

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**İNSAN EKLEM KIKIRDAĞINDAN KONDROSİT VE  
KONDROPROJENİTÖR/KÖK HÜCRE İZOLASYONU,  
KÜLTÜRÜ, BU İKİ HÜCRE HATTININ KONDROGENEZ  
KAPASİTESİ YÖNÜNDEN KARŞILAŞTIRILMASI**

**Özlem ÖZBEY**

**Doktora Tezi**

**Antalya,2014**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**İNSAN EKLEM KIKIRDAĞINDAN KONDROSİT VE  
KONDROPROJENİTÖR/KÖK HÜCRE İZOLASYONU,  
KÜLTÜRÜ, BU İKİ HÜCRE HATTININ KONDROGENEZ  
KAPASİTESİ YÖNÜNDEN KARŞILAŞTIRILMASI**

**Özlem ÖZBEY**

**Doktora Tezi**

**Tez Danışmanları**

**Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL**

**Prof. Dr. Charlie William ARCHER**

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

**Antalya,2014**

## Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurulu kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince 'Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği' ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşığıdadır.

1. **Ozbey O**, Sahin Z, Acar N, Ozcelik F T, Ozenci A M, Koksoy S, Ustunel I. Characterization of colony-forming cells in adult human articular cartilage. Acta Histochem. 2014 Feb 1. pii: S0065-1281(14)00018-X. doi: 10.1016/j.acthis.2014.01.004. [Epub ahead of print]
2. **Ozbey O**, Sahin Z, Ozenci AM, Acar N, Ustunel I. The effect of systemic corticosteroid treatment on the immunolocalisation of Notch-1, Delta, CD105 and CD166 in rat articular cartilage. Acta Histochem. 2010 Sep;112(5):424-31. doi: 10.1016/j.acthis.2009.04.005. Epub 2009 May 30.
3. **Ozbey O**, Sahin Z, Acar N, Ustunel I. Distribution of CD105 and CD166 positive cells in the proximal epiphysis of developing rat humerus. Histol Histopathol. 2010 Nov;25(11):1437-45.

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,**

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Programında  
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir. 20 Haziran 2014

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



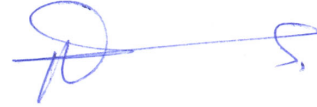
Üye : **Prof. Dr. Candan ÖZÖĞÜL**  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Üye : **Prof. Dr. A. Merter ÖZENCİ**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı



Üye : **Prof. Dr. Necdet DEMİR**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Üye : **Doç. Dr. Gökhan AKKOYUNLU**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

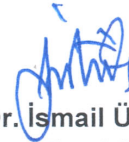


**ONAY:**

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri  
tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun **15.107/2014**  
tarih ve **19/203** sayılı kararıyla kabul edilmiştir.



**Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL**  
Enstitü Müdürü



## ÖZET

Eklem kıkırdağı ile ilgili yapılan kök hücre çalışmalarında, yetişkin eklem kıkırdağında projenitör/kök hücre özelliğine sahip hücrelerin mevcut olabileceğini ve bu hücrelerin bazı teknikler kullanılarak izolasyonlarının gerçekleştirilebileceği belirtilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, erişkin insan femuru distal eklem kıkırdağından kondrosit ve projenitör/kök hücre izolasyonu ve kültürlerinin yapılmasının ardından, in vitro ortamda, kök hücre belirteci ekspresyonlarının, farklı dokulara yönlenebilme kapasitelerinin ve ultrastrüktürel yapılarının araştırılması amaçlandı.

Çalışmamızda, erişkin insan eklem kıkırdağı örneklerinden pronaz/kollagenaz sindirimi ile kondrositlerin izolasyonu gerçekleştirildi. Tam kat kondrositlerin kültür ortamında çoğalmasına izin verilirken, projenitör/kök hücre özelliğini taşıdığını düşündüğümüz hücrelerin fibronektin adhezyon testini takiben koloniler seçilerek planlanan parametrelerin uygulanabilmesi için kültürasyonlarına devam edildi. Çalışmada incelenen parametreleri özetlemek gerekirse; kültürü yapılan kondrosit ve koloni hücre süspansiyonlarında, CD90, STRO-1, CD105, CD166 gibi kök hücre belirteci ekspresyonlarının immunohistokimyasal ve flow sitometrik yöntemle belirlenmesi, kondrosit ve koloni kültür hücrelerinin kondrogenез, adipogenez ve osteogenez'e yönlendirilmesi, bu iki hücre hattına ait hücrelerin ultrastrüktürel yapılarının araştırılması parametreleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada elde ettiğimiz bulgular şöyle özetlenebilir; kondrosit ve koloni kültür hatları flow sitometrik yöntemler ile karşılaştırıldığında, CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 ekspresyon düzeylerinin benzer olduğu belirlendi. Kondrosit ve koloni kültür hücreleri uzun süreli kültürasyon sonrasında immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, her iki grup hücrenin de bu belirteçlerin tümünü eksprese ettikleri, bununla birlikte koloni kültür hücrelerinde immunoboyanma yoğunluğunun daha fazla olduğu gözlemlendi. Yönlendirme deneylerinde, koloni hücrelerinin adipogenez ve osteogenez sürecinde, primer hücrelerin ise kondrogenез sürecinde daha iyi sonuçlar verdiği belirlendi. Bu iki hücre hattının ince yapıları incelendiğinde, koloni hücrelerinin kondrositlere göre daha bol miktarda genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve ribozom, daha az miktarda da lizozom içerdiği tesbit edildi.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgulardan yola çıkılarak, erişkin insan eklem kıkırdağında mevcut olan progenitor/kök hücrelerin mezenkimal kök hücre (MKH) özelliği taşıyabileceği söylenebilir. Ayrıca, kondrosit kültür hücrelerinin de uzun süreli kültürasyonu takiben MKH özelliğine yakın karakterler kazanabileceği de belirtilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** CD90; Stro-1; CD105; CD166; İnsan Eklem Kıkırdağı; Kök Hücre; Koloni Oluşturabilen Hücreler

## ABSTRACT

It has been reported that progenitor / stem cells might be present in human articular cartilage. In articular cartilage stem cell studies it is stated that cells with stem cell properties can be isolated with some techniques. Therefore, we aimed to isolate and culture the chondrocytes and progenitor/stem cells from adult human femoral distal articular cartilage, and investigate the expression of stem cell markers, differentiation capacities and ultrastructural features of these cells.

In our study, chondrocytes were isolated from adult human articular cartilage biopsies with pronase/collagenase digestion. Full-depth chondrocytes were cultured in different culture plates and single cell suspension were seeded on the fibronectin coated petri dishes for isolation of colony cells. Following seeding of chondrocytes, colony cells were selected and seeded on a different culture dish. Briefly, the parameters of this study were; determining the expression of stem cell markers such as CD90, STRO-1, CD105, C166 with flow cytometry and immunofluorescence techniques, induction of chondrocytes and colony cell lines to chondrogenesis, adipogenesis and osteogenesis, investigation of ultrastructure of these two cell lines.

Our findings can be summarized as; expression levels were similar between chondrocyte and colony culture cell lines. Our immunofluorescence studies showed that, expressions of all markers were observed in two cell lines, and expression intensity of colony culture cell line was higher than chondrocyte culture cell line after a long-term culture period. On cell differentiation assay results, while chondrocyte culture cell lines were more efficient in the process of chondrogenesis, colony cells were effective in the process of adipogenesis and osteogenesis. When we analyzed the ultrastructure of these two cell lines, we observed more expanded rough endoplasmic reticulum (RER) and ribosomes but less lysosomes in colony culture cell line cells than chondrocyte cell line.

In conclusion, according to the results of this study we can say that, there are progenitor/stem cells within the adult articular cartilage which are capable of mesenchymal stem cells (MSC) properties. Moreover, following the long-term culture period, chondrocytes may gain similar features with colony cells.

**Keywords:** CD90; Stro-1; CD105; CD166; Human Articular Cartilage; Stem Cell; Colony Forming Cells

## TEŞEKKÜR

Tezimin gerekleşmesi için göstermiş oldukları maddi, manevi ve bilimsel desteklerinden dolayı danışman hocam Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL ve ikinci danışmanım Prof. Dr. Charlie William ARCHER 'a,

Tez projemi gerçekleştirirken gerek bilgi ve önerileri gerekse manevi desteği ile yardımcı olan Dr. Nuray ACAR 'a,

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan Anabilim Dalımızdaki sayın hocalarıma ve tüm arkadaşlarıma,

Göstermiş oldukları her türlü destek ve bilimsel katkılarından dolayı Cardiff Üniversitesi, Bağ Doku Mühendisliği Laboratuvarları alışanlarına,

Teknik destekleri için TEMGA Ünitesinin değerli çalışanlarına,

Yardımları ile her zaman yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli elemanlarına,

Ayrıca, tez çalışmam boyunca beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan ve destek olan sevgili annem Hale Özbey ve kardeşim Murat Özbey'e, iki yıl önce kaybettiğim, benimle olduğunu ve hep olacağını bildiğim sevgili babam Necdet Kemal Özbey'e en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

<b>ÖZET</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>vii</b>
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	<b>viii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	<b>xiii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>xv</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	<b>xvii</b>
<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1.    Kıkırdak Doku	<b>3</b>
2.2.    Ekstremitte Gelişimi	<b>4</b>
2.3.    Diz Eklem Bölgesi Anatomisi	<b>8</b>
2.4.    Eklem kıkırdağının Yapısı	<b>10</b>
2.4.1.    Kondrositler	<b>10</b>
2.4.2.    Su	<b>10</b>
2.4.3.    Kollajen	<b>10</b>
2.4.4.    Proteoglikanlar	<b>11</b>
2.5.    Eklem Kıkırdağı Tabakaları	<b>12</b>
2.5.1.    YüzeyelZon	<b>12</b>
2.5.2.    Geçiş Zonu (Orta Zon)	<b>13</b>
2.5.3.    Derin Zon (RadialZon)	<b>13</b>
2.5.4.    KalsifiyeZon	<b>13</b>
2.5.5.    Tidemark	<b>14</b>



<b>2.6.</b>	<b>EkstrasellülerMatriks Yapısı</b>	<b>15</b>
<b>2.7.</b>	<b>EkstrasellülerMatriks ve Hücre Sinyalleri</b>	<b>15</b>
<b>2.8.</b>	<b>Eklem Kıkırdağı Homeostazı ve Yenilenmesi</b>	<b>17</b>
<b>2.9.</b>	<b>Eklem Kıkırdağı Lezyonları Etiyolojisi</b>	<b>18</b>
<b>2.10.</b>	<b>Kıkırdak Lezyonlarının Tanımı</b>	<b>19</b>
<b>2.11.</b>	<b>Cerrahi Prosedürler</b>	<b>20</b>
<b>2.11.1.</b>	<b>Delme (Dirilleme)</b>	<b>20</b>
<b>2.11.2.</b>	<b>Mikrokirik Yöntemi</b>	<b>20</b>
<b>2.11.3.</b>	<b>AbrazyonArtroplastisi</b>	<b>21</b>
<b>2.11.4.</b>	<b>OsteokondralGreft</b>	<b>22</b>
<b>2.11.4.1.</b>	<b>OsteokondralOtogreft</b>	<b>22</b>
<b>2.11.4.2.</b>	<b>OsteokondralAllogreft</b>	<b>22</b>
<b>2.11.5.</b>	<b>PeriostealGreft</b>	<b>23</b>
<b>2.11.6.</b>	<b>PerikondralGreft</b>	<b>23</b>
<b>2.11.7.</b>	<b>Otolog Hücre İmplantasyonu</b>	<b>23</b>
<b>2.11.7.1.</b>	<b>OtologKondrositİmplantasyonu</b>	<b>23</b>
<b>2.11.7.2.</b>	<b>İmplantasyon İçin Kullanılan Diğer Hücre Kaynakları</b>	<b>24</b>
<b>2.11.8.</b>	<b>Enzimatik Tedavi Teknikleri</b>	<b>24</b>
<b>2.12.</b>	<b>Kök Hücreler</b>	<b>25</b>
<b>2.13.</b>	<b>Eklem Kıkırdağında Var Olduğu Düşünülen Projenitör Hücreler</b>	<b>28</b>
<b>2.14.</b>	<b>Eklem Kıkırdağına Ait Kök Hücrelerin Özellikleri</b>	<b>29</b>
<b>2.15.</b>	<b>Hipotez</b>	<b>30</b>

<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>31</b>
3.1. Kıkırdak Örneklerinin Eldesi	31
3.2. Kıkırdak Dokusundan Hücre İzolasyonu, Kültürasyonu, Koloni Seçimi, (Fibronektin Adhezyon Testi) ve Kültürü	31
3.3. Kültürü Yapılan Hücre Süspansiyonlarında (Kondrosit Kültür Hattı ve Koloni Hücre Hattı) CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 Ekspresyonlarının Flow Sitometrik Yöntem ile Belirlenmesi	32
3.4. Kültürü Yapılan Hücre Hatlarında (Kondrosit Kültür Hattı ve Koloni Hücre Hattı) CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 Ekspresyonlarının İmmünofloresan Yöntemi ile İncelenmesi	33
3.5. Kültürü Yapılan Hücre Hatlarından (Kondrosit Kültür Hattı ve Koloni Hücre Hattı) Hücre Pelletlerinin Oluşturulması, Kondrojeniz, Adipojeniz ve Osteojeniz'e Yönlendirilmesi	33
3.5.1. Kondrojeniz	33
3.5.2. Adipojeniz	34
3.5.3. Osteojeniz	34
3.6. Kültürü Yapılan Hücre Hatlarının (Kondrosit Kültür Hattı ve Koloni Hücre Hattı) Ultrastrüktürel (Transmisyon Elektron Mikroskopi) Yöntem ile İncelenmesi	35
3.7. İstatistiksel Analiz	36
<b>BULGULAR</b>	<b>37</b>
4.1. Kıkırdak Dokusundan Hücre İzolasyonu, Kültürasyonu, Koloni Seçimi, (Fibronektin Adhezyon Testi) ve Kültürü	37
4.2. Kültürü Yapılan Hücre Süspansiyonlarında (Kondrosit Kültür Hattı ve Koloni Hücre Hattı) CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 Ekspresyonlarının	

4.2.1.	FlowSitometrik Yöntem ile Belirlenmesi Kültürü Yapılan Kondrosit Kültür Hattı Süspansiyonlarında CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 EkpresyonlarınınFlow Sitometrik Yöntem İle Belirlenmesi	37 37
4.2.2.	Kültürü Yapılan Koloni Hücre Hattı Süspansiyonlarında CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 Ekpresyonlarının FlowSitometrik Yöntem ile Belirlenmesi	39
4.3.	Kültürü Yapılan Hücre Hatlarında (Kondrosit Kültür Hattı ve Koloni Hücre Hattı) CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 Ekpresyonlarınınİmmünofloresan Yöntemi ile İncelenmesi	42
4.3.1.	Kültürü Yapılan Kondrosit Kültür Hattında CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 Ekpresyonlarınınİmmünofloresan Yöntemi ile İncelenmesi	42
4.3.2.	Kültürü Yapılan Koloni Hücre Hattında CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 Ekpresyonlarınınİmmünofloresan Yöntemi ile İncelenmesi	43
4.4.	Kültürü Yapılan Hücre Hatlarından (Kondrosit Kültür Hattı ve Koloni Hücre Hattı) Hücre Pelletlerininoluşturulması, Kondrogenез, Adipogenez ve Osteogenez'e Yönlendirilmesi	46
4.4.1.	Kondrogenез	46
4.4.2.	Adipogenez	48
4.4.3.	Osteogenez	48
4.5.	Kültürü Yapılan Hücre Hatlarının (Kondrosit Kültür Hattı ve Koloni Hücre Hattı) Ultrastrüktürel(Transmisyon Elektron Mikroskopu) Yöntem ile İncelenmesi	49
<b>TARTIŞMA</b>		<b>51</b>
<b>SONUÇLAR</b>		<b>56</b>

**KAYNAKLAR**

**58**

**ÖZGEÇMİŞ**

**73**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AÇB</b>	:	Arka çapraz bağ
<b>AHB</b>	:	Asimetrik hücre bölünmesi
<b>BMP</b>	:	Bone morphogenetic protein
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	:	Kalsiyum klorür
<b>CEA</b>	:	Carcinoembriyonic antigen
<b>CEA-CAM-1</b>	:	Carcinoembriyonic antigen cell adhesion molecule-1
<b>CFE</b>	:	Colony forming efficiency
<b>COMP</b>	:	Cartilage oligomeric matrix protein
<b>DMEM/ F12</b>	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
<b>EGF</b>	:	Epidermal growth factor
<b>ESM</b>	:	Ekstrasellüler matriks
<b>FBS</b>	:	Fetal bovine serum
<b>GDF</b>	:	Growth and differentiation factor
<b>GER</b>	:	Granüllü endoplazmik retikulum
<b>GLUTs</b>	:	Glucose transporter
<b>HA</b>	:	Hyaluronik asit
<b>HEPES</b>	:	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	:	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
<b>HKH</b>	:	Hematopoetik kök hücre
<b>ITS</b>	:	Insulin, Transferrin, Selenium
<b>Kİ- MKH</b>	:	Kemik iliği mezenkimal kök hücresi
<b>LK</b>	:	Lateral kondil

<b>LKL</b>	:	Lateral kollateral bağ
<b>LM</b>	:	Lateral menisküs
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	:	Magnezyum Klorür
<b>MK</b>	:	Medial kondil
<b>MKL</b>	:	Medial kollateral bağ
<b>MM</b>	:	Medial menisküs
<b>Oct-4</b>	:	Octamer-binding transcription factor 4
<b>OKİ</b>	:	Otolog Kondrosit İmplantasyonu
<b>OsO<sub>4</sub></b>	:	Osmiyum tetraoksit
<b>ÖÇB</b>	:	Ön çapraz bağ
<b>PBS</b>	:	Phosphate buffered saline
<b>PDGF-b</b>	:	Platelet-kökenli büyüme factor reseptörü
<b>PMFB</b>	:	Posterior meniskofemoral bağ
<b>SFM</b>	:	Serum Free Media
<b>SSEA-3</b>	:	Stage specific antigen-3
<b>TEM</b>	:	Transmisyon Elektron Mikroskopu
<b>TGF-b</b>	:	Transforming growth factor-beta
<b>TL</b>	:	Transvers intermeniskal bağ
<b>VEGF</b>	:	Vascular endothelial growth factor

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kıkırdak tipleri	3
2.2. Embriyo gelişiminin 4. haftasında ekstremite tomurcukları	4
2.3. Sinoviyal eklem oluşumundaki temel basamaklar	5
2.4. Sinoviyal eklem gelişimi	6
2.5. Femur distal ucu. Tibial plato	8
2.6. Diz eklemi ön ve arka görünüşü	9
2.7. Klasik kollajen molekülünün yapısı	11
2.8. Erişkin eklem kıkırdağı zonlarının şematik görünümü	13
2.9. Erişkin eklem kıkırdağı oksijen basıncı şematik şekli	14
2.10. Normal eklem kıkırdağı organizasyonu	16
2.11. İntegrinler ve büyüme faktörü sinyal iletimi	17
2.12. Mikrokırık yöntemi temel basamakları	21
2.13. Mikrokırık tekniği ile oluşturulan oluklardan hücrelerin göçü	21
2.14. Osteokondral greftleme tekniği	23
2.15. Otolog Kondrosit İmplantasyonu prosedürü	24
2.16. Kök hücrelerin farklılaşma yetenekleri	25
2.17. Kök hücrelerin asimetric bölünmesi	26
4.1. Eklem kıkırdağı dokusundan izole edilerek kültüre edilen hücrelerin morfolojik görüntüleri	38
4.2. Eklem kıkırdağından izole edilip kültürü yapılan kondrosit kültür hattının Flow Sitometrik analizleri	40
4.3. Eklem kıkırdağından izole edilip kültürü yapılan koloni hücre	

hattınınFlowSitometrik analizleri	41
<b>4.4.</b> Kondrosit kültür hattında kök hücre belirteci ekspresyonlarının immünofloresan görüntüleri	43
<b>4.5.</b> Koloni hücre hattında kök hücre belirteci ekspresyonlarının immünofloresan görüntüleri	45
<b>4.6.</b> Kondrosit ve koloni hücre hattının immünoboyanma yoğunlukları analiz sonuçları	46
<b>4.7.</b> Alsiyan mavisi ile pozitif boyanan kondrojeneze yönlendirilmiş kondrosit kültür hattı ve koloni kültür hattı pelleti kesitleri	47
<b>4.8.</b> Oilred O ile pozitif boyanan adipogeneze yönlendirilmiş kondrositkültür hattı ve koloni hücre hattı pelleti kesitleri	48
<b>4.9.</b> Alizarin Red ile pozitif boyanan adipogeneze yönlendirilmişve koloni hücre hattı pelleti kesitleri	49
<b>4.10.</b> Kondrosit kültür hattına vekoloni hücre hattına ait hücrelerin TEM görüntüleri	50



## GİRİŞ VE AMAÇ

Eklem kıkırdağı damarsız, sinirsiz ve matriks/hücre hacim oranı yüksek olan bir bağ dokusudur. Eklem kıkırdağı kondrositleri, hiyalin kıkırdak matriksi ile çevrili şekilde yerleşik olup matriks proteinlerini salgılar veya sindirirler. Bu salgılama ve sindirim işlemi doku matriksi homeostazı için zorunludur.

Eklem kıkırdağı sınırlı onarım kapasitesine sahip bir dokudur. Bu bölgedeki travmatik lezyonlar kronik dejenerasyonlara ve osteoartrite sebep olabilmektedir. Günümüzde, kıkırdak tedavileri için Mikrokırık (Microfracture) ve Otolog Kondrosit İmplantasyonu (ACI) gibi birçok strateji geliştirilmeye çalışılmıştır. Fakat elde edilen sonuçlara bakıldığında, semptomatik defekt tedavi süreçlerinde büyük ilerlemeler kaydedilirken, uzun süreli sonuçlar açısından olumlu sonuçlar elde edilememiştir. Uygulanan bu tedavi prosedürleri bazı sınırlayıcı faktörlere sahiptirler ve halen geliştirilebilir düzeydedirler. Örneğin, mikrokırık tekniği ile yapılan tedavi süreci sonucunda fibröz kıkırdak niteliğinde doku oluşumu söz konusu iken, otolog kondrosit implantasyonu tekniğinde ise hücreler kondrojenik özelliklerini koruyarak çoğaltılsalar bile defektli bölgenin boyutlarının büyük olmasına bağlı olarak yetersiz sayıda hücre eldesi söz konusu olabilmektedir. Kıkırdak doku mühendisliği alanında, bu gibi sorunların çözülebilmesi adına farklı hücre kaynaklarının arayışına gidilmiştir. Bu süreçte kök hücre kullanımları ve özellikle farklı kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kullanımı oldukça popüler hale gelmiştir. Örneğin, kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücrelerin tedavi sürecinde endokondral kemikleşme sürecine girdikleri, tip X kollajen ve alkalen fosfataz sentezi gerçekleştirdikleri belirlenmiştir [1, 2]. Bu gelişmelerin ardından araştırmacılar doku spesifik kök hücrelerin, rejenerasyon sürecinde daha etkin olabileceği görüşünü ortaya atmışlardır. Bu süreçte en etkin mekanizma, erken dönem eklem kıkırdağı gelişim sürecinin incelenmesi ve interstisyel büyümenin yanı sıra apozisyonel olarak büyümenin de gerçekleştiğinin belirlenmesi olmuştur. Bu literatür bilgisini takiben yapılan çalışmalar eklem yüzeyinde bulunan bir grup hücrenin kök hücre özelliğini taşıyor olabileceklerini desteklemektedir.

Bu hücrelerin ilk kez Archer ve arkadaşları tarafından 7 aylık sığır eklem kıkırdağı yüzeyel zonunda lokalize oldukları ve koloni oluşturabilme yeteneklerinin olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmalarda koloni oluşturabilen hücreler fibronektin kaplı kültür kaplarında 20 dakikalık fibronektin uygulaması ile diferansiyel yapışma testi uygulanarak seçilmiştir. Koloni oluşturabilen hücrelerin transit amplifying hücrelerden farklı oldukları, uzun süre kültür ortamında farklılaşmadan çoğaldıkları, telomer uzunluklarının kondrositlere göre daha uzun olduğu tesbit edilmiştir. Yönlendirme

çalışmalarında, kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerden farklı olarak, terminal farklılaşma geçirmediği ve ossifikasyona uğramadıkları belirlenmiştir.

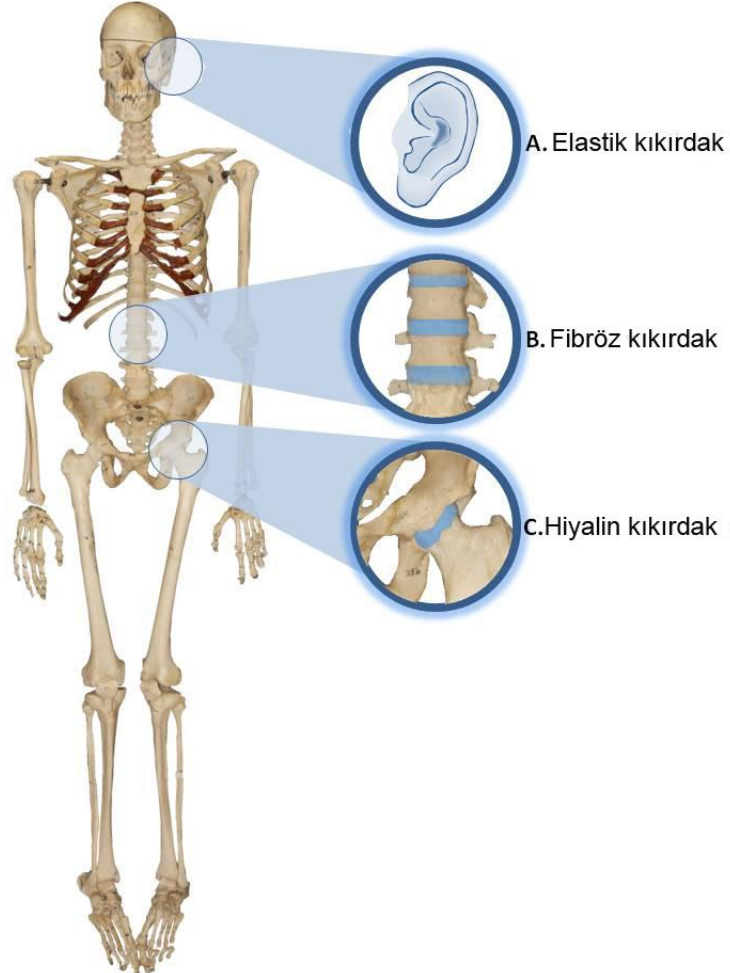
Deneysel olarak eklem kıkırdağı hasarı oluşturularak içsel onarım mekanizmasının harekete geçirilmesi ile ilgili kanıtlar mevcuttur. Uterusta fetal kuzuların troklear oluşunda oluşturulan yüzeysel defektlerden sonra bir iyileşim süreci gözlemlendiği, öncelikle hiposellüler tedavi dokusunun belirlediği ve ardından kondrositlerle doldurulduğu rapor edilmiştir [3]. Fakat sub-kondral deneysel defektler kritik boyutlarda ise (>6mm), içsel onarım mekanizmasının yetersiz kaldığı gözlemlenmiştir [4]. Bununla birlikte, eğer sub-kondral kemik plaka üzerinde yarık açılırsa (mikrofracture tekniğinde olduğu gibi), kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (KI- MKH) lezyonun olduğu bölgede hızlı bir onarım süreci başlatırlar fakat oluşan doku fibröz kıkırdak niteliğindedir ve yüksek stresli biyomekaniksel çevreye dayanıklı değildir [5]. Tüm araştırmalara rağmen halen kıkırdak- kökenli kök hücrelerin kondral lezyon tedavisine doğrudan katıldıklarını gösteren net kanıtlar yoktur. Bunun yanı sıra eklem bölgesinde bulunan kök hücreler için kesin belirteçler bulunmamaktadır.

İnsan eklem kıkırdağı tedavi sürecinde hücre kaynağı olarak kullanılmak üzere, koloni oluşturabilen kondroprogenitor/kök hücreler, kondrosit kültür hücrelerine göre in vitro koşullarda daha iyi sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir. Fakat bu belirteçlerin, kondrosit kültür hattındaki kültürasyona bağlı olarak mı ekspre olmaya başladıkları konusunda, kondroprojenitörler ile karşılaştırmalı detaylı bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Bu bilgiler ışığında amacımız, kondrosit kültür hücreleri ile, seçimi yapılan ve kondroprogenitor/kök hücre özelliği taşıdığı düşünülen hücreleri kök hücre belirteci olarak kabul edilen CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 ekspresyon düzeylerini Flow sitometrik, İmmünofloresan yöntemlerle incelemek ve Ultrastrüktürel yöntemlerle özelliklerini kıyaslamak, bunun yanı sıra bu iki farklı hücre grubunda in vitro ortamda kondrogenezi, adipogenez ve osteogenezini indükleyerek oluşturulan pelletlerde rutin boyalar ile karşılaştırmalarını yaparak farklılıklarını ortaya koyabilmektir.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kıkırdak Doku

Kıkırdak matriksinin yapısal kompozisyonuna bağlı olarak, insan vücudunda bulunan kıkırdak doku; elastik, fibröz ve hiyalin kıkırdak olarak 3 ana grupta sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.1). Anatomik olarak insan vücudu incelendiğinde oynar eklem yüzeyleri hiyalin tip kıkırdak ile kaplı olup özel bir terim olarak 'eklem kıkırdağı' adını alır. Eklem yüzeylerinde bulunan kıkırdak doku, yüksek basınca dayanıklı olup, sürtünme kat sayısını en aza indirerek eklem kıkırdağının hasar görmesine engel olmaktadır [6].

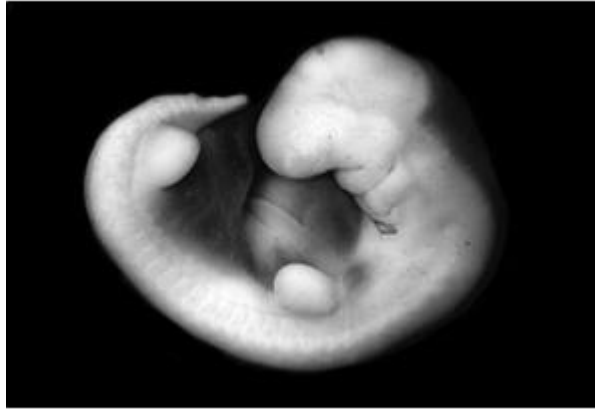


**Şekil 2.1.** Kıkırdak tipleri. A. Elastik kıkırdak, B: Fibröz kıkırdak, C: Hiyalin kıkırdak [7].

## 2.2. Ekstremitte Gelişimi

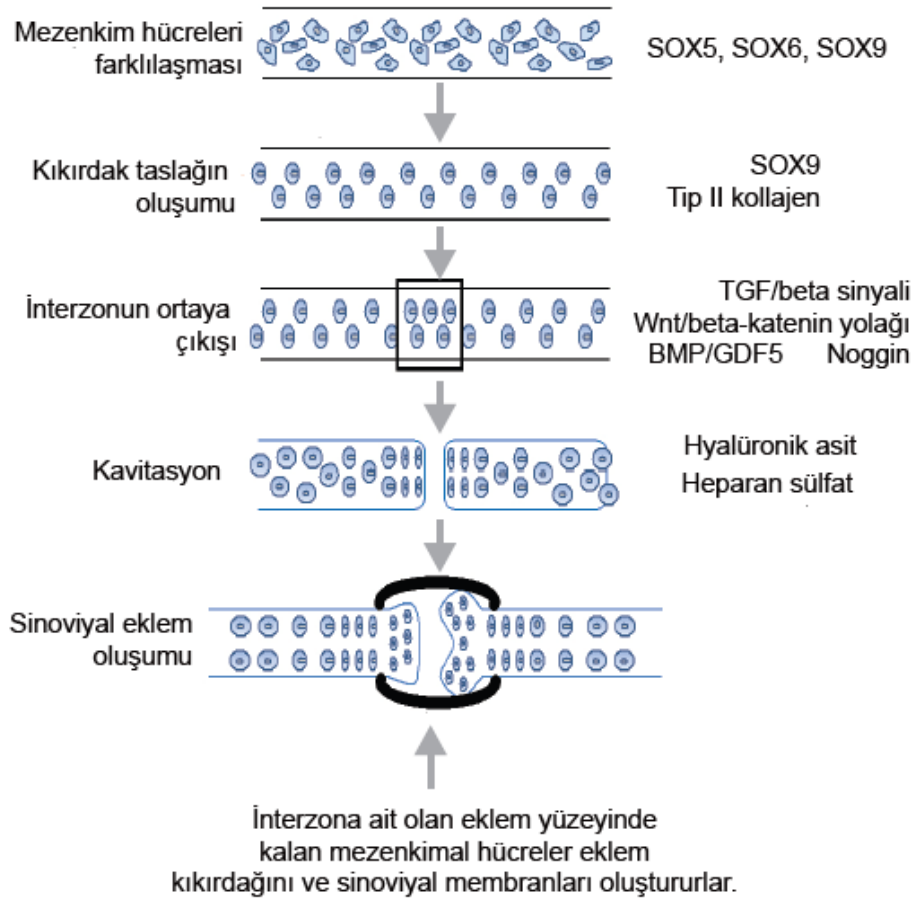
Omurgalılarda iskelet sistemi, paraksiyal mezoderm, mezodermin somatik plağı (lateral plak) ve nöral krestten gelişir. Ekstremiteler lateral plak mezoderminden köken alan somatik mezodermden gelişirken, nöral krest hücreleri baş ve yüz kemiklerini oluşturur. Notokord ve nöral tüp oluşurken, bu yapıların dış yanında bulunan intraembriyonik mezoderm, longitudinal iki paraksiyal mezoderm sütununu oluşturmak üzere kalınlaşırlar. Üçüncü haftanın sonuna doğru bu sütunlar somit adı verilen mezodermal doku parçalarına ayrılır. Her somitte daha sonra iki parça oluşur. Bunlar dermomiyotom ve skleretomdur. Dermomiyotom, dermatom ve miyotom bölgelerini içerir. Dermatom bölgesindeki hücreler, derinin dermis tabakasını oluştururken miyotomi bölgesindeki hücreler miyoblastları (kas hücre taslaklarını) oluştururlar. Ventromedialde bulunan skleretom parçanın hücrelerinden ise omurlar ve kaburgalar gelişir [8]

Embriyonik gelişimin 4. haftasında ventrolateral vücut duvarında kabartılar şeklinde ekstremitte tomurcukları belirir. Üst ekstremitte tomurcukları 26. Ve 27. günde belirginleşirken, alt ekstremitte tomurcukları 28. veya 29. günde belirginleşir [8] (Şekil 2.2).



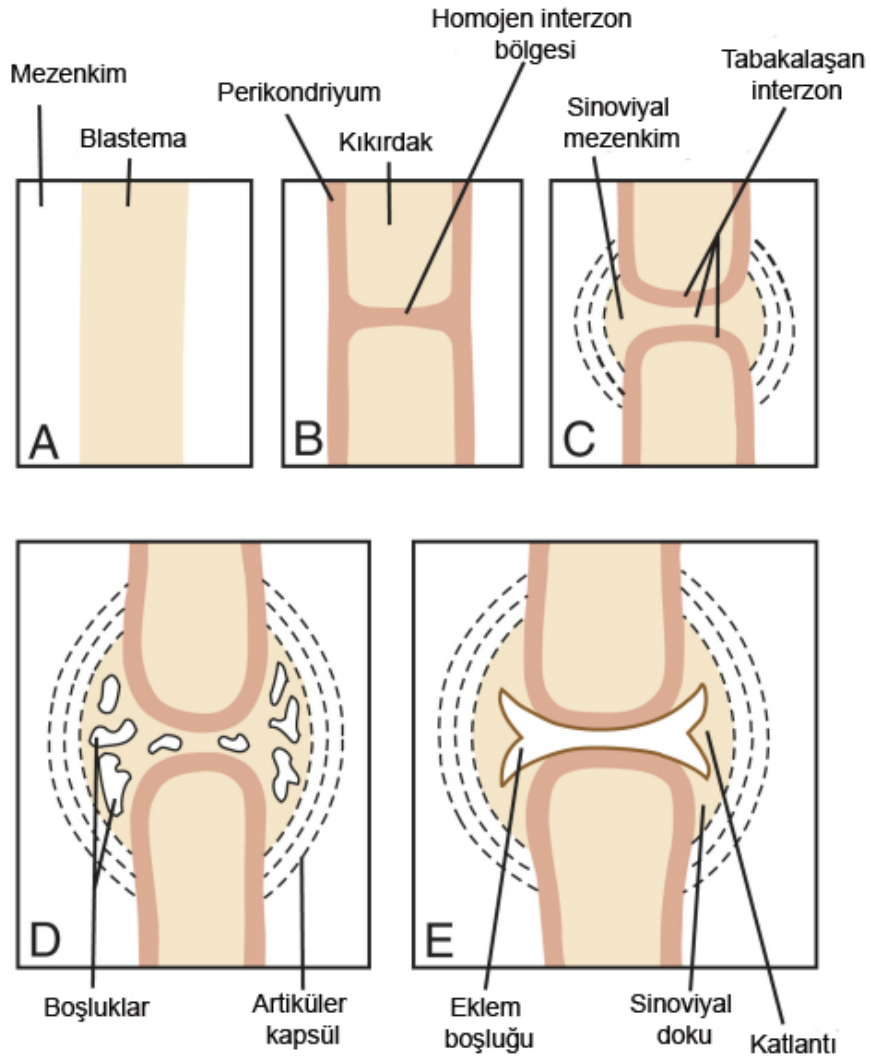
**Şekil 2.2.** Embriyo gelişiminin 4. haftasında ventrolateral vücut duvarında kabartılar şeklinde belirginleşen ekstremitte tomurcukları görülmektedir [8].

Her bir ekstremitte tomurcuğı ektoderm ile çevrili bir mezenkim kitlesi içerir. Gelişimin ilerleyen basamaklarında bu hücreler farklılaşır ve hem uzun kemiklerin öncül taslaklarını oluştururken, aynı zamanda eklem boşluğunu oluşturacak bir sürece girerler [9]. Gelişen embriyonik kıkırdak taslağı SOX-5, SOX-6 ve SOX-9 gibi transkripsiyon faktörlerinin kontrolü altındadır [10]. Özellikle SOX-9 ilk hücre yoğunlaşmasında hücre canlılığı ve farklılaşması aşamasında oldukça önemlidir (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Sinoviyal eklem oluşumundaki temel basamaklar [10].

Gelişim sürecinde kıkırdak taslaklarında, kıkırdak olmayan ve interzon olarak bilinen bölge gelişir [11]. İnterzon oluşumu sırasında, artikular progenitor hücreler en önemli kondrojenik belirteç SOX-9 downregülasyonunu uyarır [12]. Bu durumu kollajen tip II ve diğer kıkırdak spesifik genlerin bu bölgede downregülasyonu takip eder [13-15]. İnterzon bölgesindeki kondrojenik özellikleri baskılayıcı sinyaller aynı zamanda bu bölgenin farklı dokuları oluşturmak üzere yönlendirmelerine öncülük etmiş olurlar. İnterzon tek tabaka olarak ortaya çıktıktan sonra 3 farklı bölgeye ayrılır. Eklem yüzeylerini kaplayan perikondrium-benzeri iki kondrojenik tabaka ve avasküler mezenkim hücreleriyle periferde vasküler mezenkim ile devam eden, sinoviyal mezenkim tabakası olarak adlandırılan kısımlardan oluşur [16, 17]. İnterzon bölgesinde eklem yüzeylerinin oluşacağı bölgelerde ilk eklem boşluğu oluşum süreci olarak sinovyal eklem kaviteasyonları meydana gelir [18] (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** Sinoviyal eklem gelişimi. A. Yoğunlaşma. Eklem, çevre mezenkimden değil, yoğunlaşan blastemadan gelişir. B. Kıkırdaklaşma ve interzon oluşumu. İnterzon avasküler ve yüksek hücre yoğunluğuna sahiptir. C. Sinoviyal mezenkimin oluşması. Sinoviyal mezenkim interzon periferinden ve kan damarlarının bulunduğu bölgeden gelişir. D. Kavitasyon. Kaviteler interzonun periferinde merkeze yakın bölge oluşur ve eklem boşluğunu oluştururlar. E. Erişkin eklem yapısı [19].

Erken dönem eklem formasyonu sürecinde Wnt/beta-katenin'in en etkin sinyal yolağı olduğu tanımlanmıştır [9, 20]. Bu yolağın yanı sıra diğer bir faktör klasik Wnt/beta-katenin yolağının üst dalgası olan Transforming Growth Faktör beta (TGF-beta) sinyal yolağıdır [21, 22]. Farelerde yapılan çalışmalarda, TGF-beta tip II reseptör yokluğunda TGF-beta sinyal yolu kaybına bağlı olarak interfalangial eklemlerin oluşmadığı gözlenmiştir. TGF-beta tip II reseptör aracılı Wnt9a ve GDF5 regülasyonu ile eklem morfogenetik gen düzenlenmesi gerçekleştirilmektedir [23]. Bone morphogenetic proteinler (BMP) ve Growth Differentiation Faktörler (GDF) ile

Indian hedgehog, iskelet gelişimi ve eklem oluşumunda yine etken olan diğer molekülüdür [24, 25].

Oldukça kompleks olan eklem oluşumu süreci bir çok farklı olguyu içerir. Sıçan fetusları ile yapılan çalışmalarda arka ayak interdijital alanlardaki mezenkim hücrelerinin fizyolojik hücre ölümü ile birlikte dejenerasyona uğradığı gözlenmiştir [26]. Mitrovic (1977) benzer şekilde tavuk ve sıçan embriyolarında, interzon erken gelişim dalgasında, farklılaşma sürecinden hemen sonra nekrozun gerçekleştiğini ve kondrogenizin engellendiğini tesbit etmiştir [17, 27]. Bu görüşlere ters olarak, sıçan ve tavşan dizinde eklem kavitasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda hücre ölümünün gözlenmediği üzerinde durulmaktadır [28, 29]. Makrofajların interzon bölgesinin periferinde lokalize oldukları, ilerleyen süreçte eklem boşluğunun oluşacağı alanda yer almadıkları insan dokusu ile yapılan bir çalışmada gösterilmiştir [18].

Hyaluronik asit (HA) sentezinin eklem kavitasyonu için oldukça önemli olduğunu vurgulayan yayınlar mevcuttur. HA sentezi için gerekli olan, UDP glukuronat, uridin diphosphoglucose dehidrojenaz aktivasyonu aracılığı ile oluşturulur. Gelecekte eklem boşluğunun oluşacağı bölgede bu molekülün dar bir hat şeklinde ifade edildiği gözlenmiştir. Bu bulgular, makrofajlardan çok fibroblastik hücrelerin ve/veya komşu kondrositlerin eklem kavitasyonunda daha etkin olduklarını ortaya koymaktadır. CD44 ve ekstrasellüler hiyalüronan arasındaki bağlantıların olduğu bu bölgede hiyalüronan konsantrasyonunun artışıyla eklem kavitasyonunun oluşturulması kolaylaştırılıyor olabilir şeklinde görüşler ortaya atılmıştır [18, 30-32]. HA ve CD44 arasındaki etkileşim hem hücre adhezyonunu, hem de hücrelerin ayrılma sürecini hücre popülasyonlarını çevreleyen HA konsantrasyonunun artışına bağlı olarak reseptör doygunluğu ile etkiliyor olabilir [33] ve bu şekilde fonksiyonel bir eklem boşluğu meydana getirilir [13, 18, 31]. Memelilerde, HA-sentaz-2 eksikliğinde, sinovyal eklem defektleri tesbit edilmiştir. HA yanı sıra normal bir eklem boşluğunun oluşturulabilmesi için uygun oranda heperan sülfat ekspresyonuna da ihtiyaç duyulmaktadır. Fare embriyolarında yapılan çalışmalarda Ext1 (heperan sülfat sentezinde rol alan tip II transmembran glikosiltransferaz) eksikliğinde ekstremiteproksimal eklemlerinde düşük lubrisin ekspresyonu ile birlikte düzgün olmayan eklem yüzeylerinin olduğu gözlenmiştir [34].

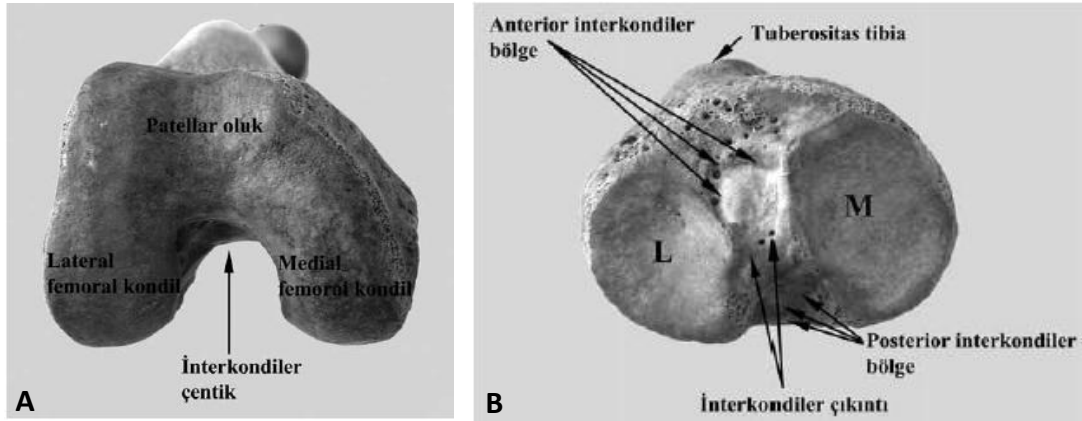
Klasik embriyoloji bilgilerimize göre, eklem kırırdağı kemik taslaklarının oluşmasından sonra epifiz bölgesinde endokondral kemikleşmeden sonra hayat boyu kalıcı olan eklem yüzeylerini örten bir tabaka olarak kalıcılığını sürdürür [35, 36]. Bu görüş bazı araştırmacılar tarafından çürütülmüştür. Bu yazarlara göre eklem kırırdağı, kavitasyonun olduğu bölgenin periferinde yer alan interzona ait hücrelerden gelişmektedir [14, 28, 30]. Yapılan ultrastrüktürel incelemelerde interzon daha önce de bahsedildiği gibi epifizyal son bölgeler ve ince bir merkezi tabaka olarak farklı zonlar olarak ayırt edilmektedir. İnterzon hücreleri erken embriyogenezde dıştan başlayarak kondrositlere farklılaşırlar ve epifiz ile birlikte kırırdağın taslağın aynı zamanda uzamasına katkı sağlamış olurlar. Ara zondaki

hücreler karşılıklı lokalize olarak eklem kıkırdağını oluştururlar. Hyde ve arkadaşları bir kıkırdak matris proteini olan matrilin-1'in epifizyal kondrositler tarafından eksprese edilirken, eklem kıkırdağının bu proteini ifade etmediğini göstermişlerdir [37, 38]. Pacifici ve ark. [39] ile Koyama ve ark. [40] yapmış oldukları çalışmalarda eklem kıkırdağı kondrositleri ile uzun kemiklerin taslağını oluşturan kondrositlerin farklı embriyonik kökenden geldiğini vurgulamaktadırlar. Kıkırdak taslağı kondrositleri farklılaşabilen, proliferen olan, hipertrofiye giderek endokondral süreçteki apoptoza giren hücreler olarak tanımlanırken, eklem kıkırdağı kondrositlerinin ise hayat boyu daha stabil ve kalıcı bir fenotipe sahip oldukları vurgulanmaktadır.

### 2.3. Diz Eklem Bölgesi Anatomisi

Diz eklemine katılan kemik oluşumları incelendiğinde femur, tibia, patella ve her ne kadar direkt olarak eklem yapısına katılmasa da eklemle ilgili bazı bağların tutunma yeri olan fibula yer almaktadır.

Femur'un distal ucu birbirlerinden belirgin olarak ayrı medial ve lateral kondillerden oluşur (Şekil 2.5). Bu kondiller tibia'nın proksimal ucundaki kendileri için uygun olan yüzeylere yerleşirler. Kondillerin şekilleri tibia'nın femur üzerindeki hareketinde oldukça büyük öneme sahiptir. Tibia'nın proksimal ucunda femur'un kondillerinin yerleşeceği medial ve lateral yüzeyler, interkondiler çıkıntı (eminens) denilen bir yapı ile birbirlerinden ayrılırlar (Şekil 2.5). Tibia'nın bu yüzeyleri meniscus adı verilen kıkırdak yapılarla derinleştirilir ve eklem yaptığı femur'un kondilleri için daha uygun yüzeyler haline gelir. Bu menisküslerin sağladığı ekstra derinlik özellikle femur ve tibia'nın lateral kondillerinin uyumu açısından büyük önem taşır.



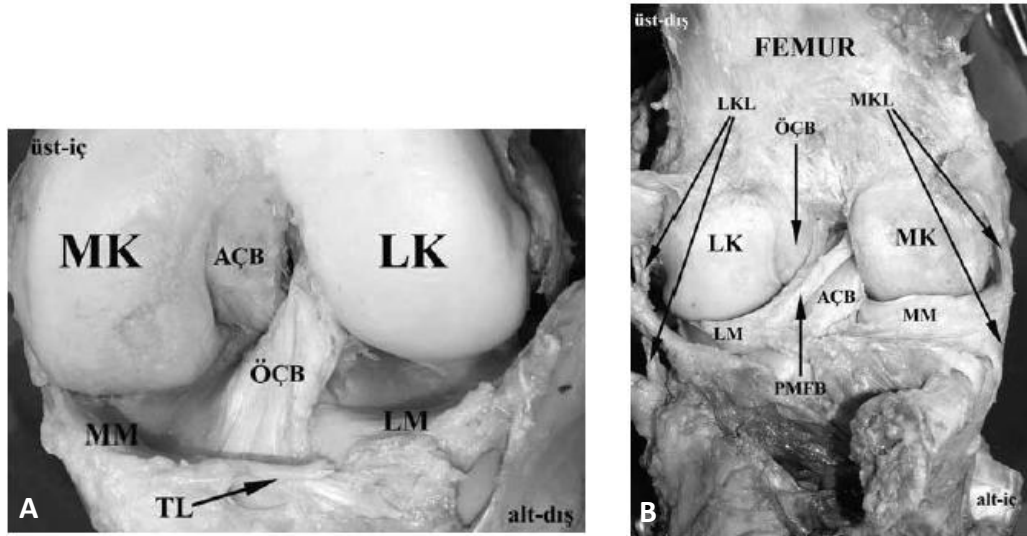
**Şekil 2.5.** A. Femur distal ucu. B. Tibial plato (Tibia distal ucu, eklem yüzeyi) L: Lateral tibia kondili; M: Medial tibia kondili [41].

Diz eklemine önemli bağlarını incelediğimizde karşımıza ilk olarak çapraz bağlar çıkar. Çapraz bağlar çok güçlü, intrakapsüler bağlardır ve tibia üzerindeki tutunma yerlerine göre adlandırılırlar. Ön (anterior) çapraz bağ



(Şekil 2.6) tibia proksimal yüzündeki ön interkondiler bölgede medial tibial çıkıntının hemen ön yan tarafına tutunur. Arka (posterior) çapraz bağ (Şekil 2.6), ön çapraz bağdan daha kalın ve güçlüdür. Yaklaşık olarak 38 mm uzunluğunda ve 13 mm genişliğindedir. Ön çapraz bağa göre yaralanmalarına daha az rastlanan ve hasta tarafından daha iyi tolere edilen arka çapraz bağ, medial femoral kondilin lateralinden ve interkondiler çentiğın tepesinden başlayarak aşağıda tibia'nın arka interkondiler bölgesine uzanır. Bu bölgede her iki menisküsün arka boynuzları arasına tutunur.

Medial kollateral bağ (iç yan bağ; Şekil 2.6) erişkinlerde ve çocuklarda diz ekleminin en sık yaralanan bağıdır. Üç-dört tabakada incelenen iki ayrı yapıdan oluşur: Yüzeyelde bulunan ve tibial kollateral bağ olarak da adlandırılan yüzeysel medial kollateral bağ ve derinde yerleşmiş kapsüler bir yapı olan derin medial kollateral bağ. Bu iki bağ arasında herhangi bir bağlantı bulunmaz ancak derin medial kollateral bağın meniskofemoral ve meniskotibial bölümleri bulunur ve bu bölümler aracılığıyla medial meniscus ile bağlantı halindedir. İç yan bağ diz ekleminin abdüksiyonunu ve rotasyonunu sınırlar. Lateral kollateral bağ (dış yan bağ; Şekil 2.6) dizin iç rotasyonunun sınırlandırılmasında etkili olan temel yapıdır. Medial kollateral bağın aksine ekstrakapsüler bir bağıdır ve dolayısıyla menisküslerle bağlantısı yoktur. Dış yan bağ hasarlarına sıklıkla ön çapraz bağ yaralanmaları da eşlik eder [41].



**Şekil 2.6.** A. Diz ekleminin önden görüntüsü. ÖÇB: Ön çapraz bağ; AÇB: Arka çapraz bağ; LK: Lateral kondil; MK: Medial kondil; MM: Medial menisküs; LM: Lateral menisküs; TL: Transvers intermeniskal) bağ. B. Diz ekleminin arkadan görüntüsü. ÖÇB: Ön çapraz bağ; AÇB: Arka çapraz bağ; LK: Lateral kondil; MK: Medial kondil; MM: Medial menisküs; LM: Lateral menisküs; PMFB: Posterior meniskofemoral bağ; MKL: Medial kollateral bağ; LKL: Lateral kollateral bağ [41].

## 2.4. Eklem Kıkırdağının Yapısı

Hiyalin eklem kıkırdağı damarsız, sinirsiz ve alenfatik bir yapıya sahiptir [6]. Kondrositler toplam eklem kıkırdağı hacminin %1-5 kadarını oluştururlar. Kondrositleri çevreleyen matriksin yapısını ise, su, proteoglikanlar, kollajenler ve kollajen olmayan proteinler oluştururlar. Matriks pH'sı normal şartlar altında 7.4' tür. Bu dengedeki küçük bir değişiklik bile doku dengesinin bozulmasına sebep olabilir [42].

### 2.4.1 Kondrositler

Kondrositler eklem kıkırdağı matriksi içerisinde laküna adı verilen boşluklar içerisine lokalize olmuşlardır. Gelişim sırasında, genellikle yuvarlak bir morfolojiye sahiptirler. Fakat bu durum farklı yaşlarda, patolojik durumlarda ve kıkırdak tabakalarında değişiklikler gösterebilir [43]. Kondrositler matriks aracılı difüzyon ile metabolik ihtiyaçlarını karşılarlar. Aynı zamanda ekstrasellüler matriks bileşenlerini, kollajen, proteoglikan ve kollajen olmayan proteinleri, sentezlemektedirler [44]. Kondrositlerin metabolik ihtiyaçları kıkırdağın tabakalarına göre farklılık göstermektedir. Örneğin, yüzeysel zon kondrositleri derin zon kondrositlerinden farklı oranlarda proteoglikan ve agrekan sentezi gerçekleştirirler [43]. Bu şekilde oluşturulan matriks kompozisyonu ile farklı yüklerin emilmesi, dağıtılması söz konusu olabilmektedir. Kondrositler matriks dengesinin korunabilmesi adına oldukça özelleşmişlerdir ve matriks yapısındaki değişiklikleri algılayarak anabolik ve katabolik dengeyi sağlamaktadırlar. Kondrosit yoğunluğu yaşa bağlı olarak zamanla azalmaktadır. Bunun yanı sıra, hücre yoğunluğu kıkırdağın farklı bölgelerinde değişiklik gösterebilmektedir [45]. Örneğin, menisküsler tarafından korunan ağırlık binmeyen bölgedeki hücresel yoğunluk ağırlık binen bölgeye göre daha fazladır.

### 2.4.2. Su

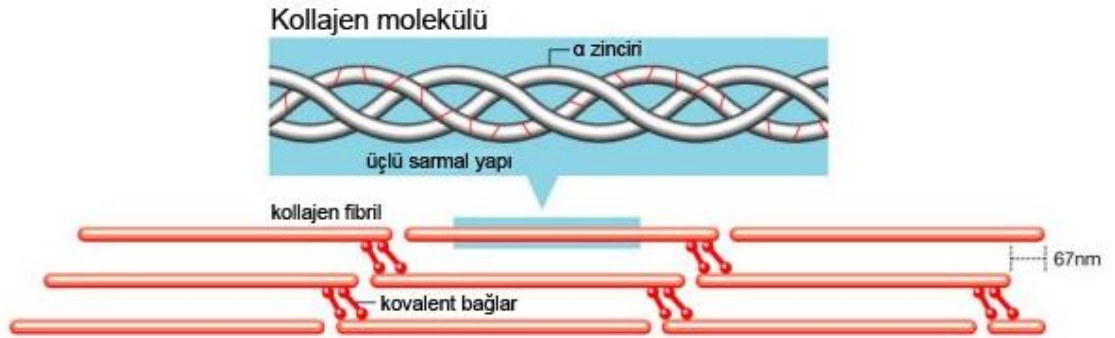
Kıkırdak dokunun yaş ağırlığının yaklaşık %80 kadarını su oluşturmaktadır. Bu oran yüzeysel bölgede derin bölgelere nazaran daha yüksektir. Bu sayede yük-bağımlı deformasyonların önlenmesi gerçekleştirilmiş olur. Metabolik aktivitenin yerine getirilmesi ve düşük sürtünmeli bir kayma yüzeyi oluşturularak hasarlar en aza indirilmeye çalışılır [46]. Su miktarı kollajen ağının organizasyonuna ve şişme direncine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Suyun matriks molekülleri ile olan etkileşimine bağlı olarak mekaniksel özellikleri değişebilmektedir [47]. Normal yaşlanma sürecinde su içeriği azalırken, osteoartrit gibi durumlarda artış gösterir. Suyun artışına bağlı olarak, geçirgenlik artar, güç kaybı oluşur ve elastikiyet azalır.

### 2.4.3. Kollajen

Yaş eklem kıkırdağının %10 kadarını oluşturur. Kollajen, kıkırdağın şeklini korumada ve germe kuvvetini sağlamada görev alır. Ayrıca diğer yapısal makromoleküller olan proteoglikanlar ve glikoproteinler kollajen yapının üzerine tutunurlar [48]. Kıkırdak gerginliği kollajenlerin sahip olduğu yaygın çapraz bağlara ve fibriller mimariye bağlıdır. Kollajen fibriller üç eş  $\alpha$ -1

zincirinin heliks yaparak oluşturduğu yapılardır (Şekil 2.7) ve kıkırdak matriksinin temel mimarisini oluştururlar [49].

Mikrofibriler ağırlıklı olarak %90-95'ini tip II kollajen oluşturur ve eklem kıkırdağının gerilme kuvvetini sağlar [50]. Kollajen tip II'nin yanı sıra kollajen III, VI, IX, X, XI, XII and XIV'da erişkin matriks yapısına katılırlar [51]. Eklem kıkırdağını oluşturan kollajen fibrillerinin merkezinde Tip II ve Tip XI kollajenler bulunur. Bu merkez yapı etrafında tabakalar halinde Tip II kollajen molekülleri ve fibrilin yüzeyine yapışmış Tip IX kollajen bulunur. Fibrildeki kollajen tiplerinin çeşitliliği kollajen fibrillerin büyüklüğünü ve şeklini belirler. Diğer minör kollajen tipleri bu majör fibril ağı arasında dağılmış halde bulunur. Tip IX kollajenin bir kondroitin sülfat yan zinciri vardır. Bu molekül kollajen fibril ile proteoglikan arasında çapraz bir bağ oluşturur. Bu özelliği dolayısıyla makromolekülleri bir araya getirerek fonksiyonel bir kompleks oluşturabilir (Kollajen fibril-proteoglikan agregat kompleksi). Tip VI kollajen üç boyutlu bir ağ oluşturur; ancak fibril yapısında değildir. Kondronlar içerisinde bulunurlar. Tip VI kollajen, yüksek germe (tensil) stresine oldukça dayanıklıdır ve eklemde germe stresini dağıtmaktadır. Tip X kollajen, primer olarak fetal büyüme plağı kıkırdağının hipertrofik tabakasında bulunur. Tip VI kollajen gibi Tip X kollajen de ağ şekillidir ve fibril yapısında değildir. Ayrıca Tip X kollajen, protokollajen içermez. Ancak diğer kollajen molekülleriyle çapraz bağlanma sonucunda protokollajen moleküllerini alır. Bu olayın fetal kıkırdak dokunun kalsifikasyonunda önemli olduğu sanılmaktadır [48].



**Şekil 2.7.** Klasik kollajen molekülünün yapısı. Üst panel, üç  $\alpha$  zincirinin oluşturduğu tek bir kollajen molekülü. Alt panel, her üç sarmal kollajen molekülünün oluşturduğu yapılar 300nm uzunluğundadır. Kollajen molekülleri arasında belirli ve sabit bir aralık bulunmaktadır (67nm). Komşu kollajen molekülleri arasındaki stabilizasyon bir molekülün N terminali ile diğerinin C terminali arasındaki kovalent bağlar ile sağlanmaktadır [52].

#### 2.4.4. Proteoglikanlar

Bu yapılar glikozaminoglikanların (kondroitin- 4 sülfat, kondroitin-6 sülfat ve keratan sülfat) proteinlerle kovalent bağ kurması sonucu oluşurlar. Bu polisakkarid protein molekülleri ıslak ağırlığın %10 kadarını oluşturur ve eklem kıkırdağının sıkışma gücüne karşı dayanıklılığını sağlarlar. Eklem kıkırdağında bulunan proteoglikanlar iki ana sınıf altında incelenebilirler:

geniş yığınlar oluşturan proteoglikan monomerleri ya da agrekanlar ve dekorin, biglikan ve fibromodulin'i içeren küçük proteoglikanlar [6]. Bu moleküller kondrositlerde üretilir ve matrikse salınımları gerçekleştirilir. Kollajen ağının korunabilmesi için proteoglikan molekülleri önemlidir.

Kollajen olmayan, matrilin ve kıkırdak oligometrik protein (COMP) gibi diğer moleküllerde matriks yapısında önemli görevlere sahiptirler. COMP kollajen fibrillogeninde katalizör olarak görev alır. Kollajen tip IX ile COMP veya matrilin-3 molekülünün etkileşimi düzgün bir eklem kıkırdağı matriks formasyonu için oldukça önemlidir. Perlekan fibril oluşumunu desteklerken kollajen VI mikrofibrilleri, kollajen II ve agrekan ile matrilin ve biglikan ya da dekorinin oluşturduğu kompleksler ile bağlanırlar [53].

Canlı yaşamı boyunca, kıkırdak sürekli içsel bir biçimlenme süreci geçirir ve bu süreçte kaybedilen matriks makro molekülleri kondrositler tarafından tekrar oluşturulmaya çalışılır. Matriksin düzgün bir şekilde yeniden düzenlenebilmesi kondrositlerin çevre makromoleküllerdeki değişiklikleri ve matriks organizasyonunu algılayabilme kapasitelerine bağlıdır. Yapısı bozulmuş moleküllerin varlığının tesbiti de dahil olmak üzere, eksik olan yeni moleküllerin uygun miktarda sentezlenmesi oldukça önemlidir. Buna ek olarak matriks, hücreler için bir sinyal iletici olarak da görev yapar. Eklem kıkırdağına yük binmesi ile oluşan mekaniksel, elektriksel ve fizikokimyasal sinyaller ile sentez ya da dejeneratif yanıtların oluşturulması için kondrositler matriks aracılığı ile uyarılmış olur [54, 55]

## **2.5. Eklem Kıkırdağı Tabakaları**

Eklem kıkırdağı kollajen oryantasyonun ve hücresel yoğunluğun değişiklik gösterdiği dört farklı bölge içerir: (a) yüzeyel zon, (b) orta ya da geçiş zonu, (c) derin ya da radial zon, (d) kalsifiye zon.

### **2.5.1. Yüzeyel Zon**

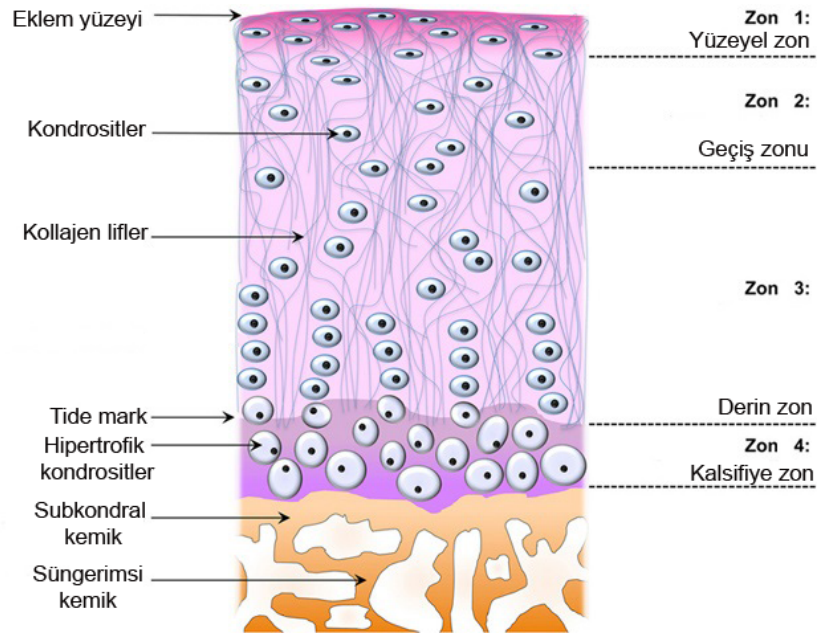
Yassı elipsoid hücreleri içeren en ince tabakadır. Hücreler eklem yüzeyine paralel konumlanmışlardır. Eklem yüzeyini çok ince bir film şeklinde sinovyal sıvı sarmaktadır. Bu yapıya "lamina splendens" ya da "lubrisin" adı verilir. Bu yapı sayesinde eklem yüzeyi oldukça kaygan bir yüzey haline getirilerek hareket sırasında sürtünme engellenmiş olur. Bu zonda yer alan kondrositler yüksek oranda kollajen sentezi yaparken, daha az miktarda proteoglikan üretirler. Bu nedenle bu zon oldukça yüksek su konsantrasyonuna sahiptir. Yoğun olarak fibronektin içerir. Fibronektin,  $\alpha 5\beta 1$  tipi integrin reseptörü ile kondrosit membranına bağlanır [8]. Paralel düzenlenmiş fibriller oldukça yüksek gerilme ve makaslama gücüne karşı koyabilmektedirler. Bu zondaki değişiklikler eklem kıkırdağının mekanik özelliklerini etkileyerek osteoartrit oluşumuna neden olabilmektedir. Bu tabaka aynı zamanda, büyük makromoleküller için bir filtre görevi görerek eklem kıkırdağının sinovyal doku immun sisteminden korunmasını sağlarlar [46] (Şekil 2.8).

### 2.5.2. Geçiş Zonu (Orta Zon)

Geçiş zonu yüzeysel zona göre daha fazla yer tutar. Yüzeysel zonun hemen altında yer alır. Bu zonda hücre yoğunluğu daha azdır, hücreler daha yuvarlak ve matrikse gelişi güzel dağılım gösterirler. Ekstrasellüler matriks (ESM) daha az kollajen fibril içerirken, daha fazla proteoglikan içerir. Buna bağlı olarak da daha az su bulundurur. Kollajen fibriller, eklem kıkırdağı yüzeyine oblik düzende olacak şekilde yerleşim gösterirler ve yüzeysel zondaki fibrillere nazaran daha geniş çaplara sahiptirler [8] (Şekil 2.8).

### 2.5.3. Derin Zon (Radial Zon)

Bu zon en geniş çaplı kollajen fibrilleri, en yoğun proteoglikan içeriğini ve en az su miktarını içerir. Hücreler geçiş zonundaki gibi yuvarlaktır fakat eklem kıkırdağı yüzeyine dik konumda sütunlar şeklinde dizilim gösterirler. Bu zondaki kollajen fibriller hücre dizilimine uyum sağlayarak paralel sütunların arasında kemiğin uzun eksenini doğrultusunda yerleşim gösterirler [8] (Şekil 2.8).



**Şekil 2.8.** Erişkin eklem kıkırdağı zonlarının şematik görünümü [56].

### 2.5.4. Kalsifiye Zon

Sahip olduğu küçük kondrositler ve kalsifiye matriks ile karakterizedir. Bazı alanlarda hücrelerin tamamen kalsifiye matriks ile çevrili oldukları gözlenir. Kalsifiye zondaki hücreleri çevreleyen matriks alanlarında, büyüme plağındaki hipertrofik kondrositlerde olduğu gibi, kolajen tip X yoğun olarak bulunur [51, 54, 57]. Bu zon derin zondan tidemark adı verilen düzgün olmayan dalgalı bir yapıyla ayrılır. Subkondral kemiğe komşu ince bir kalsifiye kıkırdak tabakası olarak tanımlanır. Yumuşak hiyalin kıkırdaktan kemiğe geçişte rol oynar. Tidemark üzerinde kondrositler prolifer olup yeni hücreler oluşturarak, interstisyel büyümeyi sağlarlar. Yaşa bağlı olarak



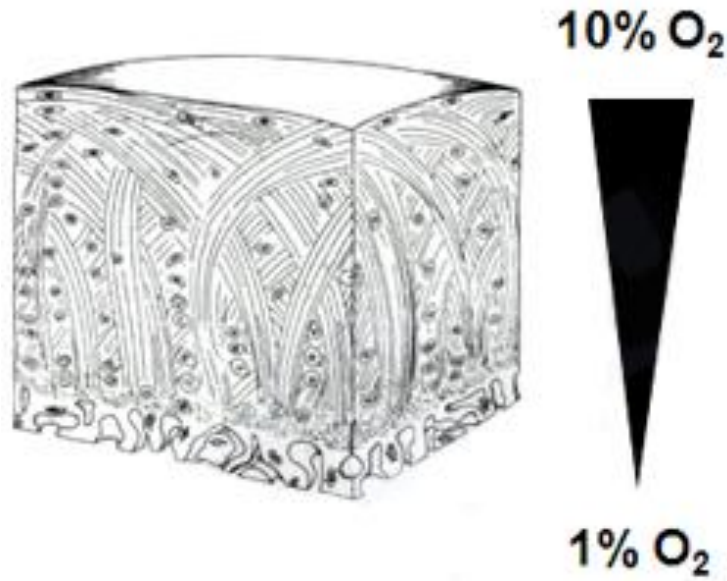
tidemark hattının yükselmesiyle artiküler kıkırdak incilir ve kalsifiye kıkırdak kemik ile yer değiştirir [8] (Şekil 2.8).

### 2.5.5. Tidemark

Tidemark dalgalı ve düzgün olmayan bir hat şeklinde derin zonu ve kalsifiye zonu birbirinden ayırır. Tidemark ve kalsifiye zon mekaniksel gücün subkondral kemiğe iletiminde oldukça önemli rol oynarlar [58]. Ultrastrüktürel olarak incelendiğinde tidemark fibrillerden oluşmuş bir band içermektedir. Bu sayede kalsifiye zon ile kalsifiye olmamış bölge arasında bulunan kollajen fibriller için sınırlayıcı bir fonksiyon oynuyor olabilir. Metabolik moleküller için Tidemark üzerinde küçük boşluklar yer almaktadır [59] (Şekil 2.8).

Çizelge 2.1. Eklem kıkırdağı tabakalarının özellikleri [60].

Tabaka	Kalınlık (µm)	Özellik	Kollajen Dizilimi	Fonksiyon
Yüzeyel	40	Metabolik aktivite düşük	Horizontal	Gerilmeye karşı
Orta(Geçiş)	500	Metabolik aktivite yüksek	Oblik	Kompresyona karşı
Derin	1000	Kollajen boyutu	Vertikal	Kompresyona karşı
Tidemark	5	Bariyer	Horizontal	Gerilmeye karşı
Kalsifiye	300	Hidroksiapatit kristalleri	-	Ankor



Şekil 2.9. Erişkin eklem kıkırdağı oksijen basıncı [61].

## 2.6. Ekstrasellüler Matriks Yapısı

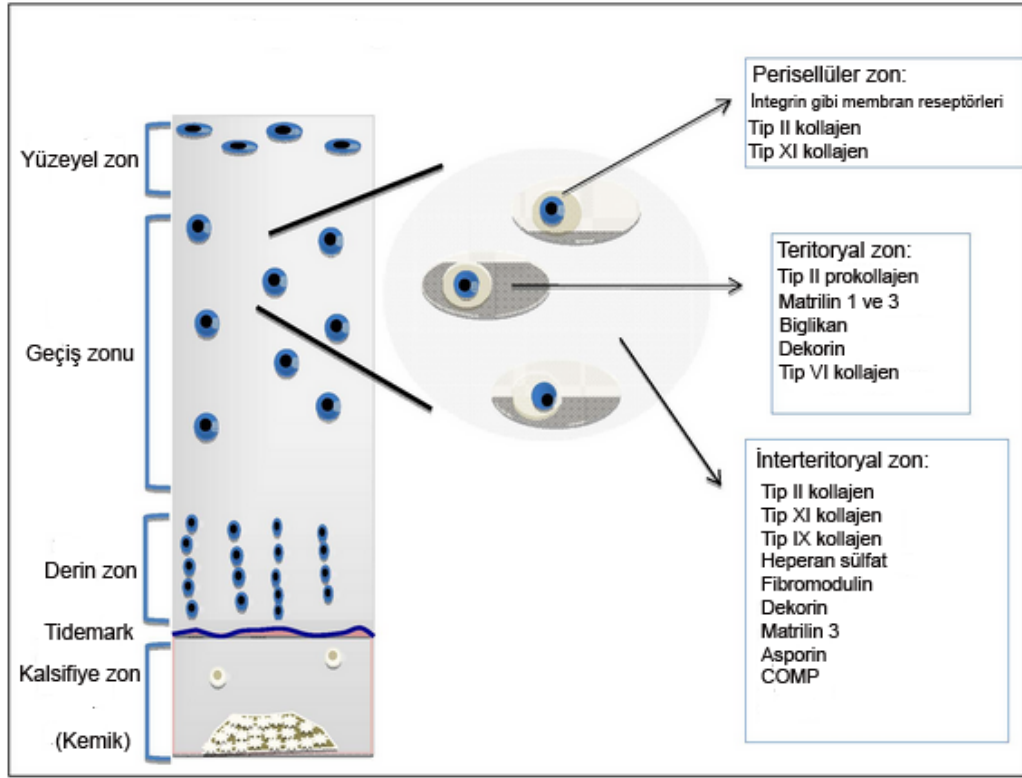
Kondrositler kıkırdak matriksi içerisinde oldukça düşük oksijen basıncında canlılıklarını idame ettirirler. Bu oran genellikle yüzeyde %10, derin zonlarda ise en az %1'e kadar düşmektedir (Şekil 2.9). İn vitro süreçte kondrositler hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa (HIF-1 $\alpha$ ) aracılığı ile glikoz taşıyıcı proteinleri (GLUTs) ve anjiyogenik faktörleri (örneğin, VEGF) stimüle ederek, bir çok kıkırdak anabolik geni aktif hale getirerek adaptasyonlarını sağlarlar [62, 63].

Kondrositleri çevreleyen ekstrasellüler matriks, kondrositlere olan uzaklığı ile farklı özellikler göstermektedir. Bu bölgeler farklı isimler almaktadır: 1- Perisellüler matriks, 2- Teritoryal matriks, 3- İnterteritoryal matriks. Perisellüler matriks hücrenin hemen etrafını çevreleyen bölgede lokalizedir. Perisellüler matriksden sonra territorial matriks yer almaktadır. Kondrositlere en uzak bölge ise interterritoryal matriks olarak adlandırılır.

Perisellüler matriks bölgesi, eklem kıkırdağı kondrositlerinin yüzeyinde bulunan reseptörler ile çevreden gelen farklı uyaranlara cevap oluşturulan bir alandır. Bu bölge agrekan, hiyalüronan ve dekorin gibi proteoglikanlar yönünden oldukça zengindir. Tip II, VI ve IX kollajen fibronektin aracılığı ile oldukça konsantre şekilde bu bölgede lokalize olmuştur. Tip VI kollajen hemen kondrositlerin çevresinde yer alır ve matriksin makromoleküler ağına tutunmasını sağlar. Teritoryal matriks ise tip VI kollajen mikrofibrillerini içerirken, çok az fibrillar kollajen içerir. İnterterritoryal matriks ise kollajen tip II, IX ve XI ile bağlantı kuran kollajen olmayan bölge içerir. Matriksin diğer molekülleri ve proteoglikanlar ile bağlantıların gerçekleştiği bölgedir. Bu yapılar kıkırdağın gerilmelere karşı direncini sağlarlar [64-66] (Şekil 2.10).

## 2.7. Ekstrasellüler Matriks ve Hücre Sinyalleri

ESM proteinleri, hücre yüzey reseptör sinyal ağında oldukça kritik ve kompleks bir rol oynamaktadırlar. Her şeyden önce, ESM büyüme faktörleri için bir rezervuar olarak hizmet etmektedir [67]. Kondrositler, mekaniksel ve biyokimyasal değişikliklere ESM aracılığı ile hücre yüzey büyüme faktör reseptörleri ve adhezyon molekülleri ile cevap verirler. ESM proteinleri, hücre davranışını, polaritesini, göçünü, farklılaşmasını, proliferasyonunu ve canlılığını, intrasellüler hücre iskeleti aracılığı ve büyüme faktörleri sinyal iletimi ile gerçekleştirirler. İntegrinler ve proteoglikanlar ESM yapısında bulunan en önemli adhezyon reseptörleridir. Çevreden gelen uyarıların algılanması ve bu uyarılara karşı hücresel cevap oluşturulması sürecinde etkindirler [67] (Şekil 2.11).

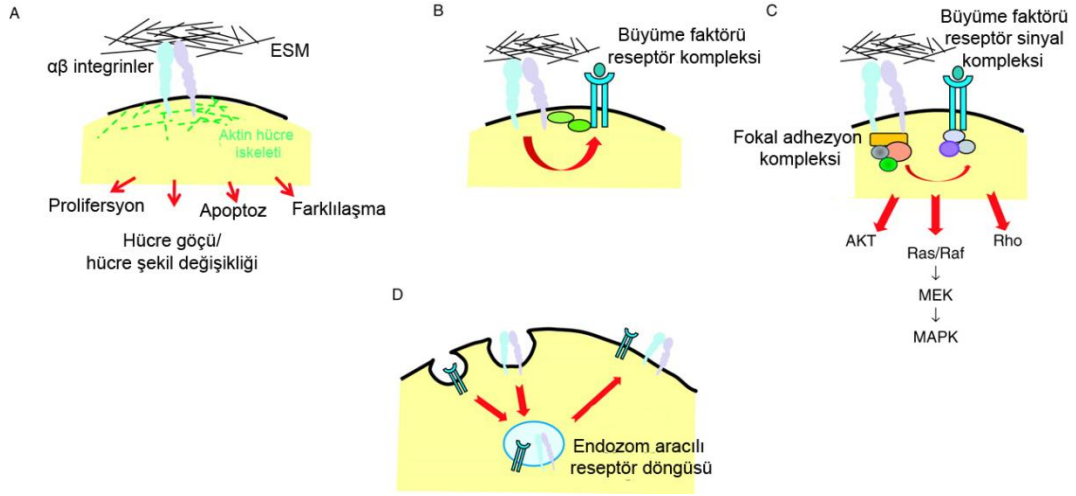


**Şekil 2.10.** Normal eklem kıkırdağı organizasyonu. Kondrositlerin hemen çevresindeki bölge perisellüler zon olarak isimlendirilirken, teritoryal zon ise hemen perisellüler matriksden sonra gelir. Kondrositlere en uzak bölge ise interteritoryal zon olarak adlandırılır. Kondrositlerin aktivitelerine bağlı olarak bu bölgeler farklılıklar gösterirler [68].

İntegrinler, 18  $\alpha$  altünite ve 8  $\beta$  altünitenin kovalent olmayan bağlarla 24 farklı kombinasyon oluşturabilen heterodimerik transmembran reseptörleridir. İntegrin dimerleri farklı ESM proteinlerine farklı afinitelerde bağlanarak ekspresyon motifleri ve hücre için sinyal yolları belirlenir. İntegrinler, ESM kompozisyonuna ve fiziksel özelliklerine bağlı olarak mekaniksel ve kimyasal sinyalleri entegre ederek hücre iskeleti yolu ile düzenlemeleri sağlarlar. İntegrin aracılı hücre adhezyon modelinde, integrinler Arg-Gly-Asp (RGD) motiflerini tanır ve bağlanırlar [67, 69].

İntegrinler, bağımsız bir şekilde, çok sayıda sinyal yolunu aktive edebildikleri gibi sinerjistik olarak da diğer büyüme faktör reseptörleri (insulin reseptörü, tip 1 insülin-benzeri büyüme faktörü reseptörü, VEGF reseptörü, TGF- $\beta$  reseptörü, Platelet-kökenli büyüme faktör reseptörü (PDGF- $\beta$ ) ve epidermal büyüme faktör (EGF) reseptörü) aracılı sinyal yolu aktivasyonlarını gerçekleştirebilirler.





**Şekil 2.11.** İntegrinler ve büyüme faktörü sinyal iletimi. **A.** İntegrinler hücre yüzeyinde lokalizedir ve ESM'de bulunan moleküllerle farklı afiniteler ile etkileşimdedirler. Hücre içerisinde ise hücre iskeleti ile bağlantılıdır ve sinyal iletiminde rol oynar. **B.** İntegrinler sitoplazmik alanları ile etkileşim halindeki adaptörler aracılığı ile büyüme faktör reseptör kompleksini etkileyebilirler. **C.** İntegrinler fokal adhezyon molekülleri ile birlikte lokalize olabilirler. Bu durumda büyüme faktör reseptörü reseptör kompleksi ile etkileşime geçerek alt yolları çalıştırabilir. **D.** İntegrinle büyüme faktör reseptör ekspresyonu oranı üzerinde etkilidirler [67].

## 2.8. Eklem Kıkırdağı Homeostazı ve Yenilenmesi

Eklem kıkırdak hasarı restorasyonundaki zorluklar kondrositlerle ilgilidir. Kondrositler izole yapılarına rağmen çevreden gelen mekanik etkilere, sitokinlere, büyüme faktörlerine cevap verebilirler. Kondrositlerin stimülatörlerindeki değişiklikler eklem kıkırdağı yıkımının ve dejenerasyonunun sebebi olabilir. Diğer bütün biyolojik sistemlerde olduğu gibi eklem kıkırdağının da doğal yapısını koruyabilmesi için belli bir dengesi vardır. Başlangıçta sentez sabit kalmasına karşın denge zamanla yıkım lehine döner ve bu andan itibaren hastanın semptomları başlar. Başlangıçta Tip II kollajen konsantrasyonu değişmeden kalır. Ancak, kollajen ağı hasar görebilir ve agrekan protein konsantrasyonu azalmasına paralel olarak proteoglikan agregasyonu azalabilir. Matrikste su konsantrasyonu artar. Matriksin sertliği azalır ve geçirgenliği artar. Matriksteki bu bozulmayı kondrosit algılar ve buna cevaben matriks sentezini ve proliferasyonunu artırır. Bu cevap dokuyu tamir edebilir, doku statüsünü değiştirebilir, ya da kıkırdak hacmini arttırabilir. Kondrositlerin aktivitesi yıllarca artmış olarak kalabilir. Yalnız katabolik aktivite anabolik aktiviteyi aşarsa veya eklem kıkırdağı tamamen kaybolup subkondral kemik açığa çıkarsa kondrosit cevabı belirgin olarak azalır. Herhangi bir nedenle harap olan kıkırdak alanında nekrotik ve atrofik değişiklikler olur. Bu değişikliklere karşın doku kendini yenilemeye çalışır. Defekt perikondrium veya çevre fasyalardan ilerleyen bağ dokusu ile doldurulur. Bu bağ dokusu granülasyon dokusu

şeklinde. Yetişkinlerde tamir bu gevşek granülasyon dokusunun kırık dokuya dönüşmesi ile tamamlanır. Bu dönüşümlerde başlıca uyarılar dış mekanik etkenlerdir. Tamir dokusundaki pek çok hücrenin sinovyumdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Eğer subkondral kemik tabakaya penetrasyon varsa kemik iliğinden de hücreler gelebilir. Fakat oluşan doku tam bir hiyalin kırık özelliğini taşımaz [48].

## **2.9. Eklem Kırık Lezyonları Etiyolojisi**

Diz eklemde meydana gelen eklem kırık problemleri oldukça yaygındır. Defektli bölgeler, lezyonlu alanlar olarak isimlendirilirler. Farklı etkenlere bağlı olarak, iki farklı kondral lezyon çeşidi mevcuttur: fokal lezyonlar ve dejeneratif lezyonlar. Fokal lezyonlar genellikle travma, osteokondritis dissekans (Kemik uçlarında kan akımının yetersizliği veya kalsiyum eksikliği nedeniyle eklem kırık parçasının ayrılması veya kırılmasıyla sonuçlanan kemik kırık yangısı) veya osteonekroz sonucu oluşurlar. Dejeneratif defektlerin sebeplerini çok keskin hatlarla çizemesek de genellikle ligament instabilizasyonu, menisküs yaralanmaları veya osteoartrit sonucu oluşurlar [70].

Travma eklem defektlerinin oluşumundaki en yaygın sebeptir. Genellikle spor yaralanmaları veya kazalar sonucu oluşur. Makaslama gücü kırık matriksi üzerinde bazen subkondral kemiğe kadar ulaşan bir stres kırık oluşmasına neden olabilir. Femoral kondillerin çevresinde oluşan lezyonların % 40-50 kadarı patella dislokasyonu sonucu bu mekanizma ile oluşur [71]. Bu durum 20-40 yaş arası genç aktif bireylerde daha sık görülür. Osteokondritis dissekans ilk kez 1888 yılında Konig tarafından tanımlanmıştır [72]. Hastaların femoral kondil bölgesinde tekrarlayan mikrotravmalar gözlenir. Dizde en sık medial femur kondilinin dış yüzünde görülür (% 75) [73]. Osteonekroz primer olarak (spontan/avasküler) ya da steroid tedavisi, post-menisektomi, alkolizm gibi çeşitli faktörlerin etkisiyle sekonder olarak oluşabilir [74]. Osteoartrit 40 yaşından sonra kırık lezyonlarının en sık nedenidir. Dejeneratif lezyonlar farklı derinliklerde ve şekillerde olabilmektedirler. Subkondral kemiğin sertleşmesi daha az güç absorpsiyonu yapmasına neden olur ve sonuçta kırık matriksi zarar görür. Bu bölgeye yükün binmesi lezyonu büyütür ve zamanla subkondral kemiğin aşınmasına neden olur [70].

Menisküs yırtıklarına bağlı olarak fonksiyon kaybı ve ligament hasarlarına bağlı olarak stabilizasyon sağlanamaması sonucu kırık dokuda hasar oranı artış gösterir [75]. Lewandrowski ve arkadaşları menisküs yırtıklarının %76 oranında eklem kırık defektlerine eşlik ettiğini rapor etmişlerdir. Bunun yanısıra uzunlamasına menisküs yırtıklarının yatay olanlara oranla eklem kırık hasarları ile daha fazla ilişkili olduğunu belirtmektedirler [76].

## 2.10. Kıkırdak Lezyonlarının Tanımı

Uygun tedavi politikalarının uygulanabilmesi için lezyonların basit bir sınıflandırmaya tabi tutulması gerekmektedir. Outerbridge tarafından geliştirilen derecelendirme sistemi, klinikte kullanılan basit ve yararlı bir sınıflandırmadır (Çizelge 2.2) [77]. Bunun yanı sıra kullanılan farklı derecelendirme sistemleri de kullanılmaktadır (Çizelge 2.3).

Lezyonun tanımlanması aşamasında önemli kriterler, lezyonun lokasyonu, boyutları (örn. yüzey alanı), şekli(örn. dairesel, köşeli) ve çevresinde sınır içerip içermemesidir (çevresi çevrili, kısmen çevrili ya da açık). Bunların yanı sıra lezyon derinliği, hafif (kısmi kalınlık), orta derecede (tam kalınlık) veya subkondral kemiğe yayılım göstermiş, şeklinde tanımlanır [78].

**Çizelge 2.2.** Outerbridge artroskopik derecelendirme sistemi [79].

Evre 0	Normal kıkırdak
Evre I	Ödem ve yumuşama
Evre II	Kısmi defektler, fissür oluşumu <1.5cm
Evre III	Subkondral kemiğe doğru fissür oluşumu > 1.5cm
Evre IV	Subkondral kemiğin etkilenmesi

**Çizelge 2.3.** Uluslararası kıkırdak Onarım Derneği tarafından önerilen ICRS derecelendirme sistemi [79].

Evre 0	Normal kıkırdak
Evre I	Normal kıkırdağa yakın özellikler (yüzeyel zon lezyonları)
Evre II	Normal olmayan kıkırdak (kıkırdağın %50 derinliğine ulaşan lezyonlar)
Evre III	Ciddi anormal kıkırdak (kıkırdağın %50 derinliğini geçen lezyonlar)
Evre IV	Ciddi anormal kıkırdak (subkondral kemiği içeren lezyonlar)

## 2.11. Cerrahi Prosedürler

Hasarlı eklem kıkırdağının tedavisi klinik anlamda halen ortopedik cerrahlar için oldukça kompleks bir sorundur. Eklem kıkırdağı tedavi prosedürleri genellikle artroskopik olarak gerçekleştirilmektedir. Artroskopi sırasında, cerrah bir artroskop kullanarak eklem çevresinde üç küçük insizyon oluşturur. Bazı durumlarda ise etkilenen bölgeye doğrudan müdahale gerektiği için cerrahiye başvurulabilir. Daha uzun açık insizyonlara ihtiyaç duyulabilir. Bazen kıkırdak ameliyatları yapılırken, meniküs veya ligament yırtıklarına da müdahale edilmek istenebilir.

Genellikle, artroskopik prosedürlerden sonra hastanın iyileşmesi geleneksel cerrahi müdahaleye göre daha kısadır.

Kıkırdak restorasyonu için kullanılan en yaygın prosedürler:

- Delme (Dirilleme)
- Mikrokırık yöntemi
- Abrazyon Artroplastisi
- Osteokondral greft
  - Osteokondral otogreft
  - Osteokondral allogreftler
- Periosteal grefler
- Perikondral greftler
- Otolog hücre implantasyonu
  - Otolog kondrosit implantasyonu
  - Farklı kaynaklara ait hücrelerin implantasyonu
- Enzimatik tedavi teknikleri

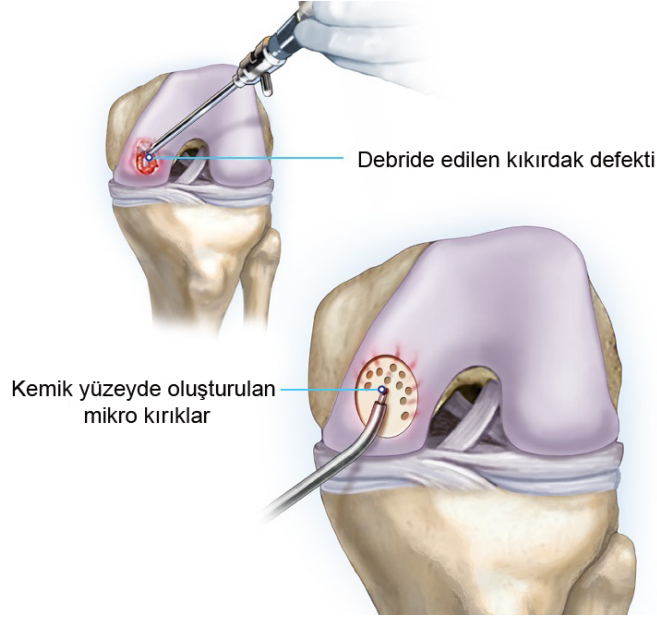
### 2.11.1. Delme (Dirilleme)

Delme yöntemini 1957 yılında ilk kullanan kişi Smillie'dir [80]. Ardından 1959 yılında yöntemin daha yaygın hale gelmesine ön ayak olan ise Pridie'dir [81]. Prosedür yüksek devirli bir delici yardımı ile subkondral kemiğin delinmesini içermektedir. Bu yöntem düşük invazyon nedeni ile küçük kondral defektlerin tedavisi için kullanılan, kemik iliği sitümlasyonu prensibine dayanan bir yöntemdir [82, 83]. Ancak, bu tekniğin, termal nekroz ve fibröz kıkırdak oluşumu gibi dezavantajları vardır [84].

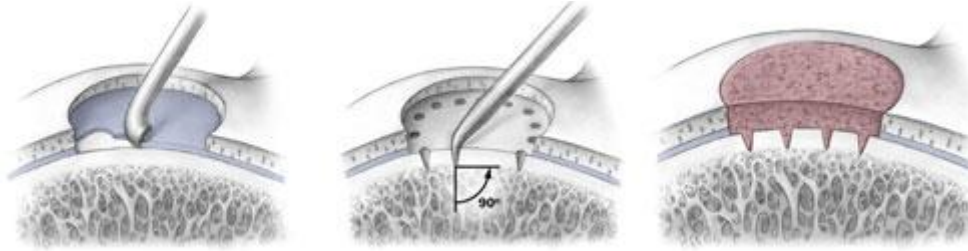
### 2.11.2. Mikrokırık Yöntemi

Mikrokırık yöntemi ilk kez Steadman [85] tarafından ortaya konmuş olup, fokal kondral defektlerin fibröz kıkırdak niteliğinde bir doku ile tamirini içerir. Kıkırdak yaralanması olan bölge üzerinde kalan kıkırdak, yeni dokunun oluşumunu engelleyeceği için onarım girişiminden önce bölgenin debride edilmesi gerekir [86]. Hasarlı bölge kıkırdak artıklarından temizlendikten sonra kemiğe 5 mm aralıklarla ve birkaç mm derinliğinde uzanan delikler açılır. Böylece bu deliklerden kemik iliğindeki kök hücrelerinin hasarlı bölgeye ulaşması için bir yol açılmış olur (Şekil 2.12). Hasarlı bölgede oluşan kan pıhtısının içine yerleşen kök hücrelerinin, uygun ortam sağlandığında kıkırdak

benzeri hücrelere dönüşme yeteneği vardır. Son yıllarda, bu pıhtının hasarlı bölgeye daha iyi tutunup organize olabilmesi için matris adı verilen çatı implantları geliştirilmiştir. Çoğu kollajenden yapılan bu zar şeklinde dokular mikro-kırık yapıldıktan sonra hasarlı bölgeye yapıştırılabilir. Yeni kırık dokusu oluşana kadar, ameliyat sonrası altı-sekiz hafta süreyle koltuk değneği kullanarak eklemi yüklenmeden korumak gerekir.



**Şekil 2.12.** Mikrokrık yöntemi temel basamakları. A. Defekli bölgenin debride edilmesi. B. Kemik yüzeyinde oluşturulan mikro kırıklar [87].



**Şekil 2.13.** Mikrokrık tekniği ile oluşturulan oluklardan hücreler hasarlı bölgeye göç ederek doku tamiri mekanizması çalıştırılmış olur [88].

### 2.11.3. Abrazyon Artroplastisi

Eklem bölgesindeki eklem kıkırdağı bazı durumlarda tamamen ortadan kalkar ve kemik yüzeyleri ortaya çıkar. Bu durum yüzeyde kalan kemiğin daha sert ve parlak olmasına neden olur. Artroskopi sırasında cerrah özel bir ekipman kullanarak abrazyon artroplastisi işlemini gerçekleştirir. Abrazyon artroplastisinin prensibi, eklem yüzeyindeki sert ve parlak kemik dokusunun

traşlanmasına dayanır. Bu traşlama hareketine bağlı olarak kemikte bir iyileşme yanıtı ortaya çıkar. Zamanla kan damarları bu alanı doldurur ve fibröz kıkırdak dokusuna benzer skar doku oluşumu gerçekleşir. Abrazyon artroplastisi sonrası oluşan fibröz kıkırdak dokusu, hiyalin kıkırdak için tipik olan tip II kollajenden ziyade tip I ve tip III kollajen içerir. Fibröz kıkırdak normal eklem kıkırdağına göre daha dayanıksızdır. Özellikle ağırlık binen alanlarda hiyalin kıkırdak kadar etkin işlev görememektedir. Oluşturulan yeni fibröz kıkırdak diz ağrılarını yeterince ortadan kaldıramayabilir. Bu yöntem genellikle geçici bir çözümdür. Belirtiler bu ameliyattan bir süre sonra tekrar ortaya çıkabilir [89].

#### **2.11.4.Osteokondral Greft**

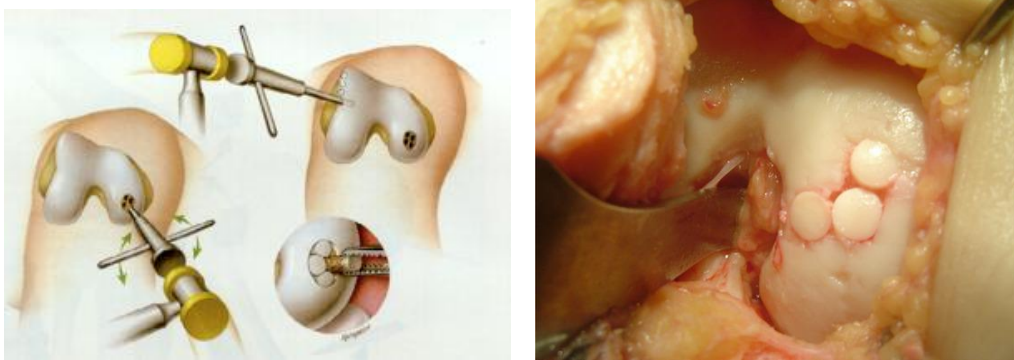
Osteokondral greftleme (veya mozaikplasti), semptomatik (ağrılı) kıkırdak ve osteokondral lezyonların tedavisinde başvuru olan bir yöntemdir. Küçük silindirik kıkırdak-kemik yapıların defektli bölgelere transplantasyonunu içerir. Bu teknik 90'lı yılların başında geliştirilmiş ve uzun süreli sonuçlarına bakıldığında olumlu sonuçlar alınmıştır. Osteokondral greftleme çoğu zaman tek bir insizyon bölgesinde yapılabilen bir prosedür olmasının yanı sıra bazı durumlarda artroskopik prosedürler de uygulanabilir. Örnek almak için kullanılan bir ekipmanla donör bölgeden silindirik tıkaçlar elde edilir. Genellikle donör bölge, eklem bölgesinde ağırlık binmeyen alanlardan seçilir. Elde edilen silindirik tıkaçların yerleştirilebileceği uygun çap ve derinlikte yuvalar yine özel ekipmanlar ile oluşturulur. Oluşturulan yuvalar yaklaşık 15-25 mm derinliğindedir. Ardından, önceden elde edilmiş olan silindir tıkaçlar uygun yuvalara transplante edilir. Transplantasyon işlemi sırasında silindir tıkaçların eklem yüzeyinin morfolojik yapısına uygun olarak yerleştirilmesine dikkat edilir [90] (Şekil 2.14).

##### **2.11.4.1.Osteokondral Otogreft**

Kıkırdak defektlerinin tedavisinde osteokondral otogreft güvenilir bir greft kaynağıdır. Ancak büyük ve geniş defektlerin rekonstrüksiyonunda, yeterli osteokondral otogreft elde edilmesi genelde mümkün olmamaktadır [91].

##### **2.11.4.2.Osteokondral Allogreft**

Osteokondral allogreftler, abrasyon artroplastisi, subkondral delme gibi daha konservatif cerrahi yöntemlerle yeterli sonucun alınmadığı genç hastalarda, eklem yüzeyindeki büyük defektlerin (>2 cm) kapatılmasında ön planda olan bir yöntemdir. Taze osteokondral [92] greftlerin genelde daha uygun olduğu kabul edilmekle beraber, dondurulmuş greftlerle de oldukça başarılı sonuçlar bildirilmektedir [93].



**Şekil 2.14.** Osteokondral greftleme tekniği. **A.** Kıkırdak-kemik silindirlerin elde edilmesi ve oluşturulan uygun yuvalara yerleştirilmesi. **B.** Medial kondil hasarı (ICRS evre III) olan bölgeye donör bölgeden elde edilen 3 silindirin yerleştirilmiş durumu [94, 95].

#### **2.11.5.Periosteal Greft**

Periosteal greftler kondrojenik potansiyellerinin olmasına bağlı olarak eklem kıkırdığı defektlerinde kullanılabilirler. Yapılan pre-klinik çalışmalarda da olog periosteal greft transplantasyonunun kıkırdak tamir prosedürleri için uygun olabileceği belirtilmektedir [96].

#### **2.11.6.Perikondral Greft**

1959 yılında ilk kez Lester transplante edilen perikondriumdan yeni kıkırdak oluşturulabileceğini rapor etmiştir [97]. Bu prosedür daha sonra farklı araştırmacılar tarafından da desteklenmiştir [98-101]. Greft dokusu, kısıtlı miktarda elde edilebildiğinden, perikondral otogreftin insanlarda kullanımı küçük eklemler ya da büyük eklemlerdeki küçük defektler ile sınırlıdır.

#### **2.11.7. Olog Hücre İmplantasyonu**

##### **2.11.7.1.Olog Kondrosit İmplantasyonu**

Olog kondrosit implantasyonu (OKİ) eklem kıkırdığı tedavi süreci için oldukça umut vaat edici bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Teknik iki ayrı cerrahi prosedür içermektedir. İlk basamak olarak eklem bölgesinin ağırlık binmeyen bir bölgesinden artroskopik olarak kıkırdak örnekleri elde edilir. Enzimatik bir işlem sonrası *in vitro* hücre kültüründe yeterli hücre sayısı elde edildikten sonra, hücreler tek başına veya degrade olabilen bir materyal ile defektli bölgeye enjekte edilirler. Enjeksiyondan sonra periosteal kapak veya kollajen membran ile üzerleri kapatılır. Brittberg [102, 103] iki araştırmasında da OKİ prosedürü uzun süreli olumlu sonuçlarını rapor etmiştir. Ancak, hücrelerin hipertrofik sürece girerek ossifikasyona gittikleri ve integrasyonun oldukça zayıf olduğu daha sonraki çalışmalarda belirtilmiştir [104].

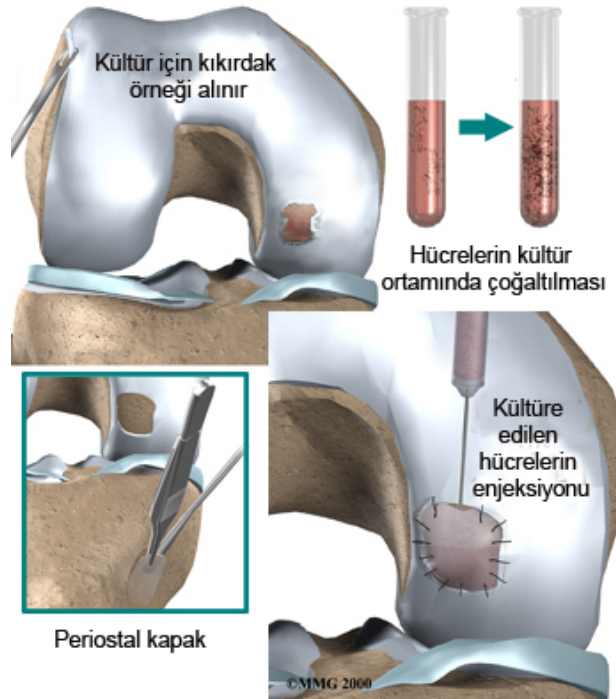


### 2.11.7.2. İmplantasyon İçin Diğer Hücre Kaynakları

Otolog kondrositlerin yanı sıra kemik iliği kökenli stromal hücreler [105], periostal hücreler [106], iskelet kas hücreleri [107], adipositler [108] ve sinovyal fibroblastlar da [104, 109, 110] eklem kıkırdağı tedavileri için alternatif hücre kaynakları olarak gösterilmektedir. Transplantasyon prosedürünün uygulanabilmesi için bu hücrelerin yeterli sayıda (en az  $1 \times 10^7$ ) elde edilebilmesi gereklidir. Ancak, MKH'lerin hücre kültüründe çoğaltılması ve farklılaşması oldukça kontrollü ve kompleks bir kondrojenik farklılaşma mekanizmasını içerir. Bu süreçte bilinmeyen bir çok basamak halen mevcuttur [111].

### 2.11.8. Enzimatik Tedavi Teknikleri

Bir çok çalışma, enzimatik sindirim ile transplante edilen hücrelerin veya kıkırdak dokunun konakçı bölgeye daha iyi entegre olacağını ileri sürmektedir. Lee ve ark. [112] ile Hunziker ve ark. [113] kondroitinaz ABC kullanarak yüzeysel zondaki proteoglikanları uzaklaştırmışlardır. Kondroitinaz ABC seçici olarak kollajen matriksi etkilemeden proteoglikanları degrades edebilmektedir [114]. Enzim muamelesinden sonra artan yapışma kuvvetini ve hücre popülasyonunu göstermişlerdir. Hiyalüronidaz (%0.1 - 0.3) ve kollajenaz (tip VII, 10-30 U/ml) uygulamasından sonra lezyon bölgesinde anlamlı düzeyde kondrosit yoğunluğunun ve entegrasyonun arttığı, ara yüzeyin daha dayanıklı hale geldiği gösterilmiştir [115, 116].



Şekil 2.15. Otolog Kondrosit İmplantasyonu prosedürü [117].



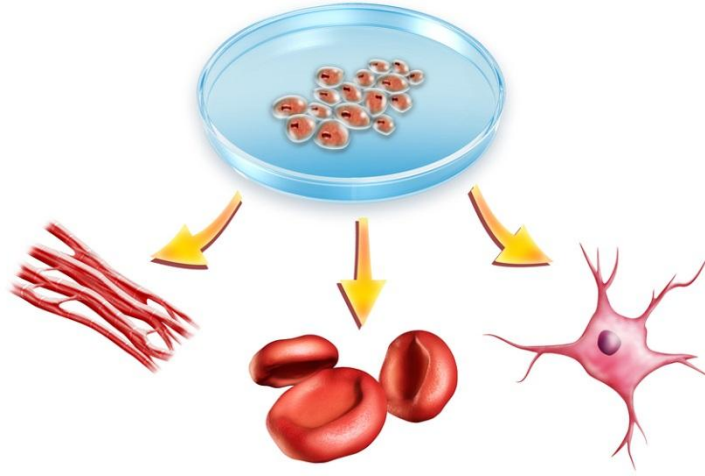
Ancak, dokular 48 saat süre ile enzim muamelesi gördüğünde, 28 gün sonunda tekrar oluşturulamayan proteoglikan kaybı gözlenmiştir. Klinik uygulamalarda, enzimatik uygulamanın kısa süreli olması önerilmektedir.

Kollajenaz, kollajen peptit bağlarını koparan bir enzimdir. Kısa süreli kollajenaz (tip I) uygulaması ile sadece yaralı bölge çevresi etkilenir ve tüm kırıldak doku zarar görmemiş olur. Böylece, progenitör hücreler konak dokudan yaralı kırığa doğru göç edebilirler.

Khan ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, kırıldak entegrasyon yüzük-disk modelinde sitokin aracılı katabolik bir etki oluşturulmasını anabolik bir süreç izlemiştir. Uygulamanın yapılmadığı grup ile karşılaştırıldığında sitokin uygulanan grupta entegrasyonun daha iyi sağlandığı belirtilmiştir [118].

## 2.12.Kök Hücreler

Kök hücreler kendilerini yenileyebilme, uzun süre bölünebilme ve diğer hücre tiplerine farklılaşabilme yetenekleri olan farklılaşmamış hücrelerdir.



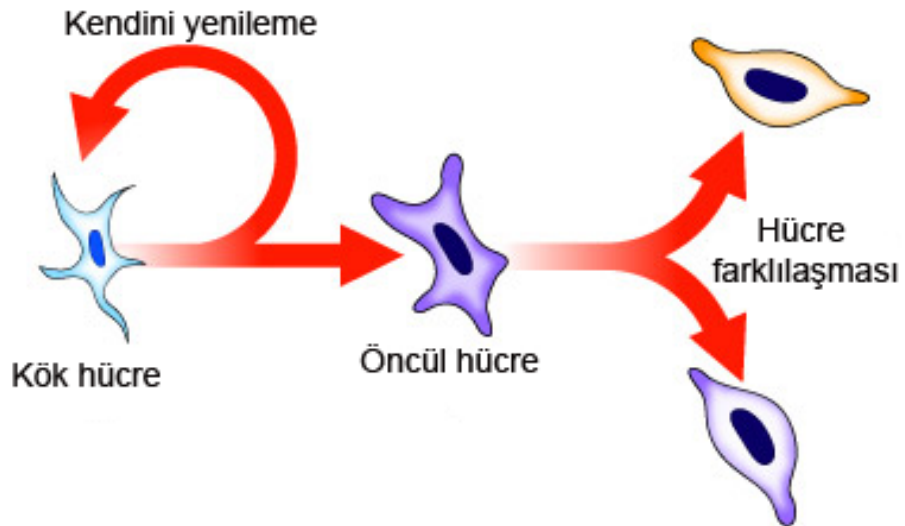
**Şekil 2.16.** Kök hücreler farklı hücre tiplerine farklılaşabilmektedirler [119].

Kendini yenileme terimi kök hücrelerin yaşam boyunca sayılarını korumak ve yeni kök hücreler yapmak üzere gerçekleştirdikleri bölünme işlemini tanımlamak için kullanılır. Bu bölünme işlemi sonucunda bölünen hücreler farklılaşmamış olan düzeylerini korurlar. Kendini yenileme programı kendini yenilemeyi uyaran proto-onkogenler ile kendini yenilemeyi sınırlayan veya genomun bütünlüğünü koruyan tümör baskılayıcılar arasındaki denge sayesinde gerçekleşir. Bu her iki hücre içi mekanizma ile nişten gelen dış

sinyaller hücrelerin kendini yenileme süreçlerinin kontrolünü sağlar. Kök hücre, dokudaki değişen gereksinimlere yanıt olarak hücre döngüsü içindeki durumunu yeniden düzenler, zaman içinde gelişim yetkinliğini değiştirir (örn; pluripotent olmaktan multipotent olmaya dönüşebilir), böylece yaşamın farklı süreçlerinde farklı bir kendini yenileme programı uygular. Kendini yenileme hücrenin çoğalma (proliferasyon) mekanizmasının aynısı değildir. Her ne kadar ikisi de hücre bölünmesi olsa da hücre çoğalması tüm kök ve öncü hücreler için kullanılan genel bir hücre bölünmesi biçimidir ve kavram olarak kendini yenilemeyi de kapsar. Kendini yenilemede bölünmeden sonra ortaya çıkan yavru hücrelerden en azından birisinin gelişim yetkinliği açısından bölünme öncesindeki hücreye benzemesi gerekir.

Kendini yenilemek kök hücrelerin sürekli gerçekleştirdiği bir davranış olmayabilir. Örneğin, radyasyona tutulan farede art arda yapılan nakillerde hematopoetik kök hücre (HKH) bölünme etkinliği kazanır, ancak fizyolojik koşullarda HKH çoğunlukla sessizdir. Nöral kök hücreler *in vivo* koşullarda farklılaşmadan önce sınırlı sayıda bölünme geçirirken kültür ortamına alındıklarında çok yoğun olarak kendini yenileme sürecine girerler. Bu saklı kalmış bölünme özelliği doku tamir mekanizması veya yenilenmesi gerektiğinde kök hücrelerin eşsiz hücreler olmalarını sağlar.

Asimetrik hücre bölünmesi (AHB) kendini yenileme ile farklılaşma arasında bir dengenin oluşması için gereken hücre bölünmesi tipidir. Bir başka ifadeyle, AHB sonucunda kök hücre kendini yenileme işlevini yerine getirirken aynı süreçte farklılaşmak üzere bir yavru hücre de üretmiş olur. Böylece, bölünen her kök hücre kendi sayısını, artma ve azalma olmaksızın sabit tutar. AHB' nin moleküler mekanizması farklı canlı türlerindeki kök hücrelerde aydınlatıldıkça bunun son derece korunmuş bir süreç olduğu anlaşılır [120].



**Şekil 2.17.** Kök hücrelerin asimetrik bölünmesi [121].

Kök hücreler, elde edildiği kaynaklarına göre; I) Embriyonik kök hücreler ve II) Erişkin kök hücreleri şeklinde sınıflandırılırken, farkanabilme yeteneklerine göre ise; 1) totipotent (tüm organizmayı oluşturabilen), 2) pluripotent [Her üç germ yaprağı (ektoderm, mezoderm ve endoderm) kökenli tüm dokuları oluşturabilen], 3) multipotent (köken bakımından birbiriyle yakından ilişkili en az 4 farklı hücre tipini oluşturabilen), 4) tripotent (köken bakımından birbiriyle yakından ilişkili en fazla 3 farklı hücre tipini oluşturabilen), 5) bipotent (köken bakımından birbiriyle yakından ilişkili en çok 2 farklı hücre tipini oluşturabilen) ve 6) unipotent ( yalnızca 1 hücre tipini oluşturabilen) kök hücreler şeklinde sınıflandırılır [122, 123].

Pluripotent kök hücreler, kendilerini yenileyebilme yetenekleri olan henüz herhangi bir hücre veya doku soyuna yönlendirilmemiş hücrelerdir. Bu hücrelerin telomeraz aktiviteleri pozitifdir. Pluripotent kök hücreler, her üç germ yaprağına ait herhangi bir somatik hücreye farkanabilirler. Yönlendirilmemiş evrede Octomer- 4 (Oct-4), Telomeraz aktivitesi, CD10, Stage specific antigen-3 (SSEA-3), Carcinoembriyonik antigen (CEA), Carcinoembriyonik antigen cell adhesion molecule-1 (CEA-CAM-1) gibi embriyonik fenotip belirteçlerini eksprese ederler. 400 veya daha fazla sayıda ard arda farkanmadan populasyon oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Ayrıca bu hücrelerin ektoderm kökenli 7, mezoderm kökenli 18 ve endoderm kökenli 11 farklı hücre tipine farkanabildikleri de gösterilmiştir [122, 124].

Erişkin kök hücreler, farkanacakları hücre soyu yönünde yönlendirilmiş hücreler olup bölünme, çoğalma ve farkanma yetenekleri mevcuttur. Aynı zamanda kendilerini yenileme yetenekleri de vardır. Multipotent, tripotent, bipotent veya unipotent özellikli hücreler olup kısmen farklılaşmışlardır. Yaşamları boyunca 50-70 defa farkanmadan populasyon oluşturabilirler. Bu hücreler oluşturacakları doku veya hücreye ilişkin spesifik belirteçlerden bazılarını eksprese ederler [122, 124].

Erişkinde kemik iliği stromal hücreleri veya mezenkimal projenitör hücreler olarak ta bilinen mezenkimal kök hücreleri (MKH) kendini yenileyebilen multipotent projenitör hücrelerdir ve birkaç farklı mezenkimal soylara farkanabilme özelliğine sahiptirler [125-127]. Bugüne kadar, birçok farklı omurgalı türüne ait MKH'nin kemik, kıkırdak, yağ, tendon ve kas dokuları gibi dokularda yer alan türe özgü hücrelere farkanabildiği gösterilmiştir [105, 128, 129]. Ek olarak, bu hücrelerin hepatik, renal, kardiyak ve nöral hücreler gibi diğer bazı hücrelere de farkanabildikleri belirtilmektedir [130-134]. Bu yüzden, bu hücreler bazen multipotent bazen de pluripotent kök hücreler şeklinde de tanımlanabilmektedir [135].

MKH'nin in vitro kültürü çalışmaları göstermiştir ki, bu hücreler CD10, SH2(CD105), SH3, SH4(CD73) , SB10 ve Stro-1 gibi kendilerine özgü hücre yüzeyi antijenleri ve peptidlerine sahiptirler. Ayrıca bu hücrelerin CD49, CD54, CD90(THY-1), CD102, CD 121a,b, CD123, CD124 ve CD166 gibi diğer adhezyon molekülleri ve büyüme (growth) faktör/sitokin reseptörlerini de eksprese ettikleri de vurgulanmıştır [136, 137].

Diğer taraftan, bu hücreler endotel hücrelerine özgü CD31, monositler/makrofajlara (CD14), lenfositler (CD11a/LFA-1), lökositler(CD45), eritrositler (glycophorin A) ve diğer hematopoietik hücrelere özgü CD3, CD14, CD19, CD34, CD38 ve CD66b gibi hücre belirteçlerini eksprese etmemektedirler [135, 138]. Alsalameh ve arkadaşlarının erişkin insan eklem kıkırdağı ve kemik iliğinde yaptıkları bir çalışmada; eklem kıkırdağından ve kemik iliğinden izole ettikleri bazı hücrelerin CD105 ve CD166 gibi hücre yüzeyi belirteçlerini birlikte eksprese ettiklerini ve bu hücrelerin *in vitro* ortamda adipogenez, kondrogenez veya osteogenez yönünde farklılabildiklerini dolayısıyla bu hücrelerin multipotent özelliği olan projenitör hücreler olabileceğini, ayrıca bu hücrelerin eklem kıkırdağından izole edilen tüm hücrelerin yaklaşık %4' ünü oluşturduklarını belirtmişlerdir [139, 140].

### **2.13. Eklem Kıkırdağında Var Olduğu Düşünülen Projenitör Hücreler**

Eklem kıkırdağı gelişimi ve büyümesi ile ilgili daha önce yapılan çalışmalarda, eklem kıkırdağının eklem yüzeyinden sekonder kemikleşme merkezine doğru aposizyonla (yüzeyden derin tabakalara doğru hücre eklenmesi) büyüdüğü ve bu olayın eklem yüzey kondrositlerinin proliferasyonu ile gerçekleştirildiği gösterilmiştir [30, 141]. Araştırmacılar bu süreçte, hücre bölünmesi ve farklılaşma kontrolü ile kök hücrelerin yüzeyde ya da yüzeye yakın bölgelerde olabileceği hipotezini ortaya atmışlardır. *M. Domestica* ile yapılan ilk çalışmalarda arka ekstremite eklem bölgesine bromodeoxyuridine enjeksiyonu yapılarak eklem kıkırdağı gelişimi, hücre proliferasyonu takibi ile incelenmeye çalışılmıştır [141]. İlk enjeksiyondan sonra kıkırdak dokuda birçok hücre işaretlenmiş, fakat tekrarlanan enjeksiyonlardan sonra eklem kıkırdağı yüzeyel bölgesinde küçük bir hücre kümesi belirlenmiştir. Bu işaretlenen hücreler ile ilgili olarak birçok açıklama yapılabilir, öncelikle araştırmacıların öngördükleri düşünce, kök hücre adayları bu hücreler uzatılmış hücre siklusuna dahil oldukları için ancak birkaç enjeksiyondan sonra belirlenebilmişlerdir şeklindedir [142]. Archer ve ark. ilk kez 1999 yılında, 7 aylık sığır eklem kıkırdağı yüzeyel zonunda kolon oluşturabilen hücrelerin seçimini gerçekleştirmişler ve bu hücrelerin derin zonlarda bulunmadığını göstermişlerdir. Aynı grup, 2004 yılında, 7 günlük sığır Metakarpofalangeal eklem yüzeyinden kök hücre izolasyonu yaparak bu hücrelerin kısmi karakterizasyonlarını içeren bir rapor yayınlamışlardır [143]. Bu çalışmanın temelini Jones ve Watt'ın yapmış olduğu insan epidermal kök hücreleri araştırması oluşturmaktadır [144]. Bu araştırmaya göre epidermis iki tip hücre içermektedir. Bu hücrelerden birinin kök hücre, diğerinin ise kendini yenileyebilme kapasitesi daha düşük ve terminal diferansiyasyona daha yatkın hücre tipi olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada, kök hücrelerin yüzeyel integrin ekspresyonlarının çok yüksek olduğu, bu nedenle fibronektin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerine hızlı bir şekilde tutunabildikleri, bir hücreden ardışık olarak beş defa bölünmeyle en az 32 hücreli koloni oluşturabilme yeteneklerinin (Colony forming efficiency, CFE) diğer hücrelere oranla 4 kat daha yüksek olduğu ve bu yeteneklerinden yararlanarak *in vitro* ortamda %90 saflıkla izolasyonlarının yapılabileceği vurgulanmıştır. Derideki kök hücreleri tanımlayıp, izole etme esasına dayanan bu uygulamaları (Jones

and Watt, 1993) temel alarak, 2004 yılında [143] *in vitro* ortam olarak fibronektini kullanarak, izole ettikleri tam olgunlaşmamış immatür buzağı eklem kıkırdağı kondrositlerinin kültürasyonunu yapmışlardır. Bu çalışmalarda fibronektinin seçilme sebebi, özellikle immatür eklem kıkırdağı yüzeyel hücrelerin ürettiği hücresel fibronektinin ekstrasellüler domeyni olan A izoformunun (fibronektinin EDA izoformu) eklem yüzeyinin matriksi içinde fazla miktarda dağılım göstermesidir [145, 146]. Archer ve grubunun yaptığı daha sonraki çalışmalarda; *in vitro* kültür ortamında integrin  $\beta 1\alpha 5$  düzeyi yüksek olan bir grup eklem yüzeyi kondrositlerinin fibronektine karşı yüksek afinite gösterdiği ve bu hücrelerin koloni oluşturma eğilimine sahip olduğu belirtilmiştir. Buna ilaveten bu grubunun diğer çalışmalarda, bu kondrositlerden farklı bir şekilde Notch ve onun ligandları gibi hücre kaderini belirleyici proteinlerin çoğunu da eksprese ettiği gösterilmiştir [143, 147, 148].

Diaz-Romero ve arkadaşlarının 2005 yılında insan eklem kıkırdağı ile yaptıkları bir çalışmada ise, eklem kıkırdağı hücreleri izole edilmiş ardından kültüre edilerek değişik fenotipik belirteçleri incelenmiştir [149]. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, eklem kıkırdağı hücreleri kültüre edilmesiyle birlikte bu hücrelerin dedifferansiye olarak fibroblast benzeri hücrelere dönüştükleri ardından da proliferatif bir özellik kazandıkları belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmada hücrelerin kültürasyon süresinin artışıyla birlikte CD10, CD90, CD105 ve CD166 gibi bazı MKH markerlerini artan bir oranda eksprese ettikleri de vurgulanmıştır. Sözü edilen bu markerleri pozitif gösteren bu hücrelerin potansiyel MKH'ler olabileceğini belirtmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada, olgunlaşmamış sığır metakarpofalangeal eklem bölgesinden yine fibronektin adhezyon yöntemi ile elde edilen kondroprojenitör hücrelerin, telomer uzunlukları, benzer PD'ye ( $P < 0.05$ ) sahip olan geri farklı kondrositlerden daha uzun olduğu tesbit edilmiştir. Bunun yanısıra kondroprojenitörlerin telomeraz aktivitesinin 2.6 kat daha fazla olduğu da belirlenmiştir. 3D pellet kültürlerinde kıkırdağa yönlendirme deneylerinde SOX9, Notch-1, agrekan ifadelerinin olduğu da gözlenmiştir [150].

#### **2.14. Eklem Kıkırdağı Dokusuna Ait Kök Hücrelerin Özellikleri**

Eklem kıkırdağından izole edilen koloni oluşturabilen hücreler plastiğe yapışabilme özellikleri, hücre yüzey belirteçleri eksprese etmeleri (CD105, CD73 ve CD90), hematopoetik hücre yüzey antijenlerini eksprese etmemeleri (CD34 ve CD45) ve osteoblast, adiposit veya kondroblast gibi multipotent farklılaşma yeteneklerine sahip oldukları için mezenkimal kök hücreler olarak sınıflandırılmaktadırlar [143, 151-153].

Kritik olarak, tamir ve rejenerasyon açısından, deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda, eklem kıkırdağı-kökenli kök hücreler kondrojenik medyum içerisinde yüksek yoğunlukta pellet kültürü oluşturulduğunda terminal farklılaşma geçirmezler ve kalıcı kıkırdağ özelliğini kaybetmeden korurlar [153]. Buna karşın, benzer yöntem kullanılarak, kemik iliği kökenli

stromal hücrelerde transkripsiyon faktörü Runx2 ve yüksek düzeyde kollajen tip X ve matrilin-1 ekspresyonu gözlenmiştir [153]. Eklem kıkırdağı kökenli hücreler, kemik iliği kaynaklı MKH'lere işlevsel olarak eşdeğer görülmesinin yanı sıra, farklılaşma potansiyelleri, hipertrofi ve mineralizasyon yetenekleri sınırlı olduğu belirlenmiştir.

### 2.15. Hipotez

Konu ile ilişkili çalışmalar incelendiğinde, eklem kıkırdağı tedavi süreçleri için çok farklı yöntem ve hücre kaynağı arayışlarının süregeldiği görülmektedir. Doku mühendisliği çalışmalarında dikkat çeken nokta erişkin kök hücrelerin potansiyelleridir. Eklem kıkırdağı yapısında bulunduğu öne sürülen kök/kondroprojenitör hücrelerin bazı MKH spesifik belirteçleri eksprese ettikleri bilinmektedir. Fakat bu belirteçlerin, kondrosit kültür hattındaki kültürasyona bağlı olarak mı ekspre olmaya başladıkları konusunda, kondroprojenitörler ile karşılaştırmalı detaylı bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Bu projedeki hipotezimiz: İnsan eklem kıkırdağı tedavi sürecinde kullanılmak üzere, eklem kıkırdağında bulunan kondroprogenitor/kök hücrelerin, kondrosit kültür hattı hücrelerine göre *in vitro* koşullarda eklem kıkırdağı yapısını tekrar oluşturabilmesi açısından daha iyi sonuçlar elde etmemizi sağlayabilir. Bu çalışmada amacımız, günümüzde uygulanan yöntemlerde kullanılan kondrosit kültür hattı ile, seçimi yapılan ve kondroprogenitor/kök hücre özelliği taşıdığı düşünülen hücreleri kök hücre belirteci olarak kabul edilen CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 ekspresyon düzeyleri göz önünde tutularak Flow sitometrik, İmmünofloresan yöntemlerle incelemek ve Ultrastrüktürel yöntemlerle kıyaslamak, bunun yanısıra bu iki farklı hücre grubunda *in vitro* ortamda kondrogenezi, adipogenezi ve osteogenezi indükleyerek oluşturulan pelletlerde rutin boyalar ile karşılaştırmalarını yaparak farklarını oraya koyabilmektir.

## GEREÇ VEYÖNTEM

### 3.1. Kıkırdak Örneğlerinin Eldesi

Bu çalışma, 20-40 yaşları arasında toplam 6 adet insana (n:6) ait eklem kıkırdağı örneklerinde yürütüldü. Örnekler, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalında kıkırdak dışında diz patolojisi olan (menisküs veya çapraz bağ lezyonu ) ve bu nedenle atroskopik cerrahi gereken hastaların kendilerinden biyopsi temini için izin alınmasını takiben femurlarının yüklenme bölgesi dışındaki distal uçlarından 0,3 X 0,3 cm boyutlarında kıkırdak biyopsileri şeklinde temin edildi.

### 3.2. Kıkırdak Dokusundan Hücre İzolasyonu, Kültürasyonu, Koloni Seçimi (Fibronektin Adhezyon Testi) ve Kültürü (n: 6)

Öncelikle hücre izolasyonu için, elde edilen eklem kıkırdağı örnekleri, Pronaz içeren (70 U ml<sup>-1</sup>, 3 saat 37 C°) (DMEM/ F12,HEPES, Gentamisin) solüsyona alındı ve parafilm ile ağız iyice kapatıldıktan 37 °C'de 3 saat çalkalayıcıda döndürüldü. 3. saatin sonunda tüplerden pronaz uzaklaştırıldı ve önceden filtre edilmiş (300 U ml<sup>-1</sup>, gece boyu 37 °C ) kollajenaz içeren (DMEM/ F12,HEPES, Gentamisin, %5 fetal buzağı serumu) solüsyona alınarak tüplerin etrafı tekrar parafilm ile kaplandı, tekrar 37 °C'de çalkalayıcıda bir gece döndürüldü.

Bu işlemlerin yanı sıra fibronektin adhezyon testlerini uygulayabilmek için petri kablari ekimden bir gece önce fibronektin ile kaplandı. Bu işlem için 1:1000 oranında fibronektin solüsyonu (PBS, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, fibronektin) hazırlandı. Petri kablariına 1.5 ml olacak şekilde süspansiyondan eklenerek bir gece boyunca +4 C°'de saklandı.

Ertesi sabah kollajenaz ve hücreleri içeren tüpler 40µm'lik Falcon marka cell strainer (hücre eleği) ile 50 ml' lik tüplere steril bir şekilde süzüldü. Hücre süspansiyonu 2000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi ve hücrelerin dibe çökmesi sağlandı. Dikkatli bir şekilde medyum uzaklaştırıldıktan sonra tüplere 5 veya 10 ml SFM (Serum Free Media) eklendi ve iyi bir şekilde karıştırıldı. Her bir tüpten 10µl numune alınarak ependorf tüplerine konuldu ve 1:10 oranında SFM ile dilüe edildi. Dilue edilen her bir tüpten 10µl alınarak hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımından sonra kondrosit kültür hattı ve fibronektin adhezyon testi uygulaması ile klonal seçimin yapılabilmesi için ayrı ayrı ekimleri gerçekleştirildi. Kondrosit kültür hattı için

petri kabına ekim yapıldı ve uygun medya içerisinde kültürasyonu gerçekleştirildi. Koloni seçimi için ise, her bir fibronektin kaplı petri kabında 4000 hücre olacak şekilde ekim yapılarak 20 dakika 37 C°de inkübasyonları sağlandı. Daha sonra medyum uzaklaştırıldı ve taze medyum [Penicillin 10000 mg ml<sup>-1</sup>/Streptomisin 10000 U ml<sup>-1</sup>, 0.1 mM askorbik asit, 0.5 mg ml<sup>-1</sup> L- glukoz, 100 mM HEPES, 1 mM sodyum piruvat, 2 mM L-glutamin and 10% fetal bovine serum (FBS)] eklenerek yapışan hücreler için medyum yenilendi ve 3., 6., 10. günlerde 32 hücreden fazla sayıda hücre içeren koloniler sayıldı. 32 hücreden fazla hücre içeren koloniler kondroprogenitor/kök hücre kolonileri olarak değerlendirildi. Kondroprogenitor/kök hücre kolonisi olarak kabul edilen hücre toplulukları daha sonra işaretlenip, koloni seçme silindiri içerisinde tripsinizasyon işlemini takiben içerisinde kültür medyumunu içeren 24 gözenekli kültür kaplarına alınarak çoğalmaya bırakıldı.

### **3.3. Kültürü Yapılan Hücre Süspansiyonlarında (Kondrosit Kültür Hattı ve Koloni Hücre Hattı) CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 Ekspresyonlarının Flow Sitometrik Yöntem ile Belirlenmesi (n:6)**

Bu bölümde, eklem kırırdağından izole edilip kültürü gerçekleştirilen kondrosit kültür hattı ve koloni hücre hatlarının 3. pasajını takiben, kök hücre belirteçleri olan CD90 (Ab11155, Abcam), STRO-1 (MAB1038, R&D Systems), CD105 (Ab53318, Abcam), CD166 (393-050, AnceLL) kompozisyonları, Flow sitometrik yöntemle araştırıldı.

Bu amaç için, kondrosit kültür hattı ve koloni hücre hattı, belirlenen süre sonunda hücrelerin tripsinizasyonu gerçekleştirilerek hücreler flask yüzeyinden kaldırıldı ve uygun solüsyon (DMEM+%10 FCS) içerisinde hücre süspansiyonu haline getirildi. Daha sonra hücre süspansiyonu ependorf tüplerine bölünerek yıkama işlemleri gerçekleştirildi. İlk basamak olarak her bir ependorf tüpüne primer antikolar (1:100) eklendi. 30 dakika +4 °C karanlık ortamda inkübasyonu sağlandı. İnkübasyondan sonra 7000 rpm'de 90 sn santrifü edildi. İşaretli olmayan primer için süpernatant uzaklaştırılarak sekonder antikor (1:100) eklendi. Sekonder antikolarlarla birlikte 20 dakika +4 °C karanlık ortamda inkübe edilerek ardından tekrar yıkama aşamaları uygulandı. En son aşama olarak süpernatant uzaklaştırıldı ve 600 µl yıkama solüsyonu ile birlikte inceleme süreci için flow tüplerine aktarıldı ve Fluorescence-activated cell sorting cihazı (FACS) ile incelemeler yapıldı. Böylelikle elde edilen hücre hatlarının, çalışılan kök hücre belirteçlerini hangi oranlarda eksprese ettiği ve kök hücre profilinin hangi oranda olduğu açıklığa kavuşturulmaya çalışıldı.



### **3.4. Kültürü Yapılan Hücre Hatlarında (Kondrosit Kültür Hattı ve Koloni Hücre Hattı), CD90, STRO-1, CD105 ve CD166**

#### **Ekspresyonlarının İmmünofloresan Yöntemi ile İncelenmesi (n:6)**

Bu parametre için, seçilerek elde edilen kondrosit kültür hattı ve koloni hattı hücreleri, gözenekli kültür lamalarına ekildi, belirli bir kültürasyon süresinden sonra PBS ile kısa süreyle yıkandı, %95'lik soğuk ethanol ile 10 dakika fikse edildi, PBS ile yıkandı (3X10 dakika), PBS ile dilue edilmiş CD90 (sc-9163), STRO-1 (MAB1038), CD105 (sc-20632), CD166 (sc-8548) primer antibodileri (2µg/ ml ) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi sabah PBS ile yıkamadan sonra, 1/200 oranında dilüe edilmiş işaretlenmiş uygun sekonder (Vector) antikorlar ile 30 dakika inkübe edildi. Vectashield mounting medium (Vector) ile kapatıldı ve flüoresan mikroskobu (Olympus BX61) ile incelenerek fotoğraflandırdı.

### **3.5. Kültürü Yapılan Hücre Hatlarından (Kondrosit Kültür Hattı ve Koloni Hücre Hattı), Hücre Pelletlerinin Oluşturulması, Kondrogenz, Adipogenez ve Osteogenez'e Yönlendirilmesi (n:6)**

Kondrosit ve koloni oluşturan hücre kültürlerinde yeteri kadar hücre çoğaltıldıktan sonra kondrogenz, adipogenez ve osteogenez' e yönlendirilmeye çalışıldı. Böylelikle, elde edilen kondrosit kültür hattı ve koloni oluşturan kültür hücrelerinin 3 farklı doku tipine farklanıp farklanamadıkları test edilmeye çalışıldı.

#### **3.5.1. Kondrogenz (n:6)**

Hücreler, sırasıyla 24 gözenekli kültür kapları, 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklar ve 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara transfer edilerek, %80 konfluent oluncaya kadar çoğaltıldı, sonrasında da 0.5 X 10<sup>6</sup> oranındaki hücre miktarı, içerisinde HEPES, gentamisin, L-proline, insulin transferrin selenium (ITS) ve pirüvat ile supplemente edilmiş düşük glukoz DMEM'den oluşan medyum ile sodium pyruvate (1 mM), ascorbate 2 – phosphate (37,5 µg/ml), dexamethasone (10<sup>-8</sup> M) ve recombinant human TGFβ1 (10 ng/ml) içeren kondrogenz medyum'lu 1,5 ml'lik ependorf tüplerine alındı, 2000 devirde 10 dakika süreyle santrifüj edildi ve %5 oranında CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik ortamda kültüre edildi. Kültürler her 2-3 günde bir taze medyum ile beslendi. 3 haftalık kültürasyon sonunda pelletler PBS ile yıkandıktan sonra tamponlanmış nötral formalin ile fikse edildi, parafin ile bloklandı, 5-6 µm kalınlığındaki parafin kesitler alındı, alınan kesitlere Alsiyan mavisini histokimyasal boyası uygulanarak ışık mikroskobu (Axioplan Zeiss, Almanya) ile fotoğraflandırdı.

### 3.5.2. Adipogenez (n: 6)

Hücreler %10 oranında FBS içeren Dulbecco' Modified Eagle medyumunu içerisinde %80 konfluent oluncaya kadar çoğaltıldıktan sonra, serum içermeyen medyum (Serum free medium, SFM) ile yıkandı, tripsinizasyon işleminden sonra hücreler kaldırılarak hemositometri ile sayımları yapıldı. Her bir ependorf tüpünde  $0.5 \times 10^6$  hücre olacak şekilde hesaplamalar yapılarak 1,5 ml'lik ependorf tüplerine alındı, 2000 devirde 10 dakika süreyle santrifüj edildi uygun medyum içerisinde (Adipogenez medyumunu, 500  $\mu$ M methylisobutylxanthine, 1  $\mu$ M dexamethasone, 60  $\mu$ M indomethacin ve 5  $\mu$ g/ml insülin) kültürasyonları (%5 CO<sub>2</sub>, 37°C) gerçekleştirildi. 3 hafta boyunca belirli aralıklarla medyum değişikliği yapıldı. Kültürasyonun 3. haftası sonrası, pellet kültürleri direkt kültür ortamından alınarak dondurma kesitlerin alınabilmesi için kriyomatriks içerisinde gömüldü. Kroystat ile kesitler elde edildikten sonra öncelikle havada kurumaları sağlandı. Daha sonra formalin ile fiksasyon işlemi gerçekleştirilerek, 1-10 dak akan su altında yıkama işlemi gerçekleştirildi. İlk olarak %60 isopropanol içerisinde alındı. Daha sonra %60 isopropanol ile hazırlanmış % 0,3 'lük oil red O ile 15 dakika boyandı. Boyama işleminden sonra tekrar %60 isopropanol içerisinde alındı. Distile su ile yıkanarak, su bazlı bir kapatıcı ile kapatıldı. Boyanmış lipid vakuolü içeren hücreler, mikroskopik (Axioplan Zeiss, Almanya) inceleme sonrası belirlendi.

### 3.5.3 Osteogenez (n:6)

Hücreler, sırasıyla 24 gözenekli kültür kapları, 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklar ve 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara transfer edilecek, %80 konfluent oluncaya kadar çoğaltıldı, sonrasında da  $0.5 \times 10^6$  oranındaki hücre miktarı, içerisinde , DMEM, %10 FBS ve osteogenik supplementler ( 100 nM dexamethasone, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate ve 0,05 mM L-ascorbic acid 2- phosphate ) içeren osteogenez medyum'lu 1,5 ml'lik ependorf tüplerine alındı, 2000 devirde 10 dakika süreyle santrifüj edildi ve %5 oranında CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik ortamda kültüre edildi. Kültürler her 2-3 günde bir taze medyum ile beslendi. 3 haftalık kültürasyon sonunda pelletler PBS ile yıkandıktan sonra tamponlanmış nötral formalin ile fikse edildi, parafin ile bloklandı, 5-6  $\mu$ m kalınlığındaki parafin kesitler alındı, kesitlerdeki kalsiyum içeriği Alizarin Red boyaması ile histokimyasal olarak belirlendi (Axioplan Zeiss, Almanya) ve fotoğraflandırıldı.

### **3.6. Kültürü Yapılan Hücre Hatlarının (Kondrosit Kültür Hattı ve Koloni Hücre Hattı) Ultrastrüktürel (Transmisyon Elektron Mikroskopu) Yöntem ile İncelenmesi (n:6)**

Öncelikle medyum içerisinde serbest halde bulunan hücrelerin TEM ile incelenebilmesi için fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücre hatları, serum içermeyen medyum (Serum free medium, SFM) ile yıkandı, tripsinizasyon işleminden sonra hücreler kaldırılarak hemositometri ile sayımları yapıldı. Ardından ependorf tüpleri içerisinde,  $0.5 \times 10^6$  hücre olacak şekilde hücreler bölündü. Hücreler kendi medyumları içerisinde 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı ve 0,1 M Kakodilat tampon ilave edildi ve süspanse olan hücreler tekrar 1000 rpm'de 5 dak santrifüj edildi. Tekrar solüsyon uzaklaştırılarak, %2.5'lik gluteraldehit ilave edilerek, resüspanse edilen hücreler 20 dak oda ısısında bekletildi. Fikse olan hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 0.1 M kakodilat tampon ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Hücre yıkama işleminden sonra 1000 rpm'de 5 dak santrifüj edildi. Bu şekilde fiksatif sağlıklı bir şekilde uzaklaştırılmış oldu. Ardından postfiksasyon için hücreler %1'lik Osmiyum tetraoksit ( $OsO_4$ ) ile resüspanse edildi ve 1 saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonunda 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Solüsyon uzaklaştırıldı ve 0.2 M Kakodilat tampon ile 3 kez 5 dakika yıkama işlemi gerçekleştirildi ( $OsO_4$  fikasyonundan sonra örnekler +4 derecede 0.2 M Kakodilat tamponunda birkaç gün saklanabilir). Hücreler yıkama işleminden sonra 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve solüsyon uzaklaştırıldı. Ardından hücreler %2'lik agar gömüldü. Agar gömme işlemine 2 dakika kala hazırlandı ve sıcak olarak eklendi. Agar eklenir eklenmez 3500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra agarın tamamen donduğu gözlemlendi ve ependorflar içerisinde agar nazik bir şekilde çıkarıldı. Bu aşamada hücrelerin zarar görmemesi çok önemli. Hücrelerin bulunduğu alanlar kesilerek fazla agar uzaklaştırıldı ve hücre-agar örneği yaklaşık  $1mm^3$ 'lük parçalara ayrıldı. TEM takibi için örnekler cam şişelere alındı. Sırası ile %30, %50 ve %70'lik etanol serilerinden 2'şer kez 10 dakika olmak üzere muamele edilerek dehidratasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından %70'lik etanol uzaklaştırılarak doymuş uranil asetat solüsyonu eklendi ve 30 dakika oda ısısında inkübasyonu sağlandı. Tekrar %70'lik etanole alındı ve artan etanol serilerinden geçirilerek (%85, %95, %100) en son propilen oksite alındı ve 10 dakika bekletildi. Bir sonraki inklüzyon basamağı için sırasıyla, propilen oksit/resin (2:1) 1 saat , propilen oksit/resin (1:1) 1 saat ve propilen oksit/resin (1:2) geceboyu oda ısısında tutuldu. Ertesi gün absolute resin içerisinde alınarak 2 kez 1 saat bekletildi. Kapsüllere absolute resin eklenerek örnekler kapsüllere yerleştirildi. Ve son basamak olarak polimerizasyon için gömülmüş olan örnekler 60 derecede 48 saat inkübe edildi. Kapsüllerden

Çıkarılan rneklerden (Leica Ultracut UCT) 300 nm'lik kalın ve 70 nm'lik ince kesitler 150 meshlik bakır gridlere alınarak, uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlanarak incelemeye hazır hale getirildiler.

### **3.7. İstatistiksel Analiz**

Kondrosit kültür hattı ve koloni kültür hattı hücrelerine ait flow bulguları student t - testi yöntemi ile istatistiksel olarak karşılaştırdı ( $p < 0,05$ ).

Çalışılan belirteçlerin immunoboyanma yoğunlukları, image j programı ile analiz edilip, istatistiksel olarak karşılaştırmaları student-t testi yöntemi ile gerçekleştirildi ( $p < 0,05$ ). Image j programı ile boyanmış olan hücrelerin yoğunlukları belirlenerek yine aynı yazılım ile grafiklelendirilerek şematize edildi.

## BULGULAR

### 4.1. Kıkırdak Dokusundan Hücre İzolasyonu, Kültürasyonu, Koloni Seçimi (Fibronektin Adhezyon Testi) ve Kültürü

İzolasyonu yapıp monolayer kültür ortamına ekilen kondrositler kültürasyonun başlangıcında, yuvarlak görünüm sergilemekteydiler (Şekil 4.1a). Ancak monolayer kültürün 5. gününde, başlangıçta yuvarlak görünümlü olan eklem kıkırdağı kökenli hücrelerin fibroblast benzeri morfoloji sergiledikleri gözlemlendi (Şekil 4.1b). Kültürasyonun 12. gününde, eklem kıkırdağı kökenli hücre gruplarının oluştuğu belirlendi. Bu hücre grupları incelendiğinde, bazı grupların en az 32 ve daha fazla hücre içerdiği gözlenirken, bazı grupların bu hücre sayısına ulaşamadığı görüldü (Şekil 4.1a-d). Literatürde de belirtildiği üzere, en az 32 veya daha fazla hücre içeren gruplar, koloni olarak isimlendirilmektedir (Şekil 4.1d). Monolayer kültür süreci takip edilerek, ilerleyen kültür aşamalarında da hücre morfolojileri kayıt altına alındı (Şekil 4.1e-f).

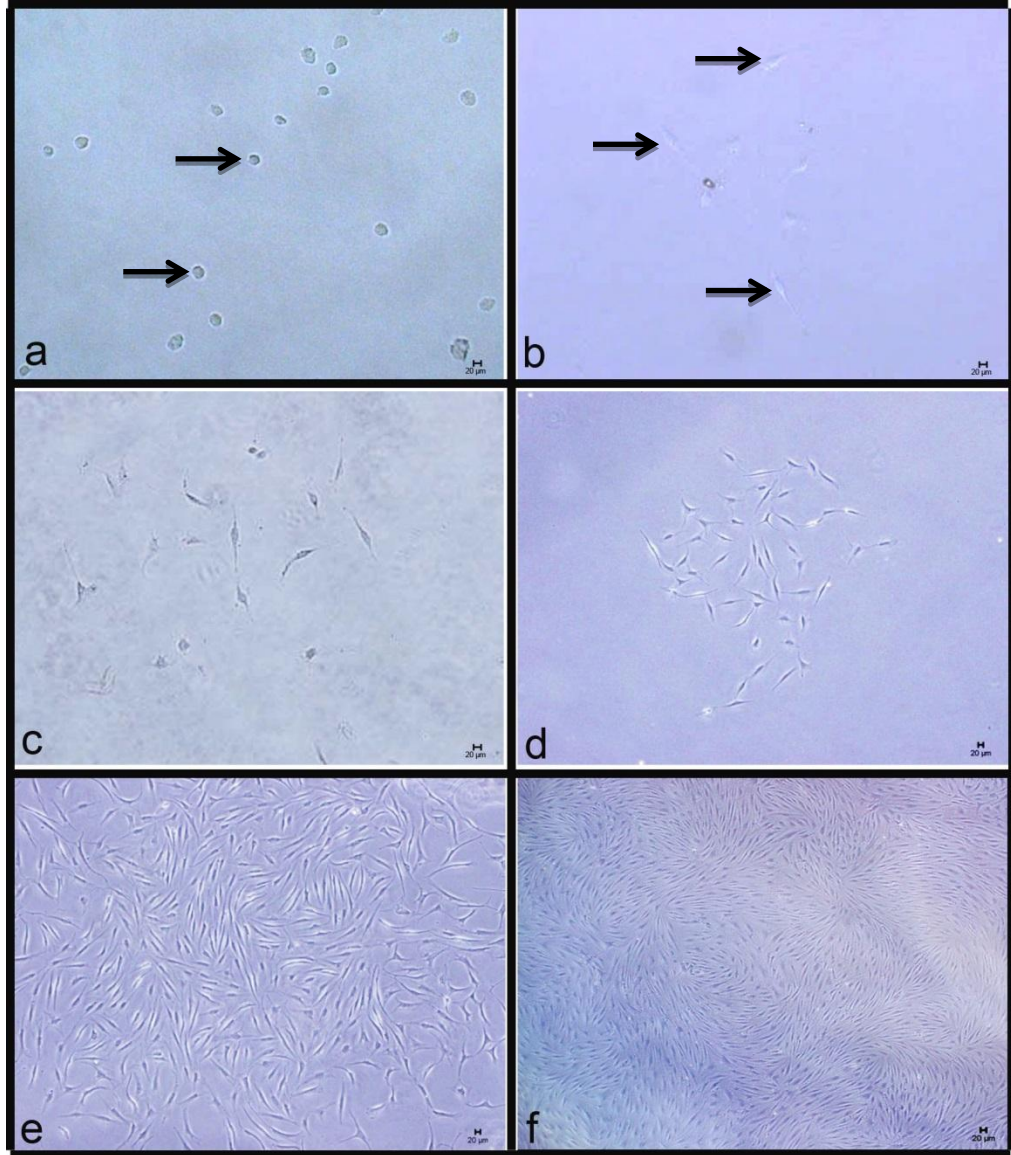
### 4.2. Kültürü Yapılan Hücre Süspansiyonlarında (Kondrosit Kültür Hattı ve Koloni Hücre Hattı), CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 Ekspresyonlarının Flow Sitometrik Yöntem ile Belirlenmesi

#### 4.2.1. Kültürü Yapılan Kondrosit Kültür Hattı Süspansiyonlarında, CD90, STRO-1, CD105, CD166 Ekspresyonlarının Flow Sitometrik Yöntem ile Belirlenmesi

İnsan eklem kıkırdağından izole edildikten sonra 3. pasajdaki kondrosit kültürlerinde, çalışılan proteinleri eksprese eden hücrelerin oranlarını tesbit etmek amacıyla uygulanan flow sitometri metodu sonucunda elde edilen veriler kantitatif olarak değerlendirildi ve Çizelge- 4.1'de özetlendi.

Kondrosit hücre süspansiyonlarında, çalışılan belirteçleri eksprese eden hücrelerin oranları şöyle özetlenebilir;

CD90: %96,2± 2,1; Stro-1: %19,1± 6,6; CD105: %37,4±14,4; CD166: %68,9± 12,1; CD105/CD166: %25,4±18,2. Elde edilen bulgulardan anlaşıldığı gibi, CD90 en yüksek oranda kondrosit kültür hattı tarafından eksprese edilmekte idi (Çizelge – 4.1; Şekil 4.2a; Şekil 4.2c; Şekil 4.2e; Şekil 4.2g).



**Şekil 4.1.** Eklem kıkırdağı dokusundan izole edilerek kültüre edilen hücrelerin morfolojik görüntüleri. **a:** İzolasyondan hemen sonra tek tabaka kültür ortamına ekilen yuvarlak görümlü, çevrelerinde territorial matriksleri bulunmayan kondrositler (oklarla). **b:** Tek tabaka kültürün 5. günündeki fibroblast benzeri hücre morfolojisi (oklarla). **c:** Tek tabakalı kültürde 32 sayısına ulaşamamış koloni oluşturamayan hücreler gözlenmektedir. **d:** Tek tabakalı kültürde en az 32 sayısına ulaşmış koloni oluşturan hücreler gözlenmektedir. **e:** Tek tabaka kültürü 20. gün. **d:** Tek tabaka kültürün ilerleyen süreçteki görüntüsü.

#### 4.2.2. Kültürü Yapılan Koloni Hücre Hattı Süspansiyonlarında, CD90, STRO-1, CD105, CD166 Ekspresyonlarının Flow Sitometrik Yöntem ile Belirlenmesi

İnsan eklem kıkırdağından izole edilen ve in vitro ortamda kültüre edildikten sonra koloni seçimini takiben koloni oluşturan hücre kültürünün 3. pasajında, çalışılan proteinleri eksprese eden hücrelerin oranlarını tesbit etmek amacıyla uygulanan flow sitometri metodu sonucunda elde edilen veriler kantitatif olarak değerlendirildi ve Çizelge-4.1'de özetlendi;

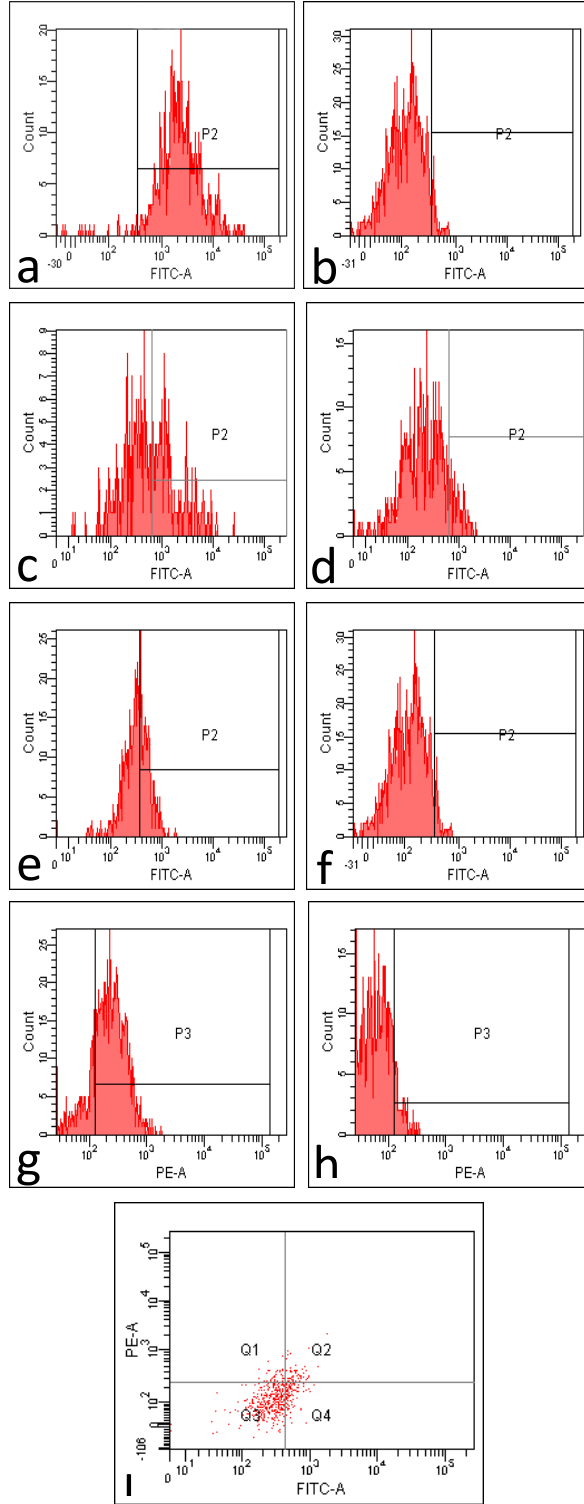
Koloni hücre süspansiyonlarında, çalışılan belirteçleri eksprese eden hücrelerin oranları şöyle özetlenebilir;

CD90: %96,4± 1,4; Stro-1: % 13,4± 3,1; CD105: %42,3±9,8; CD166: %78,4± 5,9; CD105/CD166: %27,3± 10,6. Elde edilen bulgulardan anlaşıldığı gibi, kondrosit kültür hattında olduğu gibi CD90 en yüksek oranda koloni hücre hattı tarafından eksprese edilmekte idi (Çizelge – 4.1; Şekil 4.3a; Şekil 4.3c; Şekil 4.3e; Şekil 4.3f).

Bu bulgulardan anlaşıldığı üzere, kondrosit kültür hattı ve koloni oluşturan hücre kültürlerine ait flow bulguları Student t - testi yöntemi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; iki grup arasında, kök hücre belirteci eksprese eden hücre yüzdeleri açısından istatistiksel bir farkın olmadığı belirlendi ( $p < 0,05$ ).

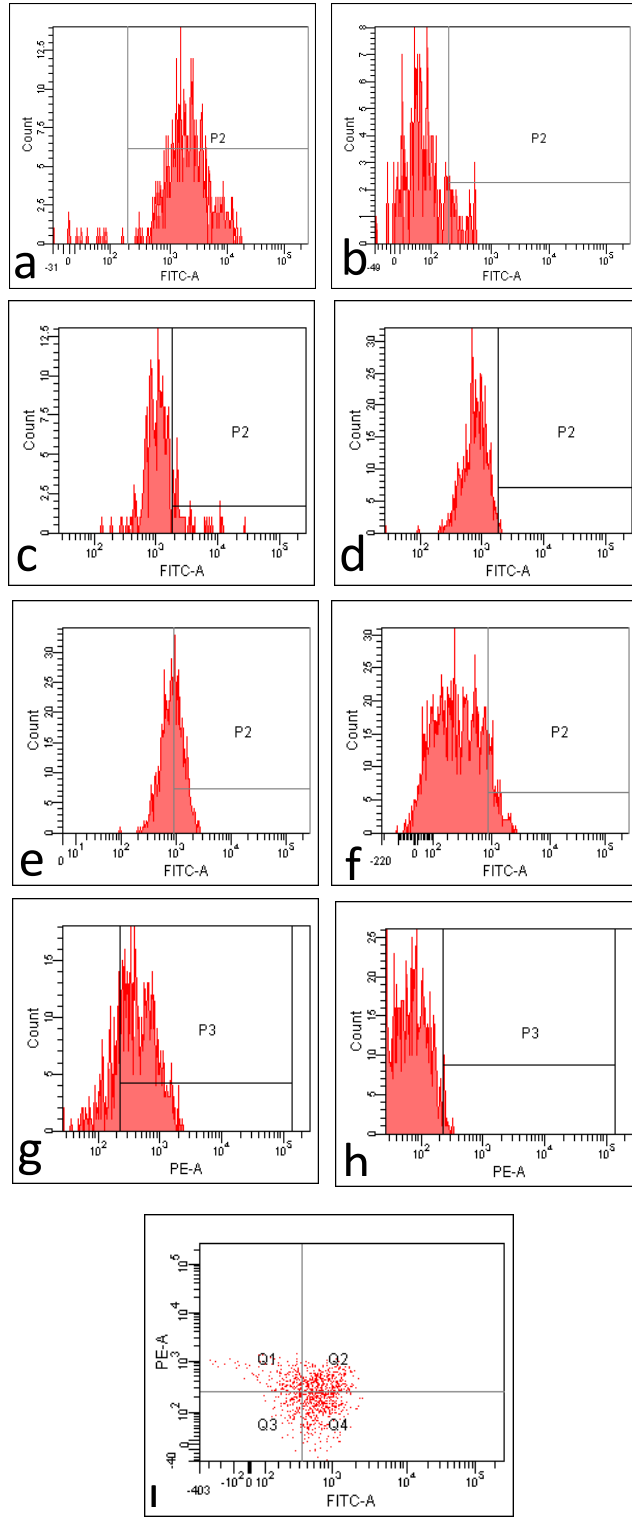
**Çizelge 4.1.** Kondrosit kültür hücre hattı ve koloni hücre hattının flow sitometri metodu sonucu elde edilen verilerin kantitatif olarak değerleri.

Belirteç ismi	Koloni (%)	Kondrosit (%)
<b>CD90</b>	%96,4± 1,4	%96,2± 2,1
<b>Stro-1</b>	% 13,4± 3,1	%19,1± 6,6
<b>CD105</b>	%42,3±9,8	%37,4±14,4
<b>CD166</b>	%78,4± 5,9	%68,9± 12,1
<b>CD15/CD166</b>	%27,3± 10,6	%25,4±18,2



**Şekil 4.2.** Eklem kıkırdağından izole edilip kültürü yapılan kondrosit kültür hattının Flow Sitometrik analizleri. a: CD90; c: STRO-1; e: CD105; g: CD166. Her bir belirteç için kullanılan ilgili izotip kontroller. b: CD90 izotip; d: STRO-1 izotip; f: CD105 izotip; h: CD166 izotip; i: CD105/CD166.





**Şekil 4.3** Eklem kırıkdağından izole edilip kültürü yapılan koloni hücre hattının Flow Sitometrik analizleri. a: CD90; c: STRO-1; e: CD105; g: CD166. Her bir belirteç için kullanılan ilgili izotip kontroller. b: CD90 izotip; d: STRO-1 izotip; f: CD105 izotip; h: CD166 izotip; i: CD105/CD166.

### **4.3. Kültürü Yapılan Hücre Hatlarında (Kondrosit Kültür Hattı ve Koloni Hücre hattı), CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 Ekspresyonlarının İmmünofloresan Yöntemi ile İncelenmesi**

#### **4.3.1 Kültürü Yapılan Kondrosit Kültür Hattında CD90, STRO-1, CD105, CD166 Ekspresyonlarının İmmünofloresan Yöntem ile İncelenmesi:**

Kondrosit kültür hattına ait hücrelerde CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 ekspresyonlarına ait immünoboyanma yoğunluklarının dağılımları semi-kantitatif olarak değerlendirildi ve Çizelge-4.2'de özetlendi.

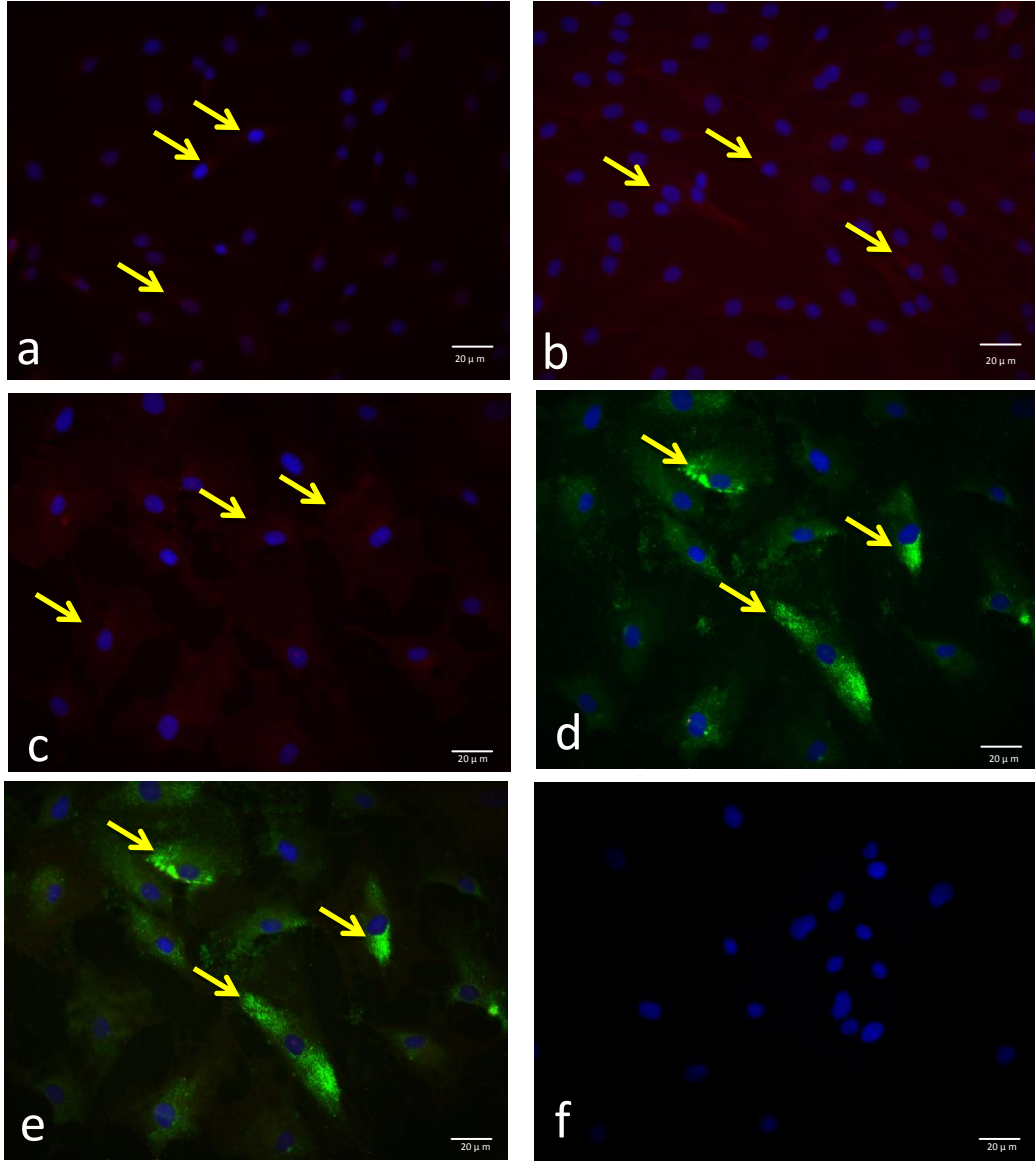
CD90 immünoboyanması, kondrosit kültür hattına ait hücrelerin çoğunluğunda, gözlemlendi. Bu yoğunluk miktarı genel olarak bu hücreler incelendiğinde zayıf pozitif [(+)] olarak belirlendi (Çizelge-4.2; Şekil 4.4a).

STRO-1, immünoboyanması, CD90 immunoboyanmasına göre daha az sayıda hücre tarafından ifade edilirken aynı zamanda reaksiyon şiddeti pozitif [+] olarak belirlendi. (Çizelge-4.2; Şekil 4.4b).

CD105 immünoboyanması, kondrosit kültür hattına ait hücrelerin çoğunluğunda reaksiyon verirken, reaksiyon şiddeti yoğun pozitif [++] olarak belirlendi. İmmünoboyanmalar daha çok sitoplazmik alanlardaydı ( Çizelge-4.2; Şekil 4.4c).

CD166 immünoboyanması, CD105 immunoboyanmasına göre yoğun pozitif [++] olarak değerlendirildi (Çizelge-4.2; Şekil 4.4d). CD105/CD166 immuoboyanması incelendiğinde yine aynı şekilde hücrelerin büyük çoğunluğunda fakat koloni hücrelerine göre daha az reaksiyon verdikleri belirlendi (Çizelge-4.2; Şekil 4.4e).

Çalışılan proteinlere ait negatif kontrol kesitlerinde, hiçbir immunoboyanmaya rastlanmadı (Şekil 4.4f).



**Şekil 4.4.** Kondrosit kültür hattında kök hücre belirteci ekspresyonları (oklar). a: CD90; b: STRO-1; c: CD105; d: CD166; e: CD105/CD166; f: negatif kontrol.

#### 4.3.2. Kültürü Yapılan Koloni Hücre Hattında CD90, STRO-1, CD105, CD166 Ekspresyonlarının İmmüno Floresan Yöntemi ile İncelenmesi:

Koloni oluşturan hücrelerde CD90, STRO-1, CD105 ve CD166, ekspresyonlarına ait immünoboyanma yoğunluklarının dağılımları semi-kantitatif olarak değerlendirildi ve Çizelge-4.2'de özetlendi.

CD90 immüno boyanması, koloni oluşturan hücrelerin çoğunluğunda, gözlemlendi. Bu yoğunluk miktarı bazı hücrelerde yoğun pozitif (Çizelge-4.2; Şekil 4.5a).

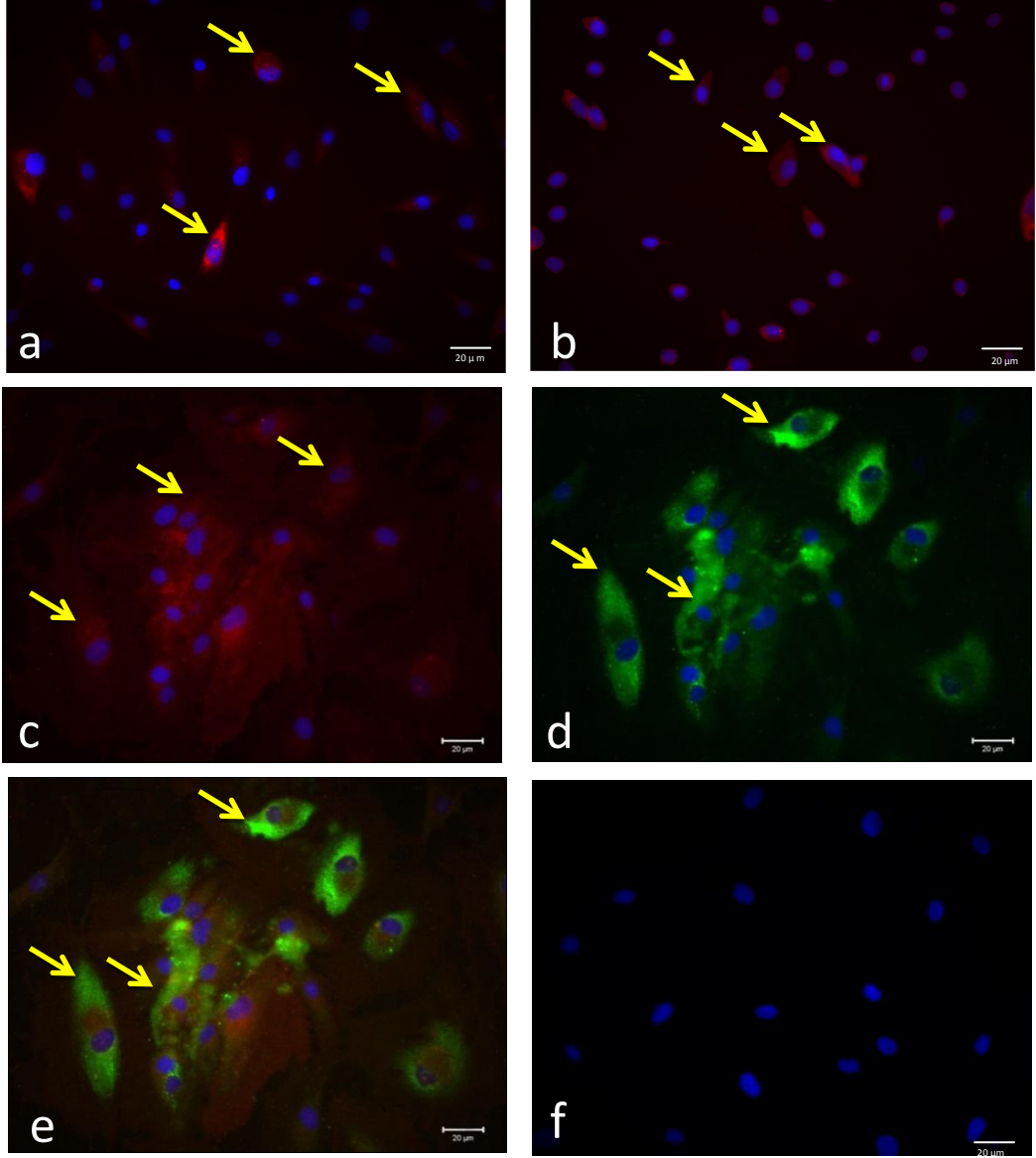
STRO-1, immüno boyanması, CD90 immüno boyanmasına benzerlik göstermekteydi. İmmüno boyanmalar daha çok sitoplazmik alanlardaydı (Çizelge-4.2; Şekil 4.5b).

CD105 immüno boyanması, koloni oluşturan hücrelerin büyük çoğunluğunda gözlemlendi. (Çizelge-4.2; Şekil 4.5c).

CD166 immüno boyanması, CD105 immüno boyanması ile benzerlik göstererek, hücrelerin büyük çoğunluğunda gözlemlendi, (Çizelge-4.2; Şekil 4.5d). CD105/CD166 immüno boyanması incelendiğinde yine aynı şekilde hücrelerin büyük çoğunluğunda immüno boyanma gözlemlendi. Büyük büyütmeelerde, CD105/CD166 immüno boyanmasının hücre gövdelerinde nükleus çevresinde yoğunlaştığı gözlemlendi (Çizelge -4.2; Şekil 4.5e).

Çalışılan proteinlere ait negatif kontrol kesitlerinde, hiçbir immüno boyanmaya rastlanmadı (Şekil 4.5f).

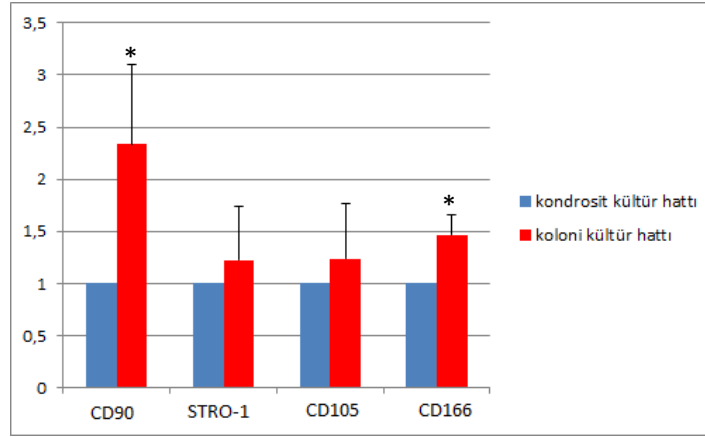
Çalışılan belirteçlerin immüno boyanma yoğunlukları, image j programı ile analiz edilip, istatistiksel olarak karşılaştırılmaları sigma stat programı ile gerçekleştirildi (Şekil 4.6).



**Şekil 4.5.** Koloni hücre hattında kök hücre belirteci ekspresyonları (oklar). a: CD90; b: STRO-1; c: CD105; d: CD166; e: CD105/CD166; f: negatif kontrol.

**Çizelge 4.2.** Kondrosit kültür hattı ve koloni hücre hattı hücrelerinde CD90, STRO-1, CD105 ve CD166, ekspresyonlarına ait immüno boyanmalarınınını semi-kantitatif değerlendirilmeleri. 0:Negatif; (+): Zayıf Pozitif; +:Pozitif; ++: Yoğun pozitif; +++: Çok yoğunpozitif

HÜCRE GRUBU	CD90	<u>Stro-1</u>	<u>CD105</u>	<u>CD166</u>	<u>CD105/CD166</u>
Kondrosit kültür hattı	(+)	++	++	++	++
Koloni hücre hattında	++	+++	+++	+++	+++



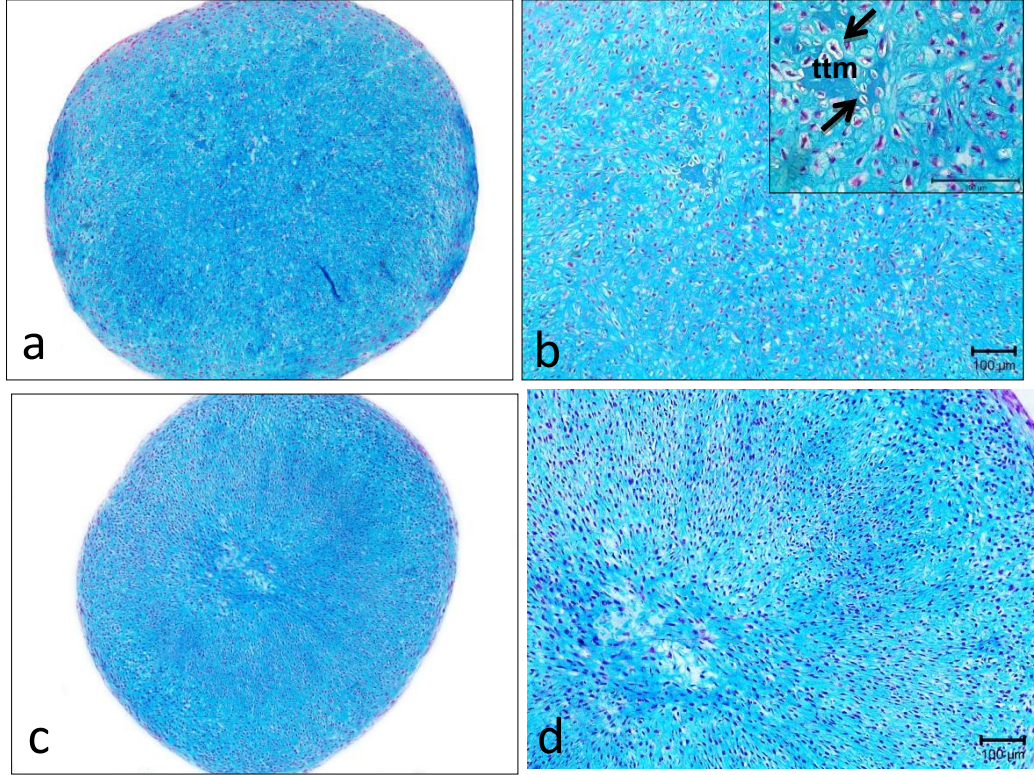
**Şekil 4.6.** Kondrosit ve koloni hücre hattının immüno boyanma yoğunlukları analiz sonuçları (p değeri <0.05 olarak kabul edilmiştir).

#### 4.4. Kültürü Yapılan Hücre Hatlarından (Kondrosit Kültür Hattı ve Koloni Hücre Hattı), Hücre Pelletlerinin Oluşturulması, Kondrogenz, Adipogenez ve Osteogenez'e Yönlendirilmesi

##### 4.4.1. Kondrogenz

Kondrogenz medyumunda içerisinde kondrogenz'e yönlendirilen kondrosit kültür ve koloni oluşturan kültür hücreleri, kondrogenz süreci sonunda Alsiyan mavisi ile boyanarak, kıkırdak matriksinin oluşup oluşmadığı, hücrelerin kıkırdak hücrelerine dönüşüp dönüşmediği morfolojik olarak değerlendirilmeye çalışıldı. Elde edilen pelletlerden kesit alınıp Alsiyan mavisi ile boyandıktan sonra ışık mikroskopu ile incelendiğinde; heriki hücre grubunda da hücre+matriks yerleşimi lakünaların oluşup oluşmadığı ve ekstrasellüler matriks alanlarında teritoryal ve interteritoryal matriks alanlarının oluşması açısından değerlendirildiğinde, kondrogenz olayının

gerçekleştiği, buna rağmen koloni oluşturan hücre grubundan elde edilen kondrogenik dokunun kondrosit kültür hattı hücrelerine oranla daha kötü kalitede olduğu belirlendi (Şekil 4.7).

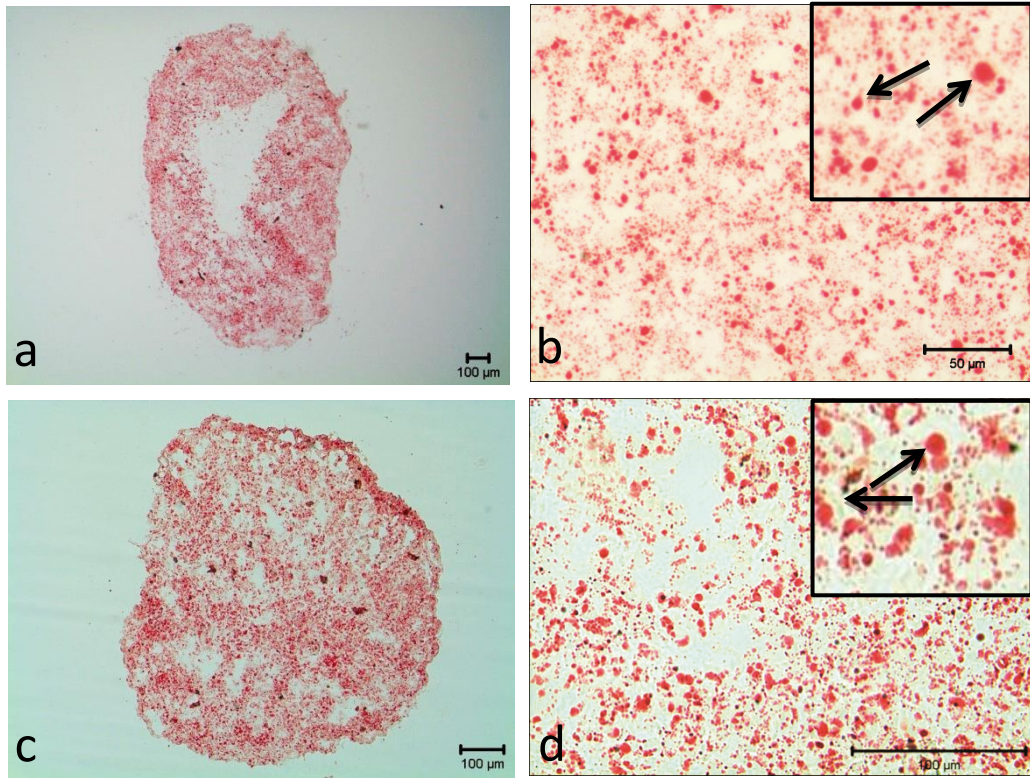


**Şekil4.7.** Alsiyan mavisi ile pozitif boyanan kondrojeneze yönlendirilmiş kondrosit ve koloni hücre pelleti kesitleri. a-b: kondrosit kültür hattı, hücre çekirdekleri hematoxilen ile boyanmış olup, territorial matrikslerinin(ttm) ise Alsiyan mavisi ile pozitif boyanmış ve lakünaları belirginleşmiş (oklarla) optimal kıkırdak dokusu alanlarını da içerdiği gözlenmektedir ; c-d: koloni hücre hattı; hücre çekirdekleri hematoxilen boyaması ile, territorial matrikslerinin(ttm) ise Alsiyan mavisi ile pozitif boyanmış olduğu görülmektedir. Lakünaları belirginleşmemiş ve kondrosit kültür hücrelerine oranla daha kötü görüntüye sahip kıkırdak dokusu oluştuğu gözlenmektedir.



#### 4.4.2. Adipogenez

Adipogenez medyumunda içerisinde, kondrosit ve koloni oluşturan kültür hücrelerinin, adipogenez süreci sonunda yağ dokusunu oluşturup oluşturmadıkları % 0,3 'lük oil red O ile boyanarak, değerlendirmeye çalışıldı. Elde edilen pelletlerden kesit alınıp oil red O ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu incelendiğinde; heriki hücre grubunda da adipogenez olayının gerçekleştiği, buna rağmen koloni oluşturan hücre grubundan elde edilen adipogenik dokunun kondrosit kültür hücrelerine oranla morfolojik açıdan daha iyi kalitede olduğu ve daha belirgin yağ damlalarına sahip olduğu belirlendi (Şekil4.8).



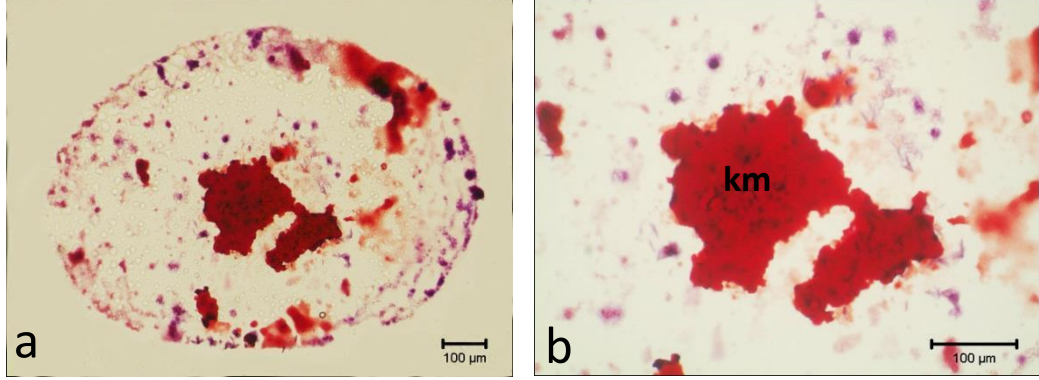
**Şekil 4.8.** Adipogenez'e yönlendirilmiş kondrosit ve koloni hücre pelleti kesitleri. Oil red O boyaması. a-b: kondrosit kültür hattı c-d: koloni hücre hattı, yağ damlacıkları (oklar)

#### 4.4.3. Osteogenez

Osteogenez medyumunda içerisinde osteogenez'e yönlendirilen kondrosit kültür hattı ve koloni oluşturan kültür hücreleri, osteogenez süreci sonunda Alizarin kırmızısı ile boyanarak, kemik matrisinin oluşup oluşmadığı, hücrelerin kemik hücrelerine dönüşüp dönüşmediği morfolojik olarak değerlendirilmeye çalışıldı. Elde edilen pelletlerden kesit alınıp Alizarin



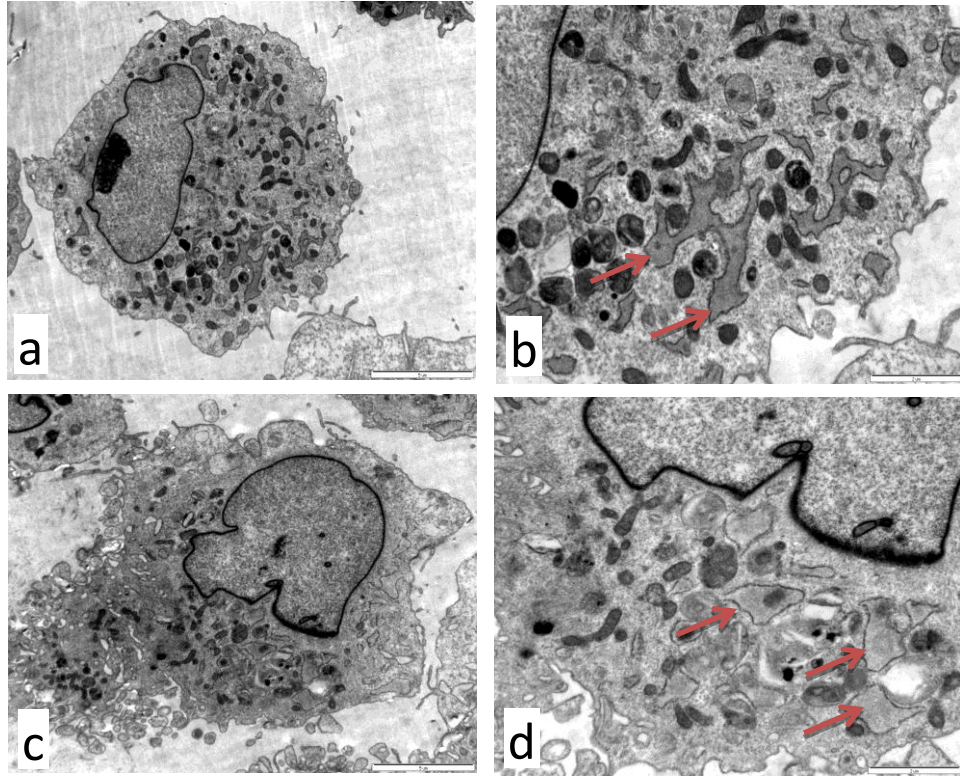
kırmızısı ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu ile morfolojik açıdan incelendiğinde; Sadece koloni oluşturan hücre grubunda osteogenez olayının gerçekleştiği, belirlendi (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9.** a-b: Adipogeneze yönlendirilmiş koloni hücre pelleti kesitleri. Alizarin Red boyaması. km: kemik matriksi alanları.

#### 4.5. Kültürü Yapılan Hücre Hatlarının (Kondrosit Kültür Hattı ve Koloni Hücre Hattı) Ultrastrüktürel (Transmisyon Elektron Mikroskobu) Yöntem ile İncelenmesi

TEM gözlemlerimiz sonucunda; kondrosit kültür hattını oluşturan hücrelerin eliptik şekilli, ökromatik ve genellikle çentikli yapıda nukleusa sahip, genişlemiş yapıdaki granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve ribozomlar dışında az sayıda organel içeren hücrelerden oluştuğu gözlemlendi. Bu hücreler, tübüler tipte mitokondrileri ve az sayıdaki lizozomları ile dikkat çekiciydiler. Lizozomlardan bazıları, konsantrik lamelli yapılar içermekteydi. Ayrıca bu hücreler, yüzeylerinde birçok uzantıya sahiptiler (Şekil 4.9). Koloni hücre hattını oluşturan hücrelerin büyük ölçüde kondrosit kültür hattını oluşturan hücrelere benzerlik gösterdiği, ancak bununla birlikte daha bol ve genişlemiş sisternalara sahip GER içerdikleri ve ayrıca lizozomal yapıların daha az yoğun ve daha az sayıda olduğu belirlendi (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** **a-b:** Kondrosit kültür hattına ait bir hücre. **a:** Ökromatik ve çentikli yapıdaki nukleus izlenmektedir. **b:** Genişlemiş yapıdaki granüllü endoplazmik retikulum (GER) (oklar) yapıları izlenmektedir. Yoğun miktarda lizozom yapıları göze çarpmaktadır. **c-d:** Koloni hücre hattına ait bir hücre. **c:** kondrosit kültür hattına benzer şekilde çentikli nukleus içermektedir. **d:** Daha fazla sayıda genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum (GER) sisternasına (oklar) sahip olduğu dikkat çekmektedir. Lizozom yapılarının daha az sayıda olduğu gözlenmektedir.

## TARTIŞMA

Eklem kıkırdağı, damarsız, sinirsiz ve sınırlı onarım kapasitesine sahip bir doku olduğundan bu bölgedeki travmatik lezyonlar kronik dejenerasyonlara ve osteoartrite sebep olabilmektedir [154]. Günümüzde kıkırdak tedavisi için kullanılan birçok teknik mevcuttur. Son yıllarda en etkin metod olarak iki yöntem üzerinde durulmaktadır. İlk yöntem, mikrokırık yöntemi olup bu yöntemde subkondral plak üzerinde bir lezyon oluşturulur. Bu şekilde kemik iliğinden defektin olduğu bölgeye doğru kanamaya izin verilerek kemik iliği stromal hücrelerinin defektli bölgeye göçü sağlanır ve yara iyileşim süreci başlatılmış olur. Yöntem oldukça basittir ve sadece bir operatif prosedür içermektedir. Fakat araştırmacılar yeni oluşan dokunun eklem kıkırdağı yapısından daha çok fibröz kıkırdağa benzer özellikler taşıdığını vurgulamaktadırlar [5, 155]. Bunun yanında, diğer bazı raporlarda yeni oluşan dokunun kireçlenme ya da kemikleşme eğilimi gösterdiği belirtilmektedir [156]. İkinci yöntem ise otolog kondrosit implantasyonudur (OKİ). Bu yöntemde, kıkırdak dokusu örneği yine aynı eklem bölgesinin normal bölümünden elde edilir. Alınan kıkırdak örneğinden hücreler elde edilir ve 10-12 kat çoğaltılarak tekrar lezyonun olduğu bölgeye, üzerine hücrelerin dağılmasını önleyecek bir parça konularak implante edilirler [102]. Tedavi gören hastaların rehabilitasyon süreçleri ise yaklaşık 1 yıl kadar sürmektedir. Otolog kondrosit implantasyonu (OKİ) yaklaşık 15 yıldır uygulanmaktadır ve bu süreç içerisinde adım adım farklı yenilikler denenmektedir. Örneğin, lezyon üzerine hücrelerin dağılmasını önleyici bir bariyer olarak kullanılan periostal kapak yerine tip I ve tip III kollajen ihtiva eden sentetik kollajenler değişik yollar ile uygulanmaktadır [157]. Buna karşın monolayer hücre kültürü sırasında 7 popülasyon artışı sonrasında hücrelerin kondrojenik potansiyellerini kayb ettikleri ve büyük defektlerde sınırlı onarım gösterebildikleri vurgulanmaktadır [158]. Bu bulgular doğrultusunda araştırmacılar kıkırdak doku mühendisliği çalışmaları için farklı kaynaklar arama sürecine girmişler ve erişkin kök hücreler olarak eklem kıkırdağının kendi yapısında bulunan kök hücrelerin bulunup bulunmadığı üzerinde durmaktadırlar.

Eklem kıkırdağı gelişim sürecinde, önce sekonder ossifikasyon merkezinin geliştiği, sonrasında eklem yüzeyinden aposizyonla eklem kıkırdağının büyüdüğü ve bu olayın eklem yüzey kondrositlerinin proliferasyonu ile gerçekleştirildiği gösterilmiştir [30, 141]. Yapılan bu çalışmalardan sonra eklem yüzeyine yakın alanlarda stem/progenitör hücrelerin lokalize olabileceği fikri güçlenmeye başlamıştır [141, 143, 147-150]. Bu görüşe dayanarak, bu hücreler bu bölgeden izole edilip tedavi amaçlı transplantasyon için kullanılabilir mi sorusu akla gelmektedir. Bu amaçla, deney hayvanı veya buzağı eklem kıkırdağında yapılan

çalışmalarda, epidermal kökenli progenitor hücrelerin özelliklerinden [144] faydalanılmıştır [30]. Epidermal kök hücrelerin yüksek düzeyde  $\beta 1$  integrin ekspresyon ettikleri ve bu yüzden de kolaylıkla ve çok hızlı bir şekilde tip IV kollajen, fibronektin veya keratinosit ekstrasellüler matriks ortamına adheze olabildikleri, yüksek düzeyde koloni oluşturma yeteneklerinin bulunduğu belirtilmiştir [144]. Bu yüzden Archer 1994 yılında, buzağı eklem kıkırdağında yaptığı bir çalışmada in vitro ortam olarak fibronektini kullanıp, izole ettiği tam olgunlaşmamış immatür buzağı eklem kıkırdağı yüzey zonu kondrositlerini önceden fibronektin ile kaplanmış petri kutularında, uygun besiyeri ortamında monolayer kültürünü yaptı. Bu çalışmalarda fibronektin seçilme sebebi, önceden gösterildiği gibi fibronektinin EDA izoformunun özellikle eklem kıkırdağı yüzeyel zonu matriksi içinde, diğer zonlardan daha fazla miktarda dağılım göstermesiydi [145, 146]. Sonuçta, bir grup eklem yüzeyi kondrositlerinin fibronektine karşı yüksek affinite gösterdiğini, bu hücrelerin koloni oluşturabilme eğilimine sahip olduğunu ve bu hücrelerin fibronektin reseptörü olan hücre yüzeyi moleküllerinden integrin  $\beta 1\alpha 5$ 'i yüksek düzeyde ekspresyon ettiğini FACS analizi kullanarak belirlenmiştir. Bu çalışmayı takip eden süreçte kök hücre belirteci olarak kabul edilen bazı markerlar kullanılarak izolasyonu gerçekleştirilmiş bu hücrelerin bu belirteçleri hangi oranlarda ekspresyon ettikleri araştırılmaya çalışılmıştır.

Bu yüzden bizim bu çalışmamızda, ilk hedef olarak Jones ve Watt (1993) ile Archer (1994) tarafından epidermal kök hücreleri ve immatür buzağı eklem kıkırdağında uygulanan yöntemleri kullanarak, eklem kıkırdağı kökenli kondroprogenitor/kök hücreleri izole edilip kültürasyonları gerçekleştirilerek ve yine izole edilen kondrositlerle embriyonik/erişkin kök hücre belirteçlerini (CD90, STRO-1, CD105, CD166) hangi düzeyde ekspresyon ettikleri flow sitometrik yöntemlerle karşılaştırıldı.

Bu amaçla, 1 gün önceden fibronektin ile kapladığımız petri kutularına uygun besiyeri ortamında, izole ettiğimiz ve içerisinde kondroprogenitor/kök hücre içerdiğine inandığımız eklem kıkırdağı kökenli kondrosit topluluğunu ettik. Literatürde yer alan protokole uyararak ve daha önceki çalışmamızda da kullanmış olduğumuz tekniği takip ederek fibronektine adheze olan çok hızlı bir şekilde çoğalarak yüksek düzeyde koloni oluşturabilme yeteneği ile ilk 10-12 günlük kültürasyon süresi içerisinde koloni oluşturabilen hücre topluluklarının seçimleri yapıldı. Koloni seçimi yapılarak kültüre edilen kültür hücrelerinin yanı sıra insan eklem kıkırdağından izole edilerek direkt kültürü yapılan kondrosit kültürasyonlarına paralel süreçlerde devam edildi.

Daha önce yapılan kondrosit monolayer kültürü çalışmalarında, kültüre edilen kondrositlerin dedifferensiyasyon ile fenotiplerini ve genotiplerini değiştirdiklerini, kültürasyon başlangıcında yuvarlak görünümlü kondrositlerin kültürasyonun ilerlemesiyle fibroblastik bir görünüm aldıkları, hücre yüzeyinde bulunan kıkırdağ belirteci olan moleküllerin zamanla azaldığı, kondrositlerin tip II kollajen yerine tip I kollajen salgılamaya başladıkları belirtilmiştir [149, 159]. Çalışmamızda kültüre edilen hücrelerin literatüre uygun olarak başlangıçta yuvarlak bir fenotipe sahip oldukları, kültürasyon

süresi ilerledikçe fibroblastik bir görünüm kazandıkları görüldü. 3 pasaj boyunca kültürasyonları yapılan ve bu süreç sonunda flow sitometrik incelemelere alınan hücrelerde ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında, yüzde değerlerinin kondrosit kültür hattına kıyasla koloni oluşturabilen hücrelerde daha yüksek olduğu tesbit edildi. Fakat istatistiksel analizler ile değerlendirmeler yapıldığında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Bu bulgulardan yola çıkılarak eklem kıkırdağından izolasyonları yapılarak direkt ekimi yapılan kondrosit kültür hattı hücrelerinde bir süre sonra kültürasyon şartlarına bağlı olarak çalışılan belirteçleri eksprese etmelerini, bu hücrelerin geriye farklanma sürecine girdikleri şeklinde yorumlanabilir [149]. Kültürasyon sürecinde meydana gelen bu ekspresyon değişikliği ile kondrosit ve koloni hücre hattı hücreleri neredeyse aynı düzeyde ekspresyon seviyelerine sahip hale gelmektedirler.

Çalışmamızdaki diğer bir parametremiz, kondrosit kültür hattı ve koloni hücre hattı, 3. pasaj sonunda embryonik/erişkin kök hücre belirteçlerini (CD90, STRO-1, CD105, CD166) imunohistokimyasal olarak hangi yoğunlukta eksprese ettikleriydi. İmmüno boyanma yoğunluk dağılımlarına bakıldığında, koloni oluşturabilen hücrelerde CD90, STRO-1, CD105 ve CD166'nın ekspresyon yoğunluklarının, kondrosit kültür hattına göre daha fazla olduğu görüldü. Mezenkimal kök hücre belirteçleri olarak kabul edilen CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 ekspresyonlarının yüksek olması insan eklem kıkırdağında mezenkimal kök hücrelerinin varlığına işaret etmektedir [122, 140].

Monolayer kültürlerde fibroblast benzeri hücrelere dönüşen ve kondrosit özelliğini kaybeden eklem kıkırdağı kökenli kondrositler, süspansiyon veya high-density kültürlerine alındığında, redifferensiyasyonla yeniden yuvarlak şekil alarak kondrosit özelliğini aldığı ve kıkırdak dokusuna özel ESM proteinlerini salgılamaya başladıkları vurgulanmaktadır [160, 161]. Bu çalışma, diğer bir parametre olarak, koloni oluşturan kondroprogenitor hücreler ve kondrositler pellet haline getirilip 21 gün süre ile adipogenez, kondrogenez ve osteogenez yönünde farklanmalarını uyarıcı besi yerlerinde kültürasyonları sağlanarak yağ, kemik ve kıkırdak dokularına farklanabilme yeteneklerinin olup olmadığı, şayet yetenekleri var ise ne ölçüde olduğu belirlenmeye çalışıldı. Farklanma süreçleri sonunda; elde edilen doku örneklerine ait kesitler yağ, kemik ve kıkırdak dokuya özgü rutin boyalarla boyanıp değerlendirilmesi ile kondrosit hücre hattı kültür hücrelerinin kondrogeneze yönelme açısından daha başarılı, adipogenez ve osteogenez açısından koloni hücrelerinin daha başarılı oldukları gözlemlendi. Ayrıca, kondrosit kültürü hücrelerinin osteogenez yönünde farklanamadıkları da belirlendi. Bununla birlikte, farklandırma sonucu elde edilen dokuların içerik yönünden bu üç farklı dokunun *in-vivo* süreçteki doku yapısına uyumluluğu, henüz tam olarak test edilememiş olup bu dokuların fonksiyonelliği araştırılmayı bekleyen bir konudur. Diğer bir önemli nokta ise seçimi yapılarak çoğaltılan koloni oluşturabilen hücrelerin kendi içerisinde farklı potansiyellere sahip olabilecekleridir. Kültürasyon sürecinde seçilen kolonilerde farklı ekspresyon düzeylerinin elde edilmesi bu olasılığı

güçlendirmektedir. Bunun yanı sıra kültür ortamında koloni oluşturabilen hücrelere ek olarak farklılaşmış olan hücrelerin destekleyici nitelikte rol oynayabilecekleri fikri de bu veriler doğrultusunda önem kazanmaktadır. Bu fikri destekler nitelikte mezenkimal kök hücreler ile kondrositlerin birlikte kültüre edilmesi ile birbirlerine desteklik sağlayarak kondrogenezin daha sağlıklı bir şekilde gerçekleşebileceği üzerinde durulmaktadır [162].

Çalışmamızdaki son parametre, kondrosit hücre kültür hattı ve koloni hücre hattının ince yapısının araştırılmasıydı. Genel olarak kondrosit hücre hattı ve koloni hücre hattına ait hücrelerin ince yapısı karşılaştırıldığında, genel olarak benzer özellikler taşıdıklarını belirledik. Farklı olarak koloni hücrelerinin daha bol ve genişlemiş sisternalara sahip GER içerdikleri ve ayrıca lizozomal yapıların daha az yoğun ve daha az sayıda olduğu belirlendi. Genişlemiş GER yapılarına dayanarak, protein üretimi bakımından koloni hücrelerinin daha aktif olduklarını söyleyebiliriz.

Sonuç olarak, literatürde yer alan bilgiler ile birlikte, eklem kıkırdağı dokusu mezenkimal karakterde hücreleri belirli oranlarda içermektedir. Fakat buna rağmen, halen kıkırdak kökenli kök hücrelerin kondral lezyon tedavisine doğrudan katıldıklarını gösteren net kanıtlar yoktur. Bunun yanı sıra eklem bölgesinde bulunan kök hücreler için kesin belirteçler bulunmamaktadır. Fakat bu konuda yapılan çalışmalarda, eklem kıkırdağı için kök hücre aday hücrelerin bazı özelliklerinden bahsedilmektedir. Örneğin bu hücrelerin Notch-1 pozitif olduğu bilinmektedir. Notch sinyal yolağı hücre kaderinin belirlenmesinde oldukça etkindir. Özellikle kök hücre özelliğine sahip hücrelerde aktif olduğu bilgisi literatürde yer almaktadır [163]. Defektli yada osteoartritli dokularda Notch1 aktif kondrositlerin varlığı gösterilmiştir [164, 165]. Bu hücrelerin migrasyon yapabildikleri histolojik verilerle desteklenmiştir. Olgunlaşmamış eklem kıkırdağı *ex vivo* kültür çalışmalarında, deneysel hasarlı eksplantlar FGF2 varlığında kondrosit yığınları oluşturmaktadırlar, yığındaki hücreler Notch1 ekspresyonu göstermektedirler [166]. Osteoartritli kıkırdak dokuda kondrosit yığınlarında Notch1 ekspresyonunun artması bir anlamda kök hücre sayısındaki artışı gösterdiği vurgulanmaktadır [140]. Notch1 aktivasyonu kalıcı olarak tüm kondrosit yığınlarında bulunmamaktadır, bu sürecin kondrosit yığınları arası potansiyel farka bağlı olabileceği vurgulanmaktadır [167]. Dikkat çekici olarak, hücre kümelerinde bulunan hücreler hem erişkin hem de erişkin olmayan fenotipik özellikler göstermektedirler. Bazı hücreler CD105/CD166 ve Notch1 ekspresyonu gösterirken bazıları kollajen tip II ve X için pozitif reaksiyon vermektedirler [165, 168, 169]. Eklem kıkırdağı spesifik kök hücre belirteçlerinin kesin belirlenememiş olmasına bağlı olarak, *in vitro* ve *in vivo* popülasyon takip deneyleri sınırlıdır. Normal erişkin insan eklem kıkırdağı-spesifik kök hücreleri, izole edilen tam kat kondrositlerden daha fazla oranda telomeraz aktivitesi gösterdikleri belirtilmiştir. Aralarındaki telomeraz aktivitesine bakıldığında eklem-kıkırdağı kökenli kök hücrelerin 7 kat daha üstün oldukları belirlenmiştir [151].

Literatürde yer alan bilgilere uyumlu olarak, daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarımızda eklem kıkırdağının yüzeyel bölgesinde CD105 ve CD166 pozitif hücrelerin lokalize olduklarını gördük [170]. Bunun yanı sıra, kondrosit ve kök/kondroprojenitör hücre hattını belirli bir kültürasyon süresinden sonra flow sitometrik yöntemlerle karşılaştırdığımızda koloni oluşturabilen hücrelerde belirteç yoğunluğunun daha fazla olduğunu fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirledik. Yönlendirme deneylerimizde ise koloni hücrelerinin adipogenez ve osteogenez sürecinde olumlu sonuçlar verdiğini fakat kondrogenezde ise kondrosit kültür hattının daha verimli olduğu gözlemledik. Kondrosit kültür hattı hücreleri kültür süreci sonucunda hücreler geri farklanıyor olabileceği gibi elemine olarak koloni hücrelerinin baskın hale gelmesi ile de sonuçlanıyor olabilir. Diğer bir önemli nokta ise seçimi yapılarak çoğaltılan bu koloni oluşturabilen hücrelerin kendi içerisinde farklı potansiyellere sahip olabilecekleri ve farklılaşmış olan hücrelerin de destekleyici nitelikte kültür ortamında bulunup bulunmalarının gerekliliğidir.

Sonuç olarak, çalışmamızın bulguları doğrultusunda koloni oluşturabilen hücrelerin potansiyel farkları ve farklılaşmış hücrelerin destekleyici özellikleri göz önüne alınarak belirli oranlarda bu hücre hatlarının kombinasyonları elde edilip bilinmeyen sorulara yanıtlar aranmaya devam edilebilir. Erişkin insan kök hücre çalışmalarında araştırılmayı bekleyen daha birçok soru halen varlığını sürdürmektedir. Dolayısıyla bu konuda daha detaylı ve moleküler düzeyde yeni araştırmalara gereksinim vardır denilebilir.

## SONUÇLAR

Eklem kırıkdağı tedavi protokollerinde günümüzde kullanılan kondrosit kültür hücreleri ile, seçimi yapılan ve kondroprogenitor/kök hücre özelliği taşıdığı düşünülen koloni hücreleri, kök hücre belirteci olarak kabul edilen CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 ekspresyon düzeyleri, ultrastrüktürel özellikleri, in vitroda kondrogenez, adipogenez ve osteogeneze yönlenebilme özellikleri açısından incelendiğinde; aşağıda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir.

- 1) Flow sitometrik analizlere göre, CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 kök hücre belirteçleri 3. pasaj sonunda hem kondrosit kültür hücrelerinde hem de koloni kültür hücrelerinde eksprese olmaktadır.
- 2) Flow sitometrik analizlere göre, CD90, CD105 ve CD 166 koloni kültür hücrelerinde daha yüksek ekspresyon oranına sahipken, STRO-1 ekspresyonunun ise kondrosit kültür hücrelerinde biraz daha fazla eksprese olmaktadır.
- 3) Flow sitometrik sonuçlara göre, bu iki hücre hattı CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 ekspresyon düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık göstermemektedir.
- 4) Kondrosit kültür hücreleri uzun süreli kültürasyon sürecinden sonra seçimi yapılmış olan koloni kültür hücreleri ile benzer düzeyde ekspresyon seviyelerine ulaşmaktadır. Bu süreç, hücrelerin geri farklılaşma mekanizmasının devreye girmesine bağlı olabileceği gibi kültür şartlarında farklılaşmış hücrelerin eliminasyonuna da bağlı olabilir.
- 5) İmmünofloresan analizlerine göre, CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 kök hücre belirteçleri, 3. pasaj sonunda hem kondrosit kültür hücrelerinde hem de koloni kültür hücrelerinde eksprese olmaktadır.



- 6) İmmünofloresan analizlerine göre, CD90, STRO-1, CD105 ve CD166 kök hücre belirteçleri koloni kültür hücrelerinde, kondrosit kültür hücrelerine göre daha yoğun eksprese olmaktadır.
- 7) Kondrosit kültür hattı ve koloni kültür hattı hücrelerinin adipogenez, osteogenez ve kondrojeneze farklılaşma süreçleri sonunda; elde edilen pellet örneklerine ait kesitler yağ, kemik ve kıkırdak dokuya özgü rutin boyalarla boyanıp değerlendirildiğinde; kondrosit kültür hattı hücrelerinin kondrojeneze yönelme açısından daha başarılı, adipogenez ve osteogenez açısından koloni hücrelerinin daha başarılı oldukları söylenebilir. Bununla birlikte bu çalışmada, kondrosit kültürü hücrelerinin osteogenez yönünde farklılaşmadıkları da belirlendi.
- 8) Kondrojeneze yönlendirilmede, kondrosit ve koloni hücre hatlarının birlikte kültürasyonları daha iyi sonuç verebilir. Bu durumda, kondrositler ve koloni hücrelerinin karşılıklı etkileşim halinde bulunmalarına bağlı olarak daha iyi nitelikte kıkırdak matris üretimi gerçekleştirilebilir. Bu konudaki çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir.
- 9) Yönlendirme deneylerinin sonuçlarına bağlı olarak, bu çalışmada, özellikle kondrojeneze yönelmede, koloniler arasında farklılık gözlemlendi. Elde edilen bu farklı sonuçlar, aslında izole edilip seçilen koloniler arasında kimlik açısından farklılıklar bulunabileceğini gösterebilir. Kültürasyon sürecinde seçilen kolonilerde farklı ekspresyon düzeylerinin elde edilmesi de bu olasılığı güçlendirmektedir.
- 10) *In vitro*da 3. pasajda elde edilen kondrosit ve koloni hücre hattı hücrelerinin ince yapılarının genel olarak benzer özellikler taşıdıkları belirlendi. Bununla birlikte, koloni hücrelerinin daha bol ve genişlemiş sisternalara sahip GER içerdikleri ve ayrıca lizozomal yapıların daha az yoğun ve daha az sayıda olduğu belirlendi. Genişlemiş GER yapılarına sahip olduklarından dolayı, koloni hücrelerinin protein üretimi bakımından daha aktif oldukları söylenebilir.

## KAYNAKLAR

1. Muraglia, A., A. Corsi, M. Riminucci, M. Mastrogiacomo, R. Cancedda, P. Bianco, and R. Quarto, Formation of a chondro-osseous rudiment in micromass cultures of human bone-marrow stromal cells. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 14): p. 2949-55.
2. Ichinose, S., K. Yamagata, I. Sekiya, T. Muneta, and M. Tagami, Detailed examination of cartilage formation and endochondral ossification using human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2005. **32**(7): p. 561-70.
3. Namba, R.S., M. Meuli, K.M. Sullivan, A.X. Le, and N.S. Adzick, Spontaneous repair of superficial defects in articular cartilage in a fetal lamb model. *J Bone Joint Surg Am*, 1998. **80**(1): p. 4-10.
4. Jackson, D.W., P.A. Lalor, H.M. Aberman, and T.M. Simon, Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am*, 2001. **83-A**(1): p. 53-64.
5. Shapiro, F., S. Koide, and M.J. Glimcher, Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 1993. **75**(4): p. 532-53.
6. Buckwalter, J.A. and H.J. Mankin, Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect*, 1998. **47**: p. 477-86.
7. <http://lyceum.algonquincollege.com/lts/onlineCourses/anatomy/content/module5-3.htm>.
8. Ozbey, O., Gelişmekte olan sıçan humerusu proksimal epifizinde CD105, CD166, Notch-1 ve Delta pozitif hücre dağılımı: İmmünohistokimyasal bir çalışma. 2008.
9. Hartmann, C. and C.J. Tabin, Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell*, 2001. **104**(3): p. 341-51.

10. Moskalewski, S., A. Hyc, E. Jankowska-Steifer, and A. Osiecka-Iwan, Formation of synovial joints and articular cartilage. *Folia Morphol (Warsz)*, 2013. **72**(3): p. 181-7.
11. Holder, N., An experimental investigation into the early development of the chick elbow joint. *J Embryol Exp Morphol*, 1977. **39**: p. 115-27.
12. Iwamoto, M., Y. Tamamura, E. Koyama, T. Komori, N. Takeshita, J.A. Williams, T. Nakamura, M. Enomoto-Iwamoto, and M. Pacifici, Transcription factor ERG and joint and articular cartilage formation during mouse limb and spine skeletogenesis. *Dev Biol*, 2007. **305**(1): p. 40-51.
13. Archer, C.W., G.P. Dowthwaite, and P. Francis-West, Development of synovial joints. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2003. **69**(2): p. 144-55.
14. Bland, Y.S. and D.E. Ashhurst, Development and ageing of the articular cartilage of the rabbit knee joint: distribution of the fibrillar collagens. *Anat Embryol (Berl)*, 1996. **194**(6): p. 607-19.
15. Francis-West, P.H., J. Parish, K. Lee, and C.W. Archer, BMP/GDF-signalling interactions during synovial joint development. *Cell Tissue Res*, 1999. **296**(1): p. 111-9.
16. Andersen, H., Histochemical studies on the histogenesis of the knee joint and superior tibio-fibular joint in human fetuses. *Acta Anat (Basel)*, 1961. **46**: p. 279-303.
17. Mitrovic, D., Development of the diarthrodial joints in the rat embryo. *Am J Anat*, 1978. **151**(4): p. 475-85.
18. Edwards, J.C., L.S. Wilkinson, H.M. Jones, P. Soothill, K.J. Henderson, J.G. Worrall, and A.A. Pitsillides, The formation of human synovial joint cavities: a possible role for hyaluronan and CD44 in altered interzone cohesion. *J Anat*, 1994. **185 ( Pt 2)**: p. 355-67.
19. <http://mulla.pri.ee/Kelley's%20Textbook%20of%20Rheumatology,t.e.H.h>
20. Guo, X., T.F. Day, X. Jiang, L. Garrett-Beal, L. Topol, and Y. Yang, Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev*, 2004. **18**(19): p. 2404-17.
21. Seo, H.S. and R. Serra, Deletion of Tgfbr2 in Prx1-cre expressing mesenchyme results in defects in development of the long bones and joints. *Dev Biol*, 2007. **310**(2): p. 304-16.

22. Serra, R. and C. Chang, TGF-beta signaling in human skeletal and patterning disorders. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2003. **69**(4): p. 333-51.
23. Spagnoli, A., L. O'Rear, R.L. Chandler, F. Granero-Molto, D.P. Mortlock, A.E. Gorska, J.A. Weis, L. Longobardi, A. Chytil, K. Shimer, and H.L. Moses, TGF-beta signaling is essential for joint morphogenesis. *J Cell Biol*, 2007. **177**(6): p. 1105-17.
24. Edwards, C.J. and P.H. Francis-West, Bone morphogenetic proteins in the development and healing of synovial joints. *Semin Arthritis Rheum*, 2001. **31**(1): p. 33-42.
25. Vortkamp, A., K. Lee, B. Lanske, G.V. Segre, H.M. Kronenberg, and C.J. Tabin, Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*, 1996. **273**(5275): p. 613-22.
26. Ballard, K.J. and S.J. Holt, Cytological and cytochemical studies on cell death and digestion in the foetal rat foot: the role of macrophages and hydrolytic enzymes. *J Cell Sci*, 1968. **3**(2): p. 245-62.
27. Mitrovic, D.R., Development of the metatarsophalangeal joint of the chick embryo: morphological, ultrastructural and histochemical studies. *Am J Anat*, 1977. **150**(2): p. 333-47.
28. Ito, M.M. and M.Y. Kida, Morphological and biochemical re-evaluation of the process of cavitation in the rat knee joint: cellular and cell strata alterations in the interzone. *J Anat*, 2000. **197 Pt 4**: p. 659-79.
29. Kavanagh, E., M. Abiri, Y.S. Bland, and D.E. Ashhurst, Division and death of cells in developing synovial joints and long bones. *Cell Biol Int*, 2002. **26**(8): p. 679-88.
30. Archer, C.W., H. Morrison, and A.A. Pitsillides, Cellular aspects of the development of diarthrodial joints and articular cartilage. *J Anat*, 1994. **184 ( Pt 3)**: p. 447-56.
31. Pitsillides, A.A., Identifying and characterizing the joint cavity-forming cell. *Cell Biochem Funct*, 2003. **21**(3): p. 235-40.
32. Pitsillides, A.A., C.W. Archer, P. Prehm, M.T. Bayliss, and J.C. Edwards, Alterations in hyaluronan synthesis during developing joint cavitation. *J Histochem Cytochem*, 1995. **43**(3): p. 263-73.
33. Toole, B.P., *Cell Biology of Extracellular Matrix*. E. D. Hay, ed ed. *Glycosaminoglycans in morphogenesis* 1981, New York: Plenum Press.

34. Mundy, C., T. Yasuda, T. Kinumatsu, Y. Yamaguchi, M. Iwamoto, M. Enomoto-Iwamoto, E. Koyama, and M. Pacifici, Synovial joint formation requires local Ext1 expression and heparan sulfate production in developing mouse embryo limbs and spine. *Dev Biol*, 2011. **351**(1): p. 70-81.
35. Goldring, M.B., Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2012. **4**(4): p. 269-85.
36. Hunziker, E.B., Growth plate structure and function. *Pathol Immunopathol Res*, 1988. **7**(1-2): p. 9-13.
37. Hyde, G., S. Dover, A. Aszodi, G.A. Wallis, and R.P. Boot-Handford, Lineage tracing using matrilin-1 gene expression reveals that articular chondrocytes exist as the joint interzone forms. *Dev Biol*, 2007. **304**(2): p. 825-33.
38. Murphy, J.M., R. Heinegard, A. McIntosh, D. Sterchi, and F.P. Barry, Distribution of cartilage molecules in the developing mouse joint. *Matrix Biol*, 1999. **18**(5): p. 487-97.
39. Pacifici, M., E. Koyama, Y. Shibukawa, C. Wu, Y. Tamamura, M. Enomoto-Iwamoto, and M. Iwamoto, Cellular and molecular mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1068**: p. 74-86.
40. Koyama, E., Y. Shibukawa, M. Nagayama, H. Sugito, B. Young, T. Yuasa, T. Okabe, T. Ochiai, N. Kamiya, R.B. Rountree, D.M. Kingsley, M. Iwamoto, M. Enomoto-Iwamoto, and M. Pacifici, A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis. *Dev Biol*, 2008. **316**(1): p. 62-73.
41. Esmer, A.F., K. Başarır, and M. Binnet, Diz ekleminin cerrahi anatomisi. *TOTBİD Dergisi*, 2011. **10**(1): p. 38-44.
42. Chen, F.S., S.R. Frenkel, and P.E. Di Cesare, Repair of articular cartilage defects: part I. Basic Science of cartilage healing. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*, 1999. **28**(1): p. 31-3.
43. Aydelotte, M.B. and K.E. Kuettner, Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Connect Tissue Res*, 1988. **18**(3): p. 205-22.

44. Muir, H., The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules*. *Bioessays*, 1995. **17**(12): p. 1039-48.
45. Thambyah, A., A. Nather, and J. Goh, Mechanical properties of articular cartilage covered by the meniscus. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006. **14**(6): p. 580-8.
46. Bhosale, A.M. and J.B. Richardson, Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull*, 2008. **87**: p. 77-95.
47. Seol, D.R., *Chondroprogenic progenitor cell response to cartilage injury and its application for cartilage repair*, 2011, University of Iowa.
48. Tabur, H., *Matür Tavşanlarda Tam Kat Eklem Kıkırdak Defeklerinin İyileşmesinde Trombosit Kökenli Büyüme Faktörünün Rolü*, 2007, Harran Üniversitesi.
49. Eyre, D.R., J.J. Wu, and P.E. Woods, The cartilage collagens: structural and metabolic studies. *J Rheumatol Suppl*, 1991. **27**: p. 49-51.
50. Bhosale, A.M. and J.B. Richardson, Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull.*, 2008. **87**: p. 77-95.
51. Eyre, D., Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res*, 2002. **4**(1): p. 30-5.
52. <http://www.worldwidewounds.com/2005/august/Schultz/Extrace-Matric-Acute-Chronic-Wounds.html>.
53. Heinegard, D., Proteoglycans and more--from molecules to biology. *Int J Exp Pathol*, 2009. **90**(6): p. 575-86.
54. Hyc, A., A. Osiecka-Iwan, J. Jozwiak, and S. Moskalewski, The morphology and selected biological properties of articular cartilage. *Ortop Traumatol Rehabil*, 2001. **3**(2): p. 151-62.
55. Gentili, C. and R. Cancedda, Cartilage and bone extracellular matrix. *Curr Pharm Des*, 2009. **15**(12): p. 1334-48.
56. <http://www.frontbiosci.org/2013/v5s/af/374/fulltext.php?bframe=figures.htm>.
57. Poole, A.R., T. Kojima, T. Yasuda, F. Mwale, M. Kobayashi, and S. Laverty, Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*, 2001(391 Suppl): p. S26-33.

58. Broom, N.D. and C.A. Poole, A functional-morphological study of the tidemark region of articular cartilage maintained in a non-viable physiological condition. *J Anat*, 1982. **135**(Pt 1): p. 65-82.
59. Redler, I., V.C. Mow, M.L. Zimny, and J. Mansell, The ultrastructure and biomechanical significance of the tidemark of articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res*, 1975(112): p. 357-62.
60. Gürer, B., In Situ Kıkırdak Doku Mühendisliği, in *Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı 2011*, Mersin Üniversitesi: Mersin.
61. [http://www.bcr.uilg.ac.be/cartilage\\_en.html](http://www.bcr.uilg.ac.be/cartilage_en.html).
62. Schrobback, K., J. Malda, R.W. Crawford, Z. Upton, D.I. Leavesley, and T.J. Klein, Effects of oxygen on zonal marker expression in human articular chondrocytes. *Tissue Eng Part A*, 2012. **18**(9-10): p. 920-33.
63. Mobasheri, A., S. Richardson, R. Mobasheri, M. Shakibaei, and J.A. Hoyland, Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes. *Histol Histopathol*, 2005. **20**(4): p. 1327-38.
64. Guilak, F., L.G. Alexopoulos, M.L. Upton, I. Youn, J.B. Choi, L. Cao, L.A. Setton, and M.A. Haider, The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1068**: p. 498-512.
65. Guilak, F., W.R. Jones, H.P. Ting-Beall, and G.M. Lee, The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999. **7**(1): p. 59-70.
66. Eyre, D.R., M.A. Weis, and J.J. Wu, Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *Eur Cell Mater*, 2006. **12**: p. 57-63.
67. Kim, S.H., J. Turnbull, and S. Guimond, Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol*, 2011. **209**(2): p. 139-51.
68. <http://www.intechopen.com/books/regenerative-medicine-and-tissue-engineering/cartilage-tissue-engineering-the-role-of-extracellular-matrix-ecm-and-novel-strategies>.
69. Shakibaei, M., C. Csaki, and A. Mobasheri, Diverse roles of integrin receptors in articular cartilage. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2008. **197**: p. 1-60.

70. Craig, W., J.W. David, and H.Z. Ming, A current review on the biology and treatment of the articular cartilage defects (part I & part II) *J Musculoskelet Res.*, 2003. **7**(3&4): p. 157-81.
71. Boden, B.P., A.W. Pearsall, W.E. Garrett, Jr., and J.A. Feagin, Jr., Patellofemoral Instability: Evaluation and Management. *J Am Acad Orthop Surg*, 1997. **5**(1): p. 47-57.
72. Patel, N. and S.D. Weiner, Osteochondritis dissecans involving the trochlea: report of two patients (three elbows) and review of the literature. *J Pediatr Orthop*, 2002. **22**(1): p. 48-51.
73. Bianchi, G., S. Paderni, D. Tigani, and M. Mercuri, Osteochondritis dissecans of the lateral femoral condyle. *Chir Organi Mov*, 1999. **84**(2): p. 183-7.
74. Patel, D.V., N.M. Breazeale, C.T. Behr, R.F. Warren, T.L. Wickiewicz, and S.J. O'Brien, Osteonecrosis of the knee: current clinical concepts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 1998. **6**(1): p. 2-11.
75. Stanitski, C.L., Articular hypermobility and chondral injury in patients with acute patellar dislocation. *Am J Sports Med*, 1995. **23**(2): p. 146-50.
76. Lewandrowski, K.U., J. Muller, and G. Schollmeier, Concomitant meniscal and articular cartilage lesions in the femorotibial joint. *Am J Sports Med*, 1997. **25**(4): p. 486-94.
77. Outerbridge, R.E., The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br*, 1961. **43-B**: p. 752-7.
78. Browne, J.E. and T.P. Branch, Surgical alternatives for treatment of articular cartilage lesions. *J Am Acad Orthop Surg*, 2000. **8**(3): p. 180-9.
79. <http://www.orthobullets.com/sports/3133/articular-cartilage-defects-of-knee>.
80. Smillie, I.S., Treatment of osteochondritis dissecans. *J Bone Joint Surg Br*, 1957. **39-B**(2): p. 248-60.
81. Pridie, A.H., The method of resurfacing osteoarthritic knee. . *J Bone Joint Surg* 1959. **41**: p. 618-23.
82. Magnussen, R.A., W.R. Dunn, J.L. Carey, and K.P. Spindler, Treatment of focal articular cartilage defects in the knee: a systematic review. *Clin Orthop Relat Res*, 2008. **466**(4): p. 952-62.



83. McGuire, D.A., T.R. Carter, and W.R. Shelton, Complex knee reconstruction: osteotomies, ligament reconstruction, transplants, and cartilage treatment options. *Arthroscopy*, 2002. **18**(9 Suppl 2): p. 90-103.
84. Saw, K.Y., A. Anz, S. Merican, Y.G. Tay, K. Ragavanaidu, C.S. Jee, and D.A. McGuire, Articular cartilage regeneration with autologous peripheral blood progenitor cells and hyaluronic acid after arthroscopic subchondral drilling: a report of 5 cases with histology. *Arthroscopy*, 2011. **27**(4): p. 493-506.
85. Steadman, J.R., W.G. Rodkey, S.B. Singleton, and K.K. Briggs, Microfracture technique for full thickness chondral defects: Technique and clinical results. . *Oper Tech Orthop*, 1997. **7**: p. 300-304.
86. Hoemann, C.D., M. Hurtig, E. Rossomacha, J. Sun, A. Chevrier, M.S. Shive, and M.D. Buschmann, Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg Am*, 2005. **87**(12): p. 2671-86.
87. <http://www.josephbermanmd.com/joint-preservation/articular-cartilage-injury-treatments/microfracture/>.
88. <http://orthoinfo.aaos.org/topic.cfm?topic=a00422>.
89. <http://www.eorthopod.com/content/articular-cartilage-problems-knee>.
90. [information/orthopaedics/procedures/knee/osteochondral-grafting-of-the-knee, h.w.o.c.u.p.](http://www.h.w.o.c.u.p.information/orthopaedics/procedures/knee/osteochondral-grafting-of-the-knee)
91. Hangody, L., G. Kish, Z. Karpati, I. Udvarhelyi, I. Sziget, and M. Bely, Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics*, 1998. **21**(7): p. 751-6.
92. Rodrigo, J.J., New techniques of cartilage healing cartilage grafting. *Sports Medicine and Arthoscopy*, 1998. **6**: p. 131.
93. Garrett, J.C., *Operative Arthroscopy 2nd edition ed. Osteochondral allografts for reconstruction of articular defects*. 1996, Philadelphia: Lippincott Raven. .
94. <http://raycrowe.com/pages/view/OsteochondralGrafting>.
95. [http://www.springerimages.com/Images/MedicineAndPublicHealth/1-10.1007\\_s00167-008-0586-y-0](http://www.springerimages.com/Images/MedicineAndPublicHealth/1-10.1007_s00167-008-0586-y-0).

96. Singh, R., V. Chauhan, N. Chauhan, and S. Sharma, Transplantation of free tibial periosteal grafts for the repair of articular cartilage defect: An experimental study. *Indian J Orthop*, 2009. **43**(4): p. 335-41.
97. Lester, C.W., Tissue replacement after subperichondrial resection of costal cartilage: two case reports. *Plast Reconstr Surg Transplant Bull*, 1959. **23**(1): p. 49-54.
98. Skoog, T., L. Ohlsen, and S.A. Sohn, Perichondrial potential for cartilagenous regeneration. *Scand J Plast Reconstr Surg*, 1972. **6**(2): p. 123-5.
99. Ohlsen, L., Cartilage formation from free perichondrial grafts: an experimental study in rabbits. *Br J Plast Surg*, 1976. **29**(3): p. 262-7.
100. Skoog, T. and S.H. Johansson, The formation of articular cartilage from free perichondrial grafts. *Plast Reconstr Surg*, 1976. **57**(1): p. 1-6.
101. Upton, J., S.A. Sohn, and J. Glowacki, Neocartilage derived from transplanted perichondrium: what is it? *Plast Reconstr Surg*, 1981. **68**(2): p. 166-74.
102. Brittberg, M., A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson, and L. Peterson, Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 1994. **331**(14): p. 889-95.
103. Brittberg, M., Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop Relat Res*, 1999(367 Suppl): p. S147-55.
104. Pei, M., F. He, B.M. Boyce, and V.L. Kish, Repair of full-thickness femoral condyle cartilage defects using allogeneic synovial cell-engineered tissue constructs. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009. **17**(6): p. 714-22.
105. Pittenger, M.F., A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, and D.R. Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
106. De Bari, C., F. Dell'Accio, and F.P. Luyten, Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(1): p. 85-95.

107. Deasy, B.M., R.J. Jankowski, and J. Huard, Muscle-derived stem cells: characterization and potential for cell-mediated therapy. *Blood Cells Mol Dis*, 2001. **27**(5): p. 924-33.
108. Zuk, P.A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J.W. Futrell, A.J. Katz, P. Benhaim, H.P. Lorenz, and M.H. Hedrick, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 2001. **7**(2): p. 211-28.
109. Pei, M., F. He, V.L. Kish, and G. Vunjak-Novakovic, Engineering of functional cartilage tissue using stem cells from synovial lining: a preliminary study. *Clin Orthop Relat Res*, 2008. **466**(8): p. 1880-9.
110. Pei, M., F. He, and G. Vunjak-Novakovic, Synovium-derived stem cell-based chondrogenesis. *Differentiation*, 2008. **76**(10): p. 1044-56.
111. Richter, W., Cell-based cartilage repair: illusion or solution for osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 2007. **19**(5): p. 451-6.
112. Lee, M.C., K.L. Sung, M.S. Kurtis, W.H. Akeson, and R.L. Sah, Adhesive force of chondrocytes to cartilage. Effects of chondroitinase ABC. *Clin Orthop Relat Res*, 2000(370): p. 286-94.
113. Hunziker, E.B. and E. Kapfinger, Removal of proteoglycans from the surface of defects in articular cartilage transiently enhances coverage by repair cells. *J Bone Joint Surg Br*, 1998. **80**(1): p. 144-50.
114. Basalo, I.M., D. Raj, R. Krishnan, F.H. Chen, C.T. Hung, and G.A. Ateshian, Effects of enzymatic degradation on the frictional response of articular cartilage in stress relaxation. *J Biomech*, 2005. **38**(6): p. 1343-9.
115. Bos, P.K., J. DeGroot, M. Budde, J.A. Verhaar, and G.J. van Osch, Specific enzymatic treatment of bovine and human articular cartilage: implications for integrative cartilage repair. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(4): p. 976-85.
116. van de Breevaart Bravenboer, J., C.D. In der Maur, P.K. Bos, L. Feenstra, J.A. Verhaar, H. Weinans, and G.J. van Osch, Improved cartilage integration and interfacial strength after enzymatic treatment in a cartilage transplantation model. *Arthritis Res Ther*, 2004. **6**(5): p. R469-76.
117. <http://www.eorthopod.com/content/articular-cartilage-problems-knee>.
118. Khan, I.M., L.G. Gonzalez, L. Francis, R.S. Conlan, S.J. Gilbert, S.K. Singhrao, D. Burdon, A.P. Hollander, V.C. Duance, and C.W. Archer, Interleukin-1beta enhances cartilage-to-cartilage integration. *Eur Cell Mater*, 2011. **22**: p. 190-201.

119. <http://milkgenomics.org/article/human-milk-contains-pluripotent-stem-cells/>.
120. Can, A., Kök hücre biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları, Mezenkimal kök hücreler, Akademisten tıp kitabevi, p. 363-412, Ankara, 2014.
121. [http://www.biologyjunction.com/stemcell\\_article.htm](http://www.biologyjunction.com/stemcell_article.htm).
122. Young, H.E. and A.C. Black, Jr., Adult stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2004. **276**(1): p. 75-102.
123. Tarnowski, M. and A.L. Sieron, Adult stem cells and their ability to differentiate. *Med Sci Monit*, 2006. **12**(8): p. RA154-63.
124. Seruya, M., A. Shah, D. Pedrotty, T. du Laney, R. Melgiri, J.A. McKee, H.E. Young, and L.E. Niklason, Clonal population of adult stem cells: life span and differentiation potential. *Cell Transplant*, 2004. **13**(2): p. 93-101.
125. Caplan, A.I., Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 1991. **9**(5): p. 641-50.
126. Prockop, D.J., Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997. **276**(5309): p. 71-4.
127. Conget, P.A. and J.J. Minguell, Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*, 1999. **181**(1): p. 67-73.
128. Alhadlaq, A. and J.J. Mao, Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *J Dent Res*, 2003. **82**(12): p. 951-6.
129. Alhadlaq, A. and J.J. Mao, Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev*, 2004. **13**(4): p. 436-48.
130. Petersen, B.E., W.C. Bowen, K.D. Patrene, W.M. Mars, A.K. Sullivan, N. Murase, S.S. Boggs, J.S. Greenberger, and J.P. Goff, Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 1999. **284**(5417): p. 1168-70.
131. Mezey, E., K.J. Chandross, G. Harta, R.A. Maki, and S.R. McKercher, Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*, 2000. **290**(5497): p. 1779-82.

132. Brazelton, T.R., F.M. Rossi, G.I. Keshet, and H.M. Blau, From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, 2000. **290**(5497): p. 1775-9.
133. Orlic, D., J. Kajstura, S. Chimenti, I. Jakoniuk, S.M. Anderson, B. Li, J. Pickel, R. McKay, B. Nadal-Ginard, D.M. Bodine, A. Leri, and P. Anversa, Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001. **410**(6829): p. 701-5.
134. Poulosom, R., M.R. Alison, T. Cook, R. Jeffery, E. Ryan, S.J. Forbes, T. Hunt, S. Wyles, and N.A. Wright, Bone marrow stem cells contribute to healing of the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14 Suppl 1**: p. S48-54.
135. Jiang, Y., B.N. Jahagirdar, R.L. Reinhardt, R.E. Schwartz, C.D. Keene, X.R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W.C. Low, D.A. Largaespada, and C.M. Verfaillie, Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002. **418**(6893): p. 41-9.
136. Simmons, P.J. and B. Torok-Storb, Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, 1991. **78**(1): p. 55-62.
137. Majumdar, M.K., M.A. Thiede, S.E. Haynesworth, S.P. Bruder, and S.L. Gerson, Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res*, 2000. **9**(6): p. 841-8.
138. Huss, R., Perspectives on the morphology and biology of CD34-negative stem cells. *J Hematother Stem Cell Res*, 2000. **9**(6): p. 783-93.
139. Majumdar, M.K., M.A. Thiede, J.D. Mosca, M. Moorman, and S.L. Gerson, Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*, 1998. **176**(1): p. 57-66.
140. Alsalameh, S., R. Amin, T. Gemba, and M. Lotz, Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(5): p. 1522-32.
141. Hayes, A.J., S. MacPherson, H. Morrison, G. Dowthwaite, and C.W. Archer, The development of articular cartilage: evidence for an appositional growth mechanism. *Anat Embryol (Berl)*, 2001. **203**(6): p. 469-79.

142. Lawman, M.J., P.D. Lawman, and C.E. Bagwell, Ex vivo expansion and differentiation of hematopoietic stem cells. *J Hematother*, 1992. **1**(3): p. 251-9.
143. Dowthwaite, G.P., J.C. Bishop, S.N. Redman, I.M. Khan, P. Rooney, D.J. Evans, L. Haughton, Z. Bayram, S. Boyer, B. Thomson, M.S. Wolfe, and C.W. Archer, The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 6): p. 889-97.
144. Jones, P.H. and F.M. Watt, Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*, 1993. **73**(4): p. 713-24.
145. Salter, D.M., J.L. Godolphin, and M.S. Gourlay, Chondrocyte heterogeneity: immunohistologically defined variation of integrin expression at different sites in human fetal knees. *J Histochem Cytochem*, 1995. **43**(4): p. 447-57.
146. Chevalier, X., P. Claudepierre, N. Groult, L. Zardi, and W. Hornebeck, Presence of ED-A containing fibronectin in human articular cartilage from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1996. **23**(6): p. 1022-30.
147. Hayes, A.J., G.P. Dowthwaite, S.V. Webster, and C.W. Archer, The distribution of Notch receptors and their ligands during articular cartilage development. *J Anat*, 2003. **202**(6): p. 495-502.
148. Ustunel, I., A.M. Ozenci, Z. Sahin, O. Ozbey, N. Acar, G. Tanriover, C. Celik-Ozenci, and R. Demir, The immunohistochemical localization of notch receptors and ligands in human articular cartilage, chondroprogenitor culture and ultrastructural characteristics of these progenitor cells. *Acta Histochem*, 2008. **110**(5): p. 397-407.
149. Diaz-Romero, J., J.P. Gaillard, S.P. Grogan, D. Nestic, T. Trub, and P. Mainil-Varlet, Immunophenotypic analysis of human articular chondrocytes: changes in surface markers associated with cell expansion in monolayer culture. *J Cell Physiol*, 2005. **202**(3): p. 731-42.
150. Khan, I.M., J.C. Bishop, S. Gilbert, and C.W. Archer, Clonal chondroprogenitors maintain telomerase activity and Sox9 expression during extended monolayer culture and retain chondrogenic potential. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009. **17**(4): p. 518-28.
151. Williams, R., I.M. Khan, K. Richardson, L. Nelson, H.E. McCarthy, T. Anabalsi, S.K. Singhrao, G.P. Dowthwaite, R.E. Jones, D.M. Baird, H. Lewis, S. Roberts, H.M. Shaw, J. Dudhia, J. Fairclough, T. Briggs, and C.W. Archer, Identification and clonal characterisation of a progenitor

cell sub-population in normal human articular cartilage. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13246.

152. Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, and E. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006. **8**(4): p. 315-7.
153. McCarthy, H.E., J.J. Bara, K. Brakspear, S.K. Singhrao, and C.W. Archer, The comparison of equine articular cartilage progenitor cells and bone marrow-derived stromal cells as potential cell sources for cartilage repair in the horse. *Vet J*, 2012. **192**(3): p. 345-51.
154. Nelson, L., J. Fairclough, and C.W. Archer, Use of stem cells in the biological repair of articular cartilage. *Expert Opin Biol Ther*, 2010. **10**(1): p. 43-55.
155. Muller, B. and D. Kohn, [Indication for and performance of articular cartilage drilling using the Pridie method]. *Orthopade*, 1999. **28**(1): p. 4-10.
156. Minas, T., A.H. Gomoll, R. Rosenberger, R.O. Royce, and T. Bryant, Increased failure rate of autologous chondrocyte implantation after previous treatment with marrow stimulation techniques. *Am J Sports Med*, 2009. **37**(5): p. 902-8.
157. Steinwachs, M., New technique for cell-seeded collagen-matrix-supported autologous chondrocyte transplantation. *Arthroscopy*, 2009. **25**(2): p. 208-11.
158. Schnabel, M., S. Marlovits, G. Eckhoff, I. Fichtel, L. Gotzen, V. Vecsei, and J. Schlegel, Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. **10**(1): p. 62-70.
159. Goessler, U.R., P. Bugert, K. Bieback, H. Sadick, A. Baisch, K. Hormann, and F. Riedel, In vitro analysis of differential expression of collagens, integrins, and growth factors in cultured human chondrocytes. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2006. **134**(3): p. 510-5.
160. Schulze-Tanzil, G., P. de Souza, H. Villegas Castrejon, T. John, H.J. Merker, A. Scheid, and M. Shakibaei, Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res*, 2002. **308**(3): p. 371-9.
161. Goessler, U.R., K. Hormann, and F. Riedel, Tissue engineering with chondrocytes and function of the extracellular matrix (Review). *Int J Mol Med*, 2004. **13**(4): p. 505-13.

162. Hubka, K.M., R.L. Dahlin, V.V. Meretoja, F.K. Kasper, and A.G. Mikos, Enhancing Chondrogenic Phenotype for Cartilage Tissue Engineering: Monoculture and Co-culture of Articular Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014.
163. Yavropoulou, M.P. and J.G. Yovos, The role of notch signaling in bone development and disease. *Hormones (Athens)*, 2014. **13**(1): p. 24-37.
164. Henson, F.M., E.A. Bowe, and M.E. Davies, Promotion of the intrinsic damage-repair response in articular cartilage by fibroblastic growth factor-2. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005. **13**(6): p. 537-44.
165. Grogan, S.P., S. Miyaki, H. Asahara, D.D. D'Lima, and M.K. Lotz, Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 2009. **11**(3): p. R85.
166. Khan, I.M., E.A. Palmer, and C.W. Archer, Fibroblast growth factor-2 induced chondrocyte cluster formation in experimentally wounded articular cartilage is blocked by soluble Jagged-1. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010. **18**(2): p. 208-19.
167. Kouri, J.B., C. Arguello, M. Quintero, A. Chico, and M.E. Ramos, Variability in the cell phenotype of aggregates or "clones" of human osteoarthritic cartilage. A case report. *Biocell*, 1996. **20**(3): p. 191-200.
168. von der Mark, K., T. Kirsch, A. Nerlich, A. Kuss, G. Weseloh, K. Gluckert, and H. Stoss, Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum*, 1992. **35**(7): p. 806-11.
169. Pretzel, D., S. Linss, S. Rochler, M. Endres, C. Kaps, S. Alsalameh, and R.W. Kinne, Relative percentage and zonal distribution of mesenchymal progenitor cells in human osteoarthritic and normal cartilage. *Arthritis Res Ther*, 2011. **13**(2): p. R64.
170. Ozbey, O., Z. Sahin, N. Acar, and I. Ustunel, Distribution of CD105 and CD166 positive cells in the proximal epiphysis of developing rat humerus. *Histol Histopathol*, 2010. **25**(11): p. 1437-45.



## ÖZGEÇMİŞ

Özlem ÖZBEY, 1981 yılında Denizli’de doğdu. 1992 yılında Namık Kemal İlkokulu’ndan, 1996 yılında Akdeniz Koleji orta kısmından ve 1999 yılında Antalya Lisesi’nden mezun oldu. 2000-2004 yılları arasında Eskişehir Osmangazi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü bitirerek lisans eğitimini tamamladı. Yüksek lisans eğitimini, 2008 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında tamamladı. Yüksek lisans eğitiminden sonra 2008 yılında 5 ay süre ile Cardiff Üniversitesi, Bağ doku laboratuvarlarında çalıştı. Sonrasında, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında doktora programına başladı. Doktora eğitimi sürecinde, TÜBİTAK 2214 (Doktora öğrencileri için yurtdışı araştırma bursu) bursu ile Cardiff Üniversitesi, Bağ doku laboratuvarlarında çalışmalar yaptı. Yüksek lisans ve doktora eğitimi dönemlerinde Science Citation Index ve Science citation Index-expanded’a kayıtlı dergilerde yayımlanmış 9 makale çalışması bulunan Özlem ÖZBEY, 8’i uluslararası olmak üzere 36 bildiriye sahiptir. 2005 yılından beri Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.