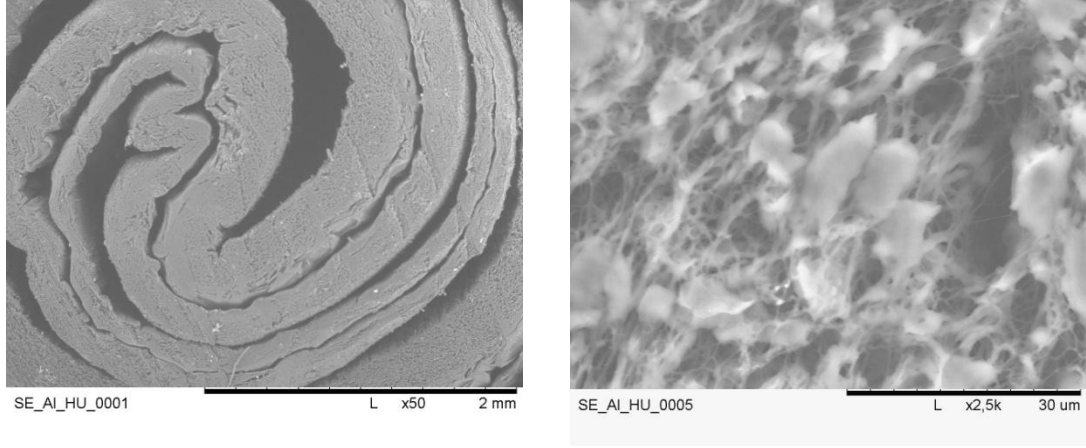


Şekil 4.4 Membranlara ait DSC termogramları ve ait çekme-uzama grafiği [282].



Ortalama fiber çapı (nm)	Ortalama gözenek boyutu (nm)
517±198	1076±494

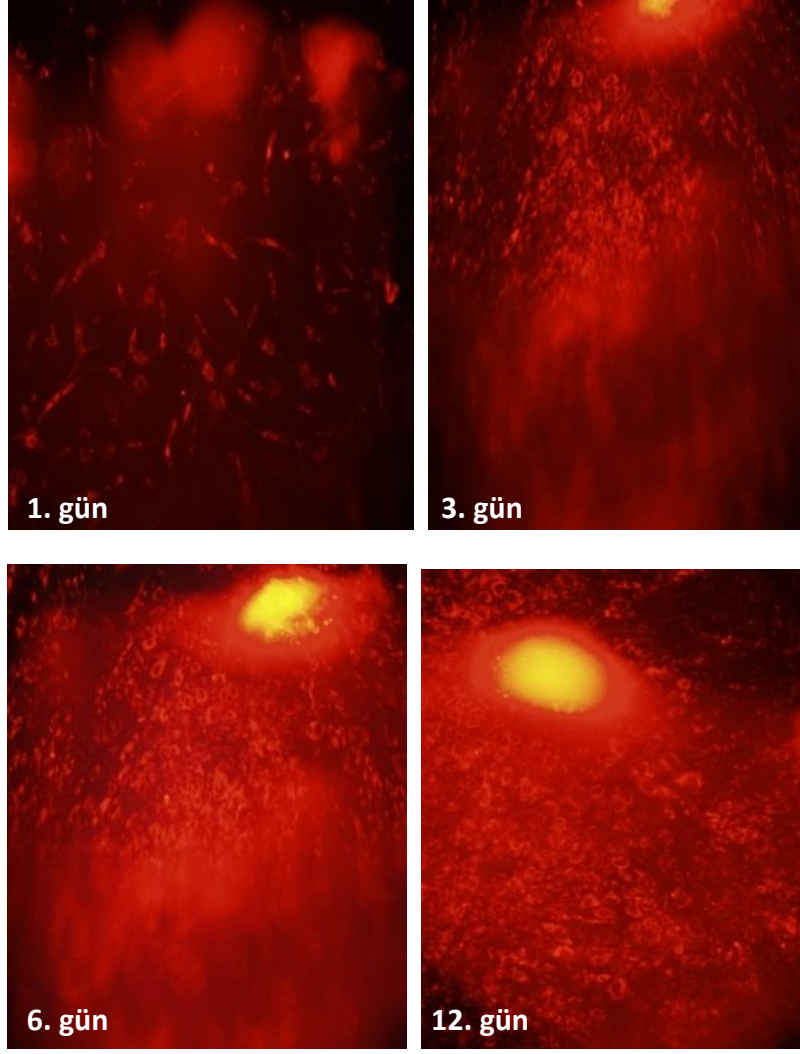
Şekil 4.5 Membranların 1000 ve 5000 büyütmede SEM görüntüleri [282].



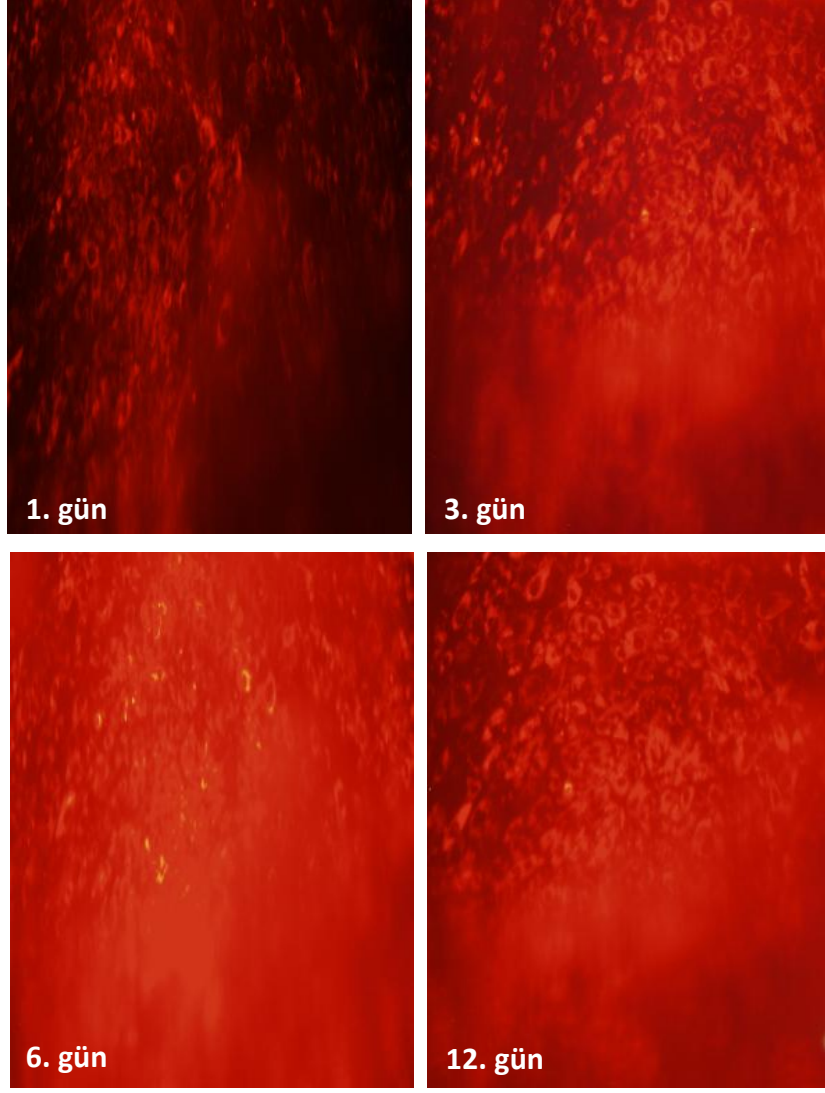
Şekil 4.6 Mikro Gözeneklere ve Makro Kanallara Sahip Scaffold 50 Ve 2500 Büyütmede SEM Görüntüleri [282].

4.1.3 Farklı Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Üzerinde Üç Boyutlu Kültür Modelinin Oluşturulması, Geliştirilmesi ve Optimizasyonu

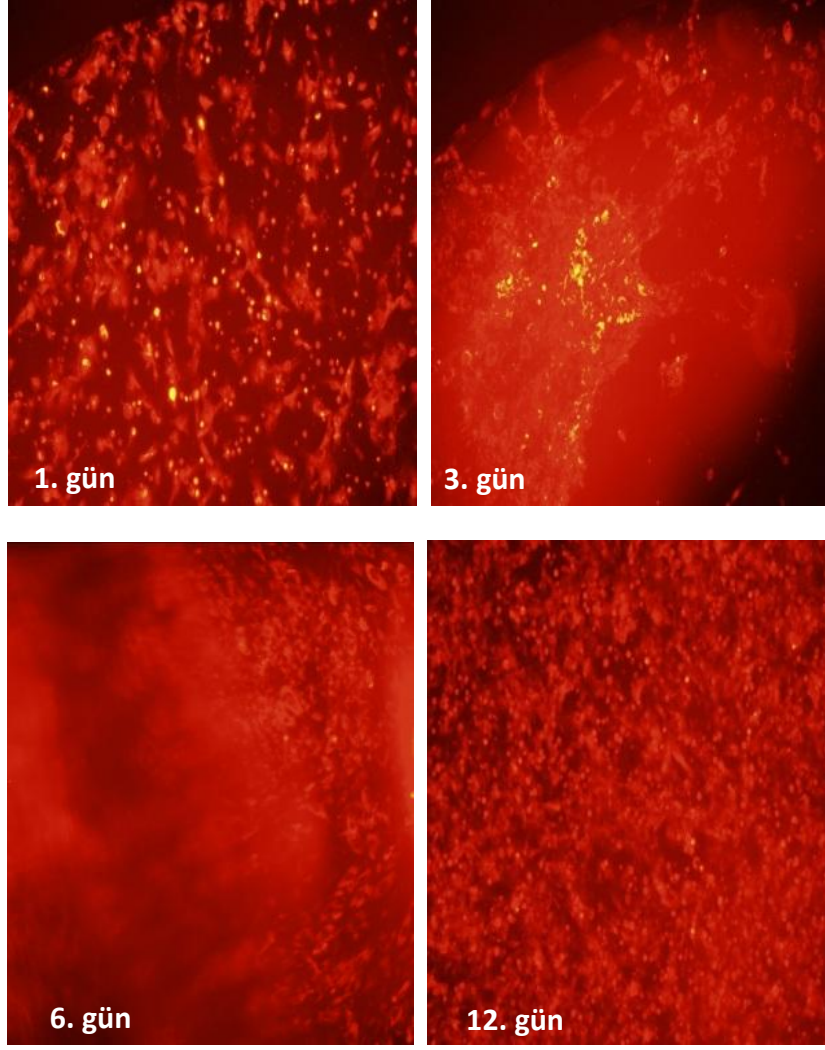
Materyal metot bölümünde bahsedilen protokole uygun olarak CM-Dil ile boyaması yapılan farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler, ters faz kontrast mikroskop altında UV ışıkta, yeşil filtre ile mebranları boyanmış bir şekilde görüntülendi. Sonuç olarak 12 gün boyunca devam ettirilen üç boyutlu kültürde PCL scaffold üzerinde farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin tutunduğu ve proliferasyonu makroskobik açıdan tespit edilmiştir. PCL scaffoldun her mezenkimal kök hücre türü için en yoğun proliferasyon olduğu günün 6.günde olduğu görülmektedir. Fakat kordon matrisin, adipoz ve olfaktör bulb mezenkimal kök hücrelerine oranla UV ışıkta daha yoğun görüldüğü tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekillerde sunulmuştur. Şekillerde de görüldüğü gibi her üç hücrenin altıncı gününde hücre yoğunluğu daha öncekilere göre daha fazla olmuştur (Hücre yoğunluğu fazla olan bölgelerde CM Dil ile boyanmış hücre daha yoğun kırmızı görülmektedir.) Ancak kordon matrisi elde edilen kök hücrelerin PCL scaffold üzerindeki üç boyutlu kültürünün diğer hücrelerden elde edilen üç boyutlu kültürlerine göre daha yoğun olduğu görülmektedir.



Şekil 4.7 CM-Dil ile Boyanmış Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Üzerindeki Görünümü (10X)



Şekil 4.8 CM-Dil ile Boyanmış Kordon Matris Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Üzerindeki Görünümü (10X)



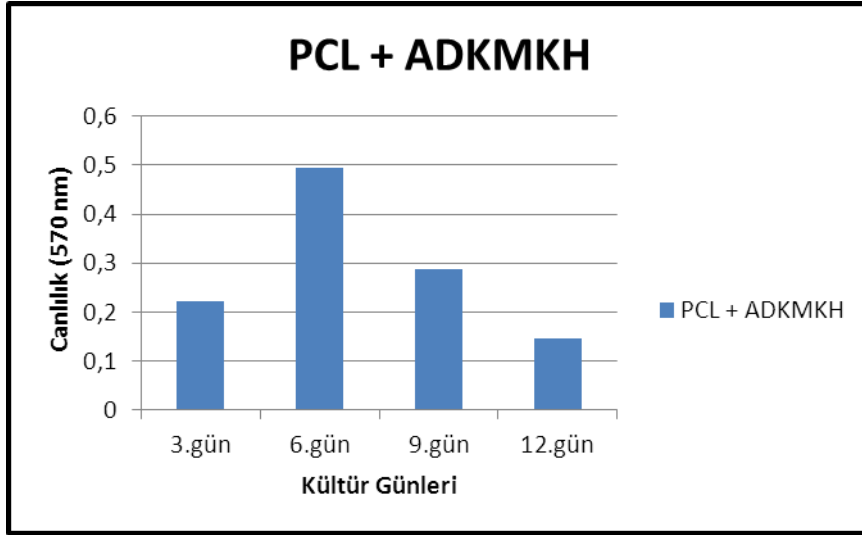
Şekil 4.9 CM-Dil ile Boyanmış Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Üzerindeki Görünümü (10X)

4.1.3.1 MTT Analizi Sonuçları

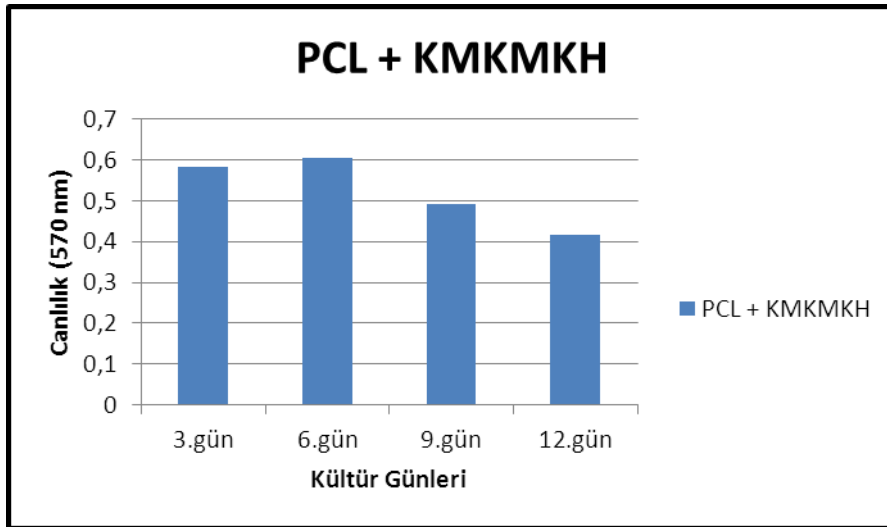
PCL scaffold üzerine farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin MTT (10mg/ml) ile canlılık analizleri yapıldı. 12 gün boyunca devam ettirilen üç boyutlu kültürde PCL scaffold üzerinde farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin canlılığı ELISA okuyucuda 570'nm de incelendi. PCL scaffold kullanılan ortamda her mezenkimal kök hücre türü için canlılığın en yüksek aralığının altıncı günde olduğu görülmektedir. Fakat kordon matrisin canlılığını adipoz ve olfaktör bulb mezenkimal kök hücrelerine oranla daha yoğun görüldüğü tespit edilmiştir. Kordon matrisi ve olfaktör mezenkimal kök hücrelerin PCL scaffold üzerinde altıncı günden sonra canlılıkları çok az miktarda azalırken, adipoz doku kaynaklı kök hücre ve PCL scaffoldun üç boyutlu kültüründe ise

12. günde altıncı güne oranla canlılık da 2 katına kadar hızlı bir düşüş olduğu görülmüştür.

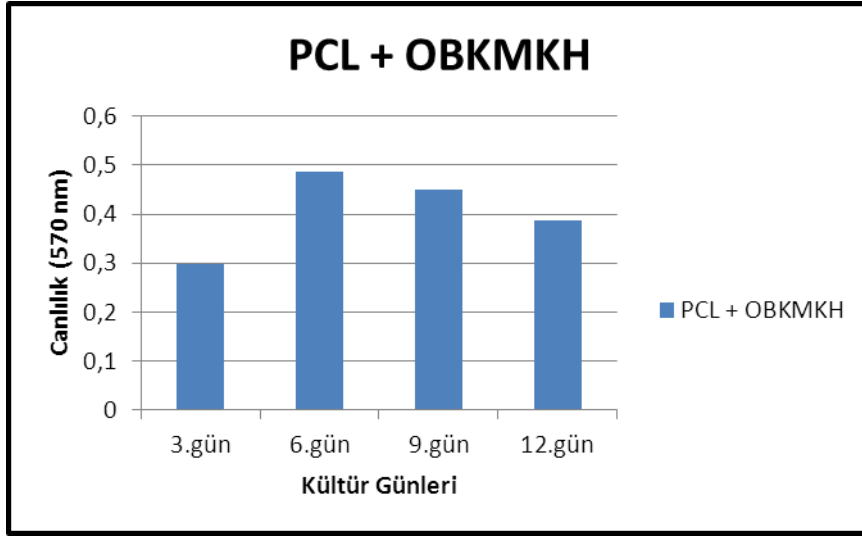
Çizelge 4.1 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold ile Üç Boyutlu Hücre Kültür Modelinde MTT Sonucu



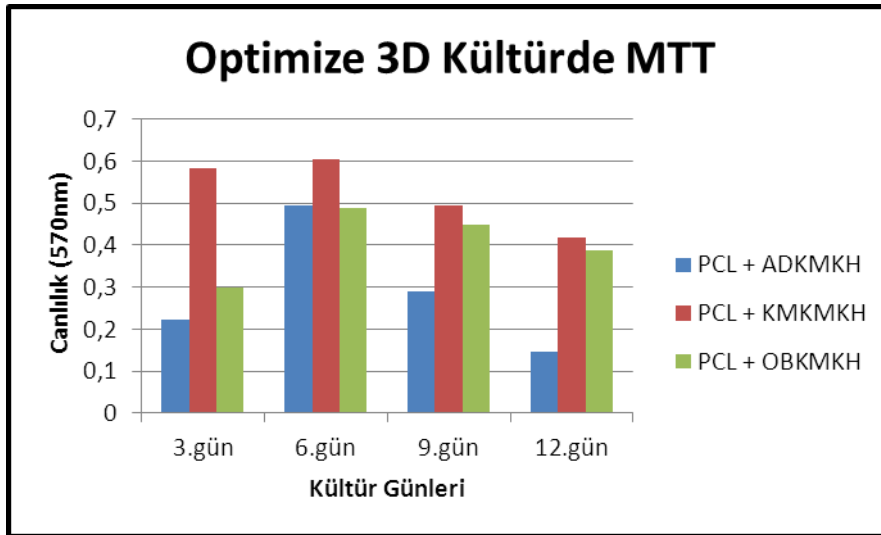
Çizelge 4.2 Kordon Matris Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold ile Üç Boyutlu Hücre Kültür Modelinde MTT Sonucu



Çizelge 4.3 Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold ile Üç Boyutlu Hücre Kültür Modelinde MTT Sonucu



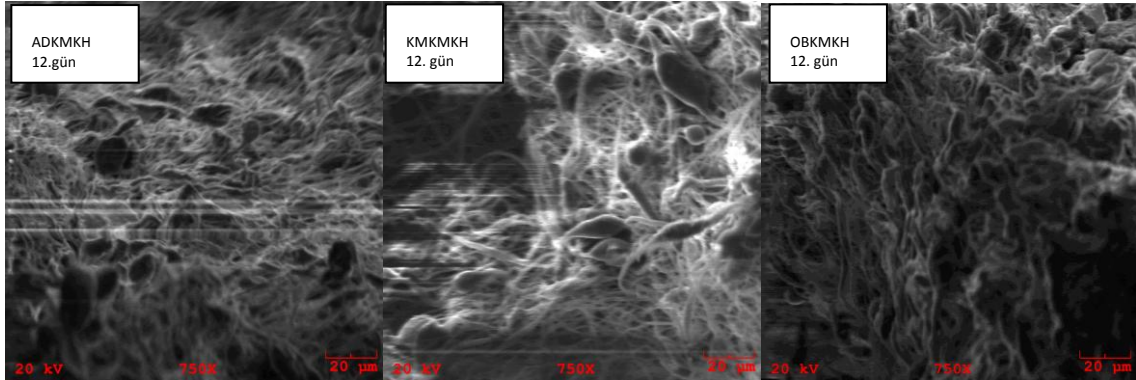
Çizelge 4.4 Farklı Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold ile Üç Boyutlu Hücre Kültür Modelinde MTT Sonucu



4.1.3.2 SEM Görüntüleri

İki farklı yöntem ile SEM numuneleri hazırlandı ve görüntülenen örneklerin sonucunda en fazla hücrenin materyal-metod kısmında anlatılan ikinci protokolde gözleendiği tespit edilmiştir. SEM görüntüleri ile hücrelerin scaffold yüzeyinde 750X de morfolojileri gözlemlendi. Numuneler altın ile kaplanamadığı için görüntüler biraz dalgalı elde edildi. SEM sonuçlarından görüldüğü gibi mezenkimal kök hücrelerin PCL scaffold etkileşimleri

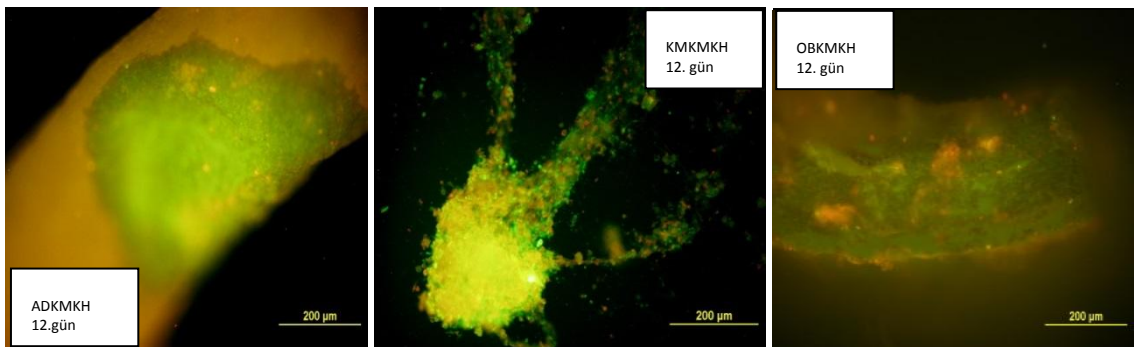
arasında çok fark görünmese de her üç kök hücrenin PCL scaffoldun fiber yapılarına net bir şekilde adezyon yaptıkları saptanmıştır.



Şekil 4.10 Farklı Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin SEM ile 12.gününde Üç Boyutlu Kültürde Morfolojileri

4.1.3.3 Canlı/Ölü Boyama Yöntemi ile İncelenmesi

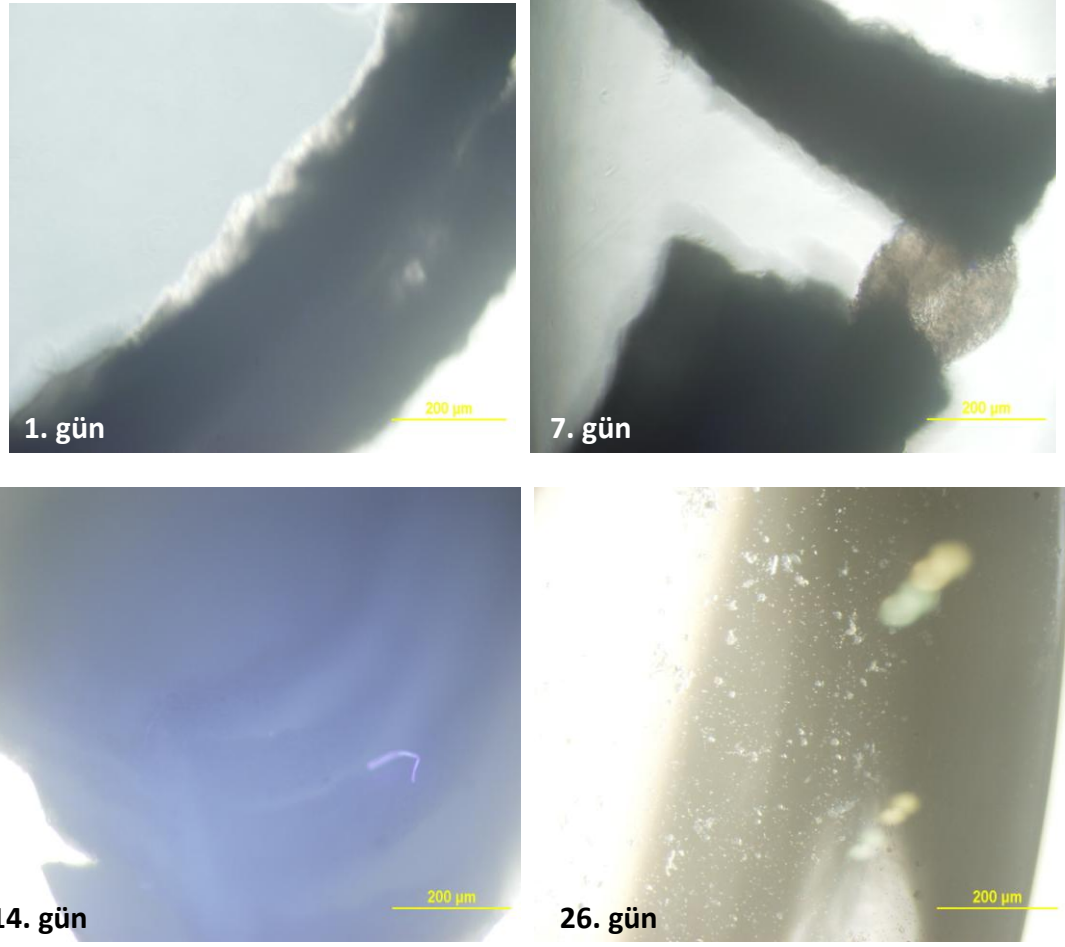
Onikinci günün sonunda boyanan 3 boyutlu yapılar üzerinde canlı hücreler Calcein sayesinde yeşil boyanırken, ölü hücreler Etidyum-bromür homodimer-1 ile kırmızı boyandığı gözlemlendi. Sonuçların MTT ile paralel olduğu yani en fazla yeşille boyalı hücrenin kordon matrisi daha sonra olfaktör ve en son adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde olduğu gözlemlendi. Böylece elde ettiğimiz sonuçlar PCL scaffold yüzeyinde kök hücrelerin canlılığının canlı/ölü boyaması ve MTT çalışması ile paralel kullanılabileceğini mümkün olduğunu göstermiştir.



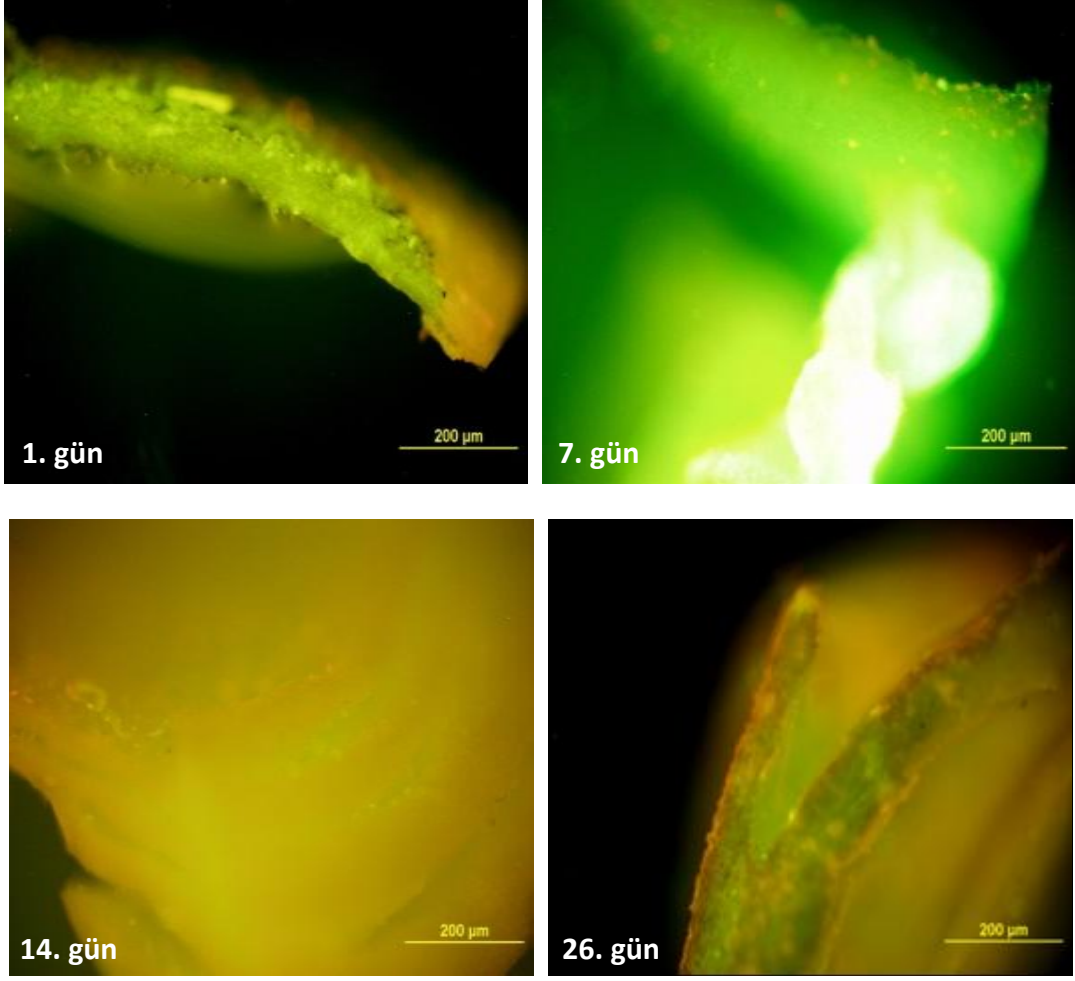
Şekil 4.11 Farklı Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Yüzeyindeki 12. Gününde Canlı/Ölü Boyaması (10X)

4.1.4 PCL Scaffold Üzerinde Mezenkimal Kök Hücre Kültürlerin Kondrojenik Farklılaşması

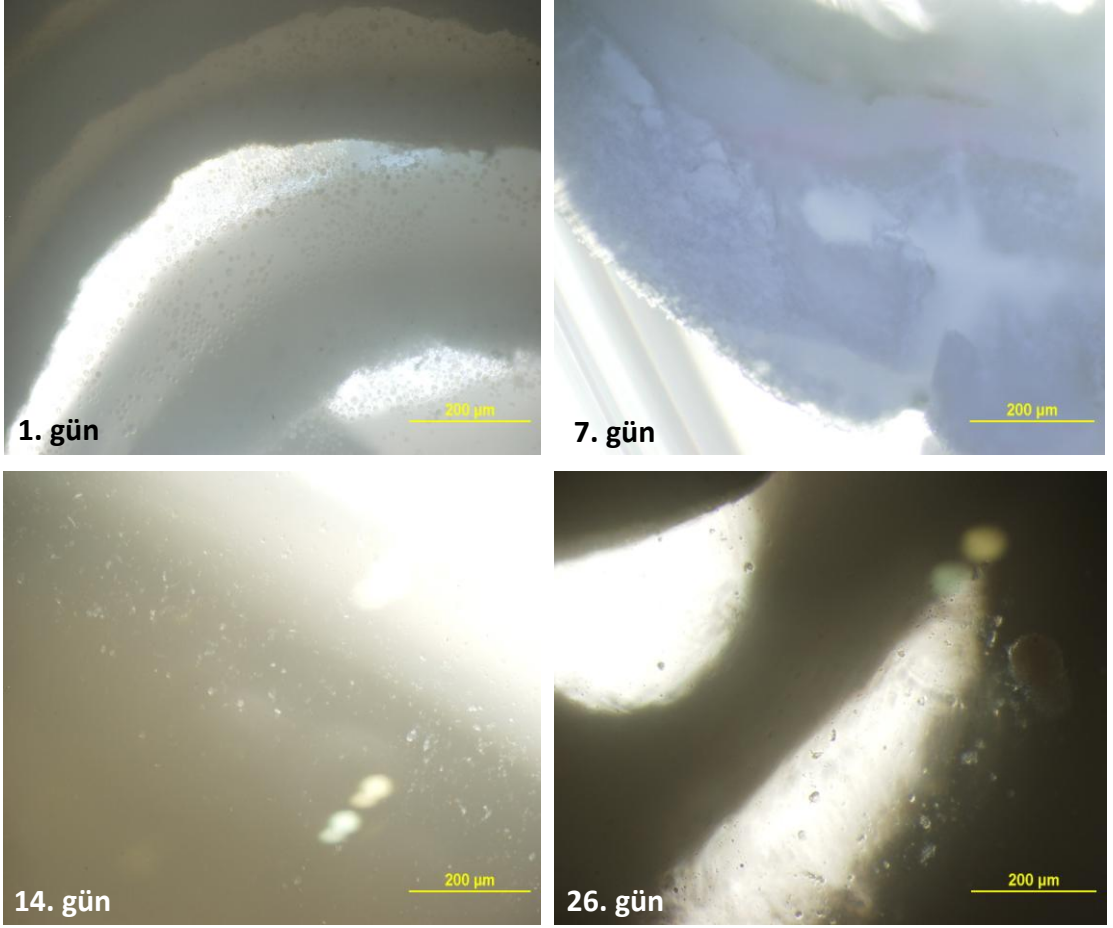
Kondrojenik farklılaşma besiyeri 3 boyutlu kültürüne zarar vermeden hafta da 2-3 defa eski besiyerinin yarısı atılarak taze besiyerinden de 300µL konularak değiştirildi. 3 boyutlu hücre kültürleri ters mikroskopta hem normal ışıkta hem de Canlı/Ölü boyaması yapılarak UV ışıkta incelendi. Elde edilen sonuçlar aşağıda gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlarda hem normal ışıkta hem de canlı/ölü boyaması sonucunda üç farklı kök hücre ile hazırlanan üç boyutlu hücre kültür modellerinde morfolojik bir farklılık görülmemiştir. Böylece üç boyutlu hücre kültürlerinde kondrojenik farklılaştığı düşünülen farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 26 gün boyunca canlı ölü boyamasıyla canlılıklarını korudukları saptandı. Canlılık boyama sonuçlarında üç mezenkimal kök hücrede de yedinci günde, on dördüncü güne oranla yeşil ışık oranının kırmızı ışık oranından fazla olduğu gözlemlenmiştir. Farklılaşma prosedürünün sonunda (26. günün sonunda) mezenkimal kök hücrelerden farklılaşan hücrelerin daha sonraki aşamalarda PZR ve eş zamanlı PZR yöntemiyle kondrosit hücresi olduğu tespit edildi (n:3).



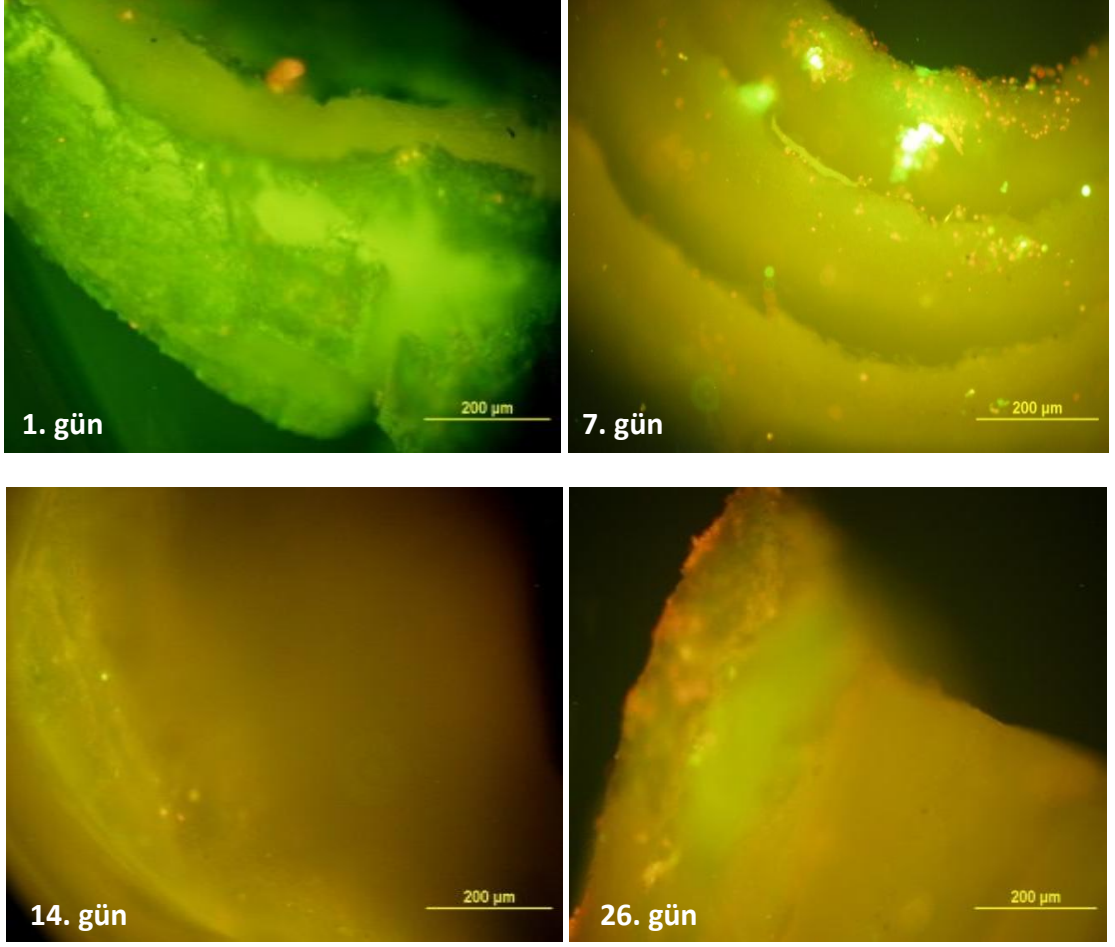
Şekil 4.12 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Yüzeyinde Kondrojenik Farklılaşmasının Takibi (10X)



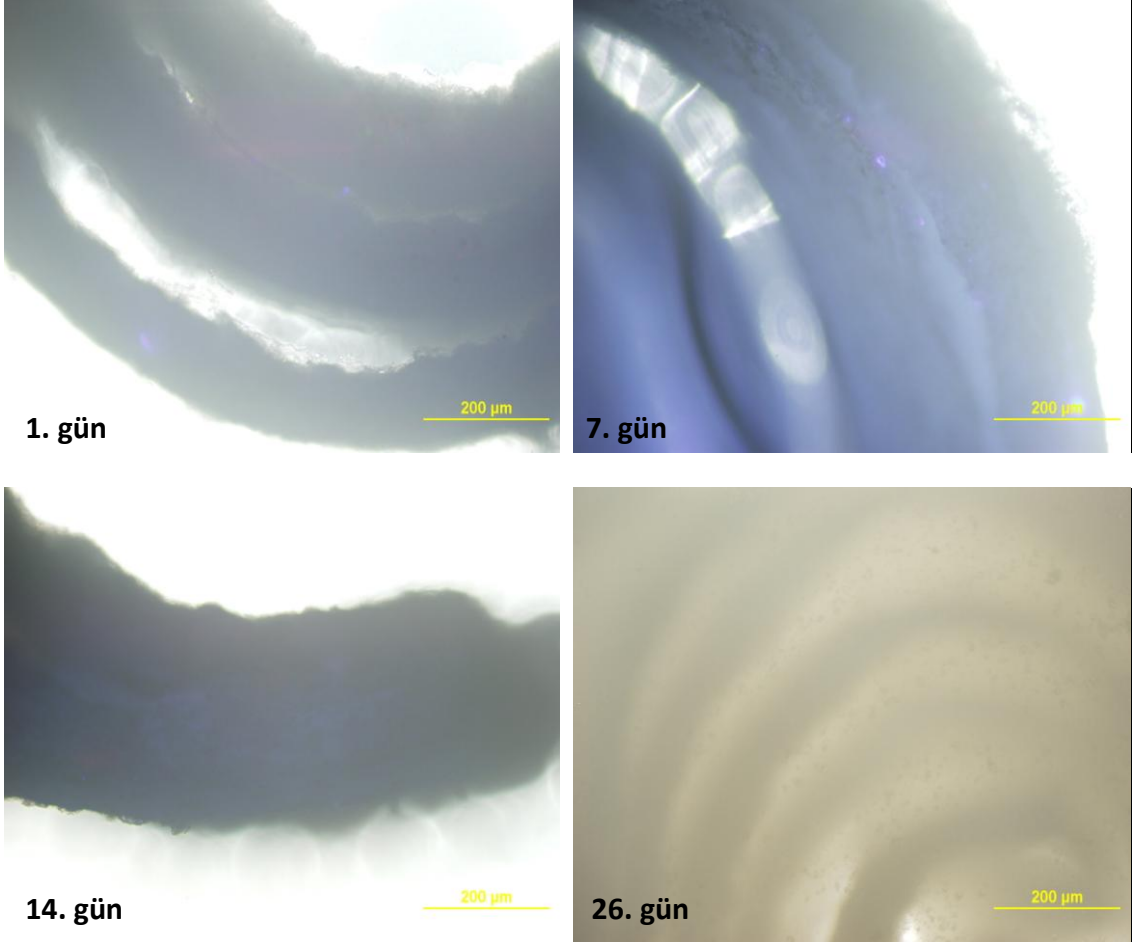
Şekil 4.13 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Yüzeyinde Kondrojenik Farklılaşmasının Canlı/Ölü Boyası ile Takibi (10X)



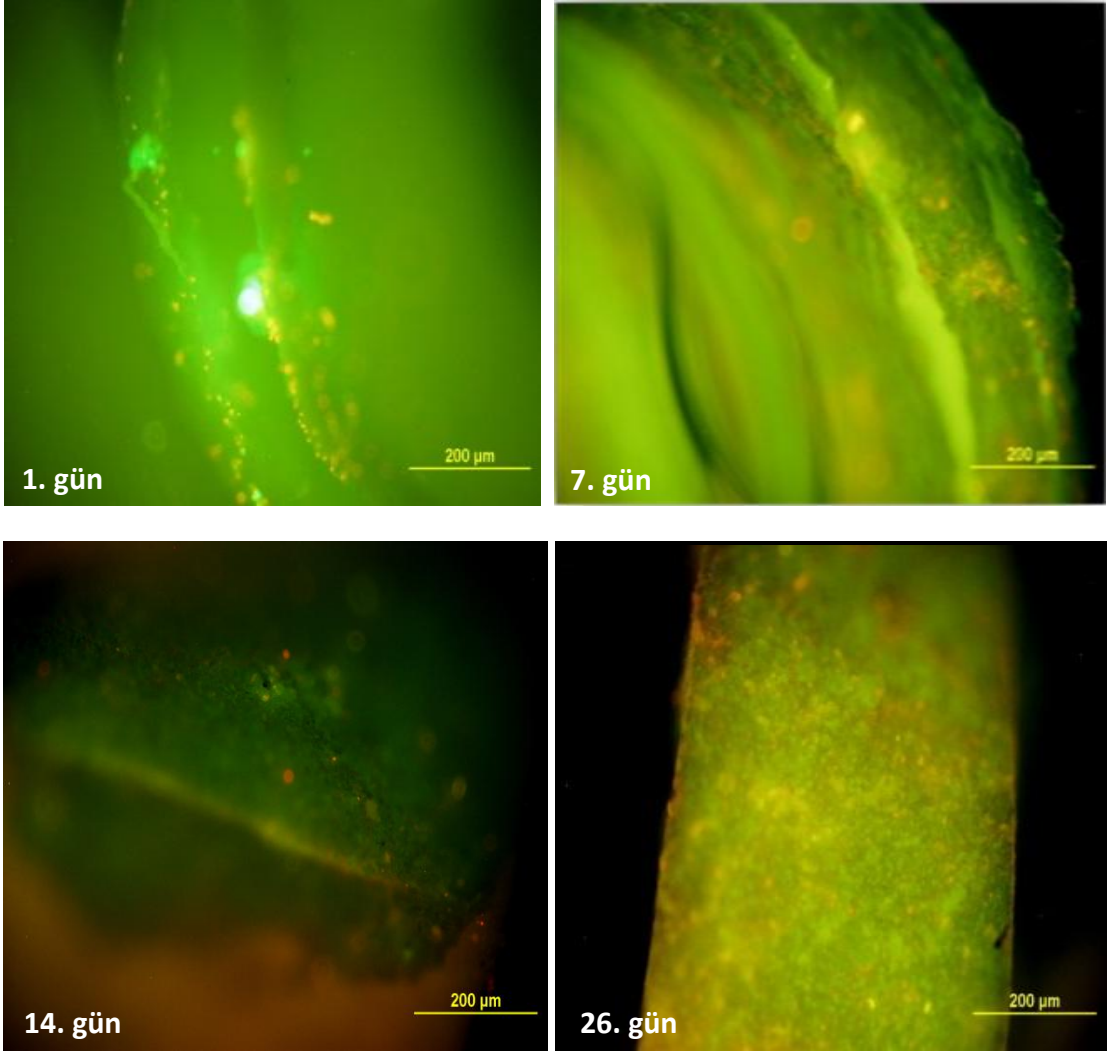
Şekil 4.14 Kordon Matrisi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Yüzeyinde Kondrojenik Farklılaşmasının Takibi (10X)



Şekil 4.15 Kordon Matrisi Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL scaffold Yüzeyinde Kondrojenik Farklılaşmasının Canlı/Ölü Boyası ile Takibi (10X)



Şekil 4.16 Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Yüzeyinde Kondrojenik Farklılaşmasının Takibi (10X)



Şekil 4.17 Olfaktör Bulb Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold Yüzeyinde Kondrojenik Farklılaşmasının Canlı/Ölü Boyası ile Takibi (10X)

4.1.4.1 MTT Analizi Sonuçları

Kondrojenik farklılaşma süresince 26 gün boyunca takip edilen farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin PCL scaffold üzerinde hazırlanmış üç boyutlu hücre kültürlerinde canlılık analizleri Canlı/Ölü boyaması ile paralel sonuç veren MTT analizi ile de yapıldı. Bu sayede PCL scaffold yüzeyine adezyon yapmış hücre sayısında artış ve azalış takip edilmiş oldu. Materyal-metot bölümünde belirtilen şekilde hazırlanmış MTT çalışmasının sonucunda;

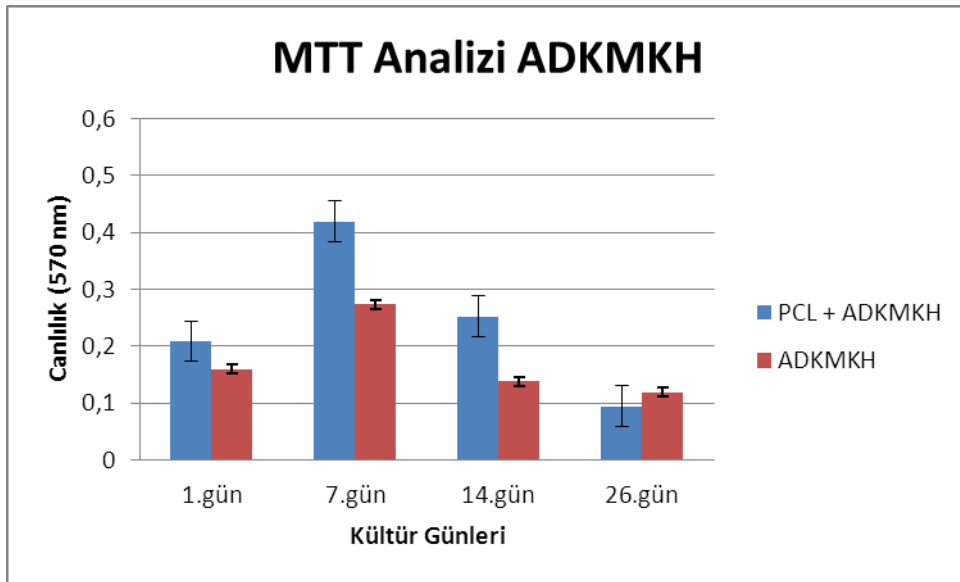
Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 570nm de PCL scaffold yüzeyi ile üç boyutlu hücre kültürlerinde normal iki boyutlu hücre kültürlerine göre kondrojenik farklılaşma süresince 0,5 kat daha fazla hücrenin olduğu gözlemlendi. Yedinci gününe kadar üç boyutlu ve iki boyutlu hücre sayısının kondrojenik farklılaşma boyunca artışı gözlemlenirken ondördüncü günün sonunda hücre sayısının birinci güne yaklaştığı 26. günün sonunda ise üç boyutlu hücre kültür modelinde hücre sayısının birinci günün altına düştüğü görüldü (n:3) (Çizelge 4.5).

Kordon matris kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 570nm de PCL scaffold yüzeyi ile üç boyutlu hücre kültürlerinde normal iki boyutlu kültürlerine göre kondrojenik farklılaşmanın birinci gününde 1,5 kat daha fazla hücrenin olduğu gözlemlendi. Yedinci gününe kadar iki boyutlu hücre sayısının farklılaşma besiyerinde de artışı gözlemlenirken, üç boyutlu hücre sayısının birinci güne oranla yaklaşık 0,25 kat düştüğü görüldü. 14. günün sonunda hücre sayısının hem üç boyutlu hem de iki boyutlu hücre sayısının birinci günün üç kat altına düştüğü görüldü. 26. günün sonunda ise üç boyutlu hücre kültür modelinde hücre sayısının 14. günün 1,5 kat üstüne çıktığı görüldü (n:3) (Çizelge 4.6).

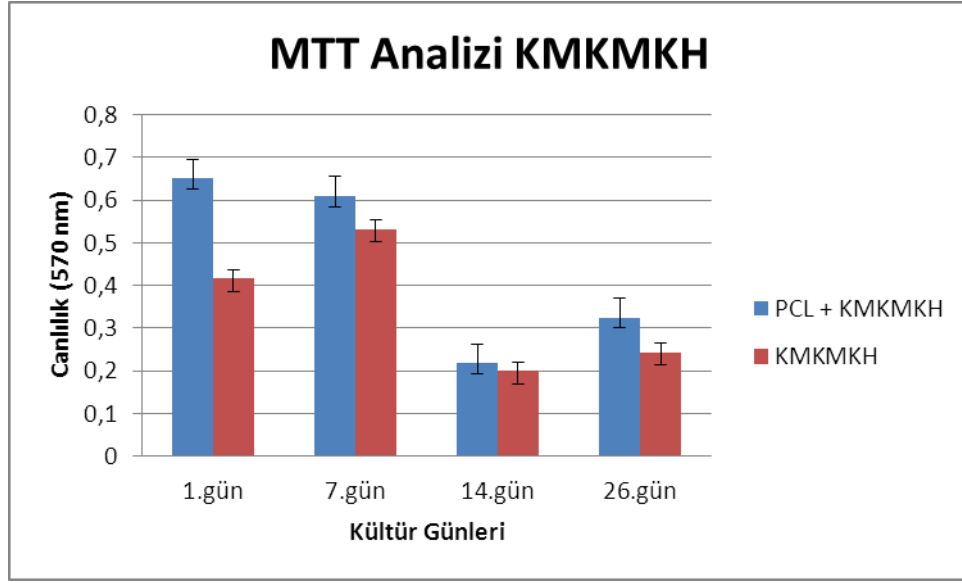
Olfaktör Bulb kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 570nm de PCL scaffold yüzeyi ile üç boyutlu hücre kültürlerinde normal iki boyutlu kültürlerine göre kondrojenik farklılaşmanın birinci gününde 2 kat daha fazla hücrenin olduğu gözlemlendi. 7. güne kadar hem iki boyutlu hem de üç boyutlu kültürde hücre sayısının artışı gözlenirken iki boyutlu hücrenin yedinci günde birinci güne oranla 2 kat, üç boyutlu hücrenin ise 7. günde birinci güne oranla yaklaşık 0,5 kat arttığı gözlemlendi. On dördüncü gününün de üç boyutlu hücrenin 7. güne oranla yaklaşık 0,5 kat düştüğü gözlemlenirken, iki

boyutlu kültürde 7. güne oranla yaklaşık 3 kat azaldığı görülmüştür. 26. günde ise üç boyutlu hücrenin 14. güne oranla canlılığın 0,5 kat azaldığı görülürken iki boyutlu kültürde hücrelerin 14. güne oranla canlılığın 0,5 kat arttığı gözlemlendi (n:3) (Çizelge 4.7). MTT sonuçları istatistiksel olarak parametrik yöntemler olan ANOVA ve student t test ile belirlenmiştir. Tüm veriler Statistical Packages of Social Sciences (SPSS, version 19.0 for Windows) programı ile yapıldı ve $p < 0,05$ değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

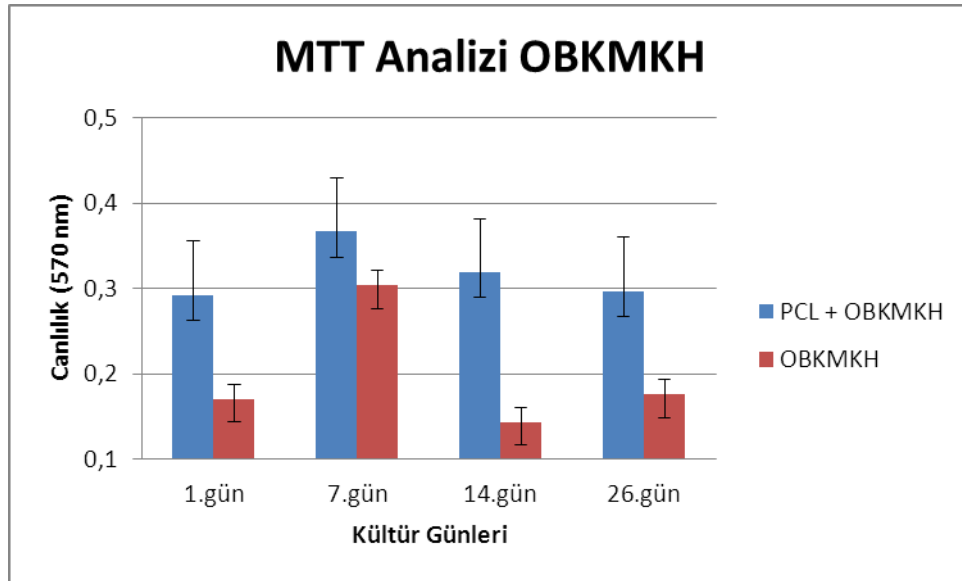
Çizelge 4.5 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler ve PCL Scaffoldun Kondrojenik Farklılaşmasında MTT Sonucu



Çizelge 4.6 Kordon Matrisi Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler ve PCL Scaffoldun Kondrojenik Farklılaşmasında MTT Sonucu



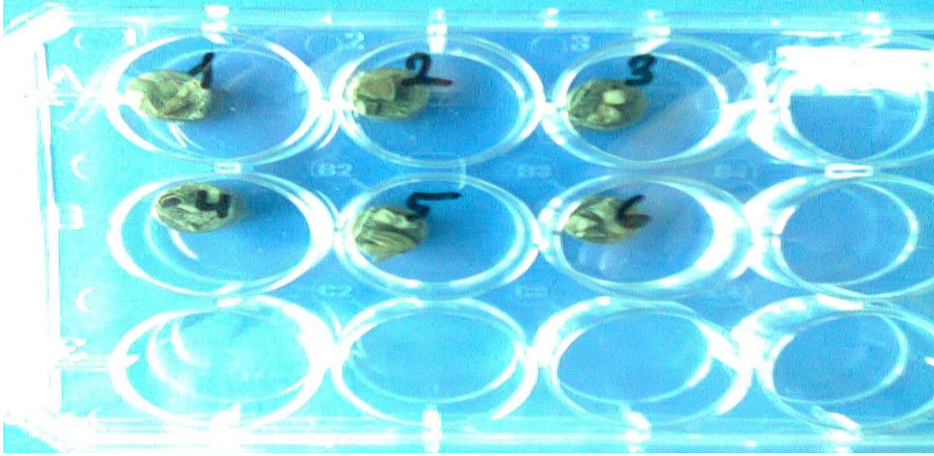
Çizelge 4.7 Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler ve PCL Scaffoldun Kondrojenik Farklılaşmasında MTT Sonucu



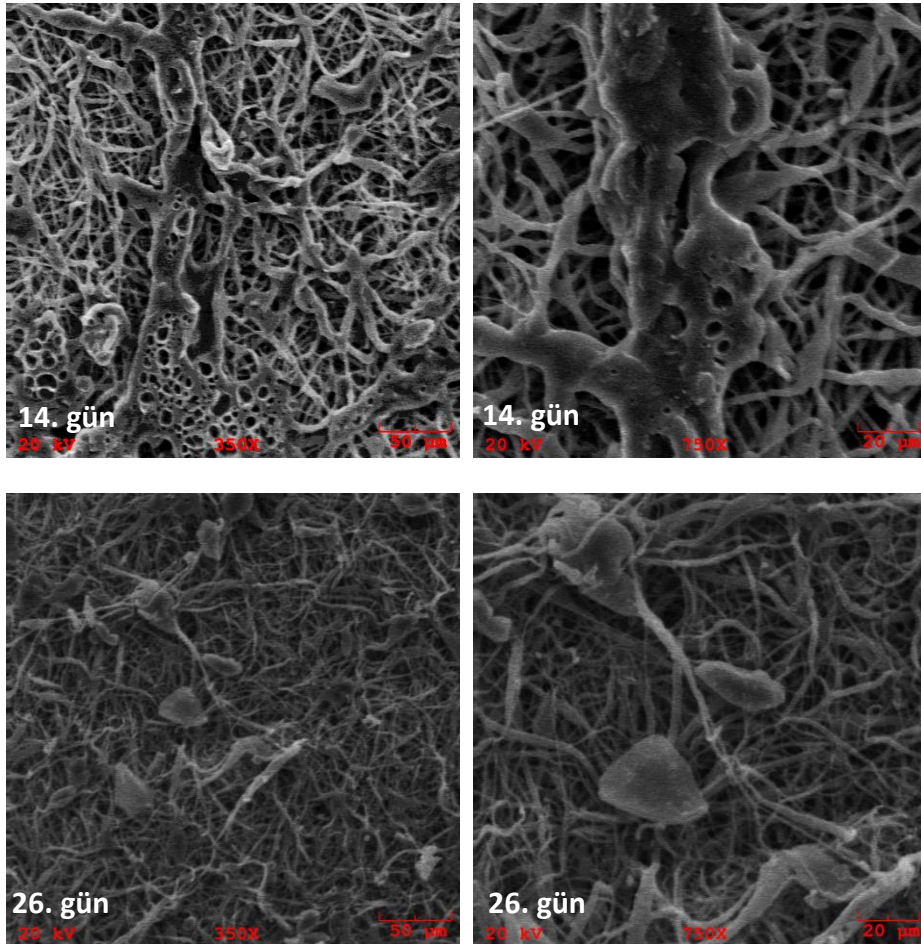
4.1.4.2 SEM Görüntüleri

Jeol JSM-5410LV SEM cihazıyla alınan görüntüler de elektro-eğirme metoduyla hazırlanmış PCL scaffoldun fiber yapıları arasında adezyon yapmış farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 14. ve 26. günlerinde morfolojileri 350X ve 750X de gösterildi. 26. gününde farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 14. günlerine

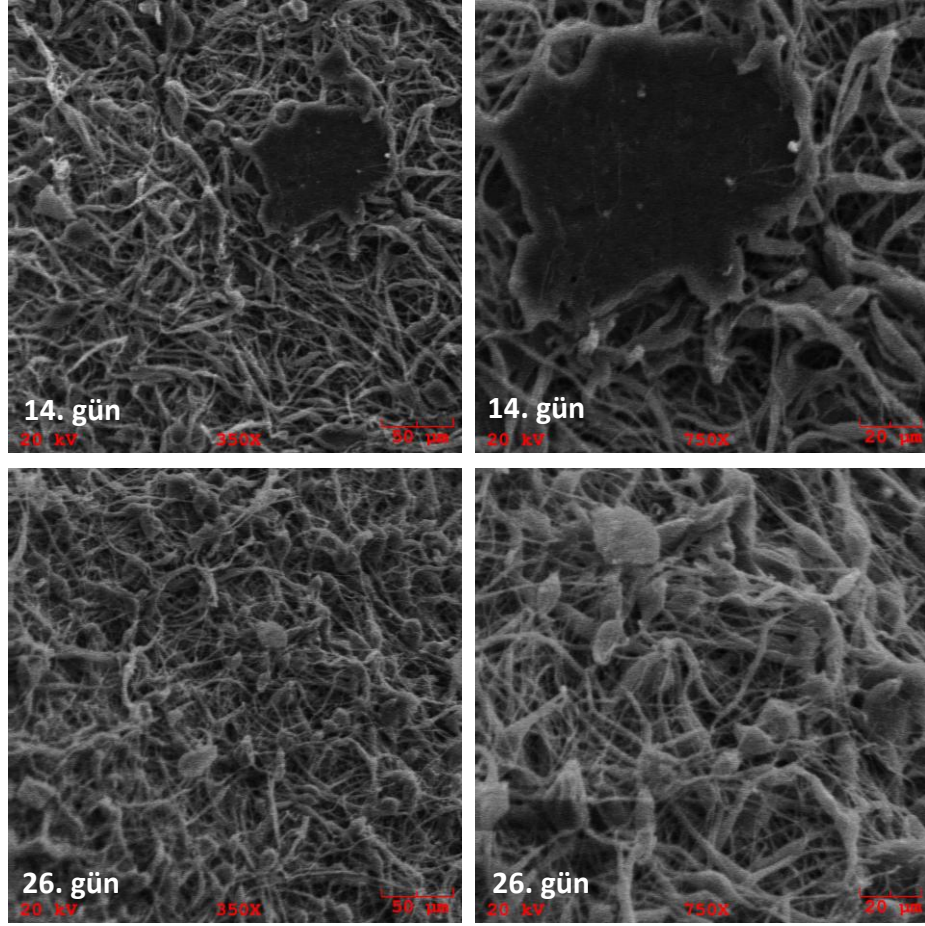
oranla daha bir arada görüldükleri gözlemlendi. Morfolojik olarak üç mezenkimal kök hücrelerin de bir birinden farklı bir görünüme sahip olmadığı saptandı.



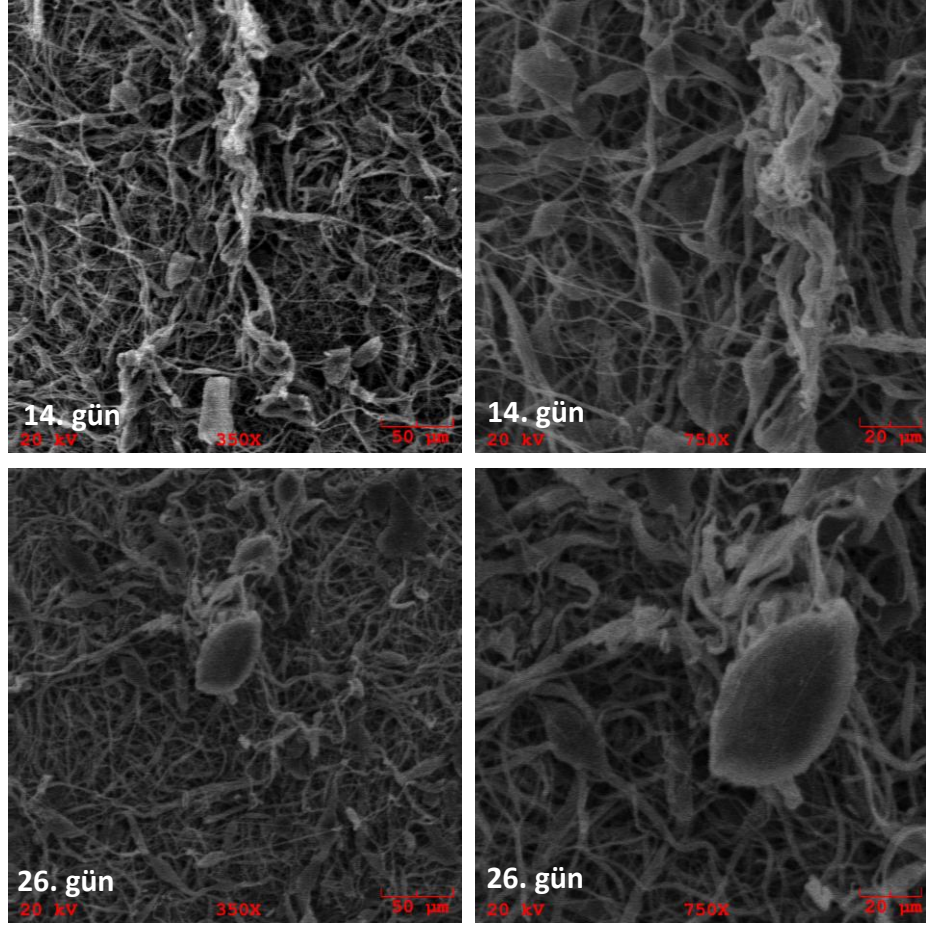
Şekil 4.18 Altın ile Kaplanmış Üç Boyutlu Numuneler



Şekil 4.19 14. ve 26. günlerinde Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold ile Üç Boyutlu Kültürde Morfolojileri



Şekil 4.20 14. ve 26. günlerinde Kordon Matris Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold ile Üç Boyutlu Kültürde Morfolojileri



Şekil 4.21 14. ve 26. Günlerinde Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Scaffold ile Üç Boyutlu Kültürde Morfolojileri

4.1.5 Üç Boyutlu Kültürlerden Elde Edilen RNA'ların Nanodrop ile RNA Miktarlarının Kantitatif Tayini, cDNA Elde Edilmesi

PCL scaffold üzerine ekilmiş farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşma süreci boyunca belirli periyotlarda (yedinci, on dördüncü ve 26. günlerinde) optimize edilen 3 boyutlu yapılardan RNA izolasyonu için RNA izolasyon kiti (IDPURE™ Spin Column Total RNA Miniprep Kit) materyal metod'da bahsedildiği gibi kullanıldı. Elde edilen RNA'lar BioSpec-nano A116449 (Shimadzu BIOTECH) nanodrop ile ölçüldü. Çalışılacak RNA'lar Jel Elektroforez ve eş zamanlı PZR de kullanılmak üzere cDNA'ya *cDNA Synthesis Kit Manual* (Takara) kiti kullanılarak çevrildi. RNA'lardan cDNA eldesinde tüm örneklerin aynı konsantrasyon da olması gerekmektedir bunun için nanodrop ile ölçülen örnekler (Çizelge 4.8.) 100 ng olacak şekilde hesaplandı. Daha sonra tekrar nanodrop ile ölçülen cDNA'lar eş zamanlı PZR çalışmasından önce 1:4 oranında dH₂O ile seyreltildi.

Çizelge 4.8 RNA miktarları

Örnek Adı	RNA Konsantrasyonu (ng/ul)	OD 260/280
PCL+ADKMKH 21.gün	14,25	1,69
PCL+KMKMKH 21.gün	21,16	1,83
PCL+OBKMKH 21.gün	22,30	1,87
PCL+ADKMKH 26.gün	24,49	2,00
PCL+KMKMKH 26.gün	34,65	2,00
PCL+OBKMKH 26.gün	70,32	1,88
Kondrosit Kontrol	603,29	2,04

Çizelge 4.9 cDNA miktarları

Örnek Adı	cDNA Konsantrasyonu (ng/ul)
PCL+ADKMKH 21.gün	522
PCL+KMKMKH 21.gün	522
PCL+OBKMKH 21.gün	450
PCL+ADKMKH 26.gün	460
PCL+KMKMKH 26.gün	463
PCL+OBKMKH 26.gün	433
Kondrosit Kontrol	478

4.1.5.1 Kondrojenik Farklılaşmasının 26. günün de cDNA'ların PZR ile Çoğaltılması ve Jel Elektroforez de Görüntülenmesi

Farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile PCL scaffold yüzeyinde hazırlanan üç boyutlu hücre kültür modellerinden elde edilen 26. güne ait cDNA'lar, Col2A1 gen varlığının belirlenmesi (F- CCGCGGTGAGCCATGATTCGC, R- GTCGTCGAGAGGACAGTCCCAG, 210 bp) için AccuStart™ II PCR Supermix (2X) (Quanta Biosciences™) PZR karışımı kullanılarak çalışıldı. Elde edilen ampikonların %3 agaroz jel de yürütülmesi sonucunda UV görüntüleyicisinde 210 bp'lik bantlar pozitif kabul edildi. Fakat bu bantlardan kordon matrisin 26. günün adipoz'dan, adipozun da olfaktörden daha fazla parlak olduğu görüldü.



Şekil 4.22 Col2A1 (210 bp) Geninin Jel Elektroforezde Görüntülenmesi

4.1.6 Eş Zamanlı PZR ile Sox9, Col2A1 ve Col1A1 gen bölgeleriyle Kondrosit oluşumunun moleküler düzeyde tespit edilmesi

PZR sonucuna göre Col2A1 gen bölgesinde yirmi altıncı günde pozitiflik veren cDNA'lar ile yirmi birinci günün cDNA'ları da içine alan bir deney düzeneği ile kondrojenik farklılaşma daha geniş kapsamlı incelenmesi amaçlanarak $\Delta\Delta C_t$ (karşılaştırmalı cT) metodu kullanılarak eş zamanlı PZR ön çalışması yapıldı. Bu çalışmada PerfeCta® SYBR® Green Supermix (Quanta Biosciences™) kullanılarak hazırlanan (Sox9, Col2A1 ve Col1A1 genlerine spesifik primerlerin ve (sırasıyla P1, P2, P3 olarak adlandırılmıştır) ve GAPDH cDNA'sının kontrol geni olarak kullanıldığı Eş zamanlı PZR (Montania 4896 Eş zamanlı PZR Cihazı, Anatolia Geneworks) ön çalışmasında pozitif kontrole göre adipoz, kordon matrisi ve olfaktör kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin yirmi altıncı günün yirmi birinci güne bakılarak incelenen tüm gen bölgelerine göre arttığı görülmüştür. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin yirmi altıncı gününde Col1A1 gen ekspresyonunda, olfaktör bulbul kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin yirmi altıncı gününde ise Col2A1 gen ekspresyonunda değişken kat sayıları baz alınarak artış olduğu eş zamanlı PZR ön çalışması ile saptanmıştır. Kullanılan pozitif kontrolün kordon matris kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile PCL üç boyutlu hücre kültürlerinden elde edilen cDNA'lara yetmemesi nedeniyle Referans geni kullanılmadığı için kordon matris için bir değişken kat sayısı hesaplanamadı. Fakat kordon matrisi kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile yapılan çalışmada da Col2A1 geni hariç diğer iki gen bölgesinde yirmi altıncı günde yirmi birinci güne oranla sadece cT değerleri üzerinden yapılan karşılaştırmada

diğer kök hücreler ile hazırlanmış üç boyutlu kültürler arasında daha fazla ekspresyon gözlemlendi.

Çizelge 4.10 Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin eş zamanlı PZR ön çalışması sonucu (n=3)

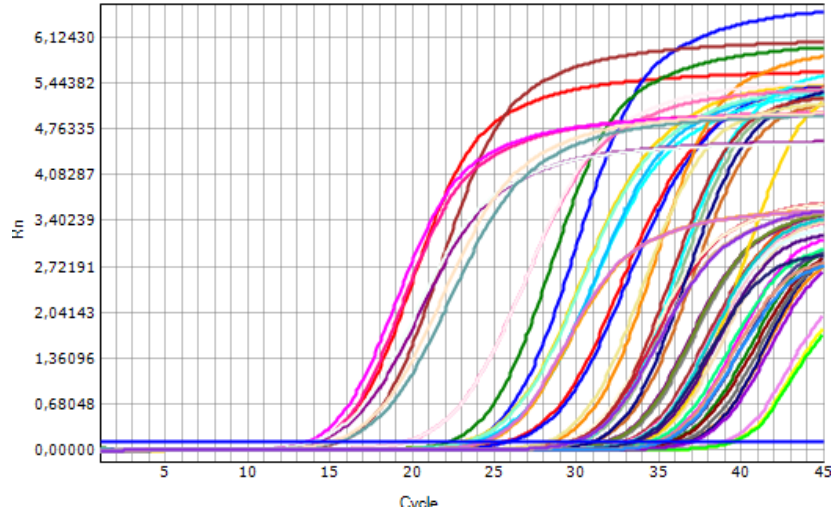
Örnek adı	Primer setleri	Değişen Kat Sayısı	Örnek CT ortalaması
A21	P1	0,0477	25,81
A26	P1	0,57	23,66
Örnek adı	Primer setleri	Değişen Kat Sayısı	Örnek CT ortalaması
A21	P2	0,098	36,195
A26	P2	0,119	35,715
Örnek adı	Primer setleri	Değişen Kat Sayısı	Örnek CT ortalaması
A21	P3	0,056	32,97
A26	P3	0,65	31,88

Çizelge 4.11 Olfaktör bulbul kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin eş zamanlı PZR ön çalışması sonucu (n=3)

Örnek adı	Primer setleri	Değişen Kat Sayısı	Örnek CT ortalaması
O21	P1	0,046	30,615
O26	P1	0,088	28,945
Örnek adı	Primer setleri	Değişen Kat Sayısı	Örnek CT ortalaması
O21	P2	0,0957	39,195
O26	P2	7,06	34,07
Örnek adı	Primer setleri	Değişen Kat Sayısı	Örnek CT ortalaması
O21	P3	0,099	33,68
O26	P3	1,84	33,265

Çizelge 4.12 Kordon matrisi kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin eş zamanlı PZR ön çalışması sonucu (n=3)

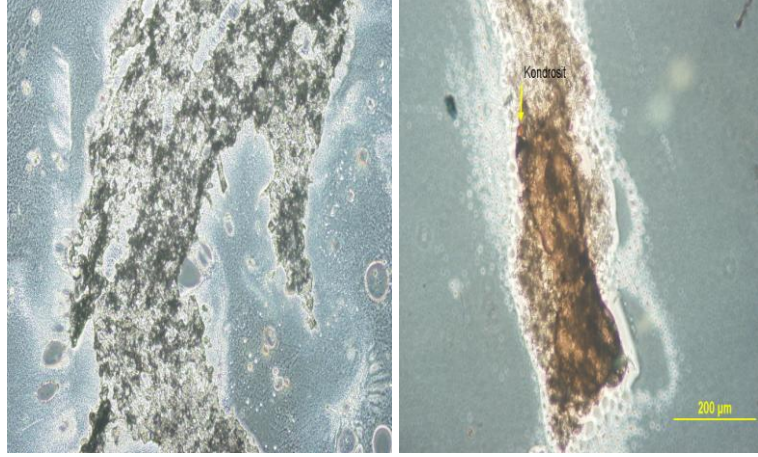
Örnek adı	Primer setleri	Örnek CT ortalaması
K21	P1	23,47
K26	P1	19,645
Örnek adı	Primer setleri	Örnek CT ortalaması
K21	P2	35,845
K26	P2	36,98
Örnek adı	Primer setleri	Örnek CT ortalaması
K21	P3	32,825
K26	P3	30,76



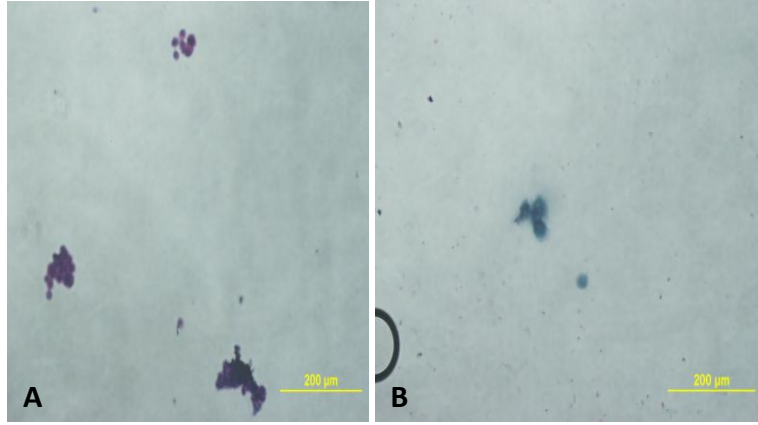
Şekil 4.23 Eş zamanlı PZR şeması

4.1.7 SafraninO/Fast Green, Alcian Blue/Nuclear Fast Red ve Anti-Collagen Type II Antibody (Milipore) Boyama Sonuçları

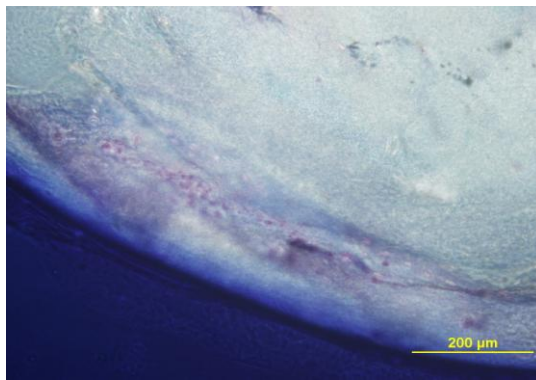
Yapılan doku takibi çalışmalarında PCL scaffoldun organik tüm çözücülerde çözünmesinden ötürü materyal metotta anlatıldığı gibi iki farklı yöntem ile doku takibi yapıldı. Alınan kesitlerden boyamaya uygun olanları ile boyamaları yapılan örneklerden Safranin O / fast green boyamada Glikozaminoglikan yapılar kırmızıya dönük turuncu renge boyanırken kollajen yapılar yeşil-gri arasında bir renge boyandı. Alcian Blue / Nuclear fast red boyamada Mukopolisakkarit yapılar mavi renk alırken hücre çekirdeği kırmızı ile boyandı. Fakat kesitler alınırken ve doku takibinde karşılaşılan problemler (scaffoldların erimesi ya da bozulması) ve pozitif şarjlı lamlarda bile kesitlerin sabit durmaması nedeniyle boyama esnasında kesitlerin tamamına yakını kaybedildi ya da yıkama esnasında scaffold yüzeyinden hücreler kayboldu. Bu nedenden dolayı elimizde çok az doku boyama preparatları bulunmaktadır. Son olarak tüm bu olumsuzlukları yenebilmek için scaffold yüzeyinden hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak hücre pelletlerinden doku takibi denemek istendi fakat hücre pelleti bu işlem içinde yeterli olmadı. Bunun için hücreler (yayma preparatlar halinde) hazırlanarak boyandı. Fakat alana tek düşen hücrelerde histolojik açıdan yorumu zorlaştırdı. Anti-Collagen Type II Antibody ile kesitler uygun olmadığı için boyama yapılamadı.



Şekil 4.24 Frozen Kesitler ve Safranin O / Fast Green Boyama (Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre 26.gün) (10X)



Şekil 4.25 Hücre Pelletlerinden Yayma preparatların Alcian Blue / Nuclear Fast Red (A) ve Safranin O / Fast Green (B) boyaması (Kordon Matris Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre 7.gün) (10X)



Şekil 4.26 Parafin Blok Kesitlen Alcian Blue / Nuclear Fast Red Boyaması (Olfaktör Bulb Mezenkimal Kök Hücre 14.gün) (10X)

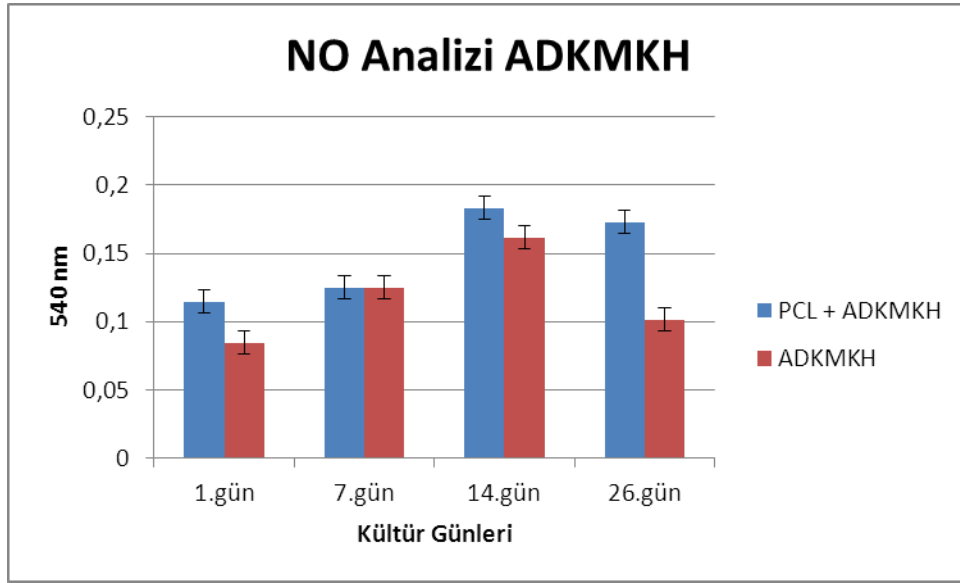
4.1.8 Nitrik Oksit (NO) Analizi

NO tayini için 540nm dalga boyunda ELISA Reader ile okunan sonuçlar grafik haline getirildi. Grafik incelendiğinde MTT deki canlılık sonuçlarını destekler nitelikte olduğu görüldü. Farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin PCL scaffold yüzeyinde üç boyutlu hücre kültürlerinde 14. günde MTT sonuçlarına göre canlılık oranının çok hızlı düştüğü zamanda NO oranının birden arttığı görüldü (n:3). NO analizi 2 boyutlu kültürün 3 boyutlu kültüre göre daha yüksek olduğu olfaktör bulbul kaynaklı mezenkimal kök hücreleri ile hazırlanan üç boyutlu kültürlerdir. NO analizi MTT analizi ile birleştirildiğinde NO miktarının arttığı aralıklarda hücrelerin canlılık oranların düştüğü söylenebilir. NO sonuçları istatistiksel olarak parametrik yöntemler olan ANOVA ve student t test ile belirlenmiştir. Tüm veriler Statistical Packages of Social Sciences (SPSS, version 19.0 for Windows) programı ile yapıldı ve $p < 0,05$ değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

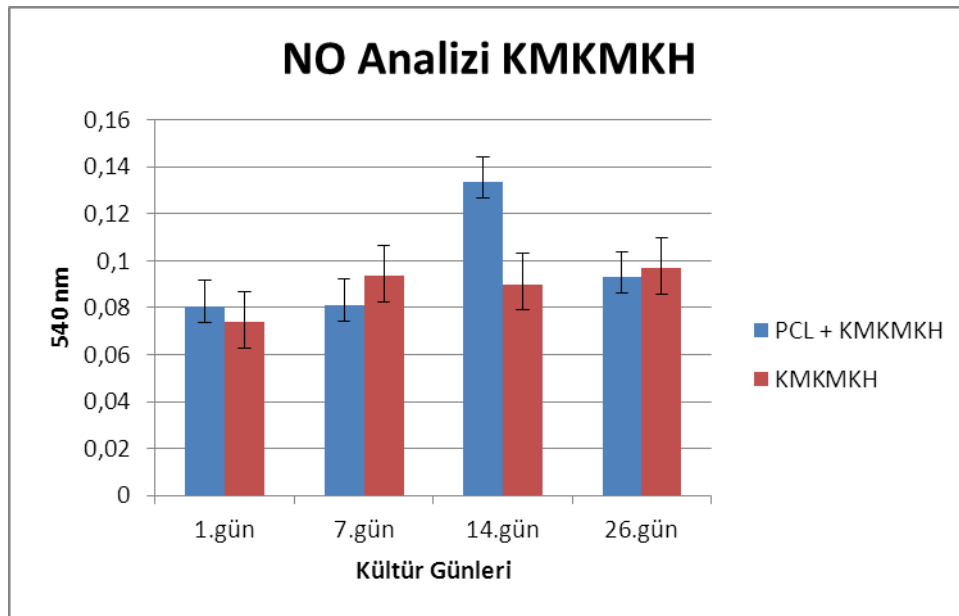


Şekil 4.27 96'lık plakda NO analizi

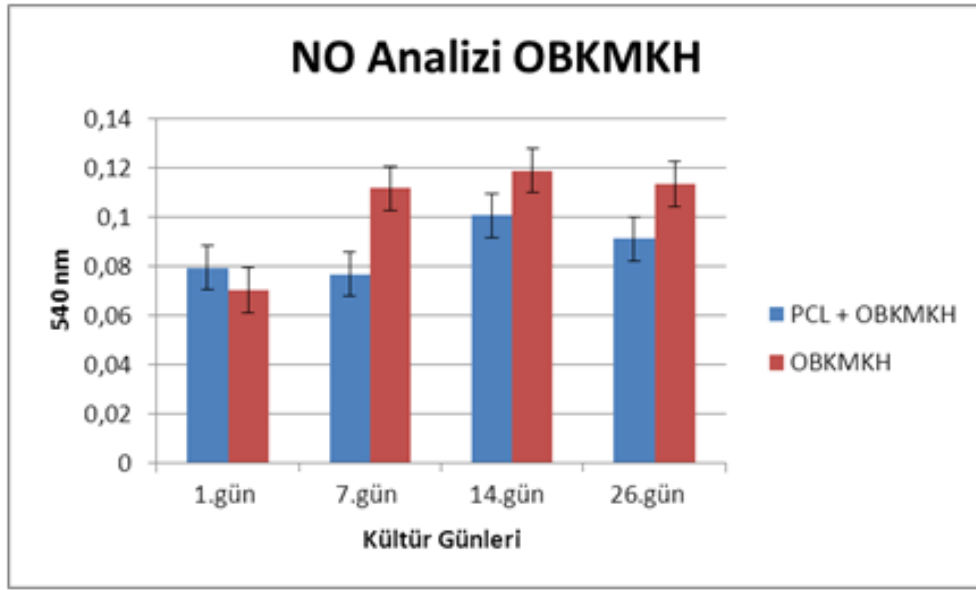
Çizelge 4.13 Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre ve PCL Scaffoldun Üç Boyutlu Kültürün NO Sonucu



Çizelge 4.14 Kordon Matris Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre ve PCL Scaffoldun Üç Boyutlu Kültürün NO Sonucu



Çizelge 4.15 Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre ve PCL Scaffoldun Üç Boyutlu Kültürün NO Sonucu



SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde son derece yaygın olan kıkırdak hasarları cerrahlar için tedavi edilmesi zor olan bir hastalıktır. Tedavisi olmayan bu hastalığın kendiliğinden iyileşme potansiyeli ya çok azdır ya da hiç yoktur. Çünkü kıkırdak doku, kondrositlerin az çoğalması ve kan damarlarının olmayışından ötürü kendiliğinden iyileşmesi oldukça zor olan bir dokudur [8], [37], [33]. Kıkırdak defektleri konservatif veya cerrahi yöntemler ile tedavi edilebilir. Konservatif tedavideki amaç ağrıyı azaltmak ve hastalarda rahatlamayı sağlamaktır [87]. Cerrahi tedavideki amaç ise ağrıyı azaltarak, kıkırdağın fonksiyonunu iyileştirmek ve hiyalin kıkırdak onarımını sağlayarak eklemdeki hasarın ilerlemesini önlemektir [88]. Günümüzde halen kıkırdak hasarı ile ilgili sorunlar güncelliğini ciddi şekilde korumaktadır [115]. Son yirmi yılda biyomalzeme teknolojileri ve hücre kaynağı çeşitliliğinin büyük gelişmeler göstermesiyle birlikte moleküler ve genetik manipülasyonlar ile işlevsel bir yapay kıkırdak üretimi yolunda kıkırdak doku mühendisliği çalışmaları oldukça umut vaat edici bir hal almıştır [116]. Kıkırdak doku mühendisliğinde çalışmalarının birçoğu otolog izole edilmiş kondrositler ile yapılmaktadır. Fakat otolog kondrositlerin *in vitro* çoğaltılmasının neden olduğu dedifferensiyon ve ya fenotip kaybı gibi dezavantajlar kıkırdak rejenerasyonunda kullanımlarını faydasız kılmaktadır [7], [131]. Kondrosit hücrelerin dezavantajları nedeniyle kıkırdak doku mühendisliğinde hızlı bir şekilde alternatif kök hücre kaynaklarına yönelim olmuştur [21]. Bu kök hücre kaynaklarından kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler yaygın kullanım alanı bulmuştur. Fakat daha sonra yapılan çalışmalar başka dokulardan da mezenkimal kök hücrelerin izole edilebileceğini ve

kıkırdak doku mühendisliğinde kullanımının daha pratik olabileceğini ortaya koymuştur [152], [287], [288], [289], [290]. Kıkırdak doku mühendisliği üzerine yapılan çalışmalarda hem doğal hem de sentetik scaffoldlar kullanılmaktadır [28], [30], [251], [254], [256], [257], [258], [259], [260], [261], [262], [265], [266], [267], [268], [288], [291]. Fakat hem sentetik scaffoldların hem de doğal scaffoldların kullanımında avantajlarının yanında dezavantajları da mevcuttur. Seçilen scaffold ile tedavi edilecek organ ya da dokunun ekstraselüler matrisi doğru bir şekilde taklit edilmeli, ayrıca tasarlanmak istenen yapay dokuya en yakın özellikleri verebilecek kök hücre hattı belirlenmelidir. FDA onaylı biyobozunur ve biyouyumlu sentetik scaffoldlardan biri olan PCL polimeri kullanılarak yapılan PCL scaffoldlar ile ilgili günümüzde güncel kıkırdak doku mühendisliği çalışmaları oldukça yaygındır. Çünkü PCL scaffold diğer sentetik polimerlerle yapılan scaffoldlara göre iyi çözünür, düşük erime noktasına sahiptir, hidrofilik yüzeyi sayesinde hücrelerin tutunmasını sağlar ve proliferasyonunu artırır [24], [29]. Kıkırdak doku mühendisliği esasları temel alınarak yapılan birçok çalışmada mezenkimal kök hücrelerin PCL scaffold üzerine başarıyla infüze edildiği tespit edilmiştir [15], [16], [283], [284], [285]. Ancak şimdiye kadar kıkırdak doku mühendisliğinde, PCL'nin hangi mezenkimal kök hücre ile daha iyi etkileşime girdiğini kıyaslı olarak inceleyen çalışmalar oldukça yetersizdir. Ayrıca kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılması için olfaktör bulb kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile PCL scaffold arasındaki etkileşimi gösteren literatürde herhangi bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Buna göre de, bu tez çalışmasının amacı; farklı kaynaklardan elde edilen adipoz doku, kordon matriks ve olfaktör bulb kökenli mezenkimal kök hücreler ile PCL scaffold arasındaki etkileşimi kıyaslı olarak incelemek, oluşturulan üç boyutlu kültürler üzerinde kondrojenezi gerçekleştirmek, daha sonra ise hangi mezenkimal kök hücre kaynağının kondrosite daha iyi farklılaştığını belirlemek ve kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılmak üzere daha uygun kök hücre kaynağını önermektir. Amaca ulaşmak için çalışmalarımızda öncelikle hücre kültürü ve doku mühendisliği laboratuvarımızın kriyobankın da bulunan adipoz [278], kordon matris [276] ve olfaktör bulb [277] olmak üzere farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücre hatlarının devamlı kültürünün yapılması gerçekleştirildi. Farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin normal şekilde proliferasyonu ve mikroskopik alanda hiçbir atipik hücrelere

rastlanmadığı saptandı. Kordon matrisi kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin adipoz doku ve olfaktör bulb kaynaklı mezenkimal kök hücrelere göre daha hızlı proliferasyon olduğu tespit edildi. [278]. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri, elde edildiği donör açısından minimal risk oluşturması ve bol miktarda elde edilebilmesi nedeniyle kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır [262]. Laboratuvarımızda konu ile ilgili yapılan tez çalışmasında da adipoz dokudan mezenkimal kök hücrelerin çeşitli yöntemlerle izolasyonu ortaya konulmuş, ayrıca örnek miktarının yetersiz olduğu durumlarda ise Allahverdiyev ve arkadaşları tarafından geliştirilen mikrokültür yöntemiyle izolasyon gerçekleştirilmiştir [278], [292].

Tez çalışmamızda kullandığımız elde edilmesi çok kolay ve diğer erişkin mezenkimal kök hücrelere nazaran daha genç bir soya sahip olan kordon matris kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin [276] sinir, karaciğer, yağ, kemik ve kıkırdak hücrelerine dönüştüğü rapor edilmiştir [290]. Laboratuvarımızda doktora tezi kapsamında buna benzer çalışmalarda gerçekleştirilmiştir [276]. Çalışmamızda ayrıca ilk kez olarak; daha önce laboratuvarımızda 2012-07-04KAP02 numaralı proje kapsamında elde edilen olfaktör bulb kökenli mezenkimal kök hücreler bu tez çalışmasında kıkırdak doku mühendisliği temelleri esas alınarak PCL scaffold ile kullanıldı [277], [293]. Olfaktör bulb kökenli mezenkimal hücreler çok küçük miktarlarda ki nazal biyopsi örneklerinden kolaylıkla elde edilebilen ve birçok hücre hatlarına farklılaşabilen mezenkimal kök hücrelerdir [200]. Olfaktör bulb kökenli mezenkimal kök hücrelerinin osteositlere farklılaşmasının, kondrositlere ve adipositlere farklılaşmasından daha yüksek bir kapasiteye sahip olduğu da yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur [147]. Fakat olfaktör bulb kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin üç boyutlu kültürleri ile kıkırdak doku mühendisliğinde kullanımlarına yönelik literatür de hiçbir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda scaffold olarak Poli (ϵ -kaprolakton) kullanıldı. İsoğlu ve arkadaşlarının kemik doku mühendisliğinde kullandıkları "spiral wounding" şeklinde hazırlanmış oldukları PCL scaffoldun şimdiye kadar kıkırdak doku mühendisliğinde etkisi incelenmemiştir [282]. Spiral wounding şeklinde hazırlanan PCL scaffold mikro gözeneklere ve makro kanallara sahiptir. "spiral wounding" şeklinde hazırlanan scaffold ile kanallara ve gözenekler birbiriyle bağlantılı hale gelir böylece kondrosit hücrelerinin

katlamalar sırasında meydana gelen makro gözeneklere de yerleşir. Ayrıca makro kanallarda proliferen olan mezenkimal kök hücreler kondrosite farklılaşarak, kanallardan scaffold bozundukça göç edebilir ve sağlıklı dokuyu oluşturabilir. Scaffoldun gelecekte yapılabilecek *in vivo* çalışmalar ile yüksek potansiyeli daha net ortaya çıkabilir.

Farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler poli (ϵ -kaprolakton) scaffold üzerinde üç boyutlu kültür modelinin oluşturulması, geliştirilmesi ve optimizasyonu için proliferen edici besiyeri ile on iki gün boyunca kültüre edildi. PCL scaffold yüzeyine ekilen farklı kökenli mezenkimal kök hücre CM Dil ile boyanarak proliferasyonu ters mikroskop da takip edildi. Kültürün altıncı gününde farklı kökenli her üç mezenkimal kök hücrenin yoğunluğu fazla olan bölgelerde CM Dil ile boyanmış hücre yoğunluğuda daha fazla görüldü. Ancak kordon matrisi ile elde edilen kök hücrelerin PCL scaffold üzerindeki üç boyutlu kültüründe diğer hücrelere nazaran daha yoğun proliferen olduğu görüldü. Optimize edilen üç boyutlu mezenkimal kök hücrelerin daha sonra canlılık analizleri (MTT ve Canlı/Ölü boyası) yapıldı ve SEM ile morfolojileri tespit edildi. Proliferen edici besiyeri ile yapılan üç boyutlu optimizasyon çalışmasında kordon matrisi kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin canlılığının adipoz ve olfaktör bulb kaynaklı mezenkimal kök hücrelerine oranla daha yoğun görüldüğü fakat kordon matrisi ve olfaktör kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin PCL scaffold üzerinde altıncı günden sonra canlılıkları çok az miktarda azalırken, adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin ve PCL scaffoldun üç boyutlu kültüründe ise on ikinci günde altıncı güne oranla canlılık da 2 katına kadar hızlı bir düşüş olduğu görülmüştür. SEM sonuçlarında ise farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin PCL scaffold etkileşimleri arasında çok fark görünmese de her üç kök hücrenin PCL scaffoldun fiber yapılarına adezyon yaptıkları saptanmıştır. Optimizasyon çalışmasında canlı/ölü boyamasının MTT ile paralel olduğu yani en fazla yeşille boyalı canlı hücrenin kordon matrisi daha sonra olfaktör ve en son adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde olduğu gözlemlendi. Böylece elde ettiğimiz sonuçlar PCL scaffold yüzeyinde kök hücrelerin canlılığının canlı/ölü boyaması ve MTT çalışması ile paralel kullanılabilineceğini mümkün olduğunu göstermiştir. Daha sonra farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin PCL scaffold üzerinde üç boyutlu kültürleri optimize edilerek literatür de ilk defa aynı anda adipoz, kordon matrisi ve olfaktör mezenkimal kök hücrelerin elektrospinnig ile hazırlanmış spiral wounding şeklinde PCL

scaffold yüzeyinde kondrojenik farklılaşmaları karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Daha sonra tez kapsamında geliştirilen üç boyutlu hücre kültür modellerinde yirmialtı gün boyunca kondrojenik farklılaşma yapıldı. Üç boyutlu kültürlerde kondrojenik farklılaşma canlılık (MTT ve Canlı/Ölü boyası), SEM ile morfolojileri, PZR ve Eş zamanlı PZR ile gen ekspresyonları, NO ve histokimyasal analizleri yapıldı. İncelenen tüm bu parametreler kapsamında kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılmak üzere PCL scaffold ile iyi etkileşime girebilen bir mezenkimal kök hücre hattı belirlendi. İlk önce kondrojenik farklılaşma besiyeri ile üç boyutlu kültürü ters mikroskopta hem normal ışıkta hem de Canlı/Ölü boyaması yapılarak UV ışıkta incelendi. Elde edilen sonuçlara göre üç farklı kök hücre ile hazırlanan üç boyutlu hücre kültür modellerinde morfolojik bir farklılık görülmedi, ayrıca üç boyutlu hücre kültürlerinde kondrojenik farklılaştığı düşünülen farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin yirmi altı gün boyunca canlı ölü boyamasıyla canlılıklarını korudukları saptandı. Canlılık boyama sonuçlarında üç mezenkimal kök hücrede de yedinci günde, on dördüncü güne oranla yeşil ışık oranının kırmızı ışık oranından fazla olduğu gözlemlendi. Farklılaşma prosedürünün sonunda 26. günün sonunda mezenkimal kök hücrelerden farklılaşan hücrelerin daha sonraki aşamalarda PZR ve eş zamanlı PZR yöntemiyle kondrosit hücrelerine benzer özellikteki hücreler olduğu tespit edildi (n:3). Yapılan MTT çalışmalarında aynı sayıda mezenkimal kök hücre ekilen üç boyutlu ve iki boyutlu kültürlerin 24 saat sonucunda kordon matrisi kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin iki boyutlu kültürde yaklaşık 2 kata kadar arttığı tespit edildi. Ayrıca üç boyutlu kültürün 24 saat sonucundaki canlılık oranı iki boyutlu kültürlerine göre genel olarak tüm farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde artmıştır. Fakat 26. gün sonunda canlılığı en yüksek olan hücrelerin, olfaktör bulbulu kaynaklı mezenkimal kök hücreler olduğu gözlemlenmiştir. İki boyutlu kültürlerine nazaran üç boyutlu kültürlerde hücrelerin canlılıklarını daha uzun süre muhafaza etmeleri, yapılan kondrojenik çalışmalarda kondrojenik farklılaşmaya da olumlu bir katkı sağlayabilir. Mezenkimal kök hücrelerin scaffoldu ekstraselüler matris gibi kullanarak kondrogenezisi gerçekleştirmesi sonucunda TipI-TipII kollajene benzer ürünler oluşturması literatürde bilinmektedir. Deney sonuçlarında Tip I ve Tip II kollajenin biyosentezinden sorumlu olan Col2A1 ve Col1A1 genleri PZR ve Eş zamanlı PZR ile saptandı. Öncelikle Col2A1 geni için bir PZR çalışması yapıldı. Bu çalışmada

incelenen üç farklı kaynaklı mezenkimal kök hücrenin kondrojenik farklılaşmasının 26. gününden elde edilen cDNA'lar jel elektroforezinde yürütüldü. Bu cDNA'ların hepsinin Col2A1 için pozitif sonuç verdiği saptandı. Daha sonra yapmış olduğumuz PZR çalışmasını desteklemek için eş zamanlı PZR çalışması yapıldı. Üç boyutlu hücre kültüründe farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmanın 21. ve 26. günlere ait cDNA'ları Sox9, Col2A1 ve Col1A1 genlerini hedefleyen primerler kullanarak bir ön çalışma yapıldı. Bu eş zamanlı PZR ön çalışması sonuçlarına göre kordon matrisi kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelere göre daha hızlı kondrosit özelliklerine benzer özellikteki hücrelere farklılaştığını gözlemledik. Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ise olfaktör kaynaklı mezenkimal kök hücrelere göre daha hızlı kondrosit özelliklerine benzer özellikteki hücrelere farklılaştığını tespit ettik. Col1A1 gen ekspresyonuna bakıldığında farklılaştığı düşünülen adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde yüksek oranda bir artış gösterdiği tespit edildi. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile PCL scaffold arasında daha önce yapılan çalışmada bu modelin kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılabilecek referans bir model olduğu rapor edilmiştir. Fakat kollajen gelişimi sadece histolojik olarak ortaya konmuştur ve gen ekspresyonları incelenmemiştir [284]. Elde ettiğimiz sonuçlar daha önce yapılan çalışmaları desteklemektedir. Ancak diğer araştırmacılardan farklı olarak biz bu çalışmada ilk kez olarak gen ekspresyonu da incelenmiş ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin kondrosite benzer özellikte ki hücrelere farklılaşması moleküler açıdan desteklenmiştir.

Çalışmamızın daha sonraki aşamasında ilk kez olarak olfaktör bulbulb kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin PCL scaffold ile üç boyutlu hücre kültür modeli incelenmiştir. Kondrojenik farklılaşmanın 21 ve 26 günleri karşılaştırıldığında Sox9, Col2A1 ve Col1A1 gen bölgeleri için ekspresyonlarda artışlar gözlenmiştir. Ayrıca olfaktör bulbulb kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin Col2A1 gen ekspresyonunun yüksek olduğu bununda olfaktör bulbulb kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kıkırdak doku mühendisliğinde yapay kıkırdak oluşturmak için istenilen hiyalin kıkırdağa bu üç farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler arasında en elverişli mezenkimal kök hücre kaynağı olduğunu göstermekteyiz. Bu da olfaktör bulbulb kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin PCL scaffold ile üç boyutlu

kültürleri ile hazırlanacak yapay dokuların kıkırdak doku mühendisliğinde gelecekte uygulanabilecek potansiyelde bir hücre olduğunu göstermektedir. Böylece tez kapsamında çalışmamızda ilk kez olarak olfaktör bulb kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kondrosit benzeri hücrelere PCL scaffold yüzeyinde farklılaştığı saptanmış ve kıkırdak doku mühendisliği açısından ciddi bir potansiyel kaynağı olduğu ortaya çıkmıştır.

Çalışmanın daha sonraki aşamasında PCL scaffoldu üzerinde oluşan kondrosit benzeri hücreleri histolojik açıdan saptama amacıyla doku takibi yapıldı. Bu amaçla frozen kesitler [294] ve parafine gömme yöntemleri uygulandı [284]. Ancak çalışmamızda diğer araştırmacılardan farklı olarak yapılan çalışmaların prosesleri bire bir uygulanmasına rağmen iyi bir sonuç alınamadı. Çünkü PCL polimeri oda sıcaklığında; kloroform, diklorometan, karbon tetraklorid, benzen, ksilen, toluen, sikloheksanon, 2-nitropropen de çözünebilir. Aseton, 2-bütanon, etil asetat, dimetilformamid, asetonitril içerisinde düşük çözünürlüğe sahipken, alkol, petrol, eter ve dietil eter içinde çözünmez. Ayrıca -60°C ve +60°C da da çok iyi bir çözünebilir [24]. Tüm bu özellikleri scaffold olarak kullanımının çalışmamız da doku takibini zorlaştırmıştır. Doku takibindeki problemlerin üstesinden gelebilmek için gelecekte literatürde de var olan PCL/Kitosan [16], PCL/PVL [15], PCL/Fibrin [284] gibi blendler ile hazırlanan scaffoldlar kullanılabilir.

Doku mühendisliğinde ortaya çıkan sorunlardan birisi uygulanabilecek scaffoldların immün yanıt oluşturabilmesidir. Bu amaçla literatürde çeşitli parametreler ve özellikle NO üretimi incelenmektedir. Bu nedenle çalışmaların daha sonraki aşamasında yapılan üç boyutlu kültür ortamında kondrojenik farklılaşma boyunca NO analizi yapıldı. Sonuçlar PCL scaffold ile farklı doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin üçü için de, özellikle kültürün 14. gününde NO miktarının diğer günlere oranla ve iki boyutlu kültürlerine oranla daha yüksek olduğu görüldü. Ayrıca olfaktör bulb kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin iki boyutlu kültürlerinde üç boyutlu kültürlerine oranla daha yüksek NO oluşturduğu tespit edildi [295]. MTT ve NO Analizi sonuçları istatistiksel olarak parametrik yöntemler olan ANOVA ve student t test ile belirlenmiştir. Tüm veriler Statistical Packages of Social Sciences (SPSS, version 19.0 for Windows) programı ile yapıldı ve $p < 0,05$ değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

Sonuç olarak bu çalışmada; ilk kez farklı üç kaynaktan elde edilen mezenkimal kök hücreler ile PCL scaffold arasındaki etkileşim kıyaslamalı olarak incelenmiştir. PCL'nin farklı üç kaynaktan elde edilen mezenkimal kök hücreler ile etkileşime girdiği fakat kondrojenik farklılaşma boyunca en iyi etkileşimin MTT ve NO sonuçlarına ($p < 0,05$) göre olfaktör bulb kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile olduğu gösterilmiştir. Kondrojenik farklılaşma hızına göre ise sırasıyla kordon matrisi, adipoz doku ve en son olarak olfaktör bulb kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kondrosit benzeri hücrelere farklılaştığı PZR ve Eş Zamanlı PZR sonucuna göre saptanmıştır. Olfaktör bulb kaynaklı mezenkimal kök hücrenin diğer mezenkimal kök hücreye göre üç boyutlu kültürlerinden elde edilen RNA'ların Eş zamanlı PZR sonucunda Col2A1 gen ifadesinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu da hiyalin kıkırdak benzeri özelliğin en fazla olfaktör bulb kaynaklı mezenkimal kök hücre ve PCL scaffold ile hazırlanan üç boyutlu kültür modeli ile sağlandığını göstermektedir. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre ve PCL scaffold ile hazırlanmış üç boyutlu kültürlerinden elde edilen RNA'ların Eş zamanlı PZR sonucunda ise Col1A1 gen ifadesinin daha fazla olduğu saptandı. Bu da fibröz kıkırdak benzeri özelliğin en fazla adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre ve PCL scaffold ile hazırlanan üç boyutlu modeli ile sağlandığını göstermektedir.

Böylece yapılan çalışma sonucunda ilk kez olarak kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılmak üzere en iyi üç boyutlu kültür modelinin olfaktör bulb kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile PCL scaffoldun olduğu bu tez çalışması kapsamında ortaya çıkarılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Felson, D.T. ve Zhang, Y., (1998). "An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention", *Arthritis & Rheumatism*, 41: 1343-1355.
- [2] Türkiye Sağlık Araştırması 2010 Sayı: 8620 27/10/2011, <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=8620>, 6 Nisan 2013.
- [3] Raghunath, J. Rollo, J. Sales, K.M. Butler, P.E. ve Seifalian, A.M., (2007). "Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage", *Biotechnology and applied biochemistry*, 46: 73-84.
- [4] Ma, P.X. ve Langer, R., (1999). "Morphology and mechanical function of long-term in vitro engineered cartilage", *J Biomed Mater Res*, 44: 217-221.
- [5] Mow, V.C. Ratcliffe, A. ve Robin Poole, A., (1992). "Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures", *Biomaterials*, 13: 67-97.
- [6] Hung, C.T. Mauck, R.L. Wang, C.C.-B. Lima, E.G. ve Ateshian, G.A., (2004). "A paradigm for functional tissue engineering of articular cartilage via applied physiologic deformational loading", *Annals of biomedical engineering*, 32: 35-49.
- [7] Kuo, C.K. Li, W.-J. Mauck, R.L. ve Tuan, R.S., (2006). "Cartilage tissue engineering: its potential and uses", *Current opinion in rheumatology*, 18: 64-73.
- [8] Wescoe, K.E. Schugar, R.C. Chu, C.R. ve Deasy, B.M., (2008). "The role of the biochemical and biophysical environment in chondrogenic stem cell differentiation assays and cartilage tissue engineering", *Cell biochemistry and biophysics*, 52: 85-102.
- [9] McNickle, A.G. Provencher, M.T. ve Cole, B.J., (2008). "Overview of existing cartilage repair technology", *Sports medicine and arthroscopy review*, 16: 196-201.

- [10] Koga, H. Engebretsen, L. Brinchmann, J.E. Muneta, T. ve Sekiya, I., (2009). "Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review", *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 17: 1289-1297.
- [11] Williams Iii RJ, B.R., (2008). "Cartilage repair procedures: clinical approach and decision making.", *Instr Course Lect*, 57: 553-561.
- [12] Wood, J.J. Malek, M.A. Frassica, F.J. Polder, J.A. Mohan, A.K. Bloom, E.T. Braun, M.M. ve Cote, T.R., (2006). "Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration", *J Bone Joint Surg Am*, 88: 503-507.
- [13] Hunziker, E.B., (2009). "The elusive path to cartilage regeneration", *Advanced Materials*, 21: 3419-3424.
- [14] Williams, R.J., (2006). "Articular cartilage repair: clinical approach and decision making", *Operative Techniques in Orthopaedics*, 16: 218-226.
- [15] Nirmal, R.S. ve Nair, P.D., (2013). "Significance of soluble growth factors in the chondrogenic response of human umbilical cord matrix stem cells in a porous three dimensional scaffold", *European Cells Materials*, 26: 234-251.
- [16] Neves, S.C. Moreira Teixeira, L.S. Moroni, L. Reis, R.L. Van Blitterswijk, C.A. Alves, N.M. Karperien, M. ve Mano, J.F., (2011). "Chitosan/poly (ϵ -caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair", *Biomaterials*, 32: 1068-1079.
- [17] Katsumoto, K. Shiraki, N. Miki, R. ve Kume, S., (2010). "Embryonic and adult stem cell systems in mammals: ontology and regulation", *Development, growth & differentiation*, 52: 115-129.
- [18] Tewarie, R.S.N. Hurtado, A. Bartels, R.H. Grotenhuis, A. ve Oudega, M., (2009). "Stem cell-based therapies for spinal cord injury", *The journal of spinal cord medicine*, 32: 105.
- [19] Beane, O.S. ve Darling, E.M., (2012). "Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration", *Annals of biomedical engineering*, 40: 2079-2097.
- [20] Ge, Z. Li, C. Heng, B.C. Cao, G. ve Yang, Z., (2012). "Functional biomaterials for cartilage regeneration", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100: 2526-2536.
- [21] Pittenger, M.F. Mackay, A.M. Beck, S.C. Jaiswal, R.K. Douglas, R. Mosca, J.D. Moorman, M.A. Simonetti, D.W. Craig, S. ve Marshak, D.R., (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells", *science*, 284: 143-147.
- [22] Mohan, N. ve Nair, P.D., (2010). "A synthetic scaffold favoring chondrogenic phenotype over a natural scaffold", *Tissue Eng Part A*, 16: 373-384.
- [23] Varga, I. Zamborský, R. ve Böhmer, D., (2012). "The tissue engineering of articular cartilage: cells, scaffolds and stimulating factors", *Experimental Biology and Medicine*, 237: 10-17.

- [24] Woodruff, M.A., Hutmaker, D. W., (2014). "The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century", *Progress in Polymer Science*, 35: 1217-1256.
- [25] Mkhabela, V.J. ve Ray, S.S., (2014). "Poly(epsilon-caprolactone) nanocomposite scaffolds for tissue engineering: a brief overview", *J Nanosci Nanotechnol*, 14: 535-545.
- [26] Ahmed, T.A. ve Hincke, M.T., (2014). "Mesenchymal stem cell - based tissue engineering strategies for repair of articular cartilage", *Histol Histopathol*, 29: 669-689.
- [27] Van Natta, F. Hill, J. ve Carothers, W., (1934). "Studies of polymerization and ring formation. XXIII. epsilon-caprolactone and its polymers", *J. Am. Chem. Soc*, 56: 455-457.
- [28] Nair, L.S. Starnes, T. Ko, J.-W.K. ve Laurencin, C.T., (2007). "Development of injectable thermogelling chitosan-inorganic phosphate solutions for biomedical applications", *Biomacromolecules*, 8: 3779-3785.
- [29] Dalton, P. Woodfield, T. ve Hutmacher, D., (2009). "Snapshot: Polymer scaffolds for tissue engineering", *Biomaterials*, 30: 701.
- [30] Pişkin, E. İšoğlu, İ.A. Bölgen, N. Vargel, İ. Griffiths, S. Çavuşoğlu, T. Korkusuz, P. Güzel, E. ve Cartmell, S., (2009). "In vivo performance of simvastatin-loaded electrospun spiral-wound polycaprolactone scaffolds in reconstruction of cranial bone defects in the rat model", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 90: 1137-1151.
- [31] Verma, G.P., (2001). "Cartilage and Bone. Fundamentals of Histology.", *New age international*, Chapter 5.
- [32] Buckwalter, J.A. ve Mankin, H.J., (1998). "Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions", *Instr Course Lect*, 47: 477-486.
- [33] Buckwalter, J. ve Mankin, H., (1997). "Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation", *Instructional course lectures*, 47: 487-504.
- [34] Stockwell, R., (1979). "Biology of Cartilage Cells", *Cambridge University Press*.
- [35] Bhosale, A.M. ve Richardson, J.B., (2008). "Articular cartilage: structure, injuries and review of management", *Br Med Bull*, 87: 77-95.
- [36] Hunziker, E.B., (2002). "Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects", *Osteoarthritis Cartilage*, 10: 432-463.
- [37] Preitschopf, A. Zwickl, H. Li, K. Lubec, G. Joo, G. Rosner, M. Hengstschlager, M. ve Mikula, M., (2012). "Chondrogenic differentiation of amniotic fluid stem cells and their potential for regenerative therapy", *Stem Cell Rev*, 8: 1267-1274.
- [38] Rountree, R.B. Schoor, M. Chen, H. Marks, M.E. Harley, V. Mishina, Y. ve Kingsley, D.M., (2004). "BMP receptor signaling is required for postnatal maintenance of articular cartilage", *PLoS Biol*, 2: e355.

- [39] Brunet, L.J. McMahon, J.A. McMahon, A.P. ve Harland, R.M., (1998). "Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton", *science*, 280: 1455-1457.
- [40] Aigner, T. ve Stove, J., (2003). "Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair", *Adv Drug Deliv Rev*, 55: 1569-1593.
- [41] Lane, J.M. Brighton, C.T. ve Menkowitz, B.J., (1977). "Anaerobic and aerobic metabolism in articular cartilage", *J Rheumatol*, 4: 334-342.
- [42] Mobasher, A. Vannucci, S.J. Bondy, C.A. Carter, S.D. Innes, J.F. Arteaga, M.F. Trujillo, E. Ferraz, I. Shakibaei, M. ve Martin-Vasallo, P., (2002). "Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis", *Histol Histopathol*, 17: 1239-1267.
- [43] Shlopov, B.V. Lie, W.R. Mainardi, C.L. Cole, A.A. Chubinskaya, S. ve Hasty, K.A., (1997). "Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases", *Arthritis Rheum*, 40: 2065-2074.
- [44] Flannery, C.R. Little, C.B. Hughes, C.E. ve Caterson, B., (1998). "Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases", *Biochem Biophys Res Commun*, 251: 824-829.
- [45] Buttle, D.J. Fowles, A. Ilic, M.Z. ve Handley, C.J., (1997). "Aggrecanase activity is implicated in tumour necrosis factor alpha mediated cartilage aggrecan breakdown but is not detected by an in vitro assay", *Mol Pathol*, 50: 153-159.
- [46] Hering, T.M., (1999). "Regulation of chondrocyte gene expression", *Front Biosci*, 4: D743-761.
- [47] Demoor, M. Ollitrault, D. Gomez-Leduc, T. Bouyoucef, M. Hervieu, M. Fabre, H. Lafont, J. Denoix, J.M. Audigie, F. Mallein-Gerin, F. Legendre, F. ve Galera, P., (2014). "Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction", *Biochim Biophys Acta*.
- [48] Goldring, S.R. ve Goldring, M.B., (2006). "Clinical aspects, pathology and pathophysiology of osteoarthritis", *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 6: 376-378.
- [49] Onyekwelu, I. Goldring, M.B. ve Hidaka, C., (2009). "Chondrogenesis, joint formation, and articular cartilage regeneration", *J Cell Biochem*, 107: 383-392.
- [50] Haque, M. ve Florin, T., (2007). "Progression of ulcerative colitis to collagenous colitis: chance, evolution or association?", *Inflamm Bowel Dis*, 13: 1321.
- [51] Goldring, M.B., (2012). "Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis", *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 4: 269-285.

- [52] Vinatier, C. Mrugala, D. Jorgensen, C. Guicheux, J. ve Noel, D., (2009). "Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors", *Trends Biotechnol*, 27: 307-314.
- [53] Knudson, C.B. ve Knudson, W., (2001). "Cartilage proteoglycans", *Semin Cell Dev Biol*, 12: 69-78.
- [54] Heinegard, D. ve Saxne, T., (2011). "The role of the cartilage matrix in osteoarthritis", *Nat Rev Rheumatol*, 7: 50-56.
- [55] Ghadially, J.A. Ghadially, R. ve Ghadially, F.N., (1977). "Long-term results of deep defects in articular cartilage. A scanning electron microscope study", *Virchows Arch B Cell Pathol*, 25: 125-136.
- [56] Lander, A.D. ve Selleck, S.B., (2000). "The elusive functions of proteoglycans: in vivo veritas", *J Cell Biol*, 148: 227-232.
- [57] Esko, J.D. Kimata, K. ve Lindahl, U., (2009). "Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans".
- [58] Varki, A., (2011). "Evolutionary forces shaping the Golgi glycosylation machinery: why cell surface glycans are universal to living cells", *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- [59] Ly, M. Laremore, T.N. ve Linhardt, R.J., (2010). "Proteoglycomics: recent progress and future challenges", *OMICS*, 14: 389-399.
- [60] Heinegard, D., (2009). "Proteoglycans and more--from molecules to biology", *Int J Exp Pathol*, 90: 575-586.
- [61] Lefebvre, V. Behringer, R.R. ve de Crombrughe, B., (2001). "L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway", *Osteoarthritis Cartilage*, 9 Suppl A: S69-75.
- [62] Lefebvre, V. Li, P. ve de Crombrughe, B., (1998). "A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene", *EMBO J*, 17: 5718-5733.
- [63] Widom, R.L. Culic, I. Lee, J.Y. ve Korn, J.H., (1997). "Cloning and characterization of hckrox, a transcriptional regulator of extracellular matrix gene expression", *Gene*, 198: 407-420.
- [64] Kennett, S.B. Udvardia, A.J. ve Horowitz, J.M., (1997). "Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription", *Nucleic Acids Res*, 25: 3110-3117.
- [65] Poree, B. Kyriotou, M. Chadjichristos, C. Beauchef, G. Renard, E. Legendre, F. Melin, M. Gueret, S. Hartmann, D.J. Mallein-Gerin, F. Pujol, J.P. Boumediene, K. ve Galera, P., (2008). "Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1.Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter", *J Biol Chem*, 283: 4850-4865.

- [66] McAlinden, A. Johnstone, B. Kollar, J. Kazmi, N. ve Hering, T.M., (2008). "Expression of two novel alternatively spliced COL2A1 isoforms during chondrocyte differentiation", *Matrix Biol*, 27: 254-266.
- [67] Buckwalter, J.A., (1998). "Articular cartilage: injuries and potential for healing", *J Orthop Sports Phys Ther*, 28: 192-202.
- [68] Shah, M.R. Kaplan, K.M. Meislin, R.J. ve Bosco, J.A., 3rd, (2007). "Articular cartilage restoration of the knee", *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 65: 51-60.
- [69] Temenoff, J.S. ve Mikos, A.G., (2000). "Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage", *Biomaterials*, 21: 431-440.
- [70] Adam, C. Eckstein, F. Milz, S. Schulte, E. Becker, C. ve Putz, R., (1998). "The distribution of cartilage thickness in the knee-joints of old-aged individuals -- measurement by A-mode ultrasound", *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, 13: 1-10.
- [71] Wong, M. ve Carter, D.R., (2003). "Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective", *Bone*, 33: 1-13.
- [72] Newman, A.P., (1998). "Articular cartilage repair", *Am J Sports Med*, 26: 309-324.
- [73] Fritz, J. Janssen, P. Gaissmaier, C. Schewe, B. ve Weise, K., (2008). "Articular cartilage defects in the knee--basics, therapies and results", *Injury*, 39 Suppl 1: S50-57.
- [74] Eyre, D., (2002). "Collagen of articular cartilage", *Arthritis Res*, 4: 30-35.
- [75] Poole, A.R. Kojima, T. Yasuda, T. Mwale, F. Kobayashi, M. ve Laverty, S., (2001). "Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair", *Clin Orthop Relat Res*: S26-33.
- [76] Matsiko A, L.T., O'Brien FJ, (2013). "Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair", *Materials*, 6(2): 637-668.
- [77] Kıkırdak Dokunun Tipleri, <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio210/chap06/lecture1.htm>], 20 Mayıs 2014
- [78] Kıkırdak Doku, [http://www.biyolojisisitesi.net/tum%20uniteler/destek ve hareket/kikirdak do ku.html](http://www.biyolojisisitesi.net/tum%20uniteler/destek%20ve%20hareket/kikirdak%20doku.html), 20 Mayıs 2014.
- [79] Hootman, J.M. ve Helmick, C.G., (2006). "Projections of US prevalence of arthritis and associated activity limitations", *Arthritis Rheum*, 54: 226-229.
- [80] Redman, S.N. Oldfield, S.F. ve Archer, C.W., (2005). "Current strategies for articular cartilage repair", *Eur Cell Mater*, 9: 23-32; discussion 23-32.
- [81] Noth, U. Steinert, A.F. ve Tuan, R.S., (2008). "Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy", *Nat Clin Pract Rheumatol*, 4: 371-380.

- [82] Odole, A.C. ve Ojo, O.D., (2014). "Is telephysiotherapy an option for improved quality of life in patients with osteoarthritis of the knee?", *Int J Telemed Appl*, 2014: 903816.
- [83] Engel, A., (1968). "Osteoarthritis and body measurements", *Vital Health Stat* 11: 1-37.
- [84] Hunter, W., (1995). "Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743", *Clin Orthop Relat Res*: 3-6.
- [85] Buckwalter, J.A. ve Mankin, H.J., (1998). "Articular cartilage repair and transplantation", *Arthritis Rheum*, 41: 1331-1342.
- [86] Madry, H. Grun, U.W. ve Knutsen, G., (2011). "Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options", *Dtsch Arztebl Int*, 108: 669-677.
- [87] Lubis, A.M. ve Lubis, V.K., (2012). "Adult bone marrow stem cells in cartilage therapy", *Acta Med Indones*, 44: 62-68.
- [88] Gill, T.J. Asnis, P.D. ve Berkson, E.M., (2006). "The treatment of articular cartilage defects using the microfracture technique", *J Orthop Sports Phys Ther*, 36: 728-738.
- [89] Magnusson, P. ve (1946). "Technique of debridement of the knee joint for arthritis. ", *Surg Clin North Am.*, 26: 226-249.
- [90] Jackson, R.W., (1996). "The Painful Knee: Arthroscopy or MR Imaging?", *J Am Acad Orthop Surg*, 4: 93-99.
- [91] Hubbard, M.J., (1996). "Articular debridement versus washout for degeneration of the medial femoral condyle. A five-year study", *J Bone Joint Surg Br*, 78: 217-219.
- [92] Steadman, J.R. Miller, B.S. Karas, S.G. Schlegel, T.F. Briggs, K.K. ve Hawkins, R.J., (2003). "The microfracture technique in the treatment of full-thickness chondral lesions of the knee in National Football League players", *J Knee Surg*, 16: 83-86.
- [93] Mithoefer, K. Williams, R.J., 3rd Warren, R.F. Potter, H.G. Spock, C.R. Jones, E.C. Wickiewicz, T.L. ve Marx, R.G., (2006). "Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique. Surgical technique", *J Bone Joint Surg Am*, 88 Suppl 1 Pt 2: 294-304.
- [94] Knutsen, G. Engebretsen, L. Ludvigsen, T.C. Drogset, J.O. Grontvedt, T. Solheim, E. Strand, T. Roberts, S. Isaksen, V. ve Johansen, O., (2004). "Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial", *J Bone Joint Surg Am*, 86-A: 455-464.
- [95] Steadman, J.R. Briggs, K.K. Rodrigo, J.J. Kocher, M.S. Gill, T.J. ve Rodkey, W.G., (2003). "Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up", *Arthroscopy*, 19: 477-484.
- [96] Joint Surface Damage, <http://www.kneesurgeonbristol.co.uk/conditions-treatments/joint-surface-damage.aspx>, 18 Mayıs 2014.

- [97] Outerbridge, H.K. Outerbridge, A.R. ve Outerbridge, R.E., (1995). "The use of a lateral patellar autologous graft for the repair of a large osteochondral defect in the knee", *J Bone Joint Surg Am*, 77: 65-72.
- [98] Gudas, R. Kalesinskas, R.J. Kimtys, V. Stankevicius, E. Toliulis, V. Bernotavicius, G. ve Smailys, A., (2005). "A prospective randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint in young athletes", *Arthroscopy*, 21: 1066-1075.
- [99] Gross, A.E. Langer, F. Houtp, J. Pritzker, K. ve Friedlaender, G., (1976). "Allotransplantation of partial joints in the treatment of osteoarthritis of the knee", *Transplant Proc*, 8: 129-132.
- [100] Gross, A.E. Silverstein, E.A. Falk, J. Falk, R. ve Langer, F., (1975). "The allotransplantation of partial joints in the treatment of osteoarthritis of the knee", *Clin Orthop Relat Res*: 7-14.
- [101] Ahmed, T.A. ve Hincke, M.T., (2010). "Strategies for articular cartilage lesion repair and functional restoration", *Tissue Eng Part B Rev*, 16: 305-329.
- [102] Malinin, T. Temple, H.T. ve Buck, B.E., (2006). "Transplantation of osteochondral allografts after cold storage", *J Bone Joint Surg Am*, 88: 762-770.
- [103] Hangody, L. Ráthonyi, G.K. Duska, Z. Vásárhelyi, G. Füles, P. ve Módis, L., (2004). "Autologous osteochondral mosaicplastySurgical technique", *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 86: 65-72.
- [104] Cascio, B.M. Pateder, D.B. Farber, A.J. Kramer, D.E. Ain, M.C. ve Frassica, F.J., (2008). "Improvement in documentation of compartment syndrome with a chart insert", *Orthopedics*, 31: 364.
- [105] Getgood, A. Brooks, R. Fortier, L. ve Rushton, N., (2009). "Articular cartilage tissue engineering: today's research, tomorrow's practice?", *J Bone Joint Surg Br*, 91: 565-576.
- [106] Harris, L.D. Kim, B.S. ve Mooney, D.J., (1998). "Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming", *J Biomed Mater Res*, 42: 396-402.
- [107] Khademhosseini, A. Vacanti, J.P. ve Langer, R., (2009). "Progress in tissue engineering", *Sci Am*, 300: 64-71.
- [108] Herman, A.R., (2002). "The history of skin grafts", *J Drugs Dermatol*, 1: 298-301.
- [109] Langer, R. ve Vacanti, J.P., (1995). "Artificial organs", *Sci Am*, 273: 130-133.
- [110] Lysaght, M.J. ve Hazlehurst, A.L., (2004). "Tissue engineering: the end of the beginning", *Tissue Eng*, 10: 309-320.
- [111] Mansbridge, J.N., (2009). "Tissue-engineered skin substitutes in regenerative medicine", *Curr Opin Biotechnol*, 20: 563-567.

- [112] Ross, J.S. ve Ginsburg, G.S., (2003). "The integration of molecular diagnostics with therapeutics. Implications for drug development and pathology practice", *Am J Clin Pathol*, 119: 26-36.
- [113] Berthiaume, F. Maguire, T.J. ve Yarmush, M.L., (2011). "Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges", *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2: 403-430.
- [114] Nemen-Guanzon, J.G. Lee, S. Berg, J.R. Jo, Y.H. Yeo, J.E. Nam, B.M. Koh, Y.G. ve Lee, J.I., (2012). "Trends in tissue engineering for blood vessels", *J Biomed Biotechnol*, 2012: 956345.
- [115] Johnstone, B. Alini, M. Cucchiari, M. Dodge, G.R. Eglin, D. Guilak, F. Madry, H. Mata, A. Mauck, R.L. Semino, C.E. ve Stoddart, M.J., (2013). "Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art", *Eur Cell Mater*, 25: 248-267.
- [116] Chung, C. ve Burdick, J.A., (2008). "Engineering cartilage tissue", *Adv Drug Deliv Rev*, 60: 243-262.
- [117] Zuk, P.A., (2001). "Stem cell research has only just begun", *science*, 293: 211-212.
- [118] Hoben, G.M. Willard, V.P. ve Athanasiou, K.A., (2009). "Fibrochondrogenesis of hESCs: growth factor combinations and cocultures", *Stem Cells Dev*, 18: 283-292.
- [119] Buschmann, M.D. Gluzband, Y.A. Grodzinsky, A.J. Kimura, J.H. ve Hunziker, E.B., (1992). "Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix", *J Orthop Res*, 10: 745-758.
- [120] Lutolf, M.P. ve Hubbell, J.A., (2005). "Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering", *Nat Biotechnol*, 23: 47-55.
- [121] Appelman, T.P. Mizrahi, J. Elisseff, J.H. ve Seliktar, D., (2011). "The influence of biological motifs and dynamic mechanical stimulation in hydrogel scaffold systems on the phenotype of chondrocytes", *Biomaterials*, 32: 1508-1516.
- [122] Schuh, E. Hofmann, S. Stok, K. Notbohm, H. Muller, R. ve Rotter, N., (2012). "Chondrocyte redifferentiation in 3D: the effect of adhesion site density and substrate elasticity", *J Biomed Mater Res A*, 100: 38-47.
- [123] Brittberg, M. Lindahl, A. Nilsson, A. Ohlsson, C. Isaksson, O. ve Peterson, L., (1994). "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation", *N Engl J Med*, 331: 889-895.
- [124] Peterson, L. Vasiliadis, H.S. Brittberg, M. ve Lindahl, A., (2010). "Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up", *Am J Sports Med*, 38: 1117-1124.
- [125] Peterson, L. Minas, T. Brittberg, M. Nilsson, A. Sjogren-Jansson, E. ve Lindahl, A., (2000). "Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee", *Clin Orthop Relat Res*: 212-234.

- [126] Kon, E. Verdonk, P. Condello, V. Delcogliano, M. Dhollander, A. Filardo, G. Pignotti, E. ve Marcacci, M., (2009). "Matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation for the repair of cartilage defects of the knee: systematic clinical data review and study quality analysis", *Am J Sports Med*, 37 Suppl 1: 156S-166S.
- [127] Filardo, G. Vannini, F. Marcacci, M. Andriolo, L. Ferruzzi, A. Giannini, S. ve Kon, E., (2013). "Matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation for cartilage regeneration in osteoarthritic knees: results and failures at midterm follow-up", *Am J Sports Med*, 41: 95-100.
- [128] Zheng, M.H. Willers, C. Kirilak, L. Yates, P. Xu, J. Wood, D. ve Shimmin, A., (2007). "Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI): biological and histological assessment", *Tissue Eng*, 13: 737-746.
- [129] Steinert, A.F. Ghivizzani, S.C. Rethwilm, A. Tuan, R.S. Evans, C.H. ve Noth, U., (2007). "Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage", *Arthritis Res Ther*, 9: 213.
- [130] Oldershaw, R.A., (2012). "Cell sources for the regeneration of articular cartilage: the past, the horizon and the future", *Int J Exp Pathol*, 93: 389-400.
- [131] Gao, J. Yao, J. ve Caplan, A., (2007). "Stem cells for tissue engineering of articular cartilage", *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 221: 441-450.
- [132] Schulze-Tanzil, G., (2009). "Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair", *Ann Anat*, 191: 325-338.
- [133] Adkisson, H.D. Martin, J.A. Amendola, R.L. Milliman, C. Mauch, K.A. Katwal, A.B. Seyedin, M. Amendola, A. Streeter, P.R. ve Buckwalter, J.A., (2010). "The potential of human allogeneic juvenile chondrocytes for restoration of articular cartilage", *Am J Sports Med*, 38: 1324-1333.
- [134] Detterline, A.J. Goldberg, S. Bach, B.R., Jr. ve Cole, B.J., (2005). "Treatment options for articular cartilage defects of the knee", *Orthop Nurs*, 24: 361-366; quiz 367-368.
- [135] Dell'Accio, F. Vanlauwe, J. Bellemans, J. Neys, J. De Bari, C. ve Luyten, F.P., (2003). "Expanded phenotypically stable chondrocytes persist in the repair tissue and contribute to cartilage matrix formation and structural integration in a goat model of autologous chondrocyte implantation", *J Orthop Res*, 21: 123-131.
- [136] Assady, S. Maor, G. Amit, M. Itskovitz-Eldor, J. Skorecki, K.L. ve Tzukerman, M., (2001). "Insulin production by human embryonic stem cells", *Diabetes*, 50: 1691-1697.
- [137] Shanti, R.M. Li, W.J. Nesti, L.J. Wang, X. ve Tuan, R.S., (2007). "Adult mesenchymal stem cells: biological properties, characteristics, and applications in maxillofacial surgery", *J Oral Maxillofac Surg*, 65: 1640-1647.
- [138] Rajendram, R., Preedy, V.R., Patel, V., (2013). *Stem Cells and Bone Tissue*, CRC Press, London.

- [139] Potten, C.S. ve Loeffler, M., (1990). "Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt", *Development*, 110: 1001-1020.
- [140] Barry, F. Boynton, R.E. Liu, B. ve Murphy, J.M., (2001). "Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components", *Exp Cell Res*, 268: 189-200.
- [141] Tapp, H. Hanley, E.N., Jr. Patt, J.C. ve Gruber, H.E., (2009). "Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair", *Exp Biol Med (Maywood)*, 234: 1-9.
- [142] Neuringer, I.P. ve Randell, S.H., (2004). "Stem cells and repair of lung injuries", *Respir Res*, 5: 6.
- [143] Tam, W.L. Ang, Y.S. ve Lim, B., (2007). "The molecular basis of ageing in stem cells", *Mech Ageing Dev*, 128: 137-148.
- [144] Kuo, T.K. Ho, J.H. ve Lee, O.K., (2009). "Mesenchymal stem cell therapy for nonmusculoskeletal diseases: emerging applications", *Cell Transplant*, 18: 1013-1028.
- [145] Oishi, K. Noguchi, H. Yukawa, H. ve Hayashi, S., (2009). "Differential ability of somatic stem cells", *Cell Transplant*, 18: 581-589.
- [146] Fortier, L.A. Barker, J.U. Strauss, E.J. McCarrel, T.M. ve Cole, B.J., (2011). "The role of growth factors in cartilage repair", *Clin Orthop Relat Res*, 469: 2706-2715.
- [147] Watt, F.M. ve Driskell, R.R., (2010). "The therapeutic potential of stem cells", *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365: 155-163.
- [148] Shanthly, N. Aruva, M.R. Zhang, K. Mathew, B. ve Thakur, M.L., (2006). "Stem cells: a regenerative pharmaceutical", *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 50: 205-216.
- [149] Munsie, M.J. Michalska, A.E. O'Brien, C.M. Trounson, A.O. Pera, M.F. ve Mountford, P.S., (2000). "Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei", *Curr Biol*, 10: 989-992.
- [150] Brignier, A.C. ve Gewirtz, A.M., (2010). "Embryonic and adult stem cell therapy", *J Allergy Clin Immunol*, 125: S336-344.
- [151] Young, H.E. ve Black, A.C., Jr., (2004). "Adult stem cells", *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 276: 75-102.
- [152] de Kretser, D., (2007). "Totipotent, pluripotent or unipotent stem cells: a complex regulatory enigma and fascinating biology", *J Law Med*, 15: 212-218.
- [153] Balogh, P. ve Engelmann, P., (2011). "Transdifferentiation and regenerative medicine".
- [154] Tuan, R.S. Chen, A.F. ve Klatt, B.A., (2013). "Cartilage regeneration", *J Am Acad Orthop Surg*, 21: 303-311.

- [155] Salibian, A.A. Widgerow, A.D. Abrouk, M. ve Evans, G.R., (2013). "Stem cells in plastic surgery: a review of current clinical and translational applications", *Arch Plast Surg*, 40: 666-675.
- [156] Zhang, H. ve Wang, Z.Z., (2008). "Mechanisms that mediate stem cell self-renewal and differentiation", *J Cell Biochem*, 103: 709-718.
- [157] Pojda, Z. Machaj, E. Kurzyk, A. Mazur, S. Debski, T. Gilewicz, J. ve Wysocki, J., (2013). "[Mesenchymal stem cells]", *Postepy Biochem*, 59: 187-197.
- [158] Mimeault, M. ve Batra, S.K., (2006). "Recent advances on multiple tumorigenic cascades involved in prostatic cancer progression and targeting therapies", *Carcinogenesis*, 27: 1-22.
- [159] Schena, F.P., (2002). "[Stem cells. What is their future in regenerative medicine?]", *G Ital Nefrol*, 19: 605-606.
- [160] Keller, G., (2005). "Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine", *Genes Dev*, 19: 1129-1155.
- [161] Oldershaw, R.A. Baxter, M.A. Lowe, E.T. Bates, N. Grady, L.M. Soncin, F. Brison, D.R. Hardingham, T.E. ve Kimber, S.J., (2010). "Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes", *Nat Biotechnol*, 28: 1187-1194.
- [162] Toh, W.S. Lee, E.H. ve Cao, T., (2011). "Potential of human embryonic stem cells in cartilage tissue engineering and regenerative medicine", *Stem Cell Rev*, 7: 544-559.
- [163] Takahashi, K. ve Yamanaka, S., (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors", *Cell*, 126: 663-76.
- [164] Meregalli, M. Farini, A. ve Torrente, Y., (2011). "Stem Cell Therapy for Neuromuscular Diseases", *Stem Cells in Clinic and Research*: 437-468.
- [165] Yamashita A, Liu S, Woltjen K, Thomas B, Meng G, Hotta A, Takahashi K, Ellis J, Yamanaka S, Rancourt DE. (2013) "Cartilage tissue engineering identifies abnormal human induced pluripotent stem cells", *Sci Rep*,3: 1978.
- [166] Hodgkinson, T. Yuan, X.F. ve Bayat, A., (2009). "Adult stem cells in tissue engineering", *Expert Rev Med Devices*, 6: 621-640.
- [167] Blau, H.M. Brazelton, T.R. ve Weimann, J.M., (2001). "The evolving concept of a stem cell: entity or function?", *Cell*, 105: 829-841.
- [168] Vescovi, A. Gritti, A. Cossu, G. ve Galli, R., (2002). "Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential", *Cells Tissues Organs*, 171: 64-76.
- [169] Martin-Rendon, E. ve Watt, S.M., (2003). "Stem cell plasticity", *Br J Haematol*, 122: 877-891.
- [170] Tarnok, A. Ulrich, H. ve Bocsi, J., (2010). "Phenotypes of stem cells from diverse origin", *Cytometry A*, 77: 6-10.

- [171] Ruan, G.P. Wang, J.X. Pang, R.Q. Yao, X. Cai, X.M. Wang, Q. Ma, L.H. Zhu, X.Q. ve Pan, X.H., (2012). "Treatment with chicken-egg-white or whole-egg extracts maintains and enhances the survival and differentiation of spleen cells", *Cytotechnology*, 64: 541-551.
- [172] Keller, R., (2002). "Stem cells on the way to restorative medicine", *Immunol Lett*, 83: 1-12.
- [173] Johnstone, B. Hering, T.M. Caplan, A.I. Goldberg, V.M. ve Yoo, J.U., (1998). "In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells", *Exp Cell Res*, 238: 265-272.
- [174] Ria, R., (2013). "Evidence for bone marrow adult stem cell plasticity: properties, molecular mechanisms, negative aspects, and clinical applications of hematopoietic and mesenchymal stem cells transdifferentiation", *Stem cells international*, 2013.
- [175] Ben-Ami, E. Berrih-Aknin, S. ve Miller, A., (2011). "Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases", *Autoimmun Rev*, 10: 410-415.
- [176] Ding, D.C. Shyu, W.C. ve Lin, S.Z., (2011). "Mesenchymal stem cells", *Cell Transplant*, 20: 5-14.
- [177] Bernardo, M.E. Locatelli, F. ve Fibbe, W.E., (2009). "Mesenchymal stromal cells", *Ann N Y Acad Sci*, 1176: 101-117.
- [178] Mou, X.Z. Lin, J. Chen, J.Y. Li, Y.F. Wu, X.X. Xiang, B.Y. Li, C.Y. Ma, J.M. ve Xiang, C., (2013). "Menstrual blood-derived mesenchymal stem cells differentiate into functional hepatocyte-like cells", *J Zhejiang Univ Sci B*, 14: 961-972.
- [179] Horwitz, E.M. Le Blanc, K. Dominici, M. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, I. Marini, F.C. Deans, R.J. Krause, D.S. ve Keating, A., (2005). "Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement", *Cytotherapy*, 7: 393-395.
- [180] Dominici, M. Le Blanc, K. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, I. Marini, F. Krause, D. Deans, R. Keating, A. Prockop, D. ve Horwitz, E., (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement", *Cytotherapy*, 8: 315-317.
- [181] Simmons, P.J. ve Torok-Storb, B., (1991). "Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1", *Blood*, 78: 55-62.
- [182] Tocci, A. ve Forte, L., (2003). "Mesenchymal stem cell: use and perspectives", *Hematol J*, 4: 92-96.
- [183] Parsons, X.H. Teng, Y.D. Parsons, J.F. Snyder, E.Y. Smotrich, D.B. ve Moore, D.A., (2011). "Efficient derivation of human cardiac precursors and cardiomyocytes from pluripotent human embryonic stem cells with small molecule induction", *J Vis Exp*: e3274.

- [184] Xu, C. Police, S. Rao, N. ve Carpenter, M.K., (2002). "Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells", *Circ Res*, 91: 501-508.
- [185] Rambhatla, L. Chiu, C.P. Kundu, P. Peng, Y. ve Carpenter, M.K., (2003). "Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells", *Cell Transplant*, 12: 1-11.
- [186] Human Mesenchymal Stem Cells I MSC Isolation in In vitro Expansion, <http://stemcellthailand.org/mesenchymal-stem-cell-isolation-expansion>, 18 MAYIS 2014.
- [187] Cartwright, M.J. Tchkonja, T. ve Kirkland, J.L., (2007). "Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms", *Exp Gerontol*, 42: 463-471.
- [188] Liu, T.M. Martina, M. Hutmacher, D.W. Hui, J.H. Lee, E.H. ve Lim, B., (2007). "Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages", *Stem cells*, 25: 750-760.
- [189] Yoshimura, H. Muneta, T. Nimura, A. Yokoyama, A. Koga, H. ve Sekiya, I., (2007). "Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle", *Cell Tissue Res*, 327: 449-462.
- [190] Lee, E.H. ve Hui, J.H., (2006). "The potential of stem cells in orthopaedic surgery", *J Bone Joint Surg Br*, 88: 841-851.
- [191] Yanez, R. Lamana, M.L. Garcia-Castro, J. Colmenero, I. Ramirez, M. ve Bueren, J.A., (2006). "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease", *Stem cells*, 24: 2582-2591.
- [192] Wagner, W. Wein, F. Seckinger, A. Frankhauser, M. Wirkner, U. Krause, U. Blake, J. Schwager, C. Eckstein, V. Ansorge, W. ve Ho, A.D., (2005). "Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood", *Exp Hematol*, 33: 1402-1416.
- [193] McElreavey, K.D. Irvine, A.I. Ennis, K.T. ve McLean, W.H., (1991). "Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord", *Biochem Soc Trans*, 19: 29S.
- [194] Wang, H.S. Hung, S.C. Peng, S.T. Huang, C.C. Wei, H.M. Guo, Y.J. Fu, Y.S. Lai, M.C. ve Chen, C.C., (2004). "Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord", *Stem cells*, 22: 1330-1337.
- [195] Prasanna, S.J., (2011). "Causal relationship between periodontitis and chronic obstructive pulmonary disease", *J Indian Soc Periodontol*, 15: 359-365.
- [196] Troyer, D.L. ve Weiss, M.L., (2008). "Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population", *Stem cells*, 26: 591-599.

- [197] Baksh, D. Yao, R. ve Tuan, R.S., (2007). "Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow", *Stem cells*, 25: 1384-1392.
- [198] Nanaev, A.K. Kohnen, G. Milovanov, A.P. Domogatsky, S.P. ve Kaufmann, P., (1997). "Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord", *Placenta*, 18: 53-64.
- [199] Fong, C.Y. Chak, L.L. Biswas, A. Tan, J.H. Gauthaman, K. Chan, W.K. ve Bongso, A., (2011). "Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells", *Stem Cell Rev*, 7: 1-16.
- [200] La Rocca, G. Anzalone, R. Corrao, S. Magno, F. Loria, T. Lo Iacono, M. Di Stefano, A. Giannuzzi, P. Marasa, L. Cappello, F. Zummo, G. ve Farina, F., (2009). "Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers", *Histochem Cell Biol*, 131: 267-282.
- [201] Murrell, W. Feron, F. Wetzig, A. Cameron, N. Splatt, K. Bellette, B. Bianco, J. Perry, C. Lee, G. ve Mackay-Sim, A., (2005). "Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa", *Dev Dyn*, 233: 496-515.
- [202] Wetzig, A. Mackay-Sim, A. ve Murrell, W., (2011). "Characterization of olfactory stem cells", *Cell Transplant*, 20: 1673-1691.
- [203] Delorme, B. Nivet, E. Gaillard, J. Haupl, T. Ringe, J. Deveze, A. Magnan, J. Sohier, J. Khrestchatisky, M. Roman, F.S. Charbord, P. Sensebe, L. Layrolle, P. ve Feron, F., (2010). "The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties", *Stem Cells Dev*, 19: 853-866.
- [204] Forni, P.E. ve Wray, S., (2012). "Neural crest and olfactory system: new prospective", *Mol Neurobiol*, 46: 349-360.
- [205] Newman, M.P. Feron, F. ve Mackay-Sim, A., (2000). "Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium", *Neuroscience*, 99: 343-350.
- [206] Carter, L.A. MacDonald, J.L. ve Roskams, A.J., (2004). "Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype", *J Neurosci*, 24: 5670-5683.
- [207] Magne, D. Vinatier, C. Julien, M. Weiss, P. ve Guicheux, J., (2005). "Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage", *Trends Mol Med*, 11: 519-526.
- [208] Krause, D.S. Theise, N.D. Collector, M.I. Henegariu, O. Hwang, S. Gardner, R. Neutzel, S. ve Sharkis, S.J., (2001). "Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell", *Cell*, 105: 369-377.
- [209] Palermo, A.T. Labarge, M.A. Doyonnas, R. Pomerantz, J. ve Blau, H.M., (2005). "Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress", *Dev Biol*, 279: 336-344.

- [210] Bernardo, M.E. Zaffaroni, N. Novara, F. Cometa, A.M. Avanzini, M.A. Moretta, A. Montagna, D. Maccario, R. Villa, R. Daidone, M.G. Zuffardi, O. ve Locatelli, F., (2007). "Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms", *Cancer Res*, 67: 9142-9149.
- [211] Caplan, A.I., (2007). "Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine", *J Cell Physiol*, 213: 341-347.
- [212] Stolzing, A. Jones, E. McGonagle, D. ve Scutt, A., (2008). "Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies", *Mech Ageing Dev*, 129: 163-173.
- [213] Bonab, M.M. Alimoghaddam, K. Talebian, F. Ghaffari, S.H. Ghavamzadeh, A. ve Nikbin, B., (2006). "Aging of mesenchymal stem cell in vitro", *BMC Cell Biol*, 7: 14.
- [214] Yang, Z. Zou, Y. Guo, X.M. Tan, H.S. Denslin, V. Yeow, C.H. Ren, X.F. Liu, T.M. Hui, J.H. ve Lee, E.H., (2012). "Temporal activation of beta-catenin signaling in the chondrogenic process of mesenchymal stem cells affects the phenotype of the cartilage generated", *Stem Cells Dev*, 21: 1966-1976.
- [215] Saito, T. Ikeda, T. Nakamura, K. Chung, U.I. ve Kawaguchi, H., (2007). "S100A1 and S100B, transcriptional targets of SOX trio, inhibit terminal differentiation of chondrocytes", *EMBO Rep*, 8: 504-509.
- [216] Dehne, T. Karlsson, C. Ringe, J. Sittlinger, M. ve Lindahl, A., (2009). "Chondrogenic differentiation potential of osteoarthritic chondrocytes and their possible use in matrix-associated autologous chondrocyte transplantation", *Arthritis Res Ther*, 11: R133.
- [217] Yamashita, S. Andoh, M. Ueno-Kudoh, H. Sato, T. Miyaki, S. ve Asahara, H., (2009). "Sox9 directly promotes Bapx1 gene expression to repress Runx2 in chondrocytes", *Exp Cell Res*, 315: 2231-2240.
- [218] Higashikawa, A. Saito, T. Ikeda, T. Kamekura, S. Kawamura, N. Kan, A. Oshima, Y. Ohba, S. Ogata, N. Takeshita, K. Nakamura, K. Chung, U.I. ve Kawaguchi, H., (2009). "Identification of the core element responsive to runt-related transcription factor 2 in the promoter of human type X collagen gene", *Arthritis Rheum*, 60: 166-178.
- [219] Soung do, Y. Dong, Y. Wang, Y. Zuscik, M.J. Schwarz, E.M. O'Keefe, R.J. ve Drissi, H., (2007). "Runx3/AML2/Cbfa3 regulates early and late chondrocyte differentiation", *J Bone Miner Res*, 22: 1260-1270.
- [220] Mengshol, J.A. Vincenti, M.P. ve Brinckerhoff, C.E., (2001). "IL-1 induces collagenase-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for Runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways", *Nucleic Acids Res*, 29: 4361-4372.
- [221] Guo, X. Day, T.F. Jiang, X. Garrett-Beal, L. Topol, L. ve Yang, Y., (2004). "Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation", *Genes Dev*, 18: 2404-2417.

- [222] Day, T.F. Guo, X. Garrett-Beal, L. ve Yang, Y., (2005). "Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis", *Dev Cell*, 8: 739-750.
- [223] Oberlender, S.A. ve Tuan, R.S., (1994). "Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis", *Development*, 120: 177-187.
- [224] Sakaguchi, Y. Sekiya, I. Yagishita, K. ve Muneta, T., (2005). "Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source", *Arthritis Rheum*, 52: 2521-2529.
- [225] Koga, H. Muneta, T. Nagase, T. Nimura, A. Ju, Y.J. Mochizuki, T. ve Sekiya, I., (2008). "Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit", *Cell Tissue Res*, 333: 207-215.
- [226] Xie, X. Wang, Y. Zhao, C. Guo, S. Liu, S. Jia, W. Tuan, R.S. ve Zhang, C., (2012). "Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration", *Biomaterials*, 33: 7008-7018.
- [227] Liu, S. Hou, K.D. Yuan, M. Peng, J. Zhang, L. Sui, X. Zhao, B. Xu, W. Wang, A. Lu, S. ve Guo, Q., (2014). "Characteristics of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of human umbilical cord and for fabrication of non-scaffold tissue-engineered cartilage", *J Biosci Bioeng*, 117: 229-235.
- [228] Bailey, M.M. Wang, L. Bode, C.J. Mitchell, K.E. ve Detamore, M.S., (2007). "A comparison of human umbilical cord matrix stem cells and temporomandibular joint condylar chondrocytes for tissue engineering temporomandibular joint condylar cartilage", *Tissue Eng*, 13: 2003-2010.
- [229] Wang L, T.I., Seshareddy K, Weiss ML, Detamore MS, (2009 Aug). "A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering", *Tissue Eng Part A*, 15(8): 2259-2266.
- [230] Chen X, Z.F., He X, Xu Y, Yang Z, Chen L, Zhou S, Yang Y, Zhou Z, Sheng W, Zeng Y, (2013). "Chondrogenic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in type I collagen-hydrogel for cartilage engineering", *Injury*, 44(4): 540-549.
- [231] Beggs, K.J. Lyubimov, A. Borneman, J.N. Bartholomew, A. Moseley, A. Dodds, R. Archambault, M.P. Smith, A.K. ve McIntosh, K.R., (2006). "Immunologic consequences of multiple, high-dose administration of allogeneic mesenchymal stem cells to baboons", *Cell Transplant*, 15: 711-721.
- [232] Glennie, S. Soeiro, I. Dyson, P.J. Lam, E.W. ve Dazzi, F., (2005). "Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells", *Blood*, 105: 2821-2827.

- [233] Keyser, K.A. Beagles, K.E. ve Kiem, H.P., (2007). "Comparison of mesenchymal stem cells from different tissues to suppress T-cell activation", *Cell Transplant*, 16: 555-562.
- [234] Siegel, G. Schafer, R. ve Dazzi, F., (2009). "The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells", *Transplantation*, 87: S45-49.
- [235] Hutmacher, D.W., (2000). "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage", *Biomaterials*, 21: 2529-2543.
- [236] Khan, W.S. Johnson, D.S. ve Hardingham, T.E., (2010). "The potential of stem cells in the treatment of knee cartilage defects", *Knee*, 17: 369-374.
- [237] Gross, A.E. Shasha, N. ve Aubin, P., (2005). "Long-term followup of the use of fresh osteochondral allografts for posttraumatic knee defects", *Clin Orthop Relat Res*: 79-87.
- [238] Grigolo, B. Roseti, L. Fiorini, M. De Franceschi, L. ve Facchini, A., (2002). "Tissue engineering applications: cartilage lesions repair by the use of autologous chondrocytes", *Reumatismo*, 54: 364-371.
- [239] Kon, E. Filardo, G. Drobic, M. Madry, H. Jelic, M. van Dijk, N. ve Della Villa, S., (2012). "Non-surgical management of early knee osteoarthritis", *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 20: 436-449.
- [240] Kon, E. Gobbi, A. Filardo, G. Delcogliano, M. Zaffagnini, S. ve Marcacci, M., (2009). "Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation compared with microfracture for chondral lesions of the knee: prospective nonrandomized study at 5 years", *Am J Sports Med*, 37: 33-41.
- [241] Iwasa, J. Engebretsen, L. Shima, Y. ve Ochi, M., (2009). "Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering", *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 17: 561-577.
- [242] Kock, L. van Donkelaar, C.C. ve Ito, K., (2012). "Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status", *Cell Tissue Res*, 347: 613-627.
- [243] Nuernberger, S. Cyran, N. Albrecht, C. Redl, H. Vecsei, V. ve Marlovits, S., (2011). "The influence of scaffold architecture on chondrocyte distribution and behavior in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts", *Biomaterials*, 32: 1032-1040.
- [244] Ikada, Y., (2006). "Challenges in tissue engineering", *J R Soc Interface*, 3: 589-601.
- [245] Woodfield TBF, v.B.C., De Wijn J, Sims TJ, Hollander AP, Riesle J, (2005). "Polymer scaffolds fabricated with pore-size gradients as a model for studying the zonal organization within tissue-engineered cartilage constructs", *Tissue Eng*, 11: 1297–1311.
- [246] Kelly, T.A. Ng, K.W. Wang, C.C. Ateshian, G.A. ve Hung, C.T., (2006). "Spatial and temporal development of chondrocyte-seeded agarose constructs in free-swelling and dynamically loaded cultures", *J Biomech*, 39: 1489-1497.

- [247] Triche, R. ve Mandelbaum, B.R., (2013). "Overview of cartilage biology and new trends in cartilage stimulation", *Foot Ankle Clin*, 18: 1-12.
- [248] Nandoe Tewarie, R.S. Hurtado, A. Bartels, R.H. Grotenhuis, A. ve Oudega, M., (2009). "Stem cell-based therapies for spinal cord injury", *J Spinal Cord Med*, 32: 105-114.
- [249] Deng, J. She, R. Huang, W. Dong, Z. Mo, G. ve Liu, B., (2013). "A silk fibroin/chitosan scaffold in combination with bone marrow-derived mesenchymal stem cells to repair cartilage defects in the rabbit knee", *J Mater Sci Mater Med*, 24: 2037-2046.
- [250] Wei, Y. Hu, Y. Hao, W. Han, Y. Meng, G. Zhang, D. Wu, Z. ve Wang, H., (2008). "A novel injectable scaffold for cartilage tissue engineering using adipose-derived adult stem cells", *J Orthop Res*, 26: 27-33.
- [251] Zheng, R. Duan, H. Xue, J. Liu, Y. Feng, B. Zhao, S. Zhu, Y. He, A. Zhang, W. Liu, W. Cao, Y. ve Zhou, G., (2014). "The influence of Gelatin/PCL ratio and 3-D construct shape of electrospun membranes on cartilage regeneration", *Biomaterials*, 35: 152-164.
- [252] Spain, T.L. Agrawal, C.M. ve Athanasiou, K.A., (1998). "New technique to extend the useful life of a biodegradable cartilage implant", *Tissue Eng*, 4: 343-352.
- [253] Safran, M.R. Kim, H. ve Zaffagnini, S., (2008). "The use of scaffolds in the management of articular cartilage injury", *J Am Acad Orthop Surg*, 16: 306-311.
- [254] Xue, J. Feng, B. Zheng, R. Lu, Y. Zhou, G. Liu, W. Cao, Y. Zhang, Y. ve Zhang, W.J., (2013). "Engineering ear-shaped cartilage using electrospun fibrous membranes of gelatin/polycaprolactone", *Biomaterials*, 34: 2624-2631.
- [255] Allemann F, M.S., Eid K, Yates KE, Zaleske D, Glowacki J, (2001 Apr). "Effects of hyaluronan on engineered articular cartilage extracellular matrix gene expression in 3-dimensional collagen scaffolds", *J Biomed Mater Res*, 55(1): 13-19.
- [256] Chen, G. Sato, T. Ushida, T. Hirochika, R. ve Tateishi, T., (2003). "Redifferentiation of dedifferentiated bovine chondrocytes when cultured in vitro in a PLGA–collagen hybrid mesh", *FEBS letters*, 542: 95-99.
- [257] Gorti, G.K. Lo, J. Falsafi, S. Kosek, J. Quan, S.Y. Khuu, D.T. ve Koch, R.J., (2003). "Cartilage tissue engineering using cryogenic chondrocytes", *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 129: 889-893.
- [258] Grigolo, B. Roseti, L. Fiorini, M. Fini, M. Giavaresi, G. Nicoli Aldini, N. Giardino, R. ve Facchini, A., (2001). "Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (Hyaff[®]-11) into cartilage defects in rabbits", *Biomaterials*, 22: 2417-2424.
- [259] Hung, C.T. Lima, E.G. Mauck, R.L. Taki, E. LeRoux, M.A. Lu, H.H. Stark, R.G. Guo, X.E. ve Ateshian, G.A., (2003). "Anatomically shaped osteochondral constructs for articular cartilage repair", *Journal of biomechanics*, 36: 1853-1864.

- [260] Lee, D.A. Reisler, T. ve Bader, D.L., (2003). "Expansion of chondrocytes for tissue engineering in alginate beads enhances chondrocytic phenotype compared to conventional monolayer techniques", *Acta Orthop Scand*, 74: 6-15.
- [261] Masuda, K. Sah, R.L. Hejna, M.J. ve Thonar, E.J., (2003). "A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: the alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method", *J Orthop Res*, 21: 139-148.
- [262] Mizuno, S. Allemann, F. ve Glowacki, J., (2001). "Effects of medium perfusion on matrix production by bovine chondrocytes in three-dimensional collagen sponges", *Journal of biomedical materials research*, 56: 368-375.
- [263] Rahman, M.S. ve Tsuchiya, T., (2001). "Enhancement of chondrogenic differentiation of human articular chondrocytes by biodegradable polymers", *Tissue Eng*, 7: 781-790.
- [264] Rao, S.B. ve Sharma, C.P., (1997). "Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential", *J Biomed Mater Res*, 34: 21-28.
- [265] Reyes, C.D. ve Garcia, A.J., (2003). "Engineering integrin-specific surfaces with a triple-helical collagen-mimetic peptide", *J Biomed Mater Res A*, 65: 511-523.
- [266] Scharstuhl, A. Schewe, B. Benz, K. Gaissmaier, C. Buhning, H.J. ve Stoop, R., (2007). "Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology", *Stem cells*, 25: 3244-3251.
- [267] Sims, C.D. Butler, P.E. Cao, Y.L. Casanova, R. Randolph, M.A. Black, A. Vacanti, C.A. ve Yaremchuk, M.J., (1998). "Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes", *Plast Reconstr Surg*, 101: 1580-1585.
- [268] Wang, S. Nagrath, D. Chen, P.C. Berthiaume, F. ve Yarmush, M.L., (2008). "Three-dimensional primary hepatocyte culture in synthetic self-assembling peptide hydrogel", *Tissue Eng Part A*, 14: 227-236.
- [269] Filardo, G. Kon, E. Roffi, A. Di Martino, A. ve Marcacci, M., (2013). "Scaffold-based repair for cartilage healing: a systematic review and technical note", *Arthroscopy*, 29: 174-186.
- [270] Ritz, J. Fuchs, H. Kieczka, H. ve Moran, W.C., (2000). "Caprolactam", *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- [271] Mahapatro, A. ve Singh, D.K., (2011). "Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines", *J Nanobiotechnology*, 9: 55.
- [272] Formation of Nanofibers via Electrospinning, <http://www.joogroup.org/index.php/research/nanofibers>, 2 Mayıs 2014.
- [273] Cottam, E. Hukins, D.W. Lee, K. Hewitt, C. ve Jenkins, M.J., (2009). "Effect of sterilisation by gamma irradiation on the ability of polycaprolactone (PCL) to act as a scaffold material", *Med Eng Phys*, 31: 221-226.

- [274] Dhillon, M.S. Behera, P. Patel, S. ve Shetty, V., (2014). "Orthobiologics and platelet rich plasma", *Indian J Orthop*, 48: 1-9.
- [275] Freyria, A.M. ve Mallein-Gerin, F., (2012). "Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors", *Injury*, 43: 259-265.
- [276] Ersöz, M., (2014). Kordon Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerinin Hepatosit Hücrelerine Farklılaştırılmasının Optimizasyonu, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [277] Allahverdiyev, A., (2013). İnsan Olfaktör Kök Hücrelerin İzolasyonu Kültürünün Yapılması Karakterizasyonu Ve Hasar Görmüş Fasiyal Sinir Hücrelerinin (Ratlarda) İyileşmesinde Etkisinin İncelenmesi, KAP Projesi, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğü, İstanbul.
- [278] Yeşilkır, S., (2010). Yağ Dokusundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu Devamlı Kültürünün Yapılması Karakterizasyonu Ve Kriyoprezervasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [279] Duval, R.-E. Clarot, I. Dumarcay-Charbonnier, F. Fontanay, S. ve Marsura, A., (2012). "Interest of designed cyclodextrin-tools in gene delivery": Elsevier.
- [280] Günel, T. ve Aydın, K., (2009). "Real time PCR ve Uygulama Alanları", *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2: 43-45.
- [281] Berthier, R. Kaufmann, A. Schweitzer, A. Thevenon, D. ve Hollard, D., (1983). "Cryopreservation of human bone marrow cells by a modification of the two-step cooling technique", *Cryobiology*, 20: 637-643.
- [282] İsoğlu, İ.A., (2009). Kemik doku mühendisliği için elektro-eğrilmiş poli(ϵ -kaprolakton) membran esaslı doku iskeleleri, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [283] Martinez-Diaz, S. Garcia-Giralt, N. Lebourg, M. Gómez-Tejedor, J.-A. Vila, G. Caceres, E. Benito, P. Pradas, M.M. Nogues, X. ve Ribelles, J.L.G., (2010). "In vivo evaluation of 3-dimensional polycaprolactone scaffolds for cartilage repair in rabbits", *The American journal of sports medicine*, 38: 509-519.
- [284] Moutos, F.T. ve Guilak, F., (2009). "Functional properties of cell-seeded three-dimensionally woven poly (ϵ -caprolactone) scaffolds for cartilage tissue engineering", *Tissue Engineering Part A*, 16: 1291-1301.
- [285] Li, W.J. Chiang, H. Kuo, T.F. Lee, H.S. Jiang, C.C. ve Tuan, R.S., (2009). "Evaluation of articular cartilage repair using biodegradable nanofibrous scaffolds in a swine model: a pilot study", *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 3: 1-10.
- [286] Elcicek, S. Bagirova, M. ve Allahverdiyev, A.M., (2013). "Generation of avirulent *Leishmania* parasites and induction of nitric oxide production in macrophages by using polyacrylic acid", *Experimental parasitology*, 133: 237-242.

- [287] Prockop, D.J., (2001). "Stem cell research has only just begun", Science (New York, NY), 293: 211.
- [288] Can, A. ve Karahüseyinoğlu, S., Erişkin Kök Hücrelerin Farklanmasındaki Hücresel ve Moleküler Mekanizmalar <http://saglikbe.cbu.edu.tr/docs/sagliktabirikim/5/5.pdf>, 20 Mayıs 2014
- [289] Mimeault, M. ve Batra, S.K., (2006). "Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies", Stem cells, 24: 2319-2345.
- [290] Goodwin, H. Bicknese, A. Chien, S. Bogucki, B. Oliver, D. Quinn, C. ve Wall, D., (2001). "Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers", Biology of Blood and Marrow Transplantation, 7: 581-588.
- [291] Kim, H.J. Park, S.-H. Durham, J. Gimble, J.M. Kaplan, D.L. ve Drago, J.L., (2012). "In vitro chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells with silk scaffolds", Journal of tissue engineering, 3: 2041731412466405.
- [292] Allahverdiyev, A.M. Baydar, S.Y. Bagirova, M. ve Findikli, N., (2012). "Microcapillary Culture Method: A Novel Tool for In Vitro Expansion of Stem Cells from Scarce Sources", Archives of medical research, 43: 423-430.
- [293] Karaaltın, B.A. Karaaltın, V.M. Öztel, N.O. Ovalı, E. Şener, M.B. Adatepe, T. Yiğit, Ö. Bozkurt, E. Baydar, Y.S. Bağirova, M. Uzun, N. ve Allahverdiyev, A., (2013). "Hasarlanmış Rat Fasiyal Sinir Rekonstrüksiyonunda İnsan Olfaktör Bölge Nöronal Kök Hücre Uygulaması", 35. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, 02-06 Kasım 2013, Antalya.
- [294] Garcia-Giralt, N. Izquierdo, R. Nogués, X. Perez-Olmedilla, M. Benito, P. Gómez-Ribelles, J. Checa, M. Suay, J. Caceres, E. ve Monllau, J., (2008). "A porous PCL scaffold promotes the human chondrocytes redifferentiation and hyaline-specific extracellular matrix protein synthesis", Journal of Biomedical Materials Research Part A, 85: 1082-1089.
- [295] Maumus, M. Manferdini, C. Toupet, K. Peyrafitte, J.-A. Ferreira, R. Facchini, A. Gabusi, E. Bourin, P. Jorgensen, C. ve Lisignoli, G., (2013). "Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis", Stem cell research, 11: 834-844.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hilal TOPTAŞ
Doğum Tarihi ve Yeri : 05.12.1988 İstanbul
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : hilaltoptas44@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2014
Lisans	Biyoloji	Trakya Üniversitesi	2010
Lise	Fen	Bahçelievler Lisesi	2005

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2010 - 2011	CDK Tıbbi Malzeme Ltd. Şti.	Aplikasyon Uzmanı/Laboratuvar Sorumlusu
2013-2013	Acıbadem Hastanesi LABMED	Laboratuvar Teknisyeni

YAYINLARI

Makale

1. Allahverdiyev, A.M., Bagirova, M., Caliskan, R., Bahar-Tokman, H., Aliyeva, H., Unal, G., Oztel, O.N., Abamor, E.Ş., Toptas, H., Yuksel, P., Kalayci, F., Aslan, M., Erzin, Y., Bal, K., Kocazeybek, B.S.. “*Microcapillary Culture Method: A Novel Tool for Diagnosis and Isolation of Helicobacter pylori*”, (2014). World Journal Of Gastroenterology, **(in review)**.

Bildiri

- 1.Olga Nehir ÖZTEL, Hilal TOPTAŞ, Adil M. ALLAHVERDİYEV, Melahat BAĞIROVA, “Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Yumurta Akı İle Etkileşiminin İncelenmesi”, 1. Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Kongresi, Kocaeli (2014).

Proje

- 1.Farklı Doku Kaynaklarından Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Peptid Hydrogel (Bd™ Puramatrix™) ve Poli (ε-Kaprolakton) Scaffoldları İle Etkileşimlerinin İncelenmesi ve Kıkırdak Doku Mühendisliğinde Kullanılmak Üzere 3 Boyutlu Hücre Kültür Modelinin Geliştirilmesi, YTÜ BAPK Projesi, Araştırmacı 11/2013 –