

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PLASENTAL KÖK HÜCRELERİN
MAKROMOLEKÜLER KALABALIK ORTAMDA
KONDROJENİK FARKLILAŞMASININ İNCELENMESİ

Sıla ÖZÇELİK

DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Yaşar Murat ELÇİN

ANKARA

2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Plasental Kök Hücrelerin Makromoleküler Kalabalık Ortamda Kondrojenik Farklılaşmasının İncelenmesi” 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.

Sıla ÖZÇELİK

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Disiplinlerarası Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalı'nda Sıla ÖZÇELİK tarafından hazırlanan "Plasental Kök Hücrelerin Makromoleküler Kalabalık Ortamda Kondrojenik Farklılaşmasının İncelenmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25/07/2023

Prof. Dr. Aysel Çağlan GÜNAL

Gazi Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Ankara Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Serap DURKUT

Ankara Üniversitesi

Üye

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

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Eklem Kıkırdığı	1
1.1.1. Kıkırdak Yapısı	3
1.1. Kondrojenenez	6
1.2.1. Moleküler Düzeyde Kondrojenenez	6
1.3. Kıkırdak Hasarları	8
1.3.1. Artritler	8
1.4. Kıkırdak Hasarlarında Güncel Tedaviler	9
1.5. Doku Mühendisliği	10
1.5.1. Kıkırdak Doku Mühendisliği	12
1.6. Makromoleküler Kalabalıklaşma	13
1.6.1. Kalabalıklaştırıcılar	15
1.6.2. Karagenan (CRG)	18
1.7. Plazenta	20
1.8. Kök hücreler	22
1.8.1. Mezenkimal Kök Hücreler	24
1.8.1.1. Plazenta Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler	25
2. GEREÇ VE YÖNTEM	27
2.2. Plazenta Kaynaklı Kök Hücrelerinin Eldesi	28
2.3. Amniyotik Membran Kök Hücrelerin Pasajlanması	29
2.4. MKH Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	29
2.4.1. Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu Çözeltisi (PBS) Hazırlanması	29
2.4.2. Tam Vasat Besiyeri	30
2.5. Amniyotik Membran MKH Karakterizasyon Çalışmaları	30
2.5.1. Faz Kontrast Mikroskobu ile Görüntüleme	30
2.5.2. Hücrelerin Büyüme Eğrisi	30
2.5.3. Proliferasyon Analizi	31
2.5.4. Üçlü Soya Farklılaştırma	31
2.5.5. Akım Sitometri Analizi	33

2.5.6. Koloni Oluşturabilen Birim (CFU-f) Analizi	34
2.6. Deney Tasarımı	34
2.6.1 Makromoleküler kalabalıklaşma	34
2.6.2. Histokimyasal Boyama	36
2.7. Hücre Migrasyon Testi	37
2.8. Koloni Oluşturma Birimi Analizi	38
2.9. Kolajen İçeriği Belirlenmesi	39
2.9.1. Protein Miktar Tayini	39
2.9.2. SDS-PAGE	41
2.10. İstatistiksel Analizler	42
3. BULGULAR	43
3.1. Faz Kontrast Mikroskop ile Görüntüleme	43
3.2. Büyüme Eğrisi Analiz Bulguları	44
3.3. Proliferasyon Analizi Bulguları	45
3.4. Üçlü Soya Farklılaşma Görüntüleri	46
3.5. Akım Sitometri Bulguları	48
3.6. Koloni Oluşturabilen Birim (CFU-f) Analizi	50
3.7. Makromoleküler Kalabalıklaşma Faz Kontrast Mikroskop Görüntüleri	51
3.8. Histokimyasal Boyamalar	53
3.9. Hücre Migrasyon Testi Bulguları	59
3.10. Koloni Oluşturma Birimi Analiz Bulguları	62
3.11. Kolajen Miktarı Analiz Bulguları	64
4.TARTIşMA	70
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	82
ÖZET	83
SUMMARY	84
KAYNAKLAR	85
ÖZGEçMİş	90

ÖNSÖZ

Tez çalışmaları kapsamında bana her zaman engin bilgileri ve tecrübeleri ile yol gösteren, yardımlarını asla esirgemeyen ve beni en doğru şekilde yönlendiren değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında histokimyasal analizler başta olmak üzere deney planlamasından başlayarak tezin son anına kadar yanımda olan ve yardımlarını esirmeyen çok değerli hocam sayın Prof. Dr. A. Eser ELÇİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Bütün yüksek lisans sürecim ve deneysel çalışmalarımın tamamında yanımda olan ve yardımları ile birçok yol kat ettiğim sevgili çalışma arkadaşım ve çok kıymetli dostum Selda GÖKŞEN'e, tez sürecimde her zaman arkamda durup bana enerji veren ve bilgilerini paylaşan bütün ElçinLab ailesine çok teşekkür ederim.

Hayatımda her zaman maddi manevi arkamda duran, hayallerimi gerçekleştirmem için beni yüreklendiren, koşulsuz sevgileri ile beni güçlü hissettiren ve sabır gösteren annem Cemile ÖZÇELİK, babam Prof. Dr. Abdurrahman ÖZÇELİK, kardeşim Özgün ÖZÇELİK başta olmak üzere bütün aileme minnettarım. Bu yoğun süreç boyunca huzurlu olmam için elinden gelen her şeyi yapan, bana enerji veren, yüreklendiren ve hayatı daha anlamlı kılan Toprak BOSTAN'a ve kedilerim Lenu, Georgei ve Catherine'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sıla ÖZÇELİK

Ankara, Temmuz 2023

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
AZ-MKH	Amniyotik membran mezenkimal kök hücresi
atm	Atmosfer basıncı birimi
BMP	Kemik morfojenik proteini
BSA	Sığır serum albümini
β	Beta
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CD	Yüzey farklılaşma antijeni
CFU-f	Fibroblast koloni oluşturma potansiyeli
CRG	Karagenan
DMEM	Dulbecco Modifiye Eagle Besiyeri
DMSO	Dulbecco Modifiye Eagle Besiyeri F-12
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
ECM	Ekstraselüler matriks
ELISA	Enzime bağlı immünosorbent yöntemi
EtOH	Etanol
FBS	Fötal sığır serumu
GAG	Glikozaminoglikan
HCl	Hidroklorik asit
H&E	Hematoksilen ve eozin
IBMX	İzobütil metil ksantin
ITS	İnsülin- transferrin- selenöz asit
kDa	Kilodalton
KV	Kondrojenik vasat
Mho	Ohm birimi
MKH	Mezenkimal kök hücre
MMK	Makromoleküler kalabalıklaşma
mRNA	Haberci RNA

mL	Mililitre
κ	Kappa
K	Kontrol
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
P	Pasaj
P/S	Penisilin-streptomisin
PBS	Fosfat tamponlu izotonik çözelti
RNA	Ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez
SV	Standart vasat
T-25	25 cm ² 'lik hücre kültür kabı
T-75	75 cm ² 'lik hücre kültür kabı
TBE	Tris/Borat/EDTA çözeltisi
TGFβ-1	Transforme edici büyüme faktörü beta-1
PZR	Polimer zincir reaksiyonu
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Donnan Eşitliği	3
Şekil 1.1.1. Artiküler Kıkırdak Bölgeleri	5
Şekil 1.1.2. Artiküler Kıkırdak Kesitinde Bölgelerin Gösterimi	5
Şekil 1.2.1. Moleküler Düzeyde Kondrojeniz	7
Şekil 1.5. Doku Mühendisliği Yaklaşımı	12
Şekil 1.6. Makromoleküler Kalabalıklaşma	14
Şekil 1.6.2. Karagenan Alt Türleri	19
Şekil 1.7. Plasenta Kısımları	21
Şekil 1.8. Kök Hücre Özellikleri	22
Şekil 1.8.1. Mezenkimal Kök hücre Kaynakları	25
Şekil 2.6.1. κ -Karagenan Sterilizasyon İşlemi	35
Şekil 2.7. Migrasyon Deneyi ImageJ Alan Hesaplaması	38
Şekil 2.8. CFU-f Frekans Hesaplama Formülü.	39
Şekil 3.1. AZ-MKH'lerin Faz-Kontrast Mikroskobu ile Çekilen Pasaj Görüntüleri	44
Şekil 3.2. AZ-MKH Büyüme Eğrisi	45
Şekil 3.3. AZ-MKH Proliferasyon Eğrisi	46
Şekil 3.4.1. AZ-MKH'lerin Osteojenik Farklılaşması Deneyi ile İlgili Histokimyasal Boyamaların Işık Mikroskobu Görüntüleri.	47
Şekil 3.4.2. AZ-MKH'lerin Adipojenik ve Kondrojenik Farklılaşması Deneyleri ile İlgili Histokimyasal Boyamaların Işık Mikroskobu Görüntüleri.	47
Şekil 3.5. Akım Sitometri Analiz Sonuçları	49
Şekil 3.6. AZ-MKH Koloni Oluşturabilen Birim (CFU-f) Analiz Sonuçları	50
Şekil 3.7. Makromoleküler Kalabalıklaştırma Faz Kontrast Mikroskop Görüntüleri	52
Şekil 3.8.1. AZ-MKH'lerin Standart Vasat (SV) ve Kondrojenik Vasat (KV) Şartlarında 0 μ g/mL CRG Konsantrasyonunun 3. Gün Kültürlerinin H&E Boyanmış Işık Mikroskobu Görüntüleri	54
Şekil 3.8.2. AZ-MKH'lerin Standart Vasat (SV) ve Kondrojenik Vasat (KV) Şartlarında 50 μ g/mL CRG Konsantrasyonunun 3. Gün Kültürlerinin H&E Boyanmış Işık Mikroskobu Görüntüleri	54

Şekil 3.8.3. AZ-MKH'lerin Standart Vasat (SV) ve Kondrojenik Vasat (KV) Şartlarında 100 µg/mL CRG Konsantrasyonunun 3. Gün Kültürlerinin H&E Boyanmış Işık Mikroskobu Görüntüleri	55
Şekil 3.8.4. AZ-MKH'lerin Standart Vasat (SV) ve Kondrojenik Vasat (KV) Şartlarında 250 µg/mL CRG Konsantrasyonunun 3. Gün Kültürlerinin H&E Boyanmış Işık Mikroskobu Görüntüleri	55
Şekil 3.8.5. AZ-MKH'lerin Standart Vasat (SV) ve Kondrojenik Vasat (KV) Şartlarında 500 µg/mL CRG Konsantrasyonunun 3. Gün Kültürlerinin H&E Boyanmış Işık Mikroskobu Görüntüleri	56
Şekil 3.8.6. AZ-MKH'lerin Standart Vasat (SV) ve Kondrojenik Vasat (KV) Şartlarında 0 µg/mL CRG Konsantrasyonunun 7. Gün Kültürlerinin H&E Boyanmış Işık Mikroskobu Görüntüleri	56
Şekil 3.8.7. AZ-MKH'lerin Standart Vasat (SV) ve Kondrojenik Vasat (KV) Şartlarında 100 µg/mL CRG Konsantrasyonunun 7. Gün Kültürlerinin H&E Boyanmış Işık Mikroskobu Görüntüleri	57
Şekil 3.8.8. AZ-MKH'lerin Standart Vasat (SV) ve Kondrojenik Vasat (KV) Şartlarında 0 µg/mL CRG Konsantrasyonunun 21. Gün Kültürlerinin Alsiyen Mavisi Boyanmış Işık Mikroskobu Görüntüleri	57
Şekil 3.8.9. AZ-MKH'lerin Standart Vasat (SV) ve Kondrojenik Vasat (KV) Şartlarında 50 µg/mL CRG Konsantrasyonunun 21. Gün Kültürlerinin Alsiyen Mavisi Boyanmış Işık Mikroskobu Görüntüleri	58
Şekil 3.8.10. AZ-MKH'lerin Standart Vasat (SV) ve Kondrojenik Vasat (KV) Şartlarında 100 µg/mL CRG Konsantrasyonunun 21. Gün Kültürlerinin Alsiyen Mavisi Boyanmış Işık Mikroskobu Görüntüleri	58
Şekil 3.8.11. AZ-MKH'lerin Standart Vasat (SV) ve Kondrojenik Vasat (KV) Şartlarında 250 µg/mL CRG Konsantrasyonunun 21. Gün Kültürlerinin Alsiyen Mavisi Boyanmış Işık Mikroskobu Görüntüleri	59
Şekil 3.8.12. AZ-MKH'lerin Standart Vasat (SV) ve Kondrojenik Vasat (KV) Şartlarında 500 µg/mL CRG Konsantrasyonunun 21. Gün Kültürlerinin Alsiyen Mavisi Boyanmış Işık Mikroskobu Görüntüleri	59
Şekil 3.9.1. Migrasyon Testi Faz-Kontrast Mikroskop Görüntüleri.	61
Şekil 3.9.2. Migrasyon Analizi Sonuçları	62
Şekil 3.10.1. CFU-f Analizi Sonuçları.	63
Şekil 3.10.2. CFU-f Analiz Sonuçları Grafiği	64
Şekil 3.11.1. BSA Standart Eğri Grafiği	66

Şekil 3.11.2. Lowry Metodu ile Belirlenen Toplam Protein Miktarı Sonuçları	67
Şekil 3.11.3. SDS-PAGE 7. Gün (SV, KV) Jel Görüntüleri	68
Şekil 3.11.4. SDS-PAGE 14. Gün (SV, KV) Jel Görüntüleri	68
Şekil 3.11.5 SDS-PAGE 21. Gün (SV, KV) Jel Görüntüleri	69



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Eklem Kıkırdağı Yapısal Yüzdelik İçeriği	2
Çizelge 1.6.1. Kalabalıklaştırıcı Polisakkaritler	16
Çizelge 2.5.5. Akım Sitometri Analizinde Kullanılan Yüzey Belirteçleri ve Floresan Boyaları	33
Çizelge 2.6.1. Deney Grupları	36
Çizelge 2.7. Migrasyon Testi Zaman Noktaları	38
Çizelge 2.9.1. Lowry Metodu Bileşenleri	40
Çizelge 2.9.2. SDS-PAGE Jel İçerikleri	41
Çizelge 3.5. Amniyotik Membran MKH Akım Sitometri Belirteçleri ve İfade Edilme Oranları	48

1.GİRİŞ

1.1. Eklem Kıkırdağı

Eklem kıkırdağı, özelleşmiş bir hiyalin kıkırdak türüdür ve eklemlerin oluşumunu sağlayan kemiklerin uçlarını örterek vücuttaki hareketlerin ağrısız bir şekilde gerçekleşmesine olanak sağlar. Kıkırdaklar yapı olarak damardan, sinir ağlarından ve lenflerden yoksundur. Hareketli eklemlerde bulunan hiyalin kıkırdaklarda, hücre çeşidi olarak, sadece kıkırdak kütlesinin %1-10'unu oluşturan kondrositler yer almaktadır. Geri kalan kısmın %20-25'ini büyük moleküller, kalan kısmını ise su kaplamaktadır. Bunun haricinde kıkırdak yapısı kolajen ve proteoglikan yapıdaki proteinlerden meydana gelir (Sophia Fox ve ark., 2009; Eschweiler ve ark., 2021; Gillis, 2019). Kıkırdağın yapısal bileşimi **Çizelge 1.1.**'de verilmiştir.

Kondrositler kıkırdağın yapısında bulunan hücre tipidir. Bu hücreler lakün adı verilen yapıların içinde bulunurlar. Aktif hücrelerdir. Farklı kıkırdaklarda ve de kıkırdağın farklı tabakalarında kondrosit sayısı değişim gösterebilir. Kondrositler ECM'yi oluşturur ve devamlılığını sağlarlar, bunun için ise özel bir mikro çevre yaratırlar (Eschweiler ve ark., 2021)

Kıkırdağın yapısının büyük bir kısmını ekstraselüler matriks (ECM) oluşturmaktadır. ECM kondrositleri korur ve kıkırdak yapısı için büyük önem arz eder. ECM yapısında kolajen, proteoglikanlar, diğer proteinler ve su bulunur. Eklem kıkırdağının ana kolajeni, kolajen II'dir. Kolajen II, fibril bir ağ oluşturur, proteoglikanlardan oluşan agregatları bu ağın içine alır ve bu da ekleme gerilime dayanma gücü sağlar. Bunun haricinde, tip X kolajen, yapısal olarak destek sağlar, tip VI kolajen ise tip II'nin oluşturduğu ağa kondrositlerin tutunmasına yardımcı olur. Tip IX fibrillerin arasındaki iletişimi sağlar. Tip XI ise fibril oluşurken çekirdeklenmeye yardımcı olur. Proteoglikan yapılarında ise kondrotin sülfat I olarak da adlandırılan

agrekan vardır. ECM'deki osmozü ayarlar (Stampoultzis ve ark., 2021; Sabir ve ark., 2017; Medvedeva ve ark., 2018).

Çizelge 1.1. Eklem kıkırdakđı yapısal yüzdelik içeriği (Eschweiler ve ark., 2021)

Eklem Kıkırdak Bileşeni	Yüzdelik Değer
Kondrositler	1–10%
Su	70–80%
Kolajen	12–14%
Tip II	10–12%
Tip IX	~1%
Tip XI	~1%
Proteoglikan	7–9%
Hiyalüronik asit-proteoglikan agregatlar	6–8%
Diğer proteoglikanlar	~1%
Mineral materyaller	<4%
Matriks proteinleri	<1%

Kıkırdakđın fizikokimyasal yapısına bakıldığında ECM'nin büyük bir rolü olduğu görölmektedir. İyonların değişimi, kıkırdak dokusuna giren su veya diğer moleküllerin kontrolü maktrikse bağımlıdır. Eklem kıkırdakđının iyon değişim mekanizmasını anlayabilmek için Maroudas'ın çalışmaları öncü olmuştur: 1968 yılında yayımlanan araştırma makalesinde kıkırdakđın sabit yük yoğunluğunun eklem yüzeyinden uzaklaştıkça arttığı, santimetrede $6-8 \times 10^{-8}$ mho iletkenliği bulunduğu ve değişen basınçlarda sıvı akışının akıntı potansiyelinin 1 atm'de $4,8-6,0 \times 10^{-4}$ volt arasında değiştiğini bulmuştur. Bu çalışmaları yaparken matriks negatif yüklü olduğundan dolayı elektrolit solüsyonlarında Donnan eşitliğinden yararlanılmıştır. (Maroudas, 1968):

$$\left(\frac{a_{kasyon}}{\bar{a}_{kasyon}}\right)^{z_{kasyon}} = \left(\frac{a_{anyon}}{\bar{a}_{anyon}}\right)^{z_{anyon}} \quad (1)$$

a=solüsyondaki iyonun aktivite kofaktörü, $\bar{a}$ = kıkırdaktaki iyonun aktivite kofaktörü, z= iyonun değeri; ve elektronötrallik durumu, yani,

$$z_{kasyon}\bar{C}_{kasyon} = z_{anyon}\bar{C}_{anyon} + \bar{C}_{hareketsiz anyon} \quad (2)$$

$\bar{C}$ = kıkırdaktaki molar konsantrasyon

Şekil 1.1. Donnan Eşitliği

Kıkırdak dokunun büyümesi iki farklı şekilde gerçekleşebilmektedir: İnterstisyel büyüme şeklinde adlandırılan çeşidinde kıkırdak kütlesi içinde mitoz bölünme ile yeni kıkırdak oluşumunu kapsar. ECM yapımı bu büyüme ile sağlanır. Diğer çeşidi ise apozisyonel büyümedir ve perikondriumdaki progenitör hücrelerin yeni kondroblastlar oluşturmaya denir. Hücrelerde ekstrasellüler matriks oluşmaya başladıktan sonra bu iki süreç koordineli devam eder (Sophia Fox ve ark., 2009).

1.1.1. Kıkırdak Yapısı

Kıkırdak yapısal olarak 4 farklı tabakada incelenir. Bunlar sırası ile yüzeysel tabaka, geçiş tabakası, derin ya da radyal tabaka ve kalsifiye tabakadır. Radyal ve kalsifiye tabaka arasında *tidemark* adı verilen bir geçiş bölgesi bulunmaktadır (O'Connor ve ark., 2013; Goldring ve ark., 2006).

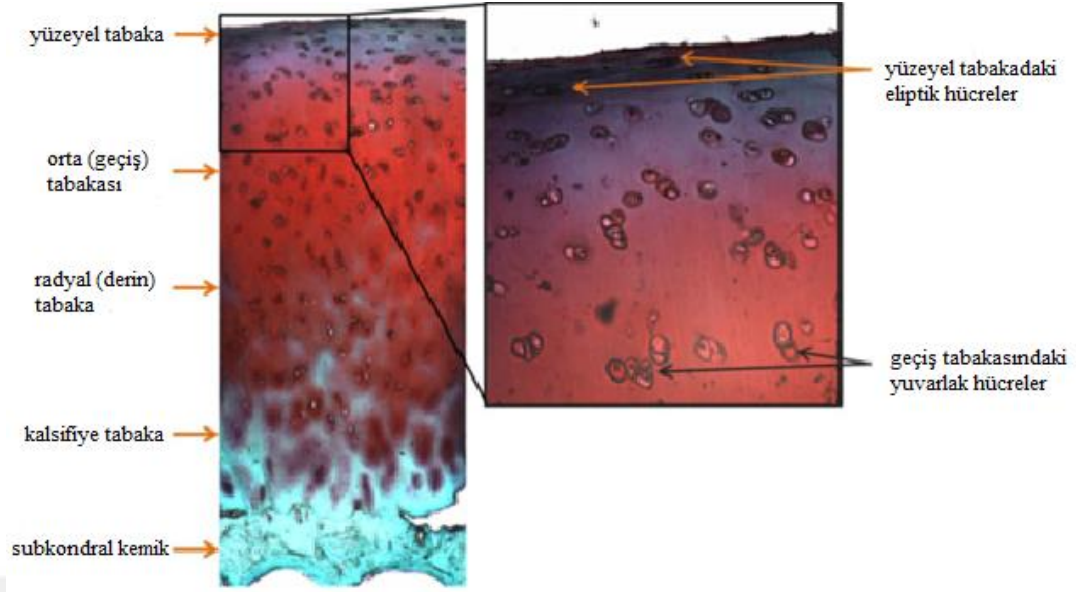
Yüzeysel tabaka: En ince tabakadır, eklem kıkırdağının %10-20 sini oluşturur. Tip I ve III kolajen fibrilleri, elipsoidal yapıda hücreler vardır. Hücreler diğer tabakalara göre daha küçüktür ve az oranda sinoviyal sıvı vardır. Kolajen konsantrasyonu yüksektir ve fibriller sıkıdır. Proteoglikanlar çok az oradadır. Daha içerideki tabakaları darbelerden ve daha büyük moleküllerden korur. Örneğin antikorlara karşı bir bariyer oluşturur. Bu da kıkırdak içine zararlı olabilecek moleküllerin geçişini engeller. Kıkırdak herhangi bir germe stresine maruz kaldığında bu tabaka ile karşılaşır.

Geçiş Tabakası: Kıkırdağın %40-50 sini oluşturur. Buradaki hücre yoğunluğu azdır. Tip II kolajen yoğunluğundan oluşan bir ağın içerisine gömülü az sayıda kondrositten oluşmaktadır. Bu tabakadaki kondrositler elipsten ziyade daha yuvarlak bir yapıya sahiptir. Kondrositler tek ya da kümelenmiş şekilde durabilir. Agrekan miktarı fazladır, bu da su tutma kapasitesini arttırır. Baskı ile gelen strese karşı ilk direnci bu tabaka sağlar.

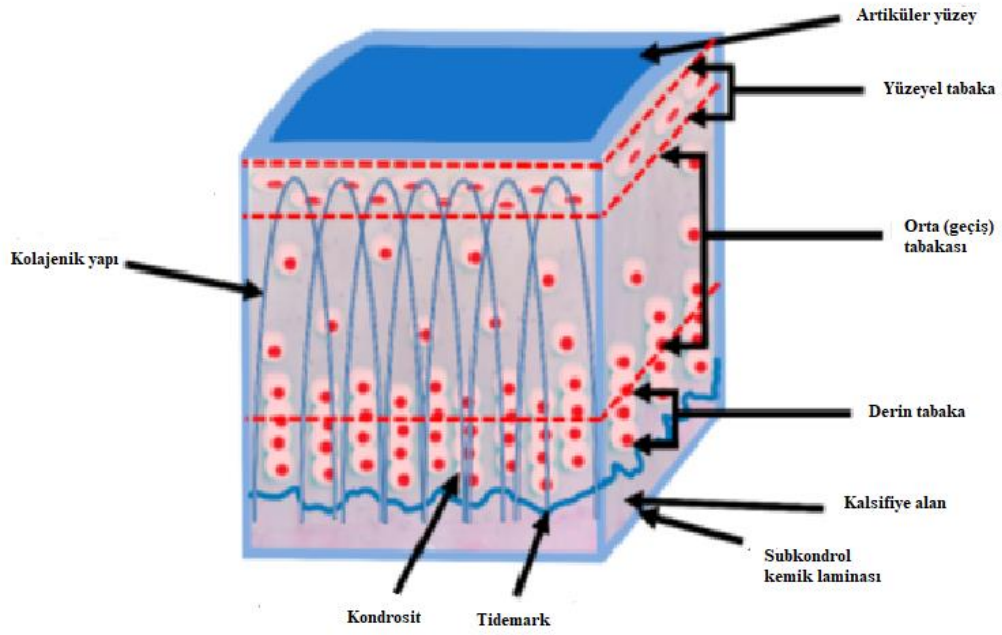
Radyal (derin) tabaka: Kıkırdağın %30-40 ını oluşturur. Derin tabakada da hücre yoğunluğu azdır ve kolajen fibrilleri rastgele dağılmış haldedir. Kolajen fibrilleri radyal biçimdedir. Bu tabakada agrekan miktarı çok yoğundur, su miktarı azdır. Bu kısımdaki kondrositler kolajen fibrilleri ile paralel şekilde konumlanmıştır ve eklemeye gelmektedir. Strese karşı en yoğun direnci radyal tabaka oluşturur çünkü eklemeye dik şekilde konumlanan fibriller direnç sağlar.

Tidemark: Kalsifiye olan kıkırdak ile derin tabaka arasındaki dinamik bir yapıdır ve bu iki bölge arasında geçiş sağlar. Derin tabakadaki kolajen lifleri bu yapıya uzanır.

Kalsifiye tabaka: Bu bölgede kalsiyum depolanır ve yoğunluğunda kolajen X bulunur. Hücreler yoğun değildir, boyut olarak çok küçüklerdir. Kondrositler artık hipertrofik hale geçmiştir. Bulundurulmuş kalsiyum sayesinde radyal tabaka ve subkondral kemik arasında geçiş sağlanır. Kıkırdağın sinoviyal sıvı ile beslenmesi ve kemikten geçiş olmamasına yardımcı olur (Patel ve ark., 2015; Eschweiler ve ark., 2021).



Şekil 1.1.1. Artiküler kıkırdak bölgeleri (Medvedeva ve ark., 2018)



Şekil 1.1.2. Artiküler kıkırdak kesitinde bölgelerin gösterimi (Eschweiler ve ark., 2021)

1.1. Kondrojeniz

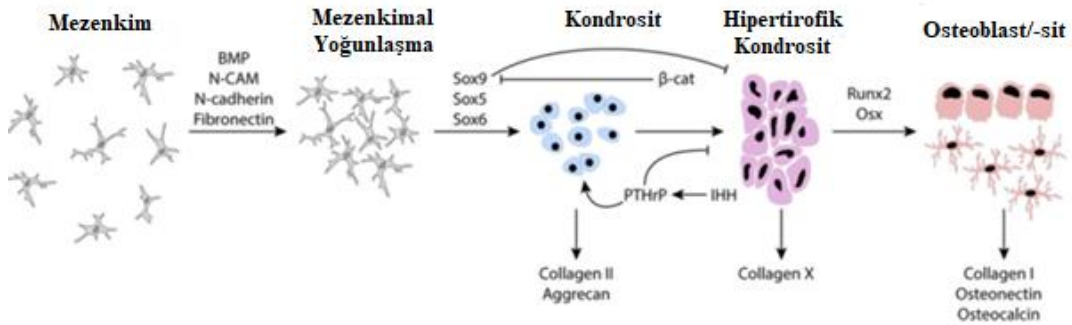
Kolajen I, III ve V ifade eden yoğunlaşmış mezenkim dokusundan kıkırdak oluşum sürecine **kondrojeniz** denir. Mezenkim büyük çoğunlukla mezodermin farklılaşmasından meydana gelen ilk bağ dokusu hücreleridir. Bu hücrelerin büyük bir bölünme ve farklılaşma yeteneği mevcuttur. Bu sayede bağ dokuyu oluştururlar. Kondrojenizin ilk aşamasında mezenkimal hücrelerin birbirine yaklaşarak agregatlar oluşturması gözlenir. Sonrasında hücreler transkripsiyon faktörü olan SOX-9'un (SRY-kutu transkripsiyon faktörü 9) ifade edilmesiyle kondroblastlara farklılaşırlar. Bu sırada tip II kolajen ve agrekan salımı da gerçekleşir. Kondroblastlar kıkırdığın yapısının büyük bir kısmını da oluşturan kıkırdak matriksini salgırlar (O'Connor ve ark., 2013; Goldring ve ark., 2006)

Salgılanan matriks miktarının artması sonucunda kondroblast hücreleri birbirlerinden uzaklaşırlar. Matriks ile tamamen çevrelendiklerinde lakünlerin içine yerleşirler ve hücreler kondrosit yapısına ulaşır. Lakünler yeni oluşturulmuş matriks ile etkileşim halinde değillerdir ve yapılarında hücre dışı sıvı bulundurlar. Kondrojenik alanın çevresinde bulunan mezenkimal doku ise perikondriumu oluşturur (Goldring ve ark., 2006; O'Connor ve ark., 2013; Michigami, 2013; Pitsillides ve ark., 2011).

1.2.1. Moleküler Düzeyde Kondrojeniz

Kondrojeniz pek çok molekül tarafından düzenlenmekte ve denetlenmektedir. Bunlardan bazıları ekstraselüler ligandlar, çekirdek reseptörleri, transkripsiyon faktörleri, adezyon molekülleri ve matriks proteinleri şeklinde sıralanabilir. Bunların haricinde, kıkırdak iskeletin gelişimi biyomekanik güçler tarafından da etkilenmektedir. Bu güçler kıkırdığın yalnızca şekil, rejenerasyon ve yaşlanmasını düzenlemezler, aynı zamanda kıkırdak içindeki hücre ile ekstraselüler matriks arasındaki etkileşimleri de değiştirebilirler. Kondrojenizi yönlendiren birkaç ana protein grubu bulunmaktadır;

- Kemik morfojenik proteini (BMP) olarak geçer ve embriyonik dönemde olan kondrojenizde yoğunlaşma ve hücrelerin farklılaşmasını belirlemede rolü olan bir büyüme faktörüdür.
- Noggin ise gelişimsel bir protein olarak mezenkimal hücrelerin farklılaşmasını önler ve aynı zamanda mezenkimal hücrelerin yoğunlaşmasını engeller, bu sayede de kondrojenizi durdurmada rol oynar.
- Sonic hedgehog (Shh), L-Sox5, Sox6, Sox9 aktivasyonunu düzenler. Pozitif geri bildirim döngüsü şeklinde çalışırlar. BMP ekspresyonu da bu döngüyü destekler. Sox9 ekspresyonu BMP ekspresyonunu indükler bunun sayesinde de kondrositler çoğalır ve farklılaşır. L-Sox5 ve Sox6, Col2a1 ve Col1a2 genlerini aktifleştirirler ve aynı zamanda ileri evre kondrosit belirteci olan Cbfa1'in ekspresyonunu engellerler.
- Indian hedgehog (Ihh) ise prehipertrofik kondrositlerde ifade edilir. Kondrosit proliferasyonunu stimüle eder ve kondrosit olgunlaşmasında rolü vardır (Pitsillides ve ark., 2011; Gillis, 2019; O'Connor ve ark., 2013; Michigami, 2013).



Şekil 1.2.1. Moleküler düzeyde kondrojeniz

1.3. Kıkırdak Hasarları

Kıkırdak hasarları birçok farklı seviyede ve türde olabilmektedir ve gerçekleştiğinde hastaların hayat standartlarını büyük oranda düşürmektedir. Hareketli eklemlerdeki hasarlardan en yaygın olanı dizlerde görülmektedir. Kıkırdak hasar gördüğünde hareketlerin ağrısız ve kolayca yapılması mümkün olmaz ve eklem yüzeyi düz bir hale gelir. Yüzeydeki kıkırdak hasarlı olduğu için de kemikler sürtünme yaratır bu da en küçük harekette bile hastaya acı verir, genellikle kıkırdak hasarlarının semptomları arasında şişlik de bulunmaktadır.

Kıkırdak hasarlarında onarım yanıtı yetersiz kalmaktadır. Yapısal olarak kıkırdak, fazla miktarda güçlü ve tekrarlayan stres yaratıcı faktörü tolere edebilir. Fakat eklem kıkırdağı damarlardan, sinir uçlarından ve lenflerden yoksun bir yapıdır. Onarım, kondrositlerin lakünler içerisinde bulunması, olgunlaşan kondrositlerin çoğalma yeteneğinin azalmasına ve de yaralı bölgelere hareket edememeleri nedeniyle de kısıtlanır. Bu sebeplerden dolayı vücuttaki diğer yapıların aksine kıkırdak bölgeleri hasar aldığı anda hızlı bir şekilde onarım sağlaması mümkün değildir. Oluşan hasar perikondrium tabakasında ise kıkırdağın diğer kısımlarında meydana gelen hasarlara kıyasla onarım daha fazla gerçekleşir, çünkü perikondrium tabakasında pluripotent progenitör hücreler bulunmaktadır. Fakat, bu bölgedeki hasarlar bile kendi kendine tamamen iyileşme gösteremeyebilir (Patel ve ark., 2015).

1.3.1. Artritler

Osteoartrit progresif ve geri döndürülemeyen bir kıkırdak dejenerasyonu hastalığıdır. Halk arasında kireçlenme olarak bilinir. Dünya çapında yaklaşık 630 milyon kişi bu hastalıktan muzdariptir ve bu sayının giderek artacağı düşünülmektedir. Osteoartrit herhangi bir eklemden meydana gelebilmesine rağmen en sık dizde görülür. Bu hastalıkta kıkırdak kalınlığı azalır, yapısı bozulur ve bu da altındaki kemiği etkileyerek peri artiküler kemik oluşumu ve subkondral skleroz gözlenmesine sebep olur. Bozulan kıkırdak ve kemik yapısı kişinin hareket ederken ağrı duymasına,

şışıklere ve hareket kısıtlılığına neden olarak yaşam kalitesini büyük oranda düşürür (Pitsillides ve ark., 2011; Freitag ve ark, 2016).

Osteoartrit etkisinin, genetik ve mekanik faktörlerle ilgili olduğu düşünülmektedir, fakat en önemli faktörlerden birisi yaştır. Yaş ile beraber ekstraselüler matriksin yapısındaki makromoleküllerin (örn: kolajen, proteoglikan) değişime uğradığı ve bunun sonucunda da ECM'nin özelliklerinin farklılaştığı düşünülmektedir. Kıkırdığın sağlığı ve devamlılığı için ECM büyük önem arz eder. Aynı zamanda çevresel faktörler ve yaş ile kondrositlerin yapısı da değişir. Hepsini düşünüldüğünde osteoartrit birçok sebebe bağlı olarak tetiklenen karmaşık bir hastalık olarak karşımıza çıkar. Osteoartrit için henüz bir ilaç tedavisi bulunamamıştır (Bartolotti ve ark., 2021).

1.4. Kıkırdak Hasarlarında Güncel Tedaviler

Tedaviler ve tedavilerdeki başarı defektin lokalizasyonu, büyüklüğü ve şekli ile ilişkilidir. Aynı zamanda hastanın fiziksel durumu ve yaşı da iyileşme yanıtında önemli bir etkidir. Hasarlar genellikle kıkırdak dejenerasyonundan kaynaklanır. Spor esnasında meydana gelen hasarlar çoğunlukla bölgeseldir, bu da tedavi yanıtını olumlu yönde etkiler. Hasarlar çoğunlukla cerrahi teknikler ile tedavi edilir (Stampoultzis ve ark., 2021). Cerrahi teknikler;

Bunlardan biri mikrokirik yöntemidir. Kemik iliği uyarımına bağlı gerçekleştirilen yöntemde subkondral kemikte küçük delikler oluşturulur. Bu mikrokiriklerin kemik iliğini uyararak kök hücre ve büyüme faktörlerinin hasarlı bölgede toplanarak kıkırdak oluşumunu tetiklemesi amaçlanır. Geniş lezyonlarda uygulanabilirliği vardır. Ne yazık ki oluşan kıkırdak tamamıyla eskisini taklit edemez ve fibröz/hyalin kıkırdak arası bir yapı oluşur (Freitag ve ark., 2016).

Mozaikplasti, aynı zamanda osteokondral greft olarak geçer. Hastanın kendi vücudundan minimal yük taşıyan bölgesinden kemik ile beraber kırık greftleri alınır ve hasarlı olan bölgeye yerleştirilir. Derin kırık defektlerinde uygulanır. Enfeksiyon oluşma ve donörde komplikasyon görülme olasılığı vardır, bu nedenle risk içerir (Freitag ve ark., 2016).

Otolog kondrosit implantasyonu (OKİ) ise eklem kırıkdağından kondrosit izolasyonu ile uygulanır. Bu izolasyon için yük binmeyen bölgelerdeki kondrositler tercih edilir. *In vitro* ortamda izole edilen kondrositler çoğaltılır ve hastaya implante edilir. Yöntemin, hücre farklılaşma durumu veya donörlerden yeterli ve sağlıklı hücre alınamaması gibi zorlukları vardır (Makris ve ark., 2015; Freitag ve ark., 2016).

Uygulanan tedaviler kısa süreli olarak hastaların hareketlerinde rahatlama sağlasa ve mental olarak motive etse bile ne yazık ki sonuçlar uzun süre kalıcı olamamaktadır. Bunun yanı sıra yan etkileri de fazladır. Araştırmacılar mevcut dezavantajlardan dolayı kırık hasarları için doku mühendisliğine yönelmişlerdir.

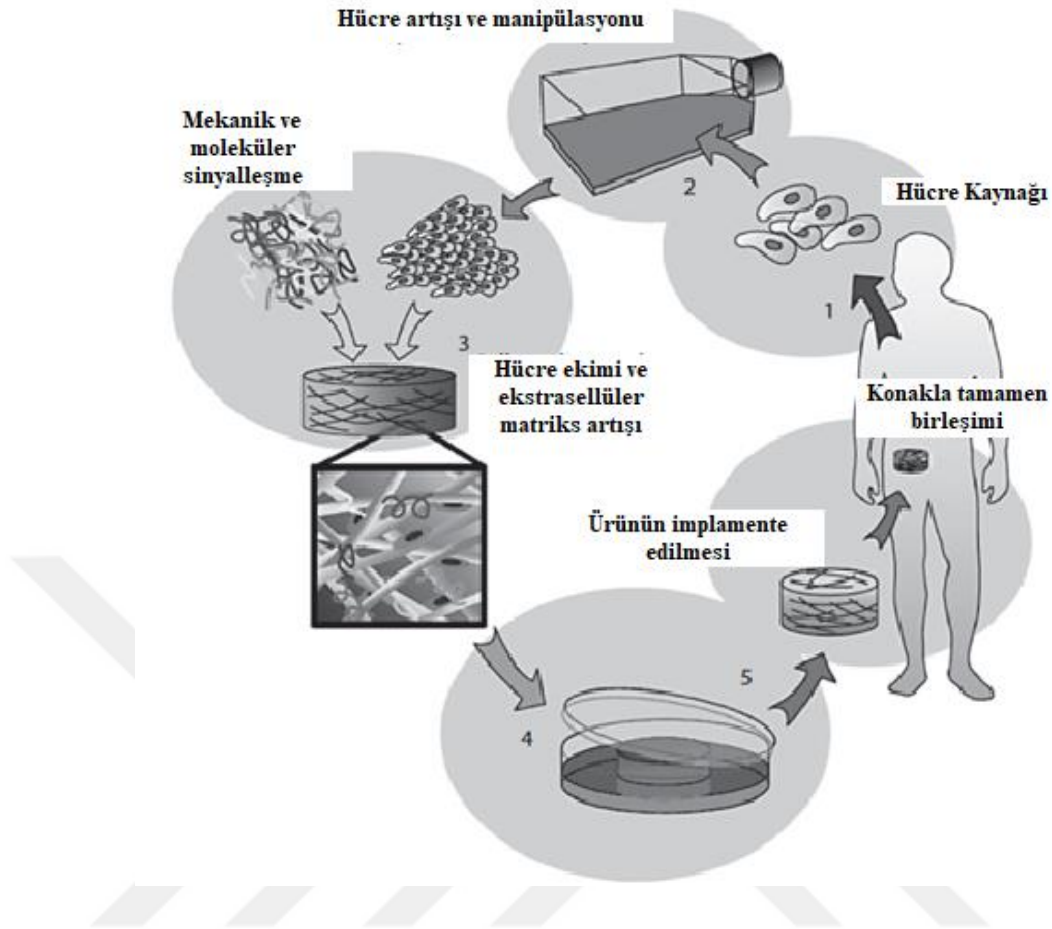
1.5. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliğinin temelini, biyolojik dokulardaki hücreler, biyolojik moleküller ve biyomalzemeler oluşturmaktır. Amaç hasarlı olan dokuyu yeniden yapmak veya hasarlı kısmı *in vivo* şartlarda aynı verimlilikte işlev gösterecek şekilde yenilemektir. Araç olarak hücreler, iskeleler ve yardımcı biyomoleküller birlikte kullanılır. Doku mühendisliği disiplinler arası bir alandır. Araştırmalar sırasında tıp, biyoloji, kimya, fizik, malzeme mühendisliği ve daha birçok alanın bilgilerinden faydalanılır. Ayrıca kök hücre çalışmaları alanı da doku mühendisliğine sıklıkla katkı sağlar (Rami Mhanna ve Anwarul Hasan, 2017).

İnsanlık tarihinin başından beri vücuttaki hasarlı organları yenileyebilme hayali vardır. Antik Mısır kültüründe ölümden sonraki yaşam için vücut parçalarının

bütün olarak korunarak gömülmesine dikkat edilmesi insan anatomisi ile ilgilendiklerini göstermektedir. Diğer kültürlerde de vücut parçalarını değiştirebilmek ya da tamir etmeye yönelik örnekler bulunmuştur. İnsanlığın bu hayaline yaklaşabilmesi ise canlı dokularla çalışabildikten sonra gerçekleşmiştir. Modern zamanlara gelindiğinde, 1993 yılında Massachusetts Teknoloji Enstitüsü'nden (MIT) kimya mühendisi Prof. Robert Langer ve Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden cerrah Prof. Joseph Vacanti'nin ortak çalışması ve başarısı ile hız kazanmıştır. Günümüzde daha basit yapıda olan ve nispeten ince vücut parçalarının örneğin deri, kemik, kırıldak hasarları gibi ticari ürünleri bulunmaktadır. Mesane, kan damarları, trake gibi daha kompleks yapılar da oluşturulmuştur. Oluşturulan yapıların damarlanma, hücre yoğunluğu ve içsel akışları konusunda eksiklikler bulunmaktadır. Vücuttaki doku ve organların hasar tedavisi ile ilgili çalışmaların hızı dokunun karmaşıklık seviyesine göre değişim gösterebilmektedir. Kalp ve karaciğer dahil olmak üzere birçok doku ile ilgili çalışmalar son hız devam etmektedir (Vacanti, 2006; Berthiaume ve ark., 2011).

Biyomalzemeler doğal veya sentetik olabilirler. Oluşturulan biyomalzeme vücut ile uyumlu ve biyobozunur olan hasarlı dokunun yerine geçebilecek malzemedir. Hücre kaynağı olarak yetişkin kök hücreler, başka kaynaklardan izole edilen kök hücreler, indüklenmiş pluripotent kök hücreler veya otolog hücreler kullanılabilir. Aynı zamanda dokunun mikroçevresini taklit etmesi için kullanılacak farklı büyüme faktörleri, mekanik uyaranlar veya küçük moleküller eklenebilir. Hücrelerin ve yardımcı moleküllerin tutunup istenilen şekilde çoğalması için dokudan dokuya değişen özelliklerde farklı iskeleler veya 3B yapılar kullanılmaktadır. Elde edilen yapı hastanın hasarlı bölgesine nakledilmektedir.



Şekil 1.5. Doku mühendisliği yaklaşımı (Moreira-Teixeira ve ark., 2011)

1.5.1. Kıkırdak Doku Mühendisliği

Kıkırdak insanların hareketlerini acısız ve kolayca gerçekleştirmesini sağlayan, dokuları koruyan ve eklemlere kaygan bir yüzey sağlayarak işlev görmelerine yardımcı olan hayati bir dokudur. Dokunun damarsız ve sinir içermeyen ağ yapısından ötürü hasar yanıtı düşüktür ve güncel tedaviler yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle kıkırdak doku mühendisliği 1977 yılında Green tarafından tanımlanmış bir biyoteknolojik alan olarak ortaya çıkmıştır. Amacı kıkırdak hasarlarını engelleyebilmek için yapay kıkırdak veya muadilini üreterek doğal kıkırdağın işlevlerini *in vivo* şartlarda sağlayabilmesidir. İlk klinik uygulamalar 1994 yılında gerçekleştirilmiştir (Patel ve ark., 2015).

Kıkırdak doku mühendisliğinin ilerleme hızını yavaşlatan birkaç temel problem vardır. Bunlar;

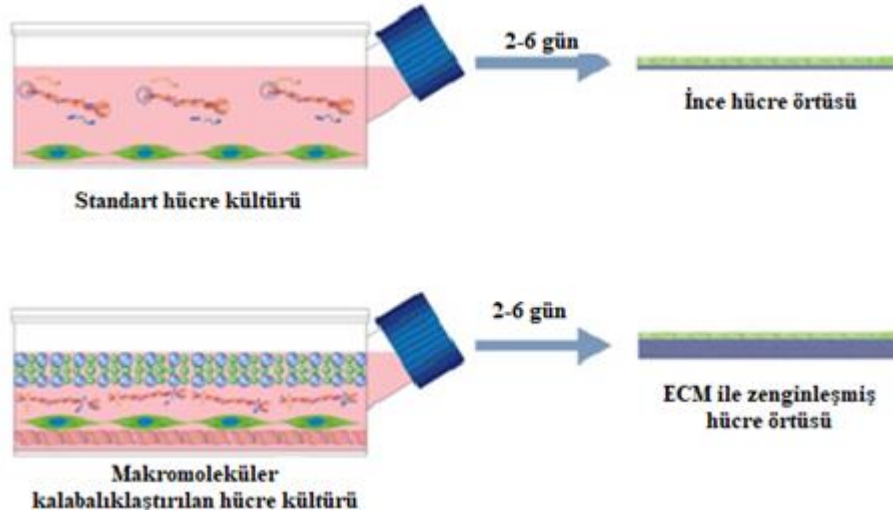
- 1) Seçilen hücre tipinin yanlış ve fazla çoğalması sonucu istenilen kıkırdak yerine kemik dokusunun oluşması,
- 2) Üretilen kıkırdak içeriğinin doğal kıkırdağınki ile aynı olamaması ve işlevini sağlayamaması,
- 3) Uzun dönem etkilerinin ve dayanıklılığının bilinmemesi,
- 4) Çalışılan hücre tiplerinin teratom oluşturmaması,
- 5) Otolog olmayan kök hücreler ile çalışıldığında hastanın immün yanıt verme riski,
- 6) Hasta profilinin (yaş, yaşam stili, defektin büyüklüğü ve yeri gibi) birçok faktöre bağlı olarak kısıtlı olması, kişiden kişiye önemli farklılıklar göstermesi,
- 7) Hasta bazında sonuç alındığı için ortak geçerli bir prosedür belirlenememesi sayılabilir (Bartolotti ve ark., 2021).

1.6. Makromoleküler Kalabalıklaşma

Makromoleküler kalabalıklaşma (MMK), bir *in vitro* modelleme kavramı olup hücre kültüründe ekstrasellüler matriksin rolünü göz önünde bulundurarak oluşturulmuş ve hücrelerin *in vivo* mikroçevrelerini en iyi şekilde taklit edebilmek amacı ile tasarlanmıştır. Geleneksel hücre kültürüne kalabalıklaştırıcı adı verilen kimyasal olarak etkisiz makromoleküllerin, çoğunlukla polisakkaritlerin, ilave edilmesi ile uygulanır (Tsiapalis ve ark., 2021). Bu kalabalıklaştırıcılardan bazıları fikor, dekstran, karegenan vs. olarak sıralanabilir. Ökaryotik hücre kültüründe MMK ilk kez 1978 yılında farklı glikozaminoglikanların DNA sentezine olan etkisinin araştırılması için kullanılmıştır (Tsiapalis ve ark., 2021).

Hücrelerin *in vivo* ortamları özü itibari ile kalabalık bir yapıya sahiptir. Sitozolik ortamdaki kalabalıklık hali *E. coli*'den (*Escherichia coli*) insanlara kadar evrimsel olarak korunmuştur (Benny ve ark., 2017). Hücrelerin yaşayıp büyüdüğü ortamdaki bu kalabalık yapı, dışlanmış hacim etkisine sebep olmaktadır. Bir molekülün kapladığı alanda başka bir molekülün bulunamayacağı olgusuna ve bu nedenle de diğer

moleküllerin kaplayacağı alanın kısıtlı olmasına **dışlanmış hacim etkisi** adı verilmektedir (Tsiapalis ve ark., 2021b; Gaspar ve ark, 2019). Bu etkinin gerçekleşen reaksiyonların kinetiği ve proteinlerin moleküler birleşmelerindeki rolü büyüktür (Satyam ve ark., 2016). MMK uygulandığı zaman dışlanmış hacim etkisi sayesinde hücrelerin geleneksel hücre kültürüne göre büyüyecekleri daha kısıtlı bir alanları olur ve bu da onları *in vivo* şartlardaki davranışlarını göstermeye iter. Geleneksel hücre kültüründe eklenen serum oranı genellikle %5 ila %20 arasında değişmektedir ve bu da çözünen madde konsantrasyonu olarak 4–16 mg/mL’ye denk gelmektedir. Fakat bu oran 80 mg/mL çözünen konsantrasyonuna sahip olan kaninkine bile yaklaşamamaktadır (Satyam ve ark., 2016). Peng ve Raghunath’tan oluşan ekip, MMK’den dolayı oluşan konsantrasyon artışının hücre kültüründe ekstrasellüler matriks çoğalmasına yol açtığını göstermişlerdir (2010).



Şekil 1.6. Makromoleküler kalabalıklaşma

Geleneksel hücre kültüründe ekstrasellüler matriksin oluşumu, yani hücrenin *in vivo* şartlardakine yakın davranış göstermesi, fazlasıyla yavaş gerçekleşmektedir. *In vitro* şartlarda üretilmeye çalışılan bir kan damarının kültür süresi yaklaşık 196 gün olarak belirlenmiştir (Kumar ve ark., 2015). Sürenin uzaması ile hücre ölümleri, fenotip değişiklikleri, fenotip kayıpları ve kontaminasyon riski büyük oranda artmaktadır. Bunun yanı sıra elde edilecek veriler için gereken yüksek maliyetler karşılanamamakta, karşılanabilse bile sonuçlar tatmin edici olmamaktadır. MMK

kullanımı ile zenginleştirilen ECM, hücre-ECM etkileşimlerinin gerçekleşmesine olanak sağlamaktadır. Bu sayede kolajen yapımı ve depolanması pro-kolajenden kolajene geçişin hızlanmasıyla çok daha kısa sürede gerçekleşmektedir. Pro-kolajenden kolajene dönüşüm hızının da ortamın yoğunluk oranıyla orantılı olduğu, kalabalık ortamlarda pro-kolajen C- ve N- proteinazların enzimatik reaksiyon hızı arttığı için daha hızlı gerçekleştiği düşünülmektedir (Tsiapalis ve ark., 2021b; Gaspar ve ark., 2019). Lareu ve ark.'nın çalışmalarında belirttiğine göre aynı sayıda hücre ekilerek büyütülen fibroblastlarda kontrol ile MMK ilave edilen (100 µg/mL dekstran sülfat) örneklerin aynı oranda kolajen depolama süresi 4 haftadan 2 güne indirilmiştir (Lareu ve ark., 2007; Graceffa ve Zeugolis, 2019).

Makromoleküler kalabalıklaşmanın ekstrasellüler matriks depolanması haricinde de birçok etkisi kanıtlanmıştır: Son yıllarda birçok çalışma kök hücre farklılaşmasını hızlandığı ve farklı hücre tiplerine doğru yönlendirdiğini göstermiştir. Ficoll 70 kDa ve Ficol 400 kDa kullanılarak hazırlanan kokteylin supramoleküler birleşmeyi hızlandığı ve kemik iliği MKH'lerinde ECM birikimini arttırdığı görülmüştür (Zeiger ve ark., 2012). Ayrıca fikolün varlığı osteojenik ve adipojenik değişimi de yönlendirmiştir (Patrikoski ve ark, 2017).

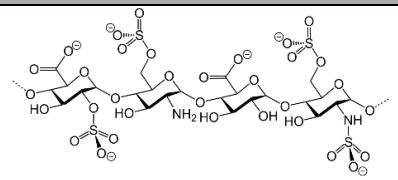
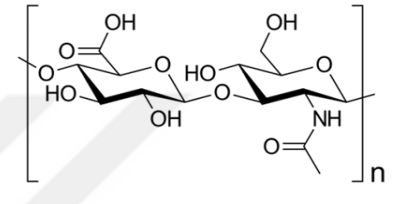
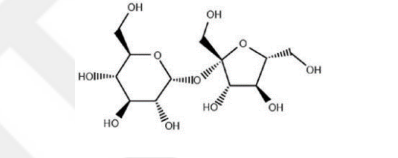
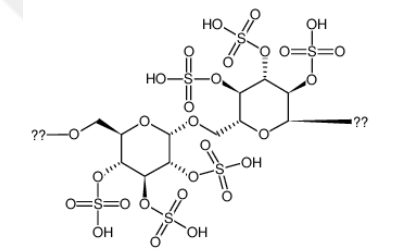
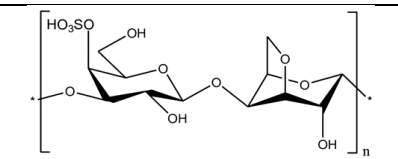
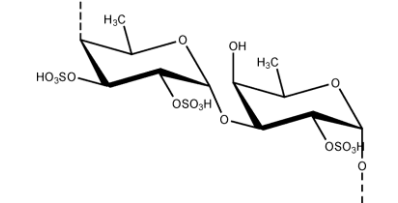
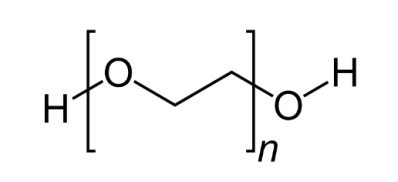
1.6.1. Kalabalıklaştırıcılar

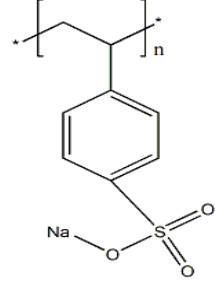
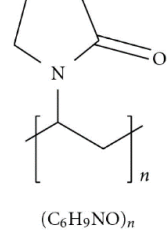
Makromoleküler kalabalıklaştırma amacı için kullanılan moleküller yükleri, pH'ları ve polidispersiteleri açısından çeşitlilik gösterir. Bu makromoleküller, MMK kavramı ilk ortaya çıktığında kimyasal olarak etkisiz olarak tanımlanmış olsalar da, sonraları bunun aksi kanıtlanmıştır. Kalabalıklaştırıcılar farklı özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Örneğin sülfatlanma durumları:

- Sülfatlanmamış polisakkaritlere örnek olarak Heparin, hiyalüronik asit ve fikol verilebilir.
- Sülfatlanmış polisakkaritler ise dekstran sülfat, deniz yosunu polisakkaritleri karagenan, fukoidan içerir.

- Sentetik polimerler: poli (etilen glikol), poli (sodyum-4-stiren sülfonat) ve poli (vinilpirolidon)’dur (Tsiapalis ve ark., 2021b).

Çizelge 1.6.1. Kalabalıklaştırmacı polisakkaritler

Polisakkaritler	Örnek	Kimyasal Yapısı
Sülfatlanmamış polisakkaritler	Heparin	
Sülfatlanmamış polisakkaritler	Hiyalüronik asit	
Sülfatlanmamış polisakkaritler	Fikol 400	
Sülfatlanmış polisakkaritler	Dekstran Sülfat 500	
Sülfatlanmamış polisakkaritler	Karagenan	
Sülfatlanmamış polisakkaritler	Fukoidan	
Sentetik Polimerler	Poli(etilen glikol)	

Sentetik Polimerler	Poli(sodyum-4-sitrin sülfonat)	
Sentetik Polimerler	Poli(vinilpirolidon)	 $(C_6H_9NO)_n$

Bunun haricinde yüklerine göre ayırım da yapılmaktadır: Kalabalıklaştırıcılardan bazıları negatif yüklü iken bazıları nötraldir (Cigognini ve ark., 2016). Negatif yüklü kalabalıklaştırıcılar (polianyon sodyum poliakrilat, fikol gibi) elektrostatik itmeyi artırır ve bu da DNA'nın daha kompakt bir hale gelmesine yol açar. Daha kompakt hale gelen DNA'nın stabilitesi artar ve böylece erime noktası yükselir (Tsiapalis ve ark., 2021). Kalabalıklaştırıcılar lineer ya da kompakt yapıya sahip olabilir. Eğer makromoleküllerin konsantrasyonu, boyutu ve molekül ağırlığı arttırılırsa DNA'ya daha az kullanılabilir alan kalacağı için DNA'nın mobilitesi kısıtlanır.

Bazı kalabalıklaştırıcılar kokteyl halinde yani aynı makromolekülün farklı ağırlıktaki türleri karıştırılarak kullanılabilir. Örneğin, fikol hem 70 kDa hem de 400 kDa olanı kullanılmaktadır. Değişkenlere ve deneyin amacına göre uygun makromolekül belirlenmelidir (Benny ve ark., 2017). Bir araştırmada kalabalıklaştırıcı özelliklerinin etkilerini gözlemleyebilmek için hidrodinamik yarıçap, yük ve polidispersite farklarına bakılmıştır. Bu çalışmada kalabalıklaştırıcı olarak karagenan, fikol ve dekstran sülfat kullanılmıştır. Bunlar farklı molekül ağırlıklarında (70, 400, 100 kDa Fikol ile 10, 100 ve 500 kDa dekstran sülfat) ya da farklı kokteyl karışımlarındaki etkileri gözlemlenmiştir. Deneyin sonucunda ise fibroblast kültüründeki ekstrasellüler matriks depolanmasındaki farklılıklar incelenmiştir. Fikol ve dekstran sülfat kokteyl olarak verildiğinde polidispersitelerini arttırdıkları için

kolajen I depolanmasında daha iyi sonuç alınmıştır. Karagenan ise zaten negatif yüklü ve polidispersitesi yüksek olduğu için tek başına onlardan iyi sonuç vermiştir. Bu araştırmanın sonucunda hücre kültüründe kullanılacak MMK'ların polidispersitesi yüksek ve yükü negatif olunca ECM depolama kapasitesinin arttığı gözlemlenmiştir (Gaspar ve ark., 2019).

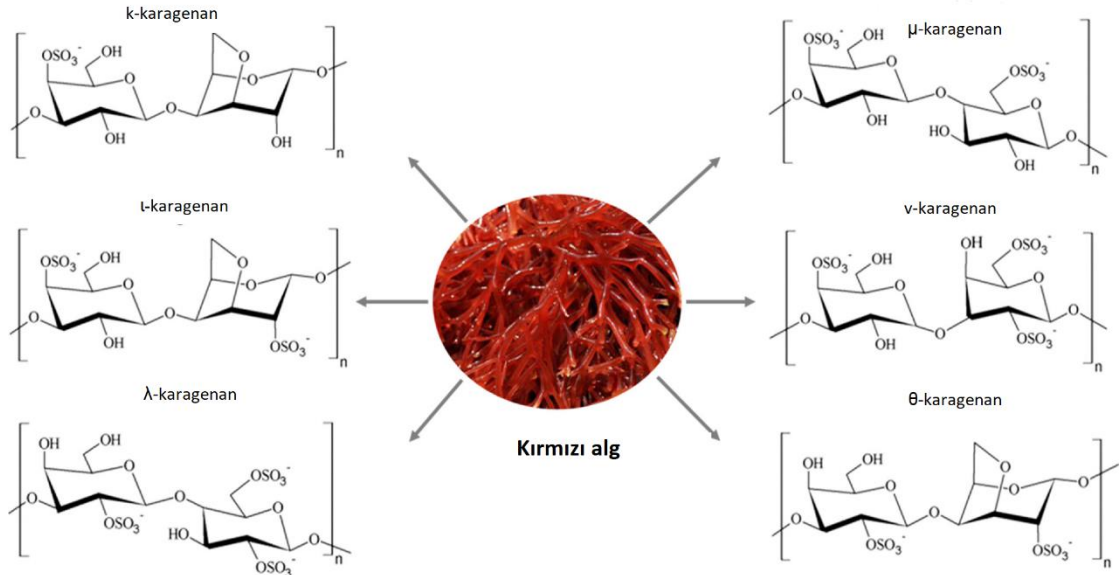
Başka bir çalışmada ise, karagenanın literatürdeki ECM depolanması konusundaki olumlu sonuçlarından yola çıkılarak, deniz yosunu ailesindeki diğer sülfatlanmış polisakkaritlerin MMK şartlarındaki tepkilerini incelenmiştir. Burada bu polisakkaritlerin ekstraselüler matriks depolama ve adipoz mezenkimal hücreleri farklı hücre tiplerine yönlendirebilme dereceleri karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, karagenan, fukoidan, galaktofukan ve ulvan ECM depolanmasını arttırmıştır (kolajen I ve kolajen V miktarlarını). Kondrojeniz için bakıldığında ise galaktofukan ve fukoidan en iyi sonucu vermiştir (de Pieri ve ark., 2020).

1.6.2. Karagenan (CRG)

Kırmızı deniz yosunlarından Rhodophyceae'nin ekstrasellüler matriksinden elde edilen karagenan, birçok farklı alanda kullanılan bir polisakkarittir (Necas ve Bartosikova, 2013). İlk kez 1837 yılında ekstrakte edilmiştir (Liu ve ark., 2015). Kullanım alanlarına bakıldığında ise gıda sektöründe kıvam verici ve düzenleyici özelliklerinden yararlanıldığı görülmektedir. Örneğin, pudinglerin kıvamı ayarlanırken veya süzme peynirin yapısı değiştirilirken içlerine karagenan ilave edilir. Aynı zamanda sosis yapımında ve düşük yağlı hamburger etlerinin üretiminde de kullanılır (Campo ve ark., 2009). İlaç sektöründe ise daha uzun süreli ilaç salımı, ilaç geliştirilmesi, pH'a veya sıcaklığa duyarlı ilaç formülasyonlarının geliştirilmesi gibi hedefler için kullanılır. Doku mühendisliğinde ise biyomateryal yapısı ve jel oluşturma kapasitesi ile öne çıkmaktadır (Yegappan ve ark., 2018). Gıda sektöründeki kullanımlarından yola çıkılan araştırmalarda karagenanın kolit ile ilişkili olduğu şüpheleri doğduğu için bazı tüketiciler şüpheli yaklaşmaktadır (Guo ve ark., 2022).

Kimyasal yapı olarak D-galaktoz ve D-anhidrogalaktoz içeren uzun lineer zincirlerden ve ester sülfatlardan meydana gelir. Sülfatları anyonik yapıya olup, genellikle Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} ile nötral hale getirilir. Yapısında %15 ila 40 ester sülfat bulunmaktadır ve karagenanlar 100 kDa'nın üzerinde bir ağırlığa sahiptir (Liu ve ark., 2015). Karagenanlar potasyum klorürde çözünmelerine göre farklı alt türlere ayrılır ve bu alt türlerinin farklı yapısal ve fonksiyonel özellikleri bulunmaktadır. Altı adet değişik formu: İyota (i)-, Kappa (j)-, Lambda (k)-, Mu (l)-, Nu (m)- ve Teta(h) karagenan şeklindedir. Farklı karagenan çeşitleri değişik yosun alt türlerinden ekstrakte edilir (Campo ve ark., 2009).

Sektörlerde en çok kullanılan karagenan alt türleri kappa, iyota ve lambdadır. Antiviral ve antitümör özellikleri biyolojik etkileri arasındadır. Genel yapısı itibari ile negatif yüklü anyonik sülfatlanmış bir polisakkarit olan karagenanın virüsteki veya hücre yüzeyindeki pozitif yüklerle etkileşime girerek virüsün konağa saldırmasını engellediği ve antiviral özelliğinin bu şekilde çalıştığı düşünülmektedir. Araştırmalarda kanın pıhtılaşmasını engellediği ve istenmeyen immüniteye yol açtığı gibi etkileri de kaydedilmiştir (Liu ve ark., 2015).



Şekil 1.6.2. Karagenan alt türleri

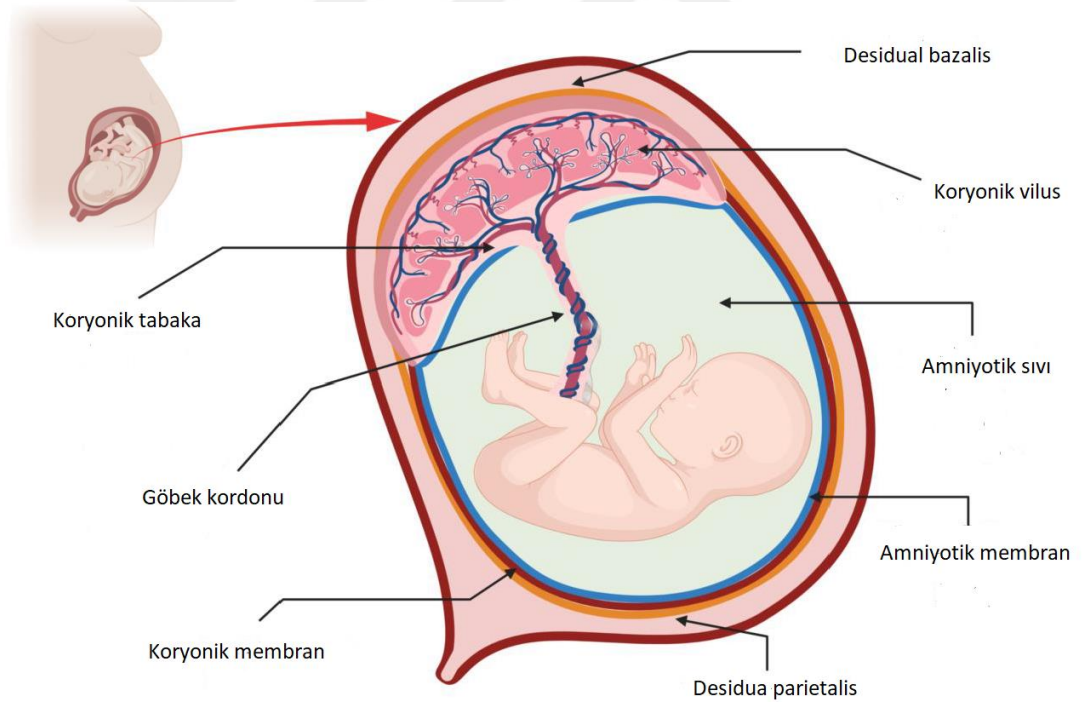
Doku mühendisliğindeki jel oluşturma yetenekleri için kappa (κ) ve iyota (ι) karagenan kullanılır bu jeller sıcaklık değişimi ile eski haline geri dönebilir yapıdadır. Lambda karagenan jel oluşturmaz (Necas ve ark., 2013). Kappa ve iyotanın yapısında bulunan anhidrat köprülerin jelleşme yapılarına katkı sağladığı düşünülmektedir. CRG jelleri 50°C'ye yakın sıcaklıklarla oluşur, 80-90 °C'de ise tekrar erirler (Liu ve ark., 2015) CRG'lar suda çözünür, viskoz sıvı solüsyonlar oluştururlar. Genellikle konsantrasyon arttıkça vizkozite de artar, sıcaklık artınca ise azalır. Düşük pH'larda ve yüksek sıcaklıkta bütün fonksiyonelliğini kaybedebilirler (Popa ve ark., 2015). K-karagenan sıcak suda çözülebilirken λ -karagenan ise soğuk suda da çözünebilir. Spesifik olarak kıkırdak doku mühendisliğine katkısı ise yapıda yer alan sülfat gruplarının kıkırdak ekstrasellüler matriksinin sGAG gruplarına benzemesindendir (Popa ve ark, 2015).

1.7. Plasenta

Hamilelik esnasında ilk gelişen ve fetal yapılar arasında en büyük olanı plasentadır. Embriyonun dış katmanı olan trofoektoderm tabakasından gelişen plasenta, fetüs ile maternal uterus arasında elektrolitlerin, antikorların, su, aminoasit, glikoz, vitamin, serbest yağ asidi gibi besinlerin iletilmesini sağlar. Aynı zamanda CO₂, O₂ gazlarının alışverişini, ürik asit, üre ve bilirubinin atılmasını mümkün kılar. Plasenta gelişimi hamilelik döneminde üç ay içerisinde yavaş gelişir, sonrasında uterus gelişimi ile paralel devam eder.

İlk oluşumu blastokist evresinde başlar. Blastokist evresinde (fertilizasyondan yaklaşık 5 gün sonra) iç hücre kitlesi ve trofoblast bulunmaktadır. Plasenta trofoblast kısmından, fetüs ve fetal membranlar ise iç hücre kitlesinden gelişir. Fertilizasyondan sonraki 6. Gün civarında implantasyon, yani blastokistin zona pellusidadan ayrılarak uterusun endometriyum tabakasına tutunup onunla birleşmesi anı gerçekleşir. İmplantasyon gerçekleşmez ise hamilelik devam edemez. İmplantasyon olduğunda trofoblast hücreleri endometriyal hücrelerle bağı koparmaya yardımcı olan sitotrofoblastlara ve birden fazla çekirdeğe sahip olan sinsitiotrofoblast hücrelerine

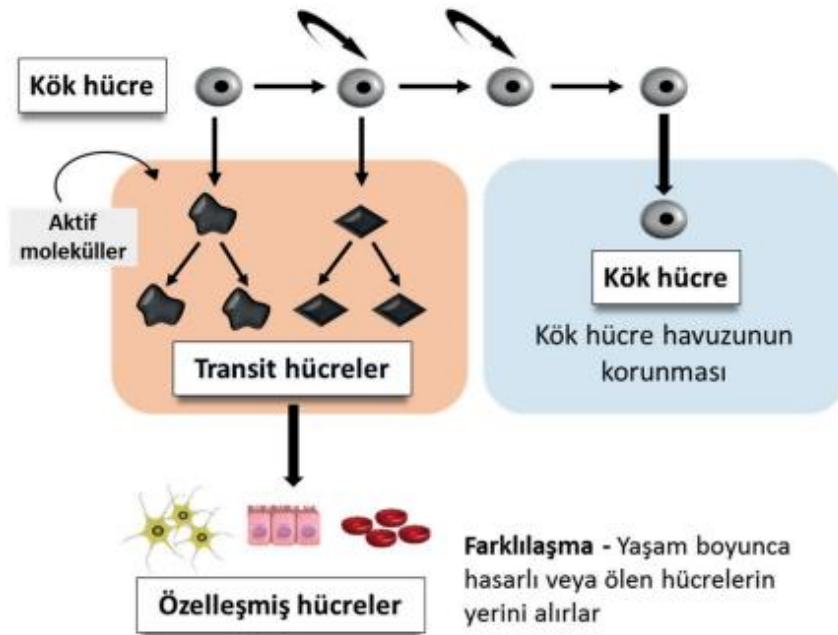
farklılaşır ve sinsitiyotrofoblastlar insan koryonik gonadotropin hormonu artışına sebep olur. Bu iki hücre grubu da koryonun bir parçasıdır ve koryon tabakası plasentayı oluşturur. Sitotrofoblast hücreleri primer koryonik villi kısmını oluşturur. Sonrasında ekstra-embriyonik mezoderminden sekonder villi, sekonder embriyonik mezodermin gelişmesinden ise üçüncül koryonik villiler oluşur. Bu yapılar gelişerek koryonik villi halini alır ve fetüs ile anne arasındaki metabolik geçişleri sağlarlar. Metabolik geçişlerin sağlandığı bu ortama ise plasental bariyer ismi verilir ve bu alışverişin en yoğun olduğu zaman 27-40. haftalar arasındadır. Plasental bariyer hamilelik süresince inceler. Fakat bu bariyer fazla seçici bir bariyer olmadığından dolayı anneden bebeğe zararlı olabilecek maddelerin (virüs, ilaç vs.) geçişine engel olamaz. Fetal yüzey koryonik tabaka ile, maternal yüzey ise desidua basalis ile çevrilidir. Koryonik damarlar umbilikal kord çevresinde birleşirler. Amniyon tabakası ise koryonu kaplar (Turco ve ark., 2019; Herrick ve Bordoni, 2022).



Şekil 1.7. Plasenta kısımları

1.8. Kök hücreler

Kök hücreler insan vücudunda mevcut bulunan diğer hücre tiplerinden, kendilerini yenileyebilme ve farklı özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilme özellikleri, diğer bir deyişle asimetric bölünebilme ve özelleşmemiş hücreler olma, özellikleri ile ayrılırlar. Kök hücreler ana kaynakları bakımından embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler olarak iki gruba ayrılabilirler (Elçin ve ark., 2015). Farklılaşabilme yeteneklerine göre ise bu hücreleri totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olmak üzere sıralayabiliriz. Totipotent olarak adlandırılan hücreler 4 lü blastomer hücreleridir; bütün bir yapıyı, organizmamızı sıfırdan oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Totipotent hücreler gibi bütün bir organizmayı geliştirmeye yeteneği olmayan fakat birden fazla farklı hücre tiplerine dönüşebilenlere ise pluripotent hücreler denir. Bu tip hücreler fertilizasyon sonrasında blastosist aşamasındaki hücrelerdir, yaklaşık olarak 5. Gün ile 2. Hafta arasında zigot bu aşamada olur. Erişkin bireylerde gözlemlenen özelleşmiş hücreleri ise multipotent sınıfındadır ve bunlar sadece belirli hücrelere dönüşebilirler. Sadece tek bir hücre tipine farklılaşabilenler ise unipotent hücrelerdir (Elçin ve ark., 2015).



Şekil 1.8. Kök hücre özellikleri (Elçin ve ark., 2015)

Yetişkin kök hücreler, adını aldığı üzere yetişkin donörlerden alınan ve vücudun çok farklı kısımlarından izole edilebilen ve özelleşmemiş hücrelerdir. Yetişkin kök hücreler için, mezenkimal kök hücreler ve kandan elde edilen hematopoetik kök hücreler örnek olarak verilebilir. Yetişkin kök hücreler embriyonik kök hücrelere nazaran daha az hücre tipine farklılaşabilirler, multipotent özelliğe sahiptirler (Brown ve ark., 2019).

Embriyonik kök hücreler yumurta sperm tarafından döllendikten sonra blastosist evresinde iken hücre iç kitlesinden izole edilen pluripotent özelliğe sahip hücrelerdir. İlk olarak 1981 yılında Gail Martin ve arkadaşları tarafından fare embriyosundan elde edilmiştir. İnsan embriyosundan yapılan ilk izolasyon ise 1998 yılını bulmuştur. Bu haldeki blastosistler hücre alınmak amacı ile toplanmadığı ve kendi haline bırakıldığı zamanlarda gelişerek insanı oluşturmaya devam ettiği için embriyonik kök hücrelerin kullanımı Dünya çapında etiksel kaygılar yaratmış ve araştırmalar için kullanımı yasaklanmıştır. Embriyonik kök hücreler pluripotent olduklarından insanların gelişim aşamalarındaki değişimler veya hastalıkların kaynağını ve ilerleyişini izleyebilmek açısından çok önemli kaynaklardır (Liu ve ark., 2020).

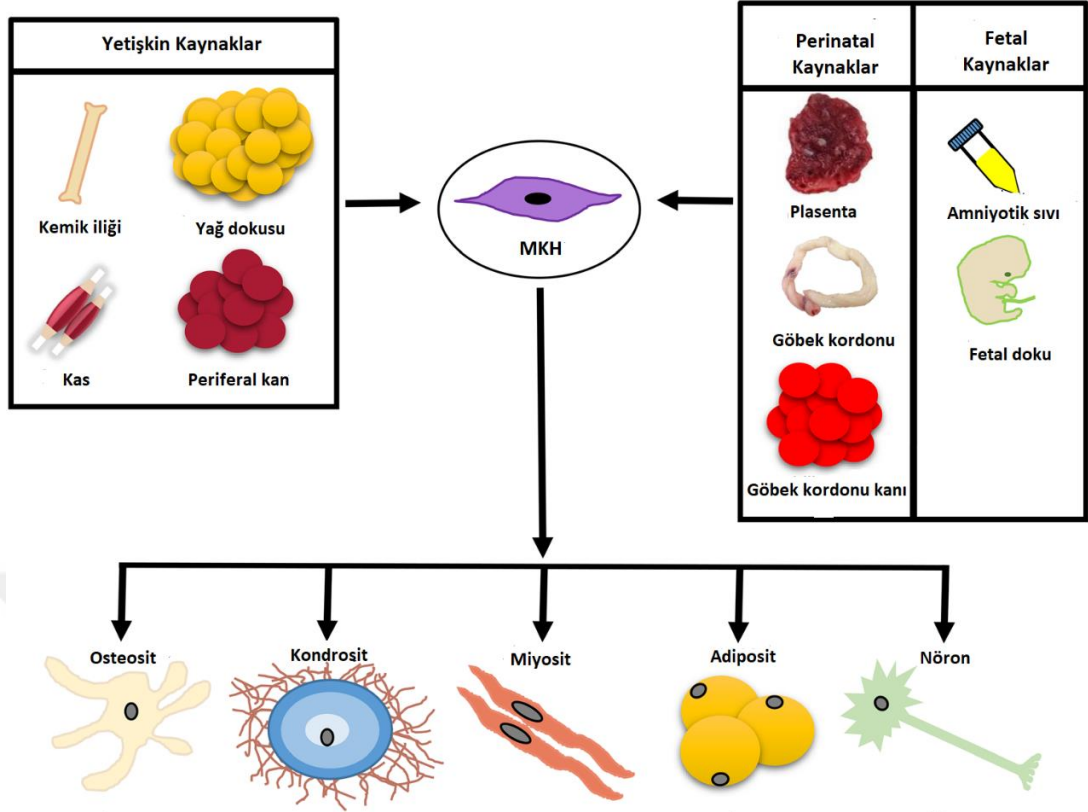
Embriyonik kök hücrelerin kullanımının yasaklanmasından sonra oluşan boşluk 2006 yılında Yamanaka, Takahashi ve ekibi tarafından indüklenmiş pluripotent hücrelerin bulunması ile doldurulmaya çalışılmıştır. Bu hücreler yetişkin kök hücrelerden izole edilip ekibin bulduğu ve sonrasında Yamanaka faktörleri olarak adlandırılan transkripsiyon faktörleri ile muamele edildiğinde aynı embriyonik kök hücreler gibi pluripotent özellik kazanarak yeniden programlanan hücrelerdir. Orijinal Yamanaka faktörleri ise sırasıyla Sox2, Klf4, Oct3/4 ve c-Myc olarak geçmektedir. Sox2 (SRY-box transcription factor 2) kendini yenileme ve hücrenin sonraki davranışlarını belirleme ve yapısını korumada, Klf4 (Krüppel-like factor 4) proliferasyon ve farklılaşmada, Oct4 (Octamer-binding transcription factor 4) gelişmenin ilk evrelerinde ve cMyc ise çoğalma büyüme ve farklılaşmada rol oynar. Bu “yeniden programlama” teknolojisi ile kişiye özgü kök hücre üretimine başlanmıştır (Takahashi ve ark., 2006; Liu ve ark., 2020).

1.8.1. Mezenkimal Kök Hücreler

1976 yılında kemik iliğinden izole edilen örneklerle bulunan ve multipotent yapıya sahip olan mezenkimal kök hücrelerin araştırmalarda kullanımı artarak devam etmiştir. Bunun nedenleri arasında birçok farklı kaynaktan izole edilebilmeleri, çoğaltılabilmeleri ve gerekli koşullar sağlanarak uzun süre saklanabilmeleri ve bunun da tekrar tekrar kullanıma olanak sağlaması sayılabilir. Ayrıca birçok farklı kaynaktan izole edilebildikleri için düşük invaziflikte prosedürlerle elde edilmeleri mümkündür. Çalışmalarda allojenik etkiler görülmemiştir ve güvenli oldukları kanıtlanmıştır. Embriyonik kök hücrelerin aksine etik açıdan problemli değildir. MKH'ler yaşlanma ile ortaya çıkan hastalıklarda büyümelerinin ve farklılaşmalarının hızlı ve yoğun olmasından ötürü tercih edilmektedirler. Aynı zamanda ortopedik hastalıkların tedavisinde, GvHD'de, nörolojik rahatsızlıklarda olumlu katkıları olmaktadır. Bir hücrenin mezenkimal kök hücre olduğunun kanıtlanabilmesi için birkaç şartı sağlaması gerekmektedir:

- a. Plastik bir yüzeye yapışabilme
- b. Özelleşmiş farklı hücre tiplerine farklılaşabilme
- c. Koloni oluşturabilme
- d. İmmün fenotiplendirmelerinde CD73, CD90, CD105 gibi yüzey belirteçlerine sahip olma ve CD14, CD19, CD34 ve CD45 belirteçlerini göstermeme.

Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, yağ dokusu, periferik kan, göbek kordon kanı, eklem sıvısı membranı, süt dişler, menstrüasyon kanı, amniyon sıvısı gibi vücudun çok çeşitli bölgelerinden/sıvılarından izole edilebilmelerine rağmen araştırmalarda kullanılacağı zaman önemli olan kısımlardan biri homojen bir hücre popülasyonu elde edebilmektir. Elde edilen kaynaklar değişikçe MKH olma özellikleri sağlansa da genetik imzalarında ve proliferasyon hızı, hücre büyüklüğü, deney materyali ile uyumu/etkileşimi gibi konularda farklılıklar göstermektedirler. Mezenkimal kök hücreler değişik hücre soyuna farklılaşmalarının yanı sıra salgıladıkları faktörler (parakrin faktörler gibi) etkiler de gösterirler. Bu sayede anti-enflamatuar, anti-apoptotik ve immün düzenleyici sinyaller gönderebilirler (Kangari ve ark., 2020; Chamberlain ve ark., 2007; Beane ve ark., 2012).



Şekil 1.8.1. Mezenkimal kök hücre kaynakları

1.8.1.1. Plasenta Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücre kaynaklarını çeşitlendirmek, iyileştirmek ve donöre daha az zarar verecek şekilde izole etme arayışında perinatal kaynaklı kök hücreler keşfedilmiştir. Bu kök hücre kaynaklarından son yıllarda artarak kullanıma sahip olan bir grup ise plasenta kaynaklı mezenkimal kök hücrelerdir.

Plasenta kaynaklı mezenkimal kök hücreler aynı zamanda ekstra embriyonik kök hücreler olarak adlandırılırlar. Plasenta, göbek kordonu, fetal membranlar, insan amniyon sıvısı ve insan göbek kordonu kanından izole edilen kök hücreler bu sınıfa dahildir. Geleneksel olarak sezaryen doğum yapmış hastaların atık olacak plasentaları alınır ve buradan kök hücreler elde edilir. Plasental kök hücreler mezenkimal kök hücre özelliği göstermelerine rağmen embriyonik kök hücrelerin çoğalmasına yakın bir çoğalma hızına da sahiptirler. İmmün öncelikli, hızlı çoğalan ve multipotent

plastisiteye sahip hücrelerdir (Li ve ark., 2012; Chamberlain ve ark., 2007; Hsu ve ark., 2011; Malek, 2012).

Plasental kök hücreler fetal veya maternal olarak ayrılabilirler. Fetal kısımlar amniyon, koryonik villi ve Wharton jölesidir. Maternal kısımlar ise koryon bölgesindedir; bunların en dışında fetal membran, plasentanın ana bölgesi ve plasental desidü bulunur. Amniyotik sıvı, amniyotik membran, koryonik membran, koryonik villi, desidüe ve plasentanın ana kısmından ayrı ayrı kök hücre tiplerini izole etmek mümkündür. Bu hücreler biyobankacılıkta, oküler hastalıklarda, kardiyovasküler, kas-iskelet ve nörolojik hastalıkların araştırılmasında kullanılmışlardır. Örneğin, Wang ve arkadaşlarının raporladığı 2015 tarihli araştırmada plasental kök hücreler miyelomeningoseal hastalığının tedavisi için fetal dönemdeki kuzularda denenmiş ve nörolojik olarak olumlu yönde etkilediği bulunmuştur (Wang ve ark., 2015). Kıkırdak hasarlarında ise doku mühendisliği çerçevesinde hücre tipi olarak gitgide yaygınlaşan bir kullanım alanına sahiptirler. Çeşitli biyomateryaller ile kullanımlarında kıkırdak hasarlarını azaltmada olumlu etkiler gözlenmiştir (de la Torre ve ark., 2021; Hsu ve ark., 2011; Li ve ark., 2012).

Bu tez çalışmasında, plasental kaynaklı bir kök hücre olan amniyotik membran mezenkimal kök hücreleri izole edildikten sonra karakterize edilmiş ve bu hücrelerin makromoleküler kalabalıklaşma uygulanmış ortam şartlarının kondrojenik farklılaşmasına etkileri incelenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Hücre kültürü çalışmaları boyunca deneylerin tümü laminar akışa sahip olan steril kabininin (Nuaire, Class II, Plymouth, ABD) içerisinde gerçekleştirilirken hücreler 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren Heracell 240 model (Thermo Scientific, Waltham, ABD) inkübatörde tutuldu. Hücreler steril doku kültür kaplarında (Corning, ABD) çoğaltıldı, besiyeri olarak MEM- α (Minimum Essential Medium- α) (Sigma, ABD) ve besiyerine katkı sağlamak amacı ile L-Glutamin, P/S ve FBS (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail) eklendi. Hücrelerin gelişiminin incelenmesi ve fotoğraflanması ise faz kontrast mikroskobu (Primovert, Zeiss, Almanya) ve ona eklenen Nikon marka TS100 (Tokyo, Japonya) fotoğraf makinesi ile gerçekleştirildi. Pasaj atlatılırken ise tripsin (Sigma, St. Louis, MO, ABD), Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Sigma, St. Louis, MO, ABD), santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-15R CA, ABD) ve TC20 otomatik hücre sayma cihazı (Bio-rad, California, ABD) kullanıldı.

Çalışmalar boyunca kullanılan kimyasallar Hidroklorik asit (HCl), Metanol (CH₃OH), sodyum klorür (NaCl), sodyum hidroksit (NaOH), glutaraldehit, KH₂PO₄, ve Na₂HPO₄ Sigma-Aldrich'ten temin edildi (St. Louis, MO, ABD).

Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon çalışmalarında; akım sitometri çalışması için FCM cihazı (Beckman Coulter Navios, CA, ABD) ve Kaluza programı kullanıldı. Üçlü soya farklılaştırma çalışmalarında besiyeri olarak DMEM-LG (Dulbecco's Modified Eagle Medium- Low Glucose) ve DMEM-HG (Dulbecco's Modified Eagle Medium- High Glucose) (Lonza, Basel, İsviçre) besiyerleri kullanıldı. Besiyeri katkısı olarak L-askorbik asit 2 fosfat (Sigma, St. Louis, MO, ABD), β -gliserofosfat (Sigma, St. Louis, MO, ABD), deksametazon (Sigma, St. Louis, MO, ABD), 3-İzobütil-1-metilksantin (IBMX) (Sigma, St. Louis, MO, ABD), azasitidin

(Sigma, St. Louis, MO, ABD), insan insülini (Sigma, St. Louis, MO, ABD) ve indometazin (Fluka, Buchs, İsviçre) eklendi. Ayrıca BMP-6 (Peprotech, Londra, İngiltere), TGF β -3 (Peprotech, Londra, İngiltere) ve ITS, insülin-transferrin-selenöz asit (BD, Bioscience) kullanıldı. Oil red O, von Kossa, alizarin kırmızı, alsiyen mavisi Sigmadan temin edildi (St. Louis, MO, ABD).

Deneylerde makromoleküler kalabalıklaştırıcı olarak κ -karagenan (Sigma, St. Louis, MO, ABD) eklendi, sterilizasyonu UV (ultraviyole) 254 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Protein miktar tayini Lowry metodu ile belirlendi. Burada kullanılan kimyasallar: Na₂CO₃, Na-K tartarat, NaOH, Cu₂SO₄.5H₂O, Folin-Ciocalteau çözeltisi, NaCl, Triton-X 100, deoksikolik asit, sodyum dodesil sülfat (SDS) Sigma'dan (St. Louis, MO, ABD) temin edildi. Proteaz inhibitör kokteyl tableti Sigma-Aldrich'ten sağlandı (St. Louis, MO, ABD). Ticari kolajen tip I, asetik asit Sigma'dan (St. Louis, MO, ABD) alındı. Geniş aralıklı protein belirteci (j449) (Amresco, Solon, Ohio,USA) kullanıldı. Jeller Imagelab (Biorad, California, ABD) ile görüntüldü.

2.2. Plazenta Kaynaklı Kök Hücrelerinin Eldesi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından verilen, 09.07.2020 tarihli ve İ7-410-20 karar numaralı etik kurul onayı çerçevesince Etlik Zübeyde Hanım, Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde 38-40. haftalarında sağlıklı bir şekilde sezaryen doğum yapan ve bilgi onam formunu imzalayan hastalardan steril şartlarda elde edilmiş olan plasentalar laboratuvarında uygun koşullarda parçalara ayrılarak -80 °C'de saklandı. Bu tez çalışması için 3+ hastadan izole edilerek saklanan amniyotik membran dokularını içeren kapaklı kaplar -80 °C'de dondurucudan çıkartılarak, 37 °C'ye ayarlanmış olan su banyo içerisine alındı ve çözündürüldü. Doku parçaları çözöldüğünde zaman kaybedilmeden MEM- α besiyeri (Minimum Essential Medium- α) (Sigma, ABD) içeren 15 mL'lik falkonlara alındı ve 200 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet %5 FBS, %1 P/S ve %1 L-Glutamin içeren MEM- α ile karıştırıldı. Sonrasında bu doku parçaları T-75 kültür kaplarına ekilerek 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde gelişmesi için bırakıldı. Üç gün

bekletilen parçalardan hücre kültür kabının plastik yüzeyine yapışmamış olanlar uzaklaştırıldı. Onbeş gün sonrasında invert (faz-kontrast) mikroskopta, doku parçalarının çevresinden hücre geliştiği gözlemlendi ve fotoğraflandı.

2.3. Amniyotik Membran Kök Hücrelerin Pasajlanması

Deneyler boyunca, hücreler bulundukları kabın yüzeyinin %80-90'ını kapladıklarında taze bir şekilde hazırlanan %0,25 tripsin, 1 mM EDTA içeren ve PBS içinde çözdürülen solüsyon kullanılarak bir sonraki pasaja geçirildi. Bunun için besiyeri içindeki hücreler besiyerlerinden uzaklaştırıldı, ardından iki kere PBS ile yıkandı. Sonrasında kabın hacmine uygun olan oranda tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek hücre kültür kapları 5 dakika inkübatörde (37°C, %5 CO₂) bekletildi. Sürenin sonunda kabın yanına hafifçe vurularak hücrelerin zeminden iyice kalkması sağlandı ve faz-kontrast mikroskop ile hücrelerin durumu kontrol edildi. Hücrelerin kalktığından emin olunduktan sonra hızlı bir şekilde kaplara besiyeri konularak tripsin-EDTA'nın etkisi durduruldu ve hücreler 50 mL'lik falkonlarda toplandı. Mikroskopta tekrar kontrol edilerek kaplarda hücre kalmadığına emin olundu. 200 g'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı. Tüpte kalan pellet besiyeri ile pipetlenerek çözüldü. Sonrasında hücreler uygun kaplara ekildi.

2.4. MKH Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

2.4.1. Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu Çözeltisi (PBS) Hazırlanması

Hücre kültüründe hücrelerin osmoza uğramalarını engellemek ve uygun pH'a sahip stabil bir solüsyon oluşturabilmek için PBS çözeltisi hazırlanıp deneyler boyunca kullanıldı. PBS (10x) stok olarak hazırlandı. 10x PBS hazırlamak için hassas tartıda 1.8 mM KH₂PO₄ (1,44 g), 137 mM NaCl (90,9 g) ve 10 mM Na₂HPO₄ (5,28 g) teker teker tartılarak 1 L'lik erlene aktarıldı. Üzerlerine 700 mL H₂O eklendikten sonra erlenin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak manyetik karıştırıcıda çözünene kadar

karıştırıldı. Tamamen çözüldüğünden emin olduktan sonra pH metre yardımı ile çözeltinin pH'ı 7,4'e ayarlandı, sonrasında çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanarak saklandı. Deneyler esnasında hazırlanan 10x'lik stok çözelti 1x'e seyreltildikten sonra otoklav cihazında 121°C'de steril edilerek kullanıldı.

2.4.2. Tam Vasat Besiyeri

Hücrelerin büyüüp gelişme ortamını sağlamak amacıyla MEM- α besiyeri (Minimum Essential Medium- α) (Sigma, ABD) tam vasat şeklinde hazırlandı ve deneyler boyunca kullanıldı. Hesaplamalar yapılarak %5 FBS (Biological Industries, ABD), %1 P/S, %1 L-glutamin total hacimle orantılanarak eklendi. Hücrelerin olumsuz etkilenebilmesi için kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilmesine özen gösterildi.

2.5. Amniyotik Membran MKH Karakterizasyon Çalışmaları

2.5.1. Faz Kontrast Mikroskobu ile Görüntüleme

Hücrelerin takibi, görüntülenmesi ve fotoğraf çekimleri faz kontrast mikroskobu (Primovert, Zeiss, Almanya) ve Nikon marka TS100 (Tokyo, Japonya) fotoğraf makinesi ile gerçekleştirildi.

2.5.2. Hücrelerin Büyüme Eğrisi

Hücrelerin büyümelerini takip edebilmek ve hızını yorumlayabilmek amacı ile AZ-MKH'lerden oluşan karma pasaj 2 hücreleri 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Her kuyucukta 5×10^4 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür kaplarına (Corning, ABD) ekim yapıp 37°C, %5 CO₂ şartlarına ayarlı inkübatörde inkübe edildi. İlk ekim yapılan saat kaydedildi. 48 saat sonrasında hücrelere tripsinizasyon işlemi uygulandı,

TC20 otomatik hücre sayım cihazı (Bio-rad, ABD) ile hücreler sayıldı, kaydedildi ve bir sonraki pasaja geçirildi. Aynı işlem 48 saat aralıklarla, hücre plato fazına geçene kadar tekrarlandı ve eğri oluşturuldu (Lange-Consiglio ve ark., 2013).

2.5.3. Proliferasyon Analizi

Tez deneylerinde kullanılacak olan P5 ve P6 hücrelerinin proliferasyon hızını gözlemlemek amacı ile 6 kuyucuklu kültür kaplarına (Corning, ABD) her kuyucukta 2×10^4 hücre olacak şekilde 3 tekrarlı olarak hücreler tripsinizasyon işlemi ile ekildi. Ekilen hücreler saat olarak kaydedildi. O saatin üzerinden hesaplanarak 3, 6 ve 9. Günlerde tripsin yapılarak hücreler TC20 otomatik hücre sayım cihazı (Bio-rad, ABD) kullanılarak sayıldı. P5 ve P6 ayrıca hesaplanarak eğri oluşturuldu.

2.5.4. Üçlü Soya Farklılaştırma

Mezenkimal kök hücreler en az 3 farklı soya farklılaşabilmelidir. Bu özelliklerini gösterebilmek amacı ile üçlü soya farklılaşma analizleri gerçekleştirilmiştir:

Osteojenik farklılaşma tripsinizasyon ile pasaj 5'e getirilen AZ-MKH'ların Lab-Tek 8 odacıklı slaytlara (Corning, ABD) her kuyucukta $1,0 \times 10^4$ hücre olacak şekilde ekildi. Ekilen hücreler 48 saat MEM- α besiyerinde çoğaltıldı ve %50'den yüksek yoğunluğa ulaşıldığında osteojenik farklılaşma için özel olarak hazırlanan besiyerine geçildi. Besiyeri olarak düşük glikoz içeren DMEM besiyerine ek olarak, 10^{-8} M deksametazon, 50 $\mu\text{g/mL}$ L-askorbik asit 2 fosfat, 10 mM β -gliserofosfat, %5 FBS, %1 P/S ve %1 L-Glutamin eklendi. Her kuyucuğa 500 μL osteojenik farklılaşma besiyeri eklenerek besiyerleri gün aşırı yenilendi. Zaman noktası 21 gün olarak belirlendi ve bu noktalarda hücreler tespit edildi. Tespit için kuyucuklar soğuk metanol ile 5 dakika muamele edildi, sonrasında metanol döküldü ve havada kurumaya bırakıldı. Osteojenik farklılaşmanın gözlemlenebilmesi için tespit edilen hücreler

Alizarin Kırmızısı ile boyandı. Alizarin kırmızısı (%2) deiyonize suda çözüldükten sonra amonyum hidroksit yardımı ile pH=4,3 ayarlandı ve hazır hale getirildi. Tespit edilmiş olan örnekler %70 etil alkol ile yıkandı, deiyonize su ile durulandı ve taze hazırlanan alizarin kırmızısı ile 5 dakika muamele edildi. Süre sonunda önce deiyonize su, sonrasında ise %70'lik etil alkol ile durulaması yapıldı ve ışık mikroskobunda görüntülendi. Aynı zamanda osteojenik farklılaşmayı tanımlayabilmek ve kalsifiye olmuş alanları gösterebilmek için von Kossa boyaması uygulandı.

Adipojenik farklılaşma için Lab-Tek 8'li Çember Slaytlara (Corning, ABD) her kuyucukta $1,0 \times 10^4$ hücre olacak şekilde pasaj 5 AZ-MKH ekildi. Hücreler 48 saat MEM- α besiyerinde inkübe edildi ve sonrasında adipojenik farklılaşmaya yardımcı olacak besiyerine geçildi. Besiyeri olarak yüksek glikoz içeren DMEM besiyerine 0,45 mM 3-izobütil-1-metilksantin (IBMX), 0,2 mM indometazin, 10^{-7} mM deksametazon, 10 μ M insan insülini, %5 FBS, %1 L-Glutamin ve %1 Pen-Strep eklenerek kullanıldı. Her kuyucuğa 500 μ L adipojenik farklılaşma besiyeri eklenerek besiyerleri gün aşırı yenilendi. Zaman noktası 21 gün olarak belirlendi ve bu noktalarda hücreler tespit edildi. Tespit için kuyucuklar soğuk metanol ile 5 dakika muamele edildi, sonrasında metanol döküldü ve havada kurumaya bırakıldı. Adipojenik farklılaşmanın gözlemlenebilmesi için tespit edilen hücreler %0,5'lik Oil Red O boyası ile boyandı ve biriken yağlar ışık mikroskobu ile görüntülendi.

Kondrojenik farklılaşma gözlenebilmesi için mikrokütle yöntemi kullanıldı: pasaj 5 AZ-MKH hücreleri 1,5'luk ependorf tüpüne $1,0 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekildi. Üzerlerine ise kondrojenik değişime katkı sağlayacak besiyeri eklendi: Besiyeri içeriği olarak yüksek glikoz içeren DMEM'e %1'lik ITS çözeltisi (5 μ g/mL insülin, 5 μ g/mL transferrin, 5 μ g/mL selenöz asit), 50 μ g/mL L-askorbik asit 2 fosfat, 10^{-7} mM deksametazon, 10 ng/mL TGF- β 3, 50 ng/mL BMP-6 kullanıldı. 35 günün sonunda hücreler dondurularak kriyostat cihazında kesitleri alındıktan sonra Alsiyen mavisi ile boyandı. Alsiyen mavisi protokolü **kısım 2.6.2.**'de açıklanan şekilde uygulandı.

2.5.5. Akım Sitometri Analizi

Hücrelerin immünofenotiplendirmesinin yapılabilmesi için akım sitometri cihazı olarak A.Ü. Tıp Fakültesi Hematoloji BD'ndaki, Beckman Coulter Navios FCM kullanıldı. Bu kapsamda pasaj 1 AZ-MKH hücreleri %80 bolluğa ulaştıklarında tripsinizasyon işlemine tabi tutuldu, tripan mavisi ile TC20 otomatik hücre sayma cihazında hücreler sayılarak 5 mL'de $1,0 \times 10^6$ hücre olacak şekilde ayarlandı ve **Çizelge 2.5.7**'de ayrıntılandırılan antikörlere bakıldı. Bunun için öncelikle hücre süspansiyonu 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant ayrıldı, 10 mL %1 BSA içeren PBS içerisinde çözöldü ve santrifüj tekrarlandı. Ardından süpernatant içinde yaklaşık 1 mL sıvı bırakılacak şekilde dikkatlice boşaltıldı. Santrifüj tüplerine 100 µL hücre süspansiyonundan eklendikten sonra her antikörden 5 µL olacak şekilde ayrı tüplere eklendi. Tüpler vortekslendi ve 20 dakika ışık almayan ortamda inkübe edildi. Süre sonunda süspansiyon 1,5 mL PBS ile muamele edildi, ardından 250 g'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Yıkamadan sonra süpernatant uzaklaştırıldı, 500 µL taze PBS eklendi ve cihazda okuması yapıldı. Verilerin analizi *Kaluza* (Beckman Coulter) ile gerçekleştirildi.

Çizelge 2.5.5. Akım sitometri analizinde kullanılan yüzey belirteçleri ve floresan boyaarı

Yüzey Belirteçleri	İşaretlendiği Floresan Boyalar
CD133	PE
CD34	APC
CD105	PC7
CD73	PE
CD90	PC5.5
HLA-DR	ECD
CD29	FITC
CD31	PB
LIN	A750

2.5.6. Koloni Oluşturabilen Birim (CFU-f) Analizi

AZ-MKH hücrelerinin karakterizasyonu kapsamında pasaj 5 hücrelerinin koloni oluşturabilme kapasiteleri incelendi. Bu kapsamda 6 kuyucuklu kültür kaplarına (Corning, ABD) üç tekrarlı olacak şekilde $2,5 \times 10^4$, 5×10^4 ve 1×10^5 hücre ekildi ve haftada 2 kere besiyeri değişimi yapılması haricinde 14 gün boyunca bir muamelede bulunulmadı. 14 günün sonunda hücreler PBS ile yıkanarak besiyerinden arındırıldı ve %2,5'luk gluteraldehit ile 5 dakika muamele edilerek sabitlendi. Sonrasında %0,5'lik kristal viyole boyası ile 30 dakika muamele edildi ve ışık mikroskopunda görüntülendi.

2.6. Deney Tasarımı

2.6.1 Makromoleküler kalabalıklaşma

İki boyutlu hücre kültüründe makromoleküler kalabalıklaşmanın AZ-MKH'lerin kondrojenik farklılaşmasına etkisinin incelenmesi amaçlandı. Makromoleküler kalabalıklaştırıcı olarak κ -karagenan (Sigma, ABD) kullanıldı. Karagenan, kullanılacak miktarlarda hassas tartıda tartıldıktan sonra 4 saat boyunca UV lambası altında laminer akışlı kabin içerisinde **Şekil 2.6.1.**'de gösterilen şekilde sterilize edildi. Her besiyeri değişim gününde kullanılacak olan karagenan porsiyonları taze olarak hazırlandı. 50, 100, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında olacak şekilde toz halindeki steril karagenan porsiyonları gereken miktardaki MEM- α besiyeri ile karıştırıldı. Ekleme yapıldıktan sonra karagenanlı besiyeri içeren 50 mL'lik falkonlar 20 dakika boyunca inkübe edilerek karagenanlar çözündürüldü.

Pasaj 5'e getirilen AZ-MKH'ler 6 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucukta $7,0 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin tutunması için 48 saat boyunca tam vasat MEM- α besiyerinde inkübe edildi. 48 saat sonrası 0. Gün olarak kabul edilerek MMK etkisi başlatıldı: 50 mL'lik falkonlara hazırlanan karagenanlar her konsantrasyon için 3 tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara ilave edildi. Her kuyucuğa toplamda 2 mL olarak

şekilde **Çizelge 2.6.1.**'de belirtilen gruplara göre besiyerleri ilave edildi. MMK eklenmeyen grup kontrol grubu olarak belirlendi. Standart vasat olarak %5 FBS, %1 P/S ve %1 L-Glutamin içeren MEM- α kullanılırken kondrojenik vasat için yüksek glikoz içeren DMEM %1'lik ITS çözeltisi (5 $\mu\text{g/mL}$ insülin, 5 $\mu\text{g/mL}$ transferrin, 5 $\mu\text{g/mL}$ selenöz asit), 50 $\mu\text{g/mL}$ L-askorbik asit 2 fosfat, 10^{-7} mM deksametazon, 10 ng/mL TGF- β 3, 50 ng/mL BMP-6 katkısı ile kullanıldı. Besiyeri değişimleri haftada iki kere olacak şekilde gerçekleştirildi. Her besiyeri değişiminde MMK içeren besiyerleri steril karagenanlar ile taze olarak hazırlandı. Makromoleküler kalabalıklaşmanın etkileri 0, 3, 7, 14 ve 21. günlerde incelendi.



Şekil 2.6.1. κ -Karagenan sterilizasyon işlemi

Çizelge 2.6.1. Deney Grupları

Vasat Türü	MMK Konsantrasyon
Standart Vasat	Kontrol
	50 µg/mL CRG
	100 µg/mL CRG
	250 µg/mL CRG
	500 µg/mL CRG
Kondrojenik Vasat	Kontrol
	50 µg/mL CRG
	100 µg/mL CRG
	250 µg/mL CRG
	500 µg/mL CRG

2.6.2. Histokimyasal Boyama

Altı kuyucuklu kültür kaplarına ekilen ve **Çizelge 2.6.1**'de gösterilen deney grupları belirtilen zaman noktalarında besiyerlerinden arındırıldı, PBS ile iki kere yıkandı, %2,5 gluteraldehit her kuyucuğa 1 mL olacak şekilde ilave edildikten sonra parafilm ile kapatılarak saklanma amacı ile +4°C'deki buzdolabına kaldırıldı.

Mayer'in hematoksilen boyası hazırlandı: 1,27 M potasyum (50 g), 0,0033 M hematoksilen (1 g), 0,001 M sodyum iyodat (0,2 g), 0,0048 M sitrik asit (1 g), deiyonize su (1 L) içerisinde çözüldü ve şişenin ışık almamasına özen gösterildi. Eozin hazırlanırken ise ilk olarak stok solüsyonu 10 gram eozin tartılarak deiyonize su (200 mL), %95 etanolde (800 mL) çözüldü. Stok solüsyonundan 250 mL alındı, 750 mL %80'lik etanol (750 mL) ve glasiyel asetik asitte (5 mL) çözüldü.

Boyama yapılacağı zaman kültür kapları çıkarıldı, %2,5'luk gluteraldehit boşaltıldı ardından distile su ile yıkandı. 1 mL hematoksilen eklendi, 10 dakika bekletildi, boya boşaltıldı. Distile su ile durulandı. %95'lik etanolde 5 dakika muamele edildi, ardından 1 mL eozin her kuyuya eklendi ve 3 dakika bekletildi. Süre sonunda

boyalar kuyulardan alındı ve kuyular %95'lik etanol ile yıkandıktan sonra havada kurumaya bırakıldı. Görüntülemeler ışık mikroskobu ile gerçekleştirildi.

Alsiyen mavisi ile boyama işlemi sülfatlanmış glikozaminoglikanları gözlemleyebilmek amacı ile yapıldı. Bunun için alsiyen mavisi 8GX (%1), %3'lük asetik asit ile çözüldü. pH'ı 2,5'a ayarlandıktan sonra boyamalar gerçekleştirildi: Bunun için fikse edilen örnekler %2,5 glutaldehitten distile su yardımı ile arındırıldıktan sonra 1 mL alsiyen mavisi ile 10 dakika muamele edildi. Sonrasında 5 dakika nükleer hızlı kırmızı boyası ile 5 dakika boyandı. Su ile boyalardan uzaklaştırıldı ve havada kurutuldu. Görüntülemeler ışık mikroskobu ile gerçekleştirildi.

2.7. Hücre Migrasyon Testi

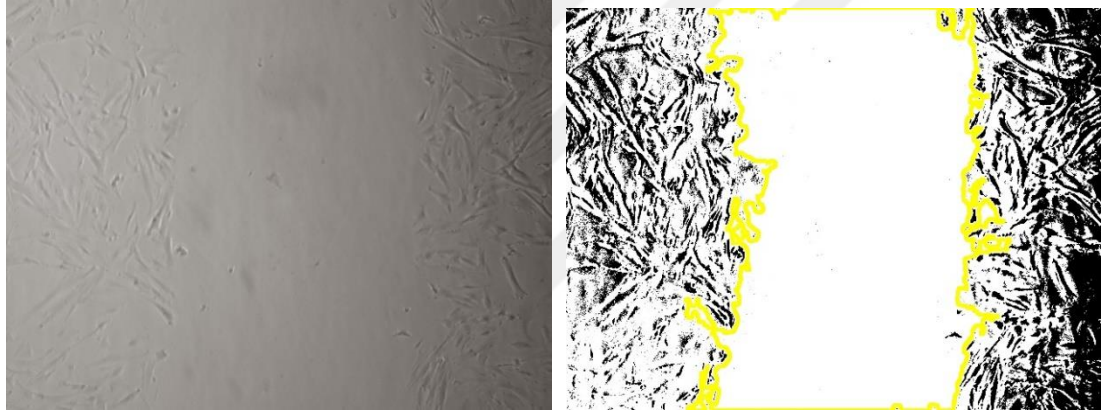
Yara iyileşmesi testi olarak da adlandırılan analiz, hücrelerin migrasyon hızı ölçümüne olanak sağlar. Bu test için 3 tekrarlı olmak üzere 12'li kuyucuk kültür kaplarına kuyu başına $1,0 \times 10^5$ pasaj 2 karma kültür AZ-MKH ekildi. Her kuyuya 2 mL olacak şekilde standart vasat MEM- α veya makromoleküler kalabalıklaştırıcı içeren MEM- α 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ ve 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlara sahip olacak şekilde eklendi. Hücrelerin kabın yüzeyini %80-90 oranında kaplayana kadar beklenildi ve sonrasında 200 μL 'lik pipet ucu kullanılarak kabın altında baştan sonra düz bir çizgi çekilerek bir nevi suni yara oluşturuldu. Faz kontrast mikroskopta hücrelerin göç etme, yarayı iyileştirme hızını gözlemlemek amacıyla fotoğraflar çekildi. Yaranın kapanma hızı **Çizelge 2.7.**'de belirtilen noktalarda ölçüldü ve ImageJ ile hesaplandı (Zeiger ve ark., 2012).

ImageJ hesaplamaları esnasında "Woundhealingtool" (Suarez-Arnedo ve ark., 2020) isimli makrodan yararlanılmıştır. Bu test için özellikle geliştirilmiş olan ImageJ aleti fotoğraf yüklendiği zaman suni yaranın alanını hesaplamaktadır. Fakat bazı örneklerde kontrast yeterli düzeyde olmadığı zaman "Woundhealingtool" sağlıklı

çalışmamaktadır. Bu örneklerde fotoğraf ImageJ’ye yüklendi, 8-bit’ çevrilerek Log3D filtresi ((Sage ve ark. 2005) uygulanarak arka planı kalabalık olan fotoğraftaki hücrelerin belirginleşmesi sağlandı. Sonrasında ise kontrast ayarlaması yapıldı, “Woundhealingtool”un çalışabilmesi için eğer kontrast tam olarak orijinal fotoğraf ile eşleşecek şekilde ayarlanamadı ise fırça seçeneği kullanılarak aradaki boşluklar manuel olarak dolduruldu. Böylece fotoğrafın alanı **Şekil 2.7.**’de gösterildiği gibi doğru bir şekilde hesaplandı.

Çizelge 2.7. Migrasyon testi zaman noktaları

Zaman Noktaları	0. saat	12. saat	24. saat	48. saat	72. saat
-----------------	---------	----------	----------	----------	----------



Şekil 2.7. Migrasyon deneyi ImageJ alan hesaplaması. Orijinal fotoğraf, ImageJ ile hesaplanan alan (soldan sağa)

2.8. Koloni Oluşturma Birimi Analizi

Mezenkimal kök hücrelerin koloni oluşturabilme kapasitesi ve MMK’nın buna olan etkileri incelendi. İzole edilip çoğaltılan pasaj 5 insan amniyotik zar mezenkimal kök hücreleri Corning’in 6 kuyucuklu kültür kaplarına üç tekrarlı olacak şekilde kuyu başına 10.000 hücre olarak ekildi. MEM- α tam vasat besiyeri veya MEM- α tam vasat besiyerinin 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ ve 500 $\mu\text{g/mL}$ ’lik konsantrasyonlara sahip MMK katkılı formları her kuyucuğun üzerine 2 mL olacak şekilde eklendi ve 14

gün boyunca, üç günde bir besiyeri değişimi haricinde herhangi bir işlem yapılmadan bekletildi.

Belirlenen sürenin sonunda kuyucuklar temizlenmesi için iki defa PBS ile yıkandı. PBS ile yapılan ikinci yıkamanın sonucunda PBS rengi şeffaf olduğu için besiyerinin uzaklaştırıldığından emin olundu ve her bir kuyucuğun üzerine 1 mL olacak şekilde %2,5'lik glutaraldehit eklendikten sonra 5 dk bekletilerek hücrelerin sabitlenmesi sağlandı. Kuyucukların diplerine değmemek şartı ile %2,5luk glutaraldehit pastör pipeti ile uzaklaştırıldı ve havada kurumaya bırakıldı. Koloni sayılarının gözlenebilmesi için sabitlenen hücreler %0,5'lik kristal viyole boya 30 dakika ile boyandı. Boyanın fazlası deiyonize su ile yıkanarak temizlendi. Işık mikroskopunda görüntülendi. CFU-f frekansı **şekil 2.8.**'de verilen şekilde hesaplandı.

$$\text{CFU-f frekansı} = (\text{Koloni sayısı} / \text{Ekilen hücre sayısı}) \times 100$$

Şekil 2.8. CFU-f frekans hesaplama formülü.

2.9. Kolajen İçeriği Belirlenmesi

2.9.1. Protein Miktar Tayini

Makromoleküler kalabalıklaşma için belirlenen deney grupları her kapta $0,35 \times 10^5$ hücre olacak şekilde T-25 kültür kaplarına AZ-MKH pasaj 5-6 karma kültürü eklendi; hücrelerin tutunması ve yeterli yoğunluğa ulaşması beklendi. MMK'nın ilave edildiği zaman 0. Gün olarak kabul edildi ve 0, 7, 14, 21. günlerde hücreler tripsinizasyon ile kaldırıldı. 1,5 mL'lik ependorf tüplerine aktarıldı. RIPA lizis ve ekstraksiyon tamponu 25 mM Tris-HCl (ph:7,6), 150 mM NaCl, 1mM EDTA, %1 Triton X-100, %1 deoksikolik asit, %0,1 SDS ve %0,1 NaOH ve proteaz inhibitörü eklenerek hazırlandı. Hücre süspansiyonu ile RIPA lizis ve ekstraksiyon tamponu 1:1 hacim oranında olacak şekilde buz üzerinde eklendi, vortekslendi ve +4 °C'de buzun

üzerinde 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda tüpler tekrar vortekslendi ve 15 dakika boyunca 4 °C’de buz üzerinde tutuldu.

Toplam protein miktar tayini için Lowry metodundan yararlanıldı: Protein standardı, sığır serum albümin (BSA) proteininin 10 mg/mL olarak seyreltilmesi üzerinden hazırlandı. Folin-Lowry metodu için gerekli solüsyonlar **Çizelge 2.9.1.**’de belirtilen oranlarda hazırlandı. Hazırlanan C solüsyonu RIPA lizis tamponu ile hazırlanan örnekler ve protein standardı bileşenleri ile 1:3 oranında karıştırılarak 15 dakika 25°C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler Folin-Ciocalteu belirteci ilave edildi, örnekler vortekslendi ve 45 dakika 25°C’de inkübe edildi. Süre sonunda 660 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazı yardımı ile okunan örneklerin absorban değerleri elde edildi.

Çizelge 2.9.1. Lowry metodu bileşenleri

Solüsyon Adı	Kimyasal	Miktar
A Solüsyonu	Na ₂ CO ₃	20 g
	NaOH	5 g
	Na-K tartarat	1,6 g
	dH ₂ O	1 L
B Solüsyonu	Cu ₂ SO ₄ .5H ₂ O	4 g
	dH ₂ O	100 mL
C Solüsyonu	A solüsyonu	50 mL
	B solüsyonu	50 mL
Folin-Ciocalteu Belirteci	Folin-Ciocalteu çözeltisi	0,3 mL

2.9.2. SDS-PAGE

Deney grupları belirlenen zaman noktalarında (0, 7, 14 ve 21. Gün) kolajen miktarlarının oranı SDS-PAGE yöntemi ile belirlendi. Bunun için örneklerin kolajen proteini içerikleri, BSA protein standardı ile karşılaştırılarak bulundu ve her kuyucuğa 10 µg protein yüklendi. Protein standart belirteci olarak ticari kolajen tip 1 üreticinin protokolüne göre, 0.1 M asetik asitte 3 saat çözündürülerek %0,1'lik solüsyon haline getirildi. Solüsyonun %10'luk miktarı kadar kloroform ile birleştirilerek +4°C'de gece boyunca inkübe edildikten sonra hazır hale getirildi ve kullanıldı.

-80°C'de saklanan sıçan kuyruklarından kolajen izolasyonu gerçekleştirildi: Rajan ve ark. protokolü düzenlenerek uygulandı (2007): Buna göre sıçan kuyrukları derilerinden steril klempler ile arındırıldı ve kolajen lifleri çıkartıldı. Bu lifler PBS ile yıkandıktan sonra %70 izopropanol ile 5 dakika muamele edildi. Sonrasında hazırlanan 0.02 N asetik asit içine alınarak +4°C'de 72 saat manyetik karıştırıcı yardımı ile inkübe edildi ve kullanıma hazırlandı. Ayrıca, *high range* (J449) protein belirteci de karşılaştırma yapmak amacı ile yüklendi.

Çizelge 2.9.2. SDS-PAGE jel içerikleri

Çözeltiler	%7,5'luk Ayırma Jeli	%4'lük Toplayıcı Jel
Distile Su	7,28 mL	9 mL
%30 Bis-Akrilamit	3,75 mL	1,98 mL
1.5 M Tris-HCl (pH: 8,8)	3,75 mL	-
0.5 M Tris-HCl (pH: 6,8)	-	3,78 mL
%10 SDS	150 µL	150 µL
%10 Amonyum Persülfat	75 µL	75 µL
TEMED	7,5 µL	15 µL

SDS-PAGE işlemini gerçekleştirebilmek için gereken %7,5'luk ayırma jeli ve %4'lük toplayıcı jel Çizelge 2.9.2'de verilen oranlarda hazırlandı. Öncesinde %7,5'lik ayırma jeli hazırlandı ve elektroforez tankına hızlıca döküldü. Jelin düzgün bir şekilde eşit olarak donması için üzerine izopropil alkol eklendi. Ayırma jelinin donduğuna

emin olunduktan sonra izopropil alkolün fazlası boşaltıldı ve hazırlanan %4'lük toplayıcı jel elektroforez tankındaki yerine döküldü. Bundan hemen sonra kuyucukların oluşabilmesi için tarak takıldı. Toplayıcı jel donduktan sonra RIPA lizis ve ekstraksiyon tamponu ile elde edilmiş olan protein örnekleri için jel hazır hale geldi. Örnekler 95 °C'de 5 dakika boyunca Laemmli numune tamponu (1 M Tris-HCl (pH:6,8) (6 mL), %10 SDS (2 mL), %100 gliserol (1 mL), β -merkaptoetanol (267 μ L), Bromofenol mavisi (2,5 mg) (1:1) ile muamele edildi. Her kuyucuğa 10 μ L örnek yüklenerek 70 V'da jel yürütüldü. Jel elektroforez tankının çalışabilmesi için içine dökülecek olan koşturma tamponu (pH:8,3), 25 mM Tris bazı (3,025 gram), 200 mM glisin (14,4 gram) ve %0,1 SDS (1 g) tartılıp 1 litre deiyonize suda çözülerek hazırlandı.

Jelin yürütmesi tamamlandıktan sonra ayrı kaba alınarak boyama çözeltisi ile boyandı. Çözelti ise 1,2 gram Coomassie brilliant blue, %50'lik metanol (454 mL) ve glasiyel asetik asitin (46 mL) çözündürülüp Whattman no.1 kâğıttan süzülmesi ile hazırlandı. Boyama çözeltisinde 2 saat bekletildikten sonra jel boya uzaklaştırma çözeltisi (%5 metanol, %7,5 glasiyel asetik asit) ile 72 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak inkübe edildi. Süre sonunda fazla boyadan arınmış olan jelin görüntüleri Biorad'ın Imagelab programı aracılığı ile alındı.

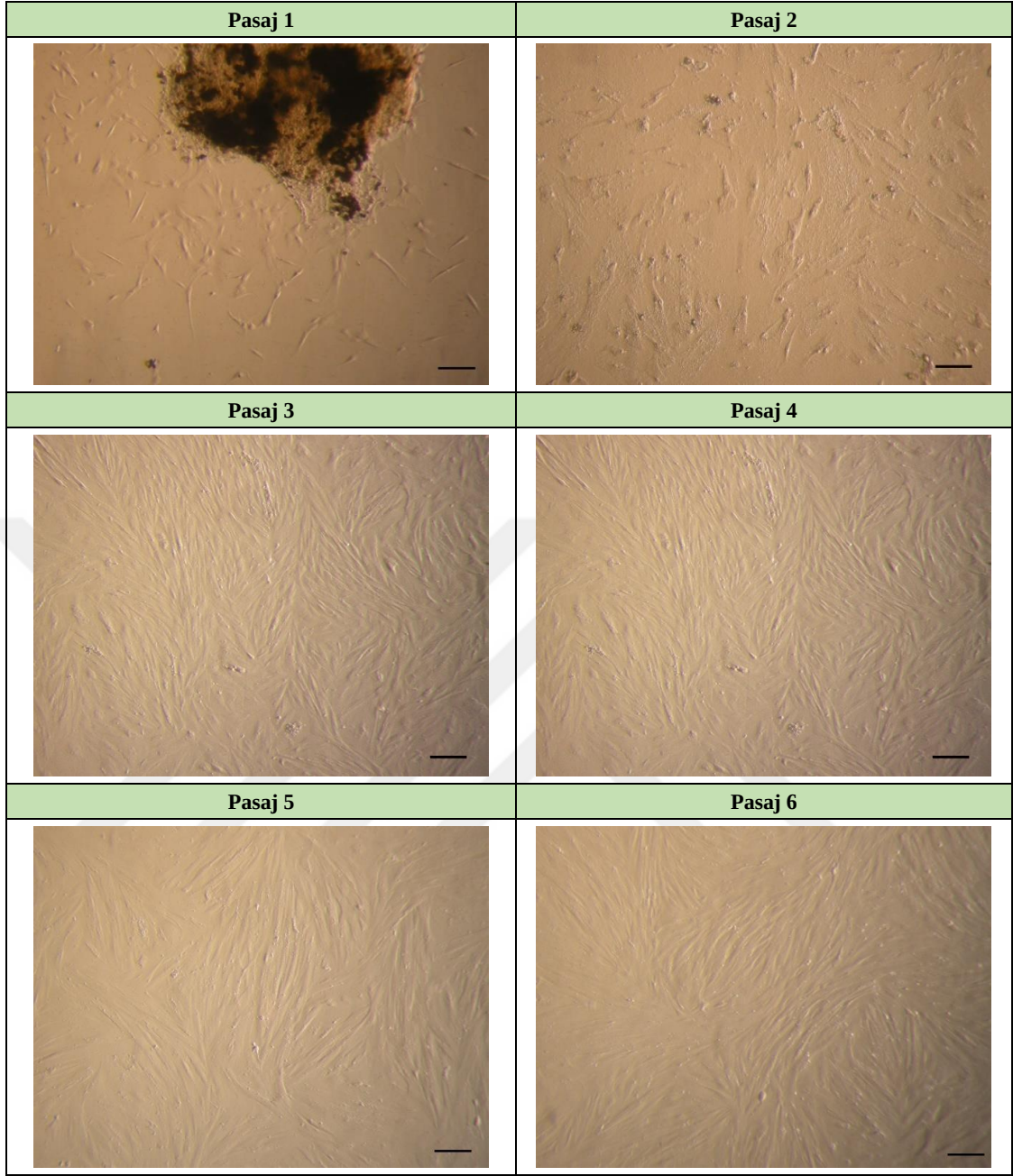
2.10. İstatistiksel Analizler

Aksi belirtilmedikçe çalışmalar üç tekrarlı gerçekleştirildi ve Graphpad Prism 8 sistemi kullanıldı. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı ve ardından gruplar arası değişimler Post-Hoc testlerinden Tukey ile tamamlandı, p değerinin anlamlı olabilmesi için 0,05'ten küçük olma şartı arandı.

3. BULGULAR

3.1. Faz Kontrast Mikroskop ile Görüntüleme

Tez çalışması kapsamında hücre kaynağı olarak amniyotik membrandan izole edilen mezenkimal kök hücreler kullanıldı. Pasaj 1’de plasentadan izole edilerek, -80°C’de saklanmakta olan ve deneyler kapsamında çözdüğü doku parçalarından hücreler yaklaşık olarak 15 gün sonrasında elde edilmeye başlandı. Pasaj 1’den itibaren hücreler kültür kaplarının yaklaşık %80’i veya daha fazlasını kapladıklarında tripsinizasyon işlemine maruz bırakılarak bir sonraki pasaja geçirildi. Pasajlar ilerledikçe hücrelerin morfolojik yapısının yuvarlak morfolojisinden uzaklaşıp uzayarak fibroblastik bir yapıya döndüğü gözlemlendi. Hücreler, mezenkimal kök hücrelerin karakteristik özelliklerinden olan plastik yüzeye yapışabilmeyi ve faz kontrast mikroskobu ile gözlenen iğsi yapıyı bütün pasajlarda başarı ile sağlandı.

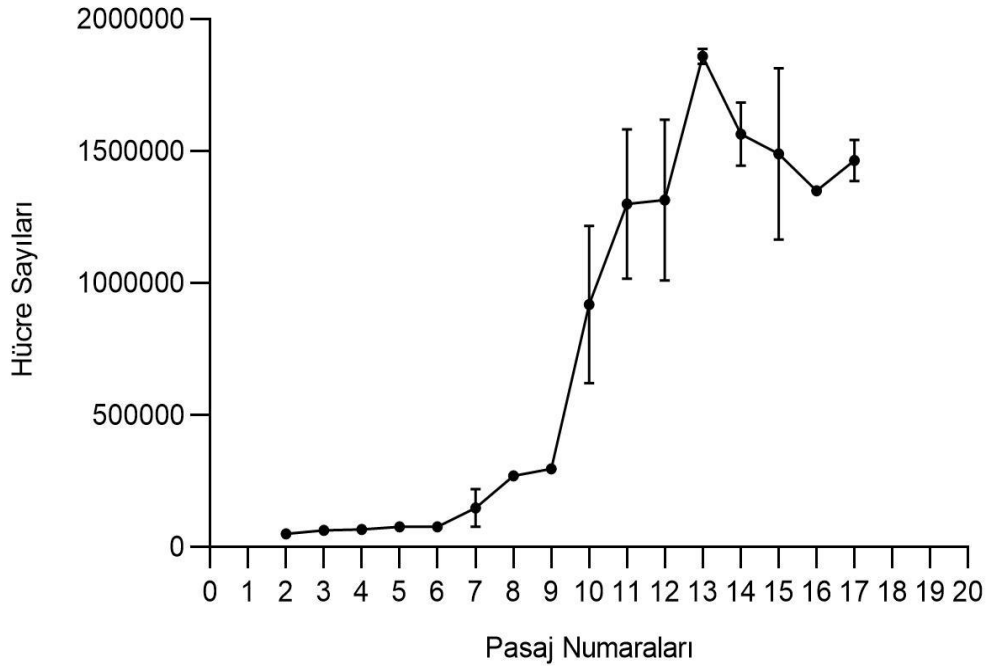


Şekil 3.1. AZ-MKH'lerin faz-kontrast mikroskobu ile çekilen pasaj görüntüleri (P1-P6). Ölçü çubukları= 20 µm.

3.2. Büyüme Eğrisi Analiz Bulguları

Büyüme eğrisi analizi amniyotik zar MKH'ların pasaj sayılarına göre gelişimlerini anlayabilmek amacı ile yapıldı. Bu amaçla AZ-MKH'lar 6'lı hücre kültür

kaplarına $5,0 \times 10^4$ hücre olacak şekilde ekildikten sonra 48 saatlik periyodlarda tripsinizasyon işlemine tâbi tutularak pasaj atlatıldı. Pasaj 2 AZ-MKH'leri ile başlatılan deney hücreler plato fazına ulaşana kadar sürdürüldü. Hücre sayılarının pasaj numaraları ile eşleştirilerek oluşturulan eğri **Şekil 3.3'te** verildi. Buna göre çoğaltılan hücreler pasaj 2 - pasaj 6 arasında daha yavaş (inkübasyon fazı) bölündü, pasaj 6 - pasaj 9 arasında ise akselerasyon fazına geçerek hızlandıkları görüldü. Pasaj 9'dan Pasaj 13'e kadar logaritmik fazda devam eden hücreler, pasaj 13'ten sonra plato fazına geçiş yaptı.

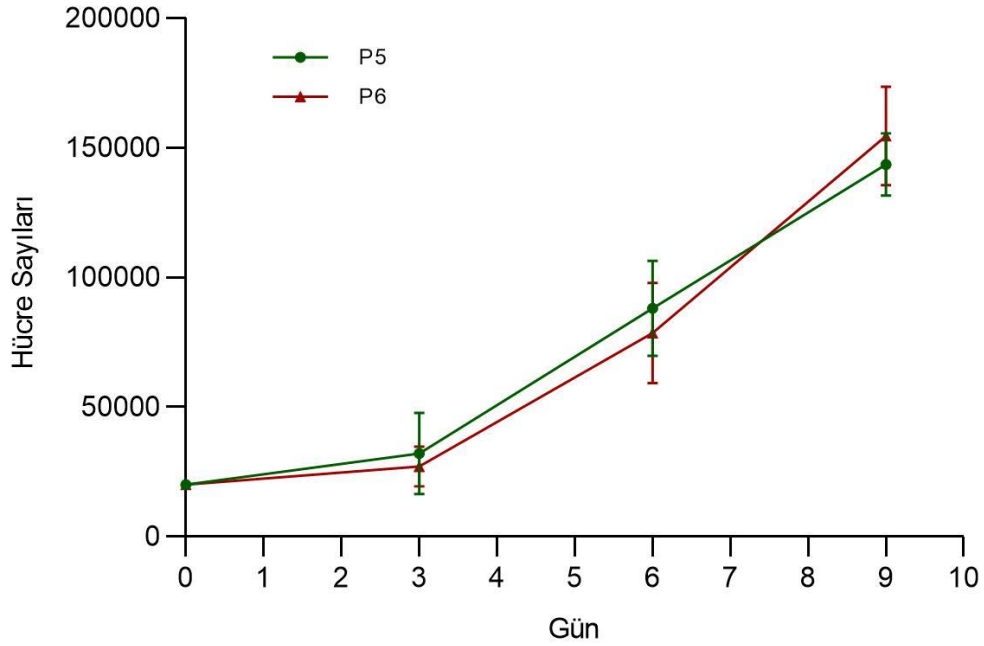


Şekil 3.2. AZ-MKH büyüme eğrisi (P2-P17)

3.3. Proliferasyon Analizi Bulguları

Makromoleküler kalabalıklaşma deneylerinde kullanılmak üzere seçilen pasaj 5 ve pasaj 6 AZ-MKH'ların proliferasyon hızlarını anlayabilmek ve karşılaştırabilmek amacı ile proliferasyon analizi yapıldı. Hücreler her kuyucukta $2,0 \times 10^4$ olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek 3, 6 ve 9. günlerde tripsinizasyon işlemi ile

sayıldı ve veriler grafiğe aktarıldı. Grafiğe göre pasaj 5 ve pasaj 6 AZ-MKH hücrelerinin proliferasyon hızları arasında belirgin bir fark gözlenmedi. İki pasajda da 0 ve 3. Günler arasındaki zaman aralığında hücreler daha yavaş çoğalırlarken, 3. günden sonra proliferasyon hızları arttı, 9. günde de bu hızın sürdürdüğü görüldü.

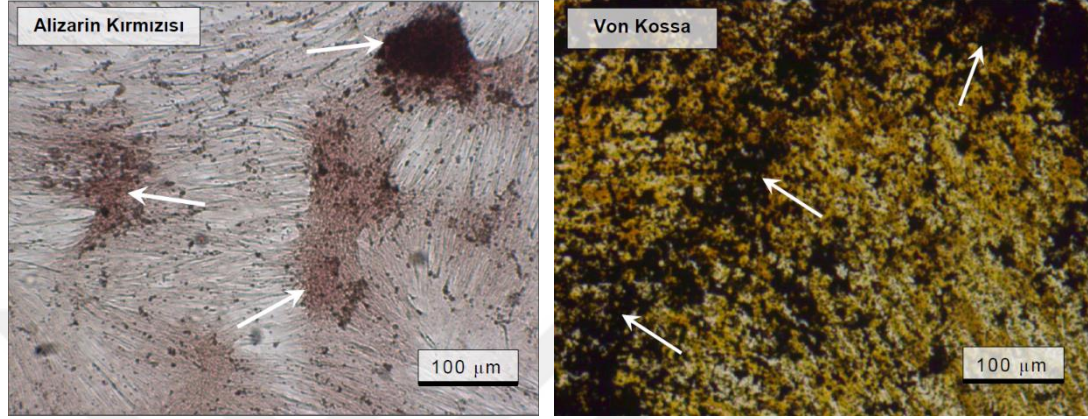


Şekil 3.3. AZ-MKH proliferasyon eğrisi (P5-P6)

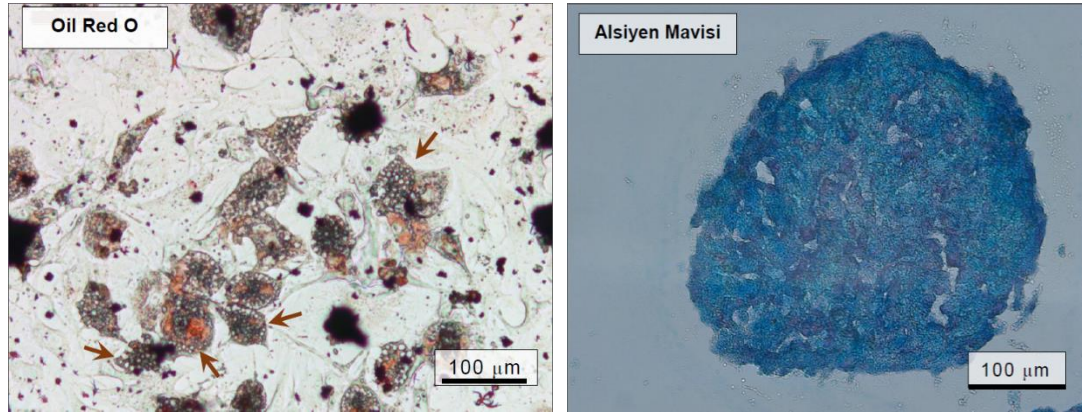
3.4. Üçlü Soya Farklılaşma Görüntüleri

Amniyotik membrandan izole edilen kök hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğunun belirlenebilmesi amacıyla yapılan üçlü soya farklılaştırma analizinde hücreler osteojenik, adipojenik ve kondrojenik olmak üzere karakterize edilerek ışık mikroskopunda görüntülemeleri yapıldı. Osteojenik farklılaşma 21. günde Alizarin kırmızısı ve von Kossa boyaları, adipojenik farklılaşma 21. günde Oil Red O boyası ve kondrojenik farklılaşma ise 35. günde Alsiyen mavisi ile boyanarak analiz edildi. Şekil 3.4.1.'de gösterilen okların işaret ettiği alanlar Alizarin kırmızısı ve von Kossa ile boyanan hücrelerdeki kalsiyum birikime işaret etti. Oil red O boyaması ise kırmızı/turuncu renkte lipid içeren vaküelleri boyayarak AZ-MKH'ların adipojenik

farklılaşmaya gittiğini gösterdi. Mikrokütle yöntemi ile gerçekleştirilen kondrojenik farklılaşma ise alsiyen mavisinin hücreyi mavi renge boyaması ile sGAG birikiminin olduğuna ve hücrelerin kondrojenik yapıya gittiğine işaret etti.



Şekil 3.4.1. AZ-MKH'lerin osteojenik farklılaşması deneyi ile ilgili histokimyasal boyamaların ışık mikroskobu görüntüleri. AZ-MKH hücrelerinin osteojenik nesile farklılaşmasının bir işareti olarak kültürde oluşan kalsiyum birikimlerinin (oklar) Alizarin kırmızı (üstte) ve von Kossa (altta) boyaları ile boyanması. Ölçü çubukları = 100 µm.



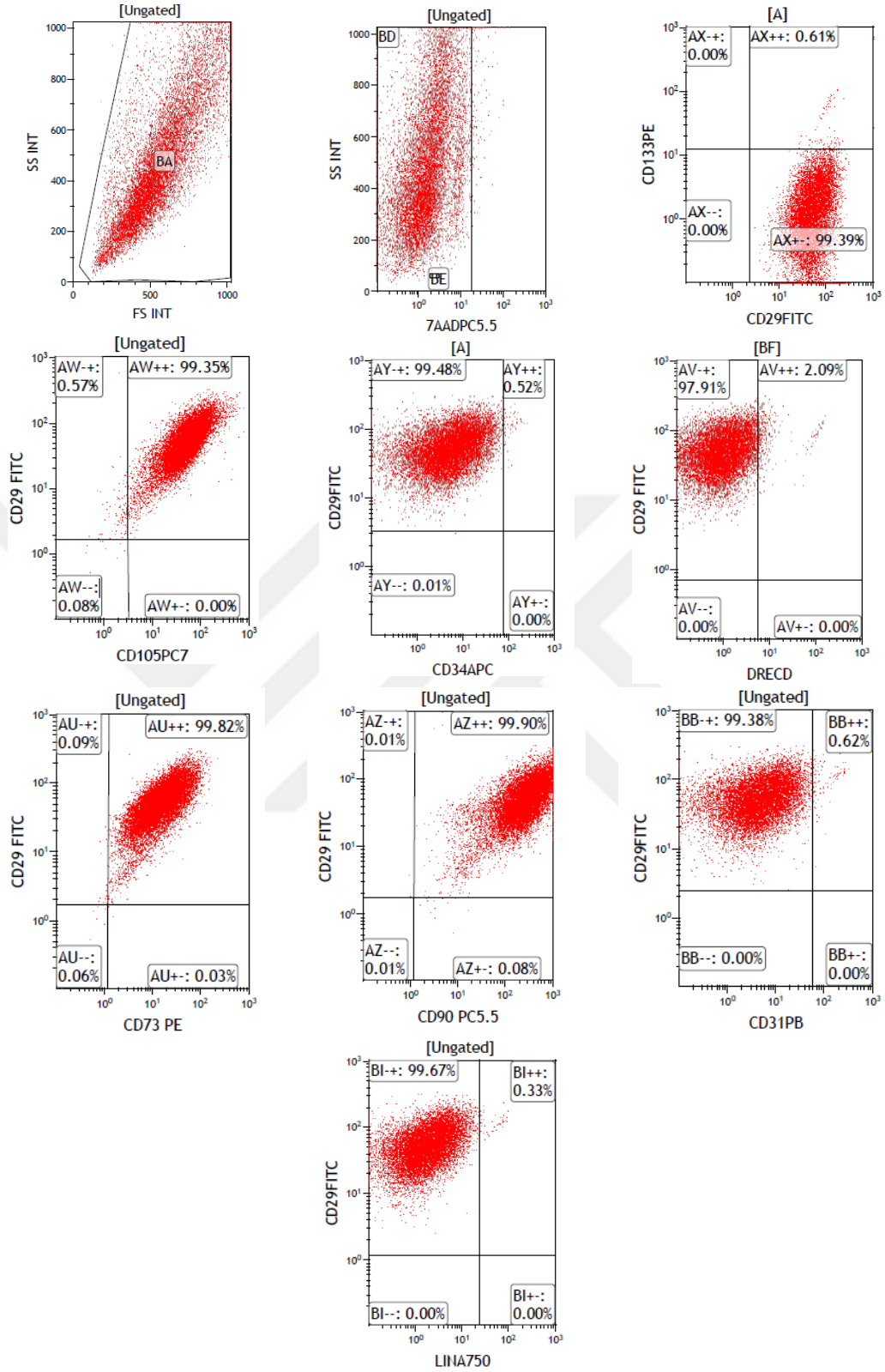
Şekil 3.4.2. AZ-MKH'lerin adipojenik ve kondrojenik farklılaşması deneyleri ile ilgili histokimyasal boyamaların ışık mikroskobu görüntüleri. Ölçü çubukları = 100 µm. Üstte, hücrelerin adipojenik farklılaşmasını gösteren Oil Red O boyaması gösterilmekte olup, oklar adipojenik hücrelere ait lipid damlacıklarını işaret etmektedir. Altta, pellet kültürdeki hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını gösteren Alsiyen mavisini boyaması verilmektedir.

3.5. Akım Sitometri Bulguları

Amniyotik membrandan izole edilen kök hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğunu doğrulamak amacı ile akım sitometri kullanılarak immünofenotiplendirme yapıldı. Karakterizasyon için kullanılan yüzey belirteçleri **Çizelge 3.5**'te, sonuçlar ise **Şekil 3.5**'te verilmiştir. Akım sitometri bulgularında, mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri olan CD105, CD90, CD29 ve CD73 yüksek düzey ifadesi gözlenirken CD133, CD34, CD31 ve LIN yüzey belirteçlerinin ifade edilmediği ortaya çıktı. HLA-DR %2,09 ile çok düşük bir düzeyde ifade edildi.

Çizelge 3.5. Amniyotik membran MKH akım sitometri belirteçleri ve ifade edilme oranları

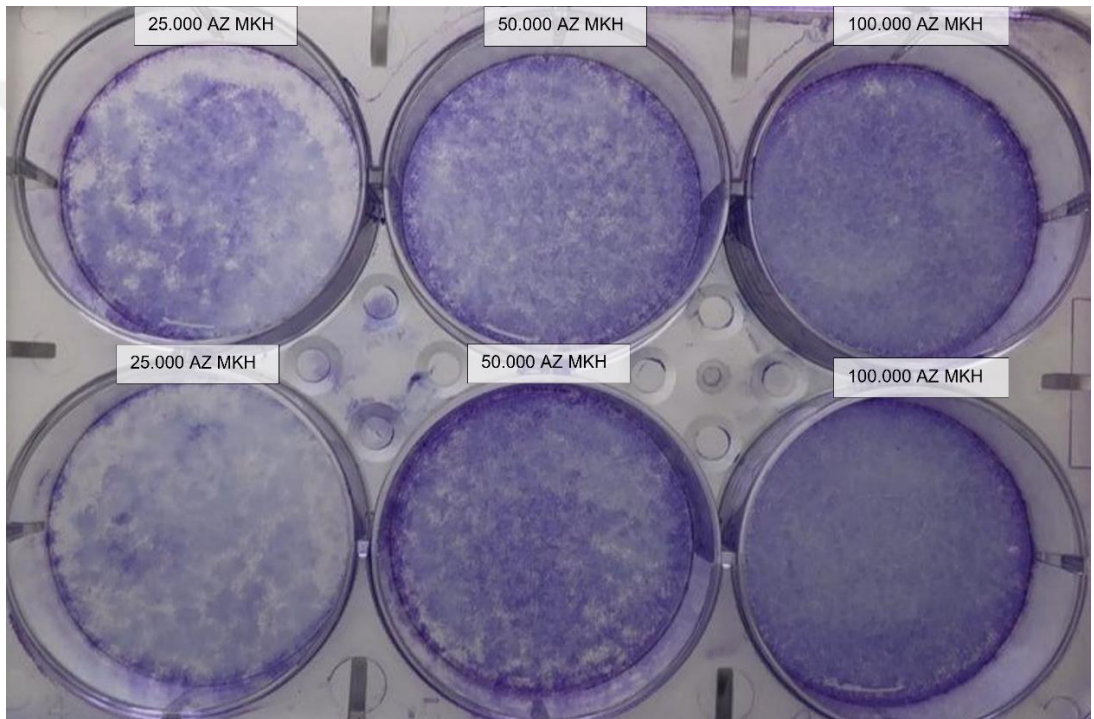
Yüzey Belirteci	Pozitiflik Durumu	Pozitiflik Oranı (%)
CD29 FITC	Pozitif	99,67
CD105 PC7	Pozitif	99,35
CD90 PC5.5	Pozitif	99,90
CD73 PE	Pozitif	99,82
CD31 PB	Negatif	0,62
CD34 APC	Negatif	0,52
HLA-DR ECD	Negatif	2,09
CD133 PE	Negatif	0,61
LIN A750	Negatif	0,33



Şekil 3.5. Akım sitometri analiz sonuçları

3.6. Koloni Oluşturabilen Birim (CFU-f) Analizi

Amniyotik membran mezenkimal kök hücrelerin koloni oluşturabilme kapasitelerinin belirlemek amacıyla kuyucuk başına 25.000, 50.000 ve 100.000 hücre, 3 tekrarlı olacak şekilde ekildikten 14 gün sonra kristal viyole ile boyanarak fotoğraflandı ve koloniler gösterildi. Bir koloni en az 50 hücreden meydana gelecek şekilde belirlendi. Grupların hepsinde koloni oluşumu gerçekleşti. Hücre sayısı arttıkça (25.000’den 100.000’e) koloni sayılarında doğru orantılı artış gözlemlendi.

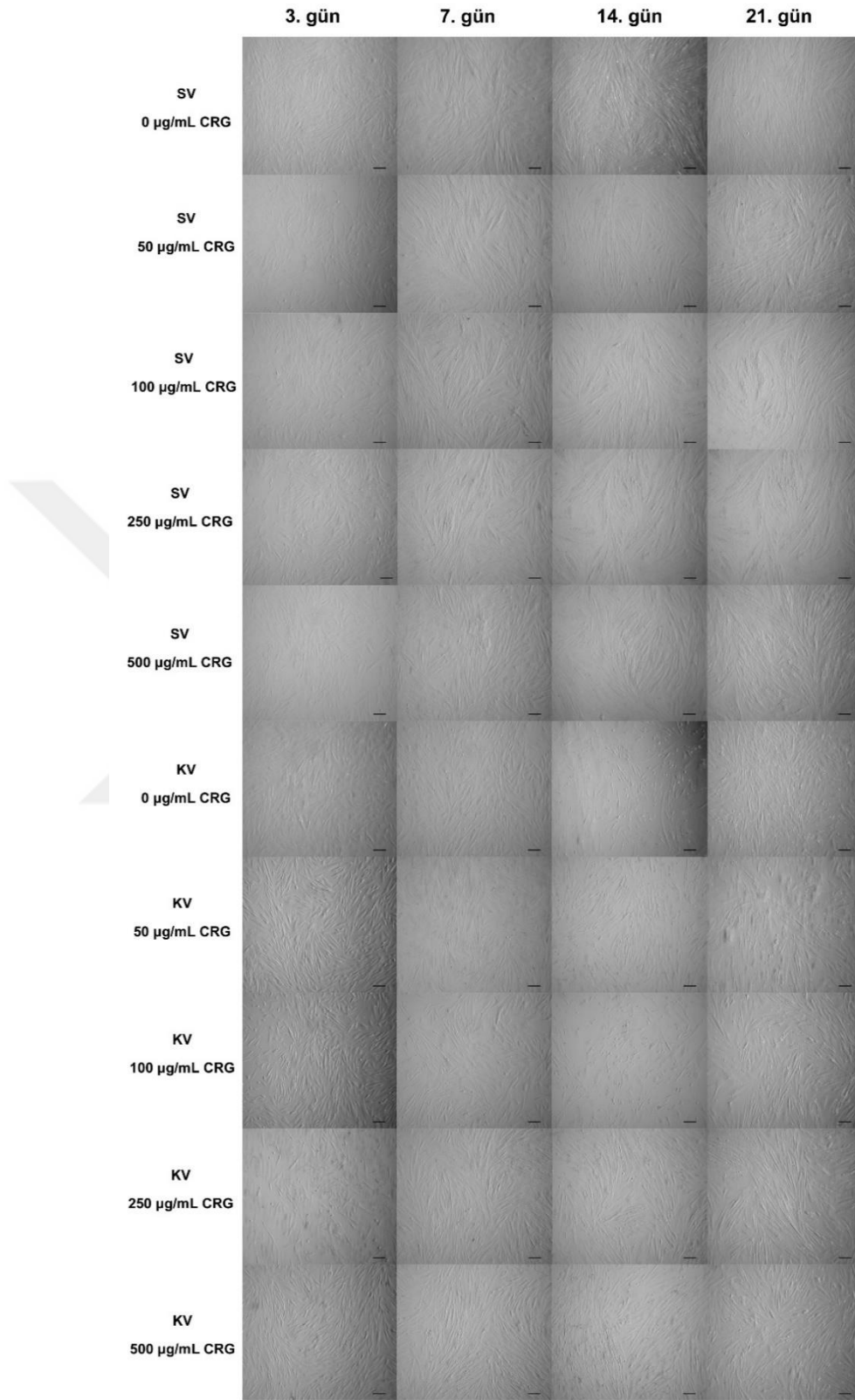


Şekil 3.6. AZ-MKH koloni oluşturabilen birim (CFU-f) analiz sonuçları. Kristal viyole ile boyanmış 25.000, 50.000, 100.000 (soldan sağa).

3.7. Makromoleküler Kalabalıklaşma Faz Kontrast Mikroskop Görüntüleri

Makromoleküler kalabalıklaşmanın hücrelerin morfolojileri üzerindeki etkilerini gözlemlemek amacı ile standart vasat MEM- α ve kondrojenik vasat içeren 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ ve 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında κ -karagenan kalabalıklaştırıcı içeren gruplar ve kontrol grupları (0 $\mu\text{g/mL}$ CRG) 3, 7, 14 ve 21. günlerde faz-kontrast mikroskobu ile görüntülendi. Hücrelerin fibroblastik morfolojilerinde bozulma veya değişim gözlenmedi.



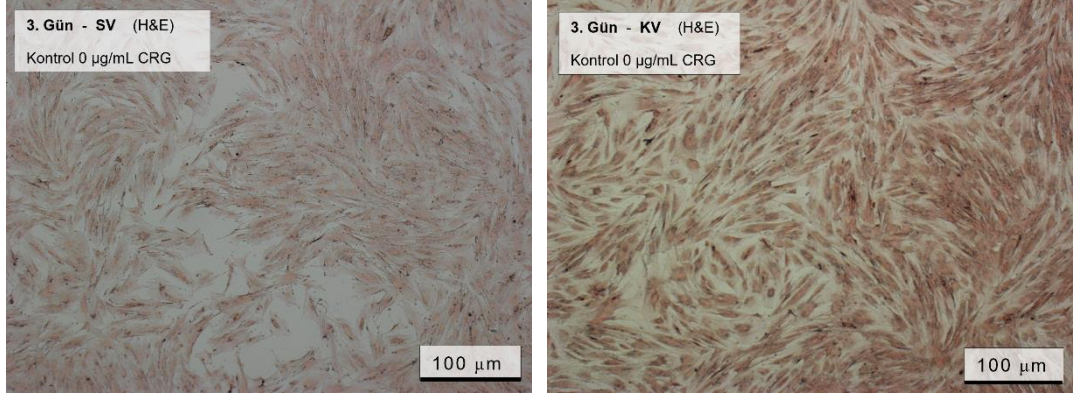


Şekil 3.7. Makromoleküler kalabalıklaştırma faz kontrast mikroskop görüntüleri. Ölçü çubukları =20 µm

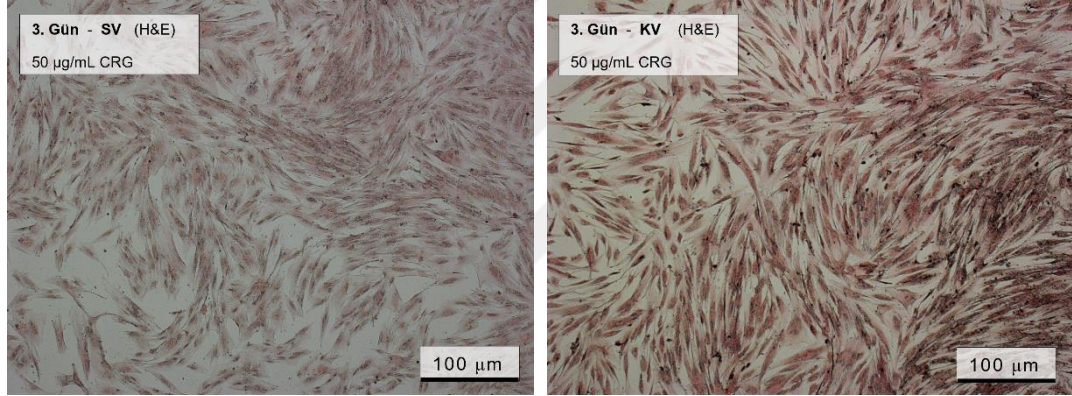
3.8. Histokimyasal Boyamalar

Makromoleküler kalabalıklaşmaya tabi tutulan gruplar arasından seçilen gruplar hücre morfolojisi için hematoksilin-eozin ve sülfatlanmış glikozaminoglikan miktarlarını belirleyebilmek için alsiyen mavisi ile boyandı. Gruplar, 3. günün kalabalıklaştırıcı içeren hem standart vasat hem de kondrojenik vasat içeren bütün grupları oldu. Aynı zamanda 7. günde hücrelerin yapısı gözlenmek istenildiği için 7. gün kontrol ve 100 µg/mL MMK içeren SV ve KV grupları boyandı. Alsiyen mavisi için ise 21. Güne ait hem standart vasat hem de kondrojenik vasat örneklerinin bütün konsantrasyonları seçildi. Örnekler ışık mikroskobu ile fotoğraflandı. Hematoksilin boyası hücrelerin çekirdeğini koyu mavi/mor renkte boyarken, sitoplazmaları ise eozin tarafından kırmızı/pembe arası bir renk ile boyaması beklenir. 3. güne ait deney gruplarının hem standart vasat hem de kondrojenik vasat ile muamele edilen grupları H&E ile boyanarak çekirdeklerinde morumsu/koyu mavi bir renk gözlemlendi. Kırmızı renk ile boyanan kısımlar sitoplazmalara ise işaret etti. 7. güne ait örneklerden 100 µg/mL CRG içeren standart vasat ve kondrojenik vasat örneklerinde de H&E boyamaları aynı şekilde mavi/mor çekirdek ve pembe sitoplazma olacak şekilde boyandı. Örneklerin hücre yapısının bozulmadı ve morfolojileri korundu.

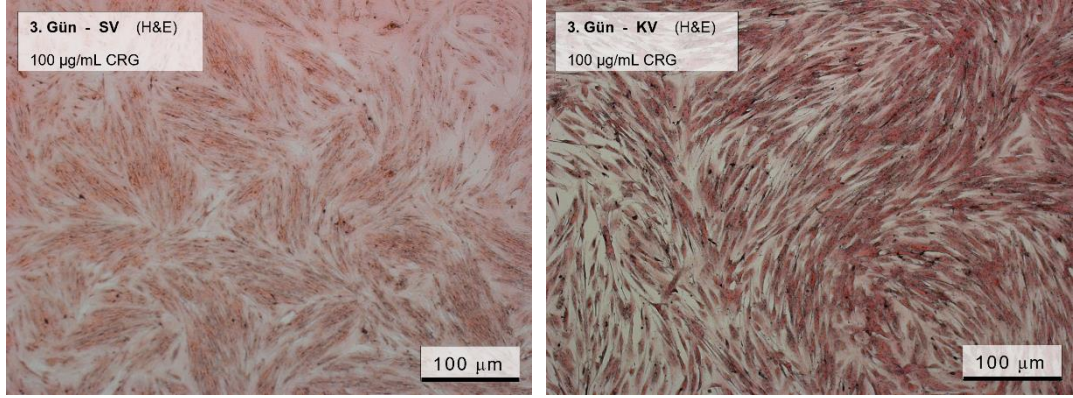
Alsiyen mavisi sGAG gruplarını yapısındaki bakır sayesinde mavi renge boyayarak hücrelerin kondrojenik farklılaşmaya gittiğine işaret eder. 21. güne ait örneklerin hepsinde sGAG birikimi belli bir oranda mavilik ile gözlemlendi. Kondrojenik vasat içeren grupların tümünde standart vasata göre daha fazla alsiyen mavisi boyaması yani mavi renk oranında daha fazla yoğunluk görüldü. Standart vasat gruplarında MMK içeren gruplarda mavilik kontrol grubuna oranla daha fazla gözlemlendi. Özellikle 250 µg/mL ve 500 µg/mL karagenan içeren deney gruplarında hem standart vasat hem de kondrojenik vasatta alsiyen mavisi diğer gruplara oranla daha fazladır. Karagenanın yoğunluğu arttırıldığı zaman alsiyen mavisinin boyadığı mavi bölgelerin arttığı, 500 µg/mL kalabalıklaştırıcı içeren grupta iyice belirginleşti ve kondrojenik vasat içeren 500 µg/mL karagenanlı grup ise deney grupları içerisinde sülfatlanmış GAG birikiminin en yoğun olduğu grup olarak gözlemlendi.



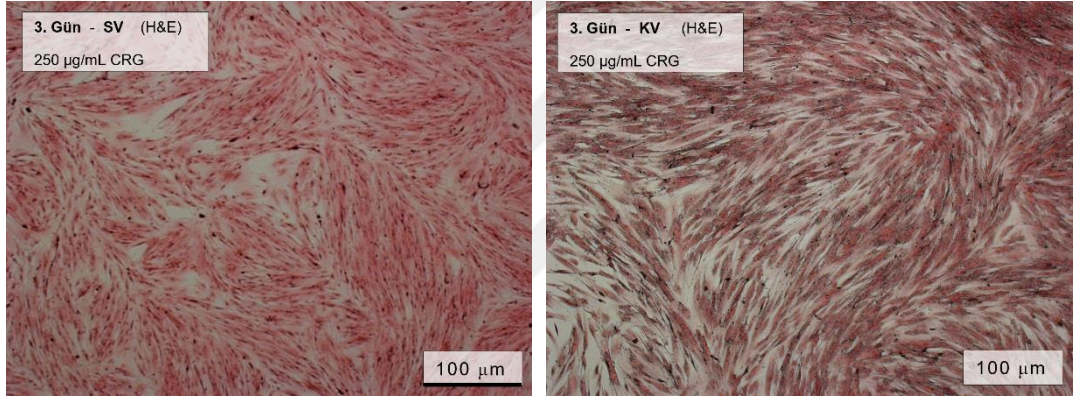
Şekil 3.8.1. AZ-MKH'lerin standart vasat (SV) ve kondrojenik vasat (KV) şartlarında 0 µg/mL CRG konsantrasyonunun 3.gün kültürlerinin H&E boyanmış ışık mikroskobu görüntüleri Ölçü çubukları= 100 µm.



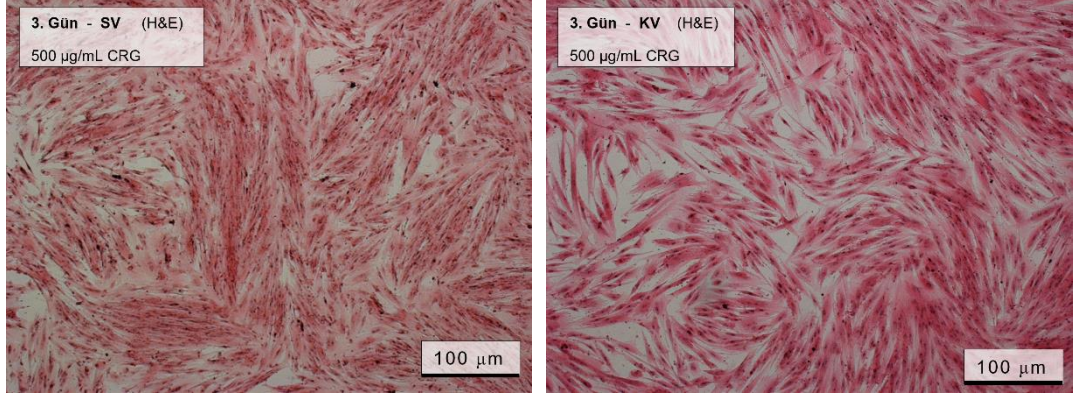
Şekil 3.8.2. AZ-MKH'lerin standart vasat (SV) ve kondrojenik vasat (KV) şartlarında 50 µg/mL CRG konsantrasyonunun 3.gün kültürlerinin H&E boyanmış ışık mikroskobu görüntüleri Ölçü çubukları= 100 µm.



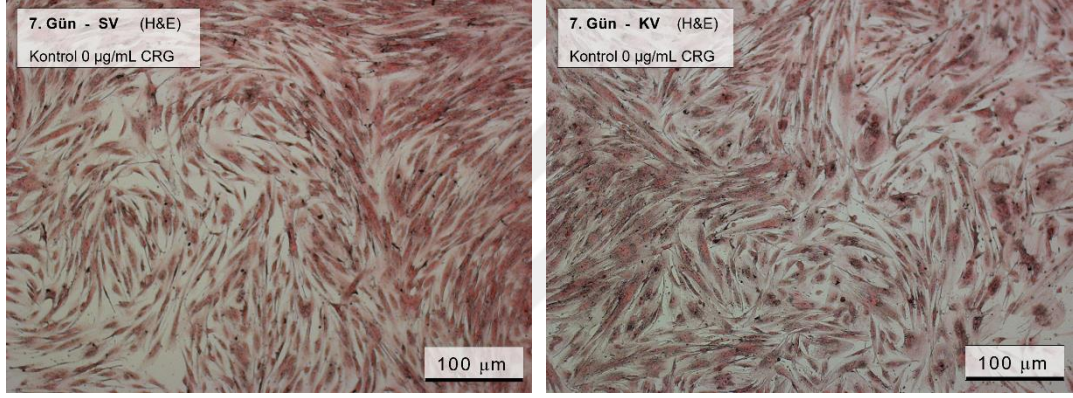
Şekil 3.8.3. AZ-MKH'lerin standart vasat (SV) ve kondrojenik vasat (KV) şartlarında 100 µg/mL CRG konsantrasyonunun 3.gün kültürlerinin H&E boyanmış ışık mikroskobu görüntüleri Ölçü çubukları= 100 µm.



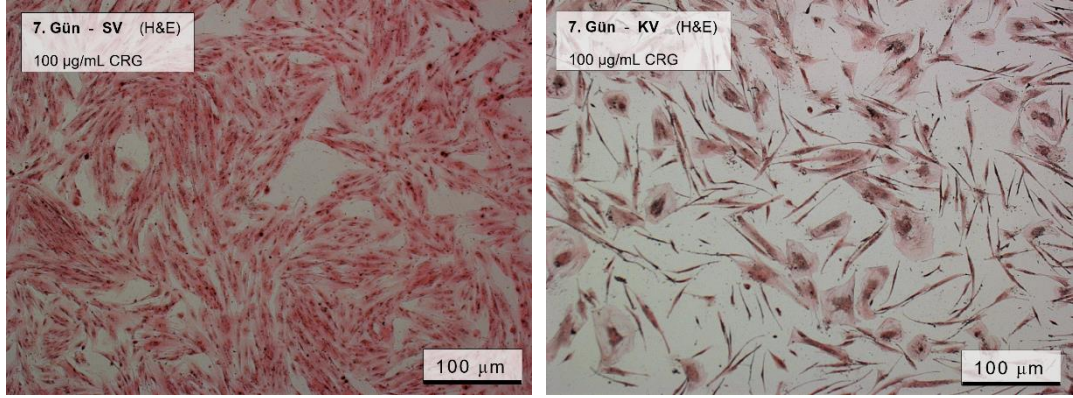
Şekil 3.8.4. AZ-MKH'lerin standart vasat (SV) ve kondrojenik vasat (KV) şartlarında 250 µg/mL CRG konsantrasyonunun 3.gün kültürlerinin H&E boyanmış ışık mikroskobu görüntüleri Ölçü çubukları= 100 µm.



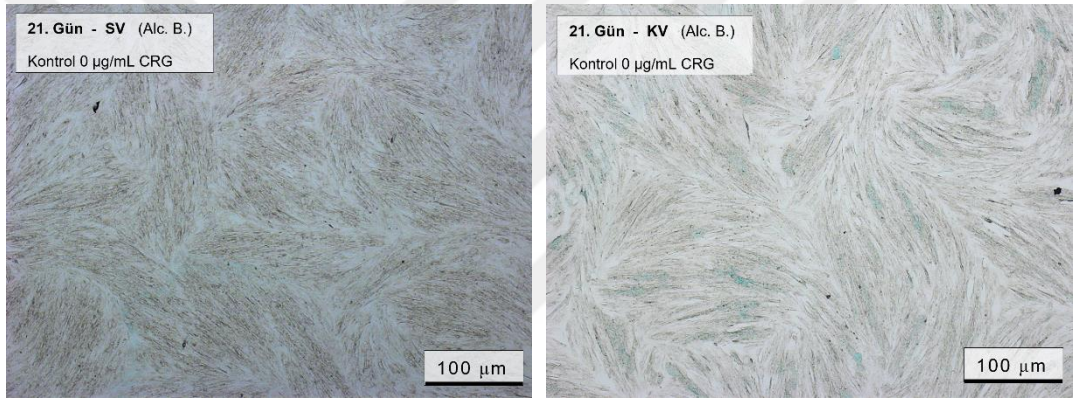
Şekil 3.8.5. AZ-MKH'lerin standart vasat (SV) ve kondrojenik vasat (KV) şartlarında 500 µg/mL CRG konsantrasyonunun 3.gün kültürlerinin H&E boyanmış ışık mikroskobu görüntüleri Ölçü çubukları= 100 µm.



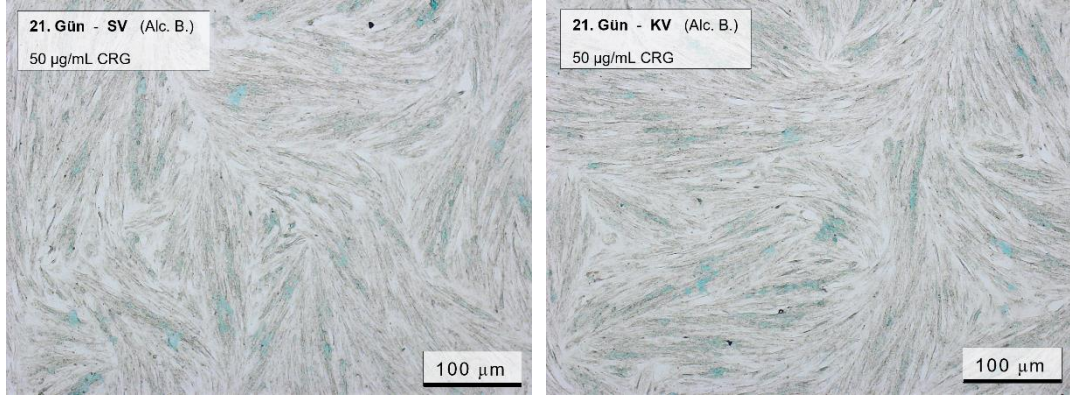
Şekil 3.8.6. AZ-MKH'lerin standart vasat (SV) ve kondrojenik vasat (KV) şartlarında 0 µg/mL CRG konsantrasyonunun 7.gün kültürlerinin H&E boyanmış ışık mikroskobu görüntüleri Ölçü çubukları= 100 µm.



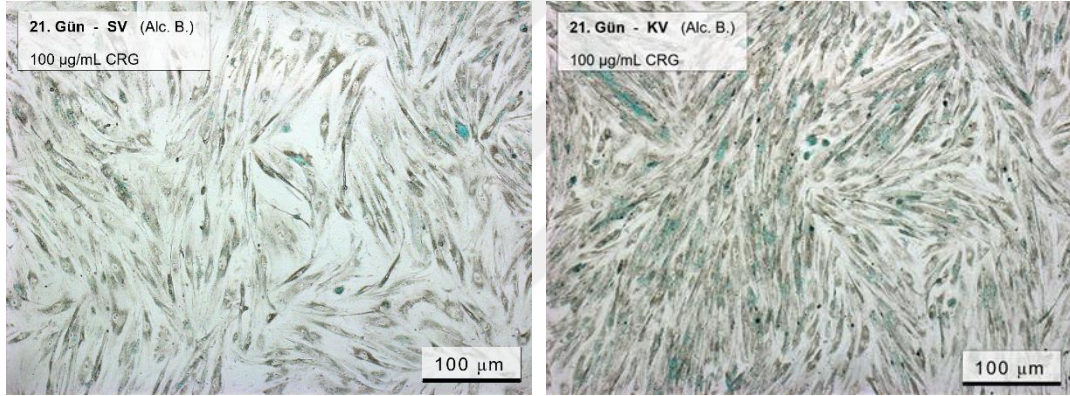
Şekil 3.8.7. AZ-MKH'lerin standart vasat (SV) ve kondrojenik vasat (KV) şartlarında 100 µg/mL CRG konsantrasyonunun 7.gün kültürlerinin H&E boyanmış ışık mikroskobu görüntüleri Ölçü çubukları= 100 µm.



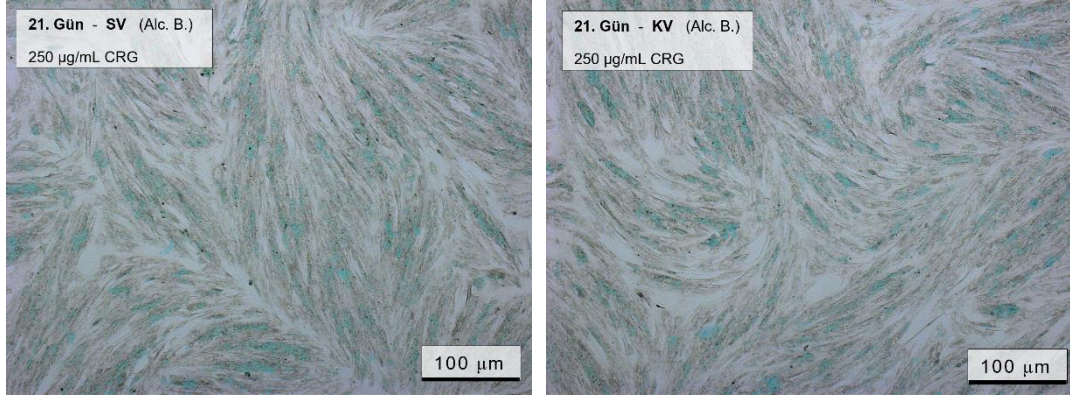
Şekil 3.8.8. AZ-MKH'lerin standart vasat (SV) ve kondrojenik vasat (KV) şartlarında 0 µg/mL CRG konsantrasyonunun 21.gün kültürlerinin alsiyen mavisi boyanmış ışık mikroskobu görüntüleri Ölçü çubukları= 100 µm.



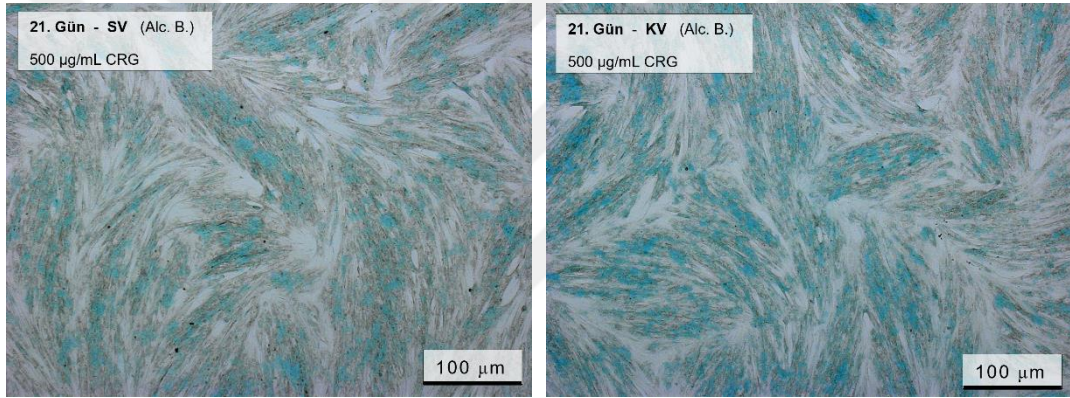
Şekil 3.8.9. AZ-MKH'lerin standart vasat (SV) ve kondrojenik vasat (KV) şartlarında 50 µg/mL CRG konsantrasyonunun 21.gün kültürlerinin alsiyen mavisi boyanmış ışık mikroskobu görüntüleri Ölçü çubukları= 100 µm.



Şekil 3.8.10. AZ-MKH'lerin standart vasat (SV) ve kondrojenik vasat (KV) şartlarında 100 µg/mL CRG konsantrasyonunun 21.gün kültürlerinin alsiyen mavisi boyanmış ışık mikroskobu görüntüleri Ölçü çubukları= 100 µm.



Şekil 3.8.11. AZ-MKH'lerin standart vasat (SV) ve kondrojenik vasat (KV) şartlarında 250 µg/mL CRG konsantrasyonunun 21.gün kültürlerinin alsiyen mavisi boyanmış ışık mikroskobu görüntüleri Ölçü çubukları= 100 µm.



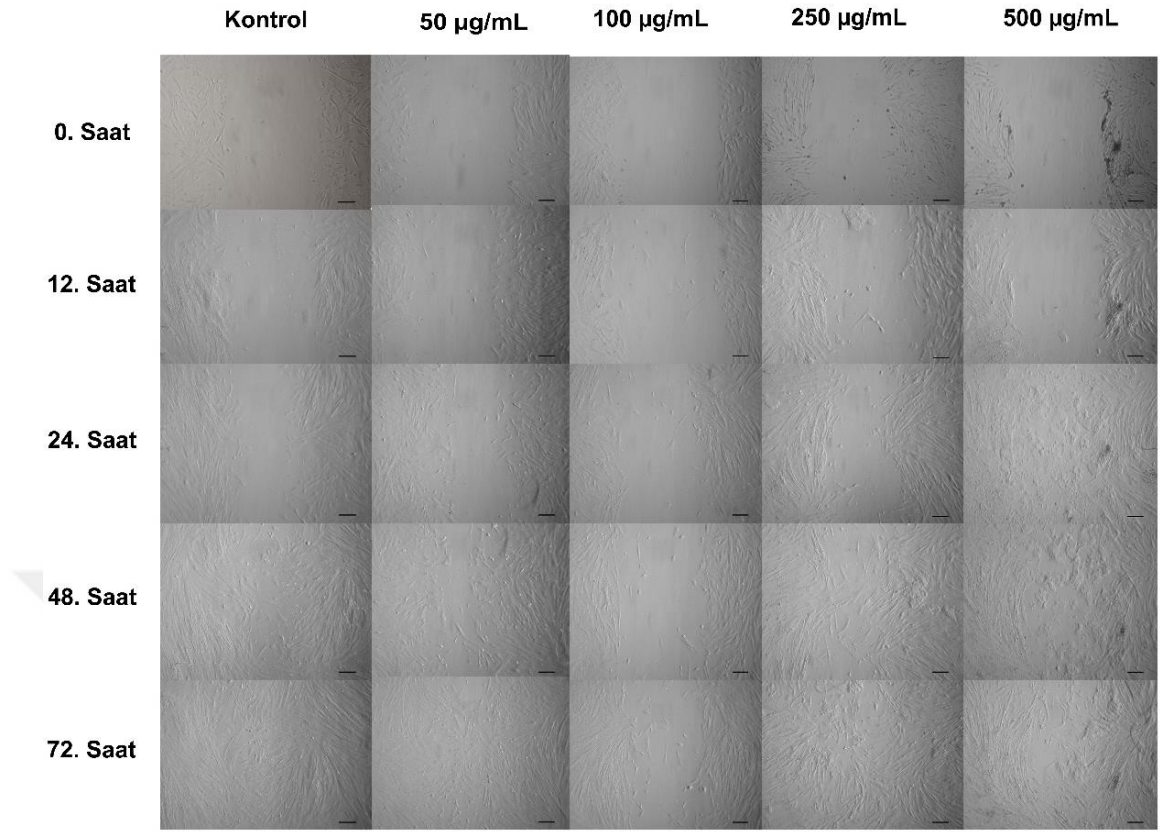
Şekil 3.8.12. AZ-MKH'lerin standart vasat (SV) ve kondrojenik vasat (KV) şartlarında 500 µg/mL CRG konsantrasyonunun 21.gün kültürlerinin alsiyen mavisi boyanmış ışık mikroskobu görüntüleri Ölçü çubukları= 100 µm.

3.9. Hücre Migrasyon Testi Bulguları

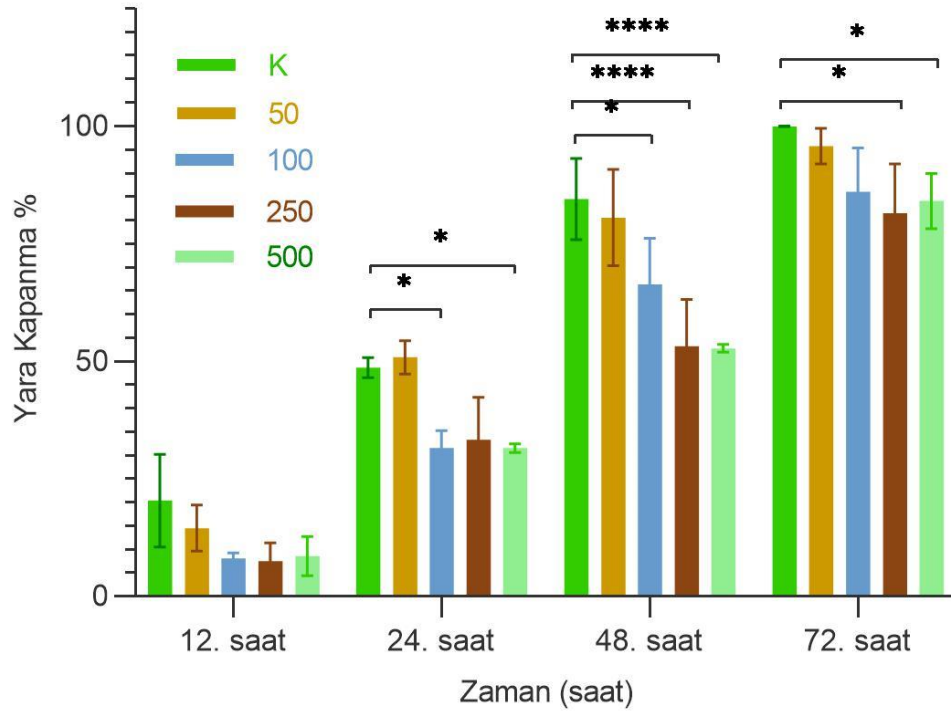
Makromoleküler kalabalıklaştırıcı konsantrasyonlarının hücrelerin davranışlarına etkilerini incelemek amacı ile migrasyon testi yapıldı. 3 tekrarlı olacak şekilde 12 kuyucuklu kültür kaplarına pasaj 2 AZ-MKH'lar ekildi. Besiyeri katkısı olarak standart vasat MEM- α 'ya 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL ve 500 µg/mL konsantrasyonlarında κ -karagenan kalabalıklaştırıcı olarak ilave edildi ve hücrelerin

kapanma hızlarını inceleyebilmek amacı ile 200 µL'lik pipet ucu ile suni yara oluşturuldu. 0. Saat, 12. Saat, 24. Saat, 48. saat ve 72. Saatlerinde faz kontrast mikroskobunda görüntülemeler yapıldı (**Şekil 3.7**). ImageJ yazılımı kullanılarak yaraların boyutlarını belirlendi ve 0. saate göre değişimleri hesaplandı, bu sonuçlar Graphpad Prism 8 kullanılarak grafiğe (**Şekil 3.7.1**) döküldü.

Buna göre, 12. Saatte kontrol (K) grubu ve MMK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p > 0,05$) bulunmadı. 24. Saate gelindiğinde ise kontrol grubu, 50 µg/mL, 250 µg/mL MMK arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yakalanmazken ($p > 0,05$), kontrol ile 100 µg/mL ve kontrol ile 500 µg/mL grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir değişim gözlemlendi. 48. Saatte gruplar arasındaki farklar artmaya başladı: K ile 50 µg/mL MMK için anlamlı bir fark gözlenemezken, K (0 µg/mL MMK) ile 100 µg/mL MMK için $p < 0,05$; K ile 250 µg/mL MMK için $p < 0,0001$ ve K ile 500 µg/mL için $p < 0,0001$ düzeylerinde anlamlı farklar bulundu. 72. Saatte ise K, 50 µg/mL MMK ve 100 µg/mL MMK arasında anlamlı bir değişim yakalanmadı, 250 µg/mL ve 500 µg/mL MMK arasında ($p < 0,05$) istatistiksel olarak fark görüldü.



Şekil 3.9.1. Migrasyon testi faz-kontrast mikroskop görüntüleri. Ölçü çubukları= 20 µm.

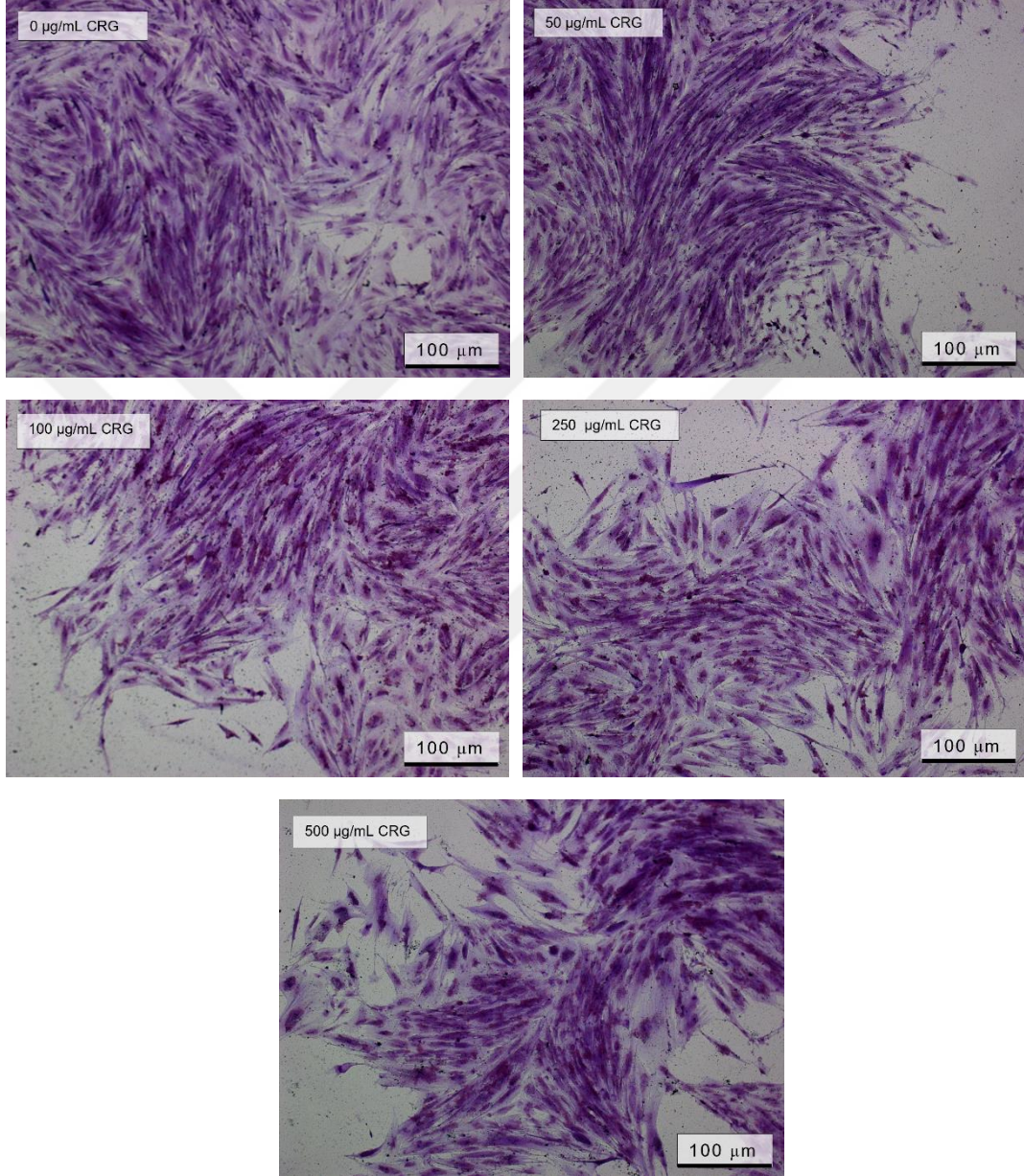


Şekil 3.9.2. Migrasyon analizi sonuçları. * İstatistiksel olarak anlamlı bir fark ifade etmektedir (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n=3$).

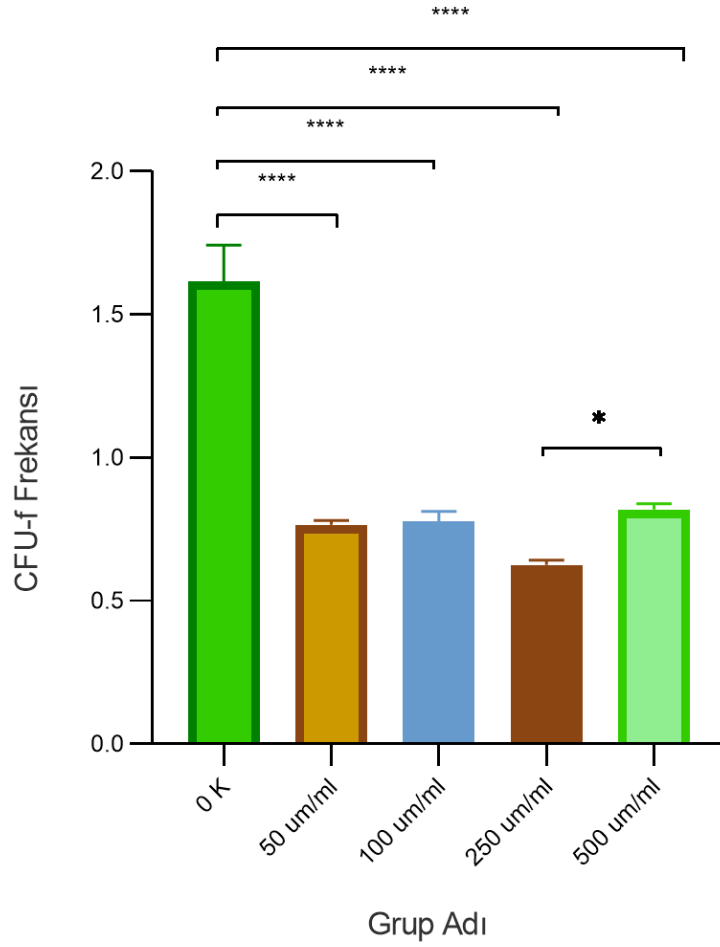
3.10. Koloni Oluşturma Birimi Analiz Bulguları

Standart vasat ile geliştirilen AZ-MKH hücreleri her kuyucukta 10.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür kaplarına 3 tekrarlı olarak ekildi. Kalabalıklaştırıcı eklenen grupların koloni oluşturma biriminin değişimini gözlemleyebilmek amacı ile CFU-f analizi yapıldı. 14. günde kristal viyole boyaması ile CFU-f sayıları incelendi. Işık mikroskobu ile fotoğraflandı. CFU-f frekansı **şekil 2.8.**'deki formüle göre hesaplandı, bunun için koloniler sayıldı, ortalaması alındı ve **Şekil 3.10.2.**'de grafiğe döküldü. **Şekil 3.10.1.**'deki ışık mikroskobu fotoğraflarında MMK içeren gruplarda kontrol grubuna göre daha az kristal viyole boyası görüldü. CFU-f frekanslarına göre hücrelere kalabalıklaştırıcı eklendiği zaman hücrelerin koloni oluşturabilme kapasiteleri büyük oranda düşerek anlamlı bir fark ($p < 0,001$) yakalandı. Karagenan konsantrasyonlarındaki değişimlerde ise 250 µg/mL MMK içeren grup, 500 µg/mL

MMK içeren gruba göre daha az koloni oluşturdu ($p < 0,05$). Diğer MMK konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark yakalanamadı. Karagenan eklenen grupların hepsinde ve kontrol grubunda koloni oluşumu gözlemlendi.



Şekil 3.10.1. CFU-f analizi sonuçları. Kontrol (0 µg/mL), 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL ve 500 µg/mL MMK içeren gruplar.



Şekil 3.10.2. CFU-f analiz sonuçları grafiği. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$, $n=3$).

3.11. Kolajen Miktarı Analiz Bulguları

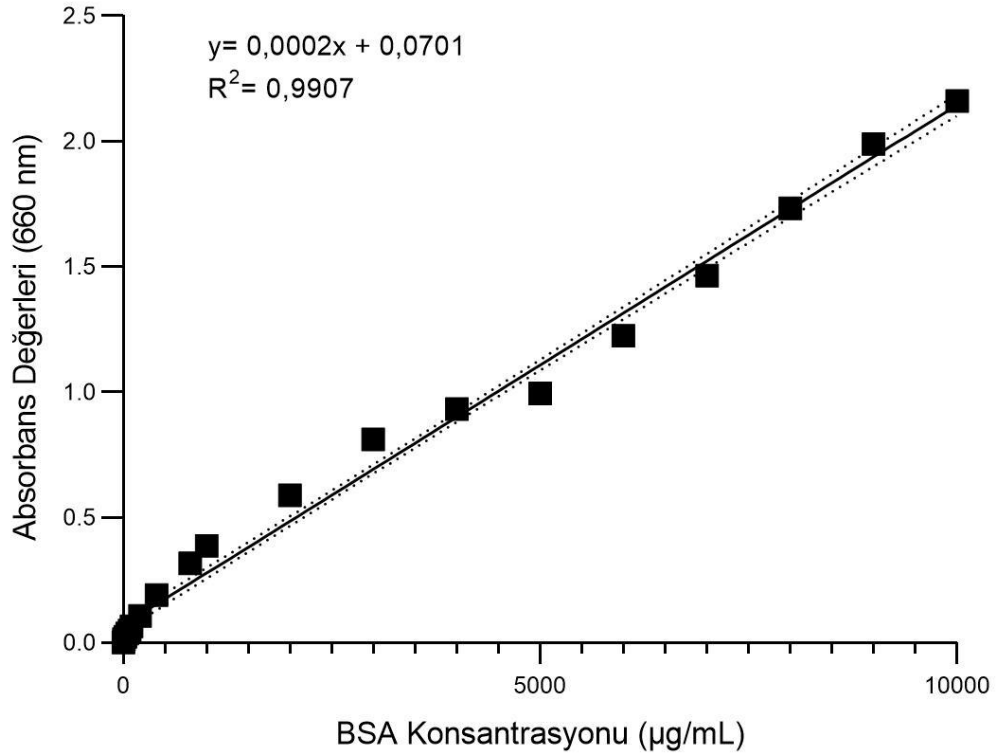
MMK uygulamasının 7, 14 ve 21. gün standart vasat ve kondrojenik vasat içeren deney gruplarının toplam protein miktarlarına ve kolajen I oranlarına olan etkisini belirleyebilmek amaçlandı. Bunun için, 10 mg/mL BSA'nın seyreltilmesi ve spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda absorbanslarının ölçülmesi ile standart eğri çizildi. Deney gruplarının toplam protein değerleri ise BSA standart eğrisine oranla belirlenerek grafiğe döküldü. Graphpad Prism 8 yazılımında tek yönlü ANOVA ve

ardından Tukey testi ile analizleri yapıldı. Toplam protein miktarları belirlendikten sonra kolajen I miktarlarının analiz edilebilmesi için SDS-PAGE analizi gerçekleştirildi. Her kuyuya 10 µg protein yüklendi. Standart olarak sıçan kuyruğundan izole edilen kolajen, ticari kolajen tip I ve geniş aralıklı protein belirteci (j449) kullanıldı. Jeller Imagelab programı ile **Şekil 3.11.3.**, **Şekil 3.11.4.** ve **Şekil 3.11.5.**'te gösterildi.

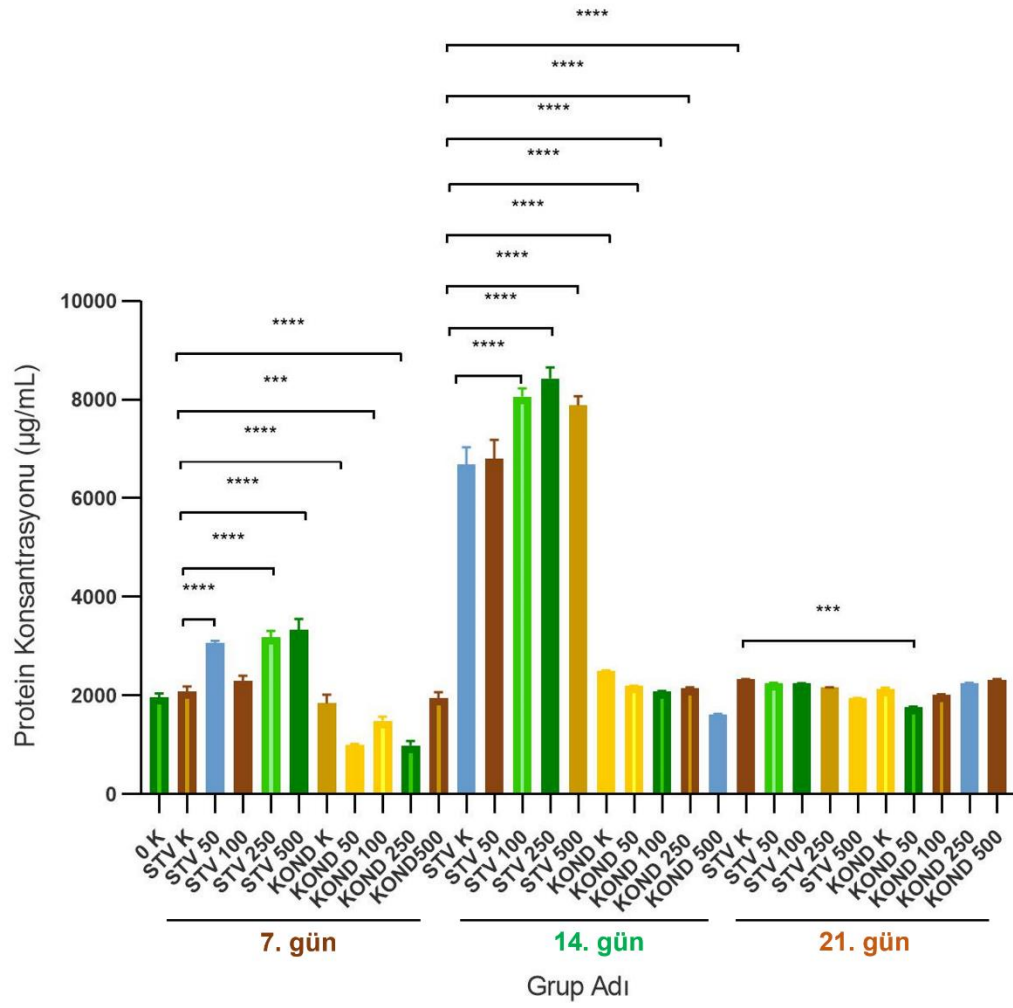
Şekil 3.11.2'de gösterilen toplam protein miktar grafiğine bakıldığında, 14. gün standart vasat ile muamele edilen örneklerin tümü, 7. ve 21. gün örneklerinin hem standart hem kondrojenik vasat içeren örneklerinden istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,0001$) düzeyde fazla protein içerdi. Bu fark kondrojenik vasat içeren 14. gün örneklerinde gözlenmedi. Gün bazında değerlendirildiğinde, 0. gün örneği ile 7. gün SV kontrol grubu arasında kayda değer bir fark görülmedi. 7. gün SV kontrol grubuna göre, makromoleküler kalabalıklaştırıcı içeren 7. gün SV 50, 250 ve 500 µg/mL ve KV 50, 250 µg/mL MMK içeren gruplar ile anlamlı olarak ($p < 0,0001$) toplam protein miktarı artışı gerçekleşti. Ayrıca kondrojenik vasat 100 µg/mL grubu da diğerlerine nazaran daha düşük miktarda olsa da ($p = 0,0002$) bir artış görüldü. 14. Gün örnekleri değerlendirildiğinde, SV kontrol grubu ile SV 50 µg/mL haricindeki tüm gruplar arasında anlamlı bir artış belirlendi ($p < 0,0001$). 21. gün örnekleri arasındaki gruplarda diğer günlere oranla makromoleküler kalabalıklaşmanın etkisi azalmış olarak görüldü: SV kontrol grubu ile anlamlı bir fark yakalanan tek grup KV 50 µg/mL ($p = 0,0007$) oldu. Toplam protein miktarları ele alındığında, 7. günde MMK gruplarının çoğunda (SV 50 µg/mL, KV 100, 500 µg/mL hariç) kontrol grubuna göre protein miktarı artarken, 14. gün standart vasatlarda gözle görünür bir artış elde edildi; fakat 14. gün kondrojenik vasat içeren grupta aynı artış yakalanmadı. 21. güne gelindiğinde örneklerde, 14. güne kıyasla toplam protein miktarlarında düşüş görüldü fakat MMK etkisi ile gruplar arasında belirgin bir fark gözlenmedi.

Kolajen I depolama miktarları 7, 14 ve 21. Günlerde hem standart hem de kondrojenik vasattaki örneklerde incelendi: **Şekil 3.11.3.**, **Şekil 3.11.4.** ve **Şekil**

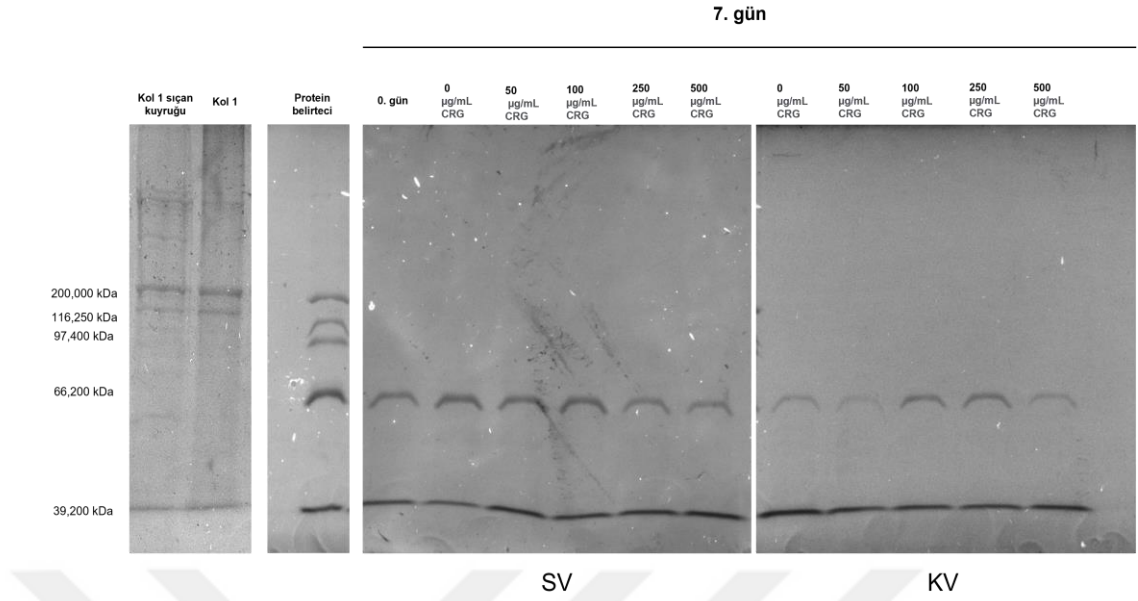
3.11.5.’te gösterilen kolajen I bantları incelendiğinde 7. Gün örneklerinin SV ve KV örneklerinde belirgin bir bant gözlenmedi. 14. Gün ve 21. Güne gelindiğinde ise grupların hepsinde kolajen bantları görüldü. En yoğun kolajen bantları standart vasat 14. Gün 500 µg/mL MMK içeren grup ve kondrojenik vasat 14. gün kontrol ve 50 µg/mL MMK gruplarında görüldü. Karagenan konsantrasyonları arasında gözle görünür bir kolajen bant yoğunluk farkı görülmedi.



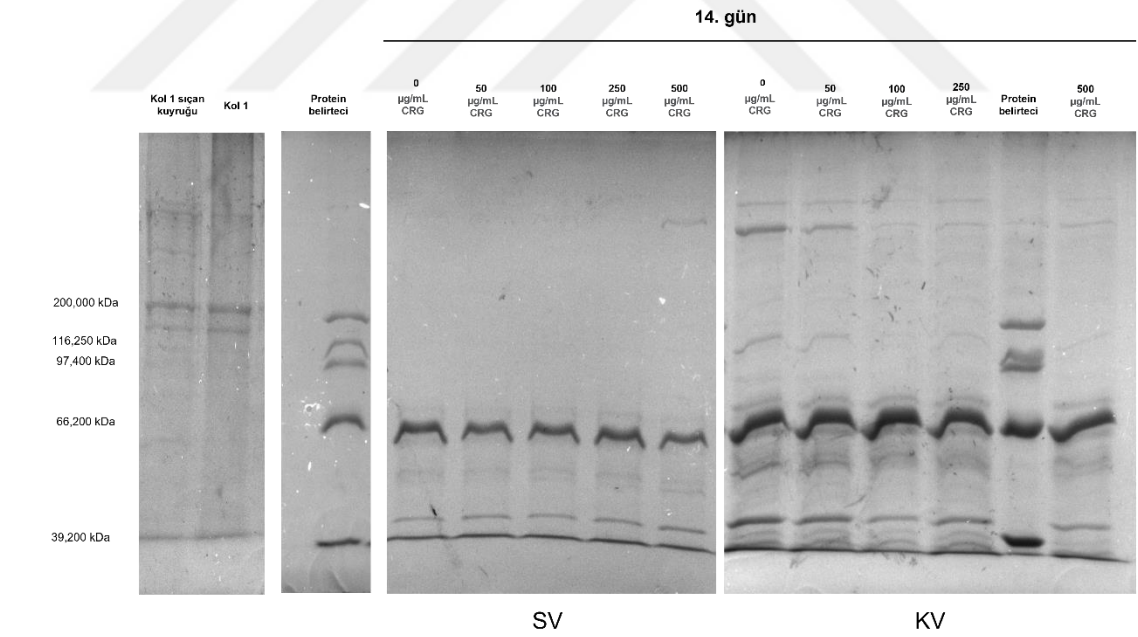
Şekil 3.11.1. BSA standart eğri grafiği



Şekil 3.11.2. Lowry Metodu ile belirlenen toplam protein miktarı sonuçları *İstatistiksel olarak anlamlı bir fark ifade etmektedir (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; $n=3$).

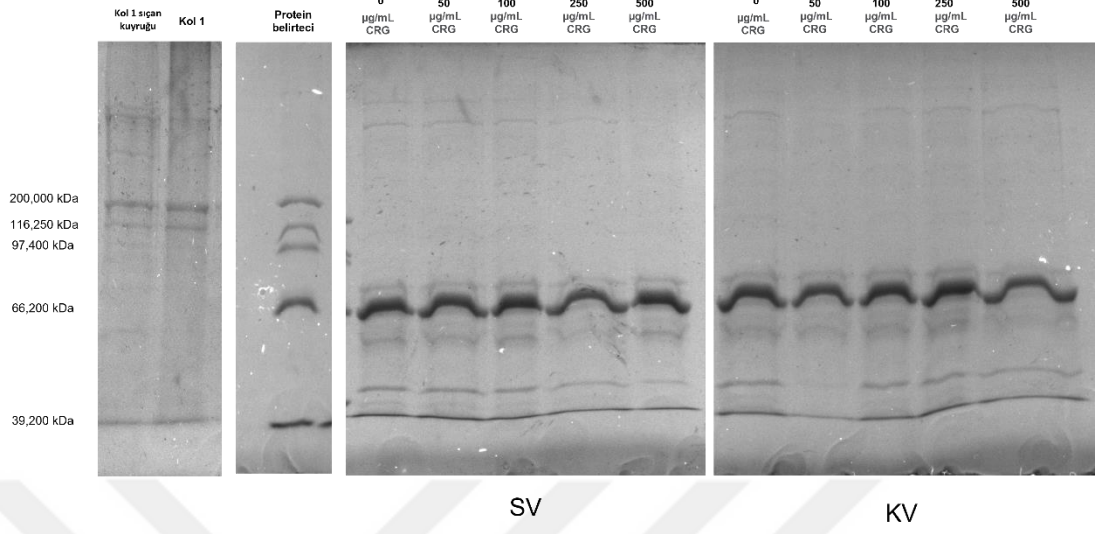


Şekil 3.11.3. SDS-PAGE 7. Gün (SV, KV) jel görüntüleri. Standart olarak sıçan kuyruğundan izole edilen kolajen 1, ticari kolajen tip 1 ve j449 geniş aralıklı protein belirteci kullanıldı. Aradaki boşluk farklı jelleri belirtmek için bırakıldı.



Şekil 3.11.4. SDS-PAGE 14. Gün (SV, KV) jel görüntüleri. Standart olarak sıçan kuyruğundan izole edilen kolajen 1, ticari kolajen tip 1 ve j449 geniş aralıklı protein belirteci kullanıldı. Aradaki boşluk farklı jelleri belirtmek için bırakıldı.

21. gün



Şekil 3.11.5 SDS-PAGE 21. Gün (SV, KV) jel görüntüleri. Standart olarak sıçan kuyruğundan izole edilen kolajen 1, ticari kolajen tip 1 ve j449 geniş aralıklı protein belirteci kullanıldı. Aradaki boşluk farklı jelleri belirtmek için bırakıldı.

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışması, kök hücre tedavilerinin önemli bir parçası olan *in vitro* hücre kültürü modellerinin kıkırdak doku mühendisliği alanındaki kullanımına katkı sağlamayı amaçlamaktadır. *In vitro* hücre kültürü modelleri, hastalıkların gelişiminin ve yapısının anlaşılması, hücre biyolojilerinin incelenmesi, mevcut ve yeni ilaçların test edilmesi, doku mühendisliği gibi alanlarda çalışmaların *in vivo* fazına geçilmesi öncesindeki bilgi birikiminin elde edilmesi için ele alınması zorunlu bir platformdur. Kritik öneme sahip olan bu modeller geleneksel yaklaşımlar ile incelendiğinde, ekstrasellüler matriksin rolü yeterince dikkate alınmadığından *in vivo* mikroçevre ile yeterince benzerlik yakalayamama gibi bir sınırlama göstermektedir. Hücreler *in vivo* şartlarda kalabalık bir ortamda büyüüp gelişmelerine rağmen, *in vitro* şartlarda bu ortam sağlanamamakta, ekstrasellüler matriks yeterli hızda gelişmemekte ve bu da hücrelerin doğal gelişim sürecini gösterememesine sebep olmaktadır. Makromoleküler kalabalıklaşma, *in vivo* hücre/doku yapısında, hiçbir makromolekülün çok fazla bulunmaması kaydı ile kalabalık bir ortam olması gerçeğine dayanır ve *in vitro* hücre kültürü ortamına etkisiz olduğu düşünülen makromoleküllerin eklenmesi ile dışlanmış hacim etkisi oluşturarak ortamı doğal mikroçevreye yaklaştırmayı amaçlar. Bu çalışmada, sezaryen doğumlarda atık olarak sınıflandırılan fakat embriyonik kök hücrelerin çoğalma hızına yakın bir çoğalma hızı gösterebilen, multipotent, immün ayrıcalıklı olan plasenta kaynaklı mezenkim kök hücreler (Li ve ark., 2012; Chamberlain ve ark., 2007; Hsu ve ark., 2011; Malek, 2012) hücre kaynağı olarak belirlenmiş ve bu hususta amniyotik membrandan izole edilen kök hücreler kullanılmıştır. Bu hücrelerin makromoleküler kalabalıklaşma ortamında kondrojenik farklılaşmaya etkileri gözlemlenmiştir. Çalışmanın ilk bölümünde, AZ-MKH'leri büyüme eğrisi, akım sitometri, koloni oluşturma potansiyeli gibi analizler ile karakterize edilmiş; çalışmanın ikinci bölümünde ise bu hücrelere iki boyutlu hücre kültürü ortamında, MMK olarak seçilen karagenan çeşitli konsantrasyonlarda ilave edilerek makromoleküler kalabalıklaşan bir ortam oluşturulmuştur. Bu ortamda standart vasat besiyeri ve kondrojenik vasat besiyeri şeklinde iki farklı büyüme ortamı hazırlanmış ve hücrelerin kondrojenik farklılaşmasındaki etkileri morfolojik inceleme,

migrasyon testi ve koloni oluşturma kapasitesi, histokimyasal boyamalar, kolajen miktarı analizleri gibi çeşitli yöntemler ile ele alınıp yorumlanmıştır.

Çalışmanın ilk bölümü üçten fazla donörden alınarak izole edilmiş ve uygun koşullarda saklanmış olan amniyotik membranların çözündürülmesi, onlardan karma (havuz) kök hücre kültürlerinin elde edilmesini ve bu kök hücrelerin karakterizasyonun yapılmasını kapsamaktadır. Amniyotik membrandan elde edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre niteliği göstermesi beklenmektedir. Mezenkimal kök hücreler plastik yüzeye yapışabilme, belli yüzey belirteçlerini tümünü veya önemli bölümünü ifade edebilme, en az üç farklı soya dönüşebilme ve kendi aralarında hücre kolonileri oluşturabilme yeteneği gibi gereklilikleri karşılamalıdır. Çalışmada hücreler doku parçalarından çoğaltılmışlardır; yani eksplant kültür yöntemi ile kök hücreler elde edilmiştir. Bu yöntem uygulanırken ilk başta minimum miktarda besiyeri eklenerek doku parçalarının yüzeye yapıştığından emin olunmuştur. Belirli zaman aralıkları ile faz kontrast mikroskopunda takibi yapılan kültür kaplarının 15. gün ve sonrasında doku parçalarının hemen yanından hücre ürettiği gözlenmiştir. Pasajlar hücreler yeterli bolluğa (~80%) ulaştıklarında sonraki pasajlara geçilmiştir. Pasajlar arasında hücre dinamiği ve morfolojik bakımdan bazı farklılıklar gözlemlenmiştir: Öncelikle ilk pasajlarda hücrelerin kap yüzeyini kaplaması çok daha uzun süreler almış, hücreler daha yuvarlak morfolojide ve küçük boyutlarda tespit edilmiştir. Pasajlar ilerledikçe, hücrelerin belirgin bir şekilde uzadıkları, boyutlarının büyüdüğü ve daha hızlı çoğalmaya başladıkları belirlenmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin özelliklerinden birisi olan iğsi yapıyı sergilemişlerdir (Brown ve ark., 2019)

AZ-MKH'ların bölünme hızlarını ve pasajlardaki davranışlarını inceleyebilmek amacıyla, büyüme eğrisi ve proliferasyon hızı analizleri gerçekleştirilmiştir. Büyüme eğrisi pasaj 2'den itibaren tripsinleme ile kaldırılan hücrelerle başlatılmış, hücrelerin büyüme döngüsünde plato fazına geldiğine kanaat getirildiğinde sonlandırılmıştır. **Şekil 3.2.**'deki eğri incelendiğinde, hücrelerin pasaj 2 ile 6 arasında daha yavaş bölündükleri, yani inkübasyon fazında oldukları, pasaj 6'dan 9'a kadar akselerasyon fazında devam ettikleri ve pasaj 9 ile 13 arasında ise logaritmik fazda oldukları görülmüştür. 13. pasajdan sonra ise plato fazında gerileme dikkat çekmiştir.

Çalışmada, AZ-MKH'lerin en verimli pasajlarının, pasaj 7 ile pasaj 13 arasında gözlemlendiği ifade edilebilir. Pasaj 13'teki yüksek orandaki artış ve pasaj 16'daki küçük azalışın ise deneysel hata payı çerçevesinde olduğu düşünülmektedir. Çalışmada AZ-MKH'lerin 5 ve 6. pasajları kullanılacak olduğundan dolayı, bu pasajlardaki çoğalma hızları proliferasyon analizi ile incelenmiştir. Proliferasyonlarındaki değişimleri izleyebilmek için, pasajlar 3, 6 ve 9. Günlerinde tripsinleme sonrası sayılarak değerlendirmeleri sağlanmıştır (Ishige ve ark., 2009). Pasaj 5 ve pasaj 6'daki hücrelerin çoğalma hızları arasında anlamlı bir fark gözlenememiştir. İki pasajda da 0 ve 3. günler arasındaki zaman aralığında daha yavaş çoğalırlarken, 3. günden sonra proliferasyon hızları artmış, 9. günde de bu hız devam etmiştir. Lange-Consiglio ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada P1, P5 ve P10 AZ-MKH'ların büyüme eğrisi oluşturulmuştur: P5'in büyümesi P1 ve P10'a göre daha hızlı gerçekleşmiştir. Alviano ve arkadaşları ise P3 AZ-MKH'lerin proliferasyonunu incelemiş ve en hızlı artışın 7. ve 15. Günler arasında olduğunu gözlemlemişlerdir. Ghasemzadeh ve arkadaşları ise, pasaj 3 AZ-MKH'lerini günlük olarak hücre sayımı ile incelemişler ve 2. Günden 5. güne hızlı bir artışı ve sonrasında plato fazına geçişi raporlamışlardır (Alviano et ve ark, 2007; Lange-Consiglio ve ark., 2013; Ghasemzadeh ve ark. 2018). Amniyotik membran ile yapılan çalışmada elde edilen kök hücrelerin farklı donörlerden ve farklı yöntemler ile izole edilip saklandığı göz önüne alındığında çalışmalarda kullanılan hücrelerin büyüme hızları ve davranışlarının aynı olmaması anlaşılabilmektedir. Literatürde yer alan diğer çalışmalarda da pasaj 5, pasaj 6'daki hücrelerin bulunduğu zaman noktalarında büyüme hızlarından yola çıkılarak pasajların verimliliği göz önüne serilmiştir. Bu tez çalışmasında, makromoleküler kalabalıklaştırıcı etkilerinin AZ-MKH'lerin hücreler yaşlanmadan, multipotent özellikleri gösterirken ve erken pasajlarında gözlenmek istenmesinden dolayı deneyler için pasaj 5 ve pasaj 6 hücrelerinin uygun olacağı düşünülmüş ve bu grup hücreler ile çalışmalar sürdürülmüştür.

Mezenkimal kök hücre özelliğine sahip olduğu kabul edilen hücrelerin üç farklı soya farklılaşabilmesi beklenmektedir. Elde edilen hücrelerde bu özelliği gösterebilmek amacıyla, AZ-MKH hücreleri osteojenik, adipojenik ve kondrojenik olmak üzere üç farklı hücre soyuna yönelik farklılaştırılmıştır. Osteojenik farklılaşma

21 gün boyunca takip edilerek alizarin kırmızı ise boyanan hücreler ile belirlenmiştir. Hücrelerin ışık mikroskopunda incelenmesi sonucunda katyonik kalsiyuma bağlanan bir histokimyasal boya olan alizarin kırmızısı yardımı ile kalsiyum birikimleri gözlenmiştir. Osteojenik farklılaşmayı gösterebilmek adına aynı zamanda 21 günün sonunda von Kossa boyaması ile kalsifiye olmuş alanlar gösterilerek osteojenik farklılaşmaya gidildiği tekrar gösterilmiştir. **Şekil 3.4.1.**'de oklarla işaretlenen alanlar kalsiyum birikimlerine işaret etmektedir. Adipojenik farklılaşma ise 21 günlük bir zamanda incelenmiş ve lipit içeren vaküoller Oil Red O boyanmasından sonraki görüntülenmesi ile kırmızı/turuncu renk ile tespit edilmiştir. Kondrojenik farklılaşma için daha uzun süreli (35 gün) mikrokütle kültürü hazırlanmış, süre sonunda ise kesiti alınarak alsiyen mavisi ile boyanmıştır. Alsiyen mavisi boyaması sonucunda kıkırdak proteoglikanları mavi renk ile boyanarak gözlenmiştir, bu da kondrojenik farklılaşma esnasında gerçekleşen sGAG birikiminin başarı ile sağlandığını göstermektedir. Sonuçların literatür ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Díaz-Prado, Muiños-López, Hermida-Gómez, Rendal-vázquez, ve ark. 2010; Lange-Consiglio ve ark., 2013b; Ma ve ark., 2019).

Akım sitometri analizi, hücrelerin ölçümlerinin bir sıvı içerisinde ilerlerken yapılması temeline dayanmaktadır. Bu yöntem kullanılarak hücrelerin DNA, RNA içeriği, boyutları, apoptoza uğrama durumları gibi birçok özelliği belirlenebilir. Bu çalışmada akım sitometri hücrelerin immünofenotipik özelliklerine ışık tutmuştur. Akış halinde iken ayrılan ve amaca uygun spesifik olarak florokoromlar ile işaretlenen hücreler Beckman Coulter Navios FCM cihazı lazerlerinin önünden geçerken bu floresan ışımalara göre ayrılarak sayısal veriler haline dönüştürülür. Elde edilen mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonunu destekleyeceği için seçilen antijenler, literatürde tanımlanmış bulunan MKH belirteçleri olan CD29 (99,67%), CD105 (99,35%), CD90 (99,90%) ve CD73 (99,82%)'ü kapsamaktadır ve bu belirteçlerin %99'un üzerinde ifade edildikleri, sonuç olarak çalışmada kullanılan hücrelerin MKH karakterini isptlamaktadır (Díaz-Prado ve ark., 2010, Nogami ve ark.,2012). Ayrıca, hücrelerin beklendiği şekilde hematopoetik kök hücre belirteçlerinden CD34'ü (0,52%), CD31'i (0,61%) ve CD133'ü (0,61%) ifade etmedikleri belirlenmiştir (He ve ark., 2020; Koike ve ark., 2014). HLA-DR (insan lökosit antijeni- antijen D ilintili)

(2,09%) yüzey belirtecinin çok düşük düzeyde ifade edilmesi ise, AZ-MKH'lerin klinik çalışmalar için büyük bir risk taşımadığının bir işareti olabilir (Ma ve ark., 2019).

Hücrelerin ekildikleri yüzeyde belirli bir süre sonra koloni oluşturabilmeleri onların hayatta kalabilme ve bölünerek kendilerini yenileyebilme özelliklerini gösterir. Bir koloni en az 50 hücreden meydana gelir. Yapılan deneyde farklı hücre yoğunluklarındaki AZ-MKH'lerin koloni sayıları, kristal viyole boyası ile boyanarak karşılaştırılmıştır. Literatürde raporlandığı gibi, AZ-MKH'lerin incelenen her üç yoğunluğunda da koloniler gözlenmiştir (Lange-Consiglio ve ark. 2013; Ma ve ark., 2019). Hücre sayısı arttıkça koloni sayısında da doğru orantılı bir artış görülmüştür.

Çalışmanın ikinci kısmında karakterizasyonu tamamlanan amniyotik membran mezenkimal kök hücrelerinin makromoleküler kalabalıklaşma etkisi ile kondrojenik farklılaşması incelenmiştir. Kalabalıklaştırıcı olarak negatif yüke sahip ve sülfatlanmış bir polisakkarit olan karagenan tercih edilmiştir. Karagenanın alt türleri arasından ise κ -karagenan doku mühendisliği çalışmalarında kullanılması, besiyeri katkısı olmaya uygun bir aday olması nedeniyle literatür ile uyumlu olarak seçilmiştir (De Pieri ve ark., 2020). 2B hücre kültürüne besiyeri katkısı olarak 0 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ ve 500 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde eklenmiştir. Konsantrasyonlar, farklı MMK oranlarının ön denemelerde uygulanması sonrasında hücreler ile olan etkileşimlerine göre belirlenmiştir (Gaspar ve ark., 2019). Bir grup standart vasat ile diğeri ise kondrojenik vasat ile muamele edilmiş ve etkileri belirlemek amacıyla morfolojik inceleme, migrasyon durumu, koloni oluşturabilme analizi, histokimyasal boyamalar, kolajen miktar analizleri yapılmıştır.

Makromoleküler kalabalıklaşmanın hücrenin davranışlarına etkilerini incelemek amacıyla, faz kontrast mikroskobu ile düzenli görüntülemeler, yara iyileşmesi testi olarak da adlandırılan migrasyon testi ve koloni oluşturabilme analizi gerçekleştirilmiştir: Standart ve kondrojenik vasat içeren, **Çizelge 2.6.1.**'de ayrıntılandırılan deney gruplarının faz kontrast mikrografları, literatür ile uyumlu

olarak MMK varlığının hücrelerin morfolojisine belirgin bir etkisinin olmadığı ve hücrelerin işi yapılarını korudukları görülmüştür (Kumar ve ark. 2015, Gaspar ve ark. 2019, Graceffa ve Zeugolis 2019). Migrasyon analizinde ise, AZ-MKH'ler bulundukları kültür kap zemininin %80-90'ını doldurdıkları zaman 200 µL'lik pipet ucu ile oluşturulan suni yaranın (çiziğin) kapanma hızının değişimini standart vasat içeren deney gruplarında (kontrol, 50, 100, 250 ve 500 µg/mL MMK) gözlemleyebilmek için karagenan besiyerine ilave edilmiş ve bu an 0. saat olarak kabul edilmiştir. Göç etme süreleri ise 0, 12, 24, 48 ve 72. Saatlerdeki ölçümlere göre karşılaştırılmıştır. 0. Saatte çizikteki açıklığın fotoğrafının çekildiği noktalar işaretlenmiş ve her bir zaman noktasında grupların aynı noktadan fotoğrafları alınarak alan karşılaştırılması yapılmıştır. 0. Saatteki açıklık alanı %100 kabul edilmiş ve diğer zaman noktalarındaki alanların oranları ise 0. Saatteki açıklıktaki değişime oranlanarak belirlenmiştir. Alanların doğru şekilde belirlenebilmesi için, bölüm 2.7.'de ayrıntılandırılan şekilde ImageJ programı ile hesaplanmış, ardından Graphpad Prism 8 programında tek yönlü ANOVA ve Tukey testi ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre, 12. Saatte kontrol (K) grubu ve MMK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p > 0,05$) bulunamamıştır. 24. Saate gelindiğinde ise kontrol grubu, 50 µg/mL, 250 µg/mL MMK arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yakalanmazken ($p > 0,05$), kontrol ile 100 µg/mL ve kontrol ile 500 µg/mL grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir değişim gözlemlenmiştir. 48. Saate gelindiğinde ise gruplar arasındaki farklar artmaya başlamıştır: K ile 50 µg/mL MMK için anlamlı bir fark gözlenemezken, K (0 µg/mL MMK) ile 100 µg/mL MMK için $p < 0,05$; K ile 250 µg/mL MMK için $p < 0,0001$ ve K ile 500 µg/mL için $p < 0,0001$ düzeylerinde anlamlı farklar bulunmuştur. 72. Saatte ise K, 50 µg/mL MMK ve 100 µg/mL MMK arasında anlamlı bir değişim yakalanmazken, 250 µg/mL ve 500 µg/mL MMK ($p < 0,05$) istatistiksel olarak fark göstermiştir. Sonuçların tamamı incelendiğinde, makromoleküler kalabalıklaşma besiyeri bulunmayan grupta migrasyonun en hızlı olduğu, makromoleküler kalabalıklaştırıcı miktarının artmasıyla migrasyon hızının düştüğü görülmüştür. Başlangıç anından sonra 24. Saatte farklar bulunmasına karşın, en büyük değişimler 48. Saatte gerçekleşmiştir. 78. Saate gelindiğinde kontrol grubu migrasyonunu (yara kapanma hali) tamamlarken 50 µg/mL ve 100 µg/mL MMK olan gruplarda nerede ise bu gruba yetişmiştir. Literatür

incelendiğinde, MMK ile migrasyonun farklı sonuçlar gösterdiği çalışmalar olduğu görülmektedir: Zeiger ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan çalışma, 62,5 mg/mL fikor kalabalıklaştırıcı MKH'lere eklenerek gerçekleştirilmiş ve MMK bulunan grubun daha yavaş migrasyon gerçekleştirdiği ($p < 0,001$) göstermiştir. Başka bir çalışmada ise (De Pieri ve ark. 2022), adipoz kökenli MKH'lere 50 µg/mL karagenan eklenmiş ve ilk 24 saatte MMK olan grubun kontrole kıyasla daha hızlı kapandığı ($p < 0,05$), 48. Saatte ise eşitlenerek bütün yaranın (çiziğin) kapandığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, migrasyon deneyi için özel olarak tasarlanan ve ortasında boşluğu bulunan hücre kültür kapları ile yapılan deneyde ise, MMK bulunmayan grupta (kontrol) oluşturulan çiziğin 48. ve 72. Saatte ($p < 0,05$) daha hızlı kapandığı gözlenmiştir. De Pieri ve ekibinin çalışmasında el ile oluşturulan deney grubunda kontrol grubu 24 saat içerisinde kapanırken otomatize edilmiş bir yöntem kullandıklarında MMK'nın yara kapanma hızını düşürdüğünü kaydetmişlerdir. Sonuç olarak hem bu tez çalışmasında hem de diğer kaynaklarda kalabalıklaştırıcı eklendiği zaman migrasyon hızının düştüğü sonuçlar kaydedilmiştir. Migrasyon hızının düşmesi ise kalabalıklaşan ortamda ECM miktarının da artması ile hücrelerin göç etmesinin zorlaştığı düşünülmektedir. Sonuçlarda belirlenen kapanma hızı farklılıklarının ise, hücre tipinden, kalabalıklaştırıcı çeşidinden, kullanılan kalabalıklaştırıcı konsantrasyonundan veya uygulanan protokollerdeki küçük farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kalabalıklaştırılan ortamlardaki hücrelerin verecekleri tepkiyi gözlemlemek amacı ile yapılan başka bir deney ise deney gruplarının koloni oluşturabilme potansiyellerini incelemek için yapılmıştır. Standart vasat ile büyütülen hücreler her kuyucukta 10.000 hücre olacak şekilde ekildikten sonra 0 µg/mL (kontrol), 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL ve 500 µg/mL karagenan içeriği ile 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda ışık mikroskopunda görüntülemeler yapılarak ve CFU-f frekansı hesaplanarak analizleri yapılmıştır. Bu analizlere göre kalabalıklaştırıcı eklendiği zaman hücrelerin koloni oluşturabilme kapasiteleri büyük oranda düşerek anlamlı bir fark ($p < 0,001$) yaratmıştır. Karagenan konsantrasyonlarındaki değişimlerde ise 250 µg/mL MMK içeren grup, 500 µg/mL MMK içeren gruba göre daha az koloni oluşturmuştur ($p < 0,05$). Fakat diğer konsantrasyonlar arasında

anlamalı bir fark yakalanamamıştır. Karagenan eklenen grupların hepsinde koloni oluşumu gözlenmiştir, bu da makromoleküler kalabalık ortamda hücrelerin kendini yenileyebilmeye devam ettiğini göstermektedir. Kristal viyole boyası yardımıyla gözlenen hücreler ve oluşturdıkları koloniler incelendiğinde hepsinde hücreler iğsi yapılarını koruyabilmekte ve çoğalmaya devam edebilmektedirler. Literatürde kemik iliği MKH hücreleri ve fikal kokteyli uygulanarak yapılan bir CFU-f deneyinde MMK eklendiği zaman koloni oluşturma kapasitelerinde artış görüldüğü raporlanmıştır (Hui Li ve Celeste Loe, 2010). Fikal ve Perkal kullanılan ve osteojenik farklılaşmanın incelendiği başka bir çalışmada ise Fikal eklenen grubun koloni oluşturma kapasitesinin Perkal eklenen gruba göre anlamalı bir şekilde ($p < 0,01$) daha fazla olduğu bulunmuştur (Chang ve ark., 2009). Çalışma hücre kültürüne eklenen molekülün her birinin farklı etkiler yaratabileceğini göstermektedir. Gronthos ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada, kemik iliği hücreleri farklı ekstrasellüler matriks glikoproteinleri (kolajen I, kolajen III, kolajen IV, fibronektin, laminin, vitronektin) ile kaplanarak koloni oluşturma kapasiteleri hakkında yorumlamalarda bulunmuşlardır. Çalışmada kontrol grubu olarak %20 FBS içeren hücre grubu kullanılmıştır. Kontrole göre değerlendirildiğinde laminin ile kaplanan grubun kontrolden fazla olduğu fakat kolajen I ve kolajen III ile kaplanan gruplarda anlamalı derecede ($p < 0,05$) az koloni oluşturduğu gözlenmiştir (Gronthos ve ark., 2001). Herhangi bir etki uygulanmayan grupla diğer çalışmada olduğu gibi farklar bulunmuştur. Bu sonuçların farklılığının hücre tipi, deney düzeneği ve kalabalıklaştırıcı farklılığı gibi faktörlerle açıklanabileceği düşünülmektedir. Karagenanın koloni oluşturma kapasitesini azalttığı ama konsantrasyonlarının arasında belirgin bir fark olmadığı görülmüştür. Makromoleküler kalabalıklaşmanın hücrelerin davranışına genel etkileri incelendiğinde morfolojilerinde gözle görülür bir değişim yaratmamasına rağmen hem hücrelerin göç etme hızını hem de koloni oluşturma kapasitelerini azaltmıştıgı gözlenmiştir.

Histokimyasal analizler için hematoksilin-eozin ve alsiyen mavisi boyaları tezin amacına uygun olması açısından seçilmiş ve hem kontrol hem de makromoleküler kalabalıklaştırıcı içeren deney grupları (**çizelge 2.6.1.**) boyanmıştır. Hematoksilin boyası hücrelerin çekirdeğini koyu mavi/mor renkte boyarken, sitoplazmaları ise eozin

tarafından kırmızı/pembe arası bir renk ile boyanmıştır. 3. güne ait deney gruplarının hem standart vasat hem de kondrojenik vasat ile muamele edilen grupları başarılı bir şekilde H&E ile boyanmıştır: Çekirdeklerinde morumsu/koyu mavi bir renk gözlenirken, kırmızı rengi boyanan kısımlar sitoplazmalara işaret etmektedir. 7. güne ait örneklerden 100 µg/mL CRG içeren standart vasat ve kondrojenik vasat örneklerinde de H&E boyamaları aynı şekilde başarı ile sürdürülmüştür, bu da örneklerin hücre yapısının bozulmadığına ve morfolojilerinin korunduğuna işaret edebilmektedir. Literatürde, 50 µg/mL askorbik asit uygulanan mezenkimal kök hücrelerin ECM üretimi için kullanılması amacı ile yapılan bir çalışmada da hematoksilin ve eozin uygulanmış ve 10. Gün örnekleri dahil çekirdek ve sitoplazmaları gösterilebilmiştir (Kittaka ve ark., 2015). Bununla beraber mezenkimal kök hücrelerin hücre kültürüne başka bir makromolekül katıldığında H&E boyamasının başarılı bir şekilde yapılabildiği desteklenmiştir. Alsiyen mavisi, ekstrasellüler matrikste bulunan proteoglikanlara bağlanabilen ve sülfatlanmış GAG'ları mavi renge boyayarak birikimlerini gösteren bir boyadır. Boya suda çözünebilen ve katyonik yapı gösteren şekildedir, kondrojenik farklılaşmanın gösterilmesinde alsiyen mavisi tercih edilmektedir. Deney gruplarının 21. gün örneklerinin hem standart vasat hem de kondrojenik vasat ile geliştirilen grupları, bütün kalabalıklaştırıcı konsantrasyonları ile birlikte alsiyen mavisi ile boyanmıştır. Kondrojenik vasat içeren grupların tümünde standart vasata göre daha fazla alsiyen mavisi boyaması yani mavi renk oranında daha fazla yoğunluk gözlenmiştir. Standart vasat gruplarında MMK içeren gruplarda mavilik daha fazla görülmektedir. Özellikle 250 µg/mL ve 500 µg/mL karagenan içeren deney gruplarında hem standart vasat hem de kondrojenik vasatta alsiyen mavisi ile daha yoğun olarak gözlenmiştir. Karagenanın yoğunluğu arttırıldığı zaman alsiyen mavisinin boyadığı mavi bölgelerin arttığı 500 µg/mL kalabalıklaştırıcı içeren grupta iyice belirginleşmiştir, kondrojenik vasata sahip olan 500 µg/mL karagenan içeren grup ise deney grupları içerisinde sülfatlanmış GAG birikiminin en yoğun olduğu grup olarak karşımıza çıkmaktadır. Karagenanın makromoleküler kalabalıklaştırıcı olarak diğer polisakkaritler ile karşılaştırıldığı bir literatürde de alsiyen mavisi ile boyama sonucunda MMK'nın sGAG miktarını arttırdığı gözlenmiştir (De Pieri ve ark., 2020). Buna karşıt olarak, Patrioski ve arkadaşlarının adipoz MKH kullandıkları çalışmalarında alsiyen mavisi boyamalarının

standart vasatta daha belirgin olduğu raporlanmıştır (2017). Alsiyen mavisi analizlerinden yola çıkarak MMK'nın sGAG birikimini arttırdığı ve De Piere ve arkadaşlarının çalışmaları ile uyumlu olduğu, Patrioski ve arkadaşları ise çalışmalarında standart vasatta daha fazla birikim gördüğünden dolayı ise onlarla çeliştiği görülmektedir. Bu farklılıkların deney tasarımına, kullanılan kalabalıklaştırıcı türüne ve konsantrasyonuna, hücre tipine, alsiyen mavisi boyama protokolüne göre değişim gösterebileceği düşünülmektedir. Histokimyasal analizlere bakıldığında hücrelerin genel yapısının sağlıklı bir şekilde devam ettiği ve kondrojenik farklılaşmaya işaret edebilen sGAG birikiminin başarı ile gerçekleştiği görülmüştür.

Kıkırdak yapısının önemli bir kısmını oluşturan (~%90) ekstrasellüler matriks elemanlarından olan proteinlerin artışı gözlemleyebilmek, hücrelerin kondrojenik farklılaşmasındaki değişimleri anlamlandırabilmek ve makromoleküler kalabalıklaşmanın deney grubuna etkilerini gözlemlemek açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle tez çalışmasında deney grubunun 7, 14 ve 21. Gün örnekleri seçilerek öncesinde toplam protein analizi, ardından SDS-PAGE yöntemi kullanılarak kolajen miktarı analizleri gerçekleştirilmiştir. Toplam protein miktarını belirlemek için BSA dilüsyonları oluşturulmuş, Lowry yöntemi ile spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda okumaları yapılarak absorbans değerleri belirlenmiştir. Deney gruplarının toplam protein miktarı standart eğriye oranla hesaplanarak kaydedilmiştir. Graphpad Prism 8 yazılımında tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey testi ile analizleri yapılmıştır. Buna göre, 14. gün standart vasat ile muamele edilen örneklerin tümü, 7. ve 21. gün örneklerinin hem standart hem kondrojenik vasat içeren örneklerinden istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,0001$) düzeyde fazla protein içermektedir. Diğer yandan bu fark kondrojenik vasat içeren 14. gün örneklerinde gözlenmemiştir. Gün bazında değerlendirildiğinde, 0. gün örneği ile 7. gün SV kontrol grubu arasında kayda değer bir fark gözlenmemiştir. 7. gün SV kontrol grubuna göre, makromoleküler kalabalıklaştırıcı içeren 7. gün SV 50, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ ve KV 50, 250 $\mu\text{g/mL}$ MMK içeren gruplar ile anlamlı olarak ($p < 0,0001$) toplam protein miktarı artışı gerçekleşmiştir. Ayrıca kondrojenik vasat 100 $\mu\text{g/mL}$ grubu da diğerlerine nazaran daha düşük miktarda olsa da ($p = 0,0002$) bir artış göstermiştir. 14. Gün örnekleri değerlendirildiğinde, SV kontrol grubu ile SV 50 $\mu\text{g/mL}$ haricindeki tüm gruplar

arasında anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p < 0,0001$). 21. gün örnekleri arasındaki gruplarda diğer günlere oranlar makromoleküler kalabalıklaşmanın etkisi azalmış gibi görünmektedir. Zira, SV kontrol grubu ile anlamlı bir fark yakalanan tek grup KV 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,0007$) olmuştur. Toplam protein miktarları ele alındığında, 7. günde MMK gruplarının çoğunda (SV 50 $\mu\text{g/mL}$, KV 100, 500 $\mu\text{g/mL}$ hariç) kontrol grubuna göre protein miktarı artarken, 14. gün standart vasatlarda gözle görünür bir artış elde edilmiştir; fakat 14. gün kondrojenik vasat içeren grupta aynı artış yakalanamamıştır. 21. güne gelindiğinde örneklerde, 14. güne kıyasla toplam protein miktarlarında düşüş belirlenmiş, fakat MMK etkisi ile gruplar arasında belirgin bir fark yakalanamamıştır.

Makromoleküler kalabalıklaşmanın önemli etkilerinden birinin pro-kolajeni, kolajen I'e dönüşümünü prokollajen N- ve C- proteazlarının aktivitesini arttırarak hızlandırmak olduğu kanıtlanmıştır (Lareu ve ark., 2007; Satyam ve ark., 2014). Gaspar ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, farklı kalabalıklaştırıcıların kolajen I depolama oranları karşılaştırıldığında polidispersitesi ve negatif yükü sebebi ile en çok karagenanın başarılı olduğu gözlenmiştir (2019). Bu çalışmada da farklı karagenan konsantrasyonları yardımı ile kalabalıklaştırılmış olan AZ-MKH hücrelerinin Kemik iliği MKH ve kalabalıklaştırıcı olarak 100 $\mu\text{g/mL}$ CRG konsantrasyonu ile çalışılan bir literatürde kolajen I artışı 7. gün ve 14. günde de kontrol grubuna göre artış ile gözlenmiştir (Graceffa ve Zeugolis, 2019). Bu çalışmada 100 $\mu\text{g/mL}$ MMK içeren grubun diğer konstantrasyonlara kıyasla bariz bir farkı görülmemiştir. Karagenan, fukoidan, galaktofukan ve kolajen I depolama miktarları 7, 14 ve 21. Günlerde hem standart hem de kondrojenik vasattaki örneklerde incelenmiştir. Kolajen I'i karşılaştırabilmek ve yürüyen jellerde belirleyebilmek amacı ile 3 adet standart seçilmiştir. İlk olarak ticari kolajen tip I kısım 2.9.2'de açıklandığı üzere izole edilmiştir. Bunun haricinde dondurulmuş sıçan kuyruklarından kolajen izole edilerek (2.9.2) jelde yürütülmüştür. Ayrıca, geniş aralıklı protein belirteci (j449) protein kDa'larının kesin olarak belirlenebilmesi açısından standart olarak eklenmiştir. Jeller geniş aralıklı protein belirtecinin bantları aşağı inene kadar yürütülmüştür. Kolajen I bantları incelendiğinde 7. Gün örneklerinin SV ve KV örneklerinde belirgin bir bant görülmemiştir. 14. Gün ve 21. Güne gelindiğinde ise grupların hepsinde kolajen bantları gözlenmektedir. En yoğun kolajen bantları standart vasat 14. Gün 500 $\mu\text{g/mL}$

MMK içeren grup ve kondrojenik vasat 14. gün kontrol ve 50 µg/mL MMK gruplarında belirlenmiştir. Kolajen birikimi 7. Günde gözlenemezken zaman ilerledikçe birikim sağlanmış bu da ECM yoğunluğunun artışı göstermiştir. 14. güne ilerledikten sonra hem kondrojenik hem de standart vasat içeren gruplarda kolajen birikimi gözlenmiş ve bu bantlar 21. günde de korunmuştur. Karagenan konsantrasyonları arasında stabil devam eden bir kolajen biriktirme kapasite değişimi görülmemiştir. Ulvan isimli denizyosunlarından izole edilen bazı polisakkarit kalabalıklaştırıcıların karşılaştırıldığı bir başka çalışmada kolajen I depolanmalarının her kalabalıklaştırıcıda farklı konsantrasyonlarda daha etkili olduğu görülmüştür. Örneğin, fukoidanın 500 µg/mL olarak eklendiği grup 10. Günde en fazla kolajen depolamasını yaparken, ulvan için hem 250 µg/mL hem de 500 µg/mL konsantrasyonları diğerlerine göre başarılı bulunmuştur. Ayrıca ulvanın 50 µg/mL konsantrasyonu MMK eklenmeyen kontrol grubu ile kolajen I depolaması konusunda anlamlı bir fark yakalayamamıştır (De Pieri ve ark., 2020). Literatürdeki bu çalışmalar MMK ve en etkili konsantrasyonları konusunda bir fikirbirliğine varılamadığını ve bu konuda daha fazla çalışma gerektiğini işaret etmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında *in vitro* hücre modellemelerine ECM'nin *in vivo* mikroçevredeki büyük önemi göz önüne alınarak yaklaşılmıştır. Makromoleküler kalabalıklaşma olarak adlandırılan ve *in vivo* hücre nişinin birçok farklı makromolekül ile çevrili ve kalabalık olduğuna olgusu ile harekete geçilmiştir. Bu kapsamda farklı donörlerden elde edilen amniyotik zar MKH'ları başarılı bir şekilde izole edilmiş ve çeşitli çalışmalar ile karakterizasyonu sağlanmıştır. Makromoleküler kalabalıklaşma etkisi için negatif yüke sahip olan karagenan hücre kültürüne çeşitli konsantrasyonlarda eklenerek standart vasat ve kondrojenik vasat olmak üzere iki koşuldaki etkileri incelenmiştir. İncelemelerin sonucunda MMK'nın hücre morfolojisinde değişim yaratmadığı fakat hücrelerin göç etme ve CFU-f oluşturma yetisini azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca histokimyasal analizler ışığında sGAG birikiminin MMK içeren gruplarda daha çok olduğu belirlenirken bütün grupların kondrojenik farklılaşmaya yöneldiği gözlenmiştir. Sonuç olarak, AZ-MKH'ların makromoleküler kalabalıklaşma ortamında standart ve kondrojenik vasatlardaki etkileri gözlenmiştir.

İlerideki çalışmalar için, kıkırdak ECM'sini oluşturan elemanların detaylı analizlerinin yapılması MMK'nın spesifik etkilerini anlamlandırmak ve literatürü zenginleştirmek açısından yararlı olacaktır.

ÖZET

Plasental Kök Hücrelerin Makromoleküler Kalabalık Ortamda Kondrojenik Farklılaşmasının İncelenmesi

Kök hücre tedavilerinin yenileyici tıbbi yönelik uygulamaları gündeme geldiğinden beri büyük bir umut vadetmesine karşın hayal edilen noktaya henüz ulaşamamıştır. Nedenleri incelendiğinde mevcut *in vitro* modellerin *in vivo* kök hücre nişine yeterli benzerliği sağlayamadığı ve hücre dışı matriksin (ECM) rolünün istenilen düzeyde ele alınmadığı görülmektedir. Bu nedenle tez çalışması kapsamında makromoleküler kalabalıklaşma yaklaşımının, yani hücre kültürü ortamının *in vivo* nişe benzetilmesi amacıyla büyük moleküllerin eklenmesi suretiyle kalabalıklaştırılmasının etkileri incelenmiştir. Bu etkiyi sağlamak üzere negatif yüklü sülfatlanmış bir polisakkarit olan karagenan kalabalıklaştırıcı olarak kullanılmıştır. Bir plasental kök hücre türü olan amniyotik zar mezenkimal kök hücreleri (AZ-MKH'leri) izole edildikten sonra, morfolojik inceleme, büyüme eğrisi analizi, proliferasyon analizi, CFU-f oluşturma kapasitesi, akım sitometri analizi, üçlü soya farklılaştırma yöntemleri ile kapsamlı olarak karakterize edilmiştir. Daha sonra, standart büyüme ve kondrojenik vasat şartları olmak üzere iki farklı kültür ortamında ve çeşitli MMK konsantrasyonları kullanılarak AZ-MKH'lerinin kültürleri sürdürülmüştür. Makromoleküler kalabalıklaşmanın ve kültür şartlarının etkileri faz kontrast mikroskopi analizleri, migrasyon testi, CFU-f analizi, histokimyasal boyamalar ve protein miktar analizleri gerçekleştirilerek karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak histokimyasal analizler, AZ-MKH hücrelerinin MMK koşulları altında gelişebildiğini ve standart vasat ortamında bile kondrojenik yönde farklılaşabildiğini ortaya koydu. Ayrıca, makromoleküler kalabalık ortamın hücrelerin migrasyon ve CFU-f oluşturma kapasitesini azalttığı da bulundu. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, MMK'ların AZ-MKH'lere olan etkilerinin incelendiği ilk çalışmadır.

Anahtar Sözcükler: makromoleküler kalabalıklaşma, plasental kök hücre, amniyotik zar mezenkimal kök hücreleri, ekstrasellüler matriks, kondrojenik farklılaşma

SUMMARY

Investigation of Chondrogenic Differentiation of Placental Stem Cells in Macromolecular Crowding Environment

Although stem cell treatments for regenerative medicine have been promising since they were brought to the agenda, the dreamed point has not been reached yet. When the reasons are examined, it is seen that *in vitro* models cannot adequately mimic the *in vivo* stem cell niche and the role of the extracellular matrix (ECM) has not been adequately considered. For this reason, the effects of the macromolecular crowding (MMC) approach, which is the crowding of the cell culture medium by adding macromolecules to simulate the *in vivo* niche, were investigated within the scope of the thesis. Carrageenan, a negatively charged sulfated polysaccharide, was used as a crowding agent to achieve this effect. Amniotic membrane mesenchymal stem cells (AM-MSCs), a type of placental stem cell, were first isolated and then extensively characterized by morphological examinations, growth curve analysis, proliferation analysis, CFU-f generating capacity, flow cytometry, and trilineage differentiation analysis. Next, cultures of AM-MSCs were maintained under two different culture conditions, i.e. standard growth and chondrogenic media conditions, and using various concentrations of MMC. The effects of macromolecular crowding and culture conditions were compared by performing phase contrast microscopy analysis, migration test, CFU-f analysis, histochemical staining and protein amount analysis. In conclusion, histochemical analyses revealed that AM-MSCs were able to proliferate under MMC conditions and differentiate into chondrogenic lineage even in the standard medium conditions. In addition, it was found that the macromolecular crowding environment reduces the capacity of cells to migrate and generate CFU-f. To our knowledge, this is the first study to examine the effects of MMCs on AM-MSCs.

Keywords: macromolecular crowding, placental stem cells, amniotic membrane mesenchymal stem cells, extracellular matrix, chondrogenic differentiation

KAYNAKLAR

- ALVIANO F, FOSSATI V, MARCHIONNI C, ARPINATI M, BONSI L, FRANCHINA M, LANZONI G, CANTONI S, CAVALLINI C, BIANCHI F, TAZZARI PL, PASQUINELI G, FORONI L, VENTURA C, GROSSI A, BAGNARA GP (2007) Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Developmental Biology*, **7**: 11.
- BARTOLOTTI I, ROSETI L, PETRETTA M, GRIGOLO B, DESANDO G (2021) A roadmap of in vitro models in osteoarthritis: A focus on their biological relevance in regenerative medicine. *Journal of clinical medicine*, **10**: 1920.
- BEANE OS, DARLING EM (2012) Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration. *Ann Biomed Eng*, **40**: 2079–2097.
- BENNY P, RAGHUNATH M (2017) Making microenvironments: A look into incorporating macromolecular crowding into in vitro experiments, to generate biomimetic microenvironments which are capable of directing cell function for tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering*, **8**: 2041731417730467.
- BERTHIAUME F, MAGUIRE TJ, YARMUSH ML (2011) Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, **2**: 403–430.
- BROWN C, MCKEE C, BAKSHI S, WALKER K, HAKMAN E, HALASSY S, SVINARICH D, DODDS R, GOVIND CK, CHAUDHRY GR (2019) Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, **13**: 1738–1755.
- CAMPO VL, KAWANO DF, SILVA DB DA, CARVALHO I (2009) Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis - A review. *Carbohydrate Polymers*, **77**: 167–180.
- CHAMBERLAIN G, FOX J, ASHTON B, MIDDLETON J (2007) Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells*, **25**: 2739–2749.
- CHANG, Y, HSIEH, PH, CHAO, C C (2009). The efficiency of Percoll and Ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential. *Chang Gung Med J*, **32**(3): 264-275.
- CIGOgnini D, GASPAR D, KUMAR P, SATYAM A, ALAGESAN S, SANZ-NOGUÉS C, GRIFFIN M, O'BRIEN T, PANDIT A, ZEUGOLIS DI (2016) Macromolecular crowding meets oxygen tension in human mesenchymal stem cell culture- A step closer to physiologically relevant in vitro organogenesis. *Scientific Reports*, **6**(1): 30746
- DE LA TORRE P, FLORES AI (2021) Current status and future prospects of perinatal stem cells. *Genes*, **12**: 1–24.
- DE PIERI A, KORNTNER SH, CAPELLA-MONSONIS H, TSIAPALIS D, KOSTJUK SV, CHURBANOV S, TIMASHEV P, GORELOV A, ROCHEV Y, ZEUGOLIS DI (2022) Macromolecular crowding transforms regenerative medicine by enabling the

- accelerated development of functional and truly three-dimensional cell assembled micro tissues. *Biomaterials*, **287**:121674
- DE PIERI A, RANA S, KORNTNER S, ZEUGOLIS DI (2020) Seaweed polysaccharides as macromolecular crowding agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, **164**: 434–446.
- DIAZ-PRADO S, MUIÑOS-LÓPEZ E, HERMIDA-GÓMEZ T, RENDAL-VÁZQUEZ ME, FUENTES-BOQUETE I, DE TORO FJ, BLANCO FJ (2010) Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, **17**: 49–59.
- DIAZ-PRADO S, MUIÑOS-LÓPEZ E, HERMIDA-GÓMEZ T, RENDAL-VÁZQUEZ ME, FUENTES-BOQUETE I, DE TORO FJ, BLANCO FJ (2010) Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *Journal of Cellular Biochemistry*, **111**(4): 846–857.
- ELÇİN M, ÇALIŞMA GRUBU ÜYELERİ (2015) TÜBA-KÖK HÜCRE ARAŞTIRMALARI ve BİYOETİK SEMPOZYUMU RAPORU.
- 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.
- FREITAG J, BATES D, BOYD R, SHAH K, BARNARD A, HUGUENIN L, TENEN A (2016) Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: Reparative pathways, safety and efficacy - A review. *BMC Musculoskelet Disord*, **17**:230.
- GASPAR D, FULLER KP, ZEUGOLIS DI (2019) Polydispersity and negative charge are key modulators of extracellular matrix deposition under macromolecular crowding conditions. *Acta Biomaterialia*, **88**: 197–210.
- GHASEMZADEH M, HOSSEINI E, AHMADI M, KAMALIZAD M, AMIRIZADEH N (2018) Comparable osteogenic capacity of mesenchymal stem or stromal cells derived from human amnion membrane and bone marrow. *Cytotechnology*, **70**: 729–739.
- GILLIS JA (2019) The Development and Evolution of Cartilage. *Elsevier Reference Module in Life Sciences: Developmental Biology*. Amsterdam, Elsevier. 1-13.
- GOLDRING MB, TSUCHIMOCHI K, IJIRI K (2006) The control of chondrogenesis. *Journal of cellular biochemistry*, **97**: 33–44.
- GRACEFFA V, ZEUGOLIS DI (2019) Carrageenan enhances chondrogenesis and osteogenesis in human bone marrow stem cell culture. *European Cells and Materials*, **37**: 310–332.
- GRACEFFA V, ZEUGOLIS DI (2019) Macromolecular crowding as a means to assess the effectiveness of chondrogenic media. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **13**: 217–231.
- GRONTHOS S, SIMMONS PJ, GRAVES SE, ROBEY PG (2001). Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone*, **28**(2): 174-181.
- GUO Z, WEI Y, ZHANG Y, XU Y, ZHENG L, ZHU B, YAO Z (2022) Carrageenan oligosaccharides: A comprehensive review of preparation, isolation, purification, structure, biological activities and applications. *Algal Research*, **61**: 102593
- HERRICK EJ, BORDONI B (2023). Embryology, Placenta. StatPearls Publishing.

- HSU SH, HUANG T B¹N, CHENG SJ, WENG SY, TSAI CL, TSENG CS, CHEN DC, LIU TY, FU KY, YEN BL (2011) Chondrogenesis from human placenta-derived mesenchymal stem cells in three-dimensional scaffolds for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering - Part A*, **17**: 1549–1560.
- HUI LI L, CELESTE LOE F (2010) Bottlenecks faced with mesenchymal stem cells in tissue engineering and clinical applications.
- ISHIGE I, NAGAMURA-INOUE T, HONDA MJ, HARNPRASOPWAT R, KIDO M, SUGIMOTO M, NAKAUCHI H, TOJO A (2009) Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. *International Journal of Hematology*, **90**: 261–269.
- KANGARI P, TALAEI-KHOZANI T, RAZEGHIAN-JAHROMI I, RAZMKHAH M (2020) Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects. *Stem cell research & therapy*, **11**: 492.
- KITTAKA M, KAJIYA M, SHIBA H, TAKEWAKI M, TAKESHITA K, KHUNG R, FUJITA T, IWATA T, NGUYEN T, OUHARA K, TAKEDA K, FUJITA T, KURIHARA H (2015) Clumps of a mesenchymal stromal cell/extracellular matrix complex can be a novel tissue engineering therapy for bone regeneration, *Cytotherapy*, **17**: 860-873
- KOIKE C, ZHOU K, TAKEDA Y, FATHY M, OKABE M, YOSHIDA T, NAKAMURA Y, KATO Y, NIKAIDO T (2014) Characterization of amniotic stem cells. *Cellular Reprogramming*, **16**: 298–305.
- KUMAR P, SATYAM A, FAN X, COLLIN E, ROCHEV Y, RODRIGUEZ BJ, GORELOV A, DILLON S, JOSHI L, RAGHUNATH M, PANDIT A, ZEUGOLIS DI (2015) Macromolecularly crowded in vitro microenvironments accelerate the production of extracellular matrix-rich supramolecular assemblies. *Scientific Reports*, **5**(1):8729.
- LAREU RR, SUBRAMHANYA KH, PENG Y, BENNY,P, CHEN C, WANG Z, RAJAGOPALAN R, RAGHUNATH M, (2007). Collagen matrix deposition is dramatically enhanced in vitro when crowded with charged macromolecules: the biological relevance of the excluded volume effect. *FEBS letters*, **581**(14): 2709–2714.
- LANGE-CONSIGLIO A, CORRADETTI B, MEUCCI A, PEREGO R, BIZZARO D, CREMONESI F (2013) Characteristics of equine mesenchymal stem cells derived from amnion and bone marrow: In vitro proliferative and multilineage potential assessment. *Equine Veterinary Journal*, **45**: 737–744.
- LIF, CHEN YZ, MIAO ZN, ZHENG SY, JIN J (2012) Human placenta-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin biomaterial in the repair of articular cartilage defects. *Cellular Reprogramming*, **14**: 334–341.
- LIU G, DAVID BT, TRAWCZYNSKI M, FESSLER RG (2020) Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Springer*. **16**: 3–32.
- LIU J, ZHAN X, WAN J, WANG Y, WANG C (2015) Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: Favourable physical features versus adverse biological effects. *Carbohydrate polymers*, **121**: 27–36.
- MA J, WU J, HAN L, JIANG X, YAN L, HAO J, WANG H (2019) Comparative analysis of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane, umbilical cord, and chorionic plate under serum-free condition. *Stem Cell Research and Therapy*, **10**(1):1-13.

- MAKRIS EA, GOMOLL AH, MALIZOS KN, HU JC AND ATHANASIOU KA (2015) Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat Rev Rheumatol.*, **11**: 21–34.
- MALEK A, BERSINGER NA (2012) Human placental stem cells: Biomedical potential and clinical relevance, *Journal of stem cells*, **6**: 75–92.
- MEDVEDEVA E V, GREBENIK EA, GORNOSTAEVA SN, TELPUHOV VI, LYCHAGIN AV, TIMASHEV PS, CHAGIN AS (2018) Repair of damaged articular cartilage: Current approaches and future directions. *International journal of molecular sciences*, **19**: 2366
- MICHIGAMI T (2013) Regulatory mechanisms for the development of growth plate cartilage. *Cellular and molecular life sciences*, **70**: 4213–4221.
- MOREIRA-TEIXEIRA LS, GEORGI N, LEIJTEN J, WU L , KARPERIEN M (2011) Cartilage Tissue Engineering. *Endocrine development*, **21**: 102–115.
- NECAS J, BARTOSIKOVA L (2013) Carrageenan: a review. *Veterinarni medicina*, **58**(4): 187-205.
- NOGAMI M, TSUNO H, KOIKE C, OKABE M, YOSHIDA T, SEKI S, MATSUI Y, KIMURA T, NIKAIDO T (2012) Isolation and characterization of human amniotic mesenchymal stem cells and their chondrogenic differentiation. *Transplantation*, **93**: 1221–1228.
- O’CONOR CJ, CASE N, GUILAK F (2013) Mechanical regulation of chondrogenesis. *Stem Cell Research and Therapy*, **4**(4):1-13.
- PATEL JM, DUNN MG (2015) Cartilage tissue engineering. *Regenerative Engineering of Musculoskeletal Tissues and Interfaces*, 135–160.
- PATRIKOSKI M, LEE MHC, MÄKINEN L, ANG XM, MANNERSTRÖM B, RAGHUNATH M, MIETTINEN S (2017) Effects of Macromolecular Crowding on Human Adipose Stem Cell Culture in Fetal Bovine Serum, Human Serum, and Defined Xeno-Free/Serum-Free Conditions. *Stem Cells International*, 2017.
- PENG Y, RAGHUNATH M (2010) Learning From Nature: Emulating Macromolecular Crowding To Drive Extracellular Matrix Enhancement For The Creation Of Connective Tissue in vitro. *Tissue engineering*, 103-118.
- PITSILLIDES AA, BEIER F (2011) Cartilage biology in osteoarthritis - Lessons from developmental biology. *Nat Rev Rheumatol*, **7**: 654–663.
- POPA EG, CARIDADE SG, MANO JF, REIS RL, GOMES ME (2015) Chondrogenic potential of injectable carrageenan hydrogel with encapsulated adipose stem cells for cartilage tissue-engineering applications. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **9**: 550–563.
- RAGHUNATH, M, ZEUGOLIS, DI (2021). Transforming eukaryotic cell culture with macromolecular crowding. *Trends in biochemical sciences*, **46**(10): 805–811.
- SAGE D, NEUMANN FR, HEDIGER F, GASSER SM , UNSER M (2005) Automatic tracking of individual fluorescence particles: Application to the study of chromosome dynamics. *IEEE Transactions on Image Processing*, **14**: 1372–1383.

- SATYAM A, KUMAR P, FAN X, GORELOV A, ROCHEV Y, JOSHI L, ZEUGOLIS D (2014). Macromolecular crowding meets tissue engineering by self-assembly: A paradigm shift in regenerative medicine. *Advanced materials*, **26**(19): 3024-3034.
- SATYAM A, KUMAR P, CÍGOGNINI D, PANDIT A. ZEUGOLIS DI (2016) Low, but not too low, oxygen tension and macromolecular crowding accelerate extracellular matrix deposition in human dermal fibroblast culture. *Acta Biomaterialia*, **44**: 221–231.
- SOPHIA FOX AJ, BEDI A, RODEO SA (2009) The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health*, **1**: 461–468.
- STAMPOULTZIS T, KARAMI P AND PIOLETTI DP (2021) Thoughts on cartilage tissue engineering: A 21st century perspective. *Current Research in Translational Medicine*, **69**(3):103299.
- SUAREZ-ARNEDO A, FIGUEROA FT, CLAVIJO C, ARBELÁEZ P, CRUZ JC, MUÑOZ-CAMARGO C (2020) An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS ONE*, **15**(7): e0232565..
- TAKAHASHI K, YAMANAKA S (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, **126**(4): 663–676.
- TSIAPALIS D, ZEUGOLIS DI (2021) It is time to crowd your cell culture media – Physicochemical considerations with biological consequences. *Biomaterials*, **275**: 120943.
- TURCO MY, MOFFETT A (2019) Development of the human placenta. *Development*, **146**(22): dev163428.
- VACANTI C (2006) The history of tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **1**: 569–576.
- WANG A, BROWN EG, LANKFORD L, KELLER BA, PIVETTI CD, SITKIN NA, BEATTIE MS, BRESNAHAN J, FARMER DL (2015) Placental Mesenchymal Stromal Cells Rescue Ambulation in Ovine Myelomeningocele. *Stem Cells Translational Medicine*, **4**(6): 659–669.
- YEGAPPAN R, SELVAPRITHIVIRAJ V, AMIRTHALINGAM S, JAYAKUMAR R (2018) Carrageenan based hydrogels for drug delivery, tissue engineering and wound healing. *Carbohydrate polymers*, **198**: 385–400.
- ZEIGER AS, LOE FC, LI R, RAGHUNATH M, VAN VLIET KJ (2012) Macromolecular crowding directs extracellular matrix organization and mesenchymal stem cell behavior. *PLoS one*, **7**(5): e37904.