



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**“MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE CONDITIONED
MEDIUM’UN KIKIRDAK GREFT YAŞAYABİLİRLİĞİNE
ETKİSİ ”**

Abdullah ÜNLÜ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Gör. Mustafa SÜTÇÜ**

Konya-2021

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**“MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE CONDITIONED
MEDIUM’UN KIKIRDAK GREFT YAŞAYABİLİRLİĞİNE
ETKİSİ”**

Abdullah ÜNLÜ
TIPTA UZMANLIK TEZİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Gör. Dr. Mustafa SÜTÇÜ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından **21122001** proje numarası ile desteklenmiştir.

Konya-2021

1.GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Amaç.....	1
1.2. Genel Bilgiler	2
1.2.1 Kıkırdak Doku	2
1.2.1.1. Kıkırdak Doku ve İşlevi	2
1.2.1.2. Kondrosit Yapı ve İşlevi	7
1.2.1.3. Kıkırdak Rejenerasyonu.....	8
1.2.2 Kök Hücre ve Diferansiasyon.....	9
1.2.2.1. Kök Hücre Tanımı ve Tarihçesi.....	9
1.2.2.2. Mezenkimal Kök Hücre	13
1.2.2.3. Kondrojenik Diferansiyasyon	14
1.2.3 Conditioned Medium	15
2. GEREÇ VE YÖNTEM	16
2.1. Deney hayvanları.....	16
2.1.1. Deney hayvanlarının temini ve bakımı	16
2.1.2. Deney hayvanlarının seçimi.....	18
2.2. Deney gruplarının belirlenmesi	18
2.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Eldesi ve Kültüre Edilmesi.....	18
2.3.1. Hücrelerin Çözülmesi ve Ekimi.....	18
2.3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyon Analizleri	19
2.3.3. Hücrelerin Tripsinizasyonu, Pasajlanması Ve Dondurulması	19
2.3.4. Hücrelerin Sayılması.....	20
2.4. Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler Ait Koşullandırılmış Besiyerinin Hazırlanması.....	20
2.5. Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Ve Koşullandırılmış Besiyerinin Enjeksiyon İşlemleri İçin Hazırlanması	21
2.6. Cerrahi İşlemlerin Yapılması	21
2.6.1. Anestezi	28
2.6.2. Kıkırdak greft modeli oluşturulması.....	28

2.6.3. Cerrahi sonrası takip	30
2.6.4. Kıkırdak greftin çıkarılması.....	30
2.6.5. Ötenazi Uygulanması.....	32
2.7. Değerlendirme yöntemleri.....	32
2.7.1. Histolojik değerlendirme	32
2.7.1.1 Hemotoksilen-Eozin Boyama	33
2.7.1.2. Masson Trikrom Boyama.....	34
2.7.2. İmmünohistokimyasal değerlendirme.....	34
2.7.3. Elektron mikroskobik değerlendirme	35
2.8. İstatistiksel Analiz	37
3. BULGULAR	38
3.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyon Sonuçları.....	38
3.2. Histolojik Değerlendirme Sonuçları.....	38
3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme Sonuçları	40
3.4. Elektron Mikroskobik Değerlendirme Sonuçları	42
3.5. İstatistiksel Analiz Sonuçları	42
4. TARTIŞMA	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	52
6. KAYNAKLAR	53
7. ÖZET.....	58
8. SUMMARY	61
9. EK: Etik Kurul Kararı	64
10. ÖZGEÇMİŞ.....	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

CM	: Conditioned medium
MSC	: Mezenkimal kök hücre
BMP	: Kemik morfogenez protein
bFGF	: Bazik fibroblast büyüme faktörü
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medium
ECM	: Ekstrasellüler matriks
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ESC	: Embriyonic stem cell, Embiyonik kök hücre
GAG	: Glikoz amino glikan
IPS	: İndüklenmiş pluripotent kök hücre
PBS	: Fosfat tamponlu salin
TGF- β	: Transforming Growth Factor- β
VEGF	: Vasküler endotelial growth faktör
FGF	: Fibroblast growth faktör

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1: Kıkırdak doku mühendisliğinde bugüne kadar kullanılan hücre kaynakları

Tablo 1.2: Bugüne kadar kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan ve karşılaştırması yapılan hücre kaynakları

Tablo 3.1: Kök hücrelerin karakterizasyon analizleri

Tablo 3.2: Kök hücrelerin karakterizasyon analizleri

Tablo 3.3: Hasar, kök hücre ve conditioned medium gruplarının greft doku insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu (A), kulak kıkırdağı insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu (B) ve greftin çevre kıkırdak ile entegrasyonu (C) açısından istatistiksel olarak kıyaslanması

Tablo 3.4: Hasar, kök hücre ve conditioned medium grupları arasında tip II kollajen ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak kıyaslanması

ŞEKİLER LİSTESİ

Şekil 1.1: Kök hücrenin diferansiasyon yolağı

Şekil 2.1: New Zealand tavşan

Şekil 2.2: Kafesler ve saklanma ortamları

Şekil 2.3: Enjekte edilen kök hücre ve conditioned medium

Şekil 2.4: Tavşanlara anestezi verilip her 2 kulak posterior tıraş edildi. Tavşanlar supin pozisyona alındı

Şekil 2.5: Supin pozisyonda tavşan kulaklarına posteriordan yaklaşıldı. Povidion iodür ile antisepti sağlandı

Şekil 2.6: 15 bistüri ile oblik kesi yapılması

Şekil 2.7: Kıkırdığın ortaya çıkarılması

Şekil 2.8: 10mm çapında punch biopsi iğnesi ile alınacak kıkırdak greftin sınırlarını belirleme

Şekil 2.9: İnce uçlu elevatör yardımıyla greftin eleve edilmesi

Şekil 2.10: Elevasyon sırasında anterior perikodriumun korunması

Şekil 2.11: 10x10 mm boyutunda kıkırdak greft

Şekil 2.12: Kıkırdak greftin tekrar yerine yerleştirilmesi

Şekil 2.13: 5.0 yuvarlak prolen ile greft yerine adapte edilmesi

Şekil 2.14: Cilt sütürasyonu ve povidion iodür ile pansuman yapılması

Şekil 2.15: Kulağın anterior yüzünün görüntüsü, herhangi bir insizyon bulunmamaktadır

Şekil 2.16: Kıkırdak greft modeli

Şekil 2.17: Kıkırdak grefte 0.5 cc conditioned medium ve 0.5 cc (2×10^6) mezenkimal kök hücre enjekte edilmesi

Şekil 2.18: Kıkırdak greftlerin 120 gün sonra eski insizyondan girilerek explore edilmesi

Şekil 2.19: Kıkırdak greft etrafında 5 mm sağlam kıkırdak içerecek şekilde en-blok anterior cilt ile birlikte eksize edilmesi

Şekil 2.20: Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

Şekil 2.21: Ultramikrotom

Şekil 3.1: A: Hematoksilen-eozin boyaması,

Şekil 3.1: B: Masson Trikrom boyaması. Hasar, kök hücre ve conditioned medium gruplarının histolojik olarak değerlendirilmesi. (10X; insert: 4X)

Şekil 3.2: A: Hasar grubunda tip II kollajen ekspresyon seviyelerinin immünohistokimyasal analizleri

Şekil 3.2: B: Kök hücre grubunda tip II kollajen ekspresyon seviyelerinin immünohistokimyasal analizleri

Şekil 3.2: C: Conditioned medium grubunda tip II kollajen ekspresyon seviyelerinin immünohistokimyasal analizleri

Şekil 3.3: Hasar grubunda morfolojisi bozulmuş kondrosit

1. GİRİŞ

Giriş ve Amaç

Travma, tümör rezeksiyonları, konjenital anomali onarımı ve estetik cerrahide sık kullanılmasından dolayı kıkırdak greftlerinin popülerliği giderek artmaktadır. Vücudumuzda kıkırdak grefti için donör alanlar sınırlıdır. Kıkırdağın beslenmesi cilt ve kemik dokunun aksine difüzyon ile sağlamaktadır. Bu da kıkırdak greftinin yaşayabilirliğini azaltmaktadır. Greft sonrası geç dönemde kıkırdak greftinin boyutunda azalma, şeklinin değişmesi ve rezorbe olması problemlerin başında gelmektedir (Bulam, Ayhan et al. 2015).

Geleneksel plastik cerrahi yöntemleri ile organların işlevsel bozuklukları ve eksiklikleri “benzeri benzer ile onar prensibi” ile sağlanmaktadır. Bu klasik yaklaşım, alıcı alan morbidite sorunlarına neden olmaktadır. Ancak rejeneratif tıp uygulamaları hücre, doku ve organların yapı ve fonksiyonlarını kök hücreler yoluyla yeniden kazanmasını sağlayarak donör alan problemlerinin önüne geçebilmektedir (Johnson, Zhu et al. 2012).

Rejeneratif tıp uygulamalarında kök hücre kullanımının popüler olması ile birlikte aynı zamanda plastik ve estetik cerrahide kullanımı da giderek artmaktadır. Son yıllarda mezenkimal kök hücrenin sadece hayvan deneylerinde değil insanlar üzerinde de yüz gençleştirme, osteoartrit gibi estetik ve eklem problemlerinde kullanımı mevcuttur (Kim, Oh et al. 2017). Mezenkimal kök hücreler kendi kendilerini yenileyebilme, farklı dokulara diferansiye olabilmesi ve immünomodülatör özellikleri nedeniyle rejeneratif tıpta önemli bir yere sahiptir. Mezenkimal kök hücreler enjekte edildikleri yerde osteosit, adiposit ve kondrosite dönüşebilme potansiyeline sahiptirler (Goldberg, Mitchell et al. 2017). Bu multipotent hücreler kemik iliği kaynaklı olabileceği gibi yağ doku, kan, dişten de elde edilebilir. Yağ dokudan elde edilen kök hücre kemik iliği kaynaklı kök hücreye göre daha kolay elde edilmesi ve donör alan problemleri nedeniyle günlük pratikte daha sık tercih edilmektedir (Oh, Park et al. 2018).

Yüzdeki estetik üniteleri oluşturan kulak ve burunun büyük kısmı kıkırdak dokudan oluşmaktadır. Kıkırdak dokunun özellikle intrinsik rejenerasyon kapasitesinin yetersiz oluşu yeniden yerine konmasını gerektirir. Modern tıpta kıkırdak rekonstrüksiyonu alloplastik materyal, allojenik kıkırdak greftleri ve otojen greftlerle yapılmaktadır. Allojenik kıkırdak greftlerinin enfeksiyona neden olması ve yüksek rezorpsiyon nedeniyle kullanımı sınırlıdır (Xu, Yang et al. 2018). Sentetik alloplastik materyallerde yüksek ekpozisyon ve enfeksiyon oranları bildirilmiştir (Borakati, Mafi et al. 2018). Günümüzde otolog kıkırdak greft kullanımı en iyi rekonstrüksiyon seçeneği olarak görülmektedir. Ancak alıcı alan morbiditeleri oluşturması otolog greft kullanımını sınırlar.

Mezenkimal kök hücrenin besi yeri olan conditioned medium; kök hücrelerin canlılığını koruduğu gibi onların diferansiasyonuna da neden olur. Mezenkimal kök hücreler kondrojenik diferansiasyon özellikleri sayesinde yeni kıkırdak oluşumunu ve kıkırdak greftin yaşayabilirliğini arttırmaktadır. Conditioned medium'un içerisinde bulunan büyüme faktörleri ve ekzosomlar sayesinde ortamda bulunan kondrositleri tetiklediği, kıkırdak üretimini arttırdığı ve kıkırdak greft yaşayabilirliğini arttırdığı düşünülmektedir (Chen, Sun et al. 2019).

Bu çalışmanın amacı mezenkimal kök hücre ve conditioned medium'un kıkırdak greft yaşayabilirliğine etkisinin gösterilmesidir. Çalışmada aynı zamanda mezenkimal kök hücre ve conditioned mediumun kıkırdak greftinin iyileşmesine etkisi kıyaslanarak kök hücrenin enjekte edilmediği ve yan etkilerinin ekarte edildiği, sadece büyüme faktörleri ve ekzosomların olduğu conditioned mediumun histolojik ve immünohistokimyasal etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Genel Bilgiler

1.2.1 Kıkırdak Doku

1.2.1.1. Kıkırdak Doku ve İşlevi

Kıkırdak yetişkin insanda, uzun kemiklerin eklem yüzeylerinde, trakea, bronşlar, burun, kulaklar, larinks ve intervertebral disklerde bulunan önemli bir destek dokudur. Kıkırdak hücreleri, lifler ve şekilsiz amorf moleküllerden oluşur.

Kan damarı ve sinir içermez. Yetişkin kemiklerin çoğu fetal yaşamda kıkırdak öncüller olarak mevcuttur. Temelde üç farklı kıkırdak tipi mevcuttur: hyalin, elastik ve fibröz kıkırdak (Caplan, Elyaderani et al. 1997).

Hyalin kıkırdak, insan vücudunda en yaygın kıkırdak tipidir. Hyalin kıkırdak kemiklerin eklem yüzeyinde, kostaların ön yüzeyi-sternum ile bileşkelerinde, larinkste, trakeada ve bronş ağacında bulunur. Hyalin kıkırdak aynı zamanda fetüslerin ve büyüyen çocukların kemiklerindeki epifiz plakalarında da bulunur.

Dış kulağın kulak kepçesi, dış kulak yolu duvarları, östaki borusu, epiglot ve larinksin bazı kısımlarında ise elastik kıkırdak bulunur (Seol, McCabe et al. 2012).

Fibroz kıkırdak intervertebral disklerin annulus fibrozusunda, simfisiz pubiste, büyük eklem yüzünde ve tendon-eklem kıkırdağı arasındaki bağlantılarda bulunur. İntervertebral diskler, dış bir fibrokartilaj tabakasından (annulus fibrosus) ve bağ dokusundan (nükleus pulposus) oluşan özel yapılardır. Tüm kıkırdak alt gruplarının vücudun işlevini sürdürmedeki önemine rağmen estetik ve rekonstrüktif cerrahide öncelikli olarak burun ve kulak kıkırdağına yerine koymak pratikte zorlayıcı olmaktadır (Koga, Engebretsen et al. 2009).

Sinovyal eklemdaki primer yük taşıyan yüzey fibröz eklem kıkırdağıdır. Eklem kıkırdağı zonal yapı göstermektedir. Yetişkin insanda eklem kıkırdağının büyük kısmının aselüler kısım oluştururken sadece %2'lik kısmını hücreler oluşturmaktadır (Stockwell 1979). Fetal hayatta kıkırdak hücre sayısı en fazlayken büyüme ile bu sayı azalmakta ve 20 ila 30 yılda en düşük seviyesine iner (Stockwell 1979). Kondrositler eklem kıkırdaklarında en önemli hücrelerdir. Tüm kondrositler hücre zarına bitişik periselüler alan ile çevrilidirler. Kıkırdak doku kondrositlerin sentezlediği hücre dışı matriks ile çevrelenmiştir (Zhao, Hwang et al. 2017).

Hyalin kıkırdak yapısı birçok çalışmaya konu olmuştur. Bu durumun tersine elastik kıkırdak daha az ilgi çekmiştir (Cox and Peacock 1977). Elastik kıkırdak oldukça esnek, bükülebilir elastik fibrillerden zengin kıkırdak türüdür. Her ne kadar mikroskopik bakı altında hyalin kıkırdağa çok benzese de makroskopik olarak sarı rengi ile ayırt edilebilir. Bu kıkırdak tipine ismini veren ancak görünmeyen elastik

lifleri göstermek için özel boyama yöntemleri kullanılır. Hiyalin gibi, elastik kıkırdak da lakuna denilen boşluklara yerleşmiş tek veya çoklu kondrositlere sahiptir. Hücre dışı elastik kıkırdak matrisi daha yüksek seviyelerde tip II kollajen içerir. Kondrositler ve hücre dışı matris perikondrium olarak bilinen dış katman içinde bulunur. Perikondrium, iki farklı katmandan oluşur. İç katman, kondroblastları içerir (henüz hücre dışı matris içinde hapsolmemiş ve bu kalın jel benzeri matriksin bileşenlerini üretmeye devam eden kondrositler). Dış katman, iç katmana doğru ilerlerken kondrositlere farklılaşan fibroblastları barındırır. Bu hareket ve diferansiasyon sırasında, fibroblastlar tip I kollajen ve hyaluronik asit salgılamasını durdurur. Kondroblastlara dönüşürken tip II kollajen ve kondroitin sülfat salgılamaya başlar.

Elastik kıkırdak hücre dışı matrisi elastin, fibrilin, glikoproteinler, kollajen tip II, IX, X ve XI ve ağırlıklı olarak proteoglikan olan agrekan bulunur. Bu bileşenler perikondriumun iç kenarlarındaki kondroblastlar tarafından üretilir ve jel benzeri bir ortam sağlarlar. Kıkırdak içindeki kondrositler, toplam doku hacminin sadece % 2'sini oluşturur. Tüm kıkırdak tiplerinin hücre dışı matrisi, kıkırdakta baskın proteoglikan olan agrekan'ın etkisiyle suya (ozmotik etki) bağlanır. Bu osmotik etki, esnek fakat sağlam bir jel üretir. Agrekan yapısının bir parçası olan glikozaminoglikan (GAG) zincirleri suyu çeker ve dayanıklı elastik yapısını oluşturur. Diğer kollajen olmayan proteinler, sitokinlerle bağlanan veya hücre dışı matrisin organize edilmesine yardımcı olan GAG'lari içerir. Elastik kıkırdakta hücre dışı matristeki elastik lifler bu dokunun belirleyici özelliğidir. Elastik veya sarı lifler, fibrilini oluşturan lif benzeri elastik zincirlerle birlikte polimerize olan elastin proteinlerinden oluşur. Serbest haldeyken bu zincirler düzensizdir. Gerilme kuvvetleri bu zincirlerin tek formda dizilimine neden olur. Bu durum kıkırdakların orijinal pozisyonlarına geri dönmelerini sağlar. Kollajen lifleri benzer şekilde hücre dışı matristeki diğer moleküller için güç ve yapısal bir çerçeve sağlayan bir ağ oluşturur. Kollajen lifler, elastik liflerden farklı olarak her kıkırdakta yüksek miktarlarda bulunur. Kollajen lifleri ayrıca perikondrium içinde de bulunur; dış katman kollajen bakımından daha zengindir (Xue, Zhang et al. 2016).

Elastik kıkırdağın temelde iki işlevi bulunur. Birincisi dinlenme durumunda dönmeden önce gerilme, basma ve bükülmeye yanıt olarak şeklini değiştirebilmek, ikincisi ise güçlü fakat esnek bir yapı sağlamaktır.

Dış kulak göreceli olarak korunmasızdır. Elastik kıkırdağın sinirsiz, avasküler özellikleri ve esnek yapısı kulağın travmaya dayanıklılığını artırmaktadır. Esnek yapısıyla birlikte şeklinin muntazam biçimde korunması, sesleri iç kulağa yönlendiren kulak kepçesinde oldukça önem kazanır.

Elastik kıkırdak bunun dışında alar kıkırdaklar, epiglot gibi birçok valv görevi gören yapıda yaygın biçimde bulunur.

Kıkırdağın temel hücre dışı matris elemanları;

Kollajen tip II: Üçlü helikal yapıda bir glikoproteindir. 67 nm uzunluğunda kendini tekrarlayan yapıdadır. Moleküler ağırlığı 425 kDa olan bu molekül kıkırdağın ana yapısını oluşturur. Gerim kuvvetini önemli oranda bu molekül sağlar. Kondrositlerin dokuda adezyonunu destekler.

Kollajen tip IX: FACIT (Fibril ilişkili Aralıklı Üçlü Helikal Yapıda Kollajen Ailesi) grubu kollajenlere üye disülfid bağlı heterodimer yapıdadır. Moleküler ağırlığı 222 kDa olan bu molekül kıkırdakta fibriller ile diğer molekülleri ilişkilendirir. Tip II kollajen ile bağlıdır.

Kollajen tip XI: Küçük fibriller kollajen olan bu molekül 545 kDa ağırlığındadır.

Agrekan: Kondroitin sülfat proteoglikanı olan bu molekül 205 kDa ağırlığındadır. Yapısında %87 kondroitin sülfat %6 keratan sülfat bulundurulur. Kıkırdağın kuru ağırlığının %10'u agrekandan oluşur. Kemikte rastlanmaz. Hyaluran ile etkileşime girer ve yüksek miktarda negatif yüklü yan gruplar içerir. Osmotik basıncı önemli miktarda bu molekül sağlar. Birincil görevi kollajen iskeletonun hidrasyonu ve dolgunluğunu sağlamaktır.

Hücre dışı matriksinde yüksek agrekan içeriği kıkırdağa kompresyon güçlerine dayanmayı sağlar. Agrekan, büyük multimoleküler komplekslerden hyaluronan içeren kompleks agregan proteoglikanlar ailesine aittir (Kirn-Safran, Gomes et al. 2004). Agrekan ailesine ait tüm moleküller hyaluronan ile bağlı amino

terminal grupları içerir. Hiyaluronan ile ilişkili moleküllerin kaybı eklem kıkırdaklarında dejenerasyonla sonuçlanabilir.

Link protein: Glikoprotein yapıda moleküler ağırlığı 45 kDa olan agrekan ve hiyaluronan arasında ilişki sağlayan proteindir.

Matris Gla protein: Glikoprotein yapıda moleküler ağırlığı 12 kDa olan molekül. Kemikte de bulunur. Kalsifikasyonun inhibisyonunu sağlar.

Ek olarak insan kıkırdağı üç dermatan sülfat proteoglikanı (biglikan, decorin, epifikan) ve iki keratan sülfat proteoglikanı (fibromodulin, lumikan) içerir. Tüm bu yapıların dışında ne proteoglikan ne de kollajen olan çok sayıda kıkırdak matris proteini bulunur.

Biglikan: Kıkırdağın temel küçük proteoglikan yapısının sağlar. Lösinden zengindir.

Fibromodulin: Kollajen tip I ve II ile bağlanır. Fibrillogenezi inhibe eder.

Kıkırdak matris protein: Disülfid bağlı 54 kDa ağırlığında bir proteindir. Amino asit dizilimi von Willebrand faktör ile çok benzer olan bu molekül eklem dışı kıkırdağın ana yapısını oluşturur. Özellikle trakea, burun ve epifizyel kıkırdakta görülür. Trakeanın ıslak ağırlığının %5'ini oluşturur.

Hiyaluronan: Yüksek moleküler kütleli bu molekül glukronik asit ve N-asetil glukozamin ko-polimeridir. Hücre plazma membranında sentezlenir. Yüksek dönüşüm hızına sahiptir. Doku oluşumu ve diferansiasyonunda rol oynar. Su ve plazma protein homeostazisinde önemlidir.

S100 protein: Asidik kalsiyum bağlayan 21 kDa ağırlığında moleküldür. Çok çeşitli yapıda bulunabilir. İşlevi tam olarak bilinmese de kondrosit belirteci olarak kullanılır. Kemiği kıkırdaktan ayırır. Daha çok hücre içinde oluşu nedeniyle kalsiyum reseptör proteinlerinde görev yaptığı, hücre büyümesi, hücreler arası iletişimi sağladığı ileri sürülmüştür (Stefansson, Wollmann et al. 1982).

1.2.1.2. Kondrosit Yapı ve İşlevi

Kondrositler kıkırdığın ana hücreleridirler. Kondrositler her zaman mezenkimal hücrelerden, kondrosit prokürsör hücrelerden oluşurlar. Kendilerine özel belirteçleri olmayan bu progenitör hücreler tip I ve II kollajen, fibronektin, proteoglikan gibi sentezledikleri moleküller özel boyalarla boyanması ile tanınırlar (Dessau, von der Mark et al. 1980).

Kondrositler üst ekstremitede, vertebrada mesodermden, kraniyal kıkırdaklarda ise ektodermden köken alırlar. Ancak hiçbir anatomik yerleşimde endodermden kaynak almazlar. Yetişkin hayat boyunca kök hücreler kondrojenik potansiyellerini sürdürürler. Özellikle kırık alanlarda ve iyileşme alanlarında bu potansiyeller gözlenebilir. Prekondrojenik hücreler, gelişimin tüm aşamalarında embriyonun farklı bölümlerinde ortaya çıkarlar. Erken dönemlerde embriyoda somit ve ekstremitte tomurcuk mezenkiminde kondrojenik farklılaşması başlamaktadır. Bunu takiben nöral krest hücrelerinin oküler, otik ve mandibular kıkırdaklara göçü başlar. Kondrojenik öncül hücreler, Hint hedgehog (Ihh), Kemik Morfogenik Protein (BMPs) ve Paratiroid Hormon (PTH), Paratiroid Hormon Related Peptit (PTHrP) gibi çeşitli sinyal moleküllerinin aracılık ettiği farklılaşma yolunu takip eder (Jüppner 2000).

Kondrositler; kıkırdak dokunun hücresel yönünü oluştururlar ve endokondral ossifikasyon sürecinde kemik oluşumunda merkezi bir rol oynarlar. Endokondral ossifikasyon süreci osteoblastlarla kondrositler arasındaki yakın işlevsel ilişkinin bir örneğidir. Endokondral kemikleşme ile avasküler bir kıkırdak şablonunun yerine vaskülarize, mineralize bir doku oluşur. Bu yoğun öncül hücreler daha sonra osteojenik ya da kondrojenik yol boyunca farklılaşır.

Epifiz büyüme plakasının oluşumu, kondrositin farklılaşma yolu için iyi bir örnektir. Büyüme plakasında farklılaşan kondrositler, farklı katmanlar halinde düzenlenir. Dinlenme durumunda ve proliferatif dönemdeki kondrositler epifizin proksimalinde bulunurken, hipertrofik ve apoptoz kondrositler diyafiz yakınında bulunur. Bu farklılaşma yolu boyunca her aşamada, kondrositler kollajenlerin, proteoglikanların ve diğer matris moleküllerinin farklı bir kompozisyonunu salgırlar (Karsenty and Wagner 2002). Hipertrofik kondrositler, hücre dışı

matrislerini aktif olarak parçalayan veya mineralize eden enzimler içeren vezikülleri barındırırlar (Wuthier, Chin et al. 1985). Bu hücreler apoptoza maruz kaldıkça onlardan geriye kalan doku boşluğu daha sonra kan damarları, osteojenik hücreler ve mezenkimal prekürsörler ile doldurulur. Sonuçta yeni trabeküler kemik oluşumunu sağlarlar (Karsenty 2001).

Olgun kondrositler sferik şekilli girintili kenarları ile beraber oldukça kaba endoplazmatik retikulum ve golgi aparatı ile tanınabilirler. Toluidin mavisi veya Giemsa boyaları ile metakromatik olarak lekelenen yoğun hücre dışı matris gözlenir. Kondrositler proteoglikan granüllerinin gömülü olduğu, 20-70 nm kalınlığında kollajen fibril tabakası ile çevrilidir. İn vivo çalışmalar kondrosit gelişimi sürecinde kollajen ekspresyonunda değişimler olduğunu göstermiştir. Kondrosit öncü hücreleri birincil olarak tip III kollajeni üretirlerken, olgunlaşan kondrositler tip II ekspresyonunu gösterirler. Daha sonra tip X kollajen üretimi de buna eklenir (Reddi, Gay et al. 1977). Buna karşılık, kalsifiye kıkırdak bölgesindeki kondrositler genellikle kalın, çapraz bağlı tip I kollajen fibrillerini içerir.

Hücre iskeletin gen ekspresyonundaki rolü henüz tam olarak çözülememiştir. Kondrositlerin hücre dışı matrisine transmembran protein bağlantıları yoluyla sabitlendiği varsayılmaktadır. Transmembran bağlantıları (fibronexus adı verilen membran bileşeni ile hücre içi aktin filamentlerine bağlanan fibronektin vb.) muhtemelen fibronektin reseptörünü içerir ve vinculin ile ilişkilidir. Böylece periselüler bölgeden bilgilerin çekirdeğe aktarılması mümkün olur. Bu yol ile kondrojenik farklılaşma süreci nukleus tarafından yönetilebilir (Guilak and Mow 2000).

Kondrositler patolojik koşullarda, düşük oksijen basınçlı bir ortamda var olma yeteneği bakımından benzersizdirler. Ancak rejenerasyon kapasiteleri yine aynı nedenlerle oldukça kısıtlıdır.

1.2.1.3. Kıkırdak Rejenerasyonu

Kıkırdak doku yavaş hücre döngüsüne sahip metabolik olarak aktif bir dokudur. Kıkırdakın intrinsik tamir kapasitesi oldukça düşüktür. Küçük lezyonlar

veya yaralanmalar bile ilerleyici hasarlara yol açabilir (Coutts, Healey et al. 2001). Sadece bazı durumlarda kendiliğinden iyileşme mümkün olur.

Her dokudaki hasar, hücre kaynaklı farklı bir onarım sürecini başlatır (Buckwalter and Mow 1992). Kondrositlerin matris bileşimindeki değişimleri algılama ve yeni molekül sentezleme kabiliyeti onarım işleminin temelini oluşturur (Martin and Buckwalter 2002). Vaskülaritesinin olmaması ve diferansiye olmayan hücrelerin kıkırdakta çok az oluşu onarım süreçlerini olumsuz etkileyen iki ana faktördür. Kondrositler aşağıda sıralanan belli koşullarda onarım özelliklerini gösterebilir.

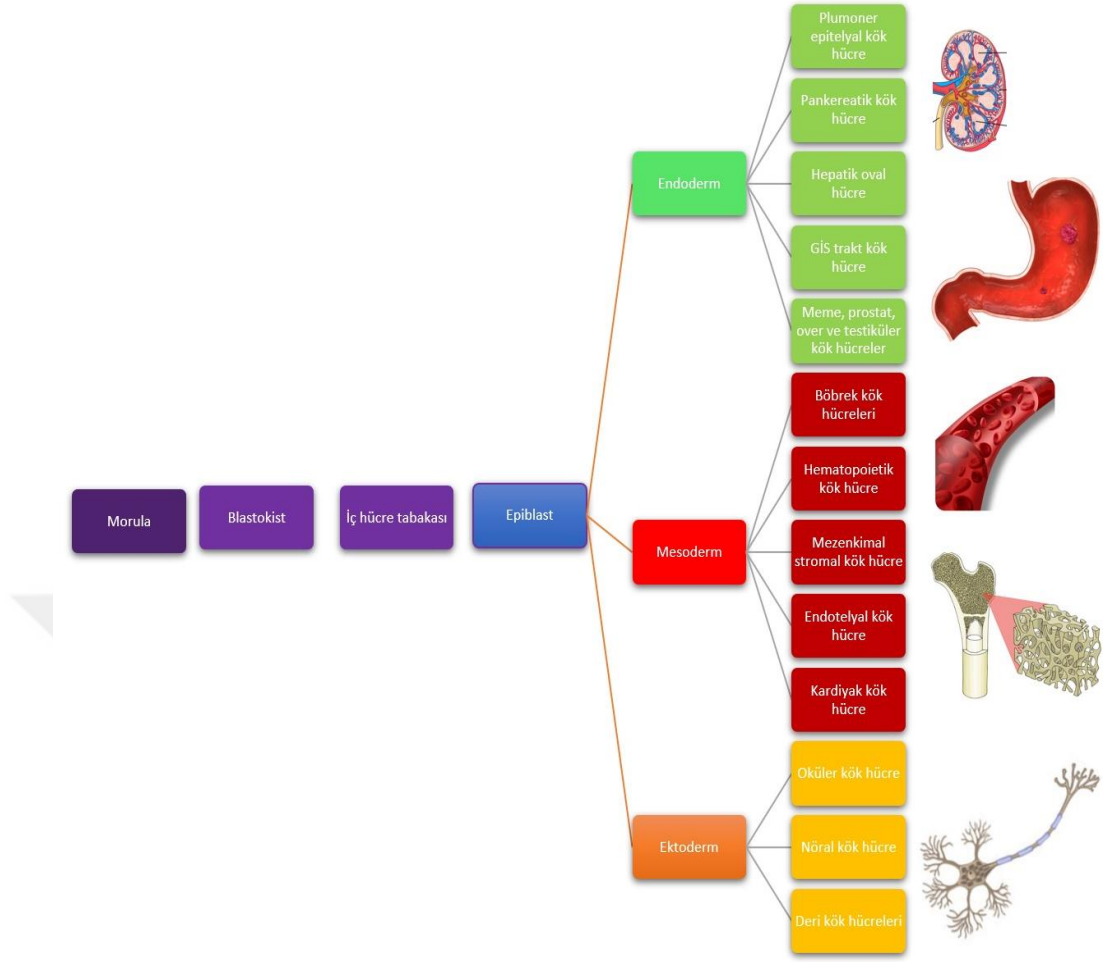
- Matriks proteoglikanlarındaki kaybın, hücrelerin süratle çoğalmasını engellemeyecek ölçüde az olması,
- Fibriler kollajen ana iskenin tam kaybedilmemiş olması,
- Doku iskelesini onaracak kapasitede kondrosit varlığı.

Yüzeysel hasarlar oluştuğunda defekt kenarında kondrositler çoğalır ve matris makromoleküllerinin sentezini artırır. Çoğu kez sentezlenen matriks ve çoğalan hücreler, doku onarımını tam olarak tamamlayamaz.

1.2.2 Kök Hücre ve Diferansiasyon

1.2.2.1. Kök Hücre Tanımı ve Tarihçesi

Doku mühendisliğinde ksenojenik, allojenik ve otojenik kaynaklardan elde edilen belirli tanımlanmış hücreler veya kök hücreler kullanılmaktadır (Tablo1.2)



Şekil 1.1: Kök hücrenin diferansiyasyon yolağı (Friedenstein 1990).

Kök hücreler, özel hücrelere diferansiye olabilen ve mitoz yoluyla daha fazla kök hücre oluşturmak için bölünebilen biyolojik farklılaşmamış hücrelerdir. Vücudun tüm doku ve organlarına temel hücre kaynağını oluştururlar (Şekil 1.1). Kök hücreler doku onarımı süreçlerinde farklı rollere aracılık etmeleri ile rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinde önemli kullanım alanları bulunmaktadır (Wang, An et al. 2014).

İnsan kıkırdak doku mühendisliği için hücre kaynağı olarak birçok farklı hücre tipi kullanılmıştır (Tablo 1.1). Bu hücre tiplerinin proliferatif kapasiteleri, kondrojenik diferansiyasyonu ve matris bileşenlerini sentezleme yetenekleri açısından karşılaştırmalı çalışmalar da yapılmıştır (Tablo1.2). Ancak herhangi bir hücre tipinin, kıkırdak doku üretimi için diğerlerinden üstün olduğu gösterilememiştir.

Tablo 1.2: Kıkırdak üretimi için bugüne kadar kullanılan hücre kaynakları.

Hücre Tipi	Kaynak
• Embriyonik kök hücre (ESC)	(Park and Im 2013)
• İndüklenmiş pluripotent kök hücre (IPS)	(Park and Im 2013)
○ Dermal fibrolasttan izole IPS	(Koyama, Miura et al. 2012)
○ Sinovyal hücrelerden izole IPS	(Kim, Son et al. 2011)
○ Kondrositlerden izole IPS	(Wei, Zeng et al. 2012)
○ Fetal nöral hücrelerden izole IPS	(Medvedev, Grigor'eva et al. 2010)
1. Mezenkimal kök hücre (MSC)	(Gardner, Archer et al. 2013)
○ Kemik iliği kaynaklı MSC	(Caplan 2007)
○ Yağ kaynaklı MSC	(Mahmoudifar and Doran 2010)
○ Umbilikal kord kanı kaynaklı MSC	(Pievani, Scagliotti et al. 2014)
○ Periferik kan kaynaklı MSC	(Tondreau, Meuleman et al. 2005)
○ Amniyotik sıvı kaynaklı MSC	(Kolambkar, Peister et al. 2007)
○ Plasenta kaynaklı MSC	(Li, Chen et al. 2012)
○ Umbilikal kord matrisi (Warton jeli) kaynaklı MSC	(Baksh, Yao et al. 2007)
○ Periost kaynaklı MSC	(Jansen, Emans et al. 2008)
○ Dental pulpa kaynaklı MSC	(Barachini, Danti et al. 2014)
○ Sinovyum kaynaklı MSC	(Chang, Chen et al. 2014)
○ Kas kaynaklı MSC	(Andriamanalijaona, Duval et al. 2008)
2. Tanımlanmış hücreler	
○ Fetal kondrosit	(Mahmoudifar and Doran 2005)
○ Neonatal kondrosit	(Saha, Kirkham et al. 2010)
○ Jüvenil kondrosit	(Adkisson IV, Martin et al. 2010)
○ Eklem kıkırdağı kaynaklı kondrosit	(Jakob, Demarteau et al. 2004)
○ Septum kıkırdağı kaynaklı kondrosit	(Tay, Farhadi et al. 2004)
○ Kosta kıkırdağı kaynaklı kondrosit	(Tay, Farhadi et al. 2004)
○ Kulak kepçesi kıkırdağı kaynaklı kondrosit	(Park, Jin et al. 2004)

Tablo 1.3: Bugüne kadar kıkırdak kullanılan ve karşılaştırması yapılan hücre kaynakları.

Karşılaştırması yapılan hücre kaynakları	İn vitro	İn vivo	Kaynak
Embriyonik kök hücre (ESC)- Dermal fibroblasttan izole IPS karşılaştırması	Var	Yok	(Liu, Goldberg et al. 2012)
Embriyonik kök hücre (ESC)- Dermal fibroblasttan izole IPS karşılaştırması	Var	Yok	(Koyama, Miura et al. 2012)
Embriyonik kök hücre (ESC)- Dermal fibroblasttan izole IPS karşılaştırması	Var	Var	(Cheng, Kapacee et al. 2014)
Kondrositlerden izole IPS- Eklem kıkırdağı kaynaklı kondrosit karşılaştırması	Var	Var	(Wei, Zeng et al. 2012)
Kemik iliği kaynaklı MSC- Yağ kaynaklı MSC	Var	Yok	(Kim and Im 2009)
Kemik iliği kaynaklı MSC- Yağ kaynaklı MSC- Periost kaynaklı MSC- Kas kaynaklı MSC- Sinovyum kaynaklı MSC	Var	Yok	(Sakaguchi, Sekiya et al. 2005)
Kemik iliği kaynaklı MSC- Umbilikal kord matrisi (Warton jeli) kaynaklı MSC	Var	Yok	(Baksh, Yao et al. 2007)
Kemik iliği kaynaklı MSC- Yağ kaynaklı MSC- Sinovyum kaynaklı MSC	Var	Var	(Kim, Kim et al. 2008)
Kemik iliği kaynaklı MSC- Kulak kepçesi kıkırdağı kaynaklı kondrosit- Neonatal kondrosit	Var	Yok	(Saha, Kirkham et al. 2010)
Kemik iliği kaynaklı MSC- Yağ kaynaklı MSC- Eklem kıkırdağı kaynaklı kondrosit- Septum kıkırdağı kaynaklı kondrosit- Kulak kepçesi kıkırdağı kaynaklı kondrosit	Var	Var	(Pleumeekers, Nimeskern et al. 2014)
Kemik iliği kaynaklı MSC- Fetal kondrosit	Var	Yok	(Mahmoudifar and Doran 2010)
Eklem kıkırdağı kaynaklı kondrosit- Septum kıkırdağı kaynaklı kondrosit	Var	Var	(Kafienah, Jakob et al. 2002)
Jüvenil kondrosit- Eklem kıkırdağı kaynaklı kondrosit	Var	Var	(Adkisson IV, Martin et al. 2010)
Kulak kepçesi kıkırdağı kaynaklı kondrosit- Septum kıkırdağı kaynaklı kondrosit- Kosta kıkırdağı kaynaklı kondrosit	Var	Yok	(Tay, Farhadi et al. 2004)

Kök hücre kavramı, 19. yüzyılın sonunda, bazı dokuların (kan, cilt, vb.), kısa süre olsa da kendini yenileyebilme yeteneğinin olabileceği varsayımı ile ortaya çıkmıştır (Berthiaume, Maguire et al. 2011). Yıllar sonra, kök hücrelerin ayrı bir antite olarak tanımlanması ile beraber, in vivo transplantasyonları sonrası gösterdikleri yüksek potansiyellerinin fark edilmesi bu konudaki çalışmaların sayısını artırmıştır.

Kıkırdak dokusu mühendisliğinde kök hücreler, kıkırdak onarımı için güvenilir adaydır. Kıkırdak doku mühendisliğinde embriyonik kaynaklı veya mezenkimal kaynaklı kök hücreler güncel çalışmalarda kullanılmaktadır (Tuan, Chen et al. 2013).

Mezenkimal kök hücre terimi ilk kez Caplan tarafından kullanılmıştır (Caplan 1991). Güncel mezenkimal kök hücre yaklaşımında, kemik iliği transplantasyonlarında kemik iliğinin ektopik kültüre edilebilmesi yol göstermiştir. Kemik iliği hücrelerinin nakli sonrası farkedilen osteojenik özelliklerinin, aslında küçük bir alt hücre grubu ile ilişkili olduğunu gösterilmesi kök hücre varlığının ilk kanıtlarındandır (Friedenstein 1990). Fark edilen bu alt grup hücrelerin hemapoetik hücrelerden farklı biçimde plastiğe hızla yapıştıkları gözlenmiştir. Aynı zamanda bu hücrelerin kültürlerinde fibroblast benzeri yapıda olmaları stroma kaynaklı olduğunu akla getirmiştir. Aynı yıllarda in vivo kök hücre transplantasyonu ile, birden fazla iskelet dokusunun (kemik, kıkırdak, adipoz doku ve fibröz doku) in vivo olarak üretilebileceği gösterilmiştir (Friedenstein 1990).

1.2.2.2. Mezenkimal Kök Hücre

Kendini yenileme kapasitesi oldukça yüksek olan mezenkimal kök hücreler birçok dokudan elde edilebilir. Mezenkimal yolak ile kondrositlere, osteoblastlara, adipositlere ve miyositlere farklılaşabilen bu hücrelerin, pluripotentten ziyade multipotent oldukları düşünülmektedir. Bununla birlikte, nöral hücreler, kardiyomiyositler, hepatositler, pankreas hücreleri ve endotel hücreleri dahil olmak üzere diğer hücre tiplerine farklılaşmalar da literatürde bildirilmiştir (Yang, Xiong et al. 2014). Bu nedenlerle pluripotent özellikler de göstermektedirler.

Embriyonik kök hücreler elde edilirken embriyoların imhası, tümör oluşturma eğilimi ve allojenik greftlerin immün red potansiyeli gibi dezavantajları bulunur. Ayrıca embriyonik kök hücreler önemli etik kaygılar içermektedir (Ben-David and Benvenisty 2011). Tümör oluşma ihtimali embriyonik kök hücrelerin klinik uygulamasını sınırlayan önemli bir engeldir, terminal diferansiasyon gösteren diğer kök hücrelerde ise bu durum daha az görülmektedir.

1.2.2.3. Kondrojenik Diferansiasyon

Günümüzde doğal kıkırdığın biyokimyasal ve işlevsel özelliklerini gösteren kıkırdak henüz üretilenmemiştir. Üretilen yapay kıkırdak dokular doğal kıkırdakla aynı hatta daha yüksek GAG konsantrasyonları içermesine rağmen, kollajen tip II içerikleri oldukça düşüktür (Kafienah, Cheung et al. 2008). Nispeten yüksek kollajen tip I seviyeleri ve göreceli olarak düşük kollajen tip II düzeyleri ile doğal kıkırdaktan uzak kompozisyon göstermektedirler (Somoza, Welter et al. 2014). Bu durum zayıf biyomekanik özelliklere ve düşük dayanıklılık düzeylerine sebep olur.

Kök hücreler greft sağ kalımını arttırmak için kullanıldığında kondrojenik diferansiasyonun kontrolü önemli bir aşamadır. Kültür ortamında diferansiasyonun başlatılması ve kondrositik fenotipi korumak için özel farklılaşma biyomolekülleri gerekir. Transforming Growth Factor - β (TGF- β) sitokin üyeleri, özellikle TGF- β 1 ve TGF- β 3, kıkırdak gelişiminin düzenlenmesinde birincil rol oynamaktadır. Bone Morfogenic Protein (BMP) ve Fibroblast Growth Faktör (bFGF) sitokinleri de kondrojenik indüksiyonu sağlar (Freyria and Mallein-Gerin 2012).

MSC kondrojenik diferansiasyonla kullanıldığında, agrekan ve kollajen tip II gibi anahtar kıkırdak belirteçleri üretebilmektedir. Ancak ortaya çıkan hücresel fenotip daha çok hipertrofik kıkırdaktır (Pelttari, Steck et al. 2008). Kollajen Tip X, matris metaloproteinaz 13 ve alkalın fosfataz gibi doku mineralizasyonu ve hipertrofi belirteçlerinin ekspresyonu, doğal olmayan matriks kompozisyonunu gösterir. Diferansiasyon kondrositik aşamada sonlanmak yerine, endokondral ossifikasyona doğru ilerler. Kondrojenik diferansiasyon esnasında hipertrofiye dönüşümü engellemek için, matriks iskele seçimi ve doku kaynağı, düzenleyici sitokinlerin uygulanması ve hipoksik doku kültür ortamı gibi önlemler alınmaktadır (Lee, Kim et al. 2013).

1.2.3 Conditioned Medium

Conditioned Medium (CM) mezenkimal kök hücrelerin besi yeri olarak tanımlanır. Kök hücreler bu besi yeri ile taşınır ve enjekte edilir. Contioned medium kök hücre içermeyen kısma verilen isimdir. Kök hücrelerin hangi yöne diferansiye olacağı henüz netlik kazanmamıştır. Ayrıca kanserojen etkileri olduğu bilinmekte olan kök hücrelerin ortamda bunu tetiklediğine dair çalışmalar bulunmaktadır. CM'un içerisinde büyüme faktörleri, sitokinler, enzimler, nükleik asitler ve biyoaktif lipidler bulunmaktadır (Tan, Tjio et al. 2021).

CM elde edilmesi nispeten daha kolaydır. Teröpotik ve kozmesötik olarak elde edilebilir. CM ürünleri daha önce karakterize edilse de CM'nin göreceli bir yeniliği nedeniyle klinik uygulamada terapötik olarak kullanımı, standartlaştırılmış yöntemlerle ürün karakterizasyonu ve potens parametreleri kesin olarak belirlenmemiştir ve bu parametreler önemli ölçüde değişebilir (Li, Ngo et al. 2019).

Spesifik sitoprotektif ve immünomodülatör faktörlerin seviyeleri, belirli bir klinik uygulama için gösterdikleri veya algılanan önemi bağlamında değerlendirilir. Bazı durumlarda CM hazırlığı, içerdiği proinflamatuvar faktörlerin, protein konsantrasyon seviyesine göre yapılır. Ancak bugüne kadar multifaktöryel ürün bileşiminin karakterizasyonu ve korelasyonu, güvenliği ve etki gücü son derece sınırlıdır (Chen, Chang et al. 2018).

CM içerisinde fibroblast growth faktör (FGF), vasküler endotelial growth faktör (VEGF), hepatosit growth faktör (HGF), sitokin, kemokin ve ekzosom sayesinde anjiogenezi ve yara iyileşmesini arttırdığı ve greft yaşayabilirliğini arttırdığı düşünülmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deney hayvanları

2.1.1. Deney hayvanlarının temini ve bakımı

Deneylerde kullanılan bütün tavşanlar Kobay Deney Hayvanları A.Ş. (Ankara, Türkiye)'den temin edildi (Şekil 2.1). Mezenkimal kaynaklı kök hücre izolasyonu ve çoğaltılması Tekgen Sağlık Hizmetlerinde gerçekleştirildi. Toplamda 21 adet New Zealand tipi tavşan kullanıldı.



Şekil 2.1: New Zealand tavşan

Tavşanlar zemin döşeme materyali olarak kaba çam talaşı kullanılarak, konvansiyonel polikarbon kafeslerde (Tecniplast, Varese, Italy) muhafaza edildi (Şekil2.2). Uygun sabit sıcaklık (24 °C) ve uygun sabit nemde (%45) tutularak deneyler tamamlandı. Kafesler 12 saat gündüz ve 12 saat gece döngüsünde, gürültüden ve titreşim yaratacak cihazlardan uzak odalarda tutularak barınma sağlandı. Pelet yem ve su ile yiyeceği kadar beslendiler.



Şekil 2.2: Kafesler ve saklanma ortamları

Deneyler başlamadan önce Kobay A.Ş. veteriner hekimi tavşanları değerlendirdi. Tavşanlarda beslenme yetersizliği, enfeksiyon ve açık yara gibi bulguların yanı sıra başka bir sağlık problemini işaret edecek herhangi bir bulguya rastlanmadığı doğrulandı. Cerrahi işlemler genel anestezi altında, veteriner hekim gözetiminde yapıldı. Tavşanların rutin bakımları işlem sonrası bakım odalarında yapıldı.

2.1.2. Deney hayvanlarının seçimi

Kıkırdak grefti iyileşmesi için mezenkimal kök hücre ve conditioned medium'un etkisini araştırmak için yaptığımız bu çalışmada immun negatif etkileri en aza indirmek için New Zealand türünde tavşan kullanılmasına karar verilmiştir (Serel, Cerkez et al. 2020).

2.2. Deney gruplarının belirlenmesi

21 New Zealand tavşan her grupta 7 fare olacak şekilde rastgele 3 gruba ayrıldı.

1. Grup: Kontrol grubu; sadece kıkırdak greft yapıldı.

2. Grup: Kök Hücre Grubu; kıkırdak greft sonrasında mezenkimal kök hücre enjekte edildi.

3. Grup: Conditioned Medium Grubu; kıkırdak greft sonrasında conditioned medium enjekte edildi.

2.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Eldesi ve Kültüre Edilmesi

Çalışmamızda köpek adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (cAD-MSC) kullanıldı. Hücreler Tekgen Sağlık Hizmetleri (İstanbul,Türkiye) firmasından "VetStem- D009/40" koduyla satın alındı. Mezenkimal kök hücrelerin büyütülmesinde %15 fetal sığır serumu (Sigma Aldrich-F7524), %2 L-glutamin (Sigma Aldrich- G6392) ve %1 antibiyotik-antimikotik solüsyon (Sigma Aldrich) ile desteklenmiş düşük glikozlu Dulbecco's Modified Eagle besiyeri (DMEM) (Biowest-L0060) - A5955) kullanıldı.

2.3.1. Hücrelerin Çözülmesi Ve Ekimi

-80°C'den alınan kriyo tüpler hızla 37°C'de çözündürüldü. Tüp içerisindeki süspansiyon 15 ml'lik tüplere aktarıldı ve üzerine 10mL önceden 37°C'ye getirilmiş besiyeri ilave edildi. Tüp 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet 5 ml besiyeri süspanse edildi ve 2 adet 25cm² flaska paylaştırıldı. 48 saat

boyunca hücreler %80 doyumluğa ulaşana kadar %5 CO₂ içeren bir atmosfer altında 37°C'lik bir inkübatörde kültüre edildi.

2.3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyon Analizleri

Uluslararası Hücre Terapisi Derneği'ne göre, bir hücrenin MSC olarak kabul edilebilmesi için; kök hücreler, CD105, CD146, CD73 yüzey antijenlerini yüksek düzeyde ve anti-HLA-DR, CD19, CD25 yüzey antijenlerini düşük seviyelerde ifade etmelidir.

Tekgen Sağlık Hizmetleri İstanbul firmasından “VetStem- D009/40” koduyla satın alınan mezenkimal kök hücrelere ait karakterizasyon analizleri “akış sitometrik yöntemle” firma tarafından gerçekleştirildi. Analizlere ait sonuçlar, çalışmanın sonuç bölümünde tablolar halinde sunuldu.

2.3.3. Hücrelerin Tripsinizasyonu, Pasajlanması Ve Dondurulması

25cm² flasklara ekimi yapılan hücreler %80 doyumluğa ulaştıktan sonra 75cm² flasklarda 13mL besiyeri içerisinde pasajlanarak çoğaltıldı. Hücrelerin besiyerleri üç günde bir taze besiyeri ile değiştirildi. Bu işleme ait deney basamakları aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

1. Flaskın içerisindeki besiyeri atıldı
2. Flask steril PBS ile yıkandı
3. Flasklara; 25cm² flask için 1-2 ml, 75cm² flask için 3-5mL önceden 37°Cye ısıtılmış tripsin/EDTA ilave edildi
4. Flask inkübatörde 4-5 dakika bekletildi.
5. Flask yüzeyinden ayrılan hücreler 15 ml'lik tüplere toplandı
6. Tüplere 5'er ml besiyeri ilave edildi
7. Tüpler 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi
8. Süpernatant atıldı
9. Pellet istenen miktarda, önceden 37 °C ye getirilmiş besiyeri içerisinde süspanse edildi

10. Hücre süspansiyonu sayıldı, seyreltilerek flasklara ve plakalara pasajlanarak donduruldu
11. Dondurulacak hücre süspansiyonuna 1:1 oranında soğuk %95 besiyeri, %5 DMSO ilave edildi. Elde edilen süspansiyon kriyo tüplere paylaştırılarak 20°C’de saklandı
12. -20°C’de bir saat bekletildikten sonra kriyo tüpler 3-4 hafta içerisinde çözülecekse -80°C’ye, uzun süre saklanacaksa sıvı nitrojende saklandı

2.3.4. Hücrelerin Sayılması

Yapılacak tüm deneylerde belirli sayıda hücrenin flasklara ekilmesi için hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre miktarının belirlenmesi gerekmektedir.

Sayım işlemi Tripan Mavisi boyaması kullanılarak yapılır. Yöntemin prensibi, membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin, Tripan Mavisi boyasını hücre içine almaları ve ölü hücre olarak değerlendirilmeleri veya membran bütünlüğünü koruyan hücrelerin ise membrandan boya geçişine izin vermemelerine dayanmaktadır.

75 cm²’lik flasklarda kültüre edilmiş hücre besiyerinin aspirasyonunu takiben hücreler steril PBS ile yıkandı. Hücreleri kaldırmak için 750 µl Tripsin/EDTA eklendi. 2-3 dakika inkübatörde bekledikten sonra, hücreler kaldırıldı. 1000 rpm’de 3 dk santrifüj sonrası süpernant kısmı atıldı. Hücreler tekrar besiyeri ile karıştırıldı. Hücre sayımı için ‘Scepter Automated Cell Counter’ adı verilen otomatik hücre sayım cihaz kullanıldı.

2.4. Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler Ait Koşullandırılmış Besiyerinin Hazırlanması

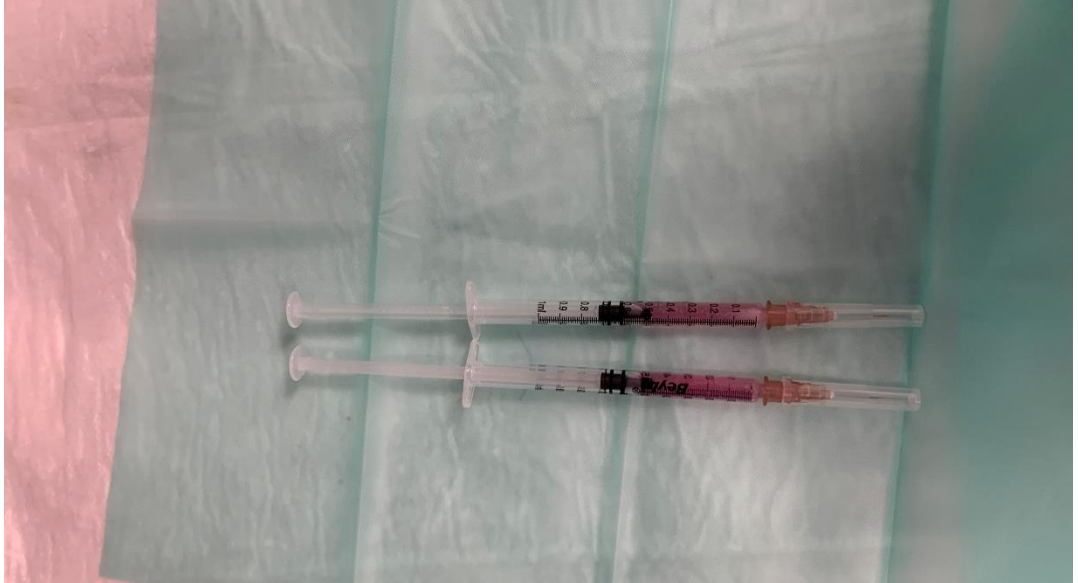
cAD-MSC hücrelerinin, 10⁶ hücre / ml olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekimi yapıldı. Hücrelerin besiyeri, günlük olarak daha az FBS (%7-%5-%2) içeren ortamla değiştirilerek %80 yaygınlığa ulaşana kadar kültürlenmeleri sağlandı. Böylece hücreler sırayla serumsuz ortama adapte edilerek ve oksidatif strese bağlı değişikliklerin, toksinlerin ve istenmeyen proteinlerin gelişmesi engellendi. %80 yaygınlığa ulaşıldığında hücrelerin üzerindeki besiyerleri toplandı ve 0.22 µm

filtrelerden geçirildi. Steril kabin içerisinde koşullu besiyerleri 1 ml'lik hacime sahip insulin enjektörlerine aktarıldı. Enjeksiyon işlemlerinde kullanılmak üzere -70°C de saklandı.

2.5. Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Ve Koşullandırılmış Besiyerinin Enjeksiyon İşlemleri İçin Hazırlanması

Mezenkimal kök hücre uygulanması yapılacak deney grubu için cAD-MSc hücrelerinin 2.3.3'de belirtildiği şekilde sayımları yapıldı. Her insulin enjektöründe 2×10^6 hücre / 0.5ml olacak şekilde hazırlandı (Şekil 2.3). İnsülin enjektörüne aktarılan hücrelerin süspanse edildiği besiyeri içerisine FBS eklentisi yapılmadı. Tüm bu işlemler enjeksiyon işleminin hemen öncesinde gerçekleştirildi (Oh, Park et al. 2018).

Mezenkimal kök hücrelere ait koşullandırılmış besiyerleri 2.4'te belirtildiği şekilde hazırlandı. -70°C 'de saklanan enjektörler deney öncesinde çıkartılarak, inkübatör içerisinde 37°C 'ye kadar ısıtıldı.



Şekil 2.3 : Enjekte edilen kök hücre ve conditioned medium

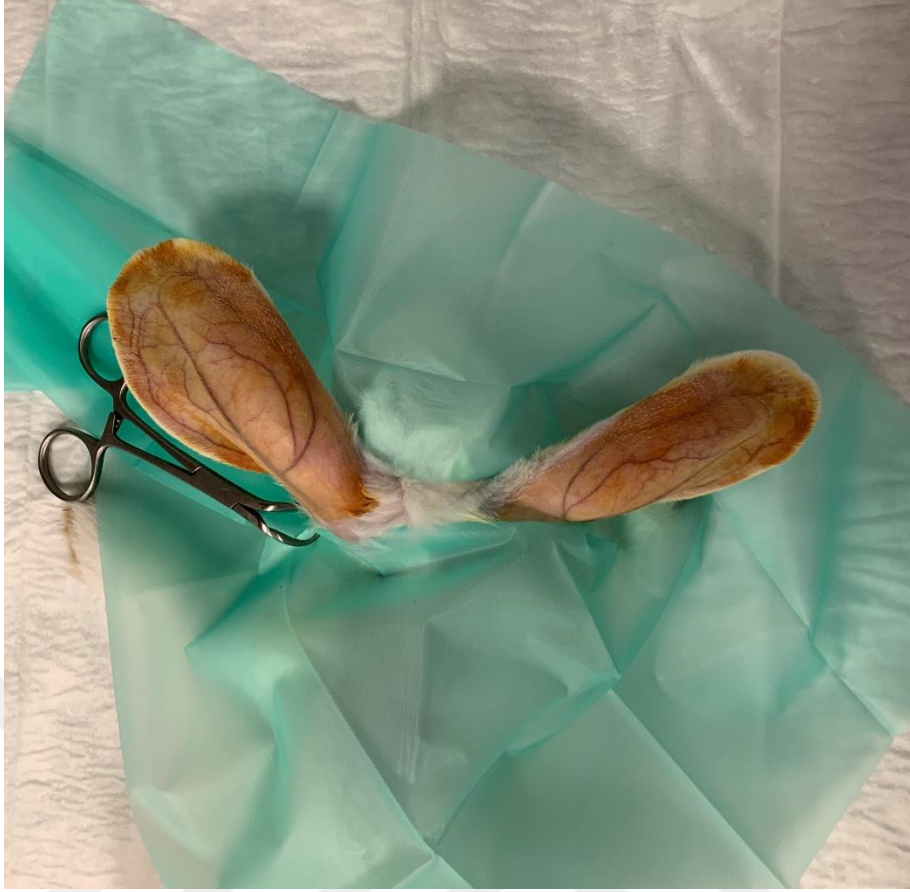
2.6. Cerrahi İşlemlerin Yapılması

3 grupta toplam 21 New Zealand tavşanda çalışma gerçekleştirildi. 30 mg/kg ketamin intraperitoneal ve 5mg/kg ksilazin anestezisi yapıldı. Veteriner hekim

tarafından her 2 kulak traş edildi (Şekil 2.4). Tavşanlar supin pozisyona alındı (Şekil 2.5). Her tavşanın her iki kulağına posteriordan yaklaşıldı. Daha sonra povidion iyod (Batticon, Adeka) ile antisepsi sağlandı (Şekil 2.5). 15 numara bistüri ile cilt kesisi yapıldı. Kıkırdak greft kesi hattına gelmeyecek şekilde cilt flebi eleve edildi (Şekil 2.6, 2.7). 10mm çapındaki punch ile alınacak kıkırdak sınırları belirlendi (Şekil 2.8). 10x10 mm boyutunda kıkırdak greft ince uçlu elevatör yardımıyla alındı (Şekil 2.9, 2.11). Bu sırada anterior perikondrium korundu (Şekil 2.10). Kıkırdak greft tekrar donor alana yerleştirildi (Şekil 2.12). 2 adet yuvarlak 5/0 propilen (Doğsan, Türkiye) sütür ile tespit edildi (Şekil 2.13). Cilt sıvı geçirmeyecek şekilde 5.0 propilen (Doğsan, Türkiye) ile sürekli olarak kapatıldı. Pansumanı yapıldı (Şekil 2.14). Tavşanlar 120 gün takip edildikten sonra sakrifiye edildi.



Şekil 2.4: Tavşanlara anestezi verilip her 2 kulak posterior traş edilmesi, tavşanlar supin pozisyona alınması



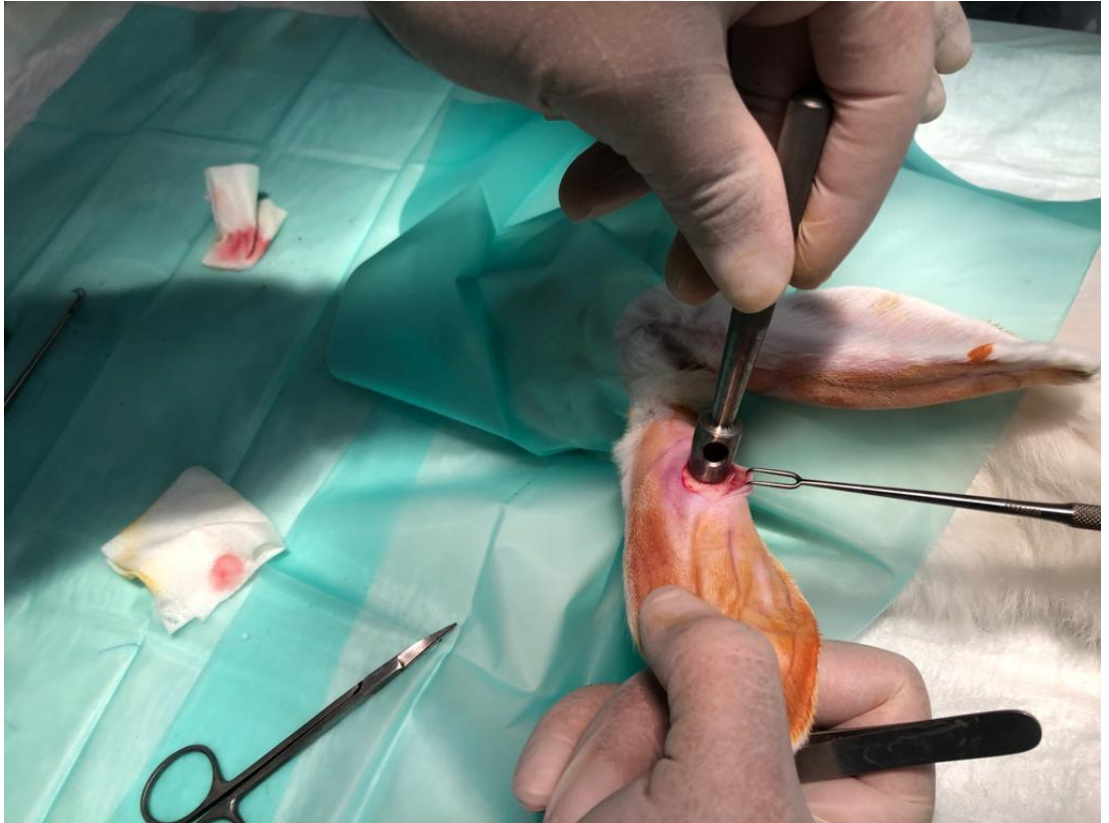
Şekil 2.5: Supin pozisyonda tavşan kulaklarına posteriordan yaklaşılmaları, Povidon iodür ile antisepti sağlanması



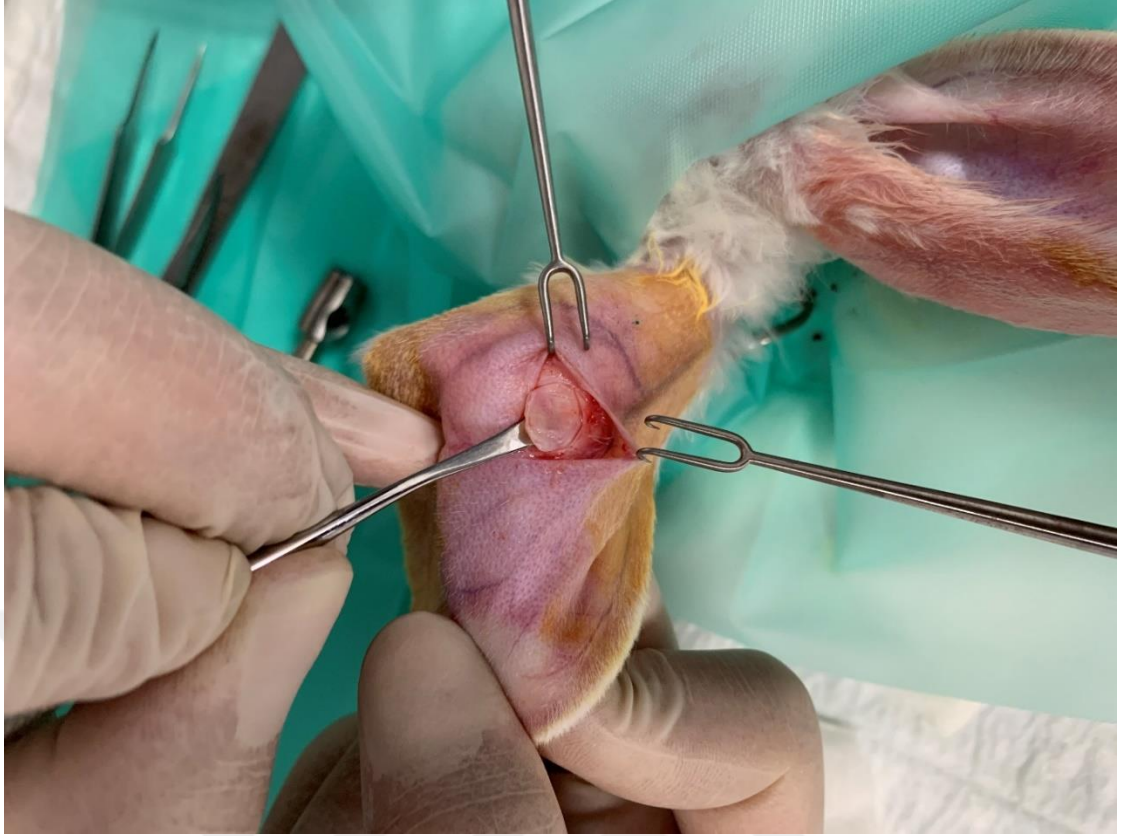
Şekil 2.6: 15 numara bistüri ile oblik kesi yapılması



Şekil 2.7: Kıkırdakın eksplere edilmesi



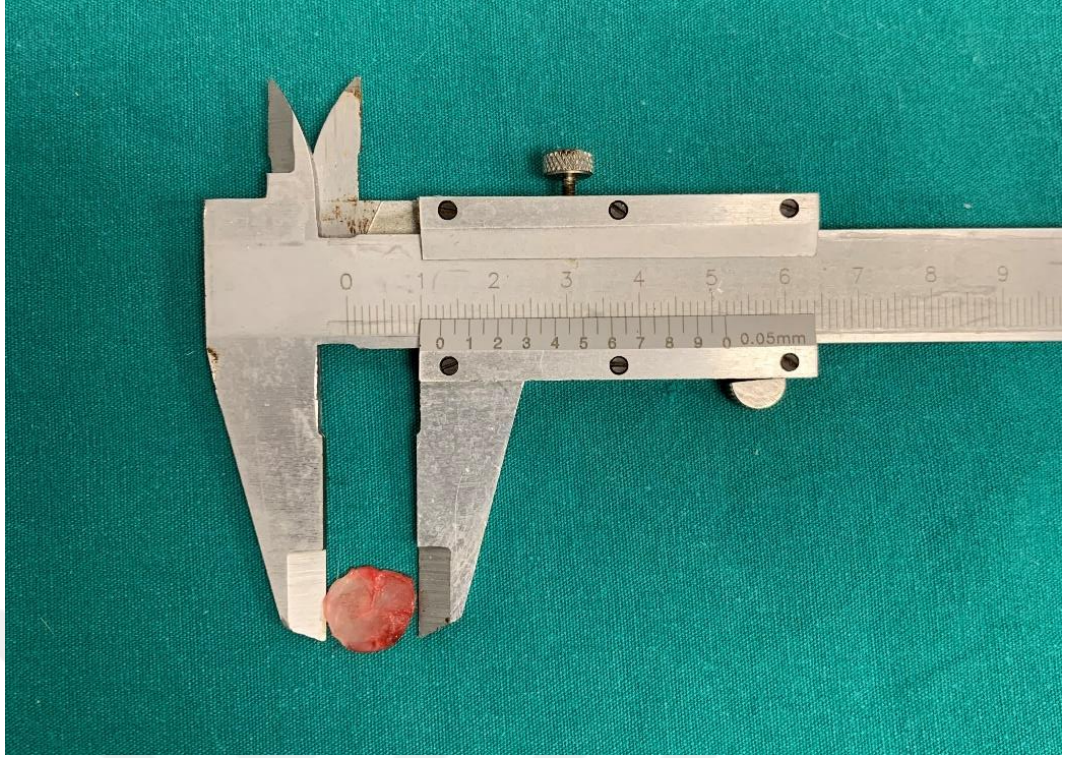
Şekil 2.8: 10mm çapında punch ile alınacak kıkırdak greftin sınırlarını belirleme



Şekil 2.9: İnce uçlu elevatör yardımıyla greftin eleve edilmesi



Şekil 2.10: Elevasyon sırasında anterior perikodriumun korunması



Şekil 2.11: 10x10 mm boyutunda kıkırdak greft



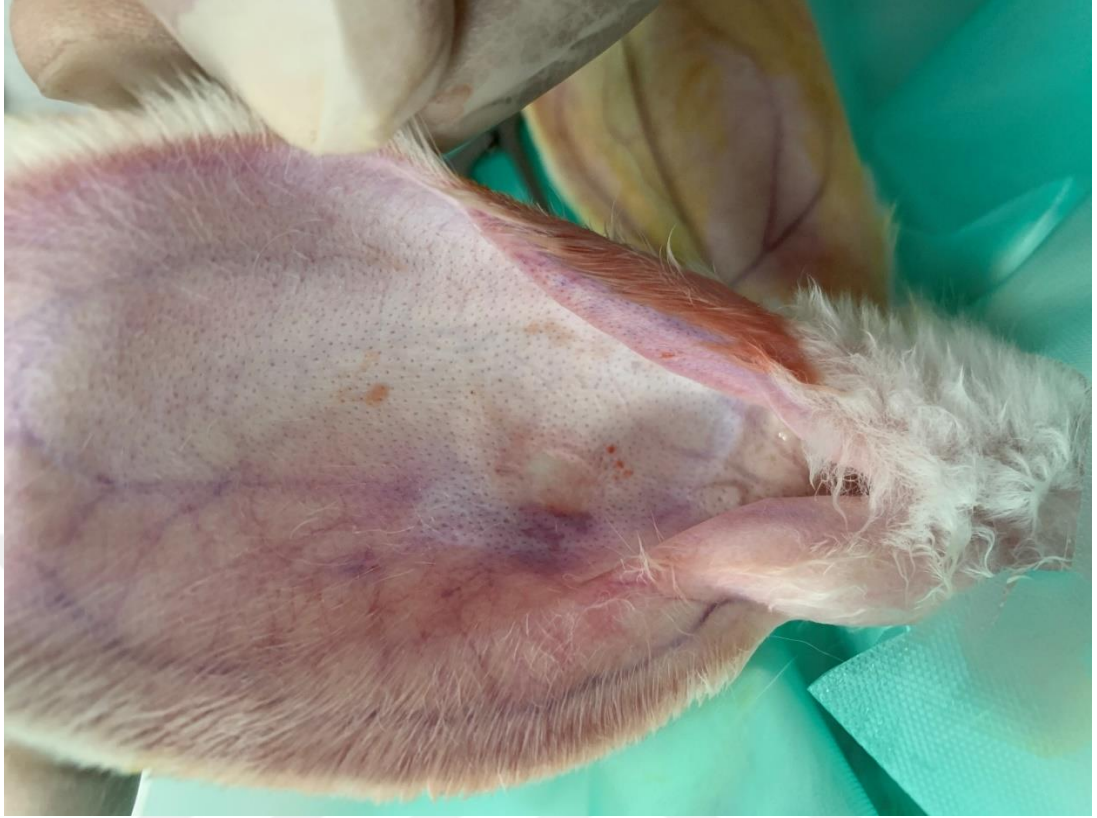
Şekil 2.12: Kıkırdak greftin tekrar yerine yerleştirilmesi



Şekil 2.13: 5.0 yuvarlak propilen ile greft yerine adapte edilmesi



Şekil 2.14: Cilt primer s  t  rasyonu ve Povidion İ  d  r ile pansuman yapılması



Şekil 2.15: Kulağın anterior yüzünün görüntüsü

2.6.1. Anestezi

Cerrahi işlemler ve enjeksiyonlar aynı cerrahi ekip tarafından gerçekleştirildi. Aseptik şartlarda tüm tavşanlara intraperitoneal yolla ketamin hidroklorür (30 mg/kg-Ketalar®, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) verildi. Aynı zamanda xylazine hidroklorit (5 mg/kg-Rompun®, Bayer, Türkiye) karışımı ile anestezi indüksiyonu sağlandı. Mezenkimal kaynaklı kök hücre, conditioned medium enjeksiyonu ve 120 gün sonra yapılan sakrifikasyon işlemlerinin tümü genel anestezi altında gerçekleştirildi.

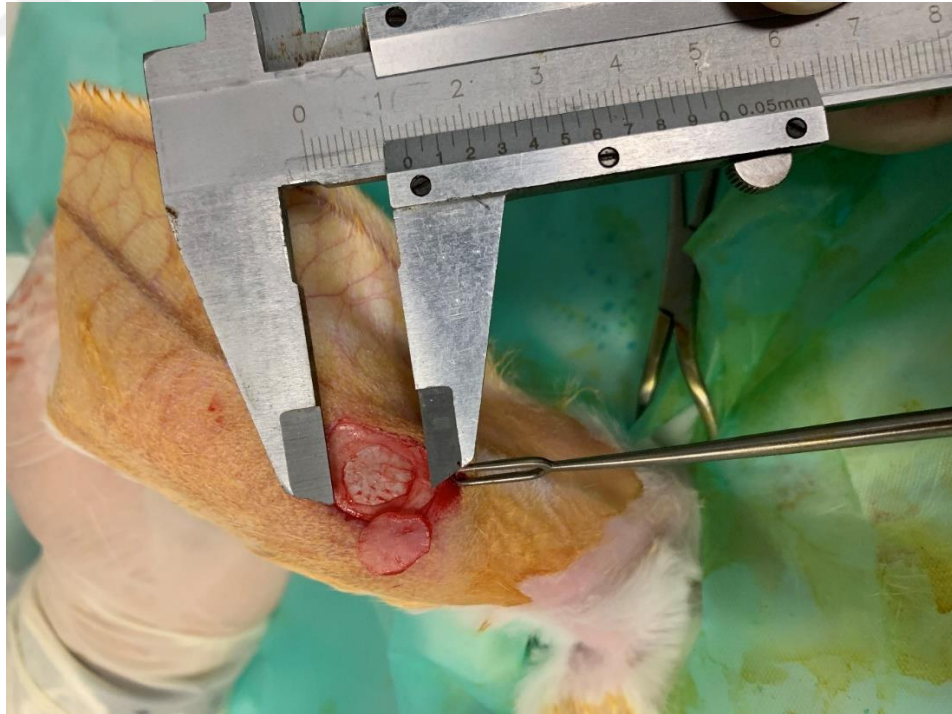
2.6.2. Kıkırdak greft modeli oluşturulması

Genel anestezi altında tavşanların her iki kulak posterior tüyleri traş edildi. Ardından povidon iyot çözeltisi ile tüm kulak dezenfeksiyonu sağlandı. Steril örtü köpük pano üzerine serildi ve tavşan bu pano üzerine sabitlendi. Kuruması sonrası povidon iyot çözeltisi steril serum fizyolojik ile uzaklaştırıldı.

Tavşan kulaklarına kıkırdak greft cilt sütürasyonu altına denk gelmemesi için flep şeklinde eleve edilerek subkutan diseksiyonu yapıldı. Kulak kıkırdak posterior perikondrium diseke edilerek kıkırda a ulaşıldı. 10 mm çapında punch ile eksize edilecek kıkırdak greft alanı belirlendi (Serel, Cerkez et al. 2020). Kulak kıkırdağı anterior perikondrium sağlam bırakılacak şekilde elevatör yardımıyla eksize edildi ( ekil 2.15).

10 mm'lik yuvarlak şekilli kıkırdak greft d nor alana tekrar yerleştirildi ( ekil 2.16). 5/0 yuvarlak propilen ile 2 adet sütür ile yerine adapte edildi. Flep şeklinde eleve edilen cilt 5/0 keskin propilen ile sıvı sızdırmayacak şekilde sütüre edildi.

Kontrol grubu olan 1. Gruba sütürasyon sonrası herhangi bir işlem yapılmadı. 2. Gruba sütürasyon sonrası kıkırdak greft hizasına gelecek şekilde 4 kadrandan mezenkimal kaynaklı kök hücre enjeksiyonu yapıldı ( ekil 2.17). 3. Gruba sütürasyon sonrası kıkırdak greft hizasına gelecek şekilde 4 kadrandan conditioned medium enjeksiyonu yapıldı ( ekil 2.17). İnsizyon hattı povidion iody r sürülerek kapatıldı.



Şekil 2.16: Kıkırdak greft modeli



Şekil 2.17: Kıkırdak grefte 0.5 cc conditioned medium ve mezenkimal kök hücre 2×10^6 0.5 cc insülin enjektörü ile enjekte edilmesi

2.6.3. Cerrahi sonrası takip

Ameliyat sonrası tavşanların anesteziden uyanması beklendi. Sorun olmadığı gözlemlendiğinde kafeslerine geri alındı. Ağrı kontrolü için cerrahi sonrası içme suları yoluyla 2 mg/ml parasetamol verildi. Günlük olarak tavşanlar ameliyat sonrası, genel durum, vücut ağırlığı, malnütrisyon, enfeksiyon bulguları yönünden yakın gözlemlendi. İnsizyon hattına günlük pansuman yapıldı. Deney boyunca hiçbir tavşan kaybı olmadı.

2.6.4. Kıkırdak greftin çıkarılması

120. günde genel anestezi altında tavşanların kulak tüyleri traş edildi. Ardından povidon iyot çözeltisi ile antisepsi sağlandı. Eski insizyondan girilerek kıkırdak greftlere erişildi (Şekil 2.18). Kıkırdak greftler etrafında 5 mm sağlam kıkırdak içerek şekilde çıkarıldı (Şekil 2.19).



Şekil 2.18: Kıkırdak greftlerin 120 gün sonra eski insizyondan girilerek explore edilmesi



Şekil 2.19: Kıkırdak greft etrafında 5 mm sağlam kıkırdak içerecek şekilde en-blok anterior cilt ile birlikte eksize edilmesi

2.6.5. Ötenazi Uygulanması

120. günde genel anestezi altında eter inhalasyonu ile ötenazi uygulandı.

2.7. Değerlendirme yöntemleri

Elde edilen preparatlara histolojik değerlendirme, immünohistokimyasal değerlendirme ve elektron mikroskopik görüntüleri değerlendirildi.

2.7.1. Histolojik değerlendirme

Hematoksilen-Eosin boyama yöntemi ile tüm örnekler histolojik olarak değerlendirildi. Greft dokusunun insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu, kulak kıkırdağı insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu ve greftin çevre kıkırdak ile entegrasyonu değerlendirildi.

Masson trikrom boyama yöntemi ile greft dokusunun insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu, kulak kıkırdağı insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu ve greftin çevre kıkırdak ile entegrasyonuna ek olarak yeni kollojen üretimi değerlendirildi.

Işık mikroskopi preparasyonu ve histolojik skora; Tüm gruplardan alınan kulak kıkırdak parçaları ışık mikroskobik incelemeler için fosfat tamponlu %10'luk formalin solüsyonuna konularak fikse edildi ve ardından yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96 ve %100) geçirilerek dehidrate edildi. Ksilen içinde 1 saat süreyle şeffaflaştırma işlemi uygulandı. Bunu takiben 56°C'deki etüvde sıvı parafin içinde bir gece bekletilen parçalar ertesi gün parafin bloklara gömüldü. Greft bölgesinden mikrotom (Thermo Scientific, HM 340E) ile 4 mikrometre kalınlığında kesitler pozitif şarjlı lam üzerine alındı. Her bir dokudan alınan kesitlere Hematoksilen-Eozin (Empire Genomics BPK4088-2) ve Masson Trikrom boyamaları yapıldı.

Histolojik değerlendirme için Serel ve arkadaşlarının çalışmalarında kullanılan skora ölçütleri modifiye edilerek kullanıldı (Serel, Cerkez et al. 2020). Hematoksilen-Eozin ve Mason Trikrom ile boyanan preparatlarda greftlenen kıkırdak parçasının iki ucunda ve kulağın kendi kıkırdak dokusunun insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonları ile greft ve kulak kıkırdağının entegrasyonu

değerlendirildi. Değerlendirmelerde greftin her iki ucu da incelendi. Skorlama aşağıdaki şekilde yapıldı:

Kulak kıkırdağının greft bölgesine yakın uçlarındaki kondrosit proliferasyonu:

0 (sıfır)	Kondrositlerde Proliferasyon yok
1	Çok az sayıda proliferasyon gösteren kondrositler
2	Az sayıda proliferasyon gösteren kondrositler
3	Belirgin kondrosit proliferasyonu
4	Oldukça artmış, bol miktarda kondrosit proliferasyonu

Greftlenen kıkırdak parçasının iki ucundaki kondrosit proliferasyonu:

0 (sıfır)	Kondrositlerde Proliferasyon yok
1	Çok az sayıda proliferasyon gösteren kondrositler
2	Az sayıda proliferasyon gösteren kondrositler
3	Belirgin kondrosit proliferasyonu
4	Oldukça artmış, bol miktarda kondrosit proliferasyonu

Greftin çevre kıkırdakla entegrasyonu:

0 (sıfır)	Hiç entegrasyon yok. Kulak kıkırdağı ve greft arası bağ doku ile dolu
1	Kulak kıkırdağı ve greft arasındaki alan kısmen fibroblastlarla doldurulmuş
2	Kulak kıkırdağı ve greft arasındaki alan tamamen fibroblastlarla doldurulmuş
3	Kulak kıkırdağı ve greft arasındaki alan kondroblastlarla doldurulmuş
4	Kulak kıkırdağı ve greft arasındaki alan tamamen kondrositlerle doldurulmuş, tam entegrasyon

2.7.1.1 Hemotoksilen-Eozin Boyama

Parafin kesitler 1 saat ksilende bekletildi ve daha sonra azalan alkol serilerinden geçirilip (%100, %96, %90, %70) distile suya indirilerek rehidrate edildi. Kesitler hematoksilende 20 dakika bekletilerek çekirdek boyanmasının gerçekleştirilmesinin ardından, akan çeşme suyunda 15 dakika bekletilerek mordanlama gerçekleştirildi. Ardından sitoplazmik boyanma için eozinde 1 dakika boyanan kesitler distile suyla yıkandıktan sonra yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96 ve %100) geçirildi. Ksilene alınıp 15 dakika bekletildikten sonra Bio Mount (Bio-optica CAT#1611) ile kapama işlemi gerçekleştirildi. Kesitler genel

morfolojik özellikleri Nikon Eclipse ışık mikroskopunda (Nikon® Instruments Inc., USA) değerlendirmeye alındı.

2.7.1.2. Masson Trikrom Boyama

Parafin kesitler 1 saat ksilende bekletildi ve azalan alkol serilerinden geçirilip (%100, %96, %90, %70) distile suya indirilerek rehidrate edildi. Kesitler demirli hematoksilende 4 dakika boyandı ve çeşme suyunda 10 dakika morarmaya bırakıldı. Ardından Ponceau ksilidin-asit fuksin solüsyonu ile 5 dakika boyandı. 2 dakika %1'lik asetik asitte bekletildi. Sonrasında, Orange G- fosfo volframik asit ile 10 dakika boyanan kesitler 2 dakika %1'lik asetik asitte bekletildi. Light green boyası ile 8 dakika boyandıktan sonra tekrar %1'lik asetik asitte 2 dakika bekletildi. Daha sonra yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100 etanol) geçirilerek dehidrate edilen kesitler ksilene alındı. 15 dakika ksilende bekletildikten sonra Bio Mount (Bio-optica CAT#1611) ile kapatıldı. Kesitler genel morfolojik özellikler ve bağ dokusu elemanlarındaki özellikleri belirlemek üzere Nikon Eclipse ışık mikroskopunda (Nikon® Instruments Inc., USA) değerlendirmeye alındı.

2.7.2. İmmünohistokimyasal değerlendirme

Tavşan monoklonal antikoları ile yeni kıkırdak üretimini gösteren tip II kollajenlerin değerlendirilmesi; tanımlanan immünohistokimyasal yöntemlere uygun biçimde yapıldı.

Parafin bloklardan alınan kesitlerde tip II kollajen immünoreaktivitesini değerlendirmek üzere kollajen tip II rabbit-polyclonal antikoru (28459-1-AP; Proteintech; UK) ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Parafin bloklardan pozitif şarjlı lamalar üzerine alınan 4 µm'lik kesitler 1 gece 56 °C'lik etüvde bekletilerek parafin fiziksel olarak uzaklaştırıldı. Ksilende 30 dakika bekletildikten sonra azalan alkol serilerinden (%100, %96, %90, %70) 2'şer defa 5'er dakika geçirilip distile suya indirilerek rehidratasyon sağlandı. PBS ile yıkamanın ardından kesitler antijen geri kazanımı için tripsin çözeltisinde 1 saat 37°C derecelik etüvde bekletildi. Etüvden çıkarıldıktan sonra oda ısısına gelene kadar bekletilip ardından üç defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. Sonrasında endojen peroksidaz aktivitesini bloklamak için metanolde hazırlanan %3'lük H₂O₂'de 20 dakika karanlıkta bekletildi. Üç kez PBS ile yıkamanın ardından lam üzerindeki dokuların etrafı

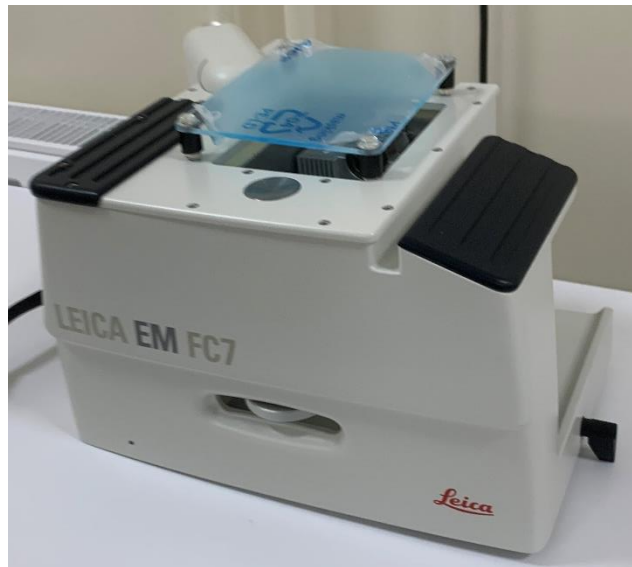
hidrofobik kalemle çizilerek havuz oluşturuldu. Dokuların üzerine özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak için HRP kiti (TL-125-HL; Thermo Fisher Scientific; USA) içindeki protein blok solüsyonu damlatılarak 10 dakika bekletildi. Ardından kesitler üzerine 1/100 dilüsyondaki kollajen tip 2 primer antikoru damlatılarak 4 °C'de 1 gece bekletildi. Ertesi gün 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 10 dakika biyotinlenmiş sekonder antikor (Abcam, ab93677) solüsyonu uygulandı. Sonrasında üç kez PBS'de yıkanan kesitlere 10 dakika streptavidin peroksidaz solüsyonu (Abcam, ab93677) uygulandı ve yine 3 kez PBS ile yıkamanın ardından 10 dakika AEC kromojen solüsyonu (TA-125HA; Thermo Fisher Scientific; USA) uygulaması gerçekleştirildi. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 2 dakika Mayer hematoksilende (Bio-optica 60002) bekletilerek çekirdek zıt boyama yapıldı. Çeşme suyunda yıkanan kesitler su bazlı kapatıcı (Sigma-aldrich F4680) ve lamel ile kapatılarak tip 2 kollajen immünreaktiviteyi Nikon Eclipse ışık mikroskopunda (Nikon® Instruments Inc., USA) değerlendirmeye alındı. Nikon Eclipse ışık mikroskopunda (Nikon® Instruments Inc., USA) 20X büyütme ile çekilen görüntülerdeki immünreaktivite, Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) yazılımı ile semikantitatif olarak ölçülmüş ve değerler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

2.7.3. Elektron mikroskopik değerlendirme

Greft alanlarından alınan doku örnekleri %2,5'lük 0.1 M PBS tamponlu (pH 7.2) glutaraldehit fiksatifinde +4°C'de 4 saat fikse edildi. PBS tampon ile yıkanmalarının ardından, %4'lük osmiyum tetroksit ile 1 saat postfikse edildiler. Yükselen aseton serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildikten sonra Epon 812 kit (Sigma Aldrich 45359 gömüldükten sonra 60°C'deki etüvde 1 gece boyunca polimerizasyon için bekletildi. Ultramikrotomla (Leica EM UC7) (Şekil 2.21) alınan yarı ince kesitler (1 µm) toluidin mavisi boyası ile boyandı. Yarı ince kesitlerde yer tayini yapıldıktan sonra bakır gridler üzerine alınan yaklaşık 60 nm kalınlığındaki ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlanmıştır. İnce kesitler, İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırma Merkez (REMER, İstanbul)' de elektron mikroskobu (GeminiTEM 500, Carl Zeiss, Almanya) ile incelendi (Şekil 2.20).



Şekil 2.20: Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)



Şekil 2.21: Ultramikrotom

2.8. İstatistiksel Analiz

Kantitatif değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama, standart deviyasyon ve minimum-maksimum olarak sunulmuştur. Normalite testleri Chi-Square testleri ve histogram grafikleri kullanılarak yapılmıştır. Tüm değişkenler normal dağılım göstermiştir. Bu nedenle, tekniğimizin sonuçlarının açıklanması için Kruskal Wallis sıralamalı tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Kruskal Wallis sonuçlarındaki değişimler ise ortalama, standart deviyasyon ve %95 güven aralığı verilerek sunulmuştur. Değişkenler arasındaki korelasyonu göstermek için Pearson korelasyon katsayısı kullanılmıştır. Kıkırdak oluşumunu ile ilişkili olabilecek faktörleri belirlemek için greft doku insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu, kulak kıkırdağı insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu, greftin çevre kıkırdak ile entegrasyonu ve tip 2 kollojen miktarı değişkenleri kullanılarak tekli lineer regresyon analizleri yapılmıştır. Tüm analizler için $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analiz için SPSS® istatistik programı ve Graphpad Prizim® programı kullanılmıştır (version 23.0 for Mac OS; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. BULGULAR

3.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyon Sonuçları

Tekgen Sağlık Hizmetleri İstanbul firmasından “VetStem- D009/40” koduyla satın alınan mezenkimal kök hücrelere ait karakterizasyon analizleri “akış sitometrik yöntemle” firma tarafından gerçekleştirildi. Analizlere ait sonuçlar, çalışmanın sonuç bölümünde tablolar halinde sunuldu (Tablo 3.1, 3.2).

Tablo 3.1: Kök hücrelerin karakterizasyon analizleri

CD105-PE				CD146-FITC				CD73-PE			
Qua d	Events	%Gate d	%Tota l	Qua d	Events	%Gate d	%Tota l	Qua d	Events	%Gate d	%Tota l
UL	9	0.10	0.09	UL	131	1.45	1.31	UL	16	0.18	0.16
UR	7346	81.52	73.46	UR	8262	91.69	82.62	UR	6272	70.90	62.72
LL	152	1.69	1.52	LL	305	3.38	3.05	LL	354	4.00	3.54
LR	1504	16.69	15.04	LR	313	3.47	3.13	LR	2204	24.92	22.04

PE: Phycoerythrin, FITC: Fluorescein isothiocyanate

Tablo 3.2: Kök hücrelerin karakterizasyon analizleri

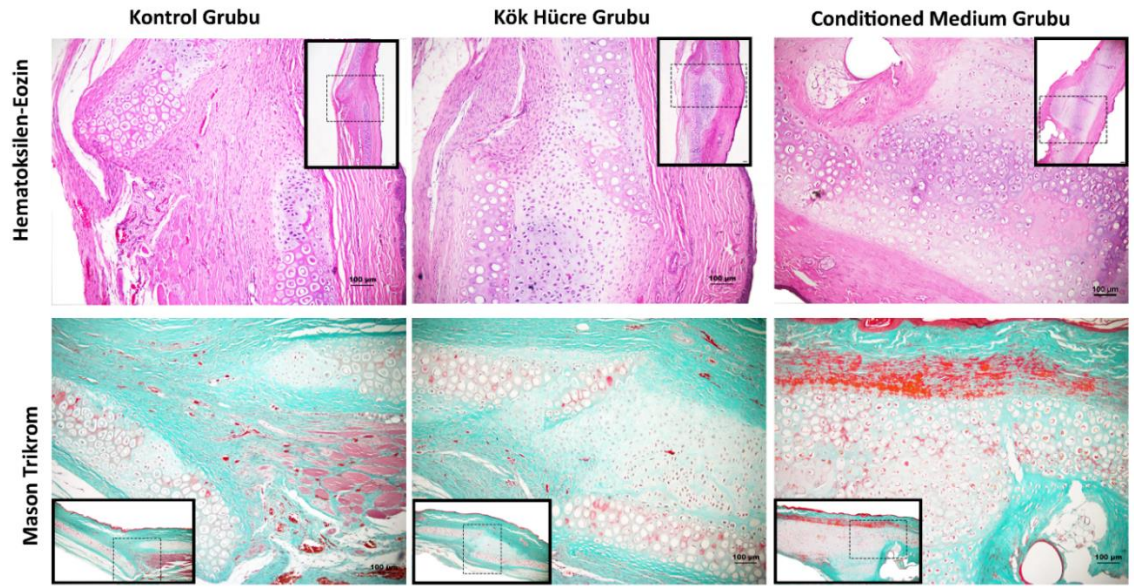
CD19-PerCP				CD25-APC				Anti-HLA-DR-PE			
Qua d	Events	%Gate d	%Tota l	Qua d	Events	%Gate d	%Tota l	Qua d	Events	%Gate d	%Tota l
UL	5518	62.38	55.18	UL	5946	67.22	59.46	UL	6007	67.24	60.07
UR	1943	21.96	19.43	UR	1264	14.29	12.64	UR	1758	19.68	17.58
LL	1373	15.52	13.73	LL	1588	17.95	15.88	LL	1163	13.02	11.63
LR	12	0.14	0.12	LR	48	0.54	0.48	LR	6	0.07	0.06

APC: Allophycocyanin, PE: Phycoerythrin, PerCP: Peridinin-Chlorophyll

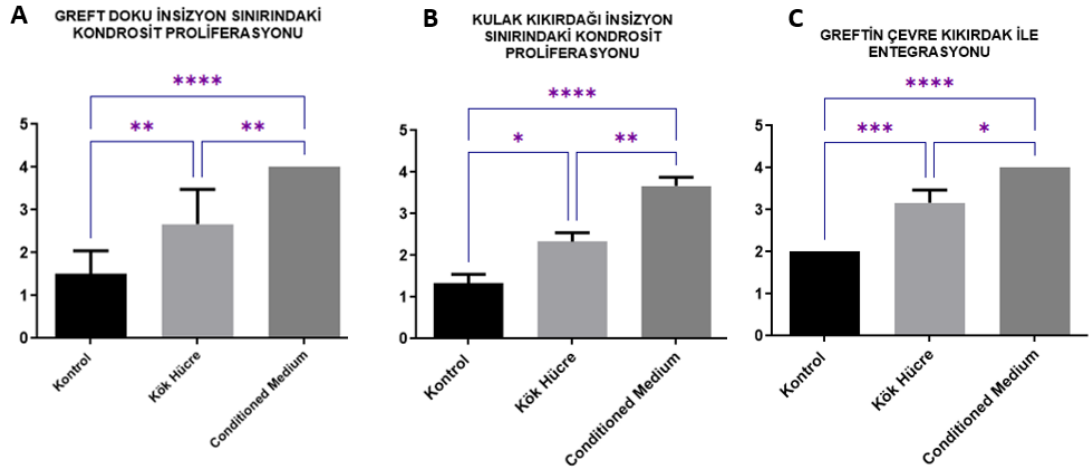
3.2. Histolojik Değerlendirme Sonuçları

Işık mikroskopik incelemelerde conditioned medium grubunda (Grup 3) kontrol grubuna (Grup 1) kıyasla greft doku insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonunda, kulak kıkırdağı insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonunda ve greft kıkırdak dokunun çevre kıkırdak doku ile entegresyonunda artış olduğu görülmüştür (Şekil 3.1). İstatistiksel analizler sonucunda conditioned medium

grubunda (Grup 3) greft doku insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonunda kontrol grubuna (Grup 1) kıyasla anlamlı ($p=0.008$) bir artış olduğu, kök hücre grubunun (Grup 2) da kontrol grubuna (Grup 1) göre artmış olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görülmüştür ($p=0.01$). Kulak kıkırdağı insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu conditioned medium grubunda (Grup 3) kontrol grubuna (Grup 1) kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p= 0.04$). Kök hücre grubunda (Grup 2) da kontrol grubuna (Grup 1) oranla artış görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir ($p=0.02$). Greftin çevre kıkırdak ile entegrasyonu açısından kıyaslandığında, conditioned medium grubunda (Grup 3) kontrol grubuna (Grup 1) kıyasla entegrasyonda istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür ($p=0.006$). Kök hücre grubunda (Grup 2) da kontrol grubuna (Grup 1) oranla artış görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterilmiştir ($p=0.01$) (Tablo 3.3).



Şekil 3.1: A: Hematoksilen-Eozin boyaması, B: Masson Trikrom boyaması. Kontrol (Grup 1), kök hücre (Grup 2) ve conditioned medium (Grup 3) gruplarının histolojik olarak değerlendirilmesi (10X; insert: 4X)



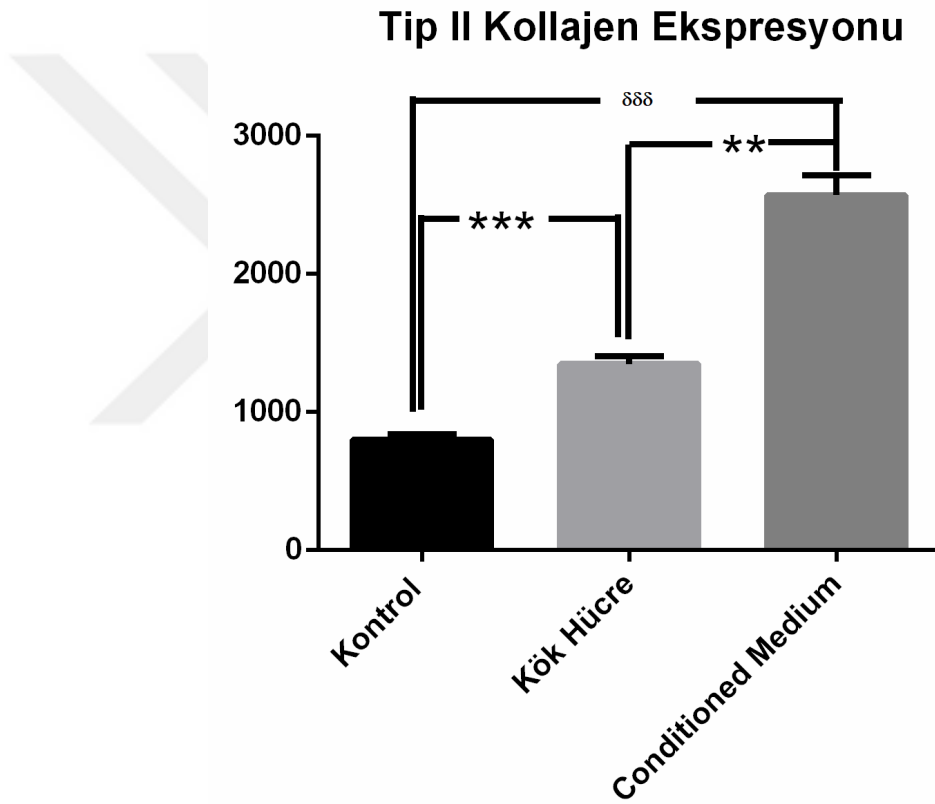
Tablo 3.3: Kontrol (Grup 1), kök hücre (Grup 2) ve conditioned medium (Grup 3) gruplarının greft doku insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu (A), kulak kıkırdağı insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu (B) ve greftin çevre kıkırdak ile entegrasyonu (C) açısından istatistiksel olarak kıyaslanması. (****p<0.0001, ***p=0.0001 to 0.001, **p=0.001 to 0.01, *p=0.01 to 0.05)

3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme Sonuçları

Hasar (Grup 1), kök hücre (Grup 2) ve conditioned medium (Grup 3) grupları tip II kollajen ekspresyon seviyesi açısından kıyaslandığında tip II kollajen ekspresyonunun conditioned medium (p=0.0002) ve kök hücre grubunda (p=0.001) hasar grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığı görülmüştür. Ayrıca conditioned medium grubundaki (Grup 3) tip II kollajen ekspresyonu kök hücre grubuna (Grup 2) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (p=0.003) (Şekil 3.2; Tablo 3.4).



Şekil 3.2: Kontrol (Grup 1), kök hücre (Grup 2) ve conditioned medium (Grup 3) grubunda tip II kollajen ekspresyon seviyelerinin immünohistokimyasal analizleri



Tablo 3.4: Kontrol (Grup 1), kök hücre (Grup 2) ve conditioned medium (Grup 3) grupları arasında tip II kollajen ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak kıyaslanması (**p=0.001; **p=0.003; δδδ p=0.0002)

3.4. Elektron Mikroskopik Değerlendirme Sonuçları

Ultrastrüktürel düzeyde hasar grubunda kıkırdak dokuda bulunan kondrositlerin morfolojisinde anomali görülmüştür (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Hasar grubunda morfolojisi bozulmuş kondrosit

3.5. İstatistiksel Analiz Sonuçları

Graft Doku İnsizyon Sınırındaki Kondrosit Proliferasyonu;

Ranks			
	Gruplar	N	Mean Rank
Graft doku insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu	Grup 1	6	5,33
	Grup 2	5	8,30
	Grup 3	6	13,25
	Total	17	

Bu çalışmada, gruplar greft doku insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonuna göre karşılaştırılmıştır. Grup 1 için greft doku insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu puan sıra ortalaması 5.33, grup 2 için greft doku insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu puan sıra ortalaması 8.30 ve grup 3 için greft doku insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu puan sıra ortalamaları 13,25'tir.

	GREFT DOKU İNSİZYON SINIRINDAKİ KONDROSİT PROLİFERASYONU	
	Aritmetik Ortalama	Standart Sapma
Grup 1	1,83	0,408
Grup 2	2,6	1,517
Grup 3	3,83	0,408

Kruskal Wallis Test

Test Statistics^{a,b}

	Graft doku insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu
Chi-Square	8,337
Df	2
Asymp. Sig.	,015

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Gruplar

Hastaların greft doku insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu puan sıra ortalamalarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. (****p<0.0001, ***p=0.0001 to 0.001, **p=0.001 to 0.01, *p=0.01 to 0.05)

Kulak Kıkırdağı İnsizyon Sınırındaki Kondrosit Proliferasyonu;

Ranks			
	Gruplar	N	Mean Rank
Kulak kıkırdağı insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu	Grup 1	6	5,83
	Grup 2	5	8,60
	Grup 3	6	12,50
	Total	17	

Bu çalışmada, gruplar kulak kıkırdağı insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonuna göre karşılaştırılmıştır. Grup 1 için kulak kıkırdağı insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu puan sıra ortalaması 5.83, Grup 2 için kulak kıkırdağı insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu puan sıra ortalaması 8.60 ve Grup 3 için kulak kıkırdağı insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu puan sıra ortalamaları 12,50'dir.

KULAK KIKIRDAĞI İNSİZYON SINIRINDAKİ KONDROSİT PROLİFERASYONU		
	Aritmetik Ortalama	Standart Sapma
Grup 1	2,33	0,816
Grup 2	2,8	1,304
Grup 3	3,67	0,516

(Kruskal Wallis Test)

Test Statistics ^{a,b}	
	Kulak kıkırdağı insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu
Chi-Square	5,807
df	2
Asymp. Sig.	,045

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Gruplar

Hastaların kulak kıkırdaki insizyon sınırındaki kondrosit proliferasyonu puan sıra ortalamalarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. (****p<0.0001, ***p=0.0001 to 0.001, **p=0.001 to 0.01, *p=0.01 to 0.05).

Greftin Çevre Kıkırdak İle Entegrasyonu;

Ranks			
	Gruplar	N	Mean Rank
Greftin çevre kıkırdak ile entegrasyonu	Grup 1	6	5,42
	Grup 2	5	8,10
	Grup 3	6	13,33
	Total	17	

Bu çalışmada, gruplar greftin çevre kıkırdak ile entegrasyonuna göre karşılaştırılmıştır. Grup 1 için greftin çevre kıkırdak ile entegrasyonu puan sıra ortalaması 5.42, Grup 2 için greftin çevre kıkırdak ile entegrasyonu puan sıra ortalaması 8.10 ve Grup 3 için greftin çevre kıkırdak ile entegrasyonu puan sıra ortalamaları 13,33'tür.

GREFTİN ÇEVRE KIKIRDAK İLE ENTEGRASYONU		
	Aritmetik Ortalama	Standart Sapma
Grup 1	1,74	0,408
Grup 2	2,6	1,14
Grup 3	3,67	0,516

Kruskal Wallis Test

Test Statistics ^{a,b}	
	Greftin çevre kıkırdak ile entegrasyonu
Chi-Square	8,367
Df	2
Asymp. Sig.	,015

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Gruplar

Hastaların greftin çevre kıkırdak ile entegrasyonu puan sıra ortalamalarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. (****p<0.0001, ***p=0.0001 to 0.001, **p=0.001 to 0.01, *p=0.01 to 0.05)

Tip 2 Kollajen Miktarı;

Ranks			
	Gruplar	N	Mean Rank
Tip 2 kollajen miktarı	Grup 1	5	3,00
	Grup 2	5	8,00
	Grup 3	5	13,00
	Total	15	

Bu çalışmada, gruplar tip 2 kollajen miktarına göre karşılaştırılmıştır. Grup 1 için tip 2 kollajen miktarı sıra ortalaması 3, Grup 2 için tip 2 kollajen miktarı sıra ortalaması 8 ve Grup 3 için tip 2 kollajen miktarı sıra oralamaları 13'tür.

	TİP 2 KOLLAJEN MİKTARI	
	Aritmetik Ortalama	Standart Sapma
Grup 1	799,2	93,593
Grup 2	1348,2	122,077
Grup 3	2570,4	323,12

Kruskal Wallis Test

Test Statistics ^{a,b}	
	Tip 2 kollajen miktarı
Chi-Square	12,522
df	2
Asymp. Sig.	,002

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Gruplar

Hastaların tip 2 kollajen miktarı sıra ortalamalarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. (****p<0.0001, ***p=0.0001 to 0.001, **p=0.001 to 0.01, *p=0.01 to 0.05)

4. TARTIŞMA

Travma, yanıklar, cilt kanseri rezeksiyonu ve rekonstrüksiyon gerektiren konjenital deformiteler, burun ve kulak kemiği defektlerini içeren yüz defektleri birçok kişiyi etkilemektedir. Kıkırdak defektlerin yıllık insidansının 415.500 olduğu gösterilmiştir (Partridge and Julian 2008). Kıkırdak defektleri içeren bu tür durumların estetik sorunların yanı sıra bazı durumlarda da yaşamı tehdit ettiği tahmin edilmektedir (Amodeo 2007). Kıkırdak deformitelerinin onarımı için alloplastik implantlar, allogreftler, otolog dokular kullanılmaktadır. Kıkırdak gerektiren rekonstrüksiyonlarda sentetik implantların yüksek enfeksiyon oranları, ekpozisyon gibi sorunlar nedeniyle kullanımı sınırlıdır. Allojenik kıkırdak greftleri yüksek rezorpsiyon oranları (>% 70) ve hastalık bulaşma riski nedeniyle problemler oluşturur (Tuan, Chen, and Klatt 2013). Otolog kıkırdak greftleri bu seçenekler arasında halen altın standart olarak gösterilmektedir. Otolog kaynakların donör saha morbiditesi ve rezorpsiyona uğraması günümüz rekonstrüktif ve estetik cerrahi alanında ciddi bir problemdir. Kıkırdak greft gerektiren durumların bu kadar fazla oluşu ve kıkırdak greftlerindeki rezorpsiyon oranının yüksek olması greft yerleştirildikten sonra geç dönemde istenmeyen sonuçlara neden olmaktadır. Bu çalışmada kıkırdak greftlerin yaşayabilmesi ve rezorpsiyon oranının az olmasını araştırmak için mezenkimal kök hücre ve conditioned mediumun etkisi araştırılmıştır.

İndüklenmiş pluripotent kök (IPS) hücrelerin kullanımı, insan embriyolarının toplanmasıyla ilgili etik sorunların üstesinden gelinmiştir. Tümöre dönüşüm ve immün reddi ile ilgili sorunlar ise günümüzde bu hücrelerde halen devam etmektedir (Ben-David and Benvenisty 2011). Mezenkimal kök hücrelerin kaynakları arasında, kemik iliği, kemik dokusu, yağ dokusu, amniyon sıvısı, amniyon zarı, gingiva, endometrium, menstrüel kan, periferik kan, plasenta ve fetal zarlar, tükürük bezi, sünnet derisi, subamniyotik-kord astar zarı, sinoviyal sıvı sayılabilir. Tüm bu kaynaklar mezenkimal kök hücreler, kıkırdak greft iyileşmesinde çok önemli avantajlar sunabilir. Mezenkimal kök hücreler, çeşitli insan dokularından elde edilebilir. Ancak, kemik iliği ve yağ dokusu en sık seçilen donör alanlardır. Kondrojenik diferansiasyon kapasitelerinin yüksek oluşu yanı sıra, mezenkimal kök

hücreler in vivo direkt terapötik etkileri göstermektedirler. MSC enjeksiyonları ile çok sayıda parakrin etki gösteren biyoaktif molekül salınımı olur. Bu parakrin etki antiapoptotik, immün modülasyon, antiskar ve kemoatraktan fonksiyonları sağlar (Griffin, Ritter, and Mahon 2010). İmmünomodülasyon etki derecesi çevreye, matriks ve yüzey çevresine yerel enflamatuvar koşullara bağlıdır. Çalışmamızda kıkırdak greft yaşayabilirliği arttırmak ve rezorbsiyonu önlemek için mezenkimal kök hücreler New Zealand tavşan kulak kıkırdağında kullanılmıştır. Se-Joon ve ark. yaptıkları çalışmada New Zealand türü tavşan kulağında kıkırdak defekt oluşturulduktan sonra yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre enjekte ederek 30 gün sonra yeni kıkırdak oluşumu, tip 2 kollojen üretimi ile ve masson trikrom boyaması ile gösterilmiştir. Wei ve ark. çalışmasında mezenkimal kök hücrelerin kartilaj yapımı ve rejenerasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir. Khalilifar ve ark. yaptıkları çalışmada yeni kartilaj üretiminde kulaktan elde edilen mezenkimal kök hücre, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre, yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre karşılaştırılmış ve hepsinde kıkırdak üretiminin arttırıldığı gösterilmiştir (Khalilifar, Baghaban Eslaminejad et al. 2019). Cheng ve ark. mezenkimal kök hücrenin kıkırdak oluşumuna katkısını hematoksilen eozin boyamasıyla göstermişlerdir. Bu çalışmalardan yola çıkarak çalışmamızda kıkırdak greft modeli oluşturduktan sonra 2. Grubumuza mezenkimal kök hücre enjeksiyonu yapıldı. Kıkırdak çalışmalarında sık kullanılan ve yeni kıkırdak oluşumunu gösterdiği bilinen hematoksilen eozin boyamaları ile değerlendirildi. Literatüre uygun şekilde kök hücre verilen grup kontrol grubundan daha anlamlı bulundu.

Çalışmamızda histolojik analizde masson trikrom ve hematoksilen eozin boyası ile boyanan kıkırdak greftlerin kondrosit aktivasyonu, migrasyonu ve çoğalması ile yeni kıkırdak oluşumunun gösterilmesi amaçlanmıştır. Gruplar arasında özellikle Mezenkimal kaynaklı kök hücre bulunduran 2. Grup ve conditioned mediumun olduğu 3. Gruplarda boyamanın yoğunlaşması ekstrasellüler matris sentezinin bu gruplarda arttığını göstermektedir. Benzer biçimde elastin fibrillerin kontrol grubuna göre daha yoğun boyandığı görülmüştür.

Kök hücreli gruplarda gözlenen hiyalin kıkırdak yönünde ağırlıklı diferansiasyon kök hücrelerin uyarıcı biyomolekülleri (TGF- β 3, askorbik asit, IL-10 vb...) yoluyla

kondrojenik diferansiyasyonu sağlamaktadır (Somoza et al. 2014). TGF- β 3, kök hücre proliferasyonunda, diferansiyasyon ve matriks üretimi dahil olmak üzere hücrel aktivitenin birçok yönünü düzenleyen bir proteindir (Yun and Moon 2008). Zhao ve ark. yaptıkları çalışmada TGF- β 3'ün conditioned medium grubunda da arttığı gösterilmiştir (Zhao, Hwang et al. 2017). Bu nedenle MSC ve CM uyarıcı proteinler için bir depo görevi görür ve anti-inflamatuar etki oluşturarak uygun bir biyoyuvarıcı ortam yaratır, kondrogenezi sağlar.

Literatürde birçok çalışma göstermiştir ki doku rejenerasyonunda mezenkimal kök hücrelerin kullanımı ile bir çığır açılmıştır. Bu hücreler gerek nakledildiği dokuda gerekli hücelere diferansiye olarak gerek ise ortama salgıladıkları faktörler ile etki göstermektedirler (Chen, Sun et al. 2019). Ancak kök hücre kültürü başlı başına zor ve karmaşık bir süreçtir. Tekrarlayan seanslar için tekrarlayan kültür ve pasajlar gerektirmektedir. Kültürün enjeksiyon amacı ile bir yerden bir yere taşınımı zordur ve soğuk zincir gerektirmektedir. Hücrelerin doku reaksiyonu oluşturma riski düşük de olsa mevcuttur (Ikehara 2013). Bu yan etki ve zorlukların aşılması amacıyla bu trofik faktörlerin izolasyonu ve bir tedavi rejimi olarak kullanımı günümüzde kök hücre tedavilerine öncü rol oynamaktadır. Literatürde trofik faktörlerin yara iyileşmesinde, nörodejeneratif hastalıklarda faydalı olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Kim, Choi et al. 2013). Kök hücrelerin kültüre edildikleri ortama eksozom, sekretom ve mikroveziküler salgı yaptığı bilinmektedir (Bhang, Lee et al. 2014). Kültür esnasında trofik faktörlerden zengin olan bu ortama “Conditioned medium (CM)” adı verilmektedir.

Bu etkinin incelenmesi ve yapılacak çalışmalar ile kök hücre tedavilerinin yerini bu parakrin salgıların alabileceği konusunda öngörüler mevcuttur (Lam, Reuveny et al. 2020). Bu sebeple MSC'lerin salgılarından oluşan Conditioned Medium deney grubu 3 olarak seçilmiştir. Conditioned Mediumun klasik kök hücre tedavilerine üstünlükleri bulunmaktadır. Tedavi planından daha önce üretilebilir, dondurulup-kurutularak uzun süre saklanabilir, bir yerden bir yere taşınması daha kolaydır (Fukuoka, Suga et al. 2012). Hücrel içerik olmadığından alıcı ile donör arasında immünolojik uyuma gerek yoktur (Kim, Choi et al. 2013). Çalışmamızda literatürler ile benzer şekilde CM'nin avantaj olarak görülen bu özelliğinin test

edilebilmesi için P6 pasajından elde edilen Conditioning Medium -20 °C’de dondurularak saklanmış ve uygulama günü çözündürülerek kullanılmıştır.

Çalışmamızda CM grubu ile MSC grubunun sonuçları benzer şekilde diğer kontrol grubuna göre belirgin düzeyde üstün olarak saptanmıştır. Literatürde Aryan ve ark. yaptıkları çalışmada 2. Derece derin yanıkların tedavisinde kemik iliği kaynaklı kök hücrelerden elde edilen Conditioned Medium kullanılmış ve bu grupta yara iyileşmesi daha iyi olarak bulunmuştur (Aryan, Bayat et al. 2018). Literatür ile uyumlu olarak CM grubu mikroskopik parametrelerde; MSC grubu ve kontrol grubundan en yüksek skorları alan grup ve istatistiksel olarak kıkırdak greft iyileşmesinde en iyi sonuç alınmıştır. Sun ve ark. yaptıkları çalışmada MSC kaynaklı kök hücrelerden elde edilen Conditioned Medium akut yara iyileşmesinde çalışılmış ve minimal ya da skarsız yara iyileşmesi sağladığı gözlenmiştir (Sun, Zhang et al. 2019).

Se-Joon ve ark. yaptıkları çalışmada tavşan kulak kıkırdak defektlerinde adipoz kaynaklı kök hücre ve besi yeri olan sekretomlarını kıyaslamışlardır. Kök hücrenin kulak kıkırdağında rejeneratif artışa neden olduğu; IGF-1, TGF-β1 ve tip 2 kollojen seviyelerini besi yeri olan sekretom grubuna karşı anlamlı şekilde arttırdığını göstermişlerdir (Oh, Choi et al. 2020). Bizim çalışmamızda kök hücre grubu kıkırdak üretimi anlamlı çıkmasına rağmen conditioned medium grubu kök hücre grubundan da anlamlı sonuçlanmıştır.

Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak MSC grubunda yeni kıkırdak oluşumunu gösteren tip 2 kollojen boyasıyla yapılan immünohistokimyasal inceleme skorları kontrol grubundan daha yüksek olarak bulunmuştur. CM grubunda ise tip 2 kollojen üretimi hem MSC grubundan hemde kontrol grubundan daha iyi sonuçlanmıştır.

CM grubunda kondrositlerin kümeleşmesinin ve yeni kıkırdak oluşumu için organizasyonunun anlamlı şekilde fazla olduğu gösterildi. Bu etki istatistiksel olarak kök hücre ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak gösterildi. Mezenkimal kök hücrelerin; Vasküler Endotelial Growth Factor (VEGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) ve anjiyopietin-1 salgılayarak dokuda anjiyogenezi, perisitlerin göçünü, kondrosit proliferasyonunu ve

yara iyileşmesini hızlandırdığı bilinmektedir (Sadat, Gehmert et al. 2007). Bu faktörlerin CM da yoğun olarak bulunduğunu ve dokulardaki vaskülarizasyonun arttırdığını belirten çalışmalar mevcuttur (Park, Kim et al. 2010). Zhao ve ark. yaptıkları çalışmada CM'nin fare kulağında kıkırdak oluşum modelinde; TGF- β 3 artışı yaparak kıkırdak oluşumunu arttırdığı saptanmıştır (Zhao et al. 2016). Çalışmamızın sonuçlarında benzer şekilde CM grubunda kıkırdak greft iyileşmesinde en iyi grup olarak saptanmış ve kıkırdak greft iyileşmesinde ve rezorbisyonu azaltmada CM tedavisinin etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

CM içerisinde bulunan büyüme faktörleri sayesinde kondrositleri tetiklediği ve ortamda bulunan hücreleri aktive ederek kıkırdak üretimini arttırdığı düşünülmektedir. Kıkırdak üretiminde ilk etapta ortamda yüksek miktarda tip 2 kollojen bulunmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerde diferansiyasyon hangi yöne gideceği tam olarak bilinmediği için CM'da ortamda kondrojenik yolağı aktive etmesi kök hücreye karşı büyük bir avantaj olarak görülmektedir. İçerisinde kök hücre bulunmadan sadece CM verilen 3. Grupta kondrojenik yolağın aktive olduğu, yeni kondrositlerin oluştuğu, tip 2 kollojenden zengin ekstrasellüler matriks meydana geldiği görüldü. Kıkırdak greft rezorbisyonunu engellemede ve yeni kıkırdak üretimine katkı sağlama açısından CM klinik pratikte herhangi bir tümöral etkisi olmadan ve herhangi bir immün reaksiyon oluşturmada güvenle kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kıkırdak greftleri rekonstrüktif ve estetik cerrahide sıklıkla kullanılmaktadır. Greftlerin yaşayabilirliği ve rezorbsiyona uğraması en sık problemdir. Çalışmamızda kıkırdak greft yaşayabilirliğini arttırması için literatürde etkinliği birçok kez kanıtlanmış olan mezenkimal kök hücre kullanılmıştır. Mezenkimal kök hücrelerin kıkırdak greft yaşayabilirliği arttırdığı bizim çalışmamızda da gösterilmiştir. Ancak son yıllarda kök hücrelerin hangi yöne diferansiye olacağı, tümöral oluşuma neden olması ve immün reaksiyona neden oldukları için kullanımı kısıtlıdır. Ayrıca kök hücrelerin donör alan gerektirmesi, elde edilmesinde ki zorluklar ve saklanma koşulları nedeniyle klinikte rutin kullanımı kısıtlıdır. Conditioned mediumun içerdiği büyüme faktörleri, eksozomlar ve uyarıcı mediatörler sayesinde yeni kıkırdak oluşumu ve kıkırdak greft yaşayabilirliğini arttırdığı gösterilmiştir. İmmün reaksiyona neden olmaması ile güvenle kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

- Adkisson IV, H. D., et al. (2010). "The potential of human allogeneic juvenile chondrocytes for restoration of articular cartilage." The American journal of sports medicine **38**(7): 1324-1333.
- Andriamanalijaona, R., et al. (2008). "Differentiation potential of human muscle-derived cells towards chondrogenic phenotype in alginate beads culture." Osteoarthritis and cartilage **16**(12): 1509-1518.
- Baksh, D., et al. (2007). "Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow." Stem cells **25**(6): 1384-1392.
- Barachini, S., et al. (2014). "Plasticity of human dental pulp stromal cells with bioengineering platforms: a versatile tool for regenerative medicine." Micron **67**: 155-168.
- Ben-David, U. and N. Benvenisty (2011). "The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells." Nature Reviews Cancer **11**(4): 268.
- Berthiaume, F., et al. (2011). "Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges." Annu Rev Chem Biomol Eng **2**: 403-430.
- Borakati, A., et al. (2018). "A systematic review and meta-analysis of clinical trials of mesenchymal stem cell therapy for cartilage repair." **13**(3): 215-225.
- Buckwalter, J. and V. Mow (1992). "Cartilage repair in osteoarthritis." Osteoarthritis: Diagnosis and Management: 71-107.
- Bulam, H., et al. (2015). "The effect of subcutaneous platelet-rich plasma injection on viability of auricular cartilage grafts." **26**(5): 1495-1499.
- Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." Journal of orthopaedic research **9**(5): 641-650.
- Caplan, A. I. (2007). "Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine." Journal of cellular physiology **213**(2): 341-347.
- Caplan, A. I., et al. (1997). "Principles of cartilage repair and regeneration." (342): 254-269.
- Chang, C. H., et al. (2014). "Human acellular cartilage matrix powders as a biological scaffold for cartilage tissue engineering with synovium-derived mesenchymal stem cells." Journal of biomedical materials research Part A **102**(7): 2248-2257.
- Chen, W., et al. (2019). "Conditioned medium of mesenchymal stem cells delays osteoarthritis progression in a rat model by protecting subchondral bone, maintaining matrix homeostasis, and enhancing autophagy." **13**(9): 1618-1628.
- Chen, Y.-C., et al. (2018). "Can mesenchymal stem cells and their conditioned medium assist inflammatory chondrocytes recovery?" **13**(11): e0205563.
- Cheng, A., et al. (2014). "Cartilage repair using human embryonic stem cell-derived chondroprogenitors." Stem cells translational medicine **3**(11): 1287-1294.
- Coutts, R. D., et al. (2001). "Matrices for cartilage repair." Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007) **391**: S271-S279.
- Cox, R. and M. Peacock (1977). "The fine structure of developing elastic cartilage." Journal of anatomy **123**(Pt 2): 283.

- Dessau, W., et al. (1980). "Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis." J Embryol Exp Morphol **57**: 51-60.
- Freyria, A.-M. and F. Mallein-Gerin (2012). "Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors." Injury **43**(3): 259-265.
- Friedenstein, A. (1990). "Osteogenic stem cells in bone marrow."
- Gardner, O. F., et al. (2013). "Chondrogenesis of mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering."
- Goldberg, A., et al. (2017). "The use of mesenchymal stem cells for cartilage repair and regeneration: a systematic review." **12**(1): 1-30.
- Guilak, F. and V. C. Mow (2000). "The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage." Journal of biomechanics **33**(12): 1663-1673.
- Jakob, M., et al. (2004). "Chondrogenesis of expanded adult human articular chondrocytes is enhanced by specific prostaglandins." Rheumatology **43**(7): 852-857.
- Jansen, E. J., et al. (2008). "Human periosteum-derived cells from elderly patients as a source for cartilage tissue engineering?" Journal of tissue engineering and regenerative medicine **2**(6): 331-339.
- Johnson, K., et al. (2012). "A stem cell-based approach to cartilage repair." **336**(6082): 717-721.
- Jüppner, H. (2000). "Role of parathyroid hormone-related peptide and Indian hedgehog in skeletal development." Pediatric Nephrology **14**(7): 606-611.
- Kafienah, W., et al. (2008). "Lumican inhibits collagen deposition in tissue engineered cartilage." Matrix Biology **27**(6): 526-534.
- Kafienah, W. e., et al. (2002). "Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes." Tissue engineering **8**(5): 817-826.
- Karsenty, G. (2001). "Chondrogenesis just ain't what it used to be." The Journal of clinical investigation **107**(4): 405-407.
- Karsenty, G. and E. F. Wagner (2002). "Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development." Developmental cell **2**(4): 389-406.
- Khalilifar, M. A., et al. (2019). "In Vitro and In Vivo Comparison of Different Types of Rabbit Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair." Cell J **21**(2): 150-160.
- Kim, C. M., et al. (2017). "Effects of human adipose-derived stem cells on the survival of rabbit ear composite grafts." **44**(5): 370.
- Kim, H. J. and G. I. Im (2009). "Chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Greater doses of growth factor are necessary." Journal of orthopaedic research **27**(5): 612-619.
- Kim, M. J., et al. (2011). "Generation of human induced pluripotent stem cells from osteoarthritis patient-derived synovial cells." Arthritis & Rheumatism **63**(10): 3010-3021.
- Kim, Y.-J., et al. (2008). "PTHrP promotes chondrogenesis and suppresses hypertrophy from both bone marrow-derived and adipose tissue-derived MSCs." Biochemical and biophysical research communications **373**(1): 104-108.

- Kirn-Safran, C. B., et al. (2004). "Heparan sulfate proteoglycans: coordinators of multiple signaling pathways during chondrogenesis." Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews **72**(1): 69-88.
- Koga, H., et al. (2009). "Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review." **17**(11): 1289-1297.
- Kolambkar, Y. M., et al. (2007). "Chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells." Journal of Molecular Histology **38**(5): 405-413.
- Koyama, N., et al. (2012). "Human induced pluripotent stem cells differentiated into chondrogenic lineage via generation of mesenchymal progenitor cells." Stem cells and development **22**(1): 102-113.
- Lam, A. T., et al. (2020). "Human mesenchymal stem cell therapy for cartilage repair: review on isolation, expansion, and constructs." **44**: 101738.
- Lee, J. M., et al. (2013). "PD98059-impregnated functional PLGA scaffold for direct tissue engineering promotes chondrogenesis and prevents hypertrophy from mesenchymal stem cells." Tissue Engineering Part A **20**(5-6): 982-991.
- Li, F., et al. (2012). "Human placenta-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin biomaterial in the repair of articular cartilage defects." Cellular Reprogramming (Formerly Cloning and Stem Cells) **14**(4): 334-341.
- Li, L., et al. (2019). "Conditioned Medium from Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Culture Prevents UVB-Induced Skin Aging in Human Keratinocytes and Dermal Fibroblasts." Int J Mol Sci **21**(1).
- Liu, Y., et al. (2012). "One-step derivation of mesenchymal stem cell (MSC)-like cells from human pluripotent stem cells on a fibrillar collagen coating." PloS one **7**(3): e33225.
- Mahmoudifar, N. and P. M. Doran (2005). "Tissue engineering of human cartilage in bioreactors using single and composite cell-seeded scaffolds." Biotechnology and bioengineering **91**(3): 338-355.
- Mahmoudifar, N. and P. M. Doran (2010). "Chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in polyglycolic acid mesh scaffolds under dynamic culture conditions." Biomaterials **31**(14): 3858-3867.
- Mahmoudifar, N. and P. M. Doran (2010). "Extent of cell differentiation and capacity for cartilage synthesis in human adult adipose-derived stem cells: Comparison with fetal chondrocytes." Biotechnology and bioengineering **107**(2): 393-401.
- Martin, J. A. and J. A. Buckwalter (2002). "Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis." Biogerontology **3**(5): 257-264.
- Medvedev, S. P., et al. (2010). "Human induced pluripotent stem cells derived from fetal neural stem cells successfully undergo directed differentiation into cartilage." Stem cells and development **20**(6): 1099-1112.
- Oh, S.-J., et al. (2020). "Comparative analysis of adipose-derived stromal cells and their secretome for auricular cartilage regeneration." **2020**.
- Oh, S. J., et al. (2018). "Auricular Cartilage Regeneration with Adipose-Derived Stem Cells in Rabbits." Mediators Inflamm **2018**: 4267158.
- Park, S. and G.-I. Im (2013). "Embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells for skeletal regeneration." Tissue Engineering Part B: Reviews **20**(5): 381-391.

- Park, S. S., et al. (2004). "Characteristics of tissue-engineered cartilage from human auricular chondrocytes." Biomaterials **25**(12): 2363-2369.
- Pelttari, K., et al. (2008). "The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis." Injury **39**(1): 58-65.
- Pievani, A., et al. (2014). "Comparative analysis of multilineage properties of mesenchymal stromal cells derived from fetal sources shows an advantage of mesenchymal stromal cells isolated from cord blood in chondrogenic differentiation potential." Cytotherapy **16**(7): 893-905.
- Pleumeekers, M. M., et al. (2014). "The in vitro and in vivo capacity of culture-expanded human cells from several sources encapsulated in alginate to form cartilage." European cells & materials **27**: 264-280.
- Reddi, A. H., et al. (1977). "Transitions in collagen types during matrix-induced cartilage, bone, and bone marrow formation." Proceedings of the National Academy of Sciences **74**(12): 5589-5592.
- Saha, S., et al. (2010). "Comparative study of the chondrogenic potential of human bone marrow stromal cells, neonatal chondrocytes and adult chondrocytes." Biochemical and biophysical research communications **401**(3): 333-338.
- Sakaguchi, Y., et al. (2005). "Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source." Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology **52**(8): 2521-2529.
- Seol, D., et al. (2012). "Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury." **64**(11): 3626-3637.
- Serel, S., et al. (2020). "Non-significant Effects of The Geometric Shape of Autologous Cartilage Grafts on Tissue Healing: An Animal Study." Aesthetic Plast Surg **44**(5): 1845-1853.
- Somoza, R. A., et al. (2014). "Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: challenges and unfulfilled expectations." Tissue Engineering Part B: Reviews **20**(6): 596-608.
- Stefansson, K., et al. (1982). "S-100 protein in soft-tissue tumors derived from Schwann cells and melanocytes." The American journal of pathology **106**(2): 261.
- Stockwell, R. A. (1979). Biology of cartilage cells, CUP Archive.
- Tan, S. S. H., et al. (2021). "Mesenchymal stem cell exosomes for cartilage regeneration: a systematic review of preclinical in vivo studies." **27**(1): 1-13.
- Tay, A. G., et al. (2004). "Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes." Tissue engineering **10**(5-6): 762-770.
- Tondreau, T., et al. (2005). "Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity." Stem cells **23**(8): 1105-1112.
- Tuan, R. S., et al. (2013). "Cartilage regeneration." The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons **21**(5): 303.
- Wang, Z., et al. (2014). "Repair of articular cartilage defects by tissue-engineered cartilage constructed with adipose-derived stem cells and acellular cartilaginous matrix in rabbits." **13**(2): 4599-4606.

- Wei, Y., et al. (2012). "Chondrogenic differentiation of induced pluripotent stem cells from osteoarthritic chondrocytes in alginate matrix." Eur Cell Mater **23**(1).
- Wuthier, R. E., et al. (1985). "Isolation and characterization of calcium-accumulating matrix vesicles from chondrocytes of chicken epiphyseal growth plate cartilage in primary culture." Journal of Biological Chemistry **260**(29): 15972-15979.
- Xu, F., et al. (2018). "The use of allogenic adipose-derived stem cells in combination with platelet-rich fibrin for the treatment of cartilage defects in rabbit ear." **10**(6): 1900.
- Xue, K., et al. (2016). "Isolation, identification, and comparison of cartilage stem progenitor/cells from auricular cartilage and perichondrium." **8**(2): 732.
- Yang, J., et al. (2014). "Adipose-derived stem cells from the breast." Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences **19**(2): 112.
- Zhao, X., et al. (2017). "Chondrogenesis by bone marrow-derived mesenchymal stem cells grown in chondrocyte-conditioned medium for auricular reconstruction." J Tissue Eng Regen Med **11**(10): 2763-2773.



7. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE CONDITIONED MEDIUM'UN KIKIRDAK GREFT YAŞAYABİLİRLİĞİNE ETKİSİ

“Dr. Abdullah ÜNLÜ”

Tez danışmanı: Dr.Öğr.Gör. Mustafa SÜTÇÜ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ / Konya, 2021

Travma, tümör rezeksiyonları, konjenital anomali onarımı ve estetik cerrahide sık kullanılmasından dolayı kıkırdak greftlerinin popülerliği giderek artmaktadır. Vücudumuzda kıkırdak grefti için donör alanlar sınırlıdır. Kıkırdağın beslenmesi cilt ve kemik dokunun aksine difüzyon ile sağlamaktadır. Bu da kıkırdak greftinin yaşayabilirliğini azaltmaktadır. Greft sonrası geç dönemde kıkırdak greftinin boyutunda azalma, şeklinin değişmesi ve rezorbe olması problemlerin başında gelmektedir. Bu çalışmanın amacı mezenkimal kök hücre ve onun besi yeri olan conditioned mediumun kıkırdak greft yaşayabilirliğine etkisini araştırmaktır.

Kıkırdak greft hayvan modeli için New Zealand tipi tavşanların kulak kıkırdağı kullanıldı. 21 adet tavşan randomize şekilde 3 grubu ayrıldı. Kulak kıkırdağında 10x10mm otojen kıkırdak greft oluşturuldu. Grup 1 kontrol grubu olarak seçildi. Grup 2 kıkırdak greftlemesi sonrasında adipoz kökenli mezenkimal kök hücre enjekte edildi. Grup 3 kıkırdak grefti sonrasında conditioned medium enjekte edildi. Tüm tavşanlar 120 gün takip edildi. Kıkırdak greftleri etrafında 5 mm sağlam kıkırdak içerek şekilde eksize edildi. Kıkırdak greftleri histolojik değerlendirme için hematoksilen eozin ve masson trikrom boyama ile

değerlendirildi. İmmünohistokimyasal değerlendirme için tip 2 kollajen boyaması yapıldı. Elektron mikroskopunda kırıkta üretimi incelendi.

Histolojik değerlendirme sonrasında CM enjekte edilen grup 3'te kondroblast oluşumu, migrasyonu ve yeni kırıkta oluşumu grup 1 ve grup 2'ye göre daha yüksek saptanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kök hücre enjekte edilen grup 2'de kontrol grubuna göre kondroblast oluşumu, migrasyonu ve yeni kırıkta oluşumu yüksek olarak belirlenmiştir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İmmünohistokimyasal boyama sonrasında tip 2 kollajen miktarı CM enjekte edilen grup 3'te grup 1 ve grup 2'ye göre daha fazla görülmüştür. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kök hücre enjekte edilen grup 2'de kontrol grubu (grup 1) göre tip 2 kollajen miktarı fazla olarak belirlenmiştir. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Travma, yanıklar, cilt kanseri rezeksiyonu ve rekonstrüksiyon gerektiren konjenital deformiteler, burun ve kulak kemiği defektlerini içeren yüz defektleri birçok kişiyi etkilemektedir. Kırıkta deformitelerinin onarımı için alloplastik implantlar, allogreftler, otolog dokular kullanılmaktadır. Kırıkta gerektiren rekonstrüksiyonlarda sentetik implantların yüksek enfeksiyon oranları, ekpozisyon gibi sorunlar nedeniyle kullanımı sınırlıdır. Allojenik kırıkta greftleri yüksek rezorpsiyon oranları (>% 70) ve hastalık bulaşma riski nedeniyle problemler oluşturur (Tuan, Chen, and Klatt 2013). Otolog kırıkta greftleri bu seçenekler arasında halen altın standart olarak gösterilmektedir. Otolog kaynakların donör saha morbiditesi ve rezorpsiyona uğraması günümüz rekonstrüktif ve estetik cerrahi alanında ciddi bir problemdir. Kırıkta greft gerektiren durumların bu kadar fazla oluşu ve kırıkta greftlerindeki rezorpsiyon oranının yüksek olması greft yerleştirildikten sonra geç dönemde istenmeyen sonuçlara neden olmaktadır.

Mezenkimal kök hücreler kendi kendilerini yenileyebilme, farklı dokulara diferansiye olabilmesi ve immünomodülatör özellikleri nedeniyle rejeneratif tıpta önemli bir yere sahiptir. Mezenkimal kök hücreler enjekte edildikleri yerde osteosit, adiposit ve kondrosite dönüşebilme potansiyeline sahiptirler (Goldberg, Mitchell et al. 2017). Bu multipotent hücreler kemik iliği kaynaklı olabileceği gibi yağ doku, kan, dişten de elde edilebilir. Yağ dokudan elde edilen kök hücre kemik iliği kaynaklı kök hücreye göre daha kolay elde edilmesi ve donör alan problemleri

nedeniyle günlük pratikte daha sık tercih edilmektedir (Oh, Park et al. 2018). Tüm bu kaynaklar mezenkimal kök hücreler, kıkırdak greft iyileşmesinde çok önemli avantajlar sunabilir. Kondrojenik diferansiasyon kapasitelerinin yüksek oluşu yanı sıra, mezenkimal kök hücreler in vivo direkt terapötik etkileri göstermektedirler. MSC enjeksiyonları ile çok sayıda parakrin etki gösteren biyoaktif molekül salınımı olur. Bu parakrin etki antiapoptotik, immün modülasyon, antiskar ve kemoatraktan fonksiyonları sağlar (Griffin, Ritter, and Mahon 2010). İmmünomodülasyon etki derecesi çevreye, matriks ve yüzey çevresine yerel enflamatuvar koşullara bağlıdır. Wei ve ark. çalışmasında mezenkimal kök hücrelerin kartilaj yapımı ve rejenerasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir. Khalilifar ve ark. yaptıkları çalışmada yeni kartilaj üretiminde kulaktan elde edilen mezenkimal kök hücre, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre, yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre karşılaştırılmış ve hepsinde kıkırdak üretiminin arttırıldığı gösterilmiştir (Khalilifar, Baghaban Eslaminejad et al. 2019). Literatüre uygun şekilde kök hücre verilen grup kontrol grubundan daha anlamlı bulundu. Kök hücrelerin kullanımı tümöre dönüşüm ve immün reddi ile ilgili sorunlar günümüzde halen devam etmektedir (Ben-David and Benvenisty 2011).

CM içerisinde bulunan büyüme faktörleri sayesinde kondrositleri tetiklediği ve ortamda bulunan hücreleri aktive ederek kıkırdak üretimini arttırdığı düşünülmektedir. Kıkırdak üretiminde ilk etapta ortamda yüksek miktarda tip 2 kollojen bulunmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerde diferansiyasyon hangi yöne gideceği tam olarak bilinmediği için CM’da ortamda kondrojenik yolağı aktive etmesi kök hücreye karşı büyük bir avantaj olarak görülmektedir. İçerisinde kök hücre bulunmadan sadece CM verilen 3. Grupta kondrojenik yolağın aktive olduğu, yeni kondrositlerin oluştuğu, tip 2 kollojenden zengin ekstrasellüler matriks meydana geldiği görüldü. Kıkırdak greft rezorbisyonunu engellemede ve yeni kıkırdak üretimine katkı sağlama açısından CM klinik pratikte herhangi bir tümöral etkisi olmadan ve herhangi bir immün reaksiyon oluşturmada, donör alan gerektirmemesi ile güvenle kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Conditioned Medium, Kök Hücre, Kıkırdak Greft

8. SUMMARY

The Effect Of Mesenchymal Stem Cell And Conditioned Medium On Cartilage Graft Viability

The popularity of cartilage grafts is increasing due to their frequent use in trauma, tumor resections, congenital anomaly repair and aesthetic surgery. In our body, the donor areas for cartilage grafting are limited. The nutrition of the cartilage is provided by diffusion, unlike the skin and bone tissue so that reduces the viability of the cartilage graft. after the graft has healed, reduction in the size, change in shape and resorption of the cartilage graft are among the leading problems. The aim of this study is to investigate the effect of mesenchymal stem cell and conditioned medium, on cartilage graft viability.

Ear cartilage of New Zealand type rabbits was used for the cartilage graft animal model. 21 rabbits were randomly divided into 3 groups. 10x10mm autogenous cartilage graft was created in the ear cartilage. Group 1 was chosen as the control group. group 2 is after cartilage grafting, adipose-derived mesenchymal stem cells were injected. group 3 is after cartilage grafting, conditioned medium was injected. All rabbits were followed for 120 days. The cartilage grafts were excised with 5 mm of intact cartilage around them. Cartilage grafts were evaluated with hematoxylin eosin and Masson trichrome staining for histological evaluation. Type 2 collagen staining was performed for immunohistochemical evaluation. Cartilage production was examined under the electron microscope.

After histological evaluation, chondroblast formation, migration and new cartilage formation were found to be higher in group 3, which was injected with CM, compared to group 1 and group 2, and it was found to be statistically significant. Chondroblast formation, migration and new cartilage formation were found to be higher in stem cell injected group 2 compared to the control group and were found to be statistically significant. immunohistochemical staining, the amount of type 2 collagen was higher in group 3, which was injected with CM, compared to group 1 and group 2 and Statistically significant. The amount of type 2 collagen was

determined to be higher in stem cell injected group 2 compared to the control group (group 1). This result was found to be statistically significant.

Trauma, burns, congenital deformities requiring skin cancer resection and reconstruction, facial defects including nasal and ear cartilage defects affect many people. Alloplastic implants, allografts, autologous tissues are used for the repair of cartilage deformities. The use of synthetic implants in cartilage-requiring reconstructions is limited due to problems such as high infection rates and exposure. Allogeneic cartilage grafts problems due to their high resorption rate (>70%) and risk of disease transmission. Autologous cartilage grafts are still shown as the gold standard among these options. Donor site morbidity and resorption of autologous graft is a serious problem in today's reconstructive and aesthetic surgery field. The higher of conditions requiring cartilage grafts and the high rate of resorption in cartilage grafts cause undesirable results in the late period after graft.

Mesenchymal stem cells have an important place in regenerative medicine due to their self-renewal, differentiation into different tissues and immunomodulatory properties. Mesenchymal stem cells have the potential to transform into osteocytes, adipocyte and chondrocyte where they are injected. These multipotent cells can be derived from bone marrow as well as from adipose tissue, blood, and teeth. Stem cells obtained from adipose tissue are preferred more frequently in daily practice due to their easier obtaining and donor area problems compared to bone marrow-derived stem cells. All these resources mesenchymal stem cells can offer very important advantages in cartilage graft healing. Besides their high chondrogenic differentiation capacity, mesenchymal stem cells show direct therapeutic effects in vivo. MSC injections, a large number of bioactive molecules with paracrine effects are released. This paracrine effect provides antiapoptotic, immune modulation, antiscar and chemoattractant functions. The degree of immunomodulation effect depends on the environment, matrix and surface environment, local inflammatory conditions. Wei et al. In this study, it was shown that mesenchymal stem cells are effective in cartilage formation and regeneration. Khalilifar et al. In their study, mesenchymal stem cells obtained from the ear, mesenchymal stem cells derived from bone marrow, mesenchymal stem cells derived

from adipose tissue were compared in the production of new cartilage and it was shown that cartilage production was increased in all of them. In accordance with the literature, the group given stem cells was found to be more significant than the control group. Problems related to the use of stem cells, tumor transformation and immune rejection still continue today.

It is thought that the growth factors in the conditioned medium activated chondrocytes and increase the cartilage production by activating the cells in the environment. In the production of cartilage, there is a high amount of type 2 collagen in the environment firstly. Since it is not known exactly in which direction the differentiation will take in mesenchymal stem cells, activating the chondrogenic pathway in the medium in CM is seen as a great advantage against stem cells. It was observed that the chondrogenic pathway was activated, new chondrocytes were formed, and an extracellular matrix rich in type 2 collagen was formed in the 3rd group, in which only CM was given without stem cells. In terms of preventing cartilage graft resorption and contributing to the production of new cartilage, we think that CM can be used safely in clinical practice without any tumoral effects and without causing any immune reaction, as it does not require a donor area.

Keywords: Conditioned Medium, Stem cell, Cartilage Graft