

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**YAPAY NİŞ MİKROÇEVREDE DOKU GELİŞİM MODELİ
OLUŞTURULMASI**

Nuray EMİN

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2012**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

YAPAY NİŞ MİKROÇEVREDE DOKU GELİŞİM MODELİ OLUŞTURULMASI

Nuray EMİN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Genel olarak hücrel rejeneratif tedaviler, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının *in vitro* olarak kontrol edilebilmesi için *in vivo* niş şartlarının *in vitro* olarak uygulanabilmesi üzerine kurulmaktadır. Hücrel tedavilerde son yıllarda sıkça kullanılan kök hücreler, çevresindeki hücrel bileşenlerden ve desteklenen hücre tipi kaynaklı sinyallerden oluşmaktadır. Kök hücre nişi, kök hücreler ile buldukları dokudaki mikroçevrede yer alan yardımcı hücreleri veya hücrelerarası ortamdaki bileşenlerin birbirleriyle olan ilişkilerini tanımlamaktadır. Yürütülen bu tez çalışmasında model sistem olarak kıkırdak doku oluşumu (kondrogenez) seçilmiş olup, doku mühendisliği yaklaşımıyla kemik iliği mezankimal kök hücreleri (MKH) ve doğal yapılı hiyaluronik asit ve kollajenden hazırlanmış polimerik iskelelerin kullanımıyla yapay niş mikroçevrenin oluşturulmasına çalışılmıştır. Sıçan femur kemik iliğinden aseptik koşullarda izole edilen mezankimal kök hücreler, öncelikle iki boyutlu kültürlerde çoğaltılmıştır. Daha sonra MKH'ler üç boyutlu Hiyaluronik Asit-Kollajen iskele üzerine, 2%'lik hiyaluronik asit çözeltisi içerisinde süspanse edilerek ekilmiştir. TGF- β içeren kondrojenik kültür ortamında hiyaluronik asitin kontrollü yıkımını sağlamak için ortama hiyaluronidaz enzimi ilave edilmiştir. Kültür işlemi düzenli olarak faz kontrast mikroskobu ile takip edilmiş ve belirli zaman noktalarında yapılacak testler için örnekler alınmıştır. Hiyaluronik Asit-Kollajen iskele üzerinde kültüre edilen MKH'lerin farklılaşarak lakün içerisinde izogen hücre grupları oluşturmaktadır. Farklılaşarak kendi hücre dışı matrikslerini sentezlemeye başlayan hücreler, kondrositler gibi, tip-2 kollajen ve agrekan sentezlemektedir. Kültür işleminin farklı aşamalarında yapılan immünohistokimyasal testlerde, sentezlenen kollajen tip-2, tip-1 ve agrekan moleküllerinin oranı tespit edilerek, kondrogenezin bulunduğu aşama ve yönlendirilmiş kıkırdak tipi belirlenebilmektedir. Bu bulgulardan da yola çıkarak yürütülen kültür sistemleri arasında kıyaslama ve yorum yapılabilmektedir.

Ocak 2012, 103 sayfa

Anahtar Kelimeler: Mezankimal kök hücre, niş, mikroçevre, kıkırdak, kondrosit, hiyaluronik asit, kollajen, hiyaluronidaz, üç-boyutlu kültür, TGF- β .

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

GENERATION OF A TISSUE DEVELOPMENT MODEL INSIDE ARTIFICIAL NICHE MICROENVIRONMENT

Nuray EMIN

Ankara University
Institute of Science and Technology
Chemistry Department

Supervisor: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

The regenerative cellular therapies generally depend on implementation of the *in vivo* niche conditions at *in vitro* for controlling the cell proliferation and differentiation at *in vitro* conditions. The stem cells that were mostly used at cellular therapies had become cellular components around them and signals that were originated from supported cell type. The stem cell niche defines the stem cells with co-cells that were localized their microenvironment of the tissue or relationship of the components from intracellular environment. At this thesis, cartilage tissue formation (chondrogenesis) were selected as a model system and approach of tissue engineering, artificial niche microenvironment was attempted to create by using bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) and polymeric scaffold that was made of natural structure of hyaluronic acid and collagen. Firstly, the mesenchymal stem cells were aseptically isolated from patellar bone marrow of rat, had proliferated from monolayer culture. Then, MSCs that were suspended in 2% hyaluronic acid solution, were seeded on Hyaluronic acid-collagen scaffold. The chondrogenic medium consisted of TGF- β , Hyaluronidase was added into the culture medium for providing the controlled digestion of hyaluronic acid. At certain time points (1-4 weeks), cell/HA-collagen samples were removed from the culture plates for evaluating by some test. The mesenchymal stem cells that were cultured on hyaluronic acid-collagen scaffold formed isogen cell groups in lacuna by differentiating. The differentiated cells which were starting the production of their own extra cellular matrix, synthesize type 2 collagen and aggrecan like chondrocytes. The cultures stages and directed cartilages type were determined by using immunohistochemistry studies reevaluated that level of collagen type-I, collagen type-II and aggrecan. By using the test results, comparison and discussion can be made between culture systems.

January 2012, 103 pages

Key Words: Mesenchymal stem cell, niche, microenvironment, cartilage, chondrocyte, Hyaluronic acid, collagen, hyaluronidase, three-dimensional culture, TGF- β .

TEŞEKKÜR

Bu çalıŐmayı yürütmemde bilgileriyle bana yol gösteren ve gerekli tüm olanakları sağlayarak yürüttüğüm bu çalıŐmayı tamamlamamı sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'ne (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü), histoloji, immimünohistokimya ve DNA miktar tayini çalıŐmalarındaki katkılarından dolayı değerli hocam Doç. Dr. A. Eser ELÇİN'e (Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü), çalıŐmalarım sırasında desteklerini üzerimden hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşlarıma, annem Birsal EMİN'e ve babam Ramazan EMİN'e,

Ayrıca doktora öğrenimim süresince Doktora Burs Programı kapsamında tarafıma burs veren TÜBİTAK-BİDEP'e teşekkürlerimi sunarım.

Nuray EMİN

Ankara, Ocak 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1.GİRİŞ.....	1
1.1 Doku Mühendisliği.....	2
1.1.1 Otolog hücre nakli.....	3
1.1.2 Hücre-Polimer Modeli.....	3
2. KÖK HÜCRELER VE ÖZELLİKLERİ.....	5
2.1 Kök Hücrelerin Sınıflandırılması	5
2.1.1. Fetus kök hücreleri	8
2.1.2 Embriyonik kök hücreler.....	9
2.1.2.1 Hasta ile farklı genetik yapıya sahip olan EKH'lerin <i>in vitro</i> fertilizasyon ile eldesi	9
2. 1.2.2 Hasta ile aynı genetik yapıya sahip olan ekh'lerin elde edilmesi.....	10
2.1.2.3 EKH'lerin laboratuarda kültüre edilmesi	11
2.1.2.4 EKH'lerin farklılaşması	12
2.1.2.5 Uygulamada karşılaşılan zorluklar.....	13
2.1.3 Yetişkin (Somatik) kök hücreler	14
2.1.3.1 Hematopoetik kök hücreler	15
2.1.3.2 Mezankimal Kök Hücreler	16

2.1.3.3 Somatik kök hücrelerin farklılaşması.....	16
2.2 Plastisite	17
2.3 Kök Hücre İşaretleyicileri (Markerleri)	19
3 KÖK HÜCRELERDE NİŞ KAVRAMI	22
3.1 Niş'in Yapısı ve Anatomik Lokalizasyonu	23
3.1.1 Çok hücreli niş	24
3.1.2 Hücreli niş	25
3.2 Hematopoetik Kök Hücre Nişi	25
3.3 Mezankimal Kök Hücre Nişi	27
3.4 Niş ve Hücre Bölünmesi	28
3.5 Kök Hücre Nişi ve Kanser Üzerine Etkisi	28
4 HİYALURONİDAZ ve HİYALURONİK ASİT METABOLİZMASI.....	30
5 MODEL SİSTEM OLARAK KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ	33
5.1 Kıkırdak Dokusunun Yapısı	34
5.1.1 Kıkırdak hücreleri	34
5.2 Kıkırdak dokusunun gelişimi	35
5.3 Kıkırdak Dokusu Tedavi Yöntemleri	36
5.3.1 Doku Mühendisliği	37
5.3.2 Ortopedik ameliyatlar	37
5.4 Kondrojenezi Etkileyen Uyarıcı Moleküller	38
5.5 Hücre Dışı Matriks Molekülleri	40
5.5.1 Yapısal proteinler	41
5.5.1.1 Kollajen lifler	41
5.5.2 Özelleşmiş proteinler	43

5.5.3	Proteoglikanlar	44
5.5.3.1	Agrekan	45
5.6	HDM Moleküllerinin Kıkırdak Dokusu İçin Önemi	46
5.7	HDM Moleküllerinin <i>In Vitro</i> Kondrosit Kültürüne Etkisi	47
6.	MATERYAL ve METOT	49
6.1	Kimyasallar ve Reaktifler	49
6.2	Hyaluronik Asit Çözeltisinin Hazırlanması ve Kelatlaştırılması	50
6.3	Sodyum Alginat Çözeltisinin Hazırlanması ve Kelatlaştırılması	51
6.4	Kitosan Çözeltisinin Hazırlanması ve Kelatlaştırılması	52
6.5	Hyaluronik Asit Kürelerinin Alginat ve Kitosan ile Kaplanması	52
6.6	Kollajen-Hyaluronik Asit İskelelerin Hazırlanması	52
6.7	Hücre Kaynağı ve İzolasyonu	53
6.8	Hücre Kültürü	54
6.9	HA'nın Degradasyon Hızının Ölçülmesi	55
6.10	Toplam DNA Miktarının Ölçülmesi	55
6.11	Kültür Ortamındaki Serbest GAG ile Matris Yapı İçerisindeki GAG Miktarının Tayini	57
6.12	Faz-Kontrast Mikroskobu ile Hücrelerin Takibi	57
6.13	Mitokondriyal Dehidrojenaz Aktivitelerinin Belirlenmesi	58
6.14	Histoloji ve İmmünohistokimya	59
6.14.1	Histokimya	59
6.14.1.1	Safranin-O boyaması.....	60
6.14.1.2	Alsiyan mavisi ile boyama.....	61
6.14.2	İmmünohistokimya	62
6.15	SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Analizi.....	63

6.16 FT-IR Analizi	63
7. ARAŞTIRMA BULGULARI	64
7.1 İzolasyon ve Hücre Sayımı	64
7.2 Faz-Kontrast Mikroskobu İncelemeleri	64
7.3 Hücre morfolojisi	66
7.4 Kondrojenik Farklılaşmanın Belirlenmesi	67
7.5 Mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesinin Tespiti (MTT testi)	69
7.6 Toplam DNA Miktarının Ölçülmesi	71
7.7 Kültür Ortamındaki Serbest Hiyaluronik Asit Miktarının Tayini	71
7.8 GAG Miktarının Tayini	73
7.9 FT-IR Bulguları	74
7.10 Histokimya	77
7.11 İmmünohistokimya Boyamaları	79
7.12 SEM Görüntüleri	81
8. TARTIŞMA ve SONUÇ	84
8.1 Yapay Niş Mikroçevre Tasarımında Hiyaluronik Asit ve Hiyaluronidazın Önemi.....	87
8.2 Kondrojenik İndüksiyonun Etkisi.....	90
8.3 Üç-Boyutlu Ortamın Önemi.....	90
8.4 Genel Değerlendirme.....	93
KAYNAKLAR.....	97
ÖZGEÇMİŞ.....	101

KISALTMALAR

HDM	Hücre dışı matriks
HA	Hiyalüronik asit
HDZ	Hiyalüronidaz
Kol	Kollajen
GAG	Glikozaminoglikan
MMP	Matriks metallo proteazları
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü
SDS	Sodyumdodesisülfat
PBS	Tuzlu fosfat tamponu
TPP	Soyum-tri-polifosfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Kök hücrelerin sınıflandırılması.....	5
Şekil 2.2 Pluripotent kök hücrelerin blastosist ve fetustan elde edilmesi.....	9
Şekil 2.3 Hematopoetik ve mezanşimal kök hücrelerin farklılaşması.....	17
Şekil 3.1 Çok hücreli nişin şematik gösterimi.....	24
Şekil 3.2 Hüresiz (HDM) nişin yapısı.....	25
Şekil 3.3 Kemik iliği HKH nişi.....	26
Şekil 4.1 Hyaluronik asitin kimyasal yapısı.....	30
Şekil 5.1 Hiyalin kıkırdak dokusu	34
Şekil 5.2 a. Mezenkimal hücreler, b. Mezenkimal hücrelerin farklılaşması ile oluşan kondroblastlar, c. Kondroblastlar kendi HDM'lerini sentezlemeye başlayarak birbirlerinden uzaklaşmaya başlar ve olgunlaşarak kondrositleri oluşturur, d. Kondrositler kendi lakünleri içerisinde çoğalarak izogen hücre gruplarını oluşturur (Junqueira vd..1993).....	35
Şekil 5.3 Kıkırdak dokusunun yapısı ve HDM bileşimi.....	41
Şekil 6.1 HA-Kollajen iskele üzerinde MKH kültürünün şematik gösterimi.....	54
Şekil 6.2 MTT'den formazan oluşumunun reaksiyon denklemi.....	58
Şekil 7.1 2-Boyutlu kültürde MKH (A,B) 3. gün, (C,D) 7. gün. Ölçü çubukları 100 µm	65
Şekil 7.2 Kondrojenik indüksiyon uygulanmış alginat kaplı HA-MKH kültürü (A) 0.gün. Ölçü Çubuğu 5 mm (B) 7. gün. Ölçü çubuğu 1 mm.....	65
Şekil 7.3 HA içerisinde tutuklanmış ve kondrojenik indüksiyon uygulanmış MKH, 1. gün. Ölçü çubukları 50 µm.....	66
Şekil 7.4 Kondrojenik İndüksiyon sonucu HA küre içerisinde hücrelerin genel görünümü ve lakun oluşumu. HDZ içeren kültür ortamı (A) 2. gün ve (B): 3 gün, HDZ içermeyen kültür (C) 5. gün ve (D) 7. gün. Ölçü çubukları 100 µm... ..	67

Şekil 7.5 Kollajen-HA polimerik iskele üzerinde kondrojenik induksiyon uygulanmış, MKH kültürü (A) 3. gün (ölçü çubuğu 50 µm), (B) 7. gün (ölçü çubuğu 100 µm), (C) 7. gün ve (D) 28. gün. Ölçü çubukları 5 mm.....	68
Şekil 7.6 MKH-HA-kollajen kültürüne, 570 nm’de spektrofotometrik olarak yapılan MTT analiz sonuçları.....	69
Şekil 7.7 HA-MKH kültürü 7. gün MTT testi sonucu formazan kristallerinin görünümü (A) Ölçü çubuğu 1 mm (B) Ölçü çubuğu 1 mm. HA-Kollajen matriks yapıda MKH kültürü (C) 14. gün ve (D) 21. gün. Ölçü çubukları 100 µm.....	70
Şekil 7.8 MKH-HA-kollajen iskele kültüründeki DNA miktarının günlere göre değişimi.....	71
Şekil 7.9 HA standart grafiği.....	72
Şekil 7.10 HA standart grafiği kullanılarak bulunan vasattaki serbest HA değerleri (ng/ml).....	72
Şekil 7.11 GAG standartlarının kütle-absorbans grafiği (650 nm).....	73
Şekil 7.12 Kültür Ortamındaki çözünmüş GAG miktarı ile hücre-polimer yapısındaki GAG miktarı.....	74
Şekil 7.13 Hiyaluronik asit ve kollajenin kimyasal yapısı.....	75
Şekil 7.14 Kollajenin FT-IR grafiği	75
Şekil 7.15 HA’nın FT-IR Spektrumu. 1738 cm ⁻¹ de COO- bağ gerilimini göstermektedir.....	76
Şekil 7.16 HA-Kollajen polimerik yapının FT-IR spektrumu. 1075 cm ⁻¹ de ester bağını oluşumu göstermektedir.....	76
Şekil 7.17 HA-Kollajen matriks yapıda MKH kültürünün alsian mavisi ile boyama sonucu (A) 7. gün (B) 14. gün (C) 21. gün ve (D) 28. gün.....	77
Şekil 7.18 HA-Kollajen matriks yapıda MKH kültürünün Safranin-O ile boyama sonucu (A) 7. gün (B) 14. gün (C) 21. gün ve (D) 28. gün.....	78
Şekil 7.19 Doğal kıkırdak dokusunun anti-kollajen tip-2 ile boyanması sonucu HDM’deki kollajen tip-2 liflerinin görünümü.....	79

Şekil 7.20 Kondrosit ekilmiş HA-kollajen kültürdeki anti-kollajen tip-1 antikorları ile 7. günde (A) ve (B) 28. gün.....	79
Şekil 7.21 Kondrosit ekilmiş HA-kollajen kültürdeki anti-kollajen tip-2 antikoru ile boyamaları. 7. günde (A), 14. gün (B), 21. gün (C) ve 28. gün (D). Ölçü Çubukları 100 µm.....	80
Şekil 7.22 Kondrosit ekilmiş HA-kollajen kültürdeki anti-agrekan antikoru boyamaları, 7. gün (A), 14. gün (B), 21. gün (C) ve 28. gün (D). Ölçü Çubukları 100 µm.....	81
Şekil 7.23 HA içerisinde tutuklanmış MKH kültürünün 13. günde SEM (taramalı yüzey mikroskobu) görüntüsü.....	82
Şekil 7.24 HA-Kollajen iskeleinin SEM (taramalı yüzey mikroskobu) görüntüsü. (A) Hücesiz HA-Kollajen İskele. HA-Kollajen İskele üzerinde kondrojenik indüksiyon uygulanmış MKH kültürü (B) 14. gün, (C) ve (D) 28. gün.....	83
Şekil 8.1 Oluşturulan yapay niş mikroçevre sisteminde oluşturulan kondrogenizasyon model sisteminden elde edilen sonuçların, embriyonik gelişim sırasındaki kıkırdak dokusu oluşumunu simgeleyen resimlerle kıyaslanması.....	96

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Kök hücrelerin buldukları dokular, özellikleri ve farklılaşma koşulları..	18
Çizelge 2.2 Bazı kök hücre yüzey markerleri ve çeşitli kaynaklardan elde edilen kök hücrelere olan etkileri.....	20
Çizelge 5.1 Kollajen tipleri ve bazı özellikleri.....	43
Çizelge 5.2 GAG'ların kompozisyonu, bağ dokusundaki dağılımı ve kollajen lifler ile olan ilişkisi	45

1. GİRİŞ

İlerleyen teknoloji ve buna bağılı olarak yapılan araştırmalar, tıp alanında yeni tedavi yöntemlerinin gelişmesine olanak sağlamaktadır. Doku hasarının yaşandığı hastalık ve travma durumlarında insan vücudunda ortaya çıkabilen eksiklik ve hasarların tedavisi, yerine göre otogreftler (hastanın kendisinden temin edilen), allogreftler (diğer insanlardan temin edilen), zenogreftler (hayvanlardan temin edilen) veya implant biyomalzemeler kullanılarak yapılabilmektedir (Thomson vd.1995).

Tedavi amaçlı olarak, otogreft kullanımı tedavilerde tercih edilen yol olmakla beraber, donör bölgede gözlenen kısmi doku ölümü, kullanılabilir donör dokunun çoğunlukla gerekenden az oluşu, cerrahi işlemlerin acı verici, zaman alıcı ve pahalı olması allogreftlere olan yönelimi arttırmaktadır (Ducheyne ve Qui 1999). Ancak, genetik farklılıklardan, hastalık bulaşma riskinden ve yerleştirilen grefte karşı oluşabilen immün tepki reaksiyonu gibi nedenlerden dolayı allogreftlerin kullanımında da kısıtlamalar bulunmaktadır (Cerroni vd. 2002). Zenogreftlerin kullanımı ise zoonosis riski ve ileri düzeyde immün tepki gibi nedenlerle çoğunlukla tercih edilmeyen bir seçenek olarak görölmektedir.

Transplantasyonlarda ve tamamen sentetik implant malzemelerin tedavi amaçlı kullanımında karşılaşılan zorluklar ve sınırlamalar, yeni bir rejeneratif tedavi yaklaşımı olan doku mühendisliğinin önem kazanmasına neden olmuştur (Langer vd. 2000). Bu yaklaşım, izole edilmiş memeli hücreleri ile bunları yapay mikroçevre olarak destekleyen polimerik yapıların ve yönlendirici moleküllerin kullanımıyla yeni doku organoidlerinin geliştirilmesi olarak basitçe tarif edilebilmektedir (Elçin 2003).

Doku mühendisliği çalışmalarında hücre kaynağı olarak somatik hücreler ya da son yıllarda çok değerli bir hücre kaynağı olarak ortaya çıkan kök hücreler kullanılmaktadır (Elçin 2004). Bunlar arasında, erişkin kökenli olan ve göreceli olarak daha kolay izolasyon ve ekspansiyon özelliği taşıyan kemik iliği Mezenkimal Kök Hücreleri *in vitro* çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Bu hücre kaynağı, doğrudan hastadan (otolog) veya diğer insan donörlerden (allogreft) temin edilmektedir. Hücrelerin, izolasyonlarının ardından uygun mikroçevrede çoğaltılarak istenilen doku tipine

farklılaştırılması gerekmektedir (Li vd. 2005). Ancak hücrelerin doğal ortamlarında lokalize oldukları niş mikroçevrenin, *in vitro* çalışmalarda tam olarak temin edilememesi uygulamada sıkıntılara yol açmaktadır.

Genel olarak hücresel rejeneratif tedaviler, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının *in vitro* olarak kontrol edilebilmesi için *in vivo* niş şartlarının *in vitro* olarak uygulanabilmesi üzerine kurulmaktadır.

Bu tez çalışmasında, yapay niş olarak hiyalüronik asit ile benzer yapıdaki doğal hidrojeller üzerine enzim etkisinin tespiti ve izole memeli kök hücrelerinin yönlendiriciler ve/veya büyüme faktörleri ile özelleştirilmiş vasat ortamında, yeniden düzenlenmesinin takip edilerek yapay mikroçevrede doku gelişim modeli oluşturulması amaçlanmıştır.

1.1 Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği son yıllarda biyoteknolojinin önemli bir alanı olarak hızlı bir gelişme göstermektedir. Biyomalzemelerdeki önemli gelişmeler, yeni hücre kültürü teknikleri, yeni bulunan ve önemi kanıtlanan büyüme faktörleri, hayati önem taşıyan nakledilebilir doku ve organların üretilebilmesi için yeni olanaklar sağlamaktadır (Vacanti ve Vacanti 1997).

Son yıllarda doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen doku organoidleri, uygulamada olan tedavilere alternatif olarak geliştirilmektedir. Doku mühendisliği yaklaşımıyla doku rejenerasyonu üzerlerinde çalışılan iki yöntem bulunmaktadır. Bunlardan birincisi; canlı ortamdan çeşitli tekniklerle (enzimatik/mekanik parçalama vb) izole edilen memeli hücrelerinin iki boyutlu (2B) hücre kültürü tekniğine göre laboratuvar ortamında çoğaltılarak kullanımı ve nakli (*hücre transplantasyonu*); ikincisiyse izole memeli hücrelerinin, üç-boyutlu (3B) biyobozunur destek malzemeleri üzerinde *in vitro* ya da *in vivo* olarak çoğaltılarak yeni doku organoidlerinin üretilmesi yöntemidir (*hücre-polimer modeli*).

1.1.1 Otolog hücre nakli

Hasarlı dokuyu yenilemek için somatik hücrelerin ya da progenitör (öncü) hücrelerin hasarlı bölgeye nakline “*hücre nakli*” adı verilmektedir. Bu tez çalışmasında model sistem olarak seçilen kıkırdak doku mühendisliği üzerine yapılan primer hücre nakli çalışmaları 1968 yılında başlamıştır. Ancak hücrelerin kendi hücre dışı matrikslerini (HDM) oluşturana kadar hasarlı bölgede tutunmasında karşılaşılan zorluklar nedeniyle başarı oranı %40’ın altında kalmıştır (Anonim 1999) .

İlk olarak 1987 yılında İsveç’te uygulanan otolog kondrosit transplantasyonu çalışmaları ile başlayan araştırmalar günümüzde, tamamen fonksiyonel olan yeni kıkırdak dokusunun çeşitli polimer iskeleler ve biyoreaktörler kullanılarak üretilmesi amacıyla yönelik olarak devam etmektedir.

1.1.2 Hücre-Polimer Modeli

Hücre naklinde, hücrelerin hasarlı bölgeye istenilen şekilde ve boyutta ulaştırılmaması durumunda yapılan çalışmanın hiçbir anlamı kalmamaktadır. Bu amaçla, hücre naklinde kullanılmak üzere oldukça yüksek düzeyde gözeneğe sahip destek materyallerinin kullanımını içeren hücre-polimer modeli geliştirilmiştir (Freed vd. 1994, Freed vd. 1994).

Hücre-polimer modelinde doğal dokudan elde edilen hücreler, sentetik ya da doğal yapıya sahip, biyolojik ortamda bozulan (biyobozunur) polimerik destek malzemeleri üzerine tohumlanmaktadır. Bu destek malzemeleri, *in vitro* olarak kültüre edilen hücrelerin, bağlanıp gelişebilmesi için gerekli olan yüzeyi sağlamaktadır. Ayrıca, hücrelerin kendi matrikslerini üretene kadar tutunabilecekleri bir çeşit yapay HDM görevi görmektedir (Temenoff ve Mikos 2000).

Kıkırdak dokusu üzerine yürütülen çalışmalarda, iki-boyutlu kültür ortamında hücrelerin dediferansiye olarak kendi fenotipik ve morfolojik özelliklerini kaybettiği

belirlenmiştir. Buna karşın üç-boyutlu ortamlarda yani polimer iskeletler ve dinamik kültür şartlarını sağlayan biyoreaktörlerde yürütülen kültürlerde, kondrositlerin dediferansiye olmadıkları ve kendi işlevlerine devam edebildikleri gözlenmiştir (Furukawa vd. 2003).

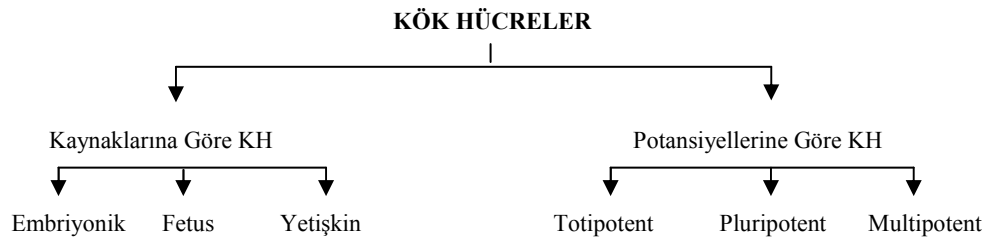
2. KÖK HÜCRELER VE ÖZELLİKLERİ

Kök hücreler, birçok dokuda bulunan ve gerektiğinde farklılaşarak dokuları oluşturma ya da tamir etme yeteneğine sahip hücrelerdir. Kök hücreler üzerine yapılan araştırmalar, bir organın tek bir hücreden nasıl geliştiği ve sağlıklı hücrelerin, yetişkin dokulardaki hasarlı hücrelerin yerini nasıl aldığı hakkında önemli bilgiler vermektedir. Yürütülen bu çalışmalar ışığında bilim adamları, genetik ve dejeneratif hastalıklar ile kazalar sonucu oluşan doku harabiyeti için hasarı yenileyen veya onaran tarzdaki tedavi olanakları üzerine araştırmalar yapmaktadır. Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran iki temel özellik vardır (Weissman *vd.*,2000). Bunlar :

1. Kök hücreler, uzun periyotlar süresince bölünerek kendilerini yenileyebilen, özel bir türe farklılaşmamış hücrelerdir.
2. Uygun *in vivo* veya *in vitro* koşullar altında özel fonksiyonlu hücrelere dönüşebilirler.

2.1 Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler potansiyellerine ve elde edildikleri kaynağa göre iki sınıf altında incelenebilmektedir (Şekil 2.1). Ancak bu sınıflar belirgin bir şekilde farklı olmayıp birbiriyle bağlantılı durumdadır.



Şekil 2.1 Kök hücrelerin sınıflandırılması

Yetişkin kök hücreler üzerine yürütülen çalışmalar, daha eski olmasına karşın, embriyonik kök hücre araştırmaları daha fazla umut vaat etmektedir. Bilim adamlarının 25 yılı aşkın bir süredir fare embriyonik kök hücreler üzerine yaptıkları çalışmalar ışığında, “insan embriyonik kök hücreleri (HESC)” olarak isimlendirilen insan kaynaklı ilk embriyonik kök hücreleri 1998 yılında laboratuvar ortamında elde edilmiştir.

Laboratuvarlarda kök hücreler üzerine yürütülen çalışmalarda öncelikle kök hücreleri, özel fonksiyonlu hücrelerden ayıran temel özellikler anlaşılmaya çalışılmıştır. Sonrasında yürütülen çalışmalarda da kök hücrelerin uzun periyotlar süresince kendilerini yenileyebilmeleri hususunda iki temel soru üzerinde durulmuştur. Bu kapsamda;

1. Embriyonik kök hücreler bir yıl ya da daha fazla süreyle laboratuvar ortamında farklılaşmadan çoğaltılabildikleri halde yetişkin kök hücrelerin çoğunun bu potansiyele sahip olmamasına etki eden faktörlerin belirlenmesi,
2. Canlı organizma içinde kök hücrelerin farklılaşmadan çoğalmalarını ve gerektiğinde özel fonksiyonlu hücrelere farklılaşmasını düzenleyen faktörlerin belirlenmesi, üzerine çalışmalar yürütülmektedir.

Bu soruların cevaplanması, normal embriyonik gelişme ve kansere neden olan anormal hücre bölünmeleri sırasında hücre çoğalmalarının nasıl düzenlendiğinin çözümlenmesinde önemli rol oynayacağı ve ayrıca embriyonik ve yetişkin kök hücrelerin laboratuvarlarda daha verimli olarak kültüre edilebilmeleri için yeni kültür tekniklerinin geliştirilmesine önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Kök hücrelerin önemli özelliklerinden bir diğeri de özel fonksiyonları yerine getirmesine izin veren özel doku yapılarına sahip olmamasıdır. Bir kök hücre kendisine komşu olan bir farklılaşmış hücre ile birlikte çalışmamaktadır. Örneğin, kalp kası hücreleri gibi vücuda kan pompalayamamakta, alyuvarlar gibi serumda oksijen moleküllerini taşıyamamakta ya da sinir hücreleri gibi vücuttaki hareket veya konuşmayı uyarıcı

sinyalleri diğer hücrelere iletememektedir. Ancak farklılaşmamış kök hücreler, uygun koşullarda özel fonksiyonlu somatik hücrelere dönüşebilmekte ve hasar görmüş hücrelerin yerini alabilmektedir .

Hücrelerin bir çok kez bölünerek çoğalmalarına “*proliferasyon*” denilmektedir. Kas, kan ve benzeri hücrelerin hiç biri normal olarak kendilerini yenileyemezken, kök hücreler bir çok kez kendilerini yenileyebilmekte ve yüksek proliferasyon özelliği göstermektedir (Weissman 2000). Laboratuarda bir kök hücre kültürünün başlatılmasından aylar sonra milyonlarca hücre elde edilebilmekte ve her kültür basamağındaki (pasajdaki) kök hücreler başlangıçtaki kök hücreler gibi farklılaşmadan çoğalmaya devam edebilmekte ya da ilerleyen pasajlarda bazı küçük değişimler gösterebilmektedir. Bu durum, kök hücrelerin uzun süre kendilerini yenileyebilme yeteneğinde olduğu göstermektedir.

Hücrelerin fenotipik ve morfolojik olarak özel fonksiyonlu başka bir hücreye dönüşmesine “*farklılaşma*” denilmektedir. Kök hücrelerin farklılaşma yetenekleri diğer somatik hücrelere göre daha fazla çeşitlilik göstermektedir. Bir kök hücrenin uygun koşullar altında birden fazla hücre tipine dönüşebilme yeteneğine “*plastisite*” denilmektedir (Vescovi *vd.* 2002). Kök hücrelerin yapısında ya da çevresinde bulunan bir takım faktörler ve sinyaller, hücrenin farklılaşmasına neden olmaktadır. Kök hücrenin yapısından kaynaklanan sinyaller, hücrede DNA üzerinde bulunan bir gen tarafından kontrol edilmekte, hücrenin tüm fonksiyonları ve yapısı bu gen tarafından kodlanmaktadır. Farklılaşma için çevresel sinyaller ise, niş ortamındaki diğer hücreler tarafından salgılanan kimyasalları, komşu hücreler ile fiziksel teması ve mikro çevresindeki belirli molekülleri içermektedir.

Kök hücre farklılaşmasında cevaplanması gereken bir çok soru bulunmaktadır. Bunlardan, hücre farklılaşması için genetik yapısından kaynaklanan etkilerin ya da çevresel faktörlerin tüm kök hücre türleri için benzer olup olmadığı ve spesifik sinyal setlerinin belirli hücrelerdeki ilerleyen farklılaşmayı tanımlamaya yeterliliğinin tespiti, hücreler arası farklılaşma yollarının aydınlatılması için kritik önem taşımaktadır. Söz konusu yolların tespitinin, rejeneratif tedavilerde, embriyonik evrenin taklit

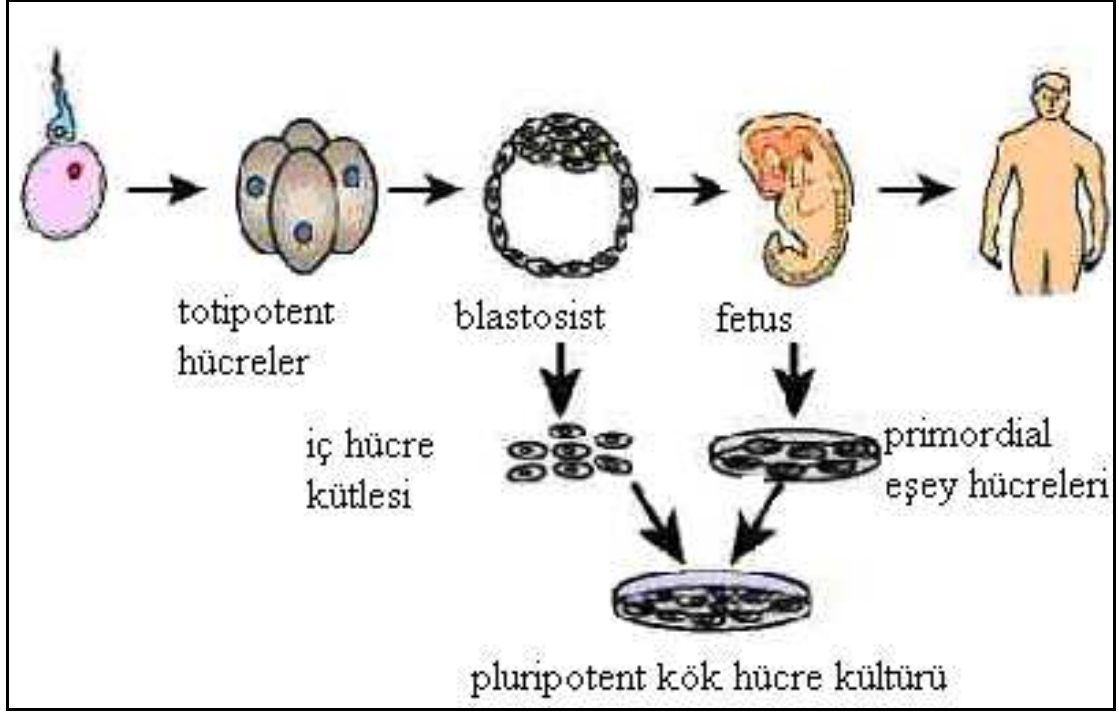
edilmesine ve kök hücrelerin istenilen hücre tipine *in vitro* kültür şartlarında farklılaştırılabilmesine olanak sağlayacak yeni tekniklerin geliştirilmesine hizmet edeceği düşünülmektedir.

Kök hücrelerin sınıflandırılmasında, kök hücrelerin potansiyellerine göre ayrımı kök hücrenin kaynağına göre değişim göstermektedir. Örneğin 4-5 günlük embriyodaki (blastokist) iç hücre külesinden elde edilen kök hücreler, vücuttaki endoderm, mezoderm ve ektodermden gelişen hücre tiplerinin bir çoğuna dönüşebilmektedir. Bu özelliğe sahip kök hücrelere “*pluripotent*” denir ve embriyonik kök hücreler pluripotent özellik göstermektedir. Embriyonun oluştuğu sıfırıncı günden, oluşan zigotun birkaç bölünme geçirmesine kadar olan evrede oluşan hücreler ise “*totipotent*” potansiyel göstermektedir ve teorik olarak vücuttaki tüm hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğini ifade etmektedir (Trounson *vd.* 2006).

Yetişkin kök hücreler genellikle içinde buldukları dokuların hücre tiplerine farklılaşmaktadır ve buldukları dokudaki hücrelerin yenilenmesinde ve hasar görmeleri durumunda bu hücrelerin tamir edilmesinde görev almaktadırlar. Bu özelliğe sahip hücrelere “*multipotent*” denilmektedir ve yetişkin kök hücreleri multipotent özellik göstermektedir. Örneğin, kemik iliğinde bulunan kan kök hücreleri eritrositlere, lökositlere ve trombositlere dönüşebilmektedir.

2.1.1 Fetus kök hücreleri

Fetus kök hücreleri, düşük ya da gebeliğin planlı şekilde sonlandırılması ile elde edilen fetustan izole edilmektedir. Özellikle, fetustaki eşey hücrelerinden yararlanılmaktadır. Bu hücreler embriyonik kök hücreler kadar olmasa da pluripotent potansiyel göstermektedir. Ancak, hem anneden hem de babadan gelen genetik özellikleri taşıdığı için terapötik klonlama ve kök hücre terapilerinde kullanılması durumunda nakledilen hastada immünolojik reaksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle uygulama alanı oldukça sınırlıdır



Şekil 2.2 Pluripotent kök hücrelerin blastosist ve fetusten elde edilmesi.

2.1.2 Embriyonik kök hücreler

Pre-embriyodan elde edilen kök hücrelere “*embriyonik kök hücre (EKH)*” denilmektedir. Embriyonik kök hücreler pluripotent potansiyel göstermektedir. İzole edilmeleri ve kültürlerde çoğaltılmaları diğer kök hücrelere oranla daha kolay olmaktadır (Yao *vd.*2006, Trounson 2006). Embriyonik kök hücreler rejeneratif tedavi sırasında hasta ile aynı genetik yapıda elde edilebileceği gibi hasta ile farklı genetik yapıda da elde edilebilmektedir. Bu bakımdan kök hücreler genetik yapılarına göre iki sınıfa ayırabilmektedir.

2.1.2.1 Hasta ile farklı genetik yapıya sahip olan ekh’lerin *in vitro* fertilizasyon ile eldesi

Bu işlem *in vitro fertilizasyon* kliniklerinde gerçekleştirilmektedir. Tüp bebek işleminin sonucunda kullanılmayan embriyolar, vericilerin izniyle EKH’lerin elde edilmesinde kullanılmaktadır. Bu işlem için embriyo *in vitro* koşullarda aktive edilerek, 4 – 6 gün süreyle geliştirilerek blastosist oluşması sağlanmaktadır.

Blastosist içi boş bir küre şeklindedir ve etrafını saran koruyucu tabaka trofoblast, içerisindeki (boşluk ya da oyuk) blastokul ve dip kısmında birikmiş olan iç hücre kütesinden (İHK) 3 kısımdan oluşmuştur. İHK yaklaşık 120 hücreden oluşmuştur ve bu hücrelerin büyük çoğunluğu pluripotent özelliğe sahipken, küçük bir kısmı totipotent özellik göstermektedir.

Bu yöntemle elde edilen EKH'lerin her iki ebeveynin genetik özeliğini taşıması tedavi amaçlı kullanımını çok kısıtlamaktadır. Bu nedenle bu yolla elde edilen kök hücreler daha çok laboratuvar araştırmalarında kullanılmaktadır.

2. 1.2.2 Hasta ile aynı genetik yapıya sahip olan EKH'lerin elde edilmesi

Hasta ile aynı genetik yapıya sahip embriyonik kök hücrelerin elde edilmesinde üç farklı yöntem izlenmektedir. Bunlar aşağıda özetlenmiştir.

Partenogenetik kök hücreler

Partenogenetik kök hücre elde etmek için henüz mayoz geçirmemiş olan diploid DNA'ya sahip bir yumurta hücresi çok düşük düzeyde elektrik sinyalleri ile aktive edilmekte ve bu şekilde yumurtanın döllenmiş gibi davranarak bölünmesi sağlanmaktadır. Bu şekilde elde edilen kök hücreler, mitokondriyal DNA'sı da değişmediği için, genetik olarak hasta ile birebir uyum içindedir.

Ooplazmik transfer

Ooplazmik transferin iki farklı uygulama şekli bulunmaktadır. Birincisi, bir yumurta hücresinin stoplazması çıkartılarak herhangi bir vücut hücresine nakledilmektedir. Bu şekilde vücut hücresi ilkel bir kök hücreye dönüştürülmektedir.

İkinci yöntemde ise, mitokondriyal DNA'sı hasarlı olan bir yumurta hücresinin çekirdeği, çekirdeği çıkartılmış sağlıklı başka bir yumurta hücresine nakledilmektedir.

Daha sonra *in vitro fertilizasyon* sonucunda EKH'ler elde edilmektedir. Ancak bu uygulama, kök hücre elde etmekten daha çok mitokondriyal DNA'sı hasarlı olan kadınların sağlıklı bir bebek sahibi olabilmesi için kullanılmaktadır.

Somatik hücre nükleer transferi (SCNT)

Somatik hücre nükleer transferi (SCNT), EKH'lerin izole edilmesinde kullanılan başka bir yöntemdir. Bu yöntem sayesinde, tek bir ebeveynin genetik özelliklerini taşıyan kök hücreler elde edilebilmektedir. Bu yöntem tam olarak terapötik klonlamayı işaret etmektedir. Bu yöntemde nükleusu çıkartılmış bir yumurta hücresi somatik hücre çekirdeği ile birleştirilmektedir. Sonra yumurta aktive edilerek bölünmesi sağlanmaktadır. Blastosist aşamasına gelindiğinde trofoblast parçalanarak İHK çıkartılmakta ve izole edilen kök hücreler *in vitro* olarak kültüre edilmektedir.

SCNT, yetişkin DNA klonlamasıyla aynı prosedürü takip etmektedir. Ancak embriyo blastosist aşamasındayken dış zarı kırılarak içersindeki kök hücreler çıkartılmakta ve kültürde farklılaştırılmadan çoğaltılmaktadır. Bu aşamada pre-embriyo öldüğü için yeni bir canlının oluşma olasılığı kalmamaktadır. Daha sonra gerekli düzenleyici faktörler ve kültür şartları kullanılarak bu kök hücrelerin *in vivo* ya da *in vitro* koşullarda istenilen doku türüne dönüşmesi sağlanır. Bu yeni dokular, genetik materyalin sahibi olan hastanın tedavisi için kullanılmaktadır.

2.1.2.3 EKH'lerin laboratuarda kültüre edilmesi

Laboratuarda hücrelerin yetiştirildiği ortama "*hücre kültürü*" denilmektedir. İHK'den izole edilen EKH'leri kültür ortamı da denilen, besleyici sıvıların bulunduğu bir plastik laboratuvar kabına yerleştirilmekte ve kabın yüzeyinde bölünerek etrafa yayılmaktadır. Kültür kabının iç yüzeyi, genellikle işlemden geçirilmiş ve artık bölünemeyecek olan fare deri fibroblast hücreleri ile kaplanmaktadır.

Fare hücreleri, İHK'deki hücrelerin kültür kabının dip kısmında tutunabilecekleri yapışkan bir yüzey sağlamaktadır. Ayrıca bu hücreler kültür ortamına besin salmaktadır. Son dönemlerde bilim adamları insan EKH'lerinin büyütülmesinde fare hücreleri dışında başka yollar tasarlamaya başlamıştır. Çünkü, fare hücreleri virüsler ile diğer makro molekülleri insan hücrelerine bulaştırma riski taşımaktadır.

Takip eden günlerde İHK hücreleri çoğalmaya ve kültür kabını doldurmaya başlamaktadır. Kültür kabı dolduğunda kök hücreler hassas bir şekilde yeni bir kültür kabına aktarılmaktadır. Bu işlem aylar boyunca sürekli olarak tekrarlanarak bir kök hücre soyu elde edilir ve bu hücre üretme yöntemine de “*alt kültüre etme işlemi*” denilmektedir.

Her alt kültür hücre döngüsüne başlamak, bir *pasaj* olarak ifade edilmektedir. 6 ay ya da daha fazla bir zaman sonunda başlangıçtaki ICM hücrelerinden milyonlarcası elde edilir. Bu hücreler farklılaşmadan çoğalmaya devam etmektedir ve bu şekilde bir EKH soyu elde edilmektedir. Elde edilen her alt kültür daha sonra kullanılmak üzere dondurularak saklanır.

2.1.2.4 EKH'lerin farklılaşması

EKH'ler kültürlerde yetiştirildiği süre zarfında farklılaşmaz. Ancak embriyonik body halinde birlikte kümeleşirlerse kendiliğinden farklılaşabilirler. Sağlıklı EKH kültürü içinde kendiliğinde farklılaşma iyi bir işaret olduğu halde spesifik hücre tipi kültürü elde etmek için iyi bir yol değildir.

Belirli bir hücre kültürü, EKH'lerin farklılaşması kontrol altında tutularak elde edilmektedir. Bu işlem için kültür ortamının kimyasal bileşimi ve kültür kabının yüzeyi değiştirilir ya da spesifik genlerin eklenmesi ile hücreler modifiye edilir. Kök hücrelerin özel hücre türlerine farklılaşması güvenli bir şekilde kontrol edilebildiğinde bu hücreler, bazı hastalıkların tedavisinde çok etkin bir şekilde kullanılabilir.

İnsan EKH'lerinin kullanılarak diyabet, Parkinson, omurilik zedelenmeleri (felç), Purkinje hücre dejenerasyonu, Duchenne kas dizanterisi, kalp hastalıkları, görme ve duyma kayıpları, Alzheimer, artrit ve çeşitli genetik bozuklukların tedavisi ile kaza veya hastalık sonucu hasar görmüş dokuların tamiri yapılabilmektedir.

2.1.2.5 Uygulamada karşılaşılan zorluklar

SCNT uygulamalarının temelini kök hücreler oluşturmaktadır. Gerekli olan kök hücrelerin elde edilmesinde ve sonrasında yürütülen aşamalarda bazı zorluklar ile karşılaşılmaktadır. Bunlar kısaca aşağıda sıralanmış olan maddelerde ifade edilmiştir.

1. Prosesin uygulanmasında karşılaşılan ilk problem kök hücrelerin izole edilerek farklılaştırılmadan kültüre edilmesidir. Kullanılacak olan kök hücrelerin hasta ile aynı genetik özelliklere sahip olması da gerekmektedir. Kullanımı uygun olan kök hücreler, yukarıda açıklandığı şekilde pre-embriyodan elde edileceği gibi hastanı kendi kemik iliği veya periferik kanından da elde edilebilmektedir.

2. Kök hücrelerin izolasyonunun ardından önemli olan, kök hücrelerin farklılaşmadan çoğaltılabilecekleri uygun kültür ortamının sağlanmasıdır. Kültür ortamında kök hücrelerden bir hücre soyu elde edilmektedir. Bu kültür ortamı ve gerekli ortam koşulları yapılan bir çok denemeler sonucunda bulunmuştur ve daha ılıman koşulların sağlanması için araştırmalar devam etmektedir. Meydana gelebilecek herhangi bir aksaklık sonucu kök hücreler, özel fonksiyonlu hücrelere farklılaşabilmekte veya kontamine olabilmektedir. Bu durumda elde edilen kök hücre kültürü kullanılamamaktadır.

3. Gerekli kök hücre soyu elde edildikten sonra bu kök hücrelerin hastaya ne şekilde uygulanacağı belirlenmelidir. Kök hücreler direkt olarak hastanın hasarlı dokularına nakledilecek ise; bu naklin nasıl gerçekleştirileceği tüm ayrıntıları ile tespit edilmelidir.

In vitro olarak laboratuvarda farklılaştırılacak ise; farklılaştırılması düşünülen doku tipini elde etmek için uygun büyüme faktörleri belirlenmelidir. Gerekli büyüme faktörleri ve ortam koşulları kök hücrelerin farklılaşması için çok önemlidir ve bu koşulların sağlanmasında bazı başarılı sonuçlar alınmasına karşın henüz pratik uygulamaların yapılabileceği aşamaya gelinememiştir.

4. Kök hücrelerin hastaya başarılı bir şekilde *in vivo* veya *in vitro* olarak uygulanmasından sonra vücut içerisinde bazı başka problemler çıkabilmektedir. Örneğin, uygulanan kök hücreler ilgili doku üzerine tam olarak entegre olamayabilmekte ve teratoma oluşumuna neden olabilmektedir. Bu benzeri sonuçların gerçekleşmesi uygulanan tedavinin başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olmaktadır.

Devam eden çalışmalar, bu ve benzeri sorunların aşılacak SCNT'nin etkin ve yaygın bir şekilde kullanılması doğrultusunda sürmektedir.

2.1.3 Yetişkin (somatik) kök hücreler

Vücut içerisindeki bir organ ya da doku içerisinde bulunan farklılaşmamış kök hücrelere *somatik kök hücre* denilmektedir. Bu hücrelerin kendilerini yenilebilme ve buldukları dokudaki hasarlı hücrelerin yerini almak üzere farklılaşma yeteneği bulunmaktadır. Yetişkin kök hücrelerin birincil görevi buldukları dokuyu korumak ve tamir etmektir.

Somatik kök hücreler yetişkin dokularda bulunmakla birlikte tam olarak kaynağı bilinmemektedir. Embriyonun ilk oluşumu sırasındaki puripotent kök hücreler dokuları oluşturmak üzere bölünmeye ve farklılaşmaya başlamaktadır. Doğum sonrasında farklılaşmasını tamamlamış olan pluripotent kök hücrelerden bazılarının belirli dokularda potansiyeli azalmış şekilde kalmasıyla somatik kök hücrelerin oluştuğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar beyinde, periferik kanda, kan damarlarında, deride, kemik iliğinde, iskelet kasında, karaciğerde somatik kök hücrenin varlığını göstermektedir.

Somatik kök hücreler üzerine yapılan çalışmalar, bu hücrelerin hastalık tedavilerinde kullanılabileceğini göstermiştir ve bu amaçla hematopoetik kök hücreler yaklaşık 40 yıldır çeşitli hastalık tedavilerinde kullanılmaktadır. Multipotent potansiyele sahip olan somatik kök hücreler uygun koşullarda sınırlı sayıda hücre türüne farklılaşabilmektedir. Somatik kök hücrelerin farklılaşması laboratuvar koşullarında kontrol edilebildiği takdirde bu hücrelerin, önemli hastalıkların tedavisinde temel hücre kaynak olarak kullanılabileceği tüm bilimsel çevrelerce kabul görmektedir.

2.1.3.1 Hematopoetik kök hücreler

Kök hücreler üzerine 1960'larda yürütülmeye başlanan çalışmalarda ilk olarak kemik iliği incelenmiştir. Yürütülen çalışmalarda kemik iliğinde iki farklı kök hücre türü olduğu tespit edilmiştir. Bu kök hücrelerin belirlenmesinde ilk olarak hematopoetik kök hücreler ve kısa bir süre sonra da mezankimal kök hücreler bulunmuştur.

Hematopoetik kök hücreler kan kök hücreleri olarak da isimlendirilmektedir. Canlı organizmasındaki tüm kan hücreleri hematopoetik kök hücreler tarafından üretilmektedir. Süregelen çalışmalar, bu hücrelerin başka tip hücrelere, örneğin karaciğer, damar ve kas hücrelerine de farklılaşabildiğini göstermektedir. Hematopoetik kök hücreler vücut içerisine daha çok kemik iliğinde daha az olarak da periferel kanda bulunmaktadır.

Ayrıca embriyoyu anneye bağlayan göbek kordonundaki kanda yoğun olarak hematopoetik kök hücre bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar her 10,000 – 15,000 kemik iliği hücresinden bir tanesinin ve her 100,000 periferel kan hücresinden bir tanesinin kök hücre olduğunu göstermektedir.

CD34, CD14, CD45 ve CD133HKM için tespit edilmiş önemli yüzey markerleridir. HKH'lerin farklılaşması çeşitli içsel ve çevresel sinyallerle düzenlenmekte ve mikroçevresinin tanımlanması sonucu HKH ile çevresi arasındaki etkileşimin dengede olmasının hücrenin davranışını düzenlediği bulunmuştur. Son yapılan çalışmalar ile

Wnt, Notch, kemik morfojenik protein (BMP), sonic hedgehog ve fibroblast büyüme faktörü'nün HKH hücre farklılaşmasını kontrol ettiği gösterilmiştir (Ross ve Li 2006, Li ve Li 2006).

2.1.3.2 Mezankimal kök hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH) genel olarak kemik iliğinde bulunmakla birlikte, kordon kanında, periferik kanda, fallov tüpünde, fetal karaciğer ve akciğer gibi dokularda da bulunmaktadır. Embriyonik evrede mezodermden gelişen mezankimal (stromal) kök hücreler multipotent özelliktedir ve vücutta hematopoetik kök hücrelerden daha az miktarda bulunmaktadır.

Morfolojik olarak, büyük bir çekirdeği ile uzun ince hücre gövdeleri bulunmaktadır. Diğer kök hücre tiplerinde olduğu gibi, MKH yüksek bir kendini yenileme kapasitesine sahiptir ve multipotent özelliği ile doku tamiri için çok büyük bir terapötik potansiyel göstermektedir (Pansky vd.2007). Mezenkimal kök hücreler bulunduğu dokudan, hasarlı bir dokuya geçebilmekte ve bu sayede hasarlı dokunun tamirini yapabilmektedir. Ayrıca, MKH multipotent özelliği sayesinde, kemik, kırıkta, yağ ve kardiyomiyositler de dahil olmak üzere çok sayıda fibröz dokulara farklılaşabilmekte ve bu özelliği sayesinde vücutta yaygın olarak kullanılabilir (Chen vd.2007).

2.1.3.3 Somatik kök hücrelerin farklılaşması

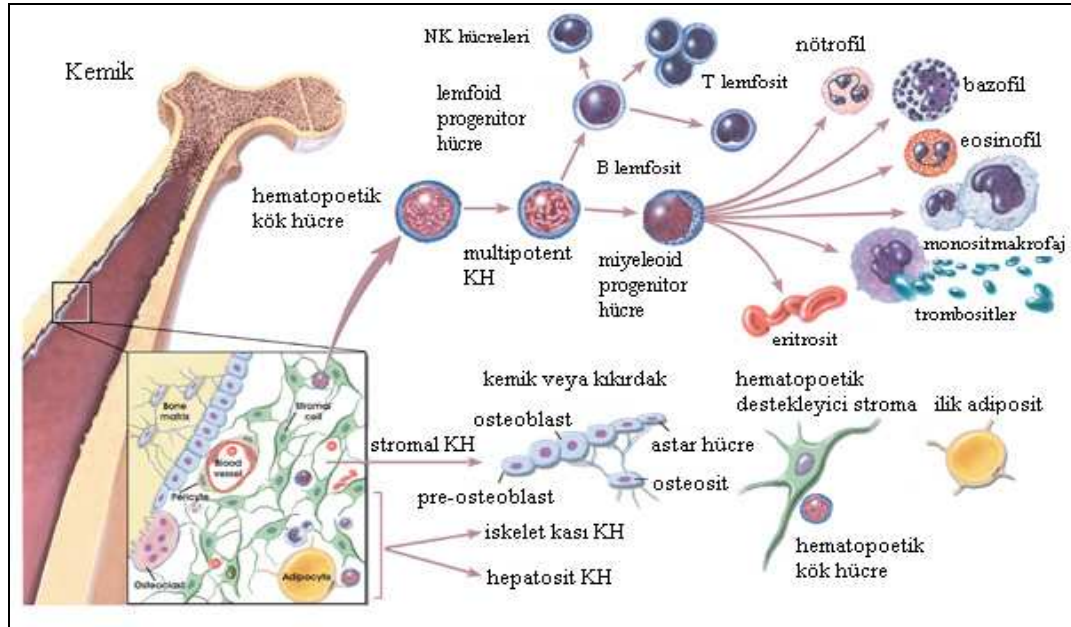
Yaşayan bir organizmadaki somatik kök hücreler, uzun periyotlar süresince bölünebilir ve bir dokuyu oluşturan, belirli şekil, yapı ile özel fonksiyona sahip olan hücrelere farklılaşabilirler. Somatik kök hücrelerin normal farklılaşma yollarına ilişkin bazı örnekler aşağıda sıralanmıştır.

1. Hematopoetik kök hücreler tüm kan hücrelerine farklılaşabilmektedir.

2. Kemik iliği mezankimal kök hücreleri mezoderm kaynaklı osteositlere, kondrositlere, adipositlere ve diğer fibröz dokular ile endodermeden kaynaklı hepatositler ile ektodermden kaynakla nöronlar da dahil olmak üzere farklı hücre tiplerine farklılaşabilmektedir.

2.2 Plastisite

Kök hücrelerin toplam hücre tipine dönüşebilme yeteneğine *plastisite* veya *transfarklılaşma* denilmektedir. Şekil 2.3'te bazı kök hücrelerin vücut içerisinde buldukları dokular ile farklılaşma koşulları gösterilmektedir.



Şekil 2.3 Hematopoetik ve mezanşimal kök hücrelerin farklılaşması

Bazı somatik kök hücrelerin plastisite özellikleri aşağıda sıralanmıştır:

1. Hematopoetik kök hücreler nöronlara, astrositlere, oligodendrositlere, karaciğer hücrelerine, kalp ve iskelet kası hücrelerine,
2. Mezankimal kök hücreler kalp ve iskelet kası hücrelerine,

3. Beyin kök hücreleri iskelet kası ve kan hücrelerine farklılaşabilmektedir.

Çizelge 2.1 Kök hücrelerin buldukları dokular, özellikleri ve farklılaşma koşulları

Doku Kaynağı	Hücre Tipi	Gelişen Hücre Tipi	Farklılaşma Koşulları	Karakterizasyon Metotları
Kemik İliği	Hematopoetik kök hücre (HKH)	Kalp Kası	Hasarlı fare kalbine etiketlenmiş HKH'ler enjekte edilir.	Yenilenen kalp hücrelerinde GFP'nin ölçümü. Kalp spesifik protein ve gen ekspresyonu ölçümü. Kalp fonksiyon testi.
	HKH	Trombosit Eritrosit Lökosit	Hematopoetik büyüme faktörleri : IL-3, IL-6, granülosit uyarıcı faktör, trombopoletin.	Hücre yüzey proteinleri için antikorların bulunması. Koloni oluşturma testi. İmmünofenotip.
	Mezansimal kök hücre (MKH)	Adiposit Kondrosit Osteoblast Tenosit	Deksometason D ₃ vitamini BMP – 2	Hücre yüzey proteinlerini bağlayıcı antikor bulunması. İmmünfloresan
	MKH	Astrosit Nöron	Epidermal büyüme faktörü. Beyinden elde edilen nörotropik faktör. β - merkaptotanol Retinoik asit	İmmünfloresan Hücre ayrılması
	MKH	İskelet kası	5-azasitidin ve Amfoterik B	Miyotublerin incelenmesi ve Miyositlerin işaretlenmesi
	MHK/HKH	Hepatosit	Karaciğer hücrelerinin çoğalmasının durması. Karaciğerde hasar oluşumu. Kemik iliği nakli.	Hücrelerin işaretlenmesi Hücre yüzey markerlerine antikorların etiketlenmesi
Embriyo-Blastosist-	Embriyonik kök hücre (ES) İHK	Adiposit	Retinoik asit, insülin, T3 (tiroid hormon), lösemi inhibitör faktörü (LIF).	Adiposit farklılaşması izlenir Adiposit enzim aktivitesi ölçümü. Adiposit spesifik gen ekspresyon ölçümü.
	ES	Astrosit oligodendrosit	Retinoik asit, fetal buzağı serumu (%10), β -merkaptotanol	Nöral spesifik hücre proteinleri için antikorlar ve Sitokimya
Primordial germhücreleri		Endoderm Mezoderm Ektoderm	LIF Fibroblast büyüme faktörü	Yüzey markerlerinin bulunması : SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81

2.3 Kök Hücre İşaretleyicileri (Markerleri)

Reseptör olarak adlandırılan ve vücuttaki tüm hücre yüzeylerini kaplayan uzmanlaşmış proteinlere marker (işaretleyici) denilmektedir. Bunlar seçici olarak işaretçi moleküllere bağlanma ya da yapışık kalma yeteneğine sahiptir. Yapısal olarak farklı birçok reseptör çeşidi olmasına karşın bunlar üzerinde işaretçi moleküllere bağlanmasını sağlayan özel bölgeler bulunmaktadır.

Hücreler, diğer hücrelerle olan iletişimlerinde ve vücut içindeki özel fonksiyonlarını yerine getirmede bir yol olarak bu markerleri kullanmaktadır. Bazı kök hücre yüzey markerleri izelge 2.2’de gösterilmiş olup, kök hücre markerlerinin bazı özellikleri de aşağıda sıralanmıştır. Bunlar;

1. Diğer işaretçi moleküllere seçici olarak bağlanma ya da yapışarak kalma yeteneğine sahiptir.
2. Yapılarında farklılıkları olan bir çok reseptör tipi vardır.
3. Yapılarında işaretçi moleküller için benzer bölgeleri vardır
4. Kök hücreler, kullanılan markerin varlığını ya da yokluğunu belirtecek şekilde marker isimleri ile belirtilir.
5. Hücreler, bu reseptörleri ve onlara bağlanan molekülleri, vücuttaki özel görevlerinin yerine getirilmesinde ve diğer hücrelerle iletişimin sağlanmasın da bir yol olarak kullanır.
6. Kök hücre markerlerinin değişik kullanım yöntemleri vardır

Çizelge 2.2 Bazı kök hücre yüzey markerleri ve çeşitli kaynaklardan elde edilen kök hücelere olan etkileri

Marker Adı	Fare EC/ EK/EG	Maymun EK	İnsan EK	İnsan EG	İnsan EC
SSEA-1	+	-	-	+	-
SSEA-3	-	+	+	+	+
SSEA-4	-	+	+	+	+
TRA-1-60	-	+	+	+	+
TRA-1-81	-	+	+	+	+
Alkalin fosfataz	+	+	+	+	+
Oct-4	+	+	+	Bilinmiyor	+
Telomeraz aktivitesi	+ ES, EC	Bilinmiyor	+	Bilinmiyor	+
Besleyici hücelere (MEF) bağımlı	ES, EG, bazı EC	Evet	Evet	Evet	biraz; nispeten düşük klonal hızlı çalışma
Kök hücrelerin kendilerini kolay yenileyebilmesini sağlayan faktörler	LIF ve gp130 reseptörlerine etkiyen diğer faktörler ve besleyici tabaka yerine kullanılabilir.	Besleyici hücreler ile ko-kültür; henüz aydınlatılmamış ilerletici faktörler	Besleyici hücreler + serum; Besleyici hücreler + serumsuz vasat + bFGF	LIF, bFGF, forskolin	Bilinmiyor; düşük çoğalma kapasitesi
ES Hücre EG Hücre EC Hücre SSEA	Embryonik Kök Hücre Embryonik (germ) Eşey hücresi Embryonik Karsinoma hücresi Stage-specific Embryonik antijen		TRA LIF bFGF EB	Tumor rejection antigen-1 Lösemi İnhibitör Faktörü Basic Fibroblast Büyüme Faktörü Embryonik Kütle (bodies)	

1. **Oct-4:** Transkripsiyon faktörüdür. Hücrelerin çoğalması ve farklılaşmaması için gereklidir. Hücrenin farklılaşmadığını göstermektedir.

2. **FGF-4:** Parakrin ve otokrin bir sinyaldir. Oct-4 ile birlikte salgılanır ve çoğalabilen ICM (iç hücre kütlesi) hücreleri tarafından sentezlenmektedir.

3. Leptin ve Stat-3: Oosit tarafından salgılanmaktadır. Dört hücreli zigotta ICM ve trofektoderm hücreleri tarafından sentezlenir. Hücrelerin farklılaşması sırasında sadece trofektoderm hücrelerince sentezlenir.

4. LIF: Lif bir sitokindir. Hücrelerin çoğalması ve yaşaması için gereklidir. Özellikle “besleyici tabaka” (feeder layer) içermeyen kültür ortamına bulunması gerekmektedir.

5. SSEA: *In vitro* olarak hücrelerin karakteristik gelişimini gösterir. Hücrelerin farklı gelişim safhalarında SSEA’lar da farklı formlarda görülmektedir.

Hücre yüzeyindeki reseptörlere seçici olarak bağlanan markerler kök hücreleri belirlemede kullanılmaktadır. Her hücre tipi, hücre yüzeylerinde kendisini diğer hücre tiplerinden ayırt edilebilir yapan belirli bir reseptör kombinasyonuna sahip bulunmaktadır.

Kullanılan markerlerin isimleri kısaltmalarla ifade edilmektedir. Toplam markerlerin bir kombinasyonu kök hücre tiplerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Kök hücreler isimlendirilirken kullanılan markerin varlığı veya yokluğu belirtilerek, o markerin isimleriyle adlandırılmaktadır. Örneğin, kan ve kemik iliğinde bulunan kan kök hücrelerinin SP ile gösterilen özel bir tipi $CD34^{-/low}$, c-Kit⁺, Sca-1⁺ şeklinde adlandırılmıştır.

3. KÖK HÜCRELERDE NİŞ KAVRAMI

Bir kök hücre, çevresindeki hücrelerden ve desteklenen hücre tipi kaynaklı sinyallerden oluşmuştur. Kök hücre nişi, kök hücreler ile buldukları dokudaki mikroçevrede yer alan yardımcı hücreleri veya hücrelerarası ortamdaki bileşenlerin birbirleriyle olan ilişkilerini tanımlamaktadır. Kök hücrelerin basit lokasyonları nişleri tanımlamamaktadır. *Nişin, anatomik ve fonksiyonel boyutların her ikisine de sahip olması gerekmektedir.*

Niş içerisinde, kök hücre karakteristiklerini düzenleyen bazı önemli faktörler vardır. Bunlardan; kök hücreler (KH) arası hücre-hücre etkileşimleri, KH-farklılaşmış komşu hücre arası etkileşimleri, KH-adezyon molekülleri etkileşimleri, HDM bileşenleri, oksijen gerilimi, büyüme faktörleri, sitokinler ile çevrenin fizikokimyasal doğal yapısı (pH, iyonik güç), ATP gibi metabolitler önemlidir (Scadden 2006).

Embriyonik gelişim sırasında çeşitli niş faktörleri, EKHlerde gen ekspresyonunu uyararak, fetusun gelişimi için çoğalma ya da farklılaşmayı teşvik eder. Kök hücreler ve niş gelişim sırasında birbirlerini teşvik eder ve erişkinlik (adulthood) süresince de birbirlerine karşılıklı sinyaller verirler (Li vd. 2005).

Mikroçevre-KH etkileşimlerinde integrinler, N-kadherinler gibi adezyon molekülleri önemli rol oynamaktadır. Jak-Stat yolağı boyunca hh, Wnts, BMPs, FGFs, Notch, SCF sinyal molekülleri kök hücre davranışlarını düzenleyici etki göstermektedir (Scadden 2006).

Memelilerde kök hücre nişi asimetric bir yapı göstermektedir. Bir nişte, hücre bölünmesi meydana geldiğinde hücrelerden biri niş içerisinde kalırken (self-renewal) diğer hücre proliferasyon ve farklılaşma ile fonksiyonel olgun hücreye dönüşmektedir (Li vd. 2005).

Genel olarak erişkin kök hücrelerde KH nişleri durgun fazdadır. Ancak bir yaralanma durumunda mikroçevrenin etrafındaki aktif sinyaller hücreleri self-renewal ve farklılaşmaya yönlendirerek, yeni dokuyu şekillendirir. *In vitro* kültüre edildiklerinde ise; yaşlanma prosesi altına girerek morfolojileri değişir ve proliferatif kapasiteleri düşer. Erişkin kök hücrelerin, kök hücre özelliklerini koruyabilmeleri için doğru kültür şartlarında geliştirilmesi gerekmektedir.

İnsan embriyonik kök hücreleri genellikle FGF-2 içeren serumlu vasatta ekspansiyon edilmekte ve EKH'lerin pluripotent özelliğini desteklediği bilinen feeder layer üzerinde kültüre edilmektedir. Ancak bu şartlar tam olarak biyomimetik *in vivo* niş şartlarını karşılamamaktadır.

3.1 Niş'in Yapısı ve Anatomik Lokalizasyonu

Kök hücrelerinin yenilenme ve farklılaşması, kök hücrelerinin içsel belirleyicileri ve *kök hücre nişi* olarak isimlendirilen, özelleşmiş bir mikroçevre tarafından düzenlenmektedir.

Bu niş, bir yandan kök hücrelerinden oluşan bir havuzun sabit bir şekilde korunmasını sağlarken, diğer yandan doku homeostazını ve onarımını sağlamak için, kök hücre aktivitesini düzenlemeye katkıda bulunacak moleküler sinyaller oluşturmaktadır.

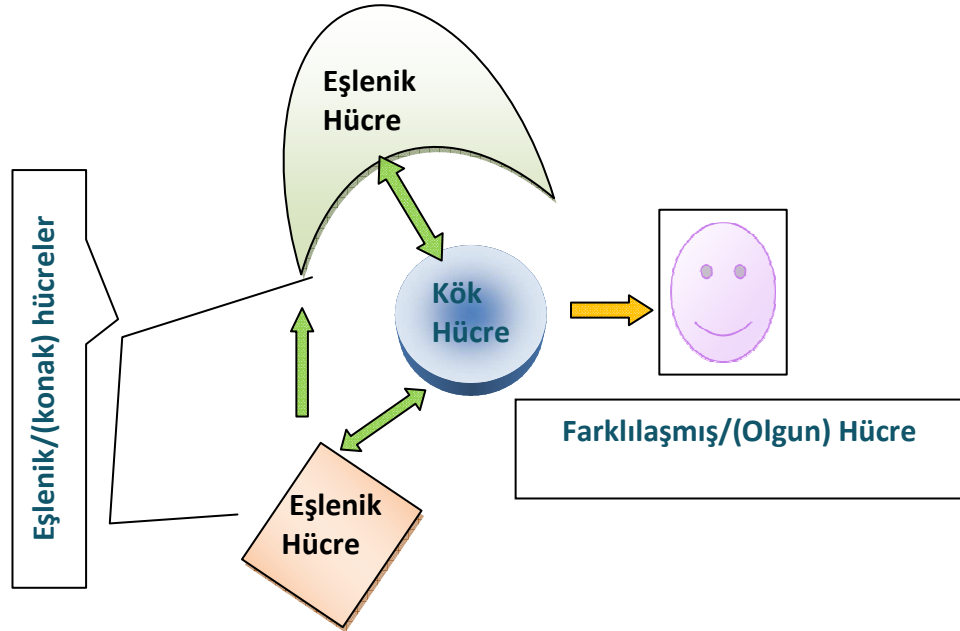
Erişkin yaşamda kök hücre nişlerinin yerleşimleri, kemik iliği, deri ve bağırsak gibi bazı dokular için iyi bilinmektedir. Niş hücreleri ile fiziksel etkileşimler, kök hücre mitozu sırasında yarıklanma düzleminin yönelimini ve niş alanlarında, Wnt, Notch ve kemik morfogenetik protein yollarının katılımıyla gerçekleşen moleküler çapraz iletişim, kök hücrelerinin simetrik ve asimetrik bölünmesi arasındaki dengeyi ve bununla ilişkili sonuçları kontrol altında tutmaktadır.

Bu olayların kontrolündeki fazlalık ya da eksiklik seklindeki bir düzen bozukluğu, doku homeostazının (düzenleyici sistemler yardımıyla organizmanın iç ortamının sabit tutulmasıdır) ve onarımının yetersizliği veya tümör oluşumu ile sonuçlanmaktadır.

Kök hücre nişleri, hücresel mikroçevre ve hücresiz mikroçevre olarak iki grup altında sınıflandırılmaktadır.

3.1.1 Çok hücreli niş

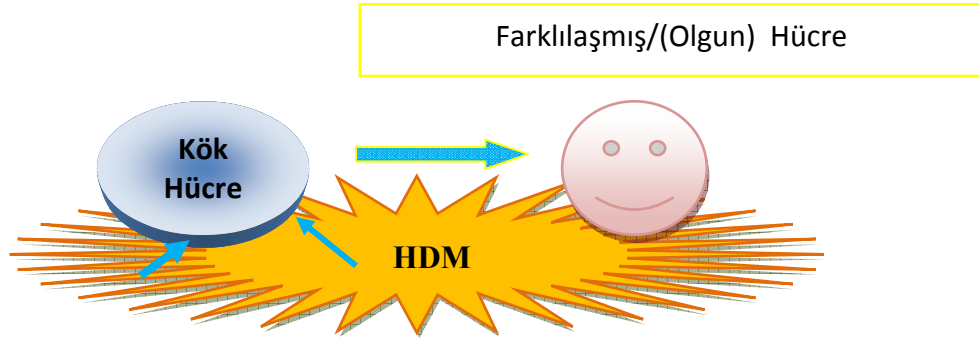
Yapısal kompozisyon olarak hücresel mikroçevrede şekillenen niş, çok hücreli niş olarak da adlandırılmaktadır. Çok hücreli nişin yapısında, kök hücre ile etkileşimde olan bir ya da daha fazla eşlenik hücre bulunmaktadır (Şekil 3.1). Bu etkileşimler kök hücrenin simetrik ve asimetrik bölünmesi işlemlerinde düzenleyici etki göstermektedir.



Şekil 3.1 Çok hücreli nişin şematik gösterimi

3.1.2 Hücresiz niş

Yapısal kompozisyon olarak hücreli nişte eşlenik hücreler bulunmamaktadır ve kök hücrenin yüzeyinde bulunan çeşili adezyon ve bağlanma proteinleri ile hücre dışı matrikte (HDM) bulunan moleküller arasındaki etkileşimle kök hücrenin fonksiyonları düzenlenmektedir (Şekil 3.2). Bu nedenle HDM nişi olarak da adlandırılmaktadır.



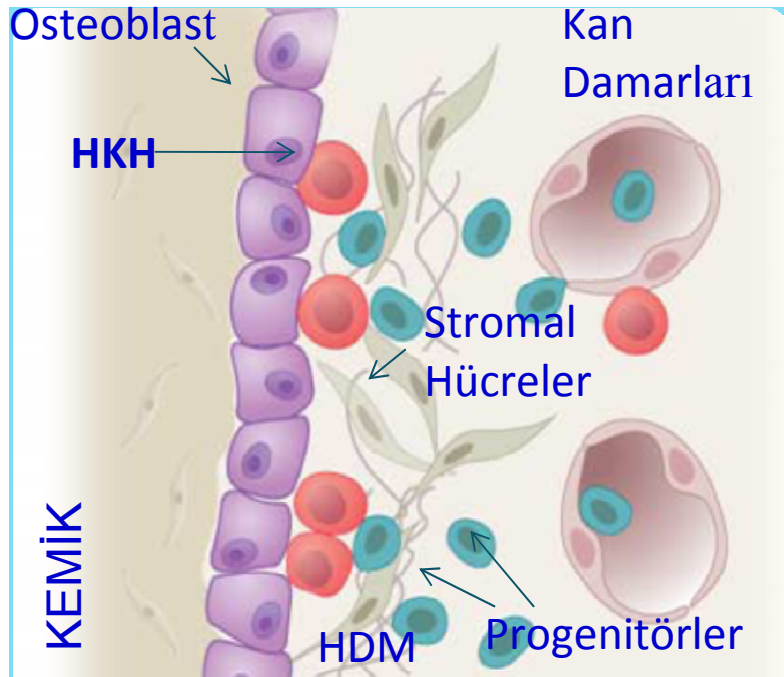
Şekil 3.2 Hücresiz (HDM) nişin yapısı.

3.2 Hematopoetik Kök Hücre Nişi

Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücreleri (HKH), en iyi tanımlanmış erişkin kök hücrelerdir ve saflaştırılarak, homojeniteye yakın düzeyde klinik evrelerine ayrılmışlardır. Öncü HKH'ler, trabeküler kemiğin endosteal yüzeyine yakın yerleşim gösterirler ve niş sinyalleri, endosteal osteoblastlardan oluşan bir alt küme tarafından üretilir. Osteoblastların, HKH sayısını, osteopontin salgılayarak düzenlediği düşünülmektedir. Osteopontin, HKH'lerin sessiz kalmasını sağlayan ve HKH çoğalması ve aktivitesi üzerinde olumsuz yönde etki gösterdiği tahmin edilen bir kemik matriks glikoproteinidir.

Nişteki çapraz iletişim, HKH sessizliği ve yenilenmesinde rol oynayan, bmi-1, p21, p18 ve Ets transkripsiyon faktörü MEF/ELF4 gibi mediyatörlerin ekspresyonunu ve aktivitesini düzenlemeye katkıda bulunabilir veya progenitor havuzunu genişletirken, HKH'lerin sürdürülmesini sağladığı gösterilmiş olan glikojen sentaz kinaz-3'ün (GSK-3) inhibisyonuna yol açabilmektedir.

HKH'ler, kalsiyum konsantrasyonlarını algılama ve onlara yanıt verme yeteneğini kazandıran bir kalsiyum algılama reseptörü eksprese etmektedir. Bu reseptöre sahip olmayan HKH'ler, endosteal nişte az yerleşim göstermektedir. Bu durum, yerleşimde ve HKH'lerin niş içerisinde tutulmasında, kemik mineral gradyentlerinin rolü olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 3.3 Kemik iliği HKH nişi

Sempatik sinir sistemi, niş içinde sinyal entegrasyonu sürecinde beklenmeyen bir katılımcıdır. Bu sistemin, HKH'lerin nişe çekimini düzenlediği düşünülmektedir. Adrenerjik sinyaller, granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) ile indüklenen osteoblast baskılanmasını ve kemiğe ilişkin CXCL12'nin olumsuz yönde

düzenlenmesini kontrol altında tutmaya ve bunun sonucunda HKH'ler dolasına karışmaktadır. CXCL12 kemik dokularında yüksek oranda eksprese edilir ve HKH'lerin nişlerine doğru çekilmelerinde ve niş içerisinde tutulmasında kritik bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir.

3.3 Mezankimal Kök Hücre Nişi

Geleneksel olarak kemik iliğinden köken alan mezenkimal kök hücreler (MKH), kendilerini yenileme ve kırıkta, kemik ve yağ dokusuna farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Bunların, klinikte ortopedik uygulamalarda kullanımı uzun süredir araştırılmaktadır ve kırıkta ve kemik onarımında kullanılabilecekleri belirlenmiştir. Hücre yüzeyindeki özel göstergeler, MKH'lerin çok homojen bir toplum oluşturacak şekilde saflaştırılmasını engellemiştir. Bu tür bir saflaştırma, tutarlı ve tekrarlanabilir etkinliğe sahip, klinik evresi ve kimliği belirlenmiş MKH ürünleri elde etmek için gereklidir. Kemik iliğindeki MKH'lerin, çeşitli göstergelerden oluşan bileşenler kullanılarak, hücre kültüründen önce makul bir biçimde zenginleştirilmesi mümkün olmuştur.

Periost, sinoviyal membran ve sinoviyal sıvı gibi başka dokulardan da multipotent MKH'ler izole edilmiştir. Yine de, doğal dokuları içinde MSC nişleri hakkındaki bilgiler henüz yetersizdir ve MKH'lerin, hücre kültürüne ait bir artefakt olup olmadığı da halen çözümlenememiş bir konudur. MKH'lerin, HKH'lere çok yakın olabilecekleri kemik iliğinin perivasküler alanlarında yerleşim gösterdikleri ileri sürülmüştür. MKH'lerin, in vitro hücre çoğalması üzerindeki inhibe edici etkisi, bu hücrelerin, HKH sessizliğinin sürdürülmesinde bir rolü olabileceği şeklindeki cazip olasılığı gündeme getirmektedir. İlginçtir ki, bağışıklık yetmezliği olan farelerin kemik iliğine intramedüller transplantasyondan sonra MKH'lerin, iliğin hematopoetik mikroçevresinde işlevsel elemanlar olan perisitlere, stromal hücrelere, kemiği kaplayan osteoblastlara ve endotel hücrelerine farklılaştıkları saptanmıştır. Erişkinin eklem kırıktağında yüzey katmanı, Notch1 eksprese eden yüksek klonojenik multipotent hücreler içermesi nedeniyle, bir niş olarak işlev görebilmektedir.

3.4 Niş ve Hücre Bölünmesi

Homeostatik koşullarda, kök hücreleri kendilerini yeniler ve farklılaşmış bir soy oluştururlar. Her bir kök hücre, birbirinin eşi iki yavru hücre (*simetrik bölünme*) veya biri kök hücresi kimliğinin koruyan, diğeri ise farklılaşmış bir hücre haline gelen, birbirinin eşi olmayan iki yavru hücre (*asimetrik bölünme*) meydana getirir.

Omurgasız model sistemlerinde gösterildiği gibi, kök hücre mitozu sırasında yarıklanma düzleminin oriyantasyonu, simetrik veya asimetrik bölünmenin belirlenmesinde önemli bir role sahip gibi görünmektedir. Kök hücre, yarıklanma düzlemi niş hücresine dikey olarak bölündüğünde, her iki yavru hücre de niş hücresi ile temas eder; buna karşılık, kök hücresi, yarıklanma düzlemi niş hücresine paralel iken bölünürse, yavru hücrelerden sadece biri niş hücresi ile temas ederken, diğeri nişten uzaklaşır ve farklılaşmayı teşvik eden bir mikroçevreye yerleşir. Omurgasız hayvanlarda, asimetrik hücre bölünmesinde, hücrenin kaderini belirleyen özgül unsurların, iki yavru hücre arasında eşit olmayan bir biçimde dağıldığı gösterilmiştir. Yakın zamanda, memeli kök hücre sistemlerinde, derinin epidermisindeki bazal hücrelerde asimetrik hücre bölünmesi olduğuna dair sonuçlar elde edilmiştir.

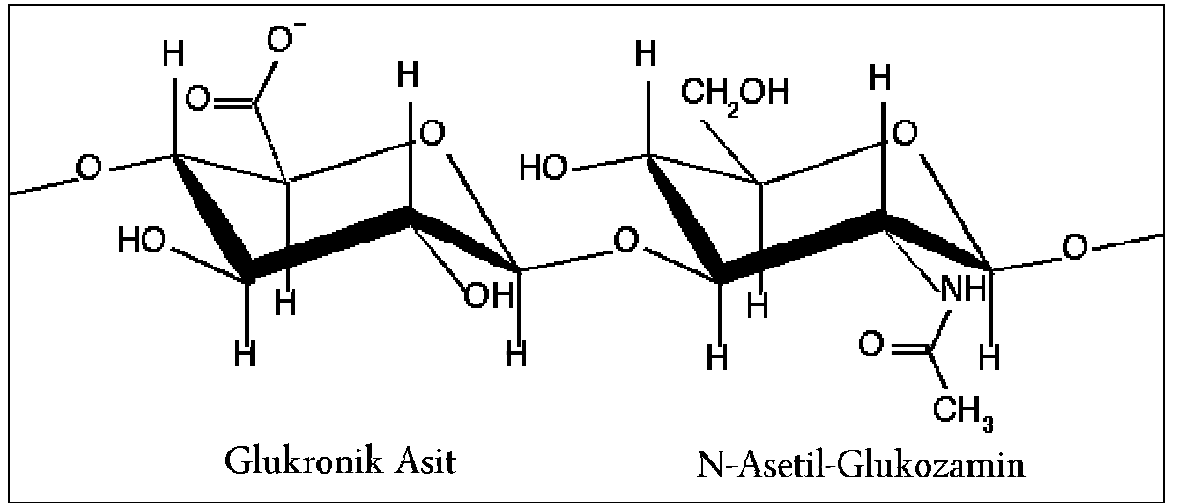
3.5 Kök Hücre Nişi ve Kanser Üzerine Etkisi

Niş yapıları, kök hücre olmayan hücre tiplerine kök hücre benzeri özellikler kazandırma potansiyeline sahip gibi görünmektedir. Omurgasızlarda yapılan çalışmalarda, somatik hücre tiplerinin, boş bir nişe yerleşip, kök hücre benzeri bir duruma geçiş yaptıkları gösterilmektedir. Aynı durum memeliler için de geçerli olabilmektedir. Çünkü fareler üzerinde yapılan incelemelerde, melanosit kök hücre soyunun, nişin dışına göç ederek dışarıda çoğaldığı ve daha sonra boş nişlere yerleşip, sonuçta sessiz duruma geçtiği belirlenmiştir. Bu nedenle nişlerin, daha olgun bir hücre tipine, kök hücre benzeri özellikler kazandırarak malin hücre özelliğini teşvik etmek suretiyle, teorik olarak anormal doku düzenine katkıda bulunma yeteneğine sahip olma olasılığı bulunmaktadır.

Diğer taraftan, tümör hücrelerinin, metastaz için tercih edilebilir nişlere yerleşme yeteneği olduğu düşünülmektedir. Nişler, kök hücrelerinin yayılmasını önlemektedir. Kendini yenileyen kök hücrelerin kontrol altına alınmamış yayılımı, tümör oluşumuna yol açabilmektedir. Aslında, tümörler arasında bulunan ve kanser kök hücreleri olarak adlandırılan bir kök hücre alt kümesi, bu tümörlerin büyümesini ve metastazını yönlendirebilmektedir. Bir tümörde bir kök hücre topluluğunun bulunması klinik açıdan önemlidir; çünkü kanser kök hücreleri, tanı ve tedavinin hedefi konumunda bulunmaktadır. Yakın tarihli çalışmalar, *Drosophila*'da, hücre kaderini belirleyen unsurların kalıtsal olarak yeterince aktarılamamasının, hücre döngüsünü kontrol altında tutan özel hedef genlerin aktive olmasıyla, mutant nöroblast dizisinin sınırsız çoğalmasına katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır. Bu bulgu, kök hücrelerin polarite kaybının, tümörogeneze yol açabileceği şeklinde bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, kök hücrelerin kendini yenilemesini doğru bir biçimde düzenlemek için hücre kaderini belirleyen unsurların, mitoz sırasında iki yavru hücre arasındaki paylaşımının sıkı bir biçimde kontrol altında tutulması gerekmektedir.

4. HİYALURONİDAZ ve HİYALURONİK ASİT

Glikozaminoglikanlar (GAG), genellikle bir üronik asit ve bir heksoz amin tarafından oluşturulan karakteristik tekrarlayan disakkarit birimlerinden meydana gelmiş olan doğrusal polisakkaritlerdir (Knudson ve Knudson 2001). Yapısında protein içermeyen tek GAG molekülü olan HA, D-glukuronik asit ve N-asetil-D-glukozamin monosakkaritlerinin birleşmesiyle oluşmuş lineer disakkarit birimlerinin tekrarlanması ile meydana gelmiştir (Şekil 4.1). HA canlılardaki HDM'de yüksek konsantrasyonda (3-20 mg/ml) bulunmaktadır. HA kondrositlerden ve sinovyal dokudaki tip B sinoviositlerden sentezlenerek eklem hareketi ve lenf kapillerleri yoluyla sinovyal sıvıya ve interselüler matrikse salgılanmaktadır. Bu yüksek elastoviskoz polimer kollajen fibriler ağı ile eklemdeki bütün hücreler, kan ve lenf damarları ve nöral yapıları çevreleyen interselüler boşluğu doldurmaktadır.



Şekil 4.1 Hyaluronik asitin kimyasal yapısı

HA sinovyal sıvı ve eklem kıkırdağı dışında gözde, vitröz humorda ve umbilikal kordda saf halde bulunmaktadır. Pek çok farklı tıbbi tedavi alanlarında kullanılmaktadır. Bunlardan; Artropatiler, yara iyileşmesini kolaylaştırmak amacıyla cerrahi sonrası adezyonlardan korunmada, tendon cerrahisi sonrasında iyileşmeyi hızlandırmak

amacıyla, üriner inkontinans tedavisinde, göz cerrahisinde, doku artırımı ve doku mühendisliğinde sıkça kullanılmaktadır.

Kıkırdak içindeki proteoglikan molekülleri daha büyük moleküller halinde proteoglikan agregatlarını meydana getiren bir hiyalüronik asit zincirine bağlı olarak gösterilmektedir. Proteoglikan agregatları, bir proteoglikan molekülüne olan agreganın bağlanma proteini yardımıyla bir hiyalüronik asit molekülüne bağlanması ve bu yapının da kollajen lifler ile etkileşime girmesi sonucu oluşmaktadır (Angel vd. 2003).

Bir glikozaminoglikan olan HA, fizyolojik özelliklerinin yanı sıra spesifik hücre yüzey reseptörlerine (CD44, hyaluronectin vb) bağlanarak hücre adezyon, migrasyon ve proliferasyonunda da rol almaktadır. HA tarafından desteklenen hücre proliferasyonu tamamen CD44-HA etkileşimine dayanmaktadır. Dokuda hasar meydana geldiğinde HA, mezenkimal ve epitel hücrelerin migrasyonunu uyarmaktadır. Tümör oluşumunda ise; CD44'ün mutasyona uğramış katı formu, HA ile etkileşerek metaztazı artırmakla birlikte serumdaki CD44 seviyesinde de artış gözlenmektedir.

HA-hücre proliferasyonunun indüksiyonu ve yaşam yolları için HA-hücre etkileşimine CD44 ve CD168 aracılık etmektedir. Bu yollar, insan kumulus hücrelerinde, oositte, erken embriyoda ve (pre-hatched) blastokistte bulunmaktadır. *In vitro* kültürlerde ise farklılaşmamış hEKH'leri yüksek seviyede CD44 ve CD168 sentezlemektedir. Farklılaşmamış hücreler, CD44'ün intrasellüler ekspresyonu ve membran ya da intrasellüler CD168 ekspresyonu ile karakterize edilmektedir.

HA polianyon yapısından ötürü yüksek oranda su tutabilmekte ve bu sayede tümör hücresinin migrasyonu için boşluklar oluşmasına neden olmaktadır. Tümör dokusunda, artan HA seviyesinin, tümör metastazına eğilimi arttırdığı bilinmekte ve hiyalüronidaz (HDZ) seviyesi tümörün invaziv potansiyeli ile korelasyon göstermektedir. Ayrıca HA konsantrasyonunun artmasıyla vücut sıvılarından taşınan ve de önemli olarak tümör hücreleri tarafından sentezlenen HDZ enzimi, migrasyon için yeni yollar açarken angiogenezi de (damar oluşumunu) uyarmaktadır. HA ile zenginleşmiş tümör matriksi içinde tümör hücresi, hücre yüzey reseptörlerini (CD44, N-cadherin, integrinler vb)

kullanarak göç etmektedir. Ayrıca tümör hücrelerini çevreleyerek immün sistemden izole eder ve bu şekilde kemorezistan hale gelmelerini sağlamaktadır.

Eklemlerde sinovial sıvıda ve büyük ölçüde kıkırdağın yapısını oluşturan HDM içerisinde bulunan HA'nın dokudaki anabolizma ve katabolizması arasındaki dengenin bozulması sonucu, matriks içerisindeki proteoglikanlar ile kollajen lifleri dejenerasyona uğramakta, dolayısıyla doğal dokunun bozulmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda da çeşitli dejeneratif hastalıklar ile tümör oluşumu ortaya çıkmaktadır. Bunun en önemli nedenlerinden birisi, artan HA konsantrasyonunu tolere edecek yeterli HDZ enziminin salgılanmaması olup, bu durumda artan HA'yı yıkarak dengeyi sağlamak üzere kondrositler tarafından MMP'ler (MMP-4 vb.) sentezlenmektedir. MMP'ler ise spesifik olarak sadece HA'yı degrade etmeyip, matriks moleküllerinin de bozunmasını sağlayarak matriks yapısının ve stabilitesinin bozulmasına neden olarak kıkırdak dokusunda hasara yol açmaktadır.

5. MODEL SİSTEM OLARAK KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Kıkırdak, bağ dokusunun özelleşmiş bir şeklidir. Hiyalin, elastik ve fibröz olmak üzere üç tip kıkırdak dokusu bulunmaktadır. Kıkırdağın ana görevi yumuşak dokuyu desteklemektir. Yapısının düzgün yüzeyli ve esnek olması eklem yüzeylerinin, darbe emici ve kaygan olmasını sağlar ve kemik hareketini kolaylaştırır. Ayrıca doğum öncesi ve sonrasında uzun kemiklerin oluşum ve gelişiminde rol almaktadır (Murathanoğlu 1996).

Avasküler yapıya sahip olan kıkırdak dokusu kan ve lenf kapillerleri ile sinir hücrelerini içermemektedir. Beslenmesi, komşu bağ dokusundaki (perikondrium) kapillerlerden ve eklem kavitelerinin sinoviyal sıvısından difüzyonla gerçekleşmektedir. Bütün avasküler dokularda olduğu gibi, kıkırdak hücreleri de düşük metabolik aktivite göstermektedir. Kan kapillerlerinin olmayışı nedeniyle kondrositler, düşük oksijen konsantrasyonlarında solunum yapmak zorundadırlar. Bu nedenlerden ötürü kıkırdak dokusunun kendini yenileme ve tamir etme yeteneği oldukça düşüktür (Reinholz vd. 2003).

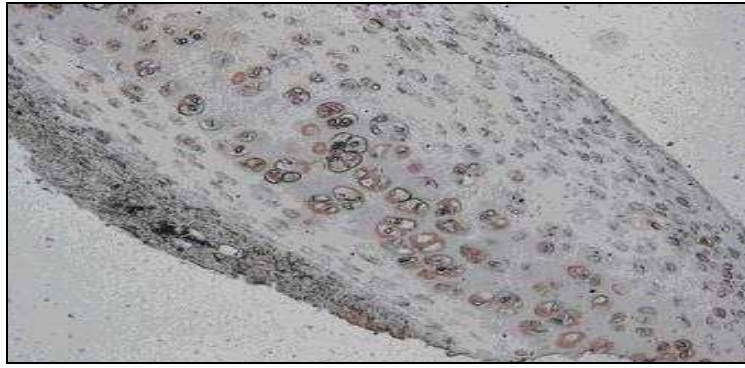
Kıkırdak, interstisyel ve apozisyonel olmak üzere iki şekilde büyümektedir. İnterstisyel büyüme, mevcut olan kondrositlerin mitotik bölünmeleri ile gerçekleşmektedir. Apozisyonel büyüme ise, perikondriyumdaki hücrelerin farklılaşması ile gerçekleşmektedir. Eklem kıkırdağında, apozisyonel hücre ekleyecek bir perikondriyum olmadığı için eklem yüzeyindeki, zamanla yıpranan hücreler ve matriks, kıkırdağın iç kısımlarından takviye edilmektedir (Junqueira vd. 1993).

Kıkırdak dokusunda yaralanmalar ve hastalıklar nedeniyle çeşitli dejeneratif hastalıklar gözlenmektedir. Bu amaçla geliştirilen çeşitli ortopedik ve hücreye dayalı teknikler gerekli olan tedaviyi tam olarak sağlayamamaktadır. Bu nedenle son yıllarda doku mühendisliği yaklaşımıyla üç-boyutlu biyobozunur ve biyoyumlu polimerik yapıların ve izole hücrelerin kullanımıyla laboratuvar ortamında kıkırdak dokusunun üretilmesine çalışılmaktadır.

5.1 Kıkırdak Dokusunun Yapısı

Kıkırdak özelleşmiş bağ dokusunun bir tipidir. Çok bol miktardaki hücre dışı matriks içine gömülü olan kıkırdak hücreleri tarafından oluşturulmuştur. Kıkırdak dokusunun oluşum aşamalarına ve gelişim mekanizmasına “*kondrogenez*” denilmektedir.

Yapıda Hücre Dışı Matriks (HDM) oldukça sıkı bir kıvam göstermektedir. HDM kıkırdak dokusuna, mekanik zorlamalar karşısında, kalıcı şekil bozukluklarına yol açılmaması için gereken esnekliği kazandırmaktadır (Vacanti ve Vacanti 1997).



Şekil 5.1 Hiyalin kıkırdak dokusu

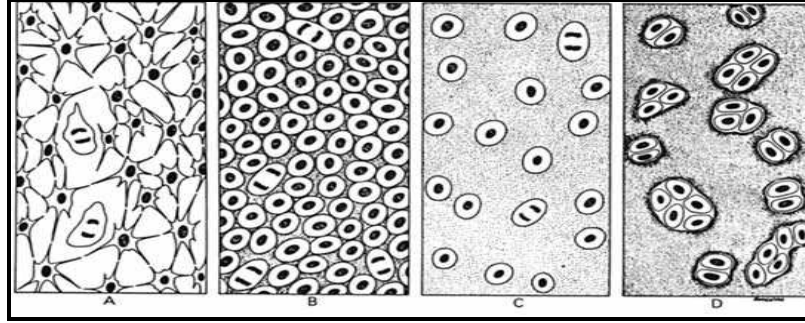
Hiyalin kıkırdak hücreleri glikozu, genellikle anaerobik glikoliz ile metabolize ederek son ürün olarak laktik asidi oluşturmaktadır. Kandaki besin maddeleri perikondriumdan daha derinlerde bulunan kondrositlere, difüzyonla geçmektedir. Bu nedenle kıkırdağın maksimum kalınlığı sınırlıdır (Angel vd. 2003). Besin maddeleri çözücü olarak matriksteki serbest suyu kullandığı için matrikste, hemen hemen hiç serbest su molekülü bulunmamaktadır (Junqueira vd. 1993).

5.1.1 Kıkırdak hücreleri

Kıkırdak dokusunda iki tip hücre bulunmaktadır. Ancak bu hücreler bilim adamları tarafından aynı hücrenin iki farklı evresi olarak kabul görmektedir. Bu hücrelerden

kondroblastlar genç kıkırdak hücrelerini, *kondrositler* ise olgun kıkırdak hücrelerini temsil etmektedir (Murathanoğlu 1996).

Kıkırdak dokusu, embriyonik evrede mezenkimal hücrelerin kondroblastlara farklılaşması ile oluşmaktadır.



Şekil 5.2.a. Mezenkimal hücreler, b. Mezenkimal hücrelerin farklılaşması ile oluşan kondroblastlar, c. Kondroblastlar kendi HDM'lerini sentezlemeye başlayarak birbirlerinden uzaklaşmaya başlaması ve olgunlaşarak kondrositleri oluşturması, d. Kondrositler kendi lakünleri içerisinde çoğalarak izogen hücre gruplarını oluşturması (Junqueira vd. 1993)

5.2 Kıkırdak Dokusunun Gelişimi

Kıkırdak dokusu, oranları yaşla farklılık gösteren iki farklı mekanizma ile büyümektedir. Bunlar; interstisyel ve apozisyonel büyümedir.

İnterstisyel (içten-dışa) büyüme, mevcut olan kondrositlerin mitotik bölünmeleri ile gerçekleşmektedir.

Apozisyonel (dıştan-içer) büyüme, perikondriyumdaki hücrelerin farklılaşması ile gerçekleşmektedir.

Her iki durumda da yeni oluşan kondrositler, kollajen liflerin ve temel maddelerin sentezini gerçekleştirmektedir. Böylece büyüme, basit bir hücre artışından daha kompleks bir şekilde gerçekleşmektedir (Sağlam vd. 2001).

İnterstisyel büyüme daha az önem taşımaktadır. Kıkırdak gelişiminin ilk dönemlerinde, kıkırdak matriksinin içten dışa doğru genişlemesi sırasında ortaya çıkar. Ayrıca uzun kemiklerin epifizyal kıkırdaklarında ve eklem kıkırdağında da görülmektedir. Uzun kemiklerin uzamasını sağlayan epifizyal plaklarda ve endokondral kemik gelişimindeki kıkırdak modelinin ortaya çıkmasında rol oynamaktadır.

Eklem kıkırdağında, apozisyonel hücre ekleyecek bir perikondrium olmadığı için eklem yüzeyindeki, zamanla yıpranan hücreler ve matriks, kıkırdağın iç kısımlarından takviye edilir. Vücudun diğer bölgelerinde bulunan kıkırdaklarda ise, matriks zamanla sertleşince interstisyel büyüme azalır ve kıkırdak bir bant halinde sadece apozisyonel olarak büyür. Apozisyonel büyümede, perikondriumun kondroblastları çoğalarak etraflarını bir matriks ile sardıktan sonra, kondrosit haline dönüşerek mevcut kıkırdağa eklenirler (Junqueira vd. 1993).

5.3 Kıkırdak Dokusu Tedavi Yöntemleri

Tedavi amacıyla günümüzde uygulanan belli başlı yöntemler; estetik ve ortopedik ameliyatlara, doku transplantasyonu ve yapay protez uygulamalarıdır. Bu yöntemlerin, avantajlarının yanı sıra birçok dezavantajı da bulunmaktadır (Angel vd. 2003).

Ameliyatla tedavide, uzun vadede sıklıkla problemler ortaya çıkabilmektedir. Doku nakillerinde, donör doku bulma zorlukları, greftin bağışıklık sistemi tarafından reddedilmesi ve greftin boyutlarından ve tespitinden kaynaklanan teknik zorluklar gibi sorunlar gözlenmektedir. Ayrıca vücudun değişik bölgelerindeki kıkırdak dokularının, aynı mekanik dayanıma sahip olmamasından ötürü, özellikle ototransplantasyonlarda gerekli mekanik dayanımın sağlanmasında güçlüklerle karşılaşmaktadır (Anonim 1999).

5.3.1 Doku mühendisliği

Doku mühendisliği son yıllarda biyoteknolojinin önemli bir alanı olarak hızlı bir gelişme göstermektedir. Biyomalzemelerdeki önemli gelişmeler, yeni hücre kültürü teknikleri ve yeni bulunan ve önemi kanıtlanan büyüme faktörleri, hayati önem taşıyan nakledilebilir doku ve organların üretilebilmesi için yeni olanaklar sağlamaktadır (Vacanti ve Vacanti 1997).

Son yıllarda, doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen kıkırdak dokusu, uygulamada olan tedavilere alternatif olarak geliştirilmektedir. Doku mühendisliği yaklaşımıyla kıkırdak doku üretiminde üzerinde çalışılan iki yöntem bulunmaktadır.

Bunlardan birincisi; vücut dışında çoğaltılan kıkırdak hücrelerinin kullanımı (*hücre transplantasyonu*); ikincisiyse kıkırdak hücrelerinin,üç-boyutlu biyobozunur destek materyalleri üzerinde üretilmesidir (*hücre-polimer modeli*).

5.3.2 Ortopedik ameliyatlar

Sağlıklı kıkırdak dokusunun da bulunduğu küçük defektlerde otolog hücre transplantasyonu yapılabilmektedir. Bu yöntemle tedavi edilemeyecek daha büyük kıkırdak doku hasarlarında ise, halen üzerinde çalışmaların devam ettiği, doku mühendisliği ürünü hücre-polimer modeli yapılar kullanılmaktadır (Freed vd. 1993).

Doku mühendisliği yaklaşımı ile kıkırdak hasarlarının tedavisi, travmatik olmayan hasarlara uygulanamamaktadır. Bu nedeni doğal dokudaki hücrelerin sağlıksızlaşması ve matriks yapının geri dönüşülmez bir şekilde bozulmasından kaynaklanmaktadır (Reddi 1994).

Sağlıklı doku miktarının yeterli olmadığı ya da doğal dokunun tamamının bozulduğu kıkırdak dokusu hasarlarında, ortopedik implantların kullanımı daha uygun görülmektedir. Bu tür uygulamalarda kıkırdak dokusunun yerine, tamamen yapay olan

biyolojik implant malzemeler yerleştirilmektedir (Angel vd. 2003). Ancak bu tür uygulamaların da önemli dezavantajları bulunmaktadır.

Ameliyatla tedavide, uzun vadede sıklıkla problemler ortaya çıkabilmektedir. Doku nakillerinde, donör doku bulma zorlukları, greftin bağışıklık sistemi tarafından reddedilmesi ve greftin boyutlarından ve tespitinden kaynaklanan teknik zorluklar gibi sorunlar gözlenmektedir. Ayrıca vücudun değişik bölgelerindeki kıkırdak dokularının, aynı mekanik dayanıma sahip olmamasından ötürü, özellikle ototransplantasyonlarda gerekli mekanik dayanımın sağlanmasında güçlüklerle karşılaşmaktadır.

Kıkırdak doku tamirinde özellikle son yıllarda geliştirilen metal ve plastik eklem protezleri, eklem ağrılarını hafifletmek ve fonksiyonlarını yerine getirmek açısından büyük başarı sağlamıştır. Buna karşın, yapay olan bu protezlerde, zamanla aşınma ve enfeksiyon gözlenmekte ve fiziksel açıdan aktif kişilerde yeterli dayanım sağlanamamaktadır. Ayrıca implantasyon sırasında bu protezlerin dokuya tutunması da sorun teşkil etmektedir.

5.4 Kondrojenezi Etkileyen Uyarıcı Moleküller

Kondrositlerin fonksiyonu, düzgün bir hormonal dengeye dayanmaktadır. Bu dengede meydana gelebilecek bir bozulma ve matriks sentezindeki anabolizma-katabolizma reaksiyonlarındaki dengesizlikler kıkırdak hasarlarına neden olmaktadır. Kıkırdağa etki eden bazı sitokinler ve büyüme faktörleri aşağıda sıralanmıştır (Murathanoğlu 1996).

Trioksin ve Testosteron: Sülfatlanmış GAG sentezini hızlandırır.

Kortizon, Hidrokortizon, Estradiol: Sülfatlanmış GAG sentezini geciktirir.

Somatotropin : Kıkırdak büyümesi genel olarak hipofizden salgılanan büyüme hormonu somatotropine bağlıdır. Bu hormon, doğrudan doğruya kondrositleri etkilemez ancak

karaciğerdeki somatomedin-C sentezini uyarır. Somatomedin-C (IGF-1) ise doğrudan kondrositleri etkileyerek büyümelerini kolaylaştırmaktadır (Junqueira vd. 1993).

C vitamini : Matriks üretimine özellikle kollajen üretimine uyarıcı etkisi vardır. Kollajenin yapısında bulunan hidroksilizin ve hidroksiprolin amino asitleri organizmada bu şekilde bulunmaz. Bu amino asitlerin hidroksilasyonu, sentezlenen kollajen peptidi minimum uzunluğa ulaştığında ve halen ribozomlara bağlı iken peptidil prolinhidroksilaz ve lizinhidroksilaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Askorbik asit (C vitamini) ise bu enzimlerin kofaktörü olarak görev almaktadır.

D vitamini: Kondrositlerin olgunlaşmasını ve matriks sentezini uyarır. Ancak kalsifikasyonu ve vasküler invazyonu da uyararak “hipertropik fenotipi” de destekler.

FGF-2: Kondrositlerin çoğalmasını uyarır. Hücrelerin hipertropik fenotipe farklılaşmasında kuvvetli bir baskılayıcı faktördür (Barbero vd. 2004).

TGF-β : TGF-β süper ailesi çok sayıda büyüme faktörü içermektedir. Bunların içinden TGF-β₁ ve TGF-β₂ kondrositlerin olgunlaşmasını ve çoğalmasını uyarmaktadır. Ayrıca vasküler invazyonu ve tümör oluşumunu önleyerek dokuyu korumaktadır.

TGF-β matriks moleküllerinin ekspresyonunu düzenler, fibronektin, proteoglikan, kollajen ve tenaskin üretimini uyarır. TGF-β'nın önemli bir etkisi de matriks moleküllerini degrade eden proteazlara karşı bunların inhibitörlerinin üretimini uyarmasıdır. Böylece proteazların matriks moleküllerini degrade ederek yapının stabilitesini ve bütünlüğünü bozmasına karşı dokuyu korumaktadır (Angel vd. 2003).

Yapısında kapiler içermeyen kıkırdak dokusu içerisinde bu uyarıcı moleküllerin bağlanarak fonksiyonlarını yapabilmesi ve matriks içerisinde depolanabilmesi için özel bağlanma bölgeleri bulunmaktadır.

5.5 Hücre Dışı Matriks Molekülleri

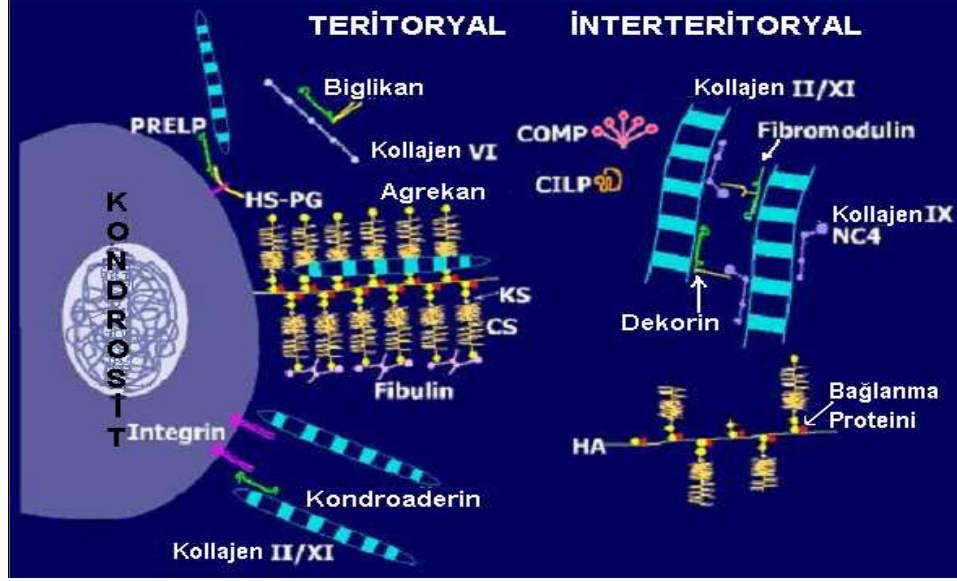
HDM, kıkırdak dokusunun önemli bir kısmını oluşturur Hücrelere besin ve gerekli maddelerin difüzyonla taşınması matriks aracılığı ile olmaktadır. Ayrıca dokunun yüksek baskı ve gerilimler ile osmotik basınca karşı korunmasında önemli bir göreve sahiptir.

HDM yüksek derecede su tutma kapasitesine sahiptir. Hücrelerin ihtiyaç duyduğu besin maddeleri ile kimyasallar matriks suyu içerisinde çözünerek taşınmaktadır. Bu nedenle matriks yapısındaki serbest su miktarı çok düşüktür (Angel vd. 2003). Ayrıca matriks içerisinde bulunan ve polianyon olarak davranan moleküller su moleküllerini tutarak doku için güvenli bir osmotik çevre oluşturmaktadır.

HDM'nin yapısı genel olarak iki kısımda incelenebilir (Şekil 2.1). Bunlardan teritoryal matriks, hücrenin çevresinde bulunur ve küçük proteoglikanlar bakımından zengindir. İnterteritoryal matriks ise protein lifler ile büyük GAG'lar bakımından zengindir ve matrikse, baskı ve gerilmeye karşı üstün dayanım kazandırır (Angel vd. 2003).

HDM molekülleri genel olarak üç başlık altında toplanabilir. Ancak bu sınıflandırma kesin sınırlarla birbirinden ayrılamamaktadır (Murathanoğlu 1996). Bunlar:

1. Yapısal proteinler: Kollajen, elastin
2. Özelleşmiş proteinler: Fibrilin, laminin, elastin, fibronektin, vitronektin
3. Proteoglikanlar: Glikozaminoglikanlar (GAG)



Şekil 5.3 Kıkırdak dokusunun yapısı ve HDM bileşimi

5.5.1 Yapısal proteinler

Yapısal proteinler dallanmış glikoproteinlerdir. Bir kor proteinine karbonhidratların bağlanması ile oluşmuş yapılardır. Yapıda protein özellik baskındır. Hücreler arası ilişkilerde görev almaktadır. Ayrıca hücrenin diğer hücelere, HDM moleküllerine ve alt tabakalara yapışmasında ve bağlanmasında büyük önem taşımaktadır. HDM'de, bazal laminada ve bağ dokusunda yerleşik olarak bulunurlar. En önemli yapısal proteinler; kollajen, fibronektin, laminin ve vitronektindir.

5.5.1.1 Kollajen lifler

HDM'nin önemli bir bileşeni ve insan vücudunda en bol bulunan proteindir, kuru ağırlığın yaklaşık olarak %30'unu oluşturmaktadır. Omurgalılarda bulunan kollajen bir proteinler grubu olup, kimyasal kompozisyonlarının farklılıkları, morfolojik özellikleri, dağılımları, fonksiyonları ve patolojileri ile fark edilen birkaç hücre tipi tarafından üretilirler.

Kollajen proteininin ana yapısını glisin (%35,5), prolin (%12) ve hidroksiprolin (%10) amino asitleri oluşturmaktadır. Yapıda ayrıca daha az miktarda olmakla birlikte lizin ve hidroksilizin amino asitleri de dikkati çekmektedir. Hidroksiprolin ve hidroksilizin amino asitleri kollajene has bir şekilde bu yapıda bulunurlar. Bu amino asitler, prolin ve lizin amino asitlerinin protein molekülü sentezlenirken peptidil prolin hidroksilaz ve lizin hidroksilaz enzimlerinin etkisiyle hidroksillenmesi sonucu oluşurlar. Bir dokuda bulunan kollajen miktarı yapısındaki hidroksiprolin miktarının tespit edilmesiyle belirlenebilmektedir (Junqueira vd. 1993).

Kollajen lifleri çok sert ve dayanıklıdır. Bu özellikleri nedeniyle dokuya büyük bir dayanım ve esneklik kazandırmaktadır. Kollajen moleküllerinin dönüşüm süreleri çok uzundur ve kendilerini yenilemesi çok yavaştır. Soğuğa ve sıcağa dayanıklı olmasına karşın pepsin ve özellikle kollajenaz enzimleri tarafından kolaylıkla sindirilirler.

Kollajen lifleri alfa zincir yapılarının çok sıkı paketlenmesi sonucu oluşmaktadır. Öncelikli olarak alfa zincirleri sentezlenerek üç tanesi bir araya gelir ve prokollajen molekülünü oluşturur. *Prokollajen molekülü*, alfa zincirlerinin uçları dağınık şekilde sarmal yapı oluşturmasıyla oluşmaktadır. Dağınık uçların prokollajen peptidaz enzimiyle kesilmesi ile kollajen molekülü oluşmaktadır. Kollajen moleküllerinin 15-20 tanesinin çapraz bağlarla bir araya gelmesi ile *kollajen fibrilleri*; kollajen fibrillerin bir araya gelerek bağlanmaları ile de *kollajen fiberleri* oluşmaktadır (Sağlam vd. 2001).

Kollajen liflerinin paketlenmiş yapısı açıldığında yapının en alt biriminin alfa-zincir peptitleri olduğu görülmektedir. Kollajenin yapısında bulunan amino asitlerin farklı şekilde ve oranda dizilmesiyle farklı alfa-zincirleri; farklı alfa-zincirlerinin bir araya gelerek paketlenmesiyle de farklı kollajen lifleri oluşmaktadır (Çizelge 2.1). Kollajen liflerinin bilinen 25 farklı türü vardır. Ancak bunlardan 5-6 tanesi özellikle önem taşımakta ve üzerinde çalışılmaktadır. Bazı kollajen türlerinin ise tam yapısı ve görevi kesin olarak belirlenememiştir.

Çizelge 5.1 Kollajen tipleri ve bazı özellikleri

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

5.5.2 Özelleşmiş proteinler

Belirli bir amaç doğrultusunda fonksiyon gösteren glikoproteinler vardır. Bunlar, doku içerisindeki spesifik görevlerini yerine getirerek hücreler ile alt tabakalar ve diğer HDM molekülleri arasındaki bağlantıyı kurarak dokunun metabolik bütünlüğünü korurlar.

Bunlardan fibronektin, vitronektin ve laminin kondrositler ile HDM molekülleri arasındaki iletişimi sağlayan önemli glikoprotein yapılarıdır.

5.5.3 Proteoglikanlar

Glikozaminoglikanlar (GAG), genellikle bir üronik asit ve bir heksoz amin tarafından oluşturulan karakteristik tekrarlayan disakkarit birimlerinden meydana gelmiş olan doğrusal polisakkaritlerdir (Knudson ve Knudson 2001). GAG çeşitleri ve bileşimleri ile vücut içerisindeki dağılımı çizelge 2.2'de verilmiştir.

Hiyalüronik asit dışındaki diğer GAG polimer zincirlerinin bir kor proteinine bağlanmasıyla *proteoglikan* molekülü oluşmaktadır. Proteoglikanlarda karbonhidratlar molekül kütlesinin %80-90'ını oluşturmaktadır. Proteoglikanların sentezi düz endoplazmik-retikulumda protein vasatına ait kısmın sentezi ile başlamakta ve aynı zamanda sülfatasyonun da meydana geldiği golgi kompleksinde tamamlanmaktadır.

Kıkırdak içinde proteoglikan molekülleri daha büyük moleküller halinde proteoglikan agregatlarını meydana getiren bir hiyalüronik asit zincirine bağlı olarak gösterilmektedir. Proteoglikan agregatları, bir proteoglikan molekülü olan agrekanın bağlanma proteini ile bir hiyalüronik asit molekülüne bağlanması ve bu yapının da kollajen lifler ile etkileşime girmesi sonucu oluşmuştur (Angel vd. 2003).

Proteoglikan moleküllerinin çoğunluğunun karbonhidrat kısmının içinde hidroksil, karboksil ve sülfat grupları yüksek orada bulunduğundan dolayı yapı son derece hidrofildir ve polianyon davranışı gösterir. Bu özelliklerinden dolayı proteoglikanlar çok sayıda katyonla elektrostatik bağlar ile bağlanabilirler (Sağlam vd.2001).

Proteoglikan agregatları son derece sulu yapılar olup molekülün etrafını kalın bir çözelti suyu tabakası çevrelemektedir. Kuru hacimlerinin yaklaşık olarak 50 katı kadar suyu absorplayarak yapı içinde tutabilirler. Bu şekilde dokuya son derece güvenli bir osmotik çevre sağlamaktadırlar (Angel vd. 2003).

Çizelge 5.2 GAG'ların kompozisyonu, bağ dokusundaki dağılımı ve kollajen lifler ile olan ilişkisi

GAG	Tekrarlayan Disakkaritler		Dağılım	Kollajen ile Elektrostatik İlişki
	Hekzaüronik asit	Heksozamin		
Hiyalüronik asit	D-glukuronik asit	D-glikozamin	sinovyal sıvı, <i>kıkırdak</i>	
Kondroitin-4-sülfat	D-glukuronik asit	D-galaktozamin	<i>Kıkırdak</i> , kemik, deri, kornea	Esas olarak kollajen tip 2
Kondroitin-6-sülfat	D-glukronik asit	D-galaktozamin	<i>Kıkırdak</i> , göbek bağı, deri,	Yüksek oranda kollajen tip 2
Dermatan sülfat	D-glukuronik asit / L-idüronik asit	D-galaktozamin	Deri, tendon, aort	Yüksek oranda kollajen tip 1
Heparan sülfat	D-glukuronik asit /L-idüronik asit	D-galaktozamin	Aort, akciğer, bazal lamina, karaciğer	Orta derecede Kol- tip 3 ve 4
Keratan sülfat (kornea)	D-galaktoz	D-galaktozamin	Kornea	
Keratan sülfat (iskelet)	D-galaktoz	D-glukozamin	<i>Kıkırdak</i>	

5.5.3.1 Agrekan

Agrekan büyük bir proteoglikan molekülüdür. Genel olarak proteoglikan agregatlarının yapısında bulunan proteoglikan molekülüdür. Negatif yüklü polisakkarit uç içeriği

yapıya yüksek derecede su tutma yeteneği kazandırmakta ve bu şekilde doku için güvenli bir osmotik çevre oluşturmaktadır (Handley vd. 2002).

Agrekan monomerleri yapısında iki dağınık bölge içermektedir. Bunlar büyük hacmi kaplayan GAG birimleri ve 3 tane globüler alan içeren bölgedir (Knudson vd. 2001)

5.6 HDM Moleküllerinin Kıkırdak Dokusu İçin Önemi

HDM bileşenleri birbirleriyle çok düzenli ve hassas bir etkileşim halindedir. Bu etkileşim dokuya iyi bir dayanım kazandırmakta ve dokunun gelişimi ile fonksiyonlarını düzgün yapabilmesi için uygun ortamı sağlamaktadır.

Dokuyu oluşturan hücrelerin ve HDM bileşenlerinin anabolik ve katabolik reaksiyonları çok hassas bir dengeye dayanmaktadır. Bu mekanizma düzgün bir hormonal denge tarafından kontrol edilmektedir. Hormonal dengenin bozulması, dokunun stabilitesinin bozulmasına ve sonucunda çeşitli sorunların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Kapiler dolaşım sistemi olmayan kıkırdak dokusunda beslenme ve gerekli olan düzenleyici moleküller, perikondriumdan ya da sinovyal sıvıdan difüzyonla sağlanmaktadır. Ancak, gerekli olan düzenleyici moleküller gerekli olan her an difüzyonla yeterince hızlı bir şekilde temin edilemeyebilir. Bu nedenle çeşitli matriks molekülleri üzerinde gerekli olan düzenleyici moleküller ve kimyasallar için bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Bu bağlanma bölgeleri bu maddeler için hem depo görevi hem de aktivite gösterebilmeleri için bir araç olarak işlev görmektedir.

Kıkırdak hastalıkları genellikle iki nedenden ortaya çıkmaktadır. Birincisi, dokudaki anabolizma ve katabolizma arasındaki dengenin bozulması sonucu matriks içerisindeki proteoglikanlar ile kollajen liflerin dejenere olmasına, dolayısıyla doku uyumunun bozulmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda da çeşitli dejeneratif hastalıklar ile tümör oluşumu ortaya çıkmaktadır. İkincisi, çeşitli yaralanmalar ve kazalar sonucu

kıkırdak dokusunun hasar görmesidir. Oluşan hasar darbenin şiddetiyle doğru orantılı olarak değişiklik göstermektedir.

5.7 HDM Moleküllerinin *In Vitro* Kondrosit Kültürüne Etkisi

Son yıllarda, doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen kıkırdak dokusu, kullanımda olan tedavi yöntemlerine alternatif olarak geliştirilmektedir. Doku mühendisliği yaklaşımıyla kıkırdak doku üretimine yönelik üzerinde çalışılan iki yöntem bulunmaktadır. Bunlardan birincisi; vücut dışında çoğaltılan kıkırdak hücrelerinin kullanımı (hücre transplantasyonu); ikincisiyse kıkırdak hücrelerinin, üç-boyutlu biyobozunur destek materyalleri üzerinde üretilmesidir (hücre-polimer modeli).

Hücre naklinde, hücrelerin hasarlı bölgeye istenilen şekilde ve boyutta ulaştırılamaması durumunda, yapılan çalışmanın hiçbir anlamı kalmamaktadır. Bu amaçla, hücre naklinde kullanılmak üzere yüksek oranda gözeneğe sahip destek materyallerinin kullanımını içeren hücre-polimer modeli geliştirilmiştir (Dunkelman vd. 1995). Hücre-polimer modelinde kıkırdak dokusundan elde edilen hücreler, sentetik ya da doğal yapıya sahip, biyolojik ortamda bozunan (biyobozunur) polimerik destek malzemeleri üzerine yerleştirilmektedir. Bu destek malzemeleri, *in vitro* olarak kültüre edilen kıkırdak hücrelerinin, bağlanıp gelişebilmesi için gerekli olan yüzeyi sağlamaktadır. Ayrıca kondrositlerin kendi matrikslerini üretene kadar tutunabilecekleri bir çeşit yapay hücre-dışı matriks (HDM) görevi üstlenmektedir (Nehrer vd. 1997).

Kültür işlemi, iki-boyutlu olarak yürütüldüğünde hücrelerin dediferansiye olarak kendi fenotipik özelliklerini kaybettiği gözlenmiştir. Buna karşın üç-boyutlu ortamlarda yani polimer iskeletlerde ve biyoreaktörlerde yürütülen kültürlerde, kondrositlerin dediferansiye olmadıkları ve kendi işlevlerine devam edebildikleri gözlenmiştir (Freed 1998). Destek malzemesinin üç-boyutlu olması, dokunun şekillendirilebilmesi ve gelişimi için önemli bir parametredir (Ming vd. 2002). İki-boyutlu tek tabaka kültürlerde fenotipik özelliklerini kaybeden otolog kondrositler, üç-boyutlu malzemeler üzerinde kondrojenik vasat ortamına alındığında, kendi HDM'lerini oluşturarak yeni kıkırdak dokusu oluşturabilmektedir (Rotter vd. 1998).

In vitro kıkırdak hücre kültürlerinin başarılı olabilmesi için bazı şartların sağlanması gerekmektedir. Kıkırdak hücreleri gelişmeleri ve fonksiyon gösterebilmeleri için bir zemine yapışma ihtiyacı duyan bağlanma bağımlı hücrelerdir. İzole edilmiş kondrositlerin *in vitro* kültür ortamına bağlanabilmesi için dışarıdan bazı müdahaleler yapılabilmesine karşın bu aşamada yine bazı matriks molekülleri bu işlem için yardımcı olmaktadır.

Bu tür matriks moleküllerinden fibronektin, laminin, vitronektin, tip-1 ve tip-4 kollajen polistiren doku kültür kaplarına yapışarak hücre eklenmesini, büyümeyi ve farklılaşmayı iletir. Ayrıca vitronektin *in vitro* olarak seruma yapışabilme yeteneğine, serum da doku kültür kabı ile polimerik biyomalzemelere yapışabilme yeteneğine sahiptir. Bu kombinasyon sayesinde hücrelerin zemine yapışarak gelişimini ilerletebilmesi için ilk ve en önemli adım atılmış olmaktadır.

İzole edilmiş kondrositler, kültür ortamına alındıklarında hemen kendi hücre dışı matrikslerini üretmeye başlamaktadır. HDM moleküllerinden bazılarının üretimi ilk bir saat içerisinde tamamlanmaktadır. Bunlardan kollajen liflerinin üretiminin ise ilk dört saatte tamamlandığı gözlenmiştir. Bu şekilde hücreler ilk aşamada buldukları ortama uyum sağlayabilecekleri molekülleri öncelikli olarak üretmekte; ilerleyen zamanda ise kendi organoid yapılarını üretmeye devam etmektedir.

6. MATERYAL ve METOT

6.1 Kimyasallar ve Reaktifler

Bu çalışmanın kültür aşamalarında, hücre kültürü saflığında, diğer bazı aşamalarda ise, yerine göre mikroskopi saflığında, analitik saflıkta (ya da daha yüksek saflık düzeyindeki) kimyasallar ve reaktifler kullanılmıştır.

Hücreler, kültür kaplarından pasajlama sırasında Tripsin ve EDTA (Sigma, ABD) kullanılarak ortamdan ayrılmışlardır.

Üç-boyutlu (3B) hücre kültürü ortamındaki polimerin kontrollü degradasyonu için hiyalüronidaz (Sigma, ABD) enzimi kullanılmıştır

Polimerik iskelelerin ve hidrojelin hazırlanmasında, hiyalüronik asit sodyum tuzu (Sigma, ABD), sodyum alginat tuzu kullanılmıştır (Sigma, ABD), kitosan (Sigma, ABD) ve wistar sıçanlarının tendonundan izole edilen tip-1 kollajen (laboratuarda hazırlanmıştır) kullanılmıştır.

Sodyum alginat tuzunu kelatlaştırmak için kalsiyum klorür (Merck, Almanya), kitosanı kelatlaştırmak için sodyum-tri-polifosfat, hiyalüronik asiti çapraz bağlamak için $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ kullanılmıştır.

Hücrelerin *in vitro* kültüründe kullanılmak üzere hazırlanan kültür sıvısında; MEM (Gibco, UK), fetal sığır serumu (FBS) (Sigma, ABD), penisilin/streptomisin/amfoterisin (Sigma, ABD), DMEM (Sigma), askorbik asit (Sigma), L-glutamin (Sigma), esansiyel olmayan amino asit çözeltisi (Gibco, ABD), TGF- β_1 (Pepro Tech, ABD), ITS⁺ (İnsülin-Transferrin-Selenoik asit kombinasyonu) (Gibco, ABD) kullanılmıştır.

SEM örneklerinin hazırlanması aşamasında, hücrelerin tespiti için %2,5'lik glutaraldehit (Sigma, ABD) çözeltisi kullanılmıştır.

İmmunhistokimya ve histokimya boyamaları için dondurarak kesit alma yönetimi kullanılmıştır.

İmmünhistokimya için monoklonal-antikör-kollajen-tip-I (Sigma, ABD), poliklonal-antikör-kollajen-tip-II (Sigma, ABD) ve monoklonal antikör-agrekan (Sigma, ABD) antikörleri kullanılmıştır.

Histolojik boyamalar için ise Safranin-O, Alsiyan mavisi, hematoksilin-eosin (Sigma, ABD) boyaları kullanılmıştır.

Hücrelerin mitokondriyal dehidrojenaz aktiviteleri, MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromür]'ye dayalı ticari bir kit (Sigma, ABD) kullanılarak ölçülmüştür.

6.2 Hiyalüronik Asit Çözeltisinin Hazırlanması ve Kelatlaştırılması

Embriyonik evrede bol miktarda bulunması nedeniyle doğal ortamı taklit edebilmek amacıyla yaptığımız çalışmada, yapay niş mikroçevreyi ve üç boyutlu ortamı sağlamak için hiyalüronik asit polimerinin çapraz bağlayıcılarla kelatlaştırılmış hidrojel formu kullanılmıştır.

Öncelikle hiyalüronik asit çözeltisini polimerleştirecek çapraz bağlayıcının belirlenmesine çalışılmıştır. Bu amaçla hiyalüronik asitin CaCl_2 , TPP (sodyumtripolifosfat) ve FeCl_3 çözeltileri içerisindeki davranışı incelenerek optimum çapraz bağlayıcı belirlenmiştir.

Uygun çapraz bağlayıcı olarak FeCl_3 'ün tespit edilmesinin ardından yapılan literatür araştırmaları ile paralel olarak FeCl_3 'ün farklı konsantrasyonları (6,3 mM, 12,6 mM, 18,9 mM ve 25,2 mM) test edilmiş ve 12,6 mM konsantrasyonda FeCl_3 çözeltisinin çapraz bağlayıcı olarak daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Hiyalüronik asitin suda hazırlanan %1, %1,5 %2 ve %2,5'lik çözeltileri ile şekillenmeleri ve polimerleşme süreleri (3, 5, 10, 15 ve 20 dakika) test edilmiş olup, hücresiz yapılan denemelerde Hiyalüronik asitin suda hazırlanan %1,5'lik çözeltisinin 15 dakika süreyle çapraz bağlayıcı ile etkileştirilemediğinde en iyi polimerleşmeyi verdiği gözlenmiştir.

Kültür işlemlerine başlamadan önce, hiyalüronik asit 2 saat süreyle UV ışık altında bekletilerek, çapraz bağlayıcı olarak kullanılan 12,6 mM FeCl₃.6H₂O steril filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

Kültür işlemi öncesinde sterilize edilen %2'lik HA çözeltisinden 4.0 ml alınarak steril enjektör içerisine aktarılmış ve 1.0 ml hücre süspansiyonu enjektörün pompası çıkartılarak hiyalüronik asit üzerine ilave edilmiştir. Enjektörün pompası kapatılarak HA ile hücre süspansiyonunun homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Bu şekilde HA konsantrasyonu %1,5'lik hale getirilmiştir.

HA çözeltisini polimerleştirmek için hazırlanmış olan steril FeCl₃ çözeltisinden 50 ml steril bir beher içerisine konulmuştur. Hazırlanan HA-hücre karışımı yavaş şekilde enjektörden çözelti içerisine gönderilerek, yaklaşık olarak 2-5 mm çapında küreler oluşması sağlanmıştır. Oluşan kürelerin tamamen polimerleşmesi için 10-15 dakika çözelti içerisinde bekletilmiştir.

6.3 Sodyum Alginat Çözeltisinin Hazırlanması ve Kelatlaştırılması

Sodyum alginatın %2'lik çözeltisini hazırlamak için 2 gr sodyum alginat ve 0,89 gr sodyum klorür tartılarak bir erlen içerisine konulmuştur. Üzerine 100 ml bidestile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak sodyum alginatın çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan alginat çözeltisi +4°C'de saklanmıştır.

Hazırlanan çözelti kullanılmadan önce 2 saat süreyle UV ışık altında bekletilerek steril edilmiştir.

Alginat çözeltisini kelatlaştırmak için 0,40 M'lik CaCl₂ çözeltisi kullanılmıştır. Hazırlanan kalsiyum klorür çözeltisi kapaklı şişelere porsiyonlanmış ve otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır.

6.4 Kitosan Çözeltisinin Hazırlanması ve Kelatlaştırılması

Kitosanın %2'lik çözeltisi, %2'lik askorbik asit içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan kitosan çözeltisi +4°C'de saklanmıştır. Hazırlanan çözelti kullanılmadan önce 2 saat süreyle UV ışık altında bekletilerek sterilize edilmiştir.

Kitosanı kelatlaştırmak için %0,6'lık TPP çözeltisi kullanılmıştır. Hazırlanan çözelti kapaklı şişelere porsiyonlanmış ve otoklavda sterilize edildikten sonra kullanılmıştır.

6.5 Hiyalüronik Asit Kürelerinin Alginat ve Kitosan ile Kaplanması

Hazırlanan HA küreler, bir petri içerisinde alginat çözeltisi ile etkileştirilmiş ve ardından kalsiyum klorür çözeltisi içerisine daldırılarak alginatın kelatlaşması sağlanmıştır. Bu işlem 1, 2 ve 3 kez tekrarlanarak yapının stabilitesi test edilmiştir.

Kitosanın TPP içerisinde polimerleşmesi esasına dayanılarak HA kürelerinin kitosan ile kaplanması işlemleri aynı şekilde test edilmiştir.

6.6 Kollajen-Hiyalüronik Asit İskelelerin Hazırlanması

Wistar sıçanlarının kuyruklarından izole edilen kollajen liflerinin %1'lik çözeltisi %0,1'lik asetik asit çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan kollajen çözeltisi daha sonra %1'lik hiyalüronik asit çözeltisi ile 9:1 oranında vorteks yardımıyla homojen karışması sağlanmıştır.

Ayrıca %1'lik kollajen çözeltisi içinde konsantrasyonu %1 olacak şekilde katı hiyalüronik asit sodyum tuzu ilave edilerek vorteks yardımıyla %1'lik kollajen-HA çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımların pH'sı NaOH ile 7,4'e ayarlanmıştır.

Taze hazırlanan %1'lik kollajen, %1'lik HA, %1'lik 9:1 kollajen-HA ve %1'lik kollajen-%1'lik HA çözeltileri 6-kuyucuklu petilere 5'er ml olacak şekilde porsiyonlanarak -20°C ve -40°C'de bir gece bekletilmiştir. Daha sonra dondurularak hazırlanan iskeleler 24 saat süreyle liyofilizatörde kurutulmuştur. Liyofilizasyonun ardından çapraz bağlama işlemi N-hidroksisüksinimid (NHS) ve 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDAC) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

6.7 Hücre Kaynağı ve İzolasyonu

Hücre kaynağı olarak Wistar sıçanları kullanılmıştır. Hayvan deneyleri, evrensel kabul gören kurallara uygun olarak, deneklerin acı ve sıkıntıları en düşük düzeyde tutularak gerçekleştirilmiştir. Hücre izolasyonu ve kültürü işlemleri laminar akışlı steril hava kabini içerisinde gerçekleştirilmiş, kullanılan malzemelerin ve maddelerin steril olmasına azami dikkat gösterilmiştir.

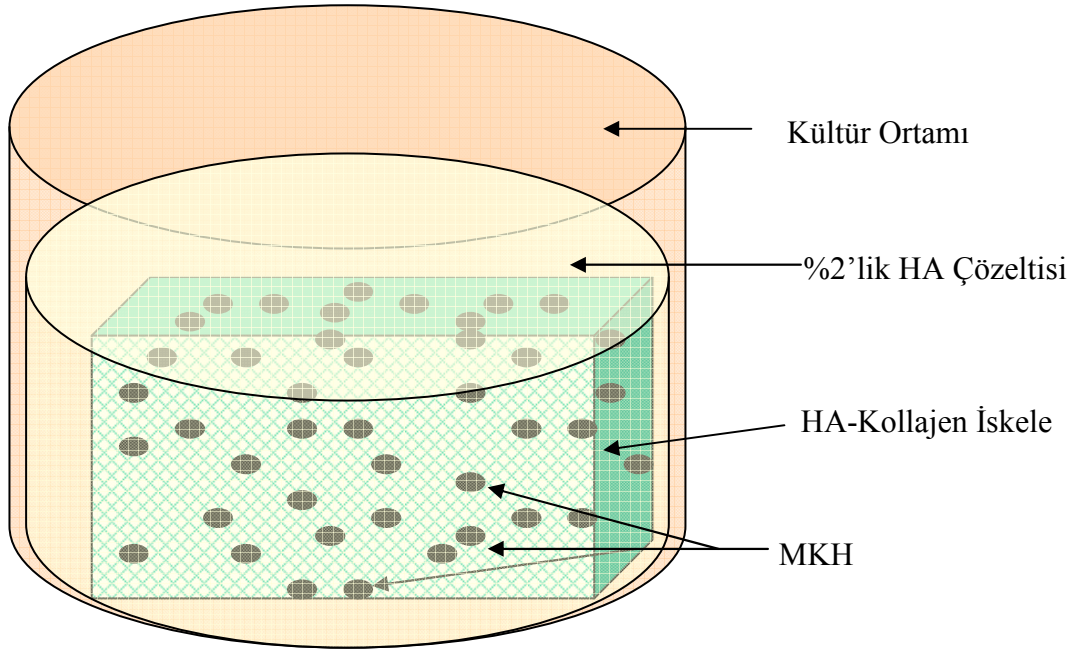
Anestetik olarak 0,2 ml/10 gr avertin kullanılarak anestezi uygulanan 200-300 gr ağırlığındaki genç wistar sıçanlarının femurları, kırılmamasına dikkat edilerek cerrahi operasyonla çıkartılmıştır. Femur başları bir makas yardımıyla kesildikten sonra femur kemik iliği, içerisinde α -MEM bulunan 10 ml'lik enjektör yardımıyla 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınmıştır. İzole edilen kemik iliği, içerisindeki istenmeyen diğer hücrelerden (stromal olmayan kan hücreleri, vd.) arındırılmak üzere α -MEM ile 1100 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjlenerek yıkanmış ve bu işlem üç kez tekrarlanmıştır.

6.8 Hücre Kültürü

Yıkama işleminin ardından elde edilen MKH süspansiyonu, T-75 doku kültür kaplarına ekilerek, %90 nem, 37°C ve %5 CO₂ şartlarına sahip olan bir inkübatör içerisine yerleştirilmiştir. İki günde bir besi yeri değiştirilerek ortamdaki istenmeyen metabolik atıkların ve zemine yapışmamış hücrelerin (ilk pasaj değişiminde) uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Hücreler P0 (Pasaj 0) aşamasında, 5-7 gün içerisinde %70 doluluk oranına ulaşıncaya kadar çoğaltılmıştır. Daha sonra tripsinizasyon işlemi ile 1 adet T-75 kültür kabından elde edilen hücreler 2 adet T-75 kültür kabına ekilerek P1 (Pasaj 1) aşamasına geçirilmiştir.

P2 (Pasaj 2) aşamasına geçilirken hücrelerin bir kısmı HA küre içerisine tutuklanarak (~200.000 hücre/küre) ya da HA-Kollajen iskele (~300.000 hücre/iskele) üzerine ekildikten sonra 300 µl %2'lik HA çözeltisi içerisine gömülerek (Şekil 6.1) üç boyutlu ortama geçirilmiştir; kalan kısmı ise dondurularak saklanmıştır.



Şekil 6.1 HA-Kollajen iskele üzerinde MKH kültürünün şematik gösterimi

MKH'lerin, HA ve kollajen yapılar yardımıyla üç boyutlu ortama geçirilmesiyle, hiyalüronidaz (HDZ) enzimi varlığında polimerin kontrollü degradasyonu ve bu aşamadaki hücre davranışı tespit edilmeye çalışılmıştır.

MKH'nin farklılaştırılacağı model sistem olarak kondrogenez seçilmiş olup, hücrelerin kondrogeneze yönelmeleri için kültür ortamına kondrojenik indüksiyonu uyaran büyüme faktörleri (TGF- β) ve kimyasallar (askorbik asit, ITS⁺ vd.) eklenmiştir.

Oluşturulan HA-MKH yapıları sürekli olarak inversiyon mikroskobu ile takip edilmiş, immünohistokimya, histokimya, TEM, SEM ve vasatta serbest HA ve GAG miktarının ölçümü için örnekler toplanmıştır.

6.9 HA'nın Degradasyon Hızının Ölçülmesi

Mezenkimal kök hücrelerin üç boyutlu ortama geçirilmesinin ardından HA'nın kontrollü degradasyonu için HDZ'nin 0,50 ve 0,75 mg/ml konsantrasyonları test edilmiştir. HDZ'nin HA'yı yıkma hızı kültür sıvısı içerisindeki bozunmuş formadaki serbest hiyalüronik asitin tayini ile ölçülmüş ve bu amaçla ticari Hiyalüronik asit Test Kiti (Corgenix, UK) kullanılmıştır. İşlem basamaklarında standart kit protokolü takip edilmiştir.

Yürütülen HA-MKH kültürlerinde degradasyon hızını ölçmek amacıyla kültür ortamından belirli zaman aralıklarında toplanan örnekler, -20°C'de dondurularak saklanmıştır.

6.10 Toplam DNA Miktarının Ölçülmesi

DNA miktarının ölçülmesinde standart bir analiz yöntemi kullanılmıştır. Farklı zaman noktalarında kültür ortamından alınan örneklere aşağıda gösterilen protokole göre işlem uygulanmıştır.

1. Kültür ortamından alınan rnekler, 0,2 M Triton X100, 5mM MgCl₂ içerisinde +4°C’de 3-4 gün bekletildi.
2. Parçalanmamış polimerler (sonikasyon, makas gibi parçalayıcılar kullanılarak) parçalandı.
3. Her tüpe 500 µl Trizol konularak 1300 rpm’de 4 dk santrifüjlendi, supernatant atıldı.
4. Her tüpe 500 µl STE, 10% SDS ve 20 ul Proteinaz K eklendi.
5. Bir gece 56°C’de inkübasyona bırakıldı.
6. 500 ul Fenol:Kloroform:İzoamil alkol (24:24:1) eklendi, vorteks ile karıştırıldı.
7. 13000 rpm’de 4°C’de 2 dk santrifüjlendi, süpernatant pipet yardımıyla temiz bir tüpe alındı.
8. 1000 µl 95% Etanol ve 1/10 oranında (3M) sodyumasetat eklendi. DNA görünene kadar yavaşça alt üst edildi.
9. Yüksek devirde 10 dk. 4°C’de santrifüjlendi ve alkol uzaklaştırıldı.
10. 500 µl %70 Etanol eklendi ve tüpe yavaşça vurularak pellet kaldırıldı.
11. Yüksek devirde 10 dk. 4°C’de santrifüjlendi.
12. Alkol dikkatlice uzaklaştırıldı ve pelletin kuruması için 15 dk. Bekletildi.
13. DNA pelleti 100 µl dH₂O kullanılarak sulandırıldı.

14. DNA 56°C’de 3-4 saat inkübe edildi.

15. İşlemlerin tamamlanmasından sonra örneklerin 280 nm de absorbans değerleri ölçüldü.

6.11 Kültür Ortamındaki Serbest GAG ile Matriks Yapı İçerisindeki GAG Miktarının Tayini

Mezenkimal kök hücrelerin hiyalüronik asit esaslı polimerik malzemeler içinde tutuklanmasının ardından kültür sıvısı içerisindeki serbest GAG miktarının ve yeni oluşan hücre dışı matriksin yapısında bulunan GAG miktarının tayininde Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay (Biocolor, UK) test kiti kullanılmıştır. İşlem basamaklarında standart kit protokolü takip edilmiştir.

Kültür ortamından belirli zaman aralıklarında toplanan örnekler, -20°C’de dondurularak saklanmıştır.

6.12 Faz-Kontrast Mikroskobu ile Hücrelerin Takibi

Kondrosit hücre kültürünün takibi ve görüntülenmesi işleminde Nikon TS100 marka (Japonya) bir faz-kontrast mikroskobu kullanılmıştır.

İzole edilen hücrelerin kültüre alınma işlemi tamamlandıktan sonra hücrelerin kültür kabının zeminine yapışması için 2 saat beklenmiştir. Bu süre sonunda hücreler faz-kontrast mikroskobu ile incelenerek görünüşleri, yapışma durumları ve sayıları kontrol edilmektedir.

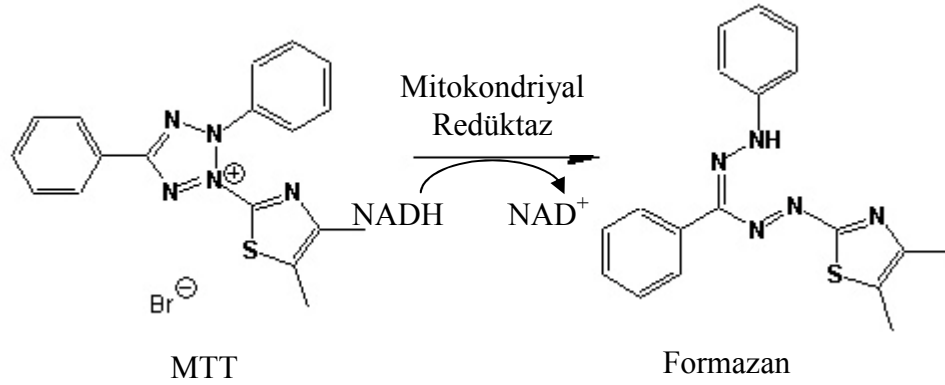
Kültür işlemi bitene kadar hücre kültürleri, vasat değişimleri sırasında gün aşırı faz-kontrast mikroskobu ile takip edilerek gözetim altında tutulmuş ve gelişmeler not edilmiştir. Hücrelerin mikroskopik olarak takip edilmesinde, fotoğraf çekimi yapılmıştır.

6.13 Mitokondriyal Dehidrojenaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

MTT, 1983 yılında memeli hücrelerinin hayatta kalmalarını ve proliferasyonlarını belirlemek için kantitatif kolorimetrik bir ölçüm olarak Mossman tarafından önerilmiştir ve günümüzde hücrelerin mitokondriyal dehidrojenaz aktivitelerini belirlemek sıklıkla kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (Mossman 1983).

İzolasyon sonrasında çeşitli hücre kültürü serilerindeki hücrelerin, mitokondriyal dehidrojenaz aktiviteleri, MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromür]'ye dayalı ticari bir kit (Sigma) kullanılarak ölçülmüştür.

MTT testi ile proliferasyon olan hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri ve canlılıkları takip edilmiştir (Mosmann 1983).



Şekil 6.2 MTT'den formazan oluşumunun reaksiyon denklemi

Bu test için 96-kuyucuklu bir petri kabı kullanılmıştır. Bu test sadece üç-boyutlu kültürler için yapılmıştır.

Petrinin kuyucuklarına temiz, taze hazırlanmış vasat konularak üzerine %10 konsantrasyonu sağlayacak şekilde MTT kiti ilave edilmektedir. Kuyucukların her birine numuneden alınan örnekler konularak 4 saat süresince karbondioksit

inkübatöründe bekletilmektedir. Ancak, kuyucuklardan birine örnek konulmayarak içerisindeki vasat kör olarak kullanılmıştır.

İnkübasyonun sonunda formazan kristallerinin oluşumu faz-kontrast mikroskopunda incelenmiştir. Sonrasında ise koyu mavi formazan kristalleri MTT çözücüsü ile çözülerek renk şiddeti 570 nm’de UV-spektrofotometresinde ölçülmüştür.

6.14 Histoloji ve İmmünohistokimya

Model sistem olarak kondrojenik indüksiyona tabi tutulan örnekler, histolojik (hematoksilin-eosin, Safranin-O, Alsiyan mavisi) ve immünohistokimyasal (kollajen tip-II, kollajen tip-I ile agrekan) incelemeler yapmak için farklı zaman noktalarında dondurarak kesit alma yöntemine göre fikse edilerek -80°C’de saklanmıştır.

Boyamalardaki farklılıklara bağlı olarak, oluşması beklenen kıkırdak dokusunun özellikleri hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır.

Örnekler dondurarak kesit alma tekniği uygulanarak histolojik boyamalara hazır hale getirilmiştir.

6.14.1 Histokimya

Histoloji çalışması, kıkırdak dokusunun oluşumu sırasında HDM’nin ana bileşimini oluşturan kollajen lifler ve agrekan molekülleri ile hücrelerin belirlenmesi için yapılmaktadır. Bu amaçla standart histoloji tekniği kullanılmıştır.

Matriks bileşimdeki glikozaminoglikanlar Alsiyan mavisi; kollajen lifler Safranin-O ve hücreler de hematoksilin-eosin ile boyanarak tespit edilmiştir.

Alınan numune kesitlerinin üzerlerine adı geçen boya çözeltileri standart protokollere göre uygulanmıştır. Daha sonra boyanın fazlası su ile yıkanarak örneklerin kuruması beklenmiş ve ardından ışık mikroskobu ile boyamalar kontrol edilmiştir.

6.14.1.1 Safranin-O boyaması

Tripsinizasyon ile tek tabakada kültür işlemine son verilerek üç boyutlu kültür ortamına alınarak kondrojenik indüksiyon uygulanan MKH, yeniden modellenme ile farklılaşmaya başladıklarında kendi HDM'lerini üretmeye başlamaktadır. Yeni HDM oluşturulurken kollajen molekülleri hücre içerisinde sentezlenmeye başlamakta ve daha sonra hücre dışına çıkartılmaktadır. İlerleyen günlerde üretilen kollajen lifler hücreler arası bölgede (intertiritorial matrikste) lokalize olmaktadır (Murathanoğlu 1996). Safranin-O ile yapılan histoloji boyamaları aşağıdaki prosedüre göre yapılmıştır.

Demir hematoksilin (Weigert's) çalışma çözeltisi:

Çözelti A: 1 gr hematoksilin 100 ml %95'lik etil alkolde hazırlanmıştır.

Çözelti B: 4 ml %29'luk ferik klorit ($FeCl_3$), 95 ml saf su ve 1 ml derişik HCl karıştırılarak hazırlanmıştır.

Eşit hacimlerde A ve B çözeltileri alınıp karıştırılarak Weigert's çözeltisi hazırlanmıştır. Kullanma süresi iki haftadır.

%0,01 Fast Green çözeltisi: 0,1 gr Fast Green 1000 ml saf suda çözülerek fast green çözeltisi hazırlanmıştır.

%1'lik Asetik asit çözeltisi: 1,0 ml glasiyal asetik asit alınmış ve 99 ml saf su ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

%0,1 Safranin-O çözeltisi: 0,1 gr safranin-O 100 ml saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

1. Numune kesitleri üzerinden parafin uzaklaştırılarak (deparafinizasyon) hidrate edilmiştir.
2. Weigert's demir hematoksilin çalışma çözeltisi ile 7 dk boyanmıştır.
3. Akan musluk suyu altında 10 dk yıkanmıştır.
4. Fast green çözeltisi ile 3 dk boyanmıştır.
5. Hızlıca %1'lik asetik asit çözeltisi ile 10-15 sn yıkanmıştır.
6. %0,1 safranin-o çözeltisi ile 5 dk boyanmıştır.
7. %95 etil alkol, mutlak (absolut) etil alkol ve ksilen ile (her biriyle 2 dk olmak üzere) suyu uzaklaştırılarak temizlenmiştir. Kalsiyum alginat ksilende çözündüğü için kullanılmamıştır

Hücre çekirdekleri siyah, sitoplazma gri-yeşil ve kıkırdak hücre granülleri (kollajen molekülleri) turuncudan kırmızıya değişen renklerde boyanmıştır.

6.14.1.2 Alsiyan mavisi ile boyama

Proteoglikan molekülleri hücre içerisinde sentezlendikten sonra hücre dışına çıkartılarak HDM'nin yapısına katılmakta ve HDM içerisinde genel olarak kondrositlerin çevresinde (teritoryal matrikste) lokalize olmaktadır. Alsiyan mavisi boyama yöntemi aşağıda verilmiştir.

1. Parafine kesitlerin üzerinde parafin uzaklaştırılarak saf su ile hidrate edilmiştir.
2. PH 1,0'daki %1'lik alsiyan mavisi çözeltisi ile 30 sn %70 güçle mikrodalgada boyanmıştır.

3. 0,1 N HCl ile 5 sn yıkanmıştır.
4. %95 etil alkol ile yıkanarak dehidrate edilmiştir.

HDM içerisindeki proteoglikan molekülleri mavi olarak boyanmıştır.

6.14.2 İmmünohistokimya

İmmünohistokimya kıkırdak dokusunun oluşumu sırasında kondrositler tarafından salgılanan HDM bileşenlerinden kollajen tip-1, kollajen tip-2 ve agrekan molekülleri için yapılmıştır. Kollajen tipinin belirlenmesi bize, oluşan kıkırdak dokusunun türünü, dolayısı ile kültür işleminin başarısını göstermektedir. İmmünohistokimya için dondurarak kesit alma-standart avidin-biyotin kompleks peroksidaz tekniği kullanılmıştır.

Çalışmada, primer antikorları belirlemek amacıyla HRP kit sistemi (AEC, ABD) kullanılmıştır. İmmünohistokimya boyamaları için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.

1. Örnekler, 10-15 dk hidrojen peroksit blok çözeltisi ile muamele edilir.
2. PBS ile yıkanır.
3. %1'lik FBS içeren PBS ile 1/100 oranında seyreltilmiş primer antikor ile etkileştirilerek oda sıcaklığında 1 saat bekletilir.
4. PBS ile yıkanır.
5. Biotinlenmiş keçi-anti-fare sekonder antikor ile 10 dk inkübe edilir.
6. PBS ile yıkama yapılır.

7. Streptavidin-Peroksidaz (HRP) ile 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.
8. PBS ile yıkama yapılır.
9. 5-10 dk AEC kromojen-AEC substrat karışımı ile inkübe edilir.
10. Saf su ile yıkama yapılır.
11. İstenirse hücre boyaması yapılabilir.

6.15 SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Analizi

Hazırlanan iskeletlerden alınan 5mm³'lük örnekler, kakodilat tamponunda hazırlanmış %2,5'lik glutaraldehitte tespit edildikten sonra 0,1 M kakodilat tamponu ile yıkanmıştır. Ardından örnekler bir dizi etanol çözeltilisinden (%50, %70, %80, %95) geçirilerek içerdiği sudan arındırılmıştır.

Örnekler havada kurutulduktan sonra ince bir tabaka halinde altınla kaplanarak (yaklaşık olarak 250 Å kalınlığında) JEOL-JSM 5600 marka taramalı elektron mikroskobunda 20 kV'de incelenmiştir.

6.16 FT-IR Analizi

Liyafilizasyon yöntemi ile hazırlanan Kollajen, Hiyalüronik asit ve kollajen-hiyalüronik asit iskelelerinin yapılarının bağlanmalarının tespiti amacıyla ATR- FTIR ile örneklerin yapı ölçümü yapılmıştır. Ölçümler, Perkin Elmer Spectrum 100 model (Waltham, MA, ABD) cihazı kullanılarak, 400-4000 cm⁻¹ aralığında gerçekleştirilmiştir.

7. ARAŞTIRMA BULGULARI

7.1 İzolasyon ve Hücre Sayımı

2-3 aylık genç Wistar sıçanlarının femur kemik kemik iliğinden izole edilen hücreler, α -MEM ile süspanse edilere tripan mavisi ile yapılan sayım sonucu her bir kültür kabında 200-300 bin hücre olacak şekilde T-75 hücre kültür kaplarına ekilmiştir.

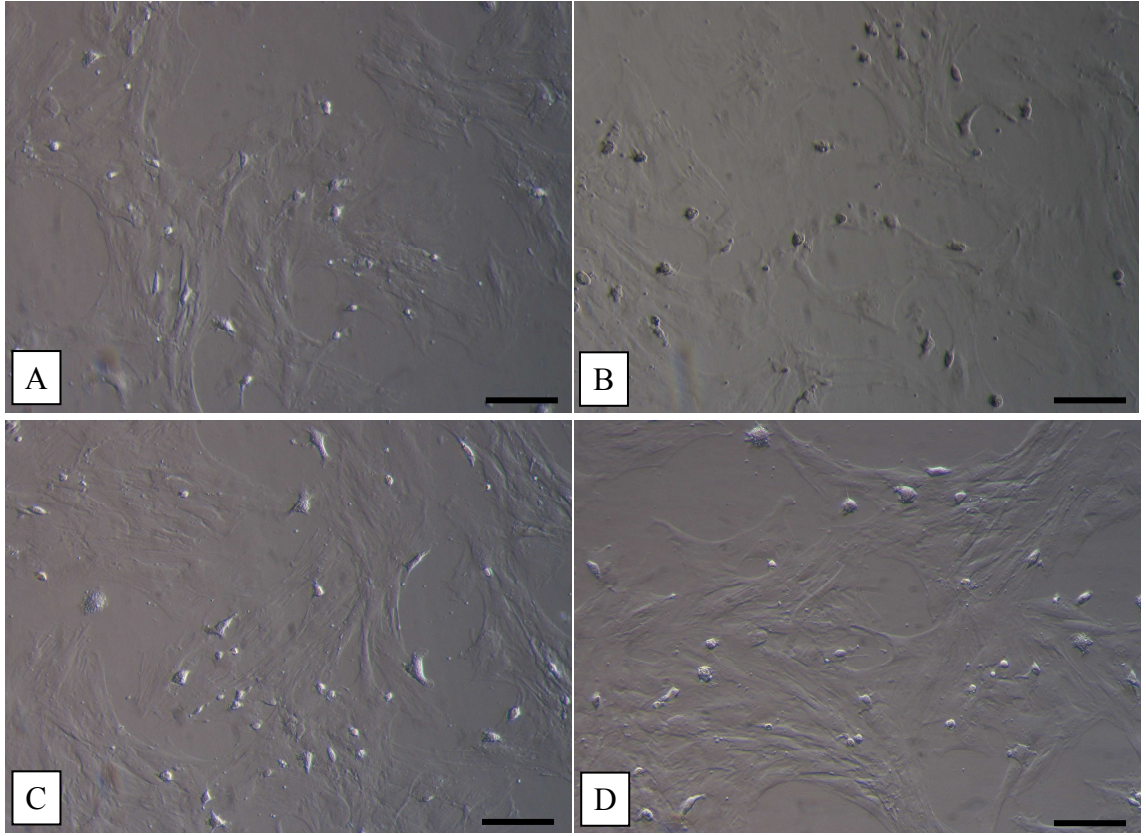
Hücre yoğunluğunun %70 doluluğa gelmesinin ardından (yaklaşık olarak 1 milyon hücre) tripsinizasyon ile pasajlama yapılarak P1 fazına geçilmiştir ve bu aşamada elde edilen hücre süspanسیونundan 100 μ l alınarak yapılan tripan mavisi ile canlılık testi sonucunda hücrelerin %90-95 oranında canlılığını koruduğu gözlenmiştir.

7.2 Faz-Kontrast Mikroskobu İncelemeleri

Hücre kültürünün takibi ve görüntülenmesi işleminde Nikon TS100 marka (Tokyo, Japonya) bir inversiyon mikroskobu, faz kontrastta kullanılmıştır.

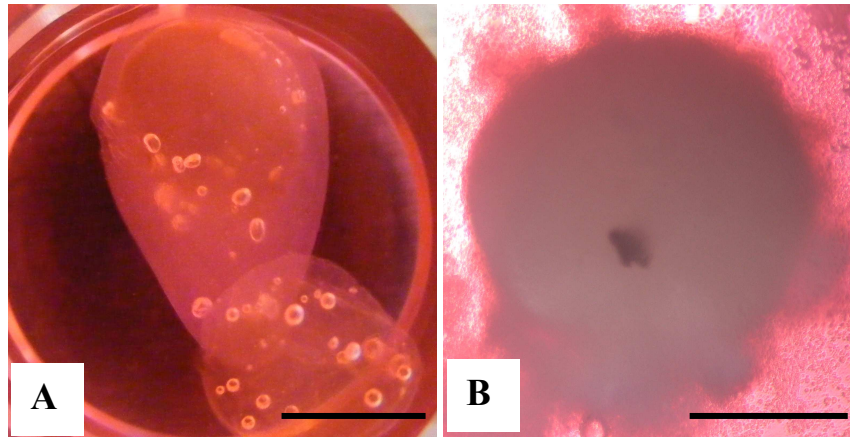
Kültür işlemi tamamlanana kadar hücre kültürleri, besiyeri değişimleri sırasında inversiyon mikroskobu ile takip edilerek gözetim altında tutulmuş ve gelişmeler not edilmiştir. T-75 kaplarında (iki boyutlu ortamda) kültüre edilen hücrelerin ilk 2 saatte zemine yapışmaya başladığı gözlenmiştir. Zemine yapışan hücrelerin fibroblastik görünüm kazanarak kısmen yuvarlak bir baş kısım ve kap içerisine yayılmış gövdelerinin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 7.1).

Kondrojenik indüksiyon uygulanan alginat kaplı HA küre içerisindeki MKH kültüründe, yapının içerisindeki yaklaşık olarak 5 mm çaplı HA kürenin, şekil 7.2.a'daki görüldüğü gibi 0. günde alginat kapsül içerisinde stabil olduğu; ancak daha sonra, HA'nın kültür ortamında bozularak alginat kapsül dışına salındığı ve 7. günden itibaren doku benzeri yapının daha küçük boyutlarda oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 7.2.b).



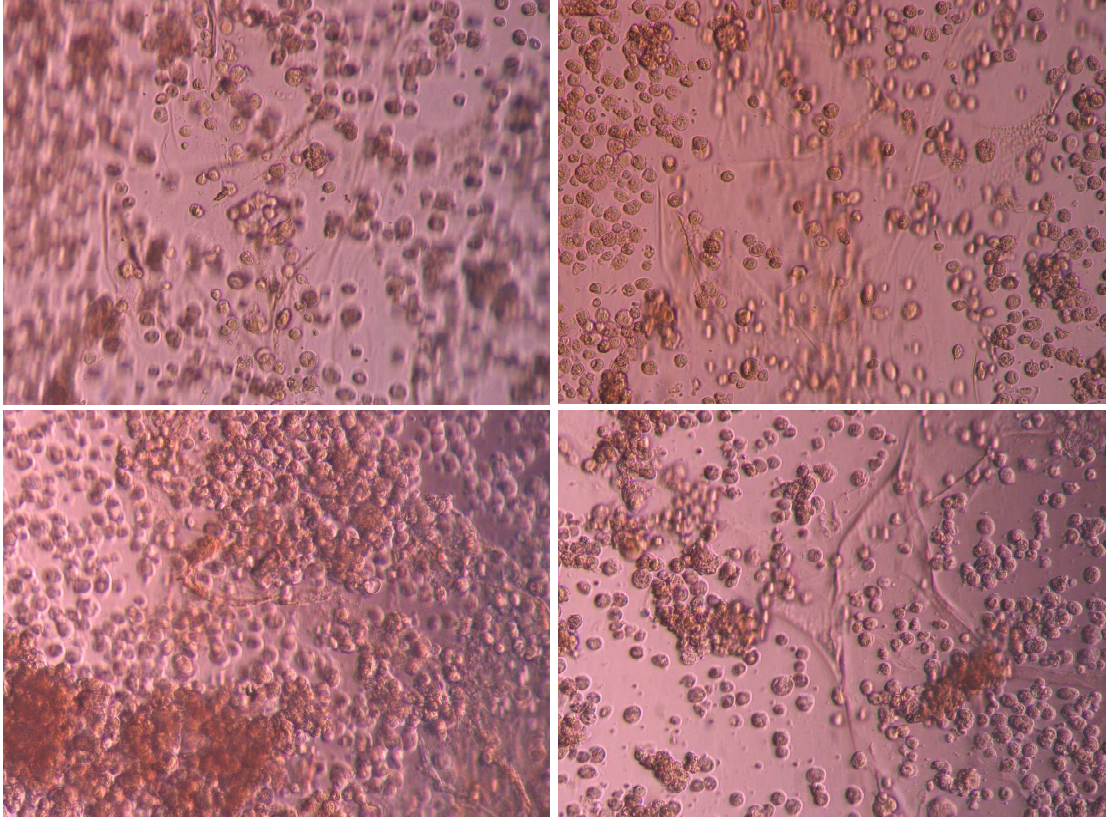
Şekil 7.1 2-Boyutlu kültürde MKH a,b. 3. gün, c,d. 7. gün (Ölçü çubukları 100 µm)

HA-MKH yapıları kullanılarak hazırlanan deney serilerinde, hiyalüronidaz (HDZ) içeren kültür vasatındaki yapıların, hiyalüronidaz (HDZ) içermeyen vasat ortamına göre daha hızlı bozunduğu gözlenmiştir.



Şekil 7.2 Kondrojenik induksiyon uygulanmış alginat kaplı HA-MKH kültürü a. 0.gün. (Ölçü Çubuğu 5 mm) b. 7. gün (Ölçü çubuğu 1 mm)

FeCl₃.6H₂O kullanılarak çapraz bağ oluşturulmuş HA yapı içerisinde hücrelerin daha kararlı ve tabakalı bir yapı içerisinde tutulduğu tespit edilmiştir (Şelik 7.2 ve 7.3).



Şekil 7.3 HA içerisinde tutuklanmış ve kondrojenik indüksiyon uygulanmış MKH, 1. gün (Ölçü çubukları 50 µm)

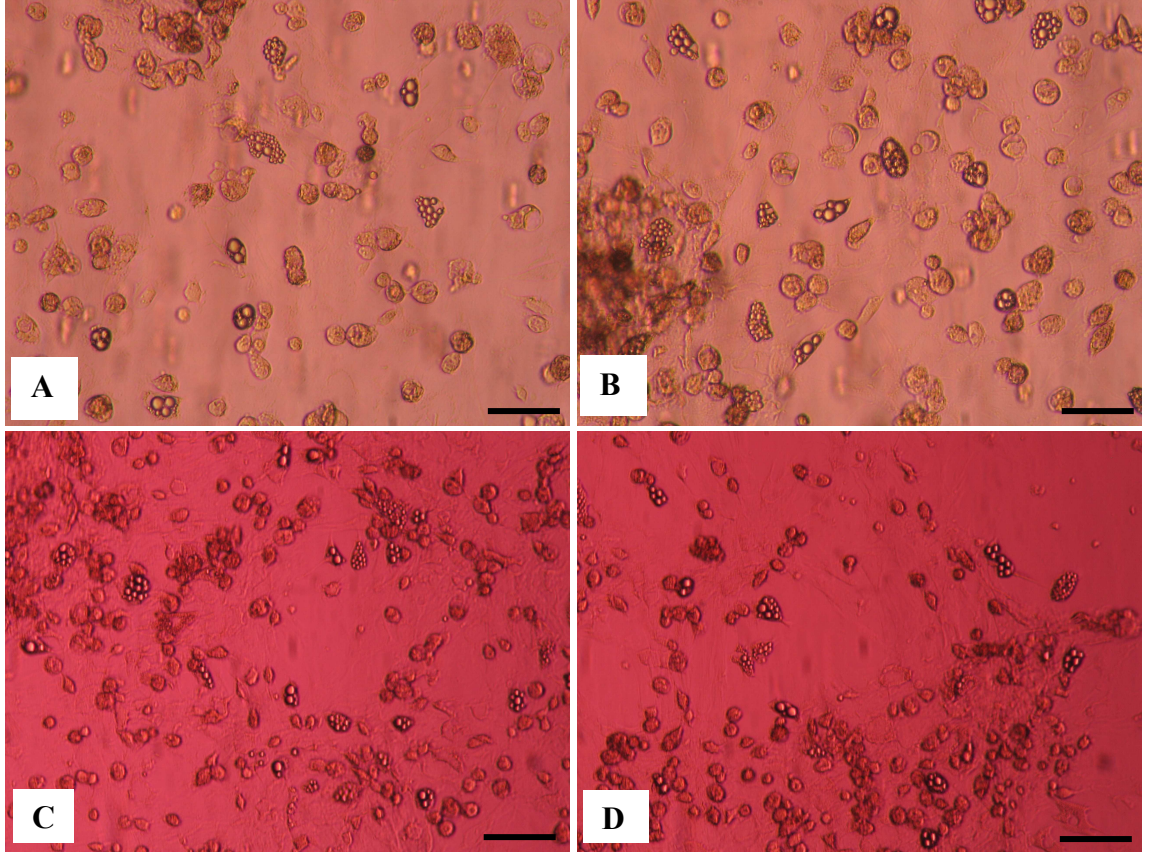
7.3 Hücre Morfolojisi

Kıvırdak hücreleri yuvarlak yapıya sahiptir ve doku gelişmeye başladıkça etrafları bir matrisle çevrilerek lakün yapısını oluştururlar. İki-boyutlu kültürlerdeki mezenkimal hücrelerin zaman içerisinde yuvarlak/oval baş kısım ve uzun ince bir gövde şeklinde olduğu görülmüştür (Şekil 7.1).

3B ortama geçirilerek kondrojenik indüksiyon uygulanan kültürlerde hücrelerin, fibroblastik yapıdan uzaklaşarak daha yuvarlak ve oval görünüme kavuştukları (Şekil 7.3) ve kültürün 2-7. günlerinde lakun oluşumlarının başladığı gözlenmiştir (Şekil 7.4).

7.4 Kondrojenik Farklılaşmanın Belirlenmesi

Farklılaştırma işleminin uygulanacağı kùltürlere kondrojenik indüksiyon, hiyalüronidaz (HDZ) enzimiyle birlikte kullanılmıştır. Kontrol amacıyla HDZ içermeyen kondrojenik vasat ortamında HA-MKH kùltürü sürdürölmüştür.

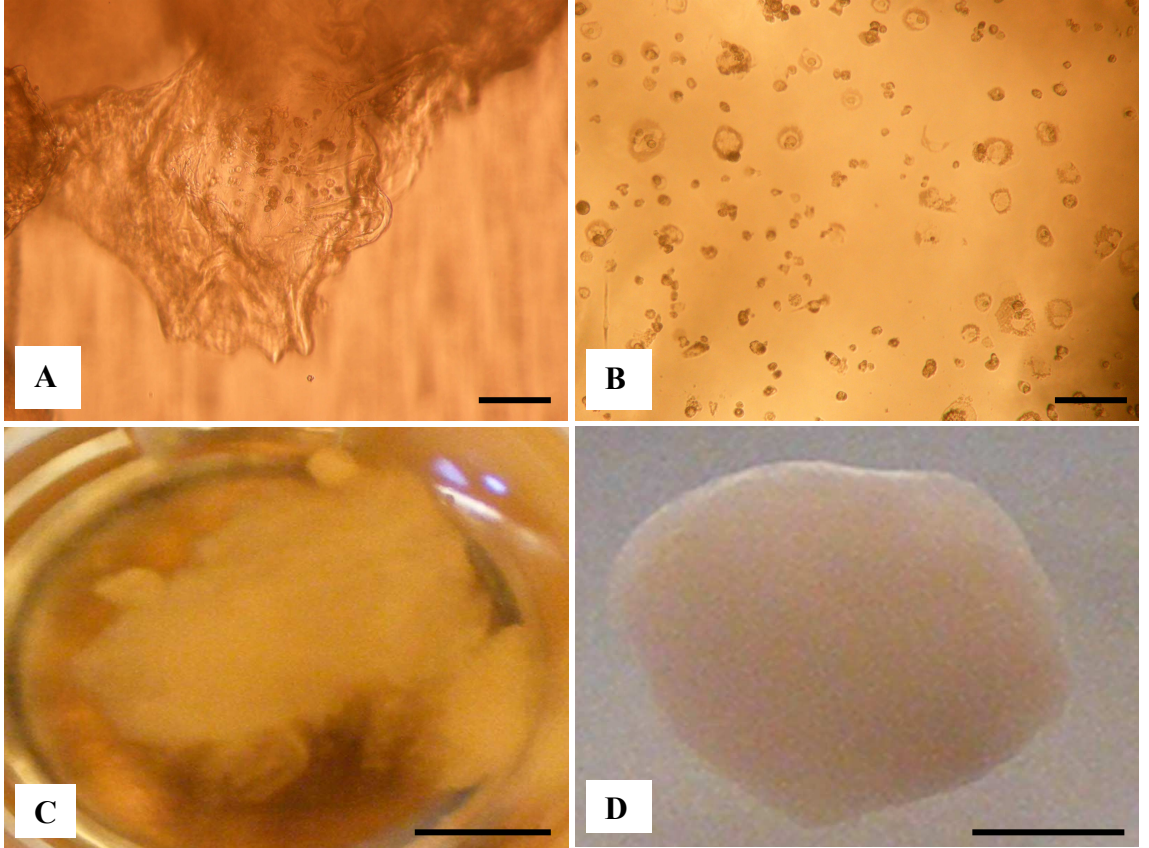


Şekil 7.4 Kondrojenik İndüksiyon sonucu HA küre içerisinde hücrelerin genel görünümü ve lakun oluşumu. HDZ içeren kùltür ortamı a. 2. gün ve b.: 3 gün, HDZ içermeyen kùltür c. 5. gün ve d. 7. gün (Ölçü çubukları 100 µm)

İnversiyon mikroskop incelemelerinde HDZ içeren kùltürlerde lakun oluşumlarının 2. günden itibaren görölmeye başlamasına karşılık; HDZ içermeyen kùltürlerde 5. ve 7. günlerden itibaren lakun oluşumu gözlenmiş; oluşum oranının HDZ içeren kùltüre oranla daha düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir.

%1'lik kollajen ve %1'lik HA ile 9:1 oranla hazırlanan polimerik iskeleler üzerinde yürütülen kültür işleminde polimerik yapının, kültür işleminin ilk günlerde daha gevşek, katmanlı ve gözenekli olduğu tespit edilmiştir.

İlerleyen günlerde yapının daha sıkı bir görünüm aldığı, lakün oluşumlarının 7 günde net olarak görülebildiği ve hücrelerin birbirlerinden uzaklaşmaya başladığı; özellikle 2. haftadan itibaren katmanlı yapıların kaybolarak hacimsel olarak küçüldüğü, buna karşın yapının daha pürüzsüz ve parlak olduğu faz kontrast mikroskobu ile gözlemlenmiştir (Şekil 7.5). Hazırlanan yapının 6 haftaya kadar stabil kaldığı ve kültür işlemi sırasında makroskobik olarak parçalanmadığı tespit edilmiştir (Şekil 7.5.d).



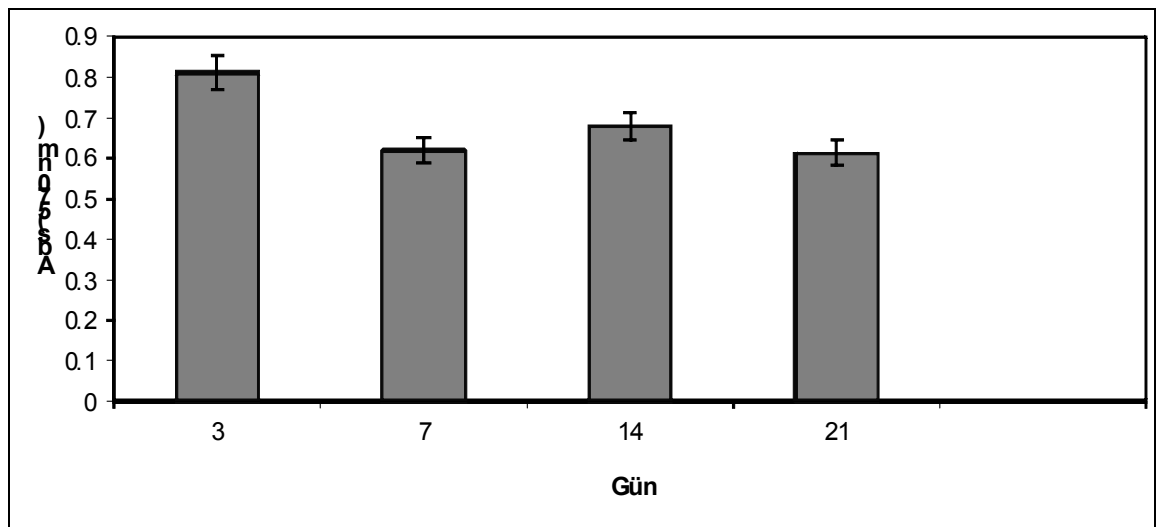
Şekil 7.5 Kollajen-HA polimerik iskele üzerinde kondrojenik indüksiyon uygulanmış, MKH kültürü a. 3. gün (ölçü çubuğu 50 μm), b. 7. gün (ölçü çubuğu 100 μm), c. 7. gün ve d. 28. gün (Ölçü çubukları 5 mm)

7.5 Mitokondriyal Dehidrojenaz Aktivitesinin Tespiti (MTT testi)

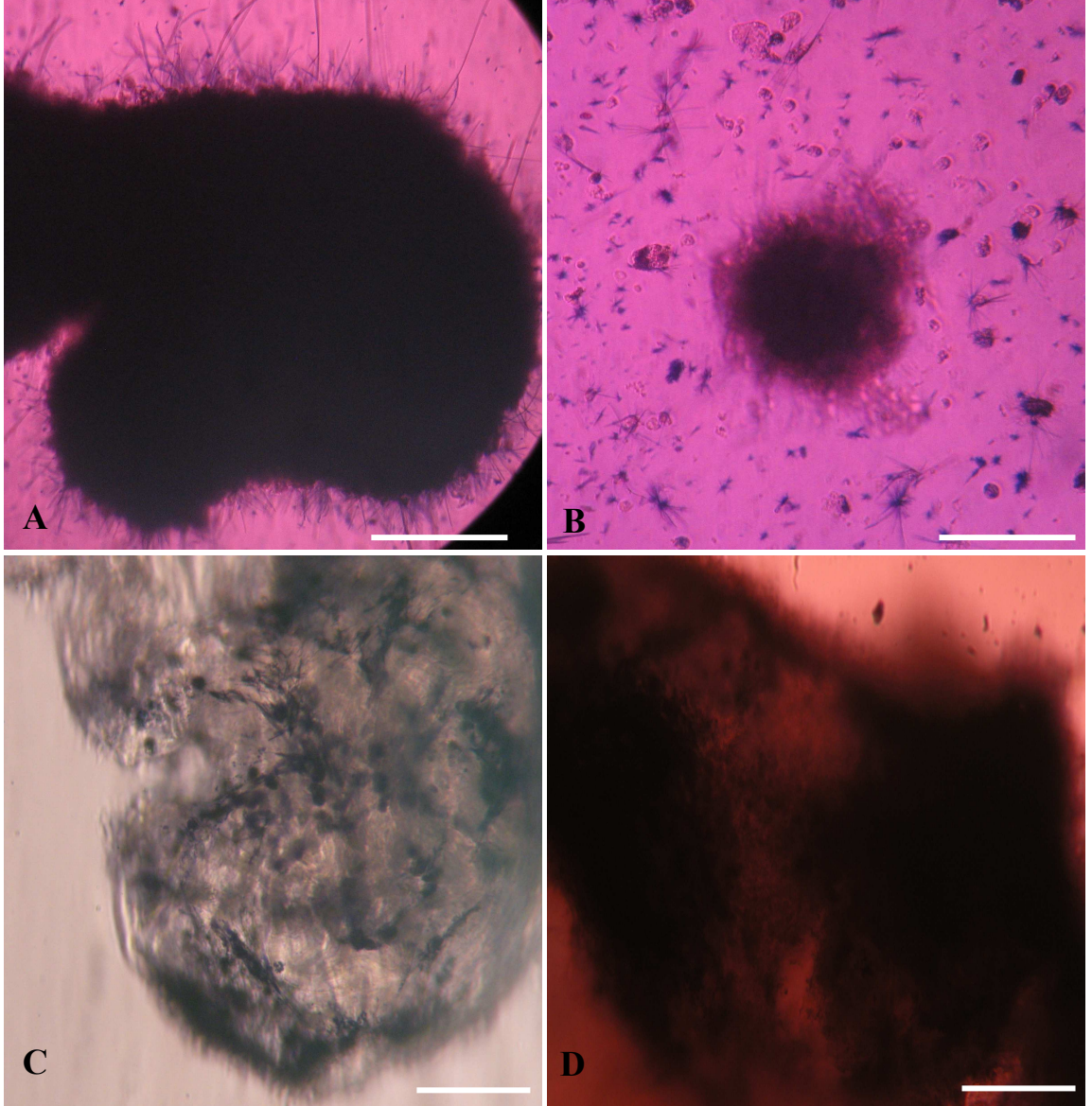
Bu testin temelini, prolifere olan hücrelerin durağan fazdaki hücrelerden daha yüksek mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesi göstermesi oluşturur. Ayrıca reaksiyon mitokondrisi bozulmamış, yaşayan ve yeterli oksijeni bulunan hücrelerde gerçekleşir. Bundan dolayı bu test hücrelerin farklı metabolik oranlarını ölçmek için uygundur (Höper 1997).

Hücrelerin canlılığının fazla olması, mitokondriyal aktivitenin artmasına neden olacağından, hücre canlılığını takip etmek içinde kullanılan bir yöntemdir. Ayrıca *in vitro* araştırmalarda, örnek içersindeki artan hücre sayısını belirlemek için uygulanabilir.

MTT testi, üç-boyutlu HA-kollajen iskele üzerindeki MKH kültürlerinden alınan boyut olarak yaklaşık aynı ölçülerdeki örneklere uygulanmıştır. Üç-boyutlu kültürde MTT sonucu oluşan formazan kristallerinin çözülerek UV-spektrofotometresinde absorpsiyon değeri ölçülmüştür. Bu ölçümlerin sonucunda elde edilen grafik şekil 7.6'da gösterilmektedir. Spektrofotometrik ölçümlerde mitokondriyal aktivitenin 3. günde en yüksek olduğu ilerleyen zaman noktalarında değerlerde kısmi bir düşüş olmak birlikte fazla bir değişim olmadığı tespit edilmiştir.



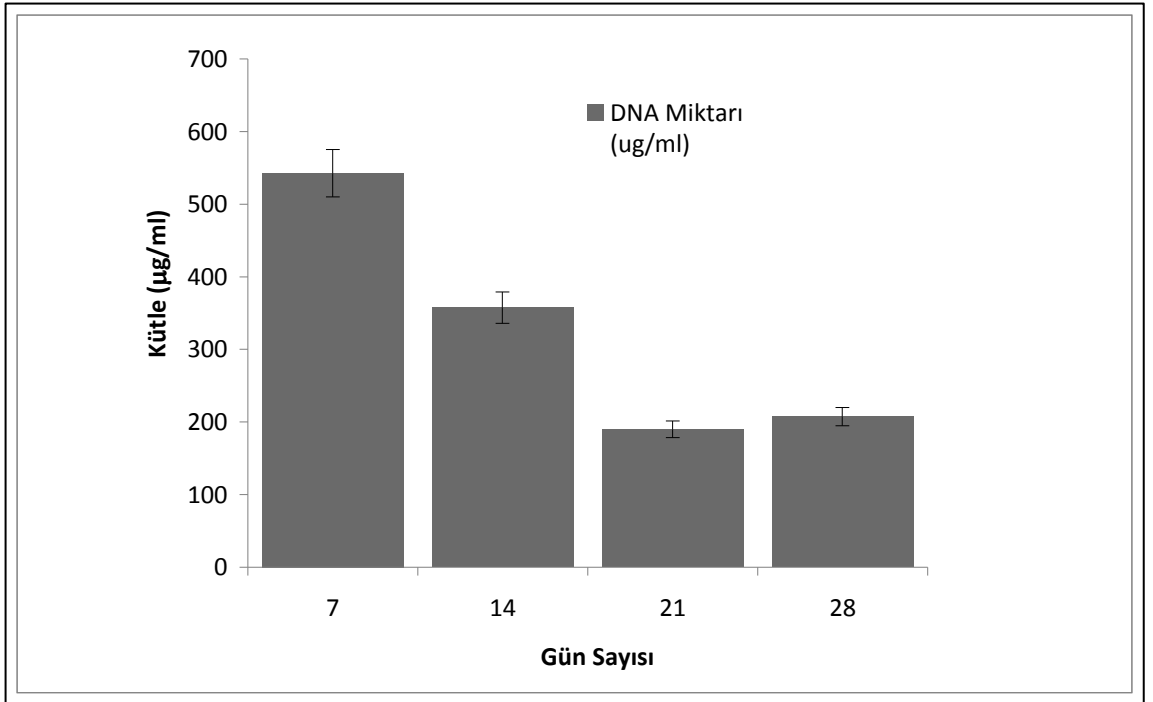
Şekil 7.6 MKH-HA-kollajen kültürüne, 570 nm'de spektrofotometrik olarak yapılan MTT analiz sonuçları



Şekil 7.7 HA-MKH kültürü 7. gün MTT testi sonucu formazan kristallerinin görünümü
a. Ölçü çubuğu 1 mm b. Ölçü çubuğu 1 mm. HA-Kollajen matris yapıda
MKH kültürü c. 14. gün ve d. 21. gün (Ölçü çubukları 100 μ m)

7.6 Toplam DNA Miktarının Ölçülmesi

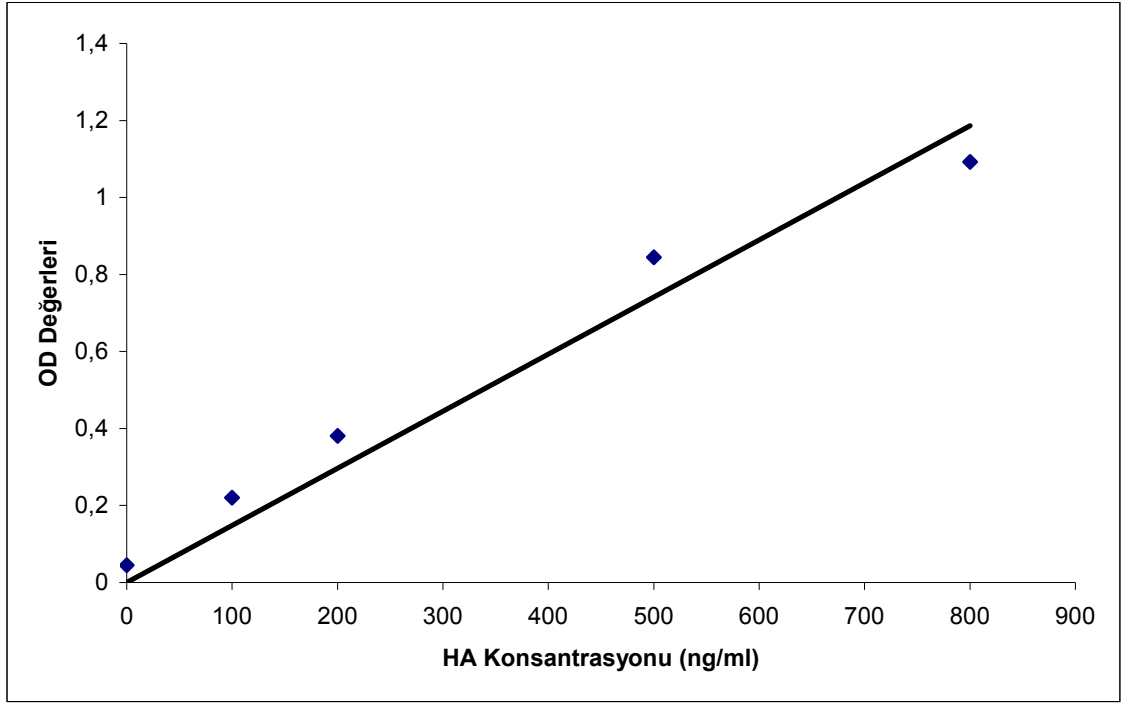
Hücre sayısını belirlemek amacıyla üç-boyutlu HA-MKH kültürlerinden boyut olarak yaklaşık aynı ölçülerde alınan örneklerde DNA miktarı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. HA-Kollajen iskele üzerinde gelişen doku benzeri yapıdaki DNA miktarının aynı boyuta sahip polimerik alanda zamanla azaldığı görülmektedir (Şekil 7.8).



Şekil 7.8 MKH-HA-kollajen iskele kültüründeki DNA miktarının günlere göre değişimi.

7.7 Kültür Ortamındaki Serbest Hiyalüronik Asit Miktarının Tayini

HA-MKH kültüründe polimer yapının degradasyon hızının ölçümü ve kültür ortamındaki serbest HA miktarının tayini amacıyla Hiyalüronik Asit test kiti (Corgenix, UK) kullanılmıştır. Yapılan ölçümler ve testler sonucunda yürütülen kültür serilerinde 5µg/ml HDZ enzimi kullanımının yeni doku organoidi oluşumunda daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Yapılan ölçümlerde, kültür ortamında serbest haldeki HA miktarının 1. ve 2. günlerde daha yüksekken ilerleyen zaman noktalarında düştüğü tespit edilmiştir.



Şekil 7.9 HA standart grafiği

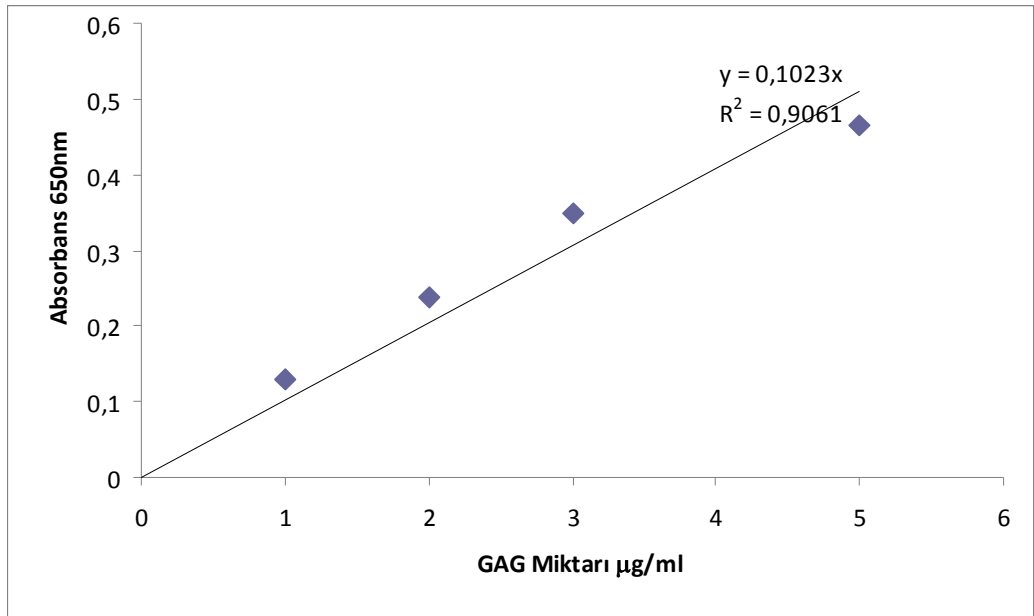
Standart HA miktarlarının 650 nm'deki OD değerlerine karşı çizilen şekil 7.9'daki grafik yardımıyla örneklerin OD değerlerinden 1 ml çözelti içerisindeki miktarları bulunarak örneklerin ait olduğu günlere karşılık şekil 7.10'daki tablo elde edilmiştir.

HDZ KONSANTRASYONU (mg/ml)	24. SAAT	48. SAAT	72. SAAT
0,75	680	220	100
0,50	560	360	96

Şekil 7.10 HA standart grafiği kullanılarak bulunan vasattaki serbest HA değerleri (ng/ml)

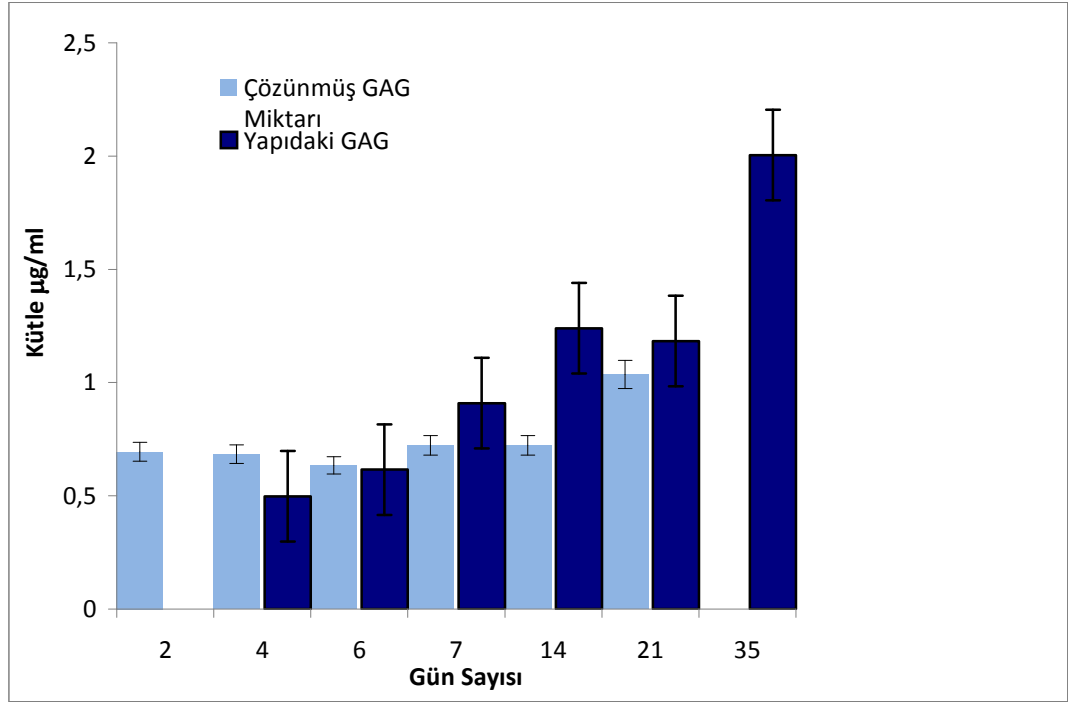
7.8 GAG Miktarının Tayini

Kondrojenik indüksiyon uygulanan HA-MKH kültüründe polimer yapı içerisinde oluşan organoidin yapısındaki GAG miktarı ile kültür ortamındaki serbest GAG miktarının tayini amacıyla Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay (Biocolor, UK) test kiti kullanılmıştır. Standart GAG miktarlarının 650 nm'deki absorbans değerlerine karşı çizilen şekil 7.11'deki grafik yardımıyla örneklerin absorbans değerlerinden 1 ml kültür sıvısı içerisindeki miktarları bulunarak örneklerin ait olduğu günlere karşılık grafiğe geçirilmiştir (Şekil 7.12).



Şekil 7.11 GAG standartlarının kütle-absorbans grafiği (650 nm)

Uygulanan test sonuçlarına göre kültür ortamındaki serbest GAG miktarının düşük seviyeler olduğu, buna karşın HA-MKH yapısı içerisinde gelişen organoidin yapısındaki GAG miktarının ilerleyen zaman noktalarında giderek arttığı ve 7. günden sonra yapı içerisindeki katı GAG miktarının kültür vasatındaki çözünmüş GAG miktarından daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 7.12).

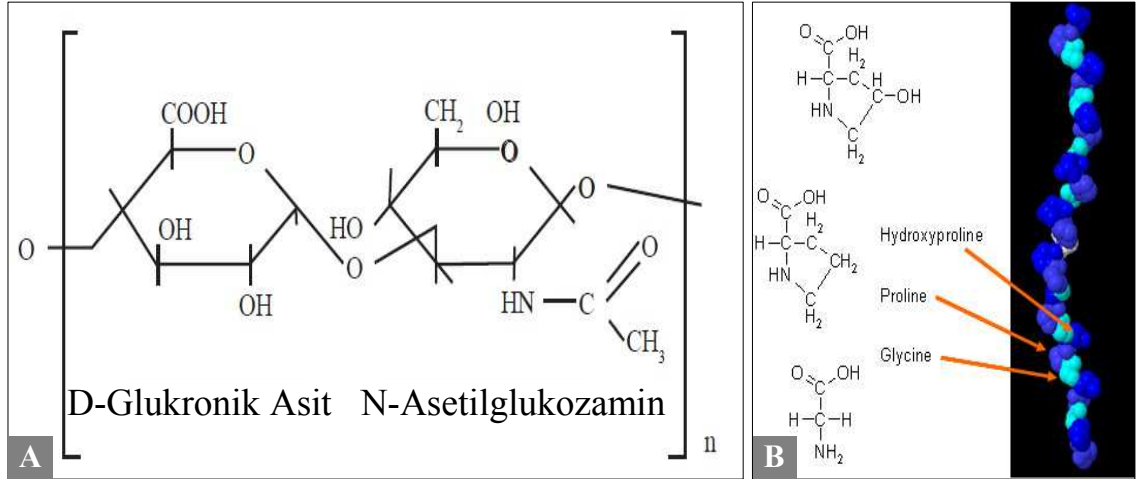


Şekil 7.12 Kültür ortamında, besiyerinde çözülmüş GAG miktarı (açık renk) ile hücre polimerik iskele yapısındaki GAG miktarı (koyu renk).

7.9 ATR FT-IR Bulguları

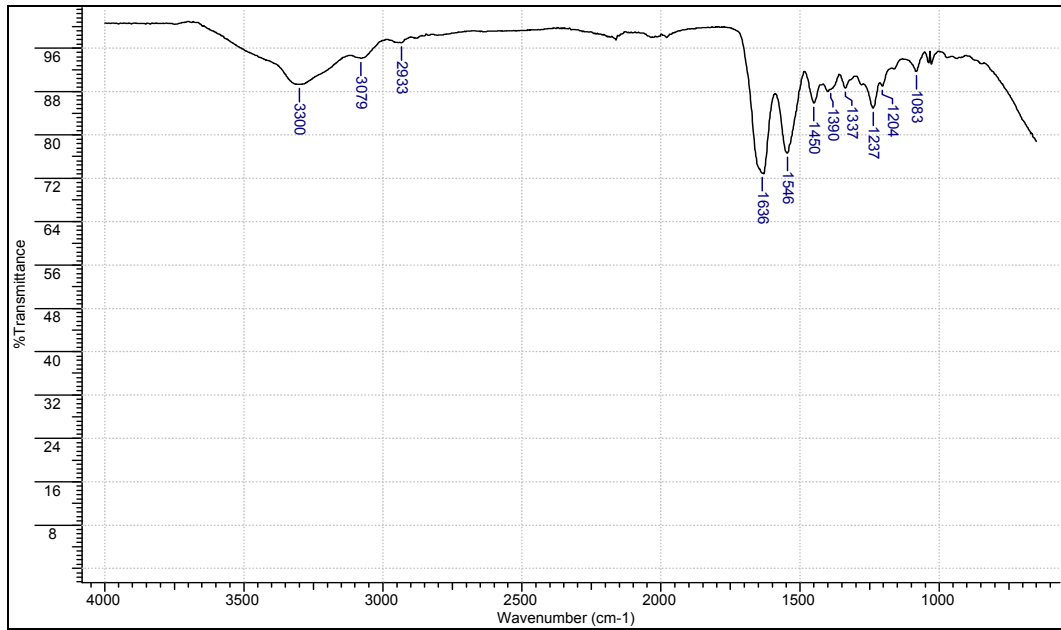
Kültür işlemlerinde kullanılmak üzere hazırlanmış olan polimerik iskelelerin, Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi ile fonksiyonel grup analizi gerçekleştirilmiştir. Bir molekülün infrared ışınmasını absorplayabilmesi için dipol momentinde net bir değişim olması gerekmektedir.

Molekülün üzerine gönderilen infrared ışınmasının frekansı, molekülün titreşim frekansına eşit olduğu zaman ancak bir absorpsiyon söz konusu olabilmektedir. O₂, N₂, Cl₂ gibi homonükleer moleküllerde titreşim ve dönme hareketleri sırasında net bir dipol moment değişimi olmadığı için bu moleküller infrared ışınmasını absorplayamamaktadır.



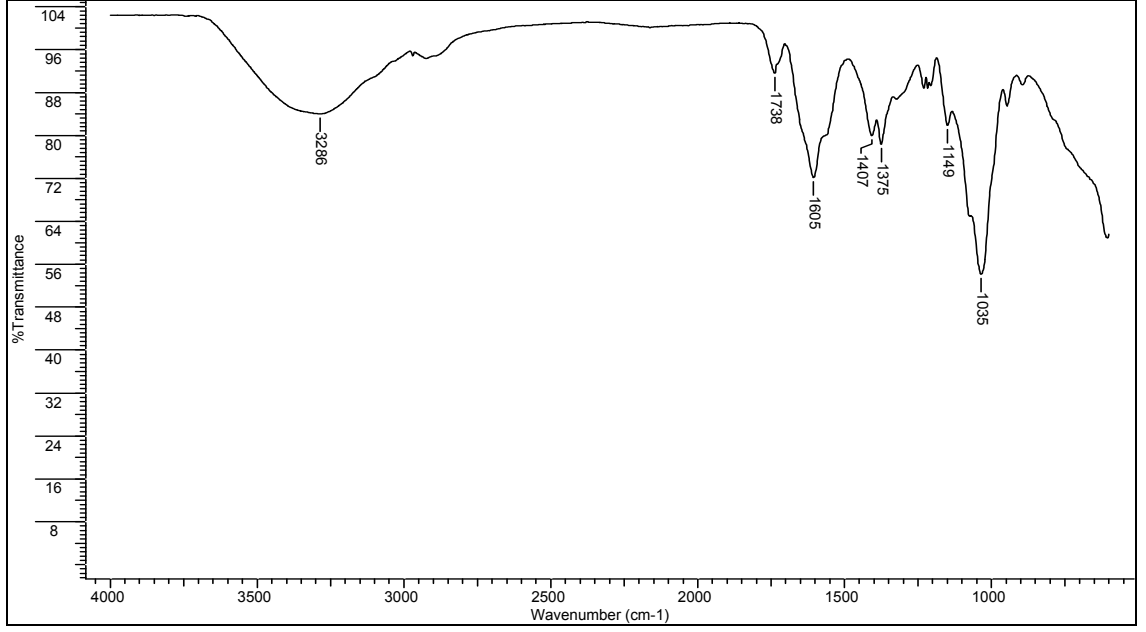
Şekil 7.13.a. Hiyalüronik asit ve b. kollajenin kimyasal yapısı

Kollajene ait 1546 cm^{-1} deki bağlar amit bağlarını, 1083 cm^{-1} deki bağlar yapıda C-O tekli bağ gerilimini, 1636 cm^{-1} deki bağlar C=O bağı ve $2800\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki bant genişliği N-H ve O-H bağ gerimlerini göstermektedir (Şekil 7.14).



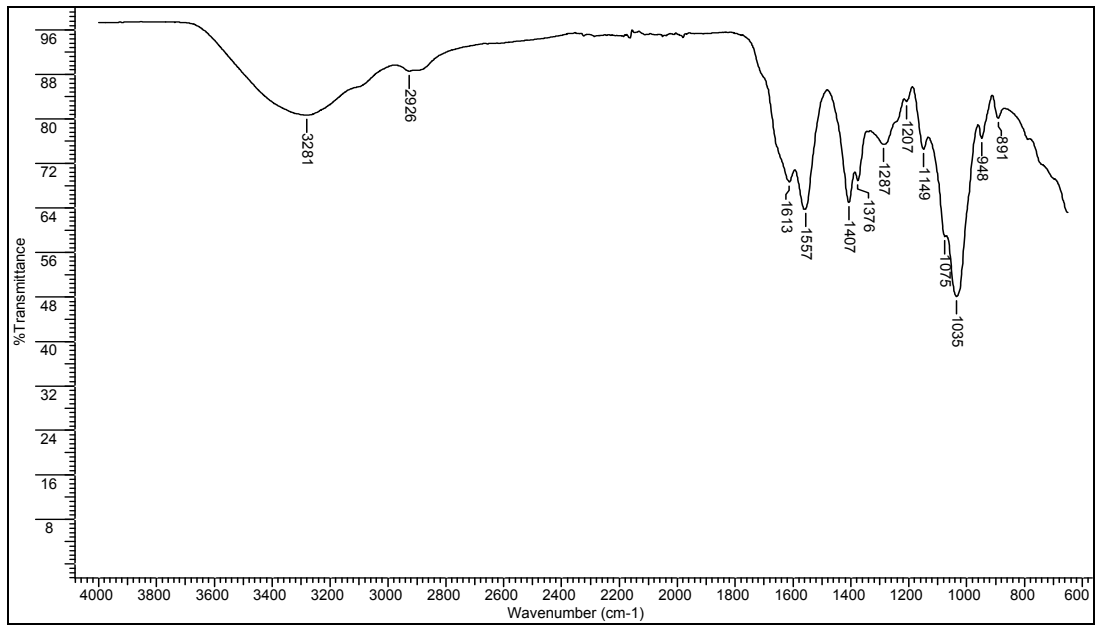
Şekil 7.14 Kollajenin FT-IR Spektrumu

HA'nın 1605 cm^{-1} de gösterdiği bant, C=O karboksil gerilme (amid 1), 1738 cm^{-1} de gösterdiği bant, COO- gerilmeden, $1375\text{-}1407\text{ cm}^{-1}$ deki bant ise C-O-H eğilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Şekil 7.15)



Şekil 7.15 HA'nın FT-IR Spektrumu. 1738 cm⁻¹ de COO- bağ gerilimi göstermektedir

HA'nın 1738 cm⁻¹ de gösterdiği COO- bağ gerilimi, polimerik yapıda kaybolarak, 1075 cm⁻¹ de ester bağı oluşumu gözlenmektedir. Şekil 7.16'daki FT-IR spektrumu, kolajen ve hiyauronik asit arasında bağ oluşumlarının gerçekleştiğini göstermektedir.



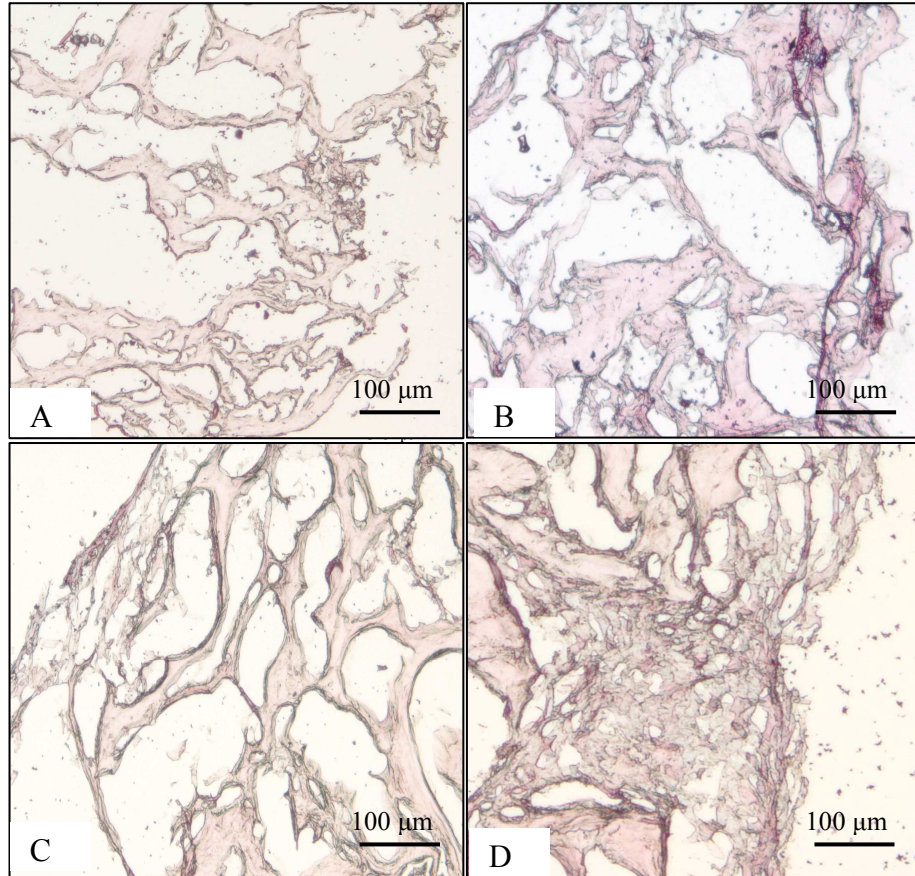
Şekil 7.16 HA-Kollajen polimerik yapının FT-IR spektrumu. 1075 cm⁻¹ de ester bağı oluşumu göstermektedir

7.10 Histokimya

Glikozaminoglikanlar Alsian mavisi, kollajen lifler Safranin-O ile boyanarak tespit edilmiştir. Histokimya boyamalarına ait resimler şekil 7.17 - 7.18'de verilmiştir.

HA-Kollajen iskele üzerinde yürütülen kondrojenik indüksiyon uygulanmış mezenkimal kök hücre kültürüne ait 7, 14, 21, ve 28. gün zaman noktalarında alınmış örneklerinin alsian mavisi ile boyanması sonucu elde edilen resim şekil 7.17'de gösterilmektedir.

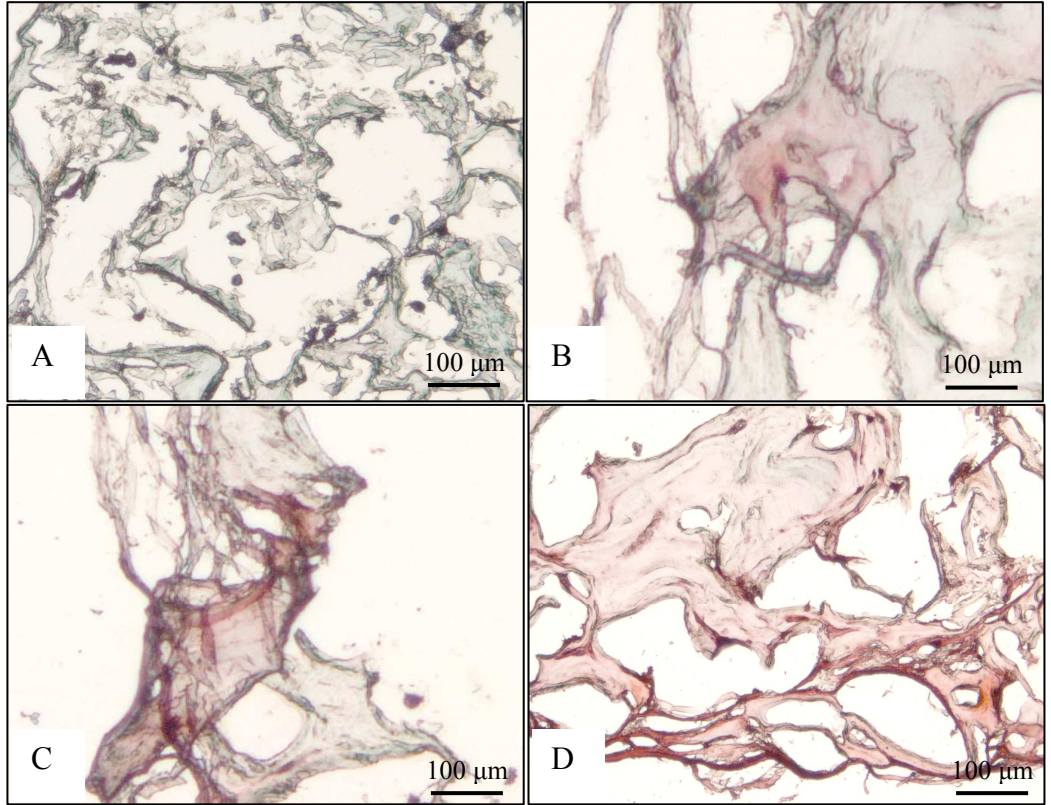
Bu resimde açıkça görülmektedir ki boyamalar tek olarak bulunan hücrelerin çevresinde çok az yoğunlaşmaktadır. Boyama miktarının, hücrelerin daha yoğun olarak bulunduğu bölgede bir hat halinde arttığı gözlenmektedir.



Şekil 7.17 HA-Kollajen matris yapıda MKH kültürünün alsian mavisi ile boyama sonucu
a. 7. gün b. 14. gün c. 21. gün ve d. 28. gün

Kondrojenik indüksiyonun yapıldığı kültür örneklerinin safranin-o boyaması sonucunda ilerleyen zaman noktalarında boyama yoğunluğunun arttığı gözlenmektedir.

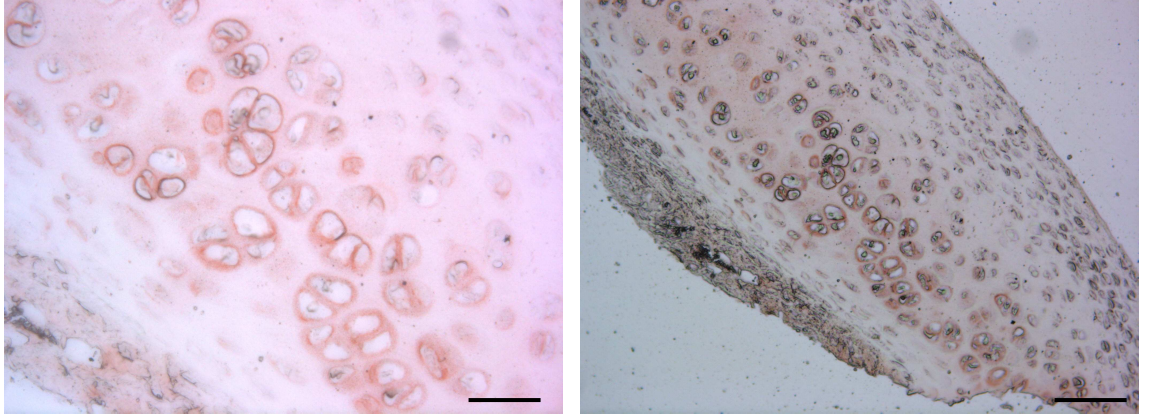
Safranin-O boyama sonuçları matriksteki toplam kollajen miktarını göstermektedir. HA-Kollajen iskele üzerinde yürütülen kondrojenik indüksiyon uygulanmış mezenkimal kök hücre kültürüne ait 7., 14., 21., ve 28. gün zaman noktalarında alınmış örneklerinin safranin-o ile boyanması sonucu elde edilen resim şekil 7.18’de gösterilmektedir. Boyama yoğunluğu, hücreler arası bölgede (interteritoryal matrikste) ve hücre çevresinde (teritoryal matrikste) çok yoğun olarak görülmektedir. Ayrıca kollajen yapı polimerik iskelelerin boyanmadığı gözlenmiştir. Elde edilen kollajen üretimin yüksek oranda gerçekleştirildiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 7.18 HA-Kollajen matriks yapıda MKH kültürünün Safranin-O ile boyama sonucu a. 7. gün b. 14. gün c. 21. gün ve d. 28. gün

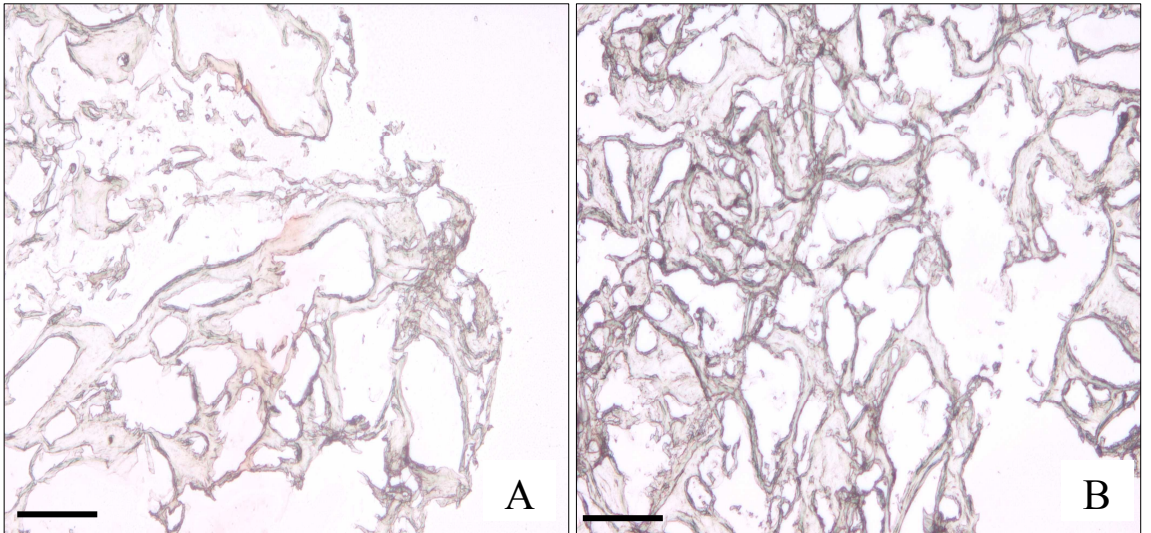
7.11 İmmünohistokimya Boyamaları

İmmünohistokimya, HDM'de bulunan yapısal proteinlerden kollajen tip-1 ve tip-2 ile GAG'lardan önemli bir matriks bileşeni olan agrekan için yapılmıştır. Doğal kıkırdığa ait kollajen tip-2 antikoruna ile boyamaları şekil 7.19'da verilmiştir.

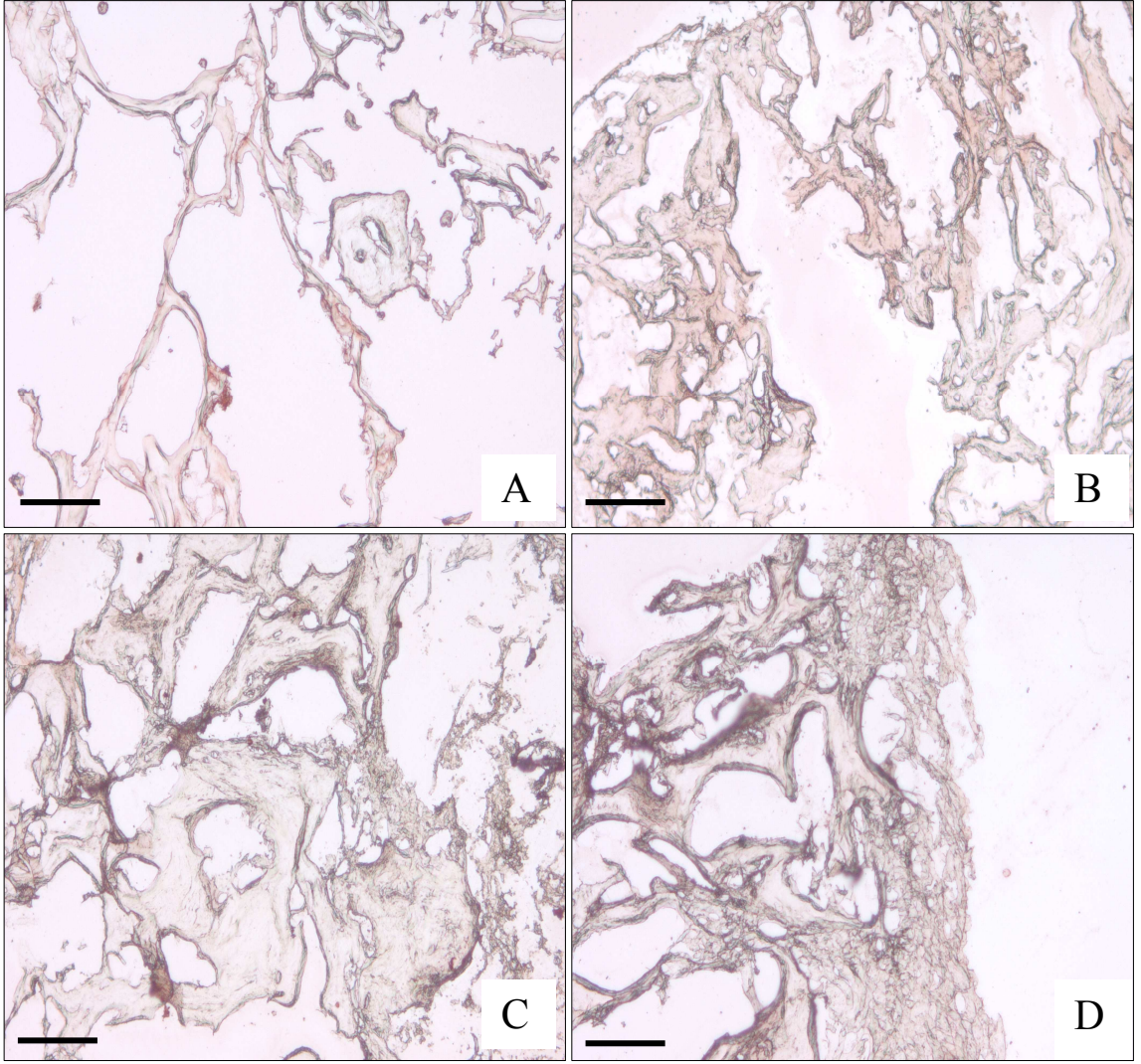


Şekil 7.19 Doğal kıkırdak dokusunun anti-kollajen tip-2 ile boyanması sonucu HDM'deki kollajen tip-2 liflerinin görünümü a. ölçü çubuğu 50 μm , b. ölçü çubuğu 100 μm

Üç-boyutlu statik kültürdeki anti-kollajen-tip-1 ve tip-2 antikor boyamaları şekil 7.19-7.20 de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar kollajen tip-1 boyamasının zayıf olduğu, buna karşın kollajen tip-2 boyanmasının daha yoğun olduğunu göstermiştir.

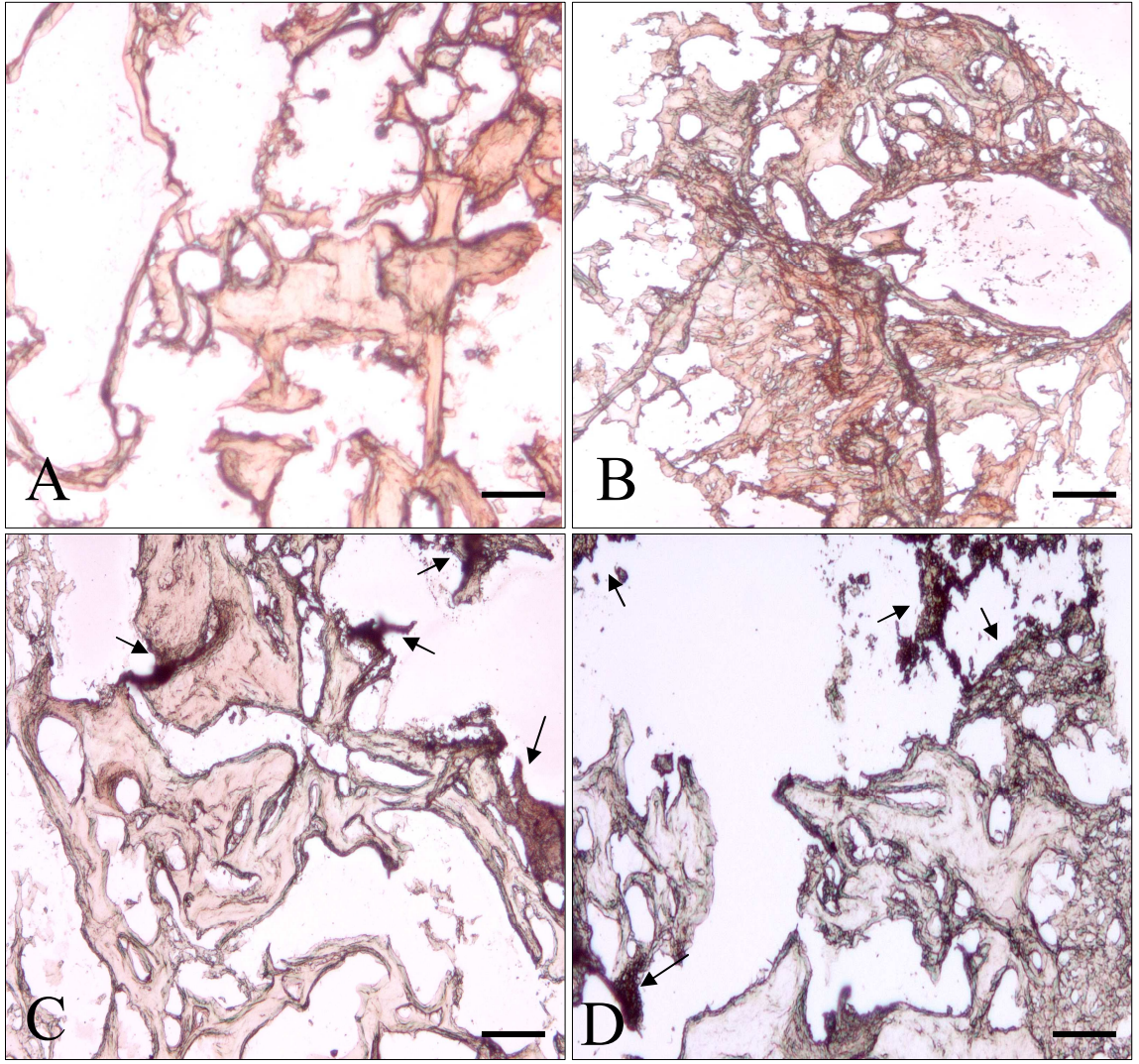


Şekil 7.20 Kondrosit ekilmiş HA-kollajen kültürdeki anti-kollajen tip-1 antikorları ile 7. günde a. ve b. 28. gün (Ölçü çubukları 100 μm)



Şekil 7.21 Kondrosit ekilmiş HA-kollajen kültürdeki anti-kollajen tip-2 antikoruna ile boyamaları. 7. günde a., 14. gün b., 21. gün c. ve 28. gün d. (Ölçü Çubukları 100 µm)

Anti-agrekan boyamalarına ait resimler şekil 7.22’de verilmiştir. Oluşan GAG agregatlarının boyutları ve boyanma yoğunluğu resimlerde açıkça görülmektedir. Boyama yoğunluğunun ilerleyen günlerde arttığı ve 28. günde oluşan agregatların artmasına paralel olarak boyama yoğunluğunun arttığı görülmektedir.

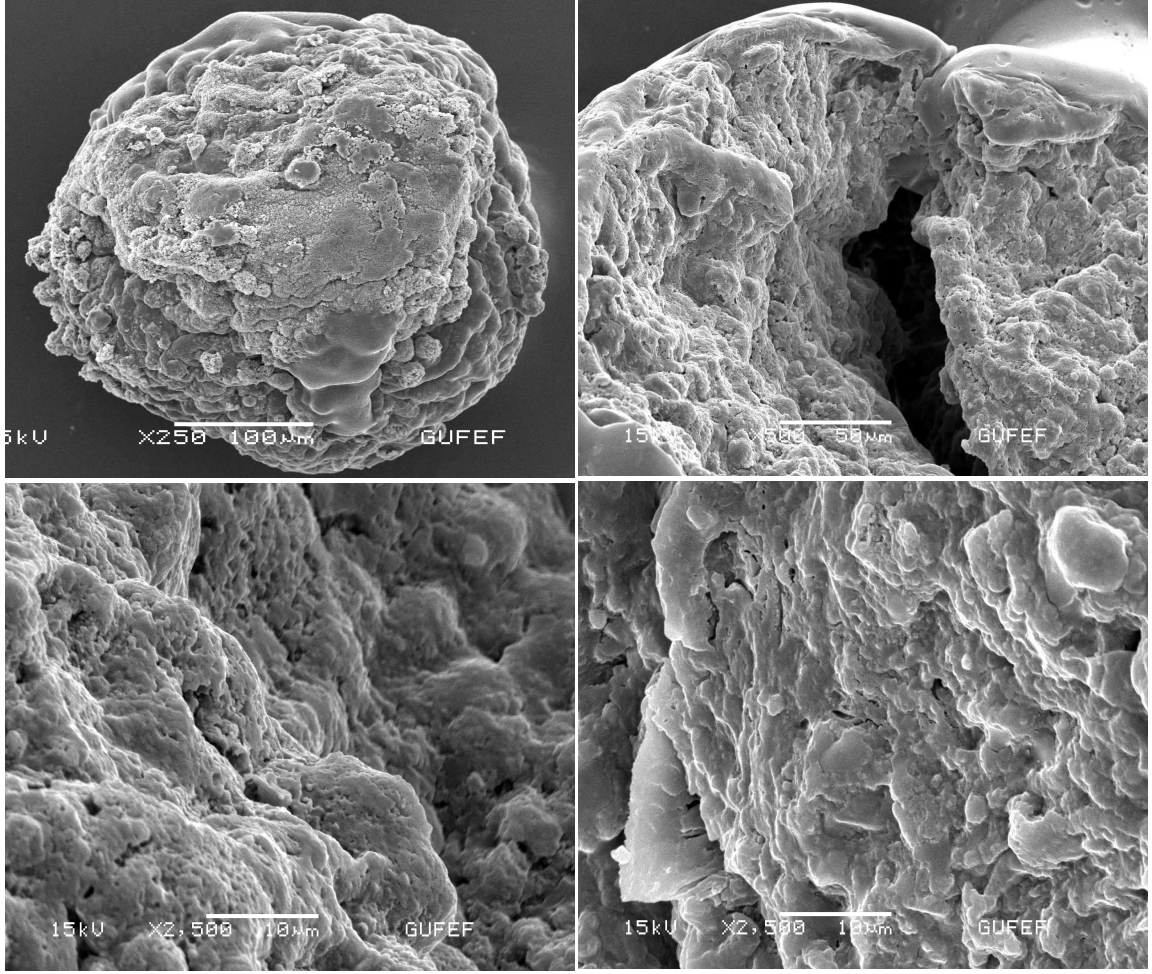


Şekil 7.22 Kondrosit ekilmiş HA-kollajen kültürdeki anti-agrekan antikör boyamaları, 7. gün a., 14. gün b., 21. gün c. ve 28. gün d. (Ölçü Çubukları 100 µm)

7.12 SEM Görüntüleri

Taramalı elektron mikroskobu ile yapılan incelemeler sonucu şekil 7.23-7.24'teki görüntüler elde edilmiştir.

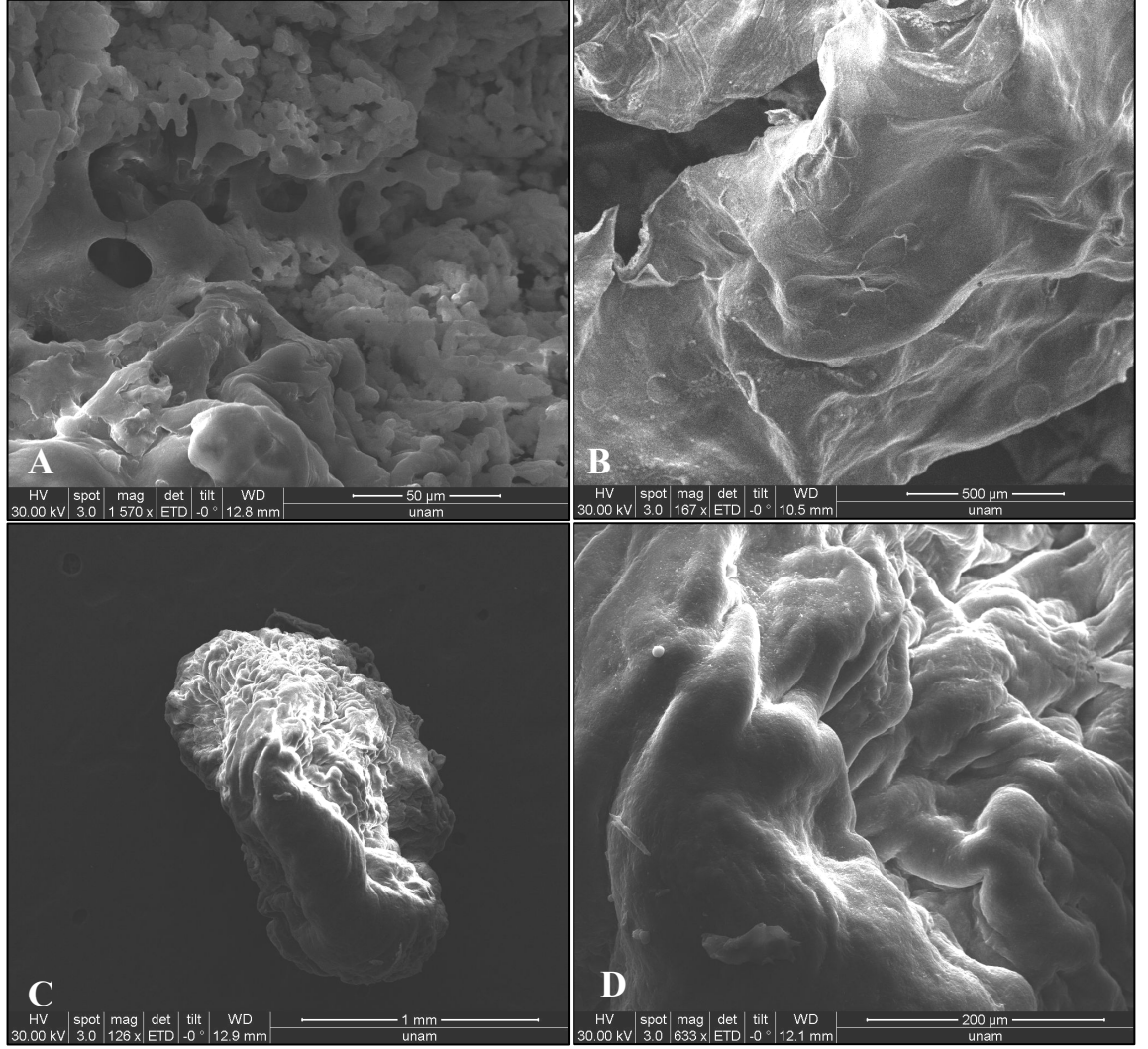
HA-MKH kültürününün 13. günde alınan örneğe ait SEM görüntüleri şekil 7.23'te verilmiştir. Görüntülerde hücrelerin yuvarlak morfolojide olduğu ve yoğun HDM içerisinde gömülü olduğu görülmektedir.



Şekil 7.23 HA içerisinde tutuklanmış MKH kültürünün 13. günde SEM (taramalı yüzey mikroskobu) görüntüsü

Ha-Kollajen iskele yapısının üst kısmı yüksek oranda gözenekliliğe ve çıkıntılara sahiptir. Gözeneklerin boyutu büyük ölçüde birbirlerine yakınlık göstermektedir ve gözeneklerin kapalı olmayıp birbirleri ile bağlantılı olduğu görülmektedir. Resim üzerindeki ölçek kullanılarak yapılan kıyaslamalarda gözenek boyutunun 10 µm-50 µm arasında değiştiği, çıkıntılarının ise daha yüksek oranda yapıda bulunduğu ve boyutlarının gözenek yapılarına oranla çok daha küçük olduğu tespit edilmiştir.

İskele üzerindeki gözeneklerin ve yüksek orandaki çıkıntılı yapının kültürün 28. gününde hücreler ve hücre dışı matriks tarafından tamamen doldurulduğu ve yapının daha pürüzsüz bir hal aldığı şekil 7.24'teki SEM görüntülerinde açıkça görülmektedir.



Şekil 7.24 HA-Kollajen iskelenin SEM (taramalı yüzey mikroskobu) görüntüsü. a. Hüresiz HA-Kollajen İskele. HA-Kollajen İskele üzerinde kondrojenik induksiyon uygulanmış MKH kültürü b. 14. gün, c. ve d. 28. gün.

8. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında, yapay niş olarak hiyalüronik asit vb. hidrojel­ler üzerine enzim etkisinin tespiti ve izole memeli kök hücrelerinin yönlendiriciler ve/veya büyüme faktörleri ile özelleştirilmiş vasat ortamında, yeniden düzenlenmesinin takip edilerek yapay mikroçevrede kıkırdak doku gelişim modeli oluşturulması amaçlanmıştır.

Kök hücreler, birçok dokuda bulunan ve gerektiğinde farklılaşarak dokuları oluşturma ya da tamir etme yeteneğine sahip hücrelerdir. Kök hücreler üzerine yapılan araştırmalar, bir organın tek bir hücreden nasıl geliştiği ve sağlıklı hücrelerin, yetişkin dokulardaki hasarlı hücrelerin yerini nasıl aldığı hakkında önemli bilgiler vermektedir. Yürütülen bu çalışmalar ışığında bilim adamları, genetik ve dejeneratif hastalıklar ile kazalar sonucu oluşan doku harabiyeti için hasarı yenileyen veya onaran tarzdaki tedavi olanakları üzerine araştırmalar yapmaktadır.

Kök hücre tedavisi, hastanın hasarlı doku ya da organlarını kök hücreleri ya da progenitör hücreleri kullanarak onaran ya da yenileyen bir tedavi yöntemidir. Bu tedavi yönteminde, kök hücreler periferik kana verilebilebileceği gibi hasarlı dokuya doğrudan da nakledilebilmektedir. Son yıllarda yapılan prelinik çalışmalarda *in vitro* koşullarda elde edilerek çoğaltılan kök hücreler, laboratuvar ortamında üç boyutlu biyobozunur ve biyoyumlu polimerik matriks yapılar içerisinde, istenilen hücre tipine farklılaştırılarak doku organoidi oluşturulmaya çalışılmaktadır. Kök hücreler ile kanıtlanmış tedavileri bulunan hastalık grupları halen son derece az olmakla birlikte, süregelen çalışmalar, kök hücrelerin daha yüksek verimle istenilen hücre tipine farklılaştırılmasının sağlanmasına yönelik olarak devam etmektedir.

Kök hücre araştırmalarında öncelikle, bir doku ya da hücrenin nasıl çalıştığı ve belirli bir hastalık ya da yaralanmada sorunun nereden kaynaklandığının belirlenmelidir. Bu şekilde hedef hücrenin ve dokunun iyi tanınması, kök hücrelerin farklılaştırılması sürecinin tanımlanması ve optimizasyonu işlemlerinin orjinaline en yakın şekilde tasarlanmasını sağlayacaktır.

Bir kök hücre, çevresindeki hücresel bileşenlerden ve desteklenen hücre tipi kaynaklı sinyallerden oluşmuştur. Kök hücre nişi, kök hücreler ile buldukları dokudaki mikroçevrede yer alan yardımcı hücreleri veya hücrelerarası ortamdaki bileşenlerin birbirleriyle olan ilişkilerini tanımlamaktadır. Kök hücrelerin basit lokasyonları nişleri tanımlamamakta, *Nişin, anatomik ve fonksiyonel boyutların her ikisine de sahip olması gerekmektedir.*

Embriyonik gelişim sırasında çeşitli niş faktörleri, EKH'lerde gen ekspresyonunu uyararak, fetusun gelişimi için çoğalma ya da farklılaşmayı teşvik etmektedir. Kök hücreler ve niş, gelişim sırasında birbirlerini teşvik etmekte ve erişkinlik (adulthood) süresince de birbirlerine karşılıklı sinyaller vermektedir (Li vd. 2005).

Memelilerde kök hücre nişi asimetrik bir yapı göstermektedir. Bir nişte, hücre bölünmesi meydana geldiğinde hücrelerden biri niş içerisinde kalırken (self-renewal) diğer hücre proliferasyon ve farklılaşma ile fonksiyonel olgun hücreye dönüşmektedir (Li vd. 2005).

Genel olarak erişkin kök hücrelerde kök hücre nişleri durgun fazda bulunmaktadır. Ancak bir yaralanma durumunda mikroçevrenin etrafındaki aktif sinyaller hücreleri self-renewal ve farklılaşmaya yönlendirerek yeni dokuyu şekillendirmektedir. *In vitro* kültüre edildiklerinde ise yaşlanma prosesi altına girerek morfolojileri değişmekte ve proliferatif kapasiteleri düşmektedir. Bu nedenle, erişkin kök hücrelerin, kök hücre özelliklerini koruyabilmeleri için uygun kültür şartlarında geliştirilmesi gerekmektedir.

Belirli bir dokuya spesifik hücre kültürü, kök hücrelerin farklılaşması kontrol altında tutularak elde edilmektedir. Bu işlem için kültür ortamının kimyasal bileşimi ve kültür kabının yüzeyi değiştirilir ya da spesifik genlerin eklenmesi ile hücreler modifiye edilmektedir. Kök hücrelerin özel hücre türlerine farklılaşması güvenli bir şekilde kontrol edilebildiğinde bu hücreler, bazı hastalıkların tedavisinde çok etkin bir şekilde kullanılabilir.

Kök hücreler kullanılarak diyabet, parkinson, omurilik zedelenmeleri (felç), purkinje hücre dejenerasyonu, duchenne kas dizanterisi, kalp hastalıkları, görme ve duyma kayıpları, alzheimer, artrit ve çeşitli genetik bozuklukların tedavisi ile kaza veya hastalık sonucu hasar görmüş dokuların tamiri yapılabilmektedir.

Hücre transplantasyonu tekniği kullanılarak kıkırdak hücrelerinin onarım amacıyla hasarlı dokuya nakli üzerine yapılan çalışmalar 1968 yılında başlamıştır. Ancak hücrelerin kendi HDM'lerini oluşturana kadar, hasarlı bölgede tutulmasında karşılaşılan zorluklar nedeniyle başarı oranı %40'ın altında kalmıştır.

Başarılı bir kıkırdak doku mühendisliği için 3 parametre önem taşımaktadır. Bunlar; *düzenleyici sinyaller, hücreler ve HDM* dir. Kondrogenез için düzenleyici etki gösteren büyüme ve farklılaşma faktörlerinden BMPs (bone morphogenetic proteins), PDGF (platelet derived growth factors), TGF- β (transforming growth factor- β) ve IGF-I (insulin-like growth factors), kıkırdak ve kemikteki iskelet kök hücrelerinin gelişmesini başlatmak ve ilerletmek için gerekli olan sinyallerin optimal kombinasyonunun tasarımına izin vermektedir. Bu büyüme faktörlerinden özellikle TGF- β süper ailesinin bir üyesi olan TGF- β_1 'in kondrojeneze pozitif yönde, önemli bir katkı sağladığı bilinmektedir. Ayrıca büyüme faktörlerinin yanı sıra kondrogenез sırasında ihtiyaç duyulan bazı kimyasalların da (askorbik asit, ITS⁺ vb.) kültür ortamına eklenmesi gerekmektedir.

Doku mühendisliği yaklaşımı ile hücre-polimer modeli kullanılarak kıkırdak dokusunun elde edilmesinde genel olarak, doğal dokudan izole edilmiş hücrelerin sentetik ya da doğal yapıya sahip, biyolojik ortamda bozunan (biyobozunur) polimerik destek malzemeleri üzerinde kültüvasyonu işlemi uygulanmaktadır. Polimerik destek malzemeler *in vitro* olarak kültüre edilen kıkırdak hücrelerinin, bağlanıp gelişebilmesi için bir çeşit yapay HDM görevi görmektedir.

Destek malzemesinin üç-boyutlu olması, dokunun şekillendirilebilmesi ve gelişimi için önemli bir parametredir. Kültür işlemi, iki-boyutlu olarak yürütüldüğünde

kondrositlerin dediferansiye olarak kendi fenotipik özelliklerini kaybettiği gözlenmiştir (Emin vd. 2008). Buna karşın üç-boyutlu ortamlarda yani polimer iskeletlerde ve biyoreaktörlerde yürütülen kültürlerde, kondrositlerin dediferansiye olmadıkları, fenotipik ve morfolojik özelliklerini koruyarak işlevlerine devam edebildikleri belirlenmiştir. Ayrıca, iki-boyutlu kültürlerde fenotipik özelliklerini kaybeden izole kondrositlerin, üç-boyutlu malzemelere yerleştirilmesiyle birlikte kondrojenik indüksiyon uygulandığında kendi HDM'lerini oluşturacak şekilde rediferansiye oldukları tespit edilmiştir (Emin vd. 2008).

Bu tez çalışmasında yapay niş mikroçevre hazırlamak için model sistemimiz olan kıkırdak dokusunun doğal yapıya en uygun ortamın hazırlanmasına çalışılmış ve bu amaçla; hiyalüronik asit, alginat ve kollajen kullanılarak hazırlanan çeşitli polimerik yapılar kullanılarak kültür ortamları test edilmiştir.

8.1 Yapay Niş Mikroçevre Tasarımında Hiyalüronik Asit ve Hiyalüronidazın Önemi

Yapısında protein içermeyen tek GAG molekülü olan ve D-glukuronik asit ve N asetil-D-glukozamin monosakkaritlerinin birleşmesiyle oluşmuş hiyalüronik asit, canlılardaki HDM'de yüksek konsantrasyonda (3-20 mg/ml) bulunmaktadır. Hiyalüronik asit, fizyolojik özelliklerinin yanı sıra spesifik hücre yüzey reseptörlerine (CD44, hyaluronectin vs) bağlanarak hücre adezyon, migrasyon ve proliferasyonunda da rol almaktadır. Hiyalüronik asit tarafından desteklenen hücre proliferasyonu tamamen CD44-Hiyalüronik asit etkileşimine dayanmaktadır. Dokuda hasar meydana geldiğinde hiyalüronik asit, mezenkimal ve epitel hücrelerin migrasyonunu uyarmaktadır. Tümör oluşumunda ise; CD44'ün mutasyona uğramış katı formu Hiyalüronik asit ile etkileşerek metaztazı artırmakla birlikte serumdaki CD44 seviyesinde de artış gözlenmektedir.

Hiyalüronik asit polianyon yapısından ötürü yüksek oranda su tutabilmekte ve bu sayede tümör hücresinin migrasyonu için boşluklar oluşmasına neden olmaktadır. Tümör dokusunda, artan hiyalüronik asit seviyesinin tümör metastazına eğilimi

arttırdığı bilinmekte ve hiyalüronidaz (HDZ) seviyesi tümörün invaziv potansiyeli ile korelasyon göstermektedir. Ayrıca hiyalüronik asit konsantrasyonunun artmasıyla vücut sıvılarından taşınan ve de önemli olarak tümör hücreleri tarafından sentezlenen HDZ enzimi migrasyon için yeni yollar açarken angiogenezide uyarmaktadır. Hiyalüronik asit ile zenginleşmiş tümör matriksi içinde tümör hücresi, hücre yüzey reseptörlerini (CD44, N-cadherin, integrinler vb) kullanarak göç etmektedir. Ayrıca tümör hücrelerini çevreler ve immun sistemden izole ederek kemorezistan hale gelmelerini sağlamaktadır.

Kıkırdak dokusu, embriyonik evrede mezenkimal hücrelerin kondroblastlara farklılaşması ile oluşmaktadır. Kıkırdak dokusu oluşum sürecinde; Mezenkimal hücreler ilk aşamada farklılaşarak kondroblastları oluşturmaktadır. Sonraki aşamada, *kondroblastlar kendi HDM'lerini sentezlemeye başladıklarından, hücreler giderek birbirinden uzaklaşmaya başlamakta ve dolayısıyla hücre/HDM oranı azalmaktadır.* Bu aşamada aynı zamanda kondroblastlar olgunlaşarak kondrositleri, kondrositler kendi lakünleri içerisinde çoğalarak izogen hücre gruplarını oluşturmaktadır (Şekil 5.2) (Junqueira vd. 1993).

Memelilerde hiyalüronik asit, kıkırdak dokusundaki kondrositlerden ve sinovyal dokudaki tip B sinoviositlerden sentezlenerek eklem hareketi ve lenf kapillerleri yoluyla sinovyal sıvıya ve interselüler matrikse salgılanmaktadır.

Büyük ölçüde kıkırdağın yapısını oluşturan HDM içerisinde bulunan hiyalüronik asit'nin dokudaki anabolizma ve katabolizması arasındaki dengenin bozulması sonucu, matriks içerisindeki proteoglikanlar ile kollajen lifleri dejenerasyona uğramakta, dolayısıyla doğal dokunun bozulmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda da çeşitli dejeneratif hastalıklar ile tümör oluşumu ortaya çıkmaktadır. Bunun en önemli nedenlerinden birisi, *artan hiyalüronik asit konsantrasyonunu tolere edecek yeterli HDZ enziminin salgılanmaması olup, artan hiyalüronik asit miktarını degrade etmek üzere kondrositler tarafından MMP'ler (MMP-4 vb.) sentezlenmektedir.* MMP'ler ise spesifik olarak sadece hiyalüronik asit'i degrade etmeyip, matriks moleküllerini de degrade ederek matriks yapısının ve stabilitesinin bozulmasına neden olarak kıkırdak dokusunda hasara yol açmaktadır.

HDZ içermeyen kültürlerde, HDZ içeren kültürlerle oranla lakün oluşumlarının daha geç gözlenmesi ve yukarıda da açıklandığı gibi oluşan yeni yapının hücreler tarafından sentezlenecek MMP'ler tarafından degradasyonunu önlemek amacıyla ortama HDZ ilavesi gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında kıkırdak dokusunun doğal gelişimini ve dokunun anabolizma ile katabolizması arasındaki ilişkiyi taklit etmek için; izole edilerek tek tabaka kültürlerde belirli sayıya kadar çoğaltılan MKH'ler, proteoglikan agregatlarını, dolayısıyla HDM iskeletini taklit etmek üzere tasarlanan doğal polimerlerden hiyalüronik asit-kollajen tip-I iskele üzerine 2%'lik hiyalüronik asit çözeltisi içerisinde suspanse edilerek ekilmiştir.

Embriyonik evrede dokuların gelişimi sırasında ortamda bol miktarda bulunmasının yanı sıra erişkin organizmada, kollajen fibriler ağı ile eklemdaki bütün hücreler, kan ve lenf damarları ve nöral yapıları çevreleyen interselüler boşluğu doldurmasından ötürü kültür ortamına hiyalüronik asit çözeltisi ilave edilmiştir.

Hücrelerin yüksek elastoviskoz yapıdaki hiyalüronik asit içerisinde daha homojen şekilde dağılarak iskele üzerine yerleşmesini sağlamak için hücreler hiyalüronik asit çözelti ile suspanse edildikten sonra iskelelerin üzerine ekim yapılmıştır. Faz kontrast mikroskop görüntüleri hücrelerin hiyalüronik asit çözeltisi içerisindeki dağılımını ve yapı içerisinde gömülü şekilde durduğunu açıkça göstermektedir (Şekil 7.2).

Kültür ortamındaki yüksek hiyalüronik asit konsantrasyonunu hücrelere ve oluşturulmak istenen dokuya zarar vermeden tolere edilebilmesi için ortama kontrollü olarak HDZ enzimi eklenmiştir. HDZ enzimin ortamdaki varlığı ile hiyalüronik asit asitin kontrollü olarak bozulması ile hücrelerin embriyonik evredeki kondrogenezi taklit etmelerine yardımcı olunmaya çalışılmıştır.

Kontrollü hiyalüronik asit bozunması sırasında ortama verilen D-glukuronik asit ve Nasetil-D-glukozaminin HDM sentezinde kullanıldığı teorimizi desteklemek için kültür sıvısındaki serbest hiyalüronik asit miktarı ve GAG miktarlarının tayini için yapılan test

sonuçları; seçilen zaman noktalarında hiyalüronik asit miktarındaki düşmeye karşılık yapı içerisindeki GAG miktarlarında artış olduğunu göstermektedir.

8.2 Kondrogenik İndüksiyonun Etkisi

Kondrogenik indüksiyon amacıyla standart kültür ortamına TGF- β , Askorbik asit, ITS⁺ (insülin, transferin, selenoik asit) ve 20% FBS ilavesi yapılmıştır.

TGF- β_1 kondrositler için yüksek spesifiteye sahiptir ve kondrojenezi olumsuz bir yöne çekebilecek etkiye göstermemektedir. Bu nedenle *in vitro* kondrojeniz için tercih edilmektedir.

TGF- β , matriks moleküllerinin ekspresyonunu regüle etmekte ve önemli olarak HDM moleküllerini degrade eden proteazları inhibe ederek matriks yapısının bozulmasını önlemektedir. TGF- β , nötrofiller, fibroblastlar ve makrofajlar için kuvvetli bir kemoatraktanttır (kimyasal çekici). Proteoglikan, fibronektin, kollajen, tenaskin ve proteaz inhibitörlerinin üretimini uyarırken, genel olarak proteaz üretimini inhibe etmektedir.

Tarafımdan hazırlanarak 2005 yılında teslim edilmiş olan “*İzole Edilmiş Sıçan Kondrositlerinin ve Polimer İskeletlerin Kullanımıyla Kıkırdak Dokusu Geliştirilmesi*” isimli yüksek lisans tezinde yapılan literatür araştırmaları ve denemelerimiz sonucunda TGF- β_1 'in 5 ng/mL oranında kullanılmasının kondrosit kültürü işlemleri için yeterli olacağı sonucuna varılmıştı. Ancak MKH ile yapılan denemelerimizde, 10 ng/ml oranında TGF- β_1 kullanımının, MKH'lerin kondrositlere farklılaşmasını sağlamada daha iyi sonuç verdiği, dolayısıyla kondrojenezi ilerlettiği tespit edilmiştir.

8.3 Üç-Boyutlu Ortamın Önemi

Eriskin yaşamda kök hücre nişlerinin yerleşimleri, kemik iliği, deri ve bağırsak gibi bazı dokular için iyi bilinmektedir. Niş hücreleri ile fiziksel etkileşimler, kök hücre mitozu

sırasında yarıklanma düzleminin yönelimini ve niş alanlarında, Wnt, Notch ve kemik morfogenetik protein yollarının katılımıyla gerçekleşen moleküler çapraz iletişim, kök hücrelerinin simetrik ve asimetrik bölünmesi arasındaki dengeyi ve bununla ilişkili sonuçları kontrol altında tutmaktadır. *Hücreli mikroçevre* ve *hücreli mikroçevre* olarak iki grup altında sınıflandırılan kök hücre nişleri kök hücrelerin bu etkileşimlerini gerçekleştirebilecekleri şekilde üç boyutlu bir yapı sahiptirler. Bu durum hücrelerin simetrik ya da asimetrik bölünme sonucu çoğalma ve farklılaşmalarını etkilemektedir.

Kondrogenez üzerine süregelen çalışmalar göstermiştir ki; izole kondrositler ya da kök hücreler kullanılarak yapılan *in vitro* hücre kültürünün başarısı büyük ölçüde kültür ortamının şartlarına bağlıdır. Kültür sırasında önemli olan sadece bir organoidin oluşması değildir, bu organoidin istenilen yapıya sahip olmasıdır. Bunu sağlamak içinde izole edilen hücrelerin istenilen fenotipik özelliklere sahip olması gerekmektedir.

Bu çalışmada, hücrelerin istenilen fenotipe farklılaşmasını sağlayarak doku organoidinin oluşması için öncelikli olarak MKH'ler, üç-boyutlu polimerik biyomalzemeler üzerine tohumlanarak, yapay bir hücre-dışı matriks (HDM) temin edilmeye çalışılmıştır. Bu şekilde hücrelere, kendi hücre-dışı matrikslerini (HDM) sentezleyene kadar tutunup, fonksiyonlarını yerine getirebilecekleri bir ortam kazandırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, canlı organizma özellikle model sistem olarak seçtiğimiz kıkırdak dokusunun yapısında önemli bir bileşen olarak bulunan doğal polimerlerden kollajen ve hiyalüronik asit, yapay HDM olarak kullanılacak polimerik iskelelerin hazırlanması için seçilmiştir.

Hiyalüronik asit ve kollajenin yapısının hidrofilik olması yapının yüksek oranda su tutabilmesini sağlamaktadır. Yürütümüz bu tez çalışmasında, sadece Hiyalüronik asit kullanılarak hazırlanan matriks yapıların yıkım hızının istenilen büyüklükte doku formasyonlarını sağlamak için yeterli olmadığı, yapının 3-5 gün içerisinde yıkıldığı ve 4x4x4 mm'lik iskele ya da 1 cm çaplı küre başına oluşan doku benzeri yapının 2-3 mm çapında kaldığı tespit edilmiştir.

Bu nedenle yapıyı daha dayanıklı hale getirmek amacıyla kıkırdak dokusunda bulunan proteoglikan agregatları taklit edilerek hiyalüronik asitin, kollajen ile EDAC ve NHS kullanılarak çapraz bağlanmış kopolimeri kullanılmıştır. Oluşturulan hibrit yapının kültür ortamındaki yıkım süresinin, polimerin büyüklüğüne bağlı olarak 3-6 hafta arasında değiştiği, bu sürenin ise doku formasyonu için yeterli olduğu tespit edilmiştir. Oluşan doku benzeri yapının boyutunun 4x4x4 mm'lik iskele başına 5-6 mm çapına kadar ulaştığı tespit edilmiştir. Bu şekilde doku benzeri yapının makroskopik olarak doğal kıkırdak dokusu formunda görüldüğü kültür işlemleri sırasında tespit edilmiştir. (Şekil 7.4)

Kollajen-Hiyalüronik asit iskeleler SEM görüntülerinden de tespit edildiği şekilde, yüzey alanın artmasını sağlayan yüksek oranda çıkıntılara ve daha az miktarda da gözeneklere sahiptir. Gözeneklerin birbirleri ile iletişim halinde olması ve yapının yüksek oranda hidrofilik olması hücre etkileşimini ve özellikle besin maddelerinin geçişini kolaylaştırmaktadır. Yaptığımız MTT testleri sonucu polimerin gözenekleri üzerinde oluşan formazan kristalleri bu durumu kanıtlamaktadır.

Kondrositler doğal yapılarında uzaklaştırıldıklarında hücre dışı matriksi oluşturmak üzere çeşitli yapısal molekülleri sentezlemeye başlar. HDM'yi oluşturan en önemli moleküllerden olan proteoglikanlar, hücre içerisinde sentezlendikten sonra hücre dışına çıkartılır ve genel olarak hücrenin hemen çevresinde yani teritoryal matrikste lokalize olur. Bu nedenle proteoglikan molekülleri teritoryal matrikste daha fazla miktarda bulunur.

Önemli bir proteoglikan molekülü olan agrekanda genel olarak hücrenin çevresinde yüksek oranda bulunmaktadır. Bu nedenle üretilme miktarına da bağlı olarak hücre çevresinde agregatlar oluşturmaktadır. Bu çalışmada, oluşan agregatların boyutlarının takip edilen kültür şartlarına göre değişiklik gösterdiği immünohistokimya fotoğraflarında gösterilmektedir.

Üç-boyutlu ortamı sağlayan *hiyalüronik asit-kollajen* iskeleleri ile yürütülen çalışmaların sonucunda yapılan histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalar,

MKH'lerin farklılaşarak kendi HDM'lerini oluşturduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, MKH'ler için tasarlanan yapay mikroçevrenin *in vitro* kıkırdak dokusu oluşturmada başarılı olduğunu göstermektedir.

Ayrıca DNA miktar tayininde, *boyutsal olarak yaklaşık aynı ölçülerde alınan örneklerdeki* DNA bileşimine bağlı olarak ilerleyen zaman noktalarında hücre miktarındaki azalmanın, doğal kıkırdak dokusundakine benzer şekilde “*Hücre/HDM*” oranının zamanla azaldığını göstermektedir. Bu sonuçları spektrofotometrik MTT verileri de desteklemektedir. Ancak MTT testinde elde edilen grafikteki düşüşün, DNA miktarını gösteren grafikteki düşme oranı kadar keskin olmaması oluşan formazan kristallerinin doğrudan hücre miktarını göstermeyip, sentezlenen HDM proteinleri ile formazan kristalleri oluşturmaktan kaynaklanmaktadır. Bu durum, oluşturulan sistemin hücreleri doğru yönde ilerlettiğini ve kondrojeniz sürecinde başarılı bir etki gösterdiğini kanıtlamaktadır.

8.4 Genel Değerlendirme

Yapılan gözlemler ve uygulan testlerin sonucunda, yürütülen kültür işlemleri takip edilerek birbirleri ile kıyaslanabilmektedir. Öncelikli olarak faz-kontrast mikroskobu ile yapılan gözlemler, MKH'lerin FeCl₃ kullanılarak çapraz bağlanmış hiyalüronik asit küre içerisinde daha serbest davranmalarına karşın polimerik yapının istenilen doku formasyonunu sağlamaya yetecek dayanımda olmadığı gibi sıfırıncı gündeki yapının boyutuna göre oluşan doku benzeri yapının boyutunun çok küçük olduğu tespit edilmiştir.

Buna karşın liyafilizatör tekniği ile %2'lik hiyalüronik asit kullanılarak hazırlanan iskele yapının ise kültür ortamında hiyalüronik asit küre yapılarına kıyasla çok daha hızlı şekilde 1-3 gün içerisinde yıkıldığı tespit edilmiştir. Sadece hiyalüronik asit kullanılarak test edilen malzelerinin dayanımlarının iyi olmaması üzerine, yapıların dayanımlarını artıracak yeni yöntemler denenmiştir.

Öncelikle FeCl₃ kullanılarak çapraz bağlanan hiyalüronik asit kürelerinin enkapsülasyon ile başka bir doğal polimer olan alginat ve kitosanla kaplanması test edilmiştir. Kitosanın polikatyonik yapıda olması nedeniyle kitosan için çapraz bağlayıcı olarak kullanılan TPP'nin hiyalüronik asit küresini yıktığı, dolayısıyla bu iki polimerik yapının birbirleri ile uyumlu olmadığı teyit edilmiştir.

CaCl₂ ile çapraz bağlanabilen polianyon yapısındaki alginat ile yapılan kaplama işlemi daha başarılı sonuç vermesine karşın, kültür ortamında yapıdaki hiyalüronik asit'in yıkım hızını istenilen boyutlarda doku formasyonunun gerçekleşmesine yetecek kadar yavaşlatmadığı ve yıkılan hiyalüronik asit'in alginat kapsülün içinden kültür ortamına salındığı tespit edilmiştir.

Kullanılan son teknikte ise doğal dokularda özellikle kıkırdak dokusunun matriks yapısında bulunan kollajen test edilmiştir. Liyofilizasyon tekniği ile hazırlanan kollajen iskelelerin kültür sıvısı ile temas ettiğinde hemen yıkılmasının görülmesi üzerine, kollajen ile Hiyalüronik Asit'in değişik konsantrasyonlardaki çözeltilerinin kopolimerizasyonları test edilmiştir.

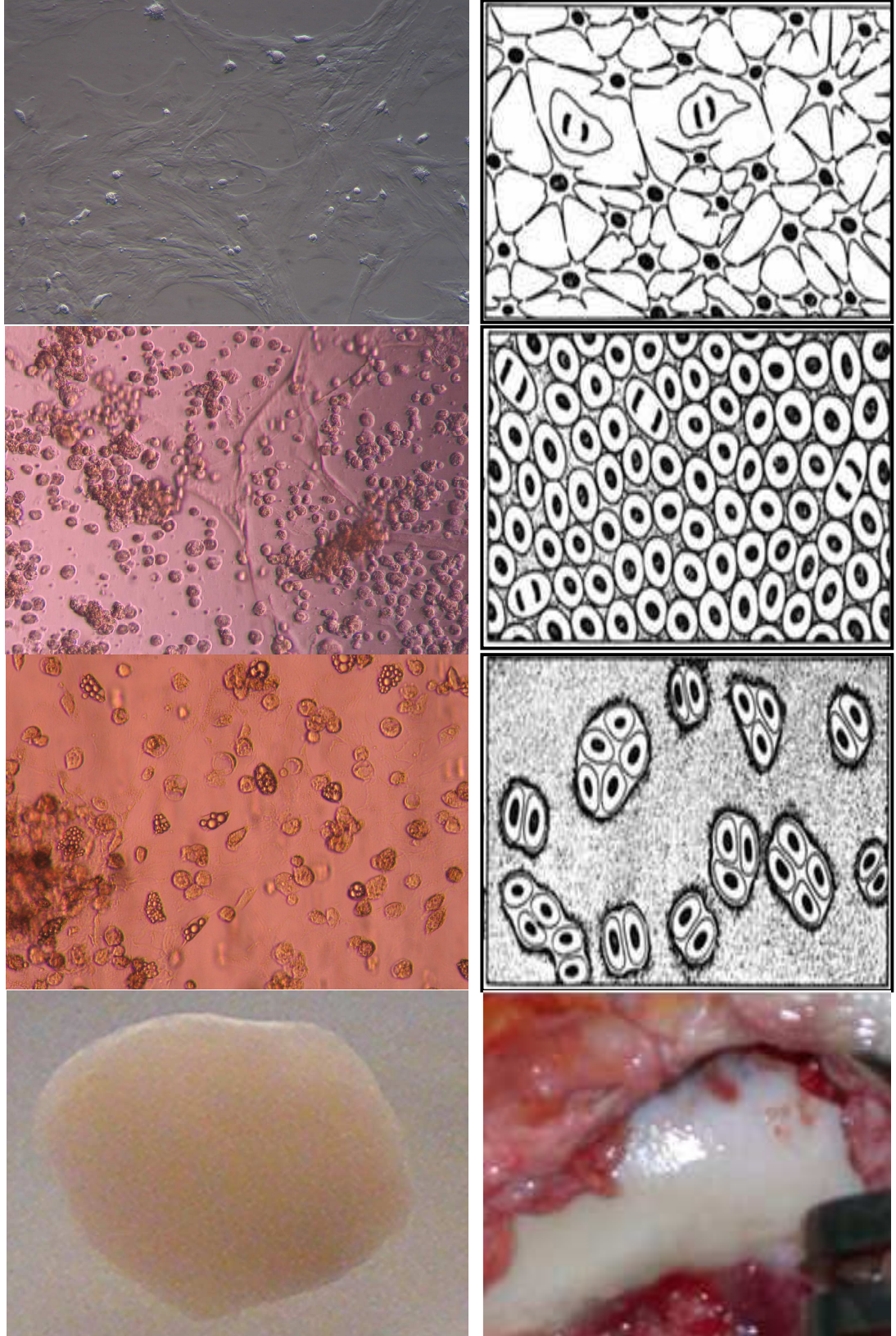
Sonuç olarak, %1'lik kollajen çözeltisi içerisinde hazırlanan %1'lik Hiyalüronik Asit çözeltisinden, liyofilizatör ve çapraz bağlayıcı olarak da NHS ve EDAC kullanılarak hazırlanan iskelelerin yapılan FT-IR analizlerinde kollajen ve hiyalüronik asit arasında ester bağlarının kurulduğunu göstermektedir. Hazırlanan iskelelerin, doku formasyonunun sağlanmasına yetecek 3-6 haftalık süreç için gerekli dayanıma sahip olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan testler ve çeşitli görüntüleme teknikleri ile elde edilen görüntüler; Hücre Dışı Matriks benzeri iskele yapı üzerinde ve tasarlanan yapay niş mikroçevrede, Mezenkimal Kök Hücrelerin yeniden modellenme ile farklılaşarak yeni kıkırdak doku organoidini daha sağlıklı bir şekilde oluşturduğunu göstermektedir.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında *Kıkırdak dokusunun embriyonik evredeki gelişimi dikkate alınarak tasarlanan yapay niş mikroçevrede doku gelişim modelimizde*; sıçan kemik iliğinden izole edilen MKH'lerin üç boyutlu yapı içerisine alındıklarında morfolojilerinin değişerek yuvarlak görünüm kazandıkları, Hiyalüronik Asit'nin kontrollü degradasyonu ile kondrositlere farklılaşmanın gerçekleşerek lakun oluşumlarının 3. Günden itibaren görülmeye başladığı ve izogen hücre gruplarının oluşarak "*Hücre/HDM*" oranının azaldığı, yapılan DNA miktar tayini, MTT ölçümleri, Hiyalüronik Asit ve GAG miktarı ölçümü ile faz kontrast görüntüleri tarafından desteklenmektedir (Şekil 8.1). Histokimya ve immünohistokimya görüntüleri de ilerleyen zaman noktalarında kollajen tip-2 ve agrekan sentezinin arttığını dolayısıyla HDM sentezinin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 8.1).

Bu tez çalışmasında yapay niş mikroçevre hazırlamak için model sistemimiz olan kıkırdak dokusunun doğal yapıya en uygun ortamın hazırlanmasına çalışılmış ve bu amaçla hazırlanan yapılar içerisinde en uygun yapı modelinin; proteoglikan agregatları taklit edilerek, liyofilizasyon ile %1'lik kollajen ve %1'lik Hiyalüronik asit kullanılarak hazırlanan polimerik iskeleler üzerine %2'lik Hiyalüronik asit çözeltisi içerisindeki MKH'lerin ekimi gerçekleştirilerek kondrojenik indüksiyon uygulanması olduğu tespit edilmiştir.

İleride gerçekleştirilecek olan *in vivo* deneylerde, bu *in vitro* çalışmadan elde edilen bulgular kullanılarak daha başarılı ilerlemelerin sağlanabileceği tahmin edilmektedir. Böyle bir durumda, elde edilecek *in vivo* ve *in vitro* sonuçların, gelecekteki klinik uygulamalar için yol gösterici olabileceği ve nihayetinde tıbbi bir hizmete yönelik olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.



Şekil 8.1 Oluşturulan yapay niş mikroçevre sisteminde oluşturulan kondrogenез model sisteminden elde edilen sonuçların, embriyonik gelişim sırasındaki kıkırdak dokusu oluşumunu simgeleyen resimlerle kıyaslanması.

KAYNAKLAR

- Angel, M., Razzano, P. and Grande, D. 2003. Defining The Challenge : The Basic Science Of Articular Cartilage Repair And Response To Injury. Lippincott Williams & Wilkins, Inc. Vol. 11 (3), pp. 168-181.
- Anonim. 1999The Promise of Tissue Engineering, Special Report, Scientific American, pp. 59-89.
- Barbero, A., Grogan, S., Schafer D., Heberer, M., Mainil-Varnet, P. and Martin, I. 2004. Age Related Changes In Human Articular Chondrocyte Yield, Proliferation And Post-Expantion Chondrogenic Capacity. Osteoarthritis and Cartilage, Vol. 12, pp. 476-484.
- Cerroni, L., Filocamo, R., Fabbri, M., Piconi, C., Caropreso, S., and Condo, S. G. 2002. Biomolecular Engineering, Vol. 19, pp. 119-124.
- Chen, Z.X., Chang, M., Peng, Y.L., Zhao, L., Zhan, Y.R., Wang, L.J. and Wang, R. 2007. Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide [OGP(10-14)] acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. Regul Pept, Vol. 142(1-2), pp.16-23.
- Duckeyne, P., and Qiu, Q. 199. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell. Biomaterials, Vol.20, pp. 2287-2303.
- Dunkelman, N.S., Zimber, M.P., LeBaron, R.G., Pavelec, R., Kwan, M. and Purchio, A.F. 1995. Cartilage Production by Rabbit Articular Chondrocytes on Polyglycolic Acid Scaffolds in Closed Bioreactor System. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 46, pp. 299-305.
- Elçin, Y.M. 2003. Tissue Engineering, Stem Cells And Gene Therapies, Kluwer-Plenum Press, Aemb, pp. 53-:350, London, Ny, Moscow.

- Elçin, Y.M. 2004. Tissue Engineering And Stem Cells, In: Biomaterials, From Molecules To Engineered Tissues, Kluwer-Plenum Press, Aemb, 553-301-316, London, Ny, Moscow.
- Emin, N., Koc, A., Durkut, S., Elcin, A.E. and Elcin, Y.M. 2008. Engineering of rat articular cartilage on porous sponges: effects of TGF- β 1 and microgravity bioreactor culture. *Artif. Cell. Blood Sub.*, Vol. 36, pp. 123-137.
- Freed, L. 1998. Chondrogenesis in a Cell-Polymer Bioreactor System. *Exp Cell Res* Vol. 240, pp. 58-65.
- Freed, L.E., Marquis, J.C., Vunjak-Novakovic, G. and Langer, R. 1994. Kinetics of Chondrocyte Growth in Cell Polymer Implants. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 43, pp. 597-604.
- Freed, L.E., Marquis, J.C., Vunjak-Novakovic, G., Emmanuel, J. and Langer, R. 1994. Composition of Cell-Polymer Cartilage Implants. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 43, pp. 605-614.
- Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G. and Langer, R. 1993. Cultivation of Cell-Polymer Cartilage Implants in Bioreactors. *J Cell Biochem* Vol. 51, pp. 257-64.
- Furukawa, K.S., Suenaga, H, Toita, K., Numata, A., Tanaka, J., Ushida, T., Sakai, Y. and Tateishi, T. 2003. Rapid and Large-Scale Formation of Chondrocyte Aggregates by Rotational Culture. *Cell Transplantation*, Vol. 12, pp. 475-479.
- Handley, C.J., Winter, G.M., Ilic, M.Z., Ross, J.M., Poole, C.A. and Robinson, H. 2002. Distribution of Newly Synthesized Aggrecan in Explant Cultures of Bovine Cartilage With Retinoic acid. *Matrix Biology*, Vol. 21, pp. 579-592.
- Knudson, C.B. and Knudson, W. 2001. Cartilage Proteoglycans. *Cell and Developmental Biology*, Vol. 12, pp. 69-78.
- Langer, R., Vacanti, T., and Tateishi, T. 2000. A Biodegradable Hybrid Sponge Nested With Collagen Microsponges. *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 51, pp. 273-279.

- Li, Z. and Li, L. 2006. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. Trends Biochem Sci., Vol. 31(10), pp. 589-595.
- Li, L., Xie T. 2005. Cell Dev. Biol. 21: 605-631.
- Nehrer, S., Breinan, H.A., Ramappa, A., Young, G., Shortkroff, S., Louie, L.K., Sledge, C.B., Yannas, I.V. and Spector, M.1997.. Matrix Collogen Type And Pore Size Influence Behaviour of Seeded Canine Chondrocytes. Biomaterials, Vol. 18 no. 11, pp 769-776.
- Pansky, A., Roitzheim, B. and Tobiasch, E. 2007. Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells. Clin Lab, Vol. 53(1-2), pp. 81-84.
- Reddi, A.H. 1994. Symbiosis of Biotechnonology and Biomaterials: Applications in Tissue Engineering of Bone and Cartilage. Journal of Cellular Biochemistry Vol. 56, pp.192-195.
- Reinholz, G.G., Lu, L., Saris, D.B.F., Yaszemski M.J. and O'Driscoll S.W. 2003. Animal Model for Cartilage Reconstruction. Biomaterials, pp. 1-11.
- Ross, J. and Li, L. 2006. Recent advances in understanding extrinsic control of hematopoietic stem cell fate. Curr Opin Hematol, Vol. 13(4), pp. 237-242.
- Rotter, N., Aigner, J., Naumann, A., Planck, H., Hammer, C., Burmester, G. and Sittinger M. 1998. Cartilage Reconstruction in Head And Neck Surgery : Comparison of Resorbable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering of Human Septal Cartilage.
- Sağlam, M., Aştı, R. ve Özer, A. 2001. Genel Histoloji. Yorum Matbaacılık. Ankara.
- Scadden, D.T. 2006. Nature, Vol. 441, pp. 1075-1079.
- Temenoff, J.S. and Mikos, A.G. 2000. Tissue Engineering for Regeneration of Articular Cartilage. Biomaterials, Vol. 21, pp. 431-440.

- Thompson, R.C., Wake, M.C., Yaszemski, M.J., And Mikos, A.G. 1995. Biodegradable Polymer Scaffolds To Regenerate Organs. *Advances In Polymer Science*, Vol. 122, pp.245-274.
- Trounson, A. 2006. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev.* Vol. 27(2), pp. 208-219.
- Unsworth, B.R. and Lelkes, P.I. 1998. Growing Tissues In Microgravity. *Nature Medicine*. Vol. 4, pp.901-907.
- Vacanti, C.A. and Vacanti, J.P. 1997. Principles of Tissue Engineering, Edit by Lanza R., Langer R., Chick W. Landes Company, pp. 619-630.
- Vescovi, A., Gritti, A., Cossu, G. and Galli, R. 2002. Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential. *Cells Tissues Organs*. Vol. 171(1), pp. 64-76.
- Weissman, I.L. 2000a. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. Vol. 100, pp. 157-168.
- Weissman, I.L. 2000b. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic barriers and opportunities. *Science*. Vol. 287, pp. 1442-1446.
- Williams, C.G., Kim, T.A., Taboas, A., Malik, A., Manson, P. and Elisseeff, J. 2003. *In Vitro* Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in A Photopolymerizing Hydrogel. *Tissue Engineering*, Vol. 9 (4).
- Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G.M., Hayek, A. and Ding, S. 2006. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc Natl Acad Sci*, Vol.103(18), pp. 6907-6912.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nuray EMİN

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 08.02.1979

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce (66,25 ÜDS, 2010)

Eğitim Durumu (Kurum ve Yılı)

Lise : Alparslan Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı), (1997).

Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Ankara, (2003).

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı (Biyokimya), Ankara, (2005).

Sci-İndeksi Kapsamındaki Uluslararası Araştırma Makaleleri

1. **Emin N.**, Koç A., Durkut S., Elçin A.E., Elçin Y.M. (2008). "Effect of TGF- β and Microgravity on the Redifferentiation of Isolated Rat Chondrocytes Seeded on Porous Scaffolds". Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology 36: 123-137.
2. Koç A., **Emin N.**, Elçin A.E., Elçin Y.M. (2008). "In Vitro Osteogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells on Mineralized Poly(DL-Lactic-co-Glycolic Acid) Scaffolds in a STLV Microgravity Bioreactor". Journal of Bioactive and Compatible Polymers 23: 244-261.

Ulusal Dergilerde Yayımlanan Araştırma Makaleleri

1. Binnet S.M., Başarır K., **Emin N.**, Yörübulut M., Elçin Y.M. (2010). "Recent Applications of Cellular Therapy in Orthopedic Surgery". Journal of Cellular Therapy and Regenerative Medicine 1:1:17-22.

Ödüller

Uluslararası BIOMED 2005 - 1. Poster Ödülü (First Place). 12th International Symposium on Biomedical Science and Technology (*BIOMED 2005*), Ege Üniversitesi, 20-23 Eylül 2005, İzmir, TÜRKİYE (Kıkırdak Doku Mühendisliği konulu araştırma için verilmiştir).

Uluslararası Sempozyum/Kongre Bildirileri

1. **Emin N.**, Elçin A.E., Elçin Y.M. “Engineering of Cartilage Tissue by Using Isolated Rat Chondrocytes Seeded on a Macroporous Polymeric Scaffold in a NASA-STLV Bioreactor”. Poster Bildirisi, 11th International Biomedical Science and Technology Days (BIOMED 2004), Hacettepe Üniversitesi, 6-10 Eylül , 2004, Ankara, TÜRKİYE.
2. **Emin N.**, Elçin A.E., Elçin Y.M. “Effect of TGF- β and Microgravity on the Redifferentiation of Isolated Rat Chondrocytes Seeded on Porous Scaffolds”. Poster Bildirisi, 12th International Symposium on Biomedical Science and Technology (BIOMED 2005), Ege Üniversitesi, 20-23 Eylül 2005, İzmir, TÜRKİYE.
3. **Emin N.**, Elçin A.E., Elçin Y.M. “Effect of TGF- β and Microgravity on the Engineering of Cartilage Tissue by Using Isolated Rat Articular Chondrocytes-Encapsulated within Calcium Alginate Fibres”. Poster Bildirisi, 13th International Symposium on Biomedical Science and Technology (BIOMED 2007), Yeditepe Üniversitesi, 26-28 Ağustos 2007, İstanbul, TÜRKİYE.
4. **Emin N.**, Elçin A.E., Elçin Y.M. “Rat Articular Cartilage Engineering Using Alginate Fibers Under Microgravity Conditions”. Poster Bildirisi, Bioengineering Conference, 2009 IEEE 35th Annual Northeast, MIT, 03-05 Nisan 2009, Boston,MA,USA.
5. **Emin N.**, Başarır K., Elçin A.E., Binnet M., Elçin Y.M. “*In Vitro* Human Neocartilage Formation on Biodegradable Scaffolds Inside STL V Bioreactor”. Poster Bildirisi, 15th International Symposium on Biomedical Science and Technology (BIOMED 2009), ODTÜ, 16-19 Ağustos 2009,Güzelyurt, KKTC.
6. **Emin N.**, Elçin A.E., Elçin Y.M. “Comparison Between The Effect Of Hydrogel Matrix And Porous Scaffold On The Cartilage Tissue Engineering”. Poster Bildirisi, 11th International Chemistry conference And Exhibition in Africa (11 ICCA), Sohag Üniversitesi, 20-23 Kasım 2010, Luxor, Mısır.

Ulusal Sempozyum/Kongre Bildirileri

1. Başarır K., **Emin N.**, Elçin A.E., Binnet M., Elçin Y.M. “Travmatik Kıkırdak Kayıplarının Tedavisinde Otolog Kondrosit İmplantasyonunun Etkinliği: Hücre Nakli ve Doku Mühendisliği Yaklaşımıyla Türkiye’deki İlk Uygulamalar”. Poster Bildirisi, 20. Milli Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi, 23-28 Ekim 2007, Ankara, TÜRKİYE.
2. Binnet M., Başarır K., **Emin N.**, Yörübulut M., Aydın M., Elçin Y.M. “Otolog Kondrosit İmplantasyonunun Ameliyat Sonrası Değerlendirilmesinde (delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage) dGEMRIC Tekniğinin Kullanımı”. Poster Bildirisi, 21. Milli Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi, 03-08 Kasım 2009, Çeşme, TÜRKİYE.

Katılan Kurslar

1. I. TÜBA Kök Hücre Kursu, 25 Haziran 2010, Ankara, TÜRKİYE.
2. II. TÜBA Kök Hücre Kursu ve VI. Kök Hücre Sempozyumu, 24-25 Haziran 2011, Ankara, TÜRKİYE.

Görev Alınan Araştırma Projeleri

1. **Araştırmacı**, Ankara Üniversitesi-Biyoteknoloji Enstitüsü (BIBAP 153).

“İzole edilmiş Sıçan Kondrositleri ve Polimerik Biyomalzemelerin Kullanımıyla Kıkırdak Doku Mühendisliği”, *Yönetici: Prof.Dr.Y.M.Elçin* (Tamamlandı).

2. **Araştırmacı**, Ankara Üniversitesi-Biyoteknoloji Projesi (BIBAP 189).

“Travmatik Kıkırdak Kayıplarının Tedavisinde Otolog Kondrosit Transplantasyonunun Etkinliğinin Arttırılması”, *Yönetici: Prof.Dr.M.Binnet; Danışman: Prof.Dr.Y.M.Elçin; Araştırmacı: Dr.K.Başarır ve N.Emin* (Tamamlandı)