

**SİNOVİAL SIVI VE SİNOVİAL MEMBRAN KAYNAKLI
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN OSTEOJENİK,
KONDROJENİK VE TENDONOJENİK FARKLILAŞMA
ÖZELLİKLERİ**

**THE OSTEOGENIC, CHONDROGENIC AND
TENDONOGENIC DIFFERENTIATION PROPERTIES OF
SYNOVIAL FLUID AND SYNOVIAL MEMBRANE
DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS**

AYGÜN İSAYEVA

Prof. Dr. İBRAHİM VARGEL

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Dürüstlüğüne, alçak gönüllülüğüne, cesaretine, hayata karşı her zaman güçlü duruşuna hep hayran olduğum, hayattayken desteğini ve sevgisini benden esirgemeyen,gücünü ve varlığını hep yanımda hissettiğim, canım babam uzman doktor Tofik İsayev ' e ithafen.

ÖZET

SİNOVİAL SIVI VE SİNOVİAL MEMBRAN KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN OSTEOJENİK, KONDRÖJENİK VE TENDONÖJENİK FARKLILAŞMA ÖZELLİKLERİ

Aygün İSAYEVA

Yüksek Lisans, BİYÖMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim VARGEL

Eylül 2019, 82 sayfa

Sunulan tez çalışmasının amacı sinovyal sıvıdan mezenkimal kök hücre izole edip, bu hücrelerin miktarının, canlılığının ve ilerleyen dönemlerde *in vitro* kondrojenik farklılaşma potansiyellerinin incelenmesidir.

Tez çalışmasının ilk aşamasında anestezi yapılmış genç ve erişkin koyunun diz ve dirsek eklemlerinden steril koşullarda 23 G iğnesi olan 3 ml şırınga ile sinovyal sıvı aspirasyonu yapılmıştır. Çalışmanın sonraki aşamasında sinovyal sıvıdan mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı için MTT testine gerek duyulmadı çünkü hücreler uzun fibroblastoid görünümlü, granülaritesi az, yapışıp çoğalan, canlı ve sağlıklı hücreler idi.

Daha sonra sinovyum (SMKH) kökenli mezenkimal kök hücrelerin osteojenik ve adipojenik büyüme ve farklılaşma ortamı olmak üzere iki farklı koşulda multipotensi özellikleri incelenmiştir. Osteojenik farklılaşma için Alizarin Red, adipojenik farklılaşma için ise Oil Red O boyama yöntemleri kullanılmıştır.

Sonuç olarak koyunun diz ve dirsek eklemlerinden elde edilen sinovial sıvıdan izole edilen MKH'ler morfolojik olarak uzun fibroblast görünümlü, canlı, kültür kabına yapışıp çoğalan hücreler idi. SMKH'ler %30-40 civarında osteojenik ve %30-40 civarında da adipojenik farklılaşma gösterdi. Osteoblast öncülerine farklılaşan SMKH'lerin hücrelerin ekstraselüler matriksinde 21. günün sonunda kalsifikasyon ve kalsiyum depoları tespit edildi. Osteojenik farklılaşma 21. günün sonunda Alizarin Red ile boyanan hücrelerde kalsiyum fosfat birikimi ile tanımlandı. Adipositlerde ise yağ hücresi fenotipi görülmektedir. Yani trigliseridlerin toplandığı büyük ve yuvarlak yağ damlacığı ortaya çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Sinovial Sıvı, MKH, Kondrosit, Sinovial Membran, Adipojenik Farklılaşma, Osteojenik Farklılaşma

ABSTRACT

THE OSTEOGENIC, CHONDROGENIC AND TENDONOGENIC DIFFERENTIATION PROPERTIES OF SYNOVIAL FLUID AND SYNOVIAL MEMBRANE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

Aygun ISAYEVA

Master of Science, Devision of BIOENGINEERING

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim VARGEL

September 2019, 82 pages

The aim of this study is to isolate mesenchymal stem cells from synovial fluid and to investigate the amount, viability and chondrogenic differentiation potential of these cells in vitro.

In the first stage of the thesis, synovial fluid aspiration was performed from the knee and elbow joints of anesthetized young and adult sheep with a 3 G syringe with a 23 G needle under sterile conditions. In the next stage, isolation of mesenchymal stem cells from synovial fluid was performed. No MTT test was required for cell viability because the cells were viable and healthy cells with long fibroblastoid appearance, low granularity, adhesion and proliferation.

Then, the multipotency properties of synovium (SMKH) derived mesenchymal stem cells under two conditions, osteogenic and adipogenic growth and differentiation medium,

were investigated. Alizarin Red was used for osteogenic differentiation and Oil Red O was used for adipogenic differentiation.

As a result, MSCs isolated from synovial fluid obtained from knee and elbow joints of sheep were morphologically prolonged fibroblast-like, viable cells that adhered to the culture vessel and proliferated. SMCCs showed osteogenic differentiation in 30-40% and adipogenic differentiation in 30-40%. Calcification and calcium depots were detected in the extracellular matrix of cells of SMKHs differentiated to osteoblast precursors at the end of the 21st day. Osteogenic differentiation was defined by calcium phosphate accumulation in Alizarin Red stained cells at the end of the 21st day. Adipocytes show fat cell phenotype. In other words, a large and round droplet of oil is formed in which triglycerides are collected.

Keywords: Synovial Fluid, MSC, Chondrocytes, Synovial Membrane, Adipogenic Differentiation, Osteogenic Differentiation

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında tecrübesi ve engin bilgi birikimiyle bana yol gösteren, sadece hocam olarak değil bir büyüğüm olarak da ilgisini ve dikkatini benden esirgemeyen çok değerli Hocam **Prof. Dr. İbrahim Vargel'e**, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca her an yanımda olarak çalışmamın yürütülmesinde, ihtiyacım olan her bilgiye ulaşmamda ve yaptığım bütün deneylerde bana yardımcı olan, uzman doktor **Hamza Okur'a**,

Tez çalışmamda kullandığım malzemeleri temin etmekte bana yardım eden, çok yoğun ve rahatsız olmasına rağmen beni dinleyen ve yardımcı olan çok değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na**,

Bilimsel anlamda bütün sorularımı yanıtlayan, tatilde olmasına rağmen hiçbir sorumu yanıtsız bırakmayan, kullandığım malzemeleri benim için seçen ve ayıran, çok saygı duyduğum **Öğretim Görevlisi Anıl Sera Çakmak'a**,

Beni her zaman dinleyen ve duygularımı paylaşan, tanıdığım ilk günden beri hep pozitif enerji aldığım çok değerli arkadaşım **Vahid Mohammadi'ye** ve yüksek lisans dönemimin ilk gününden beri hiçbir sorumu yanıtsız bırakmayan, çalışmam boyunca bana hep destek olan, çok sevdiğim arkadaşım **Aliakbar Ebrahimi'ye**

Varlıkları ile beni dünyanın en mutlu insanı yapan, sorumluluk ve paylaşma hisslerini bana öğreten, hayattaki en değerlilerim, sonsuz sevdiğim kardeşlerime;güzeller güzeli **Günel** ve bitanem, yakışıklım, yufka yürekli **Muhammed'e**,

Beni bugünlere getiren, sevgisini, maddi ve manevi desteğini bir an bile esirgemeyen, her daim yanımda olan ve sorgusuz destekleyen, hayatımda hep örnek aldığım, zekasına ve hayata dair görüşlerine hayranlık duyduğum, gösterdiği sonsuz sevgisi, desteği, anlayışı ve sabrı için canım babam **Tofik İsayev'e** ve canım, bitanecik annem **Stare İsayeva'ya**,

En içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Kıkırdak Doku Mühendisliği ve Kullanılan Hücreler	6
2.1.1. Hücre Hatları	16
2.1.2. Ko-kültürler	17
2.2. Kök Hücreler	17
2.2.1. Tarihçe.....	18
2.2.2. Kök Hücre Çeşitleri.....	19
2.3. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)	27
2.3.1. MKH İzolasyonu	27
2.3.2. MKH Karakterizasyonu	32
2.3.3. MKH Farklılaşması	33
2.3.4. MKH Yüzey Belirteçleri	35
2.3.5. MKH Kullanımı	35
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	38
3.1. Kullanılan Malzemeler	38
3.2. Eklem Kapsülünden Sinovial Sıvı Aspirasyonu	38
3.3. Hücre Kültür Çalışmaları	39
3.3.1. Sinovyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu (SMKH)	40
3.4. Hücre Karakterizasyonu	41
3.5.1. SMKH’lerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi	41
3.5.2. Osteojenik Farklılaşma.....	41

3.5.3. Adipojenik Farklılaşma.....	43
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	45
4.1. Sinovyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu (SMKH)	45
4.2. Hücre Kültür Çalışmaları.....	45
4.2.1. Sinovyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu (SMKH)	45
4.3. Hücre Karakterizasyonu	47
4.4. SMKH’lerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi	47
4.4.1 Osteojenik Farklılaşma	47
4.4.2 Adipojenik Farklılaşma.....	52
5. YORUM.....	56
6. KAYNAKLAR	58
EKLER.....	77
EK 1 – Etik Kurul İzin Belgesi	77
EK 2 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	81
ÖZGEÇMİŞ	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Eklem kıkırdağı [15].	7
Şekil 2.2. Kıkırdak dokusunda bulunan hücreler [16].	7
Şekil 2.3. Kıkırdak dokusunda bulunan hücreler [16].	8
Şekil 2.4. a. Mezenkimal hücreler, b. Mezenkimal hücrelerin farklılaşması ile oluşan kondroblastlar, c. Kondroblastlar kendi HDM'lerini sentezlemeye başlayarak birbirlerinden uzaklaşmaya başlaması ve olgunlaşarak kondrositleri oluşturması, d. Kondrositler kendi lakünleri içerisinde çoğalarak izogen hücre gruplarını oluşturması [16].	9
Şekil 2.5. Eklem kıkırdağının kesitsel yapısı [20].	10
Şekil 2.6. Kıkırdak hasarının kendisinden alınan MKH'lerle tedavisi [15].	13
Şekil 2.8. Kıkırdak lezionunu otograft ile tedavisi [15].	15
Şekil 2.9. Kök hücrenin gelişim ve değişim aşamaları [151].	28
Şekil 2.10. Kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı MKH izolasyonu [30].	29
Şekil 2.11. A) Normal sinoviyum mikroskopik görüntüsü. Eklem tipine ve eklem içinde sinoviyanın lokalizasyonuna göre yağ/fibröz doku oranı değişmektedir. (Hematoksilen &Eozin x10). B) Orta derecede OA'lı hastanın dizinden alınan sinoviyal dokunun mikroskopik görüntüsü. Sinoviyal döşeyici hücrelerin (lining cell) hipertrofisi, sinoviositlerin hiperplazisi görülüyor. Artmış vaskülarite ve orta derecede kronik inflamatuvar infiltrasyonun subsinoviyal dokuda görünüşü (Hematoksilen &Eozin x10) [20].	32
Şekil 2.12. Sinoviyal dokunun vasküler ve lenfatik dolaşımı A; Normal sinoviyum (x200 büyütme), vasküler ağı göstermek için faktör 8 ile boyanmış (kırmızı), B; Normal sinoviyum (x200 büyütme), lenfatik ağı göstermek için LYV-1 antikoruna boyanmış (kırmızı) [6].	32
Şekil 2.13. MKH'lerin farklı kullanım alanları [30].	36
Şekil 4.1 Koyun sinovial sıvı kaynaklı MKH ve fibroblast hücreleri. Optik mikroskop görüntülerinde hücrelerin kültür kabının yüzeyine tutunup yayıldıkları ve fibroblast benzeri iğsi bir morfoloji sergiledikleri belirlenmiştir.	46
Şekil 4.2 Optik mikroskopla görüntüleme zamanı giderek artan ve yüzeye tutunup yayılan fibroblast benzeri iğsi bir morfoloji sergileyen koyun sinovial sıvı kaynaklı MKH. İlk resimde MKH ve fibroblastlar görünmektedir, ikinci resimde ise artık MKH belirginleşmiş ve yüzeyi tamamen kaplamıştır.	46
Şekil 4.3 Osteojenik farklılaşma 6. gün: Hücreler birbiri içerisine girmiş, hücre hatları çok net değil (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.	48
Şekil 4.4. Kontrol grubu 6. gün: Hücreleri normal morfolojik görünümde, ancak çok yoğun. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.	48
Şekil 4.5 Osteojenik farklılaşma 13. gün: Hücreler birbiri içerisine girmiş, hücre hatları çok net değil, lakin 6. güne göre hücre hatları daha belirgindir. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.	49

Şekil 4.6 Kontrol grubu 13. gün: Hücreleri normal morfolojik görünümde, ancak çok yoğun. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.	49
Şekil 4.7 Osteojenik farklılaşma 21. gün: Hücreler birbiri içerisine girmiş, hücre hatları çok net değil, lakin 6. ve 13. güne göre hücre hatları daha belirgindir. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.	50
Şekil 4.8 Kontrol grubu 21. gün: Hücreleri normal morfolojik görünümde, ancak çok yoğun. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.	50
Şekil 4.9 Osteojenik farklılaşma 21. gün Alizarin Red boyaması: Hücrelerde oluşan yoğun miktarda kalsiyum birikimleri kırmızı renkte görülmektedir. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.	51
Şekil 4.10 Kontrol grubu 21. gün: Hücreler fibroblast benzeri normal morfolojik görünümde ve hücre yoğunluğu çok fazladır. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.....	51
Şekil 4.11 Adipojenik farklılaşma 6. gün: Hücre morfolojik olarak yuvarlaklaşmaya başlamış, bazı hücrelerde minik lipid dropletleri gözlenmekte. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.	52
Şekil 4.12 Adipojenik farklılaşma 13. gün: hücreler morfolojik olarak yuvarlaklaşmış ancak minik lipid dropletleri net görünmemekte. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.....	53
Şekil 4.13 Adipojenik farklılaşma 21. gün: hücreler morfolojik olarak yuvarlaklaşmış ancak minik lipid dropletleri net görünmemekte. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.....	53
Şekil 4.14 Adipojenik farklılaşma 21. gün Oil Red O boyaması: hücreler morfolojik olarak yuvarlaklaşmış ve minik lipid dropletleri net görünmektedir. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.	54
Şekil 4.15 Kontrol grubu 21. gün Oil Red O boyaması: Hücreleri normal morfolojik görünümde, ancak çok yoğun. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.....	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kollajen tipleri ve bazı özellikleri [16].	12
Çizelge 3.1. Osteojenik farklılaşma medyumunun içinde bulunan kimyasalların listesi [187].	43
Çizelge 3.2. Adipojenik farklılaşma medyumunun içinde bulunan kimyasalların listesi [187].	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

O ₂	Oksijen
CO ₂	Karbon dioksit
HCl	Hidroklorik asit
NaOH	Sodyum hidroksit

Kısaltmalar

AMKH	Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementer Deoksi Ribonükleik Asit
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
DPKH	Diş Pulpası Kök Hücreleri
MKH	Mezenkimal Kök Hücreler
SMKH	Sinovial Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler
ECM	Hücre Dışı Matris
EKH	Embriyonik Kök Hücre
FBS	Fötal Sığır Serumı
HKH	Hematopoetik Kök Hücreler
KiMKH	Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-Difeniltetrazolyum Bromür
P/S	Penisilin/Streptomisin
PBS	Fosfat Tamponu Çözeltilisi
RNA	Ribonükleik Asit

RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SVF	Stromal Vasküler Fraksiyon
TGF- β	Transformik Büyüme Faktörü
uPK	Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler
YKH	Yetişkin Kök Hücreler
OA	Osteoartrit

1. GİRİŞ

İnsanlarda hem yaşa bağlı olarak hem de spor yaralanmaları ve kaza sonucunda dokularda hasarlar oluşur. Küçük boyutlu hasarlarda doku kendisini onarır lakin büyük boyutlu hasarlarda doku kendini onaramıyor. Bu aşamada doku mühendisliği uygulamaları devreye girer. Doku mühendisliğinin temel hedefi laboratuvar koşullarında doku ve organ oluşturarak doku veya organ hasarları zamanı hasarlı bölgeye uygulamaktır. Organ yetmezliği bütün dünyada büyük bir sorun oluşturmaktadır. Organ nakli olmayı bekleyen bazı hastalara kısa zamanda uygun nakil yapılsa da, bazıları ise yıllarca uygun organ nakli beklerken yaşamlarını yitirmektedirler [1]. Son dönemlerde organ transplantasyonu tüm dünyada organ yetmezlikleri için tedavi seçeneği olarak uygulanmaya başlanmış cerrahi bir tedavi girişimidir. Ancak beyin ölümü gerçekleşmiş insanlardan transplantasyon için alınan organlar, organ nakli bekleyen hastaların ihtiyaçlarını karşılamamaktadır. Canlı donörlerden de yapılan organ transplantasyonu yeterli sayıda değil [2].

Bütün bu sorunlar doku mühendisliği yaklaşımlarının önemini gözler önüne sermektedir. Doku mühendisliğinde kullanılmak için uygun olan doku iskeleleri ve ihtiyaç duyulan dokuyu oluşturabilecek fonksiyona sahip hücreler hem tek başlarına, hem de ikisinin kombinasyonu şeklinde uygulanabilir [3].

Eklem kıkırdağının iyileşme potansiyeli sınırlıdır. Subkondral kemiğin delinmesi (mikrokırık oluşturulması) veya eklemin yıkanması gibi mevcut tedavi yöntemleri zamanı ise fibröz kıkırdak oluşur. Kıkırdak doku mühendisliğinde önemli olan hücreler, uygun matriks ve biyosinyallerdir. Uygun matriksle hibrid bir şekilde otolog kondrositlerin transplantasyonu son yıllarda kıkırdak onarımında çok fazla kullanılmaya başlanmıştır [4]. İleri derecede farklılaşmış doku olan eklem kıkırdağının yapısını tip II kollajenler (hücreler arası ağ) ve kondrositler oluşturur. Hücreler arası matriks üç boyutlu proteoglikan yapısındadır ve kayma, soğurma ve yük taşıma gibi işlevler açısından çok önemlidir. Avasküler yapıda olan ve sinovyal sıvıdan beslenen eklem kıkırdağı dokusunda rejenerasyon sınırlı düzeydedir ve doku içerisinde gerçekleşir. Bu yüzden eklem kıkırdağı dejenerasyon zamanı çok zayıf iyileşme gösterir ve bu hasar dejeneratif artrite neden olur. Kıkırdak dokusunun Tip I kollajen ile onarımı onun işlevini yeterince yerine getiremez

çünkü eklem kıkırdığı katmanlarının yapısal ve işlevsel özellikleri farklıdır. Mevcut tedavi yöntemleri (eklemin tek başına yıkanması, abrazyonu, debridmanı, subkondral kemiğin delinmesi) eklemin ancak boyut olarak küçük olan ve yük taşımayan bölgesinde iyi sonuç verir. Mozaikplasti yöntemi ise 4 mm²'ye kadar olan yaralanmalarda iyi sonuçlar verir. Kıkırdak doku mühendisliğindeki kullanılan bir diğer yöntem ise otojen greft yöntemidir yani kıkırdığın kendisinden, ayrıca periost, kemik iliği, kas ve yağ dokularından elde edilen ve laboratuvar ortamında hücre kültürü ile ayrıştırılarak çoğaltılan ve doyumluğa ulaşan kıkırdak benzeri hücrelerin yaralı kıkırdak bölgesine ikinci bir ameliyatla uygulanmasıdır. Ancak, otojen greft için kullanıma uygun olan eklem kıkırdığı kaynağının çok sınırlı olması da sorun oluşturmaktadır. Doku mühendisliğinde bir diğer yöntem ise uygun biyomalzeme iskelelerde büyütülen hücrelerin biyolojik yenilenmeyi sağlamak üzere kıkırdak hasarının olduğu yere enjekte edilmesidir. Kıkırdak yenilenmesi için kullanılan tüm bu tedavi yöntemlerinde amaç klinik olarak uygulanabilen, doğal dokuya benzer ve doğal doku işlevini yerine getiren kıkırdak dokusu üretilmesidir [5].

İnsan vücudu travmalara maruz kaldığında tendon ve ligament yaralanmaları oluşabilir. Bu yaralanmalar hareket fonksiyonunu kısıtladığı için önemli sorunlara neden olabilmektedir. Eğer bu tür yaralanmalar damar ve sinir yaralanmaları ile beraber seyrederse çok tehlikeli olabilir hatta hayati tehlike arz edebilir. Basit bir spor yaralanmasından ciddi bir trafik kazasına kadar birçok neden bu tür travmalara sebep olabilir. Tendon ve ligament yaralanmaları gerilme, yırtılma, künt travma veya delici yaralanma şeklinde olabilir. Bu tür yaralanmalarda bazen doğal iyileşme süreci olmaz veya bu süreci olumsuz etkileyen faktörler ortaya çıkar. Doku mühendisliği uygulamaları tendon ve ligament hasarlarının onarılmasında kullanılabilmektedir. Son zamanlarda bu alanda araştırmalar yapılmakta ve umutverici sonuçlar elde edilmektedir [1].

Kıkırdığın yapısı: eklem yüzeyinden subkondral kemiğe kadar olan alanda 4 tabaka mevcuttur. Buna sebep ise bu alanda olan kondrositlerdeki ve matriksdeki morfolojik değişikliklerdir.

- 1) Yüzeyel tabaka (Süperfisiyal Zon); İki katmandan oluşan en ince tabakadır. Eklem yüzeyinde bulunan bu katın yüzeyinde hücre bulunmaz, lakin üzerinde polisakkaritlerden oluşmuş ince fibriller yer alır. Hücre içermeyen bu alana “lamina splendens” adı verilir. Yüzeyin hemen altında ise uzun ve ince kondrositler eklem yüzeyine paralel olarak yerleşmiştir. Bu bölgede proteoglikan içeriği az, kollajen içeriği ise daha fazladır. Aynı zamanda yüzeysel tabakada diffüzyon yolu ile beslenen kıkırdığın snovial sıvıdan aldığı besin maddeleri de kontrol edilmektedir. Bu tabakanın diğer bir özelliği ise su tutma özelliğidir. Bu tabakada bulunan fibrillerin yapısı nedeniyle germe kuvvetine karşı da dirençlidir. Bu katta oluşan bozukluk mekanik direncin değişmesine, inflamatuvar ve immun yanıt oluşumuna ve sonucunda ise osteoartrite sebep olur.
- 2) Geçiş Tabakası (Transizyonel Zon); Bu bölge sentez yapan organelleri daha fazla gelişen hücrelerden oluşmaktadır. Bu tabakada bulunan sferoidik hücreler proteoglikan konsantrasyonu daha yüksek olan ve daha kalın lifli kollajen sentezlerler.
- 3) Derin Tabaka (Radiyal Zon); Kolonlar şeklinde ve eklem yüzeyine dik olarak yerleşmiş sferoidal kondrositlerden oluşmuş, en kalın kollajen fibrilleri ve en yüksek proteoglikan yoğunluğuna sahip katmandır.
- 4) Kalsifiye Kıkırdak Tabakası; İnce bir bölgedir ve derin tabakayla subkondral kemiği ayırır. Bu tabakada olan hücreler metabolik olarak daha az aktiftir [6].

Kıkırdak doku mühendisliğinde yaygın kullanılan pluripotent kök hücreler kendini yenileme yeteneğiyle yavaş olarak, değişik koşullarda değişik hücrelere dönüşebilirler. Özellikle, mezenkimal kök hücrelerin (MKH) önemli avantajları var: hipo-immunolojiktirler ve hastanın immun sisteminden kaçabilirler, birçok lokal (parakrin) veya endokrin (sistemik) büyüme faktörlerinin etkisiyle morfolojik ve biyolojik değişime uğrayarak kemik, kıkırdak, yağ, kas, vs. gibi dokulara farklılaşabilirler. Dünyada çok yaygın olan ve kıkırdak dokunun dejenerasyona uğramasına neden olan osteoartrit ve romatoid artrit gibi eklem hastalıklarında son yıllarda MKH umutverici olmaya başlamıştır, lakin buna rağmen şimdiye kadar yapılan hiçbir deney sonucunda tamamen doğal ve işlevsel olan artiküler hiyalin kıkırdak dokusu MKH kullanılarak

oluşturulamamıştır [7]. Adipoz doku ve kemik iliği kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında MKH'lerin en önemli kaynağıdır, lakin son zamanlarda literatürde sinovyum kaynaklı MKH'le yapılan çeşitli çalışmaların sonuçları da umut vericidir.

Kemik iliğinden elde edilen MKH'lerin kullanımı yaygın olsa da bu hücrelerin hem yaşam süreleri, hem farklılaşma potansiyelleri, hem de miktarı, donörün yaşı artıkça azalmaktadır yani ters orantılıdır. Ayrıca KiMKH'lerin elde edilmesi invaziv bir işlemdir [8].

MKH'leri elde etmek için kullanılan diğer bir kaynak ise adipoz dokudur. Kemik iliği gibi mezenkimden köken alan adipoz doku içerisinde destek stroması bulundurur ve bu destek stroması kolayca izole edilebilir. Burada bulunan ve kararlı bir büyüme kinetiği ve proliferasyon gösteren kök hücreler, osteojenik, adipojenik, miyojenik, ve kondrojenik farklılaşma gösterebilmektedirler. AMKH'leri MKH'lerden farklı kılan iki yüzey antijeni vardır. AMKH'ler CD-106 açısından negatifken, CD-49 açısından pozitifdir. MKH'ler ise CD-106 açısından pozitif, CD-49 açısından ise negatiftir.. AMKH'lerin CD-106 açısından negatif olması bu antijenlerin non-hematopoietik bir dokuda mevcut olmasından kaynaklanmaktadır [9]. Adipoz dokudan kısa zamanda daha çok MKH elde edilebilmektedir [10].

Sinovyumun en önemli fonksiyonu sinovial sıvıyı salgılamaktır. Sinovial sıvı eklem kıkırdığının beslenmesini ve eklem sürtünmesiz hareketini sağlayan kayganlaştırıcı sıvıdır. Sinovyumun iki hücre katmanı vardır. İç hücre tabakası "intimal lining" ve dış hücre tabakası "sublining" olarak adlandırılır. İç hücre tabakası gevşek ve avaskülerdir ve sinoviyal sıvı üretmektedir. İç hücre tabakasında Tip A hücreler ve Tip B hücreler olmakla iki temel hücre tipi mevcuttur. Kemik iliğinden köken alan Tip A hücreler "makrofaj benzeri" hücrelerdir. Fagositoz, antijen sunumu, büyüme faktörleri, sitokinler, ve inhibitörlerin sentezi ve sekresyonu, doku yıkımına neden olan birçok enzimlerin ve birçok inflamatuvar mediatörün üretiminde rolü vardır. Aynı zamanda Tip A hücreleri neoangiogeneze yani yeni kan damarları oluşumunda önemli rol almaktadır. Tip B hücreler mezenkimal kökenlidir ve morfolojik olarak fibroblastlara benziyorlar. Ribozom

dizileri ve granüllü endoplazmik retikulum gibi salgılayıcı elemanları vardır. Aynı zamanda Uridin difosfoglukoz dehidrogenaz (UDPGD) sentezini yaparlar. UDPGD hyaluronik asit sentezinde rol oynar. Tip B hücreler sitokinler gibi birçok yıkım ve inflamatuvar mediatörlerini sentezleme kapasitesine sahiptir. Kemik ve kıkırdak yıkımında etkin rol oynayan hücrelerdir. Dış hücre tabakası olan ve "sublining" olarak adlandırılan ikinci hücre katmanı ise aselülerdir, fibroblastlar ve kan damarları içerir. "Sinoviyal yüzeyin altında zengin bir mikrovasküler damar ağı mevcuttur." İntimal hücrelerin hemen yakınında ise kapiller damarlar mevcuttur. Çocukların sinoviyalarında bu kapiller belirgin olup, yaş arttıkça sayıları azalır ve doku fibrotik hal alır [11].

Halk arasında kireçlenme ismiyle bilinen, dejeneratif bir eklem hastalığı olan osteoartrit, eklemlerde olan kıkırdak dokusunun yapısında bozulma, kıkırdakta incelme, aşınma ve çevre dokuda bozulmanın eşlik etmesi ile ortaya çıkan ve özellikle yaşlılıkta en çok karşılaşılan bir hastalıktır. Diz, kalça, el bileği ve omurga eklemlerinde daha fazla oluşabilmektedir. Eklem kıkırdağının iyileşme yeteneği sınırlıdır. Eklem kıkırdağı yüksek derece ihtisaslaşmış bağ dokusudur ve muazzam bir mekanik yük emer.

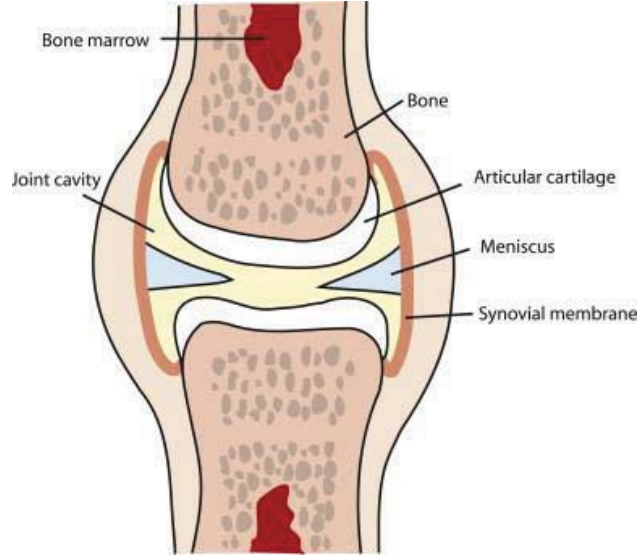
Sinoviyum kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kondrosite farklılaşma potansiyelinin diğer (yağ dokusu, kemik iliği) mezenkimal kök hücrelerine oranla daha fazla olduğu deneylerle kanıtlanmıştır. Sinovial kaynaklı MKH'lerin kemik iliği kaynaklı MKH'e benzer morfoloji ve hücre fenotipi gösterdiği bilinmektedir. Diğer taraftan sinoviyum kaynaklı MKH araştırmalarında sinovial membran daha iyi bir kaynaktır. Çünkü sinovial sıvı kaynaklı MKH'in biyolojik anlaşılabilirliği sınırlıdır. Sinovial sıvıya daha kolay erişilebilir, invaziv bir işlem gerektirmemektedir. OA ve Romatoid Artrit hastalarında da bu alana kolay ulaşılır. Sinovial sıvı kaynaklı MKH'in yüksek üreme hızı ve kondrogenez kapasitesi de vardır. Sinovium kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik, osteojenik ve tendonojenik farklılaşma potansiyellerinin öğrenilmesi ilerleyen zamanlarda OA ve RA başta olmak üzere birçok eklem hastalıklarının tedavisinde yeni bilgilere ulaşılacak ve klinik soruna ışık tutacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

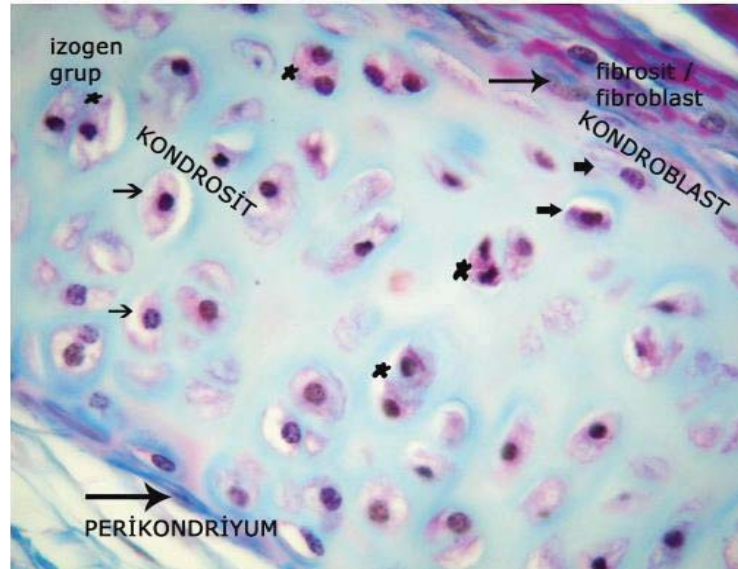
2.1. Kıkırdak Doku Mühendisliği ve Kullanılan Hücreler

Başarılı bir doku mühendisliği için gerekli olan üç bileşen var: regülatuar sinyaller, hücreler ve hücre dışı matriks [12]. Ortak yapı ve işleve sahip olan ve kendileri tarafından salgılanan ara madde ile çevrili olan hücreler grubu dokuları oluşturur. Farklı dokularda bulunan ara maddeler farklılık gösterir: kemik dokuda ara madde katı, kıkırdak dokuda yarıkatı-jelimsi, kan dokusunda ise sıvı şeklindedir. İnsan vücudunda 4 doku türü bulunuyor: epitel, destek, kas ve sinir dokusu. Kıkırdak dokusu da destek dokulara aittir.

Eklem kıkırdağı diğer bağ dokulara (menisküs, ligament, tendon) benzer şekilde hücre, makromoleküler ağ iskeleti ve eklem sıvısından oluşmaktadır. Makroskopik olarak incelendiğinde ise deformasyona dirençli, sert, parlak bir yüzey olarak görünür. Eklem kıkırdağı kas ve kemik dokularına oranla daha düşük metabolik aktivite gösterir. Eklem kıkırdağının yaş ağırlığının yaklaşık %80'ini su oluşturur. Erişkin eklem kıkırdağının yalnızca % 1'ini kondrositler oluşturur. Bu dokunun mekanik özelliklerini belirleyen faktör ise su ile ağ moleküllerinin etkileşimidir. Eklem kıkırdağının % 90-95'ini Tip 2 kollajen oluştursada, Tip 6, 9, 10 ve 11 kollajenlerini de içermektedir. Tüm doku boyunca uzanan Tip 2 kollajen ağı, proteoglikanları da sararak dokunun bütünlüğünü sağlamakla kalmaz aynı zamanda gerilmeye karşı direnç gücünü verir. Kondrositler ağ makromoleküllerini sentezler ve bu ağ makromolekülleri normal eklem hareketleri sırasında hücreyi mekanik hasardan korur. Hücre işlevlerinin düzenlenmesinde yardımcı olan moleküller (sitokinler, büyüme faktörleri), besinler, metabolik artıklar bu ağdan geçerler, hatta bu moleküller ağda depolanabilirler [4, 13,14].

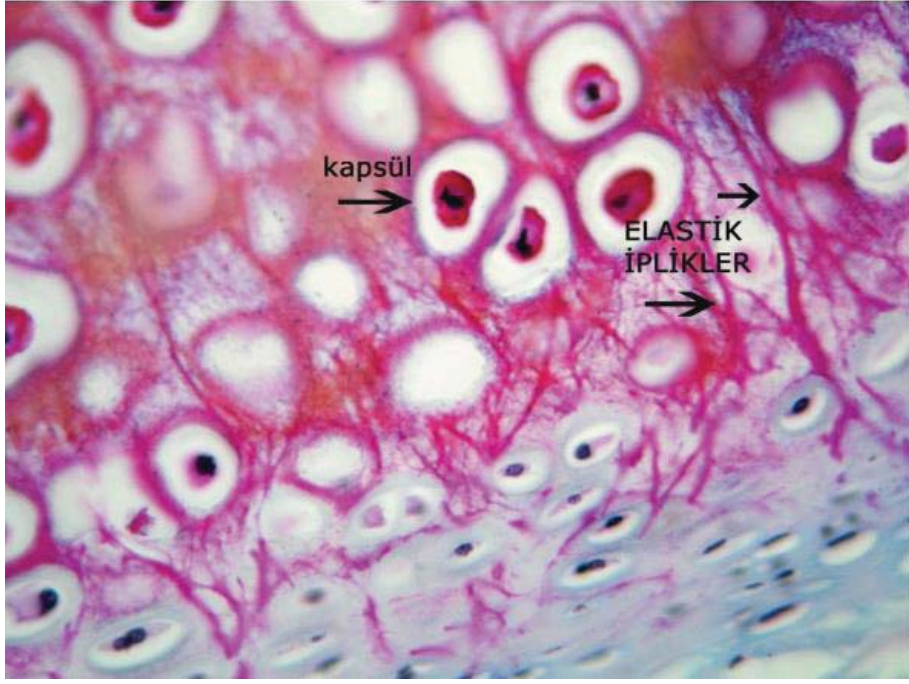


Şekil 2.1. Eklem kıkırdağı [15].



Şekil 2.2. Kıkırdak dokusunda bulunan hücreler [16].

Bağ dokusunun özelleşmiş bir şekli olan kıkırdak dokusunun 3 tipi var: hyalin, elastik ve fibröz kıkırdak. Kıkırdak yumuşak dokuyu destekler ve aynı zamanda doğumdan önce ve sonra uzun kemiklerin oluşumunda rol alır [16].



Şekil 2.3. Kıkırdak dokusunda bulunan hücreler [16].

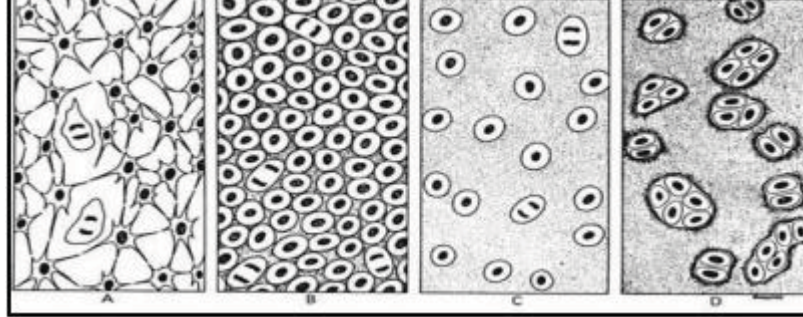
Sinir hücrelerini, kan ve lenf kapillerini içermeyen, avasküler yapıya sahip olan kıkırdak dokusunun hücrelerinin metabolik aktiviteleri düşüktür. Bu doku perikondriumda olan kapillerden ve eklem kavitelerindeki sinovial sıvıdan difüzyonla beslenmektedir. Bu yüzden de kıkırdak dokusunun kendini yenilemesi oldukça sınırlıdır [17].

Kıkırdak dokusu iki şekilde büyür: interstisyel ve apozisyonel. Kondrositlerin mitotik bölünmeleri ile gerçekleşen büyüme interstisyel büyümedir, perikondriumdaki hücrelerin farklılaşması ile gerçekleşen büyüme ise apozisyonel büyümedir. Eklem kıkırdağında perikondrium yoktur ve bu yüzden apozisyonel büyüme de yoktur [16].

Kondrogenез kıkırdak dokusunun oluşum aşamalarına ve gelişim mekanizmasına verilen isimdir. Kıkırdak hücreleri olan kondrositler kanda bulunan besin maddelerini difüzyon yolu ile almaktadırlar. Bu nedenden dolayı kıkırdağın maksimum kalınlığı sınırlıdır. [18].

Hiyalin kıkırdak hücreleri genellikle glikozu metabolize ederek laktik asidi oluşturmaktadırlar [19]. Kıkırdak matriksinde serbest suyun neredeyse hiç bulunmamasının nedeni ise besin maddelerinin çözücü olarak matriksteki serbest suyu

kullanmasıdır [16]. Kıkırdak dokusunda iki tip hücre bulunmaktadır: genç kıkırdak hücreleri olan kondroblastlar ve olgun kıkırdak hücreleri olan kondrositler [16].

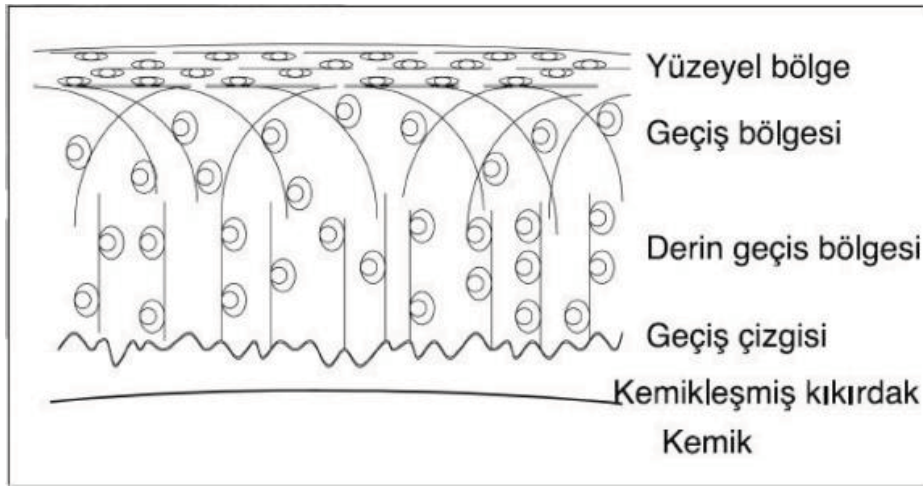


Şekil 2.4. a. Yıldız şeklindeki mezenkimal hücreler, b. Kondroblastlar, c. Kendi matriksini sentezlemeye başlayarak birbirlerinden uzaklaşmaya başlayan ve olgunlaşarak kondrositlere dönüşmekte olan kondroblastlar d. Kendi lakünleri içerisinde çoğalarak izogen hücre grupları oluşturan kondrositler [16].

Eklem kıkırdağı avasküler, alenfatik ve anöral dokudur ve erişkin eklem kıkırdağının toplam hacminin %2'sini kondrositler oluşturmaktadır. Yoğun miktarda kollajen ve proteoglikan içeren karmaşık bir matrikse sahiptir. Bu matriks kıkırdak dokusunun mekanik özelliklerini belirler. Eklem kıkırdağının hacminin %90'ı hücre dışı ara maddeden oluşur ve bu ara maddenin temel bileşenleri su, kollajen, proteoglikandır. Kuru ağırlığının %60'ı kollajen oluşturmaktadır. Bu kollajen liflerinin kendine özgü çapraz dizilimli bir yapısı vardır. Kıkırdağın temel fibriller yapısı ağ örgüsü oluşturan kollajen fibriller ve dev proteoglikanlardan meydana gelir. Su ise kıkırdak ağırlığına %65 ila %85'i oluşturur. Kıkırdak dokusunun kuru ağırlığının % 25 ile %35'i oluşturan proteoglikanlar su tutma yetenekleriyle kıkırdağa basınca karşı bir esneklik ve sertlik verirler. Tip 2 kollajen ise dokunun gerilme kuvveti ve şekline katkı sağlamaktadır. Proteoglikan içeriği derin bölgelerde yüzeysel bölgelere oranla daha yüksek yoğunluktadır. Elektron mikroskobu ile incelendiği zaman eklem kıkırdağının yapısal olarak dört tabakaya ayrıldığı gözükmemektedir:

- 1) Yüzeysel Tabaka (Tanjansiyel zon): Yüksek konsantrasyonda kollajen ve düşük konsantrasyonda proteoglikan içeren matriks sentezleyen küçük ve yassı kondrositler, gerilme kuvveti sağlayan ve eklem kıkırdağına paralel yerleşmiş kollajen liflerden oluşmaktadır.

- 2) Orta Tabaka (Transizyonel zon): En kalın tabakadır, yüzeysel kata göre daha az su ve kollajen içeriğine sahiptir ve gelişigüzel yerleşimli ve büyük çaplı kollajen lifler içerir.
- 3) Derin Tabaka (Bazal zon): Bu katta kondrositlerin metabolik etkinliği on kat daha fazladır ve en büyük çaptaki kollajen liflerini içerir. En düşük konsantrasyonda su ve en yüksek konsantrasyonda proteoglikan içerir.
- 4) Kalsifiye Kıkırdak Bölgesi [20].



Şekil 2.5. Eklem kıkırdığının kesitsel yapısı [20].

Sinoviyal doku: Sinoviyal membran aynı zamanda sinoviyum olarak da adlandırılmaktadır. Sinoviyum vasküler ve mezenşimal bir dokudur. Bütün sinoviyal eklem boşluğunu döşeyen sinoviyum dokusu eklem sıvısı ve onun komponentlerinin üretimini sağlamaktadır. Aynı zamanda eklem boşluğunda bulunan hücre ve bağ dokusu artıklarının da temizlenmesini sağlamaktadır. "Normal sinoviya kan plazması süzüntüsüne (dializatına) hyaluronat ilavesiyle meydana gelir." Hyaluronat eklemde yağlanmasında ve beslenmesinde büyük rol oynamaktadır. Sinovyal hücrelerin kıkırdak dokusunda bulunan hücrelerle aynı öncüden gelmesi onların kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılmasının daha iyi sonuçlara neden olacağını göstermektedir [20].

Kıkırdak Dokusu Tedavi Yöntemleri: Bir çok tedavi yöntemleri mevcuttur (ortopedik ameliyatlar, doku transplantasyonu ve yapay protez) [19]. Ameliyat hem riskli hem de kullanılan protezler maliyetlidir, aynı zamanda 15-20 sene sonra ameliyatın tekrarlanması gerekmektedir. Doku nakillerinde ise donör doku bulunmasındaki zorluklar, greftin boyutlarından kaynaklanan sorunlar, aynı zamanda bağışıklık sistemi tarafından

reddedilmesi gibi aplikasyonlar mevcuttur. Bunun yanı sıra vücudun farklı bölgelerinde olan kıkırdak dokularının aynı mekanik dayanıma sahip olmaması da önemli bir sorun oluşturmaktadır [18, 21].

Kıkırdak doku üretiminde kullanılan iki yöntem mevcuttur: Hücre transplantasyonu (kıkırdak hücrelerinin vücut dışında çoğaltılarak hasarlı bölgeye uygulanması) ve hücre-polimer modeli (kondrositlerin üç boyutlu iskelelerde uygun koşullarda üretilmesi) [22, 23]. Sağlıklı doku miktarı yeterli olmazsa veya doğal dokunun tamamı bozulursa (Osteoartritin son evreleri gibi) ortopedik implantlar kullanılır, yani kıkırdak dokusunun yerine, tamamen yapay olan biyolojik implant malzemeler yerleştirilir [19].

Kıkırdak doku mühendisliğinde kondrojenezi etkileyen uyarıcı moleküller mevcuttur: Triksin ve testosteron sülfatlanmış GAG sentezini hızlandırırken, kortizon, hidrokortizon, estradiol ise geciktirir [16]. Matriks üretiminde ve özellikle kollajen üretiminde uyarıcı etkisi olan askorbik asit (C vitamini) aynı zamanda organizmada bulunmayan ve kollajenin yapısında bulunan hidroksilizin ve hidroksiprolin amino asitlerinin sentezinde enzimlerin kofaktörü olarak görev almaktadır.

D vitamini kondrositlerin olgunlaşmasını ve matriks sentezini, FGF-2 ise kondrositlerin çoğalmasını uyarır [24]. TGF- β 1 ve TGF- β 2 kondrositlerin proliferasyonunu ve olgunlaşmasını indüklemektedir [19].

Hücre dışı molekülleri üç ana başlık altında toplayabiliriz: Kollajen ve elastin gibi yapısal proteinler, özelleşmiş proteinler olan laminin, fibronektin, vitronektin ve fibrilin ve diğer en önemli yapılardan biri olan proteoglikanlar (glikozaminoglikanlar (GAG)). İnsan vücudunda en bol bulunan protein olan kollajen lifler hücre dışı matriksin en önemli proteini olmakla beraber kuru ağırlığının yaklaşık olarak %30'unu oluşturmaktadır. Kollajenin yapısında az miktarda lizin ve hidroksilizin amino asitleri de bulunmaktadır. Kollajen liflerinin 25 türü bilinmektedir [16]. Laminin, fibronektin, vitronektin gibi proteinler özelleşerek doku içerisinde spesifik görevleri yerine getirerek hücreler ile diğer

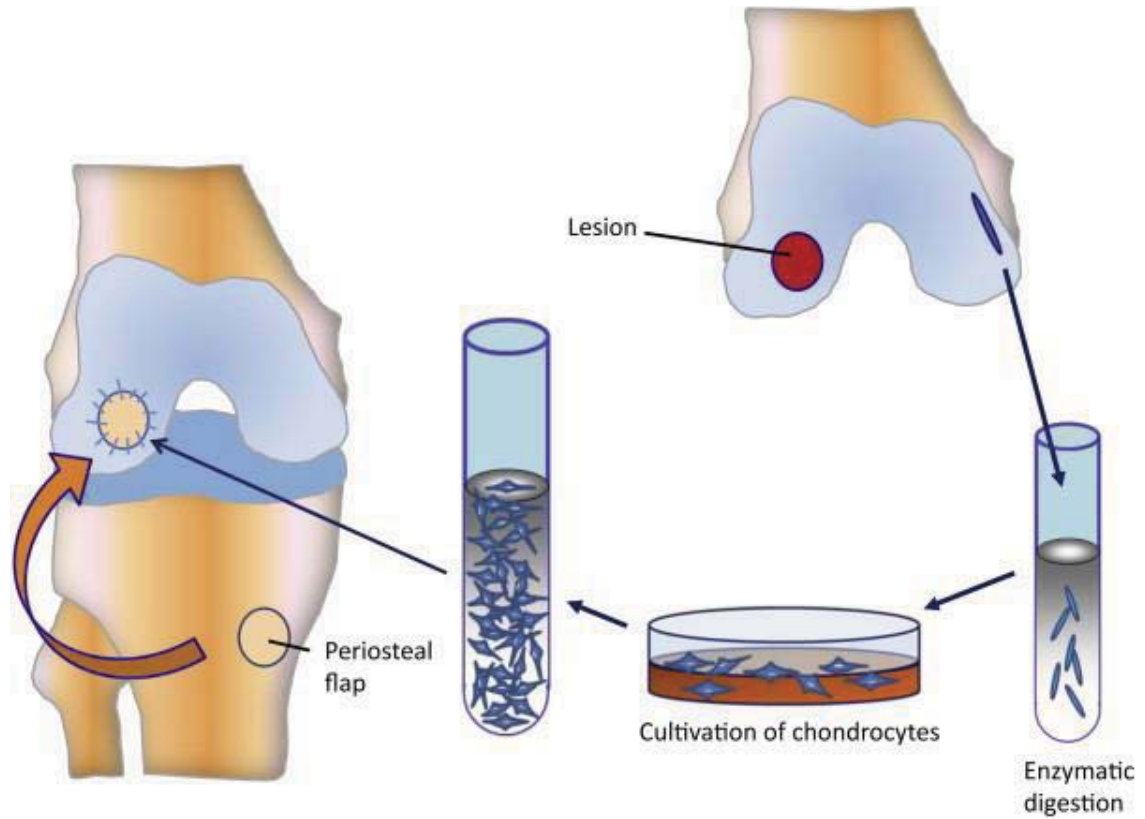
hücre dışı matriks proteinleri ile bağlantı kurarak dokunun metabolik bütünlüğünü korurlar.

Çizelge 2.1. Kollajen tipleri ve bazı özellikleri [16].

Tip	α -Zincir Düzeni	Yapısı	Lokalizasyonu
I	$[\alpha 1(I)]_2[\alpha(I)]$	300 nm, 67 nm sarılı fibriller	Deri, tendon, kemik, vb.
II	$[\alpha 1(II)]_3$	300nm, küçük 67nm fibriller	Kıkırdak
III	$[\alpha 1(III)]_3$	300nm, küçük 67nm fibriller	Deri ve kasta yoğun bulunur
IV	$[\alpha 1(IV)]_2[\alpha 2(IV)]$,	390nm C-term globüler bölge, non-fibriler	Tüm bazal lamina
V	$[\alpha 1(V)][\alpha 2(V)][\alpha 3(V)]$	390nm N-term globüler bölge, küçük fiberler	Tip-I kollajen ile ilişkili
VI	$[\alpha 1(VI)][\alpha 2(VI)][\alpha 3(VI)]$	150nm, N-C term. globular bölgeler, mikrofibriller	Tip-I kollajen ile ilişkili
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	450nm, dimer	Epitel
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_3$	??	Bazı endotel hücreler
IX	$[\alpha 1(IX)][\alpha 2(IX)][\alpha 3(IX)]$	200nm, N-term. globüler bölge	Kıkırdak, tip-II kollajen ile ilişkili
X	$[\alpha 1(X)]_3$	150nm, C-term. Globüler bölge	Hipertropik ve mineralize kıkırdak
XI	$[\alpha 1(XI)][\alpha 2(XI)][\alpha 3(XI)]$	300nm, küçük fiberler	Kıkırdak

Proteoglikanlar: Genellikle bir heksoz amin ve bir üronik asit tarafından oluşturulan Glikozaminoglikanlar (GAG), doğrusal polisakkaritlerdir” [25]. Karbonhidratlar proteoglikan molekülünün kütlesinin %80-90’ını oluşturmaktadır ve içinde hidroksil, karboksil ve sülfat gruplarını yüksek oranda barındırdığı için proteoglikan agregatları çok fazla su içeren yapılardır [21, 25].

Doku mühendisliğinin iki temel yaklaşımı vardır: *in vivo* doku mühendisliği ve *ex vivo* doku mühendisliği (*in vitro* geliştirilen yapılar kullanılır). Hem *in vivo* hem de *in vitro* doku mühendisliği için de uygun doku iskelesi, biyosinyal molekülleri ve duyarlı hücreler [26]. Sentetik ve ya doğal yapıya sahip biyobozunur polimer iskelelerde kıkırdak dokusundan elde edilen hücreler ekilerek çoğaltılıyor ve bu yapı kondrositler kendi hücre dışı matriksini üretene kadar tutuna bilmeleri için bir çeşit yapay hücre dışı matriks görevi görür [27]. İki-boyutlu kültür işlemi zamanı hücreler kendi fenotipik özelliklerini kaybederler. Buna karşın üç-boyutlu iskelelerde biyoreaktörlerde yürütülen kültür işlemi zamanı kondrositler dediferansiye olmazlar [22].



Şekil 2.6. Kıkırdak hasarının kendisinden alınan MKH’lerle tedavisi [15].

Kendini onarma yeteneği sınırlı olan sinovial eklemlerde oluşan kıkırdak kaybının tedavi yöntemleri bilim insanları tarafından uzun zamandır araştırılmaktadır, lakin onarım ve rejenerasyon kavramları arasında fark var: onarım, yaralanan eklem kıkırdağının yapı, işlev ve içerik olarak farklı olan ancak hiyalin kıkırdağa benzeyen yeni bir doku ile yenilenmesidir. Rejenerasyon ise, eklem normal hiyalin kıkırdağından ayırt edilemeyen yeni doku ile yenilenmesidir [13].

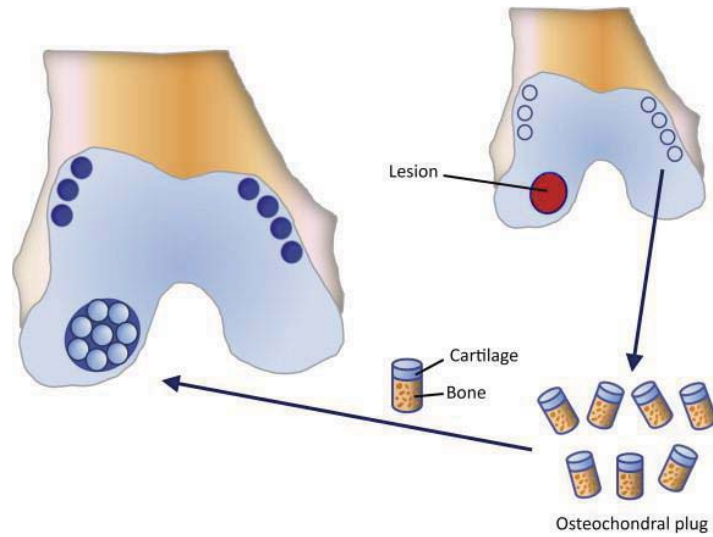
”Doku mühendisliği” kavramını ilk dile getiren kişi LexerModern Lexer’dır. O 20. yüzyılın başlarında taze kadavradan elde ettiği allogreftleri eklem rekonstrüksiyonunda kullanmıştır [14]. Doku mühendisliği yaklaşımlarının temel kaynağı hücre içermeyen bir implantın emzimler tarafından bozularak fiziksel özelliklerini kaybetmemesi için doku mühendisliği ürünü olan dokuların in vivo ortamda doğal dokular gibi davranmasıdır [28].

Doku mühendisliğinin önemli bileşenlerinden biri de hücrelerdir. Hücreleri elde etmek için uygun bir hücre kaynağına ihtiyaç duyulmaktadır. Doku mühendisliğinde kullanılan hücre kaynağı olan ve kendini yenileme ve çoğalma potansiyeline sahip olan MKH’ler (MKH) hipo-immunolojiktir ve bu nedenle hastanın immün sisteminden kaçabilmektedirler. Kıkırdak doku mühendisliğinde sinovial sıvı ve membran, kemik iliği, adipoz doku gibi kaynaklar kullanılmaktadır. [29].

Kıkırdak doku mühendisliğinde en çok kullanılan, kolay elde edilen ve farklı polimer ağlarla birlikte kullanılan kondrositler ve kondroblastların erken dönemde kıkırdak yüzeyinde yeterli onarımı sağladığı görünse de uzun dönemde aynı sonucu verememişlerdir. Chen ve ark., transplante edilen hücrenin sayısının sentezlenen ağ miktarını etkilediğini, hücre sayısı arttıkça ağ miktarının da arttığını bildirmişlerdir [31-33]. Diğer taraftan ise kıkırdak dokusunun her katında olan kondrositler biyokimyasal ve morfolojik özelliklerine göre diğerlerinden farklıdır. [34, 35]. Perikondrial ve periosteal dokuda kondrojenik potansiyelleri olan hücreler mevcuttur. Otojenik hücrelerin kullanımı zamanı daha başarılı sonuçlar elde edilir lakin bu hücreler canlılığını uzun süre koruyamamaktadır. Aynı zamanda deneyler sonucunda subkondral kemikle bağlantıda

olan hücrelerin kondrositlere farklılaşmadığı, osteoblastlara farklılaştığı bildirilmiştir [36, 37, 38].

Hiyalin kıkırdığın kendini yenileme yeteneğinin olmamasına karşı çevresinde olan perikondriumda bulunan kondroblastların az da olsa kendini yenileme yeteneği vardır.. Lakin kıkırdak hasarlarının birçoğu perikondriyuma kadar uzanmamaktadır. Büyük ölçüde kıkırdak hasarlarında ise hiyalin kıkırdak yerine fibröz kıkırdak dokusu oluşmaktadır. Bu yüzden de kök hücre tedavisi kıkırdak lezyonlarında ön plana çıkmıştır. [39-44].



Şekil 2.8. Kıkırdak lezyonunu otograft ile tedavisi [15].

Caplan [45] MKH aracılığı ile gerçekleşen kemik ve kıkırdak doku dönüşümünde çevre koşullarının MKH farklılaşmasının uyarılmasında çok önemli rolü olduğunu göstermiştir. [46-48]

Kıkırdak doku mühendisliğinde uygun bir eklem ağı oluşturmak için bir takım şeylere dikkat edilmesi gerekmektedir.

- 1) Porozite: Besinlerin ve metabolik atıkların taşınması, aynı zamanda ağa ekilen hücrelerin yapışması ve migrasyonu için porlar ve porlar arasında bağlantıların

olması çok önemlidir. Taşıyıcılık: Ağ büyüme faktörlerini kontrollü salabilme özelliğine sahip olmalı.

- 2) Adezyon: Hücrelerin normal biyokimyasal fonksiyonlarını yerine getirmesi için ağ hücrelerin yapışmasını kolaylaştırmalıdır.
- 3) Biyobozunurluk: Orijinal ağ oluşumuna izin verilmeli ve rezorbsiyon süreci kontrol edilmelidir.
- 4) Hacim Stabilitesi: Eklem yüzünün pürüzsüzlüğünün bozulmaması için ağ şişme veya büzüşme gibi hacim değişiklikleri göstermemelidir.
- 5) Biyoyumluluk: Ağ biyoyumlu malzemelerden yapılmalıdır ki, konak dokuya yerleştirildiği zaman çevre dokuyla bütünleşebilsin.
- 6) İnternal Yapışma: Boşluğa doldurulduğu zaman boşluktan tekrar dışarı çıkmaması için internal yapışma özelliği olması gerekmektedir.
- 7) Elastiklik: Ağın doğal sertliği, eklemde bir takım kuvvetlere direnebilmesi ve mekanik özellikler açısından kınak dokuya benzemesi gerekmektedir.
- 8) Cerrahi Tekniğe Uygunluk: Klinik uygulamalarda ağın hangi cerrahi uygulamayla defektif bölgeye yerleştirileceği çok önemlidir: [14, 34, 38, 49-53].

2.1.1. Hücre Hatları

Bilimsel deneylerde memelilerin ve diğer canlıların kullanılmasının olabildiğince kısıtlanması gerekliliği hücre kültürlerinin geliştirilmesine ve kullanılmasına yol açmıştır. İlk defa 1951 yılında servikal kanser hastası olan Afrika kökenli Amerikalı bir hastanın Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Baltimore’da kanserli dokularının laboratuvarda kültürü yapılmıştır [54-59]. Kanserli hücrelerden elde edilen hücre hatları (kondrosarkom) daha çok sayıda hücre üretir lakin fizyolojik süreçleri kopyalayamıyor, nedeni ise tümörjenik özelliklere sahip olmasıdır. Bu sorunu çözmek için son zamanlarda ölümsüzleştirilmiş kondrositler geliştirilmiştir. Aynı zamanda birçok genetiği değiştirilmiş hayvan modeli kıkırdak farklılaşması çalışmalarında kullanılmaktadır [60-64]. Fare kondrojenik ATDC5 hücre hattı kondrojenezin moleküler mekanizmasını araştırmak için yaklaşık 300 çalışmada in vitro bir model olarak kullanılmıştır, aynı zamanda nitrik oksit de dahil olmak üzere enflamatuar mediatörleri incelemek için de kullanılmıştır [65]. Ölümsüzleştirilmiş insan genç kostal kondrosit hücre hattı T/C-28a2

ve Murin kondrojenik hücre hattı ATDC-5 da hücre hatları da kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılmaktadır [66].

2.1.2. Ko-kültürler

Dokunun normal gelişimi ve onarım reaksiyonu için dokudaki hücrelerin organizasyonu önemlidir. Bir ko-kültür sisteminde, aynı kültür ortamında bir araya getirilen iki veya daha fazla hücre tipi yakınlıklarına ve etkileşime girme yeteneğine bağlı olarak birbiri ile etkileşir ve iletişim kurar [67]. Doku mühendisliği çalışmalarında hangi ko kültür koşullarında bir hücre tipinin soyunu koruduğunu, ikinci bir hücre tipinin soyuna farklılaştığını, aralarındaki etkileşimi incelemek özellikle önemlidir. Eklem kıkırdağının yüzeyel bölgesindeki kondrositler, sinovyal hücrelerle ve sinovyal sıvıda mevcut olan faktörlerle hücresel etkileşime girerek, fenotiplerini ve fizyolojilerini korurlar. Geçiş bölgesi ve radyal bölge içinde ise kondrositler ve hücre dışı matris arasında hücresel etkileşimler gerçekleşir, kemik-kıkırdak sınırında olan kondrositler ise subkondral kemik ve katı kemik matriksindeki osteoblastlar ile etkileşime girer. [68-71].

Hücresel yönlendirme kıkırdak doku mühendisliğinde karşılaşılan en önemli zorluktur. Hücresel yönlendirmeni etkileyen başta büyüme faktörleri olmakla birçok faktör var. Değiştirilen faktörler ko kültür sırasında doku rejenrasyonunda önemli rol oynamaktadır [72].

2.2. Kök Hücreler

”Kök hücre” terimine ilk kez botanik ile ilgili yazılarda rastlanmaktadır. Yaşamın öncüsü olan kök hücreleri tanımlamak gerekirse: Kendini yenileyen, farklı hücrelere farklılaşabilen ve klon oluşturma yeteneğine sahip olan hücrelerdir. Kök hücreler asimetric bölünerek kendini yenilerler, yani oluşan yavru hücrelerden biri kök hücre havuzuna katılır, diğeri ise bir sonraki aşama için farklılaşır.

- 1) Kök hücreler kendini yenileme (Self-Renewal) ve farklılaşabilme yeteneğine sahip özelleşmemiş hücrelerdir. Erken embriyonik dönemde kök hücrelerin

kendini yenileme kabiliyeti en yüksek düzeydedir. Aynı zamanda kök hücreler vücutta olan bütün hücelere (kemik, kıkırdak, kas, sinir, kalp vb) farklılaşabilirler [73].

- 2) Farklılaşma yetkinliği(potensi): Kök hücreler hem farklı hücre tiplerine farklılaşabilir (unipotent), hem de tek tip hücre türüne farklılaşabilir (progenitör, prokürsör).
- 3) Klon oluşturma yeteneği (klonalite): Tek bir kök hücreden çok sayıda yeni kök hücreler oluşur. Kültürde birden fazla türde hücre olursa bu klonaliteyi olumsuz yönde etkileyebilir, lakin hücreleri farklılaştırdıkça çoğalma ve farklılaşma yetenekleri azalabilir [74]. Vücudumuzdaki pek çok hücre örneğin kalp hücresi, sinir hücresi, deri hücresi özel bir işlev için şartlanmışlardır. Kök hücreler ise şartlanmamıştır ve özel uyarı alana kadar hiçbir hücreye dönüşmez.

İlk embriyonik hücre olan zigot *totipotent* hücredir, çünkü tek başına bütün bir organizmayı oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Döllenmeden sonraki ilk 4-5 günde meydana gelen hücreler de totipotent hücrelerdir. Yaklaşık beşinci günde meydana gelen ve blastositin iç hücre kitlesini oluşturan hücreler tek başına organizmayı oluşturmaya da vücutta olan bütün hücelere farklılaşabilen *pluripotent* hücrelerdir. Daha sonra oluşan hücreler ise erişkin kök hücrelerdir. Bu kök hücelere *multipotent kök* hücre denir. Sadece bir tip hücreye dönüşebilen ve aynı zamanda da kendini yenileyebilen kök hücelere ise *unipotent* kök hücreler denir [75, 76].

2.2.1. Tarihçe

İlk kez 1959'da ABD'de in vitro fertilizasyonla ilk hayvan (tavşan) oluşturuldu [77]. İnsan yumurtasını in vitro olarak ilk kez 1968'de Edwards ve Bavister fertilize ettiler. 1970'lerde ise kök hücreler embriyonik gelişmeyi göstermek için kültürde çoğaltıldı. 1978'de ise İngiltere'de ilk in vitro fertilizasyon olan insan Louise Brown doğdu [77]. 1981'de Evans, Kaufman ve Martin tarafından ilk kez fare embriyonik kök hücresi elde edilerek çoğaltıldı. 1989'da ise Pera ve ark. ları, her 3 ana germ tabakasından da insan embriyonal karsinom hücrelerini elde etmeyi başardılar. 1995 ve 1996 yıllarında ise ilk kez hayvanlardan in vitro kök hücre sağlandı.

Bilim insanları farklı yöntemlerle insan embriyosundan pluripotent kök hücre elde etmeyi başarmışlar [77]. Kök hücreler kemik hastalıklarının yanı sıra, kıkırdak lezyonlarında da yaygın kullanılmaktadır, bunun nedeni ise kondrojenik farklılaşmalarının çok iyi olmasıdır [39].

2.2.2. Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücrelerin elde edildikleri kaynaklara göre iki çeşidi vardır:

- A. Embriyonik kök hücreler
- B. Embriyonik olmayan kök hücreler

Embriyonik olmayan kök hücrelerin de üç çeşidi vardır:

- 1) Hematopoetik kök hücreler: kemik iliği kök hücreleri, periferik kan kök hücreleri, göbek kordon kanı kök hücreleri
- 2) Stromal (mezenkimal) kök hücreler
- 3) Organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreleri [78].

İnsan vücudunda sadece bulunduğu dokudaki hücelere dönüşebilme yeteneğine sahip dokuya özgün kök hücreler vardır ve bu hücreler vücutta yaşlanan ve ölen hücrelerin yenilenmesini sağlar [73].

Kolios ve ark. [79, 80], kök hücreleri beş grupta ele almıştır: embriyonik kök hücreler, fetal kök hücreler, perinatal kök hücreler, erişkin (adult) kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler. Embriyonun en erken evresindeki yani zigot oluşumundan blastosist aşamasına kadar olan evredeki farklılaşmamış kök hücreler *totipotent* kök hücrelerdir ve bütün organizmayı oluşturma yeteneğine sahiptirler. Embriyo zigot oluşumundan sonraki 5-6 günde 64-200 hücre aşamasına gelir ve bu evre blastosit evresidir. Bu evrede blastositin iç hücre kitlesindeki kök hücreler (embriyoblastlar)

pluripotent kök hücrelerdir. Bu hücreler ektoderm, endoderm ve mezoderm karakterli tüm hücrelere dönüşebilir ve bütün organ ve dokuları oluşturabilir. Embriyonik kök hücre olan pluripotent kök hücreler rejeneratif tıpta çok büyük öneme sahiptir [74, 81]. Tek bir germ tabakasından farklılaşan, kendini yenileme özelliğine sahip olan *multtipotent* kök hücreler kemik iliği, sinir, göz gibi dokularda bulunuyor. Multipotent hücreler somatik kök hücrelerdir. Eritrosit, lenfosit, miyeloid gibi kan hücrelerini oluşturan hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler de multipotent kök hücrelerdir. Kemik iliğinden, sinovial dokudan, diş pulpasından, adipoz dokudan, göbek kordonundan ve plasentadan elde edilebilen mezenkimal kök hücreler osteoblastlara, kondrositlere, kondroblastlara, pankreas beta hücrelerine, nöronlara, kas hücrelerine ve yağ dokusu hücrelerine farklılaşabilir. Mezenkimal kök hücreler sitokinler ve kemokinler gibi mediatörler salgırlar. Bu mediatörler diğer hücrelerin farklılaşmasında ve çeşitli bölgelere yönelmesinde önemli işlevlere sahiptir. Aynı zamanda MKH'ler bölgesel hücrel kontakt ile çevrelerindeki hücreleri etkileyebilmektedir.

Özel bir organda veya dokuda bulunan, kendini yenileyen progenitör kök hücreler *oligopotent* kök hücrelerdir. Bu hücreler iki veya daha fazla hücre hattına farklılaşabilir. Miyeloid ve lenfoid öncül (progenitör) hücreler oligopotent kök hücrelerdir. Oligopotent kök hücrelere diğer bir örnek ise gerektiğinde endotel gerektiğinde düz kas hücresine farklılaşabilen vasküler kök hücrelerdir. Kendini yenileme özelliğine sahip olan ve yalnız tek bir hücre serisine farklılaşabilen kök hücreler ise unipotent kök hücrelerdir. Bu hücreler öncü hücre olarak bilinmektedirler. Bu hücrelere en iyi örnek insan deri hücreleri veya hepatositlerdir. Öncü hücreler organ ve dokularda ölen hücrelerin yerini alırlar [82].

Vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilen, tekbaşına vücudu oluşturma yeteneğine sahip olan zigot hücresi ise *totipotent* kök hücredir. Fertilize yumurta hücre totipotent özelliği ile bilinen tek kök hücre tipidir [83].

Bir kök hücrenin farklı dokuları oluşturan hücrelere dönüşebilme yeteneği onun plastisitesi olarak tanımlanmaktadır [73, 84-87]. Pluripotent kök hücreler mezodermal, ektodermal ve endodermal kökenli olmak üzere vücuttaki 200 farklı hücre tipine dönüşebilme yeteneğine sahip olsalar da tek başlarına organizmayı oluşturmazlar [73,

88-90]. Multipotent kök hücreler farklı hücre tiplerine dönüştüğü zaman farklılaşma kabiliyetlerini kaybederler. Lakin küçük bir kısmı bu özelliklerini korurlar. Multipotent kök hücreler erişkin bireylerin dokularında bulunmaktadır **[85, 87, 90, 91].**

Embriyonik Kök Hücreler

Embriyo kök hücrelerini (EKH) elde etmek için ilk deneyler 1970’li yıllarda fareler üzerinde yapılmıştır ve farelerde gelişen teratokarsinomdan embriyo karsinoma hücreleri (EKaH) elde edilmiştir. Lakin bu hücrelerin tümör kaynaklı olması nedeniyle bu hücrelerde hücresel bozulmalar olabilir.

Embriyonik kök hücreler (embriyoblastlar) pluripotent kök hücrelerdir ve vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilirler. Bu hücreler hücresel tedavi uygulamalarında kullanılabilecek ideal hücre profiline sahiptir lakin bu hücreler embriyononun iç hücre tabakasından elde edildiği için bazı sorunlar oluşmaktadır: etik sorunlar, tümör gelişimi riski, immün rejeksiyon riski ve fonksiyonel olgun hücreleri elde etmek için farklılaşma protokollerinin mevcut olmaması. Bu engelleri aşmak için yeniden programlama teknolojileri ile erişkin somatik kök hücrelerden dediferansiyasyon yoluyla pluripotent hale dönüştürülmüş kök hücrelere elde edilmektedir. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (İPSC) embriyonik kök hücre protein ve genlerini eksprese ederler ve aynı pluripotent farklılaşma kapasitesine sahiptirler **[78].** İnsandaki embriyonik kök hücreler de blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent kök hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler blastokist oluşmadan önce de embriyodan elde edilebilir. Strelchenko ve ark. morula aşamasındaki embriyodan EKH elde etmişler. Klimanskaya ve ark. ise tek bir blastomerden EKH elde etmişler **[74].** Embriyonik kök hücreler iç hücre kitlesi ektoderm, endoderm ve mezoderm doku hücrelerini oluşturur lakin trofoblast olarak bilinen dış hücre katmanını plasentayı ve amnion zarını oluşturamazlar **[92, 93].**

1998 yılında Thomson ve ark. **[82].** Tarafından pluripotent özelliğe sahip ilk insan embriyonik kök hücresi elde edilmiştir.

- 1) Bazen in vitro fertilizasyon yapılan labaratuvarlarda kullanılmayan embriyolardan gerçek embriyonik kök hücre (fertil embriyonik kök hücre) elde edilir.
- 2) Bazı embriyonik kök hücreler ise somatik nükleer transfer metoduyla elde edilir. Bu yöntemde ise yumurta hücresinin çekirdeği çıkarılarak yerine vücut somatik hücre çekirdeği nakledilir ve yumurta hücresi yeniden programlanmış olur. Bu yumurta hücre aktive edilip çoğalmaya bırakılır [81].
- 3) Dölllenmemiş yumurta hücrelerinden de embriyonik kök hücre elde edilebilmektedir

Parthenogenez ile elde edilen bu ücrelere parthenogenetik embriyonik kök (pgEK) hücre denir. Büyüme faktörleri içeren özel besiyerlerinde saklanan bu hücrelerin kültür ortamları değiştirilirse diferansiye olur. Bu zaman ise üç germ tabakasını içeren embrioid cisim oluşur. İnsanlarda oosit nadiren aktive olur. Memelilerde ise döllenmemiş oosit kimyasal ve mekanik etkenlerle uyarıldığında embriyonik olmayan blastosist oluşturabilir ve bu blastosistin iç hücre kitlesinden in vitro kendini yenileme özelliği ve klon oluşturma özelliği olan ancak normal ve ekstra embriyonik gelişim görülmeyen parthenogenetik embriyonik kök hücreler elde edilebilir [94]. Parthenogenetik embriyonik kök hücreler (pgEK) düşük maliyetli ve kolay elde edilebilir olması, immünogenetik olarak tam uyumlu hücrelerin elde edilebilmesi yönünden ve en önemlisi ise etik tartışmalara neden olmaması sebebiyle alternatif kök hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır [95].

Kök hücrelerin elde edildikleri kaynaklarına göre 3 türü vardır: Embriyonel, fetal ve erişkin kök hücreler [85, 88, 91, 96-98]. Sınırsız olarak çoğalabilme kabiliyeti olan embriyonel kök hücrelerin aynı zamanda kontrolsüz çoğalma ve tümör oluşturma potansiyelleri de vardır [73, 88, 99]. Zamanla embriyonik kök hücrelerin büyüme sinyalleri azalır ve farklılaşması durur [73]. Yetişkinlerde embriyonik kök hücrelere neredeyse hiç rastlanmaz [100, 101]. Embriyonik kök hücrelerin daha değerli olmasının nedeni ise farklılaşma yeteneğinin fazla olmasıdır, ancak embriyonik kök hücrelerin elde edilmesinde etik tartışmalar vardır, aynı zamanda tümör oluşma riski de vardır [96, 102]. Bu nedenle son zamanlarda bilim insanları erişkin kök hücreler üzerine odaklanmıştır

[103]. Embriyonik dönemde diş germlieri ektodermal yapıdan oluşur, bu nedenle dental dokular ektodermal kaynaklıdır [104]. Fetüsün dokularından izole edilen fetal kök hücreler pluripotent yapıdadırlar aynı zamanda sınırsız sayıda bölünme ve kendilerini yenileme özelliğine sahiptirler. Hatta gerekli koşullar sağlanırsa tekrar farklılaşarak yumurta veya sperm hücresine de dönüşebilirler. Ancak tek başlarına yeni bir organizma oluşturamazlar [66, 105-106].

EKH'ler uzun süre kültür içerisinde farklılaşmadan kalabilirler. Ayrıca EKH'ler yüksek telomerez düzeyine sahip olmaları onları yetişkin kök hücrelere göre daha dayanıklı yapmaktadır [107]. EKH'ler osteojenik hücrelere farklılaşabilirler lakin kültürde tümörojenik farklılaşma gibi bir risk taşımaktadırlar [88-108]. Hayvanlara nakledilen embriyonik kök hücreler teratoma ve teratokarsinomalara yol açabilmekte ve bu immün yanıtı neden olabilmektedir [109]. Embriyonik kök hücrelerin klinikte uygulanmasını kısıtlanmasına sebep ise insan embriyo kök hücrelerinin kullanılmasının etik sorunlara neden olmasıdır. İnsan embriyonik kök hücrelerinin kullanımını etkileyen etik sorunlar klinik uygulamayı da sınırlamaktadır. [110]. 1981 yılında fareden elde edilen embriyoblastlar (fare blastokistindeki iç hücre kitlesi) in vitro koşullarda fare fibroblastları üzerinde çoğaltılarak EKH elde edilmiştir. Kompleman aracılığıyla alınan iç hücre kitlesi zemininde fare embriyonik fibroblastlarının bulunduğu kültür kabına alınır. Zemindeki fibroblast hücre tabakası (feeder layer) besleyici hücre tabakasıdır ve buradaki fibroblastlar bölünmezler ve çoğalmazlar, yani inaktif durumdadır. Lakin besleyici hücre tabakası olmadan da fare embriyonik kök hücreleri farklılaşmadan çoğalabilmektedirler. Bunun için ise kültür ortamına lösemi engelleyici faktör (LIF) eklenmelidir [78].

Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler (uPK hücreleri)

uPK hücreler pluripotent özellik kazanmış olmalarına rağmen doğal olarak pluripotent kök hücre değildir. uPK kök hücreleri pluripotent olmayan hücrelerin genleri değiştirilerek veya belirli ve spesifik bir dizi gen ifadesi ile uyarılarak yapay olarak oluşturulur. Verimlilikleri düşüktür lakin somatik kök hücrelere pluripotensi özelliği getirmek ilerleyen zamanlarda kök hücre tedavileri için umutvericidir [111]. 2006 yılında fare hücrelerinde, 2007 yılında ise insan hücrelerinde indüklenmiş pluripotent kök hücreler üretilmiştir. İnsan fibroblast hücrelerine Oct3/4, Sox2, Klf4 ve C-Myc genleri retroviral yolla aktarılmıştır [112, 113]. Araştırmalar sonucunda insan uPK hücreleri ile

insan EKH hücrelerinin morfoloji, gen ekspresyonu ve yüzey antijenleri, pluripotensi ve *in vitro* farklılaşma potansiyeli açısından benzer olduğu gösterilmiştir. [114].

2006 yılında kök hücre alanında çok önemli bir devrin başlangıcı olan tarihi bir keşif yapıldı. K. Takahashi ve S. Yamanaka sonuna kadar farklılaşmış dermis fibroblastlarını (Oct4, Sox2, Klf4 ve cMyc; OSKM) transkripsiyon faktörünün (TF) zorlu ifadesiyle değiştirerek yeniden programladı. Bu hücreler uPK hücreleridir [74].

Yetişkin Kök Hücreler

Yetişkin kök hücreler (YKH) yani embriyonik olmayan kök hücreler erken embriyo gelişimini tamamlamış organizmaların doku veya organlarındaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. YKH aynı zamanda somatik kök hücrelerdir. Dokuya özgü kök hücreler olan YKH içinde bulundukları dokuların özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilmektedirler. YKH'lere örnek olarak: bağırsak kök hücreleri, mezenkimal kök hücreler, nöral kök hücreler ve hematopoetik kök hücreleri gösterebiliriz. Bunun dışında pankreas, kalp, akciğer ve karaciğer gibi organlarda bulunan parankim hücrelerinin köken aldığı hücreler de yetişkin kök hücrelerdir. YKH'in esas görevleri içinde bulundukları dokunun hasar görmüş hücrelerini tamir etmektir [74, 78]. Yetişkin kök hücreler multipotenttir ve bulundukları dokuda ömür boyu çoğalırlar plasenta [115]. Kemik iliği insan vücudunda erişkin kök hücrelerin en fazla bulunduğu yerdir. Bunun dışında plasenta membranı, amniyotik sıvı, göbek kordon kanı, retina, kornea, periferik kan, saç folikülleri, diş pulpası, akciğer, karaciğer, kalp ve pankreas gibi çeşitli dokulardan da YKH izole edilebilir [66, 116-118].

Embriyonik ve postnatal kök hücrelerin farkı özelleştikleri hücrelere dönüşümlerinin farklılık göstermesidir [118]. Kök hücre nişi normal koşullarda kök hücrelerin sessiz kalmasını sağlarken doku hasarları zamanı veya doku oluşumu zamanı embriyonik kök hücrelerin uygun sinyaller alarak farklılaşmasını sağlar. Nişe ait çok çeşitli faktörler gen ekspresyonlarını düzenleyerek embriyonun gelişimi esnasında embriyonik kök hücrelerin çoğalma veya farklılaşmalarını düzenlerler [119].

Yetişkin kök hücelere özgü olan bir kavram vardır, bu kavram *plastisite* (hücreler kendi kimliğini bir organdan diğer organa geçirir) kavramıdır [120-121].

Diş Pulpası Kök Hücreleri

Periodontal ligament kök hücreleri (PDLKH), dental folikül öncü progenitör hücreleri (DFÖH), apikal papilla kök hücreleri (APKH), diş pulpası kök hücreleri (DPKH) ve süt dişi kök hücreleri (SDKH) dişte bulunan kök hücrelerdir. [120, 122]. DPKH'ların başarılı bir biçimde osteojenik farklılaşma gösterdiği yapılan deneylerle gösterilmiştir [114]. Dental kök hücelere ulaşmanın etik ve yasal sorunlara neden olmaması sebebiyle bu hücreler araştırmacıların daha fazla dikkatini çekmektedir [123-126]. Diş pulpası kök hücreleri kolay elde edilir ve etik sorun yaratmaz. Aynı zamanda yüksek farklılaşma potansiyeline sahiptir. Dental pulpa kök hücreleri in vitro ortamda kondrositlere, osteoblastlara, düz kas hücrelerine ve nöronlara farklılaşabilir [127, 128].

Hematopoetik Kök Hücreler

Kordon kanı HKH ve progenitör hücreler açısından çok zengindir. Buradaki kök hücreler kemik iliğindeki kök hücrelerden daha az sayıdadır lakin çoğalma potansiyelleri açısından daha zengindirler. Kemik iliği kök hücreleri, yaşlanma, radyasyon, enfeksiyonlar ve kimyasallar nedeniyle zarar görürken kordon kanındaki kök hücreler bu tür etkenlerle karşılaşmadıkları için daha sağlıklıdır. İnvaziv bir işlem gerektirmemesi ve etik sorunlara neden olmaması son zamanlarda araştırmacılar tarafından rağbet görmektedir. Lakin olumsuz yönleri de vardır: engraftman kök hücrelerinin alıcının kemik iliğine yerleşerek kan yapmaya başlaması bu hücrelerle daha geç gelişmektedir. Son zamanlarda iki, hatta üç vericiden alınan kordon kanı ile yapılan çoklu kordon kanı nakilleri olumlu sonuçlar vermiş ve kök hücre gereksinimi duyan hastalara bu işlemler neredeyse rutin olarak uygulanmaktadır [78].

Üzerinde en fazla çalışılan ve tedavide yaygın kullanılan erişkin kök hücrelerden biri de *hematopoetik* kök hücrelerdir. Diğer kök hücreler gibi kendini yenileyebilme yeteneğine

sahiptir. HKH'ler bütün matür kan hücrelerine dönüşebilmektedir. Periferik kan, fetal karaciğer, kordon kanı, kemik iliği gibi organlardan elde edilebilir. Özellikleri en iyi tanımlanan hematopoetik kök hücreler CD34, CD14, CD45 ve CD133 hücre yüzey belirteçlerine sahip olan ve kemik iliğinde bulunan kök hücrelerdir [78, 129].

HKH'ler embriyonik dönemde kemik iliği henüz gelişip, kök hücre fonksiyonları için uygun mikroçevreyi oluşturmada önce fetal karaciğer, plasenta, dalak, timüs ve kemik iliği arasında göç ederler. Aynı zamanda farklı anatomik bölgelerde olan HKH'in farklılaşma ve ekspansiyon özellikleri birbirinden farklıdır [130]. HKH'ler bulundukları ortama göre farklı davranış gösterirler. Kemik iliği tarafından sürekli üretilen HKH'ler olgunlaşmış kan hücrelerine dönüşürler. İntrauterin dönemde ve doğum esnasında fetal dolaşımında bulunan HKH'ler doğumdan birkaç saat kemik iliğine göç ederler. Bu hücreler uygun koşullar sağlandığında kıkırdak, kemik, kas ve diğer hücrelere farklılaşabilmektedir [131, 132].

Kemik iliğinde iki çeşit HKH ve MKH kök hücre bulunmaktadır. HKH'ler yetişkin kök hücrelerdir ve eritrosit, trombosit, fibrosit ve endotelial öncü (prekürsör) hücrelere de dönüşmektedir. Tüm hematopoetik kök hücreler CD45 yüzey belirtecini ifade eder. Lakin olgun kırmızı kan hücreleri ve onların öncülleri bu belirteci ifade etmez. HKH'lerin pluripotensi özellikleri de var, kemik iliği ve kordon kanından izole edilebilmektedir [133-135].

Tüm kan hücreleri kemik iliğinde olgunlaşır sadece T lenfositlerini oluşturacak olan progenitör hücreler timusta olgunlaşır [136]. Hematopoetik progenitörler (öncü), hücreler ekstraselüler matriks ve kemik iliği stromal hücreleri ile direkt etkileşimdedirler ve bu mikroçevreye “niş” adı verilir. Niş'ler öncü hücrelerin hayatta kalması, çoğalması ve farklılaşması için uygun substratlar sağlayan, özelleşmiş mikro çevrelerdir [137, 138]. Hematopoetik progenitör hücreler kemik iliğinde osteoblastlarla ilişkili olarak ve damarlardan uzak sakin bir durumda beklemektedirler. Bu hücrelerin kemik iliğinden mobilizasyonu kompleks olayları içerir [139].

2.3. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

1999 yılında Pittenger ve ark [140] ilk kez mezenkimal kök hücreyi (MKH) tanımladı. Kemik iliğinden köken alan fibroblast benzeri multipotent MKH, uygun uyarılarla kondrojenik, adipojenik ve osteojenik hücrelere dönüşebilmektedir. MKH plasenta, dermis, adipoz doku, sinovial doku gibi dokulardan da izole edilebilmektedir. MKH karakterize etmek için üç özelliği bulundurmaları gerekiyor:

- 1) Plastik yüzeylere yapışabilmeli
- 2) Yüzeylerinde C105, CD73 ve CD90 hücre yüzey belirteçlerini eksprese etmeli ancak CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 veya CD19 ve HLA-DR gibi belirteçleri eksprese etmemeli
- 3) Osteoblast, adiposit ve kondroblast serilerine farklılaşmalı [78].

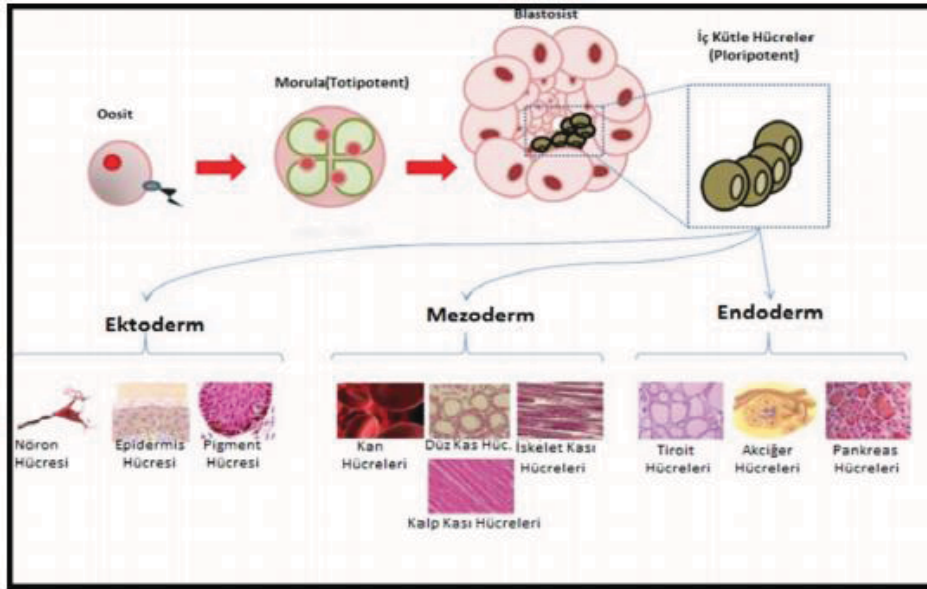
MKH'lerin deneysel çalışmalarda çok fazla kullanılmasının birçok nedeni vardır: laboratuvar ortamında kolaylıkla çoğalarak, kök hücre özelliklerini korumaktadırlar. Aynı zamanda kemik, kıkırdak, yağ, tendon, ligament, pankreas, karaciğer vb hücrelere dönüşebilmektedirler. MKH'lerin migrasyon yetenekleri vardır ve hasarlı bölgelere göç ederek, hasarlı hücrelerle füzyona girmektedirler. Çeşitli faktörler salgılayarak hasarlı dokunun tamirine katkı sağlarlar [141-143]. MKH'ler kolaylıkla kemik, kıkırdak ve yağ dokusu hücrelerine farklılaşabilmektedir. Ayrıca bazı çalışmalar sonucunda MKH'lerin kardiyak miyositleri, isket miyoblastları, nöral ve endotel hücrelerinin fenotipik özelliklerini ifade edebildiklerine ir bulgular elde edilmiştir [144, 145]. Klinikte ve klinik öncesinde MKH'lerin terapötik değerini gösteren çalışmalar mevcuttur. MKH'ler doku mühendisliğinde ve rejeneratif tıpta kullanılabilme potansiyelinden dolayı araştırmacılar tarafından büyük ilgi görmektedir. [146].

2.3.1. MKH İzolasyonu

MKH hastalardan doğrudan alınabilir, aynı zamanda allojenik dokulardan kaynaklanan immün reddi mevcut değil. Bu özelliklere sahip olmaları onların en büyük avantajıdır. Lakin MKH'leri tedavide kullanabilmek için onları belirli sayıda çoğaltmak

gerekmektedir [30]. MKH en çok kemik iliği ve adipoz doku ve kordon kanından elde edilmektedir [153]. Kemik iliği ve adipoz dokudan MKH izolasyonunda başarı oranı %100'e yakinken, kordon kanında bu oran maksimum %30-38 oranındadır [147, 148].

MKH izolasyonunda asıl kaynak kemik iliği olsa da son zamanlarda alternatif kaynak olarak kordon kanı kullanılmaktadır. Bunun nedeni ise kemik iliğinden MKH'lerin izolasyonun invaziv bir işlem olması ve farklılaşma ve dayanıklılık potansiyellerinin yaşla birlikte azalmasıdır [147]. Kordon kanının MKH kaynağı olarak kullanılmasını kısıtlayan faktör ise izolasyon verimliliğinin daha düşük olmasıdır. Kordon MKH'leri ile kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı MKH morfolojik, fenotip ve antiapoptotik özelliklerine göre benzerdirler. Kemik iliği kaynaklı MKH daha uzun zamandır çalışıldığı için klinik güvenilirliği daha fazladır [147-149]. Kemik iliği stromasında bulunan tüm hücrelerin yaklaşık %0.01'ini MKH oluşturmaktadır. [150]. Kemik iliği kaynaklı MKH insanda genellikle iliak kanattan, daha sonra ise tibia, femur, torasik ve lomber omurgadan alınan kemik iliği aspiratından elde edilir [30].

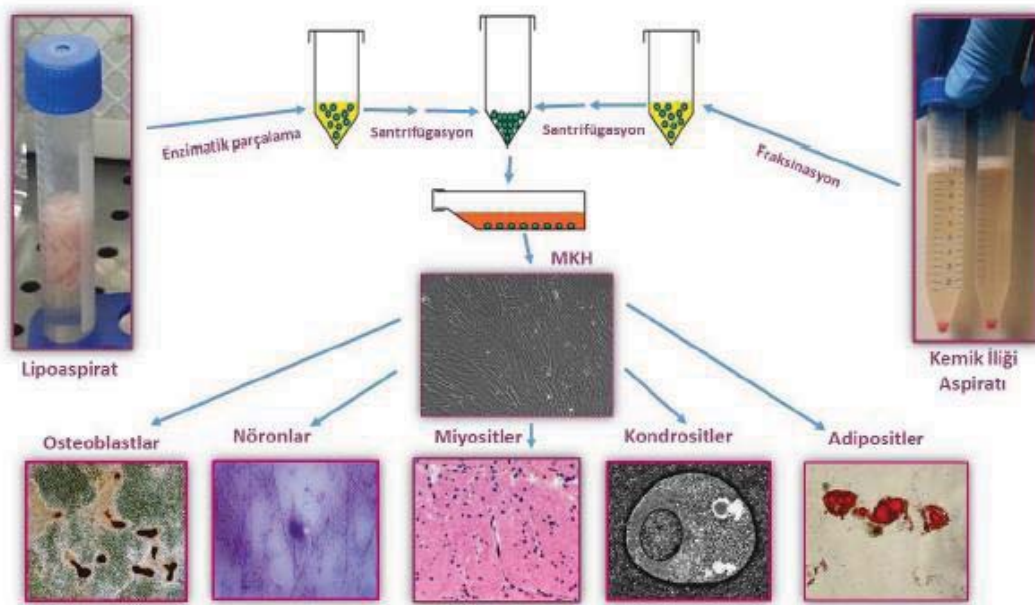


Şekil 2.9. Kök hücrenin gelişim ve değişim aşamaları [151].

Kemik iliğinde olgunlaşmış ve olgunlaşmamış kan hücreleri, stromal hücreler, sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, ECM üreten özel bir mikroçevre vardır. Aynı zamanda interlökin 1 alfa (IL1a), interlökin 1 beta (IL1b), hepatosit büyüme faktörü (HGF), tümör

nekrozis faktörü (TNF), interlökin (IL) 6, 7, 8, 11, 14, 15, gibi sitokin ve kemokinleri sentezlemektedirler [150, 152, 153].

Yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AMKH) ile ilgili ilk çalışma 1992 yılında yapılmıştır. Adipoz kök hücreleri yağ dokunun damarca zengin stromal (Stromal vascular fraction; SVF) bölgesinden elde edilir [154]. AMKH'ler fibroblast benzeri morfoloji gösteren, uzun süreli kültüre dayanıklı olan, dondurma ve çözme işlemi sırasında multipotensi özelliklerini kaybetmeyen, CD9, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD140b, CD146, CD166 hücre yüzey belirteçlerini eksprese eden ve CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79a, CD133 ve CD144 belirteçlerini ise eksprese etmeyen hücrelerdir [155, 156]. AMKH'ler de uygun koşullarda osteojenik, adipojenik, kondrojenik ve miyojenik hatlara farklılaşabilirler. [157].



Şekil 2.10. Kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı MKH izolasyonu [30].

2.3.1.1. Sinoviyum Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler (SMKH)

“Sinoviya” terimi ilk kez Paracelsus tarafından 16. yüzyılda tanımlanmıştır. Sinoviyal membran ya da sinoviyum, vasküler ve mezenşimal bir dokudur. Bu membran bütün sinoviyal eklem (diartrodial eklem) boşluğunu döşer. Eklem sıvısı ve onun çeşitli

komponentlerinin üretimi bu doku tarafından sağlanır. Aynı zamanda eklem boşluğundan hücre ve bağ dokusu artıklarının temizlenmesini de sağlar. Normal sinoviya kan plazması dializatına hyaluronat eklenmesi ile oluşmaktadır. Hyaluronat, eklem yağlama (lubrication), saflaştırma ve beslenmesine yardımcı olur [20, 158]. Sinoviyal membran eklem kırdağını örtmüyor, sadece eklem kapsülünün iç yüzünü döşüyor. Normal sinoviyal membran, 1-3 hücre kalınlığındadır ve döşeyici hücrelerden (lining cell) meydana gelen yüzeyel bir tabakadan oluşur. Eklem kapsülü ile yüzeyel tabaka arasında ise gevşek bağ dokusu mevcuttur. Üç tip sinovial doku (membran) vardır: adipoz, fibröz ve areolar [20].

- 1) Areolar tip: normal sinoviyumun en çok özelleşmiş formudur ve genellikle yüzeyde 2 kat veya 3 kat olarak devamlı sıralanmış hücrelerden oluşur. Burada aynı zamanda kapillerler, venüller ve mast hücreleri de bulunmaktadır. Normal sinoviyumun bağ dokusu matriksi tip 1 kollajenden oluşur. Kollajen fibriller yapıdadır [6].
- 2) Adipoz tip; yağ yastıkçıklarında izlenen adipoz tip yüzeysel kapillerlere ve intimal hücre tabakasına sahiptir.
- 3) Fibröz tip; Tanımlamak oldukça zordur. Aralıklarla sıralanan hücre tabakası içerir. Elektron mikroskopik incelemelerde sinoviyal dokunun tip A (makrofaj benzeri) sinoviyositler ve tip B (fibroblast benzeri) sinoviyositler olmak üzere 2 tip sinoviyositten oluştuğu görülmüştür [159].

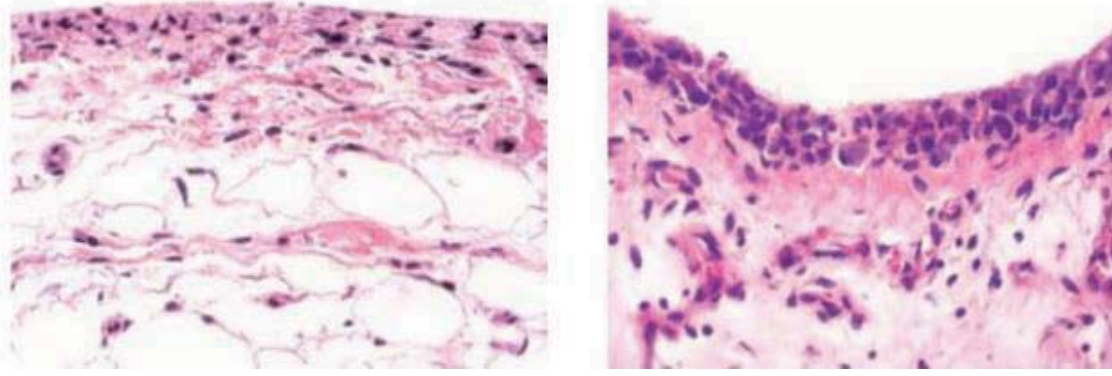
Tip B hücrelerinin (sinoviyosit) üstünde ise belirgin lizozomlar içeren, monositik hücrelerden köken alan, fagositik hücreler olan tip A hücresi bulunurlar. Sinoviyal yüzeyel tabakada bulunan hücreler, 6-12 µm çapındadır. Tip A hücresi (sinoviyosit) fibroblastlara benzeyir, belirgin golgi organeli ve az endoplazmik retikulum içerir. Tip A hücreleri kemik iliğinden köken alıp, fagositozdan sorumludurlar, aynı zamanda CD11b, CD68 ve CD14 eksprese ederler. Bu hücreler eklem boşluğundaki istenmeyen partikülleri de fagosit ederler. Tip B hücresi ise çok miktarda protein sentezi yapan organeller ve seyrek vakuoller içerir. Tip B hücreler lubrigin içeren sinoviyal sıvıyı üretirler. Her iki tip hücre sinoviyumun ekstrasellüler matriks proteinlerinin sentezinden sorumludur [20].

Sinoviyal membran, iki tabakadan oluşuyor:

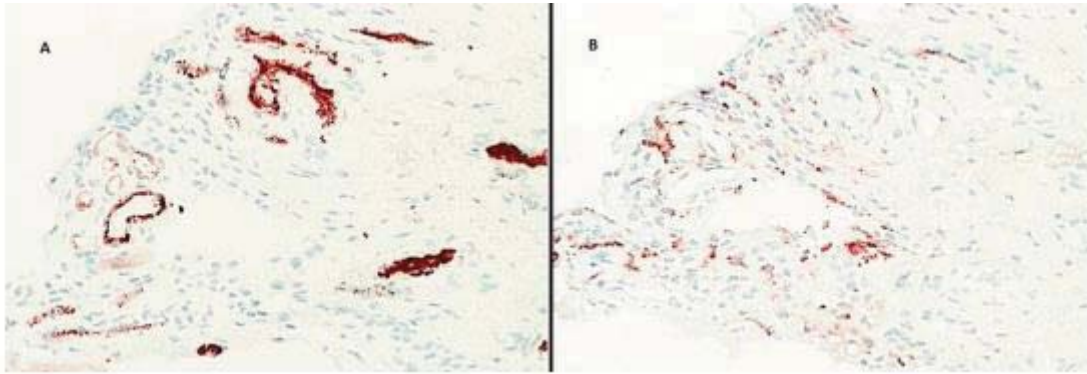
- 1) Yüzeyel tabakadaki hücreler (sinoviyal lining cell). İntraartiküler kavite ile ilişkili olan bu tabaka sinoviyumun en üst tabakasıdır. Bazal membranı olmayan aralıklı hücrelerden oluşan tabaka şeklindedir.
- 2) Sinoviyal yüzeyel hücreler: Bu tabakanın hücreleri subintimaya gevşek olarak tutunur. Subintimada ise kan damarları, lenfatikler ve sinirler bulunuyor. Subintimada makrofajlar, fibroblastlar, lenfositler, mast hücreleri ve yağ hücreleri bulunmaktadır. Makroskopik incelemelerde ise sinovial yüzey soluk pembe renğinde ve parlak görülüyor.

Daha derinde yerleşen gevşek bağ dokusu ise fibröz doku ya da yağ içerir. Daha fazla güç ve daha az esneklik gerektiren yerlerde fibröz sinoviyal membran bulunuyor. İmmünopatolojik çalışmalar zamanı endoplazmik retikulumdan zengin hücreler saptanmıştır. Bu hücreler B hücreleridir ve prostoglandinler, kollajenaz, hyaluronik asit gibi birçok eklem sıvılarının komponentlerini salgırlar. Proliferatif ve kondrojenik kapasiteleri nedeniyle sinoviyum kaynaklı mezenkimal kök hücreler (SMKH'ler), kırıldak onarımı için en uygun kaynaklardan biridir. Lakin sinovial sıvıdan ve sinovial dokudan SMKH'lerin için izolasyonu ve kültürlenmesi yöntemleri kapsamlı bir şekilde karakterize edilmemiştir [160].

Yapılan çalışmalar sonucunda SMKH'lerin KiMKH'ler ile aynı fonksiyon ve yapıda olduğugösterilmiştir. Hatta osteogenez açısından SMKH'ler daha üstündür. Son yapılan çalışmalarla sinovial sıvının da kemik iliği ve sinovial dokudakine benzer MKH'ler içerdiği gösterilmiştir [161].



Şekil 2.11. A) Normal sinoviyum mikroskopik görüntüsü. Eklem tipine ve eklem içinde sinoviyanın lokalizasyonuna göre yağ/fibröz doku oranı değişmektedir. (Hematoksilen &Eozin x10). B) Orta derecede OA'lı hastanın dizinden alınan sinoviyal dokunun mikroskopik görüntüsü. Sinoviyal döşeyici hücrelerin (lining cell) hipertrofisi, sinoviyositlerin hiperplazisi görülüyor. Artmış vaskülarite ve orta derecede kronik inflamatuvar infiltrasyonun subsinoviyal dokuda görünüşü (Hematoksilen &Eozin x10) [20].



Şekil 2.12. Sinoviyal dokunun vasküler ve lenfatik dolaşımı A; Normal sinoviyum (x200 büyütme), vasküler ağı göstermek için faktör 8 ile boyanmış (kırmızı), B; Normal sinoviyum (x200 büyütme), lenfatik ağı göstermek için LYV-1 antikoruna ile boyanmış (kırmızı) [6].

2.3.2. MKH Karakterizasyonu

Kök hücreler: 1. Kültür kabına yapışmalı; 2. Uygun farklılaşma ortamında *in vitro* ortamda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmalı; 3. CD105, CD 73 ve CD90 yüzey belirteçlerini kök hücre popülasyonunun $\geq 95\%$ ifade etmeli, CD14, CD34, CD45

kök hücre popülasyonunun $\leq 2\%$ ifade etmemelidir. Doku içerisinde kök hücreler çok düşük bir konsantrasyonda bulunmaktadır. Diğer hücrelerle kök hücreleri birbirinden ayırt etmek için her hücre tipine spesifik olan hücre yüzey belirteçleri kullanılmaktadır. [74].

2.3.3. MKH Farklılaşması

MKH'lerin karakteristik özelliklerinden biri de farklılaşmadır. Sitokinlerin, kemokinlerin, büyüme faktörlerinin etkisiyle MKH birçok hücre hattına farklılaşabilmektedir. Bu uyarıcı etkenler ortadan kalkarsa birçok hücre bölünme döngüsüne tekrar döner [78].

Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik ya da kondrojenik farklılaşmasında büyüme faktörleri fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF2), kemik morfogenetik proteini (BMP) ve dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), aynı zamanda östrojen ve paratiroid hormonu gibi hormonların rolü var [162-164].

Kondrojenik Farklılaşma

MKH'ler askorbik asit, deksametazon ve büyüme faktörünün (TGF- β süper ailesinin bir üyesi) bulunduğu üç boyutlu kültür ortamında kondrojenik farklılaşma gösterir. Hücreler bu ortamda fibroblastik morfolojilerini kaybederek küresel biçime dönüşüyorlar ve kıkırdığa özel ECM birleşenlerini ifade etmeye başlarlar. Hücre morfolojileri büyük ölçüde değişir ve glikozaminoglikanların hızlı sentezi başlar. Tip II kollajenin yüksek miktarda sentezlediği ağısı matris hücreleri çevreler. Kondrojenik farklılaşma bazı histokimyasal boyalarla örneğin: Toluidin mavisi, Safranin O ve Alcian mavisi gösterilir. Kondrogenezin ilk döneminde kültürde kondroitin-4-sülfat ve kondroitin-6-sülfat oranı neredeyse eşit olur, yalnız 8 günden sonraki aşamada ise kondroitin-6-sülfat oranda dört kat yükselme görülür. Kondrogenezde TGF- β 2 ve TGF- β 3, daha etkilidir. Kondrojenik farklılaşma zamanı MKH'ler TGF- β 3 varlığında normal eklem kıkırdığı matrisin tüm bileşenlerini (agregan, dekorin, kondroaderin, tip II kollajen, link protein, kıkırdak oligomerik matris proteini, fibromodulin) [30].

Hiyalüronik asit (HA) ve kondroitin sülfat (CS) kondrojenik farklılaşmanın erken evrelerinde kondrojenik transkripsiyon faktörü olan Sox9'un ifadesini artırır, kollajen tip-I (fibroblastik işaretçi) ifadesini ise azaltır. Kondrojenik farklılaşma zamanı Sox9 ve β -katenin moleküllerinin fiziksel etkileşimleri bazen osteoprogenitör hücrelerin oluşumuna neden olur. Farklılaşmanın hangi yönde ilerleyeceğini β -katenin çekirdek lokalizasyonu belirlemektedir: Kondrojenik farklılaşma zamanı β -katenin çekirdek lokalizasyonu daha azdır. Bunun dışında kondrosite özgü olan CD44, CD151 yüzey belirteçlerinin ifadesi artar. Aynı zamanda kondrositlere özgü olan proteinlerin de (tip-2 ve tip-4 kollajen, agrekan) ifadesi artar [162-170].

Osteojenik Farklılaşma

Wnt sinyal yolağı üzerinden β -katenin'in düşük konsantrasyonu osteoprogenitör hücrelerin kondrositlere, yüksek konsantrasyonu ise osteoblastlara farklılaşmasını sağlar. Kondrojenik farklılaşmayı SRY (sex determining region Y)-box 9 (Sox9), osteojenik farklılaşmayı ise TGF-ailesi üyesi olan BMP2 aktive eder. Wnt/ β -katenin sinyal yolağında β -katenin ifadesi kaybolursa osteoblastlar adipositlere farklılaşır [171]. Osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara farklılaşması zamanı BMP-2, BMP-4, BMP-6 ve BMP-7 ifadelerinin artması Runx2'nin de aktivasyonunu sağlar [170].

MKH'ler %70-80 yoğunluğa ulaştıkları zaman osteojenik farklılaşmayı başlatmak için onları klasik yöntem olan askorbik asit, β -gliserolfosfat, ve deksametazon ile 3-4 hafta kültür etmek gerekir. Farklılaşmayı hızlandırmak için kültüre TGF- β 3, BMP ve vitamin D3 de eklenebilir. Kültürde hücrelerin, kalsiyum açısından zengin mineralize ECM oluşturmasıyla ve alkalın fosfataz (ALP) aktivitesinin regülasyonu ile osteoblastik morfoloji göstermektedirler [172]. Hücreler arası matrisin mineralizasyonu için kalsiyum ve fosfat iyonları oldukça önemlidir. β -gliserofosfat inorganik fosfat kaynağıdır [30].

Osteojenik farklılaşma zamanı MKH'ler fibroblast benzeri yapılarından çıkarak kübik şekle dönüşürler, aynı zamanda ECM bileşenleri I kollajeni sentezler. Daha sonra ise kemikleşmenin başlangıcı olan çöküntü ve nodüller oluşur. Alizarin kırmızısı ve von Kossa boyama yöntemleri ile osteojenik farklılaşmayı göstermek mümkündür [30].

Deksametazon'un düşük dozu osteojenik farklılaşmayı uyarır, yüksek dozları ise baskılar. Aynı zamanda kollajen sentezini negatif etkiler. Lakin ortama askorbik asit eklemekle sorun çözülür [166-168]. MKH'leri osteojenik farklılaştırmak için 10 nM deksametazon, 50-500 µM Askorbik asit veya C vitamini gerekmektedir [169].

Adipojenik Farklılaşma

Osteojenik ve kondrojenik farklılaşmanın aksine adipojenik farklılaşmada Wnt sinyal yolağını aktive eden β -katenin ifadesi azalır [170, 173]. Adipojenik dönüşüm için MKH'ler insülin, indometazin, izobutilmetilksantin (IBMX) ve deksametazon ile kültür ortamına alınır, aynı zamanda askorbik asit-2-fosfat, bazik FGF ve T3 (tiroid hormonu) kültür ortamına eklenebilir. Yağ hücresine dönüşen MKH fibroblastik görünümünü kaybederek küreselleşir. Hücrelerin sitoplazmalarında yağ damlacıkları oluşur. Aynı zamanda ECM'de kollajen tip I, III, IV, V ve VI, laminin, fibronektin gibi birleşenlerin sentezi gerçekleşir. Adipojenik farklılaşmayı göstermek için Oil Red O boyaması yapılır, aynı zamanda ışık mikroskobu ile görüntülemek mümkündür [30].

2.3.4. MKH Yüzey Belirteçleri

MKH'ler CD45, CD34, CD14 ve CD11, CD80, CD86, CD40. Sıçan ve insan MKH'leri CD34'ü ifade ederken, kemirgen hücreleri CD34' ifade etmez [174]. İnsan adipoz doku hücreleri kök hücre kaynağıdır ve CD49d ifade edilir, lakin MKH'ler ifade etmez [175-177].

MKH'ler üzerinde doku uygunluk kompleksi olan MHC sınıf II molekülleri ifade edilmezken, MHC sınıf I molekülleri düşük oranda ifade edilir [178].

2.3.5. MKH Kullanımı

Dejeneratif hastalıklar tedavisi zor olan hastalıklardır. Bu hastalıklarda MKH kullanımı umutvericidir. MKH'ler çeşitli tedavi alanlarında kullanılmaktadır: kardiovasküler hastalıklar, periferik arter hastalıkları, akciğer fibrozisi, miyokart infarktı, dermatolojik hastalıklar, kas iskelet hastalıkları, periferik sinir hastalıkları gibi hastalıklarda MKH

tedavileri yaygındır [30]. MKH'ler klinikte de yaygın kullanılmaktadır, bunun nedeni ise MKH'lerin 4 önemli özelliğidir:

- 1) Doku yaralanmaları zamanı MKH'ler damar içine (intravenöz) enjekte edildiğinde hasarlı bölgeyi bulma yeteneğine sahiptirler;
- 2) Çeşitli hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahiptirler;
- 3) Hasarlı hücrelerin iyileşmesini uyararak ve inflamasyonu inhibe eden biyolojik aktif moleküller salgılamak yeteneğine sahiptirler;
- 4) İmmünojenite ve immünomodulator yeteneğine sahiptirler [30].



Şekil 2.13. MKH'lerin farklı kullanım alanları [30].

Ağır osteogenesis imperfektalı bir fetusta gebelik döneminde hastalığı hafifletmiş, doğumdan sonra ciddi hastalık tablosu oluşmasını engellemiştir [151]. Osteoartrit (OA) hastalığının erken tedavi yöntemlerinden biri olan mikro kırık yöntemi zamanı subkondral kemiğin başında kırık oluşturulur. Bu yöntem MKH ile birlikte kemik iliği elemanlarının yara bölgesine ulaşmasını sağlamaktadır. MKH'ler hücre tedavilerde direkt farklılaşmadan veya in vitro ortamda farklılaştırılarak hasarlı bölgeye enjeksiyon yolu ile verilmektedir. MKH'ler kemik, kıkırdak, ligament, tendon yaralanmalarında

[179, 180]. MKH'ler menisküslerde oluşan avasküler olan periferik yırtıkların iyileşmesinde, kas ve tendon tamirinde kullanılmaktadır [181, 182].

Bazı çalışmalar sonucu MKH naklinin belirgin malin (kötü huylu) transformasyon oluşturması görülmüştür [183]. Kırıkların %5-10'u geç kaynar ya da kaynamaz. Bu yüzden klinikte yeni tedavi modellerine gereksinim vardır [184]. Selek ve ark. [185] nüks yırtıkları azaltmak için tendon onarımı sırasında MKH'lerin tendon gücünü arttırdığını gözlemlemiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan bu tez çalışmasında koyunun diz ve dirsek eklemlerinden ilerleyen zamanlarda kıkırdak doku rejenerasyonlarında (Osteoartrit, Romatoid Artrit gibi hastalıkların neden olduğu) kullanılmak üzere sinovial sıvı kaynaklı mezenkimal kök hücreler (SMKH) izole edilmiştir. Daha sonra bu SMKH'lerin *in vitro* koşullarda hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiş ve karakterizasyonları yapılmıştır.

3.1. Kullanılan Malzemeler

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan SMKH'ler, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma ve Yetiştirme Ünitesi'nden alınan 2 adet 0-1 yaş aralığında, ağırlığı 80-90 kilo olan, Anadolu Merinosu cinsinden olan yetişkin koyundan izole edilmiştir. Tezin çalışmaları Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan 2019-03 karar numaralı izin ile yürütülmüştür [Ek-1].

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan DMEM HAM'S F12 besiyeri (%10 FBS,%1 PEN/STREP,%1 L GLUTAMIN), DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) Invitrogen (ABD) firmasından satın alınmıştır. Aynı zamanda serum (FBS) Invitrogen (ABD) firmasından alınmıştır. Osteojenik farklılaşma için kullanılan L-askorbik asit, dekzametazon ve β -gliserol fosfat tuzu Sigma (ABD) firmasından satın alınmıştır. Sinovial sıvıda olan birikintiyi kaldırmak için kullanılan 40 μ m naylon hücre süzgeci (BD Falcon. Becton Dickinson Franklin lakes, NJ, USA) firmasından satın alınmıştır. Farklılaşmayı göstermek için kullanılan Alizarin Red ve Oil Red O boyaları Invitrogen (ABD) firmasından satın alınmıştır.

3.2. Eklem Kapsülünden Sinovial Sıvı Aspirasyonu

Kök hücrelerin izole edilmesi için farklı yaklaşımlar mevcuttur. İzolasyon yönteminin belirlenmesinde mezenkimal kök hücrelerin izole edileceği doku yani mezenkimal kök hücrelerin kaynağı çok önemlidir. İzolasyon işleminden önce kullanılacak bütün malzemeler otoklav vasıtasıyla sterillemiştir. Bu tez çalışmasında 0-1 yaş aralığında, ağırlığı 80-90 kilo olan, Anadolu Merinosu koyun ırkından elde edilen sinovial sıvı kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (SMKH) izolasyonu için koyunlar 15 dakika

aralıklarla intramuskuler olarak anestezi yapılmıştır. Genç ve erişkin koyunlar anesteziden 6-12 saat önce aç bırakılmış, ama anestezide kadar su içmeleri sağlanmıştır. Premedikasyon amacı ile atropin 0.2 mg/kg'lık dozlarda 15 dakikalık aralıklarla intramuskuler olarak verilmiştir. Koyunlar anestezi sonrası dorsal-recumbent pozisyona getirilmiştir. İlk ilaç (atropin) uygulamasından 15 dakika sonra genel anestezi başlatılmıştır. Pentobarbital sodyum'un başlangıç dozu 30 mg/kg'ın intravaskuler olarak yavaş verilmesiyle yaklaşık 60-90 dakika bir anestezi sağlanmıştır. İşlem sonunda karbondioksit kullanarak ve BSRC "Alexander Fleming" Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesinin yönergelerine göre hayvana ötanazi yapılmıştır. Sürekli kalp atışı, vücut sıcaklığı ve perkutan kan O₂, kanın oksijen saturasyonu (SPO₂) anestezi sırasında gözlemlenmiştir. Vücut sıcaklığını korumak için: içinde 38-39°C su sirkülasyonu olan battaniye kullanılmıştır. Gözleri kurumaktan korumak için Ophthalmologic pomat kullanılmıştır. Mikro diseksiyon aletleri %70 etanol ile yıkanarak, birkaç saniye boyunca solüsyona daldırılmıştır. Daha sonra ise antimikrobiyal içine batırılmıştır. Steril serum fizyolojik ile yıkanarak kontaminasyona karşı önlem alınmıştır. Her koyunun eklemlerini disseke eder iken kullanılacak cerrahi aletler mutlaka sterilize edilmiştir.

Koyun yüz yukarı yatırılmış ve eklemi %100 etanol ile yıkanmıştır. Daha sonra makas veya bisturi yardımı ile forseps kullanılarak deri geriye doğru soyulmuş ve yumuşak dokular arka ayaklara kadar uzaklaştırılmıştır, ancak ayak parmaklarını kaplayan kalın keratinize deriye gelindiğinde diseksiyon durdurulmuştur.

Tibial kastan önce ayak bileği eklemi dahil olacak şekilde ayak bileği kesilmiş ve %100 etanol sprey ile kontaminasyona karşı önlem alınmıştır. Ayak bileği eklemleri antibiyotiklerle dolu bir tüpe yerleştirilmiştir. Tüm eklemler için bu işlemler tekrarlanmıştır. Bu adımdan sonra tüm işlemler laminar akış kabini içinde yapılmıştır. Kesilen eklemler birkaç saniye için %70 etanol içeren 100 mm'lik doku kültürü plakalarına yerleştirilmiştir [186].

3.3. Hücre Kültür Çalışmaları

Hücre kültür çalışmaları için, sinovial sıvı kaynaklı mezenkimal kök hücreler (SMKH) kullanılmıştır.

3.3.1. Sinovyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu (SMKH)

Uygun alan seçilmiş ve yaklaşık 15x10 (uzunluk/genişlik) boyutlarında femoral eklemin üzerindeki tüyler jiletle steril şekilde traş edilmiştir. Sonra uygulama alanı aşağıdaki gibi 3 kere sıra ile temizlenmiştir.

- 1) Povidon iyot
- 2) %70 etanol

Alan iyice kuruduktan sonra ise steril örtülerle örtülmüştür. Steril 23 G iğnesi olan 3 ml şırınga eklemin içine sokulmuştur. Sonra eklemden sinovial sıvı aspirasyonu almak için, enjektör ile kibar şekilde aspirasyon işlemi yapılmıştır, eklemden toplanan sinovial sıvının yaklaşık miktarı 0,25-0,75 ml olmuştur. Kandan virüs bulaşmaması için şırınga hemen uzaklaştırılmıştır. Örnekler soğuk zincir reaksiyonu devam ettirilerek yaklaşık 25 dakika sürede laboratuvara yetiştirilmiştir. Laboratuvarda enjektörde bulunan koyun sinoviyal sıvısı 15 ml'lik falkona aktarılmıştır. Enjektörün içinde kalan sıvıyı da almak için PBS ilave edilmiştir. 15 ml'lik falkonda son hacim 5 ml olacak şekilde (eksik olduğunda PBS ilave edilmiştir) falkon tüp santifrüje koyulmuştur. 1500 rpmde 20 dk santifrüj edilmiştir. Süpernatant dikkatli bir şekilde pelete dokunmadan uzaklaştırılmıştır. DMEM HAM'S F12 besiyeri (%10 FBS,%1 PEN/STREP,%1 L GLUTAMIN) olacak şekilde hazırlanmıştır ve hazırlanan besiyerinden 1 ml alınarak pelet çözündürülmüştür. Daha sonra üzerine 5 ml daha besiyeri ilave edilmiştir.

Serolojik pipetle homojen karışması sağlanan karışım 25'lik flaska ekilmiş ve 37 °C 'de %5 CO2 olan inkübatöre kaldırılmıştır. 7 gün boyunca hücreye dokunulmamıştır.(hareket ettirilmemesi önemli) 7. günün sonunda besiyeri çekilip PBS'le yıkama yapılmış ve yeni taze besiyeri flaska eklenmiştir. 10.günün sonunda hücre artık pasajlanmaya uygun hale gelmiştir. Hücrelerin beslenmesi için komplet hücre kültür ortamı hazırlanmıştır. Komplet hücre kültür ortamı, %25 tripsin-edta ve PBS su banyosunda 37°C'de ısıtılmıştır. CO2 inkübatöründen alınmış hücreler mikroskopta incelenmiştir.

Flask dik konuma getirilmiş ve pipet hücre tabakasının olduğu yüzeye değdirilmeden ortam yavaşça çekilmiştir. Hücre tabakasına pipet değdirilmeden flaskın alt köşesine 6ml PBS eklenerek, yüzey yıkanmış ve PBS yavaşça çekilmiştir. Daha sonra yeni bir pipet ile ortama%25 tripsin-edta eklenmiş ve flask 2-3 dakika CO2 inkübatöründe tutulmuştur (Üzerini biraz geçmesi yeterli T25;3 ml T75; 5ml).

Mikroskopta hücrelerin flask tabanından serbestleşip serbestleşmediği kontrol edilmiştir (Eğer hücreler serbest değil ise tabanına birkaç kez vurulur).

Hücreler serbest ise flaska komplet ortam eklenmiş (eklenen tripsinin 3-4 katı) ve santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Hücreler 1200 rpm de 5dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış, pelet 1:9 oranında DMSO ve FBS kullanılarak dondurulmuştur. Dondurma için cryo tüpe konan hücre önce -20'de 1 saat bekledikten sonra -80'e kaldırılmıştır [30, 186].

3.4. Hücre Karakterizasyonu

Hücrelerin metabolik aktivitesini ve canlılığını değerlendirmek için herhangi bir viabilite testine gerek duyulmadı çünkü hücreler canlı ve sağlıklı idi. Hücreler uzun fibroblastoid görünümlü, granülaritesi az, yapışıp çoğalan hücreler idi.

Sonda ise boyanmış hücreler akar suda yıkanarak optik mikroskop altında incelenmiştir.

3.5.1. SMKH'lerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

Mezenkimal kök hücreler *in vitro* ortamda ve uygun koşullarda birçok hücre serisine (özellikle: adipojenik, kondrojenik ve osteojenik) farklılaşabilmeleridir.

3.5.2. Osteojenik Farklılaşma

Osteojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi için koyun sinovial sıvısından elde edilen MKH'ler 3 pasaja kadar DMEM HAM'S F12 besiyeri (%10 FBS,%1 PEN/STREP,%1 L

GLUTAMIN) içerisinde üretilmiştir. Tripsinizasyon protokolüne uygun olarak toplanan hücrelerin canlılığı değerlendirilip sayımı yapılmıştır. 12 kuyucuklu tabakların osteojenik farklılaşma için ayrılan 4 kuyucuğuna 25 000 MKH 1 ml %10 FBS içeren DMEM-LG (gelişim mediumu) içerisinde kontrol için ayrılan, 1 kuyucuğa ise 12 5000 MKH 1 ml gelişim mediumu içerisinde ekilmiştir. Haftada 2 kez besiyeri DMF-10 ile değiştirilerek osteojenik farklılaşma değerlendirmesi için ekilen kuyulardaki hücre yoğunluğunun %70-80 ulaşması sağlanmıştır. Daha sonra bütün kuyucuklar 1 ml PBS ile yıkanmıştır. Osteojenik farklılaşma için kuyucukların bir kısmına Çizelge 3.1’de içeriği listelenen 2 ml osteojenik farklılaşma besi yeri eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına ise büyüme besi yeri eklenmiştir. 21 günde farklılaşma sonlandırılmıştır. Bütün kuyucuklar PBS ile yıkandıktan sonra osteojenik farklılaşma için ayrılan kuyulardan bir tanesi %10 formalin solüsyonu (Sigma ABD) ile fikse edilmiştir.

3.5.2.1 Alizarin Red Boyaması

Hücrelerin osteojenik farklılaşmasını ve ECM’de biriken kalsiyum birikimlerini görüntülemek üzere Alizarin Red ile boyama yapılmıştır. Formalin uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml Alizarin RedS (ARS) boyası eklenmiş, daha sonra 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuk 2 defa ddH₂O ile yıkanmıştır. Daha sonra hücrelerdeki kalsiyum fosfat mineral depositleri göstermek amacı ile dijital görüntüleme sistemi (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir [187].

Çizelge 3.1. Osteojenik farklılaşma medyumunun içinde bulunan kimyasalların listesi [187].

	50 ml medyum hazırlamak için	Saklama koşulu	Firma ve Katalog numarası
DMEM-LG	30 ml	+4	BIOCHROM, F0415
%10 Hİ-FBS	5ml	-20	BIOWEST, S181G-500
%1 Penisilin/streptomisin	500ul	-20	BIOCHROM, A-2213
%1 L-Glutamin (200Mm)	500ul	-20	BIOCHROM, K-0283
Deksametazon 100 nM	5ul	-20	SIGMA, D2915
Beta gliserofosfat 10	500ul	-20	APPLİCHEM,
L-askorbik asit 0,2	500ul	-20	SIGMA, ABD A4403
DMEM-LG	İle 50 ml tamamlanır	+4	BIOCHROM, F0415

3.5.3. Adipojenik Farklılaşma

Adipojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi için koyun sinovial sıvısından elde edilen MKH'ler 3 pasaja kadar DMEM HAM'S F12 besiyeri (%10 FBS,%1 PEN/STREP,%1 L GLUTAMIN) içerisinde üretilmiştir. Tripsinizasyon protokolüne uygun olarak toplanan hücrelerin canlılığı değerlendirilip, sayımı yapılmıştır. 12 kuyucuklu tabakların adipojenik farklılaşma için ayrılan 4 kuyucuğuna 25 000 MKH 1 ml %10 FBS içeren DMEM-LG (gelişim mediumu) içerisinde kontrol için ayrılan, 1 kuyucuğa ise 12 5000 MKH 1 ml gelişim mediumu içerisinde eklenmiştir. Adipojenik farklılaşmanın değerlendirmesi için ekilen kuyulardaki hücre yoğunluğunun %90-100 ulaşması sağlanmıştır. Daha sonra bütün kuyucuklar 1 ml PBS ile yıkanmıştır. Adipojenik farklılaşma için kuyucukların bir kısmına Çizelge 3.2'de içeriği listelenen 1 ml adipojenik farklılaşma besi yeri eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına ise gelişim mediumu

eklenmiştir. 21. günde farklılaşma sonlandırılmıştır. Bütün kuyucuklar PBS ile yıkandıktan sonra hücreler %10 formalin solüsyonu (Sigma ABD) ile fiks edilmiştir.

3.5.3.1 Oil Red O boyama

Trigliseridleri boyamak için kullanılan ve yağda çözünen bir boya olan Oil Red O boyaması zamanı yağ damlacıkları kırmızı renge boyanmaktadır. Formalin uzaklaştırıldıktan sonra bütün kuyucuklara 1 ml (1,1 mg/ml) oilredO (ORO) boyası (SIGMA, catno:0-0625) eklendikten sonra 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bütün kuyucuklar 2 defa ddH₂O ile yıkanmıştır. Daha sonra hücrelerdeki lipid birikimini göstermek amacı ile dijital görüntüleme sistemi (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir[187].

Çizelge 3.2. Adipojenik farklılaşma medyumunun içinde bulunan kimyasalların listesi [187].

	50 ml medyum hazırlamak	Saklama koşulu	Firma ve Katalog numarası
DMEM-LG	30 ml	+4	BIOCHROM, F0415
%10 Hİ-FBS	5 ml	-20	BIOWEST, S181G-500
%1 Penisilin/streptomisin	500ul	-20	BIOCHROM, A-2213
%1 L-glutamin (200Mm)	500ul	-20	BIOCHROM, K-0283
Deksametazon 1 µm	50ul	-20	SIGMA, D2915
Indometazin 60 µm	50ul	+4 veya -	SIGMA, 1341001
İnsulin 5 µg	62,5ul	-20	SIGMA, I3536
IBMX 3-Izobutil 1- metilksantin 500 µM	50ul	-20	APPLICHEM, A0695,0001
DMEM-LG	İle 50 ml	+4	BIOCHROM, F0415

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışmada sinovial sıvı kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (SMKH) osteojenik ve adipojenik farklılaşma özellikleri incelenmiştir.

4.1. Sinovyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu (SMKH)

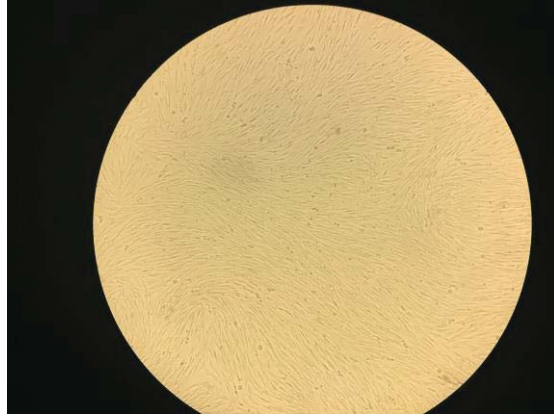
Koyunun her bacağından yaklaşık 0.25-0.75 ml sinovial sıvı elde edilmiştir. Şırınga hemen eklemde çekilerek kapatılmış ve buz aküleri eşliğinde steril köpük kutuya konulmuştur. Daha sonra bu örnekler soğuk zincir reaksiyonu devam ettirilerek yaklaşık 25 dakika içerisinde laboratuvara yetiştirilmiştir.

4.2. Hücre Kültür Çalışmaları

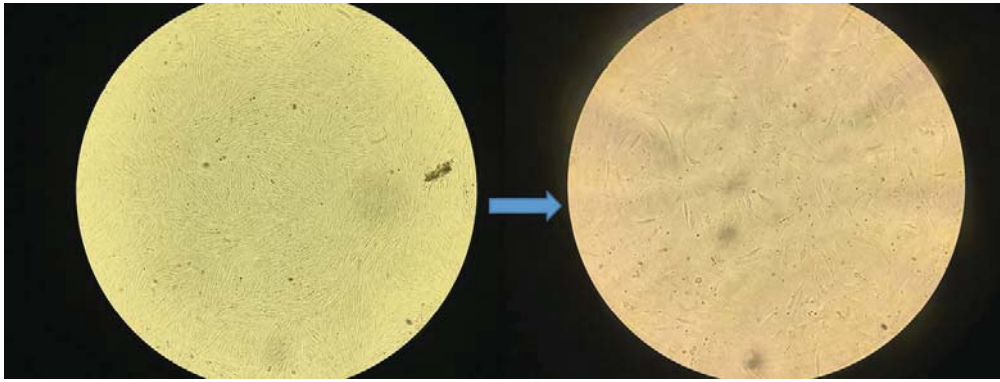
Çalışmalarda sinovial sıvı kaynaklı mezenkimal kök hücreler (SMKH) kullanılmıştır.

4.2.1. Sinovyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu (SMKH)

Sinovial sıvı kökenli hücrelerin izolasyonu sonucunda ilk 3 günde hücreler %85 oranında yoğunluğa ulaşmıştır. Bu ise hücre canlılığının çok yüksek olduğunu göstermektedir. Lakin bu aşamada MKH'ler ile fibroblast hücrelerini ayırt etmek mümkün değil, çünkü morfolojik olarak her iki hücre bir birine çok benzemektedir (Şekil 4.1). Bu aşamada MKH'ler fibroblast benzeri iğsi bir morfoloji sergilemektedir. Hücrelerin içerisindeki MKH'leri ayırt etmek için kültür devam ettirilmiştir. Yaklaşık 5-6 gün sonra kullanılan MKH'lere özel besiyeri sonucunda fibroblastlar ortadan kaldırılmış ve ortamda sadece MKH'ler kalmıştır. Böylece MKH'lerin varlığı tespit edilmiştir. Şekil 4.2 özel besiyeri kullanımından sonra elde edilen MKH'lerinin OlympusCXX41 mikroskopundaki görüntülerini göstermektedir. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi MKH'ler giderek artan ve yüzeye tutunup yayılan fibroblast benzeri iğsi bir morfoloji sergileyen hücrelerdir.



Şekil 4.1 Koyun sinovial sıvı kaynaklı MKH ve fibroblast hücreleri. Optik mikroskop ile incelendiği zaman hücrelerin kültür kabının yüzeyine tutunduğu ve yayıldığı görünmektedir. Bu hücreler fibroblast benzeri iğsi bir görünümündedir.



Şekil 4.2 Optik mikroskopla görüntüleme zamanı giderek artan ve yüzeye tutunup yayılan fibroblast benzeri iğsi bir morfoloji sergileyen koyun sinovial sıvı kaynaklı MKH. İlk resimde MKH ve fibroblastlar görünmektedir, ikinci resimde ise artık MKH belirginleşmiş ve yüzeyi tamamen kaplamıştır.

Daha sonra MKH'leri çoğalmak ve farklılaşma için hazır hale getirmek amacı ile 3 pasaj yapılmıştır. 3. pasajın sonunda süpernatant uzaklaştırılmış, pelet 1:9 oranında DMSO ve FBS kullanılarak dondurulmuştur. Dondurma için cryo tüpe konan hücre önce -20'de 1 saat bekledikten sonra -80'e kaldırılmıştır. 3. pasajın sonunda hücreler farklılaşmaya hazır hale gelmiştir.

4.3. Hücre Karakterizasyonu

3. pasaj sonucunda elde edilen MKH'ler uzun fibroblastoid görünümüne sahipti. Bu hücrelerin granülariteleri çok az idi ve kültür kabının tabanına yapışarak çoğalma eylemi gösteriyorlardı. Bu sonuçlar hücrelerin canlılığının yüksek olduğunu ve aynı zamanda metabolik aktivitelerinin de yüksek olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlara dayanarak hücrelerin canlılığı ve metabolik aktiviteleri için herhangi bir viabilite testine gerek duyulmadı.

4.4. SMKH'lerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

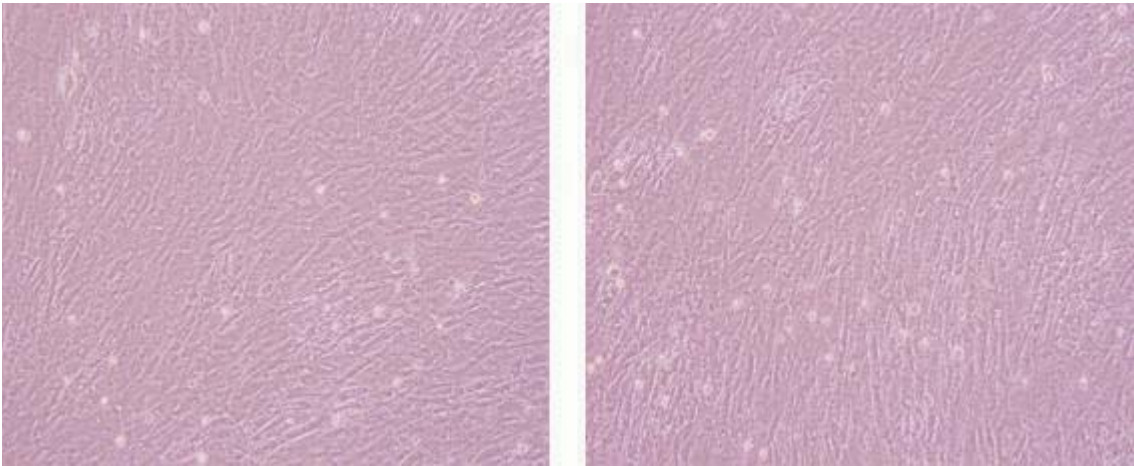
MKH'ler in vitro ortamda ve uygun koşullarda bazı hücre serilerine farklılaşabilmektedirler, özellikle: adipojenik, kondrojenik ve osteojenik.

4.4.1 Osteojenik Farklılaşma

3. pasajdan sonra osteojenik farklılaşma için yeterli miktarda MKH'ler elde edilmiştir. Osteojenik farklılaşma başladıktan sonra 6, 13 ve 21. günlerde hücrelerin farklılaşması mikroskop altında incelenmiş ve 21. günde ek olarak Alizarin Red boyası ile boyanarak mikroskop altında incelenmiştir. Kontrol kuyucuklarına ise osteojenik farklılaşma mediumu eklenmemiş sadece büyüme besi yeri eklenmiştir. Bütün kuyucuklar PBS ile yıkandıktan sonra osteojenik farklılaşma için ayrılan kuyulardan bir tanesi %10 formalin solüsyonu (Sigma ABD) ile fikse edilmiştir. 6. günün sonunda hücreleri incelediğimizde, hücreler bir birinin içerisine girmiş şekilde görünmektedir ve hücre hatları net olarak görünmemektedir. Bu sonuç 6. günde henüz yeterli miktarda osteojenik farklılaşmanın gerçekleşmediğini lakin hücrelerin farklılaşmaya doğru gittiğini göstermektedir. Kontrol grubunu incelediğimizde SMKH'ler normal morfolojik görünümde yani fibroblast benzeri hücrelerdir ve hücre yoğunluğu çok fazladır. 6. günün sonuçlarına dayanarak daha net farklılaşma sonucu elde etmek için kültür devam ettirilmiştir. 6. güne ait osteojenik farklılaşma resimleri şekil 4.3'te ve kontrol grubu şekil 4.4'te gösterilmiştir.

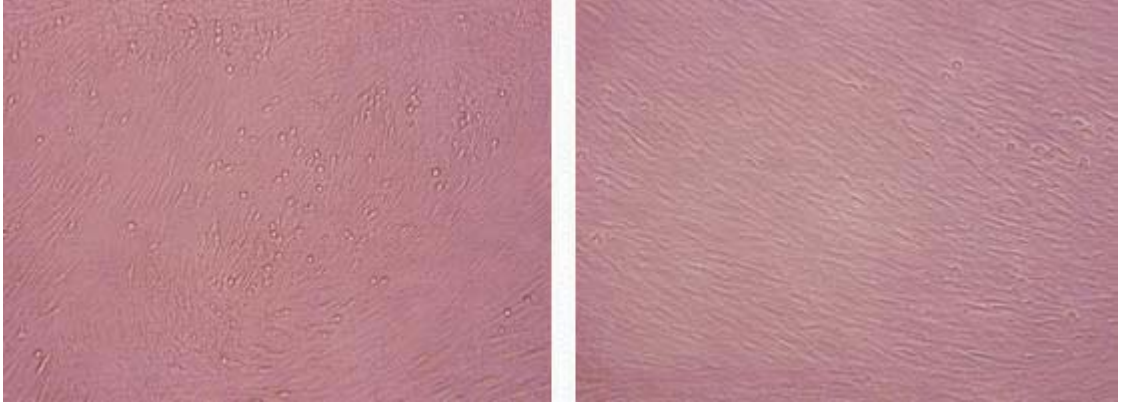


Şekil 4.3 Osteojenik farklılaşma 6. gün: Hücreler birbiri içerisine girmiş, hücre hatları çok net değil (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.

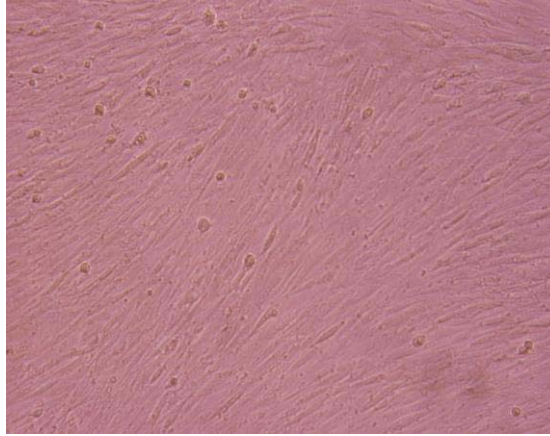


Şekil 4.4. Kontrol grubu 6. gün: Hücreleri normal morfolojik görünümde, ancak çok yoğun. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.

Osteojenik farklılaşma devam ettirilmiş ve her 3 günde bir medium değiştirilmiştir. Osteojenik farklılaşmanın 13. gününde boyama sonucunda hücreleri incelediğimizde, hücreler bir birinin içerisine girmiş şekilde görünmektedir ve hücre hatları net olarak görünmemektedir. Lakin farklılaşmanın 6. gününe oranla hücre hatları daha belirgindir ve küçük kalsiyum kristalleri görülmektedir. Bu ise hücrelerin osteojenik farklılaşmasının devam ettiğini göstermektedir. Farklılaşma 21. güne kadar devam ettirilmiştir. 13. günün sonuçları şekil 4.5'te ve kontrol grubu şekil 4.6'da gösterilmiştir.

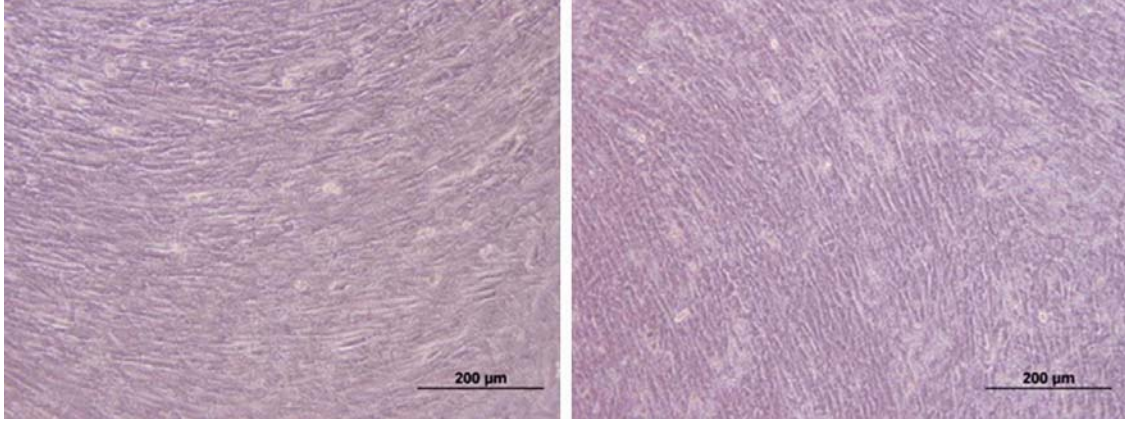


Şekil 4.5 Osteojenik farklılaşma 13. gün: Hücreler birbiri içerisine girmiş, hücre hatları çok net değil, lakin 6. güne göre hücre hatları daha belirgindir. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.

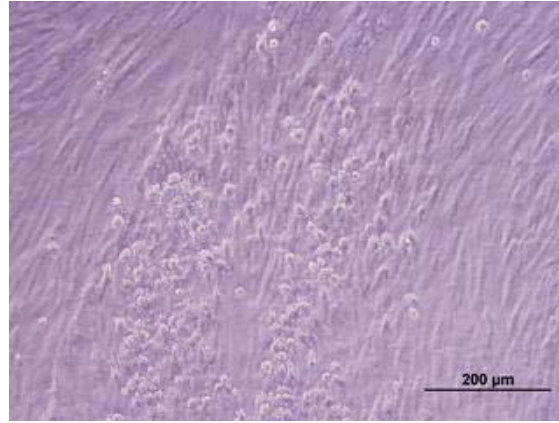


Şekil 4.6 Kontrol grubu 13. gün: Hücreleri normal morfolojik görünümde, ancak çok yoğun. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.

Osteojenik farklılaşma devam ettirilmiş ve her 3 günde bir medium değiştirilmiştir. Osteojenik farklılaşmanın 21. gününde boyama yapılmadan önce hücreleri mikroskop altında incelediğimizde, hücre hatlarının net olarak görünmediği görülmektedir. Lakin hücre hatları 6. ve 13. güne oranla daha belirgindir. Aynı zamanda kalsiyum kristalleri görülmektedir. 21. günün sonuçları şekil 4.7’de ve kontrol grubu şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7 Osteojenik farklılaşma 21. gün: Hücreler birbiri içerisine girmiş, hücre hatları çok net değil, lakin 6. ve 13. güne göre hücre hatları daha belirgindir. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.

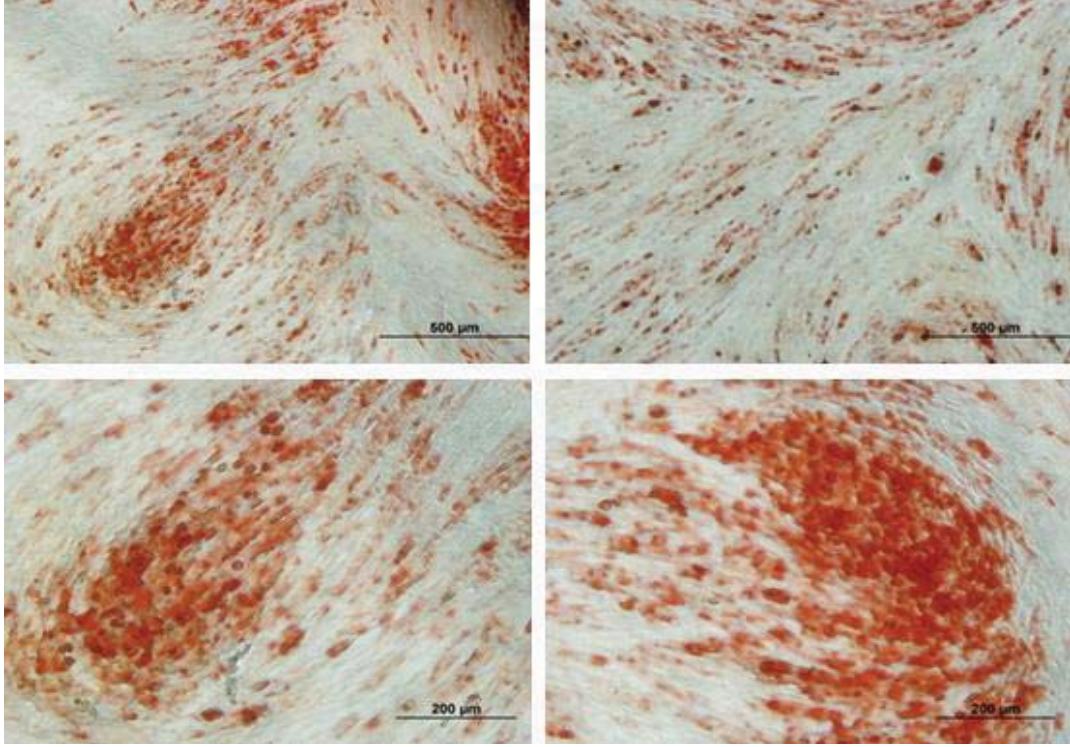


Şekil 4.8 Kontrol grubu 21. gün: Hücreleri normal morfolojik görünümde, ancak çok yoğun. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.

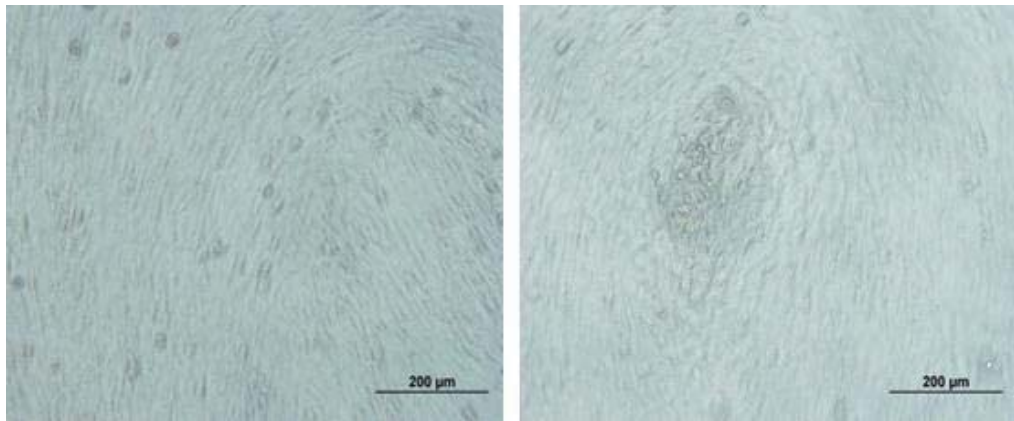
4.4.1.1 Alizarin Red Boyaması ve 21. gün farklılaşma sonuçları

Hücrelerin osteojenik farklılaşmasını ve ECM’de biriken kalsiyum birikimlerini görüntülemek üzere Alizarin Red ile boyama yapılmıştır. Mineralize depolar birinci haftanın sonunda belirmektedir. 21. günde Alizarin Red ile boyama sonucunda hücrelerde kalsiyum fosfat birikimi görülmüştür. Bu ise hücrelerde osteojenik farklılaşmanın mevcut olduğunu göstermektedir. Şekil 4.9’da da görüldüğü gibi hücrelerde yoğun bir şekilde kalsiyum birikimleri görülmektedir. Kalsiyum depoları Alizarin Red boyaması sonucu

kırmızı renkte görülmektedir. 21. günün osteojenik farklılaşma Alizarin Red boyaması sonuçları şekil 4.9'da ve kontrol grubu şekil 4.10'da gösterilmiştir.



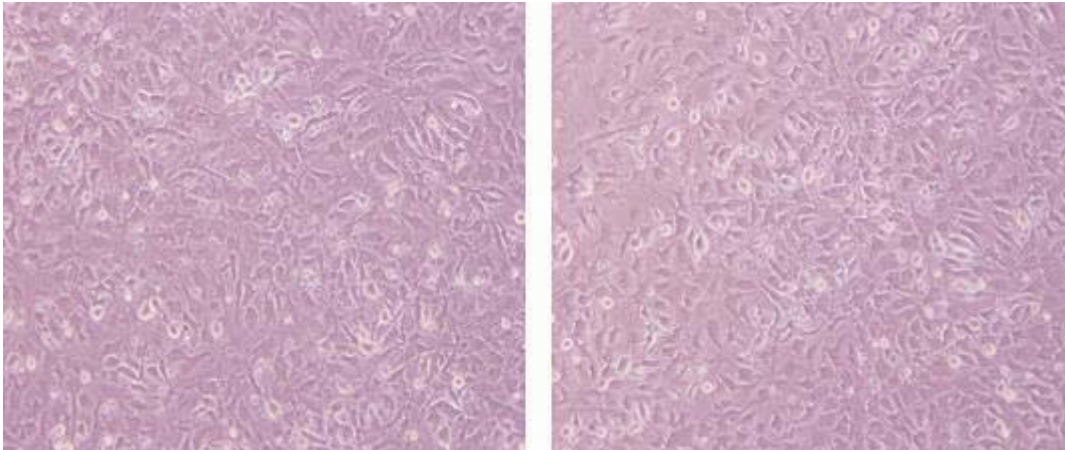
Şekil 4.9 Osteojenik farklılaşma 21. gün Alizarin Red boyaması: Hücrelerde oluşan yoğun miktarda kalsiyum birikimleri kırmızı renkte görülmektedir. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.



Şekil 4.10 Kontrol grubu 21. gün: Hücreler fibroblast benzeri normal morfolojik görünümde ve hücre yoğunluğu çok fazladır. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.

4.4.2 Adipojenik Farklılaşma

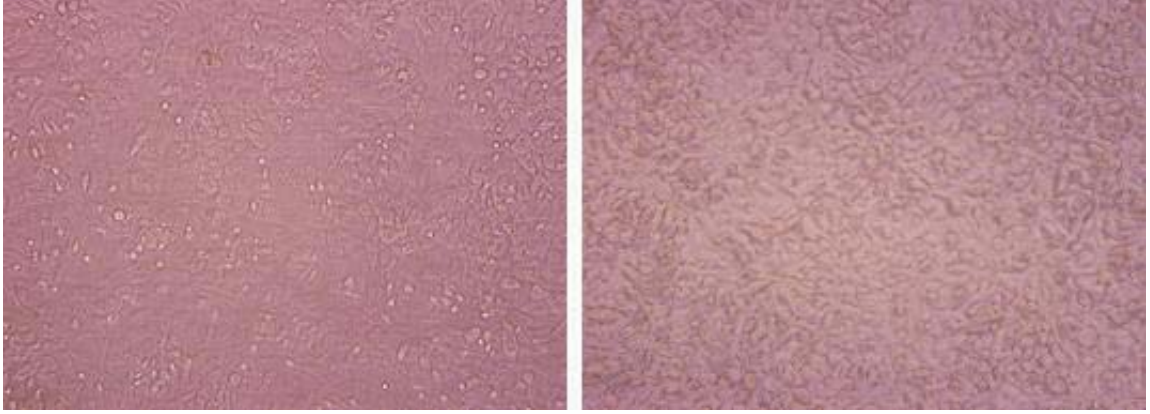
3. pasajdan sonra adipojenik farklılaşma için yeterli miktarda MKH'ler elde edilmiştir. Adipojenik farklılaşma başladıktan sonra 6, 13 ve 21. günlerde hücrelerin farklılaşması mikroskop altında incelenmiş ve ek olarak 21. günün sonunda Oil Red O boyası ile boyanarak tekrar mikroskop altında incelenmiştir. Kontrol kuyucuklarına ise gelişim mediumu eklenmiştir. Bütün kuyucuklar PBS ile yıkandıktan sonra hücreler %10 formalin solüsyonu (Sigma ABD) ile fiks edilmiştir. 6. günün sonunda hücreleri incelediğimizde, hücreler morfolojik olarak yuvarlaklaşmaya başlamış, bazı hücrelerde minik lipid dropletleri gözlenmektedir. Bu sonuç ise hücrelerin farklılaşmaya başladığını göstermektedir. Kontrol grubunu incelediğimizde SMK'ler normal morfolojik görünümde yani fibroblast benzeri hücrelerdir ve hücre yoğunluğu çok fazladır. Farklılaşmanın daha da belirgin hale gelmesi için kültür devam ettirilmiştir. 6. güne ait adipojenik farklılaşma resimleri şekil 4.11'de ve kontrol grubu şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.11 Adipojenik farklılaşma 6. gün: Hücre morfolojik olarak yuvarlaklaşmaya başlamış, bazı hücrelerde minik lipid dropletleri gözlenmekte. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.

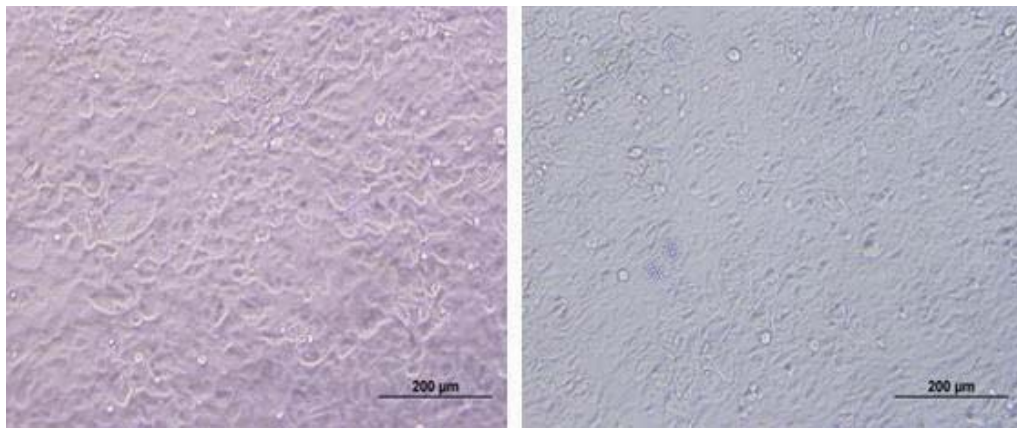
13. günün sonunda hücreleri incelediğimizde, hücreler morfolojik olarak yuvarlaklaşmış ancak minik lipid dropletleri net görünmemektedir. Bu sonuç ise hücrelerin farklılaşmasının devam ettiğini göstermektedir. Kontrol grubunu incelediğimizde SMK'ler normal morfolojik görünümde yani fibroblast benzeri hücrelerdir ve hücre yoğunluğu çok fazladır. Farklılaşmanın daha da belirgin hale gelmesi için kültür devam

ettirilmiştir. 13. güne ait adipojenik farklılaşma resimleri şekil 4.12’de ve kontrol grubu şekil 4.6’da gösterilmiştir.



Şekil 4.12 Adipojenik farklılaşma 13. gün: hücreler morfolojik olarak yuvarlaklaşmış ancak minik lipid dropletleri net görünmemekte. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.

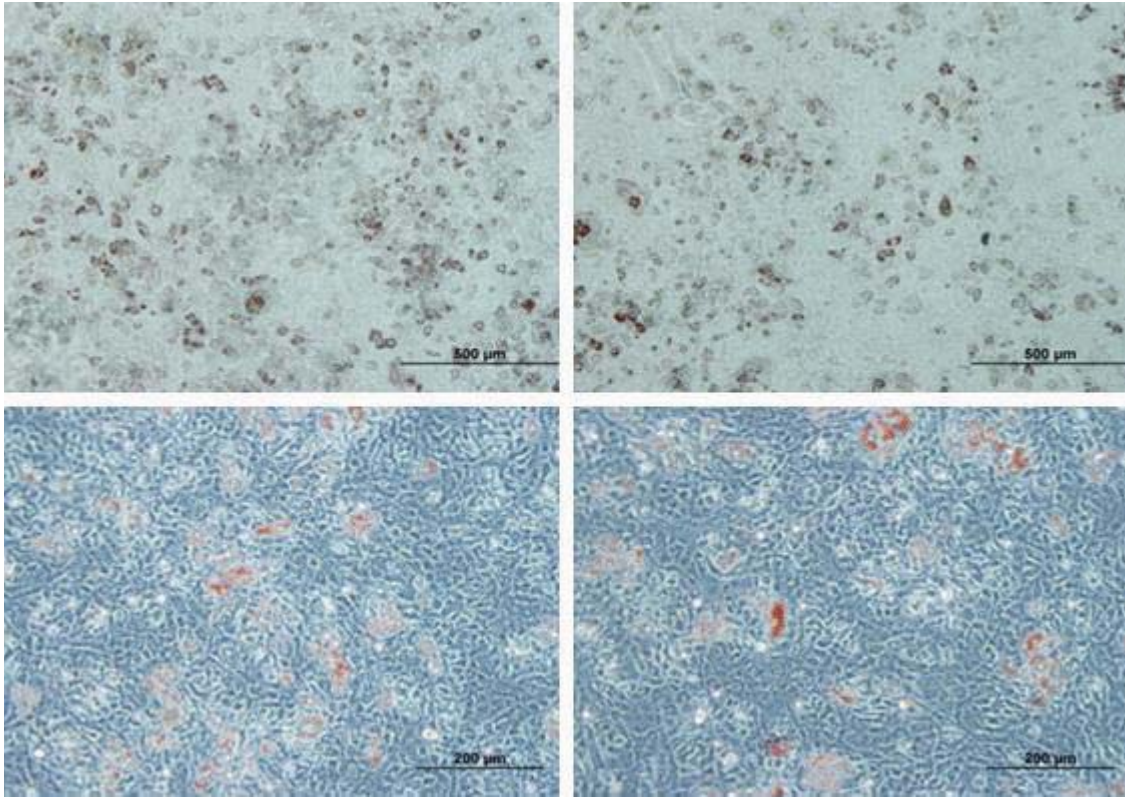
21. günün sonunda Oil Red O boyaması yapılmadan önce hücreleri incelediğimizde, hücrelerin morfolojik olarak yuvarlaklaştığını görmekteyiz. Ancak minik lipid dropletleri net görülmemektedir. Kontrol grubunu incelediğimizde SMK’ler normal morfolojik görünümde yani fibroblast benzeri hücrelerdir ve hücre yoğunluğu çok fazladır. 21. güne ait adipojenik farklılaşma resimleri şekil 4.13’de ve kontrol grubu şekil 4.8’de gösterilmiştir.



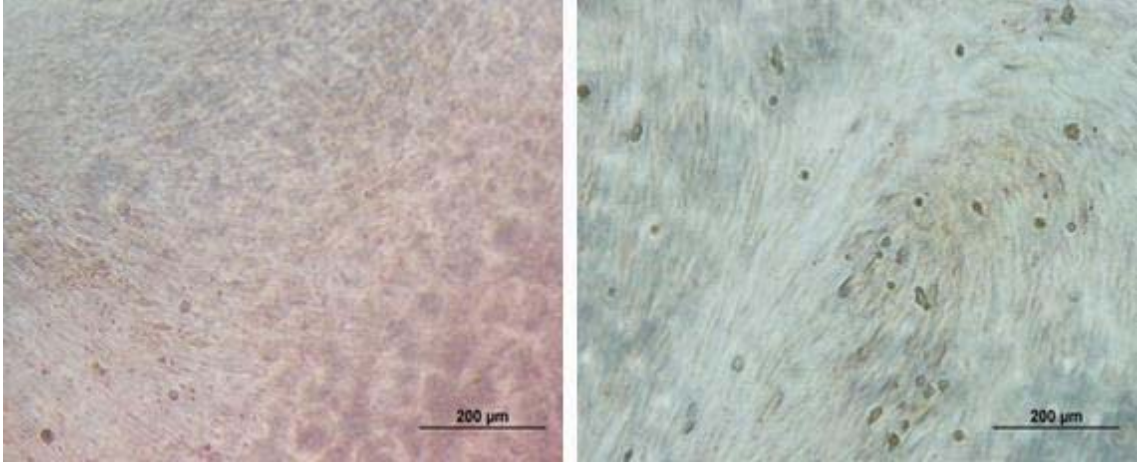
Şekil 4.13 Adipojenik farklılaşma 21. gün: hücreler morfolojik olarak yuvarlaklaşmış ancak minik lipid dropletleri net görünmemekte. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.

4.4.2.1 Oil Red O Boyaması ve 21. gün farklılaşma sonuçları

Oil Red O, trigliseridleri boyamak için kullanılır. Yağda çözünen bir boyadır ve boyama sonrası yağ damlacıkları kırmızıya boyanmaktadır. 21. günün sonunda lipid damlaları içeren adipositler oluşmaktadır. Bu adipositlerde lipid damlacıkları kırmızı renktedir ve net görülmektedir. 21. güne ait adipojenik farklılaşma Oil Red O boyaması resimleri şekil 4.14'te ve kontrol grubu şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14 Adipojenik farklılaşma 21. gün Oil Red O boyaması: hücreler morfolojik olarak yuvarlaklaşmış ve minik lipid dropletleri net görünmektedir. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.



Şekil 4.15 Kontrol grubu 21. gün Oil Red O boyaması: Hücreleri normal morfolojik görünümde, ancak çok yoğun. (Mikroskop: OlympusCXX41 Kamera: Olympus, DP71) ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.

5. YORUM

Literatürde koyun sinovial sıvı kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşması ile ilgili birçok çalışma bulunsa da, osteojenik ve adipojenik farklılaşması ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Koyunun diz ve dirsek eklemlerinden elde edilen sinovial sıvıdan izole edilen MKH'ler morfolojik olarak uzun fibroblast görünümlü, canlı, kültür kabına yapışıp çoğalan hücreler idi. SMKH'ler %30-40 civarında osteojenik ve %30-40 civarında da adipojenik farklılaşma gösterdi. Osteoblast öncülerine farklılaşan SMKH'lerin hücrelerin ekstraselüler matriksinde 21. günün sonunda kalsifikasyon ve kalsiyum depoları tespit edildi. Osteojenik farklılaşma 21. günün sonunda Alizarin Red ile boyanan hücrelerde kalsiyum fosfat birikimi ile tanımlandı. Adipositlerde ise yağ hücresi fenotipi görülmektedir. Yani trigliseridlerin toplandığı büyük ve yuvarlak yağ damlacığı ortaya çıkmaktadır. Adipojenik farklılaşmayı göstermek için 21. günün sonunda hücreler Oil Red O ile boyanmıştır. Bu boya trigliseridleri kırmızı renge boyar.

Sinovial sıvıyı elde etmek kemik iliğini elde etmekten daha kolaydır ve daha az invaziv işlem gerektirir. Sinovial sıvıdan elde edilen MKH'ler ise %85 oranında canlılık gösterir. Lakin deney sonucunda SMKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyelinin düşük olduğu görülmektedir. Bu konuda çok az çalışma yapıldığı için sonuçların ileride yapılan çalışmalara katkısı olacaktır.

Osteojenik farklılaşmada 6. günün sonunda hücreleri incelediğimizde, hücreler bir birinin içerisine girmiş şekilde görünmektedir ve hücre hatları net olarak görünmemektedir. Osteojenik farklılaşmanın 13. gününde boyama sonucunda hücreleri incelediğimizde, hücreler bir birinin içerisine girmiş şekilde görünmektedir ve hücre hatları net olarak görünmemektedir. Lakin farklılaşmanın 6. gününe oranla hücre hatları daha belirgindir ve küçük kalsiyum kristalleri görülmektedir. 21. günde Alizarin Red ile boyama sonucunda hücrelerde kalsiyum fosfat birikimi görülmüştür. Bu ise hücrelerde osteojenik farklılaşmanın mevcut olduğunu göstermektedir.

Adipojenik farklılaşmanın 6. günün sonunda hücreleri incelediğimizde, hücreler morfolojik olarak yuvarlaklaşmaya başlamış, bazı hücrelerde minik lipid dropletleri gözlenmektedir. 13. günün sonunda hücreleri incelediğimizde, hücreler morfolojik olarak yuvarlaklaşmış ancak minik lipid dropletleri hala net görünmemektedir. 21. günün sonunda lipid damlaları içeren adipositler oluşmaktadır. Bu adipositlerde trigliseridlerin toplandığı büyük ve yuvarlak lipid damlacıkları kırmızı renktedir ve net görülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Yeter, E., Demirtaş, S., Organ nakilleri ve organ bağışının önemi. Erişim adresi: <http://kisi.deu.edu.tr/bulent.cavas/ders/bok3.pdf>. Erişim tarihi: 12.04.2019.
- [2] Gülen, H., Karaca, A., Organ Transplantasyonu Sürecinde Donör Eğitimi ve Hemşirelik Bakımı, *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(2): 83-88, **2018**.
- [3] Gümüşderelioğlu, M., Doku mühendisliğinde nanoteknoloji, *Tübitak Yayınları*, Bilim ve Teknik Özel Eki, **2007**.
- [4] Korkusuz, F., Doğan, M., Bozkurt, M., Cartilage tissue engineering, *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği*, 9(3):175-178, **2010**.
- [5] Tur, K., Biomaterials and Tissue Engineering for Regenerative Repair of Articular Cartilage Defects, *Türk Romatoloji Dergisi*, 206-217, 2009.
- [6] Baylar, E., Tavşan distal femur osteonekroz modelinde sinoviyal greftlemenin etkisi: hayvan modelinde karşılaştırmalı çalışma, Uzmanlık tezi, Başkent Üniversitesi/ Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Ankara, **2016**.
- [7] Yılmaz, C., Stem cells and biomaterials in treatment of cartilage injuries, *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği*, 9(3):179-181, **2010**.
- [8] Kern, S., et al., Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue, *Stem Cells*, 24, 5, 1294-301, **2006**.
- [9] Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., Hedrick, M.H., Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, *Molecular Biology of the Cell*, 13, 4279-95, **2002**.

- [10] Shu, W., et al., Comparing the biological characteristics of adipose tissue-derived stem cells of different persons, *J Cell Biochem*, 113, 6, 2020-6, **2012**.
- [11] Özsoy, M, H., Altınel, L., Başarır, K., Çavuşoğlu, A, T., Dinçel, V, E., Romatoid Artrit Eklem Hastalığının Patogenezi, *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği*, **2006**.
- [12] Reddi, A. H., Symbiosis of biotechnology and biomaterials: Applications in tissue engineering of bone and cartilage, <https://doi.org/10.1002/jcb.240560213>, **1994**.
- [13] Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular Cartilage Part II: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation, *J Bone J Surg Am* 79-A(6):612-32, **1997**.
- [14] Şenköylü, A., Korkusuz, F., Kıkırdak Onarımında Doku Mühendisliği Uygulamaları, *TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi* Cilt: 3 Sayı: 3-4, **2004**.
- [15] Hunziker, E.B., Lippuner, K., Keel, M.J.B., Shintani, N., An educational review of cartilage repair: precepts&practice&myths&misconception&progress&prospects, *Osteoarthritis and Cartilage* 23, 334e350, **2015**.
- [16] EMİN, N., Yapay niş mikroçevrede doku gelişim modeli oluşturulması, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2012**.
- [17] Reinholz, G.G., Lu, L., Saris, D.B.F., Yaszemski M.J. and O'Driscoll S.W., Animal Model for Cartilage Reconstruction, *Biomaterials*, pp. 1-11, **2003**.
- [18] Vacanti, C.A. and Vacanti, J.P., Principles of Tissue Engineering, Edit by Lanza R., Langer R., Chick W. Landes Company, pp. 619-630, **1997**.
- [19] Angel, M., Razzano, P. and Grande, D., Defining The Challenge : The Basic Science Of Articular Cartilage Repair And Response To Injury, *Lippincott Williams & Wilkins, Inc.* Vol. 11 (3), pp. 168-181, **2003**.

[20] Haberal, B., Tam kat kırıldak hasarlarının pediküllü ve serbest sinoviya grefti ile tedavisi: hayvan modelinde karşılaştırmalı çalışma, Uzmanlık tezi, Başkent Üniversitesi/ Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Ankara, **2015**.

[21] Sağlam, M., Aştı, R. ve Özer, A., Genel Histoloji, Yorum Matbaacılık, Ankara, **2001**.

[22] Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G. and Langer, R., Cultivation of Cell-Polymer Cartilage Implants in Bioreactors, *J Cell Biochem* Vol. 51, pp. 257-64, **1993**.

[23] Reddi, A.H., Symbiosis of Biotechnonology and Biomaterials: Aplications in Tissue Engineering of Bone and Cartilage, *Journal of Cellular Biochemistry* Vol. 56, pp.192-195, **1994**.

[24] Barbero, A., Grogan, S., Schafer D., Heberer, M., Mainil-Varnet, P. and Martin, I.. Age Related Changes In Human Articular Chondrocyte Yield, Proliferation And Post-Expantion Chondrogenic Capacity. *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol. 12, pp. 476-484, **2004**.

[25] Knudson, C.B. and Knudson, W., Cartilage Proteoglycans, *Cell and Developmental Biology*, Vol. 12, pp. 69-78, **2001**.

[26] Alexander, P.G., et al., Mesenchymal stem cells in musculoskeletal tissue engineering, 1171-1199, Principles of Tissue Engineering, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00054-9>, **2014**.

[27] Nehrer, S., Breinan, H.A., Ramappa, A., Young, G., Shortkroff, S., Louie, L.K., Sledge, C.B., Yannas, I.V. and Spector, M., Matrix Collogen Type And Pore Size Influence Behaviour of Seeded Canine Chondrocytes, *Biomaterials*, Vol. 18 no. 11, pp 769-776, **1997**.

[28] Vacanti CA, Vacanti JP: The science of tissue engineering. *Orthop Clin North Am*, 31(3):351-5, **2000**.

- [29] Baksh, D., L. Song, and R.S. Tuan, Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy, *J Cell Mol Med*, 8, 3, 301-16, **2004**.
- [30] Shikhaliyeva, İ., Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasının bor katkılı hap-kaplı kitosan doku iskelelerinde incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, **2015**.
- [31] Chen AC, Nagrampa JP, Schinagl RM, Lottman LM, Sah RL: Chondrocyte transplantation to articular cartilage explants in vitro, *J Orthop Res* , 15(6):791-802, **1997**.
- [32] Şenköylü A, Şimşek A, Şahin İF, Özoğul C, Menevşe S, Denkbaş E, Pişkin E: Interaction of cultured chondrocyte with chitosan scaffold, *J Bioactive Comp Polym*, 16(6):32-6, **2001**.
- [33] Şenköylü A: Tavşanların diz eklemlerinde oluşturulan osteokondral kayıpların yapay kırıldak dokusu ile tedavisinde ağ olarak kitosan kullanımı. Uzmanlık Tezi, **2001**.
- [34] Hunziker EB: Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects, *Osteoarthritis Cartilage*, 10(6):432-63, **2001**.
- [35] Kandel RA, Boyle J, Gibson G, Cruz T, Speagle M: In vitro formation of mineralized cartilagenous tissue by articular chondrocytes, *In Vitro Cell Dev Biol*, 33(3):174-81, **1997**.
- [36] Ito Y, Fitzsimmons S, Sanyal A, Mello M, Mukherjee N, O'Driscoll S: Localization of chondrocyte precursors in periosteum, *Osteoarthritis Cartilage*, 9(3): 215-23, **2001**.
- [37] Ostrander E, Goomer C, Tontz D, Khatod M, Harwood D, Maris W: Donor cell fate in tissue engineering for articular cartilage repair, *Clin Orthop*, 389:228-37, **2001**.
- [38] Korkusuz F, Özkul A, Burgu İ: Isolation and in vitro reproduction of periosteal cells, *Turk J Med Res*, 11(3):107-11, **1993**.

- [39] Koga H, Engebretsen L, Brinchman JE, Muneta T, Sekiya I, Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*;17(11):1289–97, **2009**.
- [40] An C, Cheng Y, Yuan Q, Li J. IGF-1, BMP-2 induced differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes-like cells, *Ann Biomed Eng* ;38(4):1647– 54, **2010**.
- [41] Akgün, I., Kas iskelet sistemi hastalıklarında kök hücre uygulamaları, *Derleme TOTBİD Dergisi*; 16:266–275 doi: 10.14292/totbid.dergisi.2017.36, **2017**.
- [42] Gurusinghe S, Strappe P. Gene Modification of Mesenchymal Stem Cells and Articular Chondrocytes to Enhance Chondrogenesis, *BioMed Research International* , Article ID 369528, **2014**.
- [43] Tatebe M, Nakamura R, Kagami H, Okada K, Ueda M. Differentiation of transplanted mesenchymal stem cells in a large osteochondral defect in rabbit. *Cytotherapy* ; 7(6):520-530, **2005**.
- [44] Kristjansson, B and Honsawek, S., Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration in osteoarthritis, *World J Orthop*, Sep 18; 8(9): 674–680, **2017**.
- [45] Caplan, A.I., Mesenchymal stem cells, *Journal of orthopaedic research*, 9, 5, 641-650, **1991**.
- [46] Pittenger, M.F., et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, 284, 5411, 143-147, **1999**.
- [47] Kopen, G.C., D.J. Prockop, and D.G. Phinney, Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 19, 10711-10716, **1999**.
- [48] Farini, A., et al., Clinical applications of mesenchymal stem cells in chronic diseases, *Stem Cells Int*, 2014, 306573, **2014**.

- [49] Pacifici E, Koyama A, Iwamoto Y, Gentili E: Development of articular cartilage: What do we know about it and how may it occur?, *Connect Tissue Res*, 41(3): 175, **2000**.
- [50] Nishimura E, Solchaga I, Caplan A, Yoo J, Goldberg V, Johnstone B: Chondroprogenitor cells of synovial tissue, *Arthritis Rheum*, 42(12):2631-7, **1999**.
- [51] Kimura T, Yasui N, Ohsawa S, Ona K: Chondrocytes embedded in collagen gel maintain cartilage phenotype during long-term cultures, *Clin Orthop*, 186:231-9. 32, **1984**.
- [52] Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, et al: Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro, *J Biomed Mat Res*, 38(2):95-104. 33, **1997**.
- [53] Frenkel SR, Toolan B, Menche D, Pitman M, Panchence JM: Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone J Surg Br*, 79-B(5):831-6, **1997**.
- [54] Gartler SM. Apparent Hela cell contamination of human heteroploid cell lines, *Nature*;217(5130):750-1, **1968**.
- [55] Chatterjee R., Cell biology. Cases of mistaken identity, *Science* ;315(5814):928-31, **2007**.
- [56] Nardone R.M, Eradication of cross-contaminated cell lines: a call for action, *Cell Biol Toxicol* ;23(6):367-72, **2007**.
- [57] Masters J.R., False cell lines: The problem and a solution, *Cytotechnology*;39(2):69-74, **2002**.
- [58] Markovic O, Markovic N. Cell cross-contamination in cell cultures: the silent and neglected danger, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*;34(1):1-8, **1998**.
- [59] Lacroix M., Persistent use of “false” cell lines, *Int J Cancer*, 122(1):1-4, **2008**.

[60] Stokes, D. G., Liu, G., Dharmavaram, R., Hawkins, D., Piera-Velazquez, S., and Jimenez, S. A., Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors, *Biochem. J.* 360, 461–470, **2001**.

[61] Takigawa, M., Pan, H. O., Kinoshita, A., Tajima, K., and Takano, Y., Establishment from a human chondrosarcoma of a new immortal cell line with high tumorigenicity in vivo, which is able to form proteoglycan- rich cartilagelike nodules and to respond to insulin in vitro, *Int. J. Cancer* 48, 717–725, **1991**.

[62] Mallein-Gerin, F., and Olsen, B. R., Expression of simian virus 40 large T (tumor) oncogene in mouse chondrocytes induces cell proliferation without loss of the differentiated phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3289–3293, **1993**.

[63] Goldring, M. B., Birkhead, J. R., Suen, L. F., et al., Interleukin-1 betamodulated gene expression in immortalized human chondrocytes, *J. Clin. Invest.* 94, 2307–2316, **1994**.

[64] Robbins, J. R., Thomas, B., Tan, L., et al., Immortalized human adult articular chondrocytes maintain cartilage- specific phenotype and responses to interleukin-1 β . *Arthritis Rheum.* 43, 2189–2201, **2000**.

[65] Yao, Y., Wang, Y., ATD C5: An excellent in vitro model cell line for skeletal development. *J Cell Biochem* 114:1223–1229, **2013**.

[66] Oyar, P., Dental kök hücre kaynakları ve kemik doku rejenerasyonunda kullanılma potansiyelleri, Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg, Supplement: 15, Yıl, Sayfa : 96-101, **2016**.

[67] Gerstenfeld LC, Barnes GL, et al., Osteogenic differentiation is selectively promoted by morphogenetic signals from chondrocytes and synergized by a nutrient rich growth environment. *Connect Tissue Res* 44 (suppl 1): 85 – 91, **2003**.

- [68] Jeanine Hendriks, J., Riesle, J., A. van Blitterswijk, C., Co-culture in cartilage tissue engineering, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine review article*, 1: 170 – 178. DOI:10.1002/term.19, **2007**.
- [69] Crawford DC, Safran MR., Osteochondritis dissecans of the knee. *JAmAcadOrthopSurg* 14 (2): 90 – 100, **2006**.
- [70] Spalazzi JP, Dionisio KL, *et al*, Osteoblast and chondrocyte interactions during coculture on scaffolds. *IEEE Eng Med Biol Mag* 22(5): 27–34, **2003**.
- [71] Jiang J, Nicoll SB, *et al*, Co-culture of osteoblasts and chondrocytes modulates cellular differentiation in vitro, *Biochem Biophys Res Commun* **338**(2): 762–770, **2005**.
- [72] Li X, Lee JP, *et al*, Modulation of chondrocytic properties of fat-derived mesenchymal cells in co-cultures with nucleus pulposus, *Connect Tissue Res* **46**(2): 75–82, **2005**.
- [73] Karaşahin T., Embryonic Stem Cells, *J Fac Vet Med Univ Erciyes* ; 9: 65-71, **2012**.
- [74] Can, A., Kök hücre, Ankara. 715, **2014**.
- [75] Avasti, S., *et al.*, Stem cell: Past, present and future- a review article, *Internet Journal of Medical Update*, 3, **2008**.
- [76] Murrell, W., *et al.*, Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa, *Dev Dyn*, 233, 2, 496-515, **2005**.
- [77] Trounson, A.O., Gardner, D.K., Baker, G., Barnes, F.L., Bongso, A., Bourne, H., Calderon, I., Cohen, J., Dawson, K. *Et al*: Handbook of in vitro fertilization (Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press), **2000**.
- [78] Ateş, U., Kök hücreyi tanıyalım, *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi*; 1(1): 19-28, **2016**.

[79] Ilic D, Polak JM., Stem cells in regenerative medicine: Introduction, *Br Med bull*;98:117-26, **2011**.

[80] Kolios G, Moodley Y., Introduction to stem cells and regenerative medicine, *Respiration*;85:3-10, **2013**.

[81] Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez NM, TippnerHedges R, Ma H, et al., Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer, *Cell*;153:1228-38, **2013**.

[82] Avcılar, H., Saraymen, B., Özturan, O.Ö., Köker, M.Y., Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells, *Asthma Allergy Immunol* ,16:1-10, **2018**.

[83] Blau HM, Brazelton TR, Weimman JM., The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*; 106: 829-41, **2001**.

[84] Martin-Rendon E, Watt SM. Exploitation of stem cell plasticity, *Transfus Med* ;13:325-49, **2003**.

[85] Sağsöz H, Ketani MA., Stem Cells, *J Fac Vet Med Univ Dicle* ;129-33, **2008**.

[86] Şahin F, Saydam G, Omay SB., Stem Cell Plasticity and Stem Cell Treatment in Clinical Practice, *Turk J Hematol Oncol* ;1-15, **2005**.

[87] Kansu E., Current Concepts in Stem Cell Biology and Plasticity, *Hacettepe Med J* ;36:191-197, **2005**.

[88] Lozano FJR, Insausti CL, Iniesta F, Blanquer M, Ramirez MC, Meseguer L, Meseguer-Henarejos AB, Marin N, Martinez S, Moraleda MJ., Mesenchymal Dental Stem Cells in Regenerative Dentistry, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*;17:1062-7, **2012**.

[89] Özcan E, Özcan SSA., Periodontal Rejenerasyonda Kök Hücrenin Yeri Importance Of Stem Cell In Periodontal Regeneration, *Atatürk Üniv. Dis Hek. Fak. Derg.*;20:123-30, **2010**.

[90] Gardner RL., Stem Cells: potency, plasticity and public perception, *J Anat*;200:277-282, **2002**.

[91] Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM., Stem Cells: Hype and Reality, *Am Soc Hem Educ Program.* ;369-91, **2002**.

[92] Evans MJ, Kaufman MH., Establishment in culture of pluripotent tail cells from Mouse embryos, *Nature*; 292:154-6, **1981**.

[93] Martin G.R., Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* ;78:7634-8, **1981**.

[94] Vatansever HS., Embriyonik kök hücreler, *Sağlıkta Birikim* ;1:25-44, **2009**.

[95] Liu Y, Ye X, Mao L, Cheng Z, Yao X, Jia X, et al., Transplantation of parthenogenetic embryonic stem cells ameliorates cardiac dysfunction and remodelling after myocardial infarction, *Cardiovasc Res* ;97:208-18, **2013**.

[96] Snykers S, Kock JD, Rogiers V, Vanhaecke T., In Vitro Differentiation of Embryonic and Adult Stem Cells Into Hepotocytes:State of the Art, *Stem Cells*;27:577-605, **2009**.

[97] Vyas SP, Sihorcar V, Mishra V. Controlled and targeted drug delivery strategies towards intraperiodontal pocket diseases, *J Clin Pharm Ther*;25:21-42, **2000**.

[98] Özel BH, Ozan E, Dabak DÖ., Embryonicstem cells, *Turkiye Klinikleri J Med Sci*; 28:333-41, **2008**.

[99] Mudda JA, Bajaj M., Stem Cell Therapy: A Challenge to Periodontist, *IJDR*;22:132-9, **2011**.

[100] Huang GT., Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress, *Regen Med*;4:697-707, **2009**.

[101] Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A., Stem cells properties of human dental pulp cells, *J Dent Res*;81:531-5, **2002**.

[102] Seo BM, Sonayama W, Yamaza T, Coppe C, Kikui T, Akiyama K., SHED Repair Critical-Size Calvarial Defects in Mice. *Oral Dis*;14:428-34, **2008**.

[103] Silver LM. ,The Proteus Effect: Stem Cells and Their Promise for Medicine. Reviewed by Parson AB. Stalking Life's Second Secret. *Autumn Books Nature*;431:905-7, **2004**.

[104] Atalayın Ç, Ergücü Z, Tezel H., Diş Hekimliğinde Kök Hücre Ve Dental Pulpa Kök Hücreleri, *GÜ Diş Hek Fak Derg*;29:115-20, **2012**.

[105] O'Donoghue K, Fisk NM., Fetal Stem Cells:Best Practice and Research. *Clin Obstet Gynecol*;18:853-75, **2004**.

[106] Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S., Identification of Mesenchymal Stem/Progenitor Cells in Human First-Trimester Fetal Blood, Liver, and Bone Marrow, *Blood*; 98: 2396-402, **2001**.

[107] Sanders, R.C., Jr., et al., Stem cell research, *Paediatr Respir Rev*, 7, 2, 135-40, **2006**.

[108] Cartmell, S., Rupani, and Balint, Osteoblasts and their applications in bone tissue engineering, *Cell Health and Cytoskeleton*, 49, **2012**.

[109] Czyz, J. and A.M. Wobus, Embryonic stem cell differentiation: The role of extracellular factors, *Differentiation*, 68, 4-5, 167-174, **2001**.

[110] Couch, K.A., J. Lane, and D. Black, Point/counterpoint, *Journal of Policy Analysis and Management*, 31, 3, 706-707, **2012**.

[111] Yamanaka, S., A fresh look at ipsc cells, *Cell*, 137, 1, 13-7, **2009**.

- [112] Takahashi, K. and S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, 126, 4, 663-76, **2006**.
- [113] Yu, J., et al., Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science*, 318, 5858, 1917-1920, **2007**.
- [114] Amini, A.R., C.T. Laurencin, and S.P. Nukavarapu, Bone tissue engineering: Recent advances and challenges, 40, 5, 363-408, **2012**.
- [115] Ulmer F.L, Winkel A, Kohorst P, Stiesch M., Stem Cells –Prospects in Dentistry, *Schweiz Monatsschr Zahnmed*;120:860-83, **2010**.
- [116] Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O., Somatic stem cells for regenerative dentistry, *Clin Oral Investig* 12:113-8, **2008**.
- [117] Robey PG., Post-natal stem cells for dental and craniofacial repair, *Oral Biosci Med* ;2:83-90, **2005**.
- [118] Ballini A, De Frenza G, Cantore S, Papa F, Grano M, Mastrangelo F, Teté S, Grassi FR., In vitro stem cell cultures from human dental pulp and periodontal ligament: new prospects in dentistry, *Int J Immunopathol Pharmacol* ;20:9-16, **2007**.
- [119] Can A. Haematopoietic stem cells niches: interrelations between structure and function, *Transfus Apher Sci*;38:261-8, **2008**.
- [120] Huang, G.T.-J., S. Gronthos, and S. Shi, Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. Those from other sources: Their biology and role in regenerative medicine, *Journal of Dental Research*, 88, 9, 792-806, **2009**.
- [121] Gronthos, S., et al., Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells, *Journal of cellular physiology*, 189, 1, 54-63, **2001**.

- [122] Scheller, E.L., J. Chang, and C.Y. Wang, WNT/catenin inhibits dental pulp stem cell differentiation, *Journal of Dental Research*, 87, 2, 126-130, **2008**.
- [123] You-Young J.O, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH., Isolation and Characterization of Postnatal Stem Cells from Human Dental Tissues, *Tissue Eng* ;13:4, **2007**.
- [124] Brar GS, Toor R.S.S., Dental stem cells: Dentinogenic, Osteogenic and Neurogenic Differentiation and Its Clinical Cell Based Therapies, *Indian J Dental* ;23:3, **2012**.
- [125] SHED:Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth. *Proc Natl Acad Sci* ;100: 5807-12, **2003**.
- [126] Bluteau G, Luder H.U, Bari C.D., Stem Cells for Tooth Engineering, *Eur Cells Mater* ;16:1-9,**2008**.
- [127] Huang A.H.C, Chen Y.K, Lin L.M, Shieh T.Y, Chan A.W.S., Isolation and Characterization of Dental Pulp Stem Cells from a Supernumerary Tooth, *J Oral Pathol Med* ;37: 571–4, **2008**.
- [128] Huang G.T, Shagrananova K, Chan S.W., Formation of odontoblastlike cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro, *J Endod*; 32: 1066-73, **2006**.
- [129] Lai AY, Kondo, M., T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell, *Seminars in Immunology*, 20: 207–21, **2008**.
- [130] Durand C, Dzierzak E., Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells, *Haematologica*;90:100-8, **2005**.
- [131] Ross J, Li L., Recent advances in understanding extrinsic control of hematopoietic stem cell fate, *Curr Opin Hematol*;13:237-42, **2006**.
- [132] Li Z, Li L., Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments, *Trends Biochem Sci*;31:589-95, **2006**.

- [133] Wu, Y., R.C. Zhao, and E.E. Tredget, Concise review: Bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration, *Stem Cells*, 28, 5, 905-15, **2010**.
- [134] Kim, J. and P. Hematti, Harnessing regenerative and immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells in transplantation medicine, 163-175, **2014**.
- [135] Lanza, R., R. Langer, and J. Vacanti, *Principles of tissue engineering*. 1344, **2007**.
- [136] Petrie H.T, Zúñiga-Pflucke, J.C., Zoned out: Functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus, *Annu. Rev. Immunol.* 25: 649–679, **2007**.
- [137] MacDonald H.R, Wilson A, Radtke F., Notch1 and T-cell development: insights from conditional knockout mice, *Trends in Immunology*. 22: 155–160, **2001**.
- [138] Ural A.U., Hematopoetik kök hücre. 7. ulusal kemik iliği transplantasyonu ve kök hücre tedavileri kongresi, 08 - 10 Mart 2012, Antalya.
- [139] Suda T, Arai F, Hirao,A., Hematopoietic stem cells and their niche, *Trends Immunol.* 26: 426–433, **2005**.
- [140] Pittenger M.F, Mackay A.M, Beck S.C, Jaiswal R.K, Douglas R, Mosca JD, et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*;284:143-7, **1999**.
- [141] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells, *The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy*;8:315-7, **2006**.
- [142] Kim N, Cho S.G., Clinical applications of mesenchymal stem cells, *Korean J Intern Med*;28:387-402, **2013**.
- [143] Wang S, Qu X, Zhao R.C., Clinical applications of mesenchymal stem cells, *J Hematol Oncol*;5:19, **2012**.

[144] Gimble, J.M., A.J. Katz, and B.A. Bunnell, Adipose-derived stem cells for regenerative medicine, *Circ Res*, 100, 9, 1249-60, **2007**.

[145] Pittenger, M.F. and B.J. Martin, Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics, *Circ Res*, 95, 1, 9-20, **2004**.

[146] Barry, F.P. and J.M. Murphy, Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization, *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 4, 568-84, **2004**.

[147] Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K., Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue, *Stem Cells*;24:1294-301, **2006**.

[148] Rebelatto C.K, Aguiar A.M, Moretão M.P, Senegaglia A.C, Hansen P, Barchiki F, et al., Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue, *Exp Biol Med (Maywood)*;233:901-13, **2008**.

[149] Hu L, Hu J, Zhao J, Liu J, Ouyang W, Yang C, et al., Side-by-side comparison of the biological characteristics of human umbilical cord and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, *Biomed Res Int*;:438243, **2013**.

[150] Tocci A, Forte L., Mesenchymal stem cell: use and perspectives, *Hematol J*;4:92-6, **2003**.

[151] Gözen, A., Ünsal, S.Ş., Gökalp, M.A., Ortopedide Mezenkimal Kök Hücre Uygulamaları, Derleme, Van Tıp Dergisi, Cilt:22, Sayı:2, 131, **2015**.

[152] Karadağ, A., Altınok, B., Özkan, T., Hekmatshoar, Y., Kemik iliği stroması: hücreleri ve mikroçevresi, *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, Cilt 16, Sayı 2, **2017**.

[153] Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*;110:3499- 506, **2007**.

- [154] Zuk P.A, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell J.W, Katz A.J, et al., Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue Eng*;7:211-28, **2001**.
- [155] Berzins U.B, Brūvere R, Eivazova G, Kozlavskā T., Adipose-derived stem cells cultured in autologous serum maintain the characteristics of mesenchymal stem cells. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*;64:106-13, **2010**.
- [156] Harasymiak-Krzyzanowska I, Niedojadlo A, Karwat J, Kotula L, Gil-Kulik P, Sawiuk M, et al. Adipose tissue-derived stem cells show considerable promise for regenerative medicine applications, *Cell Mol Biol Lett*;18:479-93, **2013**.
- [157] Tabe, Y., Konopleva, M., Advances in understanding the leukemia microenvironment *Br J Haematol*, March; 164(6): 767–778, **2014**.
- [158] Örgüç, Ş., Diz Eklemi: Sinovya, *Türk Radyoloji Derneği*, Trd Sem; 4:453-72, **2016**.
- [159] Moskalewski S, Osiecka-Iwan A, Jankowska-Steifer E, Hyc A., Synovial membrane asks for independence, *Folia morphologica*, 73(4):395-398, **2014**.
- [160] Sugita. N., Moriguchi, Y., Sakaue, M., Hart, D.A., Yasui, Y., Koizumi, K., Chijimatsu, R., Shimomura, S., Ikeda, Y., Yoshikawa, H., Nakamura, N., Optimization of human mesenchymal stem cell isolation from synovial membrane: Implications for subsequent tissue engineering effectiveness, *Regenerative Therapy* 5, 79e85, **2016**.
- [161] Li, J., Huang, Y., Song, J., Li, X., Zhang, X., Zhou, Z., Chen, D., Maf, P.X., Peng, W., Wangd, W., Zhou, G., Cartilage regeneration using arthroscopic flushing fluid-derived mesenchymal stem cells encapsulated in a one-step rapid cross-linked hydrogel, *Acta Biomaterialia*, **2018**.
- [162] Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D: Transcriptional regulation of osteoblasts, *Cells Tissues Organs*, 189 (1-4): 144-152, **2009**.

[163] Satija NK, Sharma D, Afrin F, Tripathi RP, Gangenahalli G: High throughput transcriptome profiling of lithium stimulated human mesenchymal stem cells reveals priming towards osteoblastic lineage, *PLoS One*, 8 (1): e55769, **2013**.

[164] James AW: Review of signaling pathways governing MSC osteogenic, adipogenic differentiation. *Scientifica (Cairo)*, 684736, **2013**.

[165] Barry, F.P. and J.M. Murphy, Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization, *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 4, 568-84, **2004**.

[166] Hamidouche, Z., et al., Priming integrin alpha5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 44, 18587-91, **2009**.

[167] Song, I.H., A.I. Caplan, and J.E. Dennis, *In vitro* dexamethasone pretreatment enhances bone formation of human mesenchymal stem cells in vivo, *J Orthop Res*, 27, 7, 916-21, **2009**.

[168] Walsh, S., et al., High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: Relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis, *Rheumatology*, 40, 1, 74-83, **2001**.

[169] Fernandez-Merino, M., et al., Vitamin c is an ideal substitute for hydrazine in the reduction of graphene oxide suspensions, *The Journal of Physical Chemistry C*, 114, 14, 6426-6432, **2010**.

[170] Arslan, Y.E., Hız, M.M., Sezgin Arslan, T., Hücrelerinden arındırılmış hayvansal dokuların rejeneratif tedavilerde kullanımı, *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 21 (1): 139-145, **2015**.

[171] Song, L., Liu M, Ono N, Bringhurst FR, Kronenberg HM, Guo J: Loss of wnt/ β -catenin signaling causes cell fate shift of preosteoblasts from osteoblasts to adipocytes, *J Bone Miner Res*, 27 (11): 2344-2358, **2012**.

- [172] İbşirlioğlu, T., Adipoz kökenli mezenkimal kök hücre dizilerinin geliştirilmesi, immünojenotipik karakterizasyonu ve farklılaşma özelliklerinin incelenmesi, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2015**.
- [173] Cristancho, A.G, Lazar M.A, Forming functional fat: A growing understanding of adipocyte differentiation, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(11): 722- 734, **2011**.
- [174] Mizuno, H., M. Tobita, and A.C. Uysal, Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine, *Stem Cells*, 30, 5, 804-810, **2012**.
- [175] Chamberlain, G., et al., Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing, *Stem Cells*, 25, 11, 2739-2749, **2007**.
- [176] Majumdar, M.K., et al., Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells, *Journal of biomedical science*, 10, 2, 228-241, **2003**.
- [177] Rebelatto, C., et al., Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue, *Experimental Biology and Medicine*, 233, 7, 901-913, **2008**.
- [178] Alexander, P.G., et al., Mesenchymal stem cells in musculoskeletal tissue engineering, 1171-1199, **2014**.
- [179] Gurusinghe S, Strappe P., Gene Modification of Mesenchymal Stem Cells and Articular Chondrocytes to Enhance Chondrogenesis, *BioMed Research International* Volume, Article ID 369528, **2014**.
- [180] Sonomoto K, Yamaoka K, Tanaka Y. An Approach to Bone and Cartilage Repair of Rheumatoid Arthritis by Mesenchymal Stem Cells. *J UOEH*; 36(2):141-146, **2014**.
- [181] Abdel-Hamid M, Hussein MR, Ahmad AF, Elgezawi EM. Enhancement of the repair of meniscal wounds in the redwhite zone (middle third) by the injection of bone marrow cells in canine animal model, *Int J Exp Pathol*; 86(2):117-123, **2005**.

[182] Murphy J.M, Fink D.J, Hunziker E.B, Barry F.P, Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*; 48(12):3464-3474, **2003**.

[183] Rubio, D., et al., Spontaneous human adult stem cell transformation, *Cancer research*, 65, 8, 3035-3039, **2005**.

[184] Molto FG, Myers TJ, Weis JA, Longobardi L, Li T, Yan Y, et al, Mesenchymal stem cells expressing insulin-like growth factor-1 (msc1gf) promote fracture healing and restore new bone formation in 1rs1 knock-out mice: analyses of msc1gf autocrine and paracrine regenerative effects, *Stem Cells* 29(10): 1537–1548, **2011**.

[185] Selek Ö, Buluç L, Müezzinoğlu B, Ergün RE, Ayhan S, Karaöz E. Mezenkimal kök hücrelerin anti apoptotik etkileri ve tendon iyileşmesi (Hayvan çalışması).*Acta Orthop Traumatol Turc*; 48(2):187-195, **2014**.

[186] Lee, W.J., Park, J.S., Jang, S.J., Lee, S.C., Lee, H., Lee, J.H., Rho, G.J., Lee, S.L. Isolation and Cellular Phenotyping of Mesenchymal Stem Cells Derived from Synovial Fluid and Bone Marrow of Minipigs. *J. Vis. Exp.* (113), **2016**.

[187] Uckan, D., Kilic, E., Sharafi, P., Kazik, M., Kaya, F., Erdemli, E., Can, A., Tezcaner, A., and Kocaefe, C., Adipocyte differentiation defect in mesenchymal stromal cells of patients with malignant infantile osteopetrosis. *Cytotherapy*, 11(4), 392-402, **2009**.