

**GLUKOZAMİN (GA) BAĞLI HYALURONİK ASİT (HA)
NANOPARTİKÜLLERİN (GA-NHA) GELİŞTİRİLEREK
YAPISAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE IN VITRO
HÜCRE KÜLTÜRÜNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION AND RESEARCH
OF EFFICACY ON IN VITRO CELL CULTURE OF
GLUCOSAMINE (GA) CONJUGATED HYALURONIC ACID
(HA) NANOPARTICLES (GA-NHA)**

ŞEBNEM ŞAHİN

PROF. DR. FEZA KORKUSUZ

Tez Danışmanı

PROF. DR. SÜLEYMAN ALİ TUNCEL

Yardımcı Danışman

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin Nanoteknoloji ve Nanotıp
Anabilim Dalı için Öngördüğü YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2018

ŞEBNEM ŞAHİN'in hazırladığı “**Glukozamin (GA) Bağlı Hyaluronik Asit (HA) Nanopartüküllerin (GA-nHA) Geliştirilerek Yapısal Özelliklerinin Belirlenmesi ve İn Vitro Hücre Kültüründeki Etkilerinin Araştırılması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Şadan ÖZCAN

Başkan

Prof.Dr. Feza KORKUSUZ

Danışman

Doç.Dr. Özer Aylin GÜRPINAR

Üye

Yrd.Doç.Dr. Özlem AYDIN

Üye

Yrd.Doç.Dr. Çağla Zübeyde KÖPRÜ

Üye

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof.Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin 01.01.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (iç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

20 / 06 / 2018



Şebnem ŞAHİN

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

19/06/2018



ŞEBNEM ŞAHİN

ÖZET

GLUKOZAMİN (GA) BAĞLI HYALURONİK ASİT (HA) NANOPARTİKÜLLERİN (GA-NHA) GELİŞTİRİLEREK YAPISAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE IN VITRO HÜCRE KÜLTÜRÜNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Şebnem ŞAHİN

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Feza KORKUSUZ

Yardımcı Danışman: Prof. Dr. Süleyman Ali TUNCEL

Haziran 2018, 83 sayfa

Osteoartrit (OA) eklemdede ağrı, hareket kısıtlılığı, deforme ve tedavi edilmediği takdirde sakatlığa ve ölüme yol açabilen eklem hastalığıdır. Hastalığın seyrini değiştiren glukozamin (GA) ve kondroitin sülfat (KS)'in eklem kıkırdağını besleyen sinovyal sıvıya nasıl ulaştığı ve etkisini nasıl gösterdiği az bilinir. Çalışmanın araştırma soruları; (1) Hyaluronik asit (HA) nanopartikül (nHA) şeklinde geliştirilerek eklem içinde kontrollü ilaç salım sistemi olarak kullanılabilir mi? (2) GA, nHA kullanılarak eklem içine taşınabilir mi? (3) GA'lar nHA'lardan kontrollü bir şekilde salınır mı? (4) GA-nHA hücre yapışması ve çoğalmasını arttırabilir mi? (5) GA-nHA'lar kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (Kİ-MKH) kıkırdak hücresine farklılaşmasına pozitif yönde etki eder mi? (6) GA-nHA'lar sağlıklı ve OA'lı insan kıkırdak hücrelerinin ekstraselüler matriks sentezini artırıp OA işaretlerini azaltır mı?

nHA üretildikten sonra yapısal özellikleri Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ve Nükleer Manyetik Rezonans (¹H NMR) ile belirlenmiştir. nHA'ya GA ve KS bağlandıktan sonra bu moleküllerin salımı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile ölçülmüştür. KS'in nHA'dan salınmadığı görüldüğü için deneyler GA ile sürdürülmüştür. 1, 10 ve 100 µg/ml GA-nHA'ların kondrosarkoma (SW-1353) hücreleri üzerindeki etkisi WST-1 hücre

proliferasyon testi ile ölçülmüştür. GA-nHA'nın Kİ-MKH üzerindeki erken kondrojenik farklılaşma işaretlerinden SRY-Box-9 (SOX-9) ve kırık oligomerik matriks proteini (COMP) ifadelerinin üzerine etkisini ölçmek için RT-PCR yapılmıştır. GA-nHA'ların sağlıklı ve OA'lı kondrositler üzerindeki ekstraselüler matriks işaretleri olan tip II kollajen (COL2A1) ve COMP üzerine etkisi ve OA işareti olan matriks metalloproteinaz-13 (MMP-13) üzerindeki etkisi ise yine RT-PCR ile değerlendirilmiştir.

¹H NMR sonuçlarındaki 0.6-5.0 ppm arasındaki pikler nHA'ların başarılı bir şekilde sentezlendiğini, SEM ve DLS sonuçları ise partiküllerin 200-600 nm boyutları arasında homojen dağıldığını göstermektedir. HPLC ile ölçülen salım sonuçlarıyla GA'ların nHA'lardan 21 günde %20 oranında salım yaptığı belirlenmiştir. WST-1 proliferasyon testi sonuçlarına göre GA-nHA'nın üç dozu da hücre proliferasyonunu kontrol grubuna göre anlamlı olarak artırmamıştır. Ancak, GA'yı tek başına hücrelere uygulamanın kontrol grubuna göre anlamlı olarak proliferasyonu artırdığını göstermiştir. GA-nHA kondrojenik farklılaşma işaretleri olan SOX-9 ve COMP ifadesini anlamlı olarak değiştirmemiştir. OA'lı kondrositlerde 1 µg/ml GA-nHA MMP-13 seviyesini düşürmüş, 10 µg/ml GA-nHA uygulaması ise MMP-13 seviyesini düşürürken COMP ve COL2A1 seviyelerinde artışa neden olmuş ancak istatistiksel fark bulunmamıştır. Sağlıklı kondrositlerde ise üç dozda GA-nHA uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MMP-13 ifadesini baskılamış ancak bu da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tek başına GA uygulandığında ise MMP-13 seviyesi anlamlı olarak düşmüş, farklılaşma işareti olan COMP seviyesini ise anlamlı olarak yükseltmiştir. Tek başına 10 µg/ml HA uygulaması sağlıklı kondrositlerin COMP ve COL2A1 seviyesinde artış sağlasa da yine kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

GA-nHA'ların hücre proliferasyonuna ve Kİ-MKH'lerin kondrojenik farklılaşmasında bir etkisi olmamakla beraber OA'lı kondrositlerde MMP-13 ifadesini düşürdüğü, COMP ve COL2A1 seviyesini artırdığı görülmüştür. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da klinik olarak anlamlı olduğu düşünülmektedir. GA ve HA'yı tek başına uygulamalarda bazı olumlu sonuçlara ulaşmamız, GA-nHA'nın nanopartikül formunda hücrenin kullanamayacağı bir forma getirilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. GA-nHA'ların OA tedavisinde etkili bir yöntem olup olmadığının belirlenebilmesi için hücre kültür ortamındaki dinamikleri, hücreye alım, hücrede işleme mekanizmaları izlenmeli ve hücre kültüründeki etkileri uzun dönemde araştırılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: osteoartrit, kondrosit, kırık, hyalüronik asit, glukozamin, nanopartikül

ABSTRACT

DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION AND RESEARCH OF EFFICACY ON IN VITRO CELL CULTURE OF GLUCOSAMINE (GA) CONJUGATED HYALURONIC ACID (HA) NANOPARTICLES (GA-NHA)

Şebnem ŞAHİN

Master, Department of Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. Feza KORKUSUZ

Co-supervisor: Prof. Dr. Süleyman Ali TUNCEL

June 2018, 83 pages

Osteoarthritis (OA) is a articular joint disease which causes pain, limitation of movement, deformity and can lead to disability and mortality. Glucosamine (GA) and chondroitin sulfate (CS) are alter the course of the disease but it is lesser known that how they are reach to the synovial fluid and show their effects. Research questions of this study whether (a) we could produce and use as a drug delivery system hyaluronic acid nanoparticles (nHA). (b) GA would transport to joint cavity using with nHAs. (c) GA-nHA would increase cell proliferation, (d) GA-nHA would stimulate chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSC), and (e) GA-nHA would improve extracellular matrix (ECM) production and reduce OA markers of normal and osteoarthritic chondrocytes.

After production of nHA's its structural property determined with SEM, DLS and ¹H NMR. After conjugating CS and GA to nHA's, release dynamics of these molecules determined with HPLC. CS didn't release from nHA's so studies contiuned with GA. Effects of 1, 10, 100 µg/ml GA-nHA's on chondrosarcoma cell line (SW-1353) measured by WST-1 Cell Proliferation Assay. Efficacy of early chondrogenic markers including cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and SRY-Box-9 (SOX-9) expression on BM-MSCs of GA-nHAs measured by RT-PCR. Efficacy of extracellular matrix components including type II collagen (COL2A1) and COMP expression and OA marker matix metalloproteinase-13 (MMP-13)

expression on healthy and osteoarthritic human chondrocytes of GA-nHAs measured by RT-PCR, again.

Peaks between 0.6 and 5.0 ppm of ^1H NMR results showed that nHAs successfully synthesised. SEM and DLS results showed particule size dispersed between 200 and 600 nm homogeneously. HPLC results showed us GA released in the ratio of 20% in 21 days. Three doses of GA-nHA's didn't increase proliferation of chondrosarcoma cells according to WST-1 Proliferation Assay outcomes. However, application of GA alone increased the proliferation significantly compare to control group. GA-nHAs did not significantly change the SOX-9 and COMP expressions. On OA chondrocytes, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GA-nHA administration significantly decreased MMP-13 expression, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GA-nHA administration decreased MMP-13 expression and increased COMP and COL2A1 expressions, yet there is no significant difference was found. On healthy chondrocytes, three doses of GA-nHA administration repressed the MMP-13 expression compared with the control group, but no significant changes were observed. When GA applied alone, MMP-13 levels significantly decreased and chondrogenic marker COMP levels significantly increased compared with the control group. Also, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HA group increased COMP and COL2A1 levels of healthy chondrocytes but there is no significant difference with control group.

In conclusion, GA-nHAs did not effect cell proliferation and chondrogenic differentiation but decreased MMP-13 expression, increased COMP and COL2A1 expression of OA chondrocytes. Although these results are not statistically significant, they may be clinically significant. When we apply GA and HA alone, some of the positive results may be due to the fact that GA-nHA is in a form that cells can not use with nanoparticle form. In order to determine whether GA-nHAs is an effective method in the treatment of OA, the dynamics of cell culture medium, cellular uptake, cell processing mechanisms of GA-nHA should be monitored and long term effects of cell culture should be investigated.

Keywords: osteoarthritis, chondrocyte, cartilage, hyaluronic acid, glucosamine, nanoparticle

TEŞEKKÜR

Başta, bu süreçte yanımda olup, bilgi birikimi ve tecrübesiyle bana yol gösteren ve hiçbir desteğini benden esirgemeyen değerli hocam, danışmanım Prof. Dr. Feza Korkusuz olmak üzere, bana laboratuvarının kapılarını açan ve bilgisiyle tezimi şekillendiren yardımcı danışmanım Prof. Dr. Süleyman Ali Tuncel'e,

Yeri geldiğinde bir anne gibi kollayan, titiz çalışmaları ve yol göstermesiyle eksiklerimi tamamlayan hocam Prof. Dr. Petek Korkusuz'a, çalışmalarımdaya benden yardımlarını esirgemeyen ve her düştüğümde elimden tutan Yrd. Doç. Dr. Kouroush Salimi ve Yrd. Doç. Dr. Elif Bilgiç'e, her zaman arkamı kollayan ve bana destek olan ekip/yol arkadaşlarım Merve Gizer, Eda Çiftçi Dede, Yrd. Doç. Sevil Köse ve Nilgün Yersal'a, bu yolun başında bana ışık tutarak yönlendiren Prof. Dr. Mehmet Ali Onur'a,

Salım çalışmasında bize destek veren Nobel İlaç San. Ve Tic. A.Ş ekibine, PCR çalışmasında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Ekim Taşkiran ve ekibine, maddi destekleri için Hacettepe Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği'ne,

Verdikleri manevi destek ve bana olan inançlarını asla kaybetmedikleri için FenCebir Akademi ailesine ve öğrencilerime, arkadaşlarım Berfu Beysülen, Dilan Vural, Züleyha Yurtseven, Seda Ön, Hasan Yaradılmış'a, her koşulda bana destek olan annem Ayşegül Şahin'e, babam Cengizhan Şahin'e, kardeşim Elif Şahin'e, eve geldiğimde tüm stresimi benden alan Ateş ve Arif'e,

Çok teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | iii |
| TEŞEKKÜR..... | v |
| İÇİNDEKİLER..... | vi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | viii |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 1.1. GENEL BİLGİLER | 2 |
| 1.1.1 Eklem Kıkırdağı ve İşlevi | 2 |
| 1.1.2 Eklem Kıkırdağının Makro ve Mikro Moleküler Yapısı | 3 |
| 1.1.3 Kondrogenez ve Kıkırdağın Onarımı | 8 |
| 1.1.4 Osteoartrit Oluşumu ve Hastalığın Seyri | 10 |
| 1.1.5 Osteoartritte Kullanılan Tedavi Yöntemleri | 16 |
| 1.1.5.1 Eklem İçi Hyaluronik Asit (HA) Enjeksiyonları (Viskosuplementasyon) | 16 |
| 1.1.5.2 Ağızdan Alınan Besin Destekleri | 19 |
| 1.1.5.3 PRP Uygulamaları,İlaç Tedavileri,Hücreyel Terapiler ve Biyomateryaller | 22 |
| 2. MALZEME VE YÖNTEM..... | 30 |
| 2.1 Malzeme ve Cihaz..... | 30 |
| 2.2 Çalışmanın Tasarımı | 31 |
| 2.3 N-asetil d-glukozamin (GA) ve Kondroitin Süllfat (KS) Bağlı Hyaluronik Asit (HA) Nanopartiküllerin Sentezi | 34 |
| 2.3.1 Amino Etil 5β-Kolanoamid (EtCA) Sentezi | 34 |
| 2.3.2 HA Nanopartiküllerin (nHA) Sentezi | 35 |
| 2.3.3 nHA'ları Polietilen Glikol (PEG)'leme İşlemi | 35 |
| 2.3.4 nHA'lara GA ve KS'nin Bağlanması | 36 |
| 2.4 Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Görüntülemesi | 36 |
| 2.5 Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Analizi | 37 |
| 2.6 Salım Çalışması | 37 |
| 2.7 WST-1 Hücre Proliferasyon Analizi | 37 |

| | |
|--|----|
| 2.8 Mezenkimal Kök Hücrelerin Kondrojenik Farklılaşma Deneyi | 41 |
| 2.9 Kİ-MKH'lerin Karakterizasyon Deneyleri..... | 43 |
| 2.9.1 Kİ-MKH'lerin Osteojenik Farklılaşma Deneyi..... | 44 |
| 2.9.2 Akım Sitometri Analizi..... | 44 |
| 2.10 Sağlıklı ve Osteoartritli İnsan Kondrositlerinde ESM Sentezi Deneyi | 45 |
| 2.11 Metilen-Mavisi Boyaması..... | 46 |
| 2.12 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)..... | 47 |
| 2.13 İstatistiksel Analiz | 48 |
| 3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA..... | 49 |
| 3.1 nHA ve GA-nHA ve KS-GA-nHA'ların SEM Görüntüleri | 49 |
| 3.2 ¹ H-NMR Sonuçları | 49 |
| 3.4 Salım Sonuçları..... | 52 |
| 3.5 WST-1 Proliferasyon Testi Sonuçları | 54 |
| 3.6 Kİ-MKH'lerin Karakterizasyon Sonuçları..... | 55 |
| 3.6.1 Deneyde Kullanılan Kİ-MKH'lerin Fotoğrafları | 56 |
| 3.6.2 Kİ-MKH'lerin Osteojenik Farklılaşma Sonuçları..... | 56 |
| 3.6.2 Akım Sitometri Analizi Sonuçları | 58 |
| 3.7 Kondrojenik Farklılaşma RT-PCR Sonuçları | 58 |
| 3.8 Metilen Mavisi Boyama Sonuçları | 60 |
| 3.8.1 Sağlıklı İnsan Kondrositlerinin Metilen Mavisi Boyama Sonuçları..... | 60 |
| 3.8.2 Osteoartritli İnsan Kondrositlerinin Metilen Mavisi Boyama Sonuçları..... | 61 |
| 3.9 Sağlıklı ve OA'lı Kondrositlerde ESM ve OA İşaretlerinin İfadesi İçin RT-PCR Sonuçları | 62 |
| 3.9.1 Sağlıklı Kondrositlerde ESM ve OA İşaretlerinin İfadesi İçin RT-PCR Sonuçları | 62 |
| 3.9.2 OA'lı Kondrositlerde ESM ve OA İşaretlerinin RT-PCR Sonuçları..... | 63 |
| 3.10 Tartışma | 64 |
| 4. KAYNAKLAR..... | 68 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

| | |
|---------------|-----------|
| μg | mikrogram |
| ml | mililitre |
| α | alfa |
| β | beta |

Kısaltmalar

| | |
|-----------------|--|
| AK-MKH | Adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücreler |
| AKSH | Adipoz kaynaklı stromal hücre |
| ATP | Adonezin trifosfat |
| Kİ-MKH | Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler |
| KS | Kondroitin sülfat |
| CO ₂ | Karbondioksit |
| COL II | Kollajen tip II |
| ESM | Ekstraselüler matriks |
| GAG | Glikozaminoglikan |
| GA | Glukozamin |
| GA-nHA | Glukozamin bağlı hyaluronik asit nanopartiküller |
| HA | Hyaluronik asit |
| IL | İnterlökin |
| MKH | Mezenkimal kök hücre |
| MMP | Matriks metalloproteinaz |
| NAG | N-asetil d-glukozamin |
| nHA | Hyaluronik asit nanopartiküller |
| NSAIDs | Non-steroidal anti inflamatuvar ilaçlar |
| OA | Osteoartrit |
| PRP | Platelet zengin plazma |
| SAPL | Yüzey aktif fosfolipit |

| | |
|-------|---|
| SEM | Taramalı elektron mikroskobu |
| SVF | Stromal vasküler fraksiyon |
| TGF | Dönüştürücü büyüme faktörü |
| TNF | Tümör nekroz faktör |
| WHO | World Health Organization |
| WOMAC | Western Ontario ve McMaster Üniversiteleri Osteoartrit İndeksi |

1.GİRİŞ

Osteoartrit (OA), günümüzde en yaygın görülen eklem hastalığı olmakla beraber, menisküs, ligamentler, subkondral kemik dahil olmak üzere tüm eklem yapısını etkiler [1] ve ağrı, şekil bozukluğu ve hareket kısıtlılığına sebep olur. OA en sık dizlerde, kalçada, parmaklarda ve alt omurga bölgesinde görülür [2]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre dünya çapında 60 yaş üstü kadınların %18'inde erkeklerin ise %9,6'sında semptomatik OA görülmektedir. OA hastalarının %80'inde hareket kısıtlılığı görülmekte, %25'i ise temel günlük etkinliklerini gerçekleştirememektedir [3]. Ayrıca OA'nın dolaylı yollardan kalp damar hastalıkları riskini artırdığı yönünde bulgular vardır [4]. OA çoğunlukla fazla kilo, sporla beraber meydana gelen kıkırdak yaralanmaları, yaşlanmayla ilişkilendirilse de genetik etmenlerin de hastalığın kalıtımında etkisi vardır [5]. Kıkırdak dokusunun kaybı veya kıkırdak enflamasyonları OA'ya neden olur ve eğer tedavi edilmezse morbidite [6] ve hatta mortalite [7] ile sonuçlanabilir. Eklemlerde bulunan hyalin kıkırdak dokusu çok özelleşmiş bir dokudur. Kan ve lenf damarları ve periferik sinirden yoksun olduğu için yalnızca sinoviyal sıvıdan beslenir, bu yüzden de kendini yenileme kapasitesi çok azdır. Kıkırdak dokusunun esas hücreleri olan kondrositler dokunun ekstraselüler matriks (ESM) sentezinden sorumlulardır ve herhangi bir sebeple zarar görmeleri durumunda kendilerini yenileyemezler. Günümüzde OA'yı kalıcı olarak tedavi etmek mümkün değildir ancak hastalığın ilerlemesini durduran yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın olanları eklem içi hyalüronik asit (HA) enjeksiyonları, ağızdan glukozamin (GA) ve kondroitin sülfat (KS) alımı ve steroid olmayan yangı önleyici ilaçların (NSAIDs) kullanılmasıdır. NSAIDs'lerin ağrı kesici olarak kullanılmasının kişilerin mortalite riskini anlamlı olarak artırdığına dair yaklaşımlar vardır [8]. Ancak HA, GA ve KS kullanımında bu tür riskler bulunmamakla beraber "güvenli tedavi" kategorisine girmektedirler [9][10]. KS ve GA'lar kıkırdak ESM'sine katılan agrekan denilen yapıyı oluşturarak dokunun büyük oranda desteklenmesini sağlar. Ancak ağızdan alınan besin desteklerinin sindirim sisteminden kan dolaşımına katılması ve kan damarlarından yoksun olan kıkırdak dokusuna ulaşması çok zordur. Ağızdan alınan GA'ların eklem sıvısındaki GA konsantrasyonunda çok az miktarda (yaklaşık 1 µg) artış sağladığı bilinmektedir [11]. Bu yüzden GA'ın ise ağızdan alınması yerine direkt eklem boşluğuna enjekte edilmesi hastalığın seyrini

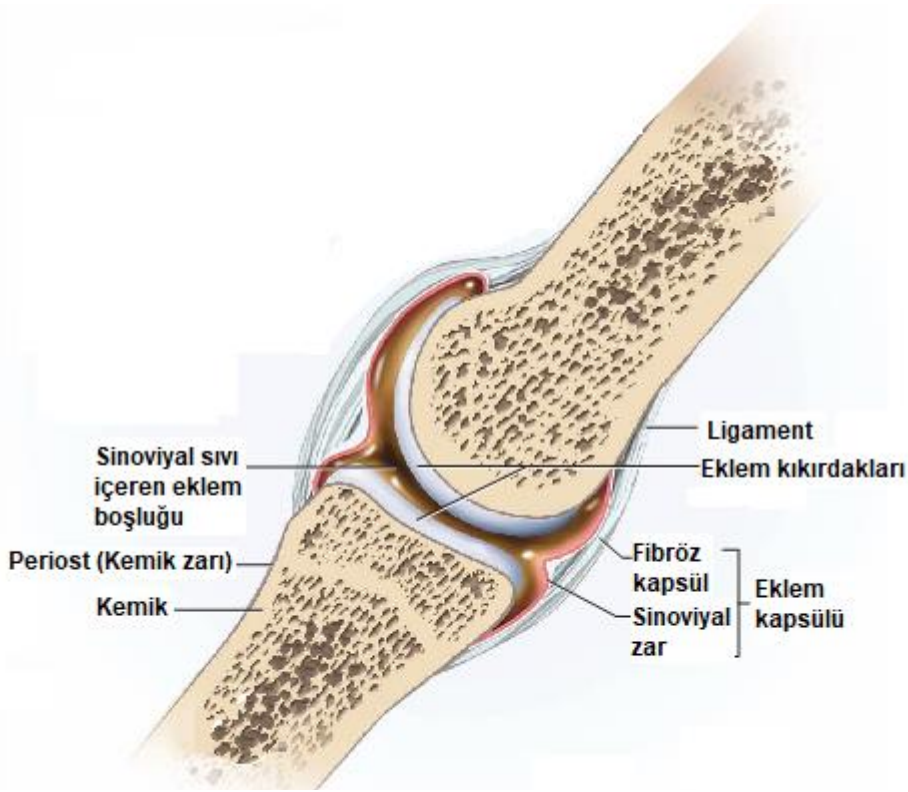
durdurmakta daha etkili olabilir. HA kıkırdak dokusunun ESM'sinde bol miktarda bulunan ve su tutma kapasitesi çok yüksek olduğu için eklem kemikleri arasında yastık görevi yapan bir karbonhidrat zinciridir. Tek başına HA enjeksiyonları günümüzde uygulanmaktadır ve hastalarda geçici bir süre ağrıyı azaltarak işlevi artırır. GA ve HA'nın beraber eklem içine enjekte edilmesi, HA'nın tek başına gösterdiği etkiden çok daha etkili ve uzun süreli olabilir. Bu çalışmada kıkırdak dokusu ESM'sinin önemli elemanları olan HA ve GA'dan enjekte edilebilir bir nano-biyomalzeme oluşturulduktan sonra *in vitro* koşullarda ticari olarak satın alınan sağlıklı ve OA'lı insan kondrositleri, insan kıkırdak kanseri hücreleri (kondrosarkoma) ile kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerdeki (Kİ-MKH) etkileri araştırılmıştır.

1.1. GENEL BİLGİLER

1.1.1 Eklem Kıkırdağı ve İşlevi

İnsan vücudunda hyalin, elastik ve fibröz olmak üzere üç tip kıkırdak dokusu bulunsa da, oynar eklemlerimizde yalnızca hyalin kıkırdak dokusu vardır [12]. Hyalin kıkırdak kemiklerin uç kısımlarında bulunur ve iki kemik arasındaki sürtünmeyi azaltır, tampon görevi görür ve ağırlığın tek noktada toplanmasını engeller. Yetişkin bir insanda kalınlığı ortalama 2-3 mm'dir ve eklem farklı yerlerinde farklı kalınlıklar gösterebilir [13]. Kıkırdak dokusu kan damarı taşımadığı için dokunun kendini yenilemesi çok yavaş gerçekleşir, sinir içermediği içinse erken yaralanmalara karşı hassas değildir [14]. Eklemlerde eklem kapsülü, sinoviyal zar, sinoviyal sıvı, eklem kıkırdağı, kasları kemiklere bağlayan tendonlar ve kemikleri birbirine bağlayan ligamentler bulunur (Şekil 1.1). Sinoviyal zar kan damarından yoksun olan kıkırdağı besleyen sinoviyal sıvıyı üretir. Sinoviyal sıvı kan serumu ve sinoviyal hücrelerin salgılarını içerir. Bu sıvı kıkırdak dokusunu sarar ve kayganlaştırarak hareket sırasında oluşacak sürtünmeyi engeller. Bu karmaşık sıvı yüzey aktif fosfolipid (SAPL), hyaluronik asit (HA) ve lubrikin (bir tür proteoglikan) içerir [15]. Yüzeye yakın olan doku metabolizma için gerekli olan besinleri sinoviyal sıvıdan difüzyonla karşılarken, kemiğe yakın doku ise subkondral kemikten karşılar. Metabolizma hızı çok yavaş olup, adenosin trifosfat (ATP) moleküllerini laktik asit fermantasyonu ile üretir [16].

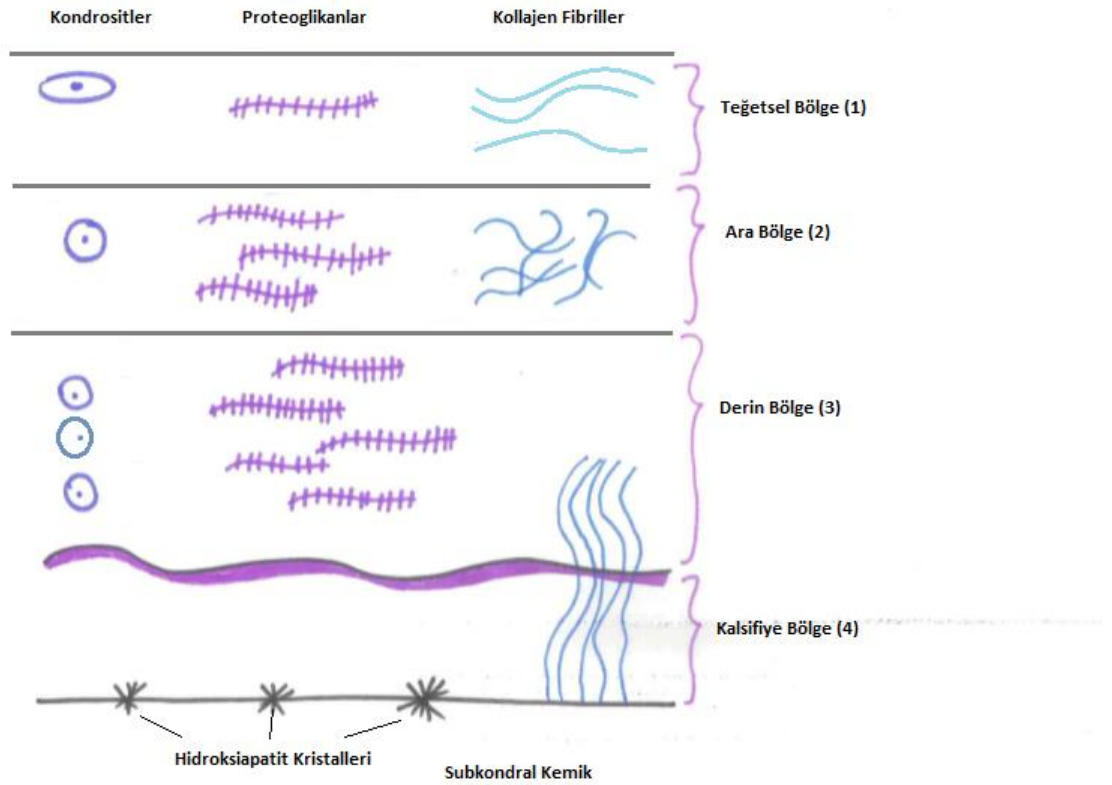
Sağlıklı hyalin kıkırdak camsı, düzgün, mavi-beyaz renkte ve pürüzsüz gözükür. Eklem kıkırdağı hem katı hem de sıvı faza sahiptir, böylece mekanik özelliklerini koruyabilir. Sıvı faz çoğunlukla su ve elektrolitlerden oluşarak katı ara maddenin aralarını doldurur. Katı faz ise kıkırdak hücreleri olan kondrositlerden ve ara madde elemanları olan kollajen lifler, proteoglikanlar ve kollajen olmayan proteinlerden oluşur [16].



Şekil 1.1 Sinoviyal eklemi oluşturan yapılar [13].

1.1.2 Eklem Kıkırdağının Makro ve Mikro Moleküler Yapısı

Hyalin kıkırdak dört bölgeden oluşur, bunlar dıştan içe doğru (1) teğetsel (yüzeysel) bölge, (2) ara bölge, (3) derin bölge, (4) kalsifiye bölgedir (Şekil 1.2). Bu bölgeler temel olarak kondrosit şekline ve tip II kollajenlerin konumuna göre birbirlerinden ayrılır.

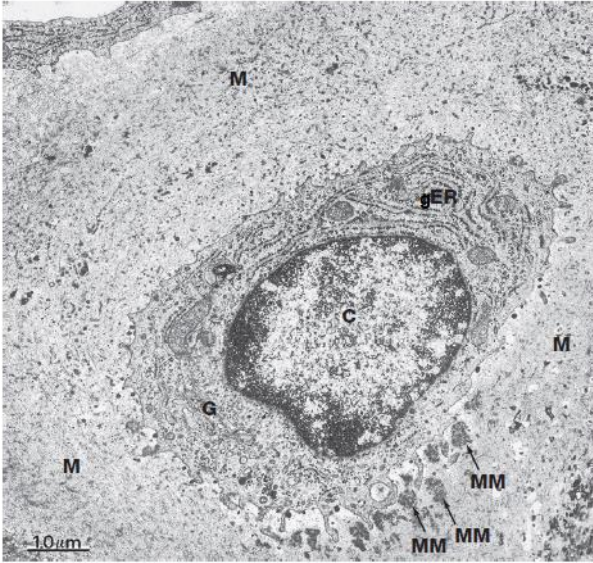


Şekil 1.2 Hyalin kıkırdağın bölgeleri [16].

Teğetsel bölgede kondrositler yassıdır, kollajen fibriller ekleme paralel bir konumdadırlar, proteoglikanlar ise seyrekler. Proteoglikanlar bu bölgede su ve oksijene karşı seçici değilken, hormon ve besin maddelerine karşı seçici geçirgen bir bariyer görevi görür [17]. Ara bölgede kondrositler yuvarlak bir morfoloji gösterirken kollajen lifler dağınık halde bulunur ve bu bölgede proteoglikan sayısı daha fazladır. Derin bölgede kollajen lifler ekleme dik bir şekilde uzanır, kondrositler sütunlar halinde dizilmiştir ve en fazla proteoglikan burada olduğu için en dayanıklı bölgedir. Proteoglikan sayısının artmasıyla bölgenin geçirgenliğinin artması, altındaki dokuların beslenmesi için önemli bir rol oynar. Kalsifiye bölge tip X kollajen bakımından zengindir ve hidroksiapatit kristalleri kıkırdağı subkondral kemiğe çapa gibi bağlar. Kıkırdak yaşlandıkça kondrositler büyür, protein miktarı, keratan sülfatın kondroitin sülfata oranı ve sertliği artar. Tüm bunlar ise hücre sayısının ve proteoglikan miktarının azalmasıyla sonuçlanır [16].

Kondrositler (Şekil 1.3) kıkırdak dokusunun temel hücreleridir ve mezenkimal kökenli kondroblastlardan köken alırlar [16]. Kondrositler tek veya izogen gruplar halinde bulunur. Bölünen kondrositler ESM materyali ürettikçe birbirlerinden

uzaklaşırlar. Kollajenler ve glikozaminoglikanlar gibi ESM elemanlarını sentezledikleri gibi, kendilerine yer açmalarına olanak sağlayan matriks yıkım enzimleri olan metalloproteinazları (MMP) da üretirler [12]. Olgun kıkırdak hücreleri matriksteki lakünelara gömülü olarak bulunur. Kondroblastlar ise kıkırdak matriksini üretirler. Bu hücreler çok gelişmiş bir golgi cisimciği, belirgin bir granüllü endoplazmik retikulum, lipid damlacıkları ve glikojen taşırlar [18]. İzogen hücre gruplarının hemen çevresi yeni üretilen matriksten oluşur ve bu bölge teritoryal matriks olarak adlandırılır. İzogen grupları birbirinden ayıran bölgeye ise interteritoryal matriks denir. Perifere doğru doğru olan kıkırdakta hücreler küçük ve yüzeye paralel bir şekilde uzanır. Hatta perikondriumdaki hücreler neredeyse ayırt edilemeyecek biçimde fibroblastlara benzemektedir (Şekil 1.5) [19]. Hyalin kıkırdak matriksinin %10-25'i kollajenden, %5-15'i proteoglikanlardan, %70-80'i ise sudan oluşur [20] (Tablo 1). Kondrositler hyalin kıkırdak dokusu hacminin yalnızca %1'lik kısmını oluştursa da ESM sentezi için çok önemli rol oynarlar [21].

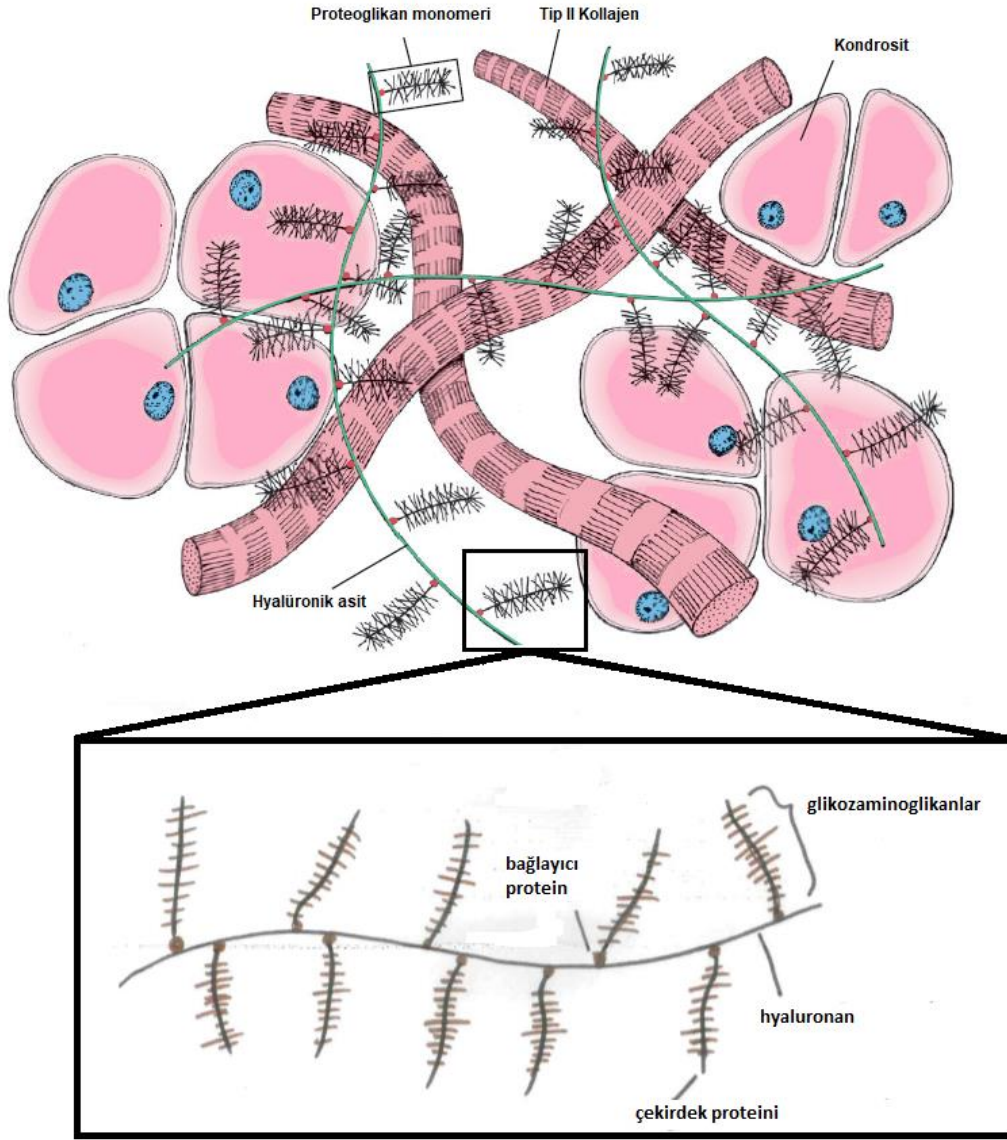


Şekil 1.3 Bir kondrositin Elektron Mikroskobu (EM) görüntüsü. EM x 16 000 [22].

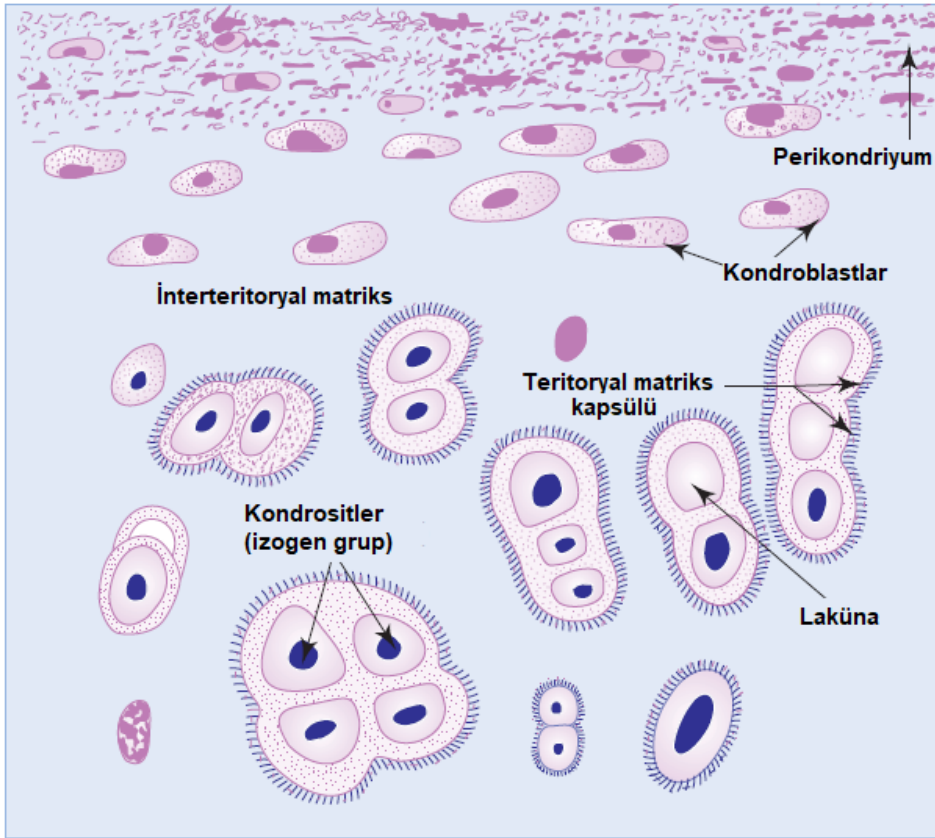
C: Kondrosit, **gER:** Granüllü endoplazmik retikulum, **G:** Golgi cisimciği, **M:** matriks, **MM:** ekstraselüler matriks materyali.

Şekildeki elektron mikrografı tek bir kondrositi bolca kıkırdak matriksi ile sarılı lakünasında göstermektedir. Hücreler protein sentezi yapmakta olduğundan granüllü endoplazmik retikulum salgı ürünleriyle şişmiş ve belirginleşmiştir. İyi

gelişmiş bir golgi cisimciği mevcuttur ve bazı glikojen tanecikleri sitoplazmada dağılmıştır [22].



Şekil 1.4 Eklem kıkırdağının ekstraselüler matris yapısını [12] ve bir proteoglikan molekülünü oluşturan yapılar [20].



Şekil 1.5 Kondrositlerin matriks bölgeleri [24].

Kollajen ana matriks proteindir, yaklaşık 20 nm çapında olup özelleşmiş ESM dokusunun üç boyutlu yapısını oluştururlar. Tip II, VI, IX, X ve XI kıkırdak matriksinde fazla miktarda bulunurlar. ESM'de en fazla bulunan glikozaminoglikanlar hyalüronik asit, kondroitin sülfat ve keratan sülfattır. En önemli proteoglikan monomeri agrekandır ve su moleküllerine karşı yüksek afinite gösterir. Hyalüronik asit molekülleri çok sayıda agrekan molekülü ile ilişkilidir ve bunlar hyalüronik asite bağlanma proteinleri ile bağlanarak proteoglikanları oluştururlar (Şekil 1.4) Proteoglikanların kıkırdağın basınca dayanıklı olan sert yapısını oluşturmadaki katkıları fazladır [23].

Tablo 1. Kıkırdağın Ekstaselüler Matriks Bileşenleri. [24], [25].

| Kollajenler | Proteoglikanlar | Kollajen | | Zar Proteinleri |
|-------------|-----------------|--------------------|----------------------|---------------------------|
| | | Olmayan Proteinler | Glikozaminoglikanlar | |
| Tip II | | COMP | | |
| Tip IX | Agrekan | Tenaskin | Kondroitin sülfat | Sindekan |
| Tip XI | Biglikan | Ankorin II | Keratan sülfat | CD44 |
| Tip VI | Dekorin | Trombomodulin | Hyaluronik asit | İntegrinler |
| Tip X | Fibromodulin | Kondroaderin | | (α 1, 2, 3, 5, 6, |
| Tip XII | Lumikan | Fibronektin | | 10; β 1, 3, 5) |
| Tip XIV | | PRELP | | |

COMP: Kıkırdak oligometrik matriks protein, PRELP: prolin/arjinin zengin uçlu lösince zengin tekrarlayan protein

1.1.3 Kondrogeniz ve Kıkırdağın Onarımı

Hyalin kıkırdak kalıcı ve geçici kıkırdak olarak iliye ayrılır. Geçici hyalin kıkırdak embriyonik evrelerde endokondral kemikte ve büyüme bölgesinde bulunur ve bir süre sonra kemiğe farklılaşır. Periostiumdaki mezenkimal kök hücreler (MKH) kondrojenik farklılaşmaya giderek önce kıkırdak yapısı oluşur daha sonra kemik formu oluşarak süreç tamamlanır. Kalıcı hyalin kıkırdak ise eklemlerde bulunur ve normal koşullarda terminal farklılaşmaya gitmez. Hücresel kökenleri iki tip kıkırdağın da aynıdır [26]. Kondrogeniz yani kıkırdak oluşumu süreci, mezenkimal hücrelerin sürece dahil olması, göç etmeleri, proliferasyonu ve yoğunlaşması ile başlar [27], [28]. Mezenkimal hücreler yuvarlaklaşır ve hücre kütlesi oluşturmak üzere kümelenirler. Hyalin kıkırdağın oluştuğu alan en başta kondrojenik nodül olarak bilinen mezenkimal (ya da ektomezenkimal) hücre topluluğu olarak tanımlanır [12]. Kondrojenik yoğunlaşma başlaması hücre adezyon molekülleri, nöral kaderin (N-kaderin) ve nöral hücre adezyon molekülü (N-CAM)'nin görülmesiyle ilişkilendirilir. Dönüştürücü büyüme faktörü (Transforming growth factor, TGF) $-\beta$, kondrojenik yoğunlaşmanın en erken faktörüdür ve fibronektin sentezini uyarır. Tenaskin ve kıkırdak oligomerik matriks proteini (COMP)'nin dahil olduğu trombospondinler gibi ekstra selüler matriks elemanları

hücre adezyon molekülleri ile etkileşime girerek hücre içi sinyal yollarını aktive ederler. Bu yollar kondroprogenitör (kıkırdak öncülü) hücrelerin tamamen kondrositlere dönüşmesini uyarır [29]. N-kaderin ve N-CAM farklılaşan kondrositlerde kaybolur ve sonradan yalnızca perikondrial hücrelerde tespit edilebilir. Kondroprogenitör hücrelerin farklılaşması kıkırdak matriksinde kollajen tip II, IX, XI ve agrekanın birikmesi ile karakterize edilir. Çekirdeğe ait olan transkripsiyon faktörü SRY-Box-9 (SOX-9) ise farklılaşmanın en erken işaretlerinden biridir ve kollajen tip II geni (COL2A1) ve kıkırdak kaynaklı retinoik asit duyarlı protein (CD-RAP) ve Col11a2 gibi kıkırdağa özgü proteinlerin genlerinin ifade edilmesini sağlar [30], [31].

TGF- β süper ailesi, kondrojenizde önemli bir rol oynar [32]. TGF- β 1 kondrositleri sentez yapması için uyarırken, interlökin (IL)-1'in yıkıcı etkisini inhibe eder [33]. In vitro koşullarda, TGF- β 1 kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kondrojenizini uyarır [34]. Ayrıca tavşanlarda TGF- β 1'in kıkırdak defektlerini iyileştirdiği yönünde umut verici çalışmalar da vardır [35]. Ancak tavşan ve farelerle yapılan başka çalışmalar da TGF- β 1'in zararlı yan etkileri de görülmüştür. TGF- β 1 uygulaması sinoviyal proliferasyonu ve fibrozisi artırmış, enflamatuar lökositlerin sinoviyal bölgeye çekilmesini sağlamış ve osteofit oluşumuna neden olmuştur [36], [37]. Bunun gibi güvenlik endişeleri göz önüne alındığında, TGF- β 1 tedavisi eklem bölgesinde uygulanabilir bir seçenek değildir. TGF- β 3 de kıkırdağın ESM üretmesi için uyarıcı bir faktördür, in vitro tavşan deneylerinde de TGF- β 3'ün bu etkisi değerlendirilmiş ve ESM sentezini artırıcı etkisi görülmüştür [34], [38]. TGF gibi kemik morfogenetik protein (BMP)-2'de kondrositlerin ESM sentezini artıran başka bir faktördür. Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) ESM elemanlarının sentezini artırırken tip I kollajen sentezini inhibe eder ve bu özelliği bakımından TGF- β 1'e benzemektedir [34].

Yoğunlaşma başlamadan önce farklılaşmamış MKH'lerden hyaluronan ve tip I kollajence zengin ESM sentezi yapılır. Farklılaşma sürecinde ise yoğunlaşmanın merkezindeki hücreler kondroblastlara farklılaşarak tip II, IX ve XI kollajen ve kıkırdağa özgü olan agrekan sentezi yaparak ESM'nin yapısını değiştirir [39]. Kondrositler bu ESM ile sarıldığında kendi karakteristik yuvarlak şekillerini alır. İlk kondrosit çekirdeği kondrosit proliferasyonu ve ESM sentezi ile büyür ve tip X kollajen sentezinin eşliğinde olgunlaşma ve hipertrofi evresi başlar. Hipertrofik

kondrositler kendilerini saran matriksi mineralleştirmeyi yönlendirir ve bununla beraber vasküler ve kemik hücreleri istilası ile apoptotik hücre ölümüne giderler [40]. Bu şekilde endokondral kemik yapısı sonlanır, kıkırdak matriksi yerine kemik matriksi yer alır. Büyüme bölgesinin başında, kondroepifiz bölgesinde ikinci bir merkez oluşur ve eklem kıkırdağı ile büyüme bölgesi kıkırdağını birbirinden ayırır. Fonksiyonel yüklenme ile eklem kıkırdağı olgunlaşır, dokunun morfolojik, biyokimyasal ve mekanik özellikleri kurulur. Eklem kıkırdağının bölgesel farklılıkları gelişim şekliyle ve lokal çevresi sonucunda oluşur [41].

Kıkırdak onarımı (1) appozisyonel büyüme, (2) interstisyel büyüme şeklinde iki türlü gerçekleşir. Appozisyonel büyümede var olan kıkırdağın yüzeyinde yeni kıkırdak oluşur. Oluşan kondrositler morfolojik ve fonksiyonel olarak fibroblastlara benzer ve perikondriyuma ait olan tip I kollajeni üretirler [42]. Bununla beraber, kıkırdak büyümesi süreci başladığında SOX-9 ifadesi ile yönlendirilen bir farklılaşma sürecine giderler. Çekirdek yuvarlaklaşır, sitoplazmik uzantılar kaybolur, sitoplazma belirginleşir ve miktarında artış olur. Bu değişimlerle beraber hücreler kondroblastlara dönüşür ve tip II kollajen gibi kıkırdak ESM'si üretmeye başlarlar. İnterstisyel büyüme ise var olan kıkırdak kütlesi içerisinde yeni kıkırdak oluşur. Kondrositler, buldukları lakünalar içerisinde bölünürler ve daha fazla ESM sentezi yaptıkça kardeş hücreler birbirlerinden uzaklaşır. Kondrositlerin interstisyel olarak yeni ESM sentezlemeleri ve yeni farklılaşan kondrositlerden appozisyonel olarak ESM sentezlenmesiyle kıkırdağın toplam büyümesi gerçekleşir [12].

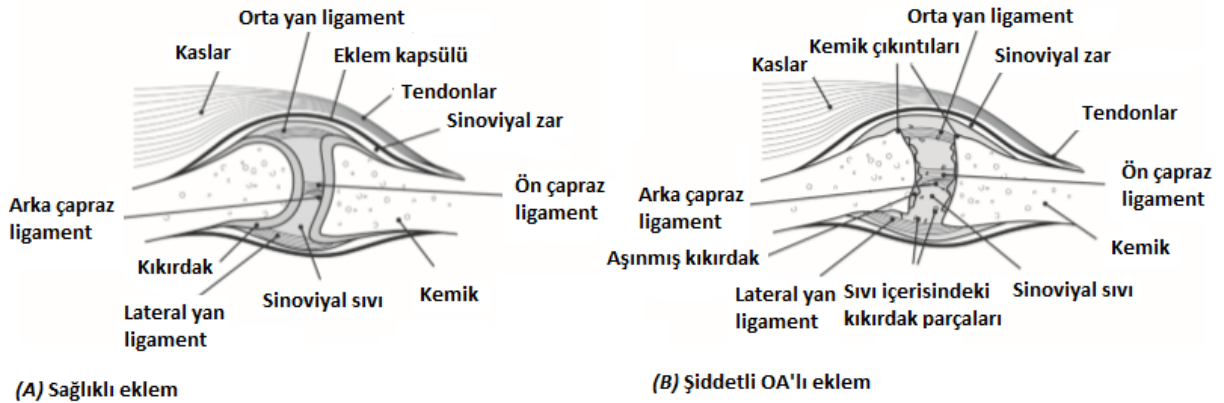
1.1.4 Osteoartrit Oluşumu ve Hastalığın Seyri

Osteoartri (OA), en sık rastlanan iskelet-kas sistemi hastalığıdır [43]. Dünya çapında 630 milyon kişinin OA'dan etkilendiği tahmin edilmektedir [44]. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) verilerine göre dünya çapında 60 yaş üstü kadınların %18'inde erkeklerin ise %9,6'sında semptomatik OA görülmektedir. OA hastalarının %80'inde hareket kısıtlılığı görülmekte, %25'i ise temel günlük aktivitelerini gerçekleştirememektedir [3]. Yaşlılar ve obezite hastaları ise OA ilişkili en büyük risk grubunu içerir [45]. Sebebi tam bilinmemekle beraber hareket yeteneğinde kısıtlılık, sakatlık ve önemli derecede ağrıya sebep olur [46].

OA'nın kadınlarda görülme sıklığı erkeklere oranla 3 kat fazladır (Spector,1999) ve aşırı kilo, kıkırdak yaralanmaları, yaşlılık ve genetik faktörlerle ilişkilendirilir [5]. OA'dan kaynaklı oluşan sakatlıkların kalp damar hastalıkları riskini artırdığı yönünde yaklaşımlar da vardır. OA dolaylı yollardan, yürüme engelliği oluşturarak veya NSAID kullanımını artırarak kalp ve damar hastalıkları riskini de artırabilir [4].

OA'nın oluşumunu sırasında proliferasyon ve hücre ölümleri (apoptozis), ESM sentezinin azalması, ESM yıkım aktivitesinde değişiklikler, enflamatuar moleküllerin artması, kondrositlerdeki fenotipik değişimler ve osteofit formasyonu görülür [47], [48].

OA tüm eklemi oluşturan yapıları etkiler. Eklem kıkırdağı zarar görür, sinoviyal sıvı değişir, subkondral kemik yeniden yaplanır, eklem kapsülünde fibrozis gerçekleşir, osteofit formasyonu oluşur ve ligamentler etkilenir [49], [50]. Erken OA evresinde kıkırdak yüzeyi düzensizleşir, proteoglikan dağılımı değişir ve yüzeysel çatlaklar oluşur. Ancak hastalık ilerledikçe bu çatlaklar daha da derinleşir ve ileri evrede kıkırdağın altındaki kemik ortaya çıkar [51]. Derinleşen çatlaklardan dolayı kemik hücreleri bölünmeye başlar ve osteofit denilen yüzeysel yapıları oluşturarak OA'yla karakterize ağrı ve hareket kısıtlılığına sebep olur [52].



Şekil 1.6 Sağlıklı ve OA'lı eklemlerin karşılaştırılması [53].

Sağlıklı eklemdede (A) kemiklerin uçları pürüzsüz bir kıkırdak yapısıyla kaplıdır ve eklem kapsülü tarafından korunur. Eklem kapsülü ve sıvısı ise kıkırdığı, kasları ve bağ dokusunu korur. Ancak OA'lı eklemdede (B) kıkırdak aşınır, kemik çıkıntıları kemiğin köşelerine doğru büyür, sinoviyal sıvı miktarı artar ve eklemdede ağrı ve şişliklere yol açar [53].



Şekil 1.7 Osteoartritli bir dizin önden X-Ray görüntüsü [2]. Eklem bölgesinde daralma, gaz birikimi, sklerozis, distal femur ve proksimal tibia kenarlarında osteofit oluşumları görülmektedir.

Tablo 2. Osteoartritli Kondrositlerin Özellikleri [24].

| Artan Fonksiyonlar | Azalan Fonksiyonlar |
|---|---|
| Tip II kollajen ve agrekan sentezi (Erken OA) | Tip II kollajen ve agrekan sentezi (Geç OA) |
| Hücre proliferasyonu | IL-1 reseptör antagonisti |
| Katabolik sitokin üretimi | IGF-1 cevabı |
| Proteinazlar (MMPs, PA, agrekanaz) | |
| Tip I IL-1 reseptörü | |
| IGFBP-3 | |
| Apoptozis | |
| NOS | |
| COX-2 | |
| Tip VI, III, IIA ve X kollajen ekspresyonu | |

MMPs: matriks metalloproteinazlar, PA: plasminojen aktivatörü, IL-1: interlökin-1, IGFBP-3: insulin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein, NOS: nitrik oksit sentaz, COX-2: siklooksigenaz-2, IGF-1: insulin benzeri büyüme faktörü 1

OA sırasında gerçekleşen hücre sel tepkiler ise erken evrede geçici bir kondrosit proliferasyonu ile başlar. Kondrositler dokuyu onarmak için ESM sentezini artırır ayrıca katabolik sitokinlerin ve matriks yıkıcı enzimlerin de sentezini artırır lar [24] (Tablo 2). Proteoglikan kaybı ve tip kollajen II fibrillerindeki yırtılmalar kıkırdak yüzeyinde başlar, süreç dokudaki su miktarının artması ve çekme gücünün azalmasıyla sonuçlanır.

Kondrositlerle ilgili matriks metalloproteinaz (MMP) ların sürece dahil olmasıyla kıkırdaktaki kollajen ve proteoglikanların yapısı bozulmaya başlar. MMP'ler kıkırdağın bozulmaya başladığı bölgede lokalize olur ve sinoviyal sıvıda tespit edilebilir [54]–[56]. OA araştırmalarında kollajenaz ve stromelizin ailesi MMP'ler en dikkat çekici olanlardır çünkü spesifik olarak ana kollajen ve proteoglikanları parçalar [57]–[59].

Son yıllardaki çalışmalar OA sürecinin anlamlı olarak oksidatif stresle bağlantılı olduğunu bulmuştur [60]. Reaktif oksijen türleri (ROS)'nin üretimi ile anti oksidan savunması arasındaki dengenin bozulması makromoleküler yıkıma ve redoks sinyalinin ve kontrolünün bozulmasına yol açar [61]. ROS en yaygın ifadeyle oksijen içeren yüksek reaktif kimyasallar olarak tanımlanır [62]. Radikal ROS örneği olarak süperoksit, nitrik oksit (NO) ve hidroksil radikaller, radikal olmayan

ROS örneği olarak da hidrojen peroksit, ozon, peroksinitrit ve hidrosit verilebilir. Kondrositler herhangi bir nedenden strese girdiklerinde nitrik oksit (NO) üretirler. NO ise matriks proteinlerinin yıkımına sebep olan interlökin-1 (IL-1) 'in salımını uyarır [52]. IL-1, lenfosit aktive edici faktör olarak bilinir [63], enflamatuar bir sitokindir ve kıkırdakta kollajenaz ve prostoglandin üretimini uyarır, IL-1'in OA ile ilgili kıkırdak yıkımıyla ilişkili olduğunu gösteren in vitro ve in vivo çalışmalar mevcuttur [64], [65]. IL-1 matriks sentezini ve kondrositlerin bölünmesini inhibe ederek matriks yıkıcı proteinlerin salgılanmasını uyarır [66]. Tümör nekroz faktör- α (TNF- α)'nın da IL-1 ile sinerjit veya benzer etki gösterdiği ve kıkırdak yıkımıyla ilişkisi olduğunu gösteren çalışmalar vardır [65]. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), siklooksijenaz 2 (COX-2) ve fosfolipaz A2 gibi enflamatuar faktörler OA'da kondrosit fonksiyonlarını modüle eder. Kondrositleri tek başına IL-1'e veya TNF- α ile beraber maruz bırakıldığında bu enflamatuar enzimlerin ekspresyonu artar [67], [68]. NO kıkırdak matriks sentezini inhibe eder ve kondrosit apoptozisini uyarır [69]. Tip II kollajen ve agrekan sentezinin azalmasıyla kıkırdağın gergin yapısı bozulur ve kıkırdak dejenerasyonu dönüşü olmayan bir evreye geçer [24], [51].

OA sürecinde kondrositlerden bazı belirleyici işaretler salgılanır (Tablo 3). Bu işaretlere sinoviyal sıvıda, kanda veya idrarda rastlanabilir. İşaretlerin birçoğu agrekan, tip II ve tip I kollajen metabolizması ile ilgilidir. Tip II kollajen ve agrekan kıkırdak matriksinde en çok bulunan yapılar olduğu için, OA araştırmalarında hedef alınmaktadır [48]. CTX-II, üriner Glc-Gal-Pyd ve serum PIINP OA hastalarında artan işaretler olmakla beraber [70], kollajen yapım işareti olan PIIANP azaldığı gözlenmiştir [71]. Ayrıca serum COMP ve C2C seviyeleri de diz dejenerasyonu olan OA hastalarında da koraledir [72]. Agrekan neoepitoplarının varlığı da OA'in varlığı ile ilişkilendirilir [73]. 36 hasta ve 15 sağlıklı kontrolle yapılan bir çalışmada plazmadaki sRAGE seviyesinin anlamlı olarak ($p<0.01$) düştüğü gözlemlenmiştir [74].

Tablo 3. Osteoartrit ile ilgili işaretler [48].

| Kollajen metabolizması | Agrekan metabolizması | Kollajen olmayan protein metabolizması | Diğer süreçler |
|---|---|--|---|
| Kollajen tip II C-terminal telopeptit (CTX-II) | Çekirdek protein parçaları (agrek an neopeptopları, ARGS ve FFGV parçaları) | COMP | Enflamatuar işaretler: hs-CRP (enflamasyon), IL-1 β , IL-6, COX-2 |
| Tip II kollajen propeptitler (PIINP, PIIANP, PIIBNP, PIICP, CIIP) | Kondroitin sülfat epitop 846 ve monoclonal antibadi 3B3(-) | Fibulin (fibulin 3 peptitleri, Fib3-1, Fib3-2) | Adipokinler (adipodenktin, leptin, visfatin) |
| Pridinolin ve Glc-Gal-PYD | Keratan sülfat | Hyaluronan | Kemikle hücre sel etkileşimler (periostin) |
| Tip II kollajen ayrılma ürünü (C2C) | | Matriks metalloproteinazlar (MMP-1,3,9,13 ve TIMP) | Wnt inhibitörleri (DKKs ve SOST) |
| Tip II kollajen-spesifik neopeptit (C2M) | | YKL-40 (kıkırdak glikoprotein 39) | Ürik asit |
| Kollajen tip I C-terminal telopeptit (CTX-I, α -CTX-I) | | | |
| Kollajen tip I N-terminal telopeptit (NTX-I) | | | |
| Kollajen tip I aminoterminal propeptit (PINP) | | | |

COMP: Kıkırdak oligometrik protein, COX-2: siklooksigenaz-2, Glc-Gal-PYD: glukosil-galaktosil-pridinolin, hs-CRP: C rekatif yüksek hassas protein, IL:interlökin, SOST: sklerostin, TIMP: doku inhibitörü matriks metalloproteinaz

OA sürecinde doğal bağışıklık aktive olur [75]. Kondrositlerden toll-benzeri reseptörler (TLR) ifade edilir [76] ki bu reseptörler hasarla ilişkili düzenlemelerde aktive edilir. OA'da bu düzenlemeler glikozaminoglikan ve hyaluronan gibi ESM molekülleri sayesinde olur [77]. Kalsiyum piyrafosfat ve sodyum urat kristalleri de toll-benzeri reseptörlere bağlanır ve bu durum da OA etiolojisinin bir parçası olarak rol oynayabilir [78]. OA'lı eklemlerde kompleman aktivasyonu ve ifadesinin anormal olarak yüksek olduğuna dair bulgular vardır [79]. Kondrositler, subkondral

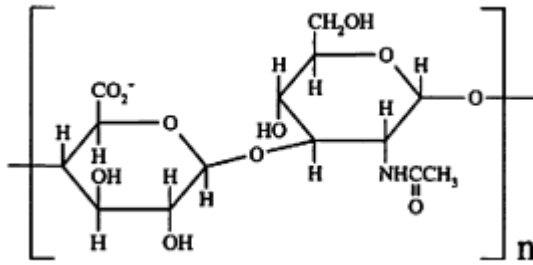
kemik ve sinoviyum gibi diğer eklem yapılarından kaynaklanan enflamatuar sinyallerle aktive olabilirler. Kondrositler ayrıca, özellikle yaşlanmış dokularda biriken glikasyon sonucu oluşan ürünlere bağlanan reseptörler de ifade ederler [80]. Bu durum fenotipin katabolik yönde değişmesi sonucu ortaya çıkar ve yaşla beraber OA görülme sıklığının artmasını açıklamakta yardımcı olmaktadır

1.1.5 Osteoartritte Kullanılan Tedavi Yöntemleri

OA tedavisinde en sık kullanılan tedavi yöntemleri: eklem içi HA enjeksiyonları, ağızdan alınan glukozamin (GA) ve kondroitin sülfat (KS) besin takviyeleri, eklem içi plateletten zengin plazma (PRP) enjeksiyonları ve steroid olmayan yangı önleyici ilaçların (NSAID) kullanılmasıdır.

1.1.5.1 Eklem İçi Hyaluronik Asit (HA) Enjeksiyonları (Viskosuplementasyon)

Sodyum hyaluronat – hyaluronik asit – hyaluronan (HA) doğal olarak canlıların dokusunda bulunan, yüksek molekül ağırlığına sahip, sodyum D-glukuronat ve N-asetil glukozamin tekrarlarından oluşan uzun bir polisakkarit zinciri olup sülfatlanmamış glikozaminoglikanlar grubuna dahildir [81] (Şekil 1.8).



Şekil 1.8 HA'nın tekrarlayan birimleri [82].

İnsanlarda kıkırdak dokusunda, sinoviyal sıvıda, göbek bağında, epidermiste, dermiste, vitröz sıvıda, torasik lenfte, serumda ve idrarda doğal olarak bulunur [83]. Sinoviyal sıvıda ve kıkırdakta dokunun viskoelastik yapısından ve kayganlığından sorumludur [84]. Normal HA konsantrasyonuna sahip sinoviyal sıvı yavaş hareketler sırasında viskoz bir kayganlaştırıcı gibi işlev görürken, ani hareketlerde ise şok emici bir etki yapar [85]. HA, hücrelerden ifade edilen birçok reseptöre bağlanabilir. Bunlar arasında küme determinantı 44 (CD44), hücre içi adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve hyaluronat aracılı hareket reseptörü (RHAMM) vardır [86], [87]. Bu bağlanmalar sonucunda sitokin salımı veya hücre döngüsü

proteinlerinin uyarılması gibi hücre içi birçok sinyal tetiklenir. Bu sinyallerle hücre çoğalması veya hücre göçü gibi hücrenin fonksiyonel olayları uyarılır [88]. OA'lı eklemlerde, HA'nın molekül ağırlığı da konsantrasyonu da sağlıklı eklem kıkırdağına göre daha azdır [89]. Viskosuplementasyonun mantığı OA'ya bağlı ağrıları azaltmak ve hareket kabiliyetini artırmaktır [90].

20 yıldan fazladır eklem içi HA enjeksiyonları, OA tedavisi için etkili ve güvenli bir seçenektir [91]. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) 1997 yılında eklem içi HA enjeksiyonlarını OA tedavisi için onaylamıştır. FDA onaylı eklem içi HA enjeksiyonları: Hylan G-F 20 (Synvisc®), Hylan G-F 20 (Synvics-One™), Sodyum hyaluronat (Hyalgan®, Supartz®, Euflexxa™, Monovisc™, Gel-Syn™, GenVisc® 850), Yüksek molekül ağırlıklı Hyaluronan (Orthovisc®), Hyaluronik asit (Gel-One®), Yüksek molekül ağırlıklı viskoelastik hyaluronan (Hymovis®)'dır (bcbswny) [92]. Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) 1997 yılında gonartoz için eklem içi HA tedavisini onaylamıştır ve Amerikan Romatoloji Birliği (ACR) ve Amerikan Ortopedik Cerrahlar Akademisi tarafından diz OA tedavisi kılavuzlarına oluşturulmuştur [93].

HA'nın tedavilerde bu kadar güvenli olmasının sebebi antijenik olmaması, immünojenik olmayan bir yapı göstermesinin yanı sıra kan bileşenleriyle zayıf etkileşim kurduğu için yüksek oranda biyouyumlu olmasıdır [9]. Dışarıdan uygulanan HA, kondrositlerin proteoglikan ve HA sentezini uyarmakla beraber matriks metalloproteinazların ve pro-enflamatuar moleküllerin baskılanmasını sağlayarak kıkırdağın yıkımını engeller [94]. *in vitro* uygulamalar HA olmadan yapılan çalışmalara karşın HA varlığında kondrositlerin daha çok ESM sentezi yaptığını, DNA proliferasyonunu, KS sentezini ve tip II kollajen sentezini artırdığını göstermiştir [95]. Kawasaki et al. (1999) [96] tavşan eklem kondrositlerini izole ederek kollajen jellere gömmüşlerdir. 0.01 ve 0.1 mg/ml HA içeren Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) uygulaması yapılan kondrositler KS sentezini artırmış, fenotipik özelliklerini kaybetmeden çoğalmışlardır.

Erken OA tedavisinde otolog PRP ve eklem içi HA enjeksiyonlarının klinik etkileri karşılaştırıldığında her iki grubun da anlamlı olarak gelişme gösterdiği [97] , oral NSAID alımı ile eklem içi HA enjeksiyonları karşılaştırıldığında ise iki grup

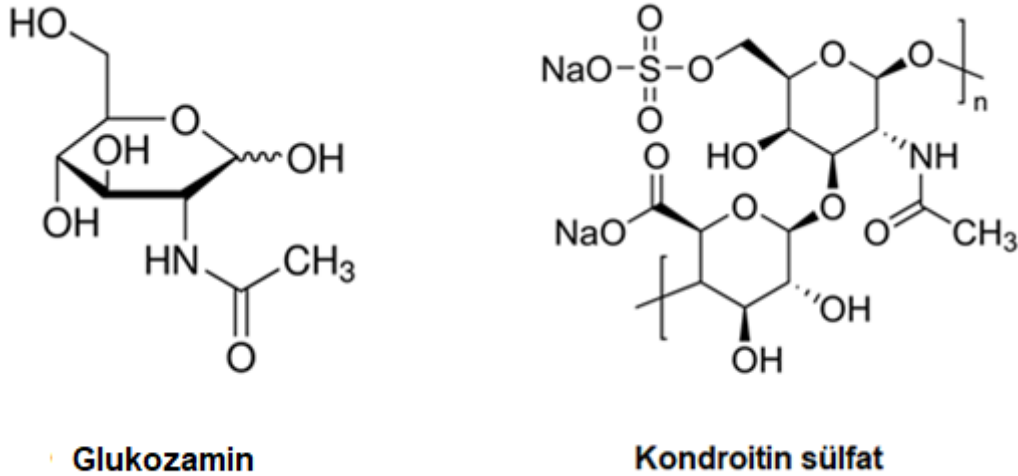
arasındaki iyileşmenin anlamlı bir fark yaratmadığı ancak HA enjeksiyonlarının daha güvenli olduğu gösterilmiştir [98]. Yine benzer bir çalışmada ağızdan alınan kortikosteroidlerle eklem içi HA enjeksiyonları karşılaştırıldığında, 6 aylık tedavi sonunda her iki grubun benzer iyileşme gösterdiği, ancak HA grubunda daha uzun vadeli etki olduğu gösterilmiştir [99]. Ayak bileği OA'sı olan 40 hastayla yapılan bir çalışmada [100] 3 hafta boyunca haftada 2 ml eklem içi HA enjeksiyonu yapılmış, görsel analog ölçeği (Visual Analogue Scale-VAS) skorları ortalamaları ilk enjeksiyondan 3, 6 ve 12. aylarda ölçüldüğünde sırasıyla 3.6 ($p<0.001$), 4.33 ($p<0.001$), ve 5.3 ($p=0.0071$) olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonunda eklem içi HA enjeksiyonlarının güvenli ve etkili bir tedavi yöntemi olduğu sonucuna varılmıştır. Ikeuchi et al. (2014) [101] yaptıkları bir çalışmada sıçan OA modeli kullanmışlardır. Hayvanlara 3 hafta eklem içi HA uyguladıktan sonra ağrı davranışlarını ve ağrıya ilgili nörokimyasalların [kalsitonin geniyle ilgili peptid (CGRP), tirozin reseptör kinaz A (TrkA) ve asit duyarlı iyon kanalı 3 (ASIC3)] salımını incelemişlerdir. HA enjeksiyonu olan grupta her üç kimyasalda azalma olsa da istatistiksel olarak anlamlı farklılık sadece CGRP'de olmuştur ($p=0.0406$). 2017 yılında yapılan bir meta-analiz derlemesinde [102] 1794 kişiden oluşan OA hastalarında HA enjeksiyonları ve kortikosteroid enjeksiyonları uzun ve kısa dönemde karşılaştırılmıştır. VAS ve WOMAC (Western Ontario and McMaster Üniversiteleri Osteoartrit İndeksi) skorları meta-analiz edilmiştir. 1 aylık süreçte kortikosteroidler HA'ya göre ağrıyı azaltmada daha etkiliyken 6 ayda HA enjeksiyonlarının daha etkili olduğu, iki uygulamanın da benzer şekilde diz fonksiyonlarını iyileştirdiği ve ikisinin de güvenli yöntemler olduğu sonucuna varmışlardır. Yapılan bir derlemede ise [103] HA enjeksiyonlarının kortikosteroid veya tuzlu su enjeksiyonlarına göre daha güvenilir bir yöntem olduğu, hafif ila orta şiddetli OA hastalarında semptomları iyileştirdiği gösterilmiştir.

HA enjeksiyonlarıyla ilgili literatürde olumsuz sonuçlar da mevcuttur. 162 kişiyle yapılan bir çalışmada [104] HA ve PRP enjeksiyonlarının farklı derecedeki diz OA'sı olan hastalarındaki etkileri karşılaştırılmıştır. Enjeksiyonlardan 6 ay sonra EuroQol Görsel Analog ölçeği (EQ-VAS) ve Uluslararası Diz Döküman Komitesi (IKDC) skorları takip edilmiştir. Çalışma sonunda çoklu (3) PRP enjeksiyonunun tek HA enjeksiyonundan daha etkili olduğu sonucuna varmışlardır. Tek doz PRP ve HA enjeksiyonu uygulanan grupların arasında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Dirsek OA'sı olan 19 hastayla yapılan başka bir çalışmada [105] hastalara 3 adet HA enjeksiyonu yapılmıştır. 3 ayın sonunda, ağrıda kısa süreli azalma ve aktivite bozukluğunda çok kısıtlı bir azalma görülmüş, 6 ayın sonunda ise enjekte edilen 19 dirsekte de herhangi bir yararlı etkiye rastlanılmamıştır. Benzer şekilde ayak bileği OA'sı ile yapılan başka bir çalışmada [106] 56 hastaya tek HA enjeksiyonu ve kontrol amaçlı tuzlu su uygulaması yapılmıştır. 12 haftalık Amerikan Ayak&Ayak Bileği Derneği (AOFAS) klinik oylamalarla oluşan skor sonuçlarında ve hastaların ağrı durumlarında her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır.

1.1.5.2. Ağızdan Alınan Besin Destekleri

30 yıldan fazladır ağızdan alınan kıkırdak proteoglikan yapısının ana molekülleri olan glukozamin (GA) ve kondroitin sülfat (KS), OA hastalığında ağrıyı azaltmak ve fonksiyonları iyileştirmek amacıyla kullanılmaktadır (Tablo 4). Glukozamin 179.2 Da molekül ağırlığında bir monosakkarit (2-amino-2-deoksi-D-glikoz), kondroitin sülfat ise 10000-50000 Da molekül ağırlığına sahip uzun bir glikozaminoglikan zinciridir [10].



Şekil 1.9 GA ve KS'nin moleküler yapısı [107],[108].

Yapılan 3 yıllık kontrollü çalışmalar ağızdan alınan GA, OA'nın radyografik ilerlemesini yavaşlattığını için hastalığın seyirini değiştirici ilaçlar kategorisine alınabilir [109].

Tablo 4. Glukozamin ve kondroitin sülfatın OA tedavisinde kullanılmasıyla ilgili çalışmalar.

| Parametre | Denek Tipi | Kullanılan İlaç | Doz | Ölçüm Yöntemi | Sonuç | Kaynak |
|---|-----------------|--------------------------------------|--------------------------------|--|--|--------|
| Glukozamin alımından sonra sinoviyal sıvıda ve plazmada glukozamin konsantrasyonu | OA'lı İnsan | Kristalin glukozamin sülfat | 1500 mg | Sıvı kromatografisi ve kütle spektrometresi | Plazma ortalaması 52.0 ng/ml'den 1282 ng/ml'ye, sinoviyal sıvıda ise 36.5 ng/ml'den 777 ng/ml'ye yükselmiştir | [11] |
| Glukozamin veya KS nin birlikte veya tek tek alınmasının insan farmakokinetiğine etkisi | Sağlıklı İnsan | Glukozamin ve kondroitin sülfat (KS) | 1500 mg glukozamin, 1200 mg KS | Fluorofor destekli karbonhidrat elektroforezi (FACE) | KS insan kan plazmasında yaklaşık 20 µg/ml. KS'nin tek başına veya glukozaminle beraber alınması plazma konsantrasyonunu değiştirmiyor. | [110] |
| Glukozaminin etkisi | OA Sıçan Modeli | Glukozamin hidroklorid (GlcN) | 1000 mg/kg | Mankin skoru, toluidine mavisi boyaması, ELISA ile serumdaki OA işaretlerinin ölçümü | GlcN'nin kollajen II sentezini artırıp, yıkımını inhibe ederek kırıldak koruyucu bir etkisi olduğu gösterilmiştir | [111] |
| N-asetil glukozamin içeren yeşil çayın kırıldak işaretlerine etkisi | Sağlıklı İnsan | N-asetil glukozamin | 1000 mg | Serum C2C and PIICP değerleri ELISA ile ölçülmüştür | C2C/PIICP oranı deney grubunda düşmüştür. (kollajen sentezi artarken yıkımı azalmıştır). Ancak deney ve kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. | [112] |
| N-asetil glukozaminin kırıldak metabolizması üzerine etkisi ve güvenilirliği | Sağlıklı İnsan | N-asetil glukozamin | 500 veya 1000 mg | Serum C2C and PIICP değerleri ELISA ile ölçülmüştür | Plasebo ve deney grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. | [113] |

C2C: Tip II kollajen yıkım, PIICP: Prokollajen II C-Terminal Propeptit

Kıkırdak dokusu kan damarından yoksun olduğu için ağızdan alınan GA ve KS'nin ne kadarının sinoviyal sıvıdan dokuya ulaştığı konusunda bilgi eksiklikleri vardır. Yapılan bir çalışmada ağızdan alınan 1500 mg'lık GA'nın sinoviyal sıvıda 740 ng/ml'lik bir artış yaptığı, plazma derişiminin ise 4 saatin sonunda 1200 ng/ml'de en yüksek seviyeye ulaştıktan 48 saat sonra eski seviyesine döndüğü gösterilmiştir [11]. Atlarla yapılan bir başka çalışmada ise [114] damar içi (IV) veya nazogastrik (NG) entübasyonla verilen 20 mg/kg GA'nın plazmada 1 µg/ml'den yaklaşık 50 µg/ml'ye çıktığı gösterilmiştir. Glukozaminlerin yaygın olarak metabolize edildiği ve metabolitlerin ağırlıklı olarak idrar ile atıldığı bilinmektedir [115]. Plazma ve sinoviyal sıvıyla yapılan çalışmalar ağızdan alınan glukozaminin gastrointestinal sistemden kana emildiğini açık bir şekilde göstermektedir.

Ancak kondroitin sülfat daha büyük bir moleküldür ve glukozamin kadar emilim göstermemektedir [116]. Sıçan ve köpeklerde ağızdan alınan sodyum 3-borohidrid-işaretli kondroitinin %70'inin emildiği ve 2 saatte en yüksek seviyeye ulaştığı, karaciğer, bağırsak, sinoviyal sıvı ve kıkırdağın ise uygulamadan 24 saat sonra en yüksek radyoaktiviteye ulaştığı gösterilmiştir [117]. Maksimum plazma konsantrasyonuna ise KS ağızdan alındıktan 1-5 saat sonra ulaşmaktadır [118].

Glukozamin/Kondroitin Artrit Müdahale Denemesi (The Glucosamine/Chondroitin Arthritis Intervention Trial-GAIT) [119] günlük 1500 mg glukozamin hidroklorid (GAH), 1200 mg KS, iki ajan birden birden, plasebo ve günlük 200 mg selekoksib gruplarını içeren çalışmasında 6 ay boyunca 1583 hastanın OA belirtilerindeki iyileşmelerini birçok parametreyle değerlendirmiştir. Çalışmanın sonucunda GAH ve KS'nin tek veya beraber alınan gruplarında seyrek ve hafif yan etkilerin oluştuğunu, GAH-KS kombinasyonunun ise orta ila şiddetli ağrısı olan OA hastalarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ağrıyı azalttığını göstermişlerdir (p=0,002). Das ve Hammad [120] ise, yaşları 45 ile 75 arasında değişen 93 OA hastasında günlük 2000 mg GAH, 1600 mg KS ve 304 mg manganaz askorbat kombinasyonunu kullanmış ve hafif ila orta şiddetli ağrısı olan OA hastalarında deney grubunun plasebo grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha üstün olduğunu görmüşlerdir (p=0.003 / 4 aylık süreçte). Deney grubunun %52'si tedaviye cevap verirken plasebo grubunun %28'i tedaviye cevap vermiştir. GAIT çalışması orta ila şiddetli OA grubunda gelişme görürken, Das ve Hammad şiddetli hastalık grubunda anlamlı bir fark bulamamıştır.

Haupt ve ark. [121] GAH ve plaseboyu 8 hafta boyunca 98 OA hastasında karşılaştırmış, yapılan günlük anketlerde tedavinin ağrıya etkili olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir (p=0.018). Deney sonunda ise hastaların %77'si glukozamini kendileri satın alarak kullanmayı sürdürmüşlerdir. Braham et al. [40] ise 12 haftalık çalışmasında olağan diz ağrısı olan OA hastalarında veya eklem kıkırdağı zedelene hastalarda günlük 2000 mg glukozamin ve plaseboyu karşılaştırmıştır. Deneyde diz ağrısındaki değişimler elle muayene, 3 metrelik ördek yürüyüşü, tekrarlayan merdiven çıkma, anket ve ağrı ölçeği ile değerlendirilmiştir. 8 haftada yaşam kalitesi skorlarında ve ağrı skorlarında anlamlı bir gelişme görülmüştür (p<0.05). Deney sonunda deney grubunun %88', placebo grubunun ise %17'si diz ağrısında iyileşme olduğunu rapor etmişlerdir.

Ancak glukozaminle ilgili olumsuz sonuç veren çalışmalar da vardır. Hughes ve Carr [122] diz OA'sı olan 80 hastaya 6 ay boyunca günlük 1500 mg glukozamin sülfat verdikleri çalışmada anlamlı olarak ağrının azalmadığını bildirmişler, VAS skorunda ise negatif sonuçlara ulaşmışlardır. Rindone et al. [123] ise 98 hastaya günlük 1500 mg glukozamin sülfat verdiği placebo kontrollü çalışmasında 2 ayda anlamlı olarak ağrıda azalma bulamamıştır.

1.1.5.3 PRP Uygulamaları, İlaç Tedavileri, Hücresel Terapiler ve Biyomateryaller

Plateletten Zengin Plazma (PRP) kişinin kendi kanından (otolog) elde edilen platelet (trombosit) yönünden zenginleştirilmiş plazmadır ve OA tedavisi için bir seçenektir [124]. PRP lökosit ve fibrin içermesi bakımından dört kategoriye ayrılır: saf plateletten zengin plazma (P-PRP), lökosit ve plateletten zengin plazma (L-PRP), saf plateletten zengin fibrin (P-PRF) ve lökosit ve plateletten zengin fibrin (L-PRF) [125].

PRP, dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), platelet-kökenli büyüme faktörü (PDGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF-2), bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) gibi büyüme faktörleri bakımından zengin olmasıyla, kondrosit farklılaşmasını, sinoviyal hücrelerin çoğalmasını ve sinoviyal hücrelerden HA sentezini uyarıcı etkisi vardır [126].

Eklem içi PRP enjeksiyonları OA tedavisi için güvenilir ve plasebodan daha etkili bir yöntemdir. Tek bir PRP enjeksiyonu WOMAC parametrelerinde (ağrı, şişlik, fiziksel fonksiyon ve toplam skor) iyileşme sağlar [127], [128]. PRP enjeksiyonları OA'lı dizlerde ağrıyı azaltmak bakımından (VAS skoru) kortikostreoidlere göre daha etkilidir ancak sportif etkinlikleri iyileştirmez [129]. Ayrıca PRP enjeksiyonları sinoviyal sıvı (SF) hacmini, enflamatuar proteinleri ve kıkırdak yıkımıyla ilgili işaretleri azaltmada da etkilidir [130], [131].

Smolina ve Khimion,2016 [132] ve Gobbi ve ark.,2015 [133] yaptıkları bir çalışmada OA'nın erken evresindeki hastalarda PRP enjeksiyonunun güvenliği ve etkisini incelemiş ve herhangi bir yan etkiye rastlamamışlardır. Standart tedaviye ilaveten gerçekleştirilen 3 eklem içi PRP enjeksiyonunun fonksiyonel aktiviteyi artırdığını ve ağrıyı azalttığını gözlemlemişlerdir.

Kondrositlerin katabolik aktivitelerini baskıladığı için anti-enflamatuar ilaçların kullanımına da OA tedavisinde sıkça rastlanmaktadır. Kortikosteroidlerin hem anti-enflamatuar hem de bağışıklık baskılayıcı özellikleri vardır [134]. FDA damgalı kortikosteroidler: metilprednizon asetat, triamsinolon asetat, betameton asetat, betameton sodium fosfat, triamsinolon heksasetonid ve deksametazondur [132].

Mc.Alindon ve ark.2017 [135] , 2 yıllık rastgellenmiş placebo kontrollü çift bilmez çalışmada OA hastalarında eklem içi triamsinolon ve tuz enjeksiyonlarını karşılaştırmışlardır. Her 3 ayda bir 40 mg triamsinolon asetinoid uygulamış ve kıkırdak hacim kaybı ve ağrı sürecini takip etmişlerdir. Triamsinolon grubunda kıkırdak hacim kaybının -0.21 mm'den -0.10 mm'ye anlamlı olarak yükseldiğini bildirmişler, ancak ağrıda anlamlı bir fark gözlemlememişlerdir. Bannuru et al.2014, eklem içi HA ve steroid olmayan anti-enflamatuar ilaç (NSAID) enjeksiyonlarını OA hastalarında karşılaştırmışlar ve her iki grupta da ağrıda azalma gözlemlemişlerdir. Ancak HA ve NSAID grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Anti-enflamatuar ilaçlar OA tedavisinde aktif olarak kullanılsa da, yan etkileri çok ağır olabilir. Mide bulantısı ve epigastrik ağrının yanı sıra, peptik ülserasyon, kanamalar ve mide delinmesine kadar ağırlaşabildiği için hasta hayatını kaybetme

riski taşır [136]. COX-2 seçici veya seçici olmayan NSAIDs'lerin ise hastalarda mortalite riskini artırdığı yönünde bulgular mevcuttur [8].

Kök hücreler de kırıkda rejenerasyonu için odaklanılan yöntemlerden biridir (Tablo 5). Kök hücre implantasyonu hala araştırılmaktadır. En sık kullanılan hücre tipleri Kİ-MKH'ler ve adipoz kökenli stromal hücrelerdir (AKSH). Her iki hücre tip, de OA sürecini baskılayarak kırıkda yenilenmesini artırır [137], [138].

Tablo 5. Kök hücre enjeksiyonu sonrası OA hastalarının WOMAC skorlarındaki gelişmeler

| Kök Hücre Tipi | Hastanın OA Tipi | Hastaların Yaş Aralığı | Hasta Sayısı | Çalışma Süresi | WOMAC Skorundaki Gelişme Puanı | Referans |
|----------------|-----------------------------------|------------------------|--------------|----------------|--------------------------------|----------|
| AKSH (SVF) | Diz OA'sı | 50- | 10 | 24 ay | 23 puan | [139] |
| Kİ-MKH | Diz OA'sı | 50-80 | 30 | 12 ay | 16.5 puan | [140] |
| Kİ-MKH | Diz, ayak bileği veya kalça OA'sı | 18-65 | 150 | 30 ay | 29.3 puan | [141] |
| AK-MKH | 2.evre diz OA'sı | 18-75 | 18 | 6 ay | 21.4 puan | [142] |
| AKSH (SVF) | 4.evre diz OA'sı | 65-82 | 13 | 6 ay | 15.8 puan | [143] |

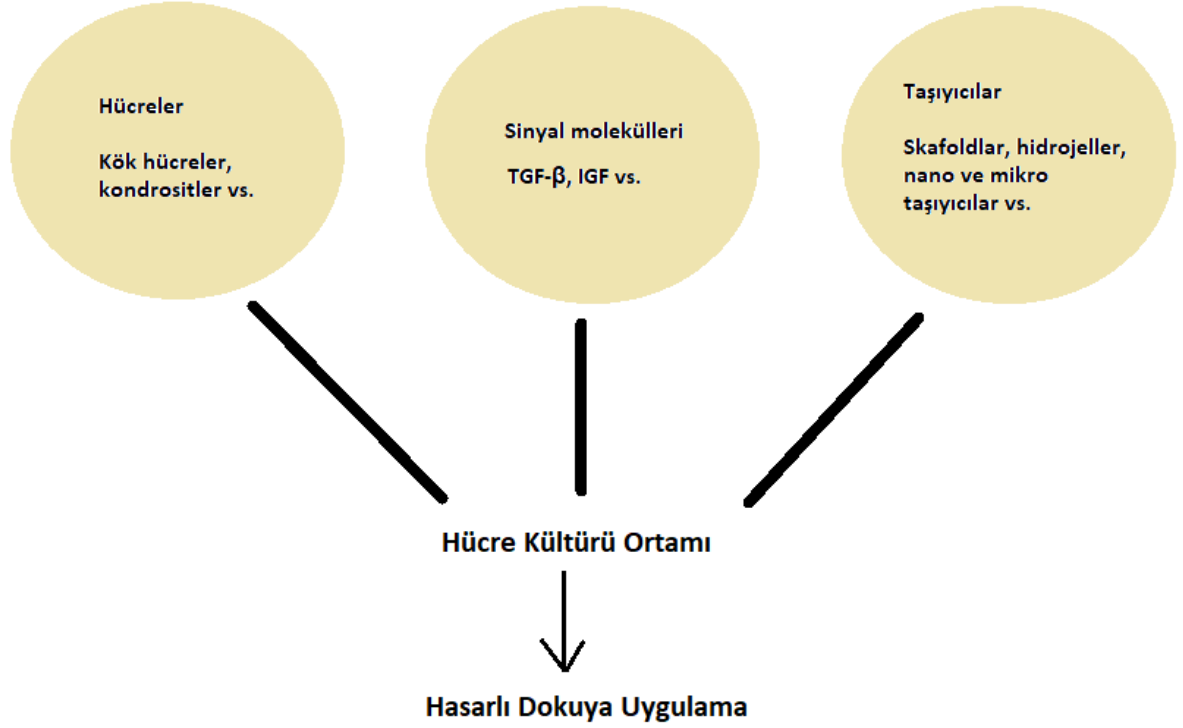
AKSH : Adipoz kaynaklı stromal hücre, Kİ-MKH:kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre, AK-MKH: Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre, SVF:Stromal vasküler fraksiyon, WOMAC: Western Ontario ve McMaster Üniversiteleri Osteoartrit İndeksi)

Al-Najar ve ark.2017 [144], yaptıkları bir çalışmada orta ila şiddetli OA'lı hastalarda eklem içi otolog Kİ-MKH uygulaması yapmışlar ve çalışma Diz Yaralanması ve Osteoartrit Sonuç Skoru (Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score-KOOS)'nda ve ortalama kıkırdak kalınlığında anlamlı bir gelişme ile sonuçlanmışlardır.

MKH'lerin ve PRP'nin OA tedavisinde beraber uygulanması da umut vericidir. Bansal ve ark.2017 [139], OA tedavisi için eklem içi adipöz kaynaklı stromal hücre (ADSC-SVF) ve PRP uygulaması yapmışlar ve 3 ayın sonunda hastaların ağrılarında anlamlı bir azalma gözlemlemişlerdir. Daha da önemlisi, bu uygulamanın herhangi bir yan etki göstermemesiyle güvenli bir profil çizdiğini de belirtmişlerdir. Ayrıca Bastos ve ark.,2018 [145], benzer bir çalışma yapmışlar, 18 adet diz OA hastalarında eklem içi otolog MKH enjeksiyonlarıyla, MKH+PRP'nin beraber enjeksiyonlarını etkinlik ve güvenlik açısından karşılaştırmışlardır. 12 ayda Diz Yaralanmaları ve Osteoartrit Sonuç Skorunda (The Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score, KOOS) anlamlı bir gelişme gözlemlemişler ($p<0.05$) ancak MKH ve MKH+PRP grupları arasında istatistiksel bir fark yakalayamamışlardır. Her iki grupta da ağrı, fonksiyon ve günlük yaşam aktivitelerinde anlamlı bir iyileşme görülmüştür ($p<0.05$). Ayrıca çalışma grubu MKH enjeksiyonlarına PRP eklemenin de ayrıca bir faydası olmadığını belirtmiştir.

Ancak, kök hücre enjeksiyonlarıyla ilgili literatürde negatif sonuçlu çalışmalar da vardır. Koh ve ark. [146] Direkt olarak ADSC'leri eklem içine enjekte ettiğinde 37 hastanın %76'sında, özellikle büyük kıkırdak lezyonu olan hastalarda, anormal bir kıkırdak yenilenmesi görmüşlerdir. Aynı grup (Kim ve ark.2015 [147]) başka bir çalışmada fibrin yapıştırıcısını ADSC enjeksiyonunda skafold olarak kullanmışlar ve skafold kullanılan grubun Uluslararası Kıkırdak Yenilenmesi Derneği (International Cartilage Repair Society, ICRS) puanı skafold kullanılmayan gruba göre anlamlı olarak artmıştır. Ayrıca direkt enjekte edilen hücrelerin eklemde muhafaza edilmesi de güçlük yaratmaktadır. Yapılan bir çalışmada direkt eklem içine enjekte edilen ADSC'lerin bir ay sonra %15'ine, 6 ay sonra ise yalnızca %1,5'ine eklemde rastlanılmıştır [148].

Ancak, Kİ-MKH'lerin klinik uygulamaları ağırlı ve invazif cerrahi müdahale gerektiğinden ve çok az hücre verimi olduğundan ve donörün fizyolojik koşullarının uygun olması gerektiğinden kısıtlıdır [149], [150].



Şekil 1.10. Biyomateryallerin kullanım şekillerinin şematik gösterimi.

Ayrıca son yıllarda teknolojinin gelişmesiyle OA tedavisinde biyomateryallerin kullanılması yaygınlaşmıştır (Şekil 1.10). Özellikle ilaç salım sistemleri, nano ve mikro boyutlu taşıyıcılar, hidrojeller, scaffoldlar en sık kullanılan teknolojilerdir. Kıkırdak ESM'sini taklit etmek OA tedavisinde umut verici sonuçlar verdiği için KS, GAG ve HA gibi kıkırdak ESM maddeleri de sıkça OA çalışmalarının merkezindedir. Klinik kısıtlamalardan dolayı deneysel biyomateryal yöntemleri çoğunlukla in vivo (hayvan deneyleri) ve in vitro (hücre deneyleri) yöntemlerle sınırlı kalmaktadır.

Aydın ve ark.,2015 [151], doksisisiklin-KS/PCL (poly-ε-caprolactone) mikro kürelerle eklem için enjeksiyonu için in vitro ve in vivo çalışmışlar ve in vivo sonuçlarda pozitif geri dönüşler alarak OA tedavisi için yeni bir bakış açısı getirmişlerdir. Maudens ve ark.2018 [152], HA'yı ısıyla aktive olan bir polimerle birleştirmişler ve HA'nın vücut sıcaklığı etkisiyle kendiliğinden nanopartiküllere dönüşmesini sağlamışlardır. Partikülleri in vivo'da test ettiklerinde biyoyumlu olduğunu,

enjeksiyon bölgesinde uzun süre durduğunu, pro-enflamatuar sitokinleri azalttığını ve kıkırdağı koruduğunu görmüşlerdir. Şükür ve ark.,2016 [153], çalışmamıza benzer olarak in vivo'da hyalüronat, kondroitin sülfat ve N-asetil-d-glukozamin (HA-KS-NAG)'i hidrojel olarak kullanmışlardır. Sıçanlara eklem içi papain enzimi enjekte ederek OA modeli oluşturmuşlar ve üç gruba ayırmışlardır. Birinci gruba yalnızca tuzlu su, ikinci gruba HA, üçüncü gruba ise HA-KS-NAG enjeksiyonu yapmışlardır. 2 hafta sonra, proteoglikan bakımından anlamlı artışı üçüncü grup göstermiştir. Tek başına HA yerine HA-KS-NAG enjeksiyonu sıçanlarda daha etkili bir sonuç vermiştir.

Eklem içinedeki küçük ilaç moleküllerinin (NSAIDs gibi) ve büyük polimerik moleküllerin (HA ve rekombinant proteinler gibi) yarı ömrünün birkaç saat ile sınırlı olduğu tahmin edilmektedir [60]. Son on yıl içerisinde OA tedavisi için nanoteknolojik çalışmalara fazlasıyla yönelme olmuştur ve bu çalışmaların büyük çoğunluğu ilaç teslim sistemlerine yöneliktir [154]–[156]. Bu sistemler eklem içerisine ilacı yavaşça ve gerektiği kadar salarak sistemik yan etkilerden kişiyi korumaktadır. Nanopartikül sistemleri ayrıca yüksek suda çözünürlük sağladığı için fizyokimyasal dengeyi ve biyoyumluluğu artırmaktadır. Ancak eklem içi teslim sistemlerinde partikül boyutu önemli bir kriterdir. 250 nm'den küçük partiküller kolayca eklem bölgesini terk edebilirken partikül boyutu büyüdükçe (1 ila 4 µm arasında) eklem bölgesindeki makrofajlar tarafından fagosite edilmektedir [157]. Teknolojinin gelişmesiyle nanopartiküller OA tedavisinde, tanısında, görüntülenmesinde ve ilaç ulaştırılmasında kullanılmak üzere diazın edilmektedir [158]. Yin ve ark.,2017 [159], OA tedavisi için KS kaplı nano platinyumlarla (PtNPs) çalışmışlardır. PtNP'lerin in vitro çalışmalarda biyoyumlu olduğu ve gelecekte OA tedavileri için farklı bir alternatif olduğu sonucuna varmışlardır. Bir çalışmada ise, selekoksibin ülserasyon gibi gastrik yan etkilerinden ve kalp-damar hastalıkları olgularından kaçınmak için hyaluronat hidrojele selekoksib dolu lipozomları gömüp cerrahi OA tavşan modelinde eklem içi enjeksiyonu olarak kullanmışlardır [160]. Çalışmanın sonucunda fosfolipidlerin ve HA'nın eklem kıkırdağı yüzeyinde kayganlaştırıcı olarak etkili sonuç verdiği ve sinoviyal sıvıda sürtünme yüzeyini azalttığını görmüşlerdir. Yeh ve ark.,2015 [161] ise kurkuminin serbest olarak verilmesinden lipozomlara yükleyerek vermenin sitotoksitesiyi azalttığını ve hücrenin alımını artırdığını göstermişlerdir. Ayrıca, kurkumin yüklü

lipozomların OA sürecini yavaşlatacağını da eklemişlerdir. Jain ve ark.,2014 [162] diaserein yüklü katı lipid nanopartikülleri (SLN) KS ile modifiye etmişlerdir. OA tedavisi için anti-OA etkisi olan diasereini hedeflemeyi amaçlamışlardır ve KS'nin formülasyonda bulunması osteoartritik lezyonları azaltmaya katkı sağlamıştır. Bu diaserein yüklü ve KS modifiyeli SLN'ler OA gibi karmaşık bir hastalıkla savaşta sinerjik etkiler göstermiştir.

Sonuç olarak, OA tedavisinde kullanılan yöntemler umut verici olsa da, hastalığı tedavi etmek yerine seyrini durduraktan öteye gidememiştir. PRP enjeksiyonları ve ilaç tedavileri kıkırdaktaki enflamatuvar molekülleri azaltıp şişlik ve ağrıyı azaltsa da kondrositlerin ESM sentezini uyarmamaktadır. Ayrıca kök hücre tedavileri de salgıladıkları anti-enflamatuvar moleküller ile ağrıyı azaltarak OA hastalarına daha iyi bir yaşam kalitesi sunmaktadır. Ancak eklem içine direkt enjekte edilen MKH'lerin anormal kıkırdak büyümesi yaratması, ağrılı cerrahi müdahalelerin hastayı zor durumda bırakması ve enjekte edilen kök hücrelerin kıkırdak bölgesinde kalmaması da kök hücre tedavilerinin olumsuz noktalarıdır. Belki de biyouyumlu skafoldların kök hücre enjeksiyonlarında kullanılması hücrelerin kıkırdak bölgesinde daha iyi hayatta kalmasına sebep olabilir.

Ağızdan alınan GA ve KS'nin direkt eklem içine enjekte edilmesinden daha az etkili olduğu, kıkırdağın kan damarlarından yoksun olmasına bağlı olarak söylenebilir. HA enjeksiyonları ağrıyı azaltmada ve kondrositlerin ESM sentezini uyarmakta etkili olsa da anti-enflamatuvar etkisi yoktur. Ayrıca HA enjeksiyonlarının hastalarda sürekli (en az yılda iki kez) tekrarlanması gerektiğinden, eklem içerisinde hızlı bir şekilde yıkıldığından ve litaretürdeki HA ile ilgili belirsiz sonuçlar da göz önüne alındığında HA'yı nanopartikül formuna getirerek GA ile birlikte eklem içine enjekte etmek hem yıkım hızını azaltabilir hem de eklem bölgesinde kalma süresini uzatarak OA hastaları için daha etkili bir seçenek oluşturabilir.

Çalışma boyunca aşağıdaki araştırma soruları cevaplanacaktır:

- (1) Hyaluronik asit (HA) nanopartikül (nHA) şekline geliştirilerek eklem içinde kontrollü ilaç salım sistemi olarak kullanılabilir mi?
- (2) GA, nHA kullanılarak eklem içine taşınabilir mi?
- (3) GA'lar nHA'lardan kontrollü bir şekilde salınır mı?

(4) GA-nHA hücre yapışması ve çoğalmasını arttırabilir mi?

(5) GA-nHA'lar KI-MKH'lerin kıkırdak hücrelerine farklılaşmasına pozitif yönde etki eder mi?

(6) GA-nHA'lar sağlıklı ve OA'lı insan kıkırdak hücrelerinin ESM sentezini artırıp OA işaretlerini azaltır mı?

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1 Malzeme ve Cihaz

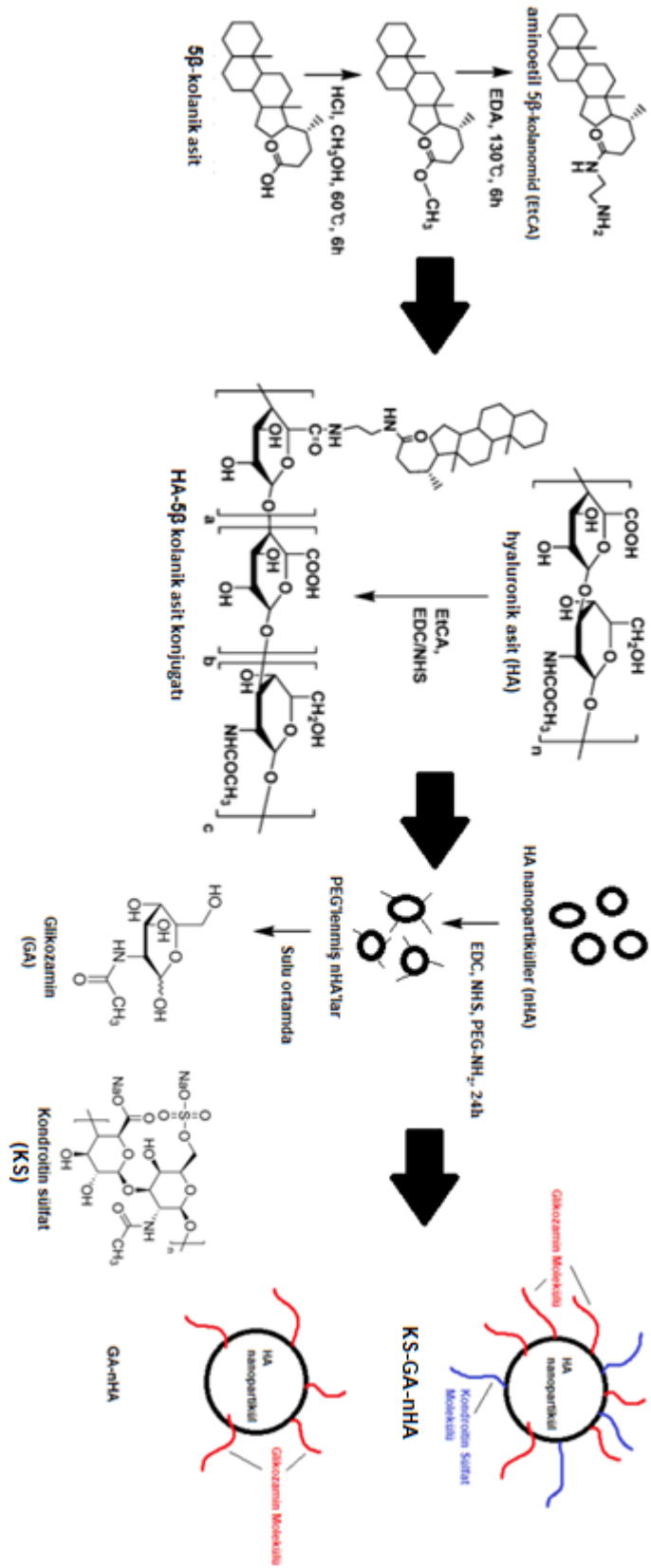
Malzeme sentezi için gerekli olan n-asetil d-glukozamin (GA, #A3286), kondroitin sülfat (KS, #Y0000280), *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-ethilkarbodiimid hidroklorid (EDC, #03450), N-hidroksisüksinimid (NHS, 56480), metoksipolietilen glikol amin (PEG, #06676), 5β-kolanik asit (#C7628), selüloz diyaliz membran tüpü (#D9777) Sigma-Aldrich (Almanya)'den alınmıştır. Hyalüronik asit olarak eklem içi enjeksiyonu olarak kullanılan Adant (GenVisc 850, TEDEC-MEIJ, İspanya) markalı sodyum hyaluronat kullanılmıştır. Sağlıklı ve OA'lı insan kondrositleri ve bu hücrelerin kültürü için gerekli tüm malzemeler (#402K-05a ve #402OAK-05a katalog numaralı kitler şeklinde) Cell Applications, Inc. (ABD)'den, kıkırdak kanser (SW-1353, kondrosarkom) hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC, ABD)'den satın alınmıştır. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (#A15652, StemPro) ve kondrojenik farklılaşma için gerekli tüm malzemeler (#A10071-01) ise Thermo Fisher Scientific (ABD)'den alınmıştır. Hücre kültürü için gerekli olan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, High Glucose ve Low Glucose), fetal sığır serumu (FBS), L-glutamin, tripsin-edta, Penisilin-Streptomisin Lonza (İsviçre)'dan, WST-1 reaktantı ise Roche (Almanya)'den alınmıştır. Akım sitometri analizinde kullanılan tüm antikorlar BD Biosciences (ABD)'den alınmıştır.

Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM, Carl Zeiss Evo 50, Almanya) Hacettepe Üniversitesi Jeoloji Mühendisliği'nde, Dinamik Işık Saçılımı (DLS, Malvern, İngiltere) Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC, HP Agilent 1200 Series, Germany) Nobel İlaç San. Ve Tic. A.Ş. (Düzce, Türkiye)'de, mikro santrifüj (Eppendorf, 5417R) Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, sabit ısı ve atmosferli inkübatör (Panasonic, MCO-170M-PE, Japonya), hücre kültürü kabini (Metis, Ankara, Türkiye), ELISA okuyucu (VersaMax Microplate Reader Pro 5, ABD), mikroskop (LEICA DFC7000T, Almanya, Program: LAS X9) ise Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda kullanılmıştır.

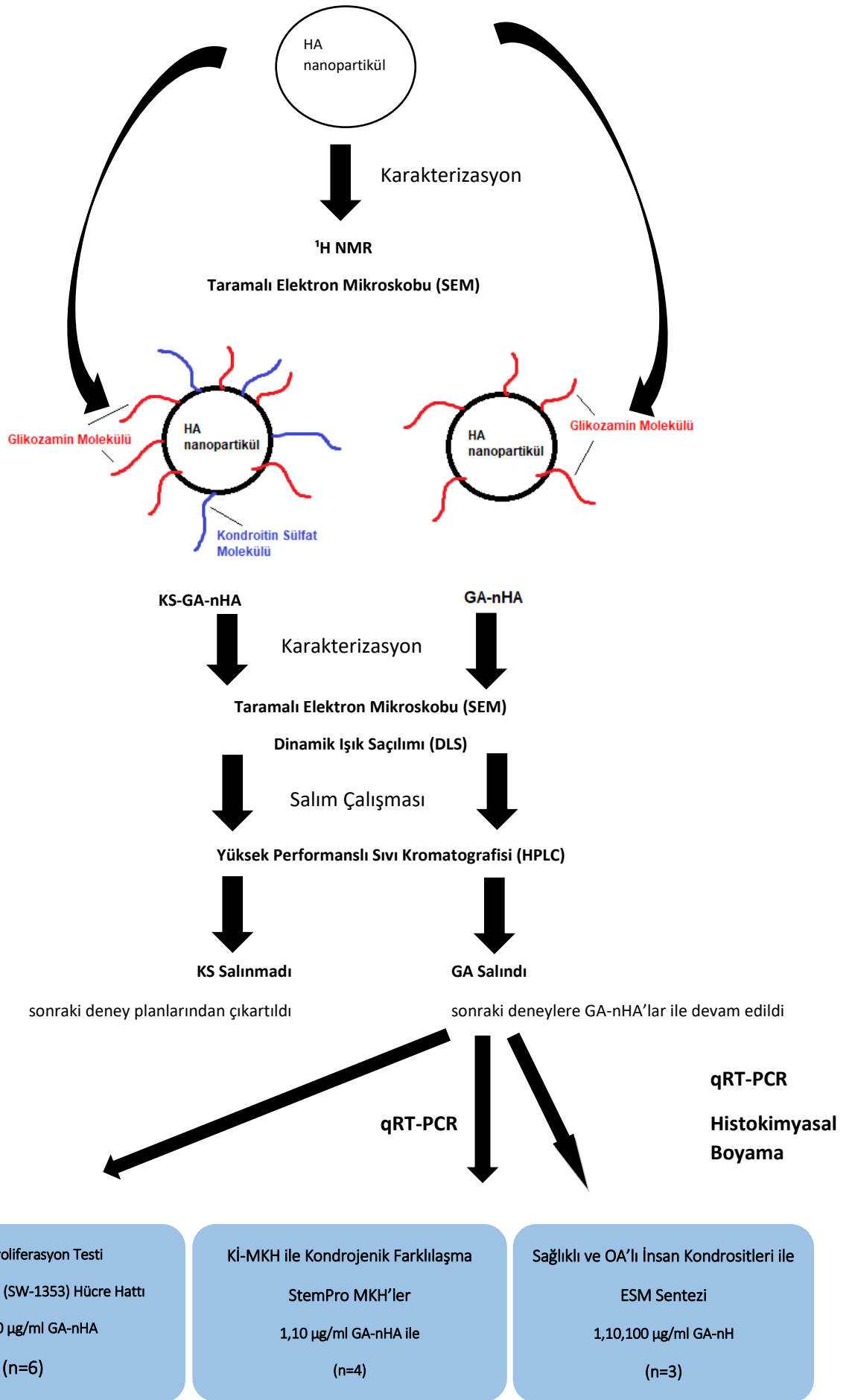
Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

2.2 Çalışmanın Tasarımı

İki fazlı malzemenin geliştirilmesi, karakterizasyonu ve in vitro analiz çalışmaları dizayn edilmiştir. Enjekte edilebilir N-asetil d-glukozamin (GA) ve kondroitin sülfat (KS) bağlı hyalüronik asit (HA) nanopartiküller (KS-GA-nHA) ve GA bağlı HA nanopartiküller (GA-nHA) Choi ve ark.,2010 [163] çalışmasındaki yöntemle üretilmiştir (Şekil 2.1). Malzeme üretildikten sonra, ortalama boyut, partikül dağılımı ve morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ile ölçülmüştür. GA ve KS'nin nanopartiküllerden salımı HPLC yöntemi ile analiz edilmiş, GA'nın partiküllerden salınması gerçekleşirken KS'nin salınmadığı görüldüğü için sonraki deneylere yalnızca GA bağlı nHA'lar ile devam edilmiştir. GA-nHA'nın in vitro hücre hücre kültüründeki etkileri WST-1 Hücre Proliferasyon Testi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile ölçülmüştür (Şekil 2.2).



Şekil 2.1 nHA, GA-nHA ve KS-GA-nHA'ların sentez aşamalarının şematik gösterimi.

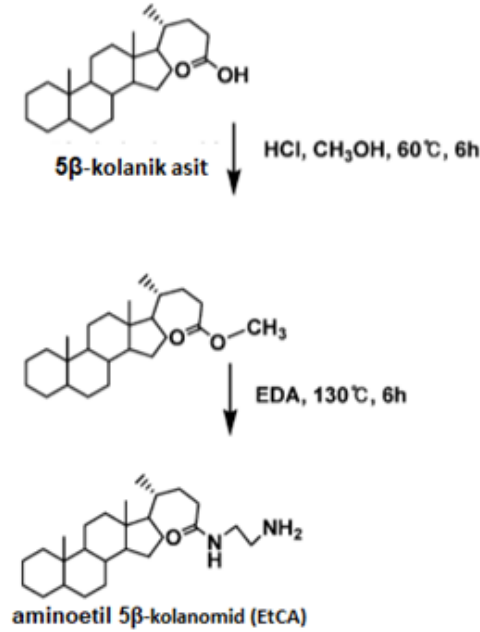


Şekil 2.2 Çalışmanın tasarımı.

2.3 N-asetil d-glukozamin (GA) ve Kondroitin Süllfat (KS) Bağlı Hyaluronik Asit (HA) Nanopartiküllerin Sentezi

2.3.1 Amino Etil 5β-Kolanoamid (EtCA) Sentezi

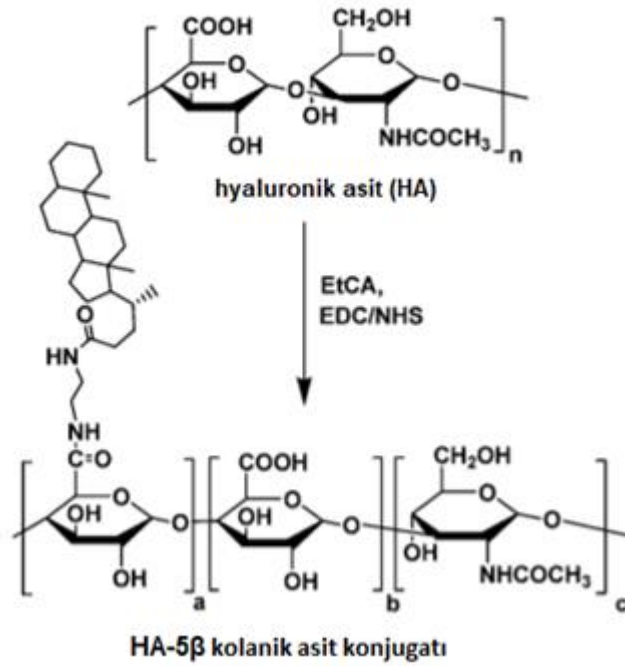
Suda çözünebilir özellikte olan HA'yı hidrofobik olarak modifiye etmek için 5β-kolanik asit kullanılmıştır. İlk olarak, 5β-kolanik asit, HA'nın karboksilik asitleriyle reaksiyona girebilmesi için amino etil 5β-kolanoamid (EtCA) formuna dönüştürülmüştür. Bunun için, 0,6 g 5β-kolanik asit, 540 µl konsantre hidroklorik asit (HCl) içeren 15 ml metanol (MeOH) içerisinde çözülmüştür. Solüsyon 6 saat boyunca 60°C'de reflux altında karıştırılmıştır. Daha sonra 0°C'ye soğutulmuş ve kristalleşip çöktürülmesi gerçekleştirildikten sonra por büyüklüğü 0,45 µm olan membran filtreden geçirilmiş ve soğuk MeOH ile yıkanmıştır. Ürün vakum altında oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra etilendiaminde çözülmüş ve 130°C'de 6 saat daha reflux edildikten sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılmış, tekrar membrane filtreden geçirilmiş (por büyüklüğü 0,45 µm) ve vakumda kurutulmuştur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. EtCA sentezinin şematik gösterimi [163].

2.3.2 HA Nanopartiküllerin (nHA) Sentezi

48,4 mg EDC ve 29,2 mg NHS 96 ml formamid içerisinde çözüldükten sonra 100 mg sodyum hyaluronat (Adant) karışan çözeltiye eklenmiştir. 40 mg EtCA 96 ml DMF içerisinde çözüldükten sonra karışan çözeltiye damla damla eklenmiştir. Solüsyon bir gün boyunca oda sıcaklığında karışmaya bırakıldıktan sonra, bir gün distile su/MeOH (1v/3v-1v/1v) ile iki gün ise sadece distile su ile diyaliz edilmiş ve dondurma-kurutma yöntemi ile kurutulmuştur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. nHA sentezinin şematik gösterimi [163].

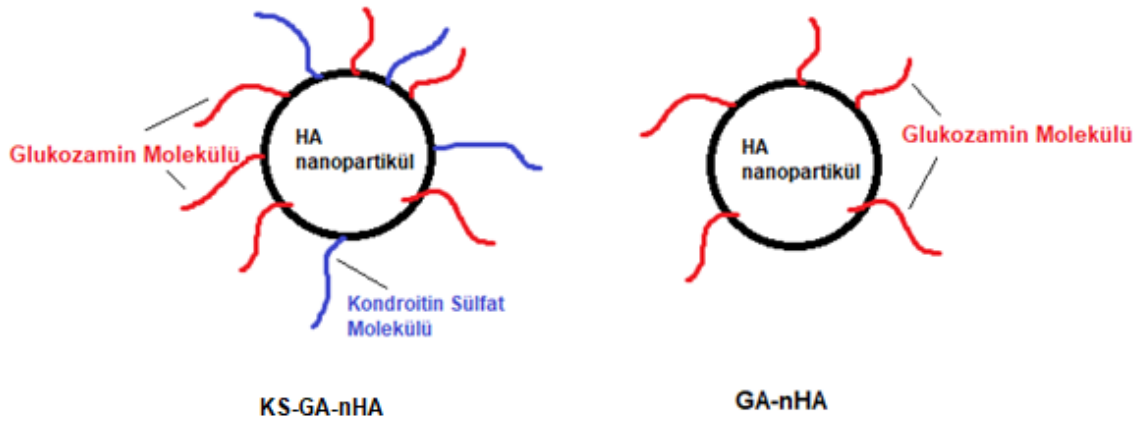
2.3.3 nHA'ları Polietilen Glikol (PEG)'leme İşlemi

12 mg EDC ve 7 mg NHS, 5 ml fosfat tampon (PB, pH=6,8) çözeltisinde çözüldükten sonra 120 mg nHA çözeltiye eklenmiş ve 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. 60 mg PEG-NH₂ 2 ml PB'de çözüldükten sonra karışan çözeltiye eklenmiştir. Elde edilen solüsyon 24 saat boyunca oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Daha sonra solüsyon bir gün boyunca MeOH ile, iki gün boyunca da distile su/MeOH (1v/3v-1v/1v) ile diyaliz edildikten sonra dondurma-kurutma işlemi ile kurutulmuştur. 120 mg nHA 5 ml PB solüsyonu içerisinde çözüldükten sonra

416 µl/10 mg partikül analiz için ¹H-Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisine (¹H-NMR) götürülmüştür.

2.3.4 nHA'lara GA ve KS'nin Bağlanması

PEG ile yüzey modifikasyonu yapılan 10 mg nHA 10 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisinde (PBS, pH=7,4) çözülmüş ve 10 mg GA ve 10 mg KS çözeltiye eklendikten sonra 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. GA-nHA sentezi için ise PEG ile yüzey modifikasyonu yapılan 10 mg nHA 10 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisinde (PBS, pH=7,4) çözülmüş ve 10 mg GA çözeltiye eklenmiş ve 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. KS-GA-nHA ve GA-nHA'nın şematik gösterimi.

2.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntülemesi

1 mg KS-GA-nHA, 1 mg GA-nHA ve 1 mg nHA ayrı iki ependorf tüpte 2 ml distile suda çözüldükten sonra partiküllerin homojen dağılması için 2 dakika boyunca sondaj tipli sonikatörde soniklenmiştir. Sonikleme işlemi boyunca partiküllerin moleküler yapısının ısıyla bozulmaması için buz banyosunda tutulmuştur. 1-2 damla solüsyon bir lama damlatılmış ve oda sıcaklığında kurutulduktan sonra altın kaplama yapılmış ve SEM'de 22K-26K X büyütmede görüntülenmiştir.

2.5 Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Analizi

DLS analizi helium iyon lazer sistemi ile gerçekleştirilmiştir. 1 mg KS-GA-nHA ve 1 mg GA-nHA 2 ml distile suda çözüldükten sonra partiküllerin homojen dağılmasını sağlamak ve agregasyonunu engellemek için 2 dakika boyunca buz banyosu içerisinde sodyum dodesil sülfat (SDS) ile sondaj tipli sonikatörde soniklenmiştir. Sonikleme işleminden sonra 1 ml KS-GA-nHA ve GA-nHA solüsyonu analiz için kullanılmıştır.

2.6 Salım Çalışması

2 mg KS-GA-nHA ve GA-nHA 0,5 ml PB (Disodyum hidrojen fosfat + sodyum dihidrojen fosfat, pH=7,2) içerisinde dağıtıldıktan sonra salım ortamından ayrılması için 13,000 rpm'de mikro santrifüj cihazında 13 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra çöken partiküller taze 0,5 ml PBS içerisinde tekrar dağıtılmış ve salım için oda sıcaklığında bırakılmıştır. Partiküllerden salınan KS ve GA miktarını tayin etmek için 1, 3, 5, 7, 14 ve 21. Günlerde santrifüjleme işlemi tekrarlanmış ve süpernatantlar analiz için ayrılmıştır. Ayrılan örneklerdeki KS ve GA tayini için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. HPLC için Thermo ODS Hypersil 250x4,6 mm 5 µm kolonu kullanılmıştır. Mobil faz olarak su içerisinde 1,5 g oktan sülfonik asit : asetronitril : trietilamin (910:89:1) kullanılmış ve akış hızı 1,0 ml/dakikaya, pH ise 4,0'e ayarlı orto fosforik asit kullanılmıştır. Çözücü olarak 5 ml asetronitrile 0,3 ml asetik asit eklenmiş ve 100 ml distile suya tamamlanmıştır.

2.7 WST-1 Hücre Proliferasyon Analizi

GA-nHA'nın hücrelerin çoğalması üzerine etkisini araştırmak için SW-1353 insan kıkırdak kanseri (kondrosarkom) hücreleri kullanılmıştır. Hücreler T-75 hücre kültürü kaplarında %10 fetal sıgır serumu (FBS), %1 L-glutamin, 50 U/ml Penisilin, 50 µg/ml Streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM-HG) besiyeri ile %5'lik CO₂ ortamında 37°C'de inkübe edilmiş ve besiyeri 48-72 saatte bir değiştirilmiştir. Hücreler %70'lik yoğunluğa ulaştığında hücre kültürü kabı PBS ile yıkanmış ve sayım yapılması için 5 ml %0,25'lik tripsin-EDTA

eklenmiş, inkübatörde 3-5 dakika arasında bekletilmiştir. Kabın yüzeyinden kalkan hücrelere tripsini inhibe etmek için 5 ml FBS içeren besiyeri eklenmiş ve hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınmıştır. 5 dakika 1200 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti tüpe vurularak homojenize edilmiştir. Hücreler tekrar 10 ml besiyeri ile sulandırıldıktan sonra tripan mavisi ile hücreler hemositometrede sayılmıştır. WST-1 analizi için pasaj 3 kondrosarkom hücreleri 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 2000 hücre/200 µl besiyeri gelecek şekilde ekim yapılmış, okunacak her gün için ayrı bir 96 kuyucuklu plaka hazırlanmıştır. 24 saat sonra, yüzeye yapışan hücrelerin üstündeki besiyeri çekilmiştir. 1 µl/ml, 10 µL/ml and 100 µL/ml dozlarda GA-nHA, nHA, HA içeren serumsuz DMEM-HG besiyeri 6 tekrarlı olacak şekilde hücrelerin üzerine 300 µl eklenmiştir. Ayrıca okutma yapılacak güne kadar salınan GA içeren besiyeri de 6 tekrarlı kuyucuklara eklenmiştir (Örneğin 100 µg/ml GA-nHA'dan 5 günde 11,5 µg GA salındığı için 5.gün okutma yapılacak plakalara 11,5 µg/ml GA içeren besiyerleri eklenmiştir) . Kontrol için 6 kuyucuğa hücrelerin üzerine yalnızca DMEM-HG eklenmiş, başka bir 6 kuyucuğa ise hücre ekimi yapılmadan yalnızca DMEM-HG besiyeri eklenmiştir. Salım sistemini bozmamak için 7 gün boyunca besiyeri değiştirilmemiştir. İnkübasyonun 1., 5. ve 7. günlerinde okutma yapılmıştır.Okutma için 200 µl besiyeri her kuyucuktan çekilmiş ve 10 µl WST-1 ayırıcı eklenmiştir. Plakaları ışıktan korumak için alimünyum folyoya sarıldıktan sonra 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 1 dakika çalkalayıcıda tutulmuş ve 460 nm dalgaboyundaki absorbans değerini ölçmek için ELISA okuyucuda okutulmuştur.

Tablo 6. 1.gün okutması için 96 kuyucuklu plaka planı (KK:Kontrol Kondrosarkom, KM:Kontrol Besiyeri)

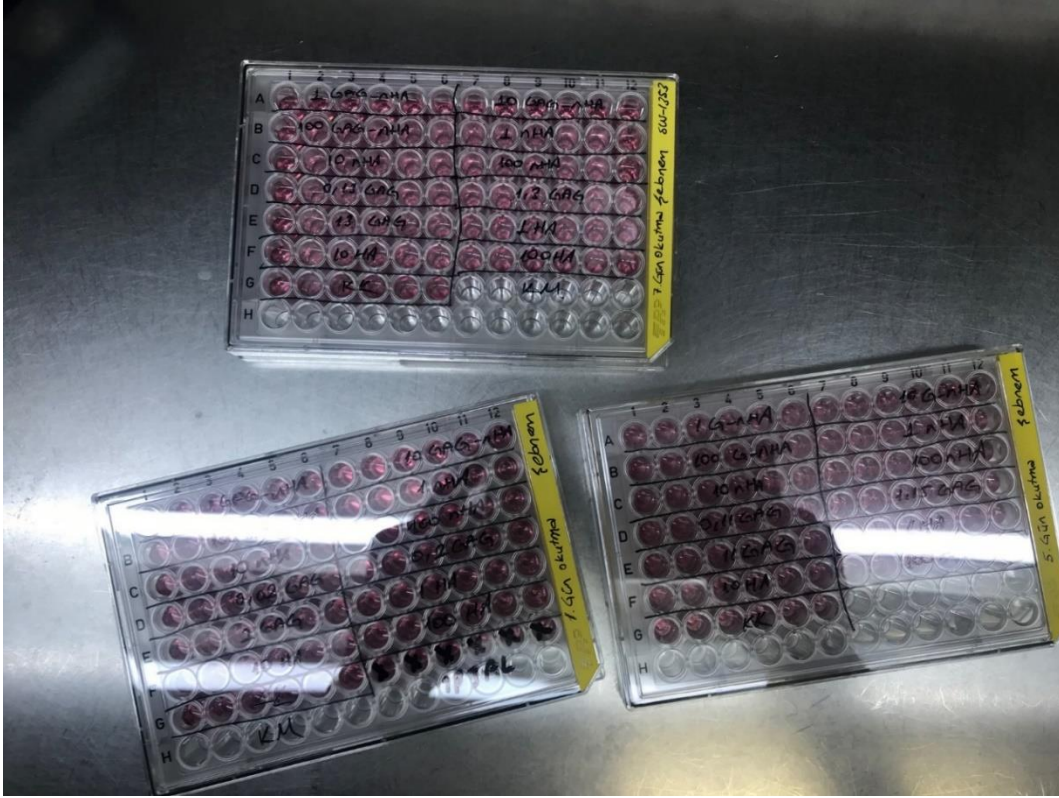
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| A | 1 µg/ml GA-nHA | 1 µg/ml GA-nHA | 1 µg/ml GA -nHA | 1 µg/ml GA -nHA | 1 µg/ml GA -nHA | 1 µg/ml GA -nHA | 10 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA |
| B | 100 µg/ml GA-nHA | 100 µg/ml GA-nHA | 100 µg/ml GA-nHA | 100 µg/ml GA-nHA | 100 µg/ml GA-nHA | 100 µg/ml GA-nHA | 1 µg/ml nHA | 1 µg/ml nHA | 1 µg/ml nHA | 1 µg/ml nHA | 1 µg/ml nHA | 1 µg/ml nHA |
| C | 10 µg/ml nHA | 10 µg/ml nHA | 10 µg/ml nHA | 10 µg/ml nHA | 10 µg/ml nHA | 10 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA |
| D | 0,02 µg/ml GA | 0,02 µg/ml GA | 0,02 µg/ml GA | 0,02 µg/ml GA | 0,02 µg/ml GA | 0,02 µg/ml GA | 0,2 µg/ml GA | 0,2 µg/ml GA | 0,2 µg/ml GA | 0,2 µg/ml GA | 0,2 µg/ml GA | 0,2 µg/ml GA |
| E | 2 µg/ml GA | 2 µg/ml GA | 2 µg/ml GA | 2 µg/ml GA | 2 µg/ml GA | 2 µg/ml GA | 1 µg/ml HA | 1 µg/ml HA | 1 µg/ml HA | 1 µg/ml HA | 1 µg/ml HA | 1 µg/ml HA |
| F | 10 µg/ml HA | 10 µg/ml HA | 10 µg/ml HA | 10 µg/ml HA | 10 µg/ml HA | 10 µg/ml HA | 100 µg/ml HA | 100 µg/ml HA | 100 µg/ml HA | 100 µg/ml HA | 100 µg/ml HA | 100 µg/ml HA |
| G | KK | KK | KK | KK | KK | KK | KM | KM | KM | KM | KM | KM |
| H | | | | | | | | | | | | |

Tablo 7. 5.gün okutması için 96 kuyucuklu plaka planı (KK:Kontrol Kondrosarkom, KM:Kontrol Besiyeri)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| A | 1 µg/ml GA-nHA | 1 µg/ml GA-nHA | 1 µg/ml GA-nHA | 1 µg/ml GA-nHA | 1 µg/ml GA-nHA | 1 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA |
| B | 100 µg/ml GA-nHA | 100 µg/ml GA-nHA | 100 µg/ml GA-nHA | 100 µg/ml GA-nHA | 100 µg/ml GA-nHA | 100 µg/ml GA-nHA | 1 µg/ml nHA | 1 µg/ml nHA | 1 µg/ml nHA | 1 µg/ml nHA | 1 µg/ml nHA | 1 µg/ml nHA |
| C | 10 µg/ml nHA | 10 µg/ml nHA | 10 µg/ml nHA | 10 µg/ml nHA | 10 µg/ml nHA | 10 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA |
| D | 0,11 µg/ml GA | 0,11 µg/ml GA | 0,11 µg/ml GA | 0,11 µg/ml GA | 0,11 µg/ml GA | 0,11 µg/ml GA | 1,15 µg/ml GA | 1,15 µg/ml GA | 1,15 µg/ml GA | 1,15 µg/ml GA | 1,15 µg/ml GA | 1,15 µg/ml GA |
| E | 11,5 µg/ml GA | 11,5 µg/ml GA | 11,5 µg/ml GA | 11,5 µg/ml GA | 11,5 µg/ml GA | 11,5 µg/ml GA | 1 µg/ml HA | 1 µg/ml HA | 1 µg/ml HA | 1 µg/ml HA | 1 µg/ml HA | 1 µg/ml HA |
| F | 10 µg/ml HA | 10 µg/ml HA | 10 µg/ml HA | 10 µg/ml HA | 10 µg/ml HA | 10 µg/ml HA | 100 µg/ml HA | 100 µg/ml HA | 100 µg/ml HA | 100 µg/ml HA | 100 µg/ml HA | 100 µg/ml HA |
| G | KK | KK | KK | KK | KK | KK | KM | KM | KM | KM | KM | KM |
| H | | | | | | | | | | | | |

Tablo 8. 7.gün okutması için 96 kuyucuklu plaka planı (KK:Kontrol Kondrosarkom, KM:Kontrol Besiyeri

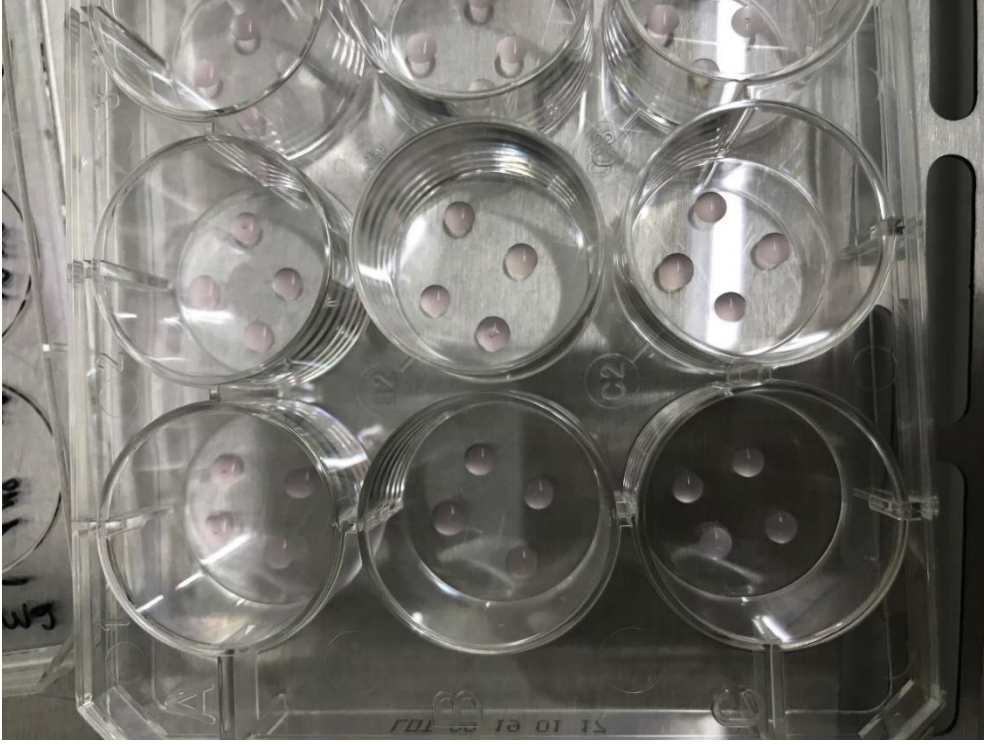
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| A | 1 µg/ml GA-nHA | 1 µg/ml GA-nHA | 1 µg/ml GA-nHA | 1 µg/ml GA-nHA | 1 µg/ml GA-nHA | 1 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA |
| B | 100 µg/ml GA-nHA | 100 µg/ml GA-nHA | 100 µg/ml GA-nHA | 100 µg/ml GA-nHA | 100 µg/ml GA-nHA | 100 µg/ml GA-nHA | 1 µg/ml nHA | 1 µg/ml nHA | 1 µg/ml nHA | 1 µg/ml nHA | 1 µg/ml nHA | 1 µg/ml nHA |
| C | 10 µg/ml nHA | 10 µg/ml nHA | 10 µg/ml nHA | 10 µg/ml nHA | 10 µg/ml nHA | 10 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA | 100 µg/ml nHA |
| D | 0,13 µg/ml GA | 0,13 µg/ml GA | 0,13 µg/ml GA | 0,13 µg/ml GA | 0,13 µg/ml GA | 0,13 µg/ml GA | 1,3 µg/ml GA | 1,3 µg/ml GA | 1,3 µg/ml GA | 1,3 µg/ml GA | 1,3 µg/ml GA | 1,3 µg/ml GA |
| E | 13 µg/ml GA | 13 µg/ml GA | 13 µg/ml GA | 13 µg/ml GA | 13 µg/ml GA | 13 µg/ml GA | 1 µg/ml HA | 1 µg/ml HA | 1 µg/ml HA | 1 µg/ml HA | 1 µg/ml HA | 1 µg/ml HA |
| F | 10 µg/ml HA | 10 µg/ml HA | 10 µg/ml HA | 10 µg/ml HA | 10 µg/ml HA | 10 µg/ml HA | 100 µg/ml HA | 100 µg/ml HA | 100 µg/ml HA | 100 µg/ml HA | 100 µg/ml HA | 100 µg/ml HA |
| G | KK | KK | KK | KK | KK | KK | KM | KM | KM | KM | KM | KM |
| H | | | | | | | | | | | | |



Şekil 2.6 WST-1 Proliferasyon Testi için hazırlanan 96-kuyucuklu plakalar.

2.8 Mezenkimal Kök Hücrelerin Kondrojenik Farklılaşma Deneyi

GA-nHA'nın insan mezenkimal kök hücrelerinin kondrositlere farklılaşması üzerindeki etkisini ölçmek için StemPro insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (Kİ-MKH) kullanılmıştır. %10 Fetal Sığır Serum (FBS) ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium- Low Glucose'a (DMEM-LG) %1 oranında L-Glutamin ve %1 oranında Penisilin-Streptomisin eklenerek %5 CO₂ atmosferine sahip inkübatörde 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücrelerin besiyerleri 48-72 saatte bir değiştirilmiştir. Hücreler %70 oranında yoğunluğa ulaştıklarında PBS ile yıkandıktan sonra T-75 hücre kültürü kaplarına 5 ml %0.25 tripsin-EDTA uygulanarak adezyon gösterdikleri yüzeyden ve birbirlerinden ayrılmasını sağlanmış, 5 dakika 1200 rpm'de santrifüj edildikten sonra üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış, hücreler tüpe vurularak homojenize edildikten sonra üzerine 10 ml normal gelişme besiyeri eklenmiştir. Birkaç kez yavaşça pipetaj yapıldıktan sonra homojen bir şekilde dağılan hücrelerin tripan mavi boyası ile hemositometrede sayımı yapılmıştır. Pasaj 7 MKH'ler kondrojenik farklılaşma deneyinde kullanılmıştır. 0,5 ml normal MKH gelişim besiyerinde 8 X 10⁶ hücre olacak şekilde sulandırılmış ve hücre süspansiyonundan 5 µl'lik damlacıklar (her damlacıkta 80,000 hücre) 12 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 4 adet damlacık olacak şekilde bırakılmıştır (Şekil 2.7). Damlacıklar 2 saat %5 CO₂ atmosferine sahip inkübatörde 37°C'de kurutulduktan sonra StemPro farklılaşma besiyeri içerisinde 1 µg/ml ve 10 µg/ml dozlarda GA-nHA, nHA ve HA hazırlanmış ve kuyucuklara eklenmiştir (Tablo 9 ve 10). Ayrıca deneyin sonlanacağı günlere kadar salınan GA miktarları da ayrı iki kuyucuğa eklenmiştir. Pozitif kontrol için bir kuyucuğa sadece farklılaşma besiyeri, negatif kontrol için ise bir kuyucuğa normal Kİ-MKH gelişim besiyeri eklenmiştir. Hazırlanan 12 kuyucuklu plakalar inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 2.8). Farklılaşma 3. ve 7.günlerde sonlandırılmış, bu süre boyunca da salım sistemini rahatsız etmemek için besiyeri değiştirilmemiştir. 3. gün okutulacak plakanın her kuyucuğuna 1 ml, 7.gün okutulacak plakanın ise her kuyucuğuna 3 ml besiyeri eklenmiştir. 3. ve 7. günlerde hücreler trizol ile muamele edilerek Eppendorf tüpler içerisinde etiketlenmiş ve -80°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.7 Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma deneyi için hazırlanan damlacıklar.



Şekil 2.8 Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma deneyi için hazırlanan 12 kuyucuklu plaka.

Tablo 9. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması için hazırlanan 12 kuyucuklu plaka planları.

| 3. Gün için 12 kuyucuklu plaka planı | | | |
|--|--|---------------------|--------------|
| Her kuyucuğa 1 ml farklılaşma besiyeri koyulmuştur | | | |
| 1 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA | 1 µg/ml nHA | 10 µg/ml nHA |
| 0,085 µg/ml GA (3 günde 1 µg GA-nHA'dan salınan GA miktarı) | 0,85 µg/ml GA (3 günde 10 µg GA-nHA'dan salınan GA miktarı) | 1 µg/ml HA | 10 µg/ml HA |
| (+) Kontrol | (-) Kontrol | (+) Kontrol (Yedek) | |

Tablo 10. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması için hazırlanan 12 kuyucuklu plaka planları

| 7. Gün için 12 kuyucuklu plaka planı | | | |
|---|--|---------------------|--------------|
| Her kuyucuğa 3 ml farklılaşma besiyeri koyulmuştur | | | |
| 1 µg/ml GA-nHA | 10 µg/ml GA-nHA | 1 µg/ml nHA | 10 µg/ml nHA |
| 0,13 µg/ml GA (7 günde 1 µg GA-nHA'dan salınan GA miktarı) | 1,3 µg/ml GA (7 günde 1 µg GA-nHA'dan salınan GA miktarı) | 1 µg/ml HA | 10 µg/ml HA |
| (+) Kontrol | (-) Kontrol | (+) Kontrol (Yedek) | |

2.9 Kİ-MKH'lerin Karakterizasyon Deneyleri

Kİ-MKH'lerin karakteristik özelliklerini belirlemek için bölüm 2.8'de anlatılan kondrojenik farklılaşmanın yanı sıra, osteojenik farklılaşma deneyi ve yüzey işaretlerini belirlemek üzere akım sitometri analizi yapılmıştır. Kİ-MKH'lerin karakteristik özellikleri; (1) Hücre kültür kaplarına yapışmalı, (2) *in vitro* koşullarda osteojenik, kondrojenik ve adipojenik olarak farklılaşabilmeli, (3) Yüzey belirteçlerinden CD44, CD73 ve CD90'ı ifade darken, CD45, CD38, CD14 ve HLA-DR'yi ifade etmemelidir [164].

2.9.1 Kİ-MKH'lerin Osteojenik Farklılaşma Deneyi

7. pasaj Kİ-MKH'ler 24 kuyucuklu plakalara, kuyucuk başına 15×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiş ve %75-80 yoğunluk oranına ulaşana kadar iki günde bir besiyerleri değiştirilmiştir. İstenilen yoğunluğa ulaşan hücreler 0,5 ml PBS ile yıkanarak 6 kuyucuğuna %10 FBS, 100 nM deksametazon (Sigma-Aldrich, Almanya), 10 mM β -gliserofosfat (Sigma-Aldrich, Almanya) ve 0,2 mM L- askorbik asit (SantaCruz, ABD) içeren osteojenik farklılaştırma besiyeri ve 6 kuyucuğuna negatif kontrol için %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM-LG (Lonza, İsviçre) besiyeri eklenmiştir. Besiyerleri üç günde bir taze besiyeri ile değiştirilmiş ve 21. günün sonunda tüm kuyucuklardan besiyerleri uzaklaştırılarak 0,5 ml PBS ile yıkanmıştır. Osteojenik farklılaştırma analizi hücre içi ALP aktivasyonunun ölçümü kantitatif olarak yapılmıştır; yıkanan kuyucuklara üreticinin talimatları doğrultusunda 0,5 ml SIGMAFAST pNPP substrat (Sigma-Aldrich, Almanya) solüsyonu eklenmiştir. Solüsyon eklenen kültür kabı folyo ile kapatılarak karanlık bir ortam sağlanmış, 30 dakika 37°C ve %5 oranında CO_2 içeren inkübatörde bekletilmiştir. 30 dk sonunda kültür kabı inkübatörden alınarak her bir kuyucuktan 200 μl çekilerek 96 kuyucuklu kültür kabına karanlık ortamda koyulmuştur ve 96 kuyucuklu kültür kabı ELISA okuyucuda 405 nm dalga boyunda okutulmuştur.

2.9.2 Akım Sitometri Analizi

7. pasaj Kİ-MKH'lerin karakteristik hücre yüzey işaretlerini ifade edip etmediklerinin değerlendirilmesi için tripsinize edilerek birbirlerinden ve tutundukları hücre kültür kabından ayrılmaları sağlanmıştır. İnkübatörden alınan hücrelere %10 FBS içeren besiyeri eklenerek tripsin aktivasyonu durdurulmuştur ve 1400 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pelet homojenize edildikten sonra ve tripan mavisini boyaması ile sayımı yapılmıştır. Sayımı yapılan hücreler bir FACS tüpünde 2×10^5 hücre olacak şekilde 2 ml PBS içerisine koyulmuştur ve tüpler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip pelet homojenize edilmiştir. Homojenize olan hücreler üzerine 100 μl PBS/BSA/Na Azide (PBN) ve aşağıda belirtilen antikörlerin her birinden 5 μl olacak şekilde eklenmiştir. $+4^\circ\text{C}$ 'de, karanlık ortamda 20 dakika inkübe edildikten sonra hücreler 20 dakika sonunda 2 kere olmak üzere PBN ile yıkanmıştır. Yıkama aşamasından sonra 200 μl PBN eklenerek BD FACS Aria2 cihazı (Becton Dickinson, New Jersey, ABD) ile okutulmuştur. Antikörler ile işaretlenen hücrelerin

yüzey belirteçlerinin 15 000 event ile okuması yapılarak FACS Diva yazılımı ile değerlendirmesi yapılmıştır.

Antikor olarak CD37 (PE, Fare anti insan #550257), CD44 (FITC, Fare anti insan #347943), CD45 (FITC, Fare anti insan #555482), CD90 (FITC, Fare anti insan #555595), CD29 (APC, Fare anti insan #559883), CD38 (PE, Fare anti insan #611114), HLA-DR (APC, Fare anti insan #347403) katalog numaralı antikorlar kullanılmıştır. Antikorların hepsi BD Biosciences (ABD)'den alınmıştır.

2.10 Sağlıklı ve Osteoartritli İnsan Kondrositlerinde ESM Sentezi Deneyi

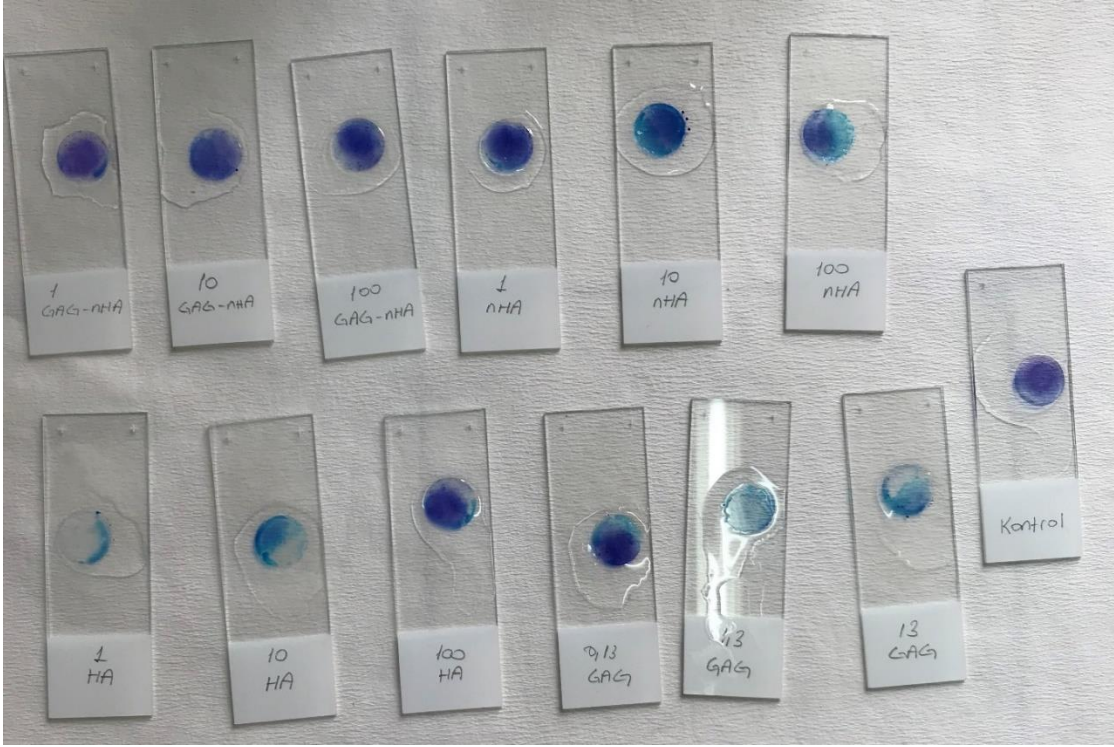
GA-nHA'nın sağlıklı ve OA'lı insan kondrositleri üzerindeki etkilerini incelemek için hücreler ticari olarak hazır bir şekilde satın alınan kondrosit büyüme besiyerinde (Cell Applications) 37°C'de %5 CO₂ atmosfer ortamında kültüre edilmiş ve besiyeri her gün değiştirilmiştir. Pasaj 4 kondrositler %70-80 oranında yoğunluğa ulaştıktan sonra Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Cell Applications) ile yıkanmış ve T-75 hücre kültürü kaplarına 10 ml tripsin-edta (Cell Applications) eklendikten sonra hemen 9 ml'si geri çekilmiştir. Oda sıcaklığında hücrelerin adezyon gösterdikleri yüzeyden kalkmaları mikroskop altında takip edilmiştir. 2-5 dakika arasında adezyon yüzeyinden kalkarak yuvarlak morfoloji gösteren hücrelere 5 ml tripsin nötralize edici solüsyon eklenmiş ve hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınmıştır. 5 dakika 1200 rpm'de santrifüj edilen hücrelerin üzerindeki süpernatant uzaklaştırılmış, tüpe vurularak homojenize edilmiş ve hücreler 10 ml kondrosit büyüme besiyerinde sulandırılmıştır. Birkaç kez yavaşça pipetaj yapıldıktan sonra hücrelerin tripan mavi boyası ile hemositometrede sayımı yapılmıştır.

Deney için 12 kuyucuklu plakaların her kuyucuğuna 20,000 hücre ekimi yapılmış ve 1 µl/ml, 10 µL/ml and 100 µL/ml dozlarında GA-nHA, nHA, HA içeren kondrosit büyüme besiyeri 3 tekrarlı olacak şekilde hücrelerin üzerine eklenmiştir. Ayrıca deneyin bitirileceği güne kadar salınan GA içeren besiyeri de 3 tekrarlı kuyucuklara eklenmiştir. Kontrol için 3 kuyucuğa hücrelerin üzerine yalnızca kondrosit büyüme besiyeri eklenmiştir. Salım sistemini bozmamak için 7 gün boyunca besiyeri değiştirilmemiştir. İnkübasyonun 3. ve 7. günlerinde hücreler trizol ile muamele edilerek ependorf tüpler içerisinde etiketlenmiş ve -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Sağlıklı ve OA'lı kondrositler için ayrı birer 12 kuyucuklu plaka ise metilen mavisi boyaması için hazırlanmıştır. Her kuyucuk besiyeri ile bir miktar ıslatıldıktan sonra kuyucuklara cover-slipler yerleştirilmiş ve üzerlerine hücre süspansiyonu damlacıklar halinde bırakılmıştır. Cover-sliplerin yüzeyine yapışmaları için hücreler 2 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda 1 µl/ml, 10 µL/ml and 100 µL/ml dozlarda GA-nHA, nHA, HA içeren kondrosit büyüme besiyeri ve 7.güne güne kadar salınan GA içeren besiyeri kuyucuklara eklenmiştir. Salım sistemini bozmamak için 7 gün boyunca besiyeri değiştirilmemiştir.

2.11 Metilen Mavisi Boyaması

7 günlük inkübasyon sonunda 12 kuyucuklu plakaların üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkanmış ve fiziksel fiksasyon için havayla kurutmaya bırakılmıştır. Hücrelerin yapıştıkları yüzeyden kalkmaması için alkolle kimyasal fiksasyon yapılmamıştır. Kuruyan cover-sliplerin üzerini kaplayacak kadar metilen mavisi boyası damlatılmış, birkaç dakika bekletildikten sonra cover slipler sırasıyla distile suyla ve %70'lik alkolle yıkanmıştır. Cover sliplerin yapıştırılacağı lamlar ve cover slipler xylolden geçirildikten sonra lamlara 1 damla kapatma medium (mounting medium) damlatılmış ve cover sliplerin hücre bulunduran yüzeyi lama bakacak şekilde gaz kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek kapatılmış, deney gruplarına göre etiketlenerek kurumaya bırakılmıştır. Lamlar kuruduktan sonra mikroskopta incelenmek üzere kaldırılmıştır.



Şekil 2.9 Metilen mavisi boyaması yapılan cover sliplerin lama yapıştırılmış hali.

2.12 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

GA-nHA'ların KI-MKH'lerin kondrojenik farklılaşması üzerine etkisini incelemek için SOX-9 ve COMP genlerine, sağlıklı ve OA'lı kondrositlerin ESM sentez işaretleri ve OA işaretleri üzerine olan etkisini incelemek içinse MMP-13, Tip II Kollajen (COL2A1) ve COMP genlerinin ifadesi, RT-PCR yöntemi ile ölçülmüştür. GAPDH ise housekeeping gen olarak seçilmiştir. Deneyde Tablo 11.'de belirtilen primerler kullanılmıştır. Hücrelerin besiyeri ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, PBS ile yıkanmıştır. Üzerine 1 ml trizol RNA izolasyon materyali eklenerek yüzeye yapışmış olan hücrelerin kalkması sağlanmıştır. Toplanan hücreler 1.5ml' lik ependorf tüpe alınarak, RNA izolasyon işlemine kadar -80 °C 'de saklanmıştır. -80°C 'den çıkarılan örnekler eriyene kadar buz üzerinde bekletilmiş, üzerlerine 200 µl kloroform eklenerek karıştırılmış ve 4°C' de 12000 x g'de 15 dk santrifüj sonrası üst faz steril 1.5ml'lik tüplere aktarılmıştır. Yeni tüpe aktarılan faza, 750µl, %100'lük etil alkol eklenip karıştırılmıştır. -20°C'de 30 dakika bekletildikten sonra 4°C' de 12000 x g'de 10 dk santrifüj edilmiş ve üst faz atılmıştır. Bu işlem 2 defa

daha tekrar edilmiştir. İzole edilen RNA'ların miktarı ve saflığı, NanoDrop spektrometre ile (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, ABD) 260, 280 ve 230 nm dalga boylarında ölçülerek standart yöntemle hesaplanmıştır. cDNA sentezi için total RNA'dan 200 ng kadarı cDNA sentez kiti (ProtoScript® First Strand #E6300, New England BioLabs, USA) kullanılmıştır. Gerçek zamanlı kantitatif qRT-PCR işlemi için, PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (#A25741, Thermo, ABD) ve ViiATM 7 Real-Time PCR System (Thermo, ABD) kullanılmıştır. Rölatif mRNA ifade analizi delta Ct yöntemi ve ViiATM 7 Software (version 1.2.4) ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 11. RT-PCR analizinde kullanılan genler ve primerleri.

| Gen | Forward Primer | Reverse Primer |
|--------|----------------------|-----------------------|
| COL2A1 | GGCAACAGGGTTCACGTACA | CGATAACAGTCTTGCCCCAGG |
| COMP | CAGGACGACTTTGATGCAGA | AAGCTGGAGCTGTCCTTCGA |
| MMP13 | AGATCACGATTTTGGGTGCT | AGGAGCATGAAAATGTGGTC |
| SOX9 | GGCAGCTGTGAACTGGCCA | GCACACGGGGAACCTGTCC |
| GAPDH | GCTCTCCGAACATCCCTGCC | CGTTGTCATACCGGAGAGCTT |

2.13 İstatistiksel Analiz

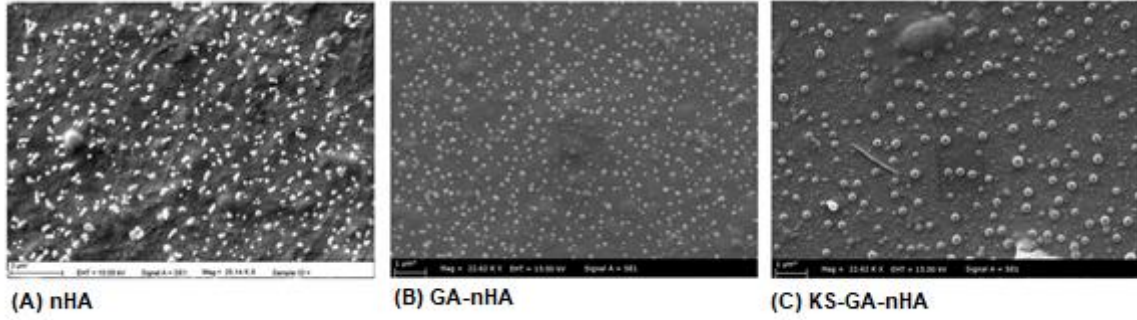
WST-1 Proliferasyon Testi sonuçlarında ortalama, standart sapma, gün bazında 14 alt grubun absorbans değerleri arasındaki anlamlı farkı tespit etme ve p değerlerini saptamak için, Hacettepe Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda İki Yönlü Varyans Analizi (Two-Way ANOVA), alt gruplarda ise Benferroni düzeltmesi yapılmıştır. Testler Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) programı kullanılarak yapılmıştır. p değeri <0,05 olan bulgular istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

RT-PCR sonuçlarında ortalama, standart sapma, gün bazında 10 ve 13 alt grubun arasındaki anlamlı farkı tespit etme ve p değerlerini saptamak için, Kruskal-Wallis testi ile ikili gruplar arasında karşılaştırma yapılmıştır. Testler Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) programı kullanılarak yapılmıştır. p değeri <0,05 olan bulgular istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 nHA ve GA-nHA ve KS-GA-nHA'ların SEM Görüntüleri

Partikül boyutları 200-600 nm arasında değişmekte ve distile su içerisinde homojen bir şekilde dağılmaktadırlar.

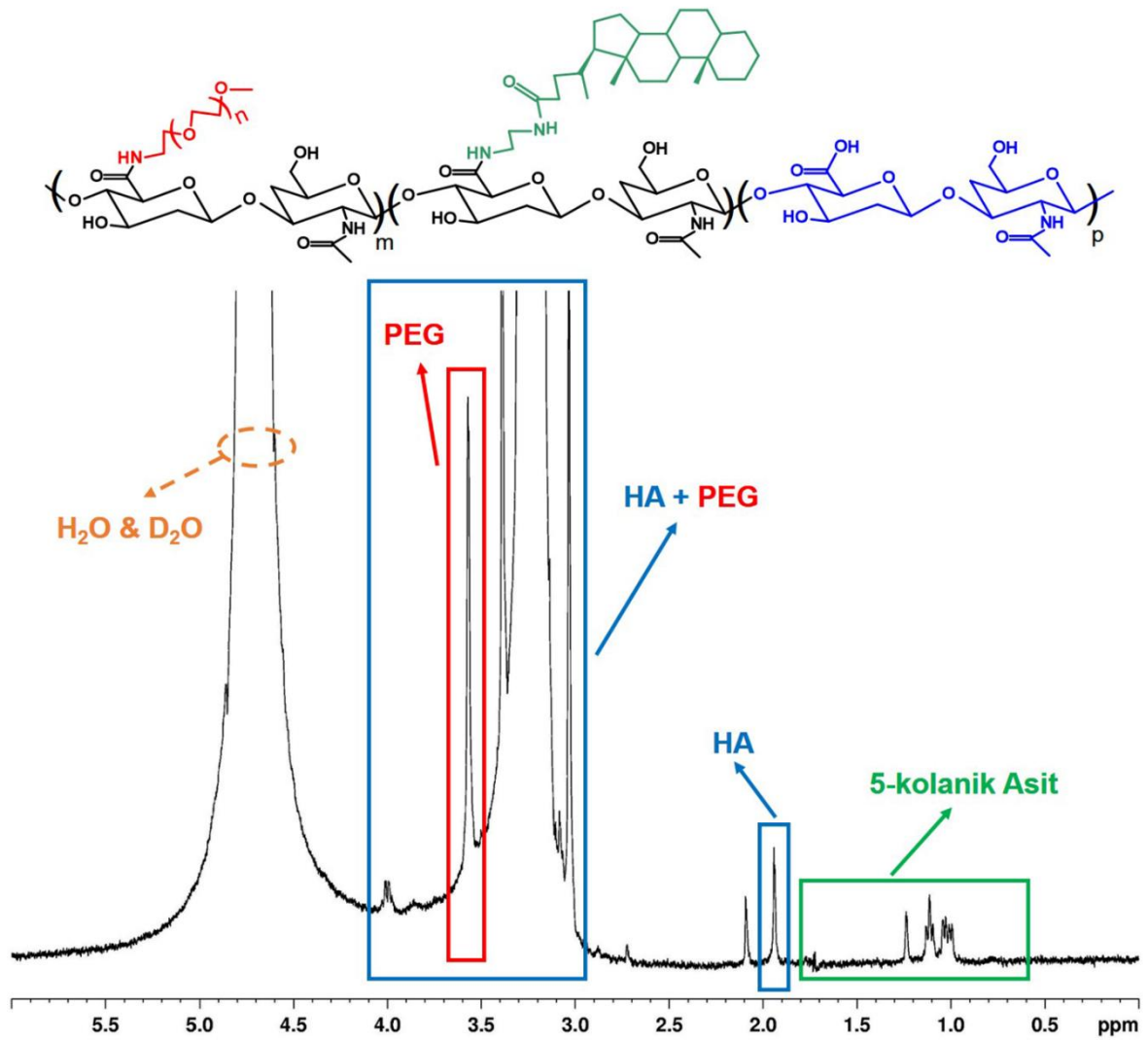


Şekil 3.1 (A) Hyaluronik asit nanopartiküller (nHA), 25.14 K X, (B) Glukozamin bağlı hyaluronik asit nanopartiküller (GA-nHA), 22.62 K X, (C) Kondroitin sülfat ve glukozamin bağlı hyaluronik asit nanopartiküllerin (KS-GA-nHA), 22.62 K X SEM görüntüleri.

3.2 ¹H-NMR Sonuçları

HA nanopartiküllerin kimyasal yapısını daha iyi analiz etmek ve oluşan bağları incelemek için ¹H-NMR analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).

0.6-1.8 ppm'de görülen pikler 5 β -kolanik asit yapısına ait metil (halka üzerinde bulunan –CH₃– grupları), metilen (halka üzerinde bulunan –COCH₃– grupları), ve etilen (–NHCH₂–gruplarının göstergesidir. Ayrıca, HA'e ait metil grupları (N-asetil glukozamin, C-2 karbonu, –CH₃–) 1.9 ppm'de, metilen ve hidroksil grupları (glukoz yapısında bulunan –COCH₃– ve –OH grupları) ise 3.0-4.1 ppm'de saptanmıştır. 3.6 ppm'de görülen pikler PEG gruplarına (–CH₂-CH₂-O–) aittir; bu da PEG'in sadece HA üzerinde bulunan C-6 karbonunda gerçekleştiğini ifade etmektedir. 4.5 ppm ve 4.8 ppm ise dH₂O pikidir. Böylece, ¹H-NMR sonuçları HA nanopartiküllerin başarılı bir şekilde sentezlendiğini kanıtlamaktadır.

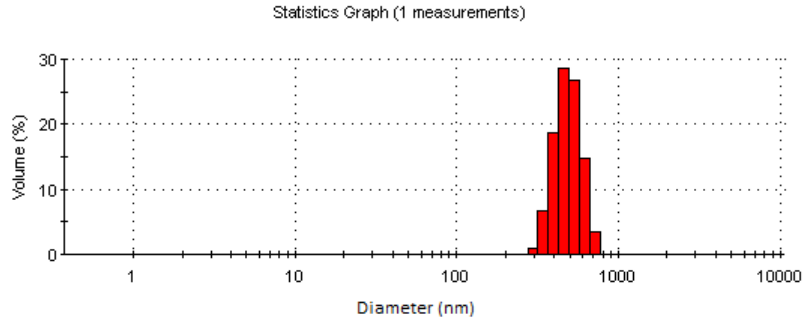


Şekil 3.2 HA nanopartiküllerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.

3.3 DLS Sonuçları

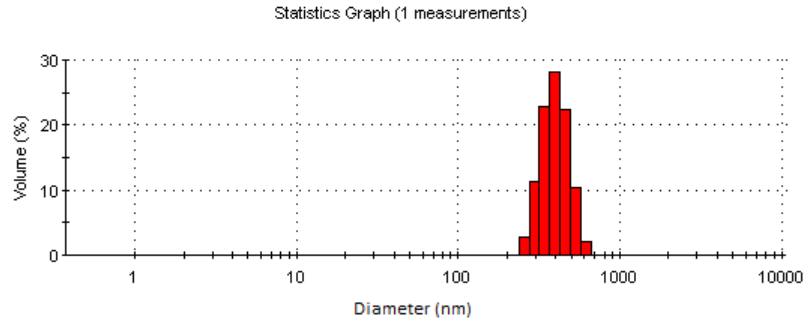
GA-nHA'ların boyutu 300-700 nm arasında değişirken partiküllerin yaklaşık %55'i 460-530 nm arasında boyuttadır. KS-GA-nHA'ların boyutu ise 220-600 nm arasında değişirken partiküllerin yaklaşık %80'i 350-530 nm arasında dağılmaktadır. DLS sonuçları SEM görüntülerindeki partiküllerin boyutlarını destekleyici niteliktedir

| Size | Mean % Volume | Std Dev % Volume |
|-------|------------------|---------------------|
| 78.82 | 0 | |
| 91.28 | 0 | |
| 105.7 | 0 | |
| 122.4 | 0 | |
| 141.8 | 0 | |
| 164.2 | 0 | |
| 190.1 | 0 | |
| 220.2 | 0 | |
| 255 | 0 | |
| 295.3 | 1.001 | |
| 342 | 6.795 | |
| 396.1 | 18.7 | |
| 468.7 | 28.54 | |
| 531.2 | 26.74 | |
| 615.1 | 14.66 | |
| 712.4 | 3.561 | |
| 825 | 0 | |
| 955.4 | 0 | |



(A) GA-nHA'ların boyut ve dağılımı

| Size | Mean % Volume | Std Dev % Volume |
|-------|------------------|---------------------|
| 78.82 | 0 | |
| 91.28 | 0 | |
| 105.7 | 0 | |
| 122.4 | 0 | |
| 141.8 | 0 | |
| 164.2 | 0 | |
| 190.1 | 0 | |
| 220.2 | 0.02087 | |
| 255 | 2.659 | |
| 295.3 | 11.41 | |
| 342 | 22.91 | |
| 396.1 | 28.2 | |
| 468.7 | 22.29 | |
| 531.2 | 10.36 | |
| 615.1 | 2.136 | |
| 712.4 | 0 | |
| 825 | 0 | |
| 955.4 | 0 | |



(B) CS-GA-nHA'ların boyut ve dağılımı

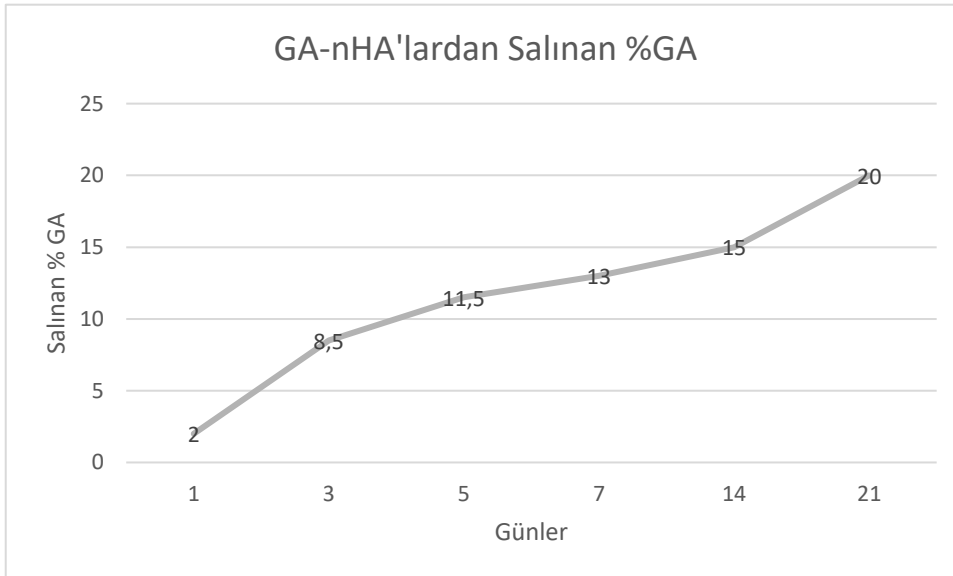
Şekil 3.2 (A) Glukozamin bağlı hyalüronik asit nanopartiküllerin (GA-nHA) ve (B) Kondroitin sülfat ve glukozamin bağlı hyalüronik asit nanopartiküllerin (KS-GA-nHA) DLS sonuçları.

3.4 Salım Sonuçları

21 günün sonunda 2 mg GA-nHA'dan 0,4 mg GA salınmıştır. Yüzdeler bazında incelendiğinde ise 21 günün sonunda GA-nHA'dan %20 oranında GA'nın salındığı gözlenmiştir.

Tablo 12. GA-nHA'lardan günlere göre salınan GA miktarı.

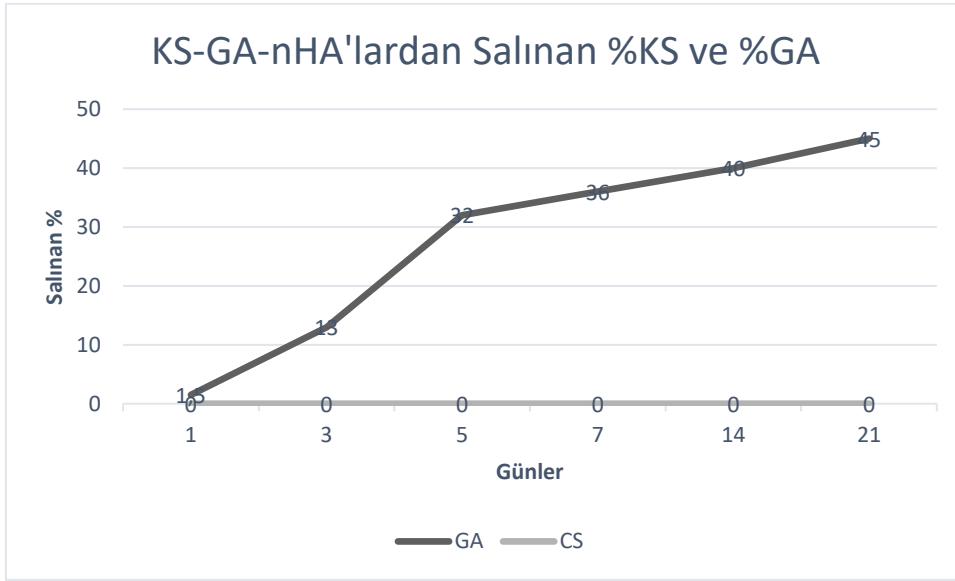
| Günler | GA-nHA'dan salınan GA miktarı (mg) | Salınan % GA |
|--------|------------------------------------|--------------|
| 1 | 0,04 | %2 |
| 3 | 0,17 | %8,5 |
| 5 | 0,23 | %11,5 |
| 7 | 0,26 | %13 |
| 14 | 0,3 | %15 |
| 21 | 0,4 | %20 |



Şekil 3.3 GA-nHA'dan günlere göre salınan GA yüzdesi.

Tablo 13. KS-GA-nHA'lardan günlere göre salınan KS ve GA miktarları.

| Günler | 2 mg KS-GA-nHA'dan Salınan KS (mg) | Salınan % KS | 2 mg KS-GA-nHA'dan salınan GA (mg) | Salınan % GA |
|--------|------------------------------------|--------------|------------------------------------|--------------|
| 1 | 0 | %0 | 0,03 | %1,5 |
| 3 | 0 | %0 | 0,53 | %13 |
| 5 | 0 | %0 | 0,64 | %32 |
| 7 | 0 | %0 | 0,72 | %36 |
| 14 | 0 | %0 | 0,81 | %40 |
| 21 | 0 | %0 | 0,9 | %45 |



Şekil 3.4. KS-GA-nHA'lardan günlere göre salınan KS ve GA yüzdesi.

21 günün sonunda KS-GA-nHA'lardan KS'nin hiç salınmazken, GA'nın 0,9 mg salındığı gözlenmiştir. GA salım yaparken KS nanopartiküllerden salınmadığı için bu süreçten sonraki tüm deneylerde yalnızca GA-nHA kullanılmıştır.

3.5 WST-1 Proliferasyon Testi Sonuçları

İstatistiksel verilere göre,

1. günde gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p=1,000$).

5. günde gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p=1,000$).

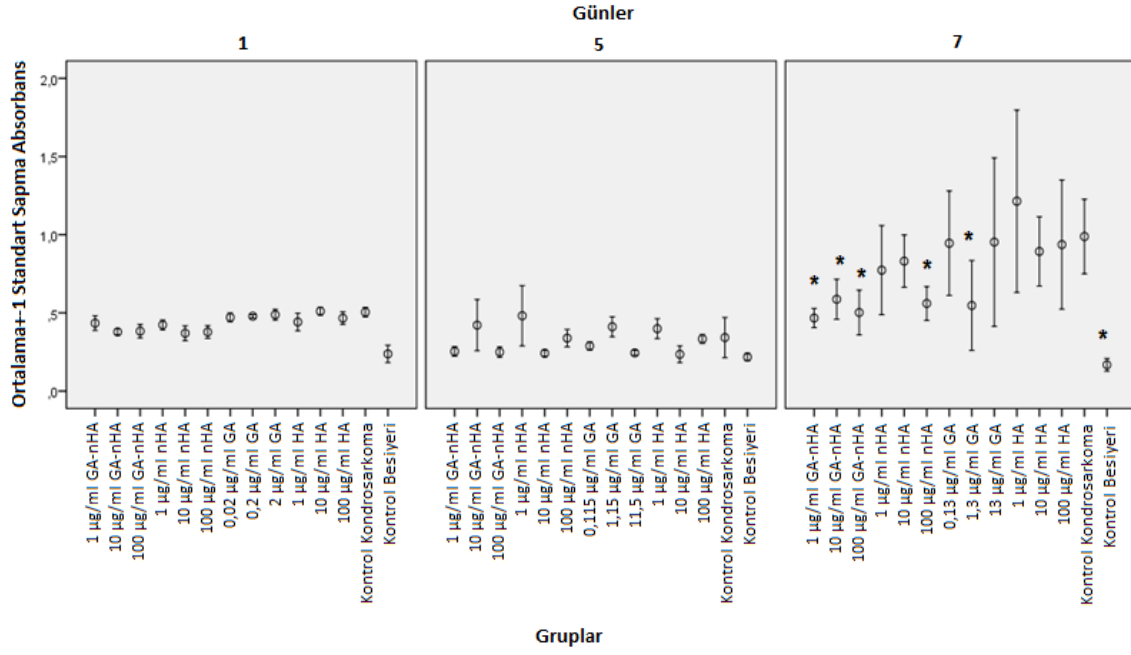
7. günde: 1 $\mu\text{g/ml}$ GA-nHA ve 100 $\mu\text{g/ml}$ GA-nHA ile kontrol besiyeri (negatif kontrol) grubu arasında bir fark görülmemiştir ($p>0,05$). Bu durum 1 $\mu\text{g/ml}$ GA-nHA ile 100 $\mu\text{g/ml}$ GA-nHA'nın diğer gruplara göre hücre proliferasyonunu anlamlı olarak düşürdüğünü göstermektedir.

1,10 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ GA-nHA uygulaması kontrol kondrosarkoma (pozitif kontrol) grubuna göre anlamlı olarak hücre proliferasyonunu düşürmüştür ($p<0,05$).

13 $\mu\text{g/ml}$ GA uygulaması yapılan grup ise 1 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ GA-nHA, 100 $\mu\text{g/ml}$ nHA ve 1,3 $\mu\text{g/ml}$ GA uygulaması yapılan gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek proliferasyon göstermiştir ($p<0,05$).

0,13 $\mu\text{g/ml}$ GA uygulaması yapılan grup, 1 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ GA-nHA, 100 $\mu\text{g/ml}$ nHA, 1,3 $\mu\text{g/ml}$ GA uygulaması yapılan gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek proliferasyon göstermiştir ($p<0,05$).

1 $\mu\text{g/ml}$ HA ise en yüksek proliferasyonu gösteren gruptur. 1 $\mu\text{g/ml}$ HA uygulaması yapılan grup anlamlı olarak 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ GA-nHA, 1, 10 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ nHA, ve 1,3 $\mu\text{g/ml}$ GA uygulaması yapılan gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek proliferasyon göstermiştir ($p<0,05$).

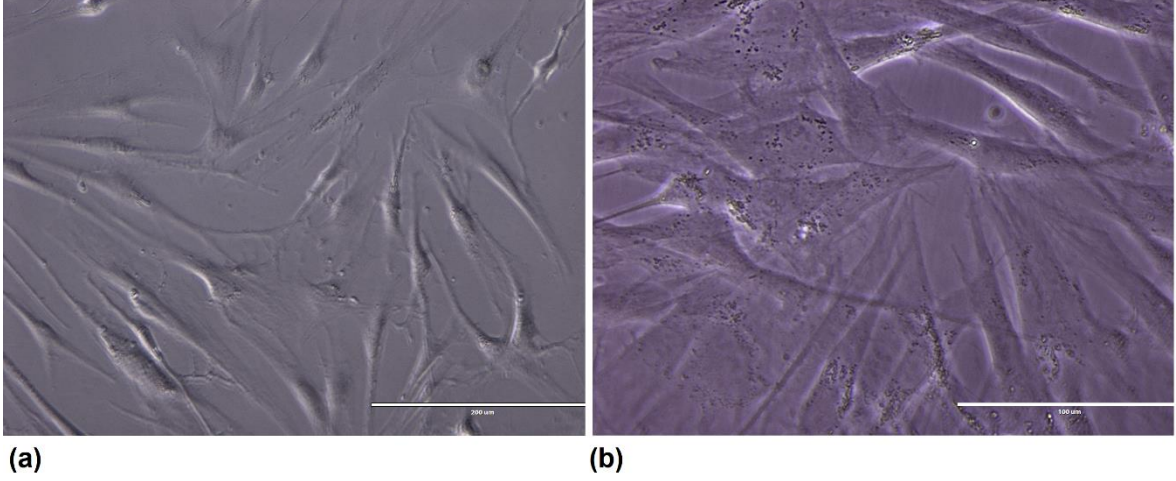


Şekil 3.5 GA-nHA'ların, pozitif ve negatif kontrol gruplarının Ortalama-Standart Sapma grafikleri. *: Pozitif kontrol (kontrol kondrosarkoma) grubuna göre anlamlı farklılık çıkan grupları belirtmektedir ($p < 0,05$)

3.6 Kİ-MKH'lerin Karakterizasyon Sonuçları

Deney süresince kullanılan pasaj 7 Kİ-MKH'lerin kültür kaplarına yapıştığı, karakteristik uzantılarının mevcut olduğu, osteojenik olarak farklılaşabildiği ve CD73, CD44, CD90, CD29 yüzey işaretlerini ifade ederken, CD45, HLA-DR ve CD38 yüzey işaretlerini ifade etmediği görülmüştür. Bu durum Kİ-MKH'lerin mezenkimal kök hücre karakteristik özelliklerini taşıdığını göstermiştir.

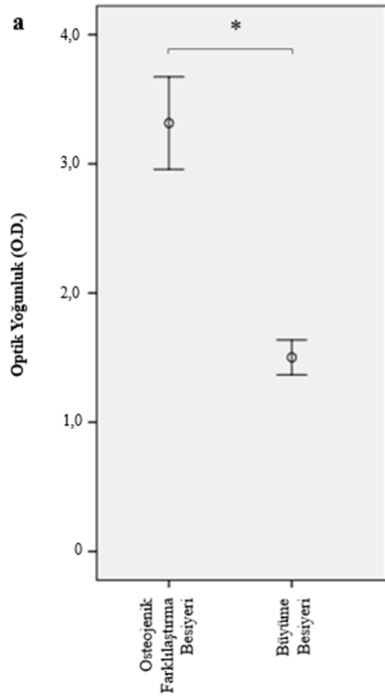
3.6.1 Deneyde Kullanılan Kİ-MKH'lerin Fotoğrafları



Şekil 3.6 (a) 20X, (b) 40X büyütmedeki Kİ-MKH'lerin fotoğrafları. Hücrelerin kültür kabına yapıştığı ve karakteristik uzantıları görülmektedir.

3.6.2 Kİ-MKH'lerin Osteojenik Farklılaşma Sonuçları

Deneylerde kullanılan pasaj 7 Kİ-MKH'ler 21 gün boyunca osteojenik farklılaştırma besiyeri uygulanarak hücre içi ALP aktivasyonu, yalnızca büyüme besiyeri uygulanan Kİ-MKH'lerin hücre içi ALP aktivasyonu ile karşılaştırılmıştır. Yapılan analiz sonucunda osteojenik farklılaştırma besiyeri uygulanan Kİ-MKH'lerin ALP oranları istatistiksel olarak anlamlı şekilde büyüme besiyeri uygulanan Kİ-MKH'lerden yüksek tespit edilmiştir ($p= 0,001$; Şekil 3.7).



b

| Gün | MKH | Ortalama ± Standart Sapma | Gözlem Sayısı (N) |
|-----|-----------------------------------|---------------------------|-------------------|
| 21 | Osteojenik Besiyeri Uygulanan MKH | 3,3155±0,3581043 | 6 |
| 21 | Büyüme Besiyeri Uygulanan MKH | 1,501833±0,1345755 | 6 |

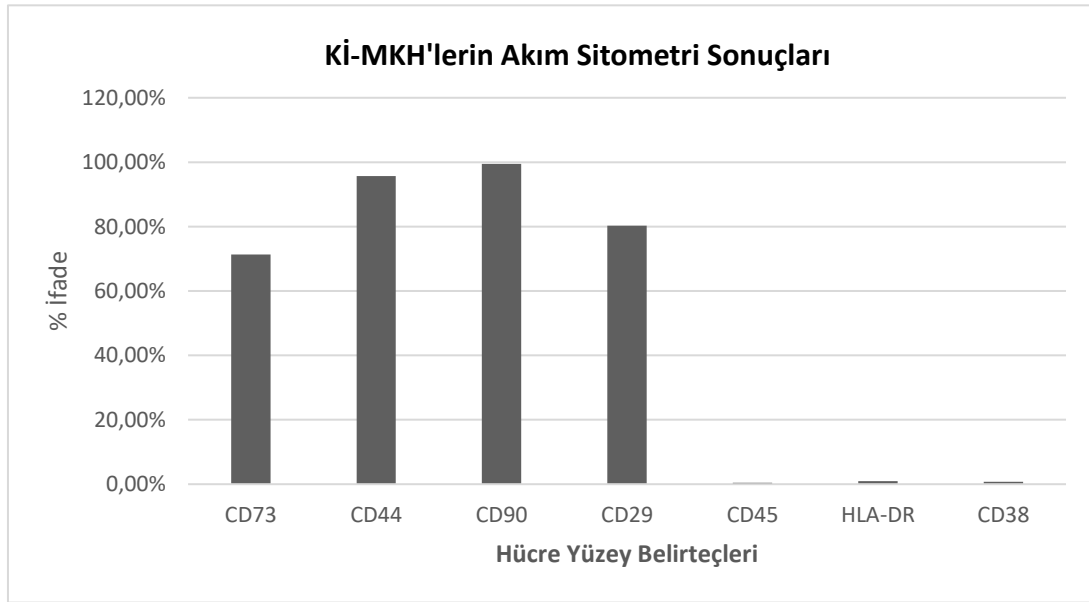
Şekil 3.7 Pasaj 7 Kİ-MKH'lerin 21. gün yapılan osteojenik farklılaştırma analizi. **a.** Hücre içi ALP aktivasyon sonuçlarının ortalama- standart sapma grafiği. **b.** Hücre içi ALP aktivasyon analizinin ortalama- standart sapma tablosu.

3.6.2 Akım Sitometri Analizi Sonuçları

Akım sitometri sonuçları, deneylerde kullanılan Kİ-MKH'lerin CD73, CD44, CD90, CD29 yüzey işaretlerini ifade ederken, CD45, HLA-DR ve CD38 yüzey işaretlerini ifade etmediğini göstermektedir.

Tablo 14. Mezenkimal kök hücrelerin yüzey işaretlerinin ifade edilme yüzdeleri.

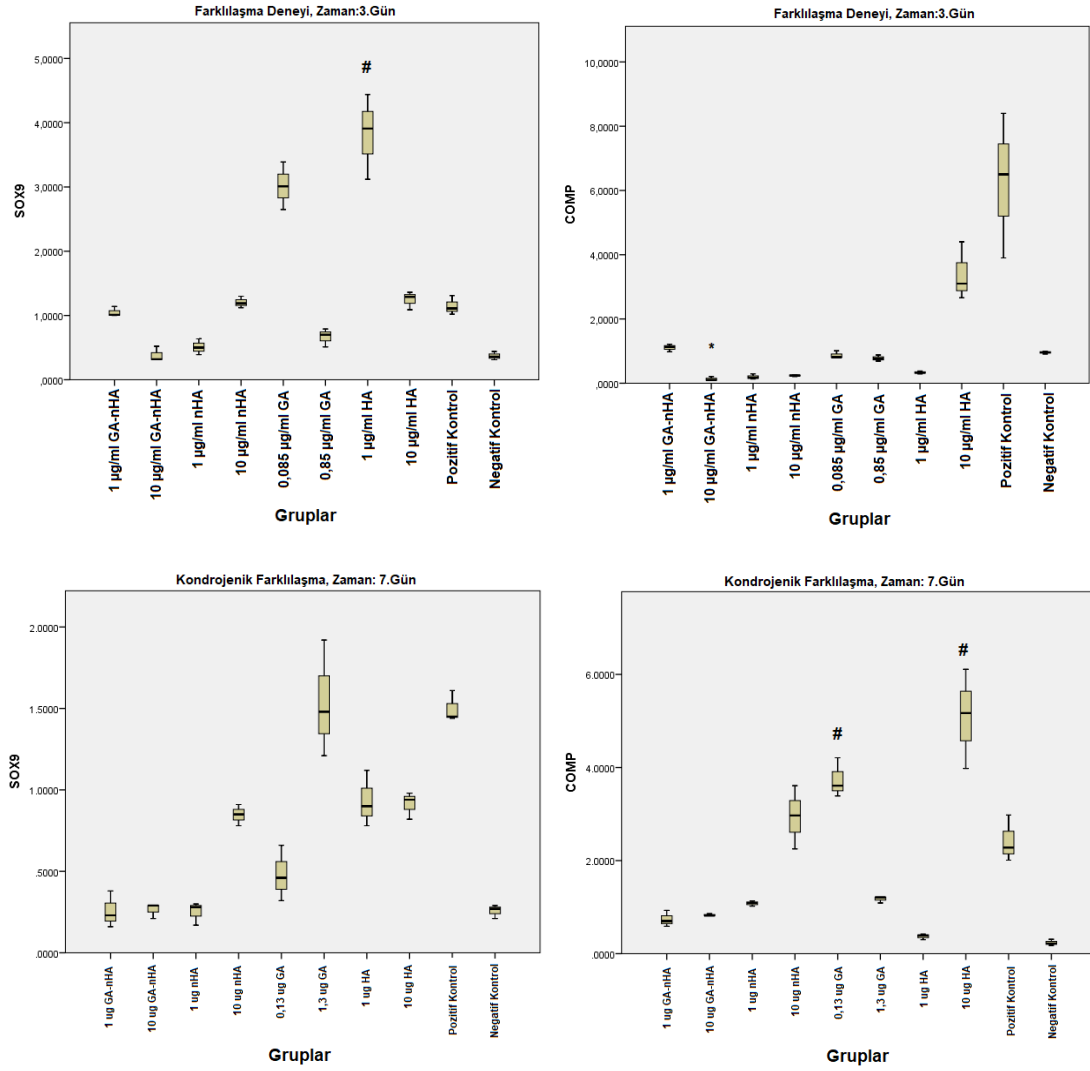
| Yüzey İşareti | Sonuç (%) |
|---------------|-----------|
| CD73 | % 71,3 |
| CD44 | % 95,7 |
| CD90 | % 99,5 |
| CD29 | % 80,3 |
| CD45 | % 0,4 |
| HLA-DR | % 0,9 |
| CD38 | % 0,7 |



Şekil 3.8 Mezenkimal kök hücrelerin yüzey işaretlerinin ifade edilme yüzdeleri.

Bölüm 3.7'deki sonuçlarla beraber, deneylerde kullanılan Kİ-MKH'lerin mezenkimal kök hücre karakteristiklerine sahip olduğu gösterilmektedir.

3.7 Kondrojenik Farklılaşma RT-PCR Sonuçları



Şekil 3.9 K1-MKH'lerin 3.günde ve 7.günde COMP ve SOX-9 ifadeleri. * : Pozitif kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık olan grupları ($p<0,05$), #: Negatif kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık olan grupları ($p<0,05$) ifade etmektedir.

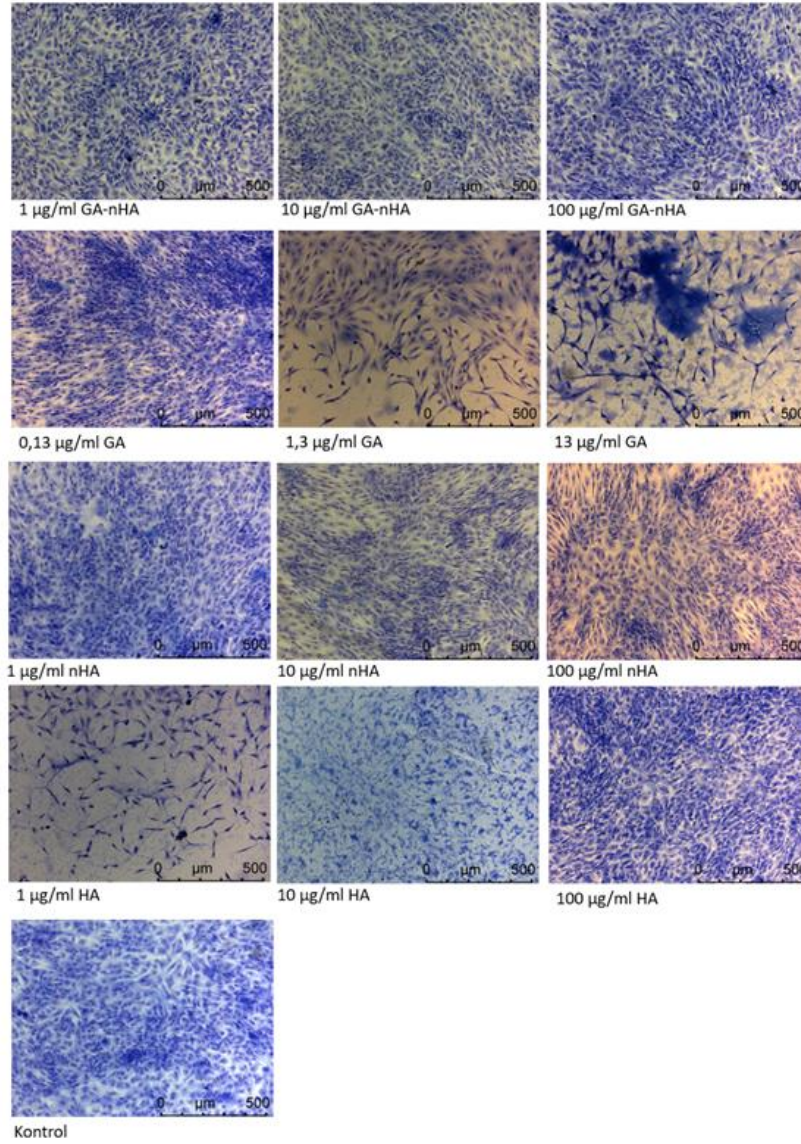
3.günde 1 µg/ml HA uygulaması yapılan gruptaki SOX-9 ifadesi, negatif kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ancak 7.günde hiçbir grubun pozitif ve negatif kontrol gruplarıyla arasında anlamlı farklılık görülmemiştir.

COMP ifade seviyesinde ise 3.günde 10 µg/ml GA-nHA uygulaması yapılan grupta pozitif kontrole göre düşüş görülürken, 7.günde 10 µg/ml HA ve 0,13 µg/ml GA ve uygulaması yapılan gruplar negatif kontrole göre anlamlı olarak ifadeyi artırmıştır.

3.8 Metilen Mavisi Boyama Sonuçları

3.8.1 Sağlıklı İnsan Kondrositlerinin Metilen Mavisi Boyama Sonuçları

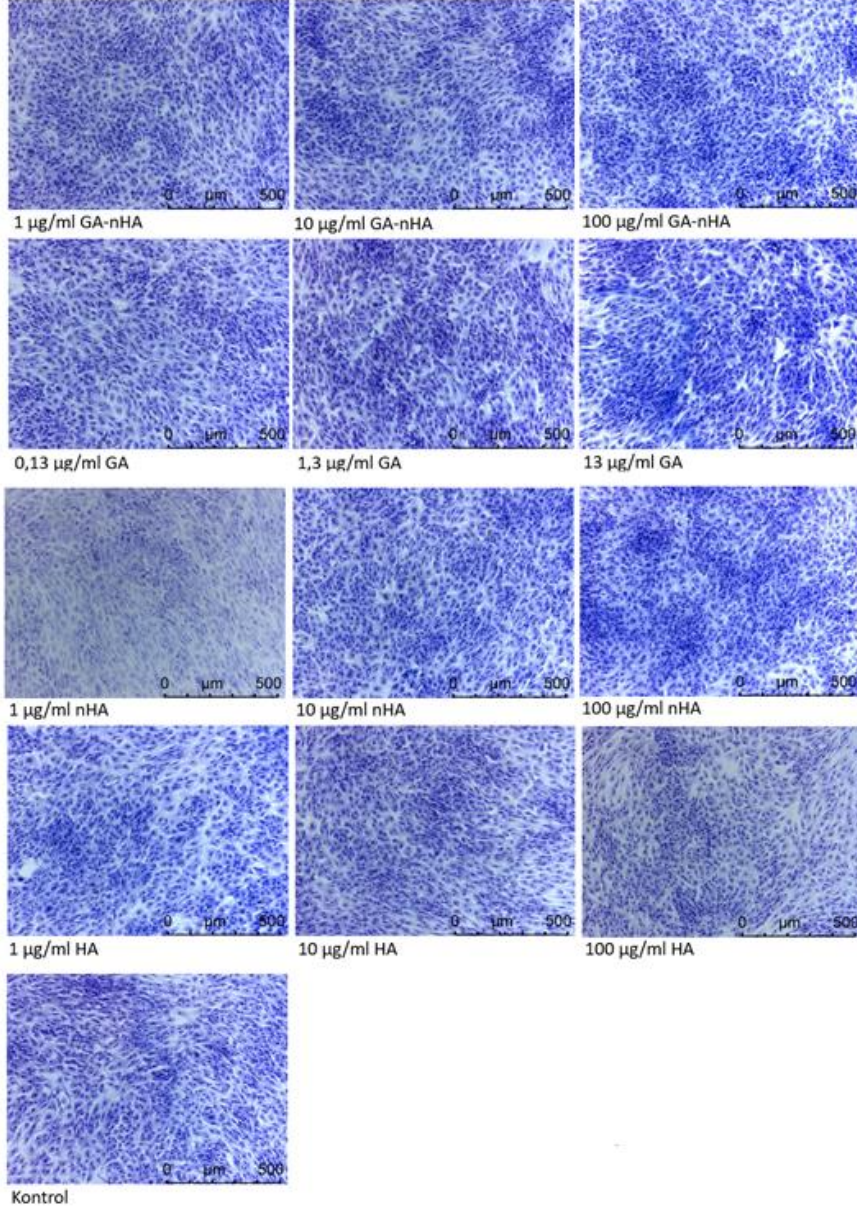
Metilen mavisi ile boyanan sağlıklı insan kondrositlerinde, hücrelerin ESM bölgesinde gözle görülür bir renk farklılığı yoktur. Bu durum farklı dozlarda uygulama yapılan GA-nHA, nHA, HA ve GA'nın hücrelerin ESM sentezinde belirgin bir fark oluşturmadığını göstermektedir.



Şekil 3.10 Sağlıklı kondrositlerin metilen-mavisi boyaması sonuçları.

3.8.2 Osteoartritli İnsan Kondrositlerinin Metilen Mavisi Boyama Sonuçları

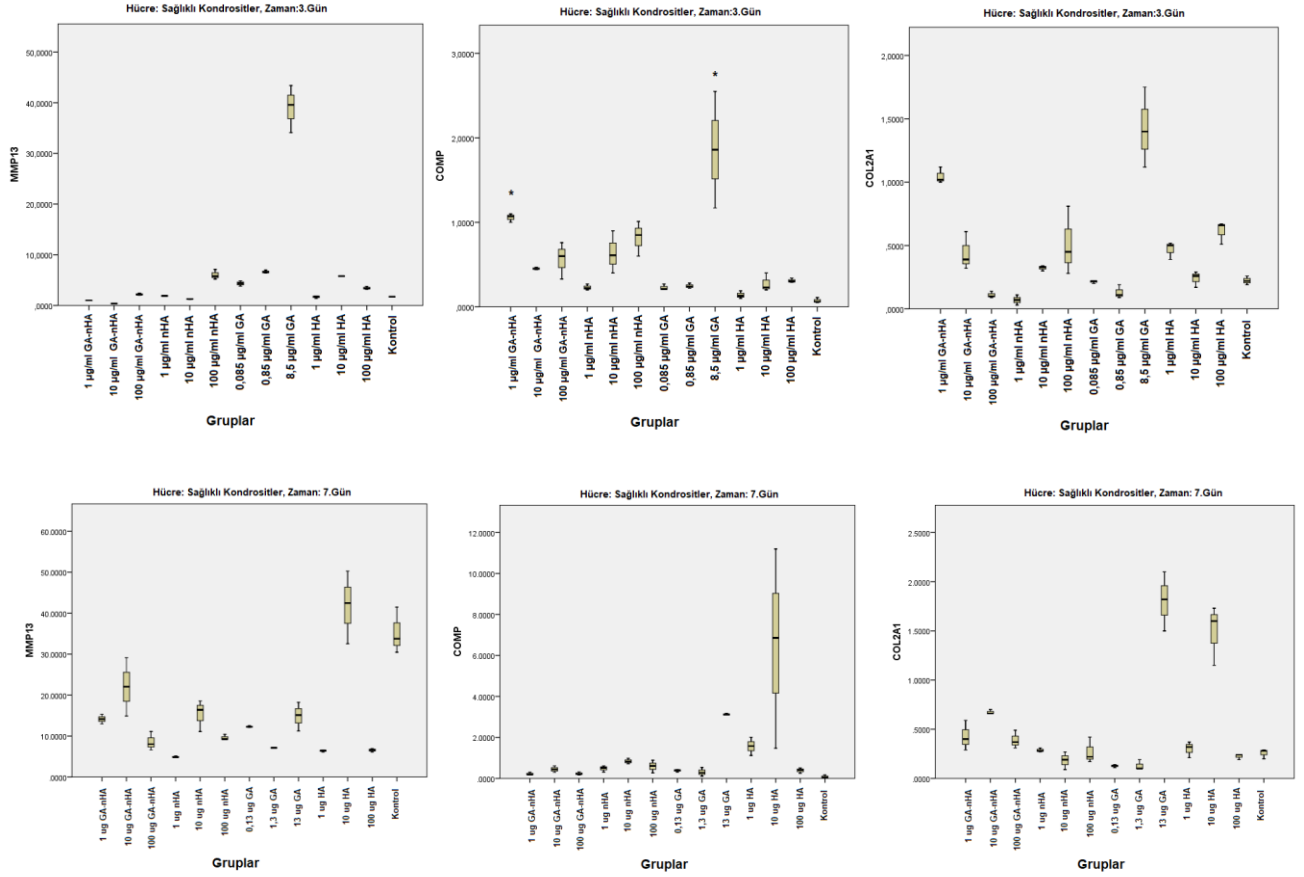
Sağlıklı kondrositlerde görüldüğü gibi, metilen mavisi ile boyanan OA'lı insan kondrositlerinde, hücrelerin ESM bölgesinde gözle görülür bir renk farklılığı yoktur. Bu durum farklı dozlarda uygulama yapılan GA-nHA, nHA, HA ve GA'nın hücrelerin ESM sentezinde belirgin bir fark oluşturmadığını göstermektedir



Şekil 3.11 Osteoartritli kondrositlerin metilen-mavisi boyaması sonuçları.

3.9 Sağlıklı ve OA'lı Kondrositlerde ESM ve OA İşaretlerinin İfadesi İçin RT-PCR Sonuçları

3.9.1 Sağlıklı Kondrositlerde ESM ve OA İşaretlerinin İfadesi İçin RT-PCR Sonuçları



Şekil 3.12 Sağlıklı kondrositlerin 3. ve 7. Günlerde MMP-13, COMP ve COL2A1 ifadeleri. * : Pozitif kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık olan grupları (p<0,05)

3. günde MMP-13 ifadesi arasında 13 grupta anlamlı bir farklılık görülmezken, COMP ifadesi 1 µg/ml GA-nHA uygulanan grupta anlamlı olarak artmıştır. Ayrıca 8,5 µg/ml GA uygulanan grupta, yani 100 µg/ml GA-nHA'dan 3 günde salınan GA tek başına uygulandığında COMP ifadesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış göstermiştir. COL2A1 seviyesinde ise 3. Günde pozitif kontrolle deney grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ancak 1 µg/ml GA-nHA ve 8,5 µg/ml GA

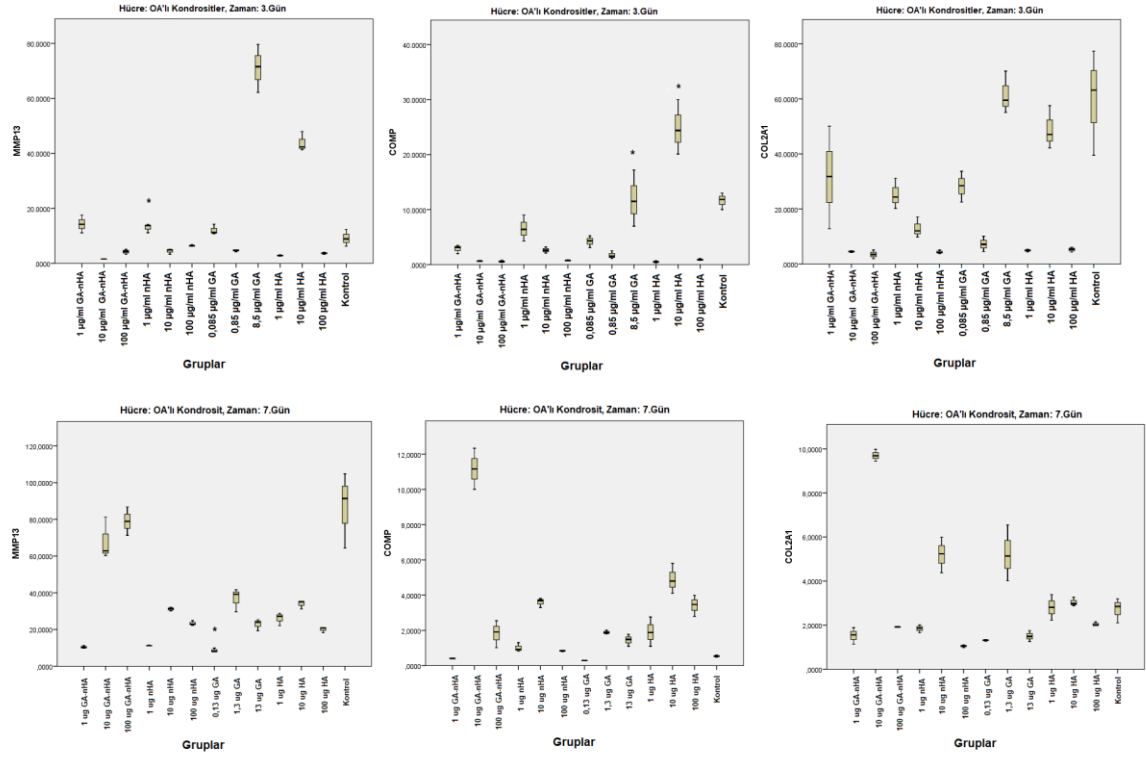
uygulamasý yapılan grupların kontrole göre daha yüksek COL2A1 ifadesi gösterdiđi görölmektedir.

7.günde ise deney grupları ve kontrol grubu arasındaki ikili karşılaştırmalarda anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). 1, 10 ve 100 µg/ml GA-nHA'nın MMP-13 ifadesini azaltıp COMP ve COL2A1 ifadelerinde bir değişikliğe neden olmadığı, 10 µg/ml HA uygulamasının ise COMP ve COL2A1 ifadesini arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu durum istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, klinik açıdan anlamlı olabilir.

3.9.2 OA'lı Kondrositlerde ESM ve OA İşaretlerinin İfadesi İçin RT-PCR Sonuçları

3. günde 8,5 µg/ml GA ve 10 µg/ml HA uygulamaları COMP seviyesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış sağlarken GA-nHA gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

7. günde ise MMP-13 seviyesini kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüren tek grup 0,13 µg/ml GA uygulaması olmuştur. GA-nHA gruplarına bakıldığında, 1 µg/ml GA-nHA uygulaması MMP-13 seviyesini kontrol grubuna göre düşürürken COMP ve COL2A1 seviyelerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. 10 µg/ml GA-nHA uygulaması ise MMP-13 seviyesini düşürürken COMP ve COL2A1 seviyelerinde yüksek oranda artışa neden olmuştur.



Şekil 3.13 OA'lı kondrositlerin 3. ve 7. Günlerde MMP-13, COMP ve COL2A1 ifadeleri. * : Pozitif kontrol grubu ile arasında anlamlı farklılık olan grupları (p<0,05)

3.10 Tartışma

Çalışmamızda kullanılan nHA'lara benzer olarak, Laroui ve ark. [165]'in çalışmasında HA kaplı polilaktid nanopartiküller 50, 75 ve 100 µg/ml dozlarında sağlıklı sıçan kondrositlerine uygulandığında, 72 saatlik periyotta hücre ölümünün görülmediği, konfokal mikroskopi ve SEM analizinde partiküllerin hücreler tarafından alındığı ve sitoplazmada partiküllerin mevcut olduğu gösterilmiştir. GA-nHA'lar [165]'teki çalışmadan farklı bir yöntemle üretilmiş olup hücre yapışması ve çoğalmasını, hücrelere yalnızca besiyeri uygulanan gruba göre anlamlı olarak düşürmesi, nanopartikülleri hücre besiyeri içerisinde toplanarak hücrelerin üzerine çökmesi ve hücrelerde stres yaratmasından kaynaklı olabilir. Choi ve ark. [166]'ın çalışmasında (Malzeme sentezinde baz alınan çalışmanın [163] devamı) çalışmamızda üretildiği şekilde üretilen PEG'li HA nanopartiküllerin *in vitro*da kanser hücreleri ve normal hücreler üzerindeki etkisi incelendiğinde, PEG'li HA

nanopartiküllerin PEG'li olmayanlara göre hücreler tarafından daha az alındığı gösterilmiştir. Ayrıca PEG'li HA nanopartiküllerin PEG'li olmayanlara göre *in vivo* fare çalışmasında, kanserli doku üzerinde daha fazla toplandığı da belirtilmiştir. GA-nHA'ların PEG'lenmesi de partiküllerin agrege olmasında bir etken olabilir. Eğer partiküllerin birleşmesi söz konusuysa, bu durumu engelleyecek farklı bir sentez yöntemi veya farklı bir yüzey modifikasyonu geliştirilebilir. Ancak, bu çalışma planlanırken GA-nHA'ların üretilme amacı, OA'lı kıkırdakta iyileşme sağlamak olduğu için bu durum çalışma açısından büyük bir sorun teşkil etmemektedir.

Yao ve ark. [167]'in çalışmasında GA'nın Kİ-MKH'lerin kondrojenik farklılaşması üzerine etkisini incelemek için, GA modifiyeli PEG hidrojellerden üç boyutlu bir *in vitro* kültür modeli oluşturulmuş ve hücreler enkapsüle edilmiştir. 5 mM ve 10 mM GA bulunduran PEG hidrojellerin Kİ-MKH'lerin kondrojenik farklılaşma işaretlerinin arttığı gözlemlenmiştir. 7.günde erken farklılaşma işareti olan SOX-9'un 5 ve 10 mM GA gruplarında diğer gruplara göre daha yüksek olduğu, 21. ve 42. günlerde ise tip II kollajen (COL2A1) ve agrekan seviyelerinin de GA'lı hidrojel gruplarında kontrol gruplarına göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ise tek başına GA ve HA uygulamaları Kİ-MKH'lerin kondrojenik farklılaşmasındaki önemli işaretlerden biri olan COMP'u artırırken, GA-nHA'ların artırmaması, bu etken maddelerin tek başlarına mezenkimal kök hücreleri uyarırken nanopartikül formuna getirildiğinde aynı dozda bile verilse uyarmadığını göstermektedir.

Benzer olarak Derfoul ve ark. [168]'in çalışmasında insan mezenkimal kök hücreleri (iMKH), normal ve osteoartritli kondrositler üzerinde GA'nın etkisi incelenmiştir. 100 µM GA uygulaması hem iMKH'lerin hem de kondrositlerin tip II kollajen ve agrekan seviyelerinde yükselme olduğu MMP-13 seviyesinde ise azalma olduğu belirtilmiştir. Ancak GA dozu yükseldikçe (10-20 mM) hücreler üzerinde inhibitor etki yaptığı da not edilmiştir. Çalışmamızda ise sağlıklı kondrositlere uygulanan düşük dozda (1 µg/ml) GA-nHA'nın 3 gün içerisinde MMP-13 seviyesini düşürdüğü, COMP ve COL2A1 seviyelerini ise yükselttiği gözlemlenmiştir. MMP-13 ve COL2A1 seviyelerinde pozitif kontrole göre anlamlı bir farklılık bulunmamışken, COMP seviyesindeki artış istatistiksel olarak anlamlıdır. 7.güne bakıldığında ise 1,10 ve 100 µg/ml GA-nHA uygulamaları MMP-13 seviyesini düşürürken COMP ve COL2A1 seviyelerinde bir değişikliğe neden

olmamıştır. Bu durum kısa vadede düşük doz GA-nHA'nın sağlıklı kondrositler üzerinde OA'dan koruyucu bir etki yapabileceğini göstermektedir.

Dodge ve ark. [169]'in çalışmasında osteoartritli kondrositlere uygulanan glukozamin sülfatın (GS) doza bağlı olarak agrekan çekirdek protein seviyesinde artış gösterdiği, 150 µM GS uygulamasında ise bu oranın %120 oranında artış gösterdiği, MMP-3 seviyesinde ise azalma olduğu bildirilmiştir. Ancak hastaların %40'ından alınan OA'lı kondrositlerin GS'ye bir tepki vermediği ve kontrol gruplarıyla bir fark göremediklerini de eklemiştir.

10 µg/ml GA-nHA'nın OA'lı kondrositler üzerine etkisiyle MMP-13 seviyesi düşmüş, ancak COMP ve COL2A1 seviyelerinde artış meydana gelmiştir. Bu durum istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da klinik açıdan anlamlı olabilir. 7.günde MMP-13 seviyesini anlamlı olarak düşüren tek grup düşük doz GA uygulamasıdır. 3.günde de tek başına GA ve tek başına HA uygulamaları COMP seviyelerini anlamlı olarak yükseltmiştir. GA ve HA'nın tek başlarına hücrenin tanıyabileceği biçimde verilmesi, hücrelerde daha olumlu bir etkiye neden olmuş olabilir.

Kıkırdak ESM'sinin doğal bileşenleri tek başlarına verildiğinde hücreler üzerinde olumlu etki gösterirken, nanopartikül formunda verildiğinde olumsuz/nötr etkilere sebep olması, bu bileşenlerin hücrenin işleyemeyeceği forma getirildiğinden kaynaklanıyor olabilir. Kondrositler GA'yı hücre içerisine alıp golgi aygıtında işleyebilse bile, HA'yı suda çözünür forma getiremeyebilir, bu çözünemeyen nHA'lar da birleşip hücrelerin üzerine çöktüğünde kondrositler strese giriyor olabilir. Bu durum aslında düşük dozda verilen GA-nHA'ların 3 gün gibi çok kısa sürede bir olumsuz etkisi olmazken, 7.güne gelindiğinde olumsuz etki göstermeye başlamasına da etkili olabilir. Başka bir yönden bakılırsa da, GA-nHA'lar hücre zarının seçici geçirgen özelliğinden dolayı reseptörlerinden alınmıyor, bu sayede de ESM elemanlarının yapısına katılmıyor da olabilir.

GA'nın *in vitro* kültür üzerinde glikozaminoglikan sentezini artırdığına yönelik çalışmalar mevcut olsa da [169][170][171], GA'nın hücrede tip II kollajen sentezini artırmadığını [172],[171] *in vitroda* kondrositler üzerinde katabolik tepkimeleri azalttığı gibi anabolik tepkimeleri de azalttığını ve bu durumun glukozaminin yeni ESM sentezi yapmaktansa, mevcut ESM yıkımına karşı hücreyi korumaya yönelik bir işlevinin olduğunu öne süren çalışmalar mevcuttur [173],[174].

Sonuç olarak, nHA'lar başarılı bir şekilde sentezlenmiş, GA ile bağlanmış ve hücrelerde herhangi bir sitotoksikite göstermemiştir. GA'lar 21 günde %21 oranında salınmıştır, ki kontrollü salım sistemi amaçlandığı için bu durum çalışmanın olumlu sonuçlarından biridir. GA-nHA'lar hücre yapışma ve çoğalmasına, KI-MKH'lerin kondrojenik farklılaşmasına ve OA'lı ve sağlıklı kondrositlerin ESM sentezi ve OA işaretlerine olumlu yönde bir etkisi olmamıştır. Çalışmanın bir sonraki aşamasında, GA-nHA'nın hücreler tarafından alınıp alınmadığı, hangi işlemlere tabi tutulduğu, besiyeri içerisinde veya doku sıvısında nasıl bir davranış sergiledikleri incelenmelidir.

4. KAYNAKLAR

- [1] J. W. J. Bijlsma, F. Berenbaum, and F. P. J. G. Lafeber, "Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice.," *Lancet (London, England)*, vol. 377, no. 9783, pp. 2115–2126, Jun. **2011**.
- [2] D. J. Hunter and D. T. Felson, "Osteoarthritis.," *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 332, no. 7542, pp. 639–642, Mar. **2006**.
- [3] WHO, "WHO | Chronic rheumatic conditions," *Who*, 2015. <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>. **(Mayıs, 2018)**
- [4] G. S. Fernandes and A. M. Valdes, "Cardiovascular disease and osteoarthritis: Common pathways and patient outcomes," *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 45, no. 4, pp. 405–414, **2015**.
- [5] J. Jerosch, "Effects of glucosamine and chondroitin sulfate on cartilage metabolism in OA: Outlook on other nutrient partners especially omega-3 fatty acids," *International Journal of Rheumatology*, vol. 2011, **2011**.
- [6] R. J. Cleveland and L. F. Callahan, "Can Osteoarthritis Predict Mortality?," *North Carolina medical journal*, vol. 78, no. 5, pp. 322–325, **2017**.
- [7] E. Nüesch, P. Dieppe, S. Reichenbach, S. Williams, S. Iff, and P. Jüni, "All cause and disease specific mortality in patients with knee or hip osteoarthritis: Population based cohort study," *Bmj*, vol. 342, no. 7798, p. 638, **2011**.
- [8] S. J. Kerr, D. S. Rowett, G. P. Sayer, S. D. Whicker, D. C. Saltman, and A. Mant, "All-cause mortality of elderly Australian veterans using COX-2 selective or non-selective NSAIDs: A longitudinal study," *British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 71, no. 6, pp. 936–942, **2011**.
- [9] L. P. Amarnath, A. Srinivas, and A. Ramamurthi, "In vitro hemocompatibility testing of UV-modified hyaluronan hydrogels.," *Biomaterials*, vol. 27, no. 8, pp. 1416–1424, Mar. **2006**.
- [10] E. C. Huskisson, "Glucosamine and chondroitin for osteoarthritis.," *The Journal of international medical research*, vol. 36, no. 6, pp. 1161–1179, **2008**.
- [11] S. Persiani *et al.*, "Synovial and plasma glucosamine concentrations in osteoarthritic patients following oral crystalline glucosamine sulphate at therapeutic dose," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 15, no. 7, pp. 764–772, **2007**.
- [12] M. H. Ross, *Histology : a text and atlas with correlated cell and molecular biology*. Lippincott Williams & Wil, **2006**.
- [13] K. S. Saladin, *Human Anatomy*, 4th ed. New York: McGraw Hill, **2014**.
- [14] E. B. Hunziker, "Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 10, no. 6, pp. 432–463, **2002**.
- [15] M. Daniel, "Role of Surface-Active Lipids in Cartilage Lubrication," *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, vol. 15, pp. 225–243, Jan. **2012**.

- [16] D. Lees and P. Partington, "Articular cartilage," *Orthopaedics and Trauma*, vol. 30, no. 3, pp. 265–272, **2016**.
- [17] P. Milner, R. Wilkins, and J. Gibson, "Cellular physiology of articular cartilage in health and disease," *Principles of Osteoarthritis*, **2006**.
- [18] L. P. Gartner and J. L. Hiatt, *Cell Biology and Histology*, 7th ed. Baltimore: Wolters Kluwer Health, **2015**.
- [19] I. Singh, *Textbook of Human Histology With Colour Atlas & Practical Guide*, 6th ed. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, **2011**.
- [20] F. Horkay, "Interactions of Cartilage Extracellular Matrix Macromolecules.," *Journal of polymer science. Part B, Polymer physics*, vol. 50, no. 24, pp. 1699–1705, Dec. **2012**.
- [21] J. A. Buckwalter and H. J. Mankin, "Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions.," *Instructional course lectures*, vol. 47, pp. 477–486, **1998**.
- [22] P. Young, Barbara; O'Dowd, Geraldine; Woodford, *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas*, 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, **2013**.
- [23] T. E. Hardingham and A. J. Fosang, "Proteoglycans: many forms and many functions.," *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 6, no. 3, pp. 861–870, Feb. **1992**.
- [24] M. B. Goldring, "The role of the chondrocyte in osteoarthritis," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 43, no. 9, pp. 1916–1926, **2000**.
- [25] N. S. Gandhi and R. L. Mancera, "The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins," *Chemical Biology and Drug Design*, vol. 72, no. 6, pp. 455–482, **2008**.
- [26] P. M. Van der Kraan and W. B. Van den Berg, "Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: Role in initiation and progression of cartilage degeneration?," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 20, no. 3, pp. 223–232, **2012**.
- [27] B. K. Hall and T. Miyake, "All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development.," *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, vol. 22, no. 2, pp. 138–147, Feb. **2000**.
- [28] R. S. Tuan, "Biology of developmental and regenerative skeletogenesis.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 427 Suppl, pp. S105-17, Oct. **2004**.
- [29] A. M. DeLise, L. Fischer, and R. S. Tuan, "Cellular interactions and signaling in cartilage development," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 8, no. 5, pp. 309–334, Sep. **2000**.
- [30] V. Lefebvre, R. R. Behringer, and B. de Crombrughe, "L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway.," *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 9 Suppl A, pp. S69-75, **2001**.

- [31] B. F. Eames, L. de la Fuente, and J. A. Helms, "Molecular ontogeny of the skeleton.," *Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews*, vol. 69, no. 2, pp. 93–101, May **2003**.
- [32] L. A. Fortier, J. U. Barker, E. J. Strauss, T. M. McCarrel, and B. J. Cole, "The role of growth factors in cartilage repair," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 469, no. 10, pp. 2706–2715, **2011**.
- [33] E. N. Blaney Davidson, A. P. M. van Caam, and P. M. van der Kraan, "Osteoarthritis year in review 2016: biology," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 25, no. 2, pp. 175–180, **2017**.
- [34] J. Fan, Y. Gong, L. Ren, R. R. Varshney, D. Cai, and D.-A. Wang, "In vitro engineered cartilage using synovium-derived mesenchymal stem cells with injectable gellan hydrogels.," *Acta biomaterialia*, vol. 6, no. 3, pp. 1178–1185, Mar. **2010**.
- [35] H. Diao *et al.*, "Improved cartilage regeneration utilizing mesenchymal stem cells in TGF-beta1 gene-activated scaffolds.," *Tissue engineering. Part A*, vol. 15, no. 9, pp. 2687–2698, Sep. **2009**.
- [36] A. C. Bakker *et al.*, "Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation.," *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 9, no. 2, pp. 128–136, Feb. **2001**.
- [37] E. N. Blaney Davidson, P. M. van der Kraan, and W. B. van den Berg, "TGF-beta and osteoarthritis.," *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 15, no. 6, pp. 597–604, Jun. **2007**.
- [38] T. Kurth *et al.*, "Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate.," *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 15, no. 10, pp. 1178–1189, Oct. **2007**.
- [39] L. J. Sandell, J. V. Sugai, and S. B. Trippel, "Expression of collagens I, II, X, and XI and aggrecan mRNAs by bovine growth plate chondrocytes in situ.," *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 12, no. 1, pp. 1–14, Jan. **1994**.
- [40] T. Kirsch, H.-D. Nah, I. M. Shapiro, and M. Pacifici, "Regulated Production of Mineralization-competent Matrix Vesicles in Hypertrophic Chondrocytes," *The Journal of Cell Biology*, vol. 137, no. 5, pp. 1149–1160, Jun, **1997**.
- [41] D. R. Carter, G. S. Beaupré, M. Wong, R. L. Smith, T. P. Andriacchi, and D. J. Schurman, "The Mechanobiology of Articular Cartilage Development and Degeneration.," *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, vol. 427, **2004**.
- [42] D. Cui, Ed., *Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations*, 1st ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, **2011**.
- [43] M. Lotz and B. Carames, "Autophagy and Cartilage Homeostasis Mechanisms in Joint Health, Aging and Osteoarthritis," *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 7, no. 10, pp. 579–587, **2012**.
- [44] S. Udgata, "Osteoarthritis: An Overview," *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences Ver*, vol. 9, no. 5, pp. 2319–7676, **2014**.

- [45] O. Gabay, "Osteoarthritis: New Perspectives," *The Spine Journal*, vol. 40, no. 6, pp. 1301–1315, **2012**.
- [46] S. Küçükşen, "Osteoarthritis Prevention," *European Journal of General Medicine*, vol. 12, no. 1, pp. 96–100, **2015**.
- [47] L. Sandell and T. Aigner, "Articular cartilage and changes in arthritis An introduction: Cell biology of osteoarthritis.," *Arthritis Res*, vol. 3, pp. 107–113, **2001**.
- [48] M Lotz et al., "Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives," *Ann. Rheum. Disease*, vol. 72, pp. 1756–1763, **2013**.
- [49] T. Aigner, J. Rose, J. Martin, and J. Buckwalter, "Aging theories of primary osteoarthritis: from epidemiology to molecular biology.," *Rejuvenation research*, vol. 7, no. 2, pp. 134–145, **2004**.
- [50] R. F. Loeser, "Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix.," *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 17, no. 8, pp. 971–979, Aug. **2009**.
- [51] A. Soyocak, M. Özgen, H. Kurt, D. T. Coşan, İ. Değirmenci, and H. V. Güneş, "MikroRNA' lar ve Osteoartrit," *Osmangazi Tıp Dergisi*, vol. 38, no. 1, pp. 6–17, **2016**.
- [52] C. Harris, ED; Budd, RC; Firestein, GS; Genovese, MC; Segent, JS; Ruddy, S; Sledge, "Osteoartrit patogenezi," in *Kelly's Textbook of Rheumatology*, F. Dinçer, Ed. İstanbul: Güneş Kitapevi, pp. 1493–1513. **2006**.
- [53] P. J. Gregory and C. Fellner, "Dietary supplements as disease-modifying treatments in osteoarthritis: a critical appraisal.," *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*, vol. 39, no. 6, pp. 436–52, **2014**.
- [54] N. Ishiguro *et al.*, "Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover: analyses of synovial fluid from patients with osteoarthritis.," *Arthritis and rheumatism*, vol. 42, no. 1, pp. 129–136, Jan. **1999**.
- [55] Y. Okada *et al.*, "Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium.," *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, vol. 66, no. 6, pp. 680–690, Jun. **1992**.
- [56] I. M. Clark, L. K. Powell, S. Ramsey, B. L. Hazleman, and T. E. Cawston, "The measurement of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), and collagenase-TIMP complex in synovial fluids from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis.," *Arthritis and rheumatism*, vol. 36, no. 3, pp. 372–379, Mar. **1993**.
- [57] R. C. Billinghamurst *et al.*, "Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 99, no. 7, pp. 1534–1545, Apr. **1997**.
- [58] P. G. Mitchell *et al.*, "Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage.," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 97, no. 3, pp. 761–768, Feb, **1996**.

- [59] K. Imai *et al.*, “Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and activation of progelatinase A in human osteoarthritic cartilage.,” *The American Journal of Pathology*, vol. 151, no. 1. pp. 245–256, Jul, **1997**.
- [60] M. L. González-Rodríguez, A. M. Fernández-Romero, and A. M. Rabasco, “Towards the antioxidant therapy in Osteoarthritis: Contribution of nanotechnology,” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 42, pp. 94–106, **2017**.
- [61] B. Poulet and F. Beier, “Targeting oxidative stress to reduce osteoarthritis,” *Arthritis Research & Therapy*, vol. 18. London, **2016**.
- [62] Y. Henrotin, B. Kurz, and T. Aigner, “Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes?,” *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 13, no. 8, pp. 643–654, Aug. **2005**.
- [63] J. M. Dayer, R. Graham, G. Russell, and S. M. Krane, “Collagenase production by rheumatoid synovial cells: stimulation by a human lymphocyte factor,” *Science*, vol. 195, no. 4274, p. 181 LP-183, Jan. **1977**.
- [64] W. P. Arend and J. M. Dayer, “Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis.,” *Arthritis and rheumatism*, vol. 38, no. 2, pp. 151–160, Feb. **1995**.
- [65] M. B. Goldring, “The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models.,” *Connective tissue research*, vol. 40, no. 1, pp. 1–11, **1999**.
- [66] P. M. van der Kraan and W. B. van den Berg, “Anabolic and destructive mediators in osteoarthritis.,” *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, vol. 3, no. 3, pp. 205–211, May **2000**.
- [67] R. M. Clancy, A. R. Amin, and S. B. Abramson, “The role of nitric oxide in inflammation and immunity.,” *Arthritis and rheumatism*, vol. 41, no. 7, pp. 1141–1151, Jul. **1998**.
- [68] M. Lotz, “The role of nitric oxide in articular cartilage damage.,” *Rheumatic diseases clinics of North America*, vol. 25, no. 2, pp. 269–282, May **1999**.
- [69] S. Hashimoto, K. Takahashi, D. Amiel, R. D. Coutts, and M. Lotz, “Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis.,” *Arthritis and rheumatism*, vol. 41, no. 7, pp. 1266–1274, Jul. **1998**.
- [70] P. Garnero, M. Piperno, E. Gineyts, S. Christgau, P. D. Delmas, and E. Vignon, “Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: Relations with disease activity and joint damage,” *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 60, no. 6, pp. 619–626, **2001**.
- [71] J. C. Rousseau *et al.*, “Serum levels of type IIA procollagen amino terminal propeptide (PIIANP) are decreased in patients with knees osteoarthritis and rheumatoid arthritis,” *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 12, no. 6, pp. 440–447, **2004**.
- [72] K. B. King, C. T. Lindsey, T. C. Dunn, M. D. Ries, L. S. Steinbach, and S.

- Majumdar, "A study of the relationship between molecular biomarkers of joint degeneration and the magnetic resonance-measured characteristics of cartilage in 16 symptomatic knees," *Magnetic Resonance Imaging*, vol. 22, no. 8, pp. 1117–1123, **2004**.
- [73] D. R. Dufield, O. V Nemirovskiy, M. G. Jennings, M. D. Tortorella, A. M. Malfait, and W. R. Mathews, "An immunoaffinity liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for detection of endogenous aggrecan fragments in biological fluids: Use as a biomarker for aggrecanase activity and cartilage degradation.," *Analytical biochemistry*, vol. 406, no. 2, pp. 113–123, Nov. **2010**.
- [74] M. Chayanupatkul and S. Honsawek, "Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in plasma and synovial fluid is inversely associated with disease severity of knee osteoarthritis.," *Clinical biochemistry*, vol. 43, no. 13–14, pp. 1133–1137, Sep. **2010**.
- [75] S. Glyn-Jones *et al.*, "Osteoarthritis," *The Lancet*, vol. 386, no. 9991, pp. 376–387, **2015**.
- [76] H. A. Kim *et al.*, "The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes.," *Arthritis and rheumatism*, vol. 54, no. 7, pp. 2152–2163, Jul. **2006**.
- [77] R. Liu-Bryan and R. Terkeltaub, "Chondrocyte innate immune myeloid differentiation factor 88-dependent signaling drives pro-catabolic effects of the endogenous Toll-like receptor 2/Toll-like receptor 4 ligands low molecular weight hyaluronan and high mobility group box chromosomal protein.," *Arthritis and rheumatism*, vol. 62, no. 7, pp. 2004–2012, Jul. **2010**.
- [78] R. Liu-Bryan, K. Pritzker, G. S. Firestein, and R. Terkeltaub, "TLR2 signaling in chondrocytes drives calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate crystal-induced nitric oxide generation.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 174, no. 8, pp. 5016–5023, Apr. **2005**.
- [79] Q. Wang *et al.*, "Identification of a central role for complement in osteoarthritis.," *Nature medicine*, vol. 17, no. 12, pp. 1674–1679, Nov. **2011**.
- [80] R. F. Loeser *et al.*, "Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis.," *Arthritis and rheumatism*, vol. 52, no. 8, pp. 2376–2385, Aug. **2005**.
- [81] E. Tamir, D. Robinson, R. Koren, G. Agar, and N. Halperin, "Intra-articular hyaluronan injections for the treatment of osteoarthritis of the knee: a randomized, double blind, placebo controlled study," *Clin Exp Rheumatol*, vol. 19, no. 3, pp. 265–270, **2001**.
- [82] G. Kogan, L. Šoltés, R. Stern, and P. Gemeiner, "Hyaluronic acid: A natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications," *Biotechnology Letters*, vol. 29, no. 1, pp. 17–25, **2007**.
- [83] A. Migliore, "Effectiveness and utility of hyaluronic acid in osteoarthritis," *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, no. 11, pp. 31–33, **2015**.

- [84] D. S. Kalman, M. Heimer, A. Valdeon, H. Schwartz, and E. Sheldon, "Effect of a natural extract of chicken combs with a high content of hyaluronic acid (Hyal-Joint) on pain relief and quality of life in subjects with knee osteoarthritis: a pilot randomized double-blind placebo-controlled trial.," *Nutrition journal*, vol. 7, p. 3, Jan. **2008**.
- [85] S. F. Brockmeier and B. S. Shaffer, "Viscosupplementation therapy for osteoarthritis.," *Sports medicine and arthroscopy review*, vol. 14, no. 3, pp. 155–162, Sep. **2006**.
- [86] J. Hodge-Dufour *et al.*, "Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 159, no. 5, pp. 2492–2500, Sep. **1997**.
- [87] M. H. Siegelman, H. C. DeGrendele, and P. Estess, "Activation and interaction of CD44 and hyaluronan in immunological systems.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 66, no. 2, pp. 315–321, Aug. **1999**.
- [88] J. J. Cao *et al.*, "Hyaluronan increases RANKL expression in bone marrow stromal cells through CD44.," *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 20, no. 1, pp. 30–40, Jan. **2005**.
- [89] J. R. Watterson and J. M. Esdaile, "Viscosupplementation: therapeutic mechanisms and clinical potential in osteoarthritis of the knee.," *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, vol. 8, no. 5, pp. 277–284, **2000**.
- [90] C.-T. Wang, J. Lin, C.-J. Chang, Y.-T. Lin, and S.-M. Hou, "Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee. A meta-analysis of randomized controlled trials.," *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 86–A, no. 3, pp. 538–545, Mar. **2004**.
- [91] Y. Henrotin *et al.*, "Consensus statement on viscosupplementation with hyaluronic acid for the management of osteoarthritis," *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, vol. 45, no. 2, pp. 140–149, **2015**.
- [92] M. Benefit, "Intra-Articular Hyaluronan Injections for Osteoarthritis (20131)," **2009**.
- [93] D. H. Neustadt, "Intra-articular injections for osteoarthritis of the knee," *Cleve Clin J Med*, vol. 73, no. 10, pp. 897-898,901-904,906-911, **2006**.
- [94] L. W. Moreland, "Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action.," *Arthritis research & therapy*, vol. 5, no. 2, pp. 54–67, **2003**.
- [95] M. Akmal, "The effects of hyaluronic acid on articular chondrocytes," *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume*, vol. 87–B, no. 8, pp. 1143–1149, **2005**.
- [96] K. Kawasaki, M. Ochi, Y. Uchio, N. Adachi, and M. Matsusaki, "Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 179, no. 2, pp. 142–148, **1999**.
- [97] C. Doria, G. R. Mosele, G. Caggiari, L. Puddu, and E. Ciurlia, "Treatment

of Early Hip Osteoarthritis: Ultrasound-Guided Platelet Rich Plasma versus Hyaluronic Acid Injections in a Randomized Clinical Trial,” *Joints*, vol. 5, no. 3. Stuttgart · New York, pp. 152–155, Sep. **2017**.

- [98] M. Ishijima *et al.*, “Intra-articular hyaluronic acid injection versus oral non-steroidal anti-inflammatory drug for the treatment of knee osteoarthritis: a multi-center, randomized, open-label, non-inferiority trial,” *Arthritis Research & Therapy*, vol. 16, no. 1, p. R18, **2014**.
- [99] M. Elsayy, SA; Hamdy, M; Ahmed, “Intra-articular injection of hyaluronic acid for treatment of osteoarthritis knee: comparative study to intra-articular corticosteroids,” *Egyptian Rheumatology and Rehabilitation*, vol. 44, pp. 153–158, **2017**.
- [100] S. H. Han, D. Y. Park, and T. H. Kim, “Prognostic factors after intra-articular hyaluronic acid injection in ankle osteoarthritis,” *Yonsei Medical Journal*, vol. 55, no. 4, pp. 1080–1086, **2014**.
- [101] M. Ikeuchi, M. Izumi, K. Aso, N. Sugimura, T. Kato, and T. Tani, “Effects of intra-articular hyaluronic acid injection on immunohistochemical characterization of joint afferents in a rat model of knee osteoarthritis,” *European Journal of Pain (United Kingdom)*, vol. 19, no. 3, pp. 334–340, **2015**.
- [102] W. He *et al.*, “Efficacy and safety of intraarticular hyaluronic acid and corticosteroid for knee osteoarthritis: A meta-analysis,” *International Journal of Surgery*, vol. 39, pp. 95–103, **2017**.
- [103] S. Bisicchia and C. Tudisco, “Hyaluronic acid vs corticosteroids in symptomatic knee osteoarthritis: a mini-review of the literature,” *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, vol. 14, no. 2, pp. 182–185, **2017**.
- [104] G. Görmeli, C. A. Görmeli, B. Ataoglu, C. Çolak, O. Aslantürk, and K. Ertem, “Multiple PRP injections are more effective than single injections and hyaluronic acid in knees with early osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial,” *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, vol. 25, no. 3, pp. 958–965, **2017**.
- [105] R. W. van Brakel and D. Eygendaal, “Intra-articular injection of hyaluronic acid is not effective for the treatment of post-traumatic osteoarthritis of the elbow.,” *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, vol. 22, no. 11, pp. 1199–1203, Nov. **2006**.
- [106] H. 3rd DeGroot, S. Uzunishvili, R. Weir, A. Al-omari, and B. Gomes, “Intra-articular injection of hyaluronic acid is not superior to saline solution injection for ankle arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study.,” *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 94, no. 1, pp. 2–8, Jan. **2012**.
- [107] “Glucosamine.”
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a8625?lang=en®ion=TR>. (**Mayis, 2018**)

- [108] "Chondroitin sulfate.
"https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/y0000280?lang=en®ion=TR. (Mayis, 2018)
- [109] O. Bruyere *et al.*, "Total joint replacement after glucosamine sulphate treatment in knee osteoarthritis: results of a mean 8-year observation of patients from two previous 3-year, randomised, placebo-controlled trials.," *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 16, no. 2, pp. 254–260, Feb. 2008.
- [110] C. G. Jackson *et al.*, "The human pharmacokinetics of oral ingestion of glucosamine and chondroitin sulfate taken separately or in combination," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 18, no. 3, pp. 297–302, 2010.
- [111] K. Naito *et al.*, "Evaluation of the effect of glucosamine on an experimental rat osteoarthritis model," *Life Sciences*, vol. 86, no. 13–14, pp. 538–543, 2010.
- [112] A. Tomonaga, M. Fukagawa, H. Ikeda, T. Hori, M. Ohkawara, and I. Nagaoka, "Evaluation of the effect of the administration of an N-acetylglucosamine-containing green tea supplement on biomarkers for cartilage metabolism in healthy individuals without symptoms of arthritis: a randomized double-blind placebo-controlled clinical st.," *Functional Foods in Health and Disease*, vol. 6, no. 12, pp. 788–808, 2016.
- [113] D. Kubomura, T. Ueno, M. Yamada, A. Tomonaga, and I. Nagaoka, "Effect of N-acetylglucosamine administration on cartilage metabolism and safety in healthy subjects without symptoms of arthritis: A case report," *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 13, no. 4, pp. 1614–1621, 2017.
- [114] M. Meulyzer *et al.*, "Comparison of pharmacokinetics of glucosamine and synovial fluid levels following administration of glucosamine sulphate or glucosamine hydrochloride," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 16, no. 9, pp. 973–979, 2008.
- [115] I. Setnikar, C. Giachetti, and G. Zanolo, "Absorption, distribution and excretion of radioactivity after a single intravenous or oral administration of [¹⁴C] glucosamine to the rat.," *Pharmatherapeutica*, vol. 3, no. 8, pp. 538–550, 1984.
- [116] C. L. Deal and R. W. Moskowitz, "Nutraceuticals as therapeutic agents in osteoarthritis. The role of glucosamine, chondroitin sulfate, and collagen hydrolysate.," *Rheumatic diseases clinics of North America*, vol. 25, no. 2, pp. 379–395, May 1999.
- [117] A. Conte, N. Volpi, L. Palmieri, I. Bahous, and G. Ronca, "Biochemical and pharmacokinetic aspects of oral treatment with chondroitin sulfate.," *Arzneimittel-Forschung*, vol. 45, no. 8, pp. 918–925, Aug. 1995.
- [118] T. Conrozier, "[Anti-arthrosis treatments: efficacy and tolerance of chondroitin sulfates (CS 4&6)].," *Presse medicale (Paris, France : 1983)*, vol. 27, no. 36, pp. 1862–1865, Nov. 1998.
- [119] D. O. Clegg *et al.*, "Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis.," *The New England journal of*

medicine, vol. 354, no. 8, pp. 795–808, Feb. **2006**.

- [120] A. J. Das and T. A. Hammad, “Efficacy of a combination of FCHG49 glucosamine hydrochloride, TRH122 low molecular weight sodium chondroitin sulfate and manganese ascorbate in the management of knee osteoarthritis.,” *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 8, no. 5, pp. 343–350, Sep. **2000**.
- [121] J. B. Houpt, R. McMillan, C. Wein, and S. D. Paget-Dellio, “Effect of glucosamine hydrochloride in the treatment of pain of osteoarthritis of the knee.,” *The Journal of rheumatology*, vol. 26, no. 11, pp. 2423–2430, Nov. **1999**.
- [122] R. Hughes and A. Carr, “A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of glucosamine sulphate as an analgesic in osteoarthritis of the knee.,” *Rheumatology (Oxford, England)*, vol. 41, no. 3, pp. 279–284, Mar. **2002**.
- [123] J. P. Rindone, D. Hiller, E. Collacott, N. Nordhaugen, and G. Arriola, “Randomized, controlled trial of glucosamine for treating osteoarthritis of the knee.,” *The Western journal of medicine*, vol. 172, no. 2, pp. 91–94, Feb. **2000**.
- [124] E. C. Rodriguez-Merchan, “Intraarticular Injections of Platelet-rich Plasma (PRP) in the Management of Knee Osteoarthritis.,” *Archives of bone and joint surgery*, vol. 1, no. 1, pp. 5–8, **2013**.
- [125] M. Dohan Ehrenfest David, “Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives,” *Muscle, Ligaments and Tendons Journal*, vol. 4, no. 1, pp. 3–9, **2014**.
- [126] P. Ornetti, G. Nourissat, F. Berenbaum, J. Sellam, P. Richette, and X. Chevalier, “Does platelet-rich plasma have a role in the treatment of osteoarthritis?,” *Joint Bone Spine*, vol. 83, no. 1, pp. 31–36, **2016**.
- [127] S. Patel, M. S. Dhillon, S. Aggarwal, N. Marwaha, and A. Jain, “Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: A prospective, double-blind, randomized trial,” *American Journal of Sports Medicine*, vol. 41, no. 2, pp. 356–364, **2013**.
- [128] L. Shen, T. Yuan, S. Chen, X. Xie, and C. Zhang, “The temporal effect of platelet-rich plasma on pain and physical function in the treatment of knee osteoarthritis: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials,” *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, vol. 12, no. 1, pp. 1–12, **2017**.
- [129] B. Forogh, E. Mianehsaz, S. Shoaee, T. Ahadi, G. R. Raissi, and S. Sajadi, “Effect of single injection of platelet-rich plasma in comparison with corticosteroid on knee osteoarthritis: a double-blind randomized clinical trial.,” *The Journal of sports medicine and physical fitness*, vol. 56, no. 7–8, pp. 901–908, **2016**.
- [130] R. M. Fawzy, N. I. Hashaad, and A. I. Mansour, “Decrease of serum biomarker of type II Collagen degradation (Coll2-1) by intra-articular

- injection of an autologous plasma-rich-platelet in patients with unilateral primary knee osteoarthritis,” *European Journal of Rheumatology*, vol. 4, no. 2, pp. 93–97, **2017**.
- [131] C. P. C. Chen, C. H. Cheng, C. C. Hsu, H. C. Lin, Y. R. Tsai, and J. L. Chen, “The influence of platelet rich plasma on synovial fluid volumes, protein concentrations, and severity of pain in patients with knee osteoarthritis,” *Experimental Gerontology*, vol. 93, pp. 68–72, **2017**.
- [132] L. Smolina and L. Khimion, “SAT0462 Autologous Platelet-Rich Plasma (PRP) in Osteoarthritis Treatment,” *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 75, no. Suppl 2, p. 838.2-838, **2016**.
- [133] A. Gobbi, D. Lad, and G. Karnatzikos, “The effects of repeated intra-articular PRP injections on clinical outcomes of early osteoarthritis of the knee.,” *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA*, vol. 23, no. 8, pp. 2170–2177, Aug. **2015**.
- [134] E. Ayhan, “Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis,” *World Journal of Orthopedics*, vol. 5, no. 3, p. 351, **2014**.
- [135] T. E. McAlindon *et al.*, “Effect of intra-articular triamcinolone vs saline on knee cartilage volume and pain in patients with knee osteoarthritis a randomized clinical trial,” *JAMA - Journal of the American Medical Association*, vol. 317, no. 19, pp. 1967–1975, **2017**.
- [136] D. R. Lichtenstein, S. Syngal, and M. M. Wolfe, “Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the gastrointestinal tract. The double-edged sword.,” *Arthritis and rheumatism*, vol. 38, no. 1, pp. 5–18, Jan. **1995**.
- [137] A. Singh *et al.*, “The role of stem cells in osteoarthritis: An experimental study in rabbits.,” *Bone & joint research*, vol. 3, no. 2, pp. 32–7, **2014**.
- [138] G. Desando *et al.*, “Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model,” *Arthritis Research & Therapy*, vol. 15, no. 1, p. R22, **2013**.
- [139] H. Bansal *et al.*, “Intra-articular injection in the knee of adipose derived stromal cells (stromal vascular fraction) and platelet rich plasma for osteoarthritis,” *Journal of Translational Medicine*, vol. 15, no. 1, pp. 1–11, **2017**.
- [140] J. M. Lamo-Espinosa *et al.*, “Intra-articular injection of two different doses of autologous bone marrow mesenchymal stem cells versus hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: Multicenter randomized controlled clinical trial (phase I/II),” *Journal of Translational Medicine*, vol. 14, no. 1, pp. 1–9, **2016**.
- [141] M. Emadedin *et al.*, “Long-Term Follow-up of Intra-articular Injection of Autologous Mesenchymal Stem Cells in Patients with Knee, Ankle, or Hip Osteoarthritis.,” *Archives of Iranian medicine*, vol. 18, no. 6, pp. 336–344, Jun. **2015**.
- [142] C. H. Jo *et al.*, “Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial.,” *Stem cells (Dayton, Ohio)*, vol. 32, no. 5, pp. 1254–1266, May **2014**.

- [143] N. Yokota, M. Yamakawa, T. Shirata, T. Kimura, and H. Kaneshima, "Clinical results following intra-articular injection of adipose-derived stromal vascular fraction cells in patients with osteoarthritis of the knee," *Regenerative Therapy*, vol. 6, pp. 108–112, **2017**.
- [144] M. Al-Najar *et al.*, "Intra-articular injection of expanded autologous bone marrow mesenchymal cells in moderate and severe knee osteoarthritis is safe: A phase I/II study," *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, vol. 12, no. 1, pp. 1–6, **2017**.
- [145] R. Bastos *et al.*, "Intra-articular injections of expanded mesenchymal stem cells with and without addition of platelet-rich plasma are safe and effective for knee osteoarthritis.," *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA*, Mar. **2018**.
- [146] Y. G. Koh, Y. J. Choi, O. R. Kwon, and Y. S. Kim, "Second-Look Arthroscopic Evaluation of Cartilage Lesions After Mesenchymal Stem Cell Implantation in Osteoarthritic Knees.," *The American journal of sports medicine*, vol. 42, no. 7, pp. 1628–1637, Jul. **2014**.
- [147] Y. S. Kim *et al.*, "Mesenchymal stem cell implantation in osteoarthritic knees: is fibrin glue effective as a scaffold?," *The American journal of sports medicine*, vol. 43, no. 1, pp. 176–185, Jan. **2015**.
- [148] M. Maumus *et al.*, "Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis.," *Stem cell research*, vol. 11, no. 2, pp. 834–844, Sep. **2013**.
- [149] E. M. Fennema, A. J. S. Renard, A. Leusink, C. A. van Blitterswijk, and J. de Boer, "The effect of bone marrow aspiration strategy on the yield and quality of human mesenchymal stem cells.," *Acta orthopaedica*, vol. 80, no. 5, pp. 618–621, Oct. **2009**.
- [150] E. U. Alt *et al.*, "Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties.," *Stem cell research*, vol. 8, no. 2, pp. 215–225, Mar. **2012**.
- [151] O. Aydin *et al.*, "In vitro and in vivo evaluation of doxycycline-chondroitin sulfate/PCLmicrospheres for intraarticular treatment of osteoarthritis," *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, vol. 103, no. 6, pp. 1238–1248, **2015**.
- [152] P. Maudens, S. Meyer, C. A. Seemayer, O. Jordan, and E. Allémann, "Self-assembled thermoresponsive nanostructures of hyaluronic acid conjugates for osteoarthritis therapy," *Nanoscale*, vol. 10, no. 4, pp. 1845–1854, **2018**.
- [153] E. Şükür, C. Talu, Y. E. Akman, E. Çirci, Y. Öztürkmen, and T. Tüzüner, "Comparison of the chondroprotective effect of a novel hydrogel compound and traditional hyaluronate on rat cartilage in a papain-induced osteoarthritis model," *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*, vol. 50, no. 4, pp. 458–463, **2016**.
- [154] M. Bottini, K. Bhattacharya, B. Fadeel, A. Magrini, N. Bottini, and N. Rosato, "Nanodrugs to target articular cartilage: An emerging platform for osteoarthritis therapy.," *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, vol. 12, no. 2, pp. 255–268, Feb. **2016**.

- [155] M.-L. Kang, J.-E. Kim, and G.-I. Im, "Thermoresponsive nanospheres with independent dual drug release profiles for the treatment of osteoarthritis.," *Acta biomaterialia*, vol. 39, pp. 65–78, Jul. **2016**.
- [156] J. B. Lin, S. Poh, and A. Panitch, "Controlled release of anti-inflammatory peptides from reducible thermosensitive nanoparticles suppresses cartilage inflammation.," *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, vol. 12, no. 7, pp. 2095–2100, Oct. **2016**.
- [157] K. Roy, R. K. Kanwar, and J. R. Kanwar, "Molecular targets in arthritis and recent trends in nanotherapy," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 10, pp. 5407–5420, **2015**.
- [158] L. R. Eichaker, H. Cho, C. L. Duvall, T. A. Werfel, and K. A. Hasty, "Future nanomedicine for the diagnosis and treatment of osteoarthritis.," *Nanomedicine (London, England)*, vol. 9, no. 14, pp. 2203–2215, Jul. **2014**.
- [159] X. feng Yin, L. liang Wang, and X. cheng Chu, "A novel chondroitin sulfate decorated nano platinum for the treatment of osteoarthritis," *Materials Science and Engineering C*, vol. 78, pp. 452–456, **2017**.
- [160] J. Dong, D. Jiang, Z. Wang, G. Wu, L. Miao, and L. Huang, "Intra-articular delivery of liposomal celecoxib-hyaluronate combination for the treatment of osteoarthritis in rabbit model.," *International journal of pharmaceutics*, vol. 441, no. 1–2, pp. 285–290, Jan. **2013**.
- [161] C.-C. Yeh *et al.*, "Evaluation of the protective effects of curcuminoid (curcumin and bisdemethoxycurcumin)-loaded liposomes against bone turnover in a cell-based model of osteoarthritis.," *Drug design, development and therapy*, vol. 9, pp. 2285–2300, **2015**.
- [162] A. Jain, S. K. Mishra, P. R. Vuddanda, S. K. Singh, R. Singh, and S. Singh, "Targeting of diacerein loaded lipid nanoparticles to intra-articular cartilage using chondroitin sulfate as homing carrier for treatment of osteoarthritis in rats.," *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, vol. 10, no. 5, pp. 1031–1040, Jul. **2014**.
- [163] K. Y. Choi *et al.*, "Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential drug carrier for cancer therapy: synthesis, characterization, and in vivo biodistribution," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 19, no. 24, p. 4102, **2009**.
- [164] M. Dominici *et al.*, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.," *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315–7, Jan. **2006**.
- [165] H. Laroui *et al.*, "Hyaluronate-covered nanoparticles for the therapeutic targeting of cartilage.," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 12, pp. 3879–3885, Dec. **2007**.
- [166] K. Y. Choi *et al.*, "PEGylation of hyaluronic acid nanoparticles improves tumor targetability in vivo," *Biomaterials*, vol. 32, no. 7, pp. 1880–1889, **2011**.
- [167] H. Yao *et al.*, "Glucosamine-modified polyethylene glycol hydrogel-mediated chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem

- cells," *Materials Science and Engineering C*, vol. 79, pp. 661–670, **2017**.
- [168] A. Derfoul, A. D. Miyoshi, D. E. Freeman, and R. S. Tuan, "Glucosamine promotes chondrogenic phenotype in both chondrocytes and mesenchymal stem cells and inhibits MMP-13 expression and matrix degradation.," *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 15, no. 6, pp. 646–655, Jun. **2007**.
- [169] G. R. Dodge and S. A. Jimenez, "Glucosamine sulfate modulates the levels of aggrecan and matrix metalloproteinase-3 synthesized by cultured human osteoarthritis articular chondrocytes.," *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 11, no. 6, pp. 424–432, Jun. **2003**.
- [170] L. Lippiello, "Glucosamine and chondroitin sulfate: Biological response modifiers of chondrocytes under simulated conditions of joint stress," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 11, no. 5, pp. 335–342, **2003**.
- [171] C. Bassleer, L. Rovati, and P. Franchimont, "Stimulation of proteoglycan production by glucosamine sulfate in chondrocytes isolated from human osteoarthritic articular cartilage in vitro," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 6, no. 6, pp. 427–434, **1998**.
- [172] D. Stoppoloni *et al.*, "Effect of glucosamine and its peptidyl-derivative on the production of extracellular matrix components by human primary chondrocytes," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 23, no. 1, pp. 103–113, **2015**.
- [173] E. J. Uitterlinden *et al.*, "Glucosamine reduces anabolic as well as catabolic processes in bovine chondrocytes cultured in alginate," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 15, no. 11, pp. 1267–1274, **2007**.
- [174] E. J. Uitterlinden *et al.*, "Glucosamine decreases expression of anabolic and catabolic genes in human osteoarthritic cartilage explants," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 14, no. 3, pp. 250–257, **2006**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Şebnem Şahin
Doğum Yeri : Ankara
Medeni Hali : Bekar
E-posta : sebnemsahin22@gmail.com
Adresi : Batısitesi Mah., Batıkent, Yenimahalle/Ankara

Eğitim

Lise : Batıkent Lisesi, 2009
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2013
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, 2018

Yabancı Dil Düzeyi

İngilizce: Çok iyi

İş Deneyimi

2016 Eylül - 2018 Haziran: Biyoloji Öğretmeni, FenCebir Akademi (Çankaya / Ankara)
2013 Eylül – 2016 Haziran: Biyoloji Öğretmeni, Eylül Özel Öğretim Kursları (Çankaya/ Ankara)
2013 / Şubat : Staj, Gen-Art Kadın Sağlığı ve Üreme Biyoteknolojisi Merkezi (Çankaya/Ankara)

Deneyim Alanları

Hücre Kültürü Teknikleri

- Hücre dondurma / çözme
- Hücre pasajlama
- Besiyeri hazırlama
- Dokudan hücre izolasyonu

in vitro Hücre Toksikite / Proliferasyon Testleri

- WST-1

- MTT
- xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Bilimsel Başarı Desteği, “Kovalent olarak bağlanmış kondroitin sülfat (CS) ve glikozaminoglikan (GAG) içeren hyaluronan (HA) nano partiküllerin (CS-GAG-nHA) geliştirilerek yapısal özelliklerinin belirlenmesi ve *in vitro* osteoartrit modelindeki etkilerinin araştırılması.” , 1 ay, Aralık 2016, 7,219 TL.

Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Araştırma Projesi, “Kovalent olarak bağlanmış kondroitin sülfat (CS) ve glikozaminoglikan (GAG) içeren hyaluronan (HA) nano kürelerin (CS-GAG-nHA) geliştirilerek yapısal özelliklerinin belirlenmesi ve *in vitro* osteoartrit modelindeki etkilerinin araştırılması.” 12 ay, Eylül 2016, 9,650,01 TL.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

2018 / Mayıs 10 – 13: Sözlü Bildiri, 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (THED), “Glikozamin bağlı hiyalüronik asit nanopartiküllerin *in vitro* osteoartritli kıkırdak hücre modellerine etkileri”, (Su Otel, Antalya, Türkiye)

2017 / Ekim 24 – 28: Poster Bildirisi, Birincilik Ödülü, 27. Ulusal Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi, “Kondroitin Sülfat (CS) ve Glikozamin (GA) Bağlı Hyalüronik Asit (HA) Nanopartiküller (CS-GA-nHA) Osteoartritli Diz Eklemini İyileştirir mi? : Yeni Bir Enjekte Edilebilir Doku Mühendisliği Yaklaşımı” (Sueno Belek Kongre Merkezi, Antalya, Türkiye)

2017 / Eylül 13 – 15 : Poster Bildirisi, European Orthopaedic Research Society (EORS), “Chondroitin Sulfate (CS) and Glucosamine (GA) Conjugated Hyaluronic Acid Nanoparticles (nHA) May Improve Osteoarthritic Joint Cartilage : A New Injectable Tissue Engineering Approach” (Münih, Almanya)



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 18/06/2018

Tez Başlığı / Konusu: GLUKOZAMİN (GA) BAĞLI HYALURONİK ASİT (HA) NANOPARTİKÜLLERİN (GA-NHA) GELİŞTİRİLEREK YAPISAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE IN VITRO HÜCRE KÜLTÜRÜNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 68 sayfalık kısmına ilişkin, 18/06/2018 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

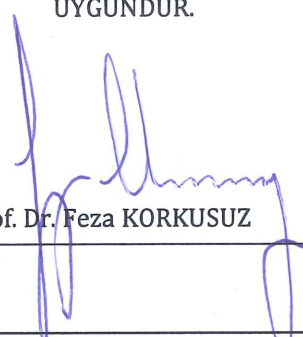
Gereğini saygılarımla arz ederim.


18.06.2018

Adı Soyadı: Şebnem ŞAHİN
Öğrenci No: N14128645
Anabilim Dalı: Nanoteknoloji ve Nanotıp
Programı: Tezli Yüksek Lisans
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.


Prof. Dr. Feza KORKUSUZ