

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
SPOR HEKİMLİĞİ ANABİLİM DALI**

**SİNOVİYUM VE YAĞ DOKUSUNDAN ELDE EDİLEN  
ALLOJENİK MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN NORMAL  
VE OSTEOARTRİTLİ KONDROSİT HÜCRE HATLARI  
ÜZERİNE OLAN ETKİ VE ETKİ MEKANİZMASININ *İN VİTRO*  
ORTAMDA İNCELENMESİ**

**Dr. Levend KARAÇOBAN**

**UZMANLIK TEZİ**

**Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA**

**2022**



**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
SPOR HEKİMLİĞİ ANABİLİM DALI**

**SİNOVİYUM VE YAĞ DOKUSUNDAN ELDE EDİLEN  
ALLOJENİK MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN NORMAL  
VE OSTEOARTRİTLİ KONDROSİT HÜCRE HATLARI  
ÜZERİNE OLAN ETKİ VE ETKİ MEKANİZMASININ *İN VİTRO*  
ORTAMDA İNCELENMESİ**

**Dr. Levend KARAÇOBAN**

**UZMANLIK TEZİ**

**Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Feza KORKUSUZ**

**ANKARA**

**2022**

**ONAY SAYFASI**

“Sinoviyum ve Yağ Dokusundan Elde Edilen Allojenik Mezenkimal Kök Hücrelerin Normal ve Osteoartritli Kondrosit Hücre Hatları Üzerine Olan Etki ve Etki Mekanizmasının *İn Vitro* Ortamda İncelenmesi” başlıklı uzmanlık tezi T.C Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’nda değerlendirilmiş olup araştırma projesine 15.10.2019 tarih ve GO 19/1010 karar numaralı etik kurul onayı alınmıştır.

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca hem hekimlik hem de akademik bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, tez danışmanım olarak her türlü sorunda bana yol gösteren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Feza Korkusuz'a, araştırma ve soru sorma heyecanına gıpta ettiğim, desteğini her zaman hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Ali Haydar Demirel'e, hem hastane içinde hem hastane dışında her türlü sorunumda günün hangi saati olursa olsun yardımını esirgemeyen, herhangi bir problemimde ilk aradığım kişi olan sevgili ağabeyim Doç. Dr. Gürhan Dönmez'e, iş disiplini, motivasyonu ve özverisi ile yorgun ve yoğun zamanlarımda çalışmaya devam etmem için bana örnek olan, öğrendiğim her bilginin sorumluluğu olduğunu bana öğreten saygıdeğer hocam Prof. Dr. Levent Özçakar'a,

Tez çalışmam boyunca özverili katkıları bulunan Prof. Dr. Petek Korkusuz, Prof. Dr. Egemen Turhan, Doç. Dr. Mustafa Çelebier, Arş. Gör. Ozan Kaplan, Uzm. Bio. Merve Gizer'e,

Birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım her türlü sorun, sorumluluk ve mutluluğu birlikte paylaştığımız, kendilerinden çok şey öğrendiğim değerli çalışma arkadaşlarım Öğr. Gör. Dr. Yiğitcan Karanfil, Dr. Ömer Faruk İliceşin, Dr. Yiğitcan Menderes, Dr. Berke Aksöz, Dr. Emine Çiftçi Özetok, Dr. Mert Tıraş, Dr. Sercan Mısırlı, Dr. İrem Hartuç Çevik ve Dr. Batuhan Erhan Aktaş'a, bölümümüz personeli Meryem Sevincek ve Bekdeş Yıldırımoglu'na,

Desteklerini her zaman hissettiğim, bütün başarılarımın kaynağı, olduğum kişi olmamı sağlayan sevgili annem, babam ve ağabeyime,

Anlayış ve sevgi ile her zaman yardımına koşan, yaptığım her işte sorgusuz beni destekleyen hayat arkadaşım Gülçin'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği tarafından desteklenmiştir.

Dr. Levend KARAÇOBAN

## ÖZET

**KARAÇOBAN, LEVEND, SİNOVİYUM VE YAĞ DOKUSUNDAN ELDE EDİLEN ALLOJENİK MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN NORMAL VE OSTEOARTRİTLİ KONDROSİT HÜCRE HATLARI ÜZERİNE OLAN ETKİ VE ETKİ MEKANİZMASININ İN VİTRO ORTAMDA İNCELENMESİ, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Spor Hekimliği Uzmanlık Tezi, Ankara, 2022.** Osteoartrit (OA) yavaş gelişen, ilerleyici eklem ağrısı ve hareket kısıtlılığı ile karakterize, ek morbiditelere neden olabilen kronik bir hastalıktır. OA tedavisinde kullanılan çeşitli tedavi seçenekleri, fizik tedavi yöntemleri, rehabilitasyon egzersizleri, basit analjezikler, nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlar, intraartiküler kortikosteroid, trombositten zengin plazma (TZP) ve hyaluronik asit enjeksiyonları ve çeşitli cerrahi yöntemlerdir. Son yıllardaki güncel bir diğer tedavi seçeneği ise mezenkimal kök hücre (MKH) uygulamalarıdır. OA tedavisinde MKH uygulamalarının etkisini ve bu etkiyi hangi yollarla gerçekleştirdiğini göstermek ve farklı dokulardan elde edilen MKH'lerin etkilerini karşılaştırmak adına OA'lı kondrositler ile üç sağlıklı bireyden elde edilmiş patella altı (P) ve cilt altı (C) yağ dokusu ve sinoviyum (S) kökenli MKH'ler birlikte kültüre edildi. 7. ve 14. günlerde ko-kültür süpernatantları analiz için toplandı. ELISA yöntemi ile OA'lı kondrositlerde P ve S kaynaklı MKH'ler ile birlikte kültüre edilince 14. günde TNF $\alpha$  konsantrasyonunda azalma (sırası ile 156,6 $\pm$ 79, 42,1 $\pm$ 6 ve 35,5 $\pm$ 3 pg/ml, p=0,036) aynı gruplarda MMP3 düzeyinde 7 günde (sırası ile 87,4 $\pm$ 43,7, 23 $\pm$ 8,9 ve 14,7 $\pm$ 3,3 pg/ml, p=0,043) ve 14. günde (sırası ile 29,1 $\pm$ 11,2, 28,3 $\pm$ 18,5 ve 20,3 $\pm$ 16,2 pg/ml, p=0,043) azalma gözlemlendi. MKH'lerin kontrole göre COMP konsantrasyonlarında neden oldukları değişim istatistiksel olarak anlamlı değildi. Metabolom analizinde gruplar arasında 1,5 kattan fazla değişiklik gösteren ve değişimi istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05) olan metabolitler tespit edildi. Sonuç olarak, farklı dokulardan elde edilen MKH'ler arasında OA'lı kondrositlere etkileri açısından farklılıklar tespit edilmesine rağmen, tüm gruplarda anti-inflamatuvar, yıkımı inhibe edici ve sentezi uyaran yönde bir etki gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Osteoartrit, mezenkimal kök hücre, hücre kültürü

## ABSTRACT

**KARAÇOBAN, LEVEND, IN VITRO INVESTIGATION OF THE EFFECTS AND MECHANISMS OF ALLOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELLS OBTAINED FROM SYNOVIUM AND FAT TISSUES ON HEALTHY AND OSTEOARTHRITIC CHONDROCYTE CELL LINES, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Sports Medicine, Thesis in Sports Medicine, Ankara, 2022.** Osteoarthritis (OA) is a chronic disease that develops slowly, is characterized by progressive joint pain and limitation of movement, and can lead to disability. Various treatment options used in the treatment of OA are physical therapy methods, rehabilitative exercises, simple analgesics, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, intraarticular steroids, platelet-rich plasma and hyaluronic acid injections, and various surgical methods. Another current treatment option is mesenchymal stem cell (MSC) injections. In order to show the effect of MSC applications in the treatment of OA and the ways in which this effect is achieved, chondrocytes with OA will be placed in the same cell culture medium with MSCs originating from infrapatellar (P) and subcutaneous (C) adipose tissues and synovium (S) obtained from healthy individuals. ELISA analyses showed when chondrocytes with OA were cultured together with MSCs of P and S origin, TNF $\alpha$  concentration decreased on day 14 (respectively 156.6 $\pm$ 79, 42.1 $\pm$ 6 and 35.5 $\pm$ 3 pg/ml, p=0.036), for the same groups MMP3 was decreased at day 7 (87.4 $\pm$ 43.7, 23 $\pm$ 8.9, and 14.7 $\pm$ 3.3 pg/ml, p=0.043) and day 14 day (sırası ile 29.1 $\pm$ 11.2, 28.3 $\pm$ 18.5 ve 20.3 $\pm$ 16.2 pg/ml, p=0.043, respectively). The changes in COMP concentrations compared to the control groups were not statistically significant. Metabolic analysis revealed metabolites with a statistically significant (p<0.05) change of more than 1.5 times between the groups. To conclude, we detected differences between MSCs obtained from different tissues in terms of their effects on chondrocytes with OA, we observed an anti-inflammatory, anti-degradation and synthesis-stimulating effects in all three tissue-derived MSC groups.

**Keywords:** Osteoarthritis, mesenchymal stem cell, cell culture

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	x
ŞEKİLLER.....	xiii
TABLOLAR .....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Osteoartritin Tanımı ve Epidemiyolojisi .....	3
2.2 Osteoartrit Patogenezi.....	3
2.3 Osteoartritin Tanısı.....	4
2.4 Risk faktörleri.....	8
2.5 Spor İlişkili Osteoartrit .....	9
2.6 Osteoartrit Tedavisi .....	13
2.6.1 Farmakolojik Olmayan Tedavi Yöntemleri .....	13
2.6.2 Farmakolojik tedavi yöntemleri .....	15
2.6.3 Cerrahi Tedavi Yöntemleri .....	20



3. GEREÇ ve YÖNTEM .....	21
3.1 Çalışma Tasarımı.....	21
3.2 Katılımcılar .....	21
3.3 Örneklem Büyüklüğü .....	22
3.4 Osteoartriti Olmayan Gönüllülerin Seçilmesi ve Patella Altı Yağ Dokusu, Sinoviyum ve Cilt Altı Yağ Dokusu Elde Edilmesi.....	23
3.5 Osteoartriti Olmayan Gönüllülerden Elde Edilmiş Patella Altı Yağ Dokusu, Sinoviyum ve Cilt Altı Yağ Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyon, Üretim ve Karakterizasyonu .....	24
3.5.1 Patella ve Cilt Altı Yağ Dokusundan Adiposit Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu.....	24
3.5.2 Sinoviyum Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu .....	24
3.5.3 Sinoviyum ve Adiposit Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Üretimi.....	25
3.5.4 Sinoviyum ve Adiposit Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu .....	25
3.6 İnsan Kaynaklı Ticari Osteoartritli ve Sağlıklı Kondrosit Üretimi .....	27
3.7 Mezenkimal Kök Hücrelerin Sağlıklı ve Osteoartritli Kondrositler ile Birlikte Kültürü.....	28
3.8 İnflamasyon, Kondrosit Yapım ve Yıkım Belirteçlerinin Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Yöntemi ile Değerlendirilmesi.....	30
3.9 Patella Altı Yağ Dokusu, Sinoviyum ve Cilt Altı Yağ Dokusunun Metabolomik Çalışmalarla İncelenmesi .....	32
3.9.1 Patella Altı Yağ Dokusu, Sinoviyum ve Cilt Altı Yağ Dokusunun İnceleme Öncesi Hazırlığı .....	32
3.9.2 Patella Altı Yağ Dokusu, Sinoviyum ve Cilt Altı Yağ Dokusundan Hazırlanan Örneklerin Q-TOF LC/MS ile Analizi.....	33

3.10 İnflamasyon, Kondrosit Yapım ve Yıkım Belirteçlerinin Metabolomik Çalışmalar ile Değerlendirilmesi.....	34
3.10.1 XCMS ile Ham Kromatogram Verisinin İşlenmesi .....	35
3.11 İnflamasyon, Kondrosit Yapım ve Yıkım Belirteçlerinin Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Yöntemi ile Ön Değerlendirilmesi.....	35
3.12 Verilerin İstatistik Yöntemler ile Değerlendirilmesi .....	36
4. BULGULAR .....	37
4.1 Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu .....	37
4.2 İnsan Kaynaklı Ticari Osteoartritli ve Sağlıklı Kondrosit Üretimi .....	45
4.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Sağlıklı ve Osteoartritli Kondrositler ile Birlikte Kültürü.....	45
4.4 İnflamasyon, Kondrosit Yapım ve Yıkım Belirteçlerinin Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Yöntemi ile Değerlendirilmesi.....	46
4.4.1 TNF $\alpha$ seviyesi .....	46
4.4.2 COMP seviyesi.....	48
4.5 Patella Altı Yağ Dokusu, Sinoviyum ve Cilt Altı Yağ Dokusunun Metabolomik Yöntemler ile İncelenmesi .....	52
4.6 İnflamasyon, Kondrosit Yapım ve Yıkım Belirteçlerinin Metabolomik Yöntemler ile Değerlendirilmesi.....	53
4.7 İnflamasyon, Kondrosit Yapım ve Yıkım Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Yöntemi ile Ön Değerlendirilmesi .....	62
5. TARTIŞMA .....	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	70

7. KAYNAKLAR.....71

8. EKLER.....

## SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACN	Asetonitril
ACR	Amerikan Romatoloji Derneği
ALK	Aktivin Reseptör-benzeri Kinaz
ALP	Alkalen fosfataz
BMP	Kemik morfojenik proteini
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
COL11A1	Tip 11 kolajen alfa 1
COL2A1	Tip 2 kolajen alfa 1
COL9A1	Tip 9 kolajen alfa 2
COMP	Kartilaj Oligomerik Matriks Proteini
COX	Siklookjinenaz
CXCL8	CXC Kemokin Ligand 8
dk	Dakika
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM-LG	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose</i>
DMOAD	Hastalığın seyrini değiştiren ilaç
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECM	Ekstraselüler matriks
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik asit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMA	Avrupa İlaç Kurumu
ESCEO	Avrupa Osteoporoz, Osteoartrit ve Kas-İskelet Hastalıklarının Klinik ve Ekonomik Yönleri Topluluğu
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>

FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
GAG	Glukozaminoglukan
GWAS	Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
HLA-DR	Majör histokompatibilite kompleksi-DR
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
IHN	<i>Indian Hedgehog Notch</i>
IL1 $\beta$	İnterlökin 1 beta
IPA	İzopropilalkol
IPO	İzotopolog Parametre Optimizasyonu
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
km	Kilometre
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
m/z	Kütle yük oranı
MKH	Mezenkimal kök hücre
ml	Mililitre
MMP	Matriks metalloproteinaz
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
NF- $\kappa$ B	Nükleer Faktör Kappa B
NH <sub>4</sub> AC	Amonyum asetat
NSAİİ	Non-steroidal anti-inflamatuvar ilaç
OA	Osteoartrit
OARSI	Uluslararası Osteoartrit Araştırma Topluluğu
ÖÇB	Ön çapraz bağ
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCA	Temel bileşen analizi
PGE-2	Prostaglandin E2
pNPP	Para-Nitrofenil fosfat
Q-TOF LC/MS	Kuadrupol uçuş zamanlı sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi
rpm	Dakikadaki devir sayısı

SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TGF $\beta$	Dönüştürücü Büyüme Faktörü beta
TNF $\alpha$	Tümör Nekrozis Faktör alfa
TUDCA	Tauroursodeoksikolik asit
TZP	Trombositten Zengin Plazma
UDCA	Ursodeoksikolik asit
USG	Ultrasonografi
VKİ	Vücut Kütle İndeksi

## ŞEKİLLER

Şekil 2.1 Kellgren-Lawrence OA evreleri .....	7
Şekil 2.2 OA gelişimi sürecinde yer alan faktörler.....	10
Şekil 3.1 Çalışma dizaynını gösteren şematik çizim. ....	23
Şekil 3.2 Mezenkimal kök hücreler ve kondrositlerin birlikte kültürü.....	30
Şekil 3.3 ELISA değerlendirmelerinde kullanılan mirolaka okuyucu.....	31
Şekil 3.4 Doku hazırlama protokolü sonunda elde edilen süpernatant.....	33
Şekil 4.1 Gönüllülerden toplanan dokular.....	37
Şekil 4.2 Gönüllülerden izole edilen pasaj sıfır MKH'ler .....	38
Şekil 4.3 Gönüllülerden izole edilerek üretimi gerçekleştirilen pasaj iki MKH'ler...39	
Şekil 4.4 MKH'lerin ALP aktivitesini gösteren grafik.....	40
Şekil 4.5 MKH'lerin kondrojenik farklılaşma kapasitesi .....	41
Şekil 4.6 Patella altı yağ dokusu kaynaklı MKH'lerin ifade ettikleri yüzey belirteçleri. .....	42
Şekil 4.7 Sinoviyum kaynaklı MKH'lerin ifade ettikleri yüzey belirteçleri.....	43
Şekil 4.8 Cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH'lerin ifade ettikleri yüzey belirteçleri.....	44
Şekil 4.9 İnsan kaynaklı ticari kondrositler.....	45
Şekil 4.10 MKH'ler ile ticari insan kaynaklı OA'lı ve sağlıklı kondrositlerin birlikte kültürü gerçekleştirilen Transwell sistemi. ....	46
Şekil 4.11 7. ve 14. günlerdeki TNF $\alpha$ seviyeleri.....	47
Şekil 4.12 7. ve 14. günlerde COMP seviyeleri. ....	49

Şekil 4.13 7. ve 14. günlerde MMP3 seviyeleri. ....	50
Şekil 4.14 Toplanan dokulara ait PCA grafikleri. ....	52
Şekil 4.15 MKH gruplarına ait PCA analizi grafikleri. ....	54
Şekil 4.16 L-Fukoz metabolitine ait pik şiddetlerinde kontrol gruplarına göre kat değişimleri.....	56
Şekil 4.17 Alfa-Tokotrienol metabolitine ait pik şiddetlerinde kontrol gruplarına göre kat değişimleri. ....	57
Şekil 4.18 Koproporfirin metabolitine ait pik şiddetlerinde kontrol gruplarına göre kat değişimleri. ....	58
Şekil 4.19 Nikotinamid metabolitine ait pik şiddetlerinde kontrol gruplarına göre kat değişimleri. ....	59
Şekil 4.20 Bilirubin metabolitine ait pik şiddetlerinde kontrol gruplarına göre kat değişimleri. ....	60
Şekil 4.21 Taurodeoksikolik asit metabolitine ait pik şiddetlerinde kontrol gruplarına göre kat değişimleri.....	61
Şekil 4.22 Galktosfingozin metabolitine ait pik şiddetlerinde kontrol gruplarına göre kat değişimleri. ....	62
Şekil 4.23 COL2A1, SOX9, MMP13 ve COMP gen ekspresyonlarının kontrol gruplarına göre kat değişimleri.....	65



**TABLolar**

Tablo 2.1 ACR Diz OA Tanı Kriterleri .....	5
Tablo 2.2 Kellgren-Lawrence OA Evrelendirme Sistemi.....	7
Tablo 2.3 Eklem üzerinde beklenen darbe ve torsiyonel yüklenmeye göre egzersiz çeşitleri .....	13
Tablo 3.1 Çalışmaya dahil edilme ve çalışmadan dışlanma kriterleri .....	22
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan deney grupları ve grupların isimlendirilmesinde kullanılan kısaltmalar.....	29
Tablo 4.1 TNF $\alpha$ , COMP ve MMP3 konsantrasyonlarının tanımlayıcı istatistikleri ..	51
Tablo 4.2 Düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı değişen metabolitler.....	55
Tablo 4.3 COL2A1, COMP, MMP13 ve SOX9 gen ekspresyonlarının kontrol gruplarına göre kat değişimleri.....	64

## 1. GİRİŞ

Osteoartrit (OA) dünyada en sık görülen eklem patolojisidir. Lokal ve sistemik inflamasyon, eklemdede yapısal dejenerasyon ve bunların sonucunda ağrı, fonksiyon kaybı ve hayat kalitesinde azalma, OA'da görülen en sık bulgulardır (1). Tüm dünyada engellilik ile yaşanan yılların sebepleri arasında birinci sırada diz ve kalça OA'sı gelmektedir (1,2). Artan yaşam süreleri ve obezite prevalansı düşünüldüğünde OA kaynaklı problemlerin de artması beklenmektedir (3).

OA gelişiminde biyokimyasal, selüler ve mekanik süreçlerin birleşimi rol oynamaktadır (4). Kıkırdak matriksin proteolizi sonucu yıkımı ile başlayan ve yapısal olarak zayıflayan matriksin fibrilasyon ve erozyonu ile devam eden süreç ve yanında eşlik eden inflamasyon ile birlikte proteoglikan ve kolajen degradasyonu ile seyreder. Sonucunda klinik olarak eklem aralığında daralma, osteofit oluşumu, subkondral skleroz ve kistler gözlenmektedir (5).

OA tedavisinde hasta eğitimi, kilo verme, yaşam tarzı değişiklikleri gibi farmakolojik olmayan yöntemler; farmakolojik olarak oral asetaminofenler, NSAİİ, glukozamin ve kondroitin kullanılmaktadır. İntraartiküler kortikosteroid, hyaluronik asit enjeksiyonları çeşitli rehberlerce önerilmektedir. Hücresel tedavi yöntemleri olarak rejenerasyonu uyarmayı hedefleyen intraartiküler Trombositten Zengin Plazma (TZP) ve mezenkimal kök hücre (MKH) enjeksiyonları güncel araştırma konuları olmuştur.

MKH'ler diğer hücre serilerine diferansiye olma yeteneğinin sahip multipotent progenitör hücrelerdir (5). Artiküler kartilaja diferansiye olabilme ve hasarlı hücrelerinin yerlerini alabilme potansiyelleri MKH'leri OA tedavisinde ilgi duyulan konulardan biri haline getirmiştir (6). Ancak MKH'lerin tüm etkileri doku spesifik hücrelere diferansiye olmaları ile açıklanamamaktadır (7,8). MKH'lerin parakrin etki ile diğer hücreleri rejenerasyon ve sentez yönünden uyardıkları, inflamasyonu baskıladıkları gözlenmiştir (9,10).

Bu çalışmanın amacı; artritlik olmayan bireylerden elde edilen patella altı yağ dokusu, sinoviyum ve cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH'lerin OA'lı kondrositler üzerine olan etkilerinin incelenmesidir. Daha önce MKH'ler ile OA ve kıkırdak defektlerinde gerçekleştirilen çalışmalar genellikle MKH'lerin kondrojenik diferansiyasyonuna dayalı etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışmamızda ise MKH'lerin kondrositler ile direkt teması olmadan gerçekleştirdikleri parakrin etkilerini inceleyen bir dizayn tercih edildi. Böylece son yıllarda klinik uygulamalarda sıklığı artan ve yine MKH'lerin parakrin özelliklerinin baskın olduğu intraartiküler MKH enjeksiyonlarının etki ve etkinliğini hakkında bilgi verebilecek bir yöntem kullanıldı. MKH'lerin OA'lı kondrositler üzerindeki parakrin etki ve/veya uyarının hangi araçlar ile gerçekleştiğini değerlendirmek için hücre dışı ortam metabolik profilinde nasıl değişiklikler yaptığını da inceledik. Son olarak farklı MKH kaynağı olarak farklı donör dokular kullanarak elde edilen MKH'ler arasında anti-inflamatuvar, kondrositlerde yıkımı önleyici ve yapımı uyarıcı özellikleri arasında fark olup olmadığı karşılaştırıldı. Araştırma soruları;

-MKH kaynağı olarak seçilen dokunun kökeni ve yerleşimi MKH'lerin OA'lı kondrositler üzerindeki etkisini değiştirmekte midir?

-MKH'lerin OA'lı kondrositler üzerindeki anti-inflamatuvar, degradasyonu inhibe edici ve sentez uyarıcı özelliklerinin zamana göre değişimleri nasıl olmaktadır?

-MKH'lerin OA'lı kondrositler üzerindeki parakrin etkileri sonucunda hücre dışı metabolomik profil nasıl değişmektedir?

Şeklindeydi. Bu sorulara yanıt arayarak güncel ve yenilikçi bir tedavi yöntemi olan diz OA'sında MKH uygulamalarının hücresel ve moleküler boyuttaki etkileri, tedavi için uygun MKH doku kaynağı ve uygun MKH konsantrasyonu gibi konuların aydınlatılması hedeflenmektedir.

Böylece, giderek tüm dünyada ciddiyet kazanan OA için öne sürülen güncel bir tedavi yöntemi olan MKH'ler hakkında ileriki klinik araştırma ve uygulamalara temel oluşturabilecek bazı sorulara yanıt arandı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Osteoartritin Tanımı ve Epidemiyolojisi

OA, erişkin yaş popülasyonunda önde gelen engellilik nedenlerinden biri olarak atfedilir ve OA'nın dünya çapında 250 milyon insanı etkilediği öne sürülmektedir (11). 60 yaş üstü bireylerde erkeklerin %9,6'sı, kadınların ise %18'inin OA'dan etkilendiği bildirilmektedir (12), 70 yaş üzeri popülasyonda bu oran %40'lara ulaşmaktadır (13). OA'nın hem bireyler hem de sağlık sistemleri üzerindeki küresel yükü, yaşlanan nüfus ve yüksek obezite prevalansı da göz önüne alındığında daha da endişe verici bir sorun haline gelmektedir (14). Gelişmiş ülkelerde OA kaynaklı sosyoekonomik yük ülke gayri safi yurtiçi hasıllarının %1-2,5'si kadar olabilmektedir (15).

OA ağrı, fonksiyon kaybı ve yaşam kalitesinde azalmanın görüldüğü, kronik seyirli bir hastalıktır (4). Primer olarak en sık diz, kalça, omurga, el ve ayaktaki eklemlerde görülmektedir (16). Eklem kıkırdağında progresif yıkım ve kayıp, subkondral kemikte skleroz, osteofit formasyonu ve eklem aralığında daralma OA sürecinde en sık eşlik eden patolojilerdir (17). Diz OA, primer olarak eklem kıkırdağı ve subkondral kemiği ilgilendirir, aynı zamanda sinoviyumu, Hoffa'nın yağ yastıkçığını, menisküsleri, ligamentleri, eklem kapsülünü ve periartiküler kasları da etkiler (18,19). Bu nedenle, OA tüm eklemin bir hastalığıdır. Eklem dejenerasyonu genellikle yıllar içinde ilerleyerek eklem kıkırdağının tahrip olması ile sonuçlanır ve devamında taşıyıcı yüzeyleri aşınmaya yatkın durumda bırakır ve bu durum artan ağrı, hareket kaybı ve deformeiteye neden olur (20). Etiyolojik kaynağına göre OA genellikle primer veya sekonder olarak sınıflandırılır. Primer OA etiyojisi büyük ölçüde aydınlatılmamış olsa da sistemik ve lokal etkenlerin dahil olduğu multifaktöryel bir durum olarak kabul görmektedir (21).

### 2.2 Osteoartrit Patogenezi

OA esas olarak eklemdaki biyomekanik ve biyokimyasal değişiklikler nedeniyle hasarlı kıkırdağın onarım sürecinin başarısızlığı ile karakterizedir. Kıkırdağ

doku vaskülarize değildir, bu nedenle kondrositlere oksijen ve nütrientlerin taşınması diğer dokulara göre daha zordur. Kıkırdak dokudaki bir hasar sonrası erken dönemde onarım sürecini başlatmak için kondrositler hasarlı alanda kümeleşirler (22,23). Ancak bu onarma müdahalesinin başarısız olması sonucu dejenerasyon lehine bir dengesizliğe yol açar.

OA'da gözlenen eklem yetmezliği zayıflamış kıkırdağa normal mekanik yüklenme sonucu olabileceği gibi normal yapıdaki kıkırdağa anormal mekanik yüklenme sonucu da olabilmektedir (24). Eklem içerisindeki hücrelerde gerçekleşen biyolojik yollar mekanosensitif olduklarından biyomekanik faktörler OA gelişimi için önem arz etmektedirler (25). Kondrositler ekstraselüler matriks (ECM) tarafından iletilen mekanik uyarıları hücre membranlarında bulunan integrinler, iyon kanalları ve bir hücre organeli olan primer siliyalar aracılığı ile intraselüler ortama aktarırlar (26–30). Hasarlı hücre ve matriksin degradasyonu (katabolizma) ile degrade edilen yapıların yerine tekrar sentezi (anabolizma) arasındaki bu remodeling dengesini belirleyen faktörlerden bir tanesi de mekanik uyarılardır.

### **2.3 Osteoartrit Tanısı**

Semptomların geniş bir spektruma yayılmış olması, şikayetlerin lokalizasyonundaki heterojenite OA tanısı ve sınıflandırmasını karmaşık hale getirmektedir. Tanıda genellikle klinik, radyolojik bulgular ile laboratuvar bulguları kullanılmaktadır. Amerikan Romatoloji Derneği'nin (ACR) önermiş olduğu tanı kriterleri genel kabul görmüş ve klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo 2.1) (31). OA tanısında radyolojik yöntemlerden geleneksel olarak direkt radyografi kullanılmıştır (32). En yaygın kullanılan radyografik tanı ve değerlendirme sistemi Kellgren-Lawrence Osteoartrit evrelemesidir (Tablo 2.2 ve Şekil 2.1) (33). Yine OA evrelemesi ve progresyon takibinde Uluslararası Osteoartrit Araştırma Topluluğu (OARSI) tarafından hazırlanan rehber de kullanılmaktadır (34).

**Tablo 2.1 ACR Diz OA Tanı Kriterleri (31)**

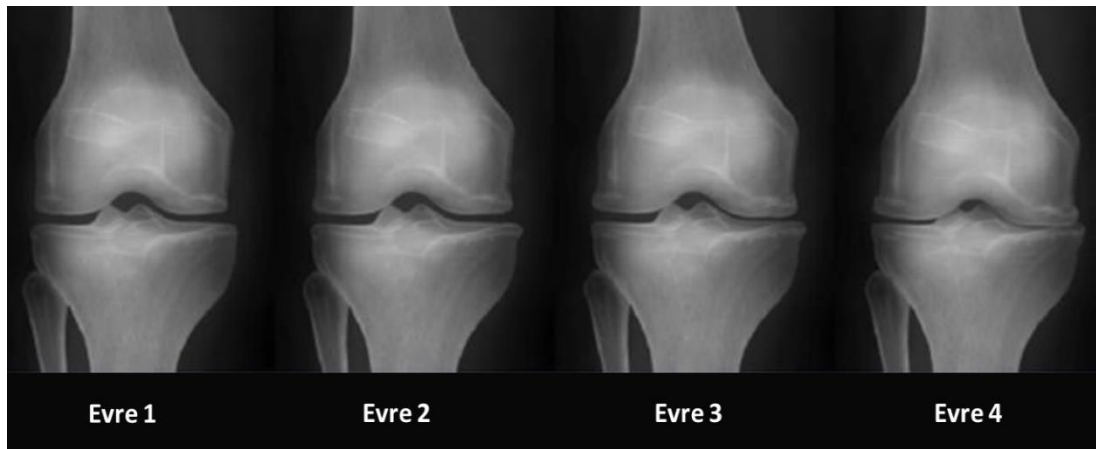
<b>Klinik Bulgular</b>	
<b>1,2,3,4 veya 1,2,5 veya 1,4,5 numaralı kriterlerin varlığı gereklidir</b>	
1	Önceki ay çoğu gün olan diz ağrısı
2	Aktif eklem hareketi sırasında krepitasyon
3	Dizde $\leq 30$ dakika süren sabah tutukluğu
4	Yaş $\geq 38$
5	Fizik muayenede diz çevresinde kemik büyümesi
<b>Klinik, Radyolojik ve Laboratuvar Bulgular</b>	
<b>1,2 veya 1,3,5,6 veya 1,4,5,6 numaralı kriterlerin varlığı gereklidir</b>	
1	Önceki ay çoğu gün olan diz ağrısı
2	Eklem kenarlarında radyografik görülen osteofitler
3	Sinoviyal sıvının berrak ve visköz olması, lökosit sayısı $< 2000$ hücre/ml olması
4	Yaş $\geq 40$
5	Dizde $\leq 30$ dakika süren sabah tutukluğu
6	Aktif eklem hareketi sırasında krepitasyon

Kolay ulaşılabilir olması, eklemleri yük taşıırken görüntüleme imkanı sunması direkt radyografiyi değerli kılan özelliklerindedir. Trabeküler ve subkondral kemik

lezyonlarının, eklem aralığında daralmanın ve osteofitlerin görüntülenmesinde direkt radyografiler genellikle birinci tercih olarak kabul görmesine karşın kıkırdak, menisküs, ligamentler ve periartiküler kasların değerlendirilmesinde Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ve Ultrasonografi (USG) ön plana çıkmaktadır. MRG’de yakın dönemde donanımsal ve yazılımsal teknolojik gelişmeler sonucunda yüksek doku çözünürlüğünde görüntüler elde edilebilmiş, fokal kıkırdak lezyonları gibi görece zor değerlendirilebilen patolojilerin görüntülenmesini mümkün kılmıştır (32). MRG’deki bazı morfolojik bulguları temel alan semikantitatif skorlama sistemleri özellikle diz eklemi için kullanılmaktadır. Bunlar arasında “Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score” (35), “Knee Osteoarthritis Scoring System” (36) ve “Boston Leeds Osteoarthritis Knee Score” (37) sayılabilir. Konvansiyonel MRG’de T2 haritalandırma yazılımları ve Difüzyon MRG kıkırdak dokudaki su içeriği değerlendirilerek proteoglikan-kolajen matris bütünlüğünü değerlendirmeye olanak sağlamaktadır (38,39). <sup>23</sup>Na MRG, Gadolinyum MRG gibi yöntemler ile kıkırdak dokudaki glukozaminoglikan (GAG) içeriği değerlendirilebilmektedir (40,41). Eklem kıkırdağı haricinde ligamentlerin, menisküslerin ve sinoviyumun değerlendirilmesinde MRG yine etkin rol oynamaktadır (42). USG, kemik yapıların içinde ve altında kalan yapıları görüntüleyemiyor olmasına karşın hastaların iyonizan radyasyona maruz kalmaması, girişimsel işlemler sırasında hekime yardımcı olması, gerçek zamanlı ve karşılaştırmalı görüntüler sunması gibi diğer görüntüleme yöntemlerinden avantajlı olduğu yönleri olan bir görüntüleme aracıdır (43). Sinoviyal hipertrofi, eklemden yer alan sinoviyal sıvının artması ve sinovit tablosuna eşlik eden vaskülarite artışı gibi durumların değerlendirilmesinde hem gri skala USG hem de Doppler USG kullanılmaktadır (44). Güncel bir yöntem olan kontrastlı USG’nin özellikle sinoviyal vaskülarizasyonu değerlendirmede kontrastlı MRG’den daha yüksek sensitiviteye sahip olduğu bildirilmektedir (45,46).

**Tablo 2.2 Kellgren-Lawrence OA Evrelendirme Sistemi**

<b>Kellgren-Lawrence OA Evrelemesi</b>	
<b>Evre</b>	<b>Bulgular</b>
0	Normal
1	Normale yakın (Klinik önemi olmayan küçük osteofitler)
2	Belirgin osteofitler mevcut ancak eklem aralığı etkilenmemiş
3	Belirgin osteofitler mevcut ve eklem aralığı daralmış
4	Belirgin osteofitler, eklem aralığında ileri derecede daralma, subkondral skleroz

**Şekil 2.1 Kellgren-Lawrence OA evreleri**



## 2.4 Risk faktörleri

OA için en yaygın risk faktörlerinden birisi yaştır. Farklı ülkelerde yapılan çalışmalar 65 yaş üstü bireylerin büyük çoğunluğunda bir veya daha fazla eklemdede radyografik dejeneratif değişiklikler tespit edildiğini bildirmektedir (47–49). Yaşlanma süreci yalnızca eklem kıkırdağını değil, ek olarak sinoviyum, subkondral kemik ve kas dahil olmak üzere diğer eklem dokularını da etkiler, eklem üzerinde gerçekleşen patolojik yüklenme ve sonucunda tüm eklem yapılarında başlayan dejeneratif sürece katkıda bulunduğu düşünülür. Artiküler kondrositleri ve diğer hücreleri kullanan çalışmalar, yaşlanan hücrelerin, hücre yaşlanmasını destekleyen artmış oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon gösterdiğini, bu durumun da hücre senesensi ile sonuçlandığını ortaya koymaktadır (50–53). Yaşlanan kondrositlerin bir başka özelliği hücrenin verdiği onarım yanıtının azalmasıdır. Bu durumda kısmen reseptör ekspresyon paternindeki değişiklikler rol almaktadır. Yaşlı ve OA'lı eklem kıkırdağından elde edilmiş kondrositlerde, Dönüştürücü Büyüme Faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) reseptörü Aktivin Reseptör-benzeri Kinaz 1'in (ALK1) ALK5'e oranı artmış, bu da TGF- $\beta$  yolunun aşağı-regülasyonu ve matriks sentezinden matriks metalloproteinaz (MMP) ekspresyonu ve katabolik sürece geçişe yol açmıştır (54,55). Güncel çalışmalar ayrıca tüm genomik DNA'nın metilasyonunun yaşlanan hücrelerde farklı patern gösterdiğini bildirmektedir (56,57). OA hastalarının kondrositlerindeki epigenetik değişiklikler genom sekanslama ile çalışılmış ve gen ekspresyonları değişen metilasyon enzimlerinin bu durumdan sorumlu olabileceği gösterilmiştir (58,59).

Son yıllarda obezite, dünya çapında bir pandemi haline gelmiştir ve obezite ile OA arasındaki ilişki uzun zamandır bilinmektedir (60,61). Obeziteli hastalarda OA daha erken yaşlarda görülmeye başlamakla beraber hastalık seyri boyunca daha şiddetli semptomlar gözlenmektedir. Diz eklemi üzerindeki artan biyomekanik yüklemeye ek olarak, obezitenin, adipokinler olarak adlandırılan yağ dokusu kökenli sitokinlerin salgılanması yoluyla da düşük dereceli sistemik inflamasyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir (62–64). Bazı proinflamatuvar sitokinlerin özellikle de IL1 $\beta$ , IL6, IL8 ve Tümör Nekrozis Faktör alfa (TNF $\alpha$ ) serum düzeyleri yüksek yağlı diyetle indüklenen fare obezite modellerinde ve obez hastalarda yüksek gözlenmiştir

(65–73). Bu inflamatuvar faktörler kondrositlerde nükleer faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) sinyal yolağını uyarır, MMP'ler aracılığıyla hücre dışı matris (ECM) degradasyonu ve katabolik süreci uyararak için tetikler (74,75).

OA'ya kalıtsal yatkınlık, yapılan aile temelli çalışmalarla gösterilmiştir (76–78). OA'nın genetiği karmaşık ve tam aydınlatılmamış olsa da OA'ya genetik katkı oldukça önemlidir (79). Son on yılda, OA patogenezinde genlerin ve sinyal yollarının rolleri, OA hastalarından elde edilen dokular kullanılarak yapılan ex vivo çalışmalar ve cerrahi olarak indüklenen OA hayvan modelleri ve genetik fare modelleri kullanılarak yapılan in vivo çalışmalar ile gösterilmiştir. Örneğin, TGF $\beta$ , Wnt/ $\beta$ -katenin, IHN ve Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) yollarındaki değişikliklerin, öncelikle kondrositlerde katabolik yanıtları indükleyerek OA gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (80–86). Genom çapında ilişki taramaları (GWAS) ile ilgili son çalışmalarda OA patogenezinde yer alan 80'den fazla gen mutasyonu veya tek nükleotid polimorfizmini (SNP) tanımlanmıştır. Tanımlanan genlerin bazıları önemli yapısal ve ECM ile ilgili faktörler (COL2A1, COL9A1 ve COL11A1) ve Wnt, kemik morfojenik proteini (BMP) ve TGF $\beta$  gibi sinyal yollarında yer alan molekülleridir. Bu yollar ve genlerin çoğu, daha önce genetik veya cerrahi olarak indüklenen OA fare modellerini kullanan çalışmalarda OA ile ilişkilendirilmiştir (87–92).

## 2.5 Spor İlişkili Osteoartrit

Son yıllarda dünyada spora katılım oranları artmaktadır ve bu artışla tüm branşlarda olmakla beraber özellikle rekabetçi ve yüksek fiziksel performansın sergilendiği spor branşlarında eklem kıkırdak hasarına bağlı yaralanmalarda da artış görülmektedir (93). Eklem kıkırdağında yüzeysel hasar, sporcuların %36'sında görülmektedir ve bu oran genel popülasyona göre iki kat daha fazladır (94). Müsabakalarda antrenmanlara göre, 30 ve üstü vücut kütle indeksine (VKİ) sahip sporcularda ve bazı oyun içi pozisyonlarda, daha yüksek yaralanma oranları gözlenmiştir (95).



**Şekil 2.2** OA gelişimi sürecinde yer alan faktörler

Diz yaralanması, genç erişkinlerde OA'nın ana nedenidir ve OA riskini dört kattan fazla artırmaktadır. Literatürde yer alan çalışmalar daha önce diz yaralanması olan bireylerin %41-51'inin sonraki yıllarda radyografik diz OA belirtilerine sahip olduğunu göstermektedir (96). Travmaya bağlı spor yaralanmaları kemik, kıkırdak, bağ ve menisküs hasarına neden olabilir ve bunların tümü eklem stabilizasyonunu olumsuz etkileyebilir. Eklem kıkırdağında delaminasyon, kortikal defekt, ligament yaralanmaları ve menisküs yırtıkları klinik olarak OA'ya yol açabilecek en yaygın yaralanmalardır (97–100). Sinoviyal hipertrofi, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, inflamasyon sürecinde yer alan sitokin ve kemokinlerin artışı ve NF-κB yolağının aktivasyonu hem travmatik diz OA'li hastalarda hem de fare yaralanma modellerinde gözlenmektedir (101).

Sporcularda artiküler kıkırdak yaralanması iki farklı mekanizma ile oluşabilir. İlki, sportif aktivite sırasında eklem kıkırdağında kronik tekrarlayan mekanik yüklenme sonucu yapısal hasar oluşması, ikincisi ise artiküler yüzeyin fissür ve ilerleyici destrüksiyonu ile ilerleyen katabolik enzimler ve sitokinlerin birikmesi sonucu oluşan kolajen ve agrekan degradasyonunun görüldüğü dejeneratif süreç. Sporla ilişkili kronik biyokimyasal ve metabolik değişiklikler, sporcularda gözlenen erken OA'daki eklem dejenerasyonuna sebep olur (102). Ekleme uzun süreli ve yüksek

yoğunluklu yük binmesi, menisküs ve ligament hasarı, eklemdede instabilite veya dizilim bozukluğu gibi patolojilerin olması kıkırdak hasarının başlaması ile sonuçlanır (103). Özellikle dizde stabiliteyi bozacak ligament yaralanması veya menisküs yaralanması olan bireylerin 5-10 yıl içerisinde %50'ye ulaşan OA gelişme riski bulunmaktadır (104). Diz yaralanması geçirmiş olmak ile diz OA riskinin incelendiği bir çalışmada kemik, kıkırdak, ligament, menisküs veya tendon yaralanması olan bireylerde OA gelişme riski ortalama 4,2 kat yüksek gözlenmiştir (105).

Mekanik yüklenme ile OA arasındaki ilişkiyi ve sorumlu mekanizmayı gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur. Kondrosit hücre kültür eksplantlarına fizyolojik kabul edilen süre ve frekanslarda siklik mekanik uyarı verilmesi sonucunda hücre proliferasyonunda, proteoglikan ve GAG sentezinde, tip 2 kolajen, fibronektin, Kartilaj Oligomerik Matriks Proteini (COMP) ve agrekan gen ekspresyonlarında artış gözlenmiştir (106–111). Ancak uzun süreli ve statik mekanik uyarıya maruz bırakılan kondrositlerde MMP, agrekanaz ve TNF $\alpha$  gen ekspresyonlarında artış (112,113), tip 2 kolajen ve agrekan gen ekspresyonlarında azalma olduğu bildirilmiştir (114). İn vivo ortamda yapılan çalışmalar da benzer yöndedir. Sağlıklı tavşan dizlerine tekrarlı mekanik yüklenmenin diz ekleminde dejeneratif değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (115). Köpeklerde yapılan çalışmalarda orta şiddetli koşunun (4 km/gün, 5 gün/hafta, 40 hafta boyunca) kıkırdak kalınlığı ve kıkırdak içerisindeki proteoglikan içeriğini arttırdığını ancak suprafizyolojik düzeydeki koşunun (20 km/gün, 5 gün/hafta, 15 hafta boyunca) kıkırdak kalınlığını ve proteoglikan içeriğini azalttığını göstermektedir (116,117). Sağlıklı bir eklemin immobilizasyonu sonucunda kıkırdak kalınlığı ve proteoglikan içeriği azalırken, stabilitesi bozulmuş bir eklemdede günlük harekete devam edilmesi kıkırdak hasarını başlatmaktadır (118). Ön çapraz bağları (ÖÇB) deneysel olarak kesilmiş köpek gruplarından serbest harekete devam edenlerde kondral hasar gözlenirken, ÖÇB transeksiyonu sonrası immobilize edilenlerde bu süreçte kondral hasar izlenmemiştir (119).

Özellikle ani yön değiştirme, rotasyonel hareketler içeren ve genel anlamda yaralanma riski yüksek sporlarda koşu gibi kontakt temasın olmadığı sporlara göre eklem dejenerasyonu sıklığı daha fazla görülmektedir (120). Farklı spor branşlarının

dahil edildiği bir meta-analiz çalışmasında sporcuların %30'unda profesyonel kariyerleri bitiminde diz OA görüldüğü bildirilmektedir (121). Tran ve arkadaşları, spora katılım açısından İngiltere'deki en popüler 32 spor branşı ile OA ilişkisine dair yürüttükleri çalışmalarında, genel anlamda sporun OA gelişme riskini artırdığını, ancak riskin sporlara göre farklılık gösterebildiğini bildirmektedirler (122). Tüm spor branşları OA gelişimi için aynı risk oranına sahip değildirler. Buz hokeyi ve greşte diz ve kalça OA riski artmışken, hentbolda kalça OA riski yüksek bulunmuştur (123).

OA'nın, sağlıklı eklem yapılarına fizyolojik düzeyin üzerindeki yüklenmeden veya hasarlı yapılara normal yüklenmeden sonra geliştiğinin varsayıldığı düşünüldüğünde profesyonel düzeyde spora katılan bireyler OA gelişimi için yüksek riske sahiptirler (124). Sporcularda B, menisküs ve tendon yaralanmalarının normal popülasyondan daha sık olduğu ve akut yaralanmalar sonrasında antrenman veya müsabaka gibi fiziksel zorlayıcı aktivitelere erken döndükleri düşünüldüğünde profesyonel bir kariyer sonucunda sporcular OA açısından risk altındadırlar (125–127).

**Tablo 2.3 Eklem üzerinde beklenen darbe ve torsiyonel yüklenmeye göre egzersiz çeşitleri**

<b>Eklem Yüklenme Düzeyi</b>	<b>Aktiviteler</b>	
Düşük	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rekreatif yüzme</li> <li>• Bisiklet, kürek veya kayak ergometresi</li> <li>• Tai Chi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Golf</li> <li>• Yürüyüş</li> <li>• Su içi aerobik egzersizler</li> </ul>
Orta	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bowling</li> <li>• Eskrim</li> <li>• Bisiklet</li> <li>• Kürek</li> <li>• Buz pateni</li> <li>• Kaya tırmanışı</li> <li>• Tenis (çiftler)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yelken</li> <li>• Hızlı yürüyüş</li> <li>• Kayak</li> <li>• Masa tenisi</li> <li>• Halter</li> <li>• Doğa yürüyüşü</li> <li>• Atçılık</li> </ul>
Yüksek	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beyzbol</li> <li>• Basketbol</li> <li>• Futbol</li> <li>• Ragbi</li> <li>• Tenis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lakros</li> <li>• Voleybol</li> <li>• Amerikan futbolu</li> <li>• Hentbol</li> <li>• Koşu</li> </ul>

## 2.6 Osteoartrit Tedavisi

### 2.6.1 Farmakolojik Olmayan Tedavi Yöntemleri

Özellikle hafif ve orta dereceli OA tedavisinde semptomların kontrolünde farmakolojik olmayan tedavi yöntemlerinin etkili oldukları bildirilmiştir (128,129). Bu yöntemlerin başında diyet ve kilo verme gelmektedir. Obez ve fazla kilolu olmanın OA için bağımsız birer risk faktörü olduğu düşünüldüğünde taşıyıcı eklemler

üzerindeki yükü hafifletmek, sistemik inflamatuvar süreci azaltmak ve kişinin egzersiz kapasitesini arttırmak adına diyet müdahalesi ile kilo vermek önerilen tedavi yöntemleri arasındadır ve birçok tedavi kılavuzunda birinci sıra tedavi yöntemlerinden biridir (130–134). Yapılan bir meta-analiz çalışmasında yalnızca kilo vermenin diz OA tanılı hastalarda ağrı ve hareket kısıtlılığı şikayetlerini iyileştirmede etkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle 20 haftalık bir süre içerisinde %5 oranında vücut ağırlığında düşüş yaşayan hastalarda semptomlarda rahatlama gözlemlendiği bildirilmiştir (135). OA tedavisinde ilk sırada yer alan modalitelerden biri de hasta eğitimi ve bilgilendirilmesidir (136,137). 9825 diz ve kalça OA tanılı hasta üzerinde yapılan çalışmada altı hafta süren bir hasta eğitiminin semptomlar, kullanılan ilaç miktarı ve OA nedeniyle iş yerinden alınan izin günü sayısında azalma ve fiziksel kapasitede artışa neden olduğu bildirilmiştir (138).

Ağrı ve fonksiyonel performans üzerinde etkili bir diğer yöntem fizik tedavi ve egzersizdir (139–141). Aynı zamanda egzersiz, kilo verme hedefine katkıda bulunan bir yöntemdir (140). OA’da egzersiz reçetelendirmesi bir denge içerisinde olmalıdır, çünkü ağrı nedeniyle egzersiz ve fiziksel aktivite kısıtlılığı olan hastaların egzersize uyum sorunu olabilmektedir. Dahası, yüksek şiddetli egzersizlerin OA üzerinde olumsuz etkilerinin de olabileceği akılda tutulmalıdır (142–144). Bu nedenle, egzersiz reçetesinin kişinin mevcut durumu ve tercihlerine göre şekillendirilmesi uygun olacaktır. Başlangıçta izometrik egzersizler gibi eklemlerde hareketin olmadığı egzersiz çeşitleri hastaya önerilebilir (145). Fiziksel kapasitesi uygun hastalarda yürüyüş veya bisiklete binme gibi izotonik egzersizler reçete edilebilir (140). Unutulmaması gereken konulardan bir tanesi de hastanın fiziksel kapasitesi kadar egzersiz programı hakkındaki eğitimi de egzersize uyumu etkilemektedir (146).

OA tedavisinde reçete edilecek egzersiz modaliteleri kuvvet ve aerobik egzersizleri içeren kara egzersizleri olabileceği gibi kara egzersizlerini ağrı nedeniyle tolere edemeyen, fiziksel kısıtlılığı bulunan hastalarda su içi egzersizler de akılda tutulmalıdır (147). Yer çekimine karşı yapılan hareketlerde suyun kaldırma kuvvetinin olumlu etkileri olması, eklemler üzerine hareketler sırasında yer tepki kuvvetinin yük oluşturmaması su içi egzersizlerin olumlu bazı özelliklerindedir (148,149). Ayrıca,

32-36 °C aralığında su sıcaklığının vasküler dolaşım eklem efüzyonları üzerinde olumlu etkileri olduğu da bildirilmiştir (150). Soğuk veya sıcak gibi termal modaliteler, lazer, terapötik ultrason, elektrikse stimülasyon ve manuel terapi teknikleri de tedavi yöntemleri arasında yer almaktadır (151–155).

Bunlar dışında özellikle şikayetlerin şiddetlendiği dönemlerde ağırlı taraftan yükü azaltacak koltuk değneği veya baston kullanımı, herhangi bir dizilim bozukluğu sonucu oluşmuş dengesiz yük dağılımını düzeltici tabanlıklar ve dizliklerin kullanımı da önerilmektedir (156).

### **2.6.2 Farmakolojik tedavi yöntemleri**

Her ne kadar herhangi bir farmakoterapiden beklenen ilgili hastalığın ilerleyişi durdurması ve hastalık kaynaklı hasarın geri döndürülmesi olsa da OA tedavisinde farmakoterapi ile hedeflenen temel amaç semptomların kontrol altına alınmasıdır. Tartışmalı olarak non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) yalnızca semptomları azaltmanın yanı sıra sinoviyum üzerindeki yapısal hasarı da geri döndürebileceği öne sürülmüş, ancak yapılan klinik çalışmalarda bu etki gösterilememiştir (157). Güncel olarak OA tedavisinde kullanılan ilaçların hiçbirinde yapısal hasarı düzeltici bir etki gösterilmemiş olup farmakoterapiden beklenen semptomların rahatlatılması ve şiddetlenmesinin engellenmesi olmuştur (158).

Asetaminofenler OA tedavisinde ilk sıra tercih edilen analjeziklerdir. Yalnızca semptom kontrolünde etkili olduklarından düzenli kullanımdan çok semptomları şiddetlendiği dönemlerde aralıklı kullanılmaları önerilmektedir. Yapılan randomize kontrollü çalışmalar ve meta-analizlerde asetaminofenlerin etkilerini kısa sürede göstermedikleri özellikle 2 hafta ile 3 ay arasında plaseboya göre ağrı ve fonksiyonda iyileşme gösterdikleri bildirilmiştir (158,159).

NSAİİ'ler analjezik, anti-inflamatuvar ve antipiretik etkileri bulunan ilaçlardır. Etki mekanizmaları siklooksijenaz (COX) enzimi inhibe etmeleri ve sonucunda prostagladin sentezini azaltmaları üzerinedir. Mevcut yan etki profilleri nedeniyle COX-2 selektif inhibisyon yapan türevleri de mevcuttur. Gastrik yan etkiler açısından



yüksek risk altında bulunan hastalarda dikkatli kullanılması, ülser kanaması hikayesi olanlarda ilk tercih tedavi seçeneği olarak diğer ajanların düşünülmesi önerilmektedir (160–162).

Basit analjezikler ile kontrol altına alınamayan durumlarda opioid analjezikler de kullanılabilir. Oral, intramusküler ve transdermal olarak uygulanan formları mevcuttur (163). Konstipasyon, ağız kuruluğu, uyku ve hafıza problemleri gibi yan etkiler ve kötüye kullanım ihtimali göz önünde bulundurulduğunda opioid analjeziklerin diğer medikal tedaviler denenmeden kullanılması ve uzun süreli tedavi planında yer alması önerilmemektedir (164–166). Atipik bir opioid olan tramadol düşük yan etki profili sebebiyle opioidler arasında ilk sıra tercih edilmesi önerilen ajanlardan biridir (167).

Glukozamin ve kondroitinler yaygın kullanılan ajanlardır. Temel olarak kondroprotektif ve/veya (DMOADs) olarak kabul edilmektedirler. OA tedavisindeki etkinlikleri konusunda çelişkili sonuçlar bildiren yayınlar olsa da özellikle ağrı kontrolünde etkili olabilecekleri bildirilmiştir (168,168,169). ESCEO tarafından hazırlanan OA tedavi rehberinde glukozamin ve kondroitin kullanımı tavsiye edilmektedir (134). Glukozaminler suda çözünen monosakkarit bileşenleridir ve insan vücudunda en fazla bulunan monosakkaritlerdir. Eklem kıkırdak matriksinde ve sinoviyal sıvıda bulunmaktadırlar. Glukozaminlerin OA tedavisindeki etkilerinin temel olarak kondrositlerin anabolik fonksiyonları üzerine olduğu düşünülmektedir (170). Bunun dışında dejeneratif süreci baskıladıkları ve anti-inflamatuvar özellikte oldukları da bildirilmektedir (171). Kondroitin genellikle sülfatlanmış formda bulunur ve eklem kıkırdağı ECM yapısının temel bileşenini oluşturur. ECM'deki osmotik basıncın oluşumuna ve kıkırdak matriksin yük altında bütünlüğünün korunmasına katkıda bulunur (172). Tensil kuvvetler karşısında kıkırdak matriksin direnç ve elastisitesinden temel sorumlu bileşendir (173). Glukozaminlere benzer şekilde ekzojen kondroitin uygulanmasının inflamasyon ve kartilaj degradasyonunu azaltıcı ve ECM sentezini uyarıcı etkileri bulunmaktadır (174). Ayrıca IL1 $\beta$  kaynaklı inflamatuvar yanıtı baskılayarak kondroprotektif etki gösterirler (175,176).

Diaserin anti-inflamatuvar etkinliğe sahip bir antrakinon türevidir. Yapılan meta-analizlerde ağrı ve uzun dönem kullanımda eklemde yapısal hasarı geciktirme üzerinde olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir (177–181). Hepatotoksisite ve ciddi diyareye neden olması nedeniyle kullanımı kritik sorunlara neden olabilese de Avrupa İlaç Kurumu (EMA) fayda-zarar dengesinde diaserin kullanımını diz ve kalça OA tedavisinde 65 yaş altı hastalar için önermektedir (182). ESCEO rehberi özellikle parasetamol ve NSAİİ kullanımı kontraendike olan hastalarda diaserin kullanımı desteklemektedir (134).

İntraartiküler glukokortikoid enjeksiyonları özellikle baskın anti-inflamatuvar etkileri nedeniyle OA tedavisinde yer almaktadırlar (183). Kolajenaz ve bazı proteinazların neden olduğu kıkırdak hasarını inhibe etmektedirler (184,185). Genel görüş NSAİİ tedavisine yanıt vermeyen hastalarda glukokortikoid enjeksiyonunun yapılması yönündedir. Yine yapılan çalışmalarda ağrı ve fonksiyon kaybı üzerinde olumlu etkileri olduğu ve bu etkinin enjeksiyondan 1 hafta sonra görülmeye başladığını bildirilmektedir (186–188). Sinovit eşlik eden vakalarda glukokortikoidlerin kullanılabilceği önerilmiştir (189,190). Glukokortikoid preparatlarının birbirlerine üstünlüğü hakkında yüksek kanıt düzeyine sahip veri olmamakla beraber metilprednizolon, triamsinolon ve betametazon tercih edilmektedir (187,191).

İntraartiküler hyaluronik asit suplemantasyonunun OA semptomlarını azaltmada etkili bir diğer yöntem olduğu gösterilmiştir (192). OA'lı eklemlerde konsantrasyonu azalan hyaluronik asidin ekzojen enjeksiyonu eklem içi viskoelastik destek sağladığı gibi yapılan çalışmalarda hastaların ağrı şikayetlerini de olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (193–195). Yüksek molekül ağırlıklı bir polisakkarit olduğundan intraartiküler enjeksiyonu fiziksel olarak artiküler yüzeylerde lubrikasyon etkisi yapmaktadır.

TZP toplanan venöz kanın santrifüjü sonrası trombosit konsantrasyonunun yaklaşık 10 kat arttırıldığı ve 1500'e yakın protein ve çok sayıda konsantre büyüme faktörleri ile trofik moleküller içeren otolog bir kan ürünüdür. Kıkırdak tamiri, rejenerasyon ve inflamatuvar sürecin baskılanmasında olumlu etkileri bulunmaktadır

(196). Trombosit kaynaklı aktive edilmiş proteinler hedef hücrelerdeki transmembran reseptörlere bağlanarak TZP'nin trofik ve anti-inflamatuvar etkilerini oluşturmaktadırlar (197). Diz OA tedavisinde TZP'nin uzun süreli klinik etkinliği bulunmaktadır (198,199).

Kök hücreler, belirli bir hücre soyuna doğru kendini yenileme ve farklılaşma yeteneğine sahip farklılaşmamış hücrelerdir. Kök hücreler, değişken farklılaşma potansiyeline sahiptirler ve bu hücreler hemen hemen tüm dokularını oluşturabildikleri için pluripotent (örneğin embriyonik kök hücreler veya indüklenmiş pluripotent kök hücreler gibi) veya sadece belirli hücre soylarına farklılaşabildikleri için multipotent (örneğin erişkin veya fetal MKH'ler gibi) olarak sınıflandırılabilirler. Kök hücreler bu nedenle rejeneratif tıp uygulamalarında kendine yer bulmaktadırlar. MKH'ler ise birden fazla hücre serisine dönüşme (multipotent) potansiyeli olan kök hücrelerdir (200). Hayvan deneylerinde intraartiküler MKH enjeksiyonunun OA tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (201,202). MKH'lerin rejeneratif özellikleri parakrin mekanizma ile anti-inflamatuvar ve kondroprotektif etki göstermelerine dayandırılmaktadır (203,204). Bu parakrin mekanizmaya hücre dışına salınan sinyal molekülleri, sitokinler, metabolitler, eksozomlar ve proteinler aracılık etmektedirler (205,206). OA gibi dejeneratif hastalıkların tedavisinde MKH'ler iki farklı etki modeli için kullanılmaktadırlar. İlki MKH'lerin parakrin olarak sekretuar fonksiyonları sayesinde kartilaj degradasyonunu yavaşlatıp, rejenerasyonu uyarmaları, ikincisi ise MKH'lerin kondrositlere diferansiyasyonu ve kültür ortamında çoğaltılmış yeni kondrositlerin bazı kalıplar üzerinde defekt alanına yerleştirilmesidir. MKH'lerin kondrositlere diferansiye olabilmeleri ve farklı biyomateryaller ile birlikte uygulanabilmeleri OA tedavisinde bir biyomühendislik alanı oluşturmaktadır (207). Kültür ortamında kondrositler ile aynı ortamı paylaşan MKH'lerin hipertrofik diferansiyasyon gibi büyüme faktörleri ile indüklenen diferansiyasyonlarda gözlenen istenmeyen olaylar yaşanmadan kondrositlere dönüşebildikleri bildirilmektedir (208).

MKH'lerin kondrositler üzerinde olan parakrin etkilerini incelemek için ko-kültür deney düzeneği kullanılmış, böylece MKH'lerden sekrete edilen trofik faktörlerin ve buna yanıt olarak kondrositlerin fenotipik değişimleri gözlenmiştir

(209–211). Parakrin etkileri inceleyen çalışmalarda yapılan yöntemlerden bir tanesi de MKH'ler olmadan MKH protein ekstratları ve hücre kültür süpernatantlarını tedavi amacıyla kullanmak olmuş ve iskemik modelde miyokardlar üzerinde ve karaciğer hasarı modelinde hepatositler üzerinde olumlu etkileri gözlenmiştir (212,213). MKH'lerin bu parakrin etkilerinde aracı moleküller olarak bazı büyüme faktörleri ve mikroRNA'lar ile hedef hücredeki proliferasyonu uyardıkları öne sürülmüştür (214,215). Kısıtlı olmakla beraber bu etkilerin bir kısmı in vivo ortamda da gösterilmiştir (216). MKH'lerin inflamatuvar cevabı parakrin sinyaller yoluyla yönettiği, immünomodülatör bir rolü de vardır. (217).

Erişim kolaylığı nedeniyle kemik iliği ve yağ dokusu kaynaklı MKH'ler ilk çalışılan dokular olsalar da, umbilikal kord, sinoviyum, plasenta, dental pulpadan da MKH'ler elde edilebilmektedir (218,219). Kemik iliği MKH için yaygın bir kaynak olarak kullanılmıştır, ancak araştırmalar kemik iliği aspiratları içinde MKH'lerin göreceli olarak azlığına işaret etmektedir. Kemik iliği aspiratlarından izole edilen mononükleer hücrelerin sadece %0,001 ile %0,01'si MKH olarak nitelendirilmiştir (220). Buna karşılık, lipoaspirat prosedürü ile hazırlanmış insan adipoz dokusu, mononükleer hücre popülasyonunun yaklaşık %1-7'si kadar MKH sayılarına sahiptir (221). Sinoviyum kaynaklı MKH'ler de diğer dokulardan elde edilen MKH'lere benzer rejeneratif yenilenme ve farklılaşma yeteneğine sahiptir ve sinoviyal dokudan elde edilen MKH'lerin kemik iliğinden elde edilenlere göre daha yüksek kondrojenik kapasite gösterdiği gösterilmiştir (222). Farklı doku kökenlerinden elde edilmiş MKH'lerin birbirlerine tedavi üstünlüğü olup olmadığı sorusunu doğurmuştur. MKH kaynağı olarak en uygun doku seçimi hasta güvenliği, erişim kolaylığı ve işlem sonrası iyileşme parametrelerine dayanmalıdır (223). Daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtlar, farklı doku kaynaklarından elde edilen MKH'lerin hücre yüzey proteini ekspresyonu ve spesifik hücre tiplerine farklılaşma kapasitelerine göre farklılık gösterdiğini belirtmektedir (224,225). Bu nedenle, OA'lı dizlerde kullanılan farklı dokulardan elde edilmiş mezenkimal kök hücrelerin farklı tedavi etkinliği gösterebileceği düşünülmüştür (226).

### 2.6.3 Cerrahi Tedavi Yöntemleri

Diğer tedavi yöntemleri başarısız veya yetersiz kaldığında cerrahi yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Artroskopik debridman OA hastalarında uygulanan yöntemlerden biridir ve yapılan geniş kapsamlı çalışmalar izole femoral kondral lezyonlar hariç olumlu etkileri olmadığı ve bu nedenle OA tedavisinde kısıtlı alana sahip olduğunu bildirmektedirler (227,228). Etkinliği zayıf olan bir diğer cerrahi yöntem eklem lavajıdır. Özellikle ileri derece sinovit tablosunun eşlik ettiği hastalarda faydalı olabileceği bildirilmektedir (229). Total eklem replasmanı cerrahisi OA için defintif tedavi olarak kabul edilmektedir (230). Total eklem replasmanı cerrahisi sonrası egzersiz ve yaşam değişiklikleri önerileri uygulanan hastalarda yalnızca konservatif tedavi alanlara göre semptomlarda daha yüksek oranda iyileşme olduğu bildirilmektedir (231). Hastada bulunan ek komorbiditeler ve ileri yaş gibi durumlarda ciddi komplikasyonlar görülebileceğinden uygun hasta seçimi önemlidir (196,232,233).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Çalışma Tasarımı

Çalışma disiplinlerarası, rastgele seçilmiş (randomize), kontrol grubu içeren, prospektif deneysel çalışma şeklinde tasarlandı. Çalışmanın etik kurul onayı 15.10.2019 tarihinde Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Karar numarası: GO 19/1010). Çalışmaya diz bölgesinden artroskopik cerrahi operasyon planlanan hastalardan, dahil edilme kriterlerini karşılayanlar kabul edildi. Çalışmaya dahil edilen katılımcılara Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Spor Hekimliği Anabilim Dalı'nda çalışmanın amacı ve yapılacak işlemler ile ilgili bilgiler sözlü ve yazılı olarak aktarılarak hastaların yazılı ve sözlü aydınlatılmış onamları alındı. Çalışmada bağımlı değişkenler deney grupları (OA kondrosit, sağlıklı kondrosit, patella altı yağ doku kökenli MKH+sağlıklı kondrosit, patella altı yağ doku kökenli MKH+OA kondrosit, sinoviyum kökenli MKH+sağlıklı kondrosit, sinoviyum kökenli MKH+OA kondrosit, cilt altı yağ doku kökenli MKH+sağlıklı kondrosit, cilt altı yağ doku kökenli MKH+OA kondrosit), bağımsız değişkenler ko-kültür süpernatantında yapılan metabolomik analizler ile ölçülecek TNF, COMP, MMP3 konsantrasyonlarıydı.

#### 3.2 Katılımcılar

Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda cerrahi operasyon endikasyonu olan, çalışma kriterlerine uygun gönüllüler seçildi. Bu bağlamda spor yaralanması sonucunda artroskopik olarak menisküs onarımı/menisektomi ve/veya ön çapraz bağ greftleme işlemleri yapılmasına Ortopedi ve Travmatoloji uzmanı tarafından karar verilmiş hastalar hedef kitle olarak belirlendi. Tüm katılımcılardan operasyon öncesi onamları alınmış olup, cerrahi işlemler sırasında cerrahi teknik gereği rutin olarak uzaklaştırılan ve tıbbi atık niteliği taşıyan dokular steril şartlar altında toplandı. Yeterli miktarda doku veya uygun doku tipinde uzaklaştırılmış dokusu olmayan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Uygun şartları sağlayan 3 hasta dokusu çalışma için gerekli miktar olarak belirlendi. Çalışmaya başlangıçta 11 gönüllü dahil edildi ve çalışmaya uygun 3 gönüllü dokusu elde edilince

doku toplama işlemi sonlandırıldı. Gönüllülerden çalışmaya dahil olmalarını sağlamak adına ek doku alınmadı. Bu nedenle çalışma için yetersiz miktarda dokusu uzaklaştırılmış 8 hasta çalışma dışı bırakıldı. Çalışmaya yalnızca erkek bireyler dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen katılımcıların yaşları ortalaması  $21,6 \pm 2,5$  olup 19 ve 25 arasında değişiyordu.

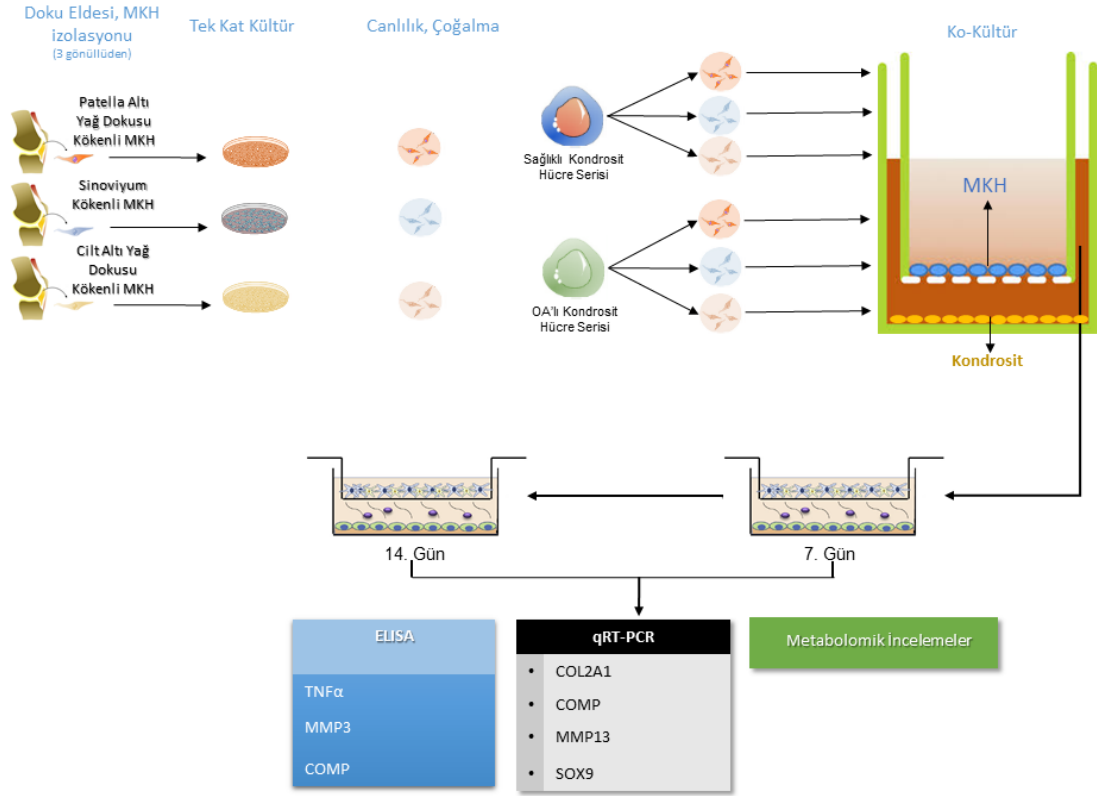
**Tablo 3.1 Çalışmaya dahil edilme ve çalışmadan dışlanma kriterleri**

Dahil edilme kriterleri	Dışlama kriterleri
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 18 yaşından büyük, 65 yaşından küçük olmak</li> <li>• Spor yaralanması nedeniyle diz bölgesinden cerrahi operasyon endikasyonu almış olmak</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• OA tanısı almış olmak</li> <li>• Grup seçimi esnasında aktif enfeksiyon sahibi olmak</li> <li>• Daha önce aynı taraf dizden cerrahi öyküsü</li> <li>• DM, obezite, vb. metabolik hastalık tanısı almış olmak</li> <li>• Malignite tanısı almış olmak</li> </ul>

### 3.3 Örneklem Büyüklüğü

Araştırılan bağımsız değişkenler açısından yapılan benzer çalışmalarda elde edilen ortalama ve standart sapma değerleri kullanılarak, güç analizi için G-power 3.0.10 programı kullanılmış ve güç=%80, hata payı=%5 olarak hesaplandı. Yapılan

hesaplamaya göre deney ve kontrol gruplarının oluşturulması için kullanılacak katılımcı sayısı n=3 olarak belirlendi.



Şekil 3.1 Çalışma dizaynını gösteren şematik çizim.

### 3.4 Osteoartriti Olmayan Gönüllülerin Seçilmesi ve Patella Altı Yağ Dokusu, Sinoviyum ve Cilt Altı Yağ Dokusu Elde Edilmesi

Ortopedik cerrah tarafından operasyon kararı alınmış ve onamı alınan hastaların, operasyon sırasında, uygulanan cerrahi işlem gereği çıkartılan ve hâlihazırda çöpe atılacak olan sinoviyum, patella ve cilt altı yağ dokuları kullanıldı. Doku çıkarımı için ek bir medikal işlem uygulanmamış olup, cerrahın operasyon sırasında uygun gördüğü miktarda çıkarmış olduğu dokular kullanıldı, ek doku çıkarımı yapılmadı. Hastadan mezenkimal kök hücre elde etmeye yeterli miktarda çöp doku çıkmamış ise, hastanın dokuları kullanılmadı.



### **3.5 Osteoartriti Olmayan Gönüllülerden Elde Edilmiş Patella Altı Yağ Dokusu, Sinoviyum ve Cilt Altı Yağ Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyon, Üretim ve Karakterizasyonu**

#### **3.5.1 Patella ve Cilt Altı Yağ Dokusundan Adiposit Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu**

Gönüllülerden izole edilen patella ve cilt altı yağ dokusu steril koşullarda %1 penisilin- streptomisin (BI, ABD) ve %10 fetal bovine serum (FBS, BI, ABD) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose (DMEM-LG, BI, ABD) besiyerine aktarıldı. Aktarılan dokular mekanik olarak 1 mm<sup>3</sup>'ten küçük parçalara bölündü ve 37°C'de 40 dakika %0,25 tripsin-EDTA (PAN BioTech., Almanya) içinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1:1 oranında %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 oranında L-glutamin (BI, ABD) içeren DMEM-LG besiyeri eklenerek 1800 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatant atılmış, hücre pelleti ve doku parçaları %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 oranında L-glutamin (BI, ABD) içeren DMEM-LG besiyerinde T75 hücre kültürü flasklarına alınarak 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ortamında kültüre edildi. Kültürün dördüncü günü doku parçaları uzaklaştırıldı ve hücre kültür flaskına tutunan hücreler gözlendi. Kültürün dördüncü gününden itibaren hücre besiyeri iki günde bir taze besiyeri ile değiştirildi ve hücrelerin kültürüne devam edildi.

#### **3.5.2 Sinoviyum Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu**

Gönüllülerden izole edilen sinoviyum dokusu steril koşullarda %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren DMEM-LG besiyerine aktarıldı. Dokular mekanik olarak 1 mm<sup>3</sup>'ten küçük parçalara bölündü ve 37°C'de 40 dakika %0,25 tripsin-EDTA içinde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 1:1 oranında %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 oranında L-glutamin içeren DMEM-LG besiyeri eklenerek 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atılarak hücre pelleti ve doku parçaları %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 oranında L-glutamin içeren DMEM-LG besiyerinde hücre kültürü flasklarına alındı ve 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ortamında kültüre edildi. Kültürün dördüncü günü doku parçaları uzaklaştırıldı ve hücre kültür flaskına

tutunan hücreler gözlemlendi. Kültürün dördüncü gününden itibaren hücre besiyeri iki günde bir taze besiyeri ile değiştirildi ve hücrelerin kültürüne devam edildi.

### **3.5.3 Sinoviyum ve Adiposit Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Üretimi**

İzole edilen MKH'lerin yoğunluğu %70 oranına ulaştığında pasajlanarak üretimine devam edildi ve üretimine devam edilmeyecek hücreler donduruldu. Pasajlama için besiyeri hücre kültür flaskından uzaklaştırıldı, hücreler PBS ile yıkandı. Yıkanan hücrelerin üzerine %0,25 tripsin-EDTA eklenmiş ve 3 dakika 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, hücrelerin üzerine tripsin ile 1:1 oranında hücre besiyeri eklendi ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatant atıldı, pellet besiyeri ile homojenize edildi ve tripan mavisi boyası ile 1:1 oranında sulandırılarak hücre sayımı yapıldı. Sayım sonrasında kültüre edilecek hücreler hücre kültür flasklarına ekilerek kültürüne devam edildi. Dondurma için sayımı yapılan hücreler her dondurma tüpünde  $10^6$  tane hücre olacak şekilde 5:4:1 oranına (Hücre Besiyeri: FBS: DMSO) sahip dondurma besiyerine aktarıldı. Dereceli dondurma için yavaş dondurma protokolüne uygun olacak şekilde dakikada 1°C soğutacak CoolCell'e (Sigma-Aldrich, Almanya) dondurma tüpleri yerleştirilerek 4 saat -80°C'de bekletildikten sonra -196°C sıvı azot tankında dondurularak saklandı.

### **3.5.4 Sinoviyum ve Adiposit Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu**

Patella altı yağ dokusu, sinoviyum, ve cilt altı yağ dokusundan üretilen MKH'lerin karakterizasyonu Uluslararası Hücresel Tedavi Topluluğu'nun Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi'nin (The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of The International Society for Cellular Therapy) ön gördüğü kriterler esas alınarak üç yöntemle gerçekleştirildi (234). Bu kriterler doğrultusunda MKH'lerin morfolojileri, multipotent özellikleri ve ifade ettikleri yüzey belirteçleri aşağıdaki yöntemler ile değerlendirildi.

Morfolojik kriter doğrultusunda, MKH'ler inverte ışık mikroskopisi altında kültür kabına tutunma özellikleri ve iğ biçimli morfolojisi incelendi.

Multipotent farklılaşma özelliği kriteri doğrultusunda, MKH'ler osteojenik ve kondrojenik farklılaştırma deneyleri yapıldı. Osteojenik farklılaşma değerlendirmesi, kantitatif olarak hücrelerde alkalen fosfataz (ALP) enzim aktivite seviyesinin spektrofotometrik yöntem ile ölçümü aracılığıyla gerçekleştirildi. Bunun için hücreler altı kuyucuklu kültür plakalarına  $2 \times 10^4$  hücre/kuyucuk oranında ekildi ve %70 yoğunluk oranına ulaşıncaya kadar besiyeri iki günde bir taze besiyeri ile değiştirildi. Hücreler hedeflenen yoğunluğa ulaştıklarında altı kuyucuklu hücre kültür plakasının üç kuyucuğunda osteojenik farklılaştırma başlatıldı, üç kuyucuğunda MKH'lerin kültürüne kontrol amaçlı devam edildi. Osteojenik farklılaştırma için hücreler PBS ile yıkandı ve kuyucuklara %10 FBS, 100 nM deksametazon (Sigma-Aldrich, Almanya), 10 mM  $\beta$ -gliserofosfat (Sigma-Aldrich, Almanya) ve 0,2 mM L-askorbik asit (SantaCruz Biotechnology Inc., ABD) içeren osteojenik farklılaştırma besiyeri eklendi. Besiyerleri üç günde bir kere olacak şekilde taze osteojenik farklılaştırma besiyeri ile değiştirildi. 21. günde, kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırıldı, PBS ile yıkanarak ve hücre içi ALP aktivitesinin ölçümü kantitatif olarak yapıldı. Bunun için üreticinin talimatları doğrultusunda kuyucuklara SIGMAFAST pNPP substrat (Sigma- Aldrich, Almanya) çözeltisi eklenerek kültür plakası karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası mikropilaka okuyucuda 405 nm dalga boyunda okutuldu. Kondrojenik farklılaşma değerlendirilmesi, Masson's trichrome ve hematoksilen eozin boyaması yöntemi ile yapıldı. Bunun için, kültürü gerçekleştirilen MKH'ler %0,25 tripsin-EDTA ile kaldırılıp  $25 \times 10^4$  hücre/tüp olacak şekilde 15 ml'lik konikal tüpe süspansiyon edildi. Konikal tüpte bulunan hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 2 ml büyüme besiyeri eklenerek konikal tüpler  $37^\circ\text{C}$  ve %5  $\text{CO}_2$  koşullarında inkübe edildi. Konikal tüp içinde 24 saat sonrasında oluşması beklenen küre biçimli pellet gözlemlendi ve pelletin dağılmamasına dikkat edilerek ticari kondrojenik farklılaştırma besiyeri olan MSCgo™ Chondrogenic Differentiation Medium'dan (BI, ABD) 2 ml eklendi. Diğer falkonda bulunan pellet üzerine kontrol olarak kullanılacağı için MKH büyüme besiyeri eklenerek aynı şekilde kültüre edildi. Her iki grubun da besiyerleri üç günde bir kere taze besiyeri ile değiştirildi. Değerlendirme yapılacak 21. günün sonunda besiyerleri ortamdaki uzaklaştırıldı ve

%10 formalin içinde oda sıcaklığında 24 saat fikse edildi. Fiksasyon sonrasında dehidrasyon için alkol serilerinden, şeffaflaştırma için ksilolden geçirildi ve parafin istasyonunda (LG1150H-C, Leica, Almanya) parafine gömüldü. Parafin bloklardan 3 µm kalınlığında kesitler kızaklı mikrotomda (SM2000R, Leica, Almanya) alındı. Bir gece 60°C’de deparafinize edilen kesitler hematoksilin eozin ve Masson’s trikrom ile boyandı. Boyanan kesitler kamera ataçmanlı (DFC7000T, Leica, Almanya) aydınlık alan mikroskopunda (DM6B, Leica, Almanya) görüntüleme programı (LASX, Leica, Almanya) ile değerlendirildi.

İfade edilen yüzey belirteci kriteri doğrultusunda, üretilen MKH’lerin yüzey belirteçleri olan CD73, CD44, CD90 ve CD29’u ifade edip, CD38, CD45 ve HLA-DR’yi ifade etmedikleri akım sitometrisi yöntemi ile değerlendirildi. Bunun için hücreler %0,25 tripsin-EDTA ile kaldırılarak 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra pellet homojenize edilerek  $1 \times 10^5$  hücre/tüp olacak şekilde tüpler hazırlandı ve 1600 rpm’de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında her tüpe %3 bovine serum albümin (Sigma, Almanya), %1 sodyum azid içeren DPBS’ten 100 µl eklendi ve fare anti insan CD73 IgG1-PE, fare anti insan CD44 IgG1-FITC, fare anti insan CD45 IgG1-FITC, fare anti insan CD90 IgG1- FITC, fare anti insan CD29 IgG1-APC, fare anti insan CD38 IgG1-APC, fare anti insan HLA-DR IgG2- APC (BD Biosciences, ABD) antikorlarından 5 µl eklenerek karanlık ortamda 15 dakika 4°C ve ardından 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hücreler 2 ml PBS ile iki kere yıkandı. Yıkama sonrasında her tüpe 300 µl PBS eklendi ve NovoCyte® (ACEA Biosciences, ABD) cihazında okutuldu. Sonuçlar NovoExpress programında (ACEA Biosciences, ABD) değerlendirildi.

### **3.6 İnsan Kaynaklı Ticari Osteoartritli ve Sağlıklı Kondrosit Üretimi**

İnsan kaynaklı ticari osteoartritli kondrosit hattı (#402OA-05a, Cell Applications, ABD) ve sağlıklı kondrosit hattı (#402-05a, Cell Applications, ABD) %15 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM/F12 (PAN BioTech., Almanya) içinde kültüre edildi. Kültüre edilen kondrositlerin besiyeri iki günde bir olacak şekilde taze besiyeri ile değiştirildi. Kültür kabı %70 oranında dolduran kondrositler, PBS ile yıkandı, %0,25 tripsin-EDTA uygulanarak 5 dakika

37°C'de inkübe edilerek tutundukları yüzeyden kaldırıldı. Tripsin aktivasyonunu durdurmak için 1:1 oranında kondrosit besiyeri eklendi. Toplanan hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan pellet homojenize edilerek hücre kültür flasklarına ekilerek kültürüne devam edildi. Kültürüne devam edilmeyen hücrelerin dondurulması için hücreler tripan mavisi boyası ile sayılmış ve  $10^6$  hücre/dondurma tüpü olacak şekilde 5:4:1 oranına (Kondrosit büyüme besiyeri:FBS:DMSO) sahip dondurma besiyeri ile dereceli dondurma için CoolCell'de (Sigma-Aldrich, Almanya) yavaş dondurma protokolüne uygun olacak şekilde dakikada 1°C soğutulularak 4 saat -80°C'de bekletildikten sonra -196°C sıvı azot tankına yerleştirilerek donduruldu.

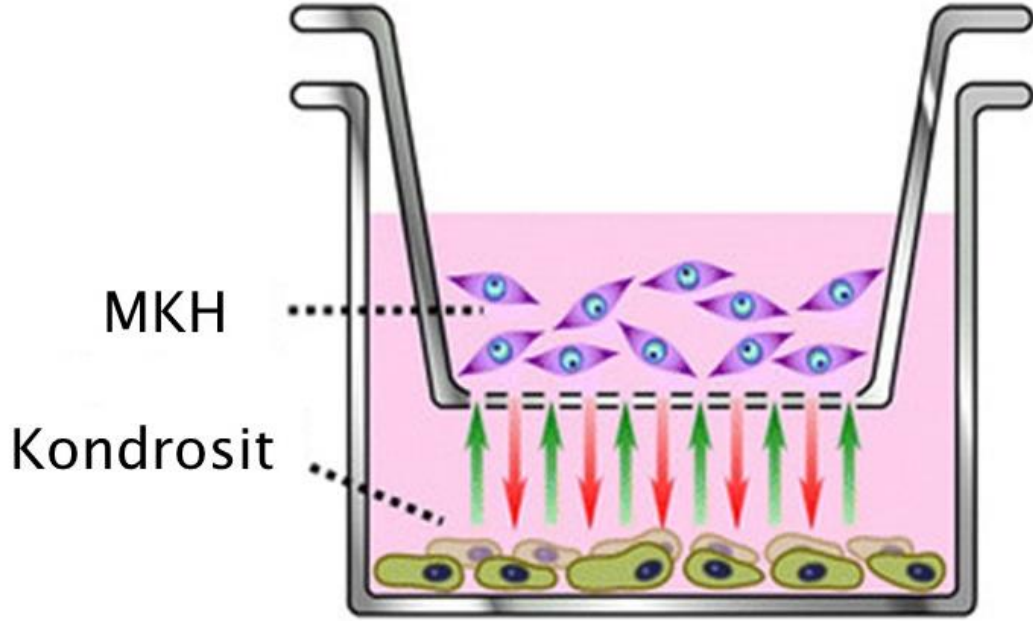
### **3.7 Mezenkimal Kök Hücrelerin Sağlıklı ve Osteoartritli Kondrositler ile Birlikte Kültürü**

Patella altı yağ dokusu, sinoviyum ve cilt altı yağ dokusundan elde edilen MKH'lerin sağlıklı ve osteoartritli kondrositler ile birlikte kültürü Transwell sistemi (Corning, ABD) kullanılarak yapıldı. Bu sistem için 0,4 µm gözenek boyutuna sahip Transwell sistemi kullanıldı. Bunun için sağlıklı ve osteoartritli kondrositler  $10^4$  hücre/kuyucuk oranında Transwell sisteminin alt kısmına ekildi ve yoğunluğu %70'lik orana ulaşana kadar kültüre edildi. Kondrositler %70 yoğunluk oranına ulaştığında Transwell sistemin üst kısmına  $15 \times 10^3$  hücre/kuyucuk patella altı yağ dokusu, sinoviyum ve cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH'ler ekildi. Kondrositler ve MKH'lerin birlikte kültürü 7. ve 14. günlerde sonlandırıldı ve süpernatant ileri değerlendirmeler için toplandı.

**Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan deney grupları ve grupların isimlendirilmesinde kullanılan kısaltmalar**

### Deney Grupları

Kısaltma	Grup Açıklaması
1 K	Sağlıklı Kondrosit
2 OAK	OA'lı Kondrosit
3 P+K	Patella altı yağ dokusu kaynaklı MKH'ler ile birlikte kültüre edilen sağlıklı kondrosit
4 P+OAK	Patella altı yağ dokusu kaynaklı MKH'ler ile birlikte kültüre edilen OA'lı kondrosit
5 S+K	Sinoviyum kaynaklı MKH'ler ile birlikte kültüre edilen sağlıklı kondrosit
6 S+OAK	Sinoviyum kaynaklı MKH'ler ile birlikte kültüre edilen OA'lı kondrosit
7 C+K	Cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH'ler ile birlikte kültüre edilen sağlıklı kondrosit
8 C+OAK	Cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH'ler ile birlikte kültüre edilen OA'lı kondrosit



Şekil 3.2 Mezenkimal kök hücreler ve kondrositlerin birlikte kültürü.

### 3.8 İnflamasyon, Kondrosit Yapım ve Yıkım Belirteçlerinin Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Yöntemi ile Değerlendirilmesi

İnflamasyon belirteci olarak  $TNF\alpha$ , kondrosit yapım belirteci olarak COMP ve kondrosit yıkım belirteci olarak MMP3 konsantrasyonları değerlendirildi. Patella altı yağ dokusu, sinoviyum ve cilt altı yağ dokusundan elde edilen MKH'ler ile birlikte kültüre edilmiş sağlıklı ve osteoartritli kondrositleri içeren deney gruplarında, kondrosit yapım ve yıkım ürünleri 7. ve 14. günlerde ELISA kitleri ile  $TNF\alpha$  (SEA133Hu, Cloud-Clone Corp., Çin), COMP (SEB197He, Cloud-Clone Corp., Çin) ve MMP3 (SEA101Hu, Cloud-Clone Corp., Çin) süpernatandaki seviyelerinin ölçümü üreticinin talimatları doğrultusunda yapıldı. Bu doğrultuda, toplanan süpernatant 1000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar dilüye edilmeden kullanıldı. Değerlendirme için kullanılacak kitlere ait ajanlar ve standart solüsyonları talimatlar doğrultusunda dilüye edildi. Örnekler ve standart solüsyonları deney planına uygun şekilde kuyucuklara eklendi ve hücre kültür plakası Plate Sealer ile kapatılarak

talimatlar doğrultusunda inkübasyon basamakları gerçekleştirildi. Ajanların örnekler ile birlikte inkübe edildiği basamaklar tamamlandığında kit içerisinde bulunan durdurucu solüsyon kuyucuklara eklendi ve hücre kültür plakası 450 nm dalga boyutunda mikroparka okuyucuda okutuldu (Şekil 3.3). Okuma sonrasında standart solüsyonlarına ait OD. değerleri aracılığı ile standart eğri çizildi. Bu eğriye ait formül ile örneklere ait OD. değerlerinden süpernatantlardaki TNF $\alpha$ , COMP ve MMP3 konsantrasyonları hesaplandı.



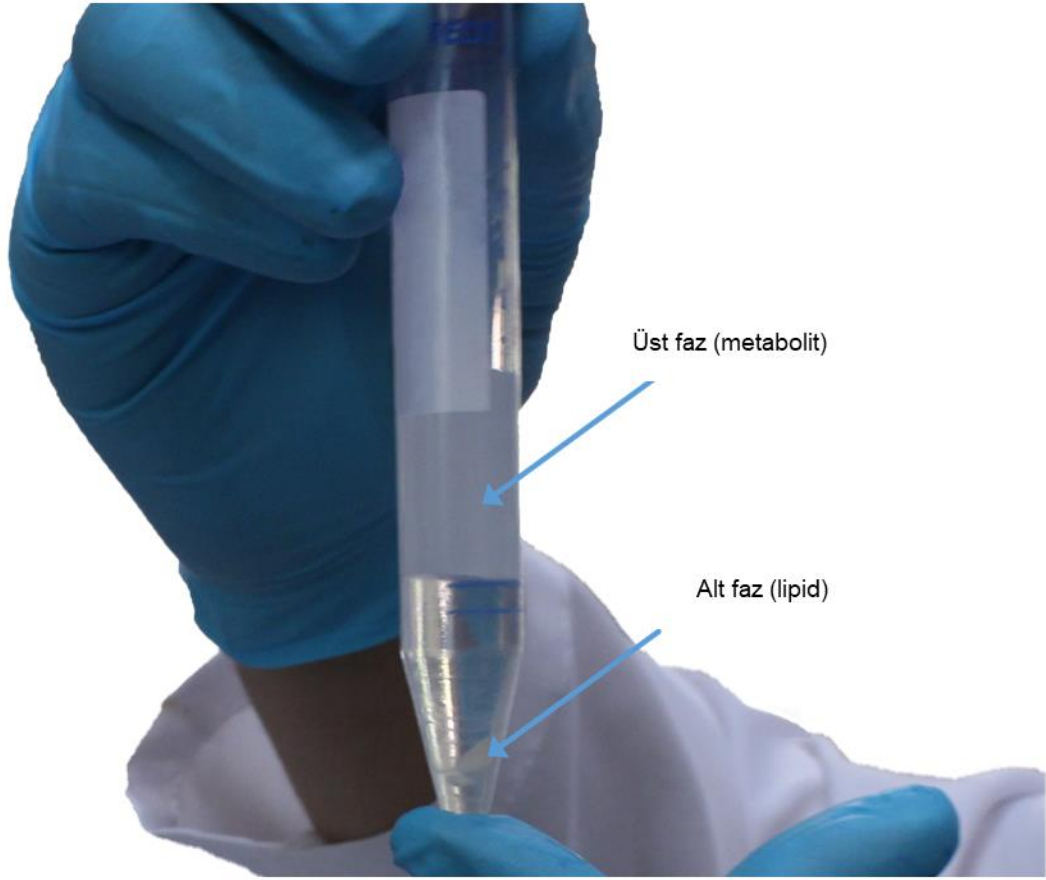
**Şekil 3.3** ELISA değerlendirmelerinde kullanılan mikroparka okuyucu.



### **3.9 Patella Altı Yağ Dokusu, Sinoviyum ve Cilt Altı Yağ Dokusunun Metabolomik Çalışmalarla İncelenmesi**

#### **3.9.1 Patella Altı Yağ Dokusu, Sinoviyum ve Cilt Altı Yağ Dokusunun İnceleme Öncesi Hazırlığı**

Patella altı yağ dokusu, sinoviyum ve cilt altı yağ dokusu örnekleri tartıldıktan sonra Eppendorf tüplere transfer edildi. Ardından 3 mL/g metanol ve 0,64 mL/g su ilave edildi. 1 dakika vortekste çalkalandıktan sonra -20°C'de 10 dakika bekletildi ve bu işlem üç defa tekrarlandı. 3 mL/g diklorometan ve 1,5 mL/g su ilave edildi. Oluşan heterojen karışım 1 dakika vortekste çalkalandıktan sonra -20°C'de 10 dakika bekletildi ve bu işlem üç defa tekrarlandı. Elde edilen son karışım 1 saat boyunca homojenizatörde tutulduktan sonra 4°C 15.000 rpm'de santrifüj edilip süpernatan elde edildi. Süpernatanın üst fazı metabolit fazı, alt fazı ise lipid fazı olarak kabul edildi (Şekil 3.4). Metabolit ve lipid fazlar, 9°C'de vakumlu santrifüj edildi ve nihai katı rezidüler Q-TOF LC/MS ile analiz edildi.



Şekil 3.4 Doku hazırlama protokolü sonunda elde edilen süpernatant.

### 3.9.2 Patella Altı Yağ Dokusu, Sinoviyum ve Cilt Altı Yağ Dokusundan Hazırlanan Örneklerin Q-TOF LC/MS ile Analizi

Kütle spektrometri analizleri Agilent 6530 Q-TOF LC/MS cihazı ile (Agilent Technologies, 184 Santa Clara, ABD) gerçekleştirildi. C18 kolon (Agilent Zorbax 1,8  $\mu$ M, 50x2,1 mm) kromatografi kolonu olarak kullanıldı. Mobil fazlar A hattında; %1, 1M amonyum asetat (NH<sub>4</sub>AC) tampon içerisinde %0,1 asetik ve B hattında; %70 asetonitril %30 izopropilalkol (ACN:IPA) %1, 1M amonyum asetat tampon içerisinde %0,1 asetik asit şeklindeydi. Gradyent elüsyonu A hattı ile 1. dakikaya kadar %45, 3. dakikada %25, 8. dakikada %11, 11. dakikada %0, daha sonra başlama koşulu 20. dakikada ve çalışmadan 5 dakika sonra olacak şekilde başlatıldı. LC/MS Q-TOF 0,20

mL/dk akış oranı, 65°C kolon sıcaklığı ve 10 µL enjeksiyon hacmi ile 100-1700 m/z tarama aralığında çalıştırıldı.

### **3.10 İnflamasyon, Kondrosit Yapım ve Yıkım Belirteçlerinin Metabolomik Çalışmalar ile Değerlendirilmesi**

Numuneler deney gününe kadar -80 °C'de saklandı. Her çalışma grubunda bulunan örneklerden 200 µL alınarak örnekler birleştirildi. Metabolit ekstraksiyonu işlemi için birleştirilen örneklerden 200 µL boş bir Eppendorf tüpe alındı, üzerine 600 µL metanol eklendi ve 90 saniye vortekslendi. Vorteks işleminden sonra numuneler 9000 rpm'de +4 °C'de 30 dakika santifrüj edildi ve sıvı faz (metabolit fazı) toplandı. Daha sonra metabolit fazı vakum santifrüj cihazında çözücüsünden uzaklaştırıldı. Daha sonra metabolit fazı, 200 µL 50:50 (h/h) su (Milli-Q): Asetonitril (ACN) ile yeniden çözüldü. Çözülen örnekler 1/1 oranında hareketli faz ile seyreltilerek kuyucuklara alındı. Ayrıca yöntemin tekrarlanabilirliğini ölçmek amacıyla tüm örneklerden oluşan bir kalite kontrol numunesi (QC) hazırlandı. Numune hazırlama basamağında kullanılan çözücü ve kimyasallar en az MS derece veya üstü saflıkta olacak şekilde Merck (Darmstadt, Almanya)'dan temin edildi. Deneyler Agilent 6530 Q-TOF LC/MS cihazında gerçekleştirildi. Hareketli faz olarak her ikisi de %0,1 formik asit içeren su ve asetonitril kullanıldı. Analizler C18 kromatografi kolonu ile gerçekleştirildi. Cihaz 100-1700 m/z tarama aralığında pozitif iyon modunda çalıştırıldı. Her örnek tekrarlı olarak karışık sırada enjeksiyon edildi. Metabolomik verilerin istatistiksel analizi için LC/MS cihazından alınan “.d” uzantılı ham data verileri “ProteoWizard” yazılımı kullanılarak “.mzXML” uzantılı dosya formatına çevrildi. Numuneler arasında pik eşleştirme ve karşılaştırma işlemleri için “R” istatistiksel programında “XCMS” metabolomik veri işleme yazılımı” kullanıldı. Elde edilen ham pikler analiz sırasındaki rastgele hatalardan kaynaklanan piklerin filtrelenmesi, piklerin örneklerdeki tüm piklerin ortalamasına göre ayrı ayrı normalize edilmesi ve gruplar arasında değişim gösteren piklerin tespit edilebilmesi için Student's T testi uygulaması ve değişim miktarları (fold change) hesaplamaları gerçekleştirildi. Değişim gösteren piklerde  $p < 0,05$  ve  $\text{fold change} > 1,5$  şartları arandı. Elde edilen pikler HMDB (Human metabolome database)'de tarandı. İlgili veri

bankasından tespit edilen metabolitler hakkında metabolomik yolak analizleri yapıldı. Metabolik yolak analizleri için online KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veri bankası kullanıldı. Deney grupları arasındaki metabolom değişimlerini göstermek için deney gruplarına ait pik şiddetleri kontrol gruplarına göre normalize edilerek kat değişimi olarak gösterildi.

### **3.10.1 XCMS ile Ham Kromatogram Verisinin İşlenmesi**

LC-MS cihazlarından alınan kromatogramlar ham verilerdir ve bunlar içerisindeki biyoinformatik verileri elde etmek amacıyla ham veri dosyaları ProteoWizard yazılımı (<http://proteowizard.sourceforge.net>) aracılığı ile. mzml formatına dönüştürülmüştür. Pik toplama, gruplama ve karşılaştırma bölümleri (metabolit profillemesi) XCMS (<https://xcmsonline.scripps.edu/>) yazılımı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. XCMS, bulguların en üst düzeyde toplanması, gruplandırılması ve karşılaştırılması için kullanılan “R yazılımı” tabanlı ücretsiz bir programdır ve optimizasyon için birçok parametreye sahiptir. Isotopologue Parameter Optimization (IPO), XCMS parametrelerini otomatik olarak optimize eden bir yazılımdır. Böylece, IPO yoluyla elde edilen optimize edilmiş parametreler, potansiyel metabolit piklerini bulmak için XCMS'ye tabi tutuldu.

### **3.11 İnflamasyon, Kondrosit Yapım ve Yıkım Belirteçlerinin Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Yöntemi ile Ön Değerlendirilmesi**

RNA izolasyonu için, süpernatant uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine denatürasyon solüsyonu (BI, ABD) eklendi. Eklenen denatürasyon solüsyonu ile hücreler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra aynı hacimde ekstraksiyon solüsyonu (BI, ABD) eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekletildikten sonra 12000 g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj yapıldı. Oluşan renksiz üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve izopropanol (Amresco, ABD) eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyon ile RNA çöktürme işlemi gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda 12000 g'de 8 dakika 4°C'de santrifüj yapıldı. Elde edilen RNA pelleti %75'lik etanol ile vortekslenerek yıkandı ve 7500 g'de 5 dakika 4°C'de santrifüj

yapıldı. Elde edilen sonuçların normalizasyonu için delta-delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) yöntemi kullanıldı.

### **3.12 Verilerin İstatistik Yöntemler ile Değerlendirilmesi**

İstatistiksel analizler Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versiyon 21 kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uyup uymadıkları görsel (histogram ve olasılık grafiği) ve analitik (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) metodlar ile değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistikler ortalama  $\pm$  standart sapma ve ortanca, minimum-maksimum değerler kullanılarak verildi. İki grup arasında parametrik dağılmayan sayısal değişkenlerin karşılaştırılmalarında Wilcoxon ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı. Parametrik dağılan değişkenler için ise Student's T testi kullanıldı. Analizler %95 güven aralığında gerçekleştirildi ve yapılan karşılaştırmalarda p değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

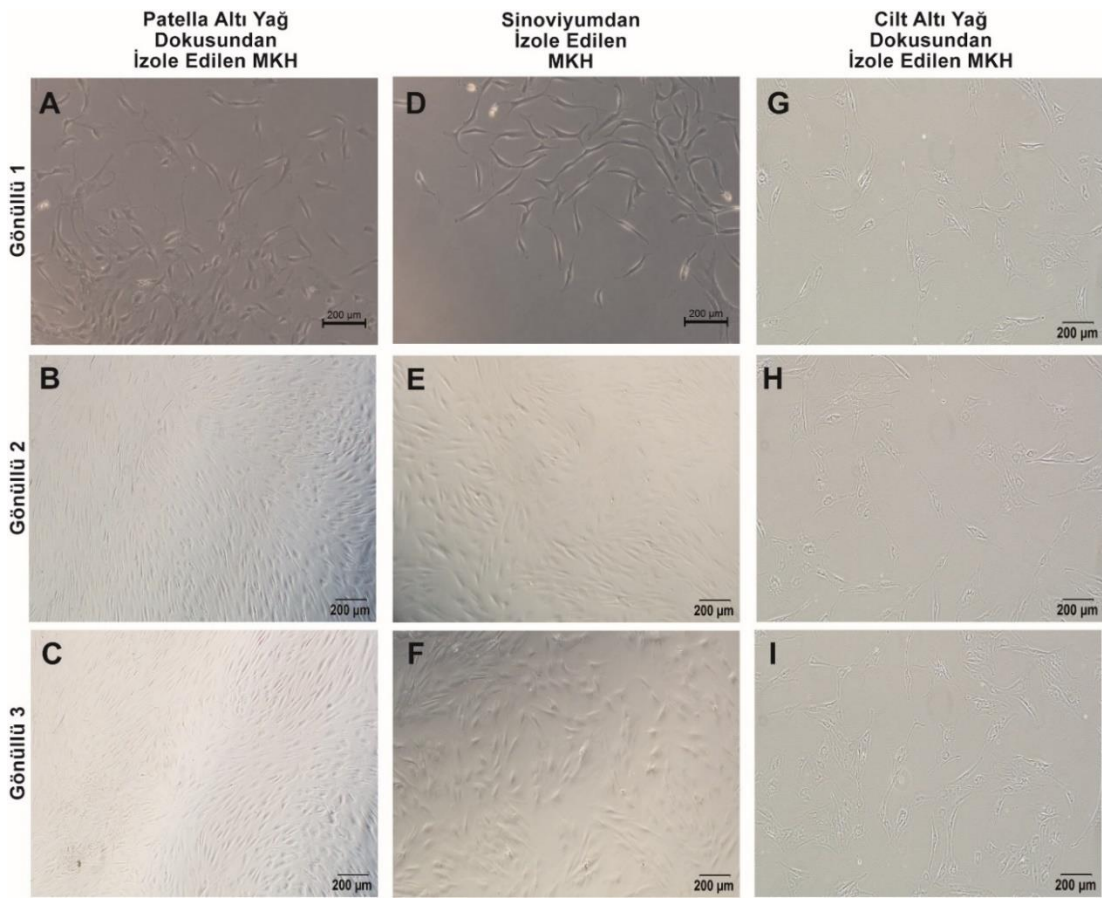
### 4.1 Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu

Çalışmaya dahil edilen üç katılımcıdan cerrahi operasyon sırasında sinoviyum, patella altı yağ dokusu ve cilt altı dokusu toplandı (Şekil 4.1). Toplanan dokulardan MKH izole edildi ve mikrogaflar ile gösterildi (Şekil 4.2). Katılımcılarda izole edilen aynı kaynaklı aynı MKH'lerin üretimine üçüncü pasajda birleştirilerek devam edildi ve karakterizasyon karışık popülasyonda gerçekleştirildi (Şekil 4.3). Elde edilen sinoviyum, patella altı yağ dokusu ve cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH'lerin morfolojik değerlendirmesinde, hücre kültürü plakalarına beklendiği gibi yapıştıkları ve karakteristik özellikleri olan iğsi morfolojiye sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 4.2).

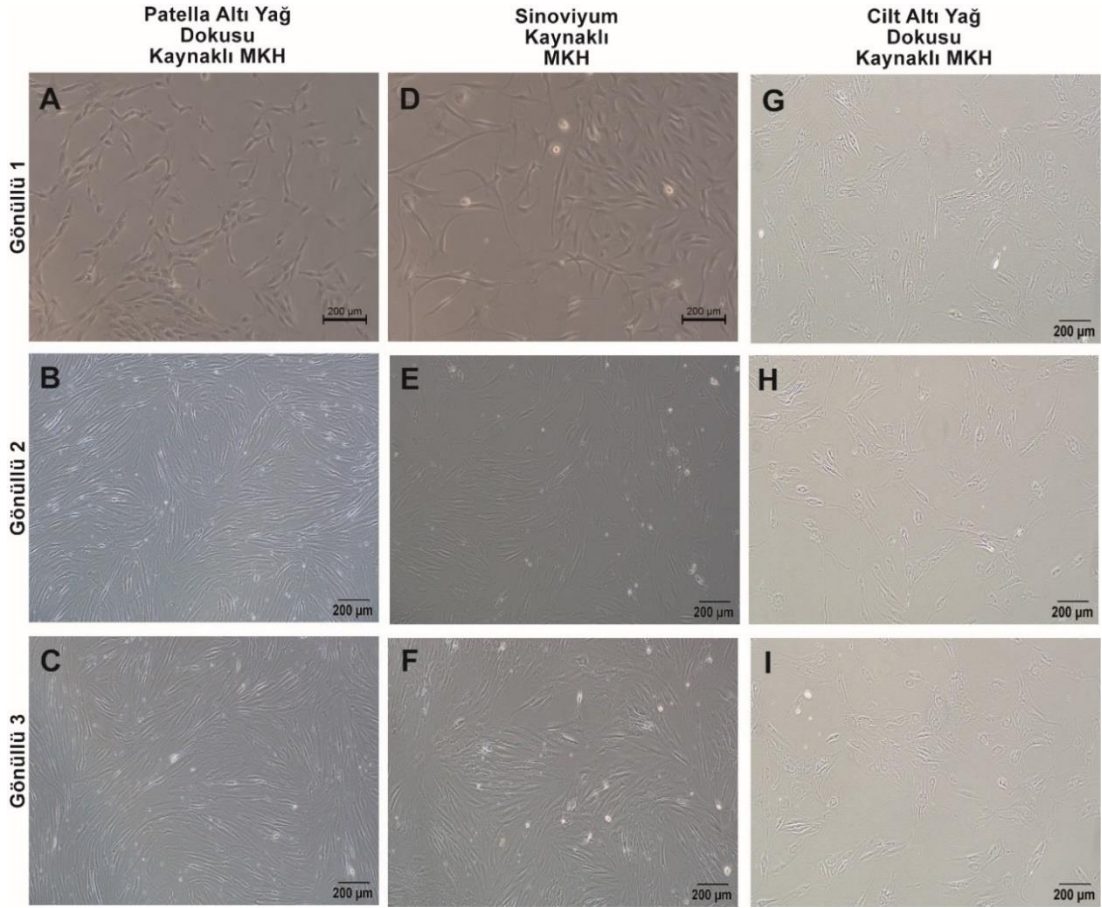


**Şekil 4.1** Gönüllülerden toplanan dokular. Soldan sağa sırasıyla; cilt altı yağ dokusu, patella altı yağ dokusu ve sinoviyum (*Görselde gönüllü bilgileri gizlenmiştir.*).

Multipotensi özelliklerinin değerlendirilmesinde, osteojenik farklılaştırma deneyleri kapsamında; osteojenik farklılaştırma besiyeri uygulanan MKH grubunun hücre içi ALP aktivitesi büyüme besiyeri uygulanan gruba göre anlamlı biçimde yüksekti (Tüm MKH grupları için  $p < 0,001$ , Şekil 4.4). Kondrojenik farklılaştırma deneyi kapsamında, 21 gün boyunca kondrojenik farklılaştırma besiyeri uygulanan MKH gruplarının sferoid oluşumu ve Masson's trikrom histokimyasal boyaması ile kolajen oluşumu her üç grup için gözlemlendi (Şekil 4.5).

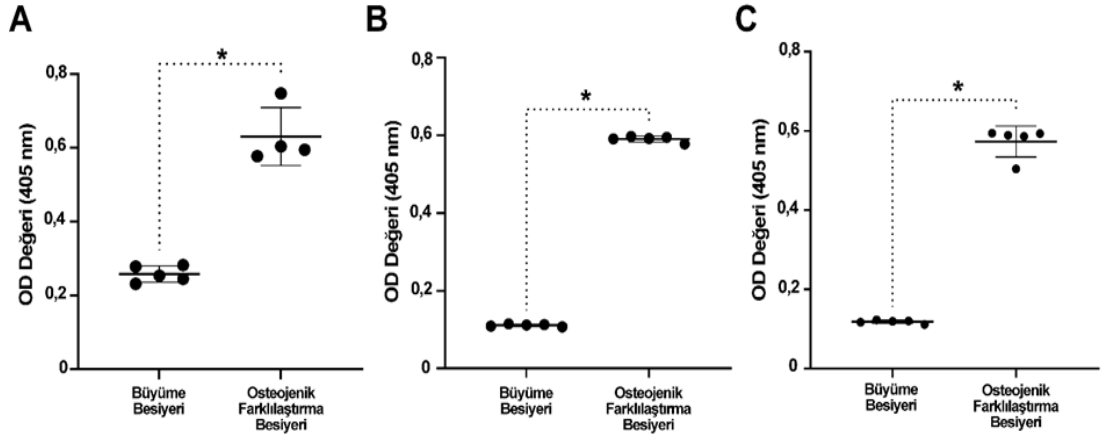


**Şekil 4.2** Gönüllülerden izole edilen pasaj sıfır MKH'ler. A- C. Patella altı yağ dokusundan izole edilen mezenkimal kök hücreler, D- F. Cilt altı yağ dokusundan izole edilen mezenkimal kök hücreler ve G- I. Sinoviyumdan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin mikrografları gösterilmektedir. Hepsisi için x100.



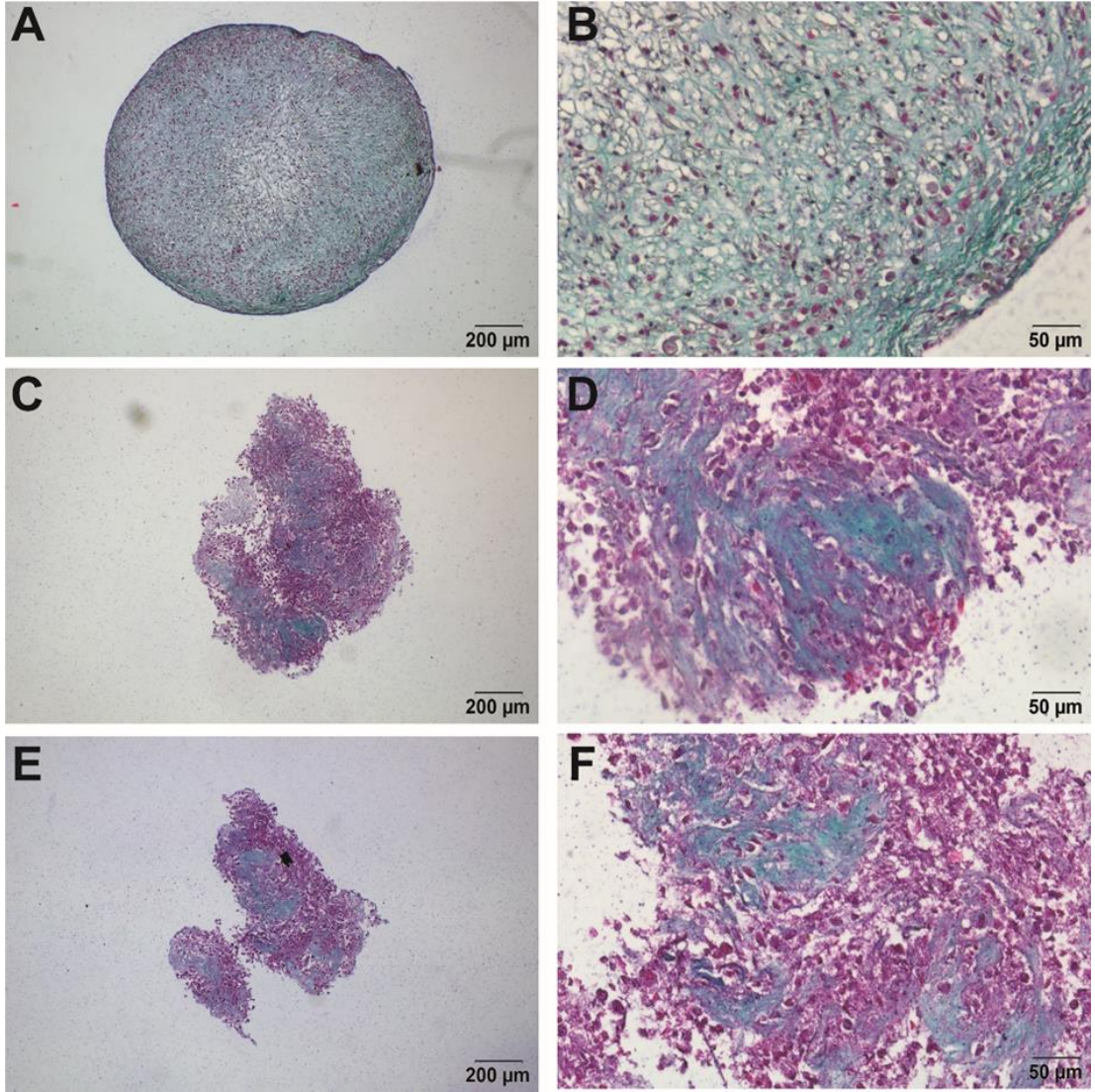
**Şekil 4.3** Gönüllülerden izole edilerek üretimi gerçekleştirilen pasaj iki MKH'ler. *A-C. Patella altı yağ dokusu, D-F. Subkutan yağ dokusu ve G-I. Sinoviyum kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin mikrografları gösterilmektedir. Hepsisi için x100.*



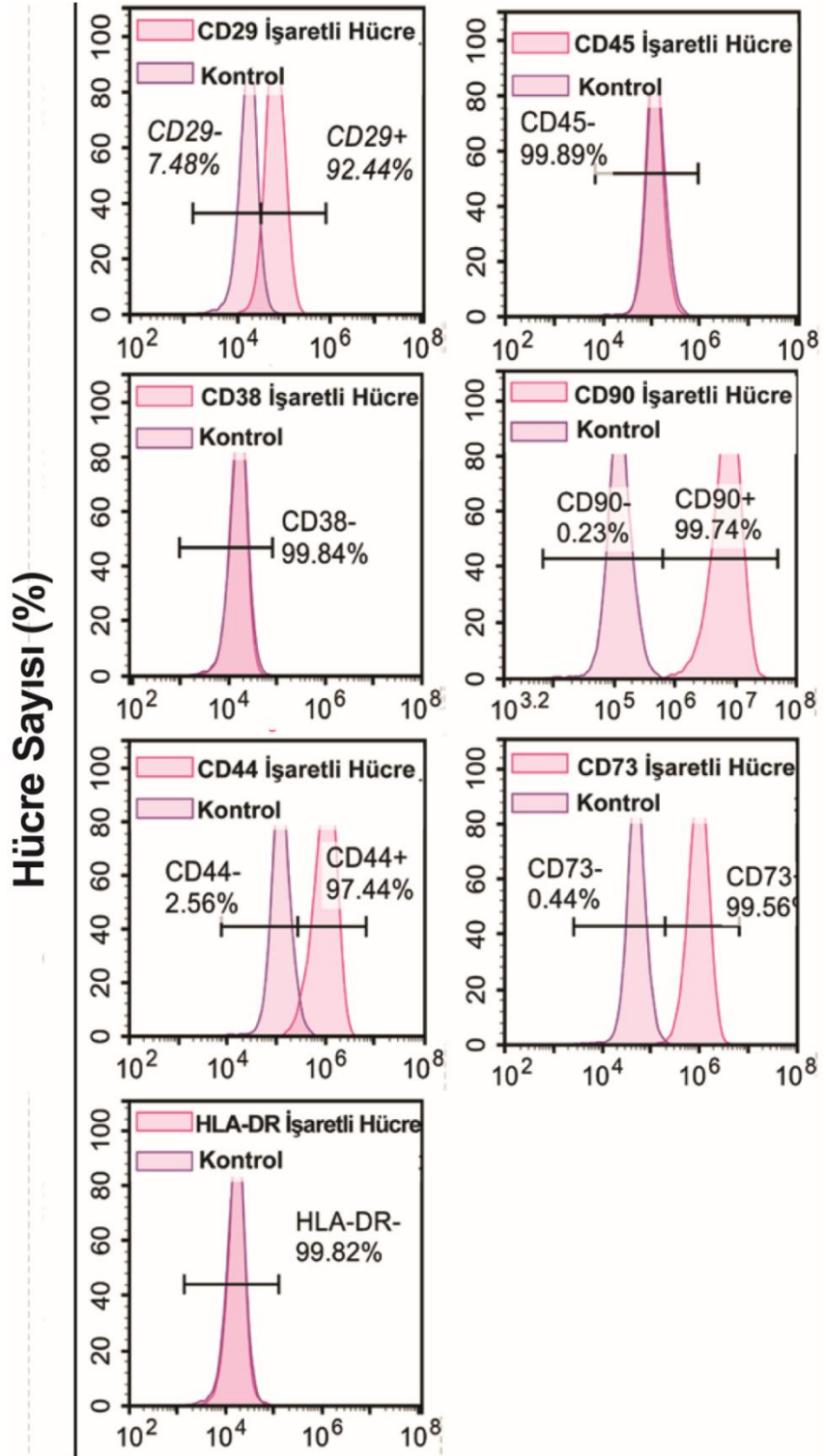


**Şekil 4.4** MKH'lerin ALP aktivitesini gösteren grafik. Patella altı yağ dokusu (A), sinoviyum (B) ve cilt altı yağ dokusu (C) kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin gösterilmektedir. \* p<0,001.

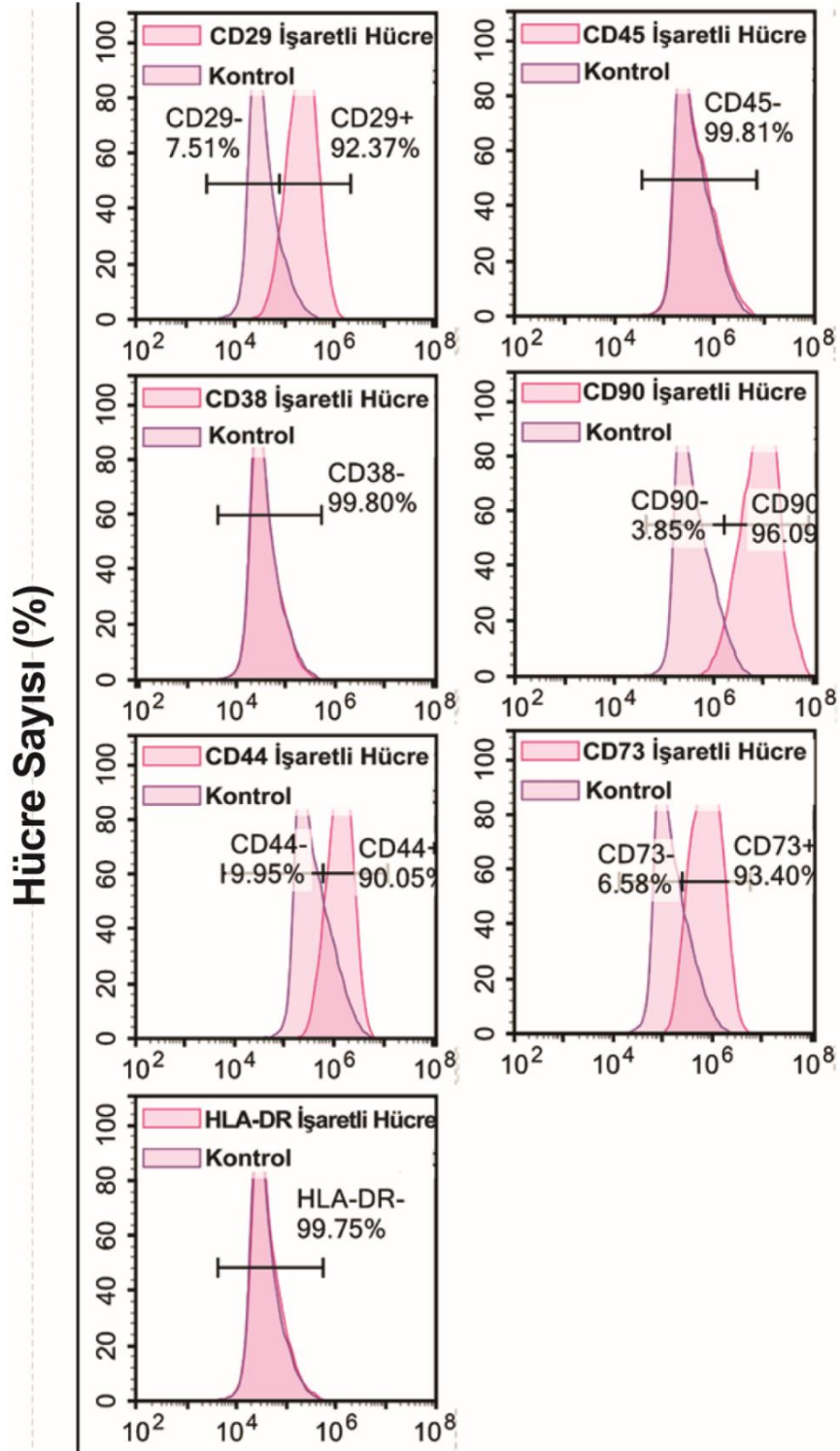
İmmünofenotipik değerlendirmede ise, tüm gruplarda pasaj dört MKH'lerin CD38, CD45, HLA-DR yüzey belirteçlerini çok düşük oranlarda ve CD29, CD44, CD73 ile CD90 yüzey belirteçlerini çok yüksek oranlarda ifade ettiği saptandı (Şekil 4.6, 4.7 ve 4.8).



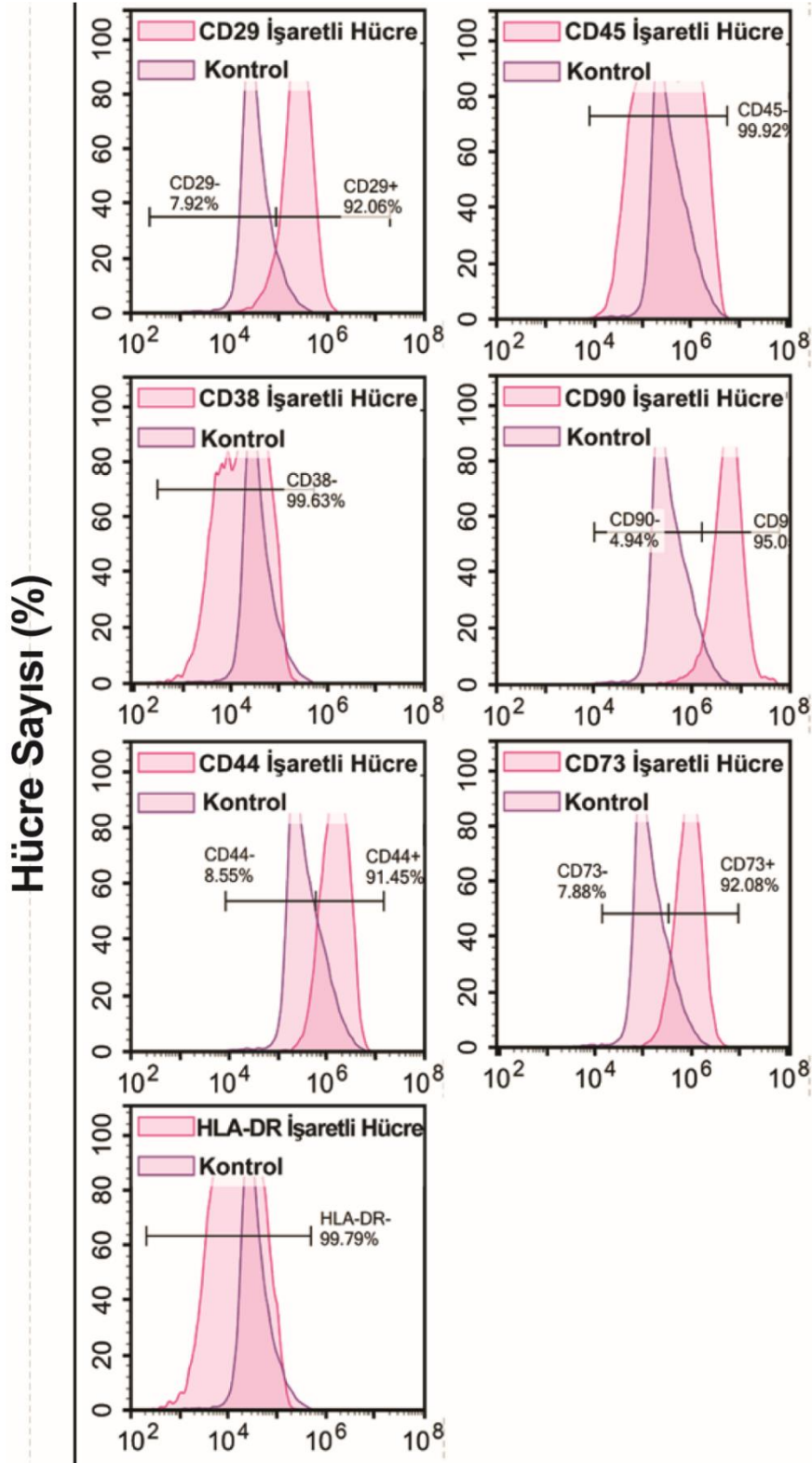
**Şekil 4.5** MKH'lerin kondrojenik farklılaşma kapasitesi için kolajen oluşumu (mavi- yeşil) gösterilmektedir. *Patella altı yağ dokusu (A, B), sinoviyum (C, D) ve cilt altı yağ dokusu (E, F) kaynaklı MKH'ler. x100 (A, C, E), x400 (B, D, F).*



**Şekil 4.6** Patella altı yağ dokusu kaynaklı MKH'lerin ifade ettikleri yüzey belirteçleri.



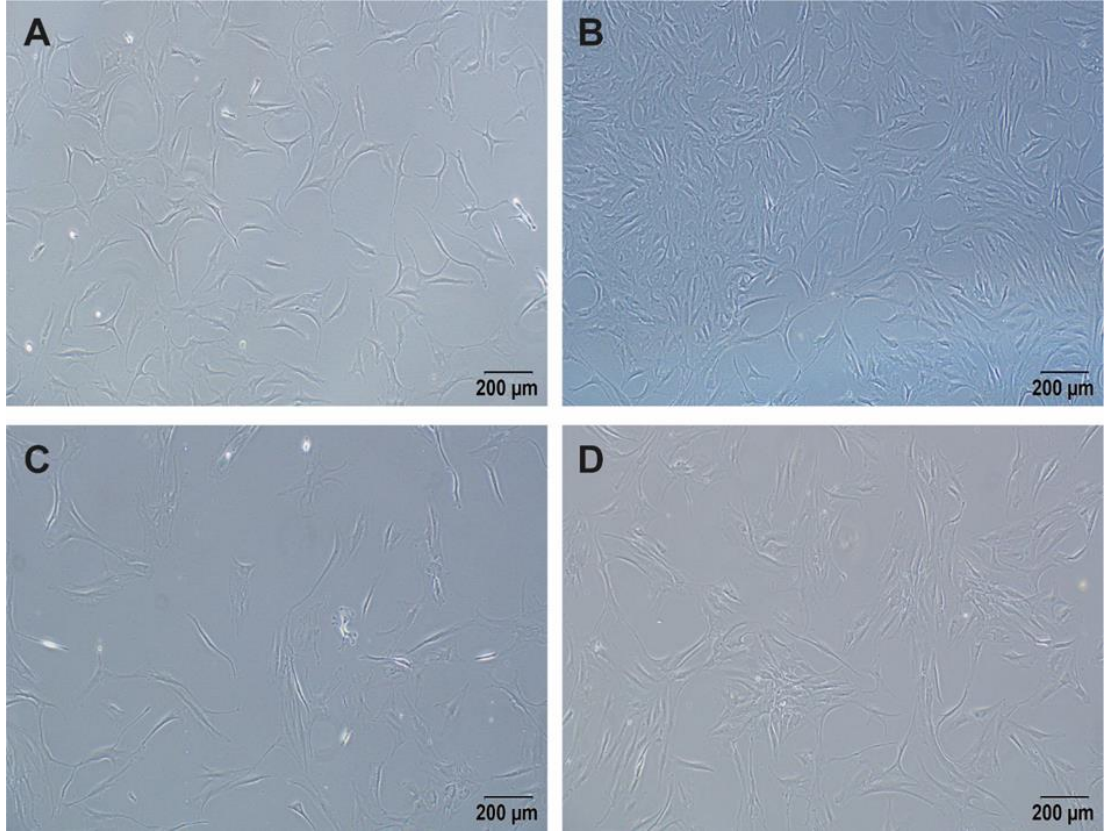
Şekil 4.7 Sinoviyum kaynaklı MKH'lerin ifade ettikleri yüzey belirteçleri.



**Şekil 4.8** Cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH'lerin ifade ettikleri yüzey belirteçleri.

## 4.2 İnsan Kaynaklı Ticari Osteoartritli ve Sağlıklı Kondrosit Üretimi

İnsan kaynaklı ticari sağlıklı ve osteoartritli kondrositlerin üretimi başarılı şekilde gerçekleştirildi. Hücrelerin morfolojik değerlendirilmesinde hücre kültür plakalarına adezyon gösterdikleri ve karakteristik morfoloji gösterdikleri gözlemlendi (Şekil 4.9).

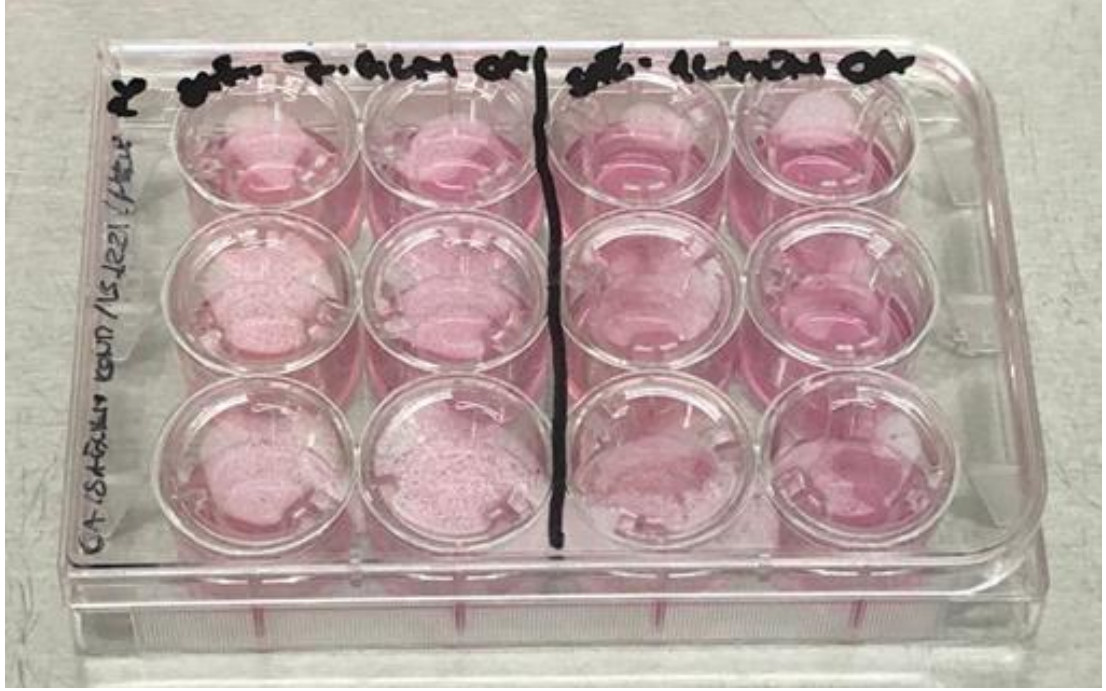


**Şekil 4.9** İnsan kaynaklı ticari kondrositler. A-B. Pasaj dört sağlıklı kondrositlerin mikrografları, C-D. Pasaj iki osteoartritli kondrositlerin mikrografları gösterilmiştir. Tamamı için x100.

## 4.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Sağlıklı ve Osteoartritli Kondrositler ile Birlikte Kültürü

İzolasyon ve üretimi gerçekleştirilen patella altı yağ dokusu, sinoviyum ve cilt altı yağ dokusu kaynaklı dördüncü pasaj MKH'lerin üretilen insan kaynaklı ticari

altıncı pasaj OA ve sağlıklı kondrositler ile birlikte kültürü 7 ve 14 gün süreyle Transwell sisteminde gerçekleştirildi (Şekil 4.10).



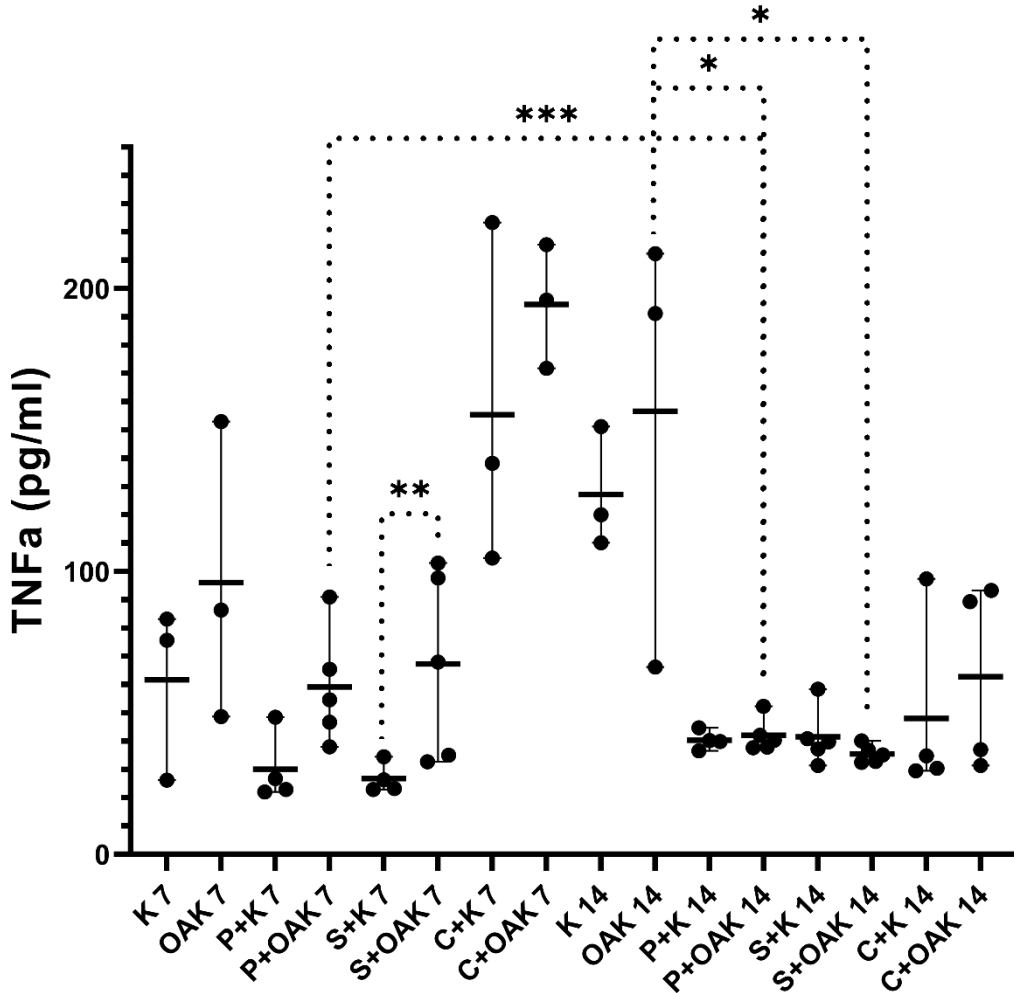
**Şekil 4.10** MKH'ler ile ticari insan kaynaklı OA'lı ve sağlıklı kondrositlerin birlikte kültürü gerçekleştirilen Transwell sistemi.

#### 4.4 İnflamasyon, Kondrosit Yapım ve Yıkım Belirteçlerinin Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Yöntemi ile Değerlendirilmesi

##### 4.4.1 TNF $\alpha$ düzeyi

7. ve 14. günlerde C+OAK grubunda (sırası ile  $194,5 \pm 86,4$  pg/ml ve  $62,8 \pm 33,1$  pg/ml) OAK grubuna (sırası ile  $96,1 \pm 52,8$  pg/ml ve  $156,6 \pm 79$  pg/ml) göre; C+K grubunda (sırası ile  $155,5 \pm 82,7$  pg/ml ve  $48,1 \pm 67,8$  pg/ml) K grubuna (sırası ile  $61,8 \pm 30,9$  pg/ml ve  $127,2 \pm 21,4$  pg/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte azalma gözlemlendi (Tablo 4.1). P+OAK ve S+OAK gruplarında (sırası ile  $42,13 \pm 6$  pg/ml ve  $35,5 \pm 3,1$  pg/ml) 14. günde OAK grubuna ( $156,6 \pm 79$  pg/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0,036$ ) bir azalma tespit edildi (Tablo 4.1, Şekil 4.11). Bu gruptaki azalma 7. günde de benzer yönde olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı değildi. 7. gün ve 14. gün arasında OAK grubunda (sırası ile  $96,1 \pm 52,8$  pg/ml ve  $156,6 \pm 79$  pg/ml) K grubuna (sırası ile  $61,8 \pm 30,9$  pg/ml ve

127,2 ± 21,4 pg/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan daha yüksek TNF $\alpha$  düzeyleri tespit edildi. 7. günde S+K grubunda (26,8 ± 5,4 pg/ml) TNF $\alpha$  düzeyi S+OAK grubuna (67,3 ± 33,3 pg/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşükken (p=0,032), 14. günde S+OAK grubunda (35,5 ± 3,1 pg/ml) S+K grubuna (41,6 ± 10,1 pg/ml) göre daha düşük TNF $\alpha$  konsantrasyonu tespit edildi. P+OAK grubunda 7. günde TNF $\alpha$  düzeyi (59,2 ± 20,5 pg/ml) iken 14. günde (42,1 ± 6 pg/ml) istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük ölçüldü (p=0,043).

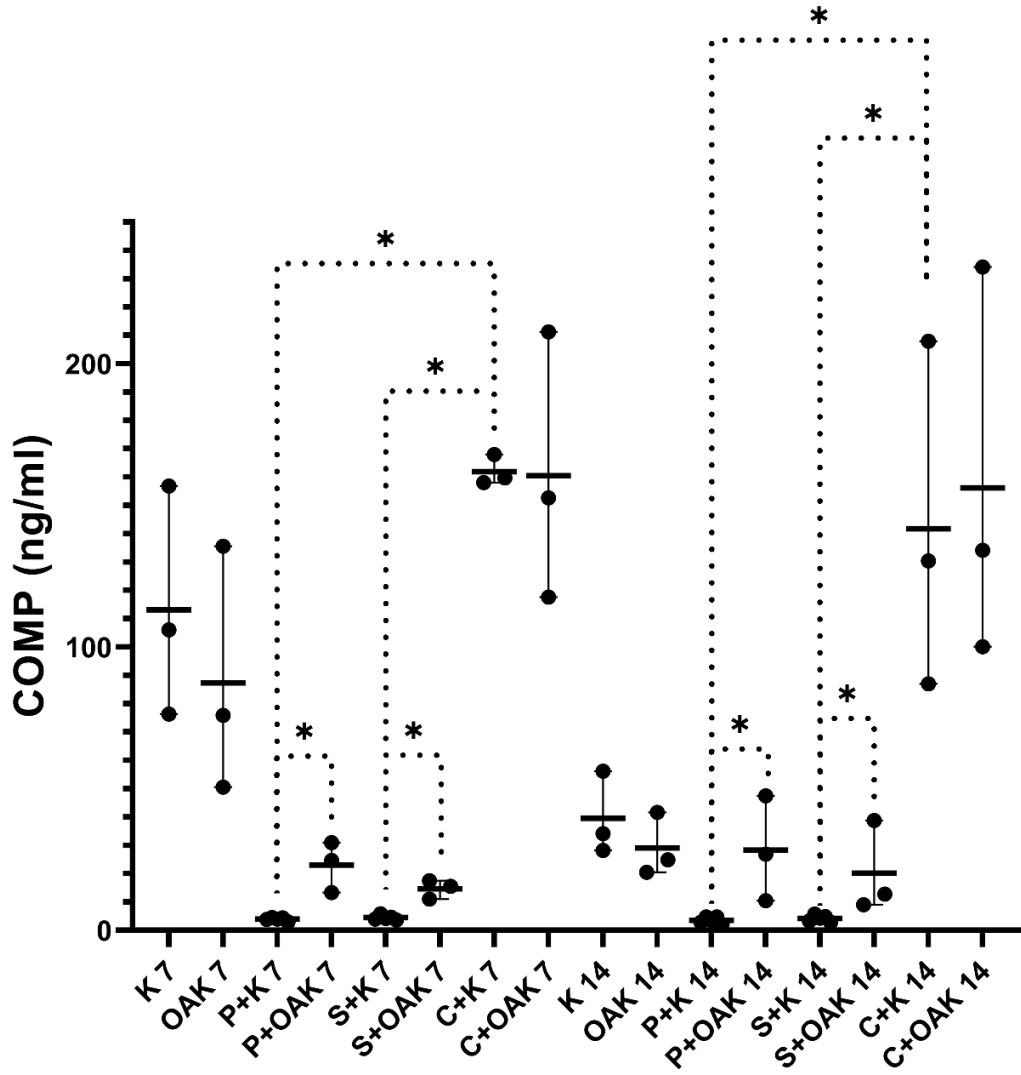


**Şekil 4.11** 7. ve 14. günlerdeki TNF $\alpha$  seviyeleri. K: Sağlıklı kondrosit, OAK: Osteoartritli kondrosit P: Patella altı yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre, S: Sinoviyum kaynaklı mezenkimal kök hücre, C: Cilt altı yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre. \* p=0,036, \*\* p=0,032, \*\*\* p=0,043



#### 4.4.2 COMP düzeyi

K ve OAK gruplarında günlere göre COMP seviyelerinde değimleri incelediğimizde hem 7 hem de 14. günde OAK gruplarında (sırası ile  $87,4 \pm 43,7$  ng/ml ve  $29,1 \pm 11,2$  ng/ml) K gruplarına (sırası ile  $113,1 \pm 40,7$  ng/ml ve  $39,6 \pm 14,8$  ng/ml) göre COMP konsantrasyonları daha düşüktü. OAK grubunda azalan COMP düzeyi MKH gruplarında tam tersi yönde değişiklik gösterdi. 7. ve 14. günde P+OAK grubunda (sırası ile  $23 \pm 8,9$  ng/ml ve  $28,3 \pm 18,5$  ng/ml) P+K grubuna (sırası ile  $4 \pm 0,6$  ng/ml ve  $3,6 \pm 1,2$  ng/ml) göre, S+OAK grubunda (sırası ile  $14,7 \pm 3,3$  ng/ml ve  $20,3 \pm 16,2$  ng/ml) S+K grubuna (sırası ile  $4,5 \pm 0,9$  ng/ml ve  $4,2 \pm 1,2$  ng/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek COMP değerleri gözlemlendi ( $p=0,036$ ). C+K ve C+OAK gruplarında diğer gruplara göre daha yüksek COMP seviyeleri tespit edildi. Her iki günde de C+K grubunda (sırası ile  $161,9 \pm 5,3$  ng/ml ve  $141,8 \pm 61,2$  ng/ml) COMP seviyesi P+K (sırası ile  $4 \pm 0,6$  ng/ml ve  $3,6 \pm 1,2$  ng/ml) ve S+K (sırası ile  $4,5 \pm 0,9$  ng/ml ve  $4,2 \pm 1,2$  ng/ml) gruplarından yüksekti ( $p=0,036$ ) (Tablo 4.1, Şekil 4.12).

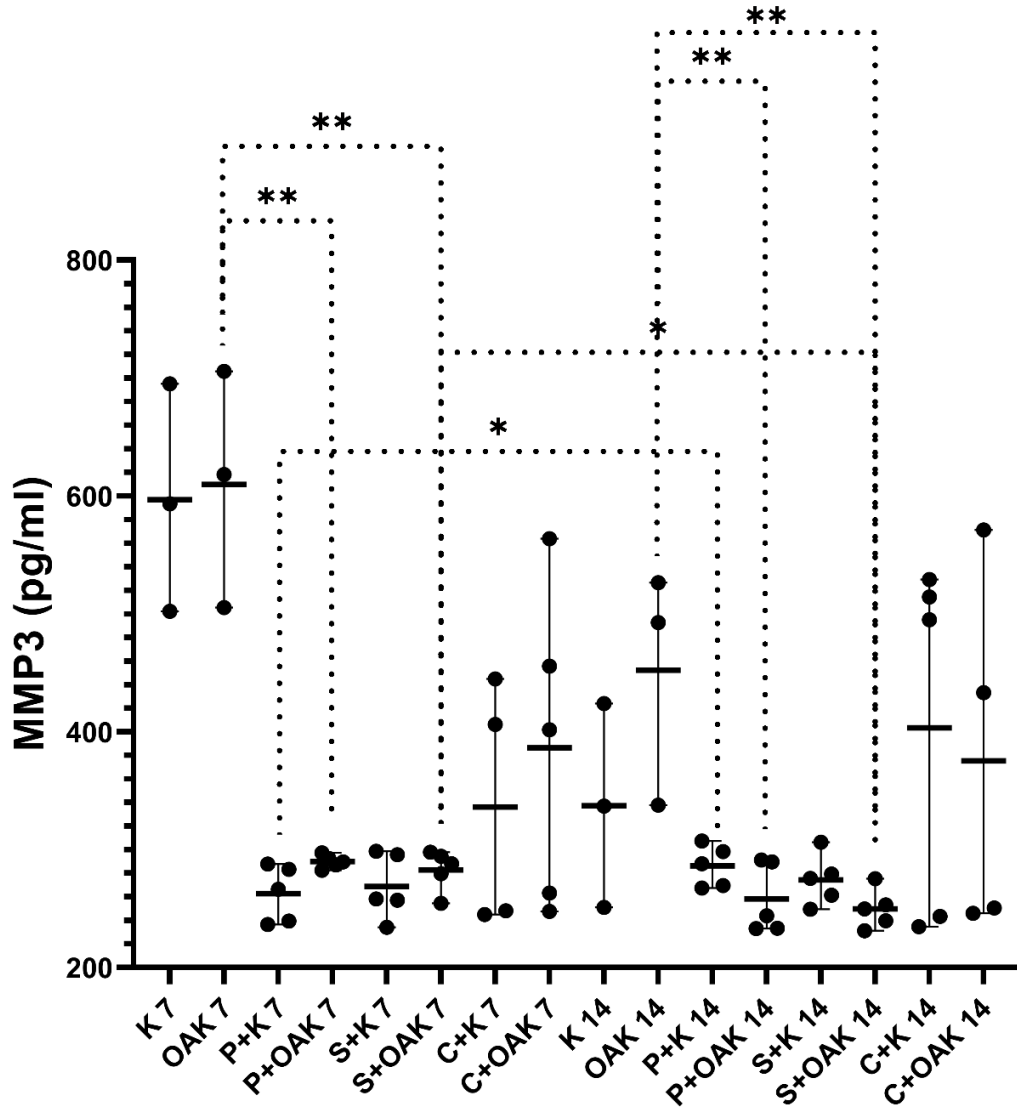


**Şekil 4.12** 7. ve 14. günlerde COMP seviyeleri. K: Sağlıklı kondrosit, OAK: Osteoartritli kondrosit P: Patella altı yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre, S: Sinoviyum kaynaklı mezenkimal kök hücre, C: Cilt altı yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre. \* p=0,036

### MMP3 düzeyi

P+K grubunda 14. günde ( $286,2 \pm 17,5$  ng/ml) 7. güne ( $262,8 \pm 24$  ng/ml) göre artış; S+OAK grubunda 14. günde ( $249,9 \pm 16,7$  ng/ml) 7. güne ( $282,9 \pm 17,3$  ng/ml) göre azalma gözlemlendi (p=0,043). Hem 7 hem de 14. günlerde MKH ile birlikte kültüre edilen OA'lı kondrosit gruplarının hepsinde OAK grubuna göre daha düşük değerler

tespit edildi, yalnızca C+OAK grubundaki bazı değerler OAK grubundan yüksek tespit edildi. Grupları ayrı ayrı incelediğimizde 7 ve 14. günlerde P+OAK grubu (sırası ile  $289,9 \pm 5,6$  ng/ml ve  $258,4 \pm 29,7$  ng/ml) ve S+OAK grubu (sırası ile  $282,9 \pm 17,3$  ng/ml ve  $249,9 \pm 16,7$  ng/ml) OAK grubundan (sırası ile  $607,8 \pm 100,5$  ng/ml ve  $452,3 \pm 100,6$  ng/ml) daha düşük MMP3 konsantrasyonlarına sahipti ( $p=0,036$ ) (Tablo 4.1, Şekil 4.13).



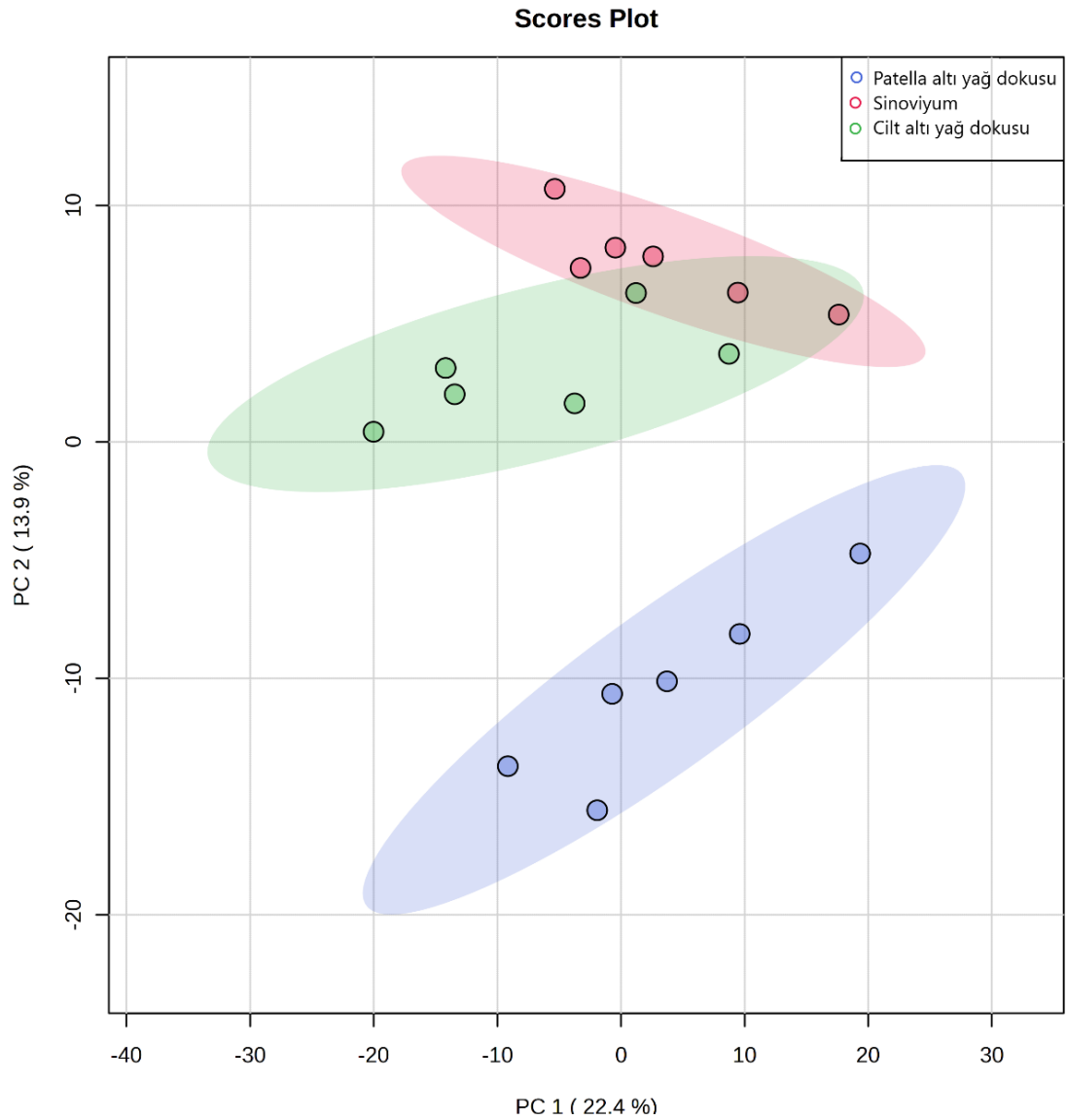
Şekil 4.13 7. ve 14. günlerde MMP3 seviyeleri. K: Sağlıklı kondrosit, OAK: Osteoartritli kondrosit P: Patella altı yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre, S: Sinoviyum kaynaklı mezenkimal kök hücre, C: Cilt altı yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre. \*  $p=0,043$ , \*\*  $p=0,036$

**Tablo 4.1 TNF $\alpha$ , COMP ve MMP3 konsantrasyonlarının tanımlayıcı istatistikleri**

Gruplar	Konsantrasyon Ortalama $\pm$ Standart Sapma Ortanca (minimum-maksimum)					
	7. Gün			14. Gün		
	<u>TNF<math>\alpha</math></u> ( <u>pg/ml</u> )	<u>COMP</u> ( <u>ng/ml</u> )	<u>MMP3</u> ( <u>pg/ml</u> )	<u>TNF<math>\alpha</math></u> ( <u>pg/ml</u> )	<u>COMP</u> ( <u>ng/ml</u> )	<u>MMP3</u> ( <u>pg/ml</u> )
<b>K</b>	67,3 $\pm$ 33,3	113,1 $\pm$ 40,7	596,9 $\pm$ 96,5	127,2 $\pm$ 21,4	39,5 $\pm$ 14,8	441,1 $\pm$ 219,1
	75,8 (26,3-83,2)	106,2 (76,4-156,8)	593,5 (502,2-695,1)	120,2 (110,2-151,3)	34,2 (28,3-56,2)	380,4 (251,2-752,2)
<b>OAK</b>	155,5 $\pm$ 82,7	87,4 $\pm$ 43,7	609,8 $\pm$ 100,5	156,6 $\pm$ 79	29,1 $\pm$ 11,2	452,3 $\pm$ 100,6
	86,4 (48,8-153)	76 (50,6-135,7)	618,2 (505,4-705,8)	191,2 (66,2-212,4)	24,9 (20,6-41,7)	492,7 (337,9-526,5)
<b>P+K</b>	30,1 $\pm$ 12,4	4,0 $\pm$ 0,6	262,8 $\pm$ 24	40,4 $\pm$ 3,3	3,6 $\pm$ 1,2	286,2 $\pm$ 17,5
	24,9 (22,1-48,5)	4 (3-4,5)	266,5 (236,7-288)	40,1 (36,6-44,8)	3,6 (2,1-4,8)	288,1 (267,6-307,4)
<b>P+OAK</b>	59,2 $\pm$ 20,5	23 $\pm$ 8,9	289,9 $\pm$ 5,6	42,1 $\pm$ 6	28,3 $\pm$ 18,5	258,4 $\pm$ 29,7
	54,7 (38-91,1)	24,8 (13,4-31)	289,9 (282,6-297,4)	40,4 (37,8-52,4)	26,9 (10,5-47,5)	244,1 (233,2-291,4)
<b>S+K</b>	26,8 $\pm$ 5,4	4,5 $\pm$ 0,9	268,8 $\pm$ 27,6	41,5 $\pm$ 10,1	4,2 $\pm$ 1,2	274,5 $\pm$ 21,4
	24,9 (23-34,6)	4,3 (3,7-5,9)	258,2 (234,3-298,7)	39,8 (31,4-58,4)	4,4 (2,9-5,8)	275,8 (249,5-306,3)
<b>S+OAK</b>	67,3 $\pm$ 33,3	14,7 $\pm$ 3,3	282,9 $\pm$ 17,3	35,5 $\pm$ 3,1	20,3 $\pm$ 16,2	249,9 $\pm$ 16,7
	68 (35-97,8)	15,5 (11,1-17,6)	288,2 (254,6-297,8)	35,1 (32,5-40,1)	12,8 (9-38,9)	249,8 (231,4-275,6)
<b>C+K</b>	155,5 $\pm$ 82,7	161,9 $\pm$ 5,3	400,7 $\pm$ 170,4	48,1 $\pm$ 67,8	141,8 $\pm$ 61,2	403,5 $\pm$ 150,4
	104,8 (30,3-138,3)	159,8 (158,1-168)	406,4 (245,1-658,8)	34,9 (30,5-97,4)	130,4 (87,1-208)	495,2 (234,8-529,1)
<b>C+OAK</b>	194,5 $\pm$ 86,4	160,6 $\pm$ 47,3	386,5 $\pm$ 133,2	62,8 $\pm$ 33,1	156,2 $\pm$ 69,6	375,3 $\pm$ 157
	171,9 (39,8-196)	152,8 (117,7-211,3)	401,8 (247,8-564)	89,4 (37,1-93,3)	134,2 (100,2-234,2)	341,9 (246,2-571,2)

#### 4.5 Patella Altı Yağ Dokusu, Sinoviyum ve Cilt Altı Yağ Dokusunun Metabolomik Yöntemler ile İncelenmesi

Gönüllülerden toplanan patella altı yağ dokusu, sinoviyum ve cilt altı yağ dokusu örneklerinin MKH izolasyonu öncesinde doku metabolomik profilleri incelendi ve sinoviyum ile cilt altı yağ dokusu arasında benzeşen metabolitler olsa dahi her üç dokunun da metabolit dağılımlarının birbirlerinden farklı olduğu gözlemlendi. (Şekil 4.14).

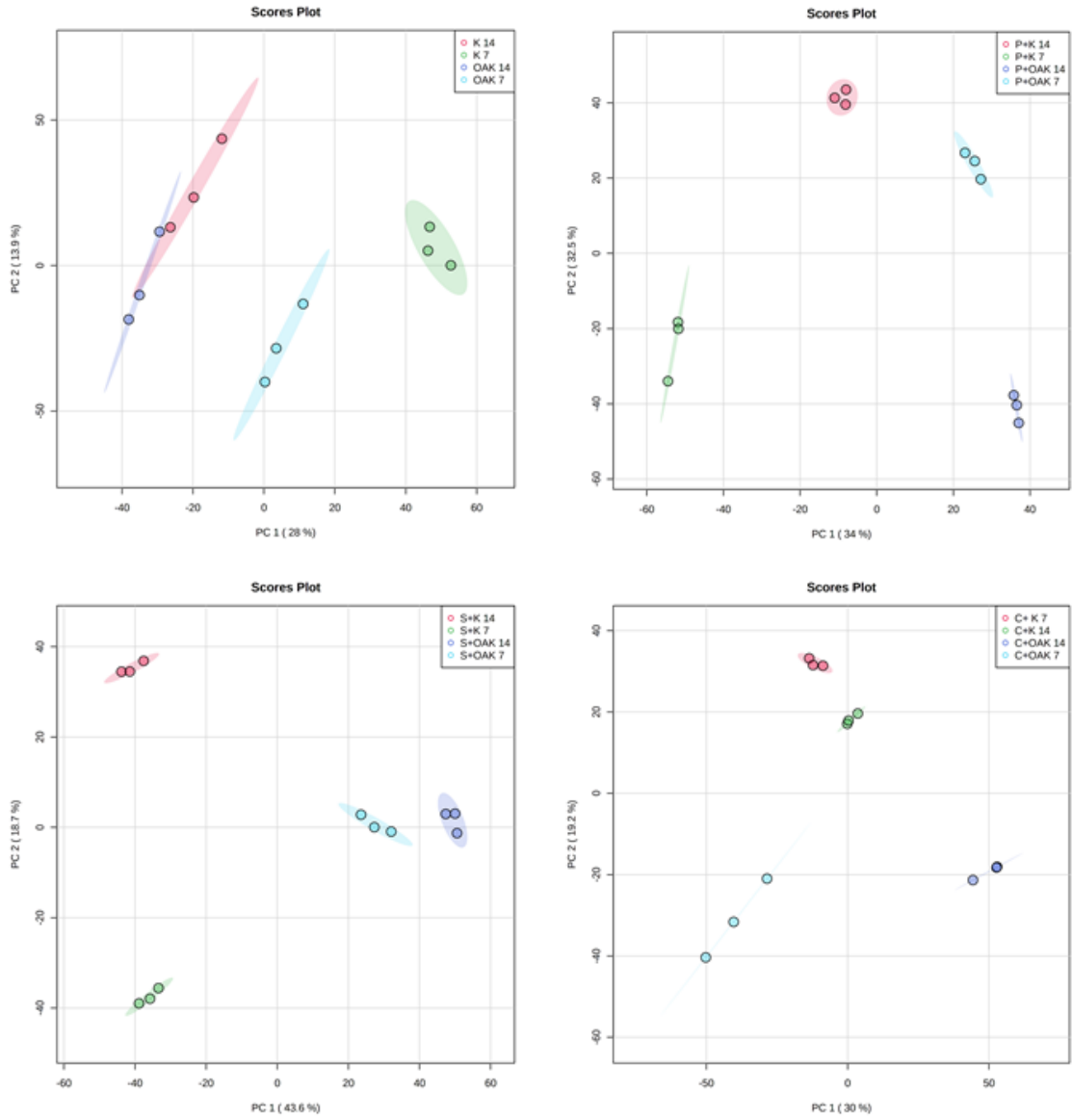


**Şekil 4.14** Toplanan dokulara ait PCA grafikleri.

#### **4.6 İnflamasyon, Kondrosit Yapım ve Yıkım Belirteçlerinin Metabolomik Yöntemler ile Değerlendirilmesi**

PCA analizlerinden elde edilen görsel grafikler incelendiğinde her üç deney grubunda da 7. ve 14. günler arasında metabolom dağılımları farklıydı. Hem gruplar arasında hem de aynı grup içerisinde iki farklı günde süpernatanda bulunan metabolitler arasında fark tespit edildi (Şekil 4.15).

MKH'ler ile kondrositlerin ko-kültür süpernatantlarında yapılan metabolomik değerlendirmede ilk olarak 3913 pik tanımlandı. Bunlardan 994 tanesi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ( $p < 0,05$ ) diğer piklerden farklıydı. Fark gösteren pikler arasından sağlıklı ve OA'lı kondrositlerde 1,5 kattan daha fazla değişim gösteren 187 pik tespit edildi. Tespit edilen 187 pik 51 adet metabolit ile eşleşti. Deney gruplarında ortak olarak bulunan 21 metabolit vardı ve yapılan analitik ve klinik değerlendirmelerden sonra yedi metabolit anlamlı kabul edildi (Tablo 4.2).



**Şekil 4.15** MKH gruplarına ait PCA analizi grafikleri. K: Sağlıklı kondrosit, OAK: Osteoartritli kondrosit P: Patella altı yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre, S: Sinoviyum kaynaklı mezenkimal kök hücre, C: Cilt altı yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre.

**Tablo 4.2 Düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı değişen metabolitler**

<b>Metabolit ismi</b>	<b>Metabolit Kütlesi</b>	<b>HMDB Kodu</b>	<b>KEGG Kodu</b>
L-Fukoz	147,0657702	HMDB0000174	C01019
Alfa-Tokotrienol	224,165375	HMDB0006327	C14153
Koproporfirin	328,1429424	HMDB0000643	C05769
Nikotinamid	393,0224517	HMDB0000229	C00455
Bilirubin	469,1707788	HMDB0003325	C05787
Taurodeoksikolik asit	472,3106687	HMDB0000896	C05463
Galaktosfingozin	500,296839	HMDB0000648	C01747

L-Fukoz pik şiddetindeki kontrollere göre olan değişim, tüm grupların 7. ve 14. günleri karşılaştırıldığında 7. gün gruplarına göre 14. gün gruplarında artış gösterdi. 7. günde P+OAK ve S+OAK gruplarında L-Fukoz kontrole göre düşük gözlenirken, C+OAK grubunda hem 7 hem de 14. günde kontrole göre yüksek gözlemlendi. 14. günde en fazla artış C+OAK grubunda görüldü (Şekil 4.16).

Alfa-Tokotrienol MKH'ler ile birlikte kültüre edilen sağlıklı kondrosit gruplarında artış gösterirken, bunun aksine P+OAK, S+OAK ve C+OAK gruplarında 14. günde azalma yönündeydi. 7. günde P+OAK grubunda belirgin, S+OAK ve C+OAK gruplarında minimal artış gözlemlendi (Şekil 4.17).

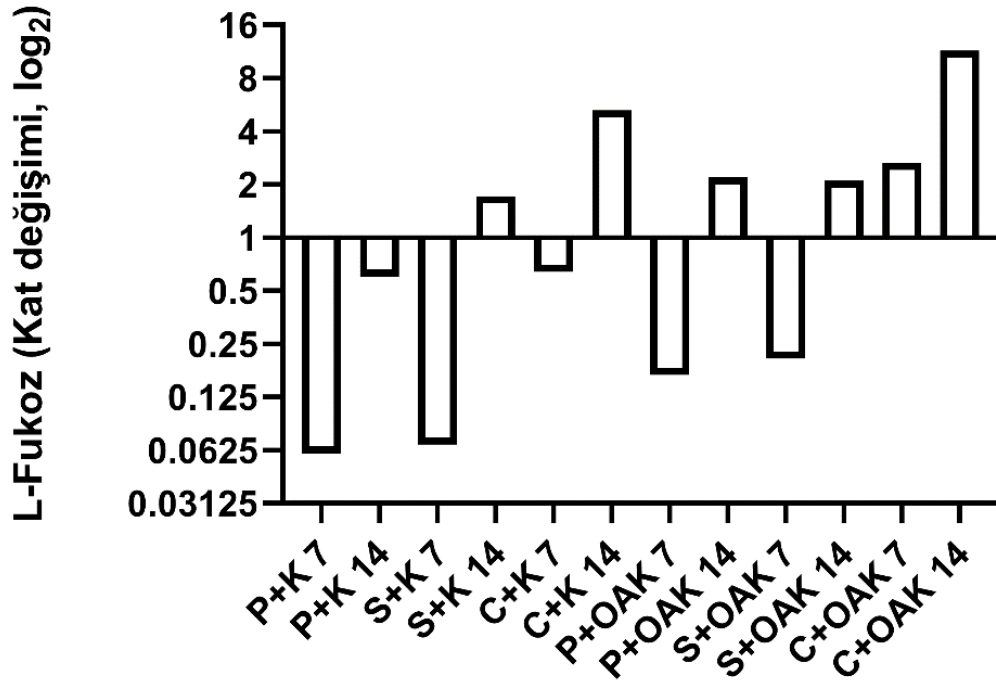
Koproporfrin düzeylerinde P+OAK ve S+OAK gruplarında her iki günde de düşüş gözlenirken yalnızca C+OAK grubunda artış gözlemlendi. Benzer şekilde P+K, S+K ve C+K gruplarında da artış vardı. OA'lı gruplar arasında artış yalnızca C+OAK grubunda izlendi. Genel olarak P+K hariç tüm gruplarda 7. günden 14. güne gidildiğinde azalma vardı (Şekil 4.18).



Nikotinamid düzeyindeki değişim tüm deney grupları için 7. günden 14. güne artış şeklindeydi. P+OAK, S+OAK ve C+OAK gruplarının üçünde de kontrole göre artış gözlemlendi (Şekil 4.19).

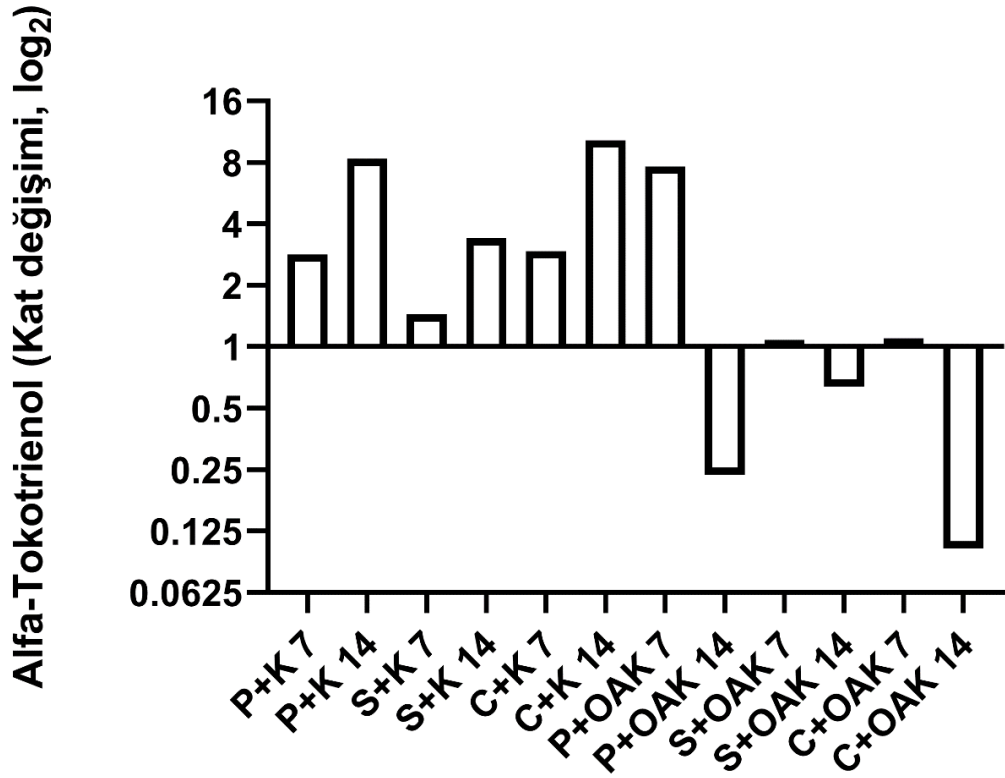
Bilirubin düzeylerinde C+OAK grubunda her iki günde artış gösterirken, P+OAK ve S+OAK gruplarında azalış vardı. Benzer değişim sağlıklı kondrosit gruplarında da gözlemlendi (Şekil 4.20).

Taurodeoksikolik asit düzeyindeki değişim MKH'lerin birlikte kültüre edildiği sağlıklı ve OA'lı kondrosit gruplarında karşılaştırıldığında tüm OA'lı kondrosit gruplarında arttığı gözlemlendi. 7 ve 14. günler arasında P+OAK ve S+OAK gruplarında 14. günde 7. güne göre artış izlenirken bu durum C+OAK için tam tersiydi (Şekil 4.21).

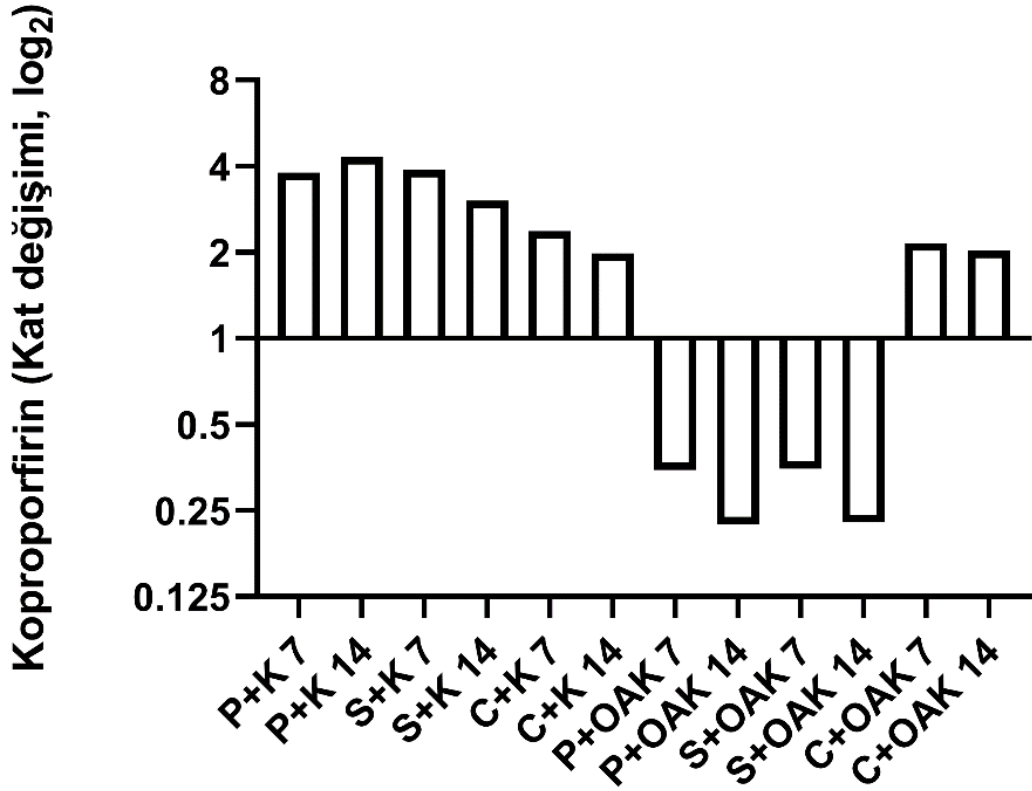


**Şekil 4.16** L-Fukoz metabolitine ait pik şiddetlerinde kontrol gruplarına göre kat değişimleri. *P*: Patella altı yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre, *S*: Sinoviyum kaynaklı mezenkimal kök hücre, *C*: Cilt altı yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre, *K*: Sağlıklı kondrosit, *OAK*: Osteoartritli kondrosit.

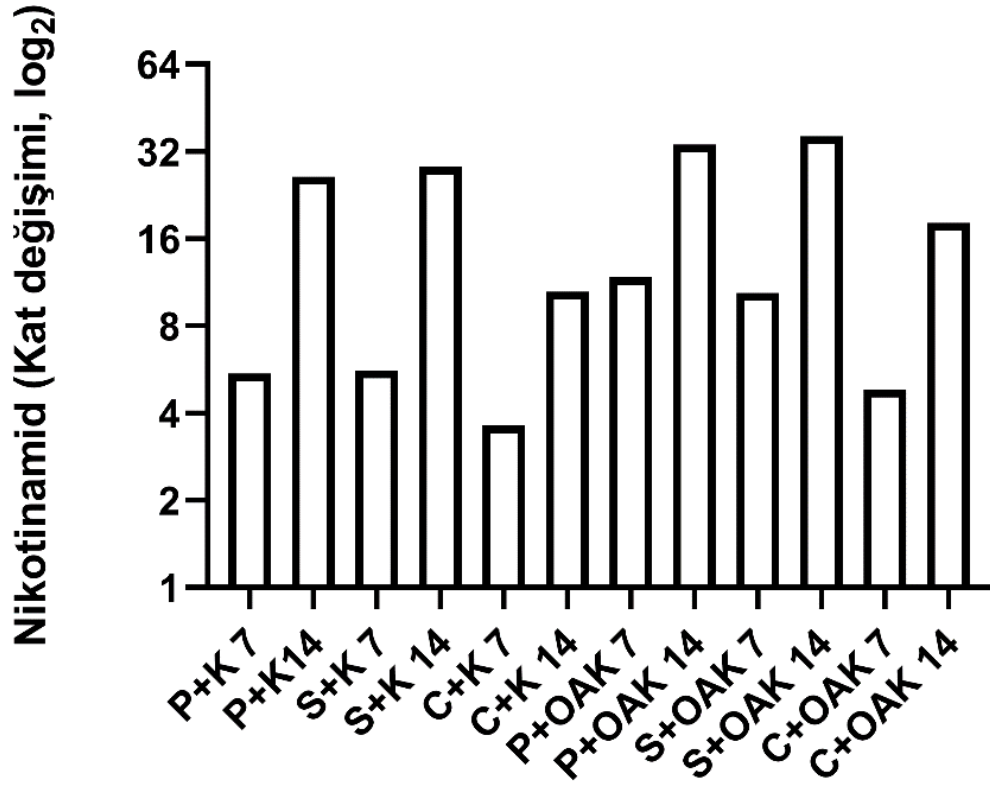
Galaktosfingozin P+OAK, S+OAK ve C+OAK gruplarının üçünde de 7. günde azalmışken 14. günde 7. güne göre artış gözlenmiş ve P+OAK ve S+OAK gruplarında 14. günde kontrole göre artmış düzeyler tespit edilmiştir (Şekil 4.22).



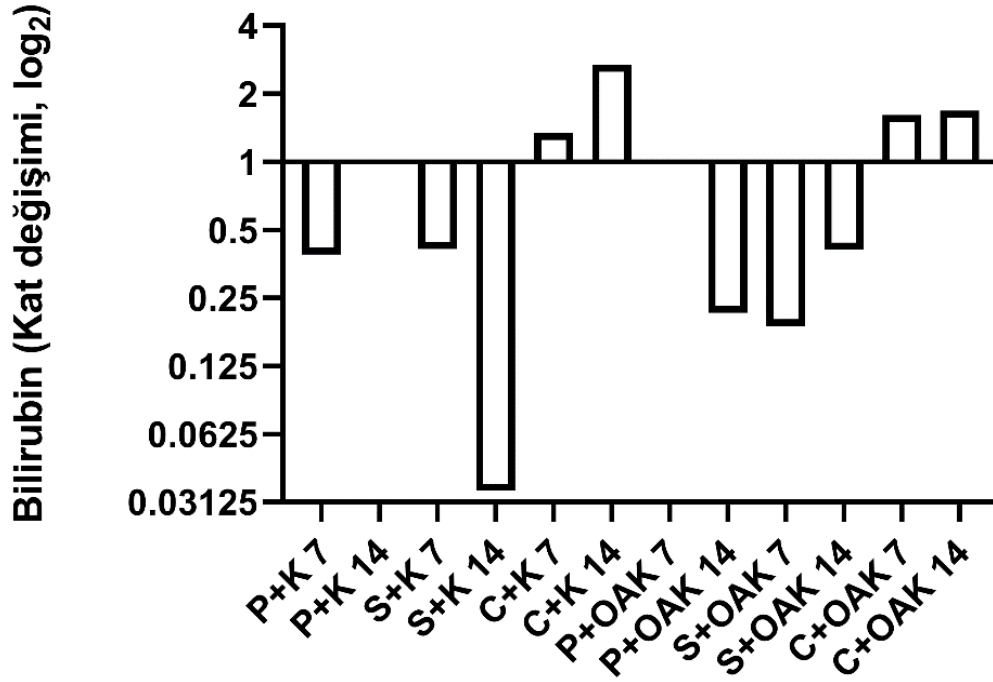
**Şekil 4.17** Alfa-Tokotrienol metabolitine ait pik şiddetlerinde kontrol gruplarına göre kat değişimleri. *P*: Patella altı yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre, *S*: Sinoviyum kaynaklı mezenkimal kök hücre, *C*: Cilt altı yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre, *K*: Sağlıklı kondrosit, *OAK*: Osteoartritli kondrosit.



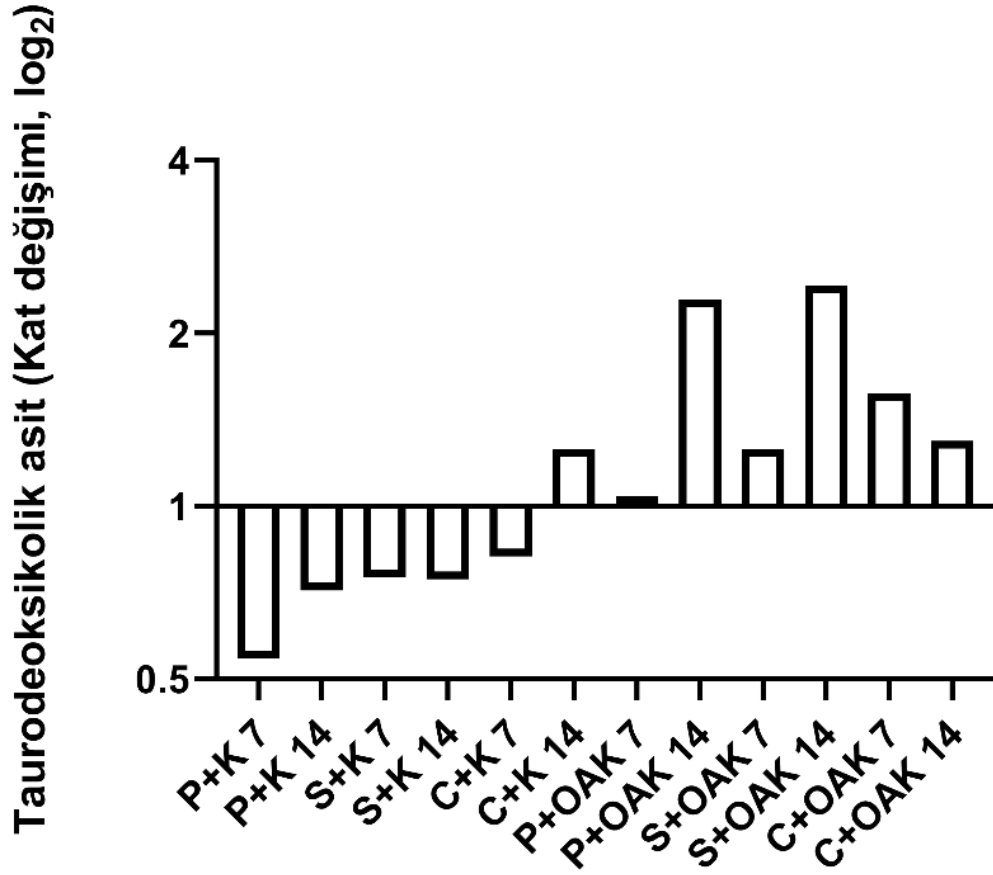
**şekil 4.18** Koproporfirin metabolitine ait pik şiddetlerinde kontrol gruplarına göre kat değişimleri. P: Patella altı yağ dokusu kaynaklı MKH, S: Sinoviyum kaynaklı MKH, C: Cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH, K: Sağlıklı kondrosit, OAK: Osteoartritli kondrosit.



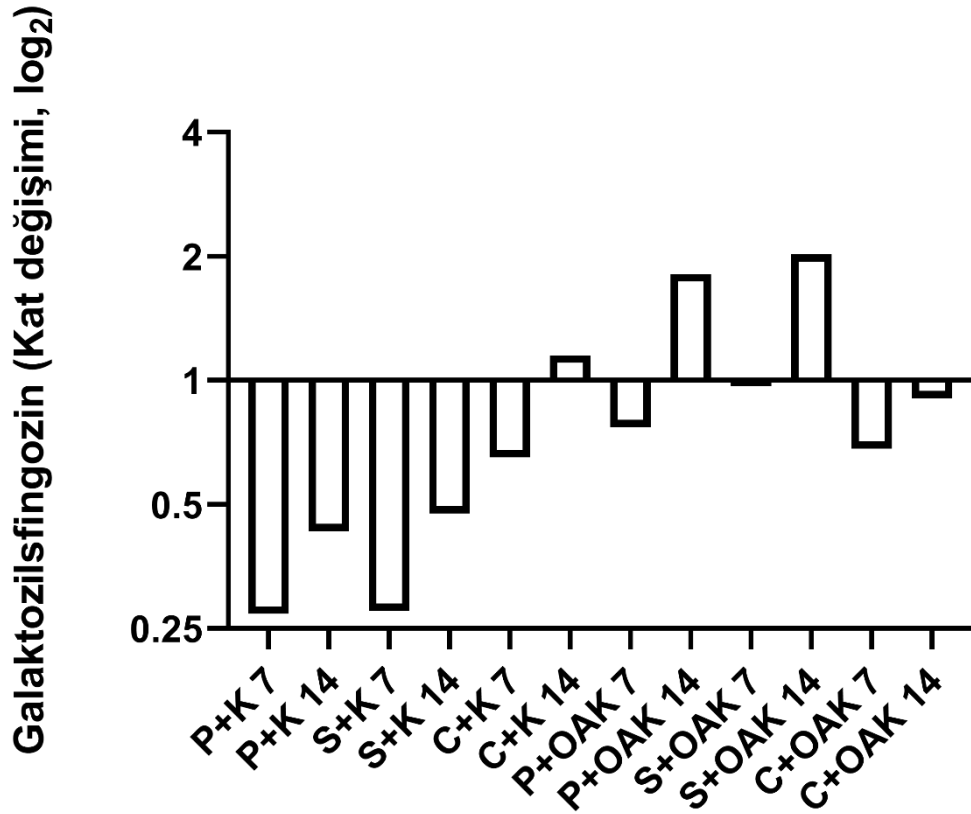
**şekil 4.19** Nikotinamid metabolitine ait pik şiddetlerinde kontrol gruplarına göre kat değişimleri. P: Patella altı yağ dokusu kaynaklı MKH, S: Sinoviyum kaynaklı MKH, C: Cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH, K: Sağlıklı kondrosit, OAK: Osteoartritli kondrosit.



**Şekil 4.20** Bilirubin metabolitine ait pik şiddetlerinde kontrol gruplarına göre kat değışimleri. *P*: Patella altı yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre, *S*: Sinoviyum kaynaklı mezenkimal kök hücre, *C*: Cilt altı yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre, *K*: Sağlıklı kondrosit, *OAK*: Osteoartritli kondrosit.



**şekil 4.21** Taurodeoksikolik asit metabolitine ait pik şiddetlerinde kontrol gruplarına göre kat değişimleri. *P*: Patella altı yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre, *S*: Sinoviyum kaynaklı mezenkimal kök hücre, *C*: Cilt altı yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre, *K*: Sağlıklı kondrosit, *OAK*: Osteoartritli kondrosit.



**Şekil 4.22** Galaktosilfingozin metabolitine ait pik şiddetlerinde kontrol gruplarına göre kat değişimleri. P: Patella altı yağ dokusu kaynaklı MKH, S: Sinoviyum kaynaklı MKH, C: Cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH, K: Sağlıklı kondrosit, OAK: Osteoartritli kondrosit.

#### 4.7 İnflamasyon, Kondrosit Yapım ve Yıkım Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Yöntemi ile Ön Değerlendirilmesi

P+OAK ve S+OAK gruplarında 7. günde kontrol OAK grubuna göre COL2A1 gen ekspresyonu artmışken (sırası ile 5,1 ve 1,7 kat), 14. günde iki grupta da azalma gözlemlendi (sırası ile 0,3 ve 0,1 kat). C+OAK grubunda ise her iki günde de kontrole yakın ekspresyon değerleri tespit edildi (sırası ile 0,9 ve 1,4 kat). P+K ve S+K ve C+K

gruplarında 7. günde kontrol K grubuna göre artmış değerler gözlemlendi (sırası ile 1276,1, 2478,6 ve 661,3 kat) (Tablo 4.3 ve Şekil 4.22).

MKH'ler ile birlikte kültüre edilen OA'lı kondrositler gruplarının tamamında OA'lı kondrositlerin tek kültürlerine göre COMP ekspresyonlarında artış izlendi. Gözlenen bu artış, 14. günde 7. günden daha yüksekti. En yüksek artış 14. günde 26,7 katlık artış ile S+OAK grubunda gözlemlendi. C+K grubunda hem 7 hem de 14. günde kontrole göre artmış (sırası ile 8,2 ve 8,5 kat), P+K grubunda 14. günde S+K grubunda ise 7. günde yüksek değerler tespit edildi (sırası ile 1,8 ve 1,3 kat) (Tablo 4.3 ve Şekil 4.22).

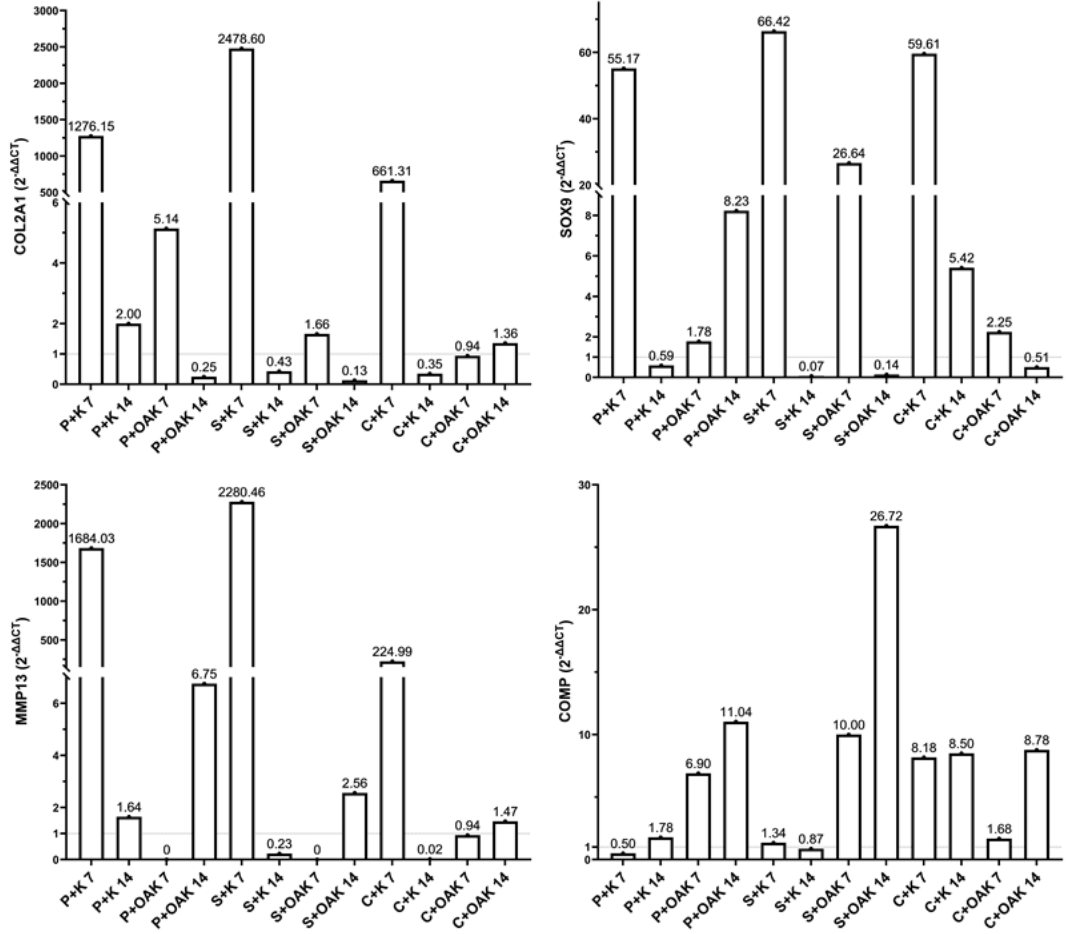
MMP13 ekspresyonları ise 7. günde P+OAK, S+OAK ve C+OAK gruplarında azalmışken, 14. günde C+OAK grubunda daha az olmakla beraber artış gösterdi. Hem 7 hem de 14. günde MMP13 ekspresyonunun kontrole göre en çok azaldığı grup C+OAK grubu oldu. Sağlıklı kondrosit gruplarında 7. günde P+K, S+K ve C+K gruplarında K grubuna göre artmış MMP13 ekspresyonları, 14. günde ise S+K ve C+K gruplarında azalmış, P+K grubunda ise düşük miktarda artmış tespit edildi (Tablo 4.3 ve Şekil 4.22).

SOX9 gen ekspresyonundaki değişimler diğer üç gendeki değişimden biraz daha farklı olarak şu şekildeydi, S+OAK ve C+OAK gruplarında 14. günde ekspresyon kontrole göre azalırken (sırası ile 0,1 ve 0,5 kat), P+OAK grubunda artış (8,2 kat) gösterdi. 7. günde P+OAK, S+OAK ve C+OAK gruplarında SOX9 ekspresyonu yüksek tespit edildi (sırası ile 1,8, 26,6 ve 2,3 kat). P+K ve S+K gruplarında 7. günde K grubuna göre artmış (sırası ile 55,2 ve 66,4 kat), 14. günde azalmış değerler gözlemledik (sırası ile 0,6 ve 0,1 kat). C+K grubunda ise 7 ve 14. günlerde SOX9 ekspresyonu artmıştı (sırası ile 59,6 ve 5,4 kat) (Tablo 4.3 ve Şekil 4.22).



**Tablo 4.3 COL2A1, COMP, MMP13 ve SOX9 gen ekspresyonlarının kontrol gruplarına göre kat değişimleri**

Gruplar	Kat Değişim ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ )							
	<u>COL2A1</u>		<u>COMP</u>		<u>MMP13</u>		<u>SOX9</u>	
	Gün							
	7	14	7	14	7	14	7	14
<b>P+K</b>	1276,2	2	0,5	1,8	1684	1,6	55,2	0,6
<b>P+OAK</b>	5,1	0,3	6,9	11	0	6,8	1,8	8,2
<b>S+K</b>	2478,6	0,4	1,3	0,9	2280,5	0,2	66,4	0,1
<b>S+OAK</b>	1,7	0,1	10	26,7	0	2,6	26,6	0,1
<b>C+K</b>	661,3	0,4	8,2	8,5	225	0,02	59,6	5,4
<b>C+OAK</b>	0,9	1,4	1,7	8,8	0,9	1,5	2,3	0,5



Şekil 4.23 COL2A1, SOX9, MMP13 ve COMP gen ekspresyonlarının kontrol gruplarına göre kat değişimleri.

## 5. TARTIŞMA

MKH'lerin anti-inflamatuvar özelliklerini ve anti-inflamatuvar mekanizmasını incelemek için, bu çalışmada MKH'ler ve kondrositler arasındaki parakrin etkiyi in vitro ortamda oluşturmak ve modellemek amacıyla Transwell ko-kültür sistemi kullanıldı. Yağ dokusu MKH için donör seçeneği olarak araştırma konusu olmuş ve birçok yayın OA tedavisi için yağ dokusu kaynaklı MKH'lerin olumlu etkilerini bildirmiştir. Yapılan tavşan çalışmalarında intraartiküler MKH enjeksiyonunun OA modellerinde kıkırdak kalınlığını arttırdığı, sinoviyal sıvıda inflamasyonu azalttığı ve OA progresyonunu yavaşlattığı bildirilmektedir (235–237). Manferdini ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada üç farklı yağ dokusu (patella altı yağ dokusu, kalça cilt altı yağ dokusu ve karın cilt altı yağ dokusu) kaynaklı MKH'ler ile osteoartritli kondrositler ile birlikte kültüre edilmiş 7 gün sonra kondrositlerde IL1 $\beta$ , IL6 ve CXCL8/IL8 gen ekspresyonlarının azaldığını bildirmişlerdir (238). Cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH'lerin kullanıldığı bir diğer çalışmada ise MKH ile ko-kültür sonrası osteoartritli kondrositlerde IL6, PGE2 ve MMP3 protein konsantrasyonlarının ve IL6 ile MMP3 gen ekspresyonlarının azaldığı bildirilmiştir (239). Zhou ve arkadaşlarının sıçanlardan elde ettikleri cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH'ler ve OA'lı kondrositleri birlikte kültüre ettikleri çalışmalarında ko-kültür süpernatantında inflamatuvar moleküllerden IL1 $\beta$ , IL6, IFN $\gamma$  ve TNF $\alpha$  protein konsantrasyonlarında azalma olduğu bildirilmektedir (240). Çalışmamızda da inflamatuvar belirteçlerden biri olan TNF $\alpha$  konsantrasyonlarında patella altı yağ dokusu kaynaklı MKH kullanılan gruplarda azalma, cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH kullanılan grupta ise kontrol OA'lı kondrosit grubuna göre artış gözlemledik. Cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH gruplarında grup içi varyansın diğer gruplara göre yüksek olması bu sonucun kaynağı olabilir.

Li ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde oluşturduğu OA modelinde, artritli dizlere enjekte edilen cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH'lerin OA gelişimini yavaşlattığı ve aynı çalışmada ko-kültür düzeneğiyle in vitro ortam incelemelerinde MKH'lerin parakrin etkileri aracılığı ile MMP3 ve MMP13 gen ekspresyonlarını azalttıklarını göstermişlerdir (241). MMP3 için benzer sonuçlar bildiren başka yayınlar da mevcuttur (242–245). Çalışmamızda da OA'lı kondrositlere göre patella

altı yağ dokusu ve sinoviyum kaynaklı MKH'ler ile birlikte kültüre edilen OA'lı kondrositlerde hem 7 hem de 14. günde MMP3 konsantrasyonlarını azalmış olarak tespit edildi. Ayrıca MMP13 ve COL2A1 gen ekspresyonları için yapılan ön değerlendirmelerin sonuçları da literatürdeki diğer çalışmalar ile benzer yöndeydi.

Patella altı yağ dokusu kaynaklı MKH'lerin rejeneratif uygulamalarda cilt altı yağ dokusuna benzer genetik stabilite gösterdiği ve donör doku olarak kolay ve etkili bir şekilde toplanabileceği, sonuç olarak klinik uygulamalar için iyi bir donör doku adayı olabileceği önceki çalışmalar ile öne sürülmüştür (246,247). Hatta Liao ve arkadaşları patella altı yağ dokusu kaynaklı MKH'leri OA tedavisinde diğer MKH'lerden üstün olarak nitelendirmektedirler (248). Patella altı ve cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH'lerin in vitro ko-kültür ortamında etkinliğinin karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada patella altı yağ dokusu kaynaklı MKH'ler ile birlikte kültüre edilen kondrositlerde ACAN, COL2A1 ve COMP gen ekspresyonları cilt altı yağ dokusu kaynaklı gruptan daha yüksek bulunmuştur (249). COL2A1 için benzer sonuçlar bildiren başka çalışmalar da mevcuttur (242,243,250–252).

Sinoviyum kaynaklı MKH'lerin OA tedavisinde olumlu etkilere sahip olduklarını göstermektedir (253–256). Diğer MKH çeşitleri gibi sinoviyum kaynaklı MKH'lerin de osteoartritli kondrositlerde SOX9 ve COL2A1 gen ekspresyonlarını arttırdığı ve inflamasyonu azalttığı bildirilmektedir (242–244,250,257,258). Çalışmamızda sinoviyum kaynaklı MKH'lerin TNF $\alpha$  ve MMP3 protein konsantrasyonunu azalttığını, COMP düzeylerini ise arttırdığını gözlemledik.

MKH'ler ile aynı ortamı paylaşan kondrositlerin metabolom düzeyindeki değişiklikler hedef hücre kondrositlerde hangi metabolik yolların ve ürünlerin artış gösterdiği hakkında bilgi sunabilmektedir. Kolesterol, hücre zarının bir bileşeni olarak, safra asidi veya steroid hormonunun kaynağı olarak ve hücresel süreçlerin bir düzenleyicisi olarak farklı roller oynamaktadır (259,260). Hücre zarındaki kolesterol, hücresel kompartmanlar arasında yarı geçirgen bir bariyer oluşturur ve hücre membranının akışkanlığı, polar moleküllerin geçirgenliği gibi bir dizi biyofiziksel özelliğini düzenler. Ek olarak, kolesterolün, membran lipidleri ve proteinleri ile etkileşimleri yoluyla membran geçişi ve transmembran sinyal yolları dahil birçok hücresel süreci modüle ettiği bilinmektedir (261–264). Tauroursodeoksikolik asit

(TUDCA), safra asidi ailesinin bir üyesidir ve ursodeoksikolik asit (UDCA) ile taurinin konjugasyonu ile oluşur ve dört aromatik halka içeren bir steroid hormonuna türevidir. TUDCA hücreleri apoptoz, endoplazmik retikulum stresi ve reaktif oksijen türleri oluşumundan korumaktadır (265). Tauroursodeoksikolik asitin (TUDCA), hücre içi kolesterol seviyelerini ve artrit, dejenere kondrositlerin membran akışkanlığını düzenleyerek osteoartrite karşı koruyucu etkilere sahip olduğu (266) ve osteoartritli hastaların kondrositlerinde ER stresini baskıladığı bildirilmiştir (267). Çalışmamızda Tauroursodeoksikolik asit MKH uygulanan gruplarda kontrole göre 14. günde daha belirgin olmak üzere yüksek tespit edildi.

Mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda yer alan Nikotinamid, hücre enerji metabolizmasında ve oksidan ürünlerin indirgenmesinde görev almaktadır (268,269). Sistemik inflamasyon ile seyreden ve kondrositlerde de inflamatuvar sürecin görüldüğü osteoartritte Nikotinamid kritik bir role sahip olması beklenebilir. Çalışmamızda MKH uygulanan tüm gruplarda kontrol kondrosit gruplarından daha yüksek değerler görülmüştür. Kondrositlerin inflamatuvar sürece karşı verdikleri yanıtta MKH ile kültüre edilen kondrositlerde anti-inflamatuvar metabolitlerde artış gözlenmiştir.

Porfirin ailesinin bir üyesi olan Koproporfirin, diğer metal-porfirin kompleksleri gibi hemoglobinler, miyoglobinler, peroksidaz, katalaz ve sitokromazlar gibi hem enzimlerinin yapılarında bulunurlar (270). Farelerde yapılan spontan OA modelinde porfirin türevlerinin OA progresyonunu yavaşlattığı (271), sinovitte inflamasyonu kontrol altına almak için fototerapide kullanılabilecek bir aracı olduğu (272,273) ve Protoporfirin IX uygulanan osteoartritli sıçan kondrositlerindeki inflamatuvar belirteçlerin azaldığı (274) gösterilmiştir. Porfirinler gibi bir diğer tetrapirel türevi olan bilirubinlerin in vitro ortamda kondrosit hücre proliferasyonunu yavaşlattığı bildirilmiştir (275). Mevcut sonuçlarımızda patella altı yağ dokusu ve sinoviyum kaynaklı MKH'lerin OA'lı kondrositlerde kontrol gruba göre Koproporfirin ve bilirubin metabolitleri azalmıştı. Bu azalışın tersine cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH gruplarında hem koproporfirin hem de bilirubin artmıştı.

Son yıllarda,  $\alpha$ -Tokoferol'ün monositer hücre adezyonu üzerindeki etkileri inceleme konusu olmuş ve düşük dansiteli lipoproteini (LDL) oksidasyondan

korumanın yanı sıra,  $\alpha$ -Tokoferol'ün endotelial adezyon moleküllerinin yüzey ekspresyonunu inhibe ederek monosit adezyonunu inhibe ettiği ve  $\alpha$ -Tokotrienol'ün etkili bir  $\alpha$ -Tokoferol türevi olduğu gösterilmiştir (276). OA tedavisi için de bu anti-inflamatuvar etkilerin incelendiği çalışmalar mevcuttur (277–280). OA'lı kondrosit grupları arasında yalnızca patella altı yağ dokusu kaynaklı MKH'ler ile birlikte kültüre edilen OA'lı kondrositlerde 7. günde  $\alpha$ -Tokotrienol düzeyi kontrole göre yüksek tespit edildi.

Bir Fukoidan polisakkarit türevi olan Fukoz, glikoprotein sentezinde yer almaktadır. Fukoz glukozaminoglukanların sentezinde yer alarak glukozamin gibi aminoşekerlerin yapısında yer alır ve hem kondrosit canlılığı için hem de kıkırdak doku ekstraselüler matriksin oluşuma dolaylı olarak katkıda bulunur (281,282). Hücre içi enerji metabolizmasının bir belirteci olana Fukoz 14 gün sonunda her üç MKH grubunda da yüksek gözlemlendi.

Galaktozilsfingozin, sfingolipid yapıda bir serebrosittir. Hücre içi artan miktarları santral sinir sisteminde nöronal hasara neden olduğu gibi, kondrositler üzerinde de infamasyonu artırıcı ve hücreyi apoptotik sürece soktuğu bildirilmiştir (283–285). Çalışmamızda cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH'ler ile birlikte kültüre edilen kondrosit gruplarında 7 ve 14. günlerde Galaktozilsfingozin düşük gözlemlendi.

Çalışmamızdaki sınırlılıklardan ilki RT-qPCR analiz basamaklarında ölçüm tekrar sayısının artırılması analizlerde düşük sinyal nedeniyle yaşanan problemleri ortadan kaldırılabildi. Ayrıca süpernatant incelemelerine ek olarak kondrosit hücre içi metabolik yolak analizleri de yapılsaydı, MKH'lerin parakrin etkilerinin kondrositler üzerinde yol açtığı değişimlerin mekanizmaları ile daha ayrıntılı aydınlatılabildi.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak MKH'ler OA'lı kondrositler ile aynı kültür ortamında bulduklarında inflamatuvar bir belirteç olan TNF $\alpha$  ve kıkırdak degridasyonunda rol alan MMP3 konsantrasyonlarında azalmaya, sentez belirteci olan COMP düzeyinde ise artmaya neden olmuştur. Bu değişimler patella altı yağ dokusu ve sinoviyum kaynaklı MKH gruplarında istatistiksel olarak anlamlıydı.

Çalışmamız sonuçlarına göre MKH'ler OA'lı kondrositler ile aynı ortamda bulduklarında hücre teması olmasa dahi kondrositlerin hücre dışı ortama aktardıkları metabolitleri ve ortamın metabolik profilini değiştirmektedirler. MKH'lerin OA tedavisinde kullanılacak parakrin etkileri sonucunda metabolom düzeyindeki gerçekleştirdikleri değişimler ileriki çalışmalar ile daha ayrıntılı aydınlatılabilir ve sonrasında klinik uygulamalar için zemin hazırlayabilir.

Her üç doku kaynaklı MKH grubu da benzer yönde anti-inflamatuvar, kıkırdak yıkımını inhibe edici ve sentezi uyarıcı etki yapmış olsalar da cilt altı yağ dokusu kaynaklı MKH'lerin patella altı yağ dokusu sinoviyum kaynaklı MKH'lere göre bahsedilen etkileri daha az gösterdiğini gözlemledik. Yine de bu üç doku arasından diğer ikisinden üstün ve klinik uygulamalar için aday olabilecek bir dokudan bahsetmemiz bu çalışma sonuçları ile mümkün değildi. Doku kökenlerinden bağımsız MKH'ler OA'lı kondrositler üzerinde iyileştirici olarak kabul edilebilecek etkilere sahipti. Bu bilgiler ışığında gerçekleştirilecek ileriki çalışmalar spor yaralanmalarına sekonder gelişen OA'nın seyrine etki edebilecek MKH tedavileri hakkındaki mevcut literatür bilgisini genişletebilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Safiri S, Kolahi AA, Smith E, et al. Global, regional and national burden of osteoarthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Ann Rheum Dis.* 2020;79(6).
2. James SL, Abate D, Abate KH, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* 2018;392(10159):1789-1858.
3. Culliford D, Maskell J, Judge A, Cooper C, Prieto-Alhambra D, Arden NK. Future projections of total hip and knee arthroplasty in the UK: results from the UK Clinical Practice Research Datalink. *Osteoarthr Cartil.* 2015;23(4):594-600.
4. Glyn-Jones S, Palmer AJR, Agricola R, et al. Osteoarthritis. *Lancet.* 2015;386(9991):376-387.
5. Mansell JP, Bailey AJ. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J Clin Invest.* 1998;101(8):1596-1603.
6. Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem.* 1994;56(3):283-294.
7. Noiseux N, Gneccchi M, Lopez-Illasaca M, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther.* 2006;14(6):840-850.
8. Da L, Meirelles S, Caplan AI, Nardi NB. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells.* 2008;26(9):2287-2299.
9. Gneccchi M, He H, Liang OD, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med 2005 114.* 2005;11(4):367-368.
10. Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol.* 2006;198(1):54-64.
11. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. *Lancet.* 2019;393(10182):1745-1759.
12. Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ.* 2003;81(9):646-656.



13. Petersson IF. Occurrence of osteoarthritis of the peripheral joints in European populations. *Ann Rheum Dis.* 1996;55(9):659-661.
14. Prieto-Alhambra D, Judge A, Javaid MK, Cooper C, Diez-Perez A, Arden NK. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(9):1659-1664.
15. March LM, Bachmeier CJM. 10 Economics of osteoarthritis: a global perspective. *Baillieres Clin Rheumatol.* 1997;11(4):817-834.
16. Dieppe PA, Lohmander LS. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet.* 2005;365(9463):965-973.
17. Chen D, Shen J, Zhao W, et al. Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone Res.* 2017;5:16044.
18. Brandt KD, Radin EL, Dieppe PA, Van De Putte L. Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(10):1261.
19. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis Rheum.* 2012;64(6):1697.
20. Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;402(402):21-37.
21. Hunter DJ, Lo GH. The management of osteoarthritis: an overview and call to appropriate conservative treatment. *Med Clin North Am.* 2009;93(1):127-143.
22. Aurich M, Squires GR, Reiner A, et al. Differential matrix degradation and turnover in early cartilage lesions of human knee and ankle joints. *Arthritis Rheum.* 2005;52(1):112-119.
23. Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(9):1916-1926.
24. Hutton C. Osteoarthritis revisited and revived. *Ann Rheum Dis.* 1994;53(2):85.
25. Vincent TL. Targeting mechanotransduction pathways in osteoarthritis: a focus on the pericellular matrix. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13(3):449-454.
26. Mobasheri A, Lewis R, Maxwell JEJ, Hill C, Womack M, Barrett-Jolley R. Characterization of a stretch-activated potassium channel in chondrocytes. *J Cell Physiol.* 2010;223(2):511-518.
27. Ramage L, Nuki G, Salter DM. Signalling cascades in mechanotransduction: cell-matrix interactions and mechanical loading. *Scand J Med Sci Sports.* 2009;19(4):457-469.

28. Guilak F, Leddy HA, Liedtke W. Transient receptor potential vanilloid 4. *Ann NY Acad Sci.* 2010;1192(1):404-409.
29. Wann AKT, Zuo N, Haycraft CJ, et al. Primary cilia mediate mechanotransduction through control of ATP-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in compressed chondrocytes. *FASEB J.* 2012;26(4):1663-1671.
30. Knight MM, Mcglashan SR, Garcia M, Jensen CG, Poole CA. Articular chondrocytes express connexin 43 hemichannels and P2 receptors – a putative mechanoreceptor complex involving the primary cilium? *J Anat.* 2009;214(2):275-283.
31. Altman R, Asch E, Bloch D, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 1986;29(8):1039-1049.
32. Braun HJ, Gold GE. Diagnosis of osteoarthritis: Imaging. *Bone.* 2012;51(2):278-288.
33. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of Osteo-Arthrosis. *Ann Rheum Dis.* 1957;16(4):494-502.
34. Altman RD, Gold GE. Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis, revised. *Osteoarthr Cartil.* 2007;15:A1-A56.
35. Peterfy CG, Guermazi A, Zaim S, et al. Whole-organ magnetic resonance imaging score (WORMS) of the knee in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2004;12(3):177-190.
36. Kornaat PR, Ceulemans RYT, Kroon HM, et al. MRI assessment of knee osteoarthritis: Knee Osteoarthritis Scoring System (KOSS) - Inter-observer and intra-observer reproducibility of a compartment-based scoring system. *Skeletal Radiol.* 2005;34(2):95-102.
37. Hunter DJ, Lo GH, Gale D, Grainger AJ, Guermazi A, Conaghan PG. The reliability of a new scoring system for knee osteoarthritis MRI and the validity of bone marrow lesion assessment: BLOKS (Boston-Leeds Osteoarthritis Knee Score). *Ann Rheum Dis.* 2008;67(2):206-211.
38. Gold GE, Burstein D, Dardzinski B, Lang P, Boada F, Mosher T. MRI of articular cartilage in OA: novel pulse sequences and compositional/functional markers. *Osteoarthr Cartil.* 2006;14(SUPPL. 1):76-86.
39. Smith HE, Mosher TJ, Dardzinski BJ, et al. Spatial variation in cartilage T2 of the knee. *J Magn Reson Imaging.* 2001;14(1):50-55.

40. Borthakur A, Shapiro EM, Beers J, Kudchodkar S, Kneeland JB, Reddy R. Sensitivity of MRI to proteoglycan depletion in cartilage: Comparison of sodium and proton MRI. *Osteoarthr Cartil.* 2000;8(4):288-293.
41. McKenzie CA, Williams A, Prasad P V., Burstein D. Three-dimensional delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC) at 1.5T and 3.0T. *J Magn Reson Imaging.* 2006;24(4):928-933.
42. Loeuille D, Chary-Valckenaere I, Champigneulle J, et al. Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: Correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis Rheum.* 2005;52(11):3492-3501.
43. Ricci V, Özçakar L. From “Ultrasound Imaging” to “Ultrasound Examination”: A Needful Upgrade in Musculoskeletal Medicine. *Pain Med (United States).* 2020;21(6):1304-1306.
44. Keen HI, Conaghan PG. Ultrasonography in Osteoarthritis. *Radiol Clin North Am.* 2009;47(4):581-594.
45. Guermazi A, Eckstein F, Hellio Le Graverand-Gastineau MP, et al. Osteoarthritis: Current Role of Imaging. *Med Clin North Am.* 2009;93(1):101-126.
46. Song IH, Burmester GR, Backhaus M, et al. Knee osteoarthritis. Efficacy of a new method of contrast-enhanced musculoskeletal ultrasonography in detection of synovitis in patients with knee osteoarthritis in comparison with magnetic resonance imaging. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(1):19-25.
47. Jordan JM, Helmick CG, Renner JB, et al. Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J Rheumatol.* 2007;34(1).
48. Van Saase JLCM, Van Romunde LKJ, Cats A, VanDenBroucke JP, Valkenburg HA. Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann Rheum Dis.* 1989;48(4):271-280.
49. Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan RF. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* 1987;30(8):914-918.
50. Naik E, Dixit VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med.* 2011;208(3):417-420.
51. Goodwin W, McCabe D, Sauter E, et al. Rotenone prevents impact-induced chondrocyte death. *J Orthop Res.* 2010;28(8):1057-1063.

52. Kim J, Xu M, Xo R, et al. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes. *Osteoarthr Cartil.* 2010;18(3):424-432.
53. Loeser RF. Aging and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2011;23(5):492-496.
54. van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, van den Berg WB. A role for age-related changes in TGFbeta signaling in aberrant chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(1).
55. Blaney Davidson EN, Remst DFG, Vitters EL, et al. Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice. *J Immunol.* 2009;182(12):7937-7945.
56. Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, et al. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet.* 2009;5(8).
57. Richardson B. Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Res Rev.* 2003;2(3):245-261.
58. Haseeb A, Makki MS, Haqqi TM. Modulation of ten-eleven translocation 1 (TET1), Isocitrate Dehydrogenase (IDH) expression,  $\alpha$ -Ketoglutarate ( $\alpha$ -KG), and DNA hydroxymethylation levels by interleukin-1 $\beta$  in primary human chondrocytes. *J Biol Chem.* 2014;289(10):6877-6885.
59. Fernández-Tajes J, Soto-Hermida A, Vázquez-Mosquera ME, et al. Genome-wide DNA methylation analysis of articular chondrocytes reveals a cluster of osteoarthritic patients. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(4):668-677.
60. Anandacoomarasamy A, Caterson I, Sambrook P, Fransen M, March L. The impact of obesity on the musculoskeletal system. *Int J Obes (Lond).* 2008;32(2):211-222.
61. Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Walker AM, Meenan RF. Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1988;109(1):18-24.
62. Fain JN. Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review. *Mediators Inflamm.* 2010;2010.
63. Das UN. Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition.* 2001;17(11-12):953-966.

64. Conde J, Scotece M, Gómez R, Lopez V, Gómez-Reino JJ, Gualillo O. Adipokines and osteoarthritis: novel molecules involved in the pathogenesis and progression of disease. *Arthritis*. 2011;2011:1-8.
65. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1111-1119.
66. Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, et al. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes*. 2003;52(7):1799-1805.
67. Stehouwer CDA, Gall MA, Twisk JWR, Knudsen E, Emeis JJ, Parving HH. Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. *Diabetes*. 2002;51(4):1157-1165.
68. Aygun AD, Gungor S, Ustundag B, Gurgoze MK, Sen Y. Proinflammatory cytokines and leptin are increased in serum of prepubertal obese children. *Mediators Inflamm*. 2005;2005(3):180-183.
69. Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2007;116(11):1234-1241.
70. Straczkowski M, Dzienis-Straczkowska S, Stêpień A, Kowalska I, Szelachowska M, Kinalska I. Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor-alpha system. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(10):4602-4606.
71. Louer CR, Furman BD, Huebner JL, Kraus VB, Olson SA, Guilak F. Diet-induced obesity significantly increases the severity of posttraumatic arthritis in mice. *Arthritis Rheum*. 2012;64(10):3220-3230.
72. Brown ML, Yukata K, Farnsworth CW, et al. Delayed fracture healing and increased callus adiposity in a C57BL/6J murine model of obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2014;9(6).
73. Zhou Q, Leeman SE, Amar S. Signaling mechanisms in the restoration of impaired immune function due to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(7):2867-2872.
74. Martel-Pelletier J. Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci*. 1999;4(1-3):d694.
75. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(1):33-42.

76. Felson DT, Couropmitree NN, Chaisson CE, et al. Evidence for a Mendelian gene in a segregation analysis of generalized radiographic osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis Rheum.* 1998;41(6):1064-1071.
77. Loughlin J, Mustafa Z, Smith A, et al. Linkage analysis of chromosome 2q in osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2000;39(4):377-381.
78. Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ.* 1996;312(7036):940-944.
79. Valdes AM, Spector TD. Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2010 71. 2010;7(1):23-32.
80. Sassi N, Laadhar L, Allouche M, et al. WNT signaling and chondrocytes: from cell fate determination to osteoarthritis physiopathology. *J Recept Signal Transduct Res.* 2014;34(2):73-80.
81. Lories RJ, Corr M, Lane NE. To Wnt or not to Wnt: the bone and joint health dilemma. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9(6):328-339.
82. Mirando AJ, Liu Z, Moore T, et al. RBP-J $\kappa$ -dependent Notch signaling is required for murine articular cartilage and joint maintenance. *Arthritis Rheum.* 2013;65(10):2623-2633.
83. Wang M, Tang D, Shu B, et al. Conditional activation of  $\beta$ -catenin signaling in mice leads to severe defects in intervertebral disc tissue. *Arthritis Rheum.* 2012;64(8):2611-2623.
84. Shen J, Li J, Wang B, et al. Deletion of the transforming growth factor  $\beta$  receptor type II gene in articular chondrocytes leads to a progressive osteoarthritis-like phenotype in mice. *Arthritis Rheum.* 2013;65(12):3107-3119.
85. Serra R, Johnson M, Filvaroff EH, et al. Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J Cell Biol.* 1997;139(2):541-552.
86. Lin AC, Seeto BL, Bartoszko JM, et al. Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis. *Nat Med.* 2009;15(12):1421-1425.
87. Zhang R, Yao J, Xu P, et al. A comprehensive meta-analysis of association between genetic variants of GDF5 and osteoarthritis of the knee, hip and hand. *Inflamm Res.* 2015;64(6):405-414.
88. Jeong C, Lee JY, Kim J, et al. Novel COL9A3 mutation in a family diagnosed with multiple epiphyseal dysplasia: a case report. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014;15(1).

89. Rodriguez RR, Seegmiller RE, Stark MR, Bridgewater LC. A type XI collagen mutation leads to increased degradation of type II collagen in articular cartilage. *Osteoarthr Cartil.* 2004;12(4):314-320.
90. Valdes AM, Spector TD, Tamm A, et al. Genetic variation in the SMAD3 gene is associated with hip and knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(8):2347-2352.
91. Bijsterbosch J, Kloppenburg M, Reijniere M, et al. Association study of candidate genes for the progression of hand osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2013;21(4):565-569.
92. Loughlin J, Dowling B, Chapman K, et al. Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(26):9757-9762.
93. Ekstrand J, Hägglund M, Kristenson K, Magnusson H, Waldén M. Fewer ligament injuries but no preventive effect on muscle injuries and severe injuries: an 11-year follow-up of the UEFA Champions League injury study. *Br J Sports Med.* 2013;47(12):732-737.
94. Flanigan DC, Harris JD, Trinh TQ, Siston RA, Brophy RH. Prevalence of chondral defects in athletes' knees: a systematic review. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;42(10):1795-1801.
95. Brophy R, Rodeo S, Barnes R, Powell J, Warren R. Knee Articular Cartilage Injuries in the National Football League – *Epidemiology and Treatment Approach by Team Physicians.* *J Knee Surg.* 2009;22(04):331-338.
96. Roos EM. Joint injury causes knee osteoarthritis in young adults. *Curr Opin Rheumatol.* 2005;17(2):195-200.
97. Fridén T, Sommerlath K, Egund N, Gillquist J, Ryd L, Lindstrand A. Instability after anterior cruciate ligament rupture. Measurements of sagittal laxity compared in 11 cases. *Acta Orthop Scand.* 1992;63(6):593-598.
98. Sernert N, Kartus JT, Ejerhed L, Karlsson J. Right and left knee laxity measurements: A prospective study of patients with anterior cruciate ligament injuries and normal control subjects. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg.* 2004;20(6):564-571.
99. Miyazaki T, Wada M, Kawahara H, Sato M, Baba H, Shimada S. Dynamic load at baseline can predict radiographic disease progression in medial compartment knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(7):617-622.
100. Andriacchi TP, Mündermann A, Smith RL, Alexander EJ, Dyrby CO, Koo S. A framework for the in vivo pathomechanics of osteoarthritis at the knee. *Ann Biomed Eng.* 2004;32(3):447-457.

101. Lieberthal J, Sambamurthy N, Scanzello CR. Inflammation in joint injury and post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2015;23(11):1825-1834.
102. Mandelbaum B, Waddell D. Etiology and pathophysiology of osteoarthritis. *Orthopedics.* 2005;28(2 Suppl):s207-14.
103. Salzman GM, Preiss S, Zenobi-Wong M, Harder LP, Maier D, Dvorák J. Osteoarthritis in Football: With a Special Focus on Knee Joint Degeneration. *Cartilage.* Published online 2017.
104. Lohmander LS, Englund PM, Dahl LL, Roos EM. The long-term consequence of anterior cruciate ligament and meniscus injuries: Osteoarthritis. *Am J Sports Med.* 2007;35(10):1756-1769.
105. Muthuri SG, McWilliams DF, Doherty M, Zhang W. History of knee injuries and knee osteoarthritis: a meta-analysis of observational studies. *Osteoarthr Cartil.* 2011;19(11):1286-1293.
106. Ikenoue T, Trindade MCD, Lee MS, et al. Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro. *J Orthop Res.* 2003;21(1):110-116.
107. Lee HS, Millward-Sadler SJ, Wright MO, Nuki G, Al-Jamal R, Salter DM. Activation of integrin-RACK1/PKC $\alpha$  signalling in human articular chondrocyte mechanotransduction. *Osteoarthr Cartil.* 2002;10(11):890-897.
108. Mauck RL, Soltz MA, Wang CCB, et al. Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J Biomech Eng.* 2000;122(3):252-260.
109. Parkkinen JJ, Lammi MJ, Helminen HJ, Tammi M. Local stimulation of proteoglycan synthesis in articular cartilage explants by dynamic compression in vitro. *J Orthop Res.* 1992;10(5):610-620.
110. Valhmu WB, Stazzone EJ, Bachrach NM, et al. Load-controlled compression of articular cartilage induces a transient stimulation of aggrecan gene expression. *Arch Biochem Biophys.* 1998;353(1):29-36.
111. Wong M, Siegrist M, Cao X. Cyclic compression of articular cartilage explants is associated with progressive consolidation and altered expression pattern of extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* 1999;18(4):391-399.
112. Honda K, Ohno S, Tanimoto K, et al. The effects of high magnitude cyclic tensile load on cartilage matrix metabolism in cultured chondrocytes. *Eur J Cell Biol.* 2000;79(9):601-609.
113. Fitzgerald JB, Jin M, Dean D, Wood DJ, Zheng MH, Grodzinsky AJ. Mechanical compression of cartilage explants induces multiple time-dependent



- gene expression patterns and involves intracellular calcium and cyclic AMP. *J Biol Chem.* 2004;279(19):19502-19511.
114. Ragan PM, Badger AM, Cook M, et al. Down-regulation of chondrocyte aggrecan and type-II collagen gene expression correlates with increases in static compression magnitude and duration. *J Orthop Res.* 1999;17(6):836-842.
  115. Radin EL, Martin RB, Burr DB, Caterson B, Boyd RD, Goodwin C. Effects of mechanical loading on the tissues of the rabbit knee. *J Orthop Res.* 1984;2(3):221-234.
  116. Arokoski J, Kiviranta I, Jurvelin J, Tammi M, Helminen HJ. Long-distance running causes site-dependent decrease of cartilage glycosaminoglycan content in the knee joints of beagle dogs. *Arthritis Rheum.* 1993;36(10):1451-1459.
  117. Kiviranta I, Tammi M, Jurvelin J, Säämänen A -M, Helminen HJ. Moderate running exercise augments glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the knee joint of young beagle dogs. *J Orthop Res.* 1988;6(2):188-195.
  118. Brandt KD. Response of joint structures to inactivity and to reloading after immobilization. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2003;49(2):267-271.
  119. Palmoski MJ, Brandt KD. Immobilization of the knee prevents osteoarthritis after anterior cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum.* 1982;25(10):1201-1208.
  120. Buckwalter JA. Sports, joint injury, and posttraumatic osteoarthritis. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2003;33(10):578-588.
  121. Madaleno FO, Santos BA, Araújo VL, Oliveira VC, Resende RA. Prevalence of knee osteoarthritis in former athletes: a systematic review with meta-analysis. *Brazilian J Phys Ther.* 2018;22(6):437-451.
  122. Tran G, Smith TO, Grice A, Kingsbury SR, McCrory P, Conaghan PG. Does sports participation (including level of performance and previous injury) increase risk of osteoarthritis? A systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med.* 2016;50(23):1459-1466.
  123. Bestwick-Stevenson T, Ifesemen OS, Pearson RG, Edwards KL. Association of Sports Participation With Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Orthop J Sport Med.* 2021;9(6).
  124. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol.* 2007;213(3):626-634.

125. Hahn T, Foldspang A, Ingemann-Hansen T. Prevalence of knee instability in relation to sports activity. *Scand J Med Sci Sports*. 2001;11(4):233-238.
126. Adams BG, Houston MN, Cameron KL. The Epidemiology of Meniscus Injury. *Sports Med Arthrosc*. 2021;29(3):E24-E33.
127. Montalvo AM, Schneider DK, Webster KE, et al. Anterior Cruciate Ligament Injury Risk in Sport: A Systematic Review and Meta-Analysis of Injury Incidence by Sex and Sport Classification. *J Athl Train*. 2019;54(5):472-482.
128. Yusuf E, Address P. Pharmacologic and Non-Pharmacologic Treatment of Osteoarthritis. *Curr Treat Options Rheumatol* 2016 22. 2016;2(2):111-125.
129. Dhillon HS. Effectiveness of Exercise Therapy and its Variations in Lower Limb Osteoarthritis: A Literature Review. *J Postgrad Med Educ Res*. 2014;48(4):190-196.
130. Cibulka MT, White DM, Woehrl J, et al. Hip pain and mobility deficits--hip osteoarthritis: clinical practice guidelines linked to the international classification of functioning, disability, and health from the orthopaedic section of the American Physical Therapy Association. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2009;39(4):A1-A25.
131. Zhang W, Doherty M, Arden N, et al. EULAR evidence based recommendations for the management of hip osteoarthritis: Report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis*. 2005;64(5):669-681.
132. Hochberg MC, Altman RD, April KT, et al. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012;64(4):465-474.
133. Bannuru RR, Osani MC, Vaysbrot EE, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2019;27(11):1578-1589.
134. Bruyère O, Honvo G, Veronese N, et al. An updated algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO). *Semin Arthritis Rheum*. 2019;49(3):337-350.
135. Christensen R, Bartels EM, Astrup A, Bliddal H. Effect of weight reduction in obese patients diagnosed with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(4):433-439.

136. Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, et al. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)*. 2020;72(2):220-233.
137. Bannuru RR, Osani MC, Vaysbrot EE, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2019;27(11):1578-1589.
138. Skou ST, Roos EM. Good Life with osteoArthritis in Denmark (GLA:D™): evidence-based education and supervised neuromuscular exercise delivered by certified physiotherapists nationwide. *BMC Musculoskelet Disord*. 2017;18(1):1-13.
139. Ettinger WH, Burns R, Messier SP, et al. A Randomized Trial Comparing Aerobic Exercise and Resistance Exercise With a Health Education Program in Older Adults With Knee Osteoarthritis: The Fitness Arthritis and Seniors Trial (FAST). *JAMA*. 1997;277(1):25-31.
140. Hunter DJ, Eckstein F. Exercise and osteoarthritis. *J Anat*. 2009;214(2):197-207.
141. Bennell KL, Hinman RS, Metcalf BR, et al. Efficacy of physiotherapy management of knee joint osteoarthritis: a randomised, double blind, placebo controlled trial. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(6):906-912.
142. Spector TD, Harris PA, Hart DJ, et al. Risk of osteoarthritis associated with long-term weight-bearing sports: a radiologic survey of the hips and knees in female ex-athletes and population controls. *Arthritis Rheum*. 1996;39(6):988-995.
143. Buckwalter JA. Sports, joint injury, and posttraumatic osteoarthritis. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2003;33(10):578-588.
144. Saxon L, Finch C, Bass S. Sports participation, sports injuries and osteoarthritis: implications for prevention. *Sports Med*. 1999;28(2):123-135.
145. Anwer S, Alghadir A. Effect of isometric quadriceps exercise on muscle strength, pain, and function in patients with knee osteoarthritis: a randomized controlled study. *J Phys Ther Sci*. 2014;26(5):745-748.
146. Messier SP, Loeser RF, Miller GD, et al. Exercise and dietary weight loss in overweight and obese older adults with knee osteoarthritis: the Arthritis, Diet, and Activity Promotion Trial. *Arthritis Rheum*. 2004;50(5):1501-1510.
147. Lin CWC, Taylor D, Bierma-Zeinstra SMA, Maher CG. Exercise for Osteoarthritis of the Knee. *Phys Ther*. 2010;90(6):839-842.

148. Poumyhumlnen T, Keskinen KL, Kyroumlauminen H, Hautala A, Savolainen J, Maumllkiauml E. Neuromuscular function during therapeutic knee exercise under water and on dry land. *Arch Phys Med Rehabil.* 2001;82(10):1446-1452.
149. Bartels EM, Lund H, Hagen KB, Dagfinrud H, Christensen R, Danneskiold-Samsøe B. Aquatic exercise for the treatment of knee and hip osteoarthritis. *Cochrane database Syst Rev.* 2007;(4).
150. Biscarini A, Cerulli G. Modeling of the knee joint load in rehabilitative knee extension exercises under water. *J Biomech.* 2007;40(2):345-355.
151. Brosseau L, Yonge K, Welch V, et al. Thermotherapy for treatment of osteoarthritis. *Cochrane database Syst Rev.* 2003;2003(4).
152. Dantas LO, Moreira R de FC, Norde FM, Mendes Silva Serrao PR, Albuquerque-Sendín F, Salvini TF. The effects of cryotherapy on pain and function in individuals with knee osteoarthritis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clin Rehabil.* 2019;33(8):1310-1319.
153. Dantas LO, Breda CC, da Silva Serrao PRM, et al. Short-term cryotherapy did not substantially reduce pain and had unclear effects on physical function and quality of life in people with knee osteoarthritis: a randomised trial. *J Physiother.* 2019;65(4):215-221.
154. Zhang C, Xie Y, Luo X, et al. Effects of therapeutic ultrasound on pain, physical functions and safety outcomes in patients with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Rehabil.* 2016;30(10):960-971.
155. Huang Z, Chen J, Ma J, Shen B, Pei F, Kraus VB. Effectiveness of low-level laser therapy in patients with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthr Cartil.* 2015;23(9):1437-1444.
156. Felson DT. Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med.* 2006;354(8):841-848.
157. Haroon N, Kim TH, Inman RD. NSAIDs and radiographic progression in ankylosing spondylitis Bagging big game with small arms? *Ann Rheum Dis.* 2012;71(10):1593-1595.
158. Qvist P, Bay-Jensen AC, Christiansen C, Dam EB, Pastoureau P, Karsdal MA. The disease modifying osteoarthritis drug (DMOAD): Is it in the horizon? *Pharmacol Res.* 2008;58(1):1-7.
159. Machado GC, Maher CG, Ferreira PH, et al. Efficacy and safety of paracetamol for spinal pain and osteoarthritis: systematic review and meta-analysis of randomised placebo controlled trials. *BMJ.* 2015;350.

160. Baigent C, Bhala N, Emberson J, et al. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet (London, England)*. 2013;382(9894):769-779.
161. Weil J, Colin-Jones D, Langman M, et al. Prophylactic aspirin and risk of peptic ulcer bleeding. *BMJ*. 1995;310(6983):827.
162. Lanza FL, Chan FKL, Quigley EMM, et al. Guidelines for prevention of NSAID-related ulcer complications. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(3):728-738.
163. Knotkova H, Fine PG, Portenoy RK. Opioid Rotation: The Science and the Limitations of the Equianalgesic Dose Table. *J Pain Symptom Manage*. 2009;38(3):426-439.
164. Avouac J, Gossec L, Dougados M. Efficacy and safety of opioids for osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Osteoarthr Cartil*. 2007;15(8):957-965.
165. Kalso E, Edwards JE, Moore RA, McQuay HJ. Opioids in chronic non-cancer pain: systematic review of efficacy and safety. *Pain*. 2004;112(3):372-380.
166. Sehgal N, Colson J, Smith HS. Chronic pain treatment with opioid analgesics: benefits versus harms of long-term therapy. *Expert Rev Neurother*. 2013;13(11):1201-1220.
167. Katz WA. Pharmacology and Clinical Experience with Tramadol in Osteoarthritis. *Drugs 1996 523*. 2012;52(3):39-47.
168. Wandel S, Juni P, Tendal B, et al. Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: network meta-analysis. *BMJ*. 2010;341(7775):711.
169. Towheed T, Maxwell L, Anastassiades TP, et al. Glucosamine therapy for treating osteoarthritis. *Cochrane database Syst Rev*. 2005;2005(2).
170. Calamia V, Ruiz-Romero C, Rocha B, et al. Pharmacoproteomic study of the effects of chondroitin and glucosamine sulfate on human articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(4).
171. Piperno M, Reboul P, Hellio Le Graverand MP, et al. Glucosamine sulfate modulates dysregulated activities of human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Osteoarthr Cartil*. 2000;8(3):207-212.
172. Bali JP, Cousse H, Neuzil E. Biochemical basis of the pharmacologic action of chondroitin sulfates on the osteoarticular system. *Semin Arthritis Rheum*. 2001;31(1):58-68.

173. Martel-Pelletier J, Kwan Tat S, Pelletier JP. Effects of chondroitin sulfate in the pathophysiology of the osteoarthritic joint: a narrative review. *Osteoarthr Cartil.* 2010;18 Suppl 1(SUPPL. 1).
174. Kubo M, Ando K, Mimura T, Matsusue Y, Mori K. Chondroitin sulfate for the treatment of hip and knee osteoarthritis: current status and future trends. *Life Sci.* 2009;85(13-14):477-483.
175. Legendre F, Baugé C, Roche R, Saurel AS, Pujol JP. Chondroitin sulfate modulation of matrix and inflammatory gene expression in IL-1beta-stimulated chondrocytes--study in hypoxic alginate bead cultures. *Osteoarthr Cartil.* 2008;16(1):105-114.
176. Jomphe C, Gabriac M, Hale TM, et al. Chondroitin sulfate inhibits the nuclear translocation of nuclear factor-kappaB in interleukin-1beta-stimulated chondrocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;102(1):59-65.
177. Pham T, Le Henanff A, Ravoud P, Dieppe P, Paolozzi L, Dougados M. Evaluation of the symptomatic and structural efficacy of a new hyaluronic acid compound, NRD101, in comparison with diacerein and placebo in a 1 year randomised controlled study in symptomatic knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(12):1611-1617.
178. Dougados M, Nguyen M, Berdah L, Mazières B, Vignon E, Lequesne M. Evaluation of the structure-modifying effects of diacerein in hip osteoarthritis: ECHODIAH, a three-year, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2001;44(11):2539-2547.
179. Bartels EM, Bliddal H, Schøndorff PK, Altman RD, Zhang W, Christensen R. Symptomatic efficacy and safety of diacerein in the treatment of osteoarthritis: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Osteoarthr Cartil.* 2010;18(3):289-296.
180. Fidelix TSA, Macedo CR, Maxwell LJ, Fernandes Moça Trevisani V. Diacerein for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;2014(2).
181. Martel Pelletier J, Pelletier JP. Effects of diacerein at the molecular level in the osteoarthritis disease process. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2010;2(2):95-104.
182. European Medicines Agency (EMA). Assessment report for diacerein containing medicinal products. 2014;44(September):1-47.
183. Saklatvala J. Glucocorticoids: Do we know how they work? *Arthritis Res.* 2002;4(3):146-150.
184. Lohmander LS, Hoerrner LA, Lark MW. Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1993;36(2):181-189.

185. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Cloutier JM, Woessner JF. Proteoglycan-degrading acid metalloprotease activity in human osteoarthritic cartilage, and the effect of intraarticular steroid injections. *Arthritis Rheum.* 1987;30(5):541-548.
186. Godwin M, Dawes M. Intra-articular steroid injections for painful knees. Systematic review with meta-analysis. *Can Fam Physician.* 2004;50(2):241-248.
187. Hepper CT, Halvorson JJ, Duncan ST, Gregory AJM, Dunn WR, Spindler KP. The efficacy and duration of intra-articular corticosteroid injection for knee osteoarthritis: a systematic review of level I studies. *J Am Acad Orthop Surg.* 2009;17(10):638-646.
188. Jüni P, Hari R, Rutjes AWS, et al. Intra-articular corticosteroid for knee osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;2015(10).
189. Hirsch G, Kitas G, Klocke R. Intra-articular corticosteroid injection in osteoarthritis of the knee and hip: factors predicting pain relief--a systematic review. *Semin Arthritis Rheum.* 2013;42(5):451-473.
190. Yusuf E, Kortekaas MC, Watt I, Huizinga TWJ, Kloppenburg M. Do knee abnormalities visualised on MRI explain knee pain in knee osteoarthritis? A systematic review. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(1):60-67.
191. Raynauld JP, Buckland-Wright C, Ward R, et al. Safety and efficacy of long-term intraarticular steroid injections in osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2003;48(2):370-377.
192. Hunter DJ. Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med.* 2015;372(11):1040-1047.
193. Colen S, Van Den Bekerom MPJ, Mulier M, Haverkamp D. Hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis with emphasis on the efficacy of different products. *BioDrugs.* 2012;26(4):257-268.
194. Arrich J, Piribauer F, Mad P, Schmid D, Klaushofer K, Müllner M. Intra-articular hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis of the knee: systematic review and meta-analysis. *CMAJ.* 2005;172(8):1039-1043.
195. Moreland LW. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(2):54.
196. Crawford RW, Murray DW. Total hip replacement: indications for surgery and risk factors for failure. *Ann Rheum Dis.* 1997;56(8):455-457.

197. Anitua E, Sánchez M, Orive G. Potential of endogenous regenerative technology for in situ regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(7-8):741-752.
198. Neustadt DH. Intra-articular injections for osteoarthritis of the knee. *Cleve Clin J Med.* 2006;73(10):897-911.
199. Görmeli G, Görmeli CA, Ataoglu B, Çolak C, Aslantürk O, Ertem K. Multiple PRP injections are more effective than single injections and hyaluronic acid in knees with early osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2017;25(3):958-965.
200. Kalamegam G, Memic A, Budd E, Abbas M, Mobasheri A. A comprehensive review of stem cells for cartilage regeneration in osteoarthritis. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1089:23-36.
201. Desando G, Cavallo C, Sartoni F, et al. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(1).
202. Toupet K, Maumus M, Luz-Crawford P, et al. Survival and biodistribution of xenogenic adipose mesenchymal stem cells is not affected by the degree of inflammation in arthritis. *PLoS One.* 2015;10(1).
203. Cosenza S, Ruiz M, Maumus M, Jorgensen C, Noël D. Pathogenic or Therapeutic Extracellular Vesicles in Rheumatic Diseases: Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived Vesicles. *Int J Mol Sci.* 2017;18(4).
204. Maumus M, Manferdini C, Toupet K, et al. Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. *Stem Cell Res.* 2013;11(2):834-844.
205. Basu J, Ludlow JW. Exosomes for repair, regeneration and rejuvenation. *Expert Opin Biol Ther.* 2016;16(4):489-506.
206. Hu GW, Li Q, Niu X, et al. Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells attenuate limb ischemia by promoting angiogenesis in mice. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1).
207. Vinatier C, Bouffi C, Merceron C, et al. Cartilage Tissue Engineering: Towards a Biomaterial-Assisted Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2009;4(4):318-329.
208. Aung A, Gupta G, Majid G, Varghese S. Osteoarthritic chondrocyte-secreted morphogens induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* 2011;63(1):148-158.



209. Mo X tao, Guo S chun, Xie H qi, et al. Variations in the ratios of co-cultured mesenchymal stem cells and chondrocytes regulate the expression of cartilaginous and osseous phenotype in alginate constructs. *Bone*. 2009;45(1):42-51.
210. Wu L, Leijten JCH, Georgi N, Post JN, Van Blitterswijk CA, Karperien M. Trophic effects of mesenchymal stem cells increase chondrocyte proliferation and matrix formation. *Tissue Eng - Part A*. 2011;17(9-10):1425-1436.
211. Wu L, Prins HJ, Helder MN, Van Blitterswijk CA, Karperien M. Trophic effects of mesenchymal stem cells in chondrocyte Co-Cultures are independent of culture conditions and cell sources. *Tissue Eng - Part A*. 2012;18(15-16):1542-1551.
212. Dai W, Hale SL, Kloner RA. Role of a paracrine action of mesenchymal stem cells in the improvement of left ventricular function after coronary artery occlusion in rats. *Regen Med*. 2007;2(1):63-68.
213. Gneocchi M, He H, Liang OD, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med*. 2005;11(4):367-368.
214. Chen TS, Lai RC, Lee MM, Choo ABH, Lee CN, Lim SK. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(1):215-224.
215. Yu XY, Geng YJ, Li XH, et al. The effects of mesenchymal stem cells on c-kit up-regulation and cell-cycle re-entry of neonatal cardiomyocytes are mediated by activation of insulin-like growth factor 1 receptor. *Mol Cell Biochem*. 2009;332(1-2):25-32.
216. Shabbir A, Zisa D, Suzuki G, Lee T. Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(6).
217. Sierra R, Wyles C, Houdek M, Behfar A. Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: current perspectives. *Stem Cells Cloning Adv Appl*. Published online 2015:117.
218. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-228.
219. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (80- )*. 1999;284(5411):143-147.
220. Alvarez-Viejo M, Menendez-Menendez Y, Blanco-Gelaz MA, et al. Quantifying Mesenchymal Stem Cells in the Mononuclear Cell Fraction of

- Bone Marrow Samples Obtained for Cell Therapy. *Transplant Proc.* 2013;45(1):434-439.
221. 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.* 2006;24(5):1294-1301.
222. Karystinou A, Dell'Accio F, Kurth TBA, et al. Distinct mesenchymal progenitor cell subsets in the adult human synovium. *Rheumatology.* 2009;48(9):1057-1064.
223. Ruetze M, Richter W. Adipose-derived stromal cells for osteoarticular repair: trophic function versus stem cell activity. *Expert Rev Mol Med.* 2014 May 9;16:e9.
224. Reinisch A, Etchart N, Thomas D, et al. Epigenetic and in vivo comparison of diverse MSC sources reveals an endochondral signature for human hematopoietic niche formation. *Blood.* 2015;125(2):249-260.
225. Mohamed-Ahmed S, Fristad I, Lie SA, et al. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):168.
226. Strioga M, Viswanathan S, Darinkas A, Slaby O, Michalek J. Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. *Stem Cells Dev.* 2012;21(14):2724-2752.
227. Siparsky P, Ryzewicz M, Peterson B, Bartz R. Arthroscopic treatment of osteoarthritis of the knee: Are there any evidence-based indications? *Clin Orthop Relat Res.* 2007;455:107-112.
228. Laupattarakasem W, Laopaiboon M, Laupattarakasem P, Sumananont C. Arthroscopic debridement for knee osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;(1).
229. Reichenbach S, Rutjes AW, Nüesch E, Trelle S, Jüni P. Joint lavage for osteoarthritis of the knee. *Cochrane database Syst Rev.* 2010;(5).
230. Dowsey MM, Gunn J, Choong PFM. Selecting those to refer for joint replacement: who will likely benefit and who will not? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2014;28(1):157-171.
231. Skou ST, Roos EM, Laursen MB, et al. A Randomized, Controlled Trial of Total Knee Replacement. *N Engl J Med.* 2015;373(17):1597-1606.

232. Namba RS, Paxton L, Fithian DC, Stone M Lou. Obesity and perioperative morbidity in total hip and total knee arthroplasty patients. *J Arthroplasty*. 2005;20(7 Suppl 3):46-50.
233. Zeni JA, Axe MJ, Snyder-Mackler L. Clinical predictors of elective total joint replacement in persons with end-stage knee osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010;11.
234. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
235. Kuroda K, Kabata T, Hayashi K, et al. The paracrine effect of adipose-derived stem cells inhibits osteoarthritis progression. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015;16(1).
236. Desando G, Cavallo C, Sartoni F, et al. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(1).
237. Toghraie FS, Chenari N, Gholipour MA, et al. Treatment of osteoarthritis with infrapatellar fat pad derived mesenchymal stem cells in Rabbit. *Knee*. 2011;18(2):71-75.
238. Manferdini C, Maumus M, Gabusi E, et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Exert Antiinflammatory Effects on Chondrocytes and Synoviocytes From Osteoarthritis Patients Through Prostaglandin E2. *Arthritis Rheum*. 2013;65(5):1271-1281.
239. Jin R, Shen M, Yu L, Wang X, Lin X. Adipose-Derived Stem Cells Suppress Inflammation Induced by IL-1 $\beta$  through Down-Regulation of P2X7R Mediated by miR-373 in Chondrocytes of Osteoarthritis. *Mol Cells*. 2017;40(3):222.
240. Zhou J, Wang Y, Liu Y, Zeng H, Xu H, Lian F. Adipose derived mesenchymal stem cells alleviated osteoarthritis and chondrocyte apoptosis through autophagy inducing. *J Cell Biochem*. 2019;120(2):2198-2212.
241. Mei L, Shen B, Ling P, et al. Culture-expanded allogenic adipose tissue-derived stem cells attenuate cartilage degeneration in an experimental rat osteoarthritis model. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176107.
242. Tuli R, Tuli S, Nandi S, et al. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem*. 2003;278(42):41227-41236.
243. Zhou Q, Zhang JH, Yuan S, et al. A New Insight of Kartogenin Induced the Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Selectively Differentiate into Chondrocytes

- by Activating the Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP-7)/Smad5 Pathway. *Med Sci Monit.* 2019;25:4960-4967.
244. Jing H, Zhang X, Gao M, et al. Kartogenin preconditioning commits mesenchymal stem cells to a precartilaginous stage with enhanced chondrogenic potential by modulating JNK and  $\beta$ -catenin-related pathways. *FASEB J.* 2019;33(4):5641-5653.
245. Mei L, Shen B, Ling P, et al. Culture-expanded allogenic adipose tissue-derived stem cells attenuate cartilage degeneration in an experimental rat osteoarthritis model. *PLoS One.* 2017;12(4).
246. Dragoo JL, Chang W. Arthroscopic Harvest of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells From the Infrapatellar Fat Pad. *Am J Sports Med.* 2017;45(13):3119-3127.
247. Neri S, Guidotti S, Lilli NL, Cattini L, Mariani E. Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stromal cells from osteoarthritis patients: In vitro genetic stability and replicative senescence. *J Orthop Res.* 2017;35(5):1029-1037.
248. Liao HJ, Chang CH, Huang CYF, Chen HT. Potential of Using Infrapatellar–Fat–Pad–Derived Mesenchymal Stem Cells for Therapy in Degenerative Arthritis: Chondrogenesis, Exosomes, and Transcription Regulation. *Biomolecules.* 2022;12(3).
249. Lopa S, Colombini A, Stanco D, de Girolamo L, Sansone V, Moretti M. Donor-matched mesenchymal stem cells from knee infrapatellar and subcutaneous adipose tissue of osteoarthritic donors display differential chondrogenic and osteogenic commitment. *Eur Cells Mater.* 2014;27:298-311.
250. Xu T, Wu M, Feng J, Lin X, Gu Z. RhoA/Rho kinase signaling regulates transforming growth factor- $\beta$ 1-induced chondrogenesis and actin organization of synovium-derived mesenchymal stem cells through interaction with the Smad pathway. *Int J Mol Med.* 2012;30(5):1119-1125.
251. Lopa S, Colombini A, Sansone V, Preis FW, Moretti M. Influence on chondrogenesis of human osteoarthritic chondrocytes in co-culture with donor-matched mesenchymal stem cells from infrapatellar fat pad and subcutaneous adipose tissue. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2013;26(1 Suppl):23-31.
252. Mak CCH, To K, Fekir K, Brooks RA, Khan WS. Infrapatellar fat pad adipose-derived stem cells co-cultured with articular chondrocytes from osteoarthritis patients exhibit increased chondrogenic gene expression. *Cell Commun Signal.* 2022;20(1).
253. Koizumi K, Ebina K, Hart DA, et al. Synovial mesenchymal stem cells from osteo- or rheumatoid arthritis joints exhibit good potential for cartilage repair

- using a scaffold-free tissue engineering approach. *Osteoarthr Cartil.* 2016;24(8):1413-1422.
254. Tao SC, Yuan T, Zhang YL, Yin WJ, Guo SC, Zhang CQ. Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model. *Theranostics.* 2017;7(1):180-195.
  255. Hatakeyama A, Uchida S, Utsunomiya H, et al. Isolation and Characterization of Synovial Mesenchymal Stem Cell Derived from Hip Joints: A Comparative Analysis with a Matched Control Knee Group. *Stem Cells Int.* 2017;2017.
  256. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 2005;52(8):2521-2529.
  257. Zhang F, Su K, Fang Y, Sandhya S, Wang DA. A mixed co-culture of mesenchymal stem cells and transgenic chondrocytes in alginate hydrogel for cartilage tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015;9(1):77-84.
  258. Kubosch EJ, Heidt E, Bernstein A, Böttiger K, Schmal H. The trans-well coculture of human synovial mesenchymal stem cells with chondrocytes leads to self-organization, chondrogenic differentiation, and secretion of TGF $\beta$ . *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1).
  259. Tabas I. Cholesterol in health and disease. *J Clin Invest.* 2002;110(5):583-590.
  260. Mishra S, Somvanshi PR, Venkatesh K V. Control of cholesterol homeostasis by entero-hepatic bile transport – the role of feedback mechanisms. *RSC Adv.* 2014;4(103):58964-58975.
  261. Pan J, Tristram-Nagle S, Nagle JF. Effect of cholesterol on structural and mechanical properties of membranes depends on lipid chain saturation. *Phys Rev E - Stat Nonlinear, Soft Matter Phys.* 2009;80(2):021931.
  262. Holthuis JCM, Menon AK. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature.* 2014;510(7503):48-57.
  263. Evans E, Rawicz W. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Phys Rev Lett.* 1990;64(17):2094-2097.
  264. Yang ST, Kreuzberger AJB, Lee J, Kiessling V, Tamm LK. The role of cholesterol in membrane fusion. *Chem Phys Lipids.* 2016;199:136-143.
  265. Roma MG, Toledo FD, Boaglio AC, Basiglio CL, Crocenzi FA, Sánchez Pozzi EJ. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: linking action mechanisms to therapeutic applications. *Clin Sci.* 2011;121(12):523-544.

266. Arai Y, Choi B, Kim BJ, et al. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) counters osteoarthritis by regulating intracellular cholesterol levels and membrane fluidity of degenerated chondrocytes. *Biomater Sci.* 2019;7(8):3178-3189.
267. Liu C, Cao Y, Yang X, Shan P, Liu H. Tauroursodeoxycholic acid suppresses endoplasmic reticulum stress in the chondrocytes of patients with osteoarthritis. *Int J Mol Med.* 2015;36(4):1081-1087.
268. Kang H, Park YK, Lee JY. Nicotinamide riboside, an NAD + precursor, attenuates inflammation and oxidative stress by activating sirtuin 1 in alcohol-stimulated macrophages. *Lab Invest.* 2021;101(9):1225-1237.
269. Vannini N, Campos V, Girotra M, et al. The NAD-Booster Nicotinamide Riboside Potently Stimulates Hematopoiesis through Increased Mitochondrial Clearance. *Cell Stem Cell.* 2019;24(3):405-418.e7.
270. Jerry Kaneko J. Porphyrins and the Porphyrrias. *Clin Biochem Domest Anim.* Published online January 1, 2008:241-258.
271. Braza-Boils A, Ferrándiz ML, Terencio MC, Alcaraz MJ. Analysis of early biochemical markers and regulation by tin protoporphyrin IX in a model of spontaneous osteoarthritis. *Exp Gerontol.* 2012;47(5):406-409.
272. Arvayo AL, Imbrie-Moore A, Levenston ME. Rapid and durable photochemical bonding of cartilage using the porphyrin photosensitizer verteporfin. *Osteoarthr Cartil.* 2019;27(10):1537.
273. Dietze A, Berg K. ALA-induced porphyrin formation and fluorescence in synovitis tissue: In-vitro and in vivo studies. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005;2(4):299-307.
274. Braza-Boils A, Alcaraz MJ, Ferrándiz ML. Regulation of the inflammatory response by tin protoporphyrin IX in the rat anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis. *J Orthop Res.* 2011;29(9):1375-1382.
275. Vassilopoulou-Sellin R, Rey-Bear N, Oyedeki CO. Bilirubin as an inhibitor of cartilage metabolism: Effect on avian chondrocyte proliferation in cell culture. *J Bone Miner Res.* 1990;5(7):769-774.
276. Theriault A, Chao JT, Gapor A. Tocotrienol is the most effective vitamin E for reducing endothelial expression of adhesion molecules and adhesion to monocytes. *Atherosclerosis.* 2002;160(1):21-30.
277. Ozkan FU, Uzer G, Türkmen I, et al. Intra-articular hyaluronate, tenoxicam and vitamin E in a rat model of osteoarthritis: evaluation and comparison of chondroprotective efficacy. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(1):1018.

278. Rhouma M, El Warrak A de O, Troncy E, Beaudry F, Chorfi Y. Anti-inflammatory response of dietary vitamin E and its effects on pain and joint structures during early stages of surgically induced osteoarthritis in dogs. *Can J Vet Res.* 2013;77(3):191.
279. Chin KY, Wong SK, Sidik FZJ, et al. The Effects of Annatto Tocotrienol Supplementation on Cartilage and Subchondral Bone in an Animal Model of Osteoarthritis Induced by Monosodium Iodoacetate. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(16).
280. Chin KY, Ima-Nirwana S. The role of vitamin E in preventing and treating osteoarthritis - A review of the current evidence. *Front Pharmacol.* 2018;9(AUG).
281. Derfoul A, Miyoshi AD, Freeman DE, Tuan RS. Glucosamine promotes chondrogenic phenotype in both chondrocytes and mesenchymal stem cells and inhibits MMP-13 expression and matrix degradation. *Osteoarthr Cartil.* 2007;15(6):646-655.
282. Shikhman AR, Brinson DC, Valbracht J, Lotz MK. Differential metabolic effects of glucosamine and N-acetylglucosamine in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(8):1022.
283. O'Sullivan C, Dev KK. Galactosylsphingosine (psychosine)-induced demyelination is attenuated by sphingosine 1-phosphate signalling. *J Cell Sci.* 2015;128(21):3878-3887.
284. Liu W, Cui Z, Wang Y, et al. Elevated expression of  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase-I in cartilage and synovial tissue of patients with osteoarthritis. *Inflammation.* 2012;35(2):647-655.
285. Wang H, Huang Y, Bao P, Wu J, Zeng G, Hu X.  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase-I protects chondrocytes against TNF-induced apoptosis by blocking the TLR4 signaling pathway. *Am J Transl Res.* 2019;11(7):4358.

## 8. EKLER

### 10.1. EK-1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu

#### ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

##### *Hekim Beyanı*

Katıldığımız çalışma bilimsel nitelikte bir araştırma olup, araştırmanın konusu kıkırdak hücresi iyileşmesinde kullanılan ve farklı dokulardan elde edilmiş mezenkimal kök hücre tedavilerinin farklılıklarını araştırmaktır. Araştırmanın ismi “Sinoviyum ve Yağ Dokusundan Elde Edilen Allojenik Mezenkimal Kök Hücrelerin Normal ve Osteoartritli Kondrosit Hücre Hatları Üzerine Olan Etki ve Etki Mekanizmasının *In vitro* Ortamda İncelenmesi”dir.

Bu amaç doğrultusunda çalışma kapsamında;

- Ameliyat sırasında çıkartılan ve çöpe atılacak dokulardan mezenkimal kök hücre elde edilecek,
- Elde edilen kök hücreler sağlıklı ve osteoartritli kondrositlerle aynı kültür ortamına konulacak,
- Sinoviyum ve yağ dokulardan elde edilmiş mezenkimal kök hücrelerin kondrositler üzerindeki etkileri ve bu etkinin hangi mekanizma üzerinden olduğu karşılaştırılıp, değerlendirilecektir.

Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Araştırmada yer almak tamamen isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel bir duruma yol açmayacaktır. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir. Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır, sizden veya



bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir. Bu çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Ortopedi ve Travmatoloji bölümünde ameliyat olacağınız için davet edilmektesiniz.

Çalışmaya katılmayı kabul ederseniz, ameliyatınız sırasında size uygulanacak işlem gereği vücudunuzdan uzaklaştırılacak ve çöpe atılacak olan diz eklemine bulunan yumuşak doku (sinoviyum), cilt ve diz kapağı kemiği (patella) altı yağ dokularınız kullanılacaktır. Daha sonra bu dokular Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na götürülecektir. Burada alınan dokudan mezenkimal kök hücre elde edilip çalışma için kullanılacaktır. Eğer çalışmaya dahil olursanız çalışma merkezini ziyaret etmeniz veya ameliyatınız sonrası doktorunuzun uygun gördüğü kontroller dışında ek bir başvuruda bulunmanız gerekmemektedir. Çalışma dahil olmanız halinde size fazladan bir işlem yapılmayacak olup, çalışmaya katılmanız sizde fazladan bir istenmeyen durum riski oluşturmayacaktır. Çalışma kapsamında sizinle ilgilenen doktorunuz çalışma süresince sizin çalışmaya katılımınızı etkileyebilecek her bilgiyi sizinle paylaşacaktır. Ayrıca çalışmadan istediğiniz zaman ayrılabilirsiniz.

Çalışmadan ayrıldıktan sonra dahi istediğiniz zaman çalışma doktorunuz ile iletişime geçebilir, çalışma süresince yeni bir bilgi bulunup bulunmadığını sorabilirsiniz. Bu çalışmanın konusuyla ilgili ve sizin çalışmaya katılmaya devam etme isteğinizi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde siz veya yasal temsilciniz zamanında bilgilendirilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da araştırma ile ilgili herhangi bir sorunda Hacettepe Üniversitesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Prof. Dr. Egemen TURHAN'a 0312 305 12 09 ve Hacettepe Üniversitesi Spor Hekimliği Anabilim Dalı Dr. Levend KARAÇOBAN'a 0312 305 13 47 numaralı telefonlardan ulaşabilirsiniz. Size ait tüm bilgiler gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileri verilmeyecektir. Ancak, araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde sizin bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde size ait bilgilere, verilerin analizlerinden sonra ulaşabilirsiniz. Bu bilgiler başka bir çalışmada bilgileriniz gizli tutularak kullanılabilir.

### ***Hastanın Beyanı***

Hacettepe Üniversitesi Spor Hekimliği Anabilim Dalı'nda yürütülen araştırmaya başlamadan önce gerekli bilgileri okudum ve Dr. Levend KARAÇOBAN tarafından sözlü olarak dinledim. Bu bilgilerden sonra araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük bir özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımını sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına olmadığımı ve bana katılmam karşılığında herhangi bir ödeme yapılmayacağını biliyorum, ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim. Bu koşullar altında, vereceğim bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

**Katılımcı**

Adı, soyadı:

Tel.

**Gerekliyse Görüşme Tanığı**

Adı, soyadı:

Tel.

İmza

İmza:

**Gerekirse Yasal Temsilci**

Adı, soyadı:

Tel.

İmza:

Görüşmeyi yapan hekimin adı soyadı: Dr. Levend KARAÇOBAN

Adres: Hacettepe Üniversitesi Spor Hekimliği Anabilim Dalı,  
Sıhhiye/ANKARA

Tel. 0312 305 13 47

İmza: