

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**Fare Embriyonik Kök Hücrelerinden Kondrosit
Farklılaştırılması ve Mezenşimal Kök Hücrelerinden
Farklılaştırılan Kondrositlerle Karşılaştırılması**

Gülşah KÜRKCÜ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

İkinci Danışman: Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 614.02.07

Sunuş Tarihi: 20.12.12

Bornova-İZMİR

2012

Biyolog Gülşah KÜRKCÜ tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan "Fare Embriyonik Kök Hücrelerinden Kondrosit Farklılaştırılması ve Mezenşimal Kök Hücrelerinden Farklılaştırılan Kondrositlerle Karşılaştırılması" başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 20.12.12 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Raportör Üye: Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

Üye :Yard. Doç. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ

Üye :Doç. Dr. Gülperi ÖKTEM

Üye :Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ



ÖZET**FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİNDEN KONDROSİT
FARKLILAŞTIRILMASI VE MEZENŞİMAL KÖK
HÜCRELERİNDEN FARKLILAŞTIRILAN KONDROSİTLERLE
KARŞILAŞTIRILMASI****KÜRKCÜ, Gülşah**

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. İsmet Deliloğlu GÜRHAN
İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Seda VATANSEVER
Aralık 2012, 79 sayfa

Bu projede her iki hücre kaynağının da kullanılması düşünülmüş olup *in vivo* karşılaştırılmasının yapılması planlanmıştır. Çalışmada, eş zamanlı olarak stok embriyonik kök hücre ile fare kemik iliğinden alınan mezenşimal kök hücrelerin uygun ortamda kültürleri yapıldıktan sonra her iki kök hücre kaynağından kondrosit farklılaştırılması yapılmıştır. Kondrosit farklılaştırması için hazırlanan hücre kültür ortamına %1 ITS(insulin transferrin, selenyum), 10 ng/ml BMP-2 (*bone morphogenetic protein-2*), 10 ng/ml TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*) ve 50 μ g/ml askorbik asit ilave edilmiştir. Hücrelerin karakterizasyonu için indirekt immunohistokimyasal teknik kullanılarak anti-aggregan, anti-kollajen II ve anti-Sox9 dağılımları bakılmıştır. Elde edilen verilere dayanarak farklılaşma kapasiteleri ve farklılaşma hızları karşılaştırılmıştır. Farklılaştırılan kondrosit hücreleri fare bacak kas dokusu içerisine verilerek hücrelerin, *in vivo* ortamdaki uyumu ve devamlılığı gözlenmiştir. Hücrelerin fare bacak kasına enjeksiyonu yapıldıktan sonraki 28. günde enjeksiyon yapılan bölgeden biyopsi alınarak rutin parafin takip işleminden sonra kesitler hematoksilin eozin ve Mason trichrom boyamaları yapılarak histokimyasal analiz yapılmıştır.

Anahtar sözcükler: Embriyonik kök hücre, Mezenkimal kök hücre, Kondrosit.

ABSTRACT

**EMBRYONIC STEM CELL DIFFERENTIATION TO
CHONDROCYTES AND COMPARE THE CHONDROCYTES
WERE DIFFERENTIATED FROM BONE MARROW STEM CELL**

KÜRKÇÜ, Gülşah

MSc in Biotechnology.

Supervisor: Prof. Dr. S. İsmet Deliloğlu GÜRHAN

Co Supervisor: Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

Aralık 2012, 79 pages

In this study, embryonic stem cells from stock and mesenchymal stem cells from bone marrow of a mouse were propagated in 1% ITS, 10 ng / ml BMP-2, 10 ng / ml TGF- β 1 and 50 mg / ml ascorbic acid, which were added in to the cultures for chondrocyte differentiation. Using indirect immunohistochemical techniques for characterization of of the differentiated cell, distribution of anti-aggregan, anti-collagen II and anti-Sox9 was checked. Based on the data obtained, the capacity and the rate of their differentiation was compared. Then The differentiated cells were transplanted into the leg muscle of the mice and further examined for their compatibility and survival *in vivo* conditions. On the 28th day after the transplantation, a biopsy sample was taken from the region of implant, and processed with routine paraffin embedding procedure, for histochemical analysis which was performed using hematoxylin eosin and Masson trichrome staining.

Keywords: Embryonic stem cell, Mesenchymal stem cells, Chondrocyte.

TEŞEKKÜR

Çalışmam sırasında hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU-GÜRHAN'a, embriyonik kök hücre hattının eldesinde ve yardıma ihtiyacım olan her anda yanımda olan Celal Bayar Üniv., Tıp Fak., Histoloji Embriyoloji Bölümü'nden ikinci danışmanım Prof. Dr. Seda VATANSEVER'e teşekkür ediyorum.

Çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan Ege Üniversitesi Hücre kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'ndaki bütün arkadaşlarıma ve Celal Bayar Üniversitesi'ndeki Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki bütün arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xx
1.GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1 Tarihçe.....	2
2.2 Kök Hücre Nedir?.....	5
2.3 Kök Hücrelerin Özellikleri	6
2.3.1 Kendini Yenileyebilme Özelliği.....	6
2.3.2 Klon Oluşturabilme Özellikleri	9
2.3.3 Farklılaşabilme Yeteneği	9
2.4 Kök Hücre Kaynakları	10

İÇİNDEKİLER(devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.1 Embriyonik Kök Hücreler	10
2.4.2 Yetişkin Doku Kaynaklı Kök Hücreler	14
2.5 Kök Hücrelerin Nişi	16
2.6 Kıkırdak Doku	17
2.6.1 Kıkırdak Dokunun Başlıca Görevleri	18
2.6.2 Kıkırdak Dokunun Yapısı ve Fonksiyonu	18
2.6.3 Kıkırdak Doku Hücreleri Kondrositler	19
2.6.4 Kıkırdak Doku Dejenerasyonu ve Tedavisi	21
3. MATERYAL VE METOT	22
3.1 Fare Kemik İliğinden Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu	24
3.2 Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması	26
3.3 Fare Embriyonik Kök Hücrelerin Kültürü	26
3.3.1 Jeletin Solüsyonunun Hazırlanması	26

İÇİNDEKİLER(devam)

	<u>Sayfa</u>
3.3.2 STO Besleyici Tabakasının Hazırlanması ve Kültürü.....	27
3.3.3 Embriyonik Kök Hücrelerin Kültürü	28
3.3.4 Embriyonik Kök Hücrelerin Pasajlanması	29
3.3.5 Damla Metodu ile Embriyoblast Oluşturulması	29
3.4 Hücrelerin Pasajlanması Dondurulması	30
3.5 Kök Hücrelerin Kondrosite Farklılaştırılması	31
3.5.1 Jelatinli ve Matrijelli Petrilerin Hazırlanması	31
3.5.2 Mezenkimal Kök Hücrelerin Kondrosite Farklılaştırılması	32
3.5.3 Alcian Mavisi ile Boyama.....	33
3.5.4 Embriyonik Kök Hücrelerin Kondrosite Farklılaştırılması	33
3.5.5 Farklılaşan Kök Hücrelerin İmmünohistokimyası	34
3.6 Farklılaşan Kök Hücrelerin Fare Bacak Kasına Enjeksiyonu	35
3.6.1 İzolasyonu Yapılan Dokuların Hematoksilen- Eozin ve Masson Trikrom Boyamasının yapılması.....	36

İÇİNDEKİLER(devam)

	<u>Sayfa</u>
4.BULGULAR	39
4.1.Fare Kemik İliğinden Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü	39
4.2. STO Besleyici Tabakasının Kültürü ve Morfolojisinin İncelenmesi	40
4.3. Embriyonik Kök Hücrelerin Kültürü ve Morfolojisinin İncelenmesi	40
4.3.1 Fare Embriyonik Kök Hücreleri ile Fare Kemik İliği Kök Hücrelerinin Morfolojisinin Karşılaştırılması	43
4.4 Damla Metodu ile Oluşturulan Embriyoblastların Morfolojisinin İncelenmesi	44
4.5 Kondrosite Farklılaştırılan Fare Kemik İliği Kök Hücrelerinin Mikrokütle Kültürünün İncelenmesi	46
4.5.1 Farklılaşan Kök Hücrelerin Alcian Mavisi ile Boyanması	47
4.6 Farklılaşan Kök Hücrelerin İmmünohistokimyasal Boyanması	48
4.6.1 Farklılaşan Kemik İliği Kök Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Boyanması	48
4.6.2 Farklılaşan Embriyonik Kök Hücrelerin İmmünohistokimyasal Boyanması	51

İÇİNDEKİLER(devam)

	<u>Sayfa</u>
4.7 İn vivo Ortamda Kondrositlerin Varlığı	53
4.7.1 İzole Edilen Yapının Hematoksilen-Eozin Boyanması	54
4.7.2 İzole Edilen Doku Kesitlerinin Masson Trikrom Boyaması.....	56
5. TARTIŞMA.....	58
5.1 Kıkırdak Dokunun Onarımında Kök Hücre Tedavisinin Kullanılması.....	58
5.2 Tamir Edilen Dokuda Oluşan Problemler	63
6. SONUÇLAR	65
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	67
ÖZGEÇMİŞ	78
.	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Kök hücrelerin diğer yetişkin dokulara farklılaşırken kendini yenileyebilme özellikleri	7
2.2 Embriyonik kök hücrelerinin kültür ortamında koloni oluşturulması.....	9
2.3 Kök hücre kaynakları	10
2.4 İnsan embriyosunun blastokist yapısı	11
2.5 Kök hücrelerinin <i>in vivo</i> ortamdaki nişinin şeması	16
2.6 Kıkırdak dokunun 3 farklı tabakasındaki hücreler	20
3.1 Tez projesinde izlenen çalışma yol izi	23
4.1 Fare kemik iliği kök hücrelerinin faz kontrast görünümü.....	39
4.2 STO hücrelerinin inverted faz kontrast görünümü	41
4.3 Mitomisin-C ile muamele edilmiş STO hücrelerinin üzerinde kültüre edilmiş EKH'lerin morfolojisinin incelenmesi	42
4.4 Fare kemik iliği kök hücreleri ile embriyonik kök hücrelerinin Faz kontrast görüntüleri	43

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.5 Damla yöntemi ile oluşturulan kültür ortamı.....	44
4.6 Embriyoblast oluşumunun çizimsel açıklaması	45
4.7 48 saat sonucunda damlalarda oluşan embriyoblastların fazkontrast Görüntüsü	45
4.8 Jelatinli petride kültüre edilen embriyoblastlar	46
4.9 Fare kemik iliği kök hücrelerinden elde edilen mikrokütle kültürünün Faz kontrast görünümü	46
4.10 Farklılaşan kondrosit hücrelerinin Alcian mavisi boyaması ardından inverted mikroskop görünümü	47
4.11 Farklılaşan kondrosit hücrelerinin Alcian mavisi boyaması ardından inverted mikroskop görünümü	48
4.12 Kondrojenik hücre kültür ortamı ile bir hafta inkübe edilmiş kemik iliği kök hücrelerinin anti-aggregan, anti-kollajen II ve anti-Sox9 antikoraları ile immünohistokimyasal boyaması	49
4.13 Kondrojenik hücre kültürü ortamı ile iki hafta inkübe edilmiş kemik iliği kök hücrelerinin anti-aggregan, anti-kollajen II ve anti-Sox9 antikoraları ile immünohistokimyasal boyaması	49

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.14 Kondrojenik hücre kültür ortamı ile üç hafta inkübe edilmiş kemik iliği kök hücrelerinin anti-aggregan, anti-kollajen II ve anti-Sox9 antikoraları ile immünohistokimyasal boyaması.....	50
4.15 Kondrojenik hücre kültür ortamı ile bir hafta inkübe edilmiş fare embriyonik kök hücrelerinin anti-aggregan, anti-kollajen II ve anti-Sox9 antikoraları ile immünohistokimyasal boyaması.....	51
4.16 Kondrojenik hücre kültür ortamı ile iki hafta inkübe edilmiş fare embriyonik kök hücrelerinin anti-aggregan, anti-kollajen II ve anti-Sox9 antikoraları ile immünohistokimyasal boyaması.....	52
4.17 Kondrojenik hücre kültür ortamı ile üç hafta inkübe edilmiş fare embriyonik kök hücrelerinin immünohistokimyasal boyaması	53
4.18 Hücrelerin fare bacak kasına verildiği yerde oluşan yapı.....	53
4.19 <i>In vivo</i> ortama transfer edilen 1 haftalık kondrositlerin hematoksil-eozin Boyaması	54
4.20 <i>In vivo</i> ortama transfer edilen 3 haftalık kondrositlerin hematoksil-eozin boyaması	55
4.21 Üç hafta kondrojenik vasat ile muamele edilmiş kök hücrelerin hematoksil-eozin boyaması.....	56

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

Şekil

Sayfa

4.22 Bir hafta kondrojenik vasat ile muamele edilmiş kök hücrelerin Mason trikrom boyanması.....	57
---	----

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ALS	<i>Amiyotrofik Lateral Skleroz</i>
BMP-2	Kemik Morfogenetik Proteini 2
bFGF	Bazal Fibroblast Büyüme Faktörü
Coll II	Kollajen Tip 2
DAB	Diaminobenzidine
DMEM	Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium
DMSO	Dimetilsulfoksid
DNA	Deoksiribonükleik asit
EB	Embriyoblast
EDTA	Etilendiamintetraasidik Asit
EKH	Embriyonik Kök Hücre
ERK	Hücre Dışı Sinyalleri Düzenleyici
FBS	Fötal Sığır Serum
gp130	Glikoprotein 130
GAG	Glikozaminoglikan
GER	Granürlü Endoplazmik Retikulum
ITS	İnsulin, Transferrin, Selenyum
JAK	Januz Kinaz
RNA	Ribonükleik asit
Ras	Ras Bağlı Faktör
SOX2	Spesifik Embriyonik Antijen
SSEA	Spesifik Embriyonik Antijen
STO	Fare Embriyonik Fibroblast Hücreleri
TGF	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
H-E	Hematoksilen-Eozin
HKH	Hematopoietik Kök Hücreler
HUES	İnsan Embriyonik Kök Hücreleri

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Hcl	Hidroklorik asit
KİSKH	Kemik İliği Stromal Kök Hücreleri
IL	İnterlökin
IPSCs	İndüklenmiş Pluripotent Hücre
İN VİVO	Canlı Koşullar Altında
İN VİTRO	Cansız Koşullar Altında
LIF	Lösemi İnhibitor Faktör
LİFR β	Lösemi İnhibitor Faktör Resöptör Beta
mRNA	Haberci Ribonükleik asit
MS	Multipleskleroz
MAPK	Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
MitC	Mitomisin-C
M	Molar
NAD/NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
Nanog	Homeobox Proteini
NEAA	Esansiyel Olmayan Aminoasitler
N	Normal
nM	Nanomolar
Oct-4	Oktamer 4
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
P/S	Penisilin/ Streptomisin
POU	Pit-Oct-Unc
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Sox9	Kondrojenik Farklılaşma Proteini
TUNEL	Apoptoza giden hücreleri boyama yöntemi
α -MEM	Alfa Minimal Esansiyel Besi Ortamı

1.GİRİŞ

Günümüzde hastalıkların teşhisi ve tedavisindeki gelişmeler çok hızlı bir şekilde ilerlemesine rağmen; modern tıp hala bazı hastalıkların tedavisini gerçekleştirememektedir. Bu hastalık grupları; tip 1 diyabet, multiple skleroz (MS), Alzheimer, Parkinson, nöro dejeneratif hastalıklar, nedeni bilinmeyen ve ölümcül bir hastalık olan amiyotrofik lateral skleroz (ALS), genetik tabanlı olmayan körlük ve sağırılık gibi hastalıklar, omurilik hasarı sonucu ortaya çıkan felçler, iyileşemeyen kırıklar, kıkırdak dejenerasyonları vb. (Weissman et al., 2000). Son yıllarda bu tür ve benzeri hastalıklarda yeni sağaltım protokollerinin geliştirilmesinde ve tedavisinde hasar gören doku-hücre veya organların işlevlerini yerine koymak (rejeneratif tıp) ya da tamir etmek (reparatif tıp) ile mümkün olabileceği düşünülmektedir (Caplan et al., 2007).

Kök hücre çalışmaları hücresel tedaviler, doku/organ mühendisliği ve gen tedavileri alanında uluslararası düzeyde patentlenebilir, bilimsel etkinliği yüksek dergilerde yayımlanabilir ve atıf alabilir düzeyde bilimsel veriler üretilerek evrensel bilime katkı sağlanabilir. Üretilen bilgi ve teknolojilerin uygulanması eğitim-öğretime destek verebilir niteliktedir. Örneğin doku mühendisliği ile ilgili dünyada alınan patenler incelendiğinde 1990 yılında toplam 20 patent alınmış iken bu sayının 2001 yılında 100'ü aşmış olduğu görülmektedir (Allen, C. E. 2012).

Bu çalışmada, embriyonik ve mezenşimal kök hücreler kondrosit hücrelerine farklılaştırıldıktan sonra sıçan bacak kasına nakil edilip hücrelerin *in vivo* gelişimi gözlenmiştir. Nakilden sonra sıçandan alınan biyopsi örneklerinde hücrelerin kaynaklarına göre çoğalmaya ne derece yatkın oldukları, farklılaşma kapasiteleri karşılaştırılarak *in vivo* ortamdaki durumları incelenmiştir. Kök hücreler nakledildikleri bölgede *in vivo* ortamda teratom oluşturma riski taşımaktadır. Dolayısıyla kök hücrelerin teratom ve kanser oluşturma riski de değerlendirilmiştir. Böylece rejeneratif tıp veya reparatif tıp alanındaki embriyonik kök hücrelerin, mezenşimal kök hücrelere oranla tedavi olanaklarının ne derece uygulanabilir olduğunun bir ön çalışması yapılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Tarihçe:

Günümüzde tıbbın yetersiz kaldığı tedavisi olmayan hastalıklar için umut ışığı olarak görülen kök hücreler germ hücrelerinden, fötüsten ve yetişkin dokulardan elde edilebilmektedirler. Kök hücre tedavisi, günümüzde birçok etik ve dini tartışmalara sebep olan, medyanın gündemini sürekli oluşturan bir konudur (Bongso and Richards, 2004).

Tarihte ilk kez 1800'lü yıllarda bazı hücrelerin diğer hücreleri oluşturabileceği fikrinin ortaya atılması ile gündeme gelen kök hücreler ilk 1900'lü yılların başında keşfedilmiştir. Bu hücrelerin sadece kan hücrelerine farklılaşabileceği düşünülmüştür. Bu dönemde kök hücreler insan ve hayvan kök hücreleri olmak üzere ikiye ayrılmıştır (Solter et al., 2006).

1950-1960'lı yıllarda Ord. Prof. Dr. Vet. Hek. Tuğ. Gen. Süreyya Tahsin Aygün, doğum sonrası atılan plasentalarda kordon kanındaki hücreler ile insan ömrünün uzatılabileceğini söyleyerek hücre kültür tekniklerinin yanı sıra ilk hücre ve kök hücre tedavilerini yapmıştır. Bunları kitap ve makaleler halinde uluslararası dergilerde yayımlamış, yurtdışında uluslararası kurultaylarda bildiri olarak sunmuş ve Almanca olarak kitap haline getirerek, Almanya'da yayımlamıştır (Dinçer, 1982).

1960 yılında Ernest A. McCulloch, James E. Till ve McCulloch kök hücrelerin kendi kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme özelliklerini tanımlamışlardır (McCulloch and Till 2005). 1991 yılında ise kök hücreler, Caplan tarafından bugünkü tanımını alarak embriyonik kök hücre ve mezenkimal kök hücre olarak isimlendirilmiştir (Burder et al., 1994).

19. yüzyıla geri döndüğümüzde 1868'de Tavassali ve Corsby, 1869'da Goujon yaptıkları çalışmalarda kemik hücresi içermeyen kemik iliği hücrelerinin osteojenik hücrelere farklılaşma eğiliminde olduğunu ispatlamışlardır (Tavassoli and Crosby, 1968). Friendstein ve arkadaşları 1960 ve 1970 yıllarında yaptığı çalışmalarda kemik iliği hücrelerinin sadece küçük bir popülasyonunu oluşturan

hücrelerin kemik hücrelerine farklılaştığını göstermişlerdir (Tavassoli and Friedenstein, 1983).

1970 yılında Friedestein ve arkadaşları kemik iliğindeki farklılaşan hücrelerin yüzeye hemen tutunması ile kolayca hematopoetik hücrelerden ayrılabilirdiğini, yüzeye tutunan bu fibroblastik hücrelerin klonal yapı göstererek ürediğini göstermişlerdir (Friedenstein et al., 1974). 1976'da Testa, 1977'de Dexter ve 1978'de Allen tarafından kemik iliği kök hücrelerinin hücrel bir mikro çevre tarafından regüle edildiği gösterilmiştir (Dexter et al., 2005).Kök hücre niş hipotezi 1978 yılında Schofield tarafından desteklenmiştir. Özellikle kemik iliği stromasında ikinci bir tip kök hücrenin bulunabileceği Tavassali, Friedenstein ve Owen tarafından ortaya atılmıştır (Owen and Friedenshtein, 1988).Kemik iliğindeki ikinci tip kök hücre fikri 1978 yılında ortaya atılmış olmasına rağmen; 1999 yılında Pittengen ve arkadaşlarının yayımladığı makaleye kadar ses getirmemiştir (Pittenger et al., 1999). Friedestein ve Owen 1987-1988 yıllarında kemik iliği kök hücrelerine kemik kök hücresi adı verilmiştir (Bianco et al., 2008).

Kemik iliği kök hücre çalışmalarından yaklaşık 10 yıl sonra 1970 yılının ortalarında teratokarsinoma çalışmalarıyla beraber embriyonik kök hücre çalışmaları da başlamıştır. Teratokarsinoma denilen kompleks yapılu tümörlerde bir çok hücre hattı bulunmuştur (deri, kas, saç, diş) . Daha sonraki çalışmalarda bu hücre tiplerinin üç ayrı embriyonik germ tabakasından mezoderm, endoderm ve ektodermden türediği ortaya çıkartılmıştır (Andrews et al., 2005).

1981 yılında Martin Evans ve Matt Kaufman embriyonik karsinoma hücrelerinin biyolojisini anlamak için blastokist hücre kütlelerini kültür ortamına aldı ve en iyi embriyonik karsinoma hücre hattını elde ettmiştir. Bu başarıyı blastokistin iç hücre kitlesinin kültüre edilmesi takip ettmiştir. Normal karyotipte, pluripotent olan bu hücrelerin kültüre edilmesiyle embriyonik kök hücrelerin biyolojisinin önemli bir kısmını keşfetmiş oldu (Evans and Kaufman, 1981).

1981 yılından on iki yıl sonra, 1993 yılında Kanadalı bilim adamları embriyonik kök hücrelerin totipotensi özelliğini bulmayı başarmışlardır.

Embriyonik kök hücrelerden yaşayan bir fare üreterek embriyonik kök hücrelerin totipotensi özelliğini ispatladılar (Kang, 2011).

1994 yılında Arif Bongso ve arkadaşları Wisconsin Üniversitesi'nde yaptıkları çalışmalar ile ilk embriyonik kök hücre izolasyonunu gerçekleştirmişler; ancak embriyonik kök hücre kültürünü yapmamışlardır (Bongso and Lee, 2005).

1998 yılında James Thomson ve arkadaşları Wisconsin Üniversitesi'nde insan embriyonik kök hücrelerinin, 5 günlük embriyodan izolasyonunu ve kültürünü yapmışlardır. Bu hücrelerin limitsiz üreme özelliğinin olduğu ve birçok hücre tipine farklılaşabileceği saptanmıştır. Yine 1998 yılında John Hopkins Üniversitesi'nde, John Gearhart tarafından yapılan bir çalışma ile 9 haftalık bir fötüs kadavrasından insan embriyonik germ hücreleri elde edilmiştir (Cohen, 2007).

Embriyonik kök hücreler, 4-5 günlük embriyonun rahim duvarına yerleşmeden önceki safhası olan blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilirler. Bu safhada embriyo 150 hücreden meydana gelen ve dış kısmında yuvarlak bir daire oluşturacak şekilde dizilmiş hücreler (trofektoderm), sıvı dolu bir kavite (blastosel) ve iç kısımda, bir küme hücre içeren yapı şeklindedir. Gelişmekte olan bir fötüsün primordial germ hücrelerinden de embriyonik kök hücrelere benzeyen hücreler elde edilebilir (Thomson et al., 2012).

2006 yılında Japon araştırmacı Dr. Shinya Yamanaka'nın laboratuvarında somatik hücreler embriyonik kök hücre genlerini ifade edebilen pluripotent benzeri hücrelere dönüştürülmüştür. Bunlara indüklenmiş pluripotent hücre (IPSCs) adı verilmiştir (Takahashi and Yamanaka, 2006).

2008 yılında French ve arkadaşları blastokist içine somatik hücrelerin çekirdeklerini transfer ederek pluripotent kök hücre elde etmeyi başarmışlardır (French et al., 2008). 2008 yılında Chung ve arkadaşları embriyoyu parçalamadan pluripotent kök hücre elde edilebileceği görüşünü ortaya atmışlardır (Chung et al., 2008). Bu iki çalışma da göstermektedir ki herhangi bir etik sorunla karşılaşmadan ve immünreaksiyon sorunu olmadan kişilerin kendi hücrelerinden pluripotent hücreler elde edilebilir.

IPSCs keşfinden üç yıl sonra, 2009 yılında Kanadalı bilim adamları IPSCs hücrelerinden yaşayan bir fare üretmeyi başarmışlardır (Guhr et al., 2006).

Klinisyenler ve bilim adamları yıllarca kök hücre araştırmaları üzerinde çalışmışlardır. Günümüzde bu çalışmaların sonucunda iki önemli gelişme sağlanmıştır. Bunlardan bir tanesi Jamie Thomson ve arkadaşları tarafından somatik hücre çekirdeklerinin tekrar programlanıp embriyonik kök hücrelere somatik hücre çekirdeklerinin aktarılması ile yapılan hayvan klonlanması; bir diğeri ise tedavisi olmayan hastalıkların hücresel tedavi imkânıdır (Lovell-Badge, 2001). Gelişim biyolojisinin temelini oluşturan hydra'larda kök hücre biyolojisinin 6 önemli özelliği gösterilmiştir; (i) sınırsız üreme ve farklılaşma özelliği (ii) hücresel çevreden gelen sinyallere çok hızlı yanıt verebilme özelliği; (iii) Wnt ve Notch sinyal yollarının kök hücre davranışlarının kontrolündeki büyük önemi; (iv) terminal farklılaşmada kromatin modifikasyonun önemi; (v) kök hücre kaynaklarında farklılaşmanın gösterilmesi; (vi) kendi kendini yenilemenin kanser gelişimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Bosch, 2009).

Planaryaların yüksek rejenerasyon kabiliyeti araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Planaryalarda bulunan pluripotent, rejenerasyondan sorumlu hücrelere neoblast hücreleri denilmiştir. Planaryanın yüksek rejenerasyon kabiliyeti ve kültürünün kolay yapılması nedeniyle kök hücre araştırmalarında en çok kullanılan model organizmadır. Ayrıca planaryanın memeli kök hücrelerine yakın biyolojide olması, insan ve farede rejenerasyon çalışmalarına umut ışığı olmaktadır (Agata, 2008). Planaryadan sonra yassı kurtlar ailesinin diğeri bir üyesi olan *Macrostomum lignano* kök hücre biyolojisi çalışmalarında önemli bir model organizmadır. Gerek kültürünün kolay olması, gerek hücre sayısının az olması, şeffaf olması neoblast (rejenerasyondan sorumlu hücreler) adı verilen kök hücre çalışmalarını kolaylaştırmaktadır. *Macrostomum lignano* ile yapılan kök hücre çalışmalarında basit yapılı kurtlardan, yüksek organizmalı canlılara kadar kök hücre biyolojisine bilgi kazandıracak uygun model bir organizmadır (Pfister, 2007).

2.2 Kök Hücre Nedir?

Kök hücreler, canlı vücudunda diğeri hücrelerden farklı olarak bölündüklerinde kendini yenileyebilen, farklılaşmamış, *in vivo* ve *in vitro*

koşullarda istenilen doku hücrelerine farklılaşabilen özel hücrelerdir. İngilizcede ‘stem’ olarak geçen kök kelimesi, bitkilerin meristem dokusundaki bitki rejenerasyonundan sorumlu hücrelerin eski botanikteki terminolojisinden esinlenilmiştir. ‘Meristem’ kelimesi ‘stem’ kelimesine dönüştürülerek ‘stem cell’ kelimesi türetilmiştir. Memelilerde hasarlanan dokuların tamiri, farklılaşmamış dokulardan bağımsız önceden var olan kök hücreler ve doku öncü hücrelerin (progenütör cell) aktivasyonu yapılır (Choumerianou et al., 2008).

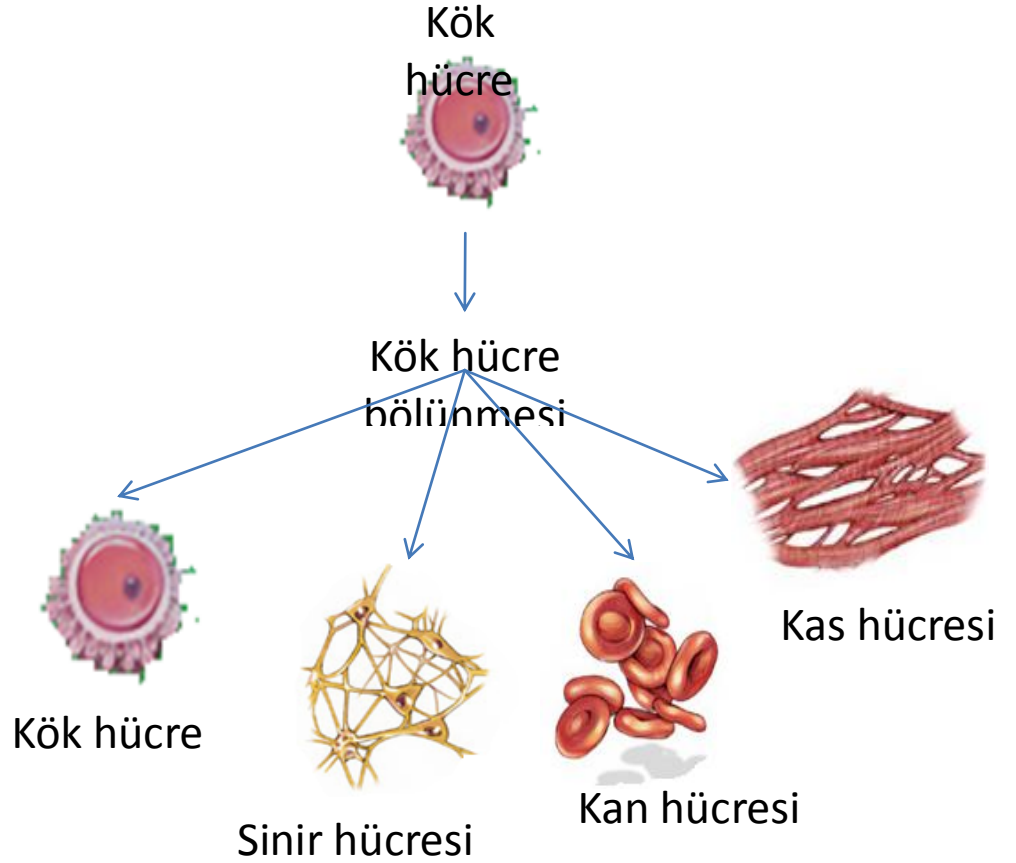
Kök hücreler sadece hasarlanan dokuların onarımından sorumlu hücreler değildir. Aynı zamanda canlının evrimsel süreçte kazanmış olduğu şekli almasını sağlayan hücrelerdir. Örneğin; bir bebek doğduğunda vücudundaki bütün organlar, gözleri, elleri, ayakları en küçük boyuttadır. Kök hücreler canlının yaşamı boyunca ürettiği, farklılaşmamış hücreler olmasına rağmen bebeğin gelişim süresince embriyonel gelişimde planlanan şekle aykırı bir farklılaşma göstermez (Khalturin et al., 2001). Vücudumuzda deri, karaciğer gibi bazı organların rejenerasyon yeteneklerini hayatımız boyunca kaybetmezken, diğer organların rejenerasyon özelliklerini kaybetmiş olmalarının sebebi hala bilinmemektedir (Institute of medicine, 1998).

2.3 Kök Hücrelerin Özellikleri

Kök hücrelerin özellikleri 3 ana başlıkta toplanabilir:

2.3.1 Kendini Yenileyebilme Özelliği

Kök hücreler *in vitro* ortamda kültüre alındıklarında somatik hücrelerden çok daha fazla üremektedirler. Kültür ortamında kök hücre popülasyonunun sayısı herhangi bir kanserleşme olmaksızın 160 kez iki katına çıkarken, normal vücut hücrelerinin popülasyonu sadece 60 kez iki katına çıkmaktadır. *In vivo* ortamda ise yetişkin kök hücrelerin üreme özellikleri canlının yaşam uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir (Cauffman et al., 2009). Kök hücreler asimetrik bölünmektedirler. Bölünme sonucu oluşan iki hücreden bir tanesi kök hücre özelliğindedirken bir diğeri farklılaşacağı dokuya ait hücrenin özelliğindedir. Bu özellikleri nedeniyle kök hücreler, bölündüklerinde kendilerini yenileyerek bir havuz oluştururlar (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Kök hücrelerin diğer yetişkin dokulara farklılaşırken kendini yenileyebilme özellikleri.

Ancak, sınırsız üreme özellikleri kanserleşmeyi de uyarabileceğinden hücrelerin sınırlayıcı kontrol mekanizmaları vardır. Kök hücrelerin kontrol mekanizmasını kök hücre nişinden gelen, hücre dışı sinyaller belirlemektedir (Molofsky et al., 2004). Kök hücrelerin asimetrik bölünebilme özelliklerini koruması hücreler arası maddeden gelen transkripsiyonel faktörlerle gerçekleşmektedir.

Yetişkin kök hücrelerin *in vivo* ve *in vitro* ortamda multipotent özelliğini korumasını sağlayan genler kaynaklarına göre farklılık göstermektedir. Örneğin kemik iliği kök hücrelerinin *in vivo* ortamda Scl, GATA-2, Bmi-1 genlerinin ifade olması farklılaşmasını engellerken, *in vitro* ortamda Hoxb4 genin ifade olması farklılaşmasını engellemektedir. İskelet kası kök hücreleri için Pax-7, nöral kök hücreler için nestin geni multipotent özelliğini belirleyen genlerdir (Willnut, 2009).

Embriyonik kök hücreler, canlıyı oluşturan doku ve organlara farklılaşabilen pluripotent kök hücrelerdir. *İn vivo* ve *in vitro* ortamda kendilerini yenileyerek pluripotent özelliklerini koruyabilmektedirler. Leukemia inhibitör faktör adı verilen LİF, embriyonik kök hücrelerin farklılaşmadan üremesini sağlayan IL-6 sitokin ailesinin önemli üyelerinden biridir. Sinyal reseptörü glikoprotein 130 (gp130)'dur. (Niwa et al., 2012) Gp130, hücre stoplazmasında bulunan LİF reseptör β (LİFR β) ile birbirine bağlıdır. Eğer ortamda LİF var ise gp130 reseptörüne bağlanır, stoplazmada bulunan LİFR β inaktive olur ve STAT3 ekspresyonu durur. Hücre farklılaşmadan üremeye devam eder. Bu yolağa da JAK STAT yolağı denilmektedir. Eğer ortamda LİF yoksa STAT3 molekülü östrojen molekülü ile bağlanır ve embriyonik kök hücrelerin pluripotent özelliği devam eder. Gp130 reseptörü bulunmayan farelerde embriyo hücrelerinin erken dönemde farklılaştığı görülmektedir (Heinrich et al.; Kunisada et al.,1998).

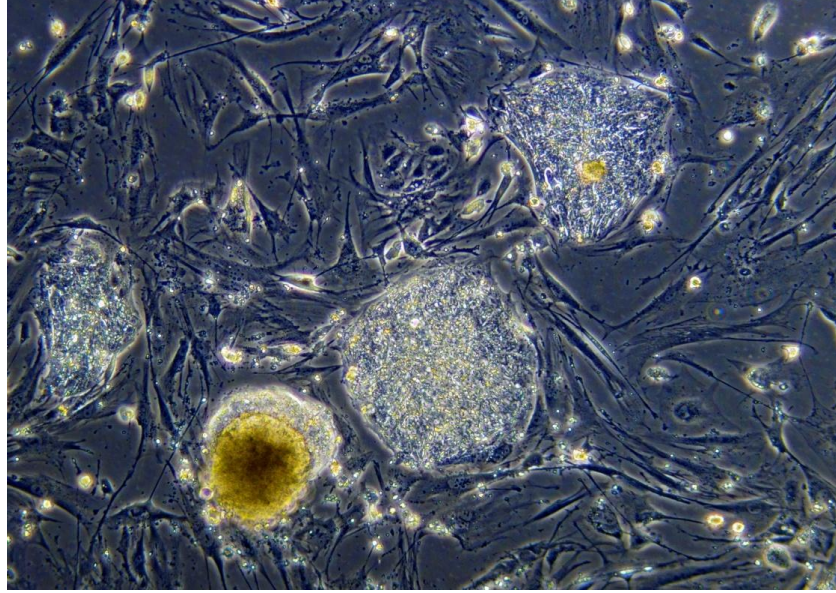
1990 yılında 3 farklı araştırmacı grup tarafından bir transkripsiyon faktörü POU (Pit-Oct-Unc) ailesinin bir üyesi olan Oct3/4 geni tanımlanmıştır (Latchman, 1999). Oct3/4 geni, embriyonun gelişim döneminde pluripotent ve totipotent özellikteki kök hücrelerde ifade olan bir genidir (Niwa et al, 2002; Shimosaki et al., 2003). Blastokist evresinde iç hücre kitlesinde Oct3/4 geni ifade olmazsa hücreler blastokistin trofoektodermine doğru farklılaşmaktadır, eğer Oct3/4 geni çok fazla ifade olursa hücreler primitif endoderme doğru farklılaşmaya gitmektedirler. Bu bilgiler doğrultusunda, Oct3/4 geninin ifade olma yoğunluğu hücrelerin pluripotent özelliğini kaybetmemesinde önemli olduğu söylenebilir. Oct3/4 geni LİF yokluğunda ifade edilemez ve hücreler farklılaşabilir ancak; LİF'in varlığında Oct3/4 geni ifade olmasa bile hücreler pluripotent özelliğini koruyabilmektedir (Masui et al., 2007).

Sox2, Oct3/4'ün kofaktörü olan sox ailesinin bir üyesidir. Sox2 geninin ekspresyonu, Oct3/4 ve sox2 nin ortamda varlığı ile regüle edilir, embriyonik kök hücreler pluripotent özelliğini koruyabilir (Takahashi and Yamanaka, 2006). Nanog, embriyonik kök hücrelerin pluripotent özelliğini korumayan transkripsiyon faktörüdür. Nanog ekspresyonu STAT3 tarafından regüle edilemez ve Oct3/4 ile yer değiştirebilen bir transkripsiyon faktörü değildir. Embriyonik kök hücrelerin LİF'in yokluğunda pluripotent özelliğini nanog ekspresyonu ile koruduğu düşünülmektedir. Nanog'un ifade olmadığı ortamda embriyonun öldüğü belirtilmektedir (Masui et al., 2007).

Embriyonik kök hücrelerde GATA 6 geninin ifade olması ile endodermal farklılaşma gerçekleşmektedir. Endodermal farklılaşma LİF ya da STAT 3 yokluğunda regüle edilirken nanog ekspresyonunun artması ile GATA 6 ekspresyonu baskılanır (Chambers et al., 2003).

2.3.2 Klon Oluşturabilme Özellikleri

Kök hücrelerin karakteristik özelliklerinden bir tanesi de tek bir hücreden klon oluşturabilmeleridir (Şekil 2.2). Kültür ortamında bir tane hücre üremesi klon oluşturması için yeterlidir (Cavaleri and Scholer, 2003).



Şekil 2.2: Embriyonik kök hücrelerinin kültür ortamında klon oluşturması (Protokol online, 2012).

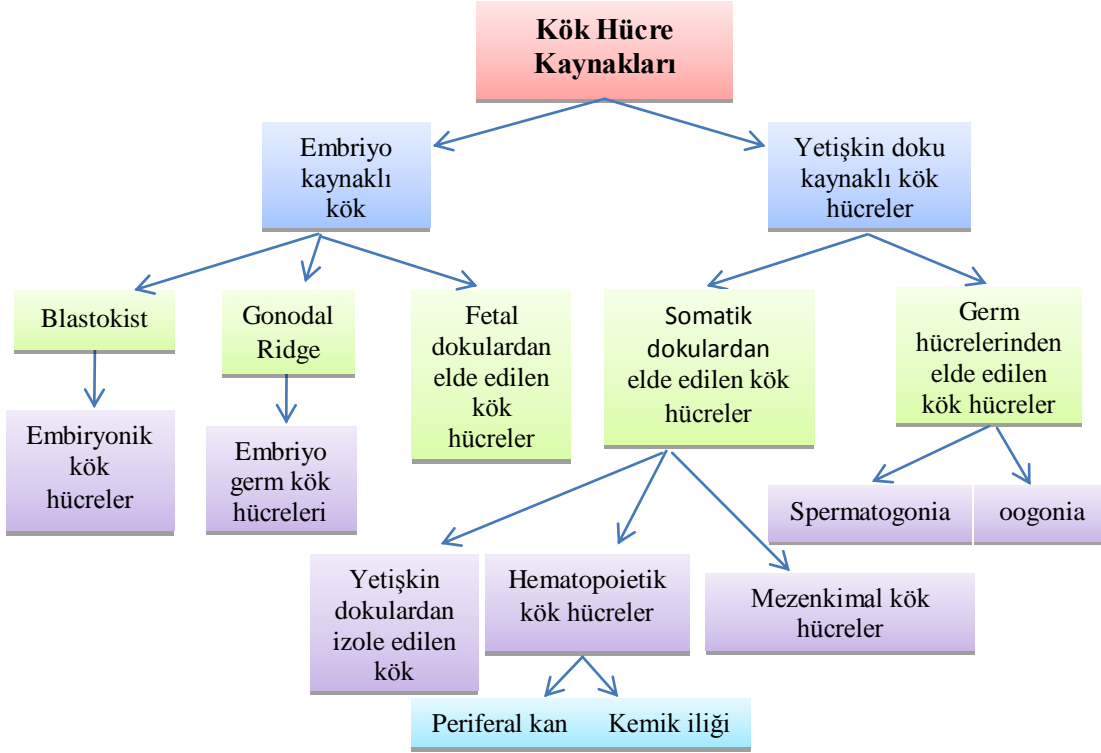
2.3.3 Farklılaşabilme Yeteneği

Kök hücreler uygun koşullar altında birçok farklı dokuların hücrelerine farklılaşabilme özelliğine sahiptirler ve bu özelliklerine göre kendi aralarında gruplandırılabilirler. Örneğin kök hücre canlıının tamamını oluşturabilme özelliğindeyse bu hücrelere totipotent kök hücre (Dries, 2004); eğer canlıının bütün doku ve organlarına farklılaşabilme özelliğindeyse bu hücrelere de pluripotent kök hücre denilmektedir. Farklılaşma özellikleri izole edildikleri dokuya göre sınırlanıyor ise bunlara da multipotent kök hücre denilmektedir

(Pittenger, 1999). Dolayısıyla kök hücrelerin izole edildikleri kaynaklara göre totipotent, pluripotent ve multipotent özellikte oldukları söylenebilir.

2.4 Kök Hücre Kaynakları

Kök hücreler kaynaklarına göre iki ana gruba ayrılırlar. 1- Embriyo kaynaklı kök hücreler, 2- Yetişkin doku kaynaklı kök hücreler (Şekil 2.3).

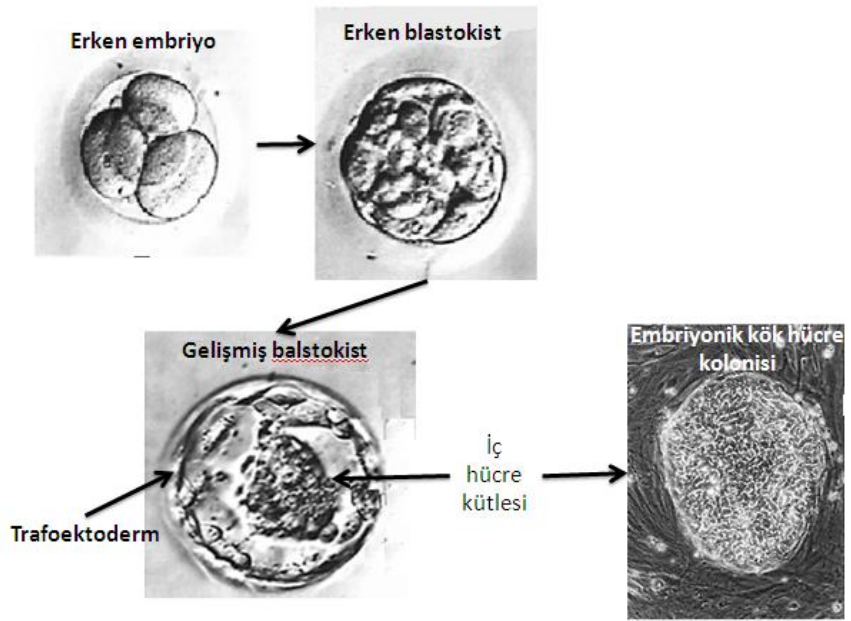


Şekil 2.3: Kök hücreler embriyonik ve yetişkin doku kaynaklı olmak üzere iki temel gruba ayrılırlar ancak embriyonik ve yetişkin doku kaynaklı kök hücrelerde kendi aralarında kaynaklarına göre ayrılmaktadırlar (İnan, 2009) .

2.4.1 Embriyonik Kök Hücreler

Dölllenmiş yumurta, bölünerek 2, 4, 8 hücreli hale gelip morula denilen küresel yapıyı oluşturmaktadır. Bölünme sonucu oluşan hücrelerin her biri, bir organizmayı oluşturabilecek özelliktedir. Bu özellikteki kök hücrelere totipotent kök hücre denmektedir (Dries, 2004). Zigot oluşumundan 5-6 gün sonra embriyo blastokist halini almaktadır. Blastokist yapısı içi blastosöl adı verilen sıvı ile dolu hücre küresidir. Bu hücre küresi iki farklı hücre tabakasından oluşmaktadır. Birinci hücre tabakası trofoektoderm adı verilen blastosöl sıvısını kaplayan, ince

epitelyal, trofobik hücrelerin oluşturduğu dış hücre tabakası; İkinci hücre tabakası da trofoektoderm tabakasının içinde blastosöl sıvısında bulunan iç hücre kütesidir. Embriyonik kök hücreler bu iç hücre kütesinin trofoektodermden ayrılıp kültüre alınması ile elde edilir. Kültüre edilen iç hücre kütesi pluripotent özellikteki kök hücrelerdir (Veeck and Zaninović, 2003). Embriyonik gelişim sırasında bu kök hücreler, hipoblast ve epiblast adı verilen iki tabakayı oluşturmaktadır. Hipoblast tabakası embriyonun gelişeceği amniyon sıvısını oluşturacakken epiblast tabakası mezoderm endoderm ve ektoderm tabakasına farklılaşır (Şekil 2.4) (Habib et al., 2007).



Şekil 2.4: İnsan embriyonunun blastokist yapısı (Veeck and Zaninović, 2003).

Embriyonik kök hücrelerin 3 karakteristik özelliği onları diğer hücrelerden ayırmaktadır. 1) Preimplante embriyodan elde edilir. 2) Uzun süre farklılaşmadan üreyebilir. 3) Üç farklı germ tabakasına farklılaşabilme özelliği ile dokuların oluşumunu inceleme olanağı sağlar.

İmplant olmamış blastokistin iç hücre kütesinden elde edilen insan pluripotent kök hücreleri yüksek telomeraz aktivitesi göstermektedir. Diplot somatik hücreler ile karşılaştırıldığında bu hücrelerin telomerlerinin canlılığın yaşına bağlı olarak kısaltıldığı söylenebilir (Thomson et al., 1998).

İnsan embriyonik kök hücrelerinin yüzey antijenleri (SSEA)-3, (SSEA)-4, (TRA)-1-60, (TRA)-1-81 ve alkalen fosfotazdır. Farklılaşmamış embriyonik kök hücreler (SSEA)-1 antikoru ile boyanmazlar; ancak farklılaştıklarında boyanabilmektedirler. İnsan embriyonik kök hücreleri ile fare embriyonik kök hücrelerinin yüzey antijenleri arasındaki fark (SSEA)-3 ve (SSEA)-4'dür. Fare embriyonik kök hücreleri bu antijenler ile boyanmaz (Marks, et al., 2012).

97 tane insan embriyosunun, iç hücre kütesinden (HUES)1, (HUES)2, (HUES)3, (HUES)17 olmak üzere 17 tane farklı embriyonik kök hücre hattı tanımlanmıştır. (HUES)1,(HUES)2, (HUES)4, (HUES)6, (HUES)7, (HUES)8, (HUES)9, ve (HUES)13, (HUES)14, (HUES)15, (HUES) 16 tanımlanmış hücre hattının ikilenme süresi 24-48 saat iken; sadece 3 tane embriyonik kök hücre hattının (HUES)3, (HUES)5 ve (HUES)10 ikilenme süresi yaklaşık 60-72 saattir. Karyotip analizinde insan embriyonik kök hücrelerinin (HUES)1, 2, 5, 6, 9, 12, 14 ve 15 hücre hatları 46 kromozomlu genotipi XX iken; (HUES)3, 4, 7, 8, 10, 11, 13, 16 ve 17 hücre hatları 46 kromozomlu genotipi XY' dir. (Draper et al., 2012).

2.4.1.1 Embriyonik Kök Hücre İzolasyonu

Blastokist tabakasından izole edilen embriyonik kök hücrelerin dış tabakası olan trofoektoderm, ekstraembriyonik germ tabakasına farklılaşabilme özelliğine sahip hücrelerden oluşmaktadır. Embriyonik kök hücreler, trofoblastın iç hücre kütesinden elde edilir. Bu hücreler embriyonik somatik ve germ hücrelerini oluştururken polar trofoblast denilen embriyonik kök hücre kütesi ile trofoblast hücreleri iletişim halindedir. Trofoblast hücreleri, ekstraembriyonik sıvıyı oluşturacak olan ektoderm hücrelerine, ektoplesantal hücrelerine farklılaşabilen kök hücrelerdir. Trofoblast kök hücreleri fötüse ait herhangi bir doku hücresine farklılaşmamaktadır (Lau and Rogers, 2004).

Embriyonik kök hücrelerin trofoblasttan eldesinde iki farklı yöntem kullanılmaktadır. 1981 yılında Evans ve Kaufman tarafından embriyonik kök hücrelerin eldesinde iki teknik kullanılmıştır: İmmunocerrahi ile izolasyon ve mekanik izolasyon (Kaufman et al., 1983).

İmmuno cerrahi yöntemi: Bu metot iç hücre kütesini blastokistten ayıran seçici bir yöntemdir. Öncelikle zona pellusida, pronaz veya benzeri zonayı

eritici enzimler ile uzaklaştırılır. Ardından embriyo anti-insan veya anti-fare serumu ile (blastokistin orijini ne ise ona uygun serum seçilmelidir) inkübe edilir.

Antikorun yıkanmasından sonra blastokist doğrudan uygun ortama alınarak trofoblastlar ortamdan uzaklaştırılıncaya kadar beklenir ve geride kalan iç hücre kitlesi mitozu durdurulmuş embriyonik fibroblast tabakası üzerine alınarak kültüre edilir. Bu yöntem, pluripotent kök hücrelerin eldesi için çok fazla zaman kaybedilen bir yöntemdir. Aynı zamanda hayvansal hücrelerin kontaminasyonu açısından da uygun bir yöntem değildir (Lorthongpanich et al., 2011).

Mekanik izolasyon: Embriyonik kök hücre hattı, direkt olarak zona pellusidası uzaklaştırılmış blastokistte trofoblastların iğne ucu ile mekanik olarak diseksiyonu veya zona pellusidası uzaklaştırılmış blastokistin direkt olarak mitozu inhibe edilmiş fibroblast tabakası üzerine konulması ile elde edilebilir. Eğer trofoblast hücreleri tamamen uzaklaştırılmamış veya bir kısmı uzaklaştırılmış ise, blastokist besleyici hücre tabakasına tutunur ve yassı hale gelir. Böylelikle iç hücre kitlesinin büyümesine izin veren çevrede yerleşmiş tek tabakalı trofoblast hücreleri gözlenir. İç hücre kitlesini oluşturan hücreler çoğaldığında oluşan koloni alttaki trofoblast hücrelerinden kolaylıkla ayrılabilir ve uygun büyüklüğe ulaştığında koloniyi oluşturan hücreler alınıp uygun ortama taşınabilirler (Vatansever, 2009).

2.4.1.2 Embriyonik kök hücrelerin üreme siklusu

Fare embriyonik kök hücrelerin üreme siklusları ile somatik hücrelerin üreme siklusları karşılaştırıldığında embriyonik kök hücrelerde G1 fazının somatik hücrelerin G1 fazından daha kısa olduğu görülmektedir. Embriyonik kök hücrelerin G1 fazı toplam mitozun sadece %15'ini oluştururken; S fazı %75'ini, G2/M ise %10'luk bir kısmını oluşturmaktadır ve bu süreç yaklaşık 1,5 saat sürmektedir (Fluckiger et al., 2006).

Memelilerin hücrelerinde G1 kontrol noktasından siklin D ailesinin üç üyesi ve siklin E ailesinin 2 üyesi sorumludur. DNA sentezinin başlaması G1 fazında siklin D ile CDK (siklin D kinaz) bileşiğinin fosforillenmesi ve retinoblastoma (RB: ilk tanımlanan retinal kanser tümör süpresör proteini) proteinin inaktive olmasına bağlıdır (Jin et al., 2010).

Embriyonik kök hücrelerde mitoz döngüsünün kontrol noktaları daha farklıdır. EKH'lerde D siklin promotorlarının aktivitesinin düşük olması nedeniyle D tip siklin kinaz enzimlerini çok az ifade ederler. Bu nedenle retinoblastoma fosforilasyonu somatik hücrelerin aksine G1 fazından S fazına geçerken değil mitozdan hemen sonra G1 fazında yapıldığı görüşmüştür. Ayrıca büyüme inhibitörü olan D:CDK4'ün inhibitörü PK16'ya karşı dayanıklıdır (Fleming et al., 1993). Dolayısıyla EKH'ler CDK4 öncülüğündeki RB fosforilasyonuna karşı da dayanıklıdır. Sonuçta, EKH'ler normal hücrelerden farklı olarak hücre bölünme kontrol yollarına sahiptir. EKH'lerde G1 kontrol noktası siklin D1 sentezinin uyarılması ve Ras-MAPK yolağının aktive olması ile gerçekleşmektedir. (Wong et al., 2009) RKs, siklin D1'i Ras-MAPK yolağını kullanarak aktive eder. EKH'lerde siklin D1'in fazla salınımını engellemek için *wortmannin* ve PD98059 salgılayarak siklin D1'in sentezini inhibe eder. Eğer siklin D1 sentezi belirli bir noktadan sonra inhibe olmazsa hücre farklılaşmaya gider (Dan et al., 2006).

Somatik hücrelerde DNA' da meydana gelen herhangi bir mutasyonda, kromozomal anomalilerde hücre p53 yolağını kullanarak apoptozise gider. Herhangi bir stres anında hücre çekirdeğinde p53 geni aktive olur ve bazı genlerin aktivasyonunu önler. Örneğin: p21, Mdm2, p21'i hücrede ifade olmaz RA fosforillenmesi engellenir ve hücre G1 fazından S fazına geçemez. Embriyonik kök hücrelerde de p53 geni sentezlenir ancak bu gen stoplazmada sentezlendiği için aktif olamamaktadır. Bu nedenle embriyonik kök hücrelerde p53 kontrol noktası yoktur (Bock et al., 2001).

2.4.2 Yetişkin Doku Kaynaklı Kök Hücreler

2.4.2.1 Somatik dokulardan elde edilen kök hücreler

Sperm ve yumurtanın dölleneninden meydana gelen embriyonun gelişmesiyle canlıya özgü doku ve organlar oluşmaktadır. Yetişkin dokulardaki bazı özel hücreler sınırsız üreme yeteneklerini kaybetmezler ve herhangi bir doku zedelemesinde, yaralanmalarda G0 fazına girerek dokuyu yenileyebilirler. Bu organlara en iyi örnekler karaciğer, deri fibroblast tabakası, epitel hücreleri ve kas doku hücreleridir. Bu dokuların büyük bir kısmı yaralansa ya da herhangi bir sebeple yok olsa dahi bu dokular kendi kendilerini hızlıca yenileyebilmektedirler.

Yetişkin dokulardaki farklılaşmış hücrelerin bölünme kapasitelerinin sürekli olmadığı ve farklılaşan hücrelerin vücutta tekrar farklılaşabilme kapasitelerinin olmadıkları bilinmektedir. Dolayısıyla doku rejenerasyonundan sorumlu hücreler hayvanın yaşamı boyunca yetişkin dokularında bulunan proliferatif, farklılaşma kapasitesindeki kök hücrelerdir (Holtzer et al., 1972).

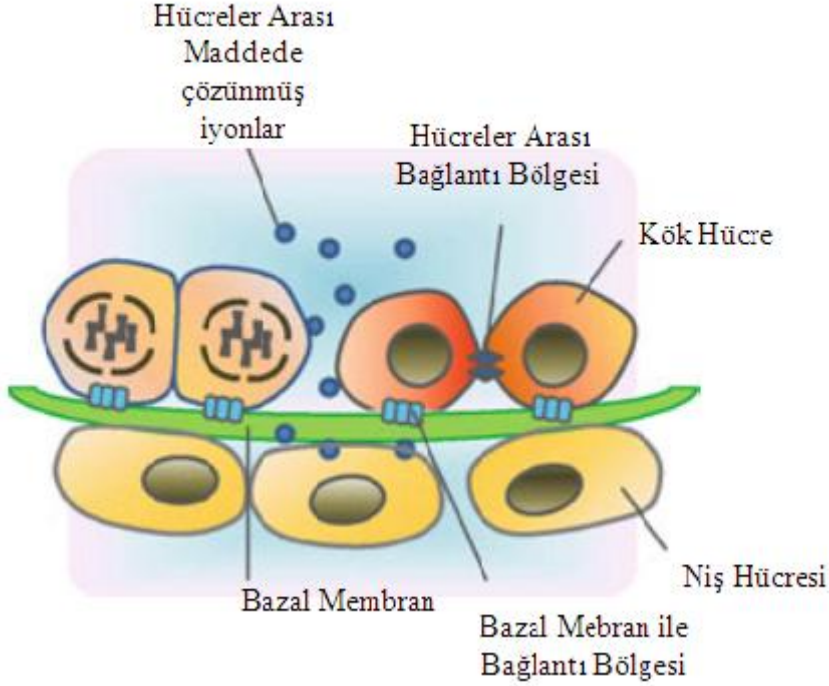
2.4.2.2 Kemik iliğinden elde edilen kök hücreler

Kemik iliği kök hücreleri, canlının doğumundan sonra kemik iliğinden elde edilen kondrosit, osteosit, miyelosit gibi hücrelere farklılaşabilme kapasitesinde olan hücrelerdir. Kemik iliğinden elde edilen hücre popülasyonu içerisinde iki tip kök hücre bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi kemik iliği stromal kök hücreleri (KİSKH); bir diğeri ise hematopoietik kök hücrelerdir. KİSKH'leri, *in vitro*' da yüzeye tutunarak klonal yapıda hızlı üreyen, kültüre edildikleri ortama eklenen kimyasallar ile çeşitli hücrelere farklılaşabilen fibroblast benzeri hücrelerdir.

Kemik iliği hematopoietik kök hücreleri ile KİSKH'leri *in vitro* ortamda kültüre edildiklerinde KİSKH'ler yüzeye tutunabilme özellikleri ile hematopoietik kök hücrelerden ayrılırlar. (Bender, 1991) KİSKH'lerinin *in vitro* kültürlerinde tanımlanan yüzey antijenleri CD10, CD13, CD29, CD44, CD49a-f, CD63, CD90, CD105, CD106, CD140b ve SB-102'dir. Kültüre edilmiş KİSKH'lerinde endotel hücrelerinin antijeni CD31, endotel progenitör hücrelerinin antijeni CD105 ve hematopoietik kök hücrelerin yüzey antijenleri CD45, CD3, CD14, CD11b, CD19, CD38 ve CD66b ifade olmamaktadır (Li and Xie, 2005).

2.5 Kök Hücrelerin Nişi

Kök hücrelerin buldukları doku içerisinde, hücrelerin yaşamını sürdürebilmesini sağlayan diğer hücrelere farklılaşabilmesini destekleyecek bir yaşam alanı vardır (Şekil 2.5). Bu yaşam alanı, dokudaki oksijen ve büyüme faktörlerinin hücrelere ulaşmasını sağlayarak hücrelerin birbiri ile iletişimini destekler. Hücreler arası maddenin oluşturduğu bu üç boyutlu ortama hücre nişi denilmektedir (Smith et al., 1988).



Şekil 2.5: Kök hücrelerinin in vivo ortamdaki nişinin şeması (Ray, 2010).

Kök hücreler buldukları ortamda farklılaşmadan bölünebilirken; diğer yandan da hedefteki dokuya farklılaşabilme özellikleri taşımaktadır. Bu iki özellik arasındaki dengeyi hücreler arası maddeden gelen sinyaller sağlar. Kök hücrenin kaderini, hücre-hücre, hücre-matriks etkileşiminden gelen sinyaller belirlemektedir. Özellikle kök hücreler, değişik dokulara farklılaşabilme özellikleri, hücrelerin hareketleri ve gelişimleri açısından kök hücrelerin nişi çok önemli rol oynamaktadır (Vallier et al., 2005).

Kök hücrelerin kendi kendilerini yenileyebilme özellikleri ekstraselüler matriksten gelen sinyallerle olmaktadır. Örneğin insan embriyonik kök hücrelerinin farklılaşmadan üreyebilmesi için bazal fibroblast büyüme faktörü (bFGF); fare embriyonik kök hücrelerinin farklılaşmaması için de lösemi inhibitör faktör (LİF) kullanılmaktadır (Nagy et al., 1993).

Embriyonik kök hücreler jelatin, matrijel kaplı kültür ortamına alınarak hücreler arası matriks ortamı sağlanabilir. Bunlara ek olarak, fare embriyonik fibroblast hücreleri (STO) kullanılarak hücreler için uygun matriks oluşturulabilir. STO hücreleri, salgıladıkları LİF ile kök hücrelerin farklılaşmadan üremesini sağlamaktadır (Takahashi and Yamanaka, 2006).

Kök hücrelerin kendi kendilerini yenileyebilme özelliklerinin yanı sıra farklılaşabilme özellikleri de hücreler arası maddeden gelen sinyallere bağlıdır. Kök hücrelerin hücreler arası madde ile arasındaki ilişki embriyogenez, doku farklılaşması ve tümörogez oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Hücreler arası madde bileşenleri hücre farklılaşmasını biofizyolojik ve biyokimyasal olmak üzere iki farklı yol ile sağlar. Hücreler arası matriksin üç boyutlu hidrofilik yapısını fibröz protein yapısı sağlar. Bu proteinler kollajen, fibronektin, laminin, elastin, vitronektin ve glikozaminoglikan adı verilen GAG'dır. GAG ekstraselüler matriksin viskoz yapısını sağlarken; kıkırdak dokuyu mekanik gerilime karşı koruyan proteinler kollajen ve elastini içerir (Metz, 2009; Kaptanoğlu and Attar, 2000). Bunlara ek olarak hücreler arası madde bir çok hücre adezyon moleküllerini de bulundurur. Bu moleküller hücrelerin tutunmasını ve üremesini sağlayan moleküllerdir. Hücreler arası maddenin kök hücrelerin farklılaşmasında rolü vardır. Doku ve organ gelişiminde progenitör hücrelerin dokuyu oluşturacak özel hücrelere farklılaşmasında, hücreler arası madde bileşenleri farklılaşma için direkt olarak gereklidir. Hücrelerin hücreler arası madde ile olan ilişkisi, farklılaşma aşamalarında çeşitli sinyal yollarının kullanılmasını sağlar (Engler et al.; Datta et al., 2006).

2.6 Kıkırdak Doku

Kıkırdak dokusu, embriyonun mezoderm tabakasında gelişen bir bağ dokudur. Kemik dokusu hariç diğer bağ dokulardan daha sert olmasına rağmen, bükülebilen esnek bir dokudur. Damarı, siniri bulunmayan bu dokunun matriks yapısı çok önemlidir. Embriyolojik gelişiminde önce mezenşim hücreleri bir araya gelerek mitozla bölünüp çoğalırlar. Oluşan bu hücre topluluğuna kıkırdaklaşma merkezi denir (Saris, 2002).

Kondroblastlar, kıkırdak matriksinin sentezinden ve salgılanmasından sorumludurlar. Kıkırdağın ileri gelişmesi ise interstisyel ve apozisyonel olarak iki şekilde devam eder. İnterstisyel tipte kıkırdağın içinden doku gelişirken; diğerinde çevre dokunun yine perikondriyumun kondrojenik aktivitesiyle dokunun gelişmesi söz konusudur. Mitozla çoğalan kondrositler interstisyel büyümeyi; perikondriyumdaki hücreler ise apozisyonel büyümeyi gerçekleştirirler (Sabatini et al., 2004). Her iki türdeki kıkırdaklaşma da gelişim çağına kadar devam eder.

Ancak perikondriyumun kondrojenik özelliği saklı kalır ve herhangi bir kırıkta hasarı durumunda rejenerasyonu sağlar. Kırıkta oluşurken dokunun ara maddesinin miktarı artar ve hücreler tek veya gruplar halinde birbirlerinden uzaklaşırlar. Olgun kırıkta hücrelerine kondrosit denir (Francis et al., 2000). Bu hücreler aktif yapıda olmayıp doku yenilenmesi sırasında kondroblastlara dönüşerek aktif hücre olurlar; yani sentez yapabilme özelliklerini kazanırlar. Hücrelerin etrafı sentez edilen ara madde ile çevrilmiştir, lifler ise daha azdır. Yapıdaki kollajen, hyaluronik asit, glikozaminoglikanlar ve glikoproteinler tüm kırıkta tiplerinde bulunan makromoleküllerdir. Ayrıca esnek özellikteki bir lif türü olan elastin de kırıkta (elastik kırıkta) yer almaktadır (Martin et al., 2010).

2.6.1 Kırıkta Dokunun Başlıca Görevleri

- 1.Yumuşak dokuları korumak ve desteklemek;
- 2.Eklemler yüzeylerinde bulunmasından dolayı kemik hareketlerini kolaylaştırmak;
- 3.Embriyonda kemiklerin ve iskelet sisteminin gelişmesine; ayrıca büyüme çağında özellikle uzun kemiklerin büyümesine yardımcı olmak;
- 4.Solunum sisteminde trakea, bronş gibi hava yollarının yapısına girerek kapanmalarına (kollaps) engel olmak.

2.6.2 Kırıkta dokunun Yapısı ve Fonksiyonu:

Yetişkinlerde kırıkta doku uzun kemiklerin yüzeylerinde, trake ve bronşlarda, burun, kulak, larinks, intervertebral disk'in yapısında bulunmaktadır. Kırıkta dokusu kırıkta doku hücreleri, fiberleri ve amorf zemin maddesi denilen jelimsi ve hiç hücre içermeyen yapısında proteoglikan, su ve matriks proteinleri içeren bir yapıdan oluşmaktadır. Kırıkta doku hücresiz maddenin çok bulunduğu, kan damarı ve sinirlerin bulunmadığı bir dokudur (Vinatier et al., 2009). Kırıkta dokunun en karakteristik özelliği fetal dönemdeki iskelet yapısının kırıktan oluşmasıdır. Yetişkinlerdeki birçok kemik fetal dönemde kırıkta yapıdadır.

Tanımlı üç tip kırıkta doku bulunmaktadır:

Hiyalin kıkırdak, fibröz kıkırdak, elastik kıkırdak. Hyalin kıkırdak, insan vücudunda baskın olarak bulunan mavimsi bir dokudur. Kemiklerin eklem bölgelerinin yüzeyinde, kaburgaların ventral kısımlarında, trake ve larinksin yüzeyinde bulunan dokudur. Hyalin kıkırdak, aynı zamanda gelişme dönemindeki çocuklarda ve fütüste kemiklerin epifiz uçlarını sarmaktadır (Cameron et al., 2009).

Elastik kıkırdak, dış kulağın yapısında, kulak kepçesi ve işitme yolunda bunlara ek olarak küçük dilin yapısında, östaki borusunda ve larinksin bir kısmında bulunmaktadır. Asıl görevlerinden biri, vücudumuzdaki tüplerin lümenlerini sararak bu dokulara elastiklik katmasıdır (Hollander et al., 2010).

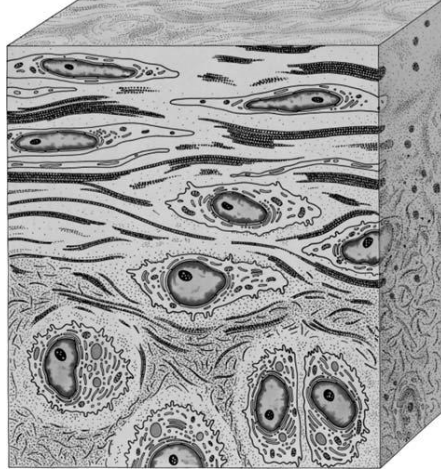
Fibröz kıkırdak omurgaların yapısında, kasık kemiğinde, geniş eklemlerin yapısında ve eklemlerin tendonlara bağlandıkları noktalarda bulunmaktadır. Gelişmiş bir kıkırdak dokuda, dokuyu oluşturan hücreler dokunun sadece %2'sini oluşturmaktadır. Bu durumun tersi fetal dokuda görülebilmektedir. Fetal kıkırdak dokuda hücre yoğunluğu fazla iken; yaşa bağlı olarak hücreler azalmaktadır (Meyer and Wiesmann, 2006).

2.6.3 Kıkırdak Doku Hücreleri Kondrositler

Kondrositler ekstraselüler matriksi oluşturan ve varlığını bu maddenin içinde sürdüren özelleşmiş hücrelerdir. Kıkırdak dokuda kondrositlerin birbiriyle olan ve ekstraselüler matriks ile olan etkileşimi kıkırdak doku homeostazisi, gelişimi, dokunun farklılaşması ve canlılığını devam ettirebilmesi için çok önemlidir (Loeser, 2000). Kondrosit hücrelerinin yüzey reseptörlerinden integrin ailesi, hücre- hücreler arası madde ilişkisinde önemli bir rol almaktadır. Kondrosit yüzeyinde ifade olan bu integrin ailesi reseptörleri fibronektin (alfa5beta1), tip II ve VI kollajen (alfa1beta1, alfa2beta1, alfa10beta1), laminin (alfa6beta1), vibronektin ve osteopontindir (alfa5beta3). İntegrin, bağlı hücreler arası maddenin gen ifadesini uyararak kondrosit fonksiyonunu düzenlerler (Guilak et al., 1999).

Eklem kıkırdak dokusu elektromikroskopi ile incelendiğinde; dokunun 3 farklı tabakadan oluştuğu görülmektedir. Süperfisiyal tabaka, hücrelerin karakteristik olarak birbirine paralel durduğu kıkırdak dokunun yüzeyinde olan dokudur. Orta tabakada, hücreler yuvarlaktır ve en alt tabakada ise hücreler

sütunlar halinde düzlemselleşerek yüzeye dik bir yapı oluşturmaktadırlar (Şekil 2.6) (Loeser, 2000).



Şekil 2.6: Kıkırdak dokunun 3 farklı tabakasındaki hücreler (MBBS Medicine, 2012).

Kondrositler, oval şekilli boyutları eklem kıkırdağında 10 μm hiyalin kıkırdakta ise 30 μm arasında değişen hücrelerdir. Hücreler lakün adı verilen kuyucukların içlerine yerleşirler ve hücreler arasındaki sınırlar çok keskin bir şekilde bellidir. Hücrelerin membran yüzeylerini artırmak için membranında girintileri ve çıkıntıları bulunmaktadır. Monosilyum denilen yapılar yetişkin kıkırdakta çok nadir görülmektedir (Hirsch et al., 1997). Genellikle fetal kıkırdak doku hücrelerinde monosiller bulunmaktadır. Kondrosit çekirdekleri yetişkin bir dokuda düzensiz, loblu ve mitoz bölünme özelliğini kaybetmiştir. Hücre sitoplazmasında en belirgin olarak görülen organel, granüllü endoplazmik retikulum ve Golgi cisimciğidir. Bu iki yapıda proteoglikan, kollajen sentezinden sorumlu organellerdir. Lizozomlar hücre içi ve hücre dışı sindirimden sorumlu organellerdir (Ofek et al., 2009). Kıkırdak doku hücrelerinde lizozom yapısı daha çok hücre dışı sindirimden sorumludur. Ekstraselüler matrikste lizozom enzimleri ile sindirime uğramış besin, endositozla hücre içine alınır. Hücre içi lizozomal vakoulde sindirimi tamamlanır. İmmatür kondrositlerde mitokondri sayısı oldukça fazladır (Kato, 1988). Ancak gelişmiş kondrositlerde mitokondrilerin sayısı az ve boyutları küçüktür. Dolayısıyla yetişkin kıkırdak doku hücrelerinin oksijenli solunum yapma oranı daha düşüktür. Glikojen ve lipit içermeleri kondrositlerin ortak özellikleridir (Kato and Iwamoto, 1990). Glikojen, epifizyal büyümede

organik fosfat kaynaklarından biri olabilir ya da matriks sentezlenirken ham madde olarak kullanılabilir. Kondrositlerde NAD/NADH dengesinin sağlanabilmesi için hücre sitoplazmasında bulunan lipidlerin sentezi reoksidasyon için önemli bir koenzim olabilir (Scott and Scuderi, 2011).

Yağ globülleri, eklem kıkırdak dokusundaki hücrelerde hiyalin kıkırdaktakinden daha küçüktür. Son araştırmalar göstermektedir ki; kıkırdak dokusunun üst kısmında bulunan hücrelerde lipid fazlalığı nedeniyle meydana gelen tıkanıklık, hücrelerin ölümüne ve lipoartrit hastalığına neden olmaktadır (Peterson et al., 2003).

2.6.4 Kıkırdak Doku Dejenerasyonu ve Tedavisi

Kıkırdak hasarı bazen travmatik bir olay bazen de bir başka rahatsızlık neticesinde gelişir. Kıkırdak doku, organizmada rejenerasyon kabiliyeti en zayıf dokulardan biridir. Bunun nedeni; eklem kıkırdağında travmatik bir lezyon oluştuğunda organizmanın oluşan hasarı fibroz kıkırdak dokusu ile onarmasıdır (Buckwalter and Mankin, 1998). Eklem kıkırdak defektlerinde hiyalin kıkırdak yerine fibroz kıkırdak gelişimi bölgedeki defektin daha kronikleşmesine ve ilerleyen dönemlerde artrozisle sonuçlanmasına neden olmaktadır. Yaklaşık 2 yüzyıldan fazla süredir eklem kıkırdağı hasarı hekimler için büyük sorun teşkil eder ve aynı zamanda bir kez dejenere olduğunda tekrar tamir edilememektedir (Brittberg et al., 1994).

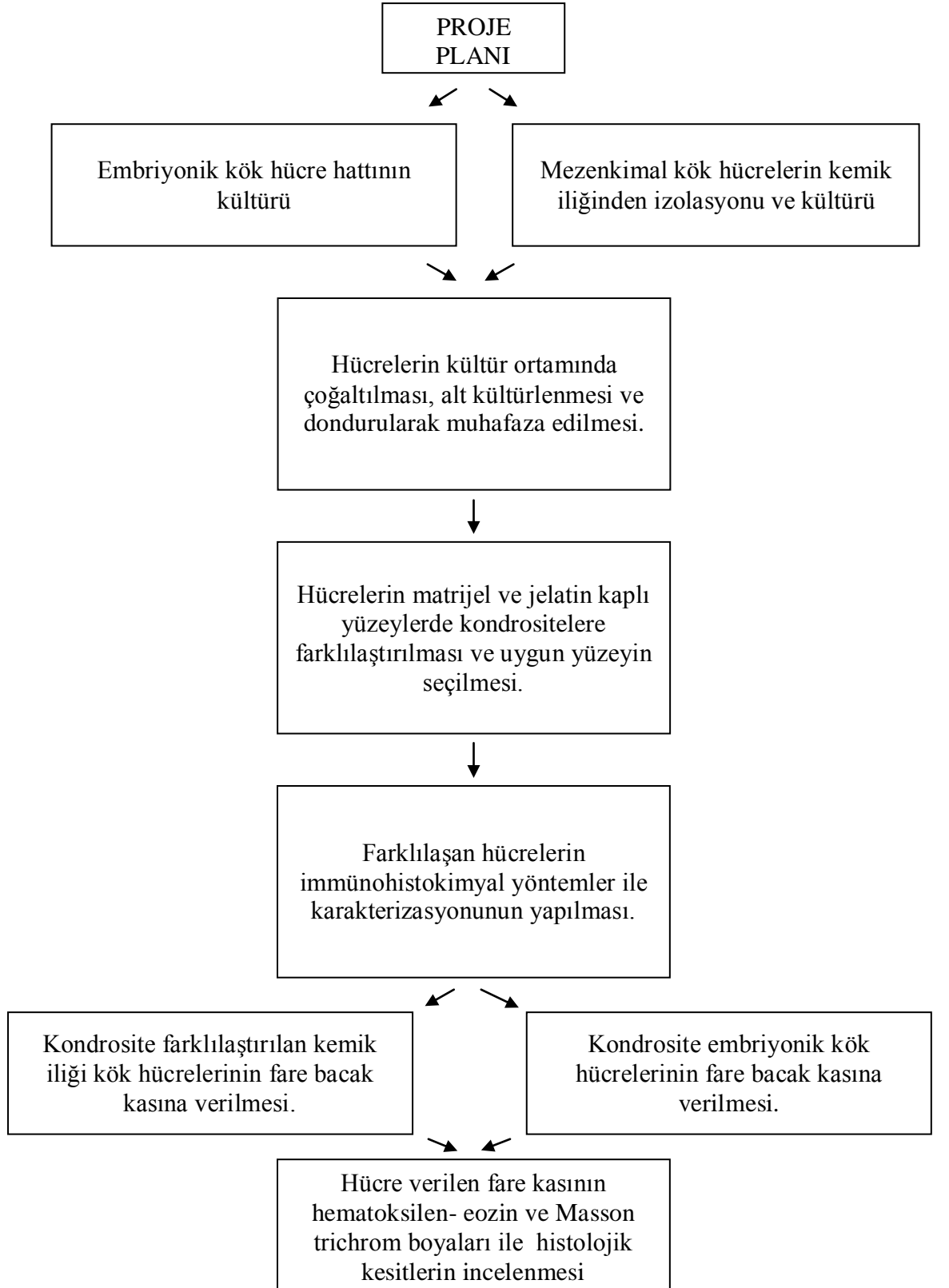
Kıkırdak dokusu, hem embriyonik hem de erişkin yaşamda endokondral ve perikondral ossifikasyonu sağlayarak kemiğin gelişimine yardımcı olur. İlaç tedavisinin yanı sıra hücre sel tedavinin son yıllarda kullanılması ile kök hücre ve farklılaştırılan hücrelerin *in vitro* kullanımları da ön plandadır. Doku mühendisleri, *in vitro* doku kültürü yöntemlerini kullanarak yaşa bağlı kıkırdak dejenerasyonunda ve yaralanmalarında, asıl kıkırdak dokunun normal fonksiyonlarını geri kazanabilmesini sağlamayı amaçlamışlardır (Lee et al., 2004). Hem embriyonik hem de mezenşimal kök hücrelerin kondrositlere farklılaştırılma potansiyelleri farklı çalışmalarda gösterilmiştir (Hegert et al., 2002).

3. MATERYAL ve METOT

Bu projede özetle;

- (1) Fare kemik iliğinden kök hücre izolasyonu ve üretimi gerçekleştirildi;
- (2) Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'nda stokta bulunan fare embriyonik kök hücrelerin üretimi gerçekleştirildi;
- (3) Embriyonik ve kemik iliği kök hücrelerinin üreme özellikleri belirlendi;
- (4) Matrijel ve jelatin üzerinde kondrositlere farklılaştırılması yapıldı;
- (5) Farklılaşan kök hücreler immünohistokimyasal boyama ile incelendi;
- (6) Kondrosite farklılaştırılan kemik iliği kök hücrelerinin ve embriyonik kök hücrelerinin fare bacak kasına transferi ile *in vivo* analizi;
- (7) *In vivo* ortamda daki kondrositler Masson trikrom ve hematoksilin-eozin boya ile incelendi (Şekil 3.1).

Bu tez çalışmasında kullanılan embriyonik kök hücre hattının kültürü ve stoklanması ve karakterizasyonunun bir kısmı, Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Bölümü'nde, diğer çalışmalar ise Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Grubu Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1: Proje izlenilen çalışma yol izi.

3.1 Fare Kemik İliğinden Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

Çalışmada kullanılan 2 adet ergin Balb/c fare, Ege Üniversitesi. Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden temin edildi. Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan izin ile (Etik kurul No: 2010-110) HELSİNKİ bildirgesine uyularak hayvanlardan örnekler alındı.

1. Çalışma laminar akışlı kabin (HERA Safe, Heraeus, Almanya) içerisinde gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce kabinin sterilizasyonu UV ışını ile yapıldı.

2. Fare diseksiyonunda kullanılacak olan diseksiyon malzemelerinin bir gün öncesinden otoklavda (121°C de 45 dk.) sterilizasyonu yapıldı.

3. Çalışma sırasında kullanılacak olan malzemelerin yüzey sterilizasyonu için iki adet 100 ml' lik şişeye %70'lik alkol ilave edildi.

4. 3 adet petri kabına dokuların fizyolojik ortamdaki özelliklerini koruması için kullanılacak olan PBS (fosfat tampon solüsyonu) koyuldu.

5. Ketamin/ksilazin bileşimi ile bayıltılan fareler servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Dış yüzey sterilizasyonunun sağlanması için fare, %70'lik alkol içerisine batırıldı.

6. Bu aşamadan sonra çalışmalara laminar akışlı kabin içerisinde devam edildi.

7. Fare, bir pens ile kuyruğundan tutularak alkolden arındırıldı.

8. Fare, sırt üstü petri kabı içerisine yatırılarak arka bacakları üst deriden ayrıldı.

9. Farenin arka bacakları vücuda bağlandığı bölgeden kesilerek PBS (Fosfat tampon solüsyonu) içeren Petri'ye aktarıldı. Petri kabındaki PBS solüsyonu birkaç kez değiştirilerek bacaklar yıkandı.

10. Her iki bacadaki femur kemikleri çıkarıldı. Tibiya kemikleri çok ince olduğu kök hücre izolasyonunda kullanılmadı.

11. Femur kemiğini saran kas dokusu PBS içeren petri kabında kemikten olabildiğince temizlendi.

12. Temizlenen kemikler PBS içeren başka bir kaba aktarıldı.

13. İnsülin enjektörleri hücre kültür ortamı ile doldurularak hazırlandı.

14. Kemiklerin sadece tek epifiz ucu kesildi.

15. Tek epifiz ucu kesilen femur kemiğinin iç kısmına insülin enjektörü sokularak kemiğin içi enjektörle çekildi. Enjektör içeriği 15 ml'lik falkon tüp içerisine aktarılırken enjektör değiştirilmeden aynı enjektör ile hücre kültür ortamı çekilip kemiğin içeriği tekrar enjektör içerisine çekildi. Tüm kemik iliğinin alınmış olduğundan emin olununcaya kadar işleme devam edildi.

16. Tüm kemik ilikleri aynı tüpe toplandı.

17. 1000 rpm'de +4°C' de 5' santrifüj (Eppendorf, 5810 R, Almanya) edildi.

18. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant döküldü ve hücreler 15 ml hücre kültürü ortamı ile süspanse edilerek tekrar 1000 rpm'de +4°C'de 5' santrifüj edildi.

19. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant döküldü. Hücreler α -MEM (HyClone MEM Alpha Modification, Cat NO:SH30265.01), %15 FBS (fötal sığır serumu, Biochrome KG, Cat No:S0115), %1 L-glutamin (Biochrome AG, Cat No:K0283, Berlin-Almanya), %1 gentamisin (HyClone, Cat. No:SV30080, Utah), %0.1 P/S (Biochrome AG, Cat No: A2213, Berlin-Almanya) içeren hücre kültür ortamı içerisinde süspanse edildi.

20. 2 adet 25 cm² yüzeyli kültür kabına (Grenier Bio-One GmbH, Frickenhausen) 2.5 ml olacak şekilde aktarıldı. Ortam ile 5 ml'ye tamamlandı.

21. 37 °C'de %5 CO₂' li %99 oranında nem sağlayan inkübatöre kaldırıldı.

22. Hücreler inkübasyona (HERA Cell, Heraeus, Almanya) bırakıldı. İlk hücre kültür ortamı değişimi kültürasyon başlangıcından 3 gün sonra yapıldı.

23. Hücrelerin üremesine göre kültür kabının %75'i kaplandıktan sonra pasaj yapıldı.

3.2 Hücrelerin Pasajlanması / Dondurulması

Hücrelerin hücre kültürüne optimizasyonu denemelerinde pasajlama özellikleri belirlendi ve genel işlemler aşağıda verilen bilgiler doğrultusunda gerçekleştirildi:

1. Kullanılmış ortam çekildi ve 4ml PBS/25 cm² yüzey alanı oranında eklendi.
2. PBS tamamen çekildi ve 600 µl tripsin-EDTA (1:60, EDTA-tripsin, EDTA: Biochrome AG, L2113, tripsin 1/250, %0.25 (w/v) Biochrome AG, Cat No:L2123, Berlin-Almanya) eklendi. Yüzeğe yayılarak 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 2-4' arası bekletildi.
3. Tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendikten sonra 600 µl tripsin-EDTA 6 ml ortam ile seyreltilerek santrifüj tüplerine toplandı ve 800 rpm'de 5' santrifüj edildi. Hücreler 1:3 oranında yeni doku kültürü kaplarına aktarıldı.
4. Dondurulacak hücreler santrifügasyon sonrası hücre kültür ortamı ile homojenize edilerek sayıldıktan sonra 300.000 – 600.000 hücre / ml dondurma ortamı (%90 FBS + %10 DMSO (dimetilsülfoksit, CryoSure-DMSO, WAK-Chemie Medical GMBH, 1.1-33-30215) olacak şekilde dondurma tüplerine aktarıldı.
5. Gece boyunca -86 °C'de köpük kap içerisinde bekletildikten sonra -196 °C'de azot tanklarına kaldırıldı.

3.3. Fare Embriyonik Kök Hücrelerinin Kültürü

3.3.1. Jelatin Solüsyonunun Hazırlanması

1. %0,1 oranında jelatin (Sigma, Cat No: G-9391, St. Louis, USA) tartıldı.
2. Distile suda çözdürüldü.

3. Hazırlanan jelatin solüsyonu 121⁰C'de 20' otoklavlanarak sterilizasyonu sağlandı.
4. Sterilizasyonu yapılmış olan jelatin solüsyonu 24 gözlü hücre pleytlerinin her bir gözüne 500 µl olacak şekilde döküldü.
5. 24 gözlü pleytler 2 saat boyunca 37⁰C'de CO₂' siz inkbatörde inkübasyona bırakıldı.
6. 2 saat sonunda pleytler laminar kabine alındı. Üzerindeki fazla jelatin çekildi.
7. Pleytlerin sterilizasyonun bozulmamasına dikkat edilerek daha sonra kullanılmak üzere +4⁰C' ye kaldırıldı.

3.3.2 STO Besleyici Tabakasının Hazırlanması ve Kültürü

1. Daha önce +4⁰C'ye kaldırılmış olan jelatin kaplı petriler çıkartıldı. Üzerlerine 1ml STO kültür vasatı 4500 mg/L glukoz ve sodyum purivat içeren Dulbecco' s modified Eagle' s medium (DMEM, Biochrom AG, Cat No: F0445, Berlin-Almanya), %15 fötal sıgır serumu (FBS, Biochrom AG, Cat No: S0113, Berlin-Almanya), %1 L-glutamin (Biochrom AG, Cat No: K0283, Berlin-Almanya), % 1 Penisilin/streptomisin (Biochrom AG, Cat No: A2213, Berlin, Germany), konuldu.
2. Pleytlerin hepsi 37⁰ C , %5 CO₂'lik inkübatöre konularak inkübasyona bırakıldı.
3. Ege Üniversitesi Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'nda sıvı azot tankında stok olarak bulunan STO (fare embriyonik fibroblast hücreleri) sıvı azot tankından alınıp hücreler doğrudan 37⁰ C sıcak su banyosu içerisinde çözüldürüldü.
4. Stok hücre (1ml), 5ml STO kültür vasatı ile, 15ml'lik santrifüj tüpüne alındı.
5. 1000 rpm'de +4⁰C' de 5' santrifüj (Eppendorf, 5810 R) edildi.
6. Santrifüj edilen 15ml'lik tüplerin süpernatant kısmı atıldı. Örnek 6ml STO vasatı ile süspanse edildi.
7. İnkübatörde bulunan jelatin kaplı 6 gözlü pleytlerin her bir gözüne 1ml olacak şekilde hücreler dağıtıldı.

8. Her iki günde bir kültür vasatı değiştirilerek hücreler kültür kabı yüzeyini kaplayıncaya kadar kültürüne devam edildi.

9. Yeterli hücre sayısına ulaşıldığında STO hücrelerinin bir kısmı, daha sonra kullanılmak üzere donduruldu.

10. STO hücrelerinin kalan kısmı da 1:3 oranında pasajlanarak kültüre edildi.

11. Pasajı yapılan STO hücreleri yüzeyi tamamen kapladıklarında mitomisin-C (MIT-C, Applichem, Cat No: A21900002, Darmstadt-Almanya) içeren vasat ile (100µg/ml) muamele edildi ve 2,5 saat inkübasyona bırakıldı.

12. İnkübasyonsonunda MIT-C'li vasatın tamamı çekildi. Hücrelerin yüzeyi PBS ile birkaç kez yıkandı ve bu hücrelerin üzerinde embriyonik kök hücrelerin kültürüne başlandı.

13. Embriyonik kök hücreler ile MIT-C ile muamele edilmiş STO hücrelerinin kültürüne eş zamanlı devam edildi.

3.3.3 Embriyonik Kök hücrelerin Kültürü

1. STO-MitC hücreleri mikroskopta incelendi. MitC-STO hücrelerinin hücre kültür ortamı çekildi. Üzerlerine 1ml Embriyonik kök hücre kültür ortamı [4500 mg/L glukoz ve sodyum purivat içeren Dulbecco' s modified Eagle' s medium (DMEM, Biochrom AG, Cat No: F0445, Berlin-Almanya) , % 15 fötal sığır serumu (FBS, Biochrom AG, Cat No: S0113, Berlin-Almanya), % 1 L-glutamin (Biochrom AG, Cat No: K0283, Berlin-Almanya), % 1 Penisilin/streptomisin (Biochrom AG, Cat No: A2213, Berlin-Almanya), 0.1 mM Non-essential amino asid (NEAA, Biochrom AG, Cat No: K0293, Berlin-Almanya), 10⁻⁶ M β-mercaptoethanol (Sigma, Cat No: M7522, St. Louis, USA) ve 1000 U/ml lökemia inhibitor faktör (LIF, Sigma, Cat No: L5158, St. Louis, USA) konuldu. İnkübatöre kaldırıldı.

2. Celal Bayar Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültür Laboratuvarı'nda sıvı azot tankında stokta bulunan embriyonik kök hücrelerden (EKH) 2 ampül alındı.

3. Her bir EKH vialı bir göze olacak şekilde 2 tane MitC-STO li göze EKH aktarıldı.

4. Her iki günde bir vasatları değiştirildi. Mikroskopta gözlemlendi.
5. Yeterli miktarda hücre elde edildiğinde daha sonra kondrojenik farklılaştırmada kullanılmak üzere dondurularak kaldırıldı.

3.3.4 Embriyonik Kök Hücrelerin Pasajlanması

1. MIT-C-STO kaplı 6 gözlü hücre kültür kablarının her bir gözüne EKH kültür ortamı konularak inkübatöre kaldırıldı.
2. ES hücrelerinin üzerine 500 µl tripsin ilave edildi. İnkübatöre kaldırıldı. 5dk bekletildi.
3. Hücrelerin kalkıp kalkmadığı mikroskopta gözlemlendi.
4. Hücreler kalktığını mikroskopta gözlemledikten sonra her bir göze 5ml ES kültür ortamı olacak şekilde 15ml'lik santrifüj tüpe hücreler toplandı.
5. Hücreler 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
6. Tüp üzerindeki süpernatant atıldı. Hücreler 6ml ES kültür ortamı ile süspanse edildi.
7. Daha sonra 6 gözlü pleytin her bir gözüne 1ml olacak şekilde dağıtım yapıldı.
8. Hücrelerin her iki günde bir vasatı değiştirilip mikroskopta gözlemlendi.

3.3.5 Damla Metodu ile Embriyoblast Oluşturulması

1. Embriyonik kök hücreler tripsin ile 37⁰ C , %5 CO₂'li inkübatörde 5' boyunca inkübe edildi.
2. Hücrelerin 5' sonunda yüzeyden kalktığı mikroskopta gözlemlendi.
3. Kalkan hücreler embriyonik kök hücre ortamı ile toplandı ve hücre sayımı yapıldı.

4. Her bir damlada 5×10^3 hücre olacak şekilde 20 µl hücre 25 cm² lik kültür kaplarının kapaklarına kondu. Petri içerisine ise 2 ml steril PBS konuldu petri kapağı dikkatlice kapatılarak inkübatöre kaldırıldı.

5. Petriler 48 saat hiç kısırdatılmadan 37⁰ C , %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.

6. Süre sonunda damlalar embriyonik kök hücre kültür vasatı ile yıkanarak oluşan embriyoblastlar steril pastör pipeti ile toplandı.

7. Eş zamalı hazırlanmış olan STO-MIT-C hücre tabakası üzerine her bir gözde en az 3 embriyoblast olacak şekilde 6 gözlü pleyte ekim yapıldı.

8. Her bir göze 2 ml embriyonik kök hücre farklılaştırma kültür ortamı eklenerek inkübatöre kaldırıldı.

3.4 Hücrelerin Pasajlanması/Dondurulması

Hücrelerin hücre kültürüne optimizasyonu denemelerinde pasajlama özellikleri belirlendi ve genel işlemler aşağıda verilen bilgiler doğrultusunda gerçekleştirildi:

1. Kullanılmış ortam çekildi. Kullanılan petrinin yüzeyini kaplayacak kadar PBS solüsyonu eklendi.

2. PBS tamamen çekildi ve 25 cm²'lik flask için 600 µl (1:60, EDTA-tripsin, EDTA: BiochromeAG, Cat No: L2113, tripsin 1/250, %0.25 (w/v) Biochrome AG, Cat No:L2123, Berlin-Almanya), 6 gözlü pleytler için 100 µl tripsin eklendi. Yüze yayılarak 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 2-4' arası bekletildi.

3. Tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlendikten sonra 600 µl tripsin-EDTA, 6ml ortam ile seyreltilerek, 100 µl tripsin-EDTA 2ml ortam ile seyreltilerek santrifüj tüplerine toplandı.

4. Hücreler 800 rpm'de 5' santrifüj edildi. 1:3 oranında yeni doku kültürü kaplarına aktarıldı.

5. Dondurulacak hücreler santrifügasyon sonrası hücre kültür ortamı ile homojenize edilerek sayıldıktan (Neubaer, ISOLAB, Laborgerate, Wertheim-

Almanya) sonra 300.000 – 600.000 hücre / ml dondurma ortamı (%90 FBS + %1) DMSO (Dimetilsülfoksit (CryoSure-DMSO), WAK-CHEMIE MESDICAL GMBH, Cat No: 1-33-30215, Steinbach-Almanya) olacak şekilde dondurma tüplerine aktarıldı.

6. Gece boyunca -86°C 'de köpük kap içerisinde bekletildikten sonra -196°C 'de azot tanklarına kaldırıldı.

3.5 Kök Hücrelerin Kondrosite Farklılaştırılması

3.5.1 Jelatinli ve Matrijelli Petrilerin Hazırlanması

3.5.1.1 Jelatinli hücre kültür kaplarının hazırlanması

1. %0.1 olacak şekilde jelatin distile su ile karıştırılıp hazırlandı.
2. Jelatin solusyonu 121°C 'de 20 dk. otoklavda sterilizasyonu yapıldı.
3. Daha sonra 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına her bir göze 2 ml olacak kadar döküldü 37°C 'lik inkübatörde 3 saat inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon 37°C 'lik 3 saat yapıldı.
5. Süre sonunda jelatinler yüzeyden çekildi. Sterilizasyonun bozulmaması için hücre kültür kablarının çevresi parafilm ile sarılarak daha sonra kullanılmak üzere $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı.

3.5.1.2 Matrijelli Hücre Kültür Kaplarının Hazırlanması

1. Matrijelin protein yapısının bozulmaması için buz dolu bir kabın içerisine matrijel konulup bir gece boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilerek eritildi.
2. Bir gün öncesinden kullanılacak olan pipet uçları, pens ve 1 ml'lik tüpler 121°C 'de 45 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu yapıldı. Sterillenmiş pipet uçları -20°C 'ye konularak bir gece inkübasyona bırakıldı.
3. Ertesi gün matrijel 1ml'lik tüplere 200 μl olacak şekilde paylaştırılarak daha sonra kullanılmak üzere -20°C 'ye kaldırıldı.

3.5.2 Mezenkimal Kök Hücrelerin Kondrosite Farklılaştırılması

1. Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırmasının yapılması için stoktan jelatinli hücre kültür kabı alındı ve üzerine 500 µl vasat konularak 1 saat 37⁰ C , %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.
2. Matrijel daha önce hazırlanmış olan stoktan bir ampül alındı. Buzlu kap içerisinde eritildi. Eriyen matrijel DMEM ile 1:6 oranında seyreltildi.
3. Matrijel 24 gözlü hücre kültür kabının her bir gözüne 500µl olacak şekilde paylaştırıldı. 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.
4. Süre 2 saat sonunda matrijel 24 gözlü hücre kültür kaplarından çekildi. Üzerine 500 µl vasat konularak 1 saat 37⁰ C , %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.
5. TGF-β1 10ng/ml(Transforming Growth Factor-β1 from porcine platelets, Sigma, Cat No: T5050, Taufkirchen-Almanya), askorbikasit 2 fosfat 50µg/ml (L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate, Santacruz, Cat No: SC-228390, Heidelberg-Almanya), 10 ng/ml BMP-2 (Bone morphogenetic protein-2, Invitrogen, Cat No: PHC7145,) dexametazon 100nM, vasatın %10'u kadar ITS (ITS + premix, insulin trasfferin selenium, BDtm Bioscience, Cat No:354352, Franklin-USA), 1mM sodyum prüvat (Gibco, Cat No: 11360039, Darmstadt-Almanya), 20 ml DMEM high glukoz, %0,01 gentamisin ile kondrojenik ortam hazırlandı.
6. Tripsinizasyon ile kalkan fare kemik iliği hücreleri konsantrasyonu 2X10⁷/ml olacak şekilde süspanse edidi.
7. Hücre süspanasyonu 12,5 µl'lik damla halinde dikkatlice 24 gözlü pleytin her bir gözüne damlatıldı.
8. Hücre yüzeye tutunması için 3 saat 37⁰ C , %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.
9. İnkübasyon sonunda hazırlanmış olan kondrojenik ortam her bir göze 500µl olacak şekilde ilave edidi.
10. Damlacıklar 24 saat sonunda küresel bir yapı aldığı gözlemlendi.
11. Her iki günde bir vasat değişimi yapıldı.

3.5.3. Alcian Mavisi ile Boyama

1. Farklılaştırma ortamının 21. günde hücreler üzerindeki kondorjenik ortam çekildi.
2. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile 2 kez yıkandı. Böylece hücre ortamı tamamen uzaklaştırıldı.
3. Hücrelerin üzerine 500 µl olacak şekilde %4 'lük paraformaldehit eklendi. Hücreler 30', fiksasyon yapıldı.
4. İnkübasyon süresi sonunda paraformaldehitin tamamen uzaklaşması için 3 kez Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkandı.
5. Kuyucuklara %1 Alsian mavisi solüsyonu eklendi ve 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. % 1 Alsian mavisi solüsyonu 0.1N HCl ile hazırlanıp hazırlanan çözelti karanlıkta saklandı
6. Petrilere 0.1N HCl ile 3 kez yıkama yapıldı.
7. Nötralizasyon için distile su ilave edildi.
8. Kuyucukların kurumasını engellemek için az miktarda distile su eklenip ve gözlem yapıldı.

3.5.4 Embriyonik Kök Hücrelerin Kondrosite Farklılaştırılması

1. Embriyonik kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırmasının yapılması için stoktan jelatinli hücre kültür kabı alındı ve üzerine 500 µl vasat konularak 1 saat $37^0 C$, %5 CO_2 'li inkübatörde inkübe edildi.
2. Matrijel daha önce hazırlanmış olan stoktan bir ampül alındı. Buzlu kap içerisinde eritildi. Eriyen matrijel DMEM ile 1:6 oranında seyreltildi.
3. Matrijel 24 gözlü hücre kültür kabınının her bir gözüne 500µl olacak şekilde paylaştırıldı. 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.
4. Süre sonunda matrijel 24 gözlü hücre kültür kaplarından çekildi. Üzerine 500 µl vasat konularak 1 saat $37^0 C$, %5 CO_2 'li inkübatörde inkübe edildi.
5. Tripsinizasyon ile kalkan embriyonik kök hücreler yoğunluğu $2 \times 10^7/ml$ olacak şekilde süspanse edidi.
6. Hücre süspansiyonu 12,5µl'lik damla halinde dikkatlice 24 gözlü pleytin her bir gözüne damlatıldı.

7. Hücrelerin yüzeye tutunması için 3 saat 37⁰ C , %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.

8. İnkübasyon sonunda hazırlanmış olan kondrojenik ortam her bir göze 500µl olacak şekilde ilave edildi.

9. Damlacıklar 24 saat sonunda küresel bir yapı aldı.

10. Her iki günde bir vasat değişimi yapıldı.

3.5.5 Farklılaşan Kök Hücrelerin İmmünohistokimyası

1. Hücre kültür plakaları 2 kez PBS solüsyonu ile 5'er dakika yıkandı ve hücre yüzeyindeki hücre kültür ortamı uzaklaştırıldı.

2. Hücreler 30 dakika %4 lük paraformaldehit solüsyonu ile fikse edildi.

3. Petriyer 3 kez 5' er dakika PBS solüsyonu ile yıkandı.

4. Daha sonra % 3' lük hidrojen peroksit (H₂O₂, Merck, Cat No: K31355100, Darmstadt, Germany) 10 dakika muamele edildi. PBS solüsyonu ile 3 kez 5' er dakika yıkandı.

5. Permeabilizasyon için hücreler %0.1 lik Triton-X 100 (Applichem, Cat No: A4975,0100, Darmstadt, Germany) ile 15 dakika muamele edildi.

6. Örnekler 3 kez 5' er dakika PBS solüsyonu ile yıkandı.

7. PBS solüsyonu hücre yüzeyinden tamamen çekildikten sonra hücreler 1 saat bloklama solüsyonu (DBS, Cat No: K023, California, USA) ile inkübe edildi.

8. Bloklama solüsyonu direkt alındıktan sonra primer antikorlar, Anti-aggregan (Sigma-Aldrich, Cat No:T5050, USA), anti-Kollajen Tip 2 (Rabbit Anti-Collagen II Polyclonal Antibody, Santacruz, Cat No:250484, USA) Sox 9 (Santacruz, Cat No: 830474, USA) kondu ve hücre kültür kapları parafilm ile sarılarak nemli bir ortamda +4 °C' de bir gece inkübasyona bırakıldı.

9. Ertesi gün hücreler 3 kez 5' er dakika PBS solüsyonu ile yıkandı.

10. PBS hücre yüzeyinden tamamen çekilerek anti rabbit/Mouse biotinlenmiş ikincil antikor (DBS, Cat No: KP500, California, USA) ilave edildi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

11. Örnekler 3 kez 5' er dakika PBS solüsyonu ile yıkandı.

12. Streptovidin-peroksidaz (DBS, Cat No: KP500, California, USA) ile hücreler 30 dakika inkübe edildi.

13. Örnekler 3 kez 5' er dakika PBS solüsyonu ile yıkandı.

14. İmmunoreaktivitenin görünürlüğü için DAB (3,3'-diaminobenzidine, DBS, Cat No:K007, California, USA) ile 5 dk inkübe edildi. Hücreler boyandıklarında 1 kez PBS ile yıkandıktan sonra 3 kez bol miktarda distile su ile hücre yüzeyi iyice temizlendi.

15. Artalan boyaması için Mayer's hematoksilen solüsyonu (J.T.Barker, Cat No:02274390059, Deventer-Holland) ile 4 dakika boyama yapıldı.

16. Örnekler distile su ile 3 kez yıkama yapıldıktan sonra, immunohistokimya için kapatma vasatı ilave edilerek lam ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda (Olympus BX40) incelenerek fotoğrafları çekildi.

17. Örneklerdeki immunoreaktivite yoğunluğu iki farklı zamanda iki gözlemci tarafından incelenerek, boyanma yok (negatif), zayıf (+), orta (++) ve kuvvetli (+++) pozitif olarak değerlendirildi.

3.6 Farklılaşan Kök Hücrelerin *In vivo* Analizi için Fare Bacak Kasına Enjeksiyonu

1. Embriyonik ve mezenşimal kök hücrelerinin farklılaştırma kültürün 1. ve 3. haftalarında 8 farklı grup oluşturuldu. Grup 1,2,3 ve 4 farklılaşma grupları iken, Grup 5,6,7 ve 8 kontrol grupları olarak belirlendi.

2. **Grup 1:** Embriyonik kök hücre: Kondrojenik vasat ile 1 hafta kültür

3. **Grup 2:** Mezenkimal kök hücre: Kondrojenik vasat ile 1 hafta kültür

4. **Grup 3:** Embriyonik kök hücre: Kondrojenik vasat ile 3 hafta kültür

5. **Grup 4:** Mezenkimal kök hücre: Kondrojenik vasat ile 3 hafta kültür

6. **Grup 5:** Embriyonik kök hücre: Embriyonik kök hücre vasatı ile 1 hafta kültür

7. **Grup 6:** Mezenkimal kök hücre: Mezenkimal kök hücre vasatı ile 1 hafta kültür

8. **Grup 7:** Embriyonik kök hücre: Embriyonik kök hücre vasatı ile 3 hafta kültür

9. **Grup 8:** Mezenkimal kök hücre: Mezenkimal kök hücre vasatı ile 3 hafta kültür

Hücreler yukarıda belirtilen haftalarda kültüre edildikten sonra, hücrelerin alınacağı gün hücreler tripsinizasyon işleminden sonra toplandı ve 10^5 hücre/ml

olacak şekilde hazırlandı. Her deney haftasında 6 adet (1. Hafta 6 adet, 2. Hafta 6 adet olmak üzere toplam 16 adet) Balb C fare kullanıldı. Her bir deneğe embriyonik ve mezenşimal kök hücre kontrol grubu hücreleri ile kondrosite farklılaşma gruplarındaki hücreler her bir ekstremiteye ayrı ayrı olmak üzere kas içerisine intramuskuler olarak enjekte edildi. Enjeksiyondan yapıldıktan sonra 4 hafta beklendi ve denekler sakrifiye edilerek bacak kasları histolojik analiz için %10 luk formalin içerisine alındı.

3.6.1 İzolasyonu Yapılan Dokuların Hematoksilen-Eozin ve Masson Trikrom Boyaması

1. İzole edilen dokular %10'luk formalin solüsyonu içerisinde 24-48 saat tespit edildi.
2. Örnekler bohçalanarak bir gece çeşme suyu altında bırakılarak fiksatifin tamamen uzaklaşması sağlandı.

3.6.1.1 Dokuların parafin takibi

1. İzole edilen dokular %10'luk formalin solüsyonu içerisinde 24-48 saat tespit edildi.
2. Örnekler bohçalanarak bir gece çeşme suyu altında bırakılarak fiksatifin tamamen uzaklaşması sağlandı.
3. Dokular sırasıyla %60, 70, 80 ve 100'lük alkol serilerinde 30'ar dakika bekletildi.
4. Alkolden çıkarılan dokular ksilen-alkol solüsyonunda 30 dakika bekletildi.
5. Ksilen solüsyonunda 60' bekletildi.
6. Ksilen solüsyonunda 60' bekletildi.
7. Ksilen- parafin solüsyonunda 30' bekletildi.
8. Parafin solüsyonunda 60' bekletildi.
9. Parafin solüsyonunda 60' bekletildi.
10. Dokular bu takip serisini tamamladıktan sonra parafin bloklara gömülmek için hazır hale geldi. Dokuyu parafine gömme işlemi yapılacağı zaman metal blok +4°C' ye alınarak soğutuldu.

11. Metal bloğun bir gözüne yarıya kadar parafin döküldükten sonra kesit alınacak yüz aşağıda olacak şekilde gömüldü.

12. Parafin bloktan her bir lamda üç kesit olacak şekilde rodajlı lamlara 5µm'lik seri kesitler alındı.

3.6.1.2 Kesitlerin hematoksilin-eozin boyanması

1. Lam üzerindeki dokular kuruduktan sonra 60°C'lik etüvde 24 saat inkübe edilerek doku içerisindeki parafin uzaklaştırıldı.

2. Kesitler 1. ksilen solüsyonu içerisinde 30' bekletildi,

3. Daha sonra 2. ksilen solüsyonu içerisinde 30' tutuldu.

4. Kesitler %95, %80, %60'lik alkol solüsyonlarında her birinde 2' şer dk olmak üzere alkol serisinden geçirildi.

5. Kesitler 5' boyunca dokular çeşme suyunda yıkandıktan sonra Hematoksilin solüsyonu içerisinde 5' bekletildi.

6. Kesitler 5' boyunca dokular çeşme suyunda yıkandıktan sonra %50 asit-%50 alkol solüsyonu içerisine batırıp çıkartıldı.

7. Daha sonra 5' boyunca dokular çeşme suyunda yıkandı

8. Kesitler 3' eozin solüsyonu içinde tutulduktan sonra 5 ' çeşme suyu ile yıkandı.

9. Kesitler %80, %90 ve %100 alkol serilerinden geçirildikten sonra 2 değişim ksilende 30 ar dk tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı

3.6.1.3 Kesitlerin Masson trikrom boyanması

1. Kesitler 60°C'lik etüvde 24 saat inkübe edilerek doku içerisindeki parafin uzaklaştırıldı.

2. Kesitler 1. ksilen solüsyonunda 30', 2. ksilen solüsyonunda 30' bekletilerek kesitlerde kalan parafinin temizlenmesi sağlandı.

3. Daha sonra kesitler %95 %80, %60'lik alkol solüsyonlarında her birinde 2' şer dk olmak üzere alkol serisinden geçirildi.

4. Kesitler çeşme suyu ile çeşme suyu 5' boyunca yıkandı.

5. Kesitler immunohistokimya kalemi (PAP pen, CCD, Cat No: SHP124, USA) ile işaretlendi.

6. Bouin's solüsyonu (Sigma, Cat No:HT10-1, Almanya) ile 15', 60⁰C etüvde inkübe edildi.

7. Kesitler üzerinden Bouin solüsyonunun sarı rengi gidinceye kadar çeşme suyu altında yıkandı.

8. Daha sonra demirli hematoksilen (Weigert hematoksilen, Sigma, Cat No: HT10-7, Almanya) ile 20' inkübe edildi.

9. Kesitler asit-alkol solüsyonuna batırılıp çıkartıldı.

10. Fucshin asit (Sigma, Cat No: HT15-1, Almanya) solüsyonu ile 10' inkübe edildi ve çeşme suyu altında 5' yıkandı.

11. Daha sonra %1'lik fosfotungustik asit (Sigma, Cat No: HT15-1, Almanya) ile 10'-15' inkübe edildi.

12. Kesitler yıkma yapılmadan metilen mavisi ile 10'-15' inkübe edildi ve çeşme suyu altında 2 kez 5' yıkandı.

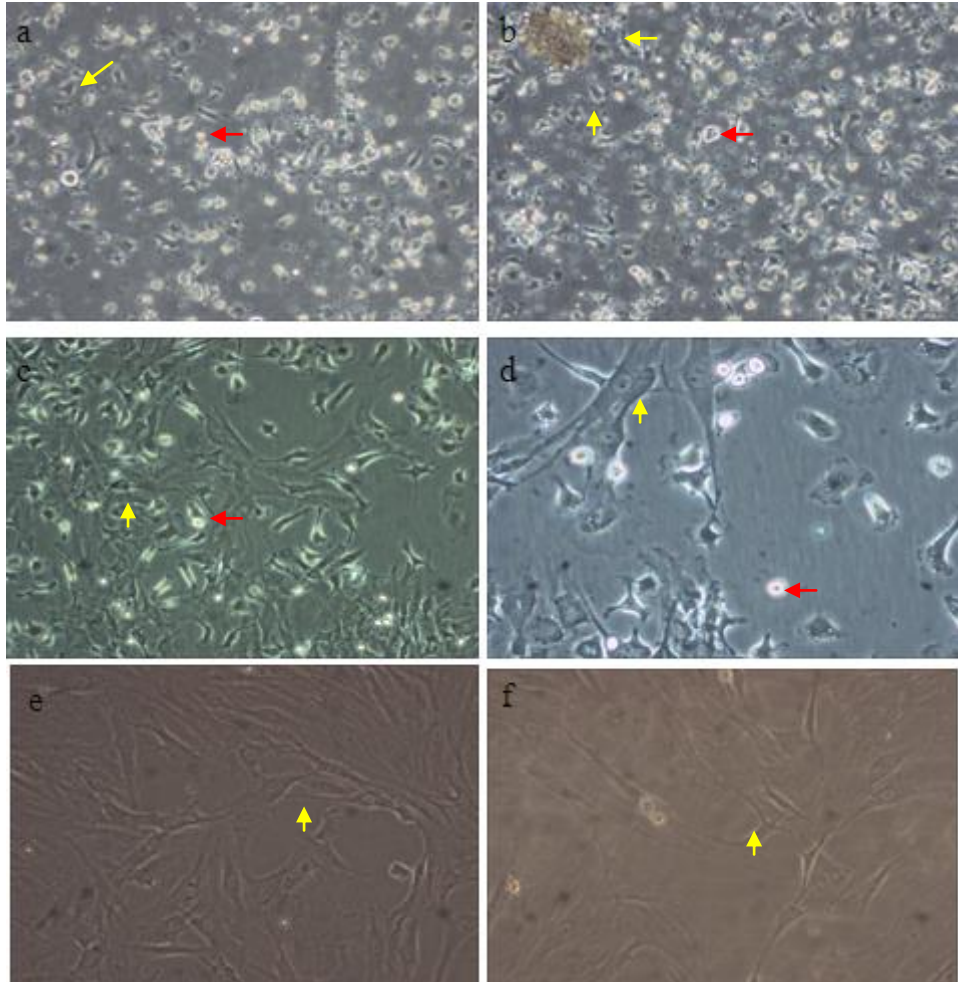
13. Daha sonra kesitler %85, %90, %100 alkol serilerinden geçirildi.

14. Kesitler 2 değişim her biri 30'şar dk olmak üzere ksilende tutuldu ve entellan ile kapatılarak ışık mikroskobunda (Olympus BX-40, Tokyo, Japonya) incelendi.

4.BULGULAR

4.1.Fare Kemik İliğinden Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü

Fare kemik iliği kök hücrelerinin izolasyonu sonucunda hücrelerin kültür ortamına alındığında eritrositler, hematopoetik seriye ait hücreler ile mezenkimal kök hücrelere ait hücrelerin olduğu gözlemlendi (Resim 4.1 a,b).



Şekil 4.1: Fare kemik iliği kök hücrelerinin faz kontrast görünümü, a,b) Hematopoetik seriye ait hücreler (kırmızı ok), kemik iliği kök hücreleri (sarı ok) 4X, 2. gün; c) Kemik iliği kök hücreleri (sarı ok), hematopoetik hücreler (kırmızı ok), 40X, 1.hafta d) Kemik iliği kök hücreleri (sarı ok), hematopoetik hücreler (kırmızı ok) 10X 1.hafta; e) Kemik iliği kök hücreleri, (sarı ok), 10X, P1; f) Kemik iliği kök hücreleri, (sarı ok), 20X, P1, (Olympus IX71).

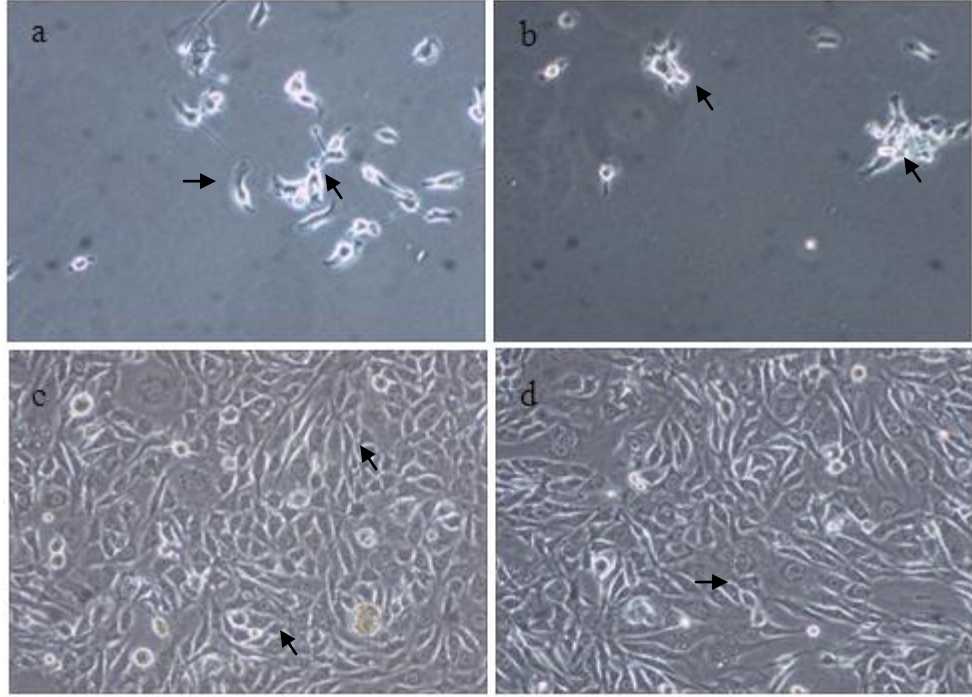
Kültüre devam edildiğinde kültürün 1. gününde bazı hücrelerin kültür kabına tutunmaya başladığı gözlemlendi (Resim 4.1c,d). Kemik iliği kök hücreleri primer kültürünün eldesinin 2. gününden itibaren yüzeye tutunarak morfolojik görünümünün farklılığı ile diğer kemik iliği hücrelerinden kolayca ayırt edilebilmektedir. Kültürün ilerleyen günlerindeki mezenkimal kök hücreler ile kültürün 2. günündeki mezenkimal kök hücreleri karşılaştırdığımızda kültürün ilk günlerindeki mezenkimal kök hücrelerinin stoplazmalarının daha dar ve uzantılarının daha ince olduğunu gözlemlendi. Kültürde kontaminasyon ya da hücreyi strese sokacak herhangi bir durum yoksa mezenkimal kök hücreler kültür kabının yüzeyini 7-8 gün arasında kaplamakta ve hücre morfolojisi geniş stoplazmalı, yıldız şeklinde gözlemlenmektedir (Şekil 4.1 e,f).

4.2. STO Besleyici Tabakasının Kültürü ve Morfolojisinin İncelenmesi

Stok STO hücreleri yukarıda materyal metod kısmında tarif edildiği gibi çözdürüldükten sonra kültürün 1. Gününde hücrelerin kültür kabına tutunmaya başladıkları gözlemlendi (Resim 4.2a,b). STO hücreleri 6 gün boyunca her iki günde bir kültür vasatı değiştirilerek hücrelerinin yüzeyi tamamen kaplayıncaya kadar kültüre devam edildi. STO hücrelerinin fuziform şekilli oldukları ve merkezi yerleşimli yuvarlak çekirdekleri olduğu izlendi (Resim 4.2.c,d). Stok için 2 pasaj işlemi yapılarak yüzeyi tamamen kaplayan STO hücrelerinin 2/3'ü donduruldu 1/3 ise pasajlanarak kültürüne devam edildi. Pasaja devam edilen hücreler yüzeyi tamamen kapladıktan sonra MIT-C ile muamele edilerek embriyonik kök hücre kültürü için hazırlandı.

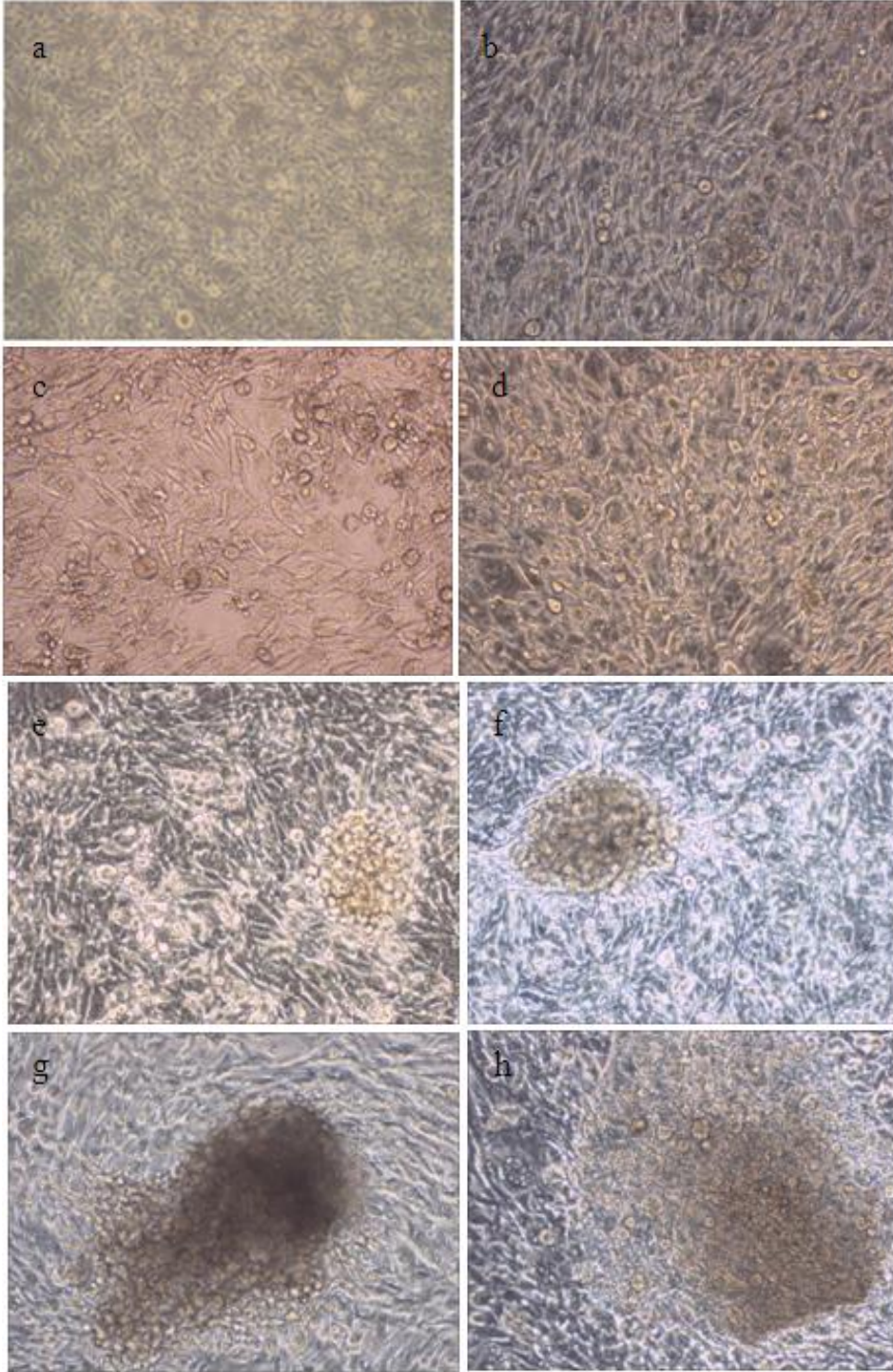
4.3. Embriyonik Kök Hücrelerin Kültürü ve Morfolojisinin İncelenmesi

Embriyonik kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri mezenkimal kök hücrelerden çok daha fazladır. Bu sebeple kültürlerinde besleyici tabaka olarak lösemi inhibitör faktör (LIF) salgılayan STO hücreleri kullanıldı.



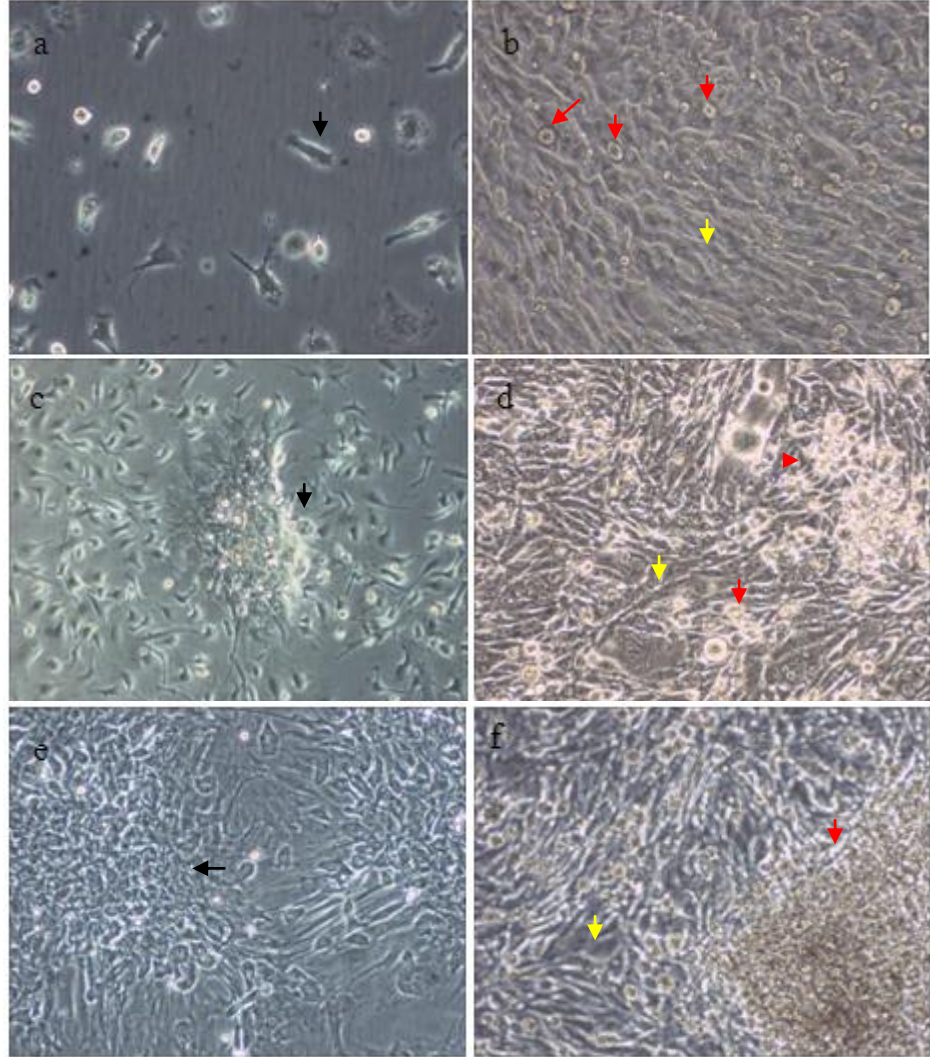
Şekil 4.2: STO hücrelerinin faz kontrast görünümü, a, b) STO hücrelerinin kültürünün 1. Günü, (Siyah ok) 40X c,d) STO hücrelerinin 10.günü yüzeyi hücreler tamamen kapladığı görüldü 200X (Olympus IX71).

STO hücrelerinin ortama salgıladıkları LIF ile EKH hücrelerinin farklılaşma potansiyellerini kısıtlamaktadırlar. MİT- C ile muamele edilen STO hücreleri kültür ortamında 7 gün boyunca yaşabildiği gözlemlendi. EKH' ler materyal metotda anlatıldığı gibi STO ile yüzeyi kaplanmış hücre kültür kaplarına çözdürüldü. Kültürün 1. ve 2. günü EKH'ler STO hücrelerinden farklı olarak yuvarlak şekilli ve uzantısız olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3 a,b). Kültürün 1. haftasında embriyonik EKH'lerin daha yoğun olduğu ayrıca bu hücrelerin bir arada koloni oluşturacak şekilde üredikleri gözlemlendi (Şekil 4.3 c,d). Kültürün ikinci haftasında embriyonik kök hücrelerin STO hücrelerin üzerinde sınırları kolayca ayırt edilen şekilde koloniler oluşturdukları, kolonide ki hücrelerinde sınırlarının belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3 e,f). EKH kültürünün 3. haftasında kök hücre kolonileri büyüdüğüve koloni sınırlarının daha belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3 g,h).



Şekil 4.3: a,b) Mitomisin-C ile muamele edilmiş STO hücrelerinin üzerinde kültüre edilmiş EKH, kültürün 1. günü 40X; c,d) kültürün 1. haftası 100X; e,f) Kültürün 2. haftası 100X; g,h) Kültürün 3. haftası 100X. (Olympus IX71)

4.3.1 Fare Embriyonik Kök Hücreleri ile Fare Kemik İliği Kök Hücrelerinin Morfolojisinin Karşılaştırılması



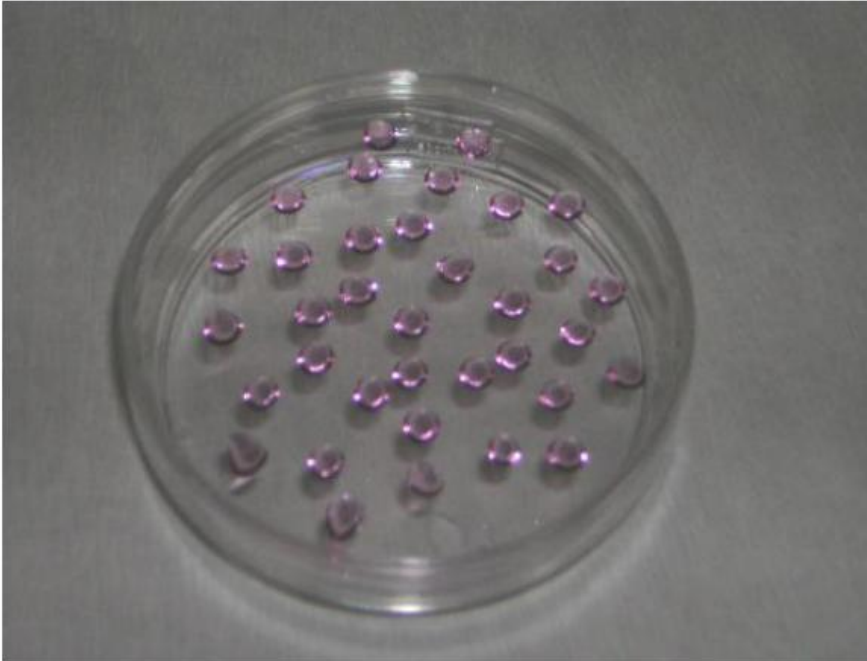
Şekil 4.4: Fare kemik iliği kök hücreleri ile embriyonik kök hücrelerinin faz kontrast görünümü a) Fare kemik iliği kök hücrelerinin kültürde 2. günü (siyah ok) 10X; b) Fare embriyonik kök hücrelerinin kültürde 2.günü (kırmızı ok), STO hücreleri (sarı ok)10X; c) K1KH'lerin kültürde 2.haftası (siyah ok) 10X; d) EKH kültürde 2. haftası (kırmızı ok), STO hücreleri (sarı ok) 10X e)K1KH kültürde 3.haftası oluşan klonal yapılar (siyah ok) 10X; e) ES kültürde 3.haftası oluşan klonal yapı (kırmızı ok) 10X (Olympus IX71).

Kök hücrelerin kültür ortamında üreme özelliklerini embriyonik ve mezenkimal kök hücrelerde karşılaştırıldığında her iki hücre kaynağının da kümeler halinde ürediklerini gözlemlendi. Fare kemik iliği kök hücrelerinin kültür ortamında 2. gününde flask yüzeyine tutunduğu gözlemlenmektedir (Şekil 4.4, a). Embriyonik kök hücrelerinin farklılaşma potansiyellerinin K1SKH hücrelerinde

daha fazla olması nedeniyle besleyici tabaka denilen STO hücreleri üzerinde kültür edilmektedir. STO hücrelerinin salgıladıkları LIF embriyonik kök hücreler kültür ortamında kendi kendine farklılaşmasını engeller (Şekil 4.4, b). Kültürün 2. ve 3. haftasında hem embriyonik (Şekil 4.4 d,f) hem de mezenkimal kök hücrelerin (Şekil 4.4 c,e) kümeler halinde üredikleri daha net görünmektedir. Her iki hücre grubunda farklılaşma sağlanmadan yapılan kültürde hücrelerin epiteloid özellikte oldukları, embriyonik hücrelerin koloni oluşturma özelliği gösterir iken, mezenşimal kök hücrelerin konfluent oluşturacak şekilde çoğalma gösterdiği izlendi.

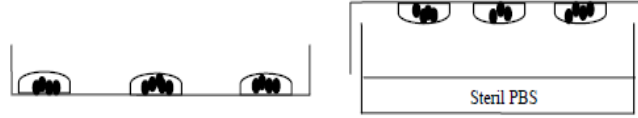
4.4 Damla Metodu ile Oluşturulan Embriyoblastların Morfolojisinin İncelenmesi

Embriyonik kök hücrelerin farklılaştırma yöntemlerinden bir tanesi olan damla metodunda hücre sayımı yapıp 5×10^3 hücre $20 \mu\text{l}$ 'lik damlalar halinde 60 cm^2 'lik petrinin kapağına ekildi. 37°C CO_2 'li inkübatörde 48 saat inkübasyonun sonucunda petri kapağındaki damlalarda (Şekil 4.5, 4.6) hücrelerin kümeler şeklinde bir arada toplanarak embriyoblast oluşumunu sağladıkları gözlemlendi.



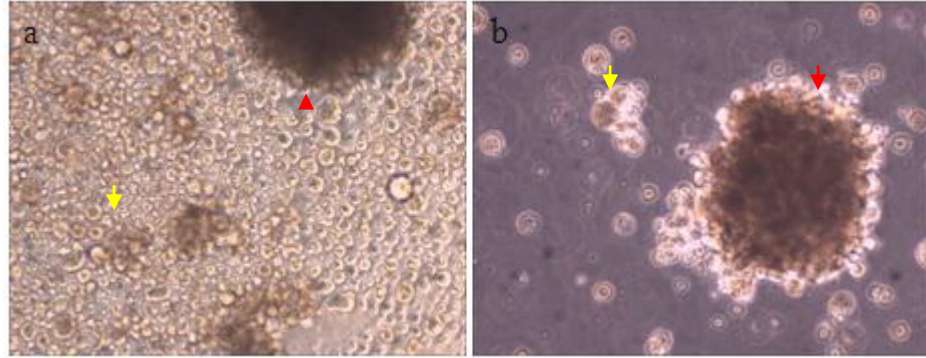
Şekil 4.5: Damla yöntemi ile oluşturulan kültür ortamı. X100.

Bu yöntem ile kapak steril şartlarda ters çevrildikten sonra damlalar üzerine ilave edilen kültür vasatı içinde embriyoblastlar Pastör pipeti ile çekilerek jelatinli 6 gözlü kültür kaplarına her bir gözde en az 3 embriyoblast olacak şekilde transfer edildi. Şekil 4.6' da damla metodu ile embriyoblast oluşumu şematik olarak gösterilmiştir.



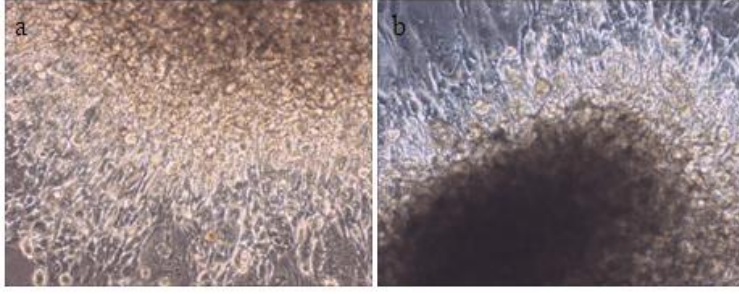
Şekil 4.6: Embriyonik cisimcik oluşumunun çizimsel açıklaması (Türköz Uluer, 2009).

Kültür ortamın alınmadan önce embriyoblastların STO hücrelerinden ayrı olarak oluştukları ve STO hücreleri ile koloni oluşturmadıkları gözlemlendi (Şekil 4.7a). Kültür ortamına alınan embriyoblastların yuvarlak şekilli, dışta endoderm ve içte ektoderm olmak üzere iki farklı hücre grubunun olduğu gözlemlendi (Şekil 4.7b).



Şekil 4.7: 48 saat sonucunda damlalarda oluşan embriyoblastların faz kontrast görüntüsü; a,b) Embriyoblast (kırmızı ok) ve STO hücreleri (sarı ok) 10X, (Olympus IX71).

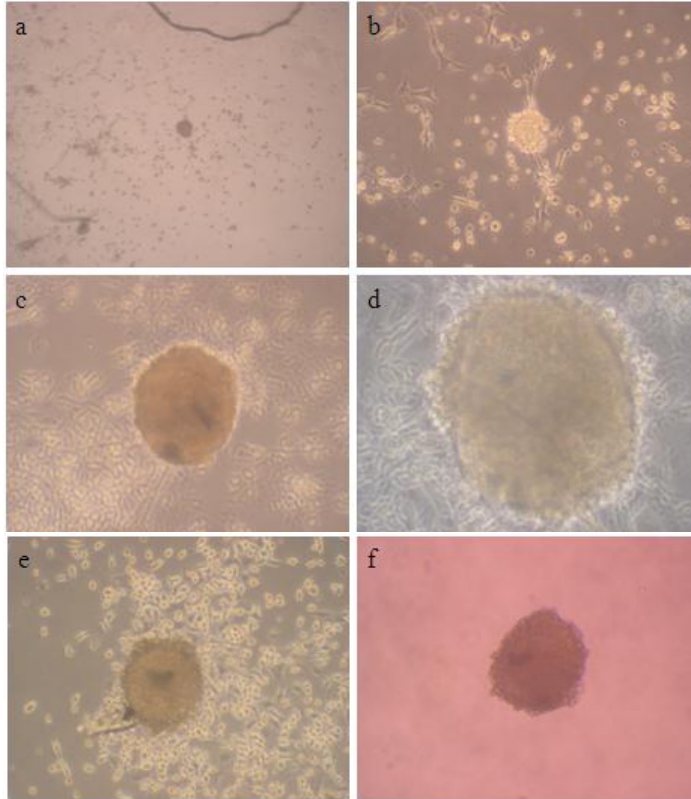
Embriyoblastlar jelatinli 6 gözlü kültür kaplarında kültürlerinde yüzeye tutunduklarında yapılarının bozulmadığı, kültüre devam edildiğinde embriyoblastların periferde bulunan hücrelerden ışınal tarzda hücrelerin proliferasyonu olduğu gözlemlendi. Embriyonik gelişim sırasında mezoderm ektoderm ile endoderm arasında farklılaşır. Kültüre edilen embriyoblastlardan proliferasyon olan hücrelerin ektoderm, endoderm ve mezoderm oldukları düşünüldü. (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Jelatinli petride yüzeye tutunmuş embriyoblastlardan hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması 200X (Olympus IX71).

4.5 Kondrosite Farklılaştırılan Fare Kemik İliği Kök Hücrelerinin Mikrokütle Kültürünün İncelenmesi

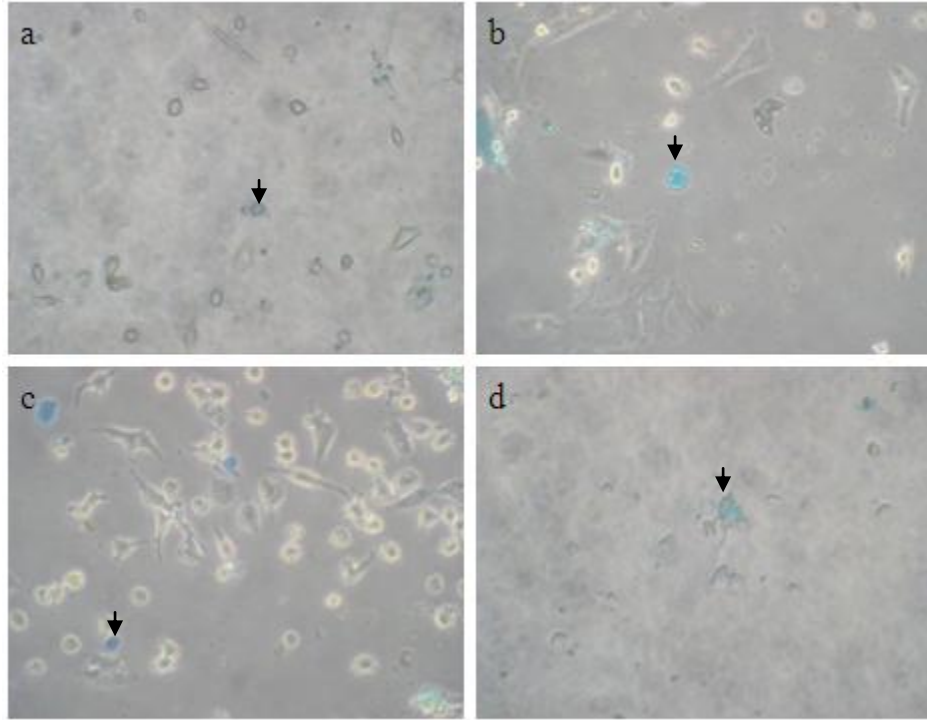
Mikrodamlar jelatin kaplı hücre kültür kaplarına ekildikten sonra inkübasyona bırakıldı. Kültürün ilk haftasında mikrodamla halindeki KİKH'lerin yüzeye tutunduğu (Şekil 4.9, c,d) ancak; ikinci haftadan itibaren hücrelerin yüzeyden ayrıldığı (Şekil 4.9, e,f), ve mikrokütle yapısının bozulmadığı gözlemlendi.



Şekil 4.9 Fare kemik iliği kök hücrelerinden elde edilen mikrokütle kültürünün faz kontrast görünümü; a) Mikrokütle 2. gün 4X; b) Mikrokütle 2. gün 10X; c) Mikrokütle 1. hafta 20X; d) Mikrokütle 1. hafta 40X; e,f) Mikrokütle 2. hafta 10X (Olympus CK40).

4.5.1 Farklılaşan Kemik İliği Kök Hücrelerin Alsiyan Mavisi ile Boyanması

KİKH'lerin 21 günü sonunda yüzeye tutunan hücrelerde alsiyan mavisi ile pozitif boyanma gözlemlendi. Özellikle yuvarlak olan hücrelerin boyanmış olması, bazı hücrelerin kondrosit olabileceklerini desteklemektedir. O nedenle uygulanan protokol ile kök hücrelerin kondrosite farklılaşmasında kullanılabileceği gösterildi. (Şekil 4.10)



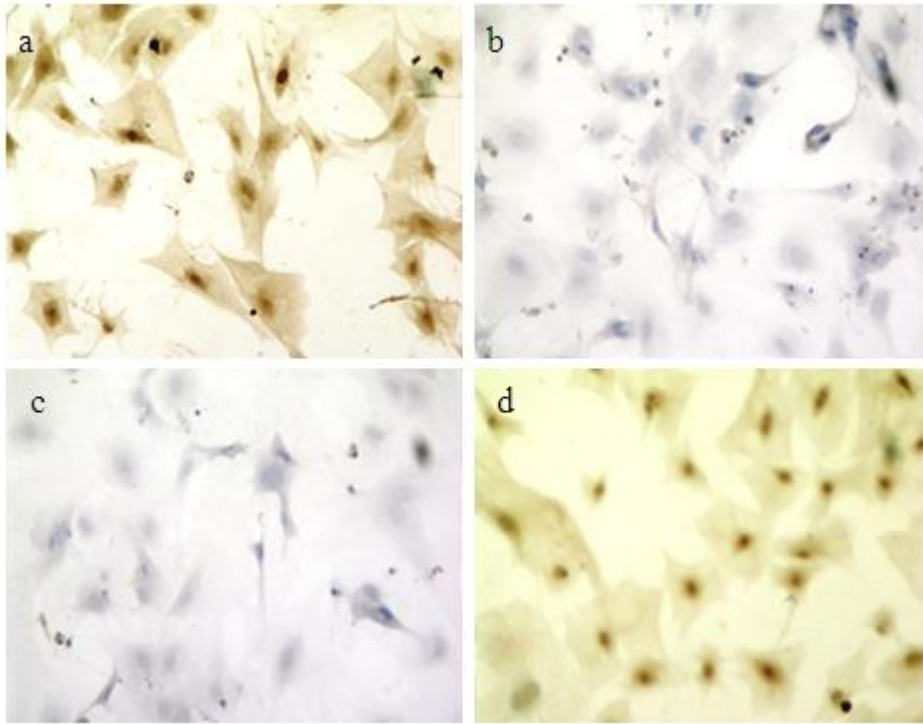
Şekil 4.10:Farklılaşan kondrosit hücrelerinin Alcian mavisi boyaması ardından faz kontrast görünümü (siyah ok) 10X (Olympus CK40).

Normal koşullar altında 1 haftada yüzeyi %80-90 oranında kaplaması beklenen mezankimal kök hücrelerin yapılan 4 tekrarlı denemelerde jelatin (%0.1 sol.) ve matrijel kaplı yüzeylere tutunmadığı ve dolayısıyla üremediği ve ilerleyen dönemlerde de öldüğü gözlemlendi.

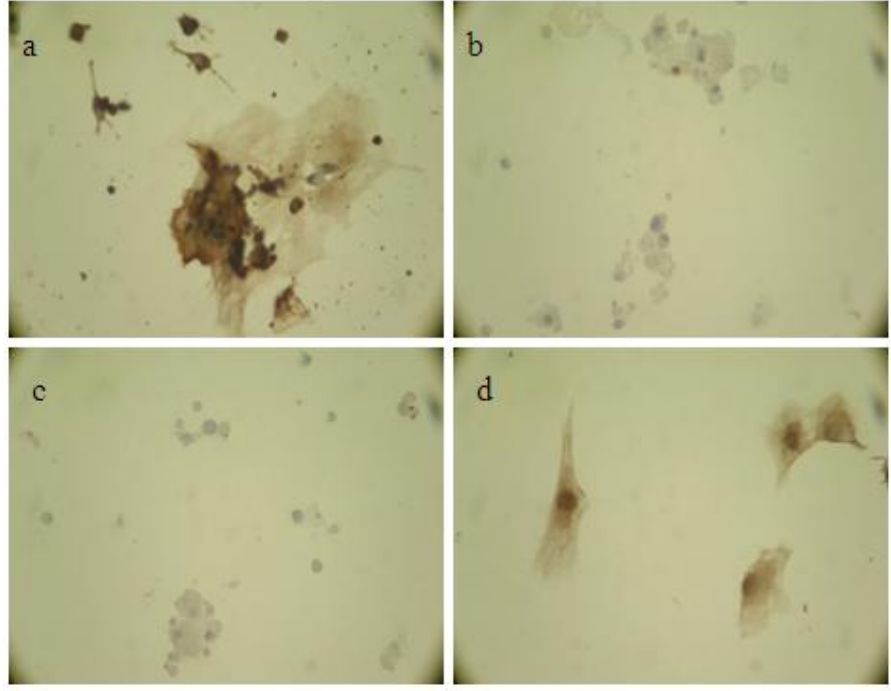
4.6 Farklılaşan Kök Hücrelerin İmmünohistokimyasal Boyaması

4.6.1 Farklılaşan Kemik İliği Kök Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Boyaması

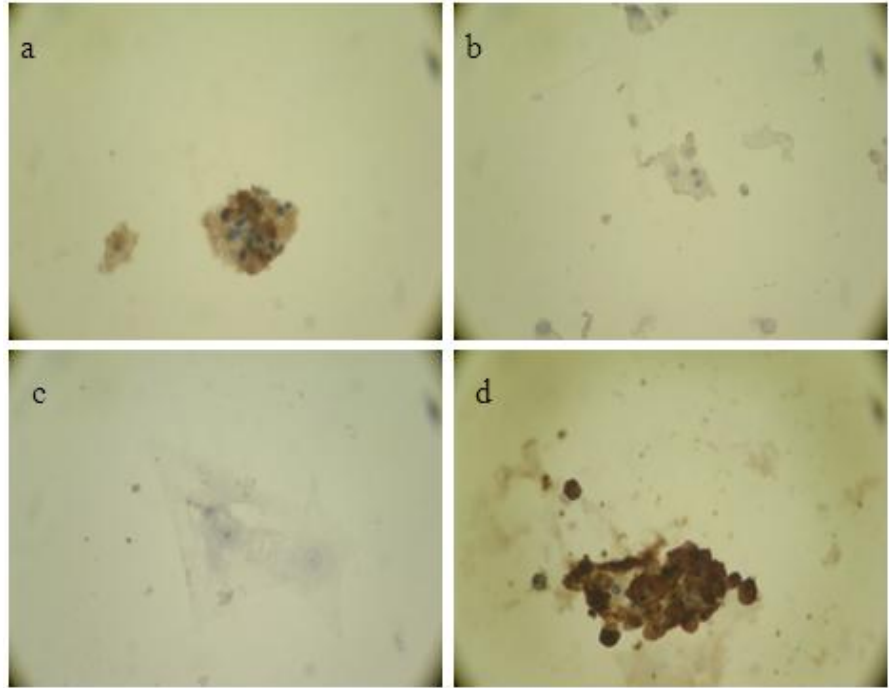
Fare kemik iliği kök hücrelerinin immünohistokimyasal boyaması sonucu bu hücrelerin Sox 9 ve agregan immunoreaktivitelerinin kültürün birinci haftasından itibaren pozitif olduğu (Şekil 4.11 a,d), kollajen immunoreaktivitesinin ise kontrol grubu ile kıyaslandığında aynı olduğu ve boyanmanın olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.11c,b).



Şekil4.11: Kondrojenik hücre kültür ortamı ile bir hafta inkübe edilmiş kemik iliği kök hücrelerinin immünohistokimyasal boyaması. a) Sox 9; b) kollajen 2; c) immünohistokimya kontrol boyama; d) agregan (20X) (Olympus CX31)

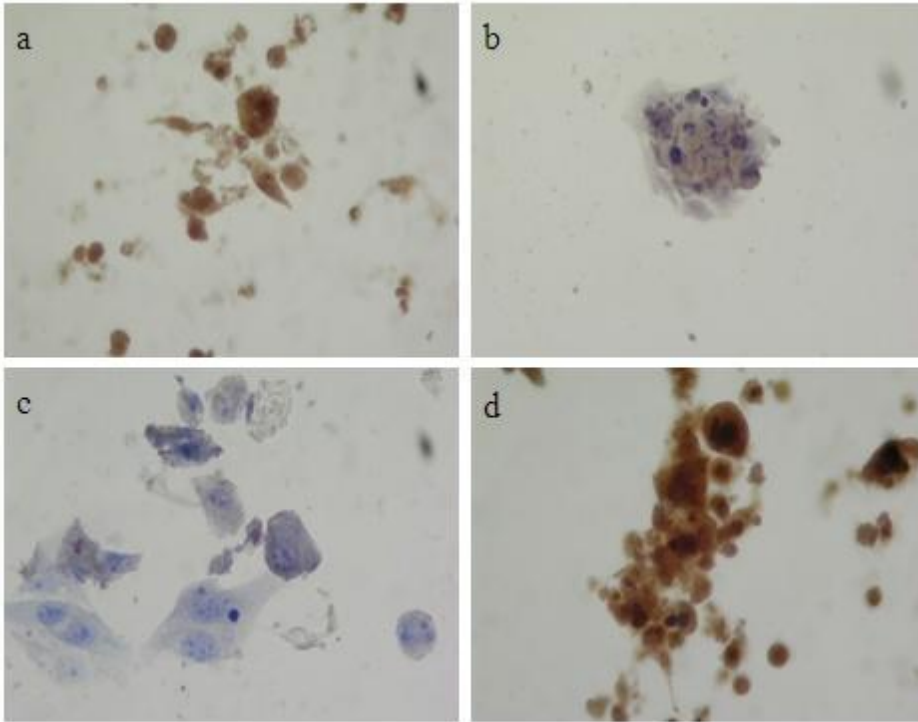


Şekil 4.12: Kondrojenik hücre kültürü ortamı ile iki hafta inkübe edilmiş kemik iliği kök hücrelerinin immünohistokimyasal boyaması. a) Sox 9; b) Kollajen tip 2; c) immünohistokimya kontrolü; d) agregan (20X) (Olympus CX31).



Şekil 4.13: Kondrojenik hücre kültür ortamı ile üç hafta inkübe edilmiş kemik iliği kök hücrelerinin immünohistokimyasal boyaması. a) Sox 9; b) kollajen 2; c) immünohistokimya kontrolü; d) agregan; (20X) (Olympus CX31).

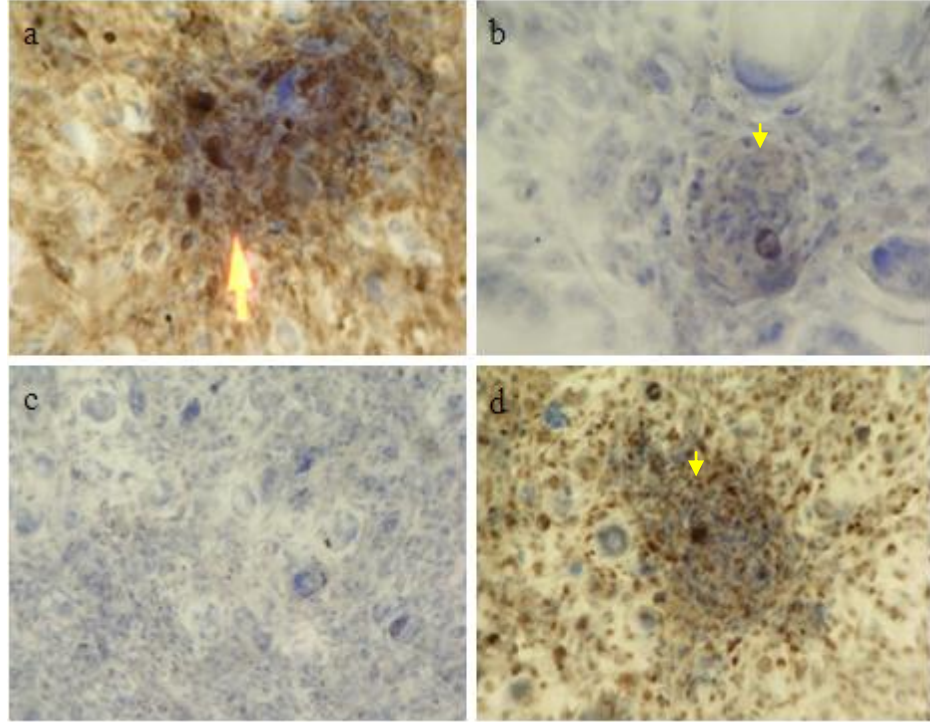
Kondrojenik kültür vasatı ile muamele edilen hücrelerin 3. haftadan itibaren kümeler oluşturduğu bu yapıya katılmayan hücrelerin ise öldüğü gözlemlendi (Şekil 4.13 a,d). KİSKH hücrelerinde Sox 9 ve agregan immunoreaktivitelerinde değişiklik gözlenmez iken, (Şekil 4.13 a,d), kollajen tip II immunoreaktivitesinin diğerlerine oranla daha fazla olduğu izlendi (Şekil 4.13, b). Kültürün 4. haftasında ise hücrelerin kollajen II immunoreaktivitelerinin kuvvetli pozitif olduğu belirlendi (Şekil 4.14, b).



Şekil 4.14: Kondrojenik hücre kültür ortamı ile 4 hafta inkübe edilmiş kemik iliği kök hücrelerinin immünohistokimyasal boyaması. a) Sox 9 antikoruna ile boyanmış hücreler; b) kollajen 2 antikoruna ile boyanmış hücreler; c) immünohistokimya kontrolü; d) agregan antikoruna ile boyanmış hücreler (20X) (Olympus CX31).

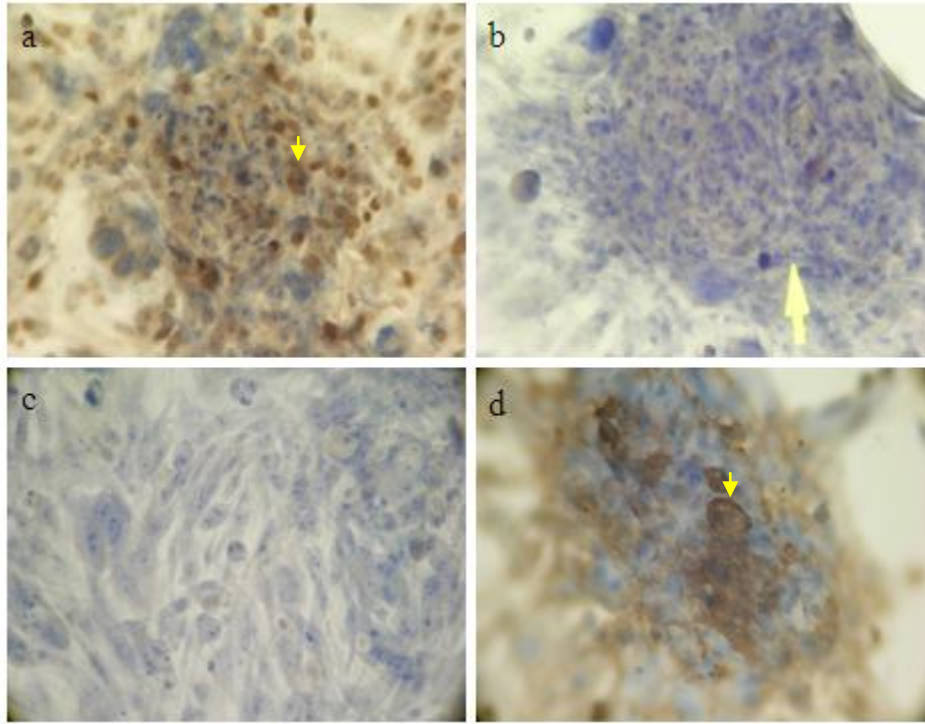
4.6.2 Farklılaşan Embriyonik Kök Hücrelerin İmmünohistokimyasal Boyaması

Embriyonik kök hücreler farklılaştırma için hem jelatinli hem de matrijel kaplı hücre kültrü kaplarına ekildi. Ancak matrijel üzerinde embriyonik kök hücreler jelatinde olduğu gibi üç boyutlu bir yapı kazanmadılar. Bu nedenle embriyonik kök hücrelerin farklılaştırma kültürlerinde jelatin kaplı petripler tercih edildi. Embriyonik kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırma ortamına alınmasının ilk haftasında Sox 9 ve agregan immunoreaktivitelerinin pozitif olduğu ancak kollajen immunoreaktivitesinin daha az olduğu gözlemlendi (Şekil 4.15). Kültürün ilk haftasından itibaren Sox 9, agregan ve kollajen II immunoreaktivitelerinin kontrol grubuna göre üç boyutlu bir yapı kazandığı saptandı (Şekil 4.15, Şekil 4.16). Bunun yanında 3. haftada hemen hemen bütün hücrelerin kollajen II immunoreaktivitelerinin pozitif olduğu belirlendi (Şekil 4.17).



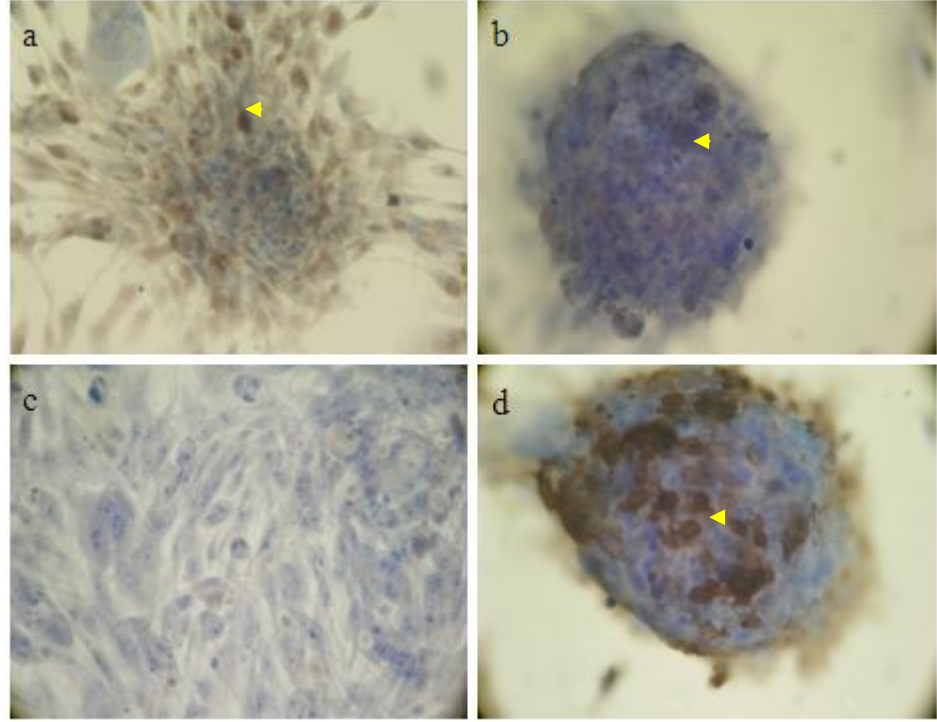
Şekil4.15: Kondrojenik hücre kültür ortamı ile bir hafta inkübe edilmiş fare embriyonik kök hücrelerinin immünohistokimyasal boyaması. a) Sox 9 antikoruna ile boyanmış, üç boyutlu yapı oluşturan hücreler (sarı ok); b) Kollajen tip 2 antikoruna ile boyanmış, üç boyutlu yapı oluşturan hücreler (sarı ok); c) immünohistokimya kontrolü; d) agregan antikoruna ile boyanmış, üç boyutlu yapı oluşturan hücreler (sarı ok) (20X) (Olympus CX31).

Embriyonik kök hücreler kondrojenik farklılaştırma ortamına alındığında ilk haftadan itibaren üç boyutlu bir yapı kazanmaya başladılar. Kondrojenik kültür ortamında olan bu hücreler (şekil 4.15, a,b,d) ile kontrol grubu karşılaştırıldığında farklılaştırma ortamında olanlar kümeler halinde üreyerek üç boyutlu bir yapı kazanırken kontrol grubunun ise iki boyutlu yapıyı korudukları saptandı (Şekil 4.15, c). Ayrıca kollajen II immunoreaktivitesinin birinci haftaya göre artış olduğu saptandı (şekil 4.16, b sarı ok).



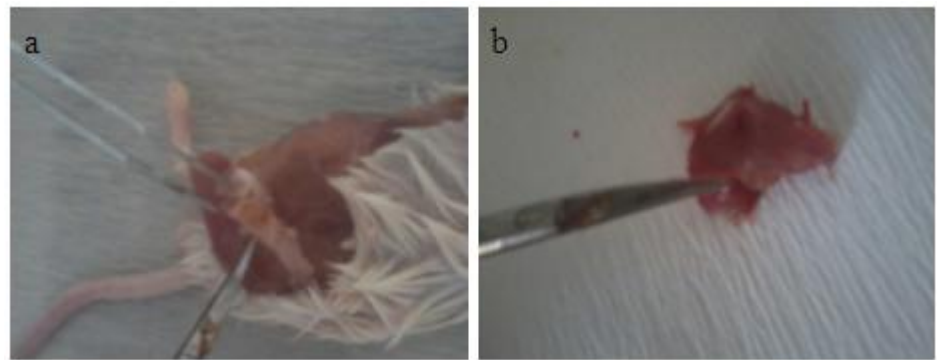
Şekil 4.16: Kondrojenik hücre kültür ortamı ile iki hafta inkübe edilmiş fare embriyonik kök hücrelerinin immünohistokimyasal boyaması. a) Sox 9 antikoruna ile boyanmış, üç boyutlu hücreler (sarı ok); b) Kollajen 2 antikoruna ile boyanmış üç boyutlu hücreler (sarı ok); c) immünohistokimya kontrolü; d) agregan antikoruna ile boyanmış üç boyutlu hücreler (sarı ok), (20X) (Olympus CX31).

Embriyonik kök hücrelerin 3 haftalık kültür sonrasında Sox 9 ve agregan immunoreaktivitelerinin ilk haftaya göre daha zayıf olduğu saptandı (Şekil 4.17 a,d). Bu süreçte kollajen tip II immunoreaktivitesinin çok yoğun olduğu gözlemlendi (Şekil 4.17, d). Üç boyutlu yapılar birinci ve ikinci haftaya oranla daha belirgin iken bu yapılara katılmayan hücrelerin ise öldükleri belirlendi.



Şekil 4.17: Kondrojenik hücre kültür ortamı ile üç hafta inkübe edilmiş fare embriyonik kök hücrelerinin immünohistokimyasal boyaması. a) Sox 9 antikoruna ile boyanmış, üç boyutlu hücreler (sarı ok); b) Kollajen tip 2 antikoruna ile boyanmış, üç boyutlu hücreler (sarı ok); c) immünohistokimya kontrolü; d) agregan antikoruna ile boyanmış, üç boyutlu hücreler (sarı ok) (20X) (Olympus CX31).

4.7 *In Vivo* Ortamda Kondrositlerin Varlığı



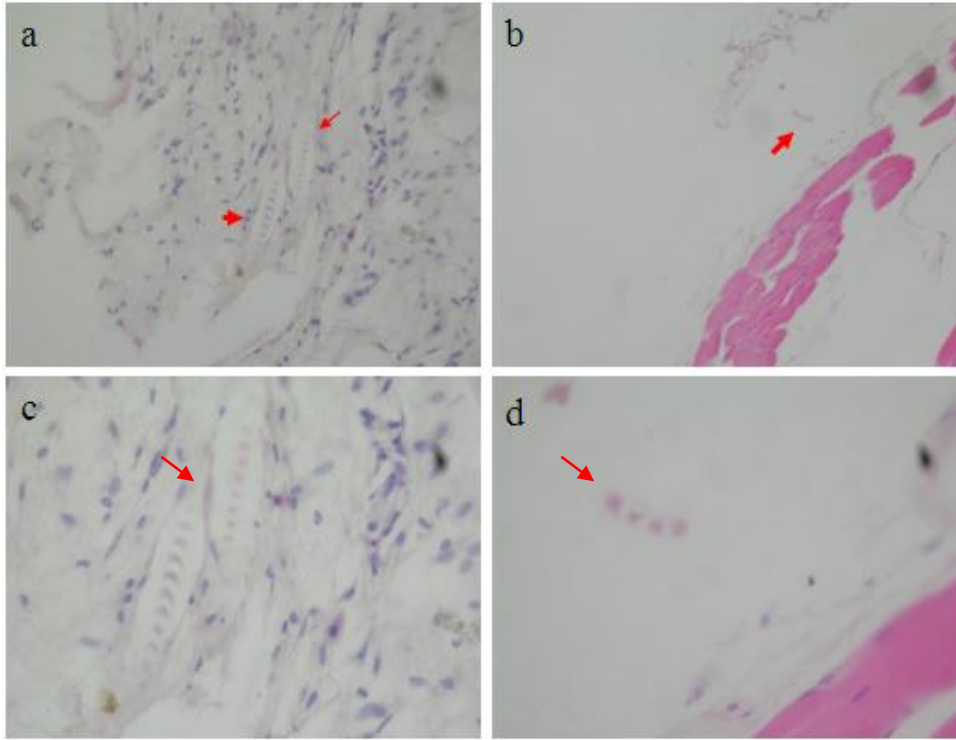
Şekil 4.18: Hücrelerin fare bacak kasına verildiği yerde oluşan yapı ok ile gösterilmiştir.

Farelerde, farklılaştırılan hücrelerin femoral kasa eksiyonunu izleyen ilk 4 hafta içinde herhangi bir sağlık sorunu gözlemlenmedi, farelerin hem ön hem de

arka ekstremitelerinde hareketlerini kısıtlayacak bir sorun ortaya çıkmadı. Embriyonik ve kemik iliği mezenşimal kök hücrelerinden farklılaştırılan hücreler kıkırdak bulunmayan bacak kası içine enjekte edilerek kıkırdak doku oluşumunun in vivo olarak analizi yapılmıştır. Hücrelerin transferinden sonra 1. Ve 2. Haftada alınan örneklerin morfolojik analizleri için hematoksilin-eozin ve Masson Trikrom boyamaları yapılmıştır.

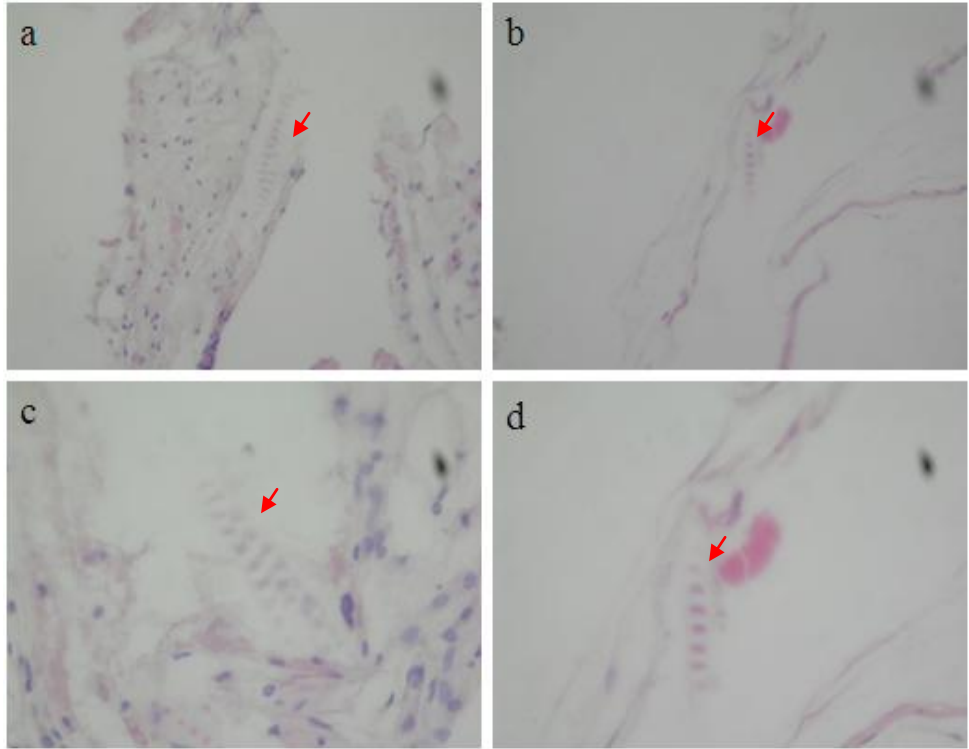
4.7.1 İzole Edilen Yapının Hematoksilin-Eozin Boyanması

1 hafta kondrojenik ortam ile muamele edilen kök hücrelerin verildiği dokudan alınan seri kesitlerde kas dokusu arasında lakunalar içinde yerleşik olarak bulunan tek tek kondrosit hücrelerin bulunduğu, etrafında matris dokusunun gelişerek, kas dokusundan kolaylıkla ayırt edilebiliği görüldü (Şekil 4.19).



Şekil 4.19: Bir hafta kondrojenik vasat ile muamele edilmiş kök hücrelerin hematoksilin-eozin boyaması; a) Farklılaştırılan kemik iliği kök hücrelerinin doku içerisinde görülen kondrojenik yapılar (kırmızı ok), (10X); b) Farklılaştırılan embriyonik kök hücrelerin doku içerisinde görülen kondrojenik yapılar (kırmızı ok), (4X); c) Farklılaştırılan kemik iliği kök hücrelerinin doku içerisinde görülen kondrojenik yapılar (kırmızı ok), (20X); d) Farklılaştırılan embriyonik kök hücrelerin doku içerisinde görülen kondrojenik yapılar (kırmızı ok), (20X) (Olympus CX31).

3 hafta kondrojenik ortam ile muamele edilmiş kök hücrelerin verildiği kas dokusundan alınan seri kesitlerde de benzer yapılar gözlemlendi(Şekil 4.20).

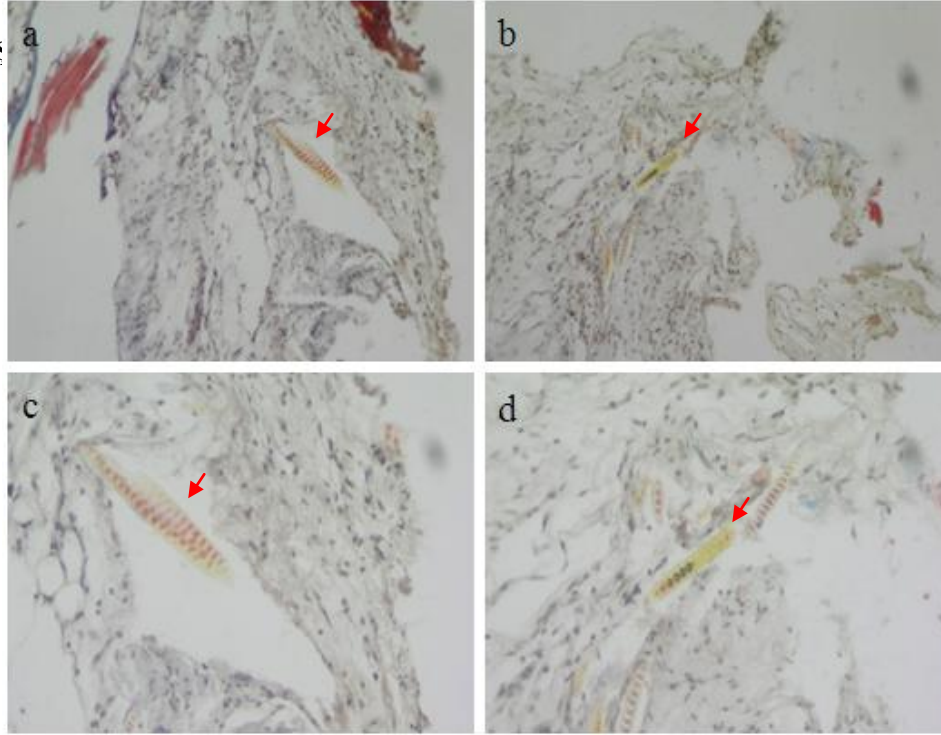


Şekil 4.20: Üç hafta kondrojenik vasat ile muamele edilmiş kök hücrelerin verildiği kas dokusundan alınan seri kesitlerin hematoksilen-eozin boyaması; a) Farklılaştırılan kemik iliği kök hücrelerinin doku içerisinde görülen kondrojenik yapılar (kırmızı ok), (10X); b) Farklılaştırılan embriyonik kök hücrelerin doku içerisinde görülen kondrojenik yapılar (kırmızı ok), (10X); c) Farklılaştırılan kemik iliği kök hücrelerinin doku içerisinde görülen kondrojenik yapılar (kırmızı ok), (20X); d) Farklılaştırılan embriyonik kök hücrelerin doku içerisinde görülen kondrojenik yapılar (kırmızı ok), (20X) (Olympus CX31).

7 gün süre ile kondrojenik vasat ile muamele edilmiş kök hücrelerin verildiği kas dokusundan alınan seri kesitlerin hemotoksilen-eozin boyanması sonrasında, (Şekil 4.20 a,b) kıkırdak doku yapılarının bulunduğu gözlemlendi.

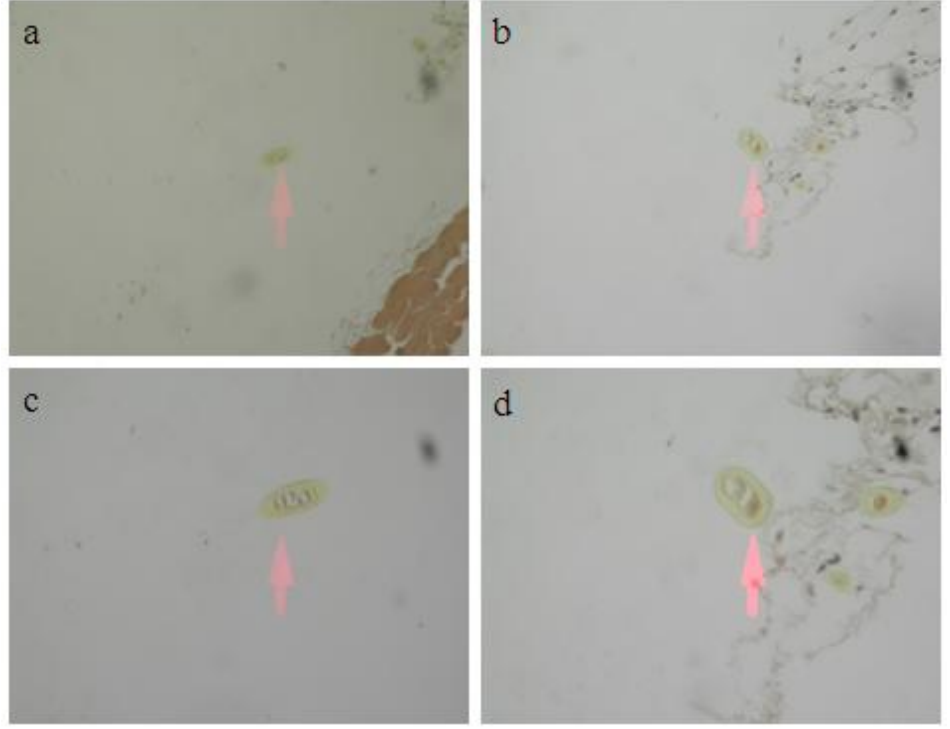
3 hafta kondrojenik ortam ile muamele edilmiş kök hücrelerin verildiği kas dokusundan alınan seri kesitlerde de (Şekil 4.20) benzer yapılar gözlemlendi.

4.7.2 İzole Edilen Doku Kesitlerinin Masson Trikrom Boyaması



Şekil 4.21: Bir hafta kondrojenik vasat ile muamele edilmiş kök hücrelerin Masson trikrom boyaması; a) farklılaştırılan kemik iliği kök hücrelerinin doku içerisinde oluşturduğu kondrojenik yapılar, (kırmızı ok) (10X); b) Farklılaştırılan embriyonik kök hücrelerin doku içerisinde oluşturduğu kondrojenik yapılar, (kırmızı ok) (10X); c) Farklılaştırılan kemik iliği kök hücrelerinin doku içerisinde oluşturduğu kondrojenik yapılar, (kırmızı ok) (20X); d) Farklılaştırılan embriyonik kök hücrelerin doku içerisinde oluşturduğu kondrojenik yapılar, (kırmızı ok) (20X) (Olympus CX31).

Hematoksilen- eozin boyaması yapılan dokulardan seri kesitler alınarak yapılan Masson- trikrom boyası sonucunda ortamda kıkırdağa özgü çevresi sarı, çekirdekleri kırmızı yapıların varlığı saptandı (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22). Ayrıca, hücrelerin tıpkı kondrositlerde olduğu gibi lakün benzeri yapılar oluşturduğu da gözlemlendi (Şekil 4.22 a,b,c,d kırmızı ok).



Şekil 4.22: Üç hafta kondrojenik vasat ile muamele edilmiş kök hücrelerin Masson trikrom boyaması; a) Farklılaştırılan kemik iliği kök hücrelerinin doku içinde oluşturduğu lakun benzeri yapılar (kırmızı ok), (10X); b) Farklılaştırılan embriyonik kök hücrelerin doku içinde oluşturduğu lakun benzeri yapılar (kırmızı ok), (10X); c) Farklılaştırılan kemik iliği kök hücrelerinin doku içinde oluşturduğu lakun benzeri yapılar (kırmızı ok), (20X); d) Farklılaştırılan embriyonik kök hücrelerin doku içinde oluşturduğu lakun benzeri yapılar (kırmızı ok), (20X) (Olympus CX31).

5. TARTIŞMA

5.1 Kıkırdak Dokunun Onarımında Kök Hücre Tedavisinin Kullanılması

Embriyonik kök hücrelerin kültürlerinde, kök hücrelerin pluripotent özelliklerini koruması için fare embriyonik fibroblast hücreleri kullanılmıştır (Takahashi et al., 2007). Fare embriyonik fibroblast hücreleri salgıladıkları LİF ile embriyonik kök hücrelerin kültürde farklılaşmadan üremelerini sağlar. Bu da hücrelerin pluripotent özelliklerini kaybetmeden kültürde üretilmesine yardımcı olur (Sato et al., 2004). Kemik iliği kök hücreleri ise *in vitro* kültür ortamında kök hücre özelliklerini kaybetmeden uzun süre kültürde kalabilirler. Kemik iliği kök hücrelerinin yüksek pasaj sayısında bile farklılaşabileceklerini Duygu Uçkan Çetinkaya ve ekibinin yaptıkları çalışmada açıklamışlardır. Çalışmalarında pasaj sayısı 1 den pasaj sayısı 15 e kadar olan kemik iliği kök hücrelerinin kondrosit ve osteoblastlara farklılaşabileceklerini göstermişlerdir (Kılıç et al., 2007). Embriyonik kök hücreler *in vitro* ortamda LİF ya da STO hücreleri ile kültüre edilmediklerinde pluripotent özelliklerini kaybedip kendi kendilerine üç farklı germ tabakasına farklılaşabilirler. Benjamin ve ekibinin yaptıkları çalışmada embriyonik kök hücrelerinin *in vitro* kültür ortamında 3 farklı tabakaya kendi kendilerine farklılaştıklarını; ancak fibroblast hücreleri ile kültüre edildiklerinde farklılaşmayı engelleyen oct4 salgılamaya devam ettiklerini gösterilmiştir (Reubinoff et al., 2000). Yapılan çalışmalar incelendiğinde, embriyonik kök hücrelerin kondrosit hücrelerine farklılaştırılma çalışmalarında mikrodama yöntemi kullanıldığı görülmektedir (Kramer et al., 2000; Hegert et al., 2002). Bu çalışmada, damla yöntemi kullanılarak embriyonikblastlar oluşturulmuştur. Oluşturulan embriyoblastlar jelatin kaplı petrilere alınarak yüzeye tutunması sağlanmıştır. Embriyoblastların gelişimi sırasında endoderm ve ektoderm tabakaları farklılanmaktadır. Embriyoblastların uygun kültür ortamlarına alınmaları ile mezoderm tabakasında farklılaştığı bilinektedir. Bu nednele çalışmamızda uygulanan protokol ile embriyoblastların ileri farklılaşmasının sağlandığı, mezoderm kökenli olan kondrositlerin gelişimi ile uygulanan protokolün embriyoblastlardan kondrosite farklılaştırmanın uygun olduğu düşünüldü.

Mezenkimal kök hücrelerin kondrositlere farklılaştırılmasında iki yöntem kullanılmaktadır: Mikrokütle ve pellet kültür yöntemi. Zhang (2010) ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada mikrokütle ve pellet kültür sistemlerini karşılaştırmışlardır; mikrokütle kültür yönteminde kondrojenik farklılaşmanın pellet kültür sistemine göre daha iyi olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca mikromass kültür sisteminde daha homojen bir yapı elde edilmekte; kollajen tip 2 ifadesi daha yüksek olmaktadır. Pellet kültür sisteminde ise kollajen tip I ifade olurken fibröz kıkırdak yapısının gelişmekte olduğunu göstermişlerdir (Zhang et al., 2010). Bu projede kemik iliği kök hücrelerinin farklılaştırılmasında kullanılan mikrokütle kültür yöntemi hem mikro damla yöntemine benzemesi nedeniyle hem de homojen üç boyutlu kondrosit hücrelerinin *in vitro* kültür şartlarında üretilmek istenmesi nedeniyle tercih edilmiştir.

Bu projede kemik iliği ve embriyonik kök hücrelerin jelatin ve matrijel kaplı iki farklı yüzeyde üreme özellikleri karşılaştırılmıştır. Kemik iliği kök hücreleri hem jelatin hem de matrijel kaplı petriyelerde üremezken; embriyonik kök hücrelerin her iki yüzeyde de üreyebildiği gözlemlenmiştir. Embriyonik kök hücrelerin farklılaştırma çalışmalarında kök hücrelerin jelatin kaplı petrideki morfolojisi ile matrijel kaplı petrideki morfolojisi karşılaştırıldığında jelatin kaplı petride üç boyutlu bir yapı kazandığı görüldü. Bu nedenle embriyonik kök hücrelerin farklılaştırma çalışmalarında jelatin kaplı petriyeler kullanılmıştır. Kemik iliği kök hücreleri ise polistren yüzeyde farklılaştırılmıştır. Kondrojenik farklılaşma ortamında jelatin kaplı petriyelerdeki hücrelerin matrijel kaplı petriyelere göre üç boyutlu üreme özellikleri jelatinin kollajen yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Hani ve ark.,(2003) yaptıkları çalışmada insan adipoz dokusundan elde ettikleri kök hücreleri aljinat, agoroz hidrojel ve jelatin kaplı hücre iskeleleri kullanarak kondrosit farklılaştırması yapmışlardır. Hücreleri 28 gün kondrojenik hücre kültür ortamı ile kültüre ettikten sonra jelatin kaplı hücre iskelesindeki hücrelerin hücreler arası matriks üretiminin diğer yüzeylere oranla daha fazla olduğu gösterilmiştir (Awada et al., 2004). Farklılaştırma sürecinde kullanılan dekzametazon, kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırma için önemli bir faktördür. Tanaka ve ark., (2004) yaptıkları çalışmada, embriyonik kök hücrelerin kondrosite farklılaşmasında dekzametazonun kollajen tip I ifadesini azaltırken; kültürün 7. gününde kollajen tip 2 nin mRNA sentezini artırdığını göstermektedir (Tanaka et al., 2004). Mackay ve ark.,(1998) insan kemik iliği

kök hücreleri ile yaptıkları çalışmada kondrojenik olmayan farklılaştırmada 1 nM'lık konstantrasyondan 100 nM'lık konantrasyonuna kadar denemeler yapılmış ve 100 nM'lık dekzametazon konantrasyonun kondrojenik farklılaştırma için en uygun konantrasyon olduğunu bulmuştur (Mackay et al., 1998). Yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak, bu projede 100nM'lık konantrasyonu kullanılmıştır. Tanaka ve ark., (2004) çalışmasına benzer olarak 100 nM'lık bulunan kondrojenik hücre kültürü ortamıyla muamele edilmiş hücreler, 1 hafta sonunda yapılan immünositokimyasal analizle kollajen tip 2 antikoruna ile boyanmış ve kollajen tip 2 ekspresyonu gözlemlenmiştir. TGF b-1, kondrojenik farklılaştırma ortamında kullanılan diğer önemli farklılaştırma faktörlerinden biridir. Mwale ve ark.'nın (2006) yaptığı çalışmada TGF b-1 içeren kültür ortamında sürdürülen kültürlerdeki hücrelerde 16 gün sonunda kollajen ifadesi görülmemiş; çok zayıf agregan ifadesi görülmüştür. Diğer taraftan TGF b-1 ile beraber kullanıldığında hem kollajen tip2 hem de kollajen tip 10'un ifadesinin arttığını gösterilmiştir. TGF b-1'in ITS ile kullanılmasının kondrojenik farklılaştırma için uygun olduğunu ispatlanmıştır (Mwale et al., 2006).

Minina ve ark.'nın yaptıkları çalışmada; BMP ve TGF ailesinin farklılaştırma ortamında beraber kullanılması hücrelerin kondrojenik farklılaşma potansiyellerini arttırdığı gösterilmiştir. (Minina et al., 2001).

Kültür ortamında kullanılan askorbik asit hücrelerin vitamin D reseptörlerini uyardığı için hem kondrojenik hem de osteojenik farklılaştırmada önemli bir faktördür. Askorbik asitin kondrojenik ortamda kullanılması matriks proteinlerinin sentezlenmesi ve hücrelerin vitamin D reseptörlerinin uyarılması için gereklidir (Farquharson et al., 1998). Chua ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, ITS'in hiyalin kıkırdak gelişiminde hücre üremesini ve farklılaşmasını olumlu yönde etkilediği ispatlanmıştır (Chua et al., 2005).

Farklılaştırma çalışmalarında çeşitli makalelerin ortak çalışmalarından faydalanılarak bir değerlendirme yapılmış ve bir protokol çıkartılmıştır. Çıkartılan protokol ile hücreler hazırlanan kültür ortamına alınmış ve her hafta immünositokimyasal analizleri yapılmıştır. Kemik iliği ve embriyonik kök hücreler farklılaştırmaya alındıklarında Sox9, agregan, kollajen tip2 antikorları ile boyanmıştır. Bunların yanında bir de normal hücre kültür ortamıyla muamele edilmiş kontrol grubu oluşturulmuştur.

Hücrelerin 1. hafta boyamalarına bakıldığında; 1 haftalık kondrojenik kültür ortamıyla muamele edilen hücrelerde Sox9, agregan boyamaları hem embriyonik hem de mezenkimal kök hücrelerde yoğun bir şekilde görülmüştür. Weimin (1999) ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Sox 9'un kıkırdak dokusunun oluşumunda ortaya çıkan ilk transkripsiyon faktörlerinden olduğunu ayrıca kıkırdak farklılaşmasının olmadığı teratoma dokusundan izole edilen örneklerin Sox 9' a karşı antikorları tarafından boyanmadığını göstermişlerdir (Weimin et al., 1999). Takashi (2006) ve ekibinin yaptıkları çalışmada agregan'a ait mRNA'nın RT-PCR ile kültürün ilk haftasından itibaren var olduğunu göstermiştir (Takashi et. Al., 2006). Ancak kollajen tip II' ye karşı olan antikor ile boyamalar embriyonik kök hücrelerin 7 günlük kültürlerinde görülmekte iken mezenkimal kök hücrelerin 21 günlük kültüründe görülmeye başlamaktadır. Nehrer ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kollajen tip II'nin bir matriks proteini olduğu kültürlerin 1. haftasından ya da 2. haftasından itibaren hücreler arası maddede görüldüğünü ispatlamışlardır (Nehrer et. Al., 1997). Kollajen tip 2, kondrosit farklılaşmasında önemli bir matriks proteindir. Embriyonik kök hücrelerin farklılaştırmanın birinci haftasından itibaren zayıf da olsa kollajen boyanması kemik iliğine oranla farklılaşma potansiyelinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Mezenkimal ve embriyonik kök hücreler Sox9 ve agregan boyamalarının 1. haftadan itibaren yüksek olmasına rağmen; kollajen antikoruyla her iki hücre hattı da 3. haftada yüksek oranda boyanmıştır.

Her iki hücre hattının da kondrojenik farklılaştırma ortamına alındıklarından itibaren 1., 2., 3. haftalardaki yoğunlukları incelendiğinde hücre yoğunluğunun haftadan haftaya azaldığı gözlemlenmiştir. Her iki hücre hattı da incelendiğinde; kültürdeki hücrelerin birbiriyle kümeler halinde ürediği görülür. Bu kümeye dahil olmayan hücrelerin ise apoptozise giderek öldüğü düşünülebilir.

Zaka ve ark.'ının yaptıkları çalışmada oksijensiz kalan kondrosit hücrelerinin apoptozise yöneldiklerini göstermiştir (Zaka et al., 2009). *In vitro* kültür şartları kondrosit farklılaşmasında yeterli oksijen sağlamıyor olabilir. Bu durum da kültürün ilerleyen günlerinde hücreleri apoptoza yönlendiriyor olabilir. Blanco ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; kondrositlerin *in vitro* ortamda TGF ve serum varlığında yüksek oranda nitritoksit ürettiklerini ispatlanmıştır. Nitrit oksitin hücreleri apoptoza götürdüğünü TUNEL ve elektron mikroskop incelemeleri göstermiştir (Blanco et al., 1995). Cao ve arkadaşlarının yaptıkları

bir diğerk çalışmada ise kondrosit hücrelerinin kültür ortamında matriks proteinlerinden mahrum olması hücrelerin toplanarak apoptoza gittiğini gösterilmiştir. Bu durum bir matriks proteini olan hiyalüronanın ortamda bulunması halinde hücrelerin apoptoza gitmesini önlediğini göstermiştir (Cao et al., 1999).

Kök hücrelerden kondrositlere farklılaştırma çalışmalarında hücrelerin matriks proteinlerini daha iyi sentezleyebilmesi için biyomateryal kullanılabilir. Bu biyometeryal, nanoteknoloji ile üretilen hücrelerin toplanarak üremesini engelleyecek ve hücre kültür ortamındaki oksijeni bütün hücelere eşit oranda dağıtacak bir biyomateryal olabilir. Böyle bir malzemenin kullanılması kondrosite farklılaşan kök hücrelerin apoptoza uğramasını engeller ve yeterli sayıda farklılaşmış hücre elde edilebilir.

Bu çalışmada, hem kemik iliğı kök hücrelerinin hem de embriyonik kök hücrelerin 3. haftadan itibaren kollajen tip 2 salgıladıklarını immünohistokimyasal yöntemler ile ispatlanmıştır. Bu hücrelerin *in vivo* ortamdaki davranışlarının incelenmesi amacıyla hücreler, hücre kültür ortamıyla fare bacak kasına enjekte edilmiştir. Kondrosite farklılaştırılan embriyonik ve mezenşimal kök hücreler kendi içinde 2 gruba ayrılmıştır: 1 hafta kondrojenik vasat ile duran kök hücreler ve 3 hafta kondrojenik vasatla inkube edilen kök hücreler. 1. ve 3. hafta sonunda fare bacak kasından izole edilen kök hücrelerin boyaması yapıldığında her iki grupta da kondrojenik yapılar bulunmuştur; ancak bu hücreleri immünosupresif farelere verilemediğı için izole edilen kas dokusunda bol miktarda lenfosit görülmüştür. Her iki hücre hattının da farklılaştırılarak fare bacak kasına verilmesi ve izole edilen dokularda teratoma oluşmaması bu hücrelerin kas dokusundaki hücrelerden etkilenmeden kondrosit özelliklerini gösterdiğini ispatlamaktadır. Bu durum hem embriyonik hem de mezenkimal kök hücrelerin iyi bir farklılaştırma çalışmasıyla rejeneratif tıpta tedavi amaçlı kullanılabileceğinin göstergesidir.

Bu çalışmada kondrosite farklılaştırılan embriyonik ve mezenkimal kök hücreler fare bacak kasına enjekte edildikten 4 hafta sonunda fare bacağına lenf nodlarına benzer yapılar oluştuğı gösterildi (Şekil 4.18- Şekil 4.19). Bu yapıların immün sistemi baskılanmamış fare kullanılmasından dolayı oluştuğı düşünüldü. Ancak Hentze (2009) ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada embriyonik kök hücreleri üç farklı germ tabakasına (ektoderm, endoderm, mezoderm) farklılaştırarak fare bacak kasına enjekte ettikten 12 hafta sonra bacak kaslarında

teratoma oluşumunu gösterdi (Hentze et. Al., 2009). Yaptığımız çalışmada, kök hücrelerin kondrosite farklılaştırıldıktan sonra verilmesi, immün sistemi baskılanmamış fare kullanılması, deneklerin 4 hafta sonunda sarkifiye edilmesi gibi nedenlerden teratoma oluşmamış olabileceği düşünüldü.

Günümüzde kıkırdak hastalıkları tedavisi için kök hücrelerin doku mühendisliği uygulamalarında kondrosite farklılaştırılarak eklem hastalıklarının tedavisinde kullanımı son zamanlarda üzerinde en çok çalışılan konulardan biridir. Artrit grubu hastalıkların en sık görülen biçimi olan osteoartrit, hücrelerarası matriks yıkımı ve kondrosit metabolizmasında bozulma ile karakterize edilen, primer bir eklem hastalığıdır. Kıkırdak kaybı, sinoviyal eklemlerde kemik kemiğe temas eder ve bunun sonucunda da eklem hareketlerinde ve işlevinde hızlı bir bozulmaya sebep olur (Senköylü et al., 2002). Eklem kıkırdağı kayıplarında dokunun kendi kendini onarma kapasitesi oldukça sınırlıdır. Sınırlı onarım gerçekleşse de oluşan doku, biyomekanik olarak orijinal eklem kıkırdağı ile aynı özellikleri taşımayan fibröz kıkırdağıdır. Günümüzde kıkırdak doku hasarının tamiri mikro kırık yöntemi osteokondral yama, periosteal graft, perikondral graft otolog kondrosit implantasyonu ile gerçekleştirilmektedir.

Türkiye’de Ars Arthro Biyoteknoloji Şirketi, hastadan alınan kıkırdak dokunun artroskopi yöntemi ile biyopsisini yapmış ve kültüre etmiştir. Hiyalin kıkırdağın rejenerasyon sürecini hızlandıran ve optimize eden patentli 3D Kollajen Tip I matriks hücre iskelesi kullanılmıştır. Tüm hastalarda Kollajen Tip II ekspresyonu gözlenmiştir. Hücre sayımlarına göre 15-45 yaş arası hastalarda günlük hücre katlanma oranının 45-60 yaş arası hastalara oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

5.2 Tamir edilen dokuda oluşan problemler

Tamir edilen dokudaki kollajen fibrilleri, rejenere kıkırdak doku çevresine iyi bir şekilde oturmamaktadır. Yaranın yakınındaki kondrosit lakünleri boşalır. Rejenere kıkırdak dokusu çevresine iyi bir şekilde yerleşmemektedir. Tip II kollajen başlangıçta olmasına rağmen 6-12. haftalarda %20-35 arasında Tip I kollajen görülmektedir. Bu belirtiler, tedavinin 10. haftasında görülmeye başlar ve 24. haftada daha da ilerler. Kondrositler hücre kültür ortamında düşük yoğunlukta bulunmaktadırlar. 4. pasaj sonunda fenotiplerinde değişiklik olmaktadır. Kollajen

tip II yerine tip I sentezlerler. Otolog kondrosit implantasyonunda, hücreler hastanın dizinden alınır. Bu hücrelerin kültürde çoğaltılması telomeraz kısalmasına neden olur. Otolog kondrosit implantasyonlarında hastanın yaşına bağlı olarak hastadan alınan örnek, doku kayıplarına sebep olabilir. Bu sebepler göz önüne alındığında; kök hücre tedavisinin kırıldak doku onarımında daha avantajlı olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

1. Bu çalışmada embriyonik ve mezenkimal kök hücrelerin kondrosite farklılaştırılması yapıldı. Farklılaştırma süreci boyunca üç farklı yüzey (Polystren yüzey, jelatin kaplı polystren yüzey, matrijel kaplı polystren yüzey) kullanıldı. En uygun yüzeyin embriyonik kök hücreler için jelatin kaplı polystren yüzey, KİKH'ler için polystren yüzey olduğu gösterildi. Her iki hücre kaynağının bu yüzeylerde karşılaştırılarak farklılaştırılması ile Türkiye'de yapılan yeni bir çalışmadır.

2. Kondrojenik farklılaştırma sürecinde her iki kök hücre kaynağında kümeler oluşturduğu ve üç boyutlu bir yapı oluşturarak kondrositlere farklılaştığı, bu yapıya katılmayan hücrelerin ise öldüğü gösterildi. Farklılaşma süresince kök hücrelerin oluşturduğu üç boyutlu yapıları desteklemek ve daha iyi kültür şartları sağlayabilmek için nanoteknolojik yöntemlerle üretilmiş jelatin kaplı ya da kollajen kaplı hücre iskelelerin kullanılması gerektiği sonucu çıkarıldı.

3. Yapılan deneylerde kullanılan hücre kültür ortamı malzemelerinin (BMP-2, TGF- β 1, Deksamethazone, Askorbik asit, Sodyumpruyvat) kondrojenik farklılaşma için uygun büyüme faktörleri olduğu gösterildi.

4. Kondrojenik kültür ortamına alınan hücreler 7., 14., 21. ve 28. günlerde Sox 9, agregan ve kollajen tip II antikoları ile boyanarak farklılaşma süreci immünohistokimyasal analiz ile 4 hafta takip edildi. Bu analizler sonucunda Sox 9 ve agregan'a karşı antikolar ile ilk haftada boyanan hücreler kollajen tip II'ye karşı antikor ile EK'ler 14 günde KİKH'leri ise 28 günde boyanmışlardır. Bu sonuçlar embriyonik kök hücrelerin mezenkimal kök hücrelere göre daha hızlı farklılaşabildiğini ispatlandı.

5. Fare bacak kasına enjekte edilen kondrositler farklı dokuya ait hücrelerden etkilenmeden kondrojenik yapısını koruduğu sonucu çıkarıldı.

6. Günümüzde kırık doku onarımında kullanılan yöntemler (mikro kırık yöntemi, otolog kondrosit implantasyonu, yama yöntemi) hastanın kırık doku dokusunun yerini almamaktadır. Bu yöntemle tamir edilen dokularda kollajen tip II yerine kollajen tip I proteini sentezlendiğinden bu yöntemler kırık doku dejenerasyonu tedavisine yetersiz kalmaktadır. Bu projede

farklılaştırılan kök hücrelerin kollajen tip II sentezlendiğinin gösterilmesiyle kıkırdak doku hastalıklarının tedavisinde kullanılabileceği ispatlandı.

7. Embriyonik kök hücrelerin kemik iliği kök hücrelerine oranla daha erken kollajen tip II sentezlemesi ve 3 haftada farklılaşmış olması, klinik operasyonlar için daha uygun olduğu sonucu çıkartılabilir. Ancak KİKH'lerin eldesinin kolaylığı ve insan kıkırdak hastalıklarının tedavisinde embriyonik kök hücre eldesinde karşılaşılan etik sorunlar KİKH'leri daha avantajlı hale getirmektedir.

8. Kök hücreler, *in vitro* ortamda farklılaştırıldıktan sonra, kıkırdak dokudan elde edilen kondrositler ile gen ifadesi karşılaştırılarak hangi kök hücre kaynağının tedavi için uygun olduğunun daha detaylı araştırılması gerektiği sonucu çıkartıldı.

9. Bunların yanında farklılaştırılan kök hücrelerin telomer uzunluğuna bakılarak hastaya ait hücrelerin telomerleri ile aynı uzunlukta olup olmadığının araştırılması gerektiği sonucu çıkartıldı.

10. Bu projede farklılaştırılan embriyonik ve mezenkimal kök hücreler fare bacak kasına enjekte edilmiştir. Enjeksiyonu yapılan denekler 4 hafta boyunca gözlemlendi ve her hangi bir teratoma oluşumu gözlemlenmedi. Teratoma oluşumunun daha detaylı incelenmesi için immünsistemi baskılanmış farelerde farklılaştırılan ve farklılaştırılmayan kök hücrelerin bacak kasına enjekte edilip en az 12 hafta gözlem yapıldıktan sonra teratoma oluşturma potansiyellerinin araştırılması gerektiği sonucu çıkartıldı.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Weissman, I. L., 2000, Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution, *Cell*, 100:157–168.

Caplan, I. A., 2007, Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine, *J. Cell. Physiol*, 213:341–347.

Allen C. E. 'About Stem Cell', <http://www.stemcell.com/en/About-Us.aspx> (Erişim Tarihi: 9 temmuz 2012.)

Bongso, A., Richards, M., 2004, History and perspective of stem cell research, Elsevier, 18(6):827–842.

Solter D., 2006, From teratocarcinomas to embriyonic stem cells and beyond: a h,story of embryonic stem cell research, *Nature Reviews Genetics*, 7:319-327.

Dinçer, F., 1982, Ord. Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün Hayatı ve Bilimsel Çalışmaları, *A. Ü. Vet. Fak. Dergisi*, 29(1-2):256-276.

McCulloch, E. A., Till, E. J., 2005, Perspective on the properties of stem cells, *Nature*, 10:5-7.

Burder, S. P., Fink, D. J., Caplan, A. I., 1994, Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy, *56(3):283-294*.

Tavassoli, M., Crosby, W. H., 1968, Transplantation of marrow to extramedullary sites, *Science*, 161:54-56.

Tavassoli, M., Friedenstein, A., 1983, Hemopoietic stromal microenvironment, *15: 195-203*.

Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V. and Panasyuk, A. F., 1974, Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo, *Transplantation*, 17(4):331-40.

Miskarova, E. D., Lalykina, K. S., Kokorin I. N. and Fridenshtein, A., 1970, Osteogenic properties of repeatedly- passaged diploid cultures of bone marrow cell, *70(9):78-81*.

Dexter, T. D., Allen, L. G. and Lajtha, L. G., 2005, Conditions controlling the proliferation of heamopoietic stem cell in vitro, *Journal of Cellular Physiology*, 91:335-344.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Moore, M.A.S., Sheridan, A.P. C., Allen T. D. and Dexter M. T., 1979, Prolonged hematopoiesis in a primate bone marrow culture system: microenvironment characteristics of stem cell production and the hematopoietic, blood, 54: 775-793.

Owen, M., Fridenshtein , A. J., 1988, Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors, Ciba Found Symp, 136:42-60.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, A. M., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R., 1999, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell, Science, 284:143-147.

Bianco, P., Robey, G. P., Simmons, J. P., 2008, Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays, Cell Stem Cell, 2:313-319.

Andrews, P. W., Bahrami, A. R., Damianoy, I., Gokhale, P. and Draper, J. S., 2005, Embryonic stem (ES) cells an embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin, Biochem Sec. Trans, 33(6): 1526-1530.

Evans, M. U., Kaufman, M. H., 1981, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, Nature, 292:154-156.

Kang, C., 2011, Gene Therapy-Developments and Future Perspectives, The İntech Press Ltd., Chine, 366p.

Bongso, A., Lee, E.H., 2005, Stem Cell From Bench to Bedside, Stallion Press Ltd., Singapor, 561p.

Cohen, C. B., 2007, Renewing The Stuff of Life: Stem Cells, Ethics, and Public Policy, Oxford Universty Press, 320p.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones J. M., 2012, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, Science, 282:1145-1147.

Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006, Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, Cell,(126), Japan, 663-676p.

French, J. A., Adams, C. A., Anderson, S. L., Kitchen, J. R., Huges, R. and Wood, S. H., 2008, Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts, Stem Cells, 26:485– 493

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Li, T., Maserati, M., Lu, S. J., Zdravkovic, T., Ilic, D., Genbacev, O., Fisher, S., Krtolica, A. and Lanza, R., 2008, Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction, *Cell Stem Cell*, 2(2):113-117.

Guhr, A., Kurtz, A., Friedgen, K., Loser, P., 2006, Current state of human embryonic stem cell research: an overview of cell lines and their use in experimental work, *Stem Cells*, 24:2187–219.

Lovell-Badge, R., 2001, Overview the future of stem cell, *Nature*, 414:88-91.

Bosch, T. C., 2009, Hydra and the evolution of stem cells, *BioEssays*, 31(4): 478-486.

Agata, K., 2008, Stem cell in planaria, *Stem Cells*, 12:59-74.

Pfister, D., Mulder, K., Philop, I., Kuales, G., Hrouda, M., Eichberder, P., Gorogonie, G., Hartenstein, V. and Ladumer, P., 2007, The exceptional stem cell system of *macrostomum ligano*: screening for gene expression and studying cell proliferation by hydroxyurea treatment and irradiation, 9:4-9.

Choumerianou, D., Dimitriou, H. and Kalamanti, M. D., 2008, Stem cells: promises versus limitations, *Mary Ann Liebert*, 14:53-60.

Khalturin, K., Anton-Erxleben, F., Milde, S., Ploetz, C., Wittlieb, J., Hemmrich, G. and Bosch, T. C. G., 2007, Transgenic stem cells in Hydra reveal an early evolutionary origin for key elements controlling self-renewal and differentiation, *Dev Biol*, 309: 32–44.

Institute of Medicine, 1998, *Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine*, National Academy Press, Washington, 20055(800):624-6242.

Cauffman, G., Rycke, M., Sermon, K., Liebaers, I., and Velde H., 2009, Markers that define stemness in ESC are unable to identify the totipotent cells in human preimplantation embryos, *Human Reproduction*, 24:63-70.

Molofsky, A. V., Pardal, R. and Morrison, J. S., 2004, Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal, *Current Opinion in Cell Biology*, 16: 700-707.

Willnut, P., 2009, *Essentials of Stem Cell Biology*, Elsevier Publishing, 166:186-195.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. and Smith A., 2012, Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3, *Gene & Development*, 12:2048–2060.

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G. and Schaper, F., Graeve L., 1998, Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway, *Biochem J*, 334:297-314.

Kunisada, K., Tone, E., Fujio, Y., Matsui, H., Yamauchi-Takahara K. and Kishimoto, T., 1998, Activation of gp130 Transduces Hypertrophic Signals via STAT3 in Cardiac Myocytes, *Journal of American Association*, 98:346-352.

Latchman, D. S., 1999, POU family transcription factors in the nervous system, *Journal of Cellular Physiology*, 179(2):126-133.

Niwa, H., Masui, S., Chambers, I., Smith, G. A. and Miyazaki, J., 2002, Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells, *Mol. Cell. Biol.*, 22(5):1526.

Shimozaki, K., Nakashima, K., Niwa, H., and Taga T., 2003, Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures, *Development Biology*, 130: 2505-2512.

Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Disuke, S., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A. A., Ko, M. S. H. and Niwa, H., 2007, Pluripotency governed by Sox 2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cell, *Nature Cell Biology*, 9:625-635.

Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A. A., Ko and M. S. H., Niwa, Hitoshi., 2007, Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells, *Nature Cell Biology*, 9:625 – 635.

Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S. and Tweedie, S., 2003, Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells, *Cell*, 113:643–655,

Cavaleri, F., Scholer, H. R., 2003, Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra, *Cell*, 113:551–557.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Protocol Online, ‘*Morphology of ES cell clones*’, <http://www.protocol-online.org/biology-forums/posts/33842.html>. (Erişim tarihi:19 Temmuz 2012).

Till, J. E., Mcculloch, E. A. and Siminovitch, L., A, 1964, Stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells, *Developmental Biology*, 51:33-36.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M, Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R., 1999, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, 284:143-147

Dries, J. D., 2004, *Stem Cell Handbook*, Shock, Humana Press, 21(6):579–580.

Veck, L. L., Zaninović, N., 2003, *An Atlas of Human Blastocysts*, The Parthenon Publishing Group, New York, 370p.

Habib, N. A., Levicar, N., Gordon, M. Y., Jiao, L. and Fisk, N., 2007, *Stem Cell Repair, and Regeneration*, Imperial College Press (2) London, 285p.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, Joseph., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M., 1998, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *science*, (282), London, 5391 p.

Marks, H., Kalkan, T., Menafra, R., Denissov, S., Jones, K., Hofemeister, H., Nichols, J., Kranz, A., Stewart, A. F., Smith, A. and Stunnenberg, H. G., 2012, The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency, *Cell*,149:590–604.

Draper, J. S., Pigott, C., Thomson J. A. and Andrews, P. W., 2002, Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture, 200:249–258.

Lau, C., Rogers, J. M., 2004, Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood, *Birth Defects Res C Embryo Today*, 72(4):300-12.

Kaufman, M. H., Robertson, E. J., Handyside, A. H. and Evans, M. J., 1983, Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos, *J. Embryol. exp. Morph.*,73:249-261.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Lorthongpanich, C., Laowtammathron C., Parnpai, R., 2011, From microsurgery to single blastomere biopsy for ES cell establishment , Thai J Vet Med., 41(1): 11-22.

Vatensever, S., 2009, Kök Hücre: Biyolojik ve Klinik Yaklaşım, Sağlıkta Birikim Dergisi, 1(5):1-10.

Fluckiger, A. C., Marcy, G., Marchand, M., Négre, D., Cosset, F. L., Mitalipov, S., Wolf, D., Savatier, P. and Dehay, C., 2006, Cell cycle features of primate embryonic stem cells, Stem Cells, 24(3): 547–556.

Jin, Q., Duggan,R., Dasa, S. S. K., Li, F. and Chen L., 2010, Random mitotic activities across human embryonic stem cell colonies, Stem Cells and Development, 19(8):241-1248.

Fleming, W. H., Alpern, E. J., Uchida, N., Ikuta, K., Spangrude, G. J. and Weissman, I. L., 1993, Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells, The Journal of Cell Biology, 122(4):897-902.

Wong, D. J., Liu, H., Ridky, T. W., Cassarino, D., Segal, E. and Chang, H. Y., 2008, Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells, Cell Stem Cell, 2:333–344.

Dan, Y. Y., Riehle, K. J., Lazaro, C., Teoh, N., Haque, J., Campbell, J. S. and Fausto, N., 2006, Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages, Pnas, 103(26):9912–9917

Bock, G. R., Cohen D. and Jamie A., 2001, From genome to therapy: integrating new technologies with drug development, Biochemistry and Molecular Biology Education, 29:126-133.

Holtzer, H., Weintraub, H., Mayne, R. and Mochan, B., 1972, The cell cycle, cell lineage, and cell differentiation, Dev. Biol. 7: 229–256.

Bender, J. G., Unverzagt, K. L., Walker, D. E., Lee, W., Van Epps D. E., Smith, D. H. and Stewart L. B., 1991, Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry, Blood, 77:2591-2596.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Li, L., Xie, T., 2005, Stem cell niche: structure and function, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21:605-631.

Smith, G. A., Heart, K. J., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M. and Rogers, D., 1988, Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides, *Nature*, 336:688-690.

Ray, K., 2010, *Biomaterials as Stem Cell Niche*, Springer, Berlin, 309p.

Vallier, L., Alexander M. and Pedersen, R. A., 2005, Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells, *Journal of Cell Science*, 118:4495-4509.

Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. and Roder, J. C., 1993, Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells, *Developmental Biology*, 90:8424-8428.

Mete G., 2009, Sıçanlarda Kronik Travmatik Diz Osteoartriti Modelinde Mezenkimal Kök Hücre Tedavisi, Uzmanlık Tezi, Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi, 51s. (yayımlanmamış).

Kaptanoğlu, E., Attar, A., 2000, Omurilik Yaralanmasında Rejenerasyon Çalışmaları ve Kök Hücre Uygulamaları, *Türk Nöroşirürji Derneği Bülteni*, 43-56s.

Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. and Discher, D. E., 2006, Matrix elasticity directs stem cell lineage specification, *Cell*, 126:677-689.

Datta, N., Pham, P. Q., Sharma, U., Sikavitsas, I. V., Jansen, A. J. and Mikos, A. G., 2006, In vitro generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation, *PNAS*, 103 (8):2488-2493.

Saris D. B. F., 2002, *Joint Homeostasis in Tissue Engineering for Cartilage Repair*, D.B.F. Saris, Utrecht 197 p.

Sabatini, M., Pastoureau, P. and Ceuninck, F., 2004, *Cartilage and Osteoarthritis*, Humana Press, (1), New Jersey,

Francis Suh, J. K., Matthew, H. W. T., 2000, Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, *Biomaterials*, 21:2589-2598.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Martin, K. L., Otsuki, S., Grogan, P. S., Sah, R., Terkeltaub, R. and D’Lima, D., 2010, Cartilage cell clusters, *Arthritis Rheum*, 62(8): 2206–2218.

Williams, G. M., Chan, E. F., Temple-Wong, M. M., Bae, W. C., Masuda, K., Bugbee, W. D. and Sah, R. L., 2010, Shape, loading, and motion in the bioengineering design, fabrication, and testing of personalized synovial joints, 43(1):1-23.

Vinater, C., Bouffi, C., Merceron, C., Gordeladze, J., Brondello, J. M., Jorgensen, C., Weiss, P., Guicheux, J. and Noël, D., 2009, Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy, *Curr Stem Cell Res Ther*, 4(4):318–329.

Cameron, T. L., Belluoccio, D., Farlie, P. G., Brachvogel, B. and Bateman, J. F., 2009, Global comparative transcriptome analysis of cartilage formation in vivo, *BMC Developmental Biology*, 9(20):1-17.

Hollander, A. P., Dickinson, S. C., and Kafienah, W., 2010, Stem cells and cartilage development: complexities of a simple tissue, *Stem Cells*, 28:1992–1996.

Meyer, U., Wiesmann, H. P., 2006, *Bone and Cartilage Engineering*, Springer, (62), 442 p.

Loeser, R. F., 2000, Chondrocyte integrin expression and function, *Biorheology*, 37:109–116.)

MBBS Medicine (Humanity First), ‘Cartilage Histology’
<http://medicinembbs.blogspot.com/2011/06/cartilage-histology.html> (Erişim Tarihi: 20 Ağustos 2012).

Guilak, F., Jones, W. R. and Ting-Beall, H. P., 1999, The deformation behaviour and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage, *Osteoarthritis Cartilage*, 7:59–70.

Hirsch, M. S., Lunsford, L. E., Trinkus-Randal, V. and Svoboda, K. K. H., 1997, Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated, *Developmental Dynamics*, 210:249–263.

Ofek, G., Natoli, R. M. and Athanasiou, K. A., 2009, Insitu mechanical properties of the chondrocyte cytoplasm and nucleus, *Journal of Biomechanic*, 42:873–877.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kato, Y., Iwamoto, M., Kolke, T., Suzuli, F. and Takano, Y., 1988, Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: Regulation by transforming growth factor beta and serum factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:9552-9556.

Kato Y., Iwamoto, M., 1990, Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation, *The Journal of Biological Chemistry*, 256:5903-5909.

Scott, N. W., Scuderi, G., 2011, *Surgery of the Knee*, Elsevier, Hardbound, 1504p.

Peterson, L., Minas, T., Brittberg, M. and Lindahl, A., 2003, Treatment of osteochondritis dissecans of knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 85(2):17-24,

Buckwalter, J. A., Mankin H. J., 1998, Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation, *Articular Cartilage*, 47:487-504.

Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O. and Peterson, L., 1994, Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation, *N. Engl J. Med.*, 331(14):889-95.

Lee, W. J., Kim, H. Y., Kim, H. S., Han, H. S. and Hahn, B. S., 2004, Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications, *Yonsei Medical Journal*, 45:41-47.

Hegert, C., Kramer, J., Hargus, G., Müller, J., Guan, K., Wobus, M. A., Müller, K.P. and Rohwedell, J., 2002, Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells, *Journal of Cell Science*, 115: 4617-4628.

Türköz-Uluer, E., 2009, Fare Embriyonik Kök Hücrelerinden Farklılaştırılan Epidermal Seri Hücrelerinden Keratinositlerin Primer Yara İyileşiminde kullanımı, Uzmanlık Tezi, CBU Tıp Fakültesi, 167s (yayımlanmamış).

Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa M. and Yamanaka, S., 2007, Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures, *Nature Protocols*, 2:3081 – 3089.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. and Brivanlou, A. H., 2004, Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor, *Nature Medicine*, 10:55-63.

Kılıç, E., Ceyhan, T. ve Cetinkaya, D. U., 2007, İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal stromal hücrelerin kıkırdak ve kemik hücrelerine farklılaşma potansiyelinin değerlendirilmesi, *Acta Orthop Traumatol Turc*, 41(4):295-301.

Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A. and Bongso, A., 2000, Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro, *Nature*, 18:399-404.

Zhang, L., Su, P., Xu, C., Yang, J., Yu, W. and Huang, D., 2010, Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems, *Biotechnol Lett.*, 32(9):1339-46.

Awada, H. A., Wickhama, M. Q., Leddy, H. A., Gimble, J. M. and Guilka, F., 2004, Differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds, *Department of Surgery*, 25(16): 3211–322.

Tanaka, H., Murphy, C. L., Murphy, C., Kimura, M., Kawai, S. and Polak, J. M., 2004, Chondrogenic Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells: Effects of Culture Conditions and Dexamethasone, *Journal of Cellular Biochemistry*, 93:454–462.

Mackay, A. M., Beck, S. C., Murphy, J. M., Barry, F. P., Chichester, C.O. and Pittenger, M. F., 1998, Chondrogenic Differentiation of Cultured Human Mesenchymal Stem Tissue Engineering, *Cells from Marrow*, 4(4): 415-428.

Mwale, F., Stachura, D., Roughley, P. and Antoniou, J., 2006, Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation, *J Orthop Res*, 24(8):1791-1798.

Minina, E., Wenzel, H. M., Kreschel, C., Karp, Seth., Gaffield, W., McMahon, A. P. and Vortkamp, A., 2001, BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation, *Development*, 128:4523-4534.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Farquharson, D. C., Berry, J. L., Mawer, E. B., Seawright, E., Whitehead, C. C., 1998, Ascorbic acid-induced chondrocyte terminal differentiation: the role of the extracellular matrix and 1,25-dihydroxyvitamin, *European Journal of Cell Biology*, 76(2):110–118.

Chua, K. H., Aminuddin, B. S., Fuzina, N. H., Ruszymah, B. H., 2005, İnsulin-transferrin-selenium prevent human chondrocyte dedifferentiation and promote the formation of high quality tissue engineered human hyaline cartilage, *Materials*, 9:58-76.

Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R. and Crombrughe, B., 1999, *Sox9* is required for cartilage formation, *Nature Genetics*, 22:85-89.

Ikenoue, T., Trindade, C. D. M., Lee, S. M., Lin, Y. E., Schurman, D. J., Goodman, S. B. and Smith, L. R., 2003, Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro, *Journal of Orthopaedic Research*, 21(1):110-116.

Zaka, R., Dion, A.S., Kusnierz, A., Bohensky, J., Srinivas, V., Freeman, T. and Williams, C. J., 2009, Oxygen tension regulates the expression of ANK (progressive ankylosis) in an HIF-1-dependent manner in growth plate chondrocytes, *J Bone Miner Res.*, 24(11):1869-1878.

Blanco, F. J., Ochs, R. L., Schwarz, H. and Lotz, M., 1995, Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide, *Am J Pathol*, 146(1):75-85.

Cao, L., Lee, V., Adams, M. E., Kiani, C., Zhang, Y., Hu, W. and Yang, B. B., 1999, Chondrocyte apoptosis β 1-Integrin–collagen interaction reduces, *Matrix Biology*, 18(4):343–355.

Senköylü, A., Ural, E., Kesenci, K., Simsek, A., Ruacan, S. ve Piskin, E., 2002, Poly(D,L-lactide/ caprolactone)/hydroxyapatite composites as bone filler: An in vivo study in rats, *Int J Artif Organs*, 25(12):1174-9.

ÖZGEÇMİŞ

İsim: Gülşah KÜRKCÜ

Doğum Yeri ve Tarihi: 06.10.1984, Ankara, Türkiye

Milliyeti: T.C.

Cinsiyeti / Medeni Hali: Bayan/ Bekâr

Adres: 1034. Sokak No: 61 Daire:14, 35140, Bornova-İzmir
Türkiye

Cep Telefonu: +90 544 4864691

E-Mail : kurkcugulsah@gmail.com

Eğitim

- **2012 Yüksek Lisans -** , Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü.
- **2004-2008 Lisans -** Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- **2000-2004 Lise –** İnönü Anadolu Lisesi

Katkıda Bulunduğu Eğitim-Öğretim Faaliyetleri

- Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Biyomühendislik Mühendislik Laboratuvarı, 2010-2012
- Yükseliş Dersanesi Biyoloji Öğretmenliği, Bölüm Başkanlığı, 2009-2012
- TEV Gönüllü Öğretmenlik, 2004-2008

Sertifikalar

- **21.Ulusal Biyoloji Kongresi**, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 03-07 Eylül 2012.
- **Temel Hücre Kültürü ve Alternatif Yöntemler Kursu**, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü Tarafından, 14-17 Haziran 2011.
- **Nanotechnology In Medicine Functional Materials and Their Medical Applications**, Ege Üniversitesi, 04-05 Temmuz 2011.

Projeler

- Antioksidan Yüklü İpek Fibroin/Hyaluronik Asit Esaslı Nanolif Mebranların Geliştirilmesi ve Yara Örtülerinde Kullanılma Potansiyellerinin Belirlenmesi, Tübitak Projesi, (2011-2012).
- Fare Embriyonik ve Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerinden Farklılaştırılan Kondrositler ile *In Vitro* Biyouyumluluk Test Modellerinin Geliştirilmesi, Ege Üniversitesi, BAP (2011-2012)
- Fare Embriyonik Kök Hücrelerinden Kondrosit Farklılaştırılması ve Mezenşimal Kök Hücrelerinden Farklılaştırılan Kondrositlerle Karşılaştırılması, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı ve Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortak Tez Projesi, (2009-2012)

İş Tecrübesi

- İncekaralar Holding, Illumina Yeni Nesil Sekanslama Cihazları'nın Aplikasyon Uzmanı ve Satış Temsilcisi (2012-)