

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HÜCRE-ECM YOĞUNLUK ORANININ ÜÇ BOYUTLU
KÖK HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN KONDROJENİK
FARKLILAŞMASINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Selda GÖKŞEN

**DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe Eser ELÇİN**

**ANKARA
2023**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Hücre-ECM Yoğunluk Oranının Üç Boyutlu Kök Hücre Kültürlerinin Kondrojenik Farklılaşmasına Etkisinin Araştırılması" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Selda GÖKŞEN

Tarih: 03/07/2023

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalında
Selda GÖKŞEN tarafından hazırlanan “Hücre-ECM Yoğunluk Oranının Üç Boyutlu
Kök Hücre Kültürlerinin Kondrojenik Farklılaşmasına Etkisinin Araştırılması” adlı
tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27 / 07 / 2023

Prof. Dr. Mahmut SELVİ
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

Dr. Öğr. Üyesi Klara DALVA
Ankara Üniversitesi
Raportör

Prof. Dr. A. Eser ELÇİN
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Doku Mühendisliği Yaklaşımları	3
1.2. Kıkırdak Doku Mühendisliği Yaklaşımları	5
1.3. Kıkırdak Doku	7
1.3.1. Eklem Kıkırdağının Yapısı	8
1.3.2. Eklem Kıkırdağının Tabakaları	8
1.3.3. Kıkırdak Doku Hücreleri (Kondrositler):	10
1.3.4. Kıkırdak Doku Ekstrasellüler Matriks Yapısı	12
1.3.5. Eklem Kıkırdağı Tedavisinde Kullanılan Cerrahi Prosedürler	13
1.4. İnsan Plasentası	16
1.5. Kök Hücreler	19
1.5.1. Farklılaşma Yeteneklerine Göre Kök Hücreler	20
1.5.2. Elde Edilen Kaynağa Göre Kök Hücreler	21
1.5.3. Mezenkimal Kök Hücreler	22
1.5.4. Perinatal Kaynaklı Kök Hücreler	24
1.6. Hücre Kültürü	27
1.6.1. 2 Boyutlu Hücre Kültürü	29
1.6.2. 3 Boyutlu Hücre Kültürü	29
1.6.3. 2B ve 3B Hücre Kültürünün Karşılaştırılması	33
1.7. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Polisakkaritler	36
1.7.1. Karragenan	37
2. GEREÇ VE YÖNTEM	39
2.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	39
2.2. Tamponlar ve Çözeltiler	40
2.2.1. Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) (10X)	40
2.2.2. % 0.05 Tripsin-EDTA Çözeltisi	40
2.2.3. FBS (Fetal Sığır Serumı – Isı İnaktif)	41
2.2.4. Tripkan Mavisi (TM)	41
2.2.5. Standart MEM- α (Minimum Essential Medium Eagle) Tam Kültür Ortamının Hazırlanması	41
2.2.6. Standart DMEM:F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and Ham's F-12 Nutrient Mixture) Tam Kültür Ortamının Hazırlanması	41
2.2.7. Adipojenik Farklılaştırma Tam Kültür Ortamı	42
2.2.8. Osteojenik Farklılaştırma Tam Kültür Ortamı	42

2.2.9.	Kondrojenik Farklılaştırma Tam Kültür Ortamı	42
2.3.	Plasentanın Temin Edilmesi	43
2.4.	Plasentanın Anatomik Diseksiyonu	43
2.4.1.	Umbilikal Kord (Göbek Bağı)	44
2.4.2.	Amniyotik Membran	44
2.4.3.	Koryon Plaka	45
2.4.4.	Koryon Villüs	45
2.4.5.	Desidua Bazalis	45
2.5.	Plasentadan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu	46
2.6.	Mezenkimal Kök Hücre Ekspansiyonu, Pasajlama, Dondurma ve Çözme	48
2.7.	Hücre Sayımı	50
2.8.	Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu	50
2.8.1.	Mikroskop ile Görüntüleme	50
2.8.2.	İmmünojenotipleme ve Hücre Canlılığı Analizi	51
2.8.3.	UK-MKH'lerin Üçlü Soya Farklılaştırılması	52
2.8.4.	UK-MKH CFU (Koloni Oluşturabilen Birim) Oluşumu	54
2.9.	Histokimyasal Boyamalar	55
2.9.1.	Kristal Viyole Boyaması	55
2.9.2.	Oil Red O Boyaması	55
2.9.3.	Alizarin Kırmızısı Boyaması	56
2.9.4.	Von Kossa Boyaması	56
2.9.5.	Alsiyen Mavisi Boyaması	56
2.9.6.	Pikro-sirius Kırmızısı Boyaması	57
2.10.	Büyüme Eğrisi	57
2.11.	Çoğalma Eğrisi Analizi	58
2.12.	<i>In Vitro</i> Migrasyon Testi	58
2.13.	MKH'lerin İki-Boyutlu (2B) Kültürü	59
2.14.	MKH'lerin Üç-Boyutlu Kültürü (Sferoid Kültür)	60
2.15.	3B Kültür Deney Gruplarının Belirlenmesi	61
2.16.	Poli-HEMA Kaplaması	62
2.17.	Sferoidlerin Çap Ölçümü	63
2.18.	Sferoidlerin Rastgele Birleşmesinde Füzyon Deneyleri	64
2.18.1.	Çiftlerin Füzyonu	64
2.18.2.	Çoklu Sferoidlerin Füzyonu	65
2.19.	Histokimyasal Analizler	66
3.	BULGULAR	67
3.1.	Plasentanın Anatomik Diseksiyonu	67
3.2.	Plasentadan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu	67
3.3.	Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu	69
3.3.1.	Mikroskop ile Görüntüleme	69
3.3.2.	İmmünojenotip ve Hücre Canlılığı Analizi	70
3.3.3.	UK-MKH'lerin Üçlü Soya Farklılaştırılması	75
3.3.4.	UK-MKH CFU (Koloni Oluşturabilen Birim) Oluşumu	78
3.4.	Büyüme Eğrisi	79
3.5.	Çoğalma Eğrisi Analizi	80
3.6.	<i>In Vitro</i> Migrasyon Testi	81
3.7.	MKH'lerin Üç-Boyutlu Kültürü (Sferoid Kültür)	82

3.8.	2B ve 3B UK-MKH CFU (Koloni Oluşturabilen Birim) Oluşumu	84
3.9.	Sferoidlerin ap lümü	85
3.10.	Sferoidlerin Rastgele Birleşmesinde Füzyon Deneyleri	89
3.10.1.	Çiftlerin Füzyonu	89
3.10.2.	Çoklu Sferoidlerin Füzyonu	96
3.11.	Histokimyasal Analizler	100
4.	TARTIşMA	104
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	112
	ÖZET	114
	SUMMARY	115
	KAYNAKLAR	116
	ZGEMİş	126



ÖNSÖZ

Kıkırdak doku mühendisliğinde tasarlanacak doku mühendisliği ürününün kıkırdak dokuya çok yakın özellikler göstermesi beklenmektedir. Kıkırdak dokunun tasarımında hücre-ECM yoğunluk farkları önemlidir. Bu tez çalışmasında üç-boyutlu hücre kültürü ortamında insan umbilikal kord mezenkimal kök hücreleri – ECM yoğunluk farklarının kondrojenik farklılaşma üzerine olası etkileri incelenmiştir.

Yüksek lisans sürecim boyunca bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren, sürecin tüm aşamalarında desteği, bilgi ve tecrübesiyle her zaman yanımda olan danışmanım Prof. Dr. A. Eser ELÇİN'e,

Yüksek lisans sürecim boyunca değerli fikir ve önerileri ile tüm sürecime katkıda bulunan, laboratuvarının tüm imkanlarını sunan, süreç boyunca yoluma ışık tutan değerli hocam Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e,

Tüm süreç boyunca yanımda olan ve desteğini her an hissettiğim canım yol arkadaşım Sıla ÖZÇELİK'e,

Süreç boyunca bana destek olan, bilgilerini ve tecrübelerini paylaşan tüm Elçin Lab. ekibine,

Bugüne kadar hayallerimi gerçekleştirmek istediğim yolda bana sağladıkları tüm maddi ve manevi destekler ve sevgilerini her an hissettiren canım annem Tülay GÖKŞEN'e ve canım babam Ahmet GÖKŞEN'e, bilgi ve tecrübesiyle hep yanımda olan canımın yarısı biricik ikizim Sibel GÖKŞEN'e, desteklerini esirgemeyen bilgi ve tecrübeleriyle sürecime katkı sağlayan canım kardeşlerim Sevgi GÖKŞEN SULUOVA ve Hamit Furkan SULUOVA'ya

Süreçte tüm varlığıyla desteğini hissettiren, ne zaman ihtiyacım olsa her an orda olan canım arkadaşım İnci Bahar ÇINAR'a

En içten minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Selda GÖKŞEN

Ankara, Temmuz 2023



SİMGELER VE KISALTMALAR

A-B	Alsiyen mavisi
AM-MKH	Amniyotik Membran Mezenkimal Kök Hücre
ACI	Otolog/Allojenik Kondrosit İmplantasyonu
AMIC	Otolog Matriks Kaynaklı Kondrojeniz
CD	Yüzey Farklılaşma Antijenleri (Cluster of Differentiation)
CFU	Koloni Oluşturabilen Birim
CFU-f	Koloni Oluşturabilen Birim Frekansı
CMGP	Kıkırdak Matriks Glikoproteini
COMP	Kıkırdak Oligometrik Matriks Proteini
DB-MKH	Desidua Bazalis Mezenkimal Kök Hücre
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM F:12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Ham's F-12 Nutrient Mixture
DMEM-HG	Yüksek Glikozlu Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM-LG	Düşük Glikozlu Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
ECM	Hücre Dışı Matriks (Ekstrasellüler Matriks)
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	Fetal Sığır Serum
GAG	Glikoz Amino Glikan
hAEC	İnsan Amniyotik Epitel Hücreler
hAMSC	İnsan Amniyotik Stromal Hücreler
hCMSC	İnsan Koryonik Mezenkimal Stromal Hücreler
hCTC	İnsan Koryonik Trofoblastik Hücreler
HEMA	Hidroksietil metakrilat
HLA	İnsan Lökosit Antijenleri
ı	İota

κ	Kappa
κ -CR	Kappa Karragenan
κ -karragenan	Kappa Karragenan
KP-MKH	Koryon Plak Mezenkimal Kök Hücre
KV-MKH	Koryon Villüs Mezenkimal Kök Hücre
λ	Lambda
L-Glu	L-Glutamin
LIN	Lineage spesifik işaretleyicileri içeren kokteyl
MACI	Matriks Kaynaklı Otolog Kondrosit İmplantasyonu
MEM- α	Minimum Essential Medium Eagle
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi (Major Histocompatibility Complex)
MKH	Mezenkimal Kök Hücreler
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
OCT	Osteo Kondral Transplantasyon
P/S	Penisilin-streptomisin
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PFA	Paraformaldehit
P-MKH	Plasenta Mezenkimal Kök Hücre
PSR	Pikrosirius kırmızısı
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
UK-MKH	Umbilikal Kord Mezenkimal Kök Hücre
2B	2 Boyutlu
3B	3 Boyutlu

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Eklem Kıkırdağının Tabakaları	18
Şekil 1.2. İnsan Plasentası ve Koryon Villusların Şematik Gösterimi	18
Şekil 1.3. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması	20
Şekil 1.4. 2B ve 3B Hücre Kültür Modellerinin Şematik Gösterimi	28
Şekil 1.5 Üç Tür Karragenan'ın Kimyasal Yapıları. Kappa (κ), İota (ι) ve Lambda (λ) Formları	38
Şekil 2.1. İnsan Plasentasının Farklı Anatomik Kısımlarından Hücre İzolasyonunun Şematik Diyagramı	44
Şekil 2.2. Plasentadan Eksplant Kültür Yöntemiyle Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu Şeması	47
Şekil 2.3. Yara Kapanma Yüzdesi Formülü	59
Şekil 2.4. MKH'lerin Üç-Boyutlu Sferoid Kültüründe Asılı Damla Yöntemi Uygulamasının Şematik Gösterimi	61
Şekil 2.5. F Dairesellik Hesaplama Formülü	63
Şekil 2.6. Sferoid Çap Ölçümlerinin Gösterimi	64
Şekil 2.7. Çift Füzyon Testinde Ölçülen Morfolojik Parametreler	65
Şekil 2.8. Çoklu Sferoidlerin Değerlendirmesinde Ölçülen Morfolojik Parametrelerin Şematik Gösterimi	66
Şekil 3.1. (A) Umbilikal Kord (B) Amniyotik Membran (C) Koryon Plak (D) Koryon Villus (E) Desidua Bazalis Eksplant Kültürlerinin Faz-Kontrast Mikroskobu Görüntüsü	68
Şekil 3.2. Plaseenta Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklı Pasajlardaki Faz-Kontrast Mikroskobu Görüntüsü (A) AM-MKH P3 (B) KP-MKH P3 (C) KV-MKH P1 (D) DB-MKH P3	69
Şekil 3.3. Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklı Pasajlardaki Faz-Kontrast Mikroskobu Görüntüsü (A) UK-MKH P0 – Eksplant Kültür. (B) UK- MKH P1 (C) UK-MKH P2 (D) UK-MKH P3. (E) UK-MKH P4. (F) UK-MKH P5	70
Şekil 3.4. Akım Sitometri İle UK-MKH'lerinin Yüzey Belirteçlerinin İfadesi	71
Şekil 3.5. Akım Sitometri İle AM-MKH'lerinin Yüzey Belirteçlerinin İfadesi	72
Şekil 3.6. Akım Sitometri İle KP-MKH'lerinin Yüzey Belirteçlerinin İfadesi	73
Şekil 3.7. Akım Sitometri İle KV-MKH'lerinin Yüzey Belirteçlerinin İfadesi	74
Şekil 3.8. Akım Sitometri İle DB-MKH'lerinin Yüzey Belirteçlerinin İfadesi	75

Şekil 3.9. UK-MKH'lerin Adipojenik Farklılaşma Potansiyelinin Oil Red O Histokimyasal Boyaması	76
Şekil 3.10. UK-MKH'lerin Osteojenik Farklılaşma Potansiyelinin Alizarin Kırmızısı ve von Kossa Histokimyasal Boyamaları	77
Şekil 3.11. UK-MKH'lerin Kondrojenik Farklılaşma Potansiyelinin Alsiyen Mavisi Histokimyasal Boyaması	78
Şekil 3.12. Kristal Viyole ile Boyanmış UK-MKH'lerin Koloni-Oluşturma Yatkınlık Deneyi (Klonojenisite; CFU) Koloni Görüntüleri	79
Şekil 3.13. UK-MKH'lerin Koloni-Oluşturma Yatkınlık Deneyi (Klonojenisite; CFU). 25000, 50000 ve 100000 hücre/cm ² Yoğunluklarında Ekilmiş Hücrelerin Kristal Viyole İle Boyanmış Işık Mikroskobu Görüntüleri	79
Şekil 3.14. UK-MKH'lerin Büyüme Eğrisi Grafiği	80
Şekil 3.15. UK-MKH'lerin Çoğalma Eğrisi Grafiği	80
Şekil 3.16. UK-MKH'lerin <i>in vitro</i> Migrasyon Işık Mikroskobu Görüntüsü	81
Şekil 3.17. UK-MKH'lerin <i>in vitro</i> Migrasyon Grafiği	82
Şekil 3.18. Plazenta Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerden Elde Edilen Sferoidlerin Çap ve Dairesellik Grafiği (A) Sferoidlerin Küre Çapının Değerlendirilmesi (B) Sferoidlerin Daireselliğinin Değerlendirilmesi.	83
Şekil 3.19. Plazentadan İzole Edilen MKH'lerden Hazırlanan Sferoidler	83
Şekil 3.20. 2B ve 3B UK-MKH'lerin Koloni-Oluşturma Yatkınlık Deneyi (Klonojenisite; CFU). 10000 Ve 25000 hücre/cm ² Yoğunluğunda Ekilmiş Hücrelerin Kristal Viyole Boyanmış Işık Mikroskobu Görüntüleri	84
Şekil 3.21. Standart Tam Kültür Ortamındaki 35 Günlük Kültür Süresi Boyunca Sferoidlerin Çapları ve Küresellikleri	85
Şekil 3.22. Standart Tam Kültür Ortamındaki 35 Günlük Kültür Süresi Boyunca Sferoidlerin Çap Ölçüm Grafiği	86
Şekil 3.23. Standart Tam Kültür Ortamındaki 35 Günlük Kültür Süresi Boyunca Sferoidlerin Dairesellik Grafiği	86
Şekil 3.24. Kondrojenik Tam Kültür Ortamındaki 35 Günlük Kültür Süresi Boyunca Sferoidlerin Çapları ve Küresellikleri	87
Şekil 3.25. Kondrojenik Tam Kültür Ortamındaki 35 Günlük Kültür Süresi Boyunca Sferoidlerin Çap Ölçüm Grafiği	88
Şekil 3.26. Kondrojenik Tam Kültür Ortamındaki 35 Günlük Kültür Süresi Boyunca Sferoidlerin Dairesellik Grafiği	88

Şekil 3.27. Standart ve Kondrojenik Tam Kültür Ortamında κ -Karragenan'ın Farklı Konsantrasyonları Kullanılarak Elde Edilen Sferoidlerin 35 Günlük Kültür Boyunca Daireselliklerini Gösteren Heat-Map Grafikleri.	89
Şekil 3.28. Standart Tam Kültür Ortamında Sferoid Çiftlerinin Füzyonu	91
Şekil 3.29. Kondrojenik Tam Kültür Ortamında Sferoid Çiftlerinin Füzyonu	92
Şekil 3.30. Standart ve Kondrojenik Tam Kültür Ortamında Sferoid Çiftlerinin Füzyon Ölçüm Grafikleri (A) Sferoidlerin Toplam Uzunluk, (B) İkili Genişlik, (C) Temas Uzunluğu, (D) Sferoidler Arası Açısı ve (E) Sferoidlerin Toplam Çevresi	93
Şekil 3.31. Standart ve Kondrojenik Tam Kültür Ortamında κ -Karagenan'ın Farklı Konsantrasyonlarından Elde Edilen Sferoid Çiftlerinin Füzyonlarının Heat-Map Grafikleri (A) Sferoidlerin Toplam Uzunluk, (B) İkili Genişlik, (C) Temas Uzunluğu, (D) Sferoidler Arası Açısı ve (E) Sferoidlerin Toplam Çevresi	95
Şekil 3.32. Standart Tam Kültür Ortamında Çoklu Sferoidlerin Füzyonu	97
Şekil 3.33. Kondrojenik Tam Kültür Ortamında Çoklu Sferoidlerin Füzyonu	98
Şekil 3.34. Standart ve Kondrojenik Tam Kültür Ortamında Çoklu Sferoidlerin Füzyon Ölçüm Grafikleri Sferoidlerin (A) Toplam Uzunluk, (B) Toplam Genişlik, (C) Çevresi	99
Şekil 3.35. Standart ve Kondrojenik Tam Kültür Ortamında κ -Karagenan'ın Farklı Konsantrasyonlarından Elde Edilen Çoklu Sferoidlerin Füzyonlarının Heat-Map Grafikleri Sferoidlerin (A) Toplam Uzunluk, (B) Toplam Genişlik, (C) Çevresi	100
Şekil 3.36. 0. Gün Kondrojenik Tam Kültür Ortamında Hazırlanan Sferoidlerin Alsiyen Mavisi ve Pikrosirius Kırmızısı (A-B & Psr) Boyamaları.	101
Şekil 3.37. 7. Gün Kondrojenik Tam Kültür Ortamında Hazırlanan Sferoidlerin Alsiyen Mavisi ve Pikrosirius Kırmızısı (A-B & Psr) Boyamaları.	102
Şekil 3.38. 14. Gün Kondrojenik Tam Kültür Ortamında Hazırlanan Sferoidlerin Alsiyen Mavisi ve Pikrosirius Kırmızısı (A-B & Psr) Boyamaları.	102
Şekil 3.39. 21. Gün Kondrojenik Tam Kültür Ortamında Hazırlanan Sferoidlerin Alsiyen Mavisi ve Pikrosirius Kırmızısı (A-B & Psr) Boyamaları.	103

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1 Kıkırdak Doku Çeşitrlerinin Özellikleri	7
Çizelge 1.2 2B ve 3B Hücre Kültür Yöntemlerinin Kıyaslaması	35
Çizelge 2.1 Akım Sitometrisi Analizi için Seçilen Mezenkimal Kök Hücre Yüzey Belirteçleri	51
Çizelge 2.2 Deney Grupları	62
Çizelge 3.1 Plasentanın Farklı Anatomik Bölgelerinden İzole Edilen MKH'lerden Hazırlanan Sferoidlerin Ortalama Çap Ölçümü	83

1. GİRİŞ

Doku mühendisliği çalışmaları hasarlanmış dokuyu iyileştirebilmek veya kaybedilen doku yerine doğal dokuya benzer bir doku koymayı hedeflese de doğal dokuyu taklit edebilmede yetersiz kalmaktadır. Doku mühendisliği ürünlerinin doğal doku özellikleri gösterebilmesi için uygun mikro çevre tasarlanmalıdır. Bu mikro çevrenin tasarımında hücrelerden, çözünür faktörlerden ve biyomateryallerden yararlanılmaktadır. Birçok farklı disiplinin ortak çalışması ile kıkırdak yenilenmesi ve onarımı için kıkırdak doku mühendisliği ürünleri geliştirilmiştir. Kıkırdak doku, kondrositlerden, zengin bir hücre dışı matriks (ECM) ve kollajen liflerinden oluşur. Kıkırdak dokusunun kan besleme sisteminin ve innervasyonun olmaması, kondrositlerin düşük metabolik aktivitesi ve yüksek ECM yoğunluğu nedeniyle kendi kendini iyileştirebilme yeteneği sınırlıdır. Bu nedenle kıkırdak doku mühendisliği ile tasarlanacak kıkırdak dokuya ihtiyaç duyulmaktadır. Klinikte hasarlı kıkırdak doku onarımı ve yenilenmesi için birçok farklı tedavi yöntemi kullanılmaktadır. Klinikte sıklıkla kullanılacak kıkırdak doku mühendisliği ürünlerinin geliştirilebilmesi için hücre tipi, kültür yöntemi ve mikro çevrenin optimizasyonu gerekmektedir.

Son yıllarda kıkırdak doku mühendisliğinde hücre kaynağı olarak ulaşılabilirliği, çoğaltılabilmesi ve depolanması gibi sebeplerle mezenkimal kök hücreler umut vaat etmektedir. Özellikle perinatal kaynaklı mezenkimal kök hücreler yüksek hücre verimi ve ekstra cerrahi işleme ihtiyaç duyulmaması sebebiyle önemli kök hücre kaynağı olarak kabul edilmektedir. İnsan umbilikal kord mezenkimal kök hücreleri diğer yetişkin kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücreler ile kıyaslandığında düşük immünojenitesi, kısa amplifikasyon süresi, non-invaziv izolasyon yöntemleri ve etik erişim gibi üstünlükleri nedeniyle öne çıkmaktadır (Baksh ve ark., 2007; Li ve ark. 2015; Troyer ve ark., 2008).

Tasarlanan kıkırdak doku mühendisliği ürünlerinde sıklıkla iki boyutlu kültür yöntemleri kullanılsa da doğal dokunun ortamını taklit etmede yetersiz kalmıştır. Bu nedenle üç boyutlu kültür yöntemleri ile hücreler ve tasarlanan mikro çevrenin

etkileşimi doğal dokuya benzer doku elde edilebilmesini kolaylaştırmıştır. Üç boyutlu kültür yöntemleri hücrelerin üç boyutlu yapılarını korumasını sağlayarak büyümelerini, birbirleri ile temas etmelerini, sinyalleşmelerini ve farklılaşmalarını kolaylaştırdığı bilinmektedir (Cukierman ve ark., 2022; Joseph ve ark., 2018). Üç boyutlu kültür yöntemleriyle iskelesiz mikro dokular üretilebilmektedir. Doku mühendisliğinde iskelesiz üç boyutlu kültür yöntemleri ile doğal kaynaklardan elde edilen biyoaktif polisakkaritler kullanılarak doğal dokuya ait mikro ortam taklit edilmeye çalışılmaktadır. Polisakkaritler biyouyumlulukları, biyobozunur yapıları, kontrol edilebilir biyolojik aktiviteleri, düşük toksisite düzeyleri, hidrojel oluşturabilmeleri ve düşük üretim maliyetleri nedeni ile tercih edilmektedir (Ullah ve ark., 2019). Deniz kaynaklarından elde edilen polisakkaritler fizikokimyasal özellikleri sebebiyle tıp alanında özellikle tercih edilmektedir (Ghanbarzadeh ve ark., 2018). Son yıllarda Rhodophyta kırmızı deniz yosunu türlerinden elde edilen sülfatlanmış lineer polisakkarit olan κ -karragenan immünomodülatör, antitümör, antiviral, antioksidan, antikoagülan özellikleri nedeniyle biyomedikal uygulamalarda öne çıkmıştır (Kuznetsova ve ark., 2020; Jafari ve ark., 2022).

Kıkırdak doku mühendisliği alanında çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen bu kapsamda üç-boyutlu hücre kültürü yöntemi ile umbilikal kord mezenkimal kök hücre kullanımına dayalı sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Umbilikal kord mezenkimal kök hücrelerinin 3B kültür ortamında hücre-ECM yoğunluk oranına bağlı olarak *in vitro* şartlarda kondrojenik farklılaşma potansiyeli incelendi. Plasentanın 5 farklı anatomik bölgesinden mezenkimal kök hücre izolasyonu yapılarak immünofenotipik karakterizasyonları yapıldı. UK-MKH'lerinin üçlü soya farklılaştırma, CFU oluşumu, büyüme eğrisi, çoğalma eğrisi ve *in vitro* migrasyon analizleri yapıldı. 5 farklı anatomik bölgeden izole edilen MKH'lerin sferoid oluşturabilme potansiyelleri incelendi. UK-MKH'lerinin 3B kültür sonrası CFU oluşturabilme kapasitesi değerlendirildi.

3B kültür yöntemiyle iki farklı kültür ortamında UK-MKH'lerinin sayısı sabit tutularak κ -karragenan farklı konsantrasyonlarında sferoidler hazırlandı. Elde edilen hücre-ECM yoğunluk farkı ile hazırlanan sferoidlerin çap ölçümleri, dairesellikleri,

rastgele birleşebilme yetenekleri ve histokimyasal boyamalar ile kondrojenik farklılaşma potansiyelleri değerlendirildi.

1.1. Doku Mühendisliği Yaklaşımları

Doku mühendisliği ilk olarak Langer ve Vacanti tarafından 1990'lı yılların başında tanımlanmıştır. Langer ve Vacanti “mühendislik ve yaşam bilimleri ilkelerinin multidisipliner yaklaşımla uygulanarak doku fonksiyonunu eski haline getirebilen, sağlıklı halin korunmasını sağlayan veya ilgili dokuyu iyileştirebilen biyolojik ürünlerin geliştirilmesine yönelik alan” olarak tanımlamışlardır (Langer ve Vacanti, 1993). Doku mühendisliği, işlevsiz dokuları restore etmek ve yaşam beklentisini arttırmak amacıyla bir organ/doku kaybı veya yetmezliği yaşayan hastaları tedavi edebilmek için biyoloji, mühendislik ve tıp ilkelerini kullanarak yeni stratejiler geliştiren multidisipliner bir yenileyici tıp alanıdır (Zhao ve ark., 2022).

Doku mühendisliği alanı, doku onarımı ve organ naklinde uygulanan mevcut geleneksel tedavilerin sınırlamalarını ve başarısızlıklarını giderebilmek için ortaya çıkmıştır. Doku mühendisliği çalışmalarının temel amacı *in vitro* ortamda fonksiyonel dokuların üretilmesi ve daha sonra bu dokuların hastaya nakledilmesi veya dokuların yerinde onarılması ve ilgili dokunun yenilenmesi için vücudun doğal yenilenme süreçlerinin uyarılmasıyla bu sınırlamaların ve başarısızlıkların üstesinden gelinmesidir. Bunun için, iskeleler, farklı kaynaklardan elde edilen hücreler, büyüme faktörleri, nano tıp, gen terapisi ve birçok başka tekniğin de yer aldığı multidisipliner yaklaşımlar kullanılmaktadır (Olson ve ark., 2011; Salgado ve ark., 2013; Jafari ve ark., 2022).

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta hazırlanacak ürünün işlevini tam anlamıyla gerçekleştirmesi için uygun hücre mikro çevresi önemlidir. Hücre mikro

evresi; hücrelerden, çözünür faktörlerden ve hücre dışı matriks (ECM) veya doku mühendisliğinde kullanılan hücre mikro çevresine benzer biyomateriyallerden oluşmaktadır. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta hücrelere mekanik destek sağlayan ve doku onarımını teşvik eden iskeleler oluşturmak için hem sentetik polimerler hem de doğal olarak türetilmiş biyomakromolekller kullanılmaktadır (Chiang ve ark., 2021).

Doku mühendisliği yaklaşımlarından birisi olan hücre tedavilerinin (kök hücre/kişiye özel hücre), yaralı/hastalıklı organ ve dokuların rejenerasyonu ve onarımı için terapötik stratejilerde önemli bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Günümüzde hücre tedavilerinden en çok tercih edileni ise mezenkimal kök hücre (MKH) tedavileridir. Doğrudan hücre enjeksiyonlarının, implantasyon sonrasında zayıf hücre sağkalımı ve yetersiz lokalizasyonu ile karakterize edildiği ve MKH'lerin sekretomunun yararlı etkilerini savunan son veriler göz önüne alındığında, hücre dışı matriks (ECM) sentezini ve birikimini artıran yöntemler ile ilgili çalışmalar daha çok ilgi görmektedir (De Pieri ve ark., 2020).

Doku mühendisliğinde elde edilecek ürünün doğal yapıya en yakın özellikte olması ve en yüksek faydayı sağlaması beklenmektedir. Bugüne kadar bu alanda birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen daha iyi doku mühendisliği ürünlerinin geliştirilmesine duyulan ihtiyaç hala devam etmektedir. Kıkırdak dokunun tamiri, yenilenmesi ve tedavi edilmesi için hücre yapısı ve mikro çevresinden dolayı bu konu da çok fazla ilerleme kaydedilememiştir. Bu tez çalışmasında kıkırdak doku mühendisliği için yeni bir yaklaşım geliştirerek, klinikte tedavi amaçlı uygulamaya yönelik hücre tipinin ve 3B kültür yönteminde kullanılacak biyoaktif molekülün belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.2. Kıkırdak Doku Mühendisliği Yaklaşımları

Kıkırdak dokusunun kendi kendini iyileştirme kapasitesi sınırlıdır. Bu sınırlılığın sebebi kan besleme sisteminin olmaması, innervasyonun olmaması, kondrositlerin düşük metabolik aktiviteye ve yüksek ECM yoğunluğuna sahip olmasıdır. Eklemlerde meydana gelen kıkırdak yaralanmaları genellikle kıkırdak kusurlarına yol açar. Kıkırdak dokusunda gerçekleşen hasar ileri yaşlarda ve hasarın üzerinden uzun zaman geçmesiyle bile geri dönüşü olmayan kusurlara yol açabilir. Bu nedenle, eklem kıkırdaklarında meydana gelen yaralanmaların nasıl hızlı ve etkili bir şekilde onarılacağı, kıkırdak rejenerasyonunun nasıl destekleneceği ve eklem fonksiyonunun nasıl restore edileceği tıp alanındaki önemli sorunlardan biridir (Yang ve ark., 2022).

Biyoloji ve mühendislik alanlarının çok-disiplinli olarak mevcut teknolojilerini kullanmaları sonucunda kıkırdak yenilenmesi ve onarımı için doku mühendisliği ürünleri geliştirilebilir hale gelmiştir. Kıkırdak doku mühendisliği alanındaki dikkat çeken ilk çalışmalardan olan Cao ve arkadaşları tarafından 1997 yılında gerçekleştirilmiş olup ineklerden alınan kondrositleri biyolojik olarak parçalanabilen kulak şeklinde tasarladıkları polimer iskeleye tohumlayarak fare derisinin altına yerleştirmişler ve yeni kıkırdak oluşumunu gözlemlemişlerdir (Cao ve ark., 1997). Son 30 yılda kusurlu kıkırdak onarımı ve yenilenmesi üzerine klinikte kullanım için çok sayıda tedavi yöntemi ve biyolojik olarak uyumlu kıkırdak doku mühendisliği ürünleri geliştirilerek uygulanmaya çalışılmıştır. Hala tam başarı sağlanamamıştır. Kıkırdak doku mühendisliği ürünlerinin üretimi için uygun hücre tipi seçimi, biyouyumlu iskeleler ve uygun mikro çevre seçilerek yeni kıkırdak doku mühendisliği ürünleri üretilir (Guo ve ark., 2023).

Kıkırdak doku mühendisliği için kondrositler, fibroblastlar, kök hücreler ve genetiği değiştirilmiş hücreler kullanılmış fakat en uygun hücre kaynağı hala belirlenememiştir. Son yıllarda kıkırdak onarımı için doku mühendisliği teknolojisi ile birlikte kullanılan mezenkimal kök hücre kaynakları umut verici bir yaklaşım

olarak kabul edilmektedir. Bazı çalışmalarda MKH tedavisinin sonuçları incelenmiş ve MKH'lerin, minimum donör alan morbiditesi ve minimal invazif enjeksiyonlar yoluyla uygulama kolaylığı gibi ek avantajlarla birlikte güvenli ve etkili olduğu gösterilmiştir (Nejadnik ve ark., 2010; Wong ve ark., 2013). Kıkırdak onarımında MKH'lerin kanıtlanmış bazı terapötik etkilerine rağmen, hücre temelli MKH tedavileri, hücrenin kaynağı, ulaşılabilirliği, çoğaltılması, depolanması ve hastalara uygulanacak tedavi sırasında optimal hücre potansiyelini ve canlılığını korumada zorluklar yaşanmaktadır. Bu nedenle mevcut hücre kaynaklarının ve kullanılan yöntemlerin bu süreçleri olumlu yönde değiştirecek şekilde düzenlenmesi gerekmektedir.

Doku mühendisliği ile üretilen kıkırdak dokusunun yük taşıma kapasitesinin sınırlı olması klinikte kullanımını zorlaştırmaktadır. Hücre-ECM yoğunluğu, üretilen kıkırdak dokusunun mekanik özelliklerini belirlemektedir (Khoshgoftar ve ark., 2013). ECM'nin mevcut fiziksel özellikleri hücrenin tüm davranışını etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle doku mühendisliği bakımından hücre-ECM yoğunluğunun düzenlenmesi dokunun fonksiyonlarını sürdürebilmesi için hayati öneme sahiptir.

Doku mühendisliğinde biyomalzeme olarak insan vücudundaki ana yapısal proteinler ve bunların türevleri kullanılmaktadır. Kollajenler ve kollejenler ile bir araya gelen glikoproteinler biyomalzeme olarak sıklıkla tercih edilmektedir. (Benny ve ark., 2016). Doku benzeri yapının oluşturulmasında kullanılan biyomalzemeler oldukça önemlidir. Dokunun doğal yapısında bulunan glikoproteinlerin biyomalzeme olarak tercih edilmesi başarı oranını artırmaktadır. Ekstrasellüler matriks olarak kullanılan aktif biyomalzemeler, hücresel işlevlerin gerçekleştirilebilmesi için gerekli fiziksel ortamı sağlar ve dokunun ihtiyacı olan moleküllerin hücrelere veya hasarlı dokuya iletilmesine olanak sağlar (Jafari ve ark., 2022).

1.3. Kıkırdak Doku

Kıkırdak; kemikler, göğüs kafesi, intervertebral diskler, kulak ve burun arasındaki eklemlerde bulunabilen sağlam ve viskoelastik bir bağ dokusudur. Sıkıştırma kuvvetlerine karşı dirençlidir, ancak yine de esneyebilir. Kıkırdak bol miktarda ECM içerisine gömülü halde bulunan kondrosit hücrelerinden oluşmaktadır. ECM, kondrositler tarafından üretilir (Brittberg, 2010; Gahunia ve Pritzker, 2020). Kıkırdak doku avasküler, anöral, non-lenfatik ve hidratlı bir iskelet dokusudur (Boyan ve ark., 2018; Eschweiler ve ark., 2021; Gahunia ve Pritzker, 2020; Kelly ve ark., 2019). Kıkırdak doku genellikle perikondrium adı verilen fibröz bir bağ dokusu tabakası ile kaplanmıştır (Gillis, 2019).

Kıkırdak doku, moleküler bileşenlerine bağlı olarak 3 sınıfa ayrılır. Bunlar; hiyalin, elastik ve fibröz kıkırdaktır. Hiyalin kıkırdak, kıkırdağın baskın şeklidir ve genellikle iskelet sistemi ile ilişkilidir. Çizelge 1.1 de kıkırdak doku çeşitlerinin özellikleri karşılaştırılmıştır.

Çizelge 1.1. Kıkırdak doku çeşitlerinin özellikleri

Kıkırdak Çeşitleri Özellikler	Hiyalin kıkırdak	Elastik Kıkırdak	Fibröz kıkırdak
Damar	İçermez	İçermez	İçermez
Perikondrium (Dış fibröz tabaka, iç kondrojenik tabaka, kan damarları)	Çevrili	Çevrili	Yoktur
Kondrositlerin çevresinde	Tip II kollajen	Tip II kollajen	Tip I kollajen
Bulunduğu yer	Burun, larinks, trakea, bronş	Dış kulak, epiglot, işitme kanallarında	İntervertebral diskler, dizin artikülerdiskleri, mandibula, sternoklavikular eklemler, simfisis pubis
Görünüm	Şeffaf	Şeffaf	Opak

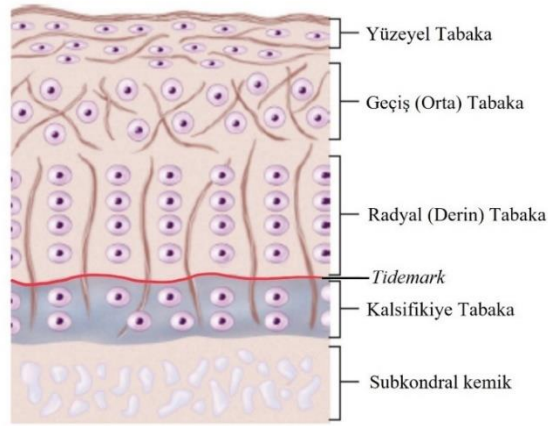
1.3.1. Eklem Kıkırdağının Yapısı

Eklem kıkırdağı, üç boyutlu bir kollajen ağı tarafından sınırlanan negatif yüklü hidrofilik proteoglikanlardan oluşan zengin bir hücre dışı matrise gömülmüş nispeten düşük kondrosit yüzdesine (%2-5) sahiptir. Negatif yüklü proteoglikanlar, pozitif yüklü kollajen fibrilleri içindeki su moleküllerini bağlayabilen ve böylece jel içinde yüksek bir ozmotik basınç oluşturan büyük agregatlar oluşturma yeteneğine sahiptir. Eklem kıkırdağının benzersiz biyolojik ve biyomekanik özellikleri, kollajen liflerinin mimarisine, büyük moleküler ağırlığa sahip çözünen proteoglikanların bileşimine ve ECM ile kıkırdak fonksiyonunu ve homeostazı koruyan kondrositler arasındaki etkileşimlere bağlıdır (Gahunia ve Pritzker, 2020).

Eklem kıkırdağı yaralanmaları akut veya kronik yaralanmalar sonucunda gelişebilir. Travmaya bağlı eklem kıkırdağı yaralanmalarının görülme sıklığı her geçen gün artmaktadır. Buna ek olarak doku da iltihaplanma, aşınma kaynaklı hasar oluşumu ve dejeneratif değişiklikler gibi çeşitli nedenlerle de kıkırdak dokuda hasar gelişmektedir. Eklem kıkırdağı hasarları genellikle yoğun ağrı ve şişme ile karakterizedir. Eklem kıkırdağındaki hasarın boyutu maruz kaldığı travmanın şiddetine ve derinliğine bağlı olarak uzun sürede ya da kısa sürede ortaya çıkmaktadır.

1.3.2. Eklem Kıkırdağının Tabakaları

Kıkırdak yüzeyinden subkondral kemiğe morfolojik olarak 4 farklı kıkırdak tabakası gözlemlenir. Bu tabakalar onları oluşturan makromoleküller sebebiyle karmaşık ve heterojen bir yapıya sahiptir. Şekil 1.1 de gösterildiği gibi yüzeyel tabaka, geçiş (orta) tabakası, radyal (derin) tabaka ve kalsifiye tabakadan oluşur. Radyal ve kalsifiye tabaka arasında "tidemark" olarak adlandırılan bir geçiş zonu bulunmaktadır (Brittberg, 2010).



Şekil 1.1. Eklem kıkırdağı tabakaları (Brittberg, 2010 makalesinden modifiye edilerek Türkçe'ye çevrilmiştir.)

- **Yüzeyel Tabaka:** "Lamina splendens" adı verilen hücresiz ince bir fibril tabakasıdır ve kondrositleri tamamen çevreler. Bu ince tabaka eklem boşluğu ile bitişiktir ve altındaki kondrositler kıkırdak yüzeyine paralel şekilde düz veya elipsoidal formdadır. Eklem kıkırdağının yaklaşık %10-20'sini oluşturmaktadır. Kollajen fibrilleri eklem yüzeyine paralel şekilde ve yoğundur. Bu tabaka alt tabakaların korunması ve sürdürülebilmesi için çok sayıda kondrosit ve sıkıca paketlenmiş kollajen fibrilleri içerir. Eklem sıvısı ile temas halindedir. Kıkırdağın maruz kaldığı gerilme ve sıkıştırma gibi kuvvetlere direnmesini sağlayan gerilme özelliğine sahiptir (Brittberg, 2010; Gahunia ve Pritzker, 2020).

- **Geçiş (Orta) Tabaka:** Uzun eksenli kıkırdak yüzeyine dik olacak şekilde yuvarlak veya dikdörtgen olan daha büyük kondrositler kollojen lifleri arasında rastgele bir dağılım gösterirler. Eklem kıkırdağının %40-60'ını oluşturur. Yüzeyel tabakayla teması olan bölge ince kollajen fibrilleri ile kıkırdak yüzeyine paralelken; radyal tabaka yüzeyine değen kısmı ise kalın kollajen fibrilleri ile genellikle dik sütunlar şeklinde yerleşmiştir (Brittberg, 2010; Gahunia ve Pritzker, 2020).

- **Radyal (Derin) Tabaka:** Kondrositler geçiş tabakasında bulunanlara kıyasla daha büyüktür ve yuvarlaktır. Eklem kıkırdağının %20-30'unu oluşturur. Kollajen liflerinin radyal şekilde düzenlenmesi sebebiyle sütunlar şeklinde düzenlenirler.

Kollajen demetlerinin en kalın olduğu bölgedir. Kalsifikasyonda yer alan alkalen fosfatazın bu tabakadaki kondrositler tarafından sentezlendiği düşünölmektedir. Yüksek proteoglikan içeriği nedeniyle sıkıştırma kuvvetlerine karşı en büyük direnci sağlamaktan sorumludur (Brittberg, 2010; Gahunia ve Pritzker, 2020; Sophia Fox ve ark. 2009).

- **Tidemark:** Kalsifiye tabaka ile radyal tabaka arasında 2-5 µm kalınlığında yoğun bazofilik kalsifiye bir çizgi şeklinde görölür. Dinamik bir yapıya sahiptir. Radyal tabakadaki kollajen fibrilleri bu geçiş bölgesine kadar uzanmaktadır. Olgunlaşmamış kıkırdakta görölmez. Dalgalı görünüme sahip olmasının sebebi maruz kaldığı mekanik kuvvettir (Brittberg, 2010; Gahunia ve Pritzker, 2020;).

- **Kalsifiye Tabaka:** Tidemark ve subkondral kemik arasında yer alan bu tabaka 100-250 µm kalınlığında kıkırdağın kemiğe sıkıca tutunmasını sağlayan tabakadır. Bu tabakanın kalınlığı kıkırdağın maruz kaldığı yüke bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Kondrositler yuvarlak, en küçük boyutlu, az sayıda ve hipertroftiktir. Kondrositler yoğun şekilde kireçlenmiş matrikse gömölü halde bulunurlar. Bu tabakadaki kondrositler alkalen fosfataz sentezi yaparlar. Bu tabakada kalsiyum depolanır. Kıkırdağın sinoviyal sıvı aracılığıyla beslenmesini ve kemik doku ile alış-verişi sağlar (Brittberg, 2010; Eschweiler ve ark., 2021; Gahunia ve Pritzker, 2020).

1.3.3. Kıkırdak Doku Hücreleri (Kondrositler):

Kondrositler, eklem kıkırdağında bulunan tek hücre tipidir. Kondroblastlar, salgıladıkları hücre dışı matriks içinde oluşturdıkları lakünler (boşluklar) içinde tekli ya da grup halinde kondrositlere dönüşürler. Kondrositler mezodermden kaynaklanır ve eklem kıkırdağının zonal bölgelerine bağlı olarak şekil, sayı ve boyut olarak değişiklik gösterir (Eschweiler ve ark., 2021). Üst katmanda hücreler düz ve yatay konumda, daha derin katmanlarda ise genellikle yuvarlak ve dikey konumda

hızalanmışlardır (Brittberg, 2010; Sophia Fox ve ark. 2009). Kondrositler ECM'nin üretilmesi ve sürekliliğinin sağlanmasından sorumludurlar (Kelly ve ark., 2019). Kondrositler anaerobik bir ortamda bulunmaları sebebiyle düşük metabolik aktiviteye sahiptirler. Kondrositler; eklem kıkırdağının mikro anatomik, mikro mekanik ve metabolik olarak aktif fonksiyonel birimleridir. Yaralanma, yaşlanma veya hastalık sebebiyle normal eklem kıkırdağının homeostazının bozulması kondrositlerin yapısını etkiler. Olgun kıkırdağın yapısı incelendiğinde kondrositlerin perisellüler ortamı (matriks ve kapsül) dokunun homeostazının korunmasında kritik role sahiptir (Gahunia ve Pritzker, 2020). Kondrositler sınırlı replikasyon potansiyeline sahiptir ve bu durum herhangi bir hasar durumunda iyileşme kapasitesini sınırlandırmaktadır. Kondrositlerin hayatta kalabilmek için optimal bir kimyasal ve mekanik ortama ihtiyacı vardır (Sophia Fox ve ark. 2009).

Kıkırdak doku hücresi olan kondroblastlar embriyogenez sırasında mezenkimal kök hücrelerden kökenlenir. Kondrogenез, mezenkimal hücre alımı ve göçü, progenitörlerin yoğunlaşması ve kondrosit farklılaşması ve olgunlaşmasını içeren ve endokondral ossifikasyon sırasında kıkırdak ve kemik oluşumuyla sonuçlanan iskelet gelişiminin en erken aşamasıdır (Goldring ve ark., 2006). MKH'ler bir araya gelerek önce kondrogenез merkezleri oluşturarak kondroblastlara farklılaşırlar. Bu merkezler ECM ile çevrili kondroblastlardan oluşur. Kondroblastların çoğalmaları/büyümleri mitozla gerçekleşerek kardeş hücrelerle izogen grupları oluşmaktadır. Bu olay aynı boşluk/lakün içinde gerçekleşmektedir. Bir süre sonra kondroblast hücreleri kondrosit hücrelerine dönüşür. Kıkırdak dokusu içinde damar oluşumu olmadığı için besin alışverişi ECM de difüzyonla gerçekleşmektedir. Kondrositler çok aktif olarak bölünmemelerine rağmen besinsel gereksinimlere sahiptirler. İhtiyaç duydukları proteoglikan gibi molekülleri ECM de sentezlerler.

1.3.4. Kıkırdak Doku Ekstrasellüler Matriks Yapısı

Hücre dışı matriksin (ECM), gelişim sürecinde ve hastalıkların ortaya çıkmasında hücre ve doku davranışını önemli düzeyde etkilediği bilinmektedir (Rape ve ark., 2015). ECM, tüm dokularda hücreler tarafından sentezlenen ve hücre yapışması, çoğalması, göçü ve farklılaşması dâhil olmak üzere önemli biyokimyasal ve biyofiziksel süreçleri yönlendiren dinamik bir mikro çevresel bileşendir. ECM; fibröz proteinler, glikoproteinler, proteoglikanlar, büyüme faktörleri ve sitokinlerden oluşan karmaşık bir mikro-ortamdır (Yoo ve ark., 2022). ECM'nin sentezi ve yeniden modellenmesi (degradasyon/sentez döngüsü) morfogenez, yara iyileşmesi ve doku bakımında çok önemlidir. Böylece, biyokimyasal sinyalleşme ile birleştirilen ECM, mekanik ve mimari/topografik işaretler gibi biyofiziksel özellikler ve hücre davranışına ilişkin değerli bilgiler sağlar (Lobo ve ark., 2016).

Kıkırdak doku ECM'si, küçük moleküler ağırlığa sahip iyonlara ve temel olarak kollajen tip II ve proteoglikanlardan oluşan makromoleküler bileşime sahip doku sıvısından oluşan esnek bir jel olarak tanımlanabilir (Gahunia ve Pritzker, 2020; Gillis, 2019). Su eklem kıkırdağının en çok bulunan bileşenidir. Suyun en büyük kısmı matrisin gözenekli yapısında, bir kısmı kollajen fibrilleri içindeki intrafibriler boşluklarda ve en az kısmı da hücre içi boşluklarda yer alır. Kıkırdak dokunun tabakaları derinleştikçe su miktarı azalır. Doku içindeki suda sodyum, kalsiyum, klor ve potasyum gibi inorganik iyonlar çözünür. Su kıkırdak ve eklem yüzeyindeki hareketi kolaylaştırırken içinde çözünen inorganik iyonların kondrositlere taşınmasını ve dağıtılmasını sağlar. Kıkırdağın maruz kaldığı basıncı tolere edebilmesine yardımcı olur (Sophia Fox ve ark. 2009).

Kollajen lifleri, kıkırdağın yapısından sorumludur ve ECM'deki kollajenin %90 - 95'i kollajen tip II'den oluşur. Ayrıca, kollajen tipleri I, IV, V, VI, IX ve XI, proteoglikan agregatları ile iç içe geçmiş fibriller ve liflerin çerçevesinin oluşturulmasında yer alırlar. Kollajen tip IX lifleri aracılığıyla yüksek oranda çapraz bağlanırlar. Kollajen, kıkırdağa gücünü ve gerilme sertliğini verir (Brittberg, 2010;

Eschweiler ve ark., 2021; Umlauf ve ark. 2010). ECM de kollajene ek olarak bulunan proteinler; fibronektin, laminin, tenasin, kondronektin, kıkırdak oligometrik matris proteini (COMP) ve kıkırdak matris glikoproteinidir (CMGP) (Gahunia ve Pritzker, 2020).

Proteoglikanlar, kıkırdağın ıslak ağırlığının %5 ila %10'unu oluşturan büyük protein-polisakarit molekülleridir. Hidrofilik yapıya sahiptirler. Keratan sülfat ve kondroitin sülfat zincirleri çekirdek proteinine kovalent bağ ile bağlanır. Hyalüronik asit zincirine bir bağlantı proteini aracılığıyla çekirdek proteinine bağlanan proteoglikanlar büyük agregatlar oluştururlar. Proteoglikan kümelerinin tüm bileşenleri kondrositler tarafından sentezlenir. Proteoglikanlar konsantrasyonları kıkırdak tabakalarında farklı yoğunluktadır. Orta tabakada en yüksek, yüzeysel tabakada en düşük konsantrasyon sahiptir (Brittberg, 2010; Eschweiler ve ark., 2021). Proteoglikanlar, kıkırdağa elastikiyetini ve direncini verir (Brittberg, 2010). Proteoglikanlar ve kollajen birbirleri ile çapraz bağlanarak kollajen fibrilleri arasındaki mesafeyi kısaltırlar (Eschweiler ve ark., 2021). Kıkırdak dokuda yaygın olarak büyük kümeler oluşturabilen agrekan, sindekanlar ve versikan gibi proteoglikanlar ve küme oluşturmeyan biglikan, decorin, fibromodulin, lumican ve perlecan bulunur (Gahunia ve Pritzker, 2020; Umlaof ve ark. 2010).

1.3.5. Eklem Kıkırdağı Tedavisinde Kullanılan Cerrahi Prosedürler

Günümüzde kıkırdak kusurlarını onarmak için konservatif ve cerrahi tedaviler, eklem içi enjeksiyon, eklem replasmanı, mikrokırık, kemik iliği stimülasyonu onarımı ve kıkırdak nakil yöntemleri kullanılmaktadır. Klinikte kıkırdak hasarı onarımında çeşitli yöntemler terapötik bir rol oynasa da, bunların sınırlamaları da vardır. Yaralanan kıkırdak hangi tedavi uygulanırsa uygulansın orijinal halini geri kazanması zordur (Yang ve ark., 2022).

1.3.5.1. Drilleme (Delme) ve Mikrokırık Yöntemi: Drilleme ve mikrokırık yöntemleri aynı mantığa sahip iki yöntemdir. Eklem kıkırdağında 1-2,5 cm²'lik delikler açılarak pürüzlü yüzey oluşturulur. Deliklere dolan kemik iliği kan pıhtıları kemik iliği mezenkimal kök hücrelerini ve büyüme faktörlerini içerir. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ve ortamda bulunan büyüme faktörlerinin etkisiyle kondrositlere farklılaşarak kusurlu kıkırdağı onarabilir. Bu yöntem günümüzde en yaygın kullanılan yöntem olsa da uzun süreli tedavi etkinliğinin az olması ve genç hastalarda daha etkili sonuçlar vermesi nedeniyle klinikte kullanımını sınırlandırmaktadır (Erggelet ve ark., 2016).

1.3.5.2. Osteokondral Transplantasyon (OCT): Nakledilen kıkırdağın kaynağına göre osteokondral otolog transplantasyon ve osteokondral allogreft transplantasyonu olarak ayrılabilir. Osteokondral otolog transplantasyon, cerrahi iyileşme süresinin kısa olması ve immün red yaşanmaması nedeniyle tercih edilebilir olsa da sağlıklı kıkırdak doku kaynağının sınırlı olması nedeniyle büyük kıkırdak hasarlarında kullanılamamaktadır. Osteokondral allogreft transplantasyonu daha az cerrahi travmaya neden olacağı için büyük kıkırdak hasarlarının onarımında tercih edilebilir. Hem taze hem de donmuş allogreftler kullanılabilir. Allogreft osteokondral transplantasyonun hastalık bulaş riski, verici kaynaklarının yetersiz olması, transplante edilecek dokunun korunması ve maliyetlerinin yüksek olması klinikte kullanımını kısıtlamaktadır (Guo ve ark., 2023).

1.3.5.3. Otolog/Allojenik Kondrosit İmplantasyonu (ACI): Eklem yüzeyinin ağırlık taşımayan bölgelerinden kondrositler toplanarak *in vitro* kültür ortamında çoğaltılır ve kıkırdağın kusurlu alanlarına implante edilir. Bu, alanın onarılmasında etkili bir yöntemdir. Yöntemin ilk uygulandığı zamandan günümüze daha çok doku mühendisliği teknikleriyle bir araya getirilerek uygulanmaktadır. İlk olarak hücre implantasyonları ile başlamış, daha sonra kollajen membranlar gibi malzemelerle birleştirilerek uygulanmaya devam edilmiştir. Bu yöntemde hücre ve malzemelerin birleştirilmesiyle hasarlı kıkırdak bölgesi örtülür ve hücre kaybı önlenmiş olur.

ACI yönteminin gelişmiş versiyonu ve günümüzde daha sık tercih edilen “Matriks Kaynaklı Otolog Kondrosit İmplantasyonu (MACI)” kıkırdak hasarının tedavisi için doku mühendisliği yöntemlerinden "hücre-iskele yapıları" temelli kıkırdak onarım tekniğidir. Hastanın sağlıklı kıkırdak dokusundan kondrositleri alınarak hücreler çoğaltılır ve iskele üzerine tohumlanır. Elde edilen doku mühendisliği ürünü ikinci bir ameliyat ile hastaya implante edilir. Bu yöntemler, travma oluşumunun az olması, pratik ve bulaş riskinin az olması nedeniyle tercih edilmektedir. Yöntemin dezavantajları; iki ameliyat gerektirmesi, uzun iyileşme süreleri gerektirmesi, yaşlı hastalarda tedavi oranının düşük olması ve yüksek maliyetli olmasıdır (Makris ve ark., 2015; Guo ve ark., 2023).

Günümüzde kullanılan bir başka otolog kondrosit implantasyon yöntemi ise kondrosferlerin kullanımıdır. Kondrosferler sağlıklı eklem kıkırdağından kondrositlerin toplanarak *in vitro* koşullarda çoğaltılması ve 3 boyutlu (3B) sferoidler şeklinde hazırlanarak eklem kıkırdağı hasarlarının onarımı için implante edilmesine dayanmaktadır. Kondrosferler, Temmuz 2017’de femoral kondil ve diz patellasının 10 cm²’ye kadar olan semptomatik eklem kıkırdağı hasarlarında kullanımı için ruhsatlandırılmıştır. Diğer yöntemler ile kıyaslamalarını içeren çalışmalar henüz devam etmektedir (Armoiry ve ark., 2019).

1.3.5.4. Otolog Matriks Kaynaklı Kondrogenез (AMIC): Tek bir ameliyat ile kıkırdağın kusurlu bölgesinin çıkarılıp temizlenmesi ve bölgede mikrokırık oluşturarak hasarlı kıkırdak bölgesinin onarılmasına dayanan hücresiz bir yöntemdir. Yöntemin etkinliğini artırmak için mikrokırık oluşturulan bölgeler büyüme faktörleri ile desteklenir. Buna ek olarak son yıllarda otolog serum veya trombosit yönünden zengin plazma ile birleştirilmiş implant matriksleri de enjekte edilmektedir. Mikrokırık ve otolog kondrosit implantasyonuna göre daha avantajlı görünse de bu yöntemde kullanılacak ürün çeşidi azdır ve klinik kullanımında uzun süreli takip sonuçlarına ihtiyaç vardır (Benthien ve ark., 2011; Guo ve ark., 2023).

1.4. İnsan Plasentası

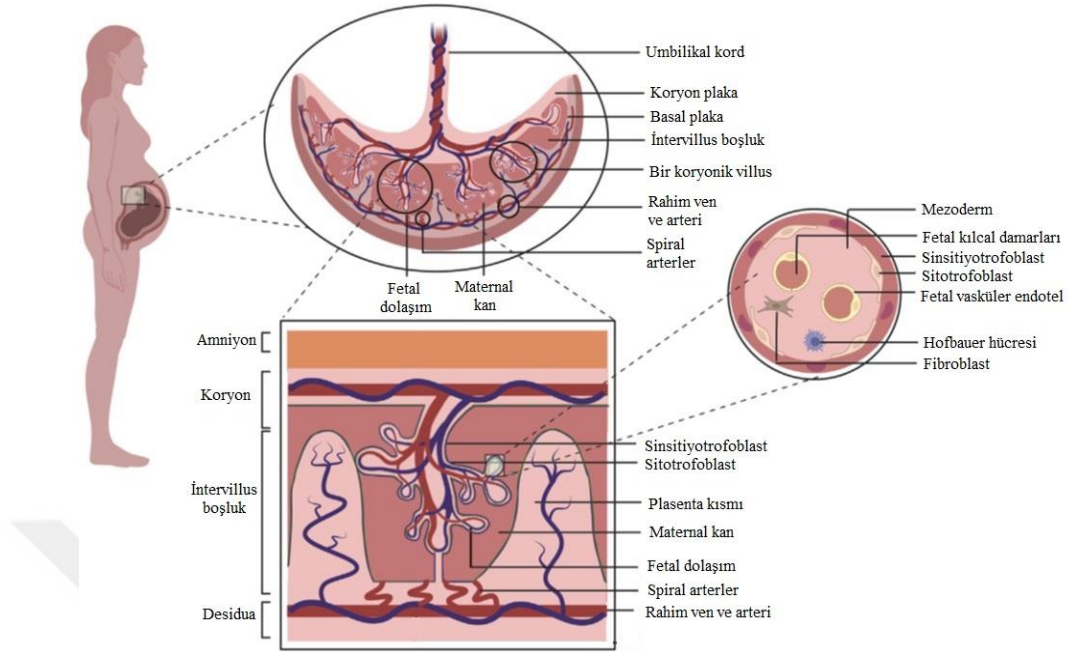
Plasenta; embriyonik ve fetal gelişim için gerekli, aynı zamanda hayatta kalmayı kolaylaştıran önemli immünolojik özelliklere sahip, geçici, dinamik ve çok yönlü bir organdır (Lobo ve ark., 2016). Plasenta gebeliğin devamı ve fetüsün gelişimi için tek fetomaternal bağlantıyı sağlamaktadır. Zigotun oluşumuyla birlikte gebeliğin ilk haftalarında hızlı ve dinamik bir şekilde gelişen ekstra embriyonik dokulardan oluşur (Kojima ve ark., 2022). Bu nedenle fetüs ile aynı genetik özelliklere sahiptir. Plasenta temel olarak blastokistin duvarını oluşturan trofektoderm ve bu yapının altında bulunan ekstra embriyonik mezoderm doku kaynaklarından meydana gelir. Trofektoderm yapısında bulunan trofoblastlardan öncelikle plasentanın epitelyal örtüsü ve koryonik yapıları gelişir. Ekstra embriyonik mezoderm yapısından ise fibroblastlar, vasküler ağ ve yerleşik makrofaj popülasyonu gelişir (Burton ve ark., 2015).

İnsan plasentası ortama 22 cm çapında, 2,5 cm kalınlığında, 500 g ağırlığında ve yaklaşık 15 m² yüzey alanına sahip diskoid bir organdır (Plitman Mayo, 2018). Şekil 1.2. de gösterildiği gibi insan plasentası amniyon, koryon ve desidua'dan oluşan hem fetal hem de maternal dokulardan oluşmaktadır. Amniyon ve koryon fetal kökenli iken, desidua maternal kökenlidir. İnsan plasentası anne ve fetüs arasında dinamik bir temas bölgesi görevi görür. Hem kendisinin hem de fetüsün hızlı büyümesini destekleyen biyosentetik gereksinimleri karşılayarak gebelikte merkezi bir metabolik rol üstlenir. Plasentanın iki yüzeyinden biri fetüse bakan ve göbek kordonunun tutunduğu koryonik plaka, diğeri ise maternal endometriuma bitişik olan bazal plakadır. Bu iki plaka arasında koryonik plakanın derin yüzeyine bağlı koryon villuslar bulunur. Her villus, bağ doku merkezinde bulunan fetal kan damarları ve *hofbauer* hücreleri olarak adlandırılan çok sayıda makrofaj içermektedir (Fisher, 2000). Birçok koryon villus gövdesinden çıkıntılar yaparak 1-3 cm çapında loblar şeklinde dallanmış 30-40 villus ağacı oluşur (Burton ve ark., 2015). Dallanmış villus ağaçları intervillöz boşlukta anne kanı içinde yüzer. Yeniden şekillenmiş maternal spiral arterlerden gelen anne kanı uterus damarlarının açıklıklarına akmadan

ve plasentadan çıkmadan önce intervillöz boşluktan akar ve villöz ağaçları arasından süzülür. Villöz ağacın hücreli bariyerinde anne ve fetus kanı arasında besinlerin, gazların ve atık ürünlerin değişimi gerçekleşir (Burton ve ark., 2015; Dusza ve ark., 2023).

Plasenta fetal gelişim boyunca insan simbiyozunun eşsiz bir örneğidir. Plasenta rahim duvarına bağlıdır ve göbek kordonu yoluyla fetus için yaşam destek sistemidir. Gebeliğin sürdürülmesi için gerekli olan maternal fizyolojik adaptasyon ve embriyonik immünolojik kabul (Kojima ve ark., 2022) ile birlikte fetal böbrek, solunum, hepatik, gastrointestinal, endokrin ve bağışıklık sistemleri olarak birçok organın üstlendiği görevleri yerine getirmektedir (Guttmacher ve ark., 2014). Maternal ve fetal dolaşımın birbirine karışmaz ve besinlerin, gazların (oksijen ve karbondioksit) ve atık metabolik ürünlerin temel değişimi plasentada gerçekleşir. Plasenta bu temel değişimleri gerçekleştirebilmek için yüzey alanı geniş ve maternal - fetal dolaşımı ayıran ince bir interhemal membrana sahiptir (Burton ve ark., 2015). Plasenta hem fetüsün varlığı ve büyümesi hem de annenin sağlığı için hayati öneme sahiptir (Strebeck ve ark., 2022). Buna ek olarak son yıllarda yapılan birçok çalışma plasenta gelişiminin bebeğin genel sağlığı üzerine de önemli katkılarının olduğunu göstermeye devam etmektedir (Guttmacher ve ark., 2014).

Anneye ait bağışıklık hücreleri gebelik süresi boyunca iki farklı alanda fetüsün antijenleri ile temas eder. Bunlardan ilki 5-6 gün sonra maternal-fetal arayüz ve utero-plasenta dolaşımı ile başlar. Diğerisi ise 9 haftalık gebelikten sonra villuslar arasında bulunan intervillöz boşluklarda maternal kanın dolaşarak yıkanmasıyla gerçekleşir. Fetüse karşı zararlı immün hasarların oluşmaması için annenin immün sisteminde düzenlemeler gerçekleşir. Bu değişim plasentanın farklı anatomik bölgelerinde bulunan farklı hücre tipleri ve değişen sayıları ile sağlanmaktadır (Bai ve ark., 2022). Plasenta çok sayıda hücre tipi ve doku yapısı içermektedir. Temel olarak trofoblast hücreleri, endotel hücreleri, bağışıklık hücreleri, fibroblastlar, kök hücreler, damar ağları, zarlar gibi birçok yapıdan oluşmaktadır (Göhner ve ark., 2014; Wu ve ark., 2018).



Şekil 1.2. İnsan plasentası ve koryon villusların şematik gösterimi (Dusza ve ark., 2023 makalesinden modifiye edilerek Türkçe'ye çevrilmiştir.)

İnsan embriyosunun gelişim sürecinde ve gebeliğin sürdürülebilmesi için plasentanın varlığı zorunludur. Embriyo ve fetüsten önce oluşmaya başlayan plasenta gelişiminin büyük bir kısmı gebeliğin ilk yarısında gerçekleşmektedir. Sağlıklı devam eden bir gebelikte plasentanın ömrü yaklaşık 9 aydır. Bu nedenle diğer insan organlarında tamamlanması gereken birçok süreç aylar hatta yıllar içerisinde gelişimine devam ederken plasentada bu süreç gebeliğin ilk yarısında gerçekleşmektedir (Fisher, 2000). Gebeliğin sonlanacağı 9. aya gelindiğinde bu organ görevini tamamladığı için ömrünün sonuna gelmiştir. Ancak plasentanın doğumdan bir süre sonra da hala canlılığını koruduğunu ve kordon kesilene kadar bebeği beslemeye devam ettiği bilinmektedir (Göhner ve ark., 2014).

Term plasenta dokusunda ekstrasellüler matriks proteinleri, sitokinler, besinler ve hücreler yönünden zengin kaynaklar olduğu bilinmektedir (Dalziel ve ark., 2022). Birçok plasenta doğumdan sonra atılmaktadır. Fakat plasentadan alınan amniyotik

membran uzun yıllardır allogreft olarak da kullanılmaktadır. Özellikle son yıllarda hem plasentadan kök/progenitör hücrelerin izolasyonu için hem de hücre dışı matris (ECM) için verimli bir kaynak olarak görülmektedir (Lobo ve ark., 2016). Doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan insan term plasentaları genellikle doğum sonrasında bağış yapan anneler tarafından karşılanmaktadır (Göhner ve ark., 2014). Doku mühendisliğinde plasentadan elde edilen hücre, ECM ve biyoaktif moleküller ile oluşturulan kombinasyonlar doku ve organların oluşumunu düzenlemektedir (Lobo ve ark., 2016).

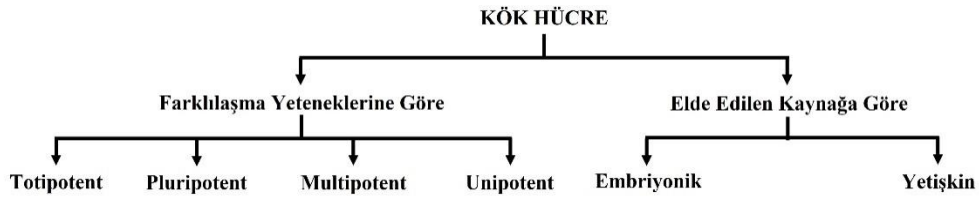
Plasenta dokusunun hem fetal hem de anne kaynaklı mezenkimal kök hücreleri barındırdığı bilinmektedir. Plasenta kaynaklı kök hücreler ile yapılan ilk uluslararası çalışmaya göre fetal plasentanın 4 bölgesi ayırt edilebilmektedir. Bunlar; amniyotik epitel, amniyotik mezenkimal, koryonik mezenkimal ve koryonik trofoblastik doku bölgeleridir. Bu nedenle plasentadan izole edilen kök veya progenitör özellik gösteren en az 4 farklı hücre popülasyonu izole edilebilir. Bu hücreler; insan amniyotik epitel hücreleri (hAEC), insan amniyotik stromal hücreler (hAMSC), insan koryonik mezenkimal stromal hücreleri (hCMSC) ve insan koryonik trofoblastik hücreleri (hCTC) olarak adlandırılmaktadır (Parolini ve ark., 2008; Hass ve ark., 2011).

1.5. Kök Hücreler

Kök hücreler, gelişimin ilk aşamalarından yaşamın sonuna kadar bulunan farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir. Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran temel özellikleri; kendi kendini yenileme, birçok farklı hücre tipine farklılaşabilme ve tek bir hücreden köken almalarıdır. Bu özelliklerinin yanı sıra kök hücreler asimetrik bölünme özellikleri sayesinde hem farklı fizyolojik şartlarda farklı özelliklere sahip hücreler hem de yeni bir kök hücre üretebilirler. Yeni kök hücrelerin üretilmesiyle kök hücre havuzu korunmuş olur (Elçin ve ark., 2015). Kök hücreler, bir dokunun oluşumu ve mevcut dokunun onarımını sağlayan parakrin

faktörlerin salgılanması da dahil olmak üzere birçok benzersiz özellik ve yeteneğe sahiptir. Bu benzersiz özellikleri sebebiyle rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinde uygulanan hücre bazlı tedaviler için umut vaat etmektedirler (Kim ve ark., 2023).

Kök hücreler temel olarak iki farklı şekilde sınıflandırılabilir (Şekil 1.3). Bunlardan ilki farklılaşma yeteneklerine göre totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak sınıflandırılmaktadır. Diğeri ise elde edilen kaynağa göre embriyonik ve yetişkin kök hücreler olarak sınıflandırılırlar. Kök hücrelerin gösterdiği özellikler elde edilen kaynağa göre farklılıklar gösterebilmektedir.



Şekil 1.3. Kök hücrelerin sınıflandırılması. (Chowdhury ve ark., 2021 modifiye edilmiştir.)

1.5.1. Farklılaşma Yeteneklerine Göre Kök Hücreler

Totipotent kök hücreler, maksimum farklılaşma potansiyeline sahip kök hücrelerdir. Embriyo ve ekstra-embriyonik soy da dâhil olmak üzere üç germ tabakasında (endoderm, mezoderm ve ektoderm) yer alan tüm hücelere bölünme ve farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Sperm ve yumurtanın döllenmesiyle oluşan zigot totipotent hücreye örnektir. Oluşan blastomer yapısı bütün bir organizmaya dönüşme potansiyeline sahiptir.

Pluripotent kök hücreler, üç germ tabakasında yer alan tüm hücelere farklılaşma yetenekleri olmasına rağmen plasenta gibi ekstra embriyonik soylara farklılaşamazlar. Blastokist yapısı yaklaşık döllenmeden 4-5 gün sonra pluripotent hale gelmektedir. Bir başka pluripotent hücre ise yapay yollarla somatik hücrelerden üretilen ve işlevleri pluripotent kök hücelere benzeyen uyarılmış pluripotent kök

hücrelerdir. Uyarılmış pluripotent kök hücrelerde embriyonik kök hücre özellikleri göstermektedir.

Multipotent kök hücreler, belirli soylardan hücreler üretebilen kısıtlı farklılaşma potansiyeline sahip kök hücrelerdir. Kısıtlı farklılaşma yetenekleri sebebiyle yetişkin kök hücreler olarak kabul edilmektedirler. En iyi temsilcileri hematopoietik kök hücreler ve mezenkimal kök hücrelerdir. Hematopoietik kök hücreler tüm kan hücrelerine (kırmızı, beyaz kan hücreleri ve trombositler) farklılaşabilirler. Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) tüm doku ve organlarda az sayıda da olsa mevcut oldukları bilinmektedir. Günümüzde MKH'ler kemik iliği, yağ doku, diş özütü ve plasenta gibi dokulardan elde edilebilmektedir.

Unipotent kök hücreler, en kısıtlı farklılaşma potansiyeline sahip, sadece bulundukları doku ve organa özgü hücre tipini oluşturabilen kök hücrelerdir (kas kök hücreleri gibi).

1.5.2. Elde Edilen Kaynağa Göre Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler, embriyonun iç hücre kütesinden türetilen vücudun tüm somatik hücrelerine farklılaşabilen ve sınırsız kendini yenileme potansiyeline sahip pluripotent kök hücrelerdir. İnsan embriyonik kök hücreleri blastokistlerin iç hücre kütesinden ve gebeliğin erken dönemlerinde kaybedilen fetüslerden türetilir. Ancak günümüzde tartışmalı etik sorunlar ve transplantasyon sonrası teratom oluşum riski embriyonik kök hücrelerin klinik çalışmalarda kullanımını engellemiştir.

Yetişkin kök hücreler, doğum sonrasında veya yetişkin doku ve organlarda dokuların korunması ve onarımında görev alan kök hücrelerdir. Yetişkin kök hücreler doku veya organda bulunan nişleri içinde uzun süreler boyunca uykuda kalabilirler. Gerekli durumlarda kendilerini yenileyebilir ve farklılaşması gereken

hücre tipine farklılaşabilirler. Yetişkin kök hücreler multipotent özelliğe sahiptirler. Doku içerisindeki sayıları değişmekle birlikte kan, yağ, beyin, kas, deri ve kornea gibi hemen hemen tüm dokularda bulunurlar. Yetişkin kök hücreler gelişim kökenlerine göre endodermal, mezodermal ve ektodermal olarak sınıflandırılabilirler. Endodermal kökenli kök hücrelere gastrointestinal sistem kök hücreleri, mezodermal kökenli kök hücrelere hematopoietik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler, ektodermal kökenli kök hücrelere deri ve nöral kök hücreler örnek verilebilir (Chowdhury ve ark., 2021).

Yetişkin ve embriyonik kök hücreler klinik kullanım için karşılaştırıldığında, yetişkin kök hücrelerin sınırlı soy farklılaşma kapasitesine sahip oldukları görülmektedir. Ancak elde edilme sürecinin daha az etik kısıtlamaya sahip olması, red oranının düşük olması, eldesinin daha kolay ve sürdürülebilir olması nedeniyle günümüzde tercih edilen kök hücre kaynaklarıdır. Aynı zamanda yetişkin kök hücrelerin temin edilme sürecinde hastalar için tehdit oluşturabilecek düzeyde örneğin alınması kaygıları da devam etmektedir. Günümüzde klinik kullanım için yetişkin kök hücre kaynaklarından sıklıkla mezenkimal kök hücreler tercih edilmektedir.

Son yıllarda, çeşitli hastalıklarda terapötik stratejiler ileriye doğru büyük bir adım atmıştır; bunların arasında rejeneratif tıp potansiyeli olan kök hücre temelli tedaviler ve immünolojik bozuklukların tedavisi giderek daha fazla ilgi görmektedir. (Li ve ark., 2015)

1.5.3. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler); kendilerini yenileme özelliğine sahip, özelleşmiş hücrelere farklılaşabilen, vücut içinde veya laboratuvar ortamında uygun koşullar altında birçok farklı hücre tipine dönüşebilen multipotent hücrelerdir. Birçok yetişkin dokusu, travma, hastalık veya yaşlanma sonrasında yenilenme kapasitesine

sahip kök hücre popülasyonları içerir. Hücreler, doku içinde veya kök hücre rezervuarı görevi gören diğer dokularda bulunabilir. MKH'ler, yetişkin dokulardan (ör. yağ doku, periferik kan, diş özü ve kemik iliği gibi) veya perinatal dokulardan (ör. plasenta, umbilikal kord, wharton jeli gibi) izole edilebilirler (Hass ve ark., 2011).

Günümüzde mezenkimal kök hücrelerin izolasyonunun farklı kaynaklardan yapılabildiği bilinmektedir. İlk olarak Friedenstein ve ark. tarafından kemik iliği kaynaklı kök hücre izolasyonları yapılmıştır (Friedenstein ve ark., 1976). Kemik iliğinin yanı sıra adipoz doku (Kern ve ark. 2006), periferik kan (Kassis ve ark. 2006), kalp (Garikipati ve ark. 2018), mens kanı (Gargett ve Medusa 2010), plasenta (In't Anker ve ark., 2004), göbek kordonu kanı (Kern ve ark. 2006) gibi çok farklı kaynaklardan mezenkimal kök hücrelerin elde edilebilmesi mümkündür. Yapılan çalışmalarda izole edilen mezenkimal kök hücrelerin proliferasyon ve çoklu soya farklılaşabiliyor olmaları birçok hastalığın tedavisinde kullanılması için umut vaat etmektedir.

Uluslararası Hücresel Terapi Derneği'nin Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi, insan MKH'sini tanımlamak için minimal kriterler önermektedir. Bu kriterlerden ilki standart kültür koşullarında tohumlandıklarında plastik yüzeye yapışabilmelidir. İkincisi CD73, CD90 ve CD105'i ifade etmeli ve hematopoietik hücre serilerine özgün yüzey belirteçleri olan CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin ifadesinden yoksun olmalıdır. Üçüncüsü ise in vitro koşullar altında en az osteojenik, adipojenik ve kondrojenik soylara farklılaşabilmelidir (Castrechini ve ark., 2010; Dominici ve ark. 2009; Sensebé ve ark. 2010). Bunlara ek olarak koloni oluşturabilme yetenekleri de mezenkimal kök hücre karakterizasyonunda kullanılmaktadır (Castrechini ve ark., 2010).

MKH'lerin kök hücre özelliklerini kaybetmeden uzun süreli *ex vivo* olarak çoğaltılabilmesi klinik uygulamaların yapılabilirliği için önemlidir. Son yıllarda

mezenkimal kök hücreler; kendini yenileme ve farklılaşma potansiyelleri, immünomodülatör ve parakrin özellikleri ve majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf II moleküllerinden yoksun olmaları göz önüne alındığında, kök hücre esaslı doku mühendisliği ve yenileyici tıp alanındaki klinik araştırmalar için çekici bir kaynak olarak görülmektedir (Caplan 2009; Li ve ark., 2015; Li, 2022; Venugopal ve ark., 2022).

MKH'lerin izole edildiği dokunun konumuna, donör sağlığına ve bunların kaynağına bağlı olarak farklı özellikler gösterdiği kanıtlanmıştır (Wang ve ark. 2016). Önceki çalışmalar farklı doku kaynaklarından ve aynı dokunun farklı bölgelerinden izole edilen MKH'ler arasında proliferasyon ve gen ekspresyonu açısından önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir (Koltsova ve ark., 2021; Wu ve ark., 2018). Hatta çevresel etkiler ve sitokinler gibi faktörlerden de etkilendikleri bilinmektedir. Bu nedenle doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında hücresele tedavi kaynağı olarak kullanılacak MKH kaynağının nereden ve hangi koşullarda izole edildiği önemlidir.

Mezenkimal kök hücreler birçok hücresele tedavi, rejeneratif tıp ve inflamatuvar hastalık için klinik deneylerde kullanılmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin klinik deneylerinin sonuçlarının değerlendirilmesi üzerine yapılan bir analizde hücresele ürünlerdeki değişkenliğin büyük olasılıkla terapötik etkinliği etkilediği gösterilmiştir. Hücresele ürünlerdeki değişkenliğin donör farklılıklarından, üretim uygulamalarından ve doku kaynağı sebebiyle yaşanabileceği belirtilmiştir (Mendicino ve ark., 2014).

1.5.4. Perinatal Kaynaklı Kök Hücreler

İnsan plasentası yüksek hücre verimi ve ekstra cerrahi işleme ihtiyaç olmadan elde edilebiliyor olması nedeniyle önemli bir kök hücre kaynağı olarak kabul edilir. Doğum sonrasında atık olarak kabul edilen perinatal dokuların yetişkin dokularla

kıyaslandığında daha yüksek oranda mezenkimal kök hücre içerdikleri bilinmektedir. Bu temel özelliğe ek olarak farklı avantajları da mevcuttur. Bunlar; elde edilirken ilave bir invazif işlem gerektirmemesi, korunmuş immün baskın fenotipi, gelişmiş *in vitro* sağ kalım, yüksek proliferasyon oranları ve yüksek engraftman kapasiteleri olarak bilinmektedir (Naeem ve ark., 2022). Son yıllarda perinatal dokulardan elde edilen mezenkimal stromal/kök hücrelerin üstün özellikleri, erişim kolaylığı ve minimum etik kaygılar nedeniyle kök hücre kaynaklı tedavilerin klinik uygulamaları için potansiyel kaynak haline gelmiştir (Teoh ve ark., 2023). Plasenta dokusuna doku mühendisliği açısından bakıldığında doku ve organ oluşumunu düzenleyen hücreler, ECM ve biyoaktif moleküller arasındaki etkileşimler açısından da önemli bir kaynaktır (Lobo ve ark., 2016). Plasentanın farklı anatomik bölgelerinde bulunan hücre tipleri ve sayıları değişkenlik göstermektedir. Aynı zamanda farklı anatomik bölgelerinden elde edilen mezenkimal kök hücreler, doku kökenleri, biyolojik aktiviteleri ve farklılaşma potansiyelleri bakımından farklılıklar göstermektedir. Plasentadan elde edilen mezenkimal kök hücreler doku mühendisliği ve yenileyici tıp için sürekli ve sınırsız kaynak sunması nedeniyle önemlidir.

Kök hücreler hemen hemen tüm doku ve organlarda perivasküler niş içinde bulunurlar (Asatrian ve ark., 2015). Plasentanın farklı anatomik kısımlarının da kök hücre yönünden zengin olduğu bilinmektedir. Perinatal kaynaklı mezenkimal kök hücre, endotelyal kök/progenitör hücreler ve hematopoietik kök hücrelere ek olarak çeşitli embriyonik veya prematüre hücre popülasyonlarını da barındırmaktadır (Hass ve ark., 2011). Placenta kaynaklı mezenkimal kök hücreler multipotent hücrelerdir. Perinatal kaynaklı kök hücreler plasentanın fetal ve maternal kısımlarından amniyon, koryon, umbilikal kord (göbek kordonu), kordon kanı, amniyon zarı ve sıvısı gibi farklı dokulardan izole edilebilmiştir (In't Anker ve ark., 2004; Mihi ve ark., 2008; Parolini ve ark., 2008; Patel ve ark., 2014; Shafiee ve ark., 2015; Vellasamy ve ark., 2012). Plasentanın farklı bölümlerinden izole edilen mezenkimal kök hücrelerin de farklı özellikler gösterdiği bilinmektedir.

Perinatal kaynaklı mezenkimal kök hücrenin yetişkin kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücreler ile kıyaslandığında daha üstün özelliklere sahiptir (Hass ve ark., 2011; Naeem ve ark., 2022). Yapılan çalışmalarda perinatal kaynaklı (plasental/göbek kordon kanı gibi) mezenkimal kök hücrenin kemik iliği veya adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreye göre proliferatif kapasite, yaşam süresi, farklılaşma potansiyeli, rejeneratif potansiyeli ve hipo-immünojenite gibi üstün hücre özellikleri bulunmuştur (Hass ve ark., 2011; Khalifeh Soltani ve ark., 2019).

1.5.4.1. Umbilikal Kord Kök Hücreleri ve Özellikleri

Embriyonun büyümesi ve yaşamını devam ettirebilmesi için hayati öneme sahip olan umbilikal kord (göbek bağı) term gebelikte yaklaşık 50-60 cm uzunluğunda, ven ve arterden oluşan kan damarları ve onları çevreleyen bağ dokusundan oluşmaktadır. Bu kan damarları wharton jölesinden (bağ dokusundan) sarmal şeklinde geçerek fetal ve plasentanın yerleştiği bölge arasında 10-11 sarmal yapar. Umbilikal kord gebelik süresi boyunca gebeliğin devamını sağlar. Doğumla birlikte görevi son bulur, ancak feto-plasental birimin en önemli bileşenidir.

İnsan umbilikal kord mezenkimal kök hücreleri (UK-MKH) yetişkin kök hücre kaynaklarından biridir. Diğer MKH izole edilen doku kaynakları ile kıyaslandığında düşük immünojenisite, kısa amplifikasyon süreleri, yüksek proliferasyon oranları, non-invaziv izole yöntemleri, *in vitro* kültür ortamında kolaylıkla manipüle edilebiliyor olması ve etik erişim gibi üstünlükleri sebebiyle hücre temelli tedaviler için umut verici bir kaynaktır (Baksh ve ark. 2007; Li ve ark., 2015; Li ve ark., 2017; Troyer ve Weiss, 2008; Venugopal ve ark., 2022)

İnsan kaynaklı umbilikal kord mezenkimal kök hücrelerini tanımlamak için; plastiğe yapışma, CFU-f oluşturma, spesifik yüzey belirteçlerini ifade etme, üçlü soya farklılaşabilme özelliklerinin gösterilmesi ve fetal kaynaklı olduklarının

kanıtlanması gerekmektedir. Umbilikal kord'tan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin pasaj 2-4'deki spesifik yüzey belirteçleri; CD90, CD73 ve CD105 pozitif, CD45, CD34, CD14 ve HLA-DR negatif olmalıdır (Parolini ve ark., 2008).

Birçok araştırmacı insan umbilikal kord'undan izole ettikleri mezenkimal kök hücrelerin *ex vivo* çoğaltılması ve karakterizasyonu için farklı yöntemler kullanmış ve diğer kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücrelerle karşılaştırmalı çalışmalarını yapmışlardır. Yeni izole edilmiş ve erken pasajlardaki umbilikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin erken pasajlarının tümörjenik olmadığı, immün-modülasyon ve farklılaşma potansiyellerinin yüksek olduğu kanıtlanmıştır. UK-MKH'lerinin diğer doku kaynaklarından izole edilen mezenkimal kök hücrelere kıyasla daha ilkel olduğu düşünülmektedir. Dusza ve ark. (2023) UK-MSC'lerinin daha yüksek proliferatif kapasiteleri, daha düşük immünojeniteleri ve daha güçlü çözünür tolerojenik faktörler üretimi nedeniyle immünomodülasyon için üstün potansiyele sahip hücreler olduğunu bulmuştur. Yetişkin kök hücre kaynaklarından izole edilen mezenkimal kök hücreler ile kıyaslandıklarında UK-MKH'lerinin izolasyonu için herhangi bir ekstra invaziv prosedüre ihtiyaç duyulmamaktadır. Bu nedenle hücre temelli tedaviler için umut verici bir hücre kaynağıdır.

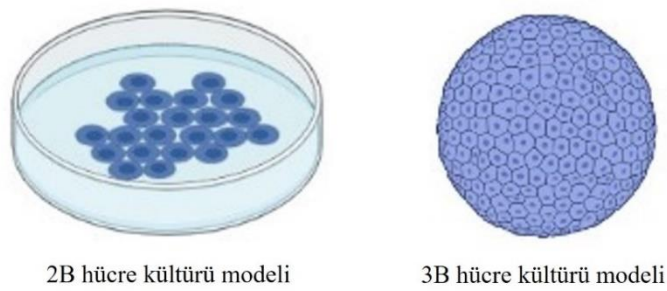
1.6. Hücre Kültürü

Hücre kültürü; bir dokudan hücrelerin çıkarılarak yapay bir ortamda büyütülmesi olarak tanımlanabilir. Hücre kültürü yapılacak hücreler doğrudan dokudan eksplant kültür yöntemiyle, enzimatik veya mekanik yollar ile izole edilebilirler. Daha önceden bu yöntemlerle izole edilerek hücre hattı oluşturulan hücreler de kullanılabilir (Antoni ve ark., 2015). Hücre biyolojisi, doku mühendisliği çalışmaları, doku morfolojisi, hastalık mekanizmaları, ilaç araştırma ve geliştirme çalışmaları gibi alanlarda yaygın olarak kullanılan *in vitro* bir yöntemdir. *In vitro* ve

in vivo hücre kültürü yöntemleriyle birçok çalışma yapılmış ve bilim dünyasına farklı bakış açıları kazandırmıştır.

Hücre kültüründe hücrelerin çoğalması için oluşturulan yapay ortam; uygun bir yüzey, temel besin kaynağı (amino asitler, karbonhidratlar, vitaminler, mineraller), büyüme faktörleri, hormonlar, uygun pH, optimum nem, sıcaklık (37°C) ve yeterli gaz miktarını (O₂ ve CO₂) sağlamalıdır. Hücreler oluşturulan bu yapay ortamda günlerce veya haftalarca büyütülebirlirler (Antoni ve ark., 2015; Joseph ve ark., 2018). Bu yapay ortamın değişkenleri değiştirilerek hücrelerin tepkisel değişimleri gözlemlenebilmektedir.

İki boyutlu (2B) hücre kültür yöntemleri uzun yıllardır kullanılmaktadır. Günümüzde de geliştirilerek birçok çalışmada kullanılmaya devam edilse de hücrelerin doğal ortamını tam olarak yansıtmamaktadır. Fakat, hücre davranışının gözlemlenmesi ve mevcut mekanizmalarının keşfedilmesi için *in vivo* ortamı daha iyi taklit edebilecek üç-boyutlu (3B) hücre kültür yöntemlerine ihtiyaç duyulmuştur. Şekil 1.4 de 2B ve 3B hücre kültür modelleri şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.4. 2B ve 3B hücre kültür modellerinin şematik gösterimi. Bu şekil BioRender.com kullanılarak hazırlandı.

1.6.1. 2 Boyutlu Hücre Kültürü

İki boyutlu hücre kültürü çalışmalarının temeli 1885 yılında Roux tarafından civciv embriyolarının nöral plakasından canlı hücre izole edilmesi ve PBS içinde birkaç gün yaşayabildiklerini göstermesiyle başlamıştır (Jedrzejszak-Silicka, 2017). 2B hücre kültürü yönteminde hücrelerin beslenmesini ve büyümesini sağlayacak önemli değişiklikler yapılmıştır. Geleneksel 2B hücre kültüründe hücreler tipik olarak cam veya polistiren gibi düz yüzeyler üzerinde tek tabaka halinde, besiyeri ortamında ve vücut ısısında (37°C) kültür kapları içinde çoğaltılmaktadır. Besiyeri ortamı için kullanılan standart besin maddeleri olsa da çoğaltılacak hücrenin gereksinimlerini karşılayacak maddeler de eklenebilir. Hücreler kültür kabının tamamına yakını doldurduğunda hücre yaşlanması ve kontaminasyonun engellenmesi için hücreler kültür kabının yüzeyinden kaldırılarak bir miktar hücre yeni bir kültür kabına tohumlanır. Bu işleme "alt kültür" ya da "pasajlama" denilmektedir. Pasajlama yapılarak hücrenin büyümesi devam ettirilir. Pasajlama da hücre büyümesi log fazına ulaştığında azalmaya başlar ve hücre çoğalması durur.

1.6.2. 3 Boyutlu Hücre Kültürü

In vitro hücre kültürü deneylerinde canlı doku ve organların fizikokimyasal ve biyolojik işlevlerini taklit edebilecek hücre bazlı yöntemlerin kullanılabilmesi için 2B tek tabakalı hücre kültür yönteminden 3B hücre kültür yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmiştir. Üç boyutlu hücre kültürü 1906 yılında Harrison tarafından sinir liflerinin kökenini araştırdığı bir çalışma ile geliştirmiştir. Harrison kurbağa embriyosundan doku parçalarını alarak cam lamel üzerinde lenf solüsyonu içerisine yerleştirmiş ve çukur cam lam üzerine ters çevirerek eksplant doku parçasını asılı damlada tutarak sinir liflerinin vücut dışındaki hücrelerden bağımsız büyüme ile geliştiğini gözlemlemiştir (Harrison, 1906). Harrison'ın bu keşfiyle birlikte hücrelerin vücut dışında tutulabildiği ve belirli bir süre boyunca da takip

edilebileceği gözlemlendi. Yıllar içinde bu temel yöntemin üzerine farklı teknikler geliştirilerek 3B kültür yöntemleri geliştirildi.

3B kök hücre kültürü sistemleri, hücreler ile hücre dışı matriks (ECM) arasındaki *in vivo* şartlarda gerçekleşen karmaşık etkileşimleri daha iyi taklit edebilecek bir yöntem olarak görülmüştür. 3B ortamda *in vitro* şartlarda hücrelerin büyüdüğü, çoğaldığı, farklılaştığı ve birbirleriyle ve hücre dışı matriks ile etkileşime girdiği bilinmektedir (Zhang ve ark., 2016). 3B kültür modeli ile yapılan çalışmalar incelendiğinde hem fizyolojik hem de biyolojik birçok mekanizmanın anlaşılmasını kolaylaştırdığı görülmüştür. Fizyolojik olarak *in vivo* ortamın daha iyi taklit edilebildiği ve hücrelerin birbiriyle etkileşiminin gözlemlenebildiği keşfedilmiştir. Genel hücre fonksiyonu, *in vivo* uygunluk, hücre sayısının takibi, canlılık, morfoloji, proliferasyon, farklılaşma, uyaranlara karşı yanıt, tümör hücrelerinin çevre dokulara göçü ve istilası, anjiogenez uyarımı, bağışıklık sisteminden kaçınma, ilaç metabolizması, gen ekspresyonu ve protein sentezi gibi birçok biyolojik mekanizmanın anlaşılmasında önemli katkılar sağlamıştır (Antoni ve ark., 2015).

3B hücre kültürü deneyleri yapılırken hücre ortamı, bir hücrenin *in vivo* ortamını taklit edecek şekilde manipüle edilebilir ve hücreden hücreye etkileşimleri, tümörojenik özelliklerini, ilaç keşfini, metabolik profil oluşturulmasını, kök hücre araştırmalarını ve diğer hastalık türleri hakkında daha doğru veriler sağlayabilir. 3B hücre kültürü, organoidlerin kullanımı yoluyla organ davranışlarının incelenmesini sağlayabilir (Jensen ve ark., 2020) ve 2B hücre kültürü sistemleri ve hayvan deneyleri arasında bir geçiş basamağı olarak değerlendirilebilecektir (Kim ve ark., 2023; Jensen ve Teng, 2020). 3B kültür sistemlerinin ilerleyen yıllarda daha çok geliştirilmesiyle hayvan deneylerine olan ihtiyacın bile ortadan kalkabileceği öngörülmektedir. Bu nedenle 3B hücre kültürü, hücre biyolojisi, rejeneratif tıp, kanser araştırmaları ve ilaç çalışmaları için önemli bir yöntem olarak dikkat çekmektedir.

3B hücre kültür yöntemleri hücrelerin 3 boyutlu fiziksel şekillerini koruyarak büyümesi, daha iyi hücre-hücre teması, hücreler arası sinyalleşme ağlarına, hücrelerin karmaşık yapılara farklılaşmasını sağlayan gelişimsel süreçlerin de kolaylaşmasını sağlar (Cukierman ve ark., 2002; Joseph ve ark., 2018).

3B hücre kültürü yöntemlerini temel olarak iskele tabanlı ve iskele içermeyen yöntemler olarak ikiye ayırabiliriz.

- **İskele Tabanlı 3B Hücre Kültür Yöntemleri**

Orijinal doku da yer alan ECM yapısını taklit edebilecek mekanik özellikleri taşıyan, hücrelerin bir araya gelebileceği, çoğalabileceği ve göç edebileceği ECM benzeri iskeleler kullanılır. İskele tabanlı yöntemlerde hazırlanan iskelenin fizikokimyasal özellikleri üzerine tohumlanan hücrelerin farklılaşma sürecini belirler. İskeleler hem doğal hem de sentetik malzemelerden üretilmektedir. İskele yapımında ECM'nin doğal bileşeni olan fibrin, kollajen ve hyaluronik asit gibi doğal malzemeler ya da doğal kaynağa sahip ipek, jelatin ve alginat gibi malzemelerde kullanılabilir (Awad ve ark., 2004; Dhaliwal, 2012; Gerecht ve ark., 2007; Willerth ve ark., 2006). İskele sentezinde polimerler, biyoaktif camlar ve peptitler gibi sentetik malzemelerde kullanılmaktadır (Gunatillake ve Adhikari 2003; Xiang ve ark., 2006). İskelenin tasarımında biyoyumluluk, biyoaktivite, biyobozunurluk, mekanik tepki ve iskele mimarisi önemli parametrelerdir (Dhaliwal 2012; Joseph ve ark., 2018). İskeleler hücrelerin tutunması, malzemeyle etkileşime geçebilmesi, büyümesi ve hayatta kalabilmesi için gerekli besin ve gazların alımını kolaylaştıracak şekilde tasarlanmalıdır.

İskelenin hazırlanması için sızdırma, eriyik kaplama, gaz köpürmesi, elyaf yapıştırma, dondurarak kurutma, elektroegirme, elyaf ağ, porojen liçi ve mikro kalıplama yöntemleri kullanılabilir (Joseph ve ark., 2018).

- İskele İçermeyen 3B Hücre Kültür Yöntemleri

İskele içermeyen 3B hücre kültürü çok sayıda hücrenin bir araya gelmesiyle agregatlar oluşur ve bu agregatlara "sferoid" denilmektedir. "Sferoid" terimi ilk olarak 1970'lerde Sutherland ve ark. tarafından Çin hamsteri V79 akciğer hücrelerini karıştırmalı kaplarda çoğalttıklarında hücresel formda hücre agregatlarının oluştuğunu gözlemlemişlerdir (Sutherland ve ark., 1971). Bu ilk keşiften sonra farklı hücre ve yöntemlerle küresel formda hücre agregatları hazırlanmıştır.

Sferoidler hücre adezyon moleküllerinin, ECM proteinlerinin ve integrinlerin kompleks homojen ve heterojen bağlanmasıyla oluşur (Kim ve ark., 2023). 3B sferoidler; *in vivo* dokuyu birçok yönden taklit edebilir, küresel yapıları nedeniyle hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimlerine izin verir, hücrelerin bir araya gelerek kendi ECM'lerini üretmelerine olanak sağlar, *in vivo* dokudakine benzer şekilde gelişen difüzyon ile besinlerin alınmasını ve atılmasını sağlar (Breslin ve O'Driscoll, 2013). Sferoidlerin büyüklüğü kullanılan hücre tipi ve sayısına göre değişkenlik göstermektedir. Sferoidler hazırlanırken hedeflenen dokuya en yakın özellikleri gösterebilecek şekilde tasarlanmalıdır. Işık floresansı ve konfokal mikroskop kullanılarak görüntülenebilir ve analizlerinin yapılabilmesi diğer 3B kültür yöntemlerine kıyasla büyük avantaj sağlamaktadır (Joseph ve ark. 2018).

İskele içermeyen 3B kültür yöntemlerinin temelini asılı damla yöntemi oluşturmaktadır. Asılı damla yönteminde hücreler hücre kültür kabının kapağında tam kültür ortamı içerisinde asılı halde kültürlenir. Kültür kabı içerisine uygun nemli ortamı sağlaması için PBS ya da tam kültür ortamı eklenir. Asılı halde hücrelerin bulunduğu kapak hızlı ve dikkatli şekilde kültür kabının üzerine ters çevrilerek kapatılır. Asılı halde duran hücreler kısa bir süre sonra bir araya gelmeye başlar ve damlacığın uç kısmında 3B küreler oluşur (Bartosh ve ark., 2010). 3B kürelerin boyutu ve oluşum süresi hücre tipi, sayısı ve ortam koşullarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Sferoidler birkaç farklı hücre bir araya getirilerek de hazırlanabilir (Hsiao ve ark., 2012; Sano ve ark., 2020). Günümüzde asılı damla

kültürü tekniği farklı ticari ürünler geliştirilerek daha kolay uygulanabilir formlar kazanmıştır. Pellet kültür, yuvarlak veya V-şekilli tabanlı düşük bağlanma yüzeyine sahip mikro kültür kapları, mikro doku kalıpları ve döndürücü şişeler içinde hazırlanabilir (Rimann ve Graf-Hausner, 2012).

Sferoidlerin mikroskobik incelemesinde; bölünen çok sayıda hücre içeren bir dış bölge, yetersiz beslenen ve oksijenlenen ve az sayıda mitoz bölünme bulunan bir ara bölge ve merkezi bir nekroz bölgesi gözlemlenmektedir (Edmondson ve ark., 2014).

3B hücre kültürü sistemleri, kök hücrelerin belirli işlevlerine, büyümesine ve süreçlerine (örneğin, embriyogenez, morfogenez ve organogenez) rehberlik etmeye yardımcı olan benzersiz özelliklere sahiptir. Küresel formdaki kök hücre sferoidleri, kök hücre özelliklerini koruyarak kendi kendini yenileme, birçok farklı soya farklılaşabilme ve protein salgılayabilme gibi kapsamlı yeteneklerinden dolayı doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında önemli bir potansiyele sahiptir (Kim ve ark., 2023).

1.6.3. 2B ve 3B Hücre Kültürünün Karşılaştırılması

2B hücre kültürü; hücrelerin şeklini, işlevini ve dış uyaranlara tepkisini yönlendiren doğal mikro ortamlarında kritik hücre-hücre ve hücre matriks etkileşimlerinden yoksun *in vivo* büyümesinden çok uzaktır. Bu durum *in vitro* test sistemlerinin prognostik kapasitesini geliştirmek için daha gerçekçi ve tahmine dayalı 3B hücre kültürü modellerinin geliştirilmesini sağlamıştır. Hücreleri 3B olarak kültürlemek; hücre morfolojisi, etkileşimleri ve dokuya özgü mimarisinin doğal dokulara daha çok benzediği *in vivo* durumu daha doğru bir şekilde özetlemektedir.

3B kültürde hücreden hücreye temaslar ve doku ortamına benzeyen hücreler arası sinyalleşmeyi sağlar. Aynı zamanda 3B kültür yöntemi ile hazırlanan kültür ortamlarında kök hücrelere doğal hücre nişini taklit edebilecekleri de gösterilmiştir (Kaminska ve ark., 2021).

2B kültürler geçmişte ve günümüzde birçok hastalığın tedavisi için kullanılmış ve kullanılmaya devam etmektedir. Ancak 2B kültürde çoğaltılan hücrelerin değişken hücre metabolizmaları ve yoğun protein ekspresyonu gibi fizyolojik koşullarını farklılaştırabilecek *in vitro* mikro ortam değişikliklerine çok açıktırlar. Aynı zamanda *in vivo* ortam koşullarını bire bir taklit edemezler. 3B kültür ortamlarında hücre-hücre etkileşimleri ve hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimleri gibi *in vivo* mikro ortamın koşullarının daha iyi taklit edilebileceği görülmüştür. Hücre agregatları, sferoidler ve organoidler gibi 3B kültür esasına göre üretilen mikro dokular *in vivo* ortamdaki hücreler gibi hareket ederek hücrelerin işlevleri ve büyümeleri ile ilgili bilgiler sunarlar (Kim ve ark., 2023). Çizelge 1.2 de 2B ve 3B hücre kültür yöntemlerinin kıyaslaması yer almaktadır.

Çizelge 1.2. 2B ve 3B hücre kültür yöntemlerinin kıyaslaması

Önemli Özellikler	2B Hücre Kültürü	3B Hücre Kültürü	Referanslar
Hücre Morfolojisi	Hücreler düz bir yüzeyde tek katmanlı büyüyüp genişleyebildikleri için düz ve uzun bir şekle sahiptirler.	Hücreler doğal şekillerini ve büyümelerini koruyarak çok katmanlı hücre agregatları (küreleri) oluştururlar.	Costa ve ark., 2016; Edmondson ve ark., 2014; Jensen ve ark., 2020; Joseph ve ark., 2018; Laghans ve ark., 2018
Hücre – Hücre Teması	Hücreden hücreye temas kenarlar ile sınırlıdır.	<i>In vivo</i> ortamdakine benzer hücre-hücre teması ile hücreler arası iyon değişimleri, küçük moleküllerin transferi ve elektrik akımı yoluyla iletişim kurabilirler.	Costa ve ark., 2016; Jensen ve ark., 2020; Joseph ve ark., 2018; Laghans ve ark., 2018; Li ve Cui, 2014; Ravi ve ark., 2015; Soares ve ark., 2012
Hücrelerin Besiyesine Maruziyeti	Hücreler kültür ortamından aynı miktarda besin ve büyüme faktörü alırlar. Bu durum hücrelerin aynı hücre döngüsünde olmalarına olanak sağlar.	Çok katmanlı bir yapı olması nedeniyle tüm katmanlar aynı oranda besin ve büyüme faktörü alamazlar. Örneğin; çekirdekteki hücreler ortamdan daha az besin ve oksijen alabilirler. Ancak bu durum <i>in vivo</i> ortamdaki gibi gereken miktarda besini almalarını da sağlayabilir.	Costa ve ark., 2016; Jensen ve ark., 2020; Joseph ve ark., 2018; Laghans ve ark., 2018; Li ve Cui, 2014
Hücre Çoğalması	Hücreler <i>in vivo</i> ortamdan daha hızlı çoğalırlar.	Kullanılan hücre tipine ve 3B kültür yöntemine bağlı olarak daha hızlı ya da daha yavaş çoğalabilirler. Çoğalmaları <i>in vivo</i> ortama benzer şekildedir.	Jensen ve ark., 2020; Joseph ve ark., 2018; Kim ve ark., 2003; Laghans ve ark., 2018; Ravi ve ark., 2015
Hücre Farklılaşması	Hücreler 3B kültür yöntemine göre daha zayıf farklılaşma gösterir.	Hücreler uygun şekilde farklılaşmıştır.	Costa ve ark., 2016; Jensen ve ark., 2020; Laghans ve ark., 2018
Protein / Gen İfadesi	Protein ve gen ifade profilleri, <i>in vivo</i> modellerle kıyaslandığında farklılık gösterir.	Protein ve gen ifade profilleri, <i>in vivo</i> hücrelerdeki seviyelere yakındır.	Costa ve ark., 2016; Jensen ve ark., 2020; Joseph ve ark., 2018; Laghans ve ark., 2018; Ravi ve ark., 2015
Mekanik Uyarılara Tepki	Mekanik uyarılara tepki zayıftır. Yer çekimini deneyimleyemezler.	Mekanik uyarılara tepki iyidir. Yer çekimini <i>in vivo</i> ortamdaki gibi deneyimleyebilirler.	Costa ve ark., 2016; Jensen ve ark., 2020; Li ve ark., 2016; Ravi ve ark., 2015
Maliyet	Büyük ölçekli çalışmalar için 3B hücre kültür yöntemine kıyasla daha ucuzdur.	2B hücre kültür yöntemlerine kıyasla daha pahalı ve daha uzun zamana ihtiyaç vardır. Ancak yapılan araştırmanın <i>in vitro</i> 'dan <i>in vivo</i> 'ya geçişinde hayvan deneyleri basamağını ortadan kaldırabilir.	Costa ve ark., 2016; Jensen ve ark., 2020; Laghans ve ark., 2018; Ravi ve ark., 2015
Kullanım ve Analiz	Tekrarlanabilir ve uzun süredir kullanıldığı için kolayca yorumlanabilir. Uzun süreli kültürler için daha idealdir.	Deneyleri tekrarlamak maliyet ve süre sebebiyle zor olabilir. Verileri yorumlamakta zorlanabilir.	Jensen ve ark., 2020

1.7. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Polisakkaritler

Polisakkaritler, yapısal olarak glikozit bağlarına sahip homo veya hetero monosakkaritler ve üronik asitlerden oluşan, tüm canlı organizmalar için hayati biyo-makromoleküllerdir (Ullah ve ark., 2019). Polisakkaritler glikozidik olarak bağlı şeker artıklarından oluşan maddelerin yanısıra amino asitlere, peptitlere, proteinlere, lipidlere ve diğer yapılara kovalent bağlarla bağlanan polimerik sakkarit yapılarını içeren biyo-makromolekülleri de bulundururlar (D'Ayala ve ark., 2008; Ullah ve ark., 2019). Polisakkaritler; insanlar, hayvanlar, deniz yosunları, bitkiler, mantarlar ve bakteriler dahil olmak üzere farklı birçok doğal kaynaktan elde edilen karbonhidrat polimerleridir (Ullah ve ark., 2019; Jafari ve ark., 2022). Literatürde polisakkaritlerin antioksidan, antitümör, antimikrobiyal, anti-obezite, hipolipidemik, antidiyabetik ve hepato-koruyucu olmak üzere birçok özelliği olduğu gösterilmiştir (Ullah ve ark., 2019).

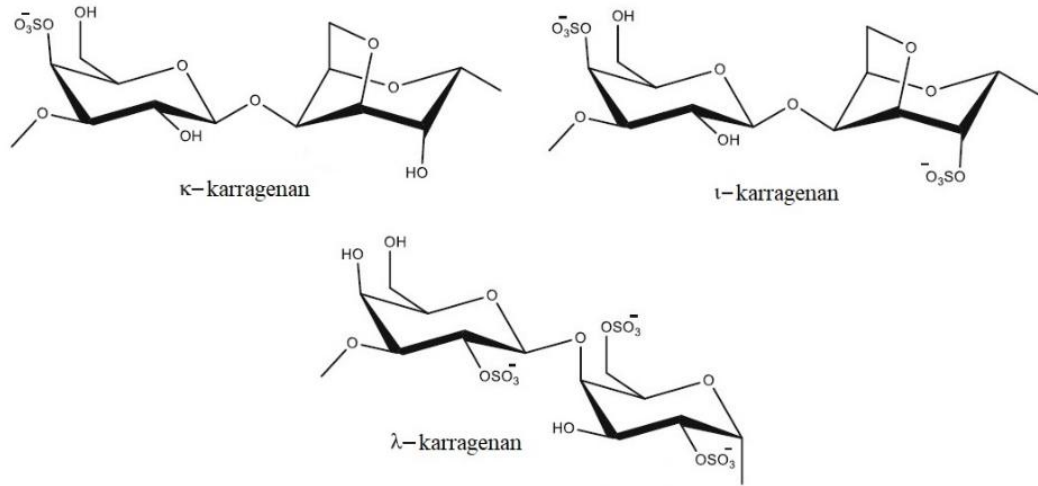
Biyolojik polimer esaslı biyomalzemeler fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri nedeniyle doku mühendisliği alanında umut verici adaylardır (Jafari ve ark., 2022). Polimerik biyomalzemeler, doğal dokuların fizyolojik mikro ortamını taklit eden en yaygın biyomalzemeler olarak kabul edilmektedir (Freedman ve ark., 2019). Biyoaktif polisakkaritlerin ve bunlardan üretilen türevlerinin doku mühendisliği alanında hücre farklılaşması, hücrenin yeniden şekillenmesi, hücre çoğalması, hücre adezyonu gibi konulardaki tıp araştırmalarında kullanılması dokuların yenilenebilirliğini ve hücresel büyümenin tanımlanmasını sağlamıştır. Doku mühendisliği uygulamalarında kitosan, kitin, kondroitin sülfat, aljinat, selüloz, nişasta, hiyalüronik asit gibi biyoaktif polisakkaritler biyomalzeme olarak kullanılmaktadır (Ullah ve ark., 2019).

Polisakkaritler kontrol edilebilir biyolojik aktiviteleri, biyobozunur olmaları, düşük toksisite, biyouyumluluk, hidrojel oluşturabilme yetenekleri ve düşük üretim maliyetlerinden dolayı doku mühendisliği alanında önemli bir yere sahiptir (Khan ve ark., 2013; Ullah ve ark., 2019). Polisakkarit esaslı biyomalzemeler özellikle

kıkırdak doku yenilenmesi, hücrelerin immobilizasyonu için jel yapımı, ilaç çalışmaları, kozmetik sektörü, gıda sektörü ve tıp alanında kullanılmaktadırlar (D'Ayala ve ark., 2008; Jafari ve ark., 2022). Tıp, eczacılık ve temel bilim çalışmalarında biyomalzeme olarak kullanılan doğal polisakkaritlerin birçoğu deniz yosunlarından ve deniz canlılarından elde edilmektedir (Kuznetsova ve ark., 2020; Jafari ve ark., 2022). Deniz kaynaklarından elde edilen başlıca polisakkaritler aljinatlar, agarlar ve karragenanlardır. Üstün fizikokimyasal özellikleri nedeniyle gıda, ilaç ve kozmetik sektörü gibi birçok sektörde kullanılmaktadırlar (Ghanbarzadeh ve ark., 2018). Son yıllarda çok yönlü biyolojik özelliklere sahip olması nedeniyle karragenanlar büyük ilgi görmektedir.

1.7.1. Karragenan

Karragenanlar, Rhodophyceae ailesinden Rhodophyta kırmızı deniz yosunu türlerinin hücre duvarlarında ve hücreler arası matrikslerinde bulunan bir polisakkarittir (Kloareg ve Quatrano, 1988; Ghanbarzadeh ve ark., 2018). Karragenanlar, dönüşümlü olarak α -(1,3) ve β -(1,4) glikozidik bağlarla bağlanan ortak bir D-galaktoz kalıntılarından oluşan tekrar eden disakkarit birimine dayanan sülfatlanmış lineer polisakkaritlerdir (Kuznetsova ve ark., 2020). Sülfat ester gruplarının sayısına ve konumuna ve α -bağlı galaktozda 3,6-anhidro halkasının oluşumuna göre sınıflandırılırlar. Buna göre, Şekil 1.5 de gösterilen ticari olarak en çok kullanılan üç karragenan tipi: κ -, ι - ve λ -karragenanlardır (Chauhan ve Saxena, 2016; Ghanbarzadeh ve ark., 2018).



Şekil 1.5. Üç tür karragenan'ın kimyasal yapıları. Kappa (κ), iota (ι) ve lambda (λ) formları (Ghanbarzadeh ve ark., 2018).

Karragenanlar, 100-1000 kDa arasında değişen molekül ağırlığına sahip sülfatlanmış lineer biyopolimerlerdir. Karragenanlar karragenaz enzimleri sayesinde daha düşük moleküler ağırlıklı oligosakkaritlere parçalanarak biyoaktif karragenan türevli oligosakkaritler de elde edilebilmektedir (Chauhan ve Saxena, 2016).

Son yıllarda üstün fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri sebebiyle biyoteknolojik ve biyomedikal uygulamalarda kullanımları artmıştır. Biyoyumlulukları ve biyobozunurluklarına ek olarak yüksek moleküler ağırlıkları, emülsifiye etme, kalınlaştırma, jelleştirme ve stabilize etme yetenekleri nedeniyle özellikle gıda, ilaç ve kozmetik sektörlerinde birçok endüstriyel uygulamada kullanılmaktadırlar (Chauhan ve Saxena, 2016; Ghanbarzadeh ve ark., 2018). İmmünomodülatör, antitümör, antiviral, antioksidan, antikoagülan özellikleri gibi biyolojik özellikleri nedeniyle karragenanlar biyomedikal uygulamalarda ön plana çıkmıştır (Kuznetsova ve ark., 2020; Jafari ve ark., 2022). Bu özelliklerine ek olarak hücresel ortamı kalabalıklaştırmak için kullanılan moleküller arasında karragenan molekülünün en kısa sürede en yüksek ECM birikimini sağladığı gösterilmiştir. Negatif yüklü olması ve polidispersitesine bağlı olarak ECM birikimini arttırmaktadır (De Pieri ve ark., 2020).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 09.07.2020 tarih ve İ7-410-20 sayılı onayı kapsamında, Etlik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden sağlıklı ve gönüllü katılımcılardan alınarak -80 °C'ye kaldırılmış plasenta dokuları kullanıldı.

2.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Laminer akışlı steril çalışma kabini (Nuaire, Class II, Plymouth, MA, ABD); eksplantların işlenmesi, hücre kültürü ile ilgili besiyeri değiştirme, tripsinleme ve benzeri tüm işlemlerde kullanıldı.

Karbondioksitli İnkübatör (Heracell 240, Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD); 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem şartlarına ayarlanmış olup hücre kültürlerinin idame ettirilmesinde kullanıldı.

İnvert (Faz Kontrast) Mikroskop (Primovert, Zeiss, Jena, Almanya) ve bağlantılı Dijital Fotoğraf Makinesi (Nikon TS100, Tokyo, Japonya); hücre kültürlerinin düzenli takip edilmesi ve fotoğraflanmasında kullanıldı.

Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-15R, Brea, CA, ABD); hücre kültürlerinin pasajlanması ve yıkama işlemlerinde kullanıldı.

Otomatik Hücre Sayım Cihazı (TC20, Bio-Rad, Hercules, CA, ABD); hücre kültürlerinin sayım işlemlerinde kullanıldı.

Akım Sitometri Cihazı (FCM, Beckman Coulter Navios, Brea, CA, ABD) ve verilerin işlenmesinde Kaluza programı kullanıldı.

Damla Spektrofotometre Cihazı (NanoDrop One, Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD); küçük hacimli spektrofotometrik ölçümlerde kullanıldı.

Multi-mod Mikroplaka Okuyucu (SpectraMax® M5, Molecular Devices, ABD); spektrofotometrik ölçümlerde kullanıldı.

2.2. Tamponlar ve Çözeltiler

2.2.1. Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) (10X)

PBS hücre kültürü ortamının pH'sını düzenlemek için kullanılan tampon çözeltisidir (Gibco, ABD). 800 mL distile su içerisinde 1.8 mM KH_2PO_4 (1,44 g), 137 mM NaCl (90,9 g) ve 10 mM Na_2HPO_4 (5,28 g) eklenerek karıştırıcı yardımıyla tamamen çözünmesi sağlandı. Çözünme tamamlandıktan sonra pH 7,4'e ayarlanarak toplam hacim 1 L'ye tamamlandı. PBS 10X stok çözeltisi olarak hazırlandı ve çalışmalarda 1X'e distile su ile seyreltilerek kullanıldı. Hücre izolasyonu ve kültür aşamalarında kullanılan PBS otoklavlanarak 4-8 °C'de muhafaza edilir. Hazırlanan çözelti 4 hafta içinde kullanıldı.

2.2.2. % 0.05 Tripsin-EDTA Çözeltisi

Tripsin-EDTA çözeltisi hücrelerin kültür kaplarından kaldırılıp pasajlanması için kullanılmış olup, %0,25 tripsin ve 1mM EDTA PBS (pH: 7,4) içerisinde çözdürülerek hazırlandı. Hazırlanan stok çözelti 4-8 °C'de 1 hafta ya da porsiyonlanarak -40 °C'de 4 hafta muhafaza edildi.

2.2.3. FBS (Fetal Sığır Serumı – Isı İnaktif)

Ticari olarak satın alınan FBS (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, İsrail), kullanım kılavuzunda belirtilen şekilde inaktifleştirildikten sonra kullanıldı. 50 mL’lik falkon tüplerde porsiyonlanarak -40 °C de saklandı.

2.2.4. Tripan Mavisi (TM)

Ticari olarak satın alınan tripan mavisi boyası (Sigma, ABD) bir hemositometre (Bio-Rad) ile canlı hücrelerin sayımında kullanıldı.

2.2.5. Standart MEM- α (Minimum Essential Medium Eagle) Tam Kültür Ortamının Hazırlanması

MEM- α besiyeri (Biological Industries) içerisine %10 FBS (Biological Industries), %1 penisilin-streptomisin (pen-strep) (Gibco), %1 L-glutamin (Lonza) ve %1 anti-fungusit eklendi. Pasaj 1’den sonra tam kültür ortamına anti-fungusit eklenmedi. Hazırlanan tam kültür ortamı +4 °C’de muhafaza edildi. Çalışma öncesinde besiyerinin oda sıcaklığına gelmesi için beklenildi.

2.2.6. Standart DMEM:F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and Ham's F-12 Nutrient Mixture) Tam Kültür Ortamının Hazırlanması

DMEM:F12 (Dulbecco's modified eagle's medium and Ham's F-12 nutrient mixture) besiyeri (Biological Industries) içerisine %10 FBS (Biological Industries), %1 penisilin-streptomisin (pen-strep) (Gibco) ve %1 L-glutamin (Lonza) eklendi.

Hazırlanan tam kültür ortamı +4 °C’de muhafaza edildi ve çalışmadan önce oda sıcaklığına gelmesi için beklendi.

2.2.7. Adipojenik Farklılaştırma Tam Kültür Ortamı

DMEM-HG (Yüksek glikozlu DMEM) besiyeri (Biological Industries) içerisine %10 FBS (Biological Industries), %1 penisilin-streptomisin (pen-strep) (Gibco), %1 L-glutamin (Lonza), 1 µM dekzametazon, 0,5 mM 3-izobütil-1-metilksantin (IBMX), 10 µM insan insülini, 0,2 mM indometazin eklendi. Bu adipojenik farklılaştırma tam kültür ortamı kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

2.2.8. Osteojenik Farklılaştırma Tam Kültür Ortamı

DMEM-LG (Düşük glikozlu DMEM) besiyeri (Biological Industries) içerisine %10 FBS (Biological Industries), %1 penisilin-streptomisin (pen-strep) (Gibco), %1 L-glutamin (Lonza), 10 mM dekzametazon, 50 µM L-askorbik asit ve 10 mM β-gliserofosfat eklendi. Osteojenik farklılaştırma tam kültür ortamı kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

2.2.9. Kondrojenik Farklılaştırma Tam Kültür Ortamı

DMEM-HG (Dulbecco's modified Eagle's medium – High Glucose) besiyeri (Biological Industries) içerisine %5 FBS (Biological Industries), %1 penisilin-streptomisin (pen-strep) (Gibco), %1 L-glutamin (Lonza), 50 µM dekzametazon, 50 µg/ml L-askorbik asit, 40 µg/mL prolin, 100 µg/mL sodyum pirüvat, %1 ITS, %1

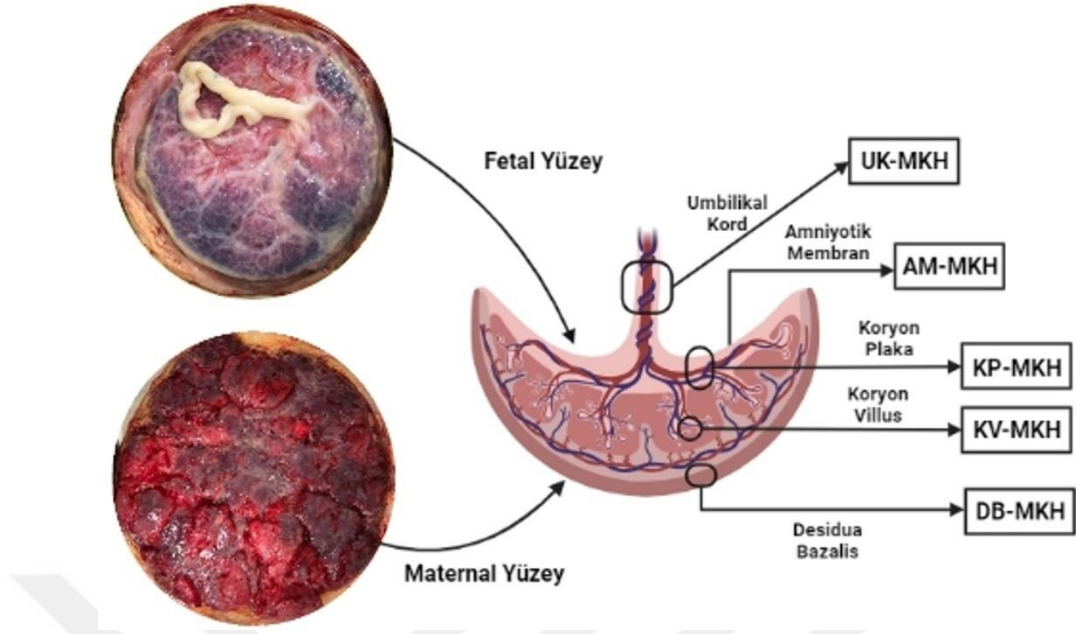
esansiyel-olmayan amino asit karışımı ve 10 ng/mL TGF- β 3 eklendi. Kondrojenik farklılaştırma tam kültür ortamı kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

2.3. Plasentanın Temin Edilmesi

Bu tez çalışmasında kullanılan plasentalar Etlik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden 38-40 haftalık, herhangi bir komplikasyonu bulunmayan ve sağlıklı sezaryen doğum yapan gebelerden, bilgilendirilmiş gönüllü onam formu alınarak temin edildi. Bütünlüğü bozulmamış plasenta sezaryen sonrasında steril torba içerisine aseptik şartlarda aktarıldı. Ameliyathaneden teslim alınan plasenta yaklaşık olarak yarım saat içerisinde +4 °C sıcaklık şartlarında laboratuvara ulaştırıldı. Çalışmalarda anatomik diseksiyonu yapılarak uygun koşullarda -80 °C'ye kaldırılan doku parçaları kullanıldı.

2.4. Plasentanın Anatomik Diseksiyonu

İnsan term plasenta laboratuvara getirildikten sonra aseptik şartlar altında etrafındaki kan ve kan pıhtıları uzaklaştırılana kadar steril PBS (pH:7.4) ile 5-6 kez yıkandı. Plasentanın anatomik yapısına dayalı olarak Şekil 2.1'de gösterilen doku bölgelerinden diseksiyon işlemi yapıldı.



Şekil 2.1. İnsan plasentasının farklı anatomik kısımlarından hücre izolasyonunun şematik diyagramı. Bu şekil BioRender.com kullanılarak hazırlandı.

2.4.1. Umbilikal Kord (Göbek Bağı)

Umbilikal kord dokusu plasentaya bağlı kısmın yaklaşık 1 cm üzerinden kesildikten sonra steril bir petri kabına alındı. Dokunun üzerindeki kanı uzaklaştırmak için %1 penisilin-streptomisin (Gibco, Thermo, Waltham, MA, ABD) ve %1 fungusit içeren PBS (pH: 7,4) ile defalarca yıkandı. İki arter, bir ven ve yüzey dokuları çıkarıldıktan sonra steril petri içerisinde bistüri yardımıyla yaklaşık 0,5 cm'lik parçalara bölündü.

2.4.2. Amniyotik Membran

Amniyotik membran, alttaki koryondan nazikçe ayrılarak çıkartıldı (Şekil 2.2). Ardından ayrılan amniyotik membran %1 penisilin-streptomisin (Gibco, ABD) ve

%1 fungusit içeren PBS (pH:7.4) çözeltisi ile yıkandı. Steril petri içerisinde bistüri yardımıyla 0,5 - 1 cm'lik parçalara bölündü.

2.4.3. Koryon Plaka

Plasentanın fetal yüzeyinden amniyotik membran ayrıldıktan sonra umbilikal korda en yakın bölgeden koryonik plak disekte edildi ve steril bir petri kabına alındı. Üzerindeki kanı uzaklaştırmak için %1 penisilin-streptomisin (Gibco, ABD) ve %1 fungusit içeren PBS (pH:7.4) ile yıkandı. Umbilikal kord'un üzerindeki kan ve kan pıhtıları uzaklaştırıldıktan sonra steril petri içerisinde bistüri yardımıyla 0,5 - 1 cm'lik parçalara bölündü.

2.4.4. Koryon Villüs

Plasenta dokusunun yaklaşık 0,5 cm derinliğinden umbilikal korda en yakın bölgeden ve plasentanın maternal yüzeyinden (desidua) ≥ 1 cm uzaklıktan koryon villüslerinden disekte edildi ve steril bir petri kabına alındı. Üzerindeki kanı uzaklaştırmak için %1 penisilin-streptomisin (Gibco, ABD) ve %1 fungusit içeren PBS (pH:7.4) ile yıkandı. Kan ve kan pıhtıları uzaklaştırıldıktan sonra steril petri içerisinde bistüri yardımıyla 0,5 - 1 cm'lik parçalara bölündü.

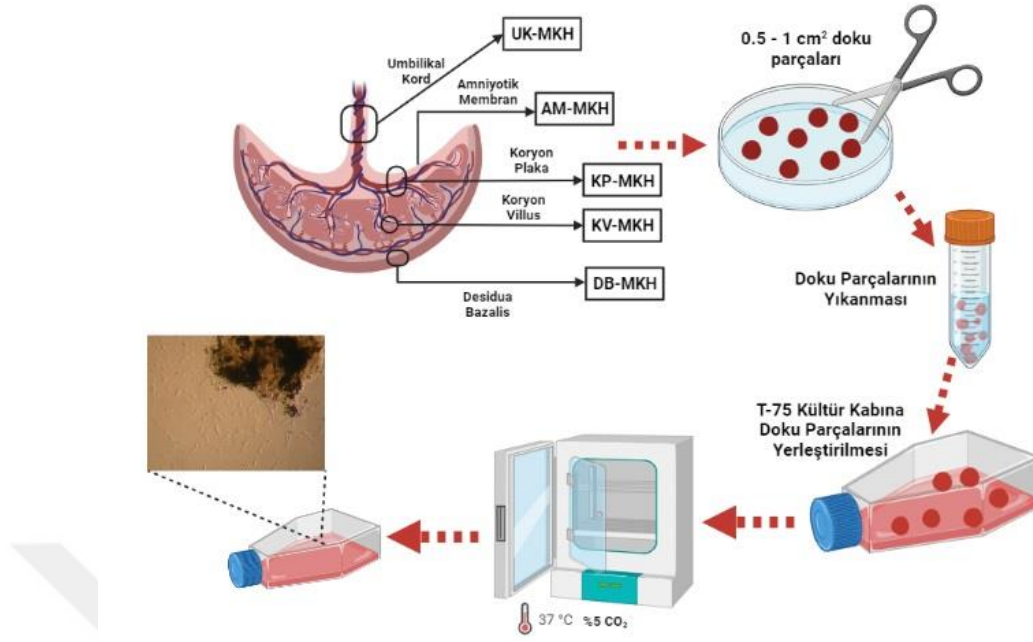
2.4.5. Desidua Bazalis

Plasentanın maternal yüzeyinin merkez noktasından 0,5 cm derinliğinde desidua bazalis dokusu disekte edildi ve steril petri kabına alındı. Üzerindeki kanı uzaklaştırmak için %1 penisilin-streptomisin (Gibco, ABD) ve %1 fungusit içeren

PBS (pH:7.4) ile yıkandı. Kan ve kan pıhtıları uzaklaştırıldıktan sonra steril petri içerisinde bistüri yardımıyla 0,5 - 1 cm'lik parçalara bölündü.

2.5. Plasentadan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

İnsan term plasentasından umbilikal kord, amniyotik membran, koryon plak, koryon villüs, desidua bazalis veya kan damarları gibi makroskobik olarak ayırt edilebilen farklı bölgelerden doku eksplantlarından mezenkimal kök hücre izolasyonu yapılabilmektedir. Literatürde mezenkimal kök hücre izolasyonu için enzimatik sindirim ya da eksplant kültür yöntemleri kullanılmaktadır. Eksplant kültür yöntemi kolay, hızlı, ilave ayırma işlemine gerek kalmadan ve düşük maliyetle hücre izolasyonu yapmaya imkân tanımaktadır. Aynı zamanda proteolitik enzimlerin neden olabileceği potansiyel hücre hasar da önlenmektedir. Eksplant kültür yönteminde eksplant doku parçalarına bağlı olan ekstrasellüler matriks ve hücre bileşenler doku parçasından göç eden hücrelerin büyümesine katkıda bulunacak maddeleri salgılayarak izolasyonun hücreler üzerinde oluşturduğu stresi azaltmakta ve hücrelerin fizyolojik ortamlarında elde edilmelerine olanak sağlamaktadır. Şekil 2.2'de gösterilen 38-40 haftalık insan term plasentasından fetal ve maternal dokuları içeren diseksiyonu yapılan dokulardan eksplant kültür yöntemi ile mezenkimal kök hücre izolasyonu yapıldı. UK-MKH (n=4), AM-MKH (n=4), KP-MKH (n=3), KV-MKH (n=3) ve DB-MKH (n=3) farklı biyolojik kopya ile hücre havuzu oluşturularak alt kültürleri yapıldı.



Şekil 2.2. Plasentadan eksplant kültür yöntemiyle mezenkimal kök hücre izolasyonu şeması. Bu şekil BioRender.com kullanılarak hazırlandı.

5 farklı anatomik bölgeden alınarak yaklaşık 0,5 - 1 cm'lik parçalara bölünen dokular yaşanabilecek herhangi bir kontaminasyonu engellemek için 50 mL'lik falcon tüp içinde %1 penisilin/streptomisin (P/S), %1 anti-fungusit, %1 iyodür içeren PBS ile seri santrifüjleme işlemleri ile yıkandı. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Doku parçaları kandan ve istenmeyen artıklardan uzaklaştırıldıktan sonra 75 cm²'lik yatık kültür kaplarına (T75) aktarıldı. Kültür kaplarına aktarılan doku parçalarının (eksplantların) üzerine tam kültür ortamı eklendi. Tam kültür ortamı olarak umbilikal kord, koryon plak, koryon villus ve desidua bazalis için DMEM:F12, %10 FBS, %1 P/S, %1 L-Glu, %1 anti-fungusit kullanılırken, amniyotik membran için α -MEM, %10 FBS, %1 P/S, %1 L-Glu, %1 anti-fungusit kullanıldı. Mezenkimal kök hücrelerin doku parçalarından göç etmesi için %5 CO₂'e ayarlı inkübatörde 37°C'de kültürlendi. 75 cm²'lik yatık kapları ilk 2 gün hareket ettirilmeden inkübatörde bekletildi. İki günün sonunda tam kültür ortamı değiştirilerek tutunmayan doku parçaları uzaklaştırıldı. Haftada 2 kez taze tam kültür ortamı değişimi yapılarak hücre büyümesinin durumu gözlemlendi. 10-14. günde doku parçalarının çeperlerinde mezenkimal kök hücre benzeri hücrelerin ortaya çıkışı ve kültür kabına

tutunmaları gözlemlendi. Hücreler, ~21-30. günler arasında %70-80 yoğunluğa ulaştığında alt kültüre geçildi. Alt kültür aşamasında, eksplant kültür içindeki doku parçaları PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı ve % 0,05 tripsin-EDTA tampon çözeltisi ile hücreler kaldırılarak 15 mL'lik falcon tüpler içerisinde toplandı. umbilikal kord, koryon plak, koryon villus ve desidua bazalis dokularından izole edilen hücreler 1500 devir/dakika'da 11 dk, amniyotik membran dokusundan izole edilen hücreler 200xg'de 5 dk santrifüj yapılarak süpernatant atıldı. Hücre pelleti dokuya özgü taze tam kültür ortamı ile homojen olacak şekilde pipetlendi. Hücreler T-75 yatık kültür kabına tohumlandı. Sonrasında %70-80 yoğunluğa ulaşan hücrelerin ileri pasajlarına devam edildi.

2.6. Mezenkimal Kök Hücre Ekspansiyonu, Pasajlama, Dondurma ve Çözme

Eksplant kültür yöntemi ile izole edilen hücrelerin ekspansiyonu haftada 2 kez besiyeri değiştirilerek devam ettirildi. Pasajlamadan önce T-75 kültür kabı içindeki hücrelerin yoğunluğu, morfolojileri ve herhangi bir kontaminasyon olup olmadığı invert mikroskop ile kontrol edildi. Pasajı yapılacak T-75 kültür kabı %70'lik etanol ile dekontamine edilerek laminar kabin içerisine alındı. T-75 kültür kabı içindeki besiyeri atıldı ve tam kültür ortamının uzaklaştırılması için PBS ile yıkandı. % 0,05 tripsin-EDTA çözeltisi ile hücreler kaldırılarak 15 mL'lik falcon tüpler içerisine toplandı. Umbilikal kord, koryon plak, koryon villüs ve desidua bazalis MKH'leri 1500 devir/dakika hızda 11 dk, amniyotik membran MKH'leri 200 g'de 5 dk süreyle santrifüj yapılarak süpernatant atıldı. Hücre pelleti taze tam kültür ortamı ile homojen olacak şekilde pipetlendi. Hücreler T-75 yatık kültür kaplarına tohumlanarak pasajlama işlemleri yapıldı. Üç-boyutlu kültür çalışmalarında umbilikal kord MKH'leri 3-5. pasajlarda, koryon plak, koryon villüs ve desidua bazalis MKH'leri 4. pasajda, amniyotik membran MKH'leri ise 4-6. pasajlarda kullanıldı.

Dondurma işlemi için erken pasajlardaki hücrelere (2-3. pasajlar) tripsinleme yapıldı. Elde edilen hücre pelleti laminar kabin içerisinde buz üzerine alındı ve FBS içerisinde homojen olacak şekilde pipetlendi. 1,8 mL'lik kriyojenik tüplere $1-5 \times 10^6$ hücre/mL olacak yoğunlukta alındı. Üzerine %10 DMSO eklendi ve 1-2 kez hafifçe alt üst edilerek hızlıca $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki dondurucuya alındı ve uzun süreler boyunca muhafaza edildi.

Çalışmada, kriyojenik tüplerde $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta muhafaza edilen plasentanın 5 farklı anatomik bölgesine ait doku parçaları kullanıldı. Hücre ve doku parçalarını çözme işlemi için önceden $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklığa ısıtılan su banyosu kullanıldı. İşlemde, örneğin tamamen çözünmesi değil buzunun hafifçe erimesi (yaklaşık 1dk) beklendi. Kriyojenik tüpler %70'lik etanol ile dekontamine edildikten sonra laminar kabin içerisine alındı ve önceden oda sıcaklığına getirilmiş olan 10 mL tam vasat içerisine alındı. Hücrelerin yapısının koruması için kriyojenik tüpler içine eklenen DMSO santrifüj edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılarak doku parçaları T-75 yatık kültür kabına steril pens yardımıyla yerleştirildi. Doku parçalarının yerlerinin oynamamasına dikkat edilerek 8 mL taze tam besiyeri eklendi. 37°C 'de ve %5 CO_2 ortam koşullarında inkübasyon başlatıldı. 48 saat sonra besiyeri değiştirilerek tutunmayan doku parçaları uzaklaştırıldı. Haftada 2 kez taze tam kültür ortamı ile besiyeri değişimi yapıldı. 10-14. günde doku parçalarının etrafında mezenkimal kök hücre benzeri hücrelerin çıkışı ve kültür kabına tutunmaları gözlemlendi. 21-30. günler arasında %70-80 yoğunluğa ulaşan eksplant kültür içindeki doku parçaları PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı ve % 0,05'lik tripsin-EDTA çözeltisi ile hücreler kaldırılarak 15 mL'lik falcon tüp içerisine toplandı. Umbilikal kord, koryon plak, koryon villüs ve desidua bazalis MKH'leri 1500 devir/dakika hızda 11 dk, amniyotik membran MKH'leri 200 g'de 5 dk süreyle santrifüj yapılarak süpernatant atıldı. Hücre pelleti taze tam besiyeri ile homojen olacak şekilde pipetlendi. Hücreler T-75 kültür kabına tohumlandı. Sonrasında %70-80 yoğunluğa ulaşan hücrelerin pasajlanmasıyla devam edildi.

2.7. Hücre Sayımı

Hücre sayımları pasajlama, 2B ve 3B deney aşamalarında Bio-Rad TC20 otomatik hücre sayım cihazı (hemositometre) ile yapıldı. Hücre süspansiyonları homojen olacak şekilde pipetlendikten sonra örnekten 10 μ L alınıp 10 μ L tripan mavisi çözeltisi ile karıştırıldı ve hemositometre slaytına yüklenerek sayımı yapıldı. TC20 otomatik hücre sayım cihazı 1 mL'deki hücre sayısını hesaplamaktadır. Okunan hücre sayısının yoğunluk durumuna göre dilüsyon yapılarak sayımlar tekrar edildi.

2.8. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu

2.8.1. Mikroskop ile Görüntüleme

Plasentanın 4 farklı anatomik bölgesinden (amniyotik membran (n=4), koryon plak (n=3), koryon villus (n=3) ve desidua bazalis (n=3)) eksplant kültür yöntemiyle izole edilen MKH'ler P4'e kadar çoğaltıldı ve deneylerde P2-4 kullanıldı. Umbilikal kord dokusundan (n=4) eksplant kültür yöntemiyle izole edilen UK-MKH'leri P5'e kadar çoğaltıldı ve deneylerde P3-5 kullanıldı. Eksplant kültür sonrası ilk yapılan tripsinizasyondan sonra izole edilen hücrelerden havuzlanmış allojenik kültürler elde edildi. Hücrelerin alt kültürüne havuzlanmış hücreler ile devam edildi. Amniyotik membrandan izole edilen MKH'lerin çoğaltılmasında diğerlerinden farklı olarak %5 FBS kullanıldı.

Plasentanın 5 farklı anatomik bölgesinden (umbilikal kord, amniyotik membran, koryon plak, koryon villüs ve desidua) eksplant kültür yöntemi ile izole edilen MKH'lerin invert mikroskop (T1-SM, Nikon) ile fibroblastik morfolojileri

gözlemlendi ve görüntüler Nikon Coolpix P5100 marka fotoğraf makinesi kullanılarak alındı.

2.8.2. İmmünofenotipleme ve Hücre Canlılığı Analizi

Hücre yüzey belirteçlerini tanımlamak için kullanılan floresan aktifleşmiş hücre ayırma temelli immünofenotipik karakterizasyon deneyleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı'ndaki Beckman Coulter Navios FCM cihazı ile yapıldı. İmmünofenotipik karakterizasyon için Çizelge 2.1'de listelenen mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri seçildi.

Çizelge 2.1. Akım sitometri analizi için seçilen mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri

Pozitif Belirteçler	Negatif Belirteçler
Yüzey Antijeni	Yüzey Antijeni
CD29	CD31
CD73	CD34
CD90	LIN
CD105	HLA-DR

İnsan term plasentasının 5 farklı anatomik bölgesinden (umbilikal kord, amniyotik membran, koryon plak, koryon villüs ve desidüa) izole edilen MKH'lerin T-75 yatık kültür kaplarındaki yoğunluğu ~% 80'e ulaştığında mezenkimal kök hücre ekspansiyonunda ayrıntılı olarak anlatıldığı şekilde her dokudan elde edilen MKH'ye özgü yöntem ile tripsin işlemi yapıldı ve hemositometre ile hücre sayımları gerçekleştirildi. UK-MKH P2 ve P4, AM-MKH P2 ve DB-MKH P3, KV-MKH ve KP-MKH P1 hücreleri ile immünofenotiplendirme yapıldı. Her dokudan izole edilen mezenkimal kök hücre için 5 mL tampon çözelti içerisinde 1×10^6 hücre olacak şekilde süspanse edilerek 300g'de 5 dk santrifüjleme yapıldı. Süpernatant atılarak pellet 1 mL tampon çözeltisi ile homojen olacak şekilde karıştırıldı. Seyreltilen hücre süspansiyonundan antikor boyaması için tüplere 100'er μ L eklendi. Hücrelerin

üzerine ise 5 µL kadar florokrom işaretli hedefe spesifik anti-insan -CD29, -CD31, -CD34, -CD73, -CD90, -CD105, -LIN (lineage spesifik işaretleyicileri içeren kokteyl) ve -HLA-DR monoklonal antikorları (Çizelge 2.1) eklenerek vorteks ile karıştırıldı. Boyama için hücreler oda sıcaklığında 20 dk inkübasyona bırakıldı. Ardından yıkama solüsyonu ile 300g de 5 dk santrifüj edilerek 2 kez yıkandı. Tüpteki son hacim 200 µL olacak şekilde hücreler hücre yıkama tamponu (% 0,1 sodyum azid ve % 0,5 BSA) ile süspanse edildi. Süspanse edilen hücreler Beckman Coulter Navios FCM akım sitometri cihazına yerleştirilerek uygun ayarlarda okuma yapıldı. Elde edilen veriler Kaluza yazılımı ile analiz edildi.,

2.8.3. UK-MKH'lerin Üçlü Soya Farklılaştırılması

MKH'ler birçok farklı doku kaynağından izole edilebilen, uygun kültür koşullarında farklı soylara farklılaşabilen hücre popülasyonlarıdır. Umbilikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmasını indükleyecek farklı özelliklerde tam kültür ortamları hazırlandı. Farklılaştırma deneyleri, 8-bölmeli lamlarda ve 4. pasajdaki UK-MKH'leri kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol grupları için standart tam kültür ortamı (DMEM:F12) kullanıldı.

2.8.3.1. Adipojenik Farklılaştırma

Adipojenik farklılaştırma için her 8-bölmeli slaytlara 2×10^4 sayısında hücre ekildi. Adipojenik farklılaştırma tam kültür ortamı için; DMEM-HG besiyeri (Biological Industries; BI) içerisine %10 FBS (BI), %1 penisilin-streptomisin (pen-strep) (Gibco), %1 L-glutamin (Lonza), 1 µM deksametazon, 0,5 mM 3-izobutilmetil-ksantin, 10 µM insülin, 0,2 mM indometasin eklendi. Tam kültür

ortamı 48 saatte bir değiştirildi. UK-MKH'ler 21 gün boyunca %5 CO₂ içeren inkübatöründe 37°C'de inkübe edildi. 21. gün sonunda tam kültür ortamı alınarak kuyucuklar 2 kez steril PBS ile yıkandı. Kuyucuklarda bulunan hücreler soğuk metanolde 5 dk bekletilerek tespit edildi. Adipojenik farklılaşmanın kanıtı olarak hücre içinde biriken yağ damlacıklarının birikimini görebilmek için Oil Red O boyaması yapıldı. İnvert mikroskop (Imager.Z2, Zeiss) ile boyanmalar gözlemlendi ve görüntüleri alındı.

2.8.3.2. Osteojenik Farklılaştırma

Osteojenik farklılaştırma için hücreler, her 8-bölmeli slaytlara 2×10^4 hücre/cm² yoğunlukta ekildi. Osteojenik farklılaştırma tam kültür ortamı için; DMEM-LG besiyeri (Biological Industries) içerisine %10 FBS (BI), %1 penisilin-streptomisin (pen-strep) (Gibco), %1 L-glutamin (Lonza), 10 mM deksametazon, 50 µM L-askorbik asit, 10 mM β-gliserofosfat eklendi. Tam kültür ortamı 48 saatte bir değiştirildi. UK-MKH'ler 7, 14 ve 21 gün boyunca %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de inkübe edildi. 7., 14. ve 21. gün sonunda tam kültür ortamı alınarak hücreler soğuk metanol ile tespit edildi. Osteojenik farklılaşmanın kanıtı olarak hücre içinde kalsiyum birikimini görebilmek için von Kossa ve alizerin kırmızısı boyamaları yapıldı. İnvert mikroskop (Imager.Z2, Zeiss) ile boyanmalar gözlemlendi ve görüntüleri alındı.

2.8.3.3. Kondrojenik Farklılaştırma

Kondrojenik farklılaştırma için 2 mL eppendorf tüpü içerisine 5×10^6 kadar hücre ekilerek pellet kültür yapıldı. Kondrojenik farklılaştırma tam kültür ortamı için; DMEM-HG (Dulbecco's modified Eagle's medium – High Glucose) besiyeri (Biological Industries) içerisine % 5 FBS (BI), %1 penisilin-streptomisin (pen-strep)

(Gibco), %1 L-glutamin (Lonza), 50 µM deksametazon, 50 µg/ml L-askorbik asit, 40 µg/mL prolin, 100 µg/mL sodyum piruvat, %1 ITS, %1 esansiyel olmayan amino asit çözeltisi ve 10 ng/mL TGF-β3 eklendi. Tam kültür ortamı 48 saatte bir değiştirildi. UK-MKH'ler 35 gün boyunca %5 CO₂ inkübatörü ortamında 37°C'de inkübe edildi. Hücreler soğuk metanolde 5 dk bekletilerek tespit edildi. Kondrojenik farklılaşmanın kanıtı olarak ekstrasellüler matrikste bulunan glikozaminoglikanları gözlemek için alsiyen mavisi ile boyandı İnvert mikroskop (Imager.Z2, Zeiss) ile boyanmalar gözlemlendi ve görüntüleri alındı.

2.8.4. UK-MKH CFU (Koloni Oluşturabilen Birim) Oluşumu

2.8.4.1. 2B Kültür ile CFU Oluşumu

UK-MKH'ler 100, 1000, 10000 hücre olmak üzere üç farklı hücre yoğunluğu 6 kuyucuklu kültür kaplarına (Corning) iki tekrarlı olarak ekildi. Standart tam kültür ortamında pasajlama işlemi yapılmadan 14 gün boyunca kültür sürdürüldü. 14 gün sonunda 6 kuyucuklu kültür kabı 2 kez PBS ile yıkanarak besiyeri uzaklaştırıldı. Hücrelerin yüzeye sabitlenmesi için soğuk metanol eklenerek 5 dakika bekletildi. Hücrelerin oluşturdukları kolonilerin histokimyasal olarak gözlemlenmesi için kültürler % 0,5 kristal viyole ile boyandı. Koloni oluşumu invert mikroskop (Imager.Z2, Zeiss) ile boyanmalar gözlemlendi ve görüntüleri alındı.

2.8.4.2. 3B Kültür Sonrası CFU Oluşumu

UK-MKH'lerin sferoidlerine tripsinleme işlemi uygulanarak 10000 hücre 6 kuyucuklu kültür kabına (Corning) iki tekrarlı olarak ekildi. Standart tam kültür ortamında pasajlama işlemi yapılmadan 14 gün boyunca kültür sürdürüldü. 14 gün

sonunda 6 kuyucuklu kültür kabı 2 kez PBS ile yıkanarak besiyeri uzaklaştırıldı. Hücrelerin yüzeye sabitlenmesi için soğuk metanol eklenerek 5 dakika bekletildi. Hücrelerin oluşturdukları kolonilerin histokimyasal olarak gözlemlenmesi için kültürler % 0,5 kristal viyole ile boyandı. Koloni oluşumu invert mikroskop (Imager.Z2, Zeiss) ile boyanmalar gözlemlendi ve görüntüleri alındı.

2.9. Histokimyasal Boyamalar

2.9.1. Kristal Viyole Boyaması

CFU oluşumunun belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda 6 kuyulu kültür kaplarına 2 tekrarlı olarak ekilen UK-MKH'leri 14. gün sonunda soğuk metanol ile sabitlendi. Her kuyuya oda sıcaklığında % 0,5'lik kristal viyole eklenerek 10 dk bekletildi ve boya arındırılana kadar deiyonize su ile yıkandı. Histokimyasal olarak hücrelerin oluşturdukları koloniler invert mikroskop (Imager.Z2, Zeiss) ile boyanmalar gözlemlendi ve görüntüleri alındı.

2.9.2. Oil Red O Boyaması

Stok Oil Red O boyasının hazırlanması için 100 mL izopropanol alkol içinde 0,5 g Oil Red O su banyosu içinde çok ısıtılmadan çözdürüldü. Oil Red O çalışma solüsyonunu 30 ml stok solüsyondan alınarak üzerine 20 ml distile su eklenerek seyreltilti. 10 dk karıştırıldıktan sonra Whatman filtre kağıdından süzülerek koyu renkli şişe içerisinde muhafaza edilir. Boyama yapılacak örneklerin üzeri kaplanacak şekilde Oil Red O çalışma solüsyonu ile kaplandı ve 15 dk boyamaya bırakıldı. %60'lık izopropanol ile durulanarak kurutuldu. Oil Red O boyaması adipojenik farklılaşma da yağ damlacıklarını gözlemlemek için kullanıldı. Boyamalar invert mikroskop (Imager.Z2, Zeiss) ile boyanmalar gözlemlendi ve görüntüleri alındı.

2.9.3. Alizarin Kırmızısı Boyaması

50 mL distile su içerisinde 1 g Alizarin kırmızısı çözündürülerek boyamadan önce taze olarak hazırlanır. Tespit edilen hücreler yaklaşık 1 dk % 70'lik etanol de bekletildi ve distile su ile durulandı. Örneklerin üzeri kaplanacak şekilde 5 dk Alizarin kırmızısı ile boyandı. Distile su ile yıkandı. Alizarin kırmızısı boyamasında Ca tuzlarının birikimi turuncu-kırmızı renkte boyanır. Alizarin kırmızısı boyaması osteojenik farklılaşma da Ca birikimini gözlemlemek için kullanıldı. Boyamalar invert mikroskop (Imager.Z2, Zeiss) ile boyanmalar gözlemlendi ve görüntüleri alındı.

2.9.4. Von Kossa Boyaması

Von Kossa boyaması için hücreler 5 dk soğuk metanol ile sabitlendi. Tespit edilen hücreler 2 kez distile su ile yıkandı. UV ışığı altında oda sıcaklığında %1 gümüş nitrat solüsyonu ile boyandı. 2 kez distile su ile yıkandı. Reaksiyona girmeyen gümüş nitratın uzaklaştırılması için 1 dk % 5 sodyum tiyosülfat ile muamele edilip, 2 kez distile su ile durulandı. 5 dk nükleer fast red (nükleer kırmızısı) solüsyonu ile boyandı. 2 kez distile su ile durulandı. Dehidrasyon için dereceli alkollerden geçirildi. 2-3 kez ksilenden geçirildi. Von Kossa boyaması ile Ca tuzlarının birikimi siyah, çekirdek kırmızı ve sitoplazma pembe boyanır. Von Kossa boyaması osteojenik farklılaşma da Ca birikimini gözlemlemek için kullanıldı. Boyamalar invert mikroskop (Imager.Z2, Zeiss) ile boyanmalar gözlemlendi ve görüntüleri alındı.

2.9.5. Alsiyen Mavisi Boyaması

%3'lük glasiyel asetik asit çözeltisi ile %1'lik Alsiyen mavisi (pH: 2,5) hazırlandı. Tespit edilen hücreler 3 dk boyunca % 3'lük glasiyel asetik asit

çözeltisinde bekletildi. 65 °C’de ısıtılmış Alsiyen mavisi boyası ile 10 dk inkübe edildi. Akan musluk suyunda boya durulandı. 5 dk nükleer hızlı kırmızı solüsyonu ile inkübe edildi. 3 kez distile su ile durulandı. Dereceli alkollerden geçirilerek kurutuldu. 2-3 kez ksilenden geçirildi. Ekstrasüllüler matriks içindeki glikozaminoglikanlar mavi renkte, çekirdek kırmızı renkte boyanır. Alsiyen mavisi boyaması kondrojenik farklılaşma da GAG’ları gözlemlemek için yapıldı. Boyamalar invert mikroskop (Imager.Z2, Zeiss) ile boyanmalar gözlemlendi ve görüntüleri alındı.

2.9.6. Pikro-sirius Kırmızısı Boyaması

100 ml doymuş sulu pikrik asit çözeltisi içinde 0.1 g sirius kırmızısı çözdürüldü. 100 ml distile su içine 0.5 ml asetik asit ekleyerek asitli su hazırlandı. Çekirdeklerin boyanması için 8 dk hematoksilen ile boyandı ve akan musluk suyunda yıkandı. Pikro-sirius boyası ile 1 saat inkübe edildi. 2 kez asitli su ile yıkandı. 3 kez %100 etanolden geçirilerek kurutuldu. Ekstrasüllüler matriks içindeki kollajen lifleri kırmızı renkte, çekirdek kahverengiye yakın bir renkte boyanır. Pikro-sirius boyaması kondrojenik farklılaşma da kollajenleri gözlemlemek için yapıldı. Boyamalar invert mikroskop (Imager.Z2, Zeiss) ile gözlemlendi ve görüntüleri alındı.

2.10. Büyüme Eğrisi

Kültürlenmiş hücreler genellikle, gecikme, log ve plato fazı olmak üzere üç aşamada tanımlanan karakteristik model ile büyütülür. Büyüme eğrisi, hücrelerin çoğalma kabiliyetlerinin analiz edilmesi ve karşılaştırılması için kullanılmaktadır (Baghaban Eslaminejad ve ark., 2008). Büyüme eğrisi için P1 aşamasında bulunan UK-MKH’ler kullanıldı. UK-MKH (5×10^5 hücre/kuyu) 6 kuyucuklu kültür kaplarına

(Corning, USA) 2 tekrarlı olarak ekildi ve %5 CO₂ inkübatörde (HERAcell 150i) 37 °C'de inkübe edildi. Her 48 saatte bir tripsinleme yapılarak hücre sayımı gerçekleştirildi. Deney, hücreler plato fazına ulaşana kadar devam edildi. 12 gün boyunca takip edildi. Hücre sayımından elde edilen veriler ile büyüme eğrisi çizildi.

2.11. Çoğalma Eğrisi Analizi

Farklı pasajlardaki UK-MKH'lerin çoğalma kabiliyetlerinin analiz edilmesi ve karşılaştırılması için kullanıldı. Deneylerde kullanılan 3-5. pasajlardaki UK-MKH'leri 20.000 hücre/mL konsantrasyonda 24 kuyucuklu kültür kaplarına 2 tekrarlı olarak ekildi ve %5 CO₂ içeren inkübatörde (HERAcell 150i) 37 °C'de inkübe edildi. Besiyeri haftada iki kez değiştirildi. Üç farklı zaman noktasında (96, 144 ve 192. saatler) farklı kuyucuklara ekilen hücreler %0,05 tripsin-EDTA çözeltisi ile tripsinleme yapıldıktan sonra hücre sayımı gerçekleştirildi.

2.12. *In Vitro* Migrasyon Testi

Migrasyon testi moleküler ve hücresel mekanizmaların hücre göçü sürecine katkısını değerlendirmek için kullanılan *in vitro* bir tekniktir (Bobadilla ve ark., 2019). *In vitro* migrasyon testi, *in vitro* hücre göçü düzeyini belirlemek için kullanılan, kolay, düşük maliyetli ve iyi geliştirilmiş bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Temel adımlar, bir hücre tek tabakasında "çizik" oluşturmayı, bu çizici kapatmak için başlangıçta ve hücre geçişi sırasında düzenli aralıklarla görüntülerinin alınmasını ve hücrelerin geçiş oranını ölçmek için görüntülerin karşılaştırılmasıyla değerlendirilir. Hücre göçü tekli hücrelerin veya hücre kümelerinin bir konumdan diğerine hareketini içermektedir. Hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimlerinin hücre migrasyonu üzerindeki etkilerini gözlemlemek için uygun bir yöntemdir (Liang ve ark., 2007; Bobadilla ve ark., 2019).

In vitro migrasyon testi için P4 aşamasında bulunan UK-MKH'ler kullanıldı. UK-MKH (10^5 hücre/kuyu) 35 mm kültür kaplarına (Corning, USA) 2 tekrarlı olarak ekildi. 37 °C'de ve %5 CO₂'e ayarlı inkübatörde (HERAcell 150i) 48 saat inkübe edildi. Hücrelerin yoğunluğu tam bolluğa (%90-100) ulaştığında 200 µL'lik mikropipet ucu yardımıyla kuyucuğun bir ucundan diğer ucuna kadar düz bir çizgi çekildi. Bu çizgi çekildikten sonra zeminden kalkan hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için kuyucuklar 1 defa PBS ile yıkandı. Taze tam kültür ortamı eklenerek 0, 6, 12, 24 ve 48. saatlerde incelemeler yapıldı. Görüntüler invert mikroskop (T1-SM, Nikon) ile gözlemlendi ve görüntüler Nikon Coolpix P5100 marka fotoğraf makinesi kullanılarak alındı. Migrasyon hızı tüm zaman noktaları için ImageJ yazılımı kullanıldı. Yara kapanma yüzdesinin belirlenmesi için Şekil 2.3 de gösterilen formül kullanılmıştır. A₀; ilk ölçülen yara alanı, A_t; zaman noktasında kalan yara alanı.

$$\text{Yara kapanma yüzdesi (\%)} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$$

Şekil 2.3. Yara kapanma yüzdesi formülü

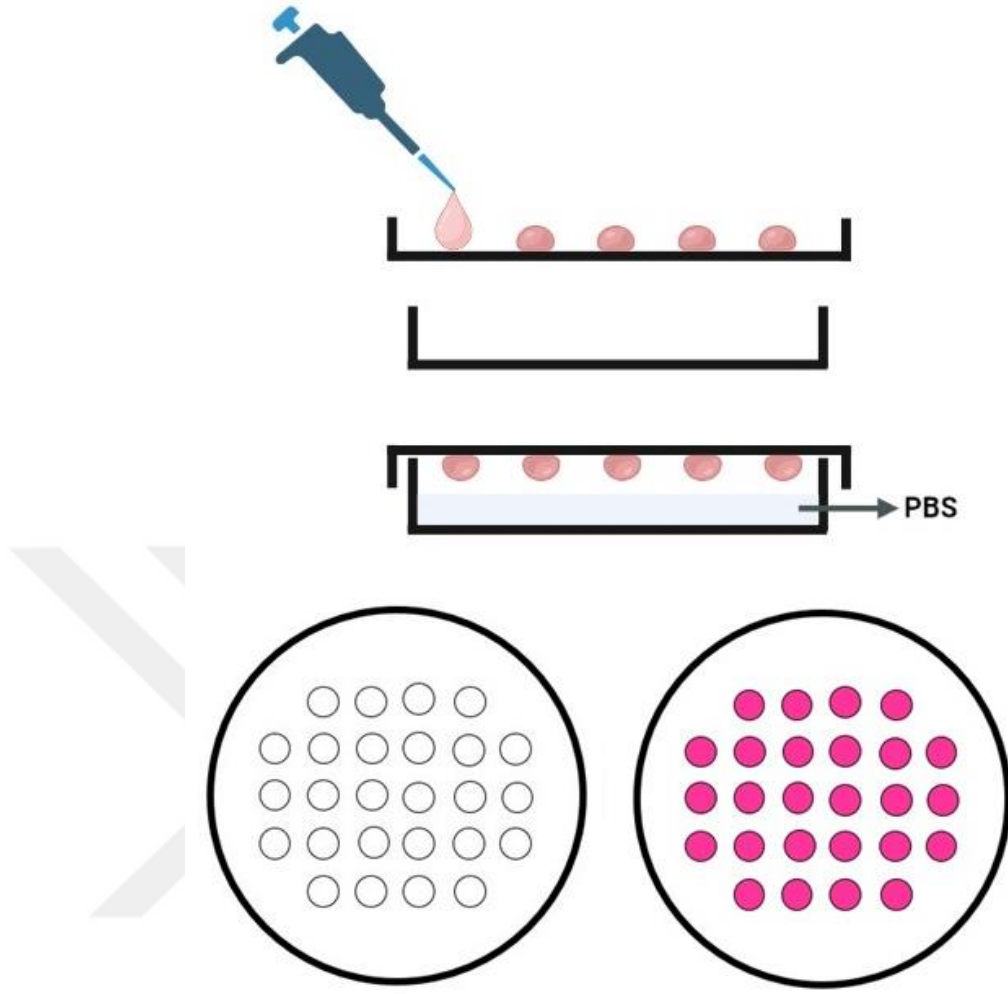
2.13. MKH'lerin İki-Boyutlu (2B) Kültürü

İnsan term plasentasının 5 farklı anatomik bölgesinden (umbilikal kord, amniyotik membran, koryon plak, koryon villüs ve desidüa) izole edilen MKH'ler çalışmada kullanılacak pasajlara kadar T-75 yatay kültür kaplarında 2B olarak çoğaltıldı. Çalışmalarda kullanılmak üzere belirlenen pasajlara gelen hücreler toplanarak MKH karakterizasyonu ve 3B sferoid kültürlerin hazırlanması için kullanıldı.

2.14. MKH'lerin Üç-Boyutlu Kültürü (Sferoid Kültür)

Bu tez çalışmasında “Sferoidler” veya “Homojen üç-boyutlu mikro doku kümeleri”, Bartosh ve ark. 2014’de belirtilen asılı damla yöntemine göre oluşturuldu. 3B kültür çalışmalarında; UK-MKH’ler için Pasaj 3-5, AM-MKH’ler için Pasaj 4-6, KP-MKH’ler için Pasaj 4, KV-MKH’ler için Pasaj 4 ve DB-MKH’ler için ise Pasaj 4 hücreleri kullanıldı.

3B kültürlerin hazırlanmasında hücreleri elde etmek için insan term plasentasının 5 farklı anatomik bölgesinden (umbilikal kord, amniyotik membran, koryon plak, koryon villüs ve desidüa) izole edilen MKH'ler 2B kültürde %70-80 hücre yoğunluğuna ulaştığında tripsinleme işlemi yapılarak kaldırıldı ve 35 µL tam kültür ortamı içerisinde 5×10^4 hücre olacak şekilde (damla başına ~50.000 hücre) 90 mm çaplı steril petrilerin kapak içlerine Şekil 2.4 de gösterildiği gibi eşit aralıklarla asılı damlalar şeklinde aktarıldı. Ortamın nemliliği için, her bir petrinin tabanına 15 mL steril PBS ilave edildi. İç taraflarında asılı damlaları taşıyan petri kapakları, PBS içeren petriler üstüne dikkatlice kapatıldı ve 72 saat boyunca 37 °C’de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde (HERAcell 150i) inkübe edildi. 72 saatin sonunda elde edilen hücresel agregatlar petri kapağı yaklaşık 10-20 derece açıyla tutularak bir pipet yardımıyla toplandı. Toplanan hücre agregatları 150 µl standart tam kültür ortamı kullanılarak poly-HEMA kaplanmış 96 kuyulu kültür kaplarına her kuyuda tek hücre agregatı olacak şekilde aktarıldı.



Şekil 2.4. MKH'lerin üç-boyutlu sferoid kültüründe asılı damla yöntemi uygulamasının şematik gösterimi. Bu şekil BioRender.com kullanılarak hazırlandı.

2.15. 3B Kültür Deney Gruplarının Belirlenmesi

Hücre-ECM yoğunluk farkının kondrojenik farklılaşma üzerine etkisini gözlemlemek üzere Çizelge 2.2 de gösterildiği gibi 2 farklı tam kültür ortamı ve 4 farklı κ -karragenan konsantrasyonu ile 8 grup oluşturuldu. Deney grupları, hücre-ECM yoğunluk oranı farkını oluşturmak için sferoidlerdeki hücre sayısı sabit tutularak κ -karragenan'ın oranı değiştirilmek suretiyle oluşturuldu. κ -karragenan konsantrasyonları 0, 50, 100 ve 250 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi. Zaman noktaları olarak ise, her konsantrasyon için 0, 7, 14, 21, 28, ve 35. günler belirlendi.

Çizelge 2.2. Deney grupları.

Gruplar Zaman Noktaları	Standart Tam Kültür Ortamı				Kondrojenik Tam Kültür Ortamı			
	Kontrol 0 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml	Kontrol 0 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
0. Gün								
7. Gün								
14. Gün								
21. Gün								
28. Gün								
35. Gün								

2.16. Poli-HEMA Kaplaması

3B kültür deneylerinde sferoidlerin yüzeye tutunmasını engellemek için kültür kaplarının yüzeyi poli-HEMA ile kaplandı. 0,6 g poli-HEMA (Sigma-Aldrich) 20 mL % 95’lik etanol içinde gece boyunca 37°C sıcaklıkta karıştırılarak çözdürüldü. Kültür kaplarının yüzeyleri poli-HEMA ile kaplanması için, poli-HEMA stok çözeltisi, 96-kuyulu kültür kaplarının her bir kuyusuna 50 µL, 48-kuyulu kültür kaplarının her bir kuyusuna 150 µL ve 6-kuyulu kültür kaplarının her bir kuyusuna 1,5 mL olacak şekilde aktarıldı. poli-HEMA’nın tüm yüzeyi kaplaması için kaplar çevrilerek yayılma sağlandı. Kaplar gece boyunca kurumaya bırakıldı ve daha sonra kullanımdan hemen önce PBS (pH:7.4) çözeltisi ile 2 kez yıkandı (Min ve ark., 2021). Poli-HEMA kaplamaları kullanımdan kısa süre önce yapılarak, kurumanın önüne geçildi.

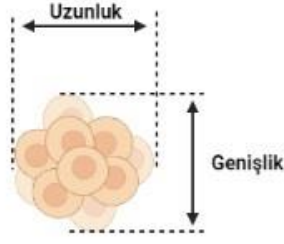
2.17. Sferoidlerin Çap Ölçümü

Plasentanın 5 farklı anatomik bölgesinden izole edilen MKH'lerden aynı hücre sayısında aynı koşullarda hazırlanan sferoidler 72 saat sonrasında morfolojik olarak şekil ve boyut (çap, alan ve çevre) yönünden değerlendirildi. 3B sferoidlerin morfolojik parametrelerinin çap (R), alan (A) ve çevre (Ç) ölçümleri için ImageJ yazılımı kullanıldı. Şekil 2.5'de gösterilen formül ile sferoidlerin dairesellikleri hesaplandı. Mikrometre cinsinden ifade edilen ölçümler için referans olarak her görüntünün çubuk boyutu ile belirlendi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edildi. Asılı damla yöntemiyle elde edilen 5 adet sferoid rastgele ölçüldü. Yapılan değerlendirmelerden sonra tez çalışmasının UK-MKH'leri ile yapılmasına karar verildi.

$$F \text{ dairesellik} = 4\pi A / \text{Ç}^2$$

Şekil 2.5. F dairesellik hesaplama formülü.

UK-MKH'leri ile hazırlanan yüksek yoğunluklu 3B sferoidler asılı damla yöntemiyle oluşturuldu. Tüm konsantrasyonlar için elde edilen sferoidler 0, 7, 14, 21, 28 ve 35. günlerde invert mikroskop (T1-SM, Nikon) ile gözlemlendi ve görüntüler Nikon Coolpix P5100 marka fotoğraf makinesi kullanılarak fotoğraflandı. 3B sferoidlerin tüm zaman noktalarındaki Şekil 2.6 da gösterilen morfolojik parametrelerin ölçümleri için ImageJ yazılımı kullanıldı. Şekil 2.5'de gösterilen formül ile sferoidlerin dairesellikleri hesaplandı. Asılı damla yöntemiyle elde edilen 10-18 adet sferoid rastgele ölçüldü. Deneyler, tüm gruplar için 4 farklı donörden elde edilen karma kültürün üç biyolojik kopyası şeklinde gerçekleştirildi (n=3) (Côtés ve ark., 2021; Stuart ve ark., 2017).



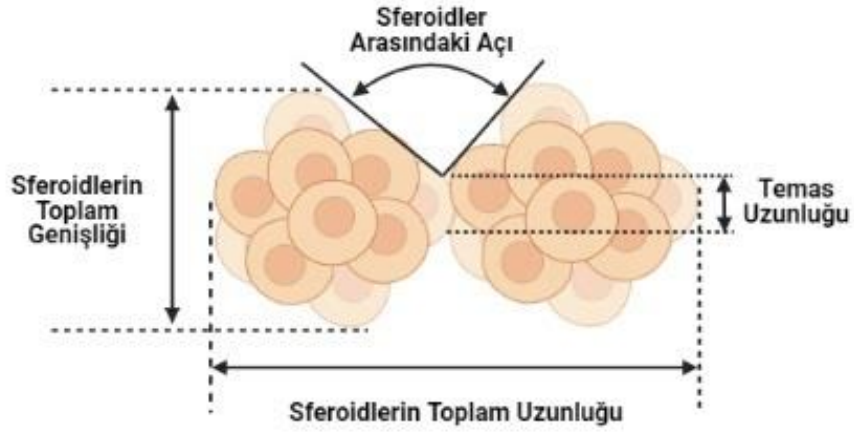
Şekil 2.6. Sferoid çap ölçümlerinin gösterimi. Bu şekil BioRender.com kullanılarak hazırlandı.

2.18. Sferoidlerin Rastgele Birleşmesinde Füzyon Deneyleri

Büyük dokuları oluşturmak için yapı taşları olarak görülen sferoidlerin rastgele birleşme kapasiteleri iki yöntem kullanılarak test edildi.

2.18.1. Çiftlerin Füzyonu

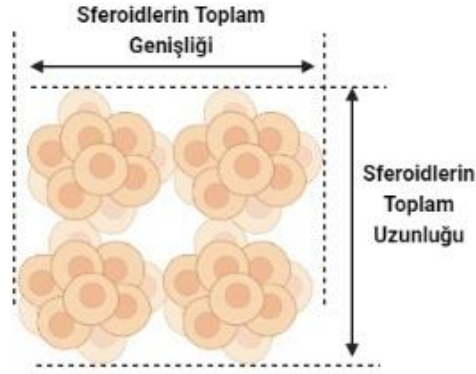
Asılı damla yöntemiyle oluşturulmuş 2 adet sferoid poli-HEMA kaplı 96-gözlü kapların kuyucuklarına aktarıldı. Her kuyucuğa 2 sferoid olacak şekilde dikkatlice yerleştirildi ve 200 μ L besiyeri eklendi. Çiftlerin füzyonu deneyi tüm konsantrasyonlar için 3 donörden elde edilen karma kültürden üç biyolojik kopya şeklinde gerçekleştirildi (n=3). 15 çiftin (çift sferoidin) görüntüleri 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96 ve 168 saatlik kültürler sonrasında analiz edildi. Birleşmiş sferoid çiftlerinin ölçümleri Şekil 2.7 de gösterildiği gibi arasındaki açı, ikili uzunluk, ikili genişlik ve temas uzunluğu ImageJ kullanılarak ölçüldü (De Moor ve ark., 2020).



Şekil 2.7. Çift füzyon testinde ölçülen morfolojik parametrelerin şematik gösterimi. Bu şekil BioRender.com kullanılarak hazırlandı.

2.18.2. Çoklu Sferoidlerin Füzyonu

Çoklu sferoidlerin bir makro doku oluşturmak üzere birleşme kapasitesini değerlendirmek için asılı damla yöntemiyle oluşturulan 4 adet sferoid poli-HEMA kaplı 48-li kabın kuyucuklarına aktarıldı. Her kuyucuğa 4 sferoid olacak şekilde dikkatlice yerleştirildi ve 2 ml besiyeri eklendi. Çoklu füzyonun takibi için görüntüleri 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96 ve 168 saatlik kültürden sonra analiz edildi. Çoklu sferoidlerin ölçümleri Şekil 2.8 de gösterildiği gibi toplam uzunluk, toplam genişlik ve çevresi ImageJ yazılımı kullanıldı. Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edildi. Çoklu füzyon deneyinde tüm konsantrasyonlar için 3 donörden elde edilen karma kültürden üç biyolojik kopya şeklinde gerçekleştirildi (n=3). (Côrtes ve ark., 2021; Stuart ve ark., 2017; De Moor ve ark., 2020)



şekil 2.8. Çoklu sferoidlerin değerlendirmesinde ölçülen morfolojik parametrelerin şematik gösterimi. Bu şekil BioRender.com kullanılarak hazırlandı.

2.19. Histokimyasal Analizler

Tüm grup ve zaman noktalarına ait sferoidler toplanarak 15 dakika boyunca % 4'lük paraformaldehit (PFA) içinde sabitlendi. Örnekler, onbeş dakika sonrasında iki kez PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra %7,5'lik sükröz çözeltisi eklendi ve gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün öncelikle %15'lik sükröz çözeltisi içine alınıp 15 dk beklendi ve daha sonra %30 sükröz çözeltisi ile değiştirildi. Takiben sferoidler, donmuş doku örneği (OCT Sakura Tissue-Tek, Alphen aan den Rijn, Hollanda) ortamına gömüldü ve -80 °C sıcaklıktaki dondurucuya kaldırıldı. Sferoidler, 20-30 µm kalınlıktaki kesitler elde etmek için kriyostat kullanılarak kesildi. Lizin kaplı cam mikroskop slaytlarında kesitler alındı ve boyama yapılana kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

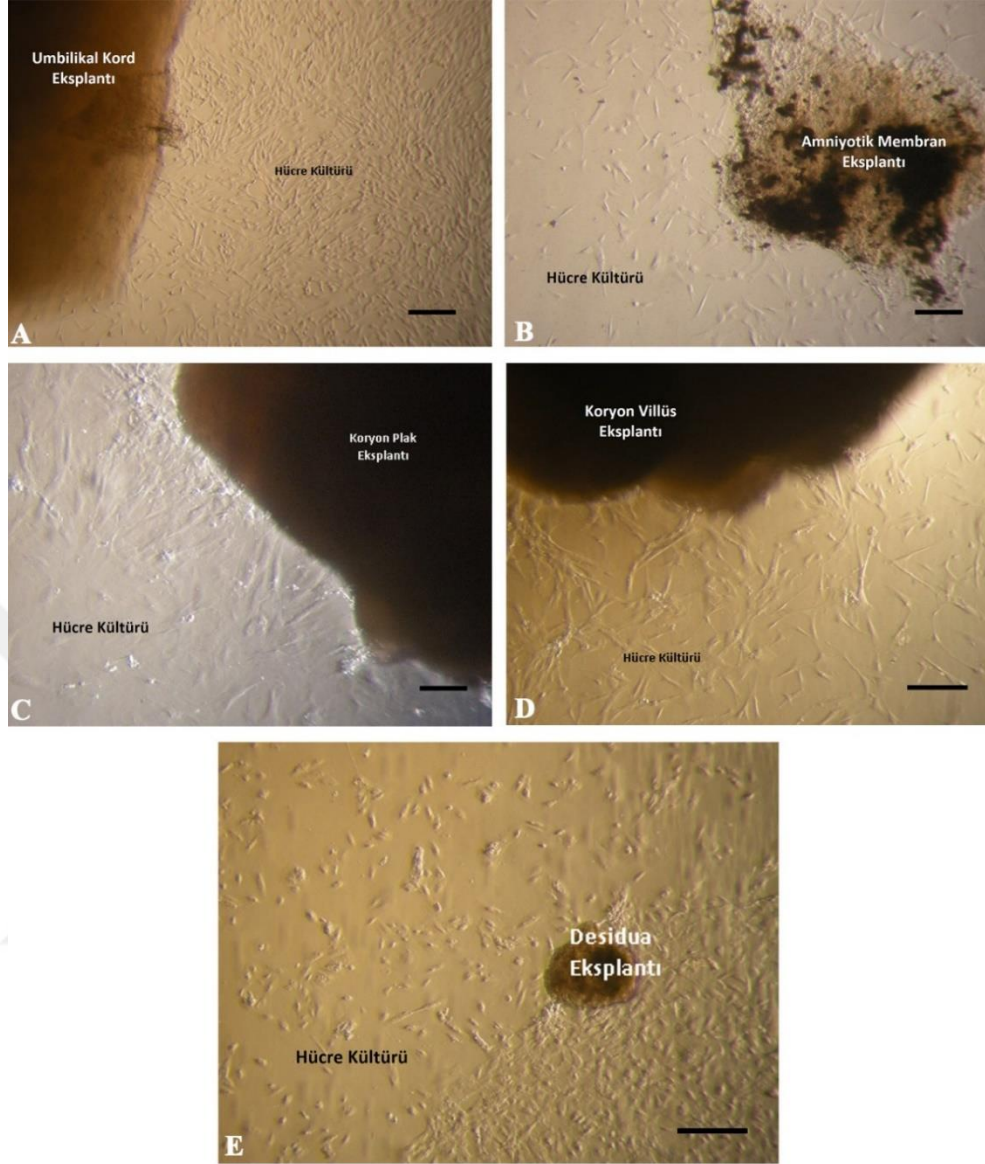
3. BULGULAR

3.1. Plasentanın Anatomik Diseksiyonu

Plasentanın fetal yüzeyinden umbilikal kord, amniyotik membran ve koryon plak, maternal yüzeyinden koryon villus ve desidua bazalis kısımlarından doku parçaları alındı.

3.2. Plasentadan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

Eksplant kültür yöntemi ile plasentanın 5 farklı anatomik bölgesinden (umbilikal kord, amniyotik membran, koryon plak, koryon villus ve desidua bazalis) MKH izolasyonları yapıldı. UK-MKH (n=4), AM-MKH (n=4), KP-MKH (n=3), KV-MKH (n=3) ve DB-MKH (n=3) farklı biyolojik kopya ile oluşturulan havuzdan alt kültürleri kullanıldı. Şekil 3.1 de eksplant kültürlerin faz-kontrast mikroskop görüntüleri görülmektedir.

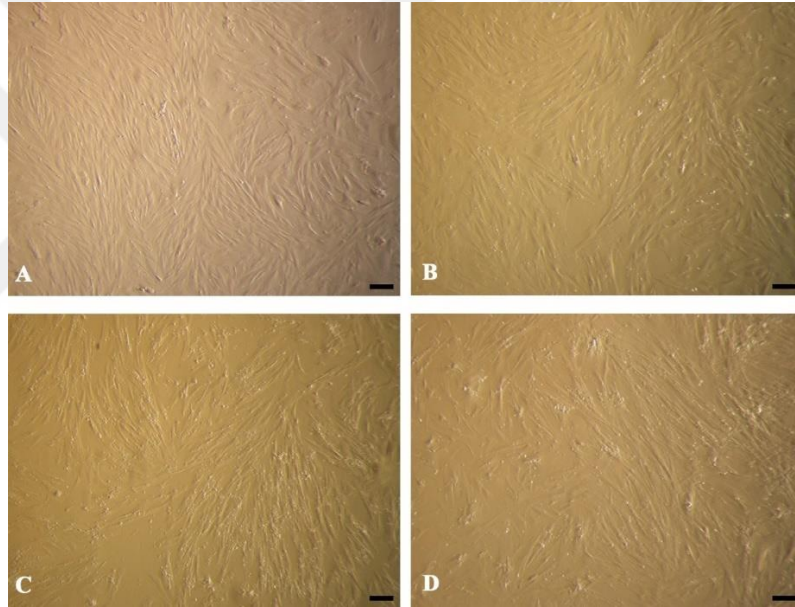


Şekil 3.1. (A) Umbilikal kord (B) Amniyotik Membran (C) Koryon plak (D) Koryon villüs (E) Desidua bazalis eksplant kültürlerinin faz-kontrast mikroskobu görüntüsü. Ölçek çubuğu = 150 µm.

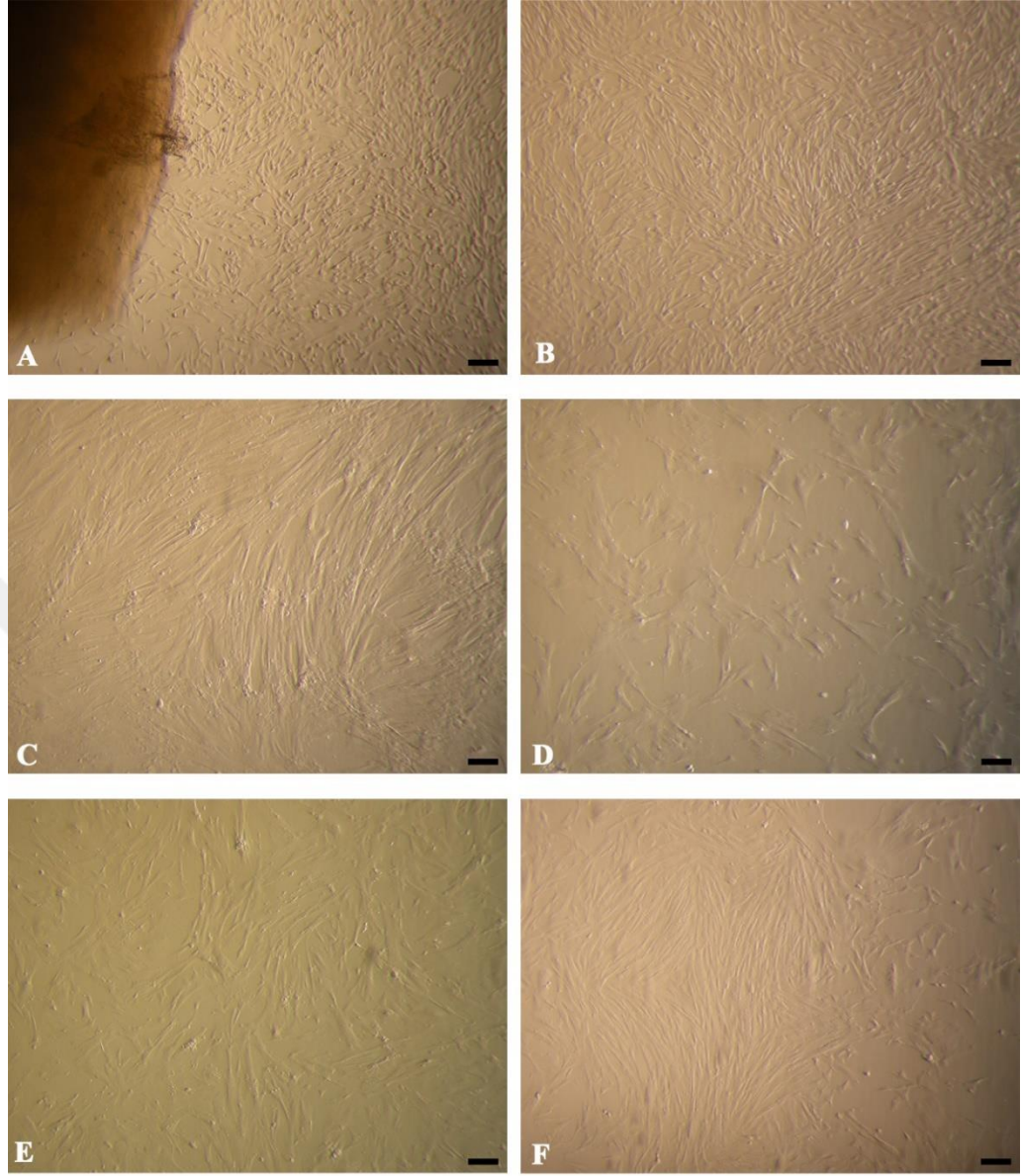
3.3. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu

3.3.1. Mikroskop ile Görüntüleme

Plasentanın tüm dokularından izole edilen MKH'lerin hücre morfolojilerinin fibroblastik yapıda olduğu faz kontrast mikroskopik inceleme ile gözlemlendi (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3). Hücreler de alt kültür genişlemesi sırasında kendiliğinden farklılaşma gözlemlenmedi.



Şekil 3.2. Plasenta kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin farklı pasajlardaki faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (A) AM-MKH P3. (B) KP-MKH P3. (C) KV-MKH P1. (D) DB-MKH P3. Ölçek çubuğu = 150 µm.

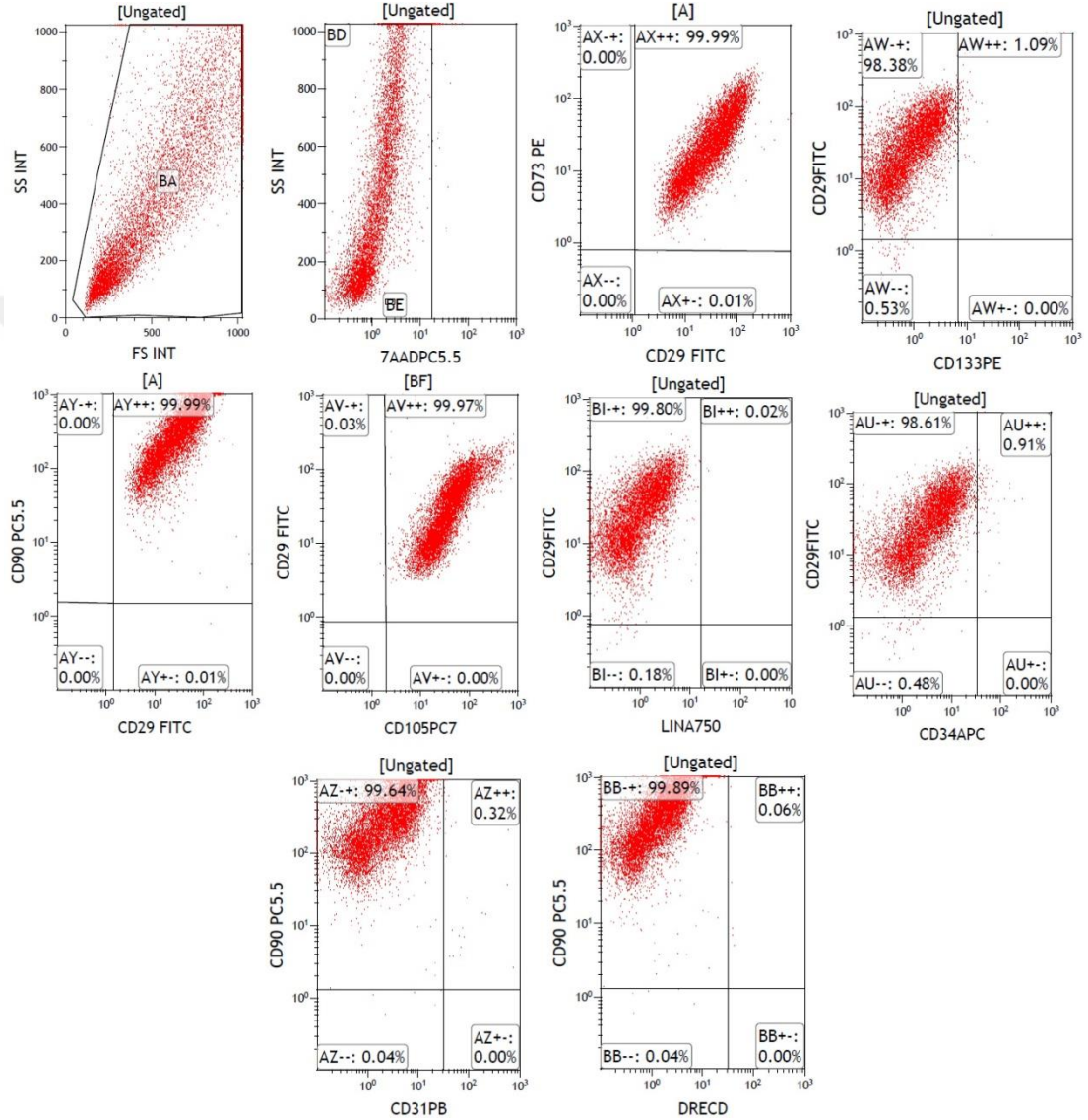


Şekil 3.3. Umbilikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin farklı pasajlardaki faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (A) UK-MKH P0 – Eksplant kültür. (B) UK-MKH P1. (C) UK-MKH P2. (D) UK-MKH P3. (E) UK-MKH P4. (F) UK-MKH P5. Ölçek çubuğu = 150 μ m.

3.3.2. İmmünojenotip ve Hücre Canlılığı Analizi

Umbilikal kord dokusundan izole edilen mezenkimal kök hücrelerinin immünojenotip profilini hem P2 hem de P4 de belirlemek için akım sitometri ile

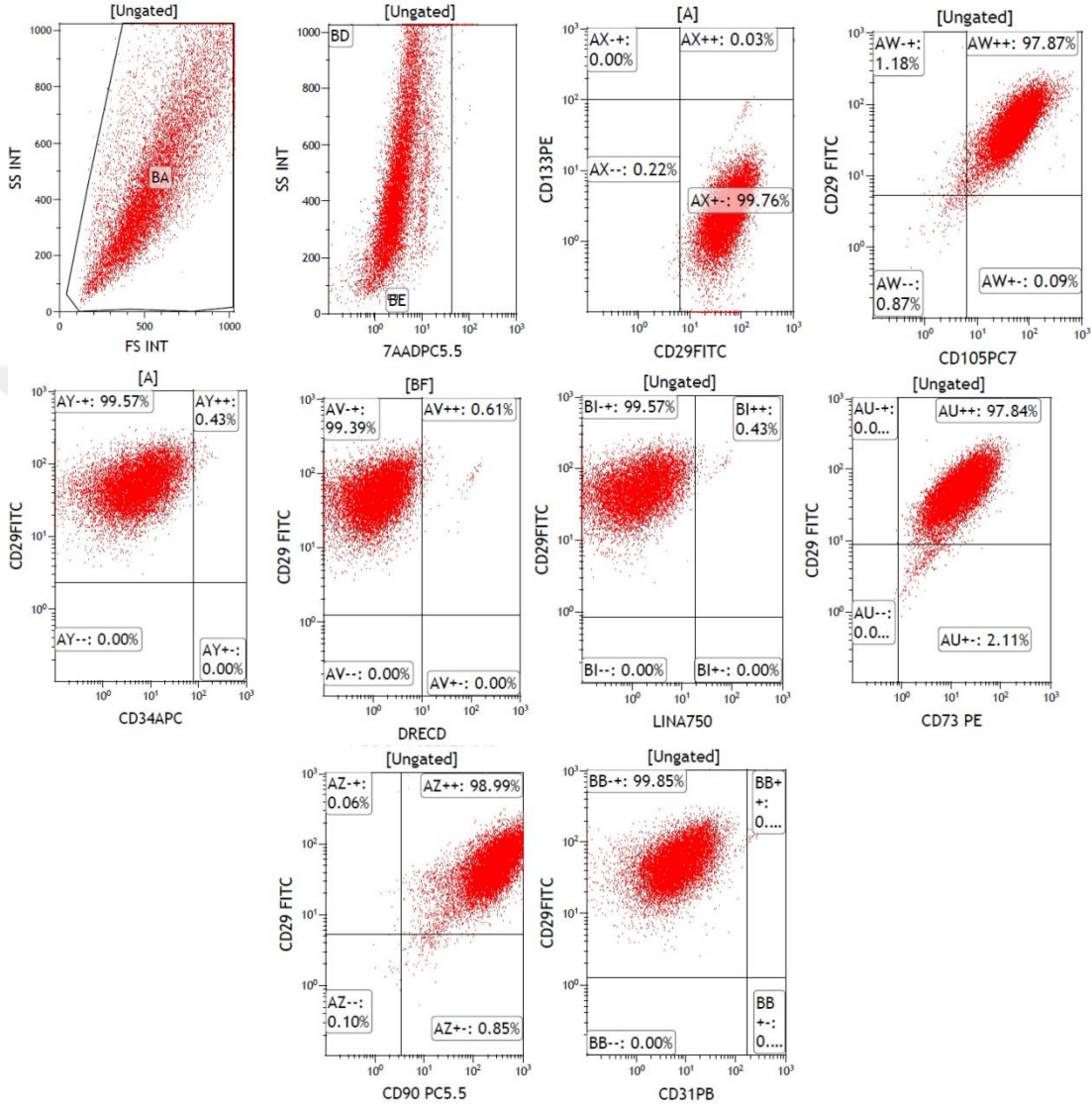
analiz yapıldı. Her iki pasajdaki UK-MKH'lerinin; CD73, CD90, CD105 ve CD29 MKH yüzey belirteçlerini yüksek oranda ifade ettikleri, diğer yandan CD34, CD31, CD133, LIN (CD3, CD14, CD19, CD45), HLA hematopoietik kök hücre yüzey belirteçlerini ifade etmedikleri tespit edildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Akım sitometri ile UK-MKH'lerinin yüzey belirteçlerinin ifadesi.

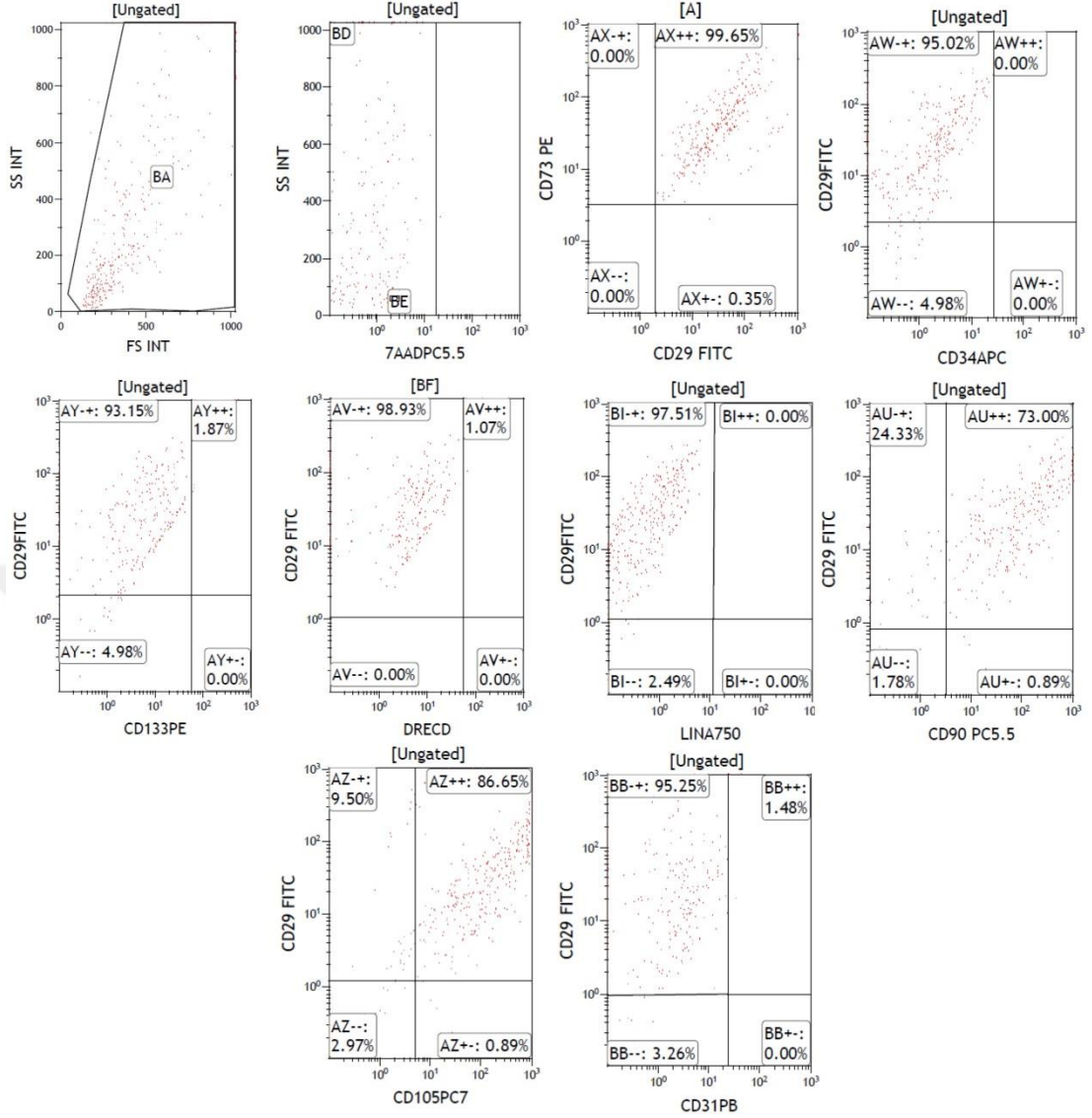
Amniyotik membrandan izole edilen mezenkimal kök hücrelerinin immünofenotip profilini belirlemek için P2 hücreler akım sitometri ile analiz edildi. AM-MKH'lerinin; CD73, CD90, CD105 ve CD29 MKH yüzey belirteçlerini yüksek oranda ifade ettikleri, diğer yandan CD34, CD31, CD133, LIN (CD3, CD14, CD19,

CD45), HLA hematopoietik kök hücre yüzey belirteçlerini ifade etmedikleri tespit edildi (Şekil 3.5).



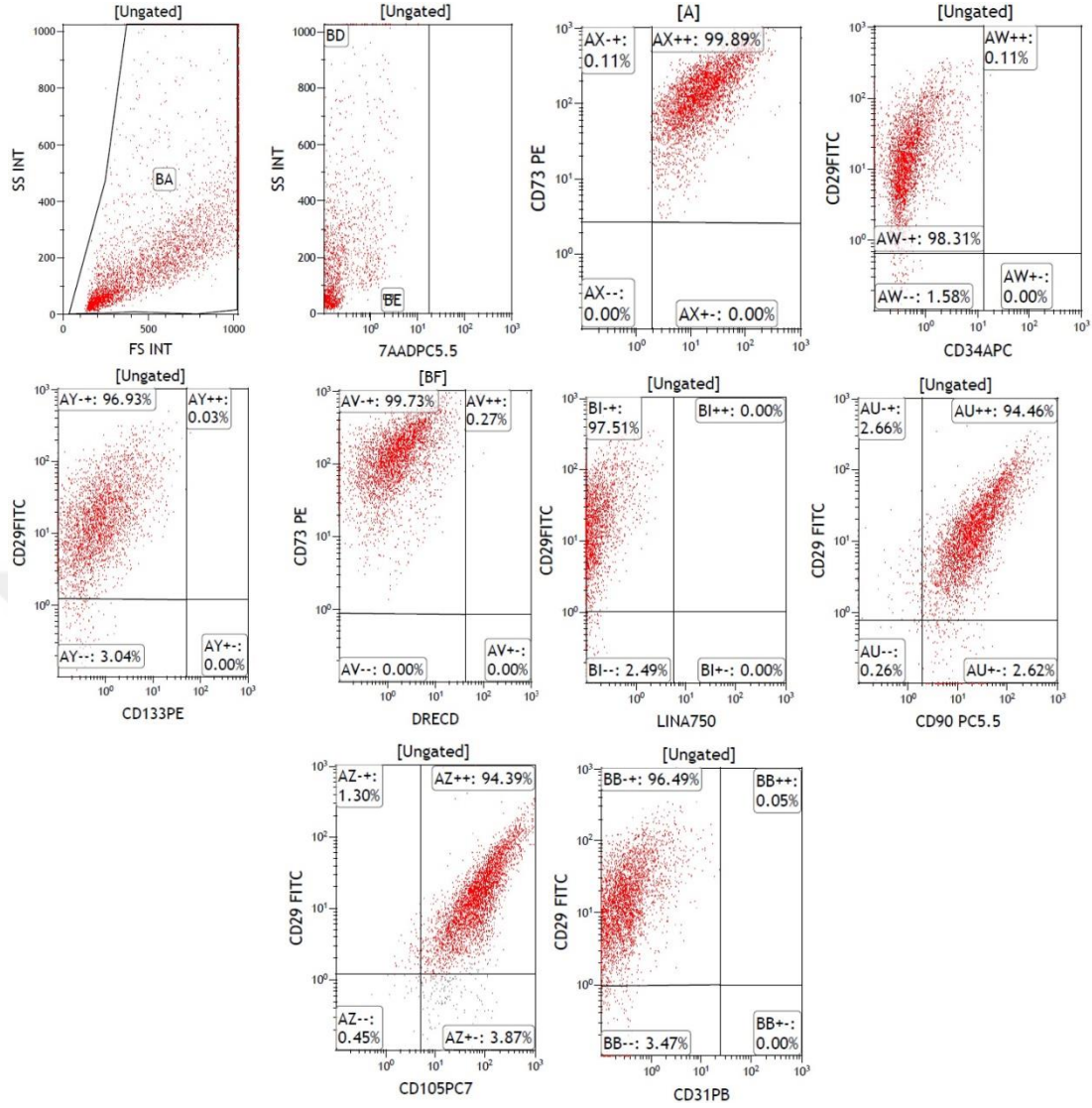
Şekil 3.5. Akım sitometri ile AM-MKH'lerinin yüzey belirteçlerinin ifadesi.

Koryon plak dokusundan izole edilen mezenkimal kök hücrelerinin immünofenotip profilini belirlemek için P1 hücreler akım sitometri ile analiz edildi. KP-MKH'lerinin; CD73, CD90, CD105 ve CD29 MKH yüzey belirteçlerini yüksek oranda ifade ettikleri, diğer yandan CD34, CD31, CD133, LIN (CD3, CD14, CD19, CD45), HLA hematopoietik kök hücre yüzey belirteçlerini ifade etmedikleri tespit edildi (Şekil 3.6).



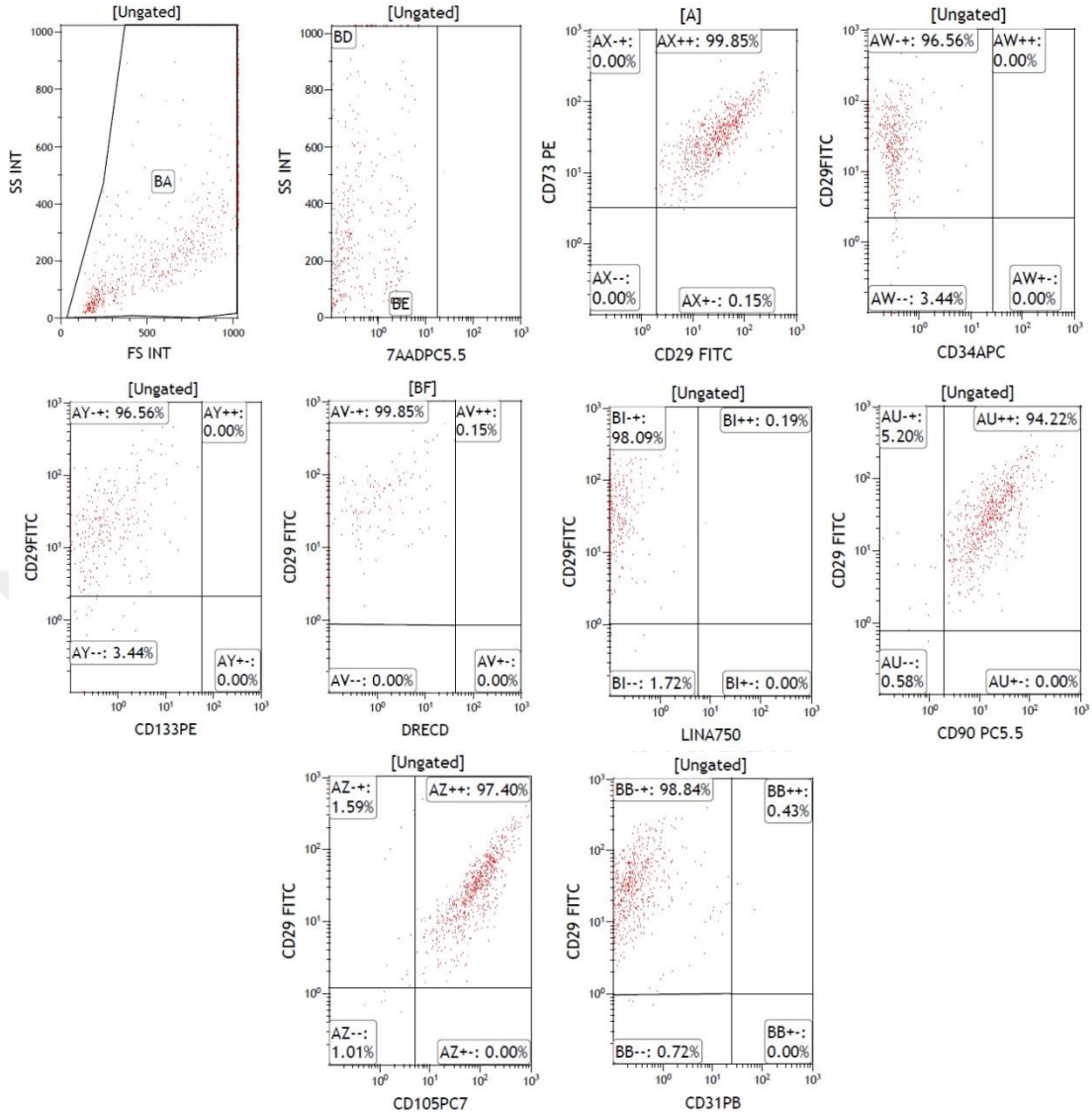
Şekil 3.6. Akım sitometri ile KP-MKH'lerinin yüzey belirteçlerinin ifadesi.

Koryon villus dokusundan izole edilen mezenkimal kök hücrelerinin immünofenotip profilini belirlemek için P1 hücreler akım sitometri ile analiz edildi. KV-MKH'lerinin; CD73, CD90, CD105 ve CD29 MKH yüzey belirteçlerini yüksek oranda ifade ettikleri, diğer yandan CD34, CD31, CD133, LIN (CD3, CD14, CD19, CD45), HLA hematopoietik kök hücre yüzey belirteçlerini ifade etmedikleri tespit edildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Akım sitometri ile KV-MKH'lerinin yüzey belirteçlerinin ifadesi.

Desidua bazalis dokusundan izole edilen mezenkimal kök hücrelerinin immünofenotip profilini belirlemek için P3 hücreler akım sitometri ile analiz edildi. DB-MKH'lerinin; CD73, CD90, CD105 ve CD29 MKH yüzey belirteçlerini yüksek oranda ifade ettikleri, diğer yandan CD34, CD31, CD133, LIN (CD3, CD14, CD19, CD45), HLA hematopoietik kök hücre yüzey belirteçlerini ifade etmedikleri tespit edildi (Şekil 3.8).

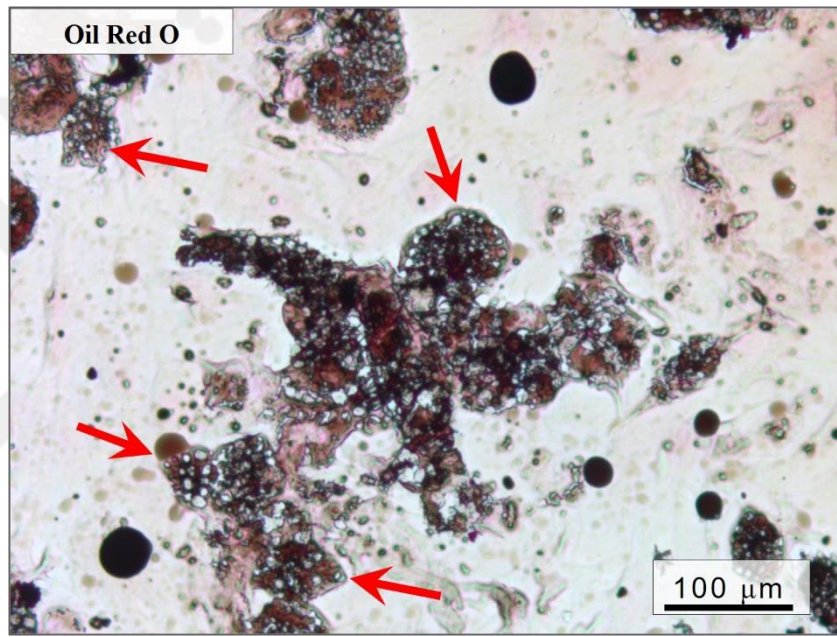


Şekil 3.8. Akım sitometri ile DB-MKH'lerinin yüzey belirteçlerinin ifadesi.

3.3.3. UK-MKH'lerin Üçlü Soya Farklılaştırılması

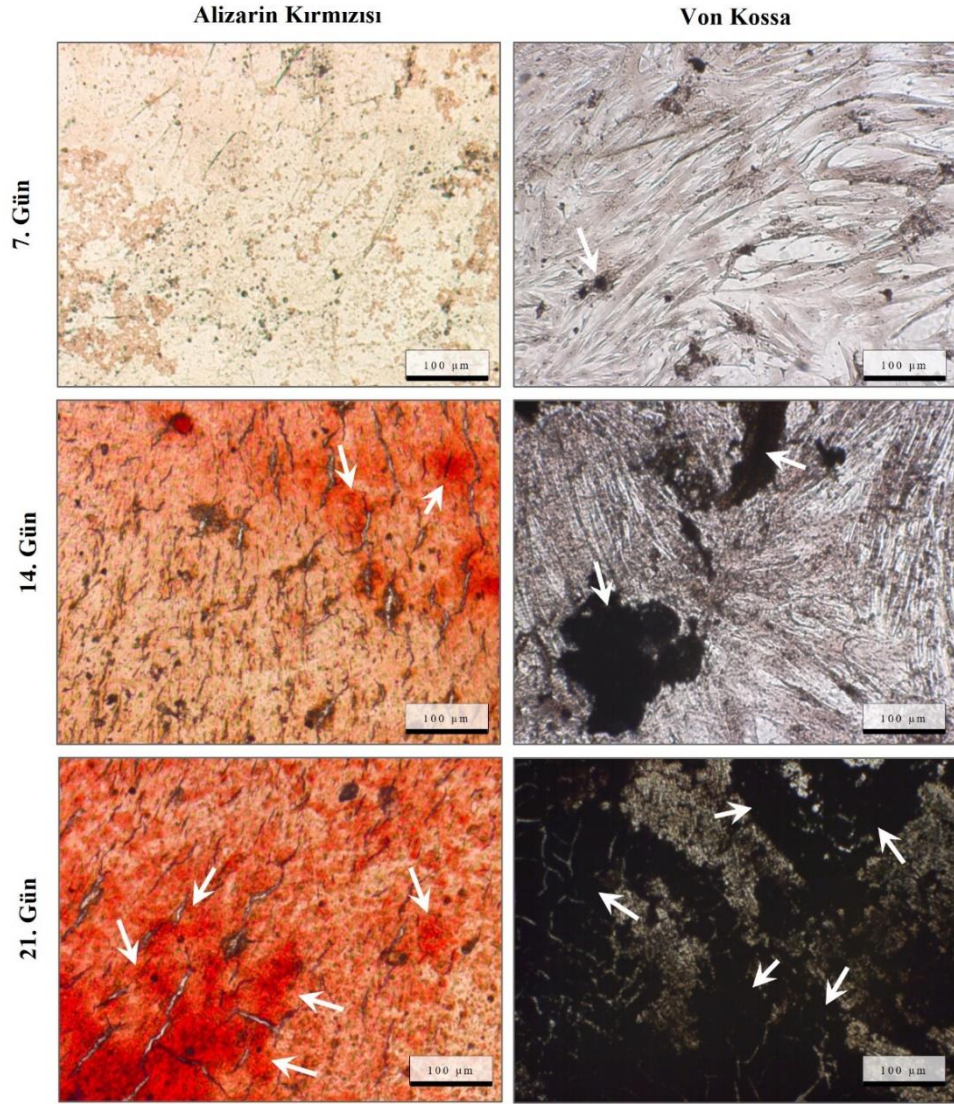
UK-MKH'leri farklı indüksiyon koşulları altında çoklu soya farklılaşma potansiyelini doğrulamak için adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma açısından incelendi. Çoklu soya farklılaştırma deneylerinde P4 UK-MKH'leri kullanıldı.

UK-MKH'lerin adipojenik farklılaşma potansiyelleri adipojenik tam kültür ortamında kültürlendikten sonra Oil Red O boyaması yapılarak lipid damlacıklarının biriktiği ve adipositlere farklılaştığı görüldü. Oil Red O boyamasında adipojenik farklılaştırılmış hücrelerin turuncu-kırmızı Oil Red O boyandığı görüldü. Şekil 3.9 da adipojenik nesile farklılaşmış hücelere ait lipid damlacıklarını içeren vaküoller oklar ile gösterildi. UK-MKH'leri sadece standart tam kültür ortamında negatif kontrol olarak kültürlendiğinde limit damlacıklarının birikimi gözlemlenmedi.



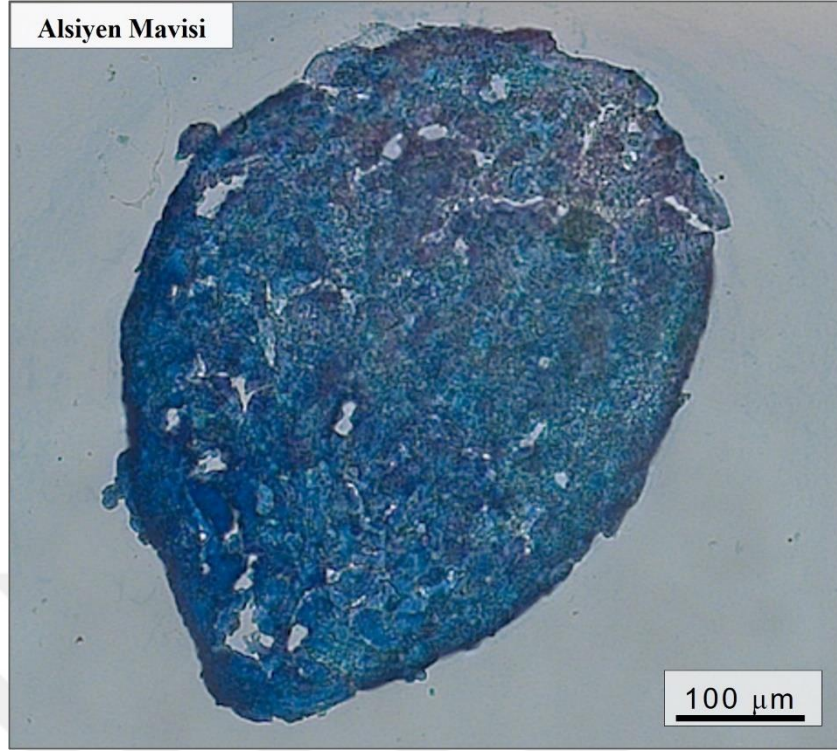
Şekil 3.9. UK-MKH'lerin adipojenik farklılaşma potansiyelinin Oil Red O histokimyasal boyaması. Ölçü çubuğu = 100 µm.

UK-MKH'lerin osteojenik farklılaşma potansiyelleri osteojenik tam kültür ortamında kültürlendikten sonra Alizarin kırmızısı ve von Kossa boyamaları yapılarak osteoblastlara farklılaşmaya teşvik ettiği görüldü. Şekil 3.10'daki ışık mikroskobu görüntülerin mineralize kalsiyum birikimleri (oklar) hücrelerin kültür zamanına bağımlı olarak kademeli şekilde osteojenik yönde farklılaştıklarını göstermektedir. UK-MKH'leri sadece standart tam kültür ortamında negatif kontrol olarak kültürlendiğinde Alizarin kırmızısı ve von Kossa boyamalarının negatif olduğu görüldü.



Şekil 3.10. UK-MKH'lerin osteojenik farklılaşma potansiyelinin alizarin kırmızısı ve von Kossa histokimyasal boyamaları. Ölçü çubukları = 100 µm.

UK-MKH'lerin kondrojenik farklılaşma potansiyelleri 3B pellet kültür kondrojenik tam kültür ortamında 35 gün kültürlendikten sonra çok katmanlı hücre peletinin hücre dışı matris açısından zengin bir morfoloji geliştirdiği görüldü. Şekil 3.11'deki ışık mikroskobu görüntülerinde alsiyen mavisi ile boyanmış hücre dışı matrikste biriken glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar gözlemlendi. UK-MKH'leri sadece standart tam kültür ortamında negatif kontrol olarak kültürlendiğinde alsiyen mavisi boyamasının negatif olduğu belirlendi.

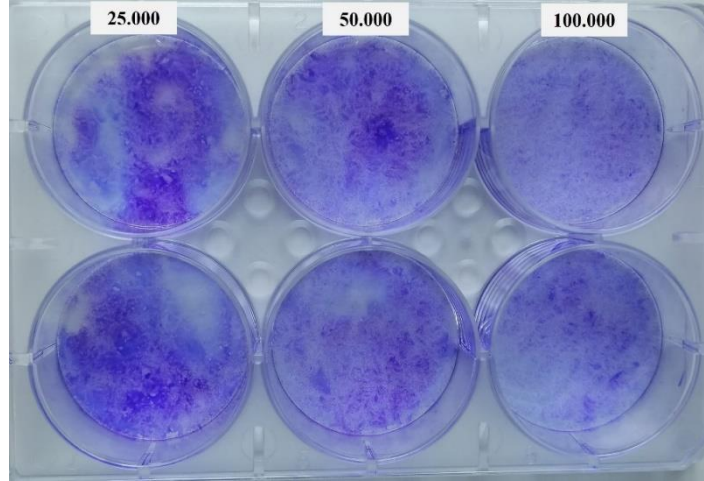


Şekil 3.11. UK-MKH'lerin kondrojenik farklılaşma potansiyelinin Alsiyen mavisi histokimyasal boyaması. Ölçü çubuğu = 100 μ m.

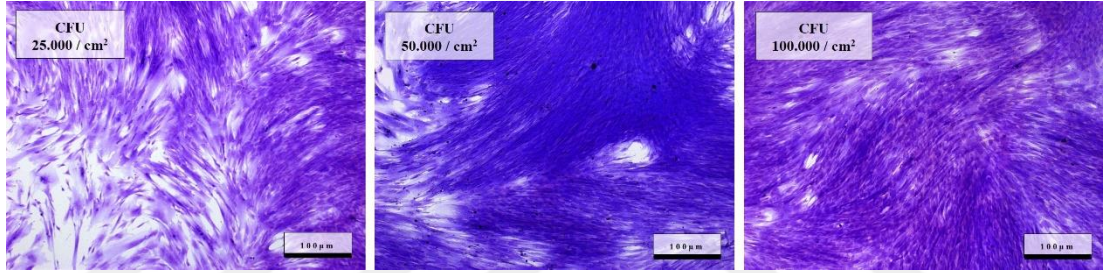
Bu bulgular bu tez çalışmasında kullanılan UK-MKH'lerinin tipik MKH çoklu soy potansiyeli özelliğine sahip olduğunu göstermiştir.

3.3.4. UK-MKH CFU (Koloni Oluşturabilen Birim) Oluşumu

MKH'lerin mezenkimal kök hücre olduklarını doğrulamak ve popülasyon içindeki kök/progenitor hücrelerin frekansını belirlemek için koloni oluşturabilme kapasiteleri incelendi. UK-MKH'lerinin koloni oluşturma kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla farklı hücre yoğunluklarında (25.000, 50.000 ve 100.000) 2 tekrarlı olarak ekimi yapılarak 14 gün sonunda kristal viyole ile boyandı. UK-MKH'lerinin hücre yoğunluğunun artışıyla birlikte koloni oluşturma potansiyellerinin arttığı ve her hücre yoğunluğu için sayılamayacak kadar çok koloni oluşumu gözlemlenmiştir. (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13).



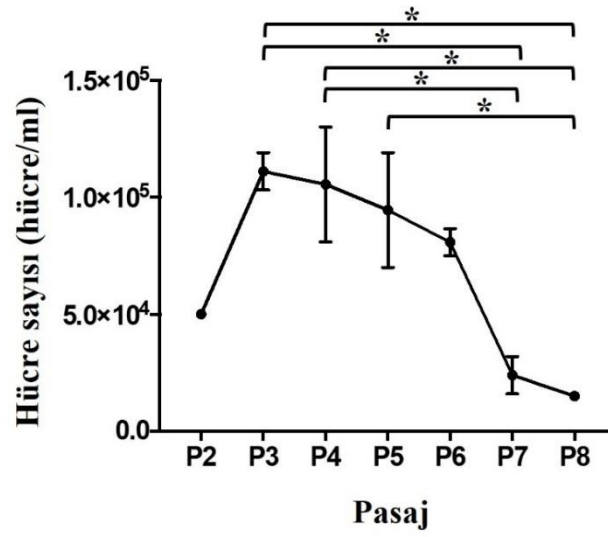
Şekil 3.12. Kristal viyole ile boyanmış UK-MKH'lerin koloni-oluşturma yatkınlık deneyi (klonojenisite; CFU) koloni görüntüleri.



Şekil 3.13. UK-MKH'lerin koloni-oluşturma yatkınlık deneyi (klonojenisite; CFU). 25000, 50000 ve 100000 hücre/cm² yoğunluklarında ekilmiş hücrelerin kristal viyole ile boyanmış ışık mikroskobu görüntüleri. Ölçü çubukları = 100 µm.

3.4. Büyüme Eğrisi

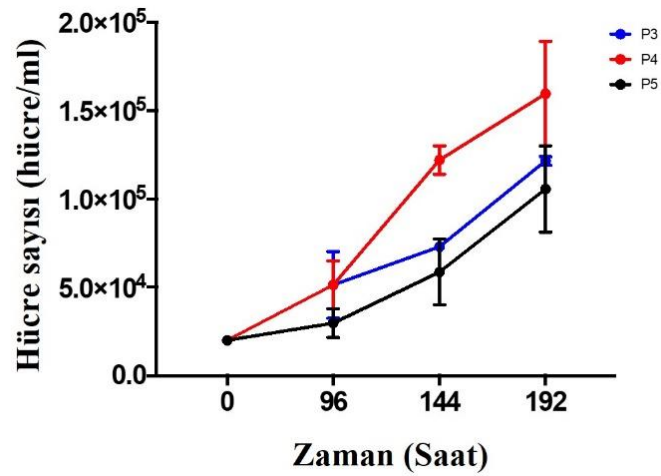
UK-MKH'leri için büyüme eğrisi oluşturuldu. Elde edilen büyüme eğrisi incelendiğinde, gecikme fazının çok kısa sürdüğü ve P3'te log fazına ulaştığı tespit edildi. P6'dan sonra hücre çoğalmasının azaldığı ve P8'de ise plato fazına ulaştığı belirlendi (Şekil 3.14). P3, 4 ve 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmaması log fazının devam ettiğini göstermektedir. P6 sonrasındaki pasajlarda log fazı ile ilişkili pasajlarla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. Bu sebeple deneylerde P3-5 tercih edildi ($p \leq 0.05$).



Şekil 3.14. UK-MKH'lerin büyüme eğrisi grafiği

3.5. Çoğalma Eğrisi Analizi

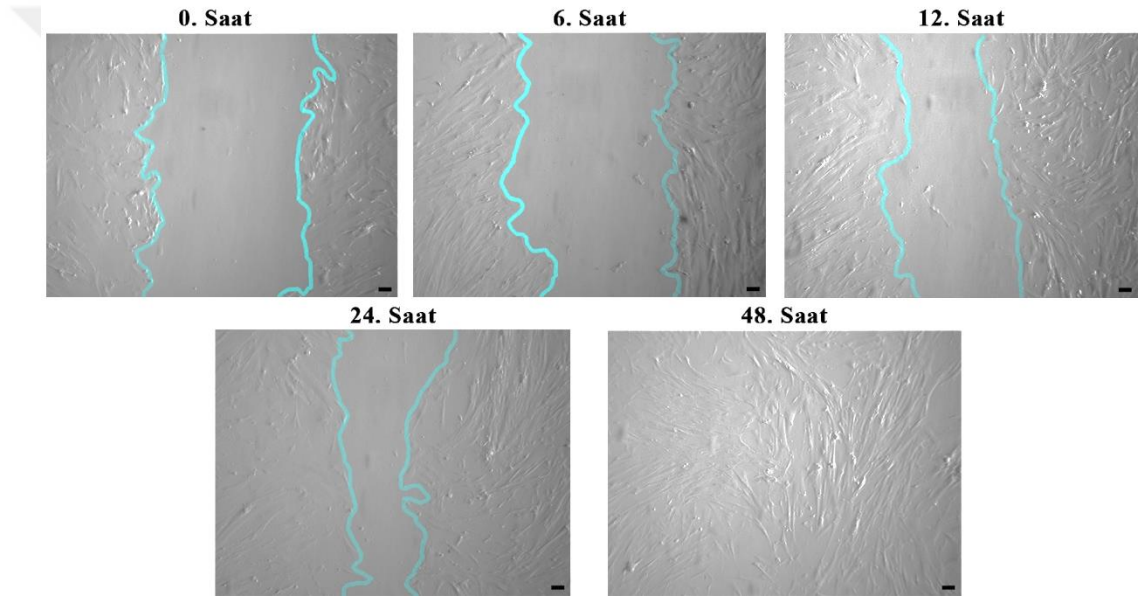
P3, P4 ve P5 UK-MKH'lerin çoğalma kabiliyetleri analiz edildiğinde P4'ün en yüksek çoğalma kapasitesine ulaştığı belirlendi (Şekil 3.15). 3 farklı pasaj için belirlenen zaman noktalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p < 0.05$).



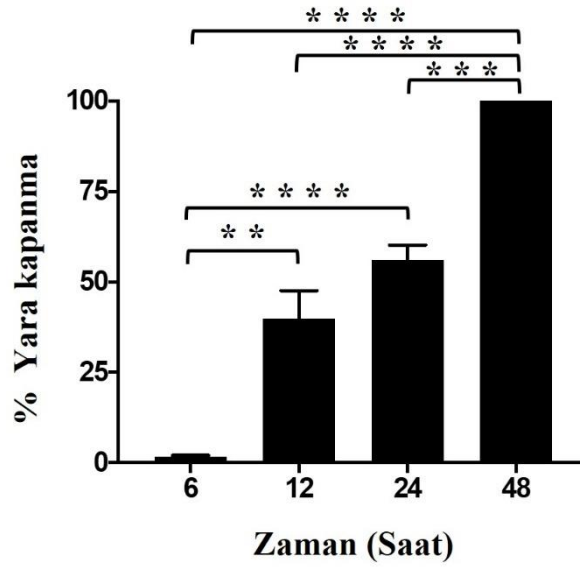
Şekil 3.15 UK-MKH'lerin çoğalma eğrisi grafiği

3.6. *İn Vitro* Migrasyon Testi

UK-MKH'lerinin P4 hücreleri ile *in vitro* migrasyon testi yapılmıştır. *İn vitro* migrasyon testi ile hücrelerin migrasyon ve proliferasyonundan etkilendiğini göz önünde bulundurarak 6, 12, 24 ve 48 saat sonra kapanma yüzdeleri karşılaştırdık ($p \leq 0.05$). Sonuçlar Şekil 3.16 ve Şekil 3.17 de sunulmuştur. Buna göre, hücre migrasyonunun 6. saatte başladığı ve 24. saatten sonra yara alanının hızla kapanarak yüzde yüz oranında kapanmanın gerçekleştiği tespit edildi.



Şekil 3.16. UK-MKH'lerin *in vitro* migrasyon ışık mikroskobu görüntüsü



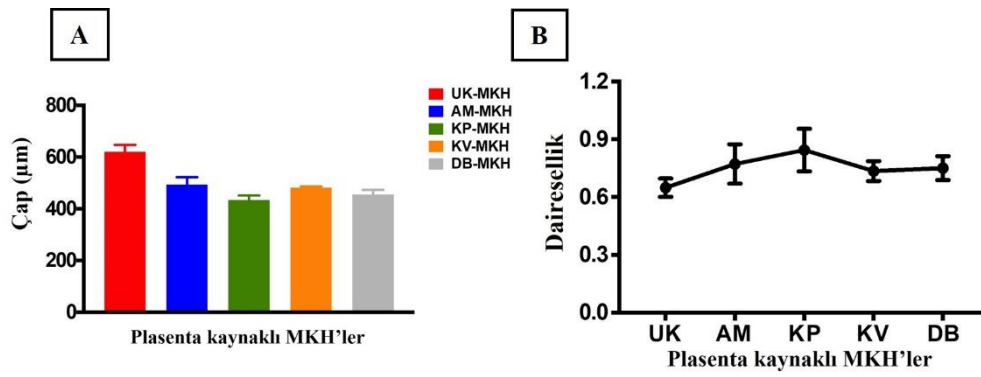
Şekil 3.17. UK-MKH'lerin *in vitro* migrasyon grafiği

3.7. MKH'lerin Üç-Boyutlu Kültürü (Sferoid Kültür)

Plasentanın 5 farklı anatomik bölgesinden izole edilerek P4'e kadar alt kültürü yapılan MKH'lerden aynı hücre sayısında aynı koşullarda sferoidler hazırlandı. Hazırlanan sferoidler; kullanılan hücrenin çoğalma potansiyeli ve morfolojik olarak şekil ve boyutları yönünden değerlendirildi. Asılı damla yöntemiyle 72 saat sonunda toplanan tüm sferoidlerin düzensiz şekilli küresel form kazandığı gözlemlendi (Şekil 3.19). 24 saat sonra alınan ölçümlerde ise, sferoidlerin daireselliklerinin tüm hücre tipleri için birbirlerine çok yakın olduğu tespit edildi (Şekil 3.18). Sferoidlerin ortalama çap ölçüm değerleri Çizelge 3.1'de, çap grafiği Şekil 3.18 de gösterilmiştir. Şekil 3.19 da plasentanın farklı anatomik bölgelerinden izole edilen mezenkimal kök hücreler ile hazırlanan sferoidler gösterilmiştir.

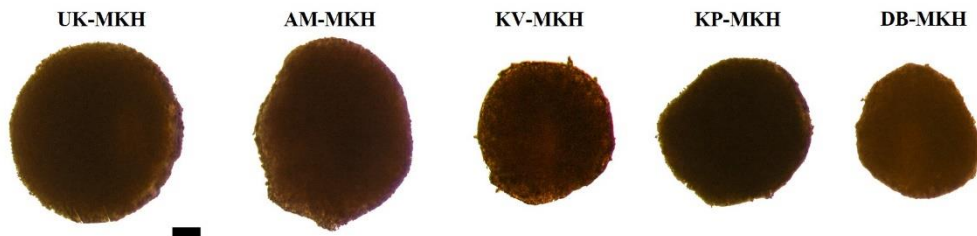
Çizelge 3.1. Plasentanın farklı anatomik bölgelerinden izole edilen MKH'lerden hazırlanan sferoidlerin ortalama çap ölçümleri

Plasentanın Farklı Anatomik Bölgelerinden İzole Edilen MKH	Sferoidlerin Ortalama Çap Ölçümleri
UK-MKH	620.72 ± 24.26 µm
AM-MKH	493.06 ± 26.65 µm
KP-MKH	434.01 ± 15.89 µm
KV-MKH	481.20 ± 4.98 µm
DB-MKH	455.05 ± 16.31 µm



Şekil 3.18. Plazenta kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden elde edilen sferoidlerin çap ve dairesellik grafiği (A) Sferoidlerin küre çapının değerlendirilmesi (B) sferoidlerin daireselliğinin değerlendirilmesi.

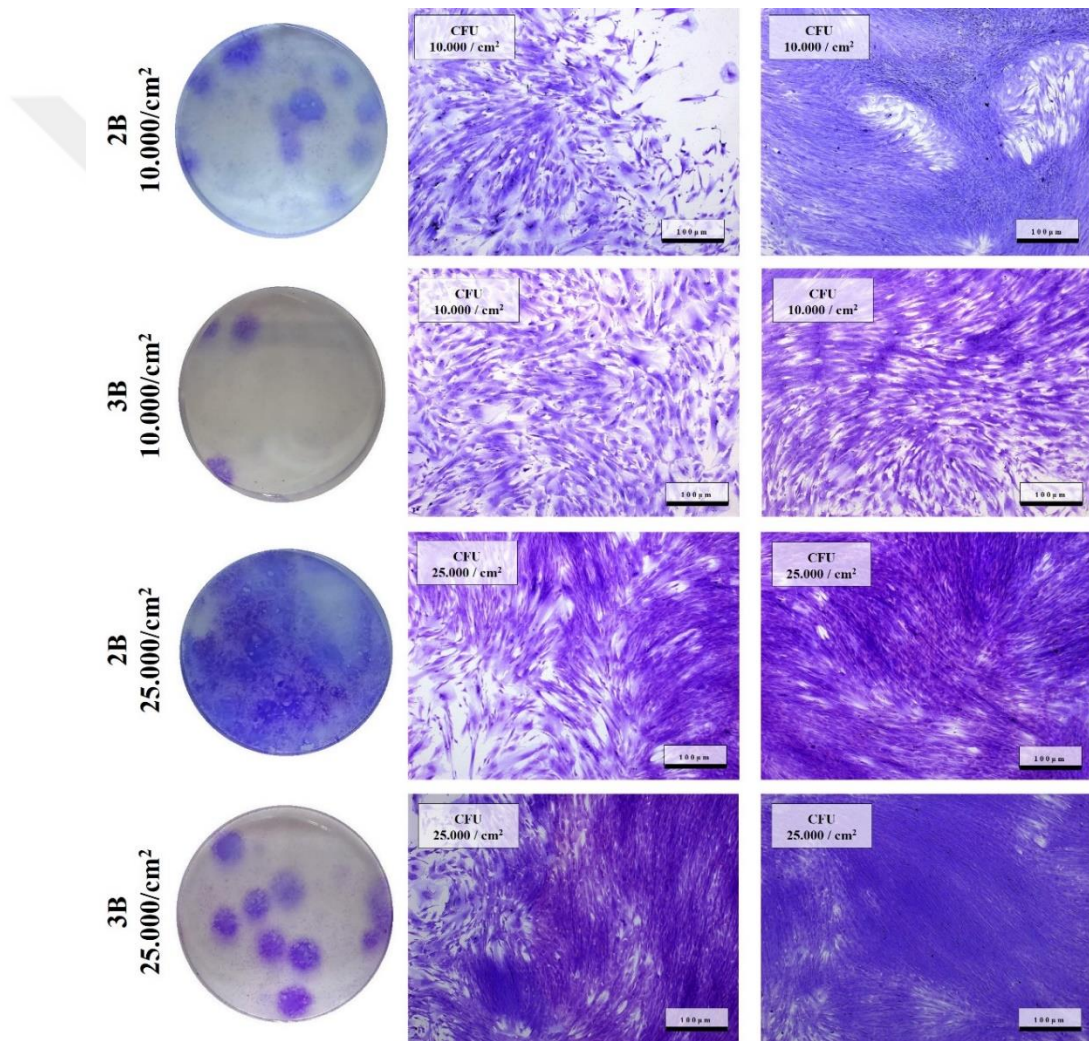
UK-MKH çoğalma kapasitesi bakımından öne çıkması ve elde edilen sferoidlerin formları göz önüne alınarak çalışmanın devamında UK-MKH'leri ile deneylere devam edilmesine karar verildi.



Şekil 3.19. Plasentadan izole edilen MKH'lerden hazırlanan sferoidler

3.8. 2B ve 3B UK-MKH CFU (Koloni Oluşturabilen Birim) Oluşumu

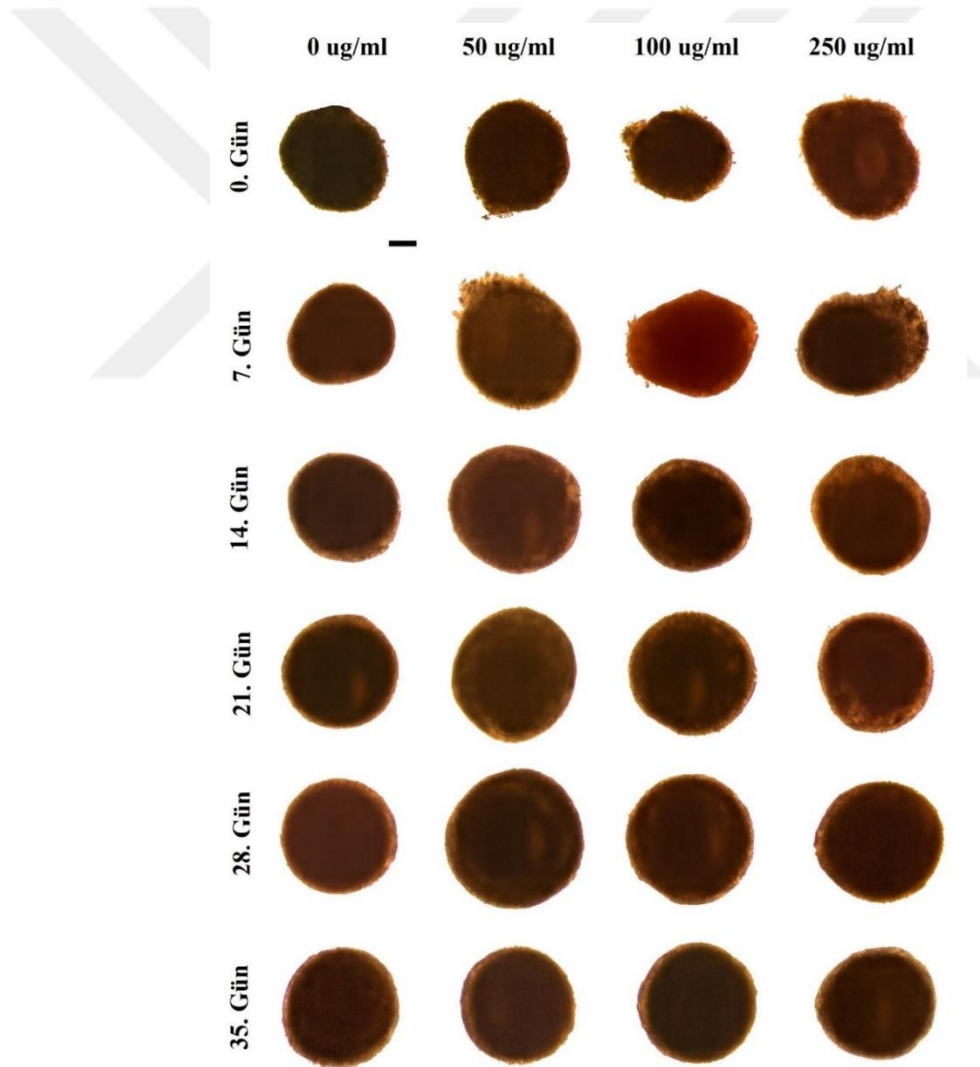
UK-MKH'lerinin CFU oluşum deneyi için hem 2B hem de 3B kültür sonrasında elde edilen hücrelerden iki farklı hücre yoğunluğunda ekimler yapıldı. 2B kültür ve 3B kültür sonrası UK-MKH koloni oluşturabilme kapasiteleri kıyaslandığında 3B kültür sonrası UK-MKH'lerin koloni oluşturabilme kapasitesinin 2B kültür UK-MKH'lere göre önemli ölçüde azaldığı görüldü (Şekil 3.20).



Şekil 3.20. 2B ve 3B UK-MKH'lerin koloni-oluşturma yetkinlik deneyi (klonojenisite; CFU). 10000 ve 25000 hücre/cm² yoğunluğunda ekilmiş hücrelerin kristal viyole boyanmış ışık mikroskobu görüntüleri. Ölçü çubukları = 100 µm.

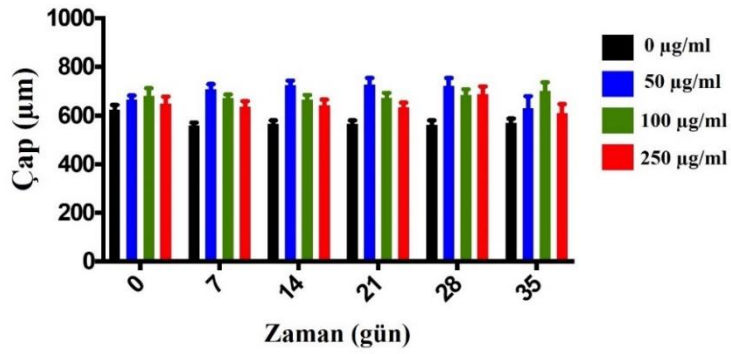
3.9. Sferoidlerin ap lümü

Asılı damla yöntemi ile hem standart tam kültür ortamında hem de kondrojenik tam kültür ortamında farklı κ -Karragenan konsantrasyonlarında sferoidler hazırlandı ve inkübatörde kültüre alındı. 72 saatlik inkübasyon sonunda oluşan sferoidler toplandı ve poli-HEMA kaplı 96 kuyulu kültür kaplarına aktarıldı. Tüm zaman noktaları için çap ölçümleri ve dairesellikleri değerlendirildi. Standart tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin artan kültür süresiyle daha yuvarlak ve kompakt bir form kazandıkları gözlemlendi (Şekil 3.21).



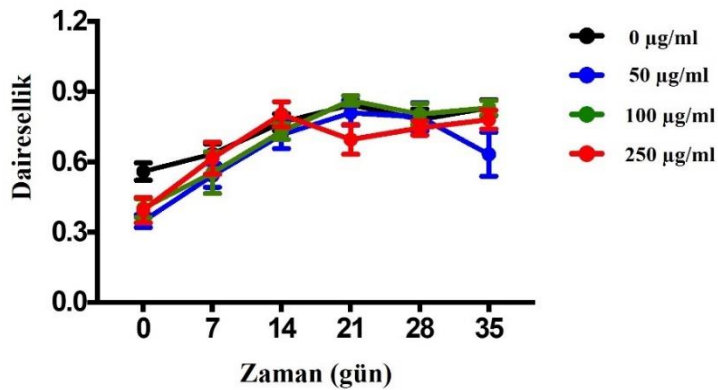
Şekil 3.21. Standart tam kültür ortamındaki 35 günlük kültür süresi boyunca sferoidlerin çapları ve küresellikleri. Ölçek çubuğu 100 m.

Elde edilen sferoidlerin ortalama çap değerleri hesaplandı ve çap ölçüm grafiği hazırlandı. Standart tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin ortalama çap değerlerinin zamana bağımlı olarak daha kompakt bir yapı kazandığı gözlemlendi (Şekil 3.22). Standart tam kültür ortamında 35. günün sonunda en yüksek çap değerinin 100 µg/ml κ-karragenan konsantrasyonuna sahip grupta olduğu gözlemlendi.



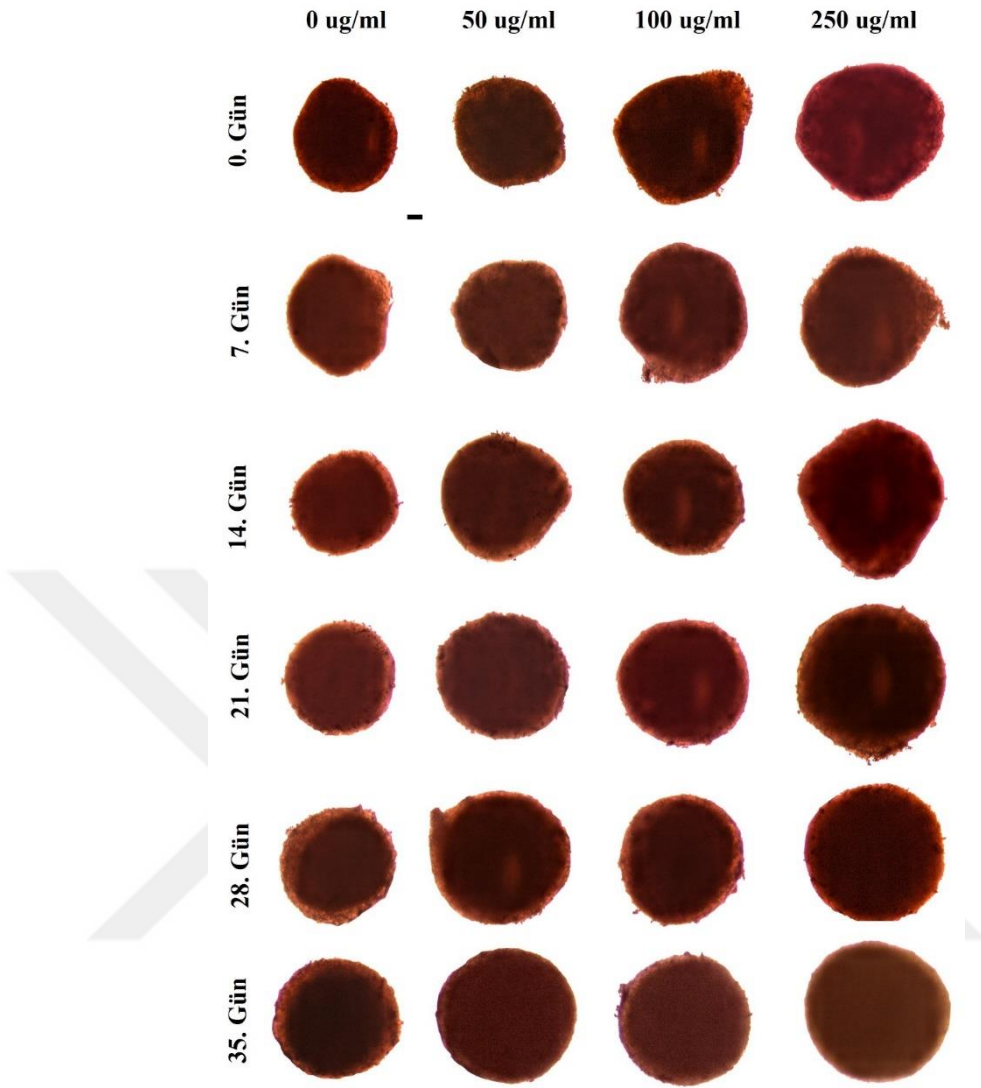
Şekil 3.22. Standart tam kültür ortamındaki 35 günlük kültür süresi boyunca sferoidlerin çap ölçüm grafiği

Standart tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin tüm konsantrasyonlar için daireselliklerinin sabit kaldığı belirlendi (Şekil 3.23).



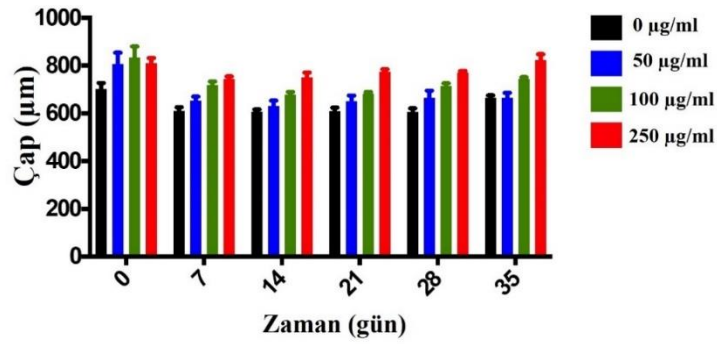
Şekil 3.23. Standart tam kültür ortamındaki 35 günlük kültür süresi boyunca sferoidlerin dairesellik grafiği

Kondrojenik tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin artan kültür süresiyle daha yuvarlak ve kompakt bir form kazandıkları gözlemlendi (Şekil 3.24).



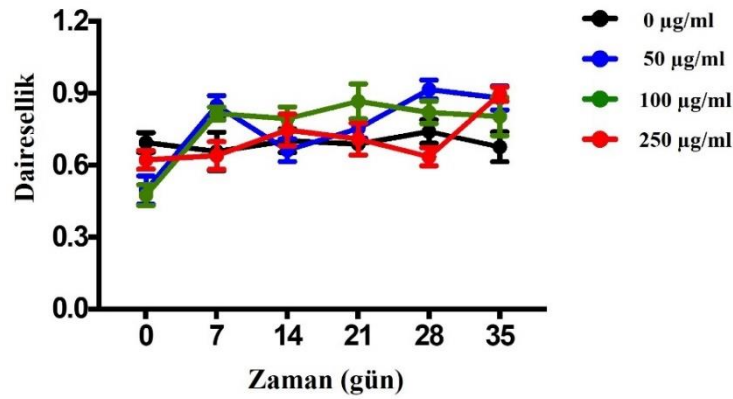
Şekil 3.24. Kondrojenik tam kültür ortamındaki 35 günlük kültür süresi boyunca sferoidlerin çapları ve küresellikleri. Ölçek çubuğu 100 µm.

Kondrojenik tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin ortalama çap değerlerinin standart tam kültür ortamında hazırlananlara kıyasla daha büyük çap değerine sahip olduğu ve zamana bağımlı olarak daha kompakt bir yapı kazandığı gözlemlendi (Şekil 3.25). Kondrojenik tam kültür ortamında 35. günün sonunda en yüksek çap değerinin 250 µg/ml κ -karragenan konsantrasyonuna sahip grupta olduğu gözlemlendi.



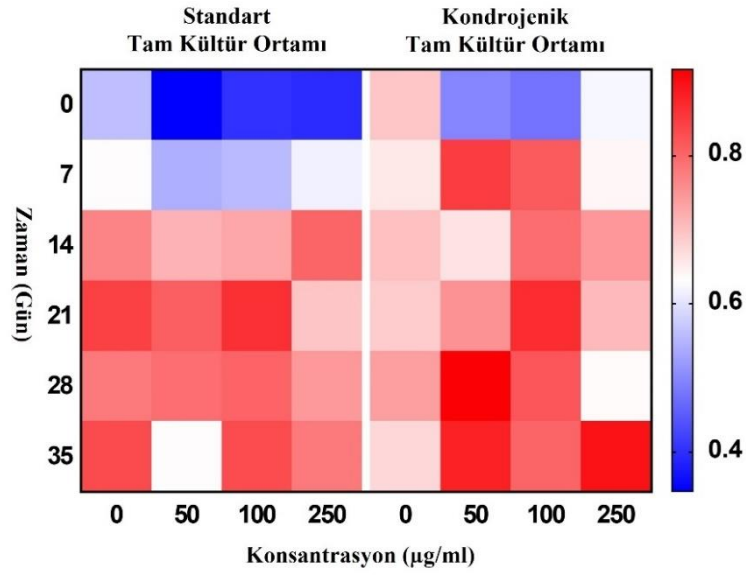
Şekil 3.25. Kondrojenik tam kültür ortamındaki 35 günlük kültür süresi boyunca sferoidlerin çap ölçüm grafiği

Kondrojenik tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin tüm konsantrasyonlar için daireselliklerinin sabit kaldığı belirlendi (Şekil 3.26).



Şekil 3.26. Kondrojenik tam kültür ortamındaki 35 günlük kültür süresi boyunca sferoidlerin dairesellik grafiği

Standart ve kondrojenik tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin tüm konsantrasyonlar için daireselliklerinin sabit kaldığı ve 28 - 35. günlerde başlangıçtan daha büyük ve kompakt yapıda oldukları gözlemlendi. Kondrojenik tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin standart tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlere kıyasla daha gevşek yapıda olduğu ve 35. gün de birbirlerine yakın dairesellikler gösterdiği gözlemlendi (Şekil 3.27).



Şekil 3.27. Standart ve kondrojenik tam kùltür ortamında κ -karragenan'ın farklı konsantrasyonları kullanılarak elde edilen sferoidlerin 35 günlük kùltür boyunca daireselliklerini gösteren heat-map grafikleri.

3.10. Sferoidlerin Rastgele Birleşmesinde Füzyon Deneyleri

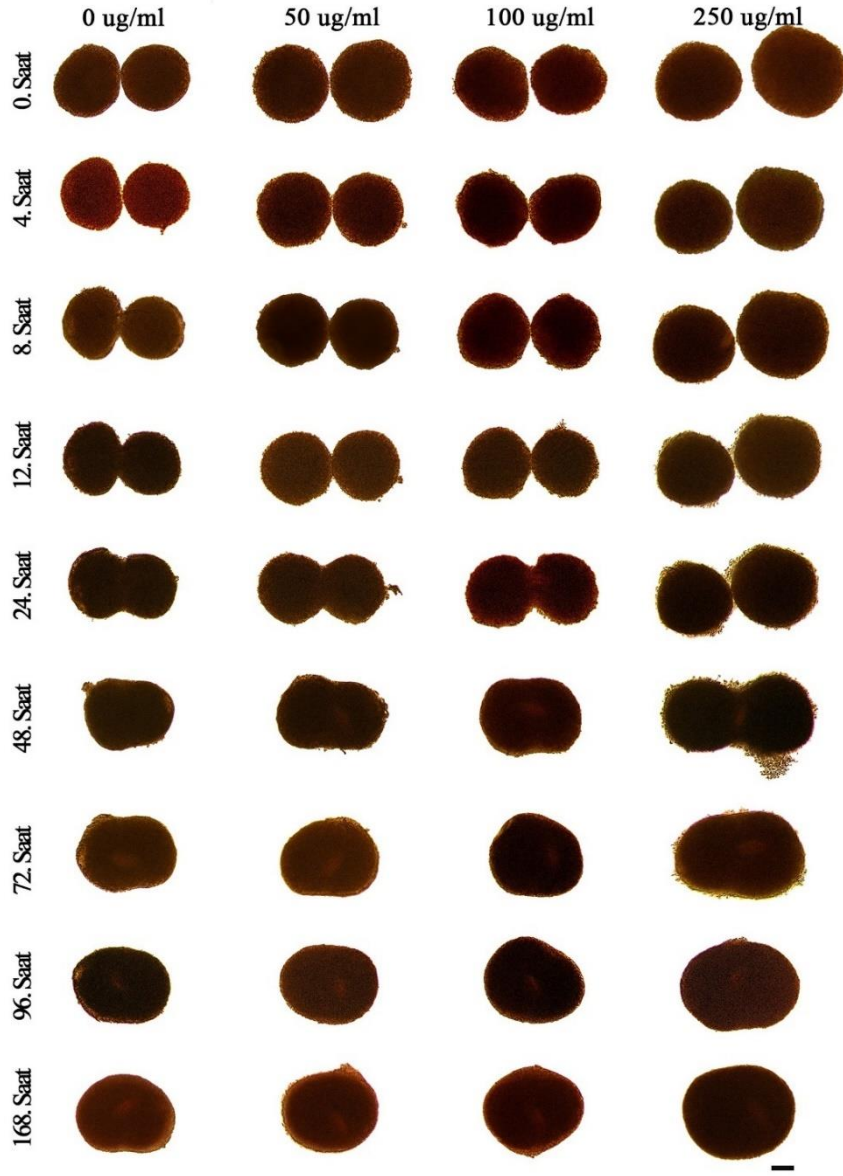
Asılı damla yöntemiyle oluşturulan sferoidlerin zamana bağımlı olarak rastgele birleşme kapasiteleri ile büyük dokuları oluşturabilme potansiyelleri gözlemlenmiştir. Hasarlı bölgeye aktarıldıklarında ortamdaki dokuyla bütünleşebileceği görülmüştür.

3.10.1. Çiftlerin Füzyonu

Asılı damla yöntemiyle oluşturulan sferoidler toplandı ve zamana bağımlı olarak rastgele birleşme potansiyellerini gözlemlemek için birbirlerine yakın olacak şekilde 96 kuyulu kùltür kapları içinde çiftler oluşturuldu. Her kuyu da 2 sferoid olacak şekilde 6 tekrarlı olarak yerleştirildi. Sferoidlerin füzyon kinetiği ters mikroskop ile 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 ve 168. saatlerde takibi yapılarak analiz

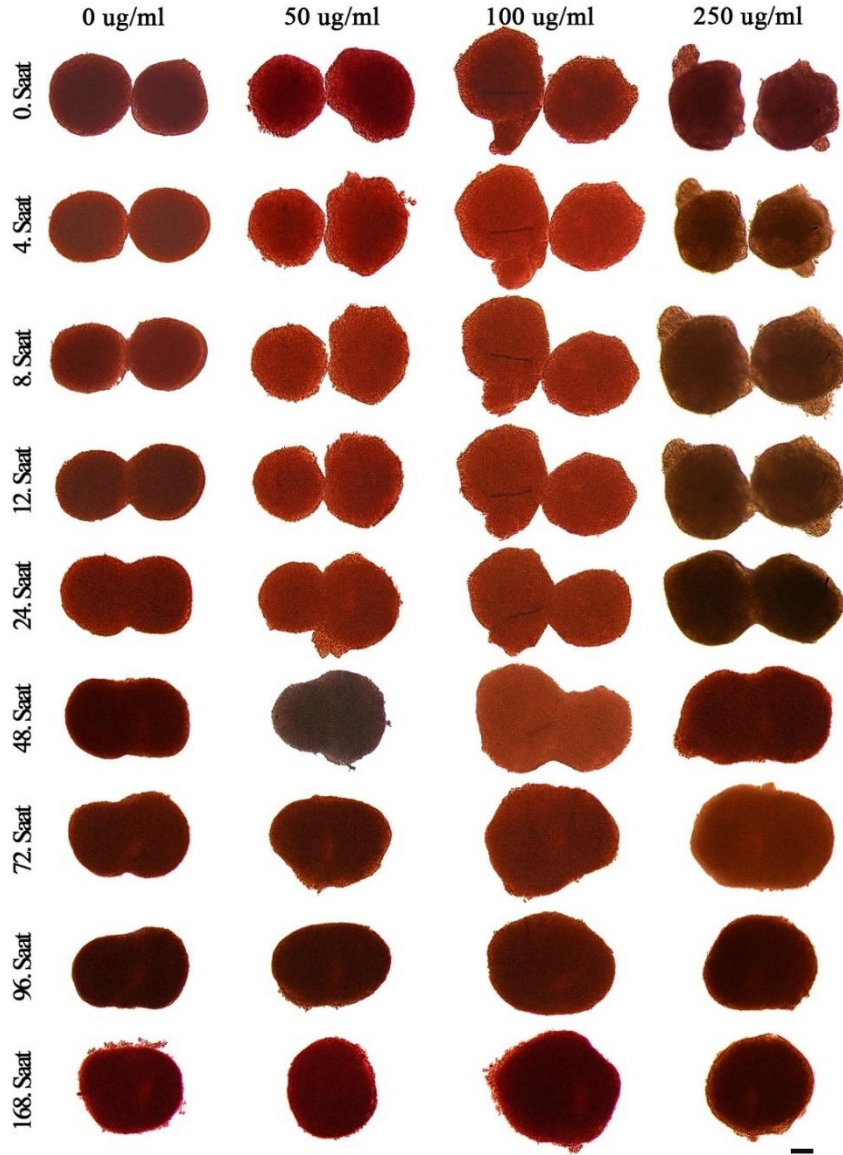
edildi. Temas uzunluğu, küreler arası açđ, ikili uzunluk ve ikili genişlik ölçümleri De Moor ve ark. (2020) tarafından açıklanan yöntemle göre ImageJ de ölçülmüştür. Tüm konsantrasyonlarda temas uzunluklarının ve küreler arasındaki açının zamanla arttığı ve ikili uzunluk ve genişliğin azaldığı gözlemlenmiştir.

Standart tam kültür ortamında 0, 50 ve 100 µg/ml κ-karragenan konsantrasyonlarında hazırlanan sferoidlerin 48. saatte büyük oranda kaynaştığı, fakat 250 µg/ml κ-karragenan konsantrasyonunda hazırlanan sferoidlerin 72. saatte bu kaynaşmayı gerçekleştirebildiği gözlemlendi. 96. saate sferoidlerin tek bir küremsi form aldığı görüldü. 168. saat sonunda kaynaşma noktalarının morfolojik olarak ayırt edilemediği tamamen kaynaşmış sferoidler gözlemlendi (Şekil 3.28).



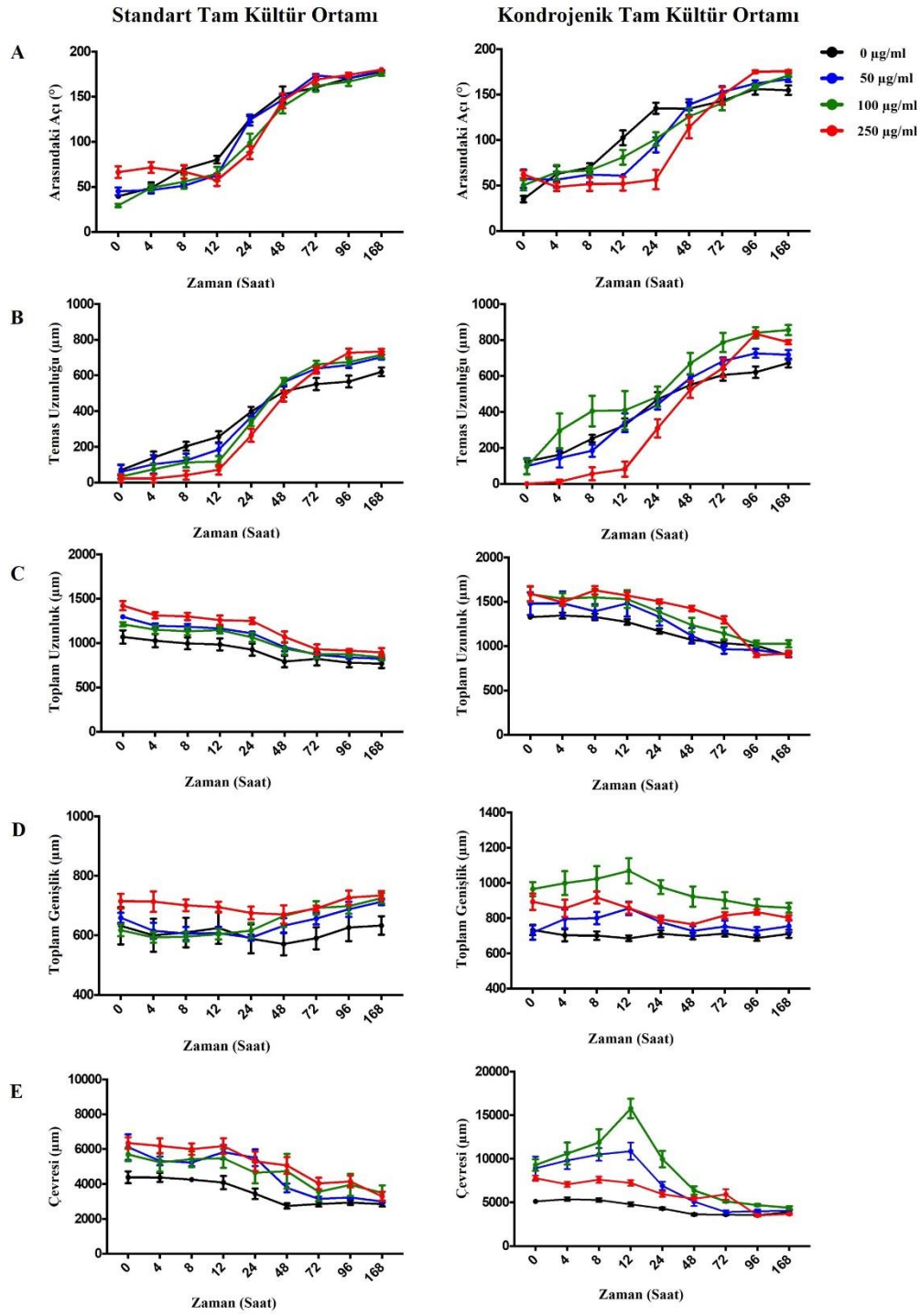
Şekil 3.28. Standart tam kültür ortamında sferoid çiftlerinin füzyonu. Ölçek çubuğu 100 µm.

Kondrojenik tam kültür ortamında 0, 50, 100 ve 250 µg/ml κ-karragenan konsantrasyonlarında hazırlanan sferoidlerin κ-karragenan miktarının artışıyla füzyonlarının daha yavaş gerçekleştiği gözlemlendi. Tüm κ-karragenan konsantrasyonlarında 48. saatte büyük oranda kaynaştığı, 72. saatte tek bir küremsi form kazandıkları gözlemlendi. 168. saat sonunda kaynaşma noktalarının morfolojik olarak ayırt edilemediği tamamen kaynaşmış sferoidler gözlemlendi. 168. Saat sonunda ölçülen çap değerlerinin tüm konsantrasyonlarda birbirine çok yakın olduğu gözlemlendi (Şekil 3.29).



Şekil 3.29. Kondrojenik tam kültür ortamında sferoid çiftlerinin füzyonu. Ölçek çubuğu 100 μm .

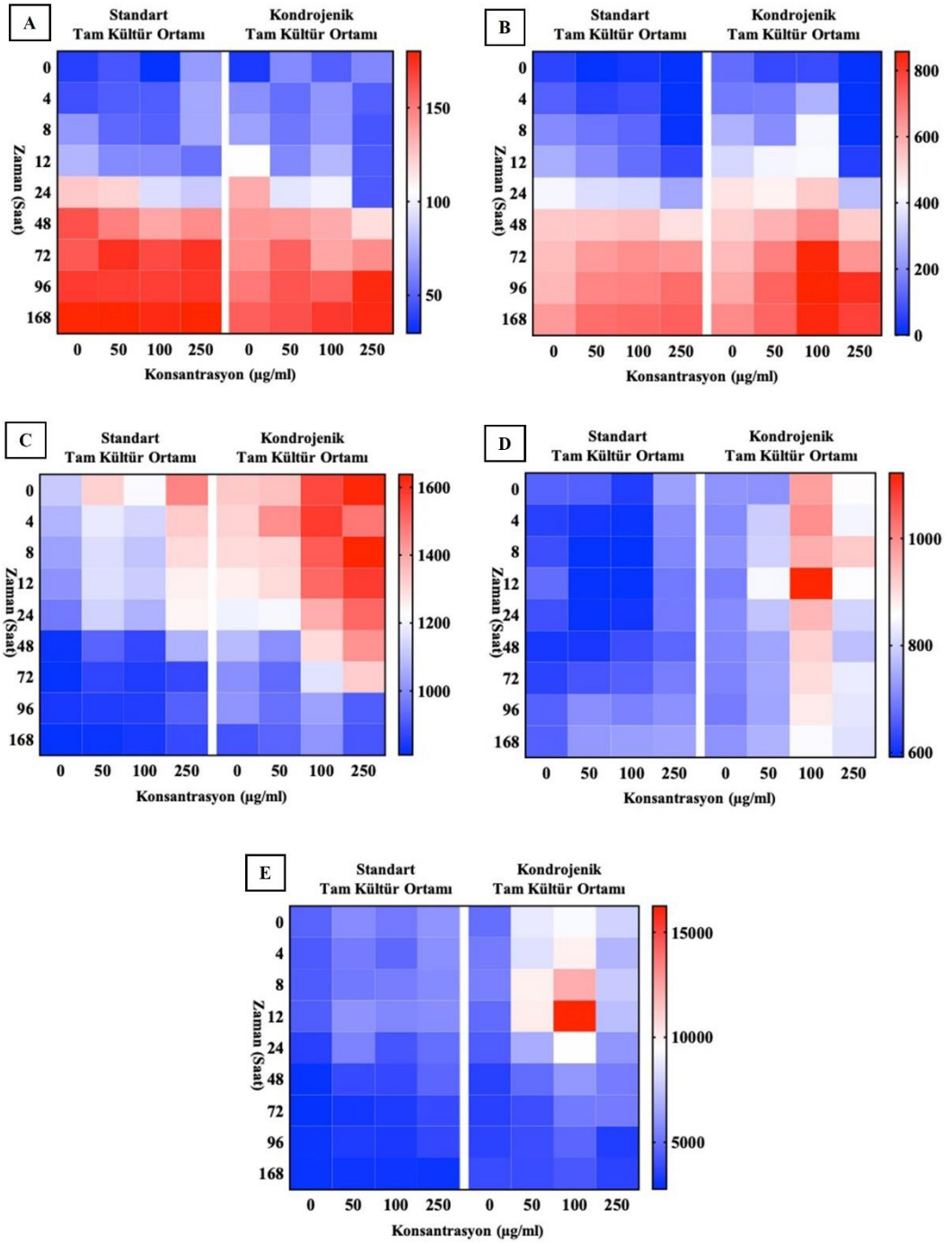
Standart tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin 12. saatte, kondrojenik tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin 24. saatte aralarındaki açının hızla büyümeye başladığı ve 72. saate birleşmenin tamamen gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.30 A). Her iki kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin temas uzunluklarının 12. saatten sonra hızla artarak 72. saate en üst seviyeye ulaştığı görülmüştür (Şekil 3.30 B).



Şekil 3.30. Standart ve kondrojenik tam kültür ortamında sferoid çiftlerinin füzyon ölçüm grafikleri. (A) Sferoidlerin toplam uzunluk (µm), (B) ikili genişlik (µm), (C) temas uzunluğu (µm), (D) sferoidler arası açı (°) ve (E) sferoidlerin toplam çevresi. Morfolojik parametreler Image J yazılımı kullanılarak ölçüldü (n = 6).

Kondrojenik tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin toplam uzunluğunun ve genişliklerinin standart tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlere kıyasla büyük olduğu ve zamana bağımlı olarak standart tam kültür ortamındaki sferoidlerin 72. saatte, kondrojenik tam kültür ortamındaki sferoidlerin 96. saatte kompakt ve yuvarlak form kazandıkları gözlemlendi (Şekil 3.30 C ve Şekil 3.30 D). Sferoidlerin çevresinin standart tam kültür ortamında zamana bağımlı olarak azaldığı, kondrojenik tam kültür ortamında 12. saate kadar artış gösterdiği ve 12. saatten sonra azaldığı gözlemlendi (Şekil 3.30 E).

Sferoidler arasındaki açının standart tam kültür ortamında 72. saatten sonra, kondrojenik tam kültür ortamında 96. saatten sonra 180°'ye yaklaştığı gözlemlendi (Şekil 3.31 A). Her iki kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin de temas uzunluğunun 48. saatten sonra en üst seviyeye ulaştığı ve κ -karragenan konsantrasyonunun artması ile temas uzunluklarının artışının daha yavaş gerçekleştiği gözlemlendi (Şekil 3.31 B). Her iki kültür ortamında da sferoidlerin toplam uzunluklarının kısalarak toplam genişliğe yaklaştığı ve 48. saatten sonra kompakt ve yuvarlak form kazandıkları gözlemlendi (Şekil 3.31 C ve Şekil 3.31 D). Aynı şekilde her iki kültür ortamında sferoid çevrelerinin 24. saatten sonra azalarak daha yuvarlak form kazandığı gözlemlendi (Şekil 3.31 E).

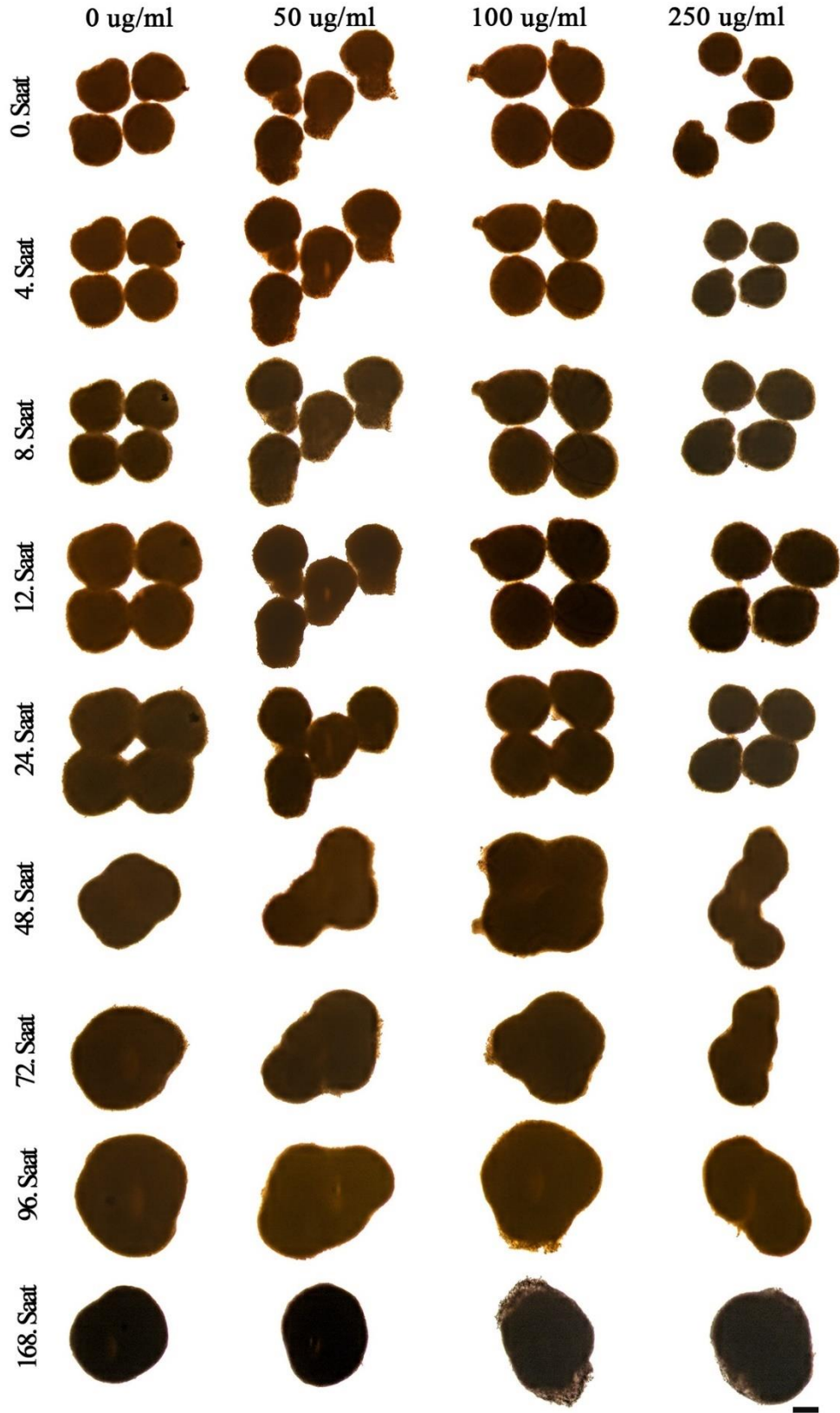


Şekil 3.31. Standart ve kondrojenik tam kültür ortamında κ -karragenan'ın farklı konsantrasyonlarından elde edilen sferoid çiftlerinin füzyonlarının heat-map grafikleri. (A) Sferoidlerin toplam uzunluk (μm), (B) ikili genişlik (μm), (C) temas uzunluğu (μm), (D) sferoidler arası açı ($^\circ$) ve (E) sferoidlerin toplam çevresi.

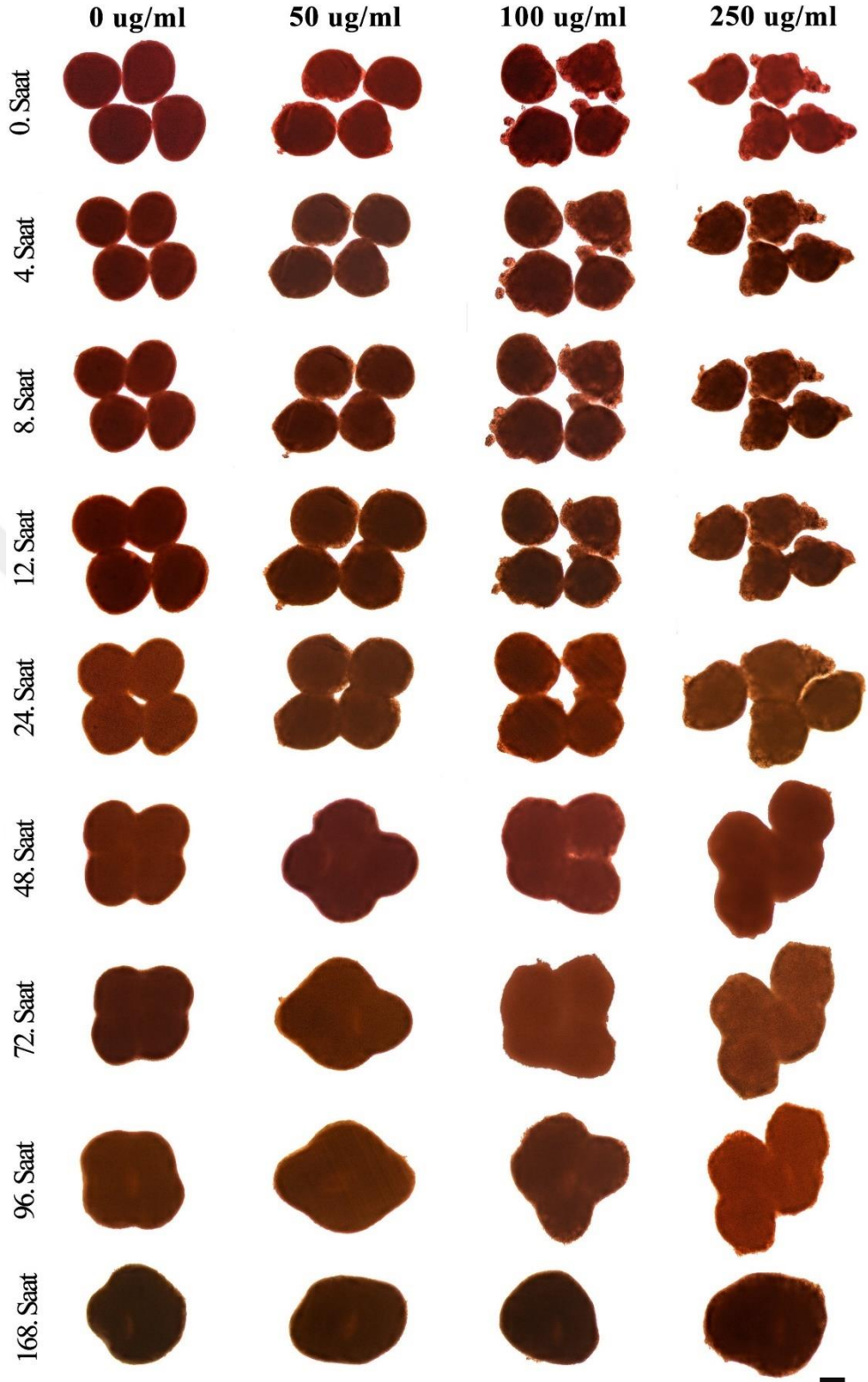
3.10.2. Çoklu Sferoidlerin Füzyonu

Asılı damla yöntemiyle oluşturulan sferoidlerin zamana bağımlı olarak kaynaşma potansiyellerini gözlemek için birbirlerine yakın olacak şekilde 96 kuyulu kültür kaplarına her kuyu da 4 sferoid olacak şekilde 6 tekrarlı olarak yerleştirildi. Sferoidlerin füzyon kinetiği ters mikroskop ile 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 ve 168. saatlerde takibi yapılarak analiz edildi.

İkili uzunluk, ikili genişlik ve toplam çevre ölçümleri ImageJ de yapıldı. Tüm konsantrasyonlarda ikili uzunluk, ikili genişlik ve toplam çevrenin zamana bağımlı olarak azaldığı gözlemlendi. Her iki kültür ortamında 0, 50, 100 ve 250 µg/ml κ-karragenan konsantrasyonlarında hazırlanan sferoidlerin κ-karragenan miktarının artışıyla füzyonlarının daha yavaş gerçekleştiği gözlemlendi. 48. saatte kaynaşmanın tamamen gerçekleştiği ve ilerleyen saatlerde daha küresel form kazanmaya başladığı gözlemlendi. 168. saat sonunda kaynaşma noktalarının morfolojik olarak ayırt edilemediği tamamen kaynaşmış sferoidler gözlemlendi (Şekil 3.32 ve Şekil 3.33). Füzyon deneyleri sırasında birbirine tamamen temas etmeyen sferoidlerin dönerek ilk bulunduğu noktadan farklı bir noktadan temas ettiği gözlemlendi.

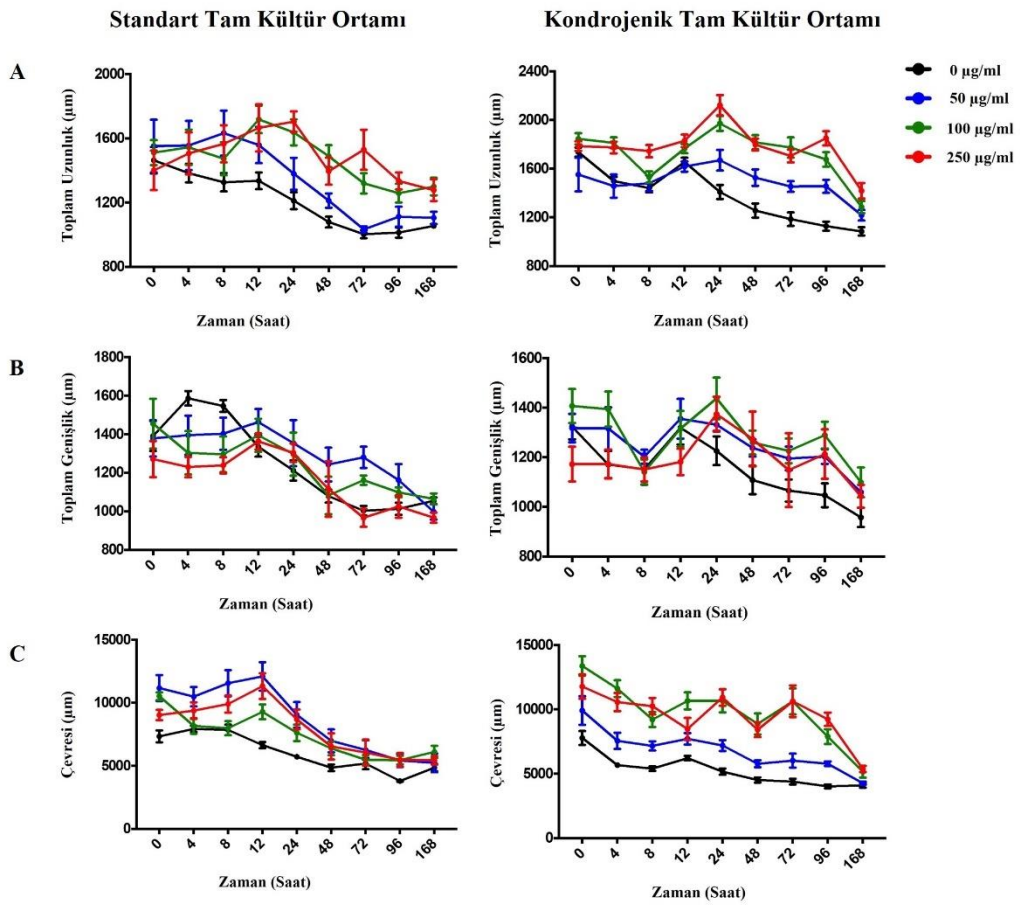


Şekil 3.32. Standart tam kültür ortamında çoklu sferoidlerin füzyonu. Ölçek çubuğu 250 μ m.



Şekil 3.33. Kondrojenik tam kültür ortamında çoklu sferoidlerin füzyonu. Ölçek çubuğu 250 μ m.

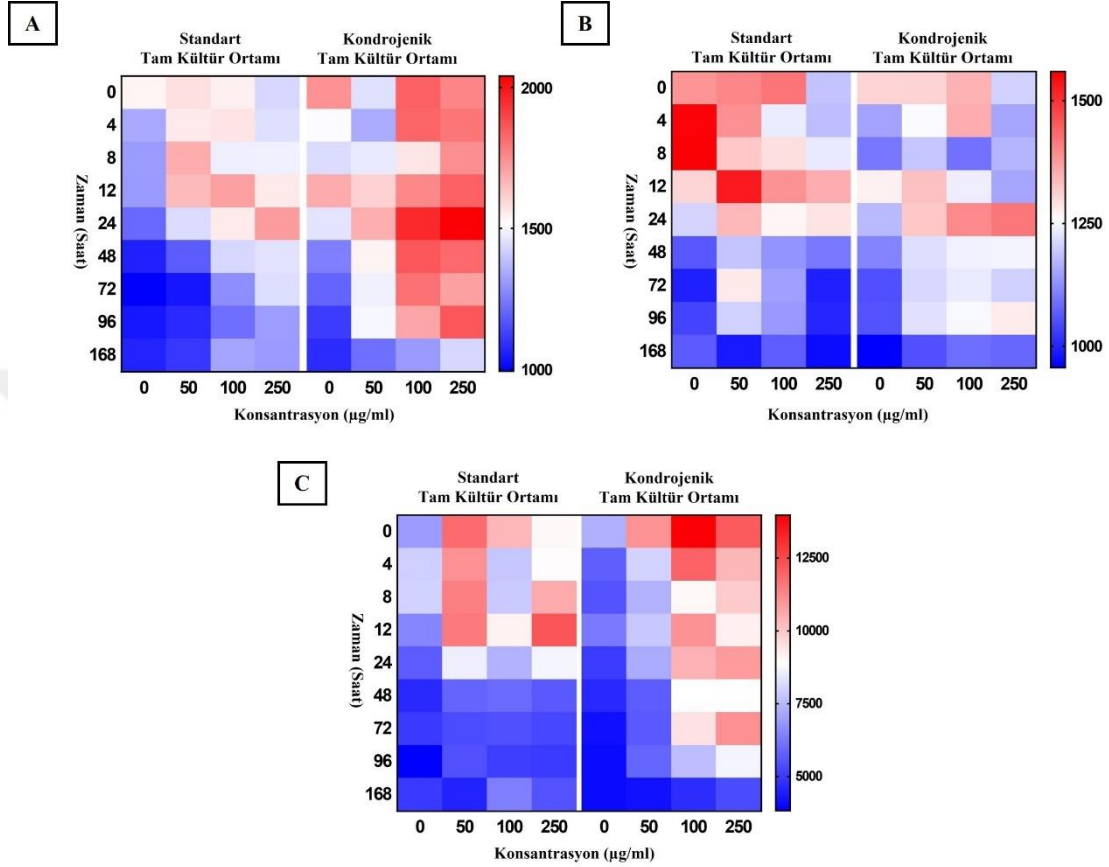
Kondrojenik tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin toplam uzunluğunun ve genişliklerinin standart tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlere kıyasla büyük olduğu ve zamana bağımlı olarak standart tam kültür ortamındaki sferoidlerin 72. saatte, kondrojenik tam kültür ortamındaki sferoidlerin 96. saatte kompakt ve yuvarlak form kazandıkları gözlemlendi (Şekil 3.34 A ve Şekil 3.34 B). Sferoidlerin çevresinin standart tam kültür ortamında 12. saate kadar artış gösterdiği ve 12. saatten sonra azaldığı, kondrojenik tam kültür ortamında zamana bağımlı olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 3.34 C).



Şekil 3.34. Standart ve kondrojenik tam kültür ortamında çoklu sferoidlerin füzyon ölçüm grafikleri. Sferoidlerin (A) toplam uzunluk (µm), (B) toplam genişlik (µm) ve (C) toplam çevresi morfolojik parametreler Image J yazılımı kullanılarak ölçüldü. (n = 6).

Her iki kültür ortamında da sferoidlerin toplam uzunluklarının kısalarak toplam genişliğe yaklaştığı ve 48. saatten sonra kompakt ve yuvarlak form kazandıkları gözlemlendi (Şekil 3.35 A ve Şekil 3.35 B). Aynı şekilde her iki kültür ortamında

sferoid çevrelerinin 24. saatten sonra azalarak daha yuvarlak form kazandığı gözlemlendi (Şekil 3.35 C).

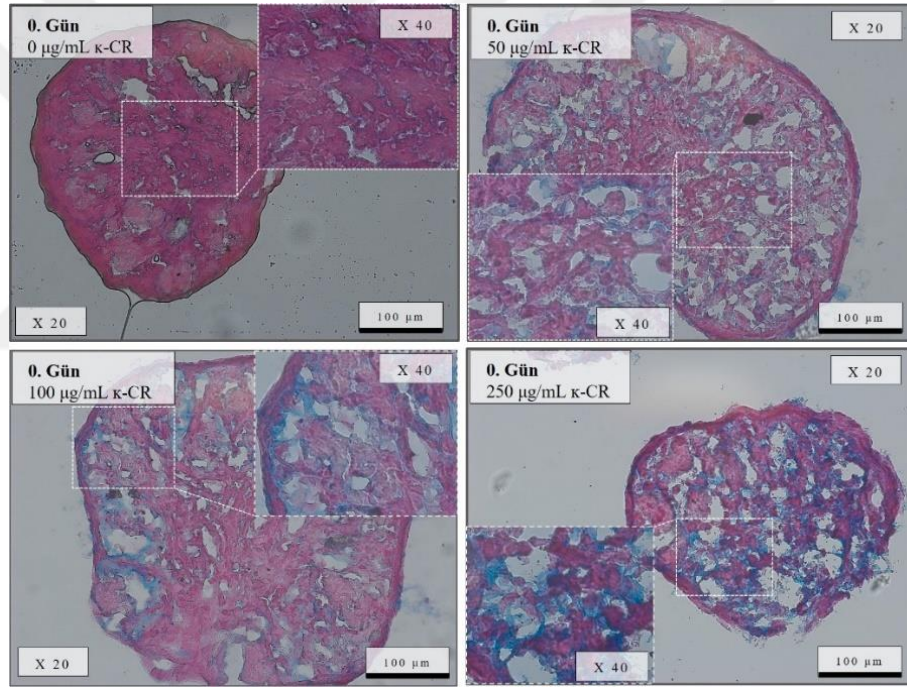


Şekil 3.35. Standart ve kondrojenik tam kültür ortamında κ -karragenan'ın farklı konsantrasyonlarından elde edilen çoklu sferoidlerin füzyonlarının heat-map grafikleri. Sferoidlerin (A) toplam uzunluk (µm), (B) toplam genişlik (µm), ve (C) toplam çevresi.

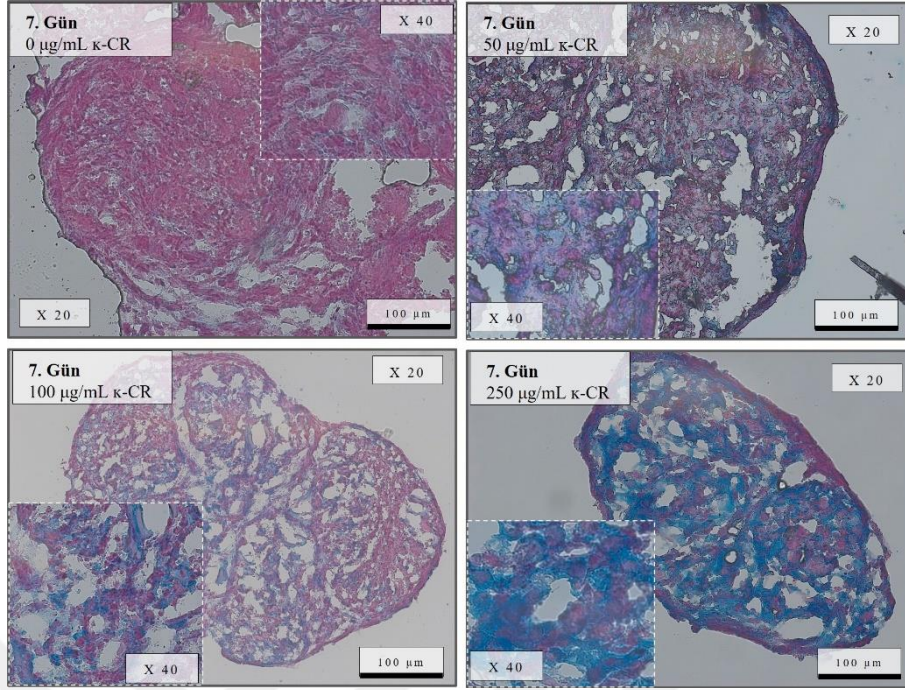
3.11. Histokimyasal Analizler

Kondrojenik tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlerden kesitler alınarak pikrosirius kırmızısı ve alsiyen mavisi boyamaları yapılmıştır. Pikrosirius kırmızısı boyaması ile ECM'deki kollajen ağları, alsiyen mavisi boyamasıyla da negatif yüklü proteoglikanlar boyanmaktadır.

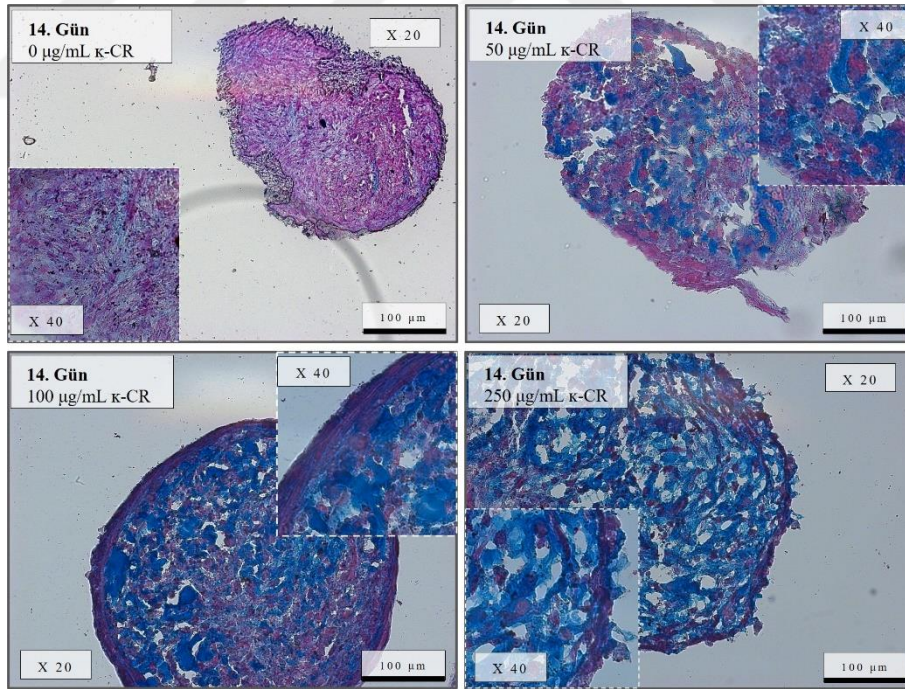
72 saat sonunda toplanan sferoidler 0. gün olarak kabul edilmiştir. 0. günde κ -karragenan'ın konsantrasyonu arttıkça alsiyen ile maviye boyanan kısımların arttığı ve bu boyanan alanların biyoaktif polisakkarit olan κ -karragenan olduğu düşünülmektedir. Zamana bağımlı olarak glikozaminoglikan miktarlarına bakıldığında zamanla hücreler arasında bulunan κ -karragenan'ın hücreler tarafından metabolize edilerek ve dokuya ait GAG yapılarının oluşumu gözlemlendi. Tüm κ -CR konsantrasyonları ve zamana bağımlı olarak kollajen ağlarının ve negatif yüklü proteoglikanların miktarı artmıştır. Zamana bağımlı olarak tüm sonuçlar Şekil 3.36, Şekil 3.37, Şekil 3.38 ve Şekil 3.39 de gösterilmiştir.



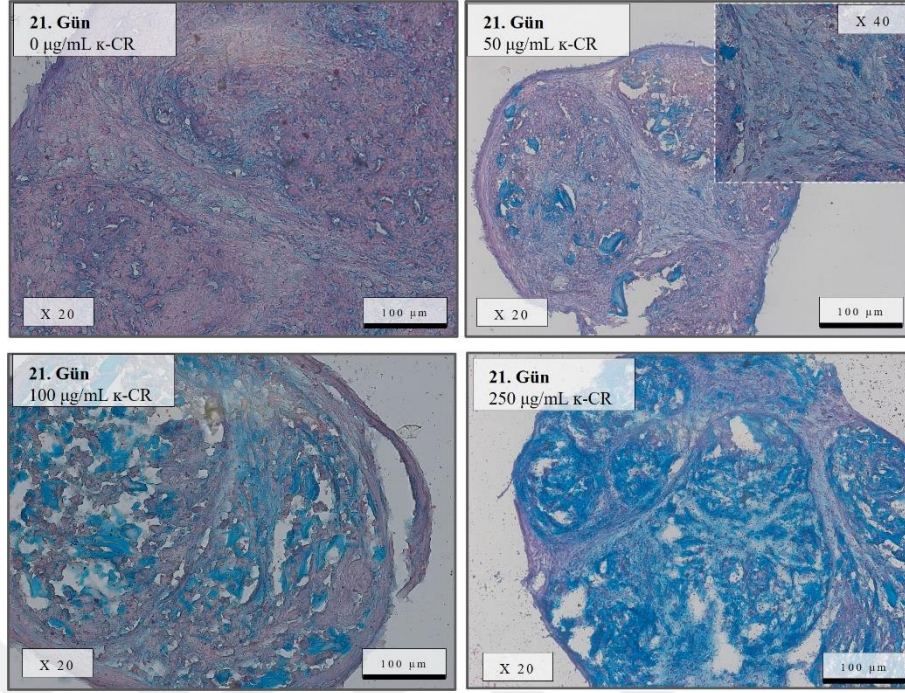
Şekil 3.36. 0. gün kondrojenik tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin Alsiyen mavisi ve Pikrosirius kırmızısı (A-B & PSR) boyamaları.



Şekil 3.37. 7. gün kondrojenik tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin Alsiyen mavisi ve Pikrosirius kırmızısı (A-B & PSR) boyamaları.



Şekil 3.38. 14. gün kondrojenik tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin Alsiyen mavisi ve Pikrosirius kırmızısı (A-B & PSR) boyamaları.



Şekil 3.39. 21. gün kondrojenik tam kültür ortamında hazırlanan sferoidlerin Alsiyen mavisi ve Pikrosirius kırmızısı (A-B & PSR) boyamaları.

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında üç-boyutlu hücre kültürü ortamında insan plasenta kaynaklı umbilikal kord mezenkimal kök hücreleri ile hücre dışı matriks yoğunluğunun *in vitro* şartlarda kondrojenik farklılaşma durumuna olası etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu kapsamda plasentanın beş farklı anatomik bölgesinden eksplant kültür yöntemi ile mezenkimal kök hücre izolasyonları yapılmıştır. Literatür taraması, hücrelerin çoğalma potansiyelleri ve ideal sferoid oluşturabilme gibi özellikleri değerlendirilerek umbilikal kord mezenkimal kök hücreleri ile tez deneylerinin yapılmasına karar verilmiştir. UK-MKH'lerin mezenkimal kök hücre karakterizasyonu için immünofenotiplendirme ve hücre canlılığı analizi, üçlü soya farklılaştırma ve koloni oluşturabilme potansiyeli incelenerek MKH karakterizasyonu yapılmıştır. UK-MKH'lerinin büyüme ve çoğalma eğrisi analizleri yapılarak proliferasyon potansiyeli, *in vitro* migrasyon testi ile de hücrelerin göç hızı gözlemlenmiştir. Tezin deneylerinde 3B kültür ortamında hücre sayısı sabit tutularak hücre-ECM yoğunluk farkı için κ -karragenan'ın 4 farklı konsantrasyonunda ve iki farklı kültür ortamında (standart ve kondrojenik tam kültür ortamı) sferoidler hazırlanmıştır. Kondrojenik farklılaşma için her iki kültür ortamında ve 4 farklı konsantrasyonda hazırlanan sferoidlerin morfolojik ölçümleri, füzyon deneyleri ve histokimyasal boyamaları incelenmiştir.

Kıkırdak doku mühendisliği yöntemleriyle kıkırdak doku hasarlarının onarımı için seçilecek hücre kaynağının, biyomateryallerin ve sinyal faktörlerini hasarlı bölgeye ileten yaklaşımların geliştirilmesi gereklidir. Seçilecek hücre kaynağının kolay ulaşılabilir ve çoğaltılabilir olması önemli bir parametredir. Bu nedenle doğumdan sonra atık olarak kabul edilen plasenta dokularının doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanındaki kullanımı son yıllarda artmıştır. MKH'lerin farklı kültür ortamlarında hücrenin farklılaşmasını sağlayan biyoaktif molekülleri üreterek salma kapasitelerine ek olarak bağışıklık tepkisinin modülasyonu rejeneratif tıp ve hücre temelli tedavilerde kullanılabilmesi için yüksek beklentiler oluşturmuştur (Caplan ve Sorrell, 2015). Plasenta dokularından MKH izolasyonunda ekstra invaziv bir

prosedüre ihtiyaç duyulmaması, immün düzenleyici özellikleri ve zengin MKH içermesi nedeniyle hücre bazlı tedaviler için önemli bir kaynaktır. Plasenta aynı zamanda iyi bir ECM kaynağıdır. Plasentanın fetüs kökenli mezenkimal kök hücreler barındırdığı bilinen umbilikal kord dokusundan izole edilen UK-MKH'leri yetişkin kök hücre kaynaklarından biridir. Diğer MKH izole edilen doku kaynakları ile kıyaslandığında düşük immünojenitesi, non-invaziv izole yöntemleri, *in vitro* kültür ortamında kolaylıkla çoğaltılabiliyor olması ve etik erişim gibi üstünlükleri sebebiyle hücre temelli tedaviler için umut verici bir kaynaktır. Perinatal kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin incelendiği bir çalışmada UK-MKH'lerinin diğer perinatal kaynaklı MKH'lere kıyaslandığında proliferatif potansiyelinin yüksek olduğu ve birçok parakrin faktörü daha yüksek oranda salgıladığı gösterilmiştir (Wu ve ark., 2018). UK-MKH'lerinin iyi karakterize edilmiş yetişkin MKH (kemik iliği MKH gibi) kaynaklarına alternatif mezenkimal kök hücre kaynağı olabileceği düşünülmektedir. Bonab ve ark. (2006) kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin *in vitro* yaşlanmasını belirlemek üzere yaptıkları çalışma da MKH'lerin *in vitro* hücre kültür ortamına alınmasıyla birlikte yaşlanmanın başladığını ve kök hücre özelliklerini zamanla kaybettiklerini göstermişlerdir. Bu nedenle MKH'lerin deneysel ve klinik çalışmalarda erken pasajların kullanılmasının avantajlı olacağını söylemişlerdir. Bu bilgiler ışığında UK-MKH'lerinin klinikte hücre bazlı tedavi yöntemleri ile birçok hastalığın tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada 3-4 farklı donörden temin edilen ve eksplant kültür için uygun koşullarda saklanan plasenta dokuları kullanılmıştır. Plasentanın fetal yüzeyinden umbilikal kord, amniyotik membran ve koryon plak, maternal yüzeyinden ise koryon villus ve desidua bazalis bölgelerinden alınan doku parçaları literatürde belirtilen uygun tam kültür ortamında çoğaltılmış ve deneyler için kullanılmıştır. İzole edilen tüm hücrelerin fibroblast benzeri morfolojide ve plastiğe tutunarak çoğalabildiği gözlemlenmiştir. MKH'ler ile daha önce yapılan çalışmalarda farklı MKH kaynaklarının farklılaşma potansiyeli, proliferasyon yeteneği ve gen ekspresyonu gibi özelliklerinin farklılıklar gösterdiği bilinmektedir. Wang ve ark. (2016) fetal kemik iliği (F-Kİ-MKH), yağ dokusu (AD-MKH) ve wharton jölesinden (WJ-MKH) izole ettikleri MKH'lerin 15 gen ekspresyon düzeylerini kıyasladıklarında WJ-

MKH'lerindeki ekspresyon düzeyleri ile AD-MKH'ler ile benzerken, F-Kİ-MKH'leri ile farklı olduğunu göstermişlerdir. Aynı donörün plasentasının umbilikal korda yakın ve uzak olacak şekilde iki farklı noktadan doku örnekleri alarak mezenkimal kök hücre izolasyonları yapmışlar ve izole ettikleri MKH'leri erken ve geç pasajdaki özelliklerini incelemişlerdir. Bu çalışma sonucunda erken pasajlardaki farklılıklar az iken, geç pasajlarda önemli farklılıklar olduğunu gözlemlemişlerdir (Koltsova ve ark., 2021).

UK-MKH'lerinin mezenkimal kök hücre karakterizasyonunda Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT) tarafından tanımlanan minimum kriterlere uygun olarak MKH özelliklerini göstermiştir. UK-MKH'lerinin plastik yüzeye tutunabildiği, MKH yüzey belirteçleri yönünden pozitif olduğu, çoklu soya farklılaşabildikleri ve koloni oluşturabildikleri gözlemlenmiştir. Eksplant kültür yöntemiyle izole edilen hücreler 10-14 gün sonra doku parçalarının etrafında gözlemlenmiştir. Hücrelerin alt kültürleri yapıldığında hücre morfolojilerinin P1'den itibaren iğ şeklinde ve fibroblast benzeri morfoloji sergiledikleri gözlemlenmiştir (Şekil3.4).

Eksplant kültür yöntemiyle izole edilen mezenkimal kök hücreler ileri pasajlarda çoğaltılarak immünofenotiplendirmeleri yapılmıştır. İzole edilen tüm hücrelerin immünofenotiplendirme ve canlılık analizinde 7AAD yüzey belirteciyle canlı hücreler belirlenmiştir. CD73, CD90, CD105 ve CD29 MKH yüzey belirteçlerinin ifade edildiği, CD34, CD31, CD133, LIN, HLA hemapoyetik kök hücre yüzey belirteçlerinin ifade edilmediği belirlenmiştir. Hem fetal hem de maternal MKH'lerin benzer fenotipik özellikler ve çoklu soya farklılaşma potansiyeli göstermelerine rağmen fetal kaynaklı MKH'lerin daha çok genişleme kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir (Wu ve ark., 2018). Wu ve ark. (2018) farklı perinatal dokulardan izole ettikleri MKH'lerin biyolojik özellikleri açısından aynı olmadığını ve ISCT kriterlerine uygun olarak benzer yüzey belirteçlerine sahip olsalarda yüzey belirteçlerinin ifade edilme oranının değiştiğini gözlemlemişlerdir. İzolasyonu yapılan 5 farklı MKH'nin Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT) tarafından

önerilen kriterleri karşıladığını göstermektedir (Domonici ve ark., 2006; Koltsova ve ark., 2018; Sensebé ve ark., 2010).

Kök hücre özelliği gösterdiğini tanımladığımız 5 farklı MKH istenen pasajlara çoğaltılarak sferoid oluşturma potansiyellerinin gözlemlenmesi için aynı sayıda uygun tam kültür ortamı içerisinde 3B sferoidleri hazırlanmıştır. Tüm hücrelerden hazırlanan sferoidlerin daireselliklerinin birbirlerine çok yakın olduğu ve en büyük çap değerine UK-MKH'lerinin sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Literatürden edindiğimiz bilgiler, UK-MKH'lerinin mezenkimal kök hücre özellikleri ve sürdürülebilir 3B kültürlerin hazırlanabilmesi için ilerleyen deneylere UK-MKH'leri ile devam edilmesine karar verilmiştir.

UK-MKH'leri 3 farklı hücre yoğunluğunda (25.000, 50.000 ve 100.000) ekilerek 14 gün sonunda koloni oluşturabilme kapasiteleri incelendiğinde hücre sayısının artmasıyla birlikte oluşan koloni sayısının da arttığı gözlemlenmiştir. 25.000 hücre/cm² hücre ekimi yapılan kuyucuklarda dahil olmak üzere sayılamayacak kadar çok hücre kolonisi gözlemlenmiştir. Farklı kaynaklardan izole edilen MKH'lerin koloni oluşturabilme yeteneklerinin önemli farklılıklar gösterdiği bilinmektedir (Koltsova ve ark., 2018; Surdo ve ark., 2013; Musorina ve ark., 2019; Szepesi ve ark., 2016).

Mezenkimal kök hücrelerin çoklu soya farklılaşma yetenekleri önemli bir özellikleridir. Çoklu soya farklılaşma yetenekleri temel özellikleri olmasına rağmen MKH'lerin farklılaşması çoğunlukla donöre, izole edildiği dokunun kaynağına, izole edilme yöntemine, proliferatif kapasitesine, ilerleyen pasajlar ile birlikte gerçekleşen hücre yaşlanmasına ve *in vitro* kültür koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. MKH'ler multipotent hücreler olsalarda tüm MKH'ler aynı hücresel soylara farklılaşamazlar. İzole ettiğimiz UK-MKH'lerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik soylara farklılaşması sırayla kalsiyum birikintileri, yağ damlacıkları ve glikozaminoglikanlardan zengin ECM yapısı ile gösterilmiştir. Adipojenik kültür

ortamı içinde 21 gün boyunca kültürlenmiş hücrelerde adipojenik farklılaşmayı gösteren yağdan zengin vakuollerin birikimi gözlemlenmiştir. UK-MKH'lerinin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik soylara uygun şekilde farklılaştığı gösterilmiştir. Bu deneyler, izole edilen UK-MKH kültürünün, kontrollü bir şekilde, çoklu soylara farklılaşacağını göstermiştir. Sonuçlarımız literatür ile uyumludur (Secco ve ark. 2008). UK-MKH'leri, iyi yayılmış bir morfolojiye sahip kültürde çoğalma yetenekleriyle, yüzeylerinde tutarlı yüzey belirteçlerinin varlığı ve kontrollü *in vitro* koşullar altında çoklu mezenkimal soylara farklılaşmaları ile karakterize edildi.

UK-MKH'lerinin proliferasyon yeteneği, büyüme ve çoğalma eğrileri analiz edilerek incelenmiştir. Büyüme eğrisi analizinde P2'den P8'e kadar alt kültüründe gecikme fazının kısa olduğu ve P3'te log fazına ulaştığı, P6'dan sonra ise hücre çoğalmasının azaldığı gözlemlenmiştir. Bu veriler ışığında çoğalma eğrisi analizi için P3, P4 ve P5 UK-MKH'leri kullanılmıştır. P3, P4 ve P5 UK-MKH'lerinin zamana bağlı olarak çoğalma kabiliyetleri analiz edildiğinde en yüksek çoğalma kabiliyetinin 192. saatte P4'te olduğu gözlemlenmiştir. Pasajlar ilerledikçe büyüme hızının arttığı ve sürenin kısaldığı gözlemlenmiştir.

Hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimlerinin hücre migrasyonu üzerindeki etkilerini gözlemlemek için UK-MKH'lerinin P4'ün hücreleri ile *in vitro* migrasyon testi yapılmıştır. Hücre migrasyonunun 6. saatte bireysel hücre geçişleriyle başladığı ve 24. saatten sonra hücre kümelerinin göçüyle yara alanının hızla kapanarak 48. saatte yüzde yüz oranında kapanmanın gerçekleştiği tespit edildi.

2B hücre kültürü modellerinde hücrelerin *in vivo* koşulları tam anlamıyla taklit edemediği ve elde edilen sonuçlarda istenen başarıya ulaşılamadığı görülmektedir. 3B kültür yöntemleriyle *in vivo* koşulların en iyi taklit edileceği yöntemler seçilerek gerçek doku yenilenmesinden söz edebiliriz. 3B kültür çalışmaları, 2B kültür ve hayvan deneyleri arasında bir basamak olabilecek potansiyeldedir. Geliştirilen 3B kültür modelleri ile elde edilen sonuçların daha başarılı olduğu görülmektedir.

Kıkırdak doku mühendisliği alanında çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen bu kapsamda üç-boyutlu hücre kültürü yöntemi ile perinatal kaynaklı mezenkimal kök hücre kullanımına dayalı sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.

Doğal kıkırdak dokusunu taklit edebilen fizikokimyasal ve biyolojik özelliklere sahip biyoaktif polisakkaritler ile farklı doku mühendisliği ürünleri hazırlanabilir. İskeleler, hidrojeller gibi hızlı ve kolay üretilebilecek polisakkaritler günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Kullanılan bu biyoaktif polisakkaritlerin yeni kıkırdak oluşumunu teşvik ettiği veya sağladığı literatürde gösterilmiştir. Biyoaktif polisakkaritler ile çoklu soya farklılaşma özelliğine sahip mezenkimal kök hücreler ile birleştirilmeleriyle doğal kıkırdak dokusunu taklit edebilecek doku mühendisliği ürünleri hazırlanabilir.

Mezenkimal kök hücre karakterizasyonları tamamlandıktan sonra 3B kültür çalışmalarına geçilmiştir. Asılı damla yöntemi ile ortamdaki ECM yoğunluğunu taklit etmesi için biyoaktif polisakkarit olan κ -karragenan'ın farklı konsantrasyonlarında sferoidler hazırlanmıştır. Deneyler standart ve kondrojenik tam kültür ortamında 4 farklı κ -karragenan konsantrasyonu hazırlanarak oluşturulmuştur. Hücre-ECM yoğunluk farkı oluşturularak ideal konsantrasyon belirlenmeye çalışılmıştır. Tüm kültür ortamı ve konsantrasyonlarda hazırlanan sferoidlerin kondrojenik farklılaşma üzerine etkileri morfolojik ölçümleri, metabolik analizler ve histokimyasal boyamalarla incelenmiştir.

Plasenta kaynaklı hücrelerden hazırlanan organoidlerin uzun süreli kültürlerinin devam ettirilebildiği, kültür ortamında bulunan hormonlara karşı duyarlı olduğu ve canlı bir doku oluşturmak için hücrelerin farklılaşabildiği gösterilmiştir. Hazırlanan organoidlerin 1 yıldan uzun süre büyütülebildiği ve süresiz olarak dondurularak saklanabileceği belirtilmiştir (Sheridan ve ark., 2020).

Son yıllarda kıkırdak doku mühendisliğinde kıkırdak onarımı ve rejenerasyonu için hücre temelli tedaviler popüler olmuştur. Ancak farklı hücre kültür

yöntemleriyle hazırlanan kondrositlerin orijinal kıkırdak dokusuna göre daha az dayanıklı yapılar sergiledikleri bilinmektedir. 2B kültür yöntemleriyle çoğaltılan hücrelerin kondrojenik farklılaşma eğilimi gösterdiği çalışmalar vardır. 2B kültür ile elde edilen kondrositlerin orijinal kıkırdak dokusunun yapısındaki hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimlerini taklit etmede başarısız olduğu görülmektedir. Orijinal kıkırdak dokusunu en iyi taklit edebilecek kültür yöntemlerinin 3B kültür yöntemleri olduğu düşünülmektedir (Gionet-Gonzales ve Leach, 2018). Bu nedenle 2B kültür ortamında çoğaltılan hücreler 3B yapı iskeleleri, membranlar ve hidrojel ile birleştirilerek kıkırdak doku yapısı taklit edilmeye çalışılmaktadır. 3B mikro dokular; pelet kültürü, döndürücü şişe kültürü, asılı damla yöntemi gibi yöntemler ile hazırlanabilir. Pelet kültür ve döndürücü şişe yöntemleri ile elde edilen sferoidlerin boyutlarının değişken olduğu bilinmektedir. Asılı damla yönteminde ise elde edilen sferoidler diğer iki yönteme kıyasla daha stabildir.

Günümüzde kıkırdak hasarı tedavisinde sıklıkla tercih edilen ACI veya MACI yöntemlerinde kullanılan hücre veya hücre malzeme kombinasyonları yerine biyoaktif polisakkaritler ve birçok hücrenin bir araya gelerek oluşturdukları sferoidlerin kullanılmasının daha iyi sonuçlar elde edileceğini düşünüyoruz. Hücresel mikro doku yapılarının oluşturulması için sferoidler hazırlanırken biyoaktif polisakkarit olan κ -karragenan'ın sferoid oluşumundan önce ortama eklenmesiyle doğal ECM yapısı taklit edilmeye çalışılmıştır. Hücre-ECM yoğunluk farkı için κ -karragenan 50, 100 ve 250 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Ortamda κ -karragenan miktarı arttıkça sferoid çapının büyüdüğü ve daha gevsek yapıli sferoidler oluşturduğu gözlemlenmiştir. 35. günde sferoidlerin daha kompakt bir yapı kazanarak çaplarının birbirine daha yakın olduğu gözlemlenmiştir. Sferoid çapları literatürde farklı hücre ve yöntemlerle elde edilen sferoidler ile kıyaslandığında çap olarak büyük oldukları gözlemlenmiştir.

Ortama eklenen biyoaktif polisakkaritin *in vitro* kültür koşullarında hücre dışı matriks birimini önemli ölçüde artırdığı gözlemlenmiştir. Bu elde edilen sonucun literatür ile de uyumlu olduğu görülmüştür (Côtés ve ark., 2021; De Moor ve ark., 2020; Stuart ve ark., 2017; De Pieri ve ark., 2020). Literatürde ortamın

kalabalıklaşması için kullanılan polisakkaritlerin kültür süresini kısalttığı ve farklılaşmayı hızlandırdığı gösterilmiştir (Benny ve ark., 2016). Allojenik mezenkimal kök hücre kaynaklarından üretilen iskelesiz kondrosferlerin hasarlı kıkırdak dokuya basit cerrahi girişimler ile uygulanarak daha hızlı tedavi sağlanabileceği düşünülmektedir. Literatürde iskelesiz kondrosferlerin kullanımının gelecekte artacağı öngörülmektedir (Guo ve ark., 2023).

Sferoidlerin *in vitro* ortamda ikili ve çoklu füzyon deneyleri yapılmıştır. İki sferoid 96 kuyulu kültür kabı içinde bir araya getirilerek kıkırdak mikro doku füzyonu gerçekleştirebildiği gözlemlenmiştir. Sferoidlerin çift füzyonu birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Füzyonun ilk 24 saati boyunca ikili uzunluk ve genişlik ölçümlerinde azalmanın olduğu, ilerleyen ölçümlerde ise genişliğin artarak uzunluğa yaklaştığı ve ikili sferoidlerin sıkılaşarak daha kompakt küresel bir yapı kazandığı görülmüştür. 4'lü füzyon deneylerinde ilk 48 saat boyunca toplam uzunluk ve genişlik ölçümleri azaldı. 48 saat sonraki ölçümlerde küresel bir yapı kazandıkları gözlemlendi.

Tüm konsantrasyonlarda hazırlanan sferoidler kollajen içeriğinin belirlenmesi için pikro-sirius kırmızı ile ve glikozaminoglikan yapılarının belirlenmesi için ise alsiyen mavisi ile boyanmıştır. Glikozaminoglikan içeriğinin ve kollajen liflerinin zamana bağımlı olarak arttığı gözlemlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp hasarlı veya işlevsiz dokuları restore etmek ve yaşam beklentisini arttırmak amacıyla bir organ veya doku kaybı veya yetmezliği yaşayan hastaları tedavi edebilmek için umut verici bir alandır. Doku mühendisliği ürünlerinin yerine konulacağı dokuya en yakın fizikokimyasal ve biyolojik özelliklere sahip olabilmesi için doku mühendisliği ürünlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Doku mühendisliği yöntemleri ile üretilen ürünün doğal dokuya en yakın özellikte ve yüksek biyouyumluluk göstermesi gerekmektedir. Doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler ile kök hücrelerin birleştirilmesiyle biyouyumluluğu arttırdığı düşünülmektedir. MKH doku mühendisliği uygulamalarında kullanımı son derece yaygın olup MKH'lerin kondrojenik farklılaşabilme yeteneklerinden yararlanılarak üç-boyutlu doku mühendisliği ürünleri tasarlanabilmektedir.

UK-MKH'leri kök hücre temelli tedaviler için uygun bir aday olarak görülmektedir. UK-MKH izolasyonu için donör, uygun izolasyon yöntemi, büyük ölçekli çoğaltılması ve hücre bankacılığı için önemli avantajlar sunmaktadır. Bugüne kadar prelinik ve klinik birçok çalışmada UK-MKH'lerinin etkinliği ve güvenliği test edilmiştir. UK-MKH'lerinin klinikte kullanılabilmesi için donör seçim kriterlerinin, transplante edilecek optimal dozun, saklanma koşullarının ve klinikte güvenle kullanılması ile ilgili süreçlerin standardize edilmesine ihtiyaç vardır.

3B doku mühendisliği ürünlerinin 2B kültür ürünlerinden daha başarılı sonuçlar ürettiği düşünülmektedir. Kıkırdak dokusunun kan besleme sisteminin ve innervasyonunun bulunmaması, kondrositlerin görece düşük metabolik aktivitesi ve yüksek ECM yoğunluğu nedeniyle kendi kendini yenileme yeteneği sınırlıdır. Mevcut kıkırdak dokusunu destekleyebilecek fonksiyonel bir kıkırdak dokusu tasarlamak amacıyla hücre-ECM yoğunluk farkları önemlidir. Hücre-ECM yoğunluğu üretilen kıkırdak dokusunun mekanik özelliklerini de belirlemektedir. Mevcut literatür incelendiğinde kıkırdak doku mühendisliği için kullanılan birçok

doku mühendisliği ürünü olmasına rağmen kıkırdak dokusunun fiziksel işlevlerini tam anlamıyla yerine getirebilecek bir doku mühendisliği ürünü konusunda eksiklikler mevcuttur. Orijinal kıkırdak dokuya en yakın doku mühendisliği ürününü hazırlayabilmek için bazal besinlerin, hücre yoğunluğunun, kültür ortamının, kültür yönteminin, mekanik kuvvetlerin, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin MKH farklılaşması üzerinde önemli etkileri vardır ve bunların klinikte kullanım için standartlaştırılmış kültür koşulları gerekmektedir.

Bu çalışmada temel hücre kaynağı olarak tercih ettiğimiz UK-MKH'leri, gelecekte kök hücre temelli klinik uygulamalar için büyük potansiyele sahiptir. Bu tez çalışmasında 3B hücre kültürü ortamında UK-MKH – ECM yoğunluğunun kondrojenik farklılaşması üzerine etkilerinin araştırılmasıyla kondrojenik özellik gösteren kondrosferler elde edilmiştir. Elde edilen 3B kondrosferler ile kıkırdak dokusundaki hücre davranışları gözlemlenebilir ve mevcut mekanizmaları keşfedilmesine olanak sağlayabilir.

ÖZET

Hücre-ECM Yoğunluk Oranının Üç Boyutlu Kök Hücre Kültürlerinin Kondrojenik Farklılaşmasına Etkisinin Araştırılması

Doku mühendisliği işlevsiz dokuları restore etmek ve yaşam beklentisini arttırmak amacıyla bir organ veya doku kaybı veya yetmezliği yaşayan hastaları tedavi edebilmek için umut verici bir tedavi yaklaşımı olmuştur. Doku mühendisliğinde elde edilecek ürünün doğal yapıya en yakın özellikte olması ve en yüksek faydayı sağlaması beklenmektedir. Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) doku mühendisliği uygulamalarında kullanımı son derece yaygın olup MKH'lerin kondrojenik farklılaşabilme yeteneklerinden yararlanılarak üç-boyutlu (3B) doku mühendisliği ürünleri tasarlanabilmektedir. Mevcut kıkırdak dokusunu destekleyebilecek fonksiyonel bir kıkırdak doku tasarlamak amacıyla dokunun mekanik özelliklerini belirleyen hücre-ECM yoğunluk farkları önemlidir. Çalışmada üç-boyutlu hücre kültürü ortamında insan plasenta kaynaklı umbilikal kord mezenkimal kök hücre – ECM yoğunluğunun kondrojenik farklılaşması üzerine etkileri araştırıldı. 3B kültür ortamında hücre sayısı sabit tutularak hücre-ECM yoğunluk farkı için κ -karragenan'ın 4 farklı konsantrasyonunda ve iki farklı kültür ortamında (standart ve kondrojenik tam kültür ortamı) sferoidler hazırlandı. Kondrojenik farklılaşma için her iki kültür ortamında ve 4 farklı konsantrasyonda hazırlanan sferoidlerin morfolojik ölçümleri, füzyon deneyleri ve histokimyasal boyamaları incelendi. Çalışma sonucunda 3B kültür yöntemiyle hazırlanan sferoidlerin kondrojenik farklılaşma gösterdiği tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: Hücre Dışı Matriks, κ -karragenan, Kondrojenik Farklılaşma, Mezenkimal Kök Hücre, 3B kültür

SUMMARY

Investigation of the Effect of Cell-ECM Density Ratio on Chondrogenic Differentiation of Three-Dimensional Stem Cell Cultures

Tissue engineering has been a promising approach to restoring dysfunctional tissues and increasing life expectancy in treating patients experiencing organ or tissue loss or failure. However, the product obtained in tissue engineering is expected to be closest to the natural structure and will provide the highest benefit. Using mesenchymal stem cells (MSCs) in tissue engineering applications is extremely common, and three-dimensional tissue engineering products can be designed by utilizing the chondrogenic differentiation abilities of MSCs. Cell-ECM density differences, which determine the tissue's mechanical properties, are important to design a functional cartilage tissue that can support the existing cartilage tissue. In this study, the effects of umbilical cord mesenchymal stem cell – ECM density on chondrogenic differentiation investigated in a three-dimensional cell culture medium. Spheroids were prepared at four different concentrations of κ -carrageenan and in two different culture mediums (standard and chondrogenic complete culture medium) for the cell-ECM density difference by keeping the cell number constant in the 3D culture medium. Morphological measurements, fusion experiments and histochemical staining of spheroids prepared in both culture media and at four different concentrations for chondrogenic differentiation examined. As a result of the study, it determined that spheroids prepared by the 3D culture method showed chondrogenic differentiation.

Keywords: Extracellular Matrix, κ -carragenan, Chondrogenic Differentiation, Mesenchymal Stem Cell, 3D Culture

KAYNAKLAR

- ANTONI D, BURCKEL H, JOSSET E, NOEL G (2015). Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International journal of molecular sciences*, **16(3)**: 5517-5527.
- ARMOIRY X, CUMMINS E, CONNOCK M, METCALFE A, ROYLE P, JOHNSTON R (2019). Autologous chondrocyte implantation with chondrosphere for treating articular cartilage defects in the knee: an evidence review group perspective of a NICE single technology appraisal. *PharmacoEconomics.*, **37**: 879-886.
- ASATRIAN G, PHAM D, HARDY WR, JAMES AW, PÉAULT B (2015). Stem cells technology for bone regeneration: current status and potential applications. *Stem Cells Cloning*, **8**: 39-40.
- AWAD HA, WICKHAM MQ, LEDDY HA, GIMBLE JM, GUILAK F (2004). Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials*. **25(16)**: 3211-3222.
- BAGHABAN ESLAMINEJAD M, MARDPOUR S, EBRAHIMI M, ESLAMINEJAD MB (2008). Growth kinetics and in vitro aging of mesenchymal stem cells isolated from rat adipose versus bone marrow tissues., *Iranian Journal of Veterinary Surgery*, **3(2)**: 9-20.
- BAI K, LEE CL, LIU X, LI J, CAO D, ZHANG L, HU D, LI H, HOU Y, XU Y, KAN ASY, CHEUNG KW, NG EHY, YEUNG WSB, CHIU PCN (2022). Human placental exosomes induce maternal systemic immune tolerance by reprogramming circulating monocytes. *Journal of Nanobiotechnology*, **20(1)**: 86-102.
- BAKSH D, YAO R, TUAN RS (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem cells*, **25(6)**: 1384-1392.
- BARTOSH TJ, YLÖSTALO JH, MOHAMMADIPOOR A, BAZHANOV N, COBLE K, CLAYPOOL K, LEE RH, CHOI H, PROCKOP DJ (2010). Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107(31)**: 13724-13729.
- BARTOSH TJ, YLOSTALO JH (2014). Preparation of anti-inflammatory mesenchymal stem/precursor cells (MSCs) through sphere formation using hanging-drop culture technique. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, **28(1)**: 2B-6.
- BENNY P, BADOWSKI C, BIRGITTE LANE E, RAGHUNATH M (2016). Improving 2D and 3D skin in vitro models using macromolecular crowding. *Journal of Visualized Experiments.*, **114**: 1-11.

- BENTHIEN JP, BEHRENS P (2011). The treatment of chondral and osteochondral defects of the knee with autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC): Method description and recent developments. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, **19(8)**: 1316-1319.
- BOBADILLA AVP, ARÉVALO J, SARRÓ E, BYRNE HM, MAINI PK, CARRARO T, BALOCCO S, MESEDUER A, ALARCÓN T (2019). In vitro cell migration quantification method for scratch assays. *Journal of the Royal Society Interface*, **16(151)**: 1-11.
- BONAB MM, ALIMOGHADDAM K, TALEBIAN F, GHAFARI SH, GHAVAMZADEH A, NIKBIN B (2006). Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biology*, **7**: 1-7.
- BOYAN BD, DOROUDI M, SCOTT K, SCHWARTZ Z. (2018). Cartilage. In *Vitamin D. Academic Press*. **1**: 405-417.
- BRESLIN S, O'DRISCOLL L (2013). Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug discovery today*, **18(5-6)**: 240-249.
- BRITTBERG M. (2010). Cartilage Morphology. *Cartilage Surgery E-Book: An Operative Manual, with Expert Consult*, Chapter 1: 1-8.
- BURTON GJ, FOWDEN AL (2015). The placenta: A multifaceted, transient organ. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **370 (1663)**: 1-8.
- CAPLAN AI (2009). Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, **217(2)**: 318-324.
- CAPLAN AI, SORRELL J M (2015). The MSC curtain that stops the immune system. *Immunology letters*, **168(2)**: 136-139.
- CASTRECHINI NM, MURTHI P, GUDE NM, ERWICH JJHM, GRONTHOS S, ZANNETTINO A, BRENNECKE SP, KALIONIS, B (2010). Mesenchymal stem cells in human placental chorionic villi reside in a vascular Niche. *Placenta*, **31(3)**: 203-212.
- CHAUHAN PS, SAXENA A (2016). Bacterial carrageenases: an overview of production and biotechnological applications. *3 Biotech*, **6(2)**: 1-18.
- CHIANG CE, FANG YQ, HO CT, ASSUNÇÃO M, LIN SJ, WANG YC (2021). Bioactive decellularized extracellular matrix derived from 3D stem cell spheroids under macromolecular crowding serves as a scaffold for tissue engineering. *Advanced Healthcare Materials*, **10(11)**: 1-13.
- CHOWDHURY S, GHOSH S (2021). Stem Cells an Overview. *Stem Cells: Biology and Therapeutics*, 1-21.
- CÔRTEZ I, MATSUI RAM, AZEVEDO MS, BEATRICI A, SOUZA KLA, LAUNAY G (2021). A scaffold- And serum-free method to mimic human stable cartilage validated by secretome. *Tissue Eng Part A*, **27(5-6)**: 311-27.

- COSTA EC, MOREIRA AF, DE MELO-DIOGO D, GASPAR VM, CARVALHO, MP, CORREIA IJ (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances*, **34(8)**: 1427-1441.
- CUKIERMAN E, PANKOV R, YAMADA KM (2002). Cell interactions with three-dimensional matrices. *Current Opinion in Cell Biology*, **14(5)**: 633-640.
- D'AYALA GG, MALINCONICO M, LAURIENZO P (2008). Marine derived polysaccharides for biomedical applications: *Chemical Modification Approaches. Molecules.*, **13(9)**: 2069-2106.
- DALZIELL J, KEANEY J, KEARNES M, THIERRY B, WINTER M (2022). Bioengineering human placentas: social implications of an advancing field. *Trends in Biotechnology*, **40(2)**: 137-140.
- DE MOOR L, FERNANDEZ S, VERCRUYSE C, TYTGAT L, ASADIAN M, DE GEYTER N (2020). Hybrid bioprinting of chondrogenically induced human mesenchymal stem cell spheroids. *Front Bioeng Biotechnol.*, **8**: 484-504.
- DE PIERI A, RANA S, KORNTNER S, ZEUGOLIS DI (2020). Seaweed polysaccharides as macromolecular crowding agents. *Int J Biol Macromol.*, **164**: 434-46.
- DHALIWAL A (2012). 3D cell culture: A review. *Mater Methods*, **2**: 1-27.
- DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC, KRAUSE DS, DEANS RJ, KEATING A, PROCKOP DJ, HORWITZ, EM (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*, **8(4)**: 315-317.
- DUSZA HM, VAN BOXEL J, VAN DUURSEN MBM, FORSBERG MM, LEGLER J, VÄHÄKANGAS KH (2023). Experimental human placental models for studying uptake, transport and toxicity of micro- and nanoplastics. *Science of the Total Environment.*, **860**: 1-17.
- EDMONDSON R, BROGLIE JJ, ADCOCK AF, YANG L (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and Drug Development Technologies*, **12(4)**: 207-218.
- ELÇİN M (2016). Kök hücrelere bakış: Tanımlar, kavramlar ve sınıflandırmalar. *Tüba Kök Hücre Araştırmaları ve Biyoetik Sempozyumu Raporu*. **20**: 19-33.
- ERGGELET C, VAVKEN P (2016). Microfracture for the treatment of cartilage defects in the knee joint – A golden standard? *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma.*, **7(3)**: 145-152.
- ESCHWEILER J, HORN N, RATH B, BETSCH M, BARONCINI A, TINGART M, MIGLIORINI F. (2021). The biomechanics of cartilage—An overview. *Life*, **11(4)**: 302.
- FISHER SJ (2000). The Placenta Dilemma. *Semin Reprod Med.*, **18(3)**: 321-326.

- FREEDMAN BR, MOONEY DJ (2019). Biomaterials to Mimic and Heal Connective Tissues. *Advanced Materials.*, **31(19)**: 1-27.
- FRIEDENSTEIN AJ, GORSKAJA UF, KULAGINA NN (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.*, **4(5)**: 267-274.
- GAHUNIA HK, PRITZKER KP. (2020). Structure and function of articular cartilage. *Articular Cartilage of the Knee: Health, Disease and Therapy*, **3**: 4-21.
- GARIKIPATI VNS, SINGH SP, MOHANRAM Y, GUPTA AK, KAPOOR D, NITYANAND S. (2018). Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human fetus heart. *PLoS One*, **13(2)**:1-14.
- GARGETT CE, MASUDA H. (2010). Adult stem cells in the endometrium. *Molecular Human Reproduction*, **16(11)**: 818-834.
- GERECHT S, BURDICK JA, FERREIRA LS, VUNJAK-NOVAKOVIC G (2007). Hyaluronic acid hydrogel for controlled selfrenewal and differentiation of human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104(27)**:11298-11303.
- GHANBARZADEH M, GOLMORADIZADEH A, HOMAEI A (2018). Carrageenans and carrageenases: versatile polysaccharides and promising marine enzymes. *Phytochemistry Reviews.*, **17(3)**: 535-571.
- GILLIS JA. (2019). The development and evolution of cartilage. *Elsevier Reference Module in Life Sciences: Developmental Biology*. Amsterdam, Elsevier, 1-13.
- GIONET-GONZALES MA, LEACH JK. (2018). Engineering principles for guiding spheroid function in the regeneration of bone, cartilage, and skin. *Biomedical Materials*, **13(3)**: 034109.
- GOLDRING MB, TSUCHIMUCHI K, IJIRI K. (2006). The control of chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, **97(1)**: 33-44.
- GÖHNER C, SVENSSON-ARVELUND J, PFARRER C, HÄGER JD, FAAS M, ERNERUDH J (2014). The placenta in toxicology. Part IV: Battery of toxicological test systems based on human placenta. *Toxicol Pathol.*, **42(2)**: 345-351.
- GUNATILLAKE PA, ADHIKARI R (2003). Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells & Materials* **5(1)**: 1-16.
- GUO X, MA Y, MIN Y, SUN J, SHI X, GAO G (2023). Progress and prospect of technical and regulatory challenges on tissue-engineered cartilage as therapeutic combination product. *Bioactive Materials.*, **20**: 501-518.
- GUTTMACHER AE, MADDOX YT, SPONG CY (2014). The Human Placenta Project: Placental structure, development, and function in real time. *Placenta*, **35(5)**: 303-4.
- HARRISON RG (1906). Observations on the living developing nerve fiber. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **4(1)**: 140-143.

- HASS R, KASPER C, BÖHM S, JACOBS R (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, **9**: 12-26.
- HSIAO AY, TUNG YC, QU X, PATEL LR, PIANTA KJ, TAKAYAMA S. (2012). 384 hanging drop arrays give excellent Z-factors and allow versatile formation of co-culture spheroids. *Biotechnology and Bioengineering*, **109(5)**: 1293-1304.
- INT' ANKER PS, SCHERJON SA, KLEIJBURG-VAN DER KEUR C, DE GROOT-SWING GM, CLAAS FH, FIBBEWE, KANHAI HH (2004) Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*, **22**: 1338-1345.
- JAFARI A, FARAHANI M, SEDIGHI M, RABIEE N, SAVOJI H (2022). Carrageenans for tissue engineering and regenerative medicine applications: A review. *Carbohydrate Polymers*, **281**: 1-21.
- JEDRZEJCZAK-SILICKA M. (2017). History of cell culture. *New Insights into Cell Culture Technology*, **1**: 13.
- JENSEN C, TENG Y (2020). Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture?. *Frontiers in Molecular Biosciences*, **7**: 33-48.
- JOSEPH JS, MALINDISA ST, NTWASA M (2018). Two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cell culturing in drug discovery. *Cell Culture*, **2**: 1-22.
- KAMINSKA A, WEDZINSKA A, KOT M, SARNOWSKA A (2021). Effect of long-term 3D spheroid culture on WJ-MSC. *Cells*, **10(4)**: 719-739.
- KASSIS I, ZANGI L, RIVKIN R, LEVDANSKY L, SAMUEL S, MARX G, GORODETSKY R. (2006). Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplantation*, **37(10)**: 967-976.
- KELLY AM, PASCHOS NK, GIOTIS D, KELLY JD. (2019). Articular Cartilage Physiology. *General Orthopaedics and Basic Science*, 69-70.
- KERN S, EICHLER H, STOEVE J, KLUTER H, BIEBACK K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, **24(5)**: 1294-1301.
- KHALIFEH SOLTANI S, FOROGH B, AHMADBEIGI N, HADIZADEH KHARAZI H, FALLAHZADEH K, KASHANI L (2019). Safety and efficacy of allogenic placental mesenchymal stem cells for treating knee osteoarthritis: a pilot study. *Cytotherapy*, **21(1)**: 54-63.
- KHAN F, AHMAD SR (2013). Polysaccharides and their derivatives for versatile tissue engineering application. *Macromolecular Bioscience*, **13(4)**: 395-421.
- KHOSHGOFTAR M, WILSON W, ITO K, VAN DONKELAAR CC (2013). Influence of tissue- and cell-scale extracellular matrix distribution on the mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *Biomech Model Mechanobiol*, **12(5)**: 901-13.

- KİM TK, SHARMA B, WILLIAMS CG, RUFFNER MA, MALIK A, MCFARLAND EG, ELISSEEFF JH (2003). Experimental model for cartilage tissue engineering to regenerate the zonal organization of articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, **11(9)**: 653-664.
- KIM W, GWON Y, PARK S, KIM H, KIM J (2023). Therapeutic strategies of three-dimensional stem cell spheroids and organoids for tissue repair and regeneration. *Bioactive Materials*, **19**: 50-74.
- KLOAREG B, QUATRANO RS (1988). Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, **26**: 259-315.
- KOJIMA J, ONO M, KUJI N, NISHI H (2022). Human chorionic villous differentiation and placental development. *International Journal of Molecular Sciences*, **23(14)**: 1-18.
- KOLTSOVA AM, KRYLOVA TA, MUSORINA AS, ZENIN VV, TURILOVA VI, YAKOVLEVA TK, POLJANSKAYA GG (2018). The dynamics of cell properties during long-term cultivation of two lines of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of human umbilical cord. *Cell Tiss. Biol.*, **12**: 7-19.
- KOLTSOVA AM, ZENIN VV, PETROSYAN MA, TURILOVA VI, YAKOVLEVA TK, POLJANSKAYA GG (2021). Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from different regions of the placenta of the same donor. *Cell and Tissue Biology*, **15**: 356-369.
- KUZNETSOVA TA, ANDRYUKOV BG, BESEDNOVA NN, ZAPOROZHETS TS, KALININ AV (2020). Marine algae polysaccharides as basis for wound dressings, drug delivery, and tissue engineering: A review. *Journal of Marine Science and Engineering*, **8(7)**: 1-25.
- LANGER R, VACANTI JP. (1993). Tissue Engineering. *Science*, **260(5110)**: 920-926.
- LANGHANS SA (2018). Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Frontiers in Pharmacology*, **9**: 1-14.
- LI C. (2022). Isolation and Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells, Functional Assays and Long-Term Culture Associated Alterations of Cellular Properties. *Cell Culture: Advanced Technology and Applications in Medical and Life Sciences*, **71**: 1-28.
- LI M, LUAN F, ZHAO Y, HAO H, LIU J, DONG L, FU X, HAN W (2017). Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates wound healing with fewer scars. *International Wound Journal*, **14(1)**: 64-73.
- LI T, XIA M, GAO Y, CHEN Y, XU Y (2015). Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **15(9)**: 1293-1306.
- LI Y, HUANG G, LIM, WANG L, ELSON EL, JIAN LU T, GENIN GM, XU F (2016). An approach to quantifying 3D responses of cells to extreme strain. *Scientific Reports*, **6(1)**: 19550.
- LI Z, CUI Z (2014). Three-dimensional perfused cell culture. *Biotechnology Advances*, **32(2)**: 243-254.

- LIANG CC, PARK AY, GUAN JL (2007). In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.*, **2(2)**: 329-333.
- LOBO SE, LEONEL LCPC, MIRANDA CMFC, COELHO TM, FERREIRA GAS, MESS A (2016). The placenta as an organ and a source of stem cells and extracellular matrix: A review. *Cells Tissues Organs.*, **201(4)**: 239-252.
- MAKRIS EA, GOMOLL AH, MALIZOS KN, HU JC, ATHANASIOU KA (2015). Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nature Reviews Rheumatology.*, **11(1)**: 21-34.
- MALTEPE E, FISHER SJ (2015). Placenta: the forgotten organ. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **31**: 523-552.
- MENDICINO M, BAILEY AM, WONNACOTT K, PURI RK, BAUER SR (2014). MSC-based product characterization for clinical trials: An FDA perspective. *Cell Stem Cell.*, **14(2)**: 141-145.
- MIHU CM, MIHU D, COSTIN N, RUS CIUCA D, SUSMAN S, CIORTEA R (2008). Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord. *Rom J Morphol Embryol* **49**: 441-446.
- MIN S, CHOE C, ROH S (2021). Aqp3 increases intercellular cohesion in nslc a549 cell spheroids through exploratory cell protrusions. *Int J Mol Sci.*, **22(8)**: 4287-4303.
- MUSORINA AS, ZENIN VV, TURILOVA VI, YAKOVLEVA TK, POLJANSKAYA GG (2019). Characterization of a nonimmortalized mesenchymal stem cell line isolated from human epicardial adipose tissue. *Cell and Tissue Biology*, **13**: 247-258.
- NAEEM A, GUPTA N, NAEEM U, KHAN MJ, ELRAYESS MA, CUI W (2022). A comparison of isolation and culture protocols for human amniotic mesenchymal stem cells. *Cell Cycle.*, **21(15)**: 1543-1556.
- NEJADNIK H, HUI JH, CHOONG EPF, TAI BC, ENG HIN LEE (2010). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: An observational cohort study. *American Journal of Sports Medicine.*, **38(6)**: 1110-1116.
- OLSON JL, ATALA A, YOO JJ (2011). Tissue engineering: current strategies and future directions. *Chonnam Medical Journal*, **47(1)**: 1-13.
- PAROLINI O, ALVIANO F, BAGNARA GP, BILIC G, BÜHRING HJ, EVANGELISTA M, HENNERBICHLER S, LIU B, MAGATTI M, MAO N, MIKI T, MARONGIU F, NAKAJIMA H, NIKAI DO T, PORTMANN-LANZ CB, SANKAR V, SONCINI M, STADLER G, SURBEK D, TAKASHI TA, REDL H, SAKURAGAWA N, WOLBANK S, ZEISBERGER S, ZISCH A, STROM SC (2008). Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. *Stem Cells*, **26 (2)**: 300-311.
- PATEL J, SHAFIEE A, WANG W, FISK NM, KHOSROTEHRANI K (2014). Novel isolation strategy to deliver pure fetal-origin and maternal-origin mesenchymal stem cell (MSC) populations from human term placenta. *Placenta*, **35(11)**: 969-971.
- PLITMAN MAYO R (2018). Advances in Human Placental Biomechanics. *Computational and Structural Biotechnology Journal.*, **16**: 298-306.
- RAPE AD, ZIBINSKY M, MURTHY N, KUMAR S (2015). A synthetic hydrogel for the high-throughput study of cell-ECM interactions. *Nat Commun.*, **6(1)**: 1-9.

- RAVI M, PARAMESH V, KAVIYA SR, ANURADHA E, PAUL SOLOMON FD (2015). 3D cell culture systems: advantages and applications. *Journal of Cellular Physiology*, **230**(1): 16-26.
- RIMANN M, & GRAF-HAUSNER U (2012). Synthetic 3D multicellular systems for drug development. *Current Opinion in Biotechnology*, **23**(5): 803-809.
- SALGADO AJ, OLIVEIRA JM, MARTINS A, TEIXEIRA FG, SILVA NA, NEVES NM (2013). Tissue engineering and regenerative medicine: Past, present, and future. *International Review of Neurobiology*, **108**: 1-33.
- SANO K, USUI M, MORITANI Y, NAKAZAWA K, HANATANI T, KONDO H, NAKATOMI M, ONIZUKA S, IWATA T, SATO T, TOGARI A, ARIYOSHI W, NISHIHARA T, NAKASHIMA K (2020). Co-cultured spheroids of human periodontal ligament mesenchymal stem cells and vascular endothelial cells enhance periodontal tissue regeneration. *Regenerative Therapy*, **14**: 59-71.
- SECCO M, ZUCCONI E, VIEIRA NM, FOGAÇA LLQ, CERQUEIRA A, CARVALHO MDF, JAZEDJE T, OKAMOTO OK, MUOTRI AR, ZATZ M (2008). Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood!. *Stem cells*, **26**(1): 146-150.
- SENSEBE L, KRAMPERA M, SCHREZENMEIER H, BOURIN P, GIORDANO R (2010). Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox sanguinis*, **98**(2): 93-107.
- SHAFIEE A, FISK NM, HUTMACHER DW, KHOSROTEHRANI K, PATEL J (2015). Fetal endothelial and mesenchymal progenitors from the human term placenta: potency and clinical potential. *Stem Cells Transl. Med.*, **4**: 419-423.
- SHERIDAN MA, FERNANDO RC, GARDNER L, HOLLINSHEAD MS, BURTON GJ, MOFFETT A, TURCO MY (2020). Establishment and differentiation of long-term trophoblast organoid cultures from the human placenta. *Nat Protoc.*, **15**: 3441–3463.
- SOARES CP, MIDDLEJ V, DE OLIVEIRA MEW, BENCHIMOL M, COSTA ML, MERMELSTEIN C (2012). 2D and 3D-organized cardiac cells shows differences in cellular morphology, adhesion junctions, presence of myofibrils and protein expression. *PloS one*, **7**(5): 1-11.
- SOPHIA FOX AJ, BEDI A, RODEO SA. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*, **1**(6): 461-468.
- STREBECK R, JENSEN B, MAGANN EF (2022). Thick Placenta in Pregnancy: A Review. *Obstetrical & Gynecological Survey*, **77**(9): 547-557.
- STUART MP, MATSUI RAM, SANTOS MFS, CÔRTEZ I, AZEVEDO MS, SILVA KR (2017). Successful low-cost scaffold-free cartilage tissue engineering using human cartilage progenitor cell spheroids formed by micromolded nonadhesive hydrogel. *Stem Cells International*, **2017**: 1-11.
- SURDO JLL, MILLIS, BA, BAUER SR (2013). Automated microscopy as a quantitative method to measure differences in adipogenic differentiation in preparations of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, **15**(12): 1527-1540.
- SUTHERLAND RM, MCCREDIE JA, INCH WR (1971). Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, **46**(1): 113-120.
- SZEPESI Á, MATULA Z, SZIGETI A, VÁRADY G, SZALMA J, SZABÓ G, UHER F, SARKADI V, NÉMET K (2016). In vitro characterization of human mesenchymal

- stem cells isolated from different tissues with a potential to promote complex bone regeneration. *Stem Cells International*, **2016**: 1-9.
- TEOH PL, AKHIR HM, AJAK WA, HIEW VV (2023). Human mesenchymal stromal cells derived from perinatal tissues: Sources, characteristics and isolation methods. *Malaysian Journal of Medical Sciences.*, **30(2)**: 55-68.
- TROYER DL, WEISS ML (2008). Concise review: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem cells*, **26(3)**: 591-599.
- ULLAH S, KHALIL AA, SHAUKAT F, SONG Y (2019). Sources, extraction and biomedical properties of polysaccharides. *Foods*, **8(8)**: 304-327.
- UMLAUF D, FRANK S, PAP T, BERTRAND J. (2010). Cartilage biology, pathology, and repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**: 4197-4211.
- VELLASAMY S, SANDRASAIGARAN P, VIDYADARAN S, GEORGE E, RAMASAMY R (2012) Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from human placenta tissue. *World J Stem Cells*, **4**: 53-61.
- VENUGOPAL P, BALASUBRAMANIAN S, MAJUMDAR AS, TA M (2011). Isolation, characterization, and gene expression analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under xeno-free culture conditions. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, **4**: 39-50.
- WANG Q, YANG Q, WANG Z, TONG H, MA L, ZHANG Y, SHAN F, MENG Y, YUAN, Z (2016). Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from fetal-bone marrow, adipose tissue, and Warton's jelly as sources of cell immunomodulatory therapy. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, **12(1)**: 85-96.
- WILLERTH SM, ARENDAS KJ, GOTTLIEB DI, SAKIYAMA-ELBERT SE (2006). Optimization of fibrin scaffolds for differentiation of murine embryonic stem cells into neural lineage cells. *Biomaterials*. **27 (36)**: 5990-6003.
- WONG KL, LEE KBL, TAI BC, LAW P, LEE EH, HUI JHP (2013). Injectable cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in varus knees with cartilage defects undergoing high tibial osteotomy: A prospective, randomized controlled clinical trial with 2 years' follow-up. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery.*, **29(12)**: 2020-8.
- WU M, ZHANG R, ZOU Q, CHEN Y, ZHOU M, LI X, RAN R, CHEN Q (2018). Comparison of the biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from the human placenta and umbilical cord. *Sci Rep.*, **8(1)**: 5014-5023.
- XIANG Z, LIAO R, KELLY MS, SPECTOR M (2006). Collagen-GAG scaffolds grafted onto myocardial infarcts in a rat model: A delivery vehicle for mesenchymal stem cells. *Journal of Tissue Engineering*. **12(9)**: 2467-2478.
- YANG X, LI S, REN Y, QIANG L, LIU Y, WANG J (2022). 3D printed hydrogel for articular cartilage regeneration. *Composites Part B: Engineering.*, **237**: 1-50.
- YOO YI, KO KW, CHA SG, PARK SY, WOO J, HAN DK (2022). Highly effective induction of cell-derived extracellular matrix by macromolecular crowding for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. **107**: 391-400.

ZHANG W, ZHUANG A, GU P, ZHOU H, FAN X (2016). A review of the three-dimensional cell culture technique: Approaches, advantages and applications. *Current Stem Cell Research & Therapy*, **11(4)**: 370-380.

ZHAO YUE, SONG S, REN X, ZHANG J, LIN Q, ZHAO YANLI (2022). Supramolecular adhesive hydrogels for tissue engineering applications. *Chemical Reviews.*, **122(6)**: 5604-5640.

