

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
BMP-6 GENİ AKTARIMI İLE
KIKIRDAK DOKUSUNA FARKLILAŞMASI**

**CHONDROGENIC DIFFERENTIATION OF
MESENCHYMAL STEM CELLS
MEDIATED BY BMP-6 GENE DELIVERY**

GONCA KARAGÖZ

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
NANOTEKNOLOJİ ve NANOTİP Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,
Bu çalışma jürimiz tarafından **NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP ANABİLİM DALI**
'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

:.....
Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş

Üye (Danışman)

:.....
Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu

Üye

:.....
Prof Dr. Kezban Ulubayram

Üye

:.....
Prof. Dr. Mehmet Ali Onur

Üye

:.....
Yard. Doç. Dr. Ayşe Gönen Karakeçili

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil DENİZLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Başarımın ve azmimin mimarı olan,
hayattayken hiçbir desteğini benden esirgemeyen,
gücünü ve varlığını hep yanımda hissettiğim;
canım babam emektar Öğretmen Yasin Karagöz'ün anısına...*

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN BMP6 GENİ AKTARIMI İLE KIKIRDAK DOKUSUNA FARKLILAŞMASI

Gonca KARAGÖZ

ÖZ

Sunulan tez çalışmasında amaç, BMP6 (Bone Morphogenetic Protein 6) geni ile modifiye edilmiş sıçan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler ve kitosan doku iskelelerinden oluşan yapının, *in vitro* ortamda kıkırdak doku oluşturma potansiyelinin araştırılmasıdır. Bu amaca yönelik olarak, BMP6 genini içeren pShuttle-rBMP6 plazmidi elde edilmiş, hücrelerin plazmidle modifikasyonu sağlanmış ve BMP6 ile modifiye olmuş hücrelerin kitosan doku iskeleleri üzerindeki davranışları, hücre kültür sistemlerinde araştırılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında, gen aktarımında kullanılacak plazmidin taşıdığı BMP6 cDNA'sının, plazmidteki varlığı ve nükleotid dizisi, dizi analiziyle doğrulandıktan sonra, plazmidin kompetent *E.coli* hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transforme *E.coli* hücreleri sıvı besi ortamlarında kültüre edilerek plazmidin bu hücrelerde çoğaltılması sağlanmış, çoğalan hücrelerden kit aracılığıyla saf halde plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır.

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen bir diğer aşamada, kitosan ve lipid bazlı ajandan oluşan iki farklı gen aktarım sistemiyle plazmid DNA birleştirilip DNA-lipozom ve DNA-kitosan kompleksleri elde edilmiştir. Oluşturulan DNA-lipozom kompleksleri sıçan mezenkimal kök hücrelerine aktarılıp BMP6 geni ile modifiye edilmiş mezenkimal kök hücreler elde edilmiştir. Gen ile aktifleşmiş kitosan ise dondurarak-kurutma yöntemiyle üretilmiş kitosan doku iskelelerine (çap=5 mm, kalınlık=1 mm), fosfat tampon çözeltisi içinde çözünmüş plazmid DNA emdirilerek hazırlanmıştır.

Tez çalışmasının son aşamasında, kitosan doku iskeleleri ile hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalar 4 grup örnekle yürütülmüştür. Birinci gruptaki kitosan doku iskelelerine yalnızca hücre ekilmiş (kontrol grubu), ikinci gruptaki hücreler kültüre edilirlerken, farklılaşma ortamlarına iskele başına 20 ng olacak şekilde rekombinant BMP6 proteini eklenmiştir. Üçüncü gruptaki doku iskelelerine pShuttle-rBMP6 plazmidile modifiye edilmiş hücreler ekilmiştir. Dördüncü gruptaki örnekler ise, pShuttle-rBMP6 emdirilmiş kitosan doku iskelelerine mezenkimal kök hücreler ekilerek hazırlanmıştır. Hücre kültür çalışmaları 21 gün boyunca durgun ortamda yürütülmüştür. Plazmid emdirilmiş iskelelerden kültür ortamına salınan DNA miktarı, deneysel çalışmaların devam ettirildiği 21 gün boyunca, spektrofotometrik olarak izlenmiştir. Kitosan doku iskelelerinin, hücrelerin kondrojenik farklılaşmaları için uygun bir sürede ve kontrollü olarak plazmid DNA'nın salımını desteklediği belirlenmiştir. Hücre üremesi MTT (3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) analizi ile takip edilmiş, analiz sonucunda modifiye hücrelerin üreme eğilimlerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Hücre morfolojileri SEM ile görüntülenmiş, kontrol grubundaki hücrelerin hipertrofik bir morfolojiye sahip oldukları, BMP6 ile modifiye olmuş hücrelerin ise kondrojenik fenotipte oldukları gözlemlenmiştir. Plazmid aktarılmış

hücrelerde BMP6 geninin ifadesi ELISA testiyle kantitatif olarak saptanmış, böylece hücrelere gen aktarımının gerçekleştiği doğrulanmıştır. Ayrıca bu analizle, dolaylı olarak iki farklı yolla gerçekleşen transfeksiyonun birbirine yakın verimlilikte olduğu saptanmıştır. Kondrojenizin kantitatif olarak değerlendirilmesi ve farklı gruplardaki DNA içeriklerinin karşılaştırılması için biyokimyasal analiz yapılmıştır. İki haftalık ve üç haftalık periyod sonunda yapılan     mlerde, modifiye hücreleri içeren doku iskelelerinin, glikozaminoglikan (GAG) ve DNA içeriğinin, diğer gruplarla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Gen ile aktifleşmiş kitosan doku iskelelerindeki modifiye hücrelerin, lipozomal ajanla transfekte edilenlere göre daha fazla GAG sentezledikleri belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirilerek, BMP6 geni ile modifiye edilmiş sıçan mezenkimal kök hücreleri ve üç boyutlu kitosan doku iskelelerinden oluşan yapının, kondrojenizin sağlanması da etkin bir sistem olabileceği ve klinik uygulamalarda kıkırdak onarımına yönelik olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Kıkırdak doku mühendisliği; gen terapi; plazmid DNA; BMP6, GAM; kitosan doku iskelesi; mezenkimal kök hücre.

Danışman: Prof. Dr. Menemşe G M şDEREL   LU, Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı.

CHONDROGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS MEDIATED BY BMP6 GENE DELIVERY

Gonca KARAGÖZ

ABSTRACT

In the presented study, the promotion of *in vitro* chondrogenesis was investigated by using chitosan scaffolds and bone marrow derived mesenchymal stem cells (rBMSCs) which are modified with BMP6 (Bone Morphogenetic Protein 6). For this purpose, pShuttle-rBMP6, the expression vector consisting of the coding sequence of the BMP6 is obtained, and then chondrogenic and cellular activities of modified cells on chitosan scaffolds were determined under static culture conditions.

In the first part of the study, pShuttle-rBMP6 were amplified and sequenced to ensure that the BMP6 cDNA insert and nucleotide sequence were correct. After the confirmation of cloned BMP6 gene; plasmids were transformed into competent *E.coli* cells, and then they were propagated in *E.coli*. Finally, the plasmid DNA was isolated and purified from *E.coli*.

In the next part of the study, by combining plasmid DNA with two different gene delivery systems which are composed of chitosan and lipid based agent, DNA-lyposome and DNA-chitosan complexes were produced. By the transfection of constructed DNA-lyposome complexes into rBMSCs, cells modified with BMP6 gene were obtained. To produce gene activated matrix, plasmid DNA (in PBS) was embedded into the chitosan scaffolds (diameter=5mm, thickness=1mm) fabricated by freeze-drying technique.

In the last part of the study, *in vitro* cultivation of cells which are seeded onto chitosan scaffolds was performed. Scaffolds were divided to four groups. Group 1 is composed of only MSCs seeded into the pure chitosan scaffolds; group 2 was the scaffolds consist of MSCs which were cultured in the presence of 20 ng recombinant protein per scaffold; group 3 was BMP6-modified MSCs that are seeded into chitosan scaffolds and group 4 consists of MSCs seeded into the scaffolds together with pShuttle-rBMP6. Cell culture studies were carried out in static conditions for 21 days. The plasmid DNA release from scaffolds were quantified by spectrophotometrically during the culture period. Results demonstrated that, chitosan scaffolds were performed the controlled-release of plasmid DNA for sustained periods of time and at an adequate level, thus they provide the modification of MSCs to induce chondrogenic differentiation. Cell viability and proliferation were analyzed by MTT(3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Results demonstrated that the percent of viable MSCs modified with BMP6 was significantly higher than those of nontransfected MSCs, which indicated that BMP6-transfected MSCs showed much better proliferation properties. The attachment, proliferation and chondrogenic differentiation of stem cells into the scaffolds were morphologically examined by SEM analysis.

The observations suggested that, BMP6-modified MSCs differentiated to the chondrogenic phenotype, otherwise cells in the control group showed hypertrophic morphology. The expression level of BMP6 protein in the culture medium of BMP6-modified MSCs was quantified by ELISA. BMP6 protein detection demonstrated the synthesis of BMP6 protein that was secreted to the medium by successfully transfected cells via two different gene delivery systems. In addition, this analyze indirectly showed that, the transfection efficiencies of both systems were close to each other. Furthermore, biochemical analysis was performed with cell-seeded scaffolds to determine glycosaminoglycan (GAG) and DNA quantities at the 7th and 14th days of culture. As a result, higher amounts of GAG and DNA were obtained from the scaffolds containing modified cells than that of the scaffolds containing unmodified cells.

After the evaluation and discussion of the results obtained from the cell culture studies, the engineered construction that composed of three dimensional chitosan scaffolds and bone marrow derived mesenchymal stem cells modified with BMP6 could be considered as efficient systems to induce cartilage regeneration for clinical applications.

Keywords: Cartilage tissue engineering; gene therapy; plasmid DNA; BMP6; GAM; chitosan scaffold; mesenchymal stem cell.

Advisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Hacettepe University, Department of Nanotechnology and Nanomedicine

TEŞEKKÜR

Bilgi birikimi ve tecrübesiyle çalışmalarımı titizlikle yürütülmesini ve sonuçlandırılmasını sağlayan, inandığım yolda başarıyla yürümem için gereken desteği ve cesareti veren, hayat boyu örnek alacağım çok değerli hocam Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na,

Tez çalışmalarımın bir bölümünün yürütülmesinde önderlik eden değerli hocam Prof. Dr. Cihan Öner'e,

Çalışmalarımda gerek teorik, gerekse pratik anlamda tüm samimiyetiyle beni destekleyen, kendisinden çok şey öğrendiğim, çok sevgili hocam Dr. İ. Çağatay Karaaslan'a,

Deneysel çalışmalarımın yürütülmesinde büyük emeği olan, olumlu yaklaşımıyla hep moral veren ve yanımda olan çok sevgili hocam Dr. R. Seda Tıgılı'ya,

Deneysel çalışmalarımda kullandığım plazmidi sağlayan Prof. Dr. Gerald Hankins'e ve laboratuvar olanaklarından yararlandığım; Biyoloji, Kimya, Nanoteknoloji ve Nanotıp Bölümlerinden tüm hocalarıma,

Çalışmalarımın yürütülmesinde katkıları olan Kerem Selçuk, Beril Erdem, Fatma Zilifdar, Solmaz Mosayyabi ve laboratuvar arkadaşlarım Anıl S. Kahraman, Işıl Gerçek Beşkardeş, Damla Çetin ve canım arkadaşım Sevcan Dalkıranoglu'na,

Desteğini her an arkamda hissettiğim eşsiz anneanneme ve canım aileme,

Benimle üzüldüğüm benimle sevdiğim, çıkış yolu bulamadığım anlarda hep yeni bir kapıyı aralayan, hayattaki en değerli varlığım anneme, babama ve biricik ablam Dr. Kıvılcım Özden'e,

Yaşam sevincim ve hayat arkadaşım Davut Kayabaşı'na,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI.....	1
2. TEMEL BİLGİLER.....	5
2.1. Gen Terapi.....	5
2.1.1.Gen terapinin tarihçesi.....	6
2.1.2. Terapötik nükleik asitler.....	8
2.1.3. Gen terapide kullanılan vektör sistemleri.....	10
2.1.3.1. Viral sistemler.....	10
2.1.3.2. Virüs harici sistemler.....	12
2.1.4. Hücre içine gen aktarımının gerçekleştirilmesi.....	12
2.1.5. Somatik gen terapi ve eşey hücresi gen terapisi.....	14
2.1.6. Klinik uygulamalarda kullanılan gen terapi yöntemleri.....	14
2.1.7. Gen aktarımı uygulamaları.....	16
2.1.8. Gen terapiyle hedeflenen hastalıklar.....	17
2.1.9. Gen terapisi araştırmalarında bugüne kadar yaşanan önemli gelişmeler.....	18
2.1.10. Gen terapisinde son durum ve ticari ürünler.....	19
2.2. Doku Mühendisliğinde Gen Terapi Uygulamaları.....	20
2.2.1. Biyosinyal moleküllerin üretiminin gen aktarımıyla sağlanmasının avantajları.....	21
2.2.2. Doku mühendisliğinde gen aktarım stratejileri.....	22
2.2.3. GAM tasarımı.....	23
2.2.3.1. Vektörlerin doku iskelesine enkapsülasyonu.....	23
2.2.3.2. Vektörlerin doku iskelesi yüzeyine immobilizasyonu.....	25

2.2.4. Doku iskelelerinden gen aktarımı.....	26
2.2.5. Doku mühendisliği ve gen terapi yaklaşımıyla onarılan dokular.....	27
2.2.5.1. Deri ve yara iyileşmesi.....	27
2.2.5.2. Kemik.....	28
2.2.5.3. Sinir.....	28
2.2.5.4. Kan damarları.....	29
2.3. Kıkırdak Doku Mühendisliği.....	29
2.3.1. Kıkırdak doku fizyolojisi.....	30
2.3.2. Kıkırdak doku mühendisliğinde geleneksel yaklaşımlar.....	34
2.3.3. Kıkırdak doku mühendisliğinde gen terapi yaklaşımları.....	36
2.3.3.1. Tedavide kullanılan aday genler ve terapötik etki mekanizmaları.....	36
2.3.3.2. Aktarımda kullanılan doku iskeleleri.....	38
2.3.3.3. Artikular (eklem) kıkırdak onarımında gen aktarı stratejileri.....	39
2.3.3.4. Gen terapiyle artikular kıkırdak hasarlarının onarılması.....	41
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	46
3.1. BMP6 cDNA'sının Eldesi, Plazmide Klonlanması ve Sekans Doğruluğunun Tayini.....	46
3.1.1. BMP6 cDNA'sının eldesi ve plazmide klonlanması.....	47
3.1.2. Klonlanan genin sekans doğruluğunun tayini.....	47
3.1.2.1. pShuttle-rBMP6 plazmidinin çoklu klonlama bölgesinin amplifikasyonu.....	49
3.1.2.2. Otomatik DNA dizi analizi (Sekans analizi).....	50
3.2. <i>E.coli</i> Hücrelerinin Rekombinant Plazmidlerle Transformasyonu.....	51
3.2.1. <i>E.coli</i> kültüründe kullanılan besi ortamlarının hazırlanması.....	52
3.2.2. Kompetent <i>E.coli</i> hücrelerinin canlılığının ve transformasyon kapasitelerinin pUC 19 kontrol DNA'sı ile test edilmesi.....	53
3.2.3. Kompetent <i>E.coli</i> hücrelerinin pShuttle-CMV ile	

transformasyonu.....	53
3.3. Transforme <i>E.coli</i> Hücrelerinin Katı Besi Ortamlarında Çoğaltılması ve Saklanması.....	54
3.4. Transformant Kolonilerin Sıvı Besi Ortamlarında Çoğaltılması ve Kolonilerden Plazmid DNA İzolasyonunun Yapılması.....	54
3.5. Sıçan Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücre (rBMSC) Eldesi ve Hücrelerle Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları.....	55
3.5.1. Hücre morfolojilerinin gözlemlenmesi.....	56
3.5.2. Hücre üremesine ait özgül üreme hızı ve hücre ikilenme süresinin hesaplanması.....	57
3.5.3. Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşma davranışlarının incelenmesi.....	57
3.5.3.1. Hücre kültür koşulları.....	57
3.5.3.2. Hücrelerin Safranin O ile boyanması.....	58
3.6. Kitosan Doku İskelesi Üretimi ve Karakterizasyonu.....	58
3.7. Plazmidin Sıçan Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelere Aktarılması.....	59
3.7.1. Lipofektamin aracılığıyla gerçekleştirilen transfeksiyon.....	59
3.7.2. Plazmidin kitosan doku iskelelerine emdirilmesi.....	60
3.8. Kitosan Doku İskeleleriyle Yürütülen Hücre Kültürü Çalışmaları.....	60
3.8.1. Hücre kültür koşulları ve örnek gruplarının hazırlanması....	61
3.8.2. Doku iskeleleriyle yürütülen hücre kültür çalışmaları kapsamında yapılan analizler ve gözlemler.....	61
3.8.2.1. DNA salım çalışmaları.....	62
3.8.2.2. Hücre üremesi ve mitokondriyal aktivite analizi (MTT yöntemi).....	62
3.8.2.3. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile analiz.....	63
3.8.2.4. ELISA (enzyme-linked immunoabsorbance assay) testi.....	63
3.8.2.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi.....	64
3.8.2.6. Doku iskelelerinin biyokimyasal analizi.....	66
3.8.2.7. İstatistiksel analiz.....	66

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI.....	67
4.1. Kıkırdak Doku Üretimi İçin Doku İskelesi, Hücre ve Biyosinyal Molekülü (gen) Seçimi.....	67
4.1.1. Doku iskelesi fabrikasyonunda kullanılacak biyomalzemenin ve uygun üretim koşullarının seçimi.....	68
4.1.2. Kondrojenezi uyaracak hücre tipinin seçimi.....	69
4.1.3. Kondrojenezi uyaracak biyosinyal molekülün (genin) seçimi.....	70
4.2. Sıçan Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelere <i>in vitro</i> BMP6 Geni Aktarılması.....	73
4.2.1. BMP6 geni içeren pShuttle-BMP6 plazmidinin oluşturulması ve klonlanan BMP6 cDNA dizisinin doğrulanması.....	74
4.2.1.1. pShuttle-BMP6'nın DNA dizi analizi sonucu.....	74
4.2.2. pShuttle-BMP6'nın saf halde elde edilmesi.....	75
4.3. Mezenkimal Kök Hücrelere Plazmidi Aktaracak Aktarım Yönteminin ve Vektörün Seçimi.....	76
4.3.1. Lipofektamin ile mezenkimal kök hücrelere gen aktarımı...	77
4.3.2. Gen ile aktifleşmiş kitosan aracılığıyla gen aktarımı.....	78
4.3.3. Aktarım metodunun transfeksiyon verimine olan etkisi.....	80
4.4. Sıçan Mezenkimal Kök Hücrelerinin Karakterizasyon Çalışmaları...	82
4.4.1. Hücrelerin morfolojik gözlem sonuçları.....	82
4.4.2. Hücre üremesine ait özgül üreme hızı ve hücre ikilenme süresinin hesaplanması.....	84
4.4.3. Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmalarına ilişkin gözlem sonuçları.....	86
4.5. Kitosan Doku İskeleleriyle Yürütülen Hücre Kültürü Çalışmaları.....	89
4.5.1. Kitosan doku iskelelerinden plazmid DNA salımı.....	89
4.5.2. MTT analizi.....	91
4.5.3. ELISA testi sonuçları.....	93
4.5.4. SEM analizi.....	94
4.5.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analiz sonuçları.....	98

4.5.6. Doku iskelelerinin biyokimyasal analizi.....	102
5. GENEL SONUÇLAR.....	105
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	110
EKLER.....	117
ÖZGEÇMİŞ.....	118

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. SCID hastalığının gen terapi yöntemiyle tedavisinin şematik gösterimi.....	8
Şekil 2.2. Gen tedavisi uygulamalarında kullanılan vektörler ve kullanım oranları.....	10
Şekil 2.3. Retroviral yolla gerçekleşen gen aktarım mekanizması.....	11
Şekil 2.4. Gen aktarım mekanizması: (a) Genin hücrede izlediği yol ve hedef proteinin üretimine kadar meydana gelen değişimler, (b) Katyonik vektörlerin hücrelere alınmasından protein sentezine kadar gerçekleşen olaylar dizisi.....	13
Şekil 2.5. Adenovirüsler aracılığıyla gen aktarımının gerçekleşmesi.....	14
Şekil 2.6. Mutant genin susturulması için uygulanan yöntemler: (a) Antisens teknoloji, (b) Ribozim teknolojisi.....	15
Şekil 2.7. Oligonükleotid aracılığıyla mutasyona uğramış bir genin susturulması.....	16
Şekil 2.8. <i>Ex vivo</i> ve <i>in vivo</i> yaklaşımla gen terapi.....	17
Şekil 2.9. 2010 yılında gen terapiye yönelik olarak tüm dünyada yapılan klinik denemelerin hastalıklara göre dağılımı.....	18
Şekil 2.10. Doku mühendisliğinde uygulanan gen aktarım stratejilerinin şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.11. Vektörlerin hidrojellerden (a) ve hidrofobik doku iskelerinden (b) ayrılması.....	24
Şekil 2.12. (a) Özgül ve özgül olmayan etkileşimlerle vektörün bağlanması, (b) Vektörün biyomateryalden ayrılması.....	25
Şekil 2.13. (a) Gen ile aktive olmuş matris yapısı, (b) Doku iskelelerinden gen aktarımı yoluyla doku onarımı.....	26
Şekil 2.14. Kıkırdak doku (a) histolojik kesit görüntüsü. Hücreler lakünler içerisinde yer almaktadır. Perikondrium şeklin üst ve alt kısmında pembe ile boyanmış kısımda gösterilmiştir (hemotoksilen-eozin boyaması) (b) Kondrosit elektron mikroskop görüntüsü.....	31
Şekil 2.15. Kıkırdak matrisinin moleküler yapılanması	

Şekil 2.16. Kıkırdak doku tiplerinin şematik gösterimi (a) hiyalin kıkırdak, (b) elastik kıkırdak, (c) fibröz kıkırdak.....	32
Şekil 2.17. Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan yaklaşımların şematik gösterimi.....	35
Şekil 2.18. Kıkırdak hasarlarının onarımında gen aktarım yaklaşımları: (a) Vektör veya GAM aracılığıyla <i>in vivo</i> gen aktarımı, (b) GAM'a hücreler ekilerek yapılan <i>ex vivo</i> gen aktarımı, (c) Modifiye hücrelerin matrise ekilmesiyle gerçekleşen <i>ex vivo</i> gen aktarımı.....	40
Şekil 2.19. Romatoid artrit oluşturduğu enflamasyon nedeniyle diz kapağı ekleminde meydana gelen kıkırdak ve kemik hasarı.....	42
Şekil 3.1 Deneyisel çalışmalardaki aşamaların şematik gösterimi.....	46
Şekil 3.2. BMP6 geni cDNA ve amino asit şifreleyen bölgelerinin dizilimi.....	48
Şekil 3.3. pShuttle-CMV'nin çoklu klonlama bölgesinin DNA dizisi ve bu bölgenin amplifikasyonu için tasarlanan primerlerin ileri ve geri bağlanma bölgeleri.....	49
Şekil 3.4. Plazmid DNA izolasyonun şematik olarak açıklaması.....	54
Şekil 4.1. Çalışma kapsamında hazırlanan doku iskelelerinin genel görüntüsü: (a) Kuru halde (sol tarafta), ıslak halde (sağ tarafta), (b) Dondurarak-kurutma tekniği ile üretilen kitosan doku iskelelerinin SEM görüntüsü (x250).....	69
Şekil 4.2. pShuttle-CMV'nin gen haritası.....	74
Şekil 4.3. pShuttle-BMP6'nın sekans analizine ait kromatogram görüntüsünden bir kesit.....	75
Şekil 4.4. pShuttle-BMP6'ya ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	76
Şekil 4.5. Kitosan ile lipofektaminin transfeksiyon verimlerinin karşılaştırılması...	81
Şekil 4.6. rBMSCs'nin kristal viyole görüntüleri : (a) 3.gün (x10), (b) 7.gün (x10), (c) 3.gün (x20), (d) 7. gün (x20).....	83
Şekil 4.7. rBMSC'nin floresan mikroskop görüntüleri : (a) 1. gün (x20), (b) 3. gün (x20), (c) 7. gün (x20), (d) 16. gün.....	84
Şekil 4.8. Hemositometrik sayım sonucu elde edilen kemik iliği mezenkimal kök hücre üreme grafiği.....	85
Şekil 4.9. Özgül üreme hızının hesaplanması için kullanılan $\ln x - t$ grafiği.....	86
Şekil 4.10. Kondrojenik ortam (KO) ve büyüme ortamında (BO)	

çoğaltılmış ve Safranin-O ile boyanmış rBMSCs'nin optik mikroskop görüntüleri : (a,b) 7. gün (x20), (c,d) 14. gün (x20), (e,f) 21. gün (x20), (g,h) 28. gün (x20).....	87
Şekil 4.11. Kitosan doku iskelerinin zamana karşı plazmid DNA salım profili...	89
Şekil 4.12. MTT analizi ile rBMSC'in saf kitosan, plazmid yüklenmiş kitosan ve BMP6 eklenmiş kitosan üzerindeki ve transfekte rBMSC'nin saf kitosan üzerindeki reme davranışları (İstatistiksel önem farklılığı, n=3, * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 kitosan kontrol grubudur).....	91
Şekil 4.13. Kitosan doku iskelelerinin 7. güne ait görüntüleri: (a) Plazmid emdirilmiş kitosan+ rBMSCs (x774), (b) Plazmid emdirilmiş kitosan+rBMSCs (x1000), (c) plazmid+rBMSCs (750), (d) plazmid+rBMSCs (x1000), (e) Serbest BMP6+rBMSCs (x500), (f) Serbest BMP6+rBMSCs (x250).....	95
Şekil 4.14. Ondördüncü güne ait SEM görüntüleri (a) Plazmid emdirilmiş kitosan doku iskelesi (x100), (b) Plazmid içermeyen kitosan doku iskelesi (x100).....	96
Şekil 4.15. Kitosan doku iskelelerinin 14. güne ait SEM görüntüleri: (a) rBMSCs (x735), (b) rBMSCs (x750), c) BMP6+rBMSCs (x500), (d) BMP6+rBMSCs (x500).....	97
Şekil 4.16. Modifiye hücreleri içeren kitosan doku iskelelerinin 14. güne ait SEM fotoğrafları: (a) Plazmid emdirilmiş kitosan+rBMSCs (x1000), (b) Plazmid emdirilmiş kitosan+rBMSCs (x1000), (c) Plazmid+rBMSCs (x250), (d)Plazmid+rBMSCs (x500).....	97
Şekil 4.17. rBMSCs ekilmiş kitosan doku iskelelerinin 21. güne ait SEM görüntüleri: (a) rBMSCs (x2000), (b) BMP6+rBMSCs (x1000), (c) Plazmid+ rBMSCs (x1000), (d) Plazmid emdirilmiş kitosan+rBMSCs (x1960).....	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Terapötik nükleik asitler ve moleküler düzeydeki etkileri.....	9
Çizelge 2.2. Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan aday genler ve etki mekanizmaları.....	38
Çizelge 2.3. Artikular kıkırdak hasarlarında yapılan gen aktarım çalışmaları.....	45
Çizelge 3.1. İleri ve geri amplifikasyon primerlerine ait nükleotid dizisi.....	49
Çizelge 3.2. PZR için hazırlanan reaksiyon karışımı bileşimindeki maddeler ve kullanıldığı miktarlar (10x Reaksiyon Tamponu: 10 mM Tris HCl pH:9,0, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ , %0,1 Triton X100, 0,2 mg/mL BSA veya Jelatin.)	
Çizelge 3.3. Dizi analizi reaksiyonunda kullanılan reaksiyon karışımı bileşimi.....	50
Çizelge 3.4. RT-PCR analizi için tasarlanmış primer dizileri, gen bankası erişim numaraları.....	65
Çizelge 4.1. Çalışma kapsamında hazırlanan kitosan doku iskelelerinin temel özellikleri.....	69
Çizelge 4.2. BMP6 ve GAPDH geni için karşılaştırmalı ve göreceli gen ifadesi..	100
Çizelge 4.3. Kitosan, BMP6-kitosan, DNA-kitosan ve modifiye hücre kitosan durgun kültürdeki biyokimyasal bileşimleri (İstatistiksel önem farklılığı, n=3,* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 kitosan kontrol grubudur).....	102

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Terapötik nükleik asitler ve moleküler düzeydeki etkileri.....	9
Çizelge 2.2. Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan aday genler ve etki mekanizmaları.....	38
Çizelge 2.3. Artikular kıkırdak hasarlarında yapılan gen aktarım çalışmaları.....	45
Çizelge 3.1. İleri ve geri amplifikasyon primerlerine ait nükleotid dizisi.....	49
Çizelge 3.2. PZR için hazırlanan reaksiyon karışımı bileşimindeki maddeler ve kullanıldığı miktarlar (10x Reaksiyon Tamponu: 10 mM Tris HCl pH:9,0, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ , %0,1 Triton X100, 0,2 mg/mL BSA veya Jelatin.)	
Çizelge 3.3. Dizi analizi reaksiyonunda kullanılan reaksiyon karışımı bileşimi.....	50
Çizelge 3.4. RT-PCR analizi için tasarlanmış primer dizileri, gen bankası erişim numaraları.....	65
Çizelge 4.1. Çalışma kapsamında hazırlanan kitosan doku iskelelerinin temel özellikleri.....	69
Çizelge 4.2. BMP6 ve GAPDH geni için karşılaştırmalı ve göreceli gen ifadesi..	100
Çizelge 4.3. Kitosan, BMP6-kitosan, DNA-kitosan ve modifiye hücre kitosan durgun kültürdeki biyokimyasal bileşimleri (İstatistiksel önem farklılığı, n=3,* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 kitosan kontrol grubudur).....	102

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AA	Askorbik asit
AAV	Adenoassociated Virus (Adeno bağımlı virüs)
ACAN	Aggrecan
ACI	Autologous Chondrocyte Implantation (Ototolog Kondrosit İmplantasyonu)
ADA	Adenozin deaminaz
AIDS	Acute Immune Deficiency Syndrome (İnsan İmmün Yetmezlik Sendromu)
ANOVA	Varyans Analizi
BCL	B Hücreli Lenfoma
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor (Beyin Türevli Sinir Büyüme Faktörü)
BMP	Bone Morphogenetic Protein (Kemik Morfogenetik Proteini)
bp	Base pair (Baz çifti)
BSA	Sığır Serum Albümin
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CMV	Cytomegalovirus (Sitomegalovirüs)
COL	Kollagen
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein (Kıkırdak Oligomerik Matris Proteini)
DD	Deasetilasyon Derecesi
Dex	Deksametazon
DHH	Desert hedgehog

DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagles Medium F12
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
DTT	Ditiotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Ekstrasellüler matris
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EVA	Polietilen-Ko-Vinil-Asetat
FBS	Fetal Sığır Serumu
FDA	Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu)
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
GAG	Glikozaminoglikan
GAM	Gen ile aktifleşmiş matris
GDNF	Glial Cell Line-Derived Neurotropic Factor (Glial Hücre Türevli Nörotrofik Faktör)
GlcAT-I	Glukuronil Transferaz-1
HCL	Hidroklorik Asit
HMDS	Hekzametildisilazan
HEK-293	Human Embryonic Kidney-293 (İnsan Embriyonik Böbrek Hücreleri)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü)
HSV	Herpes Simplex Virüsü
hTERT	Human Telomerase Revers Transcriptase (İnsan Telomeraz Ters Transkriptaz Enzimi)

IGF	İnsülin Büyüme Faktörü
IHH	Indian hedgehog
IL	İnterlökin
ITS	İnsülin, transferin, selenyum
İNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
kb	kilobaz
LB	Luria Bertani
mM	Milimolar
MMLV	Moloney Murine Lösemi Retrovirüsü
MMP	Metalloproteinaz
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MSC	Mesenchymal Stem Cell
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür)
N	Newton
ng	nanogram
NGF	Nerve Growth Factor (Sinir Büyüme Faktörü)
NO	Nitrik Oksit
OTCD	Ornitin Transcarbamilase Deficiency (Ornitin Transkarbamilaz Eksikliği)
PBS	Phosphate Buffer Saline (Fosfat Tampon Çözeltisi)
PDGF	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PEG	Polietilen Glikol
PEI	Polietilen İmin
PGA	Poliglikolik Asit
PLA	Polilaktik Asit

PLGA	Poli-Laktik-Ko-Glikolik Asit
pShuttle-rBMP6	Sıçan BMP6 genini içeren rekombinant plazmid
RA	Romatoid Artrit
rBMSCs	Rat Bone Marrow Derived Mesenchyma Stem Cells (Sıçan Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler)
RNA	Ribonükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz
RPM	Revolutions per minute (Dakikadaki dönüş)
RT-PCR	Real-Time Polymeric Chain Reaction (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
SCID	Severe Combined Immunodeficiency (Ağır Kombine Bağışıklık Eksikliği)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SHH	Sonic hedgehog
siRNA	Small Interfering RNA (Küçük müdahaleci RNA)
SMART	Spliceosome-Mediated RNA Trans-splicing [Splaysozomla RNA transkriptinin kesip çıkarılarak değişimi (trans-splays)]
SOC	Super Optimal Broth with Glucose
TCPS	Polistiren Hücre Kültür Kapları
TGF	Transforming Growth Factor (Dönüştürücü Büyüme Faktörü)
TMB	Tetrametilbenzidin
TNF	Tümör Nekroz Faktör
UV	Ultraviyole
v/v	Hacim/Hacim Oranı

VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
w/v	Ağırlık/Hacim Oranı
μ	Özgöl üreme hızı
μL	Mikrolitre

1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Kıkırdak dokusu, yenilenme için gerekli sinirsel bağlantıları az, kan ve lenf damarlarından yoksun bir dokudur. Ayrıca, kondrositlerin hareketsizliği ve çok zor çoğalabilmeleri, kıkırdak doku onarımını zorlaştırmaktadır (Chung and Burdick 2008; Steinert et al., 2008). Belirtilen nedenler, kıkırdak dokusu kayıpları ve hasarlarını temel bir sağlık sorunu haline getirmektedir. Travmatik durumlara en fazla maruz kalan ve kıkırdak hastalıklarının en yaygın görüldüğü kıkırdak tipi ise artikular (eklem) kıkırdak olmaktadır (Chung and Burdick, 2008). Osteoartrit, özellikle gelişmiş ülkelerde görülen ve nüfusun %30'unu etkilediği bilinen dejeneratif bir eklem hastalığıdır. Yaşlanan nüfus ve artan obezite nedeniyle, gelecekte osteoartrit vakalarının sayısında büyük bir artış olacağı düşünülmektedir (Clouet et al., 2009).

Eklem kıkırdağının onarılmasında kullanılan popüler tedavi yöntemleri; estetik ve ortopedik ameliyatlar, doku transplantasyonu ve protez uygulamalarıdır. Tüm bu tekniklerle, eklemdaki acı hafifletilip eklem işlevsellik kazandırılrsa da, tedaviye bağlı olarak, zamanla ve yük artışıyla parçalanabilen, biyokimyasal ve biyomekaniksel özellikleri bakımından hiyalin kıkırdağın gerisinde kalan fibröz kıkırdak oluşmakta ve bu kıkırdağın parçalanmasıyla da osteoartrit gelişebilmektedir. Söz konusu tedavilerin diğer olumsuzlukları, ameliyat sonrası gelişebilecek komplikasyonlar, dokunun alındığı bölgede hasar oluşması ve greft reddidir (Chung and Burdick, 2008). Tüm bu tedavilerin olumsuzluklarına çözüm getirmek üzere öngörülen yaklaşım “*doku mühendisliği ile kıkırdak dokusu üretilmesidir*”. Doku mühendisliği ile tedavi amacıyla geliştirilen ilk metod, “Otolog kondrosit transplantasyonu” (autologous chondrocyte implantation=ACI) dur. Bu yöntemde, hastadan alınan sağlıklı kondrositler kültür ortamında çoğaltıldıktan sonra süspanse halde hasarlı olan bölgeye implante edilir. Bu tedavi yaklaşımıyla, klinikte bazı iyi sonuçlar alınsa da, kondrositler tek tabakalı kültür ortamlarında “de-differansiye” olarak fenotipik özelliklerinin çoğunluğunu kaybettiklerinden, rejeneratif özelliklere sahip, doğal hiyalin kıkırdak dokusunu taklit edebilecek bir yapı şu ana kadar geliştirilememiştir (Gelse and Schneider 2006).

Doku mühendisleri ACI tekniğini ileri götürerek öncelikle, hücreleri, üç boyutlu yapay matrislerle (doku iskeleleri) birleştirmişlerdir. Daha sonra bu sistemlere; büyüme, farklılaşma, transkripsiyon faktörleri ve sitokinleri içine alan biyosinyal moleküller dahil edilmişlerdir. Bu moleküllerin bazıları kondrojenik farklılaşma, matris sentezi gibi anabolik olayların yönlendirilmesinde etkiliyken; bazıları da hasar görmüş dokudaki katabolik süreçlerin durdurulmasında etkilidir. Ancak protein yapısındaki biyosinyal moleküllerin, doku mühendisliği uygulamalarında verimli bir şekilde kullanılabilmesi için, etkin olan dozlarının ve uygulandıkları sürenin çok iyi ayarlanması gerekir. Bu parametreler üzerinde belirleyici olan ise proteinlerin aktarılması için seçilen sistemlerdir. Terapötik özelliğe sahip rekombinant proteinler iki farklı şekilde hedef bölgelere aktarılabilir: 1. Lokal veya sistemik olarak çözülmüş halde; 2. Doku iskelesine emdirme ve immobilizasyon gibi yollarla bağlanarak. Ancak bu proteinler özellikle *in vivo*'da kısa yarılanma ömrüne sahip olduklarından, hedef bölgeye terapötik dozda ulaşmaları için yüksek ve tekrarlanan dozlarda verilmeleri gerekmektedir. Bu durum hem tedavi maliyetlerini artırır, hem de yüksek doz, hedeflenmeyen organlarda hasara neden olabilir (Saraf and Mikos 2006). Ayrıca rekombinant proteinler translasyon sonrası modifikasyonlardan yoksun oldukları için doğal proteinlerin sağladığı terapötik etkiyi gösteremeyebilirler (Storrie and Mooney, 2006). Proteinlerin aktarılması için geliştirilen kontrollü salım sistemlerinde ise proteinlerin kararlılığının korunması oldukça güçtür. Proteinler, taşıyıcı sistemlere hapsedilirlerken uygulanan üretim metodları (yüksek sıcaklıklar, şiddetli karıştırma vb.) ve aktarım sırasında proteinlerin hidratlanması, proteinlerin parçalanmasına yol açabilir. Böylece proteinler yapısal ve kimyasal bütünlükleri korunamadığı için işlev gösteremezler. (Fu et al.,2000; Saraf and Mikos, 2006).

Rekombinant proteinlerin ve kontrollü salım sistemlerinin taşıdığı dezavantajlara çözüm getirmek üzere geliştirilen yöntem, "gen terapi" dir. Kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında kullanımı araştırılmakta olan bu yöntemde; terapötik bir proteini kodlayan gen hücrelere aktararak, hücreler modifiye edilir. Böylece hücreler proteinleri lokal ve uzun süreli olarak sentezleyip mikroçevrelerine salarlar ve hasarlı kıkırdak dokusunun rejenerasyonunu gerçekleştirirler. Protein lokal olarak üretilip salındığı için hedeflenmeyen dokular, proteine düşük düzeyde maruz kalmış olurlar.

Artikular kıkırdağın tedavisinde sinoviyal hücreler, kondrositler ve mezenkimal kök hücreler olmak üzere üç temel hücre tipinin genetik modifikasyonu hedeflenir. Kondrositlerin yoğun bir matrisle çevrili olmaları, eklemin iç taraflarında ve az sayıda olmaları, aktarım verimliliğini düşürür. Ayrıca çoğalmaları sırasında fenotipik özelliklerini kaybetmeleri, bu hücrelerin olumsuz özelliklerindendir (Steinert et al., 2008). Mezenkimal kök hücreler ile yapılan çalışmalar, bu hücrelerin kondrositlere iyi bir alternatif olduğunu göstermektedir. Bu hücrelerin tanımlanmış belli bir fenotipi olmadığı için, kondrojenik faktörlerle kıkırdak dokusuna farklılaşmaları sağlanabilir. Yetişkin kıkırdağının yenilenmesi morfojenetik proteinler ve sinyal moleküllerin eksikliği nedeniyle tam olarak gerçekleşemez. Bu eksikliği gidermek amacıyla, hücrelerin bu ajanlar tarafından uyarılması sağlanmaktadır. BMP-2, BMP-7, CDMP-1 ve TGF- β büyüme faktörlerini kodlayan genlerin çoğunluğu *in vivo* ve *ex vivo* kıkırdak rejenerasyonuna yönelik gen terapi çalışmalarında kullanılmıştır (Gelse and Schneider, 2006). TGF- β süper ailesinin bir alt grubu olan BMP6'nın (kemik morfojenetik protein-6) mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını indüklediği ve kondrogenezde önemli rol oynadığı bilinmektedir. (Hennig et al., 2007; Indrawattana et al., 2004; Estes et al., 2006). Ancak, literatürde kondrogenezi geliştirdiği bilinen BMP6'nın, kıkırdak doku oluşumuna yönelik olarak gen aktarım metodlarıyla aktarıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak hücrelere, nükleik asitler, yalın halde, virüslerle, viral olmayan vektörlerle veya gen ile aktifleşmiş matris (GAM) yapıları aracılığıyla aktarılabilir. Virüsler taşıdıkları kapsid yapısı aracılığıyla enfekte edecekleri hücreleri tanıyıp bağlanma özelliğine sahiptirler. Ancak, bu yapı enfekte ettikleri hücrelerde immün cevaba neden olur. Viral olmayan, katyonik lipozomlar ve katyonik polimerler ise DNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileşerek büyük miktarlardaki DNA molekülünü sıkıştırır ve yoğunlaştırır (Storrie and Mooney, 2006). Katyonik lipozomlar immünojenite taşımayan, biyouyumlu ve biyobozunur özellikte sistemlerdir. Lipofektamin memeli hücrelerine gen aktarımında, sıklıkla kullanılan bir vektördür (Birchall et al., 1999). GAM teknolojisinde ise viral ya da viral olmayan bir vektör içerisindeki plazmid DNA doku iskelesiyle birleştirilerek, elde edilen GAM yapısı hasarlı dokuya implante edilir (Salem and Leong; 2006). Bu sistemlerle vektör uzun süre taşındığından

transfeksiyon verimi artar ve hücreler önemli miktarlarda rekombinant protein sentezi gerçekleştirebilir (Bonadio et al., 1999).

Artikular kırıkdağın onarımını gerçekleştirilmesinde *in vivo* ve *ex vivo* olmak üzere iki farklı gen aktarım stratejisi kullanılabilir. *In vivo* gen aktarımda vektör doğrudan eklem boşluğuna enjekte edilir veya bir matris ile birleştirilerek kırıkdağıdaki hasarlı bölgeye aktarılır. *Ex vivo* yaklaşımda ise izole edilmiş hücreler *in vitro* ortamda çoğaltılıp hücrelere ilgili gen aktarıldıktan sonra bir matris yapısı ile birleştirilir ya da izole edilmiş hücreler GAM yapısı üzerine ekilerek vücuda implante edilirler (Steinert et al., 2008).

Gen aktarımında, kollajen ve hiyaluronan gibi doğal polimerler ile PLGA [poli(laktid-ko-glikolid)] ve karboksimetil selüloz gibi sentetik polimerler kullanılabilir (Bonadio, 2000). Kitosan ile kitosandan türevli doku iskeleleri plazmid DNA'yı yüksek verimlilikte hapsedebilen ve koruyabilen katyonik bir matris özelliğindedir. Kitosana kırıkdağ oluşumunu destekleyen uygun gözeneklilikte, gözenek çapında ve yeterli mekanik dayanıma sahip üç boyutlu doku iskeleleri üretilebilir (Salem and Leong, 2006; Tıgılı et al., 2007).

Sunulan tez kapsamındaki çalışmanın amacı, BMP6 geni ile modifiye edilmiş sıçan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreleri ve kitosan doku iskelelerinden oluşan yapının, *in vitro* ortamda kırıkdağ doku oluşturma potansiyelinin araştırılmasıdır. Bu amaca yönelik olarak sıçan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreleri kitosan ve lipid bazlı ajandan oluşan iki farklı gen aktarım sistemiyle modifiye edilmişlerdir. Hücre kültür çalışmaları, kitosan doku iskeleleriyle yürütülmüştür. Yapılan analizlerle hücrelerin modifikasyonu doğrulanmış, hücreler BMP6 proteinini, deneysel çalışmaların devam ettirildiği 21 gün boyunca sentezlemişler ve kondrogenez gerçekleşmiştir. Tez kapsamında yürütülen çalışmalar ve elde edilen bulgular ilerleyen bölümlerde açıklanmıştır.

2. TEMEL BİLGİLER

Bu bölümde, yapılan tez çalışmasının temelini oluşturan konularla ilgili literatür bilgileri üç ana başlık altında özetlenmiştir. İlk bölümde, gen terapi tanımlanmış, tarihçesi, gen aktarım mekanizması ve gen terapi türleri belirtilerek, somatik gen terapinin farklı uygulama stratejilerinden ve hedeflediği hastalıklardan söz edilmiştir. İkinci bölümde, doku mühendisliği ve doku mühendisliğinde gen terapi uygulamaları açıklanmıştır. Son bölümde ise kıkırdak doku mühendisliği tanımlanmış, kıkırdak dokusunun yapısı ve tiplerinden söz edilerek kıkırdak doku mühendisliğinde gen terapi yaklaşımları açıklanmıştır.

2.1. Gen Terapi

Kromozomlar üzerinde bireylerin kalıtsal karakterlerini taşıyan ve bu karakterlerin ortaya çıkışını sağlayan, belli uzunluktaki DNA parçalarından oluşan ve nesilden nesile aktarılan kalıtım birimleri “gen”olarak adlandırılır. Genler “düzenleyici bölgeler”, “ekzon” ve “intron” bölgelerinden oluşmaktadır. Genlerin ekzon bölgeleri protein sentezinden sorumlu şifreyi taşıyan kısımlardır. Organizmada yaşamsal fonksiyonların pek çoğu, hücrelerin büyük bir bölümünü oluşturan genlerin ürünü olan proteinlerce yürütülür. Kanda oksijen taşınmasını sağlayan “hemoglobinler”, biyolojik katalizörler olan “enzimler”, bağışıklık sisteminin elemanları olan “immünoglobulinler” ve vücutta düzenleyici görevlere sahip bazı “hormonlar” organizmadaki proteinlerden yalnızca birkaçıdır. Genlerin yapısında meydana gelen değişimler “mutasyon” olarak adlandırılır. Bazı mutasyonlar, vücudumuzda hayati öneme sahip bazı proteinlerin hiç sentezlenmemesine, gereğinden çok sentezlenmesine ya da hatalı sentezlenmesine neden olarak bir takım ciddi rahatsızlıkları ortaya çıkarabilir. Örneğin “orak hücreli anemi”, hatalı bir genin işlev göstermesinden kaynaklanan genetik hastalıklardan biridir. Eritrositlerde (kırmızı kan hücreleri) bulunan ve oksijen taşımakla görevli olan hemoglobinin beta zincirinin altıncı aminoasitindeki değişim, eritrositlerin kılcal damarlardan geçmesine engel olacak orak şeklini almasına ve dolayısıyla dokulara yeterli oksijen gitmemesine neden olur. Tek bir gendeki hatadan kaynaklanan bu tür hastalıklarda, klasik ilaçla tedavi yöntemleri çoğunlukla kalıcı bir çözüm getiremezken, bugün “gen terapisi” olarak bilinen yaklaşımlasomatik bir hücrede

bulunan vebastalığa yol açan mutant allelleri yerine, normal olanlar sokularak enccv temel düzeyden tedaviye gidilebilmektedir. Gen terapisi, en genel tanımıyla, hücresel bir işlevi değiştirmek amacıyla genetik bilgiyi taşıyan nükleik asitlerin (DNA veya RNA) hücrelere aktarımıdır.

2.1.1 Gen terapinin tarihçesi

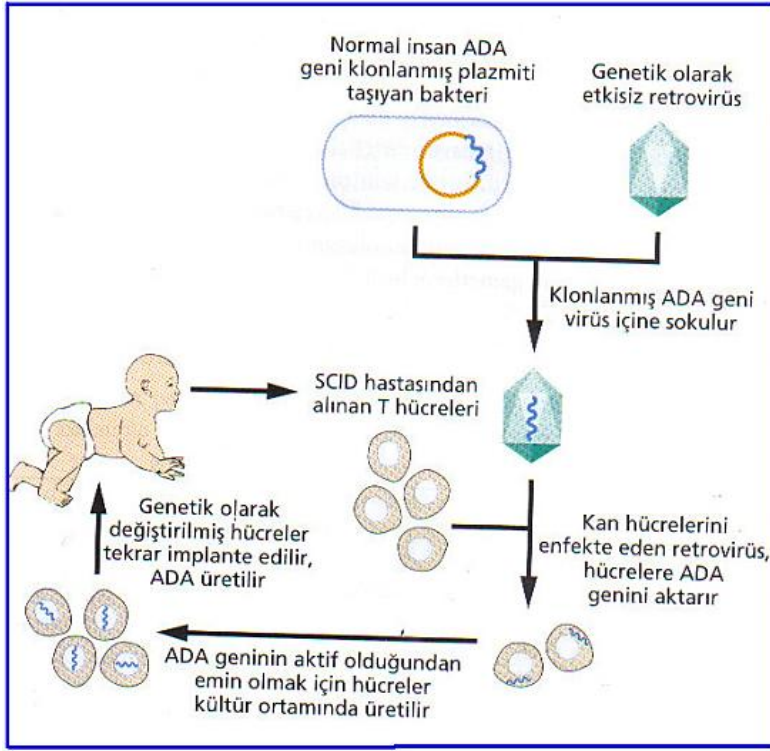
Gen terapinin ortaya çıkışı 1960'lı yıllara rastlamaktadır. Bu yıllarda moleküler genetiğin temelleri atılmış ve bakterilere gen aktarımı gerçekleştirilmiştir. Memeli hücrelerinde gerçekleştirilen ilk gen terapinin uygulaması da yine 1960'larda "Shope papilloma" virüsleriyle yapılan bir çalışmaya dayanır. Dr. Stanfield Rogers (Tennessee niversitesi) bu virüsle enfekte olan tavşanları incelediğinde, kanlarında aşırı miktarda arjinaz enzimi bulunduğunu tespit etmiştir. Daha sonra araştırmacı, Shope papilloma virüsünün insanlara bulaşıp bulaşmadığını araştırmak amacıyla, bazı bilim adamlarının kanlarını incelemiş ve bu virüsle, 20 yıl önce bile çalışan bazı bilim adamlarının kanında, arjinin seviyesinin normalden daha az olduğunu gözlemlemiştir. Böylece virüsün insanlara bulaşarak, insanların genomik yapısını değiştirdiğine dair bir hipotez ortaya atmıştır. Bu hipotezin, 1969'da Almanya'da Dr. Terheggen tarafından tanımlanan bir genetik hastalık sayesinde araştırılma olanağı doğmuştur. Bu hastalık plazmadaki yüksek miktardaki arjinin seviyesi ile seyrettiği için, Dr. Rogers Dr. Terheggen'e, hastalara Shope virüsünü enjekte etmeyi önermiştir. Bunun zerine, hasta iki çocuktan alınan hücrelere *in vitro* ortamda virüs aktarılmış ve virüsle enfekte hücrelerin arjinaz aktivitesi kazandığı grlmştir. Ancak virüs doğrudan sistemik dolaşıma verildiğinde hastaların arjinin seviyesi düşmemiş ve bu nedenle klinik durumları değişmemiştir. Bu çalışmayla, gen terapi uygulamalarında başarı sağlanması için gereken bilgi birikiminin ve bilimsel alt yapının henüz kazanılamadığı anlaşılmıştır.

1970'lerin başlarında "gen terapisi" terimini ilk kullanan kişi Pensilvanya niversitesi'nden Dr. Theodore Friedmann olmuştur. Gen terapisi esas olarak 1972'de ortaya çıkan rekombinant DNA teknolojisinin gelişimiyle ilerlemeye başlamıştır. Retrovirslerin ve bunların vektör olarak kullanımlarının anlaşılmasından sonra, 1980'li yıllarda viral genomlar kullanılarak, kültüre edilmiş memeli hücrelerinde gen terapisi uygulamalarına başlanmıştır. 1983'te Dr.

Friedmann ve arkadaşları, Lesch-Nyhan hastalığına neden olan kusurlu HPRT enzimini kodlayan geni, viral yolla normal olanıyla değiştirmeyi başarmıştır. Bu çalışmada, insan HPRT cDNA'sı retrovirüsler aracılığıyla bu enzimden yoksun fare ve insan hücrelerine aktarıldığında, hücreler tarafından bu enzimin üretilmesi sağlanmıştır. İlerleyen yıllarda hem viral, hem de viral olmayan taşıyıcıları kapsayan yeni teknikler geliştirilmiştir. 1987'de hepatit B virüsüne karşı ilk rekombinant DNA aşısı üretilmiştir. Bu işlem, maya vektörüne viral DNA parçası yerleştirilerek yapılmıştır (Wolff and Lederberg, 1994).

İlk FDA onaylı "somatik gen terapisi" denemesi, 1990'da monogenik bir hastalık için olgun T hücrelerine gen aktarımı, MoMLV tabanlı bir vektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tedavi, ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü'nde ileri evre "SCID (ağır kombine bağışıklık eksikliği)" hastalığına sahip olan dört yaşındaki Ashanti DeSilva'ya uygulanmıştır. Ölümcül bir bağışıklık sistemi bozukluğu olan bu hastalık, "adenozin deaminaz (ADA)" enzimini kodlayan gendeki bir mutasyon sonucu ortaya çıkmaktadır. Tedaviye, hastadan bağışıklık sisteminin elemanı olan beyaz kan hücreleri sınıfından T hücrelerinin izolasyonu ile başlanmıştır. Normal ADA geniyle klonlanmış retrovirüslerle T hücreleri karıştırılarak, virüslerin T hücrelerini enfekte etmesi sağlanmış ve böylece ADA geni, hücrelerin kromozomuna katılarak aktif hale gelmiştir. Genin ifade edildiğinden emin olmak için genetik olarak değiştirilmiş (mutant) T hücreleri laboratuvarında üretilmiş ve küçük kızın kan dolaşımına bir milyar ya da daha fazla oranda değiştirilmiş T hücresi verilerek tedavi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.1) (Klug and Cummings, 2000).

Etik kaygılara rağmen, gen terapisindeki bu gelişme; toplumun ve bilimsel çevrelerin oldukça ilgisini çekmiş ve özellikle tek genden kaynaklı hastalıklar üzerine yoğunlaşan klinik denemelerin başlamasına öncü olmuştur.



Şekil 2.1. SCID hastalığının gen terapi yöntemiyle tedavisinin şematik gösterimi (Klug and Cummings, 2002).

2.1.2. Terapötik nükleik asitler

Gen terapi uygulamalarında hücredeki bir işlevi değiştirmek için kalıtsal materyal hücrelere aktarılmaktadır. Hedeflenen işlev, belirli bir proteinin miktarını arttırmak ya da azaltmak olabileceği gibi, yabancı bir proteini üretmek de olabilir. Kalıtsal bir hastalığın tedavisi için gerçekleştirilen uygulamalarda ise, mutant genin ya da bu genin ürünü olan proteinin ortadan kaldırılması amaçlanabilir. Başarılı bir gen terapi uygulamasının gerçekleşmesinin ön koşullarından biri, moleküler düzeyde istenilen etkiye uygun olan nükleik asiti seçmektir. Aktarımda kullanılan nükleik asit çeşitleri: DNA, RNA ve nükleotid tuzaklarıdır. Bunların moleküler düzeydeki etkileri ise genin işlevinin kazanılması ya da kaybedilmesi şeklinde görülür (Munson and Godbey, 2006) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Terapötik nükleik asitler ve moleküler düzeydeki etkileri.

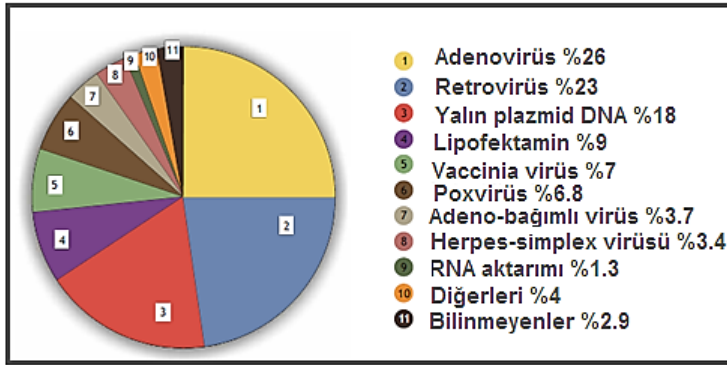
Terapötik nükleik asitler
DNA (oligonükleotidler, plazmidler, virüsler, yapay kromozomlar, bakteriler)
RNA (oligonükleotidler, ribozimler, siRNA, mRNA, virüsler)
Nükleotid tuzakları
Terapötik nükleik asitlerin moleküler düzeydeki etkileri
Genin işlevinin kazanılması (gen değişimi/yer değiştirmesi, trans-splicing)
Genin işlevinin kaybedilmesi (antisens RNA, RNA interferans)

Hayatın yapı taşı olan DNA, aktarımda kullanılan başlıca kalıtsal materyaldir. Tedavi amaçlı kullanılan DNA ve RNA dizileri en fazla 20 nükleotitten oluşan “oligonükleotid” denilen kısa zincirler halinde olabilir. Aktarımda kullanılan diğer bir yapı, “plazmid” denilen halkasal DNA parçalarıdır. Ekstrakromozomal (kromozomdan bağımsız) plazmidler, çekirdek DNA’sından bağımsız olarak replikasyona veya transkripsiyona uğrayabilir, genin aktarılacağı bölgeyi tanıyacak nükleotid dizileri içerebileceği gibi ayrıca düzenleyici ve bağlayıcı elemanlar olan, “promotör” ve “enhansır” gibi bölgeler de içerebilir. “CMV” (cytomegalovirus) promotörü, memeli hücrelerinde transkripsiyonu başlatmadaki etkinliği nedeniyle gen terapide yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA düzeyinde “antisens (karşı anlamlı) oligonükleotidler” ise, hedeflenen genlerin regülatör bölgelerinde çift sarmal DNA ile birleşerek yapısını bozarlar.

Gen tedavisinde kullanılan RNA çeşitleri ise “antisens oligonükleotidler”, “siRNA” (small interfering= küçük müdahaleci RNA) ve “ribozimler” dir. RNA düzeyinde antisens oligonükleotidler post-transkripsiyonel olarak mRNA düzeyinde etki ederek translasyonu engellerler. siRNA ise mRNA’ya bağlanarak genomik DNA transkripsiyonuna karışır ve mRNA’yı parçalar. Aktarımda kullanılan bir diğer yapı olan “ribozimler”, hedef mRNA’yı endoribozomal olarak parçalayan enzimlerdir. “Nükleotid tuzakları” olarak adlandırılan kısa oligonükleotid zincirleri ise potansiyel olarak zararlı genlerin başlangıç sekanslarını taklit ederek mRNA ve protein miktarında azalmaya neden olurlar (Boeckle and Wagneri, 2006; Munson and Godbey, 2006).

2.1.3. Gen terapide kullanılan vektör sistemleri

Gen terapi uygulamalarında, seçilen nükleik asitin eksprese olması veya mutant bir genin ekspresyonunu bloke etmesi gibi işlevlerini gerçekleştirebilmesi için öncelikle hedef hücreye aktarılması gerekmektedir. Nükleik asitler hücrelere “yalın olarak”, “viral sistemlerle” veya “non-viral sistemler” aracılığıyla aktarılabilir (Şekil 2.2). Genin aktarılmasında kullanılan taşıyıcı sisteme “vektör” adı verilir. Eğer terapötik gen organizmaya, bir proteinin sentezlenmesi için aktarılıyorsa, geni taşıyan vektörün hücre çekirdeğine kadar ulaşması gerekir. siRNA gibi stratejilerde ise nükleik asitin faaliyet göstermesi için sitoplazmaya kadar aktarılması yeterlidir (Mammen et al. 2007; Laporte and Shea, 2007).



Şekil 2.2. Gen tedavisi uygulamalarında kullanılan vektörler ve kullanım oranları.

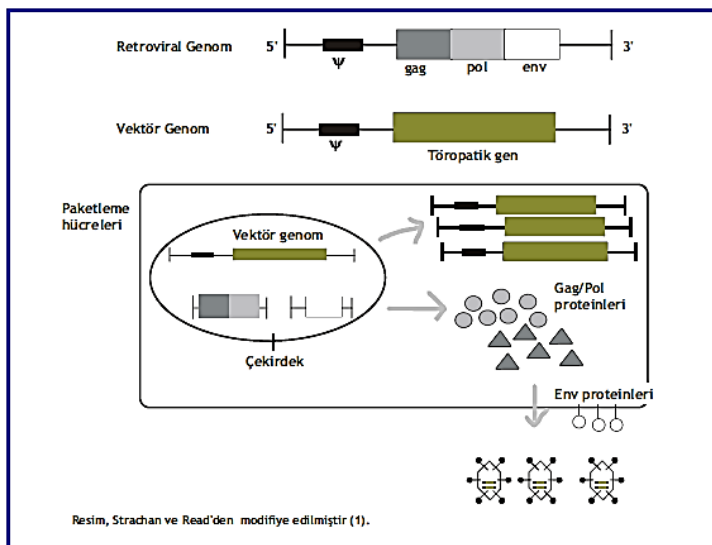
2.1.3.1. Viral sistemler

Viral sistemler ilk geliştirilen gen aktarım sistemleridir. Virüslerle gerçekleşen gen aktarımına “transdüksiyon” adı verilir. Gen terapide en çok kullanılan virüsler: “retrovirüsler”, “adenovirüsler”, “adeno-bileşimli virüsler” ve “herpes-simplex” virüsleridir. Virüsler, DNA veya RNA’dan oluşmuş genetik materyalin *kapsid* denilen hücre dışı kılıf ile çevrilmesiyle oluşan yapılardır. Kapsid, protein yapısındadır ve genin aktarılacağı hücrenin zarındaki reseptörleri tanıyıp bağlanma özelliğindedir. Bu özellikleri nedeniyle viral vektörlerin aktarım verimlilikleri, virüs harici sistemlere göre daha yüksektir. Viral kapsidler aynı zamanda taşıdıkları nükleik asitin vücut içinde parçalanmasını engelleyici bir koruma sağlarlar. Ancak virüsler taşıdıkları kapsid yapısı nedeniyle, enfekte ettikleri hücrelerde, *immün cevap oluşturma riski* taşırlar ve bu da verimliliklerini kısıtlayan önemli bir faktördür. Bu nedenle son yıllarda araştırmalar, replikasyona

uğramayan ve düşük sitotoksiste gösteren virüslerin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır (Nazir et al., 2005).

Gen terapi uygulamalarında sıklıkla kullanılan virüsler olan “retrovirüsler”, RNA virüsleridir ve “revers transkriptaz” enzimi taşıdıkları için, genomlarından çift zincirli “cDNA” sentezleyebilirler. Sitoplazmalarında bulunan nükleoprotein ve sentezledikleri cDNA sayesinde konak hücrenin kromozomuna entegre olabilirler. Ancak retrovirüslerin çekirdeğe erişimi yalnızca hücre bölünmesi sırasında sağlanabildiğinden, bu durum retroviral vektörlerin kullanımını kısıtlamaktadır. Diğer yandan, çoğalan hücrelere gen aktarabilme potansiyelleri, beyin tümörlerindeki kanser hücrelerine seçici olarak terapötik genin aktarılmasını sağlamaktadır (Bleiziffer et al., 2007).

Retroviral vektörler, gen aktarım verimliliklerinin yüksek olması nedeniyle birçok klinik denemede kullanılmışlardır. Bu vektörlerin hücrenin genomunu değiştirme olasılıklarını ortadan kaldırmak için, vektördeki “gag”, “pol” ve “env” genleri çıkarılarak buraya hedef gen klonlanır. Vektörün paketlenmesi ise; gag, pol ve env fonksiyonu olan özel bir hücrede gerçekleştirilir. Ancak vektör homolog rekombinasyonla bu genleri alıp doğal virüs formuna dönüşebileceğinden, genlerin herbiri farklı bir ekspresyon vektörüne yerleştirilir (Şekil 2.3). Böylelikle vektör tarafından bu genlerin tekrar kazanılması büyük ölçüde azaltılmış olur (Takeuchi et al., 1997).



Şekil 2.3. Retroviral yolla gerçekleşen gen aktarım mekanizması.

Adenovirüsler ise retrovirüsler gibi insersiyonel mutasyon riski taşımazlar ve bölünmeyen hücreleri de enfekte edebilirler. Bu nedenle deri, akciğer, karaciğer, beyin, kas ve kan damarları gibi birçok doku için aday vektördürler (Bleiziffer et al., 2007).

2.1.3.2. Virüs harici sistemler

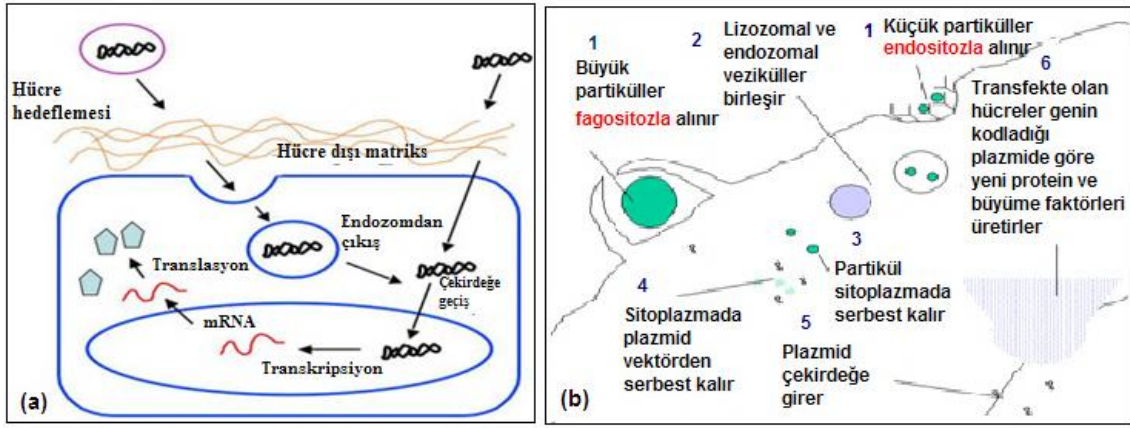
Virüs haricindeki vektör sistemleri genel olarak üç kategoriden oluşur: Yalın DNA aktarımını gerçekleştiren sistemler, lipid tabanlı sistemler ve polimer tabanlı sistemler. Lipid tabanlı sistemler “katyonik lipidler” ve “dendrimerlerden”, polimer tabanlı sistemler “katyonik” ve “nötr polimerler”den oluşur. Diğer yöntemler ise “mikroenjeksiyon”, “elektroporasyon” ve “gen tabancası” yöntemleridir. Bu yöntemlerin ortak özelliği, yalın DNA ya da plazmidin hücrelere aktarılmasıdır (Gene therapy, 2011).

Viral olmayan vektörler aracılığıyla gerçekleşen aktarıma “transfeksiyon” adı verilir. İki tip sentetik vektör yoğun olarak çalışılmıştır: “Katyonik lipozomlar” ve “katyonik polimerler”. Her ikisi de elektrostatik olarak DNA’nın negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileşime girerler ve DNA’yı “lipopleks” ve “polipleks” denilen kompleksler oluşturmak üzere sıkıştırır ve yoğunlaştırırlar. Bu işlem DNA’nın serumdaki nükleazlar tarafından parçalanmasını engeller. Poliplekslerin transfeksiyon verimi viral vektörlere göre daha düşük olmasına rağmen, sıkılaştırma özellikleri, büyük miktarlardaki DNA’nın yoğunlaştırılabilmesini sağladığından, verimdeki azalma bu sayede dengelenebilir (Storrie and Mooney, 2006).

2.1.4. Hücre içine gen aktarımının gerçekleştirilmesi

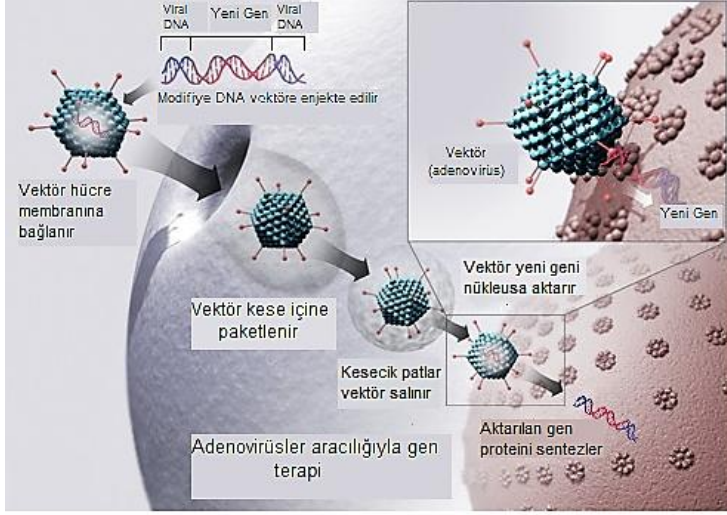
Katyonik vektörlerle oluşturulan DNA kompleksleri 150-200 nm’den küçükse pinositozla, daha büyükse fagositozla hücre zarının oluşturduğu yalancı ayaklar ile oluşturulan endositik kesecikler halinde hücre içine alınır. Viral olmayan vektörlerin hücre zarındaki reseptörlere bağlanan ligandlarla modifiye edilmeleri “endozom keseciği” halinde hücre içine alınmalarını kolaylaştırabilir. Bu kesecikler sitoplazmada lizozomal keseciklerle birleşerek enzimlerle parçalanır (Eğer DNA bir

vektör tarafından kalkanlanmazsa, endozom ve lizozomun düşük pH'ı ve yıkıcı enzimatik etkisi DNA'nın degradasyonuna neden olur). DNA kompleksinin endozomal yapıdan çıkması kolay değildir. PEI (polietilenimin) gibi polikasyonik "proton süngerleri" ya da zarı parçalayıcı özellikte aktif peptidler endozomdan çıkışı kolaylaştırır da bu yeterli olmayabilir. DNA kompleksi sitoplazmaya geçtikten sonra, 10-50 nm arasındaki gözeneklerden geçip çekirdeğe girmeden önce vektörden ayrılmalıdır. DNA, katyonik vektörlerden ayrıldıktan sonra sitoplazmadan çekirdeğe geçebilir. Ancak hücre mitoz geçirirken çekirdek zarı parçalandığı için DNA/vektör kompleksinin bu esnada çekirdek zarının gözeneklerinden geçebildiği kanıtlanmıştır (Salem and Leong, 2006; Boeckle and Wagner, 2006) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Gen aktarım mekanizması: (a) Genin hücrede izlediği yol ve hedef proteinin üretimine kadar meydana gelen değişimler, (b) Katyonik vektörlerin hücrelere alınmasından protein sentezine kadar gerçekleşen olaylar dizisi.

Viral vektörler katyonik vektörlere göre hücre içi gen aktarımında daha başarılıdır. Virüsler aktif endositozla hücreye girip endozomu parçalayarak dışarı çıkabilirler. En önemlisi, genomlarını aktif olarak çekirdek gözeneklerinden geçirip çekirdeğe aktarabilirler. Ayrıca adenovirüsler, katyonik vektörlerden farklı olarak, hücre iskeleti boyunca çekirdeğe doğru hareket etme kabiliyetine sahiptirler (Bleiziffer et. al, 2007) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Adenovirüsler aracılığıyla gen aktarımının gerçekleşmesi.

2.1.5. Somatik gen terapi ve eşey hücresi gen terapisi

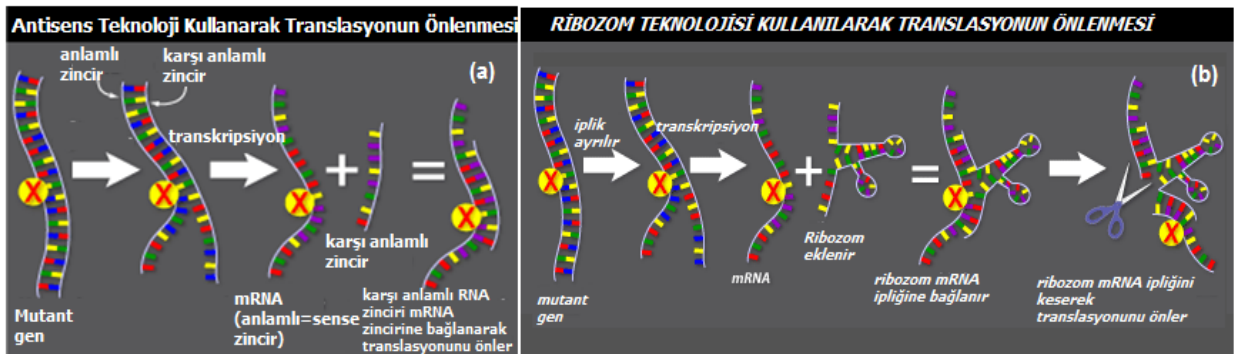
Gen terapiyle iki farklı hücre tipi hedeflenebilir. Bunlar somatik (vücut) hücreler ve eşey (sperm ve yumurta) hücreleridir. “Eşey hücrelerinin gen terapisi”nde sperm ve yumurta, işlevsel genlerin aktarımıyla modifiye edilir. Değişim eşey hücrelerinde meydana geldiği için kalıtsal olup bir sonraki nesile aktarılabilir. Tedavinin etkisi gelecek kuşaklar üzerinde görüleceğinden, etiğe aykırı olarak nitelendirilerek insanlarda uygulanması yasaklanmıştır. Ancak mitokondriyal hastalıklar için kullanılan çekirdek gen aktarımı etik açıdan uygun bulunmaktadır.

“Somatik gen tedavisinde” amaç alıcının hücreleri veya dokularında ilgili hastalığı düzeltecek genetik değişikliği yapmaktır. Bu tedavide kişinin genomunda meydana gelen değişiklik sonraki nesillere aktarılmamaktadır. Günümüzde tüm gen terapi uygulamaları somatik hücrelere yapılmaktadır (Mammen et al., 2007).

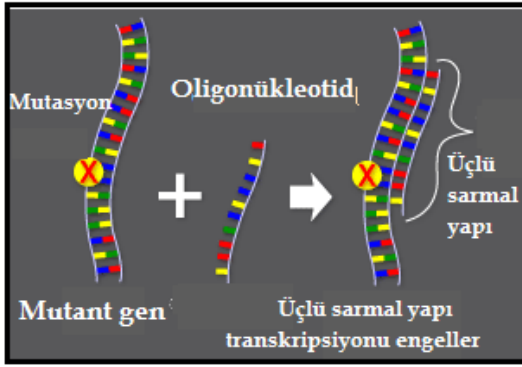
2.1.6. Klinik uygulamalarda kullanılan gen terapi yöntemleri

Farklı hastalıkların tedavisinde uygulanacak gen terapi yönteminin seçiminde belirleyici olan unsur, hastalığa neden olan etmendir. Klinik çalışmalarda uygulanan belli başlı gen terapi yöntemleri şunlardır:

- Mutant genin işlevsel kopyasının aktarılması: Bu yöntemde mutant gen kalmakta, ancak eksik olan proteini sentezleyecek işlevsel gen hastaya aktarılmaktadır. Ancak mutant genin, normal proteinin çalışmasını engelleyici bir proteini kodladığı durumlarda normal genin hücreye eklenmesi bir yarar sağlamaz. Bu şekilde işleyen mutant genlere *dominant negatif* adı verilir. Bu durumun üstesinden gelmek için “gen değişimi” yöntemi uygulanabilir (Learn. genetics, 2011).
- Gen değişimi: Mutant geni “homolog rekombinasyonla” fonksiyonel kopyası ile değiştirmektir. Mutant genin işlevinin hücreye zarar verdiği durumlarda izlenecek bir yöntemdir (Mammen et al., 2007).
- Mutant genin susturulması: Ekspresyonu aşırı artmış (bazı onkogenler gibi) veya mutant olan genlere uygulanır. Hatalı gen ürünü olan kusurlu proteinin hastalığa yol açtığı durumlarda kullanılır. Mutant genin susturulması, transkripsiyonu durduran siRNA etkisiyle (RNA interferansı) gerçekleşebilir. siRNA mutant alleldeki tekli nükleotid polimorfizmlerini yüksek özgüllükte hedefleyebilir (Boeckle and Wagner, 2006). Bu diziler aracılığıyla, *Spinocerebellar ataksi tip 3in vivo* tedavisinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Antisens RNA ise hedef mRNA transkriptinin translasyonunun önlenmesi için kullanılır (Şekil 2.6.a). Antisens RNA, Orak hücreli anemide beta-globin geninin inhibe edilmesi ve HIV 1 enfeksiyonunda CXCR4 yıkımının sağlanması için hücrelere aktarılmıştır (Bonadio et al., 1998; Munson and Godbey, 2007). Ribozimlerle, “H-ras” ve “bcr-abl” dominant onkogenlerinin mRNA’sı hedeflenmiştir (Şekil 2.6.b). Genin DNA düzeyinde susturulması ise çift zincirli DNA ile üçlü sarmal oluşturan oligonükleotidler aracılığıyla gerçekleşir. Bu zincirler, DNA’nın mRNA transkripti oluşturmalarını engellerler (Kars, 2007; Learn.Genetics, 2011) (Şekil 2.7).



Şekil 2.6. Mutant genin susturulması için uygulanan yöntemler: (a) Antisens teknoloji, (b) Ribozim teknolojisi.



Şekil 2.7. Oligonükleotid aracılığıyla mutasyona uğramış bir genin susturulması.

- Spesifik hücrelerin öldürülmesi: Özellikle kanser tedavisinde kullanılan bu yöntemle, toksik kemoterapötik ajan, toksik olmayan formda vücuda verilirken, bu ön ilacı aktiveleyen enzimi kodlayan “intihar genin” kanser hücrelerine aktarılmasıyla hücrelerin apoptozu teşvik edilir (Kars, 2007).
- Genin onarılması: Mutant gen “seçici ters mutasyonla” normal fonksiyonuna döndürülebilir. SMART [Splaysozomla RNA transkriptinin kesip çıkarılarak değişimi (trans-splays)], oluşmuş bir mutasyonun geriye döndürülmesini sağlayan bir tekniktir (Learn.genetics, 2011).
- Gen faaliyetlerinin ayarlanması: Genin ifadenme düzeyini değiştirmek veya tamamen kapatarak geni susturmaktır. Bu uygulama, hücrede fazla üretilen bir proteinin sentezini azaltmak ya da hatalı bir proteinin sentezini durdurmak amacıyla gerçekleştirilebilir (Mammen et al., 2007).

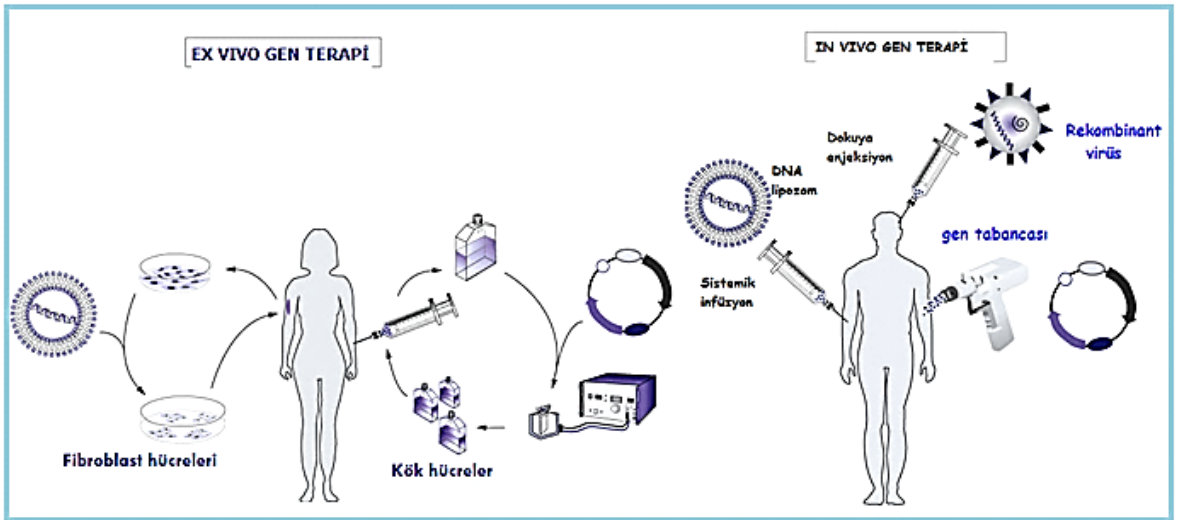
2.1.7. Gen aktarımı uygulamaları

Hedef doku ya da organa yapılan gen aktarımı “sistemik yolla aktarım” ve “lokal yolla aktarım” olmak üzere iki temel stratejiyle gerçekleştirilir. Sistemik yolla aktarımda vektör doğrudan sistemik dolaşıma enjekte edilir ve buradan tüm vücuda yayılır. Lokal yolla gen aktarımı ise *in vivo* ve *ex vivo* olmak üzere iki farklı şekilde yapılır. *In vivo* gen aktarımında vektörle kompleksleştirilmiş ya da yalın haldeki terapötik DNA hastaya doğrudan implante ya da enjekte edilir. Bu yaklaşımla, özgül bir hücre popülasyonunu hedeflemek güçtür, genelde çevre dokulardaki hücreler transfekte edilir. Bu yaklaşımın başarısı, transfekte olmaya

uygun olan hücre sayısı ile orantılıdır ve transfeksiyon verimine bağlı olarak üretilen protein miktarı da değişir (Şekil 2.8).

“Ex vivo gen aktarımı”nda hastanın hücreleri izole edildikten sonra hücreler kültür ortamında çoğaltılarak hedef gen hücrelere aktarılır. Gen aktarımının gerçekleştiği hücreler seçilerek çoğaltılır ve daha sonra hastanın dokusuna implante edilir ya da doğrudan kan akımına enjekte edilir. Bu yöntem maliyet ve zaman bakımından dezavantajlı olsa da genetik manipulasyonu doğrulanmış hücrelerin kullanılması ve transfeksiyon veriminin ölçülebilmesi bakımından avantajlıdır (Şekil 2.8).

Ex vivo uygulamaların bir aşaması olan *in vitro* uygulamalar ise çalışmalara organizmaları dahil etmeden hayvandan izole edilmiş hücrelerin laboratuvar ortamında kültürasyonu ve transfeksiyonu aşamalarını içerir. In vitro çalışmalar, ex vivo uygulamalar için bir model oluşturur (Munson and Godbey, 2006; Mammen et al., 2007).

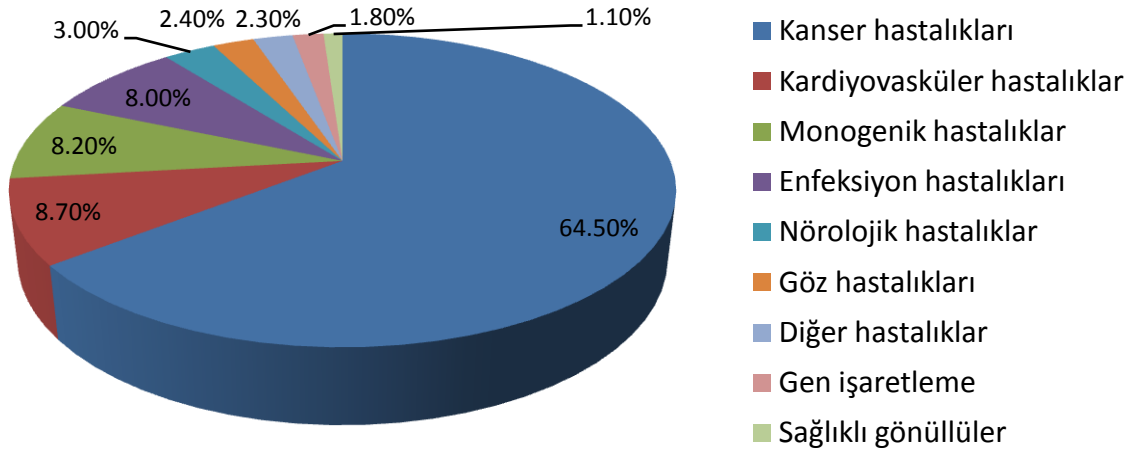


Şekil 2.8. Ex vivo ve in vivo yaklaşımla gen terapi.

2.1.8. Gen terapiyle hedeflenen hastalıklar

Gen terapisi özellikle genetik hastalıkların iyileştirilmesinde üstün bir potansiyele sahiptir. Bugüne kadar, İnsan Genom Projesi'nin yardımıyla 4000'in üzerinde genetik hastalık tanımlanmıştır. Bunlar tek bir gene bağlı hastalıklar, çoklu gen mutasyonları, kromozom anomalileri veya nadiren mitokondrinin kromozomal olmayan DNA'sındaki mutasyonların neden olduğu hastalıklardır (Patel, 2009).

Gen terapisinin yalnızca genetik hastalıkları değil, aynı zamanda enfeksiyon hastalıklarını (örneğin AIDS), kanseri, Parkinson gibi nörolojik hastalıkları, göz hastalıklarını ve kardiyovasküler (kalp-damar) hastalıkları da iyileştirme kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.9). Böylelikle gen bir ilaç gibi hizmet vermektedir. Ayrıca “koruyucu gen terapisi” olarak bilinen bir yaklaşımla, oluşma riski taşıdığı düşünülen bir hastalık önceden önlenabilir. Bugün gen terapisinin “terapötik anjiyogenez” (yeni damar oluşumu), “miyokardiyal koruma”, “doku rejenerasyonu ve tamiri”, “koroner anjiyoplastinin başarısını sınırlandıran restenoz gelişiminin önlenmesi” gibi farklı alanlarda da umut vaat edici çözümler getireceği düşünülmekte ve araştırmalar sürdürülmektedir (Edelstein et al., 2007).



Şekil 2.9. 2010 yılında gen terapiye yönelik olarak tüm dünyada yapılan klinik denemelerin hastalıklara göre dağılımı.

2.1.9. Gen terapisi araştırmalarında bugüne kadar yaşanan önemli gelişmeler

1990'lı yıllarda başlayan klinik denemelerin sayısı her geçen yıl artış göstermiştir. Bu yıllarda, talasemi, kistik fibrozis ve bazı kanserler, hatalı mRNA'nın onarımı hedeflenerek tedavi edilen hastalıklardandır. Western Reserve Üniversitesi'nden ve Copernicus Terapötik'ten araştırmacılar ise DNA'yı çekirdeğe aktarabilen 25 nm genişliğinde küçük lipozomlar üretmişlerdir. 1999, onaylanan 116 çalışmayla en fazla klinik denemenin gerçekleştirildiği yıldır. Ancak aynı yıl, “ornitin transkarbamilaz enzimi eksikliği” (OTCD) hastalığı için denek olarak kullanılan 18 yaşındaki Jesse Gelsinger, adenovirus taşıyıcıya bağlı gelişen bağışıklı yanıtı

sonucunda, çoklu organ yetmezliğine girerek yaşamını yitirmiştir. Bu olaydan sonra gen terapisi büyük gerileme yaşamıştır. 2000'li yıllardan itibaren gen terapi uygulamasıyla birçok X-SCID hastası tedavi edilmiştir. Ancak bazı hastalarda, viral taşıyıcıya bağlı olarak kanser ve lösemi gelişmesi üzerine, 2002'de Fransız ve Amerikan FDA'i SCID hastalığında gen terapisi denemelerini durdurma kararı almıştır. 2003 yılında FDA, retroviral vektörlerin kullanıldığı 30 gen terapisi denemesini askıya almıştır. Aynı yıl, Los Angeles Kaliforniya Üniversitesi'nden araştırmacılar, Parkinson hastalığının tedavisi için, PEG (polietilen glikol) ile kaplı lipozomlar aracılığıyla beyine gen aktarımı gerçekleştirmişlerdir. 2005'te hayvanlardaki sağırlığın tedavisinde, ATOH1 geninin domuzun kohleayasına aktarılmasıyla başarı yakalanmıştır. Ağustos 2006'da kanserde ilk başarılı uygulama, "ileri metastatik melanom" hastalarından alınan lenfositlerin kanser hücrelerini hedeflemek üzere genetik olarak modifiye edilmesiyle gerçekleşmiştir. 2007'de Texas'taki bazı araştırmacılar tarafından, lipid tabanlı nanopartiküller aracılığıyla tümör baskılayıcı genlerin akciğer kanseri tümörlerinin sayısını ve büyüklüğünü önemli miktarda düşürdüğü gösterilmiştir. Aynı yıl, RPE65 genindeki bir mutasyondan kaynaklanan "Leber konjenital körlüğü" gen terapiyle tedavi edilmiştir. 2009'da geliştirilen bir yaklaşımla, nanopartiküllere yüklenen genler tümör hücrelerini öldürmek üzere hedeflenmiştir. 2010 yılında, deri kanserine neden olan BRAF genindeki mutasyon kaldırılarak, bu kanseri temelden önleyen veya yayılmasını engelleyen bir tedavi yöntemi geliştirilmiştir. Bu tedavinin yakın zamanda FDA tarafından onaylanması beklenmektedir. Aynı yıl, Merab Kokaia ve grubu, epilepsi hastası bir sıçana nöropeptid ve reseptör gen terapisini birlikte uygulamıştır. Tedavi başarıyla sonuçlanmış ve epilepsi nöbetleri baskılanmıştır. Bu tedavinin , tüm beyni etkileyen anti epileptik ilaçlara alternatif olarak insanlarda kullanılabileceği düşünülmektedir. 2011 yılında bir grup araştırmacı, mazF ile modifiye edilmiş T lenfositler aracılığıyla HIV virüsünün replikasyonunu engellemişlerdir (Gene therapy net., 2011; Gene therapy, 2007).

2.1.10. Gen terapisinde son durum ve ticari ürünler

Bugüne kadar sadece iki gen terapisi ürünü pazara ulaşmıştır. Bunlardan ilki 2004'te, *SiBiono Gene Tech* tarafından üretilen "Gendicine" olup 14 yıllık bir çalışmanın sonunda geliştirilmiştir. Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomunun

tedavisinde etkili olan bu ürün, Çin’de piyasaya sürülmüştür. Şu an Çin resmi otoritelerince onay verilmiş diğer gen ilaçları: *Sunway Biotech* firmasından ilk onkolitik virus olan H101 – “Oncorine”, *Medgenn* firmasından akciğer kanserinde kullanmak üzere geliştirilen anjiogenik inhibitör olan “Endostar”dır. Rekombinant insan p53 tümör baskılayıcı geni taşıyan bir adenoviral vektörü içeren Gendicine, tümörlü bölgeye enjekte edildikten sonra hücre siklusunu durduran ve apoptozu teşvik eden bir antitümöral aktiviteyi tetikler. İlaç faz III çalışmasında, 120 hastada radyoterapi ve kemoterapiyle birlikte denenmiştir. Sonuçta, ilacın bu tedavilerin etkinliğini üç kattan fazla arttırdığı görülmüş ve 3 yıllık takip süresince hiçbir hastada nüks izlenmemiştir (Patel, 2009).

2007 yılında Filipinler’de piyasaya sürülen “Rexin-G” ise retroviral bir vektör içinde Siklin-G1 tümör baskılayıcı genini içerir. Rexin-G’nin avantajı, intratümoral enjeksiyona gerek kalmadan, intravenöz olarak uygulanabilmesi ve sadece kanser hücrelerini hedefleyebilmesidir. Rexin-G, pankreas kanserinin tedavisi için Amerikan İlaç ve Gıda İdaresi (FDA) tarafından onay almıştır.

Nisan 2009 Pharmaprojects dergisinde, halen çalışılan 244 adet gen içerikli ilaç üzerinde çalışmaların olduğu rapor edilmiştir. Akut ekstremitte iskemisinde hepatosit büyüme faktörünü kodlayan plazmid içeren “Collategene” Japonya’dan onay beklemektedir. Bir tür beyin kanseri olan gliomun tedavisi için, *Ark Therapeutics* tarafından geliştirilen “Cerepro” adenoviral yolla timidin kinaz enzimini taşıyangenbazlı bir ilaçtır. Tümör kitlesinin çıkarılmasından sonra hastaların sağlıklı beyin dokusu iğne enjeksiyonla verilir. İlerleyen günlerde intravenöz yolla verilen “Ganciclovir”, üretilen timidin kinazı mitozu inhibe eden bir maddeye dönüştürür. Beyindeki sağlıklı nöronlar bölünmediği için tümör hücrelerinin çoğalması inhibe edilir ve yeni tümör oluşumu engellenir. Cerepro’nun yakın gelecekte tüm Avrupa’da kullanılmak üzere piyasaya sürülmesi beklenmektedir (Patel, 2009).

2.2. Doku Mühendisliğinde Gen Terapi Uygulamaları

Doku mühendisliğinde hücrelerin çoğalmasını, göçünü, farklılaşmasını ve matris sentezini uyaran, ayrıca dokuda meydana gelen bazı katabolik süreçlerin ve

inflamasyonun durdurulmasına yönelik olarak büyüme, farklılaşma ve transkripsiyon faktörleri ile sitokinler gibi biyosinyal moleküllerin kültür ortamına eklenmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmalar, biyosinyal moleküllerin rekombinant moleküller halinde kültür ortamına verilmesi yerine, hücrelere gen terapi yöntemiyle aktarılmasının yumuşak doku yenilenmesi, kemik oluşumu, kırıldak ve kemik iyileşmesi gibi rejeneratif süreçlerin gerçekleşmesinde daha etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca bazı rekombinant proteinlerin doğrudan canlıya verilememesi nedeniyle, bu moleküllerin sentezlenmesi için gen terapi yönteminin uygulanması zorunludur.

2.2.1. Biyosinyal moleküllerin üretiminin gen aktarımıyla sağlanmasının avantajları

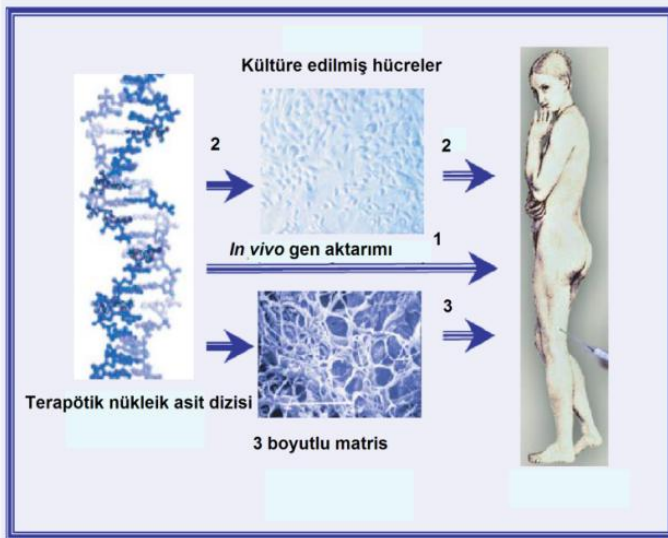
Biyosinyal moleküller, vücuda rekombinant proteinler halinde aktarıldıklarında, proteinlerin *in vivo*'da yarılanma ömürlerikısa olduğu için etkinlikleri kısa sürmektedir. Bu nedenle moleküllerin, hasarın olduğu bölgeye terapötik dozda ulaşması için yüksek miktarda ve tekrarlanarak verilmesi gerekmektedir. Bu durum hem tedavi maliyetlerinde artışa neden olur, hem de hedeflenen organlar için terapötik olan bu doz hedeflenmeyen organlarda hasara yol açabilir (Saraf and Mikos 2006). Rekombinant proteinlerin diğer bir olumsuz tarafı ise vücuttaki proteinlerin translasyon sonrasında geçirdiği modifikasyonlardan yoksun olmalarıdır. Böylece aktivite göstermeleri için gereken konformasyonu kazanamadıklarından tedavide etkin olamayabilirler (Storrie and Mooney 2006).

Tüm bu problemlerin çözümünde gen terapi yöntemi oldukça etkilidir. Bu yöntemle tedavide gerekli olan proteinleri sentezlemek amacıyla proteinleri kodlayan terapötik genler, hasarlı bölgeden alınan hücrelere aktarılır ve tekrardan bu bölgeye enjekte edilerek; yüksek seviyelerde, sürekli ve lokal olarak gen ekspresyonu sağlanır. Modifiye edilmiş hücreler proteini lokal olarak sentezler ve doğal bir şekilde mikroçevrelerine salarlar ve böylece hedeflenmeyen çevre dokular da en az şekilde zarar görür. Ancak genetik bir hastalığı tedavi etmek için kullanılan gen tedavisinde onarılmış bir genin hayat boyu ekspresyonu istenirken, doku onarımını gerçekleştirecek transgenin geçici ve lokal ekspresyonu istenir (Saraf and Mikos 2006; Steinert et al., 2008).

2.2.2. Doku mühendisliğinde gen aktarım stratejileri

Terapötik bir proteini kodlayan geni içeren DNA dizisi; herhangi bir vektör içine yerleştirilmeden ya da (virüs, polimer veya lipid tabanlı) uygun bir vektör içerisine yerleştirildikten sonra alıcıya 4 farklı yoldan aktarılabilir:

- 1- Doğrudan *in vivo* gen aktarımıyla: Terapötik DNA hedef dokuya ya da doğrudan sistemik dolaşıma verilir.
- 2- Genetik modifiye hücrelerle *ex vivo* gen aktarımıyla: Tedavisi gerçekleştirilecek dokuya özgü hücreler (fibroblastlar, deri hücreleri vb.) veya kök hücreler, hastadan izole edilir. Daha sonra bu hücreler kültüre edilip çoğaltıldıktan sonra, hedef geni içeren nükleik asit dizisi içeren vektör aracılığıyla ya da yalın haldeyse fiziksel yollarla (enjeksiyon, gen tabancası, elektroporasyon gibi) genetik olarak modifiye edilir. Modifiye hücreler *in vitro*'da seçildikten sonra alıcıya verilir.
- 3- Gen ile aktive olmuş 3 boyutlu matrisler (GAM) aracılığıyla gen aktarımı: Terapötik DNA üç boyutlu matris yapısına enkapsüle edilir ya da immobilize edilir. Ardından GAM yapısı hastaya implante edildikten sonra gen aktarımı bu yapı aracılığıyla gerçekleşir.
- 4- Genetik olarak modifiye edilmiş hücreler 3 boyutlu matris yapısına ekildikten sonra hastaya implante edilir (Bleiziffer et al., 2007) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Doku mühendisliğinde uygulanan gen aktarım stratejilerinin şematik gösterimi.

2.2.3. GAM tasarımı

GAM yapısını oluşturan DNA, matris ile iki temel mekanizmayla birleşir. Bu mekanizmalar, “doku iskelesine enkapsülasyon” ve “yüzeye immobilizasyon”dur.

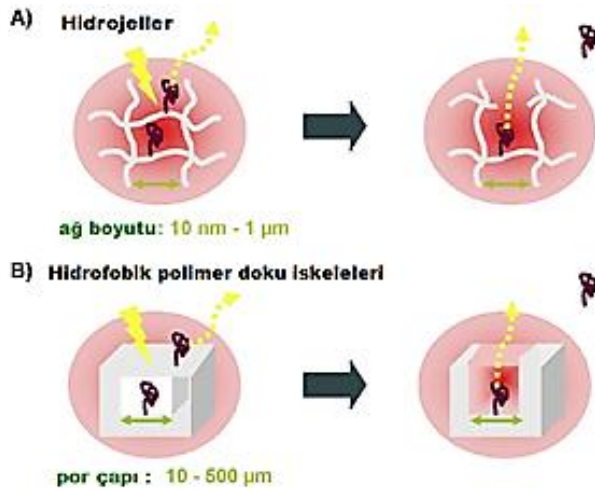
2.2.3.1. Vektörlerin doku iskelesine enkapsülasyonu

DNA'nın doku iskelesine enkapsülasyonda; hedef bölgede, lokal ve kontrollü DNA salımı amaçlanır. Vektör doku iskelesine hapsedilmeden önce katyonik bir polimerle yoğunlaştırılabilir (kondensasyon). Bu işlem parçacık büyüklüğünü azaltır, DNA'yı degradasyondan korur, DNA'nın hücre membranıyla etkileşimini sağlar ve proton sünger etkisi ile endozomdan çıkışını kolaylaştırır. Polietilenimin (PEI) DNA'nın yoğunlaştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir polimerdir. (Storrie and Mooney, 2006).

Vektörlerin doku iskelesine enkapsülasyonu, doku iskelesi fabrikasyon yöntemleri ile birlikte (gazla köpüklendirme-partikül uzaklaştırma, elektroeğirme, sıcaklıkla indüklenmiş faz ayrımı, çözücü buharlaştırma gibi) gerçekleştirilir. Vektör doku iskelesine hapsedilirken dikkat edilmesi gereken önemli nokta, doku iskelesinin fabrikasyonunda kullanılan yöntemin vektöre zarar vermemesidir. Çünkü yüksek sıcaklık, organik çözücüler, serbest radikal oluşumu ve kayma gerilimi vektörün parçalanmasına neden olabilir. Vektör polimer içine hapsedilirken kurutulması ve süktroz gibi protektanlarla stabilize edilmesi gerekmektedir. Eğer dehidrasyon ve rehidrasyon işlemleri sırasında vektör katı formunu koruyabilirse daha uzun ömürlü olabilir. Vektörler, hidrofilik (örneğin; hidrojeller) ya da hidrofobik polimerlere enkapsüle edilebilir (Şekil 2.11). Örneğin, hidrofobik bir polimer olan laktid ve glikolid kopolimerleri (PLGA) ile yapılan bir çalışmada gaz köpüklendirme/parçacık uzaklaştırma yöntemi kullanılmıştır. Köpüklendirme metoduyla, yüksek derecede gözenekli olan ve iç içe geçmiş gözenek yapısına sahip bir iskelenin oluşması sağlandığı gibi, aynı zamanda DNA organik çözücüler kullanılmadan iskeleyle birleştirilmiştir. Vektörün hidrofobik polimerlerden serbest kalması üç aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar: polimerin degradasyonu, vektörün çözülmesi ve son olarak vektörün polimerden difüzyonudur. PLGA gibi biyobozunur polimerlerden

tasarlanmış GAM yapısı, *in vivo*'ya implante edildiğinde; vücut sıvısı polimeri degrade ederek gözenekler arasından sızar, hapsolmuş vektörü yapıdan çözer ve difüzyonunu sağlar. Poli(etilen-ko-vinilasetat) EVA, gibi biyobozunur olmayan polimerlerden vektörün serbest kalması ise önceden var olan gözenekler içine su moleküllerinin sızmasıyla gerçekleşir (Laporte and Shea, 2007) (Şekil 2.11.b).

Hidrofilik gen aktarım sistemleri olan hidrojeller, doğal ya da sentetik hidrofilik polimerlerin kendiliğinden birleşmesi ya da çapraz bağlanmasıyla oluşan ve yapısında % 90' ın üzerinde su bulunduran polimerlerdir. Hidrojelden gen aktarım sistemleri geliştirmede kullanılan polimerler: Kollajen, jelatin, ipek-elastin benzeri polimerler, kitosan, agaroz, hiyaluronik asit, fibrin ve polietilen glikol (PEG)'dur. Hücrelerin jelleşmeden önce zarar görmeden hidrojele hapsedilebilirliği, bu tekniğin vektörler için de kullanılmasını sağlamıştır. Hidrojelden vektörün serbest bırakılması hidroliz veya hücre duyarlı jel aracılı mekanizmalarla gerçekleşir ve ağ büyüklüğü, iyon değişimi ve kimyasal grupların yerleşimine bağlı olarak manipule edilebilir. Daha geniş bir ağ yapısı daha çabuk şişmeye neden olur. Geniş ağ yapısında hidrolize olabilen gruplar ağın omurgasında bulunursa yapı çabuk parçalanır, bu gruplar ağın bağlantı bölgelerinde yer alırsa yapının parçalanma oranı düşer (Laporte and Shea, 2007) (Şekil 2.11.a).



Şekil 2.11. Vektörlerin hidrojellerden (a) ve hidrofobik doku iskelerinden (b) ayrılması.

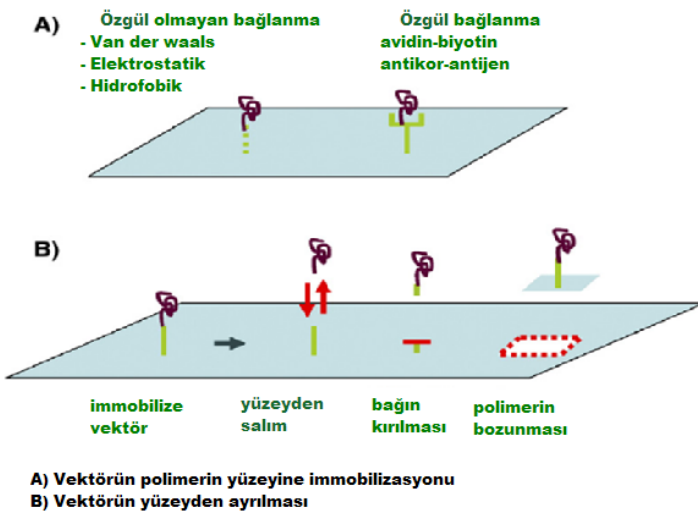
2.2.3.2. Vektörlerin doku iskelesi yüzeyine immobilizasyonu

Vektörlerin doku iskelerine immobilizasyonu iki şekilde gerçekleşir: Özgül olmayan etkileşimler ve özgül etkileşimler (Şekil 2.12.a).

Özgül olmayan etkileşimler, negatif yüklü DNA ve RNA ile pozitif yüklü protein, katyonik polimer ve katyonik lipid arasındaki hidrofobik, elektrostatik etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri aracılığıyla gerçekleşir. Vektörün polimere bağlanma kuvveti, birbiriyle etkileşecek grupların oranlarına bağlıdır (Örneğin polimerdeki amin gruplarıyla, DNA'daki fosfat grupları oranı).

Özgül etkileşimler, polimer ve vektör arasında, birbirini kimyasal olarak tamamlayıcı fonksiyonel gruplar arasında olur. Biotin-avidin etkileşimi ve antijen-antikor etkileşimi bu tür etkileşimlerdenidir. Hiyaluronik asitle oluşturulmuş hidrojellerin neutravidinlenmesi ve PEI-DNA kompleksinin biyotinlenmesi sonucu gerçekleşen etkileşim biotin-avidin etkileşimine bir örnektir. Antijen-antikor etkileşimine, kollajen ve poliüretan filmlerin, anti-adenovirüs antikorlarıyla modifiye edildikten sonra, adenovirüs antijenine bağlanmaları örnek olarak verilebilir.

Özgül olmayan yollarla immobilize olmuş bir vektör yüzeyden salımla yapıdan ayrılırken, kovalent olarak bağlanmış vektör, bağın kırılması ya da matrisin parçalanmasıyla serbest kalır (Şekil 2.12.b).

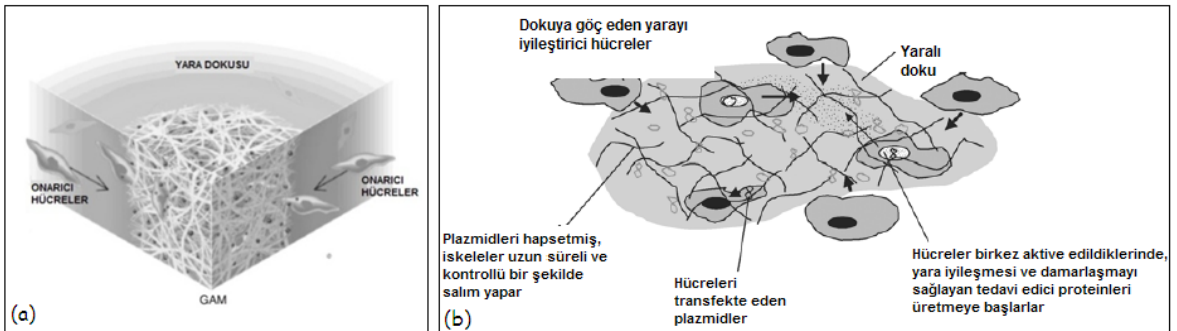


Şekil 2.12. (a) Özgül ve özgül olmayan etkileşimlerle vektörün bağlanması, (b) Vektörün biyomateryalden ayrılması.

2.2.4. Doku iskelelerinden gen aktarımı

DNA'nın doku iskelelerine bağlanma şekline göre gen aktarımı iki şekilde gerçekleşir. Bunlar, "polimerden serbest kalma" ve "substrat aracılı gen aktarımı"dır. DNA, doku iskelesine enkapsüle edilirse, polimerden serbest kalma mekanizması çalışır. Bu mekanizmayla, plazmid DNA'nın ürettiği terapötik protein hızlı bir şekilde veya birkaç günden bir aya varabilen bir periyot süresince polimerik yapıdan serbest bırakılır. Diğer yandan substrat aracılı aktarım, DNA'nın biyomateryal yüzeyine immobilize olduğunu gösterir. Bu yaklaşım, doku rejenerasyonunu destekleyen hücre adezyonu ve göçünü teşvik etmek için uygulanır (Bleiziffer, 2007).

İlaç salım teknolojisi, gen terapi tekniği ve biyomateryal doku iskelelerinin sinerjik uygulaması, ileri düzeydeki doku implantlarının üretilmesine olanak sağlayan bir yaklaşımdır. Bu yaklaşımda gen terapi tekniği iki farklı şekilde uygulanabilir. İlk yaklaşımda, önceden plazmid DNA ile *in vitro* ortamda modifiye edilmiş hücreler bir doku iskelesine ekilerek malzemenin dokuya implantasyonu gerçekleştirilir. İkinci yaklaşımda ise viral ya da viral olmayan bir vektör içerisindeki plazmid DNA doku iskelesiyle birleştirilerek, elde edilen GAM yapısı hastaya implante edilir (Şekil 2.13.a). Doku iskelesi her iki yaklaşımda da doku oluşumu için hücrelerin içine göç edebileceği alanı ve gereken fiziksel desteği sağlar. Implante edilen GAM yapısına çevredeki dokulardan göç eden hücreler, matrinden salınan plazmid ile transfekte olurlar ve istenilen gen ürününü (örneğin, büyüme faktörü) üretmeye başlarlar. Burada, hücreler doku rejenerasyonunu destekleyen bir fabrika rolünü üstlenirler (Şekil 2.13.b) (Salem and Leong, 2006).



Şekil 2.13. (a) Gen ile aktive olmuş matris yapısı, (b) Doku iskelelerinden gen aktarımı yoluyla doku onarımı.

Sistemik yolla veya enjeksiyonla yapılan gen aktarımında, bir hücre popülasyonunun veya vücuttaki özgül bir bölgenin hedeflenmesi oldukça güç iken, polimerik doku iskelelerinden salınan vektör birincil olarak implant bölgesinde lokal bir gen ekspresyonunu sağlar. Ayrıca polimerik doku iskelesi; vektörü, terapötik kapasitesini düşüren serumdaki nükleazlardan, proteazlardan ve immün sistem saldırılarından büyük ölçüde korur. Polimerik malzemeler, viral vektörler için de avantajlıdır. Bu yapılar, virüslerin yarılanma ömürlerini uzatarak, virüsün maruz kaldığı immün cevabı azaltırlar. Buna ek olarak, doku iskelesi tabanlı gen aktarım sistemleri vektörü uzun süre taşıyabildiklerinden, hücrelerin transfeke olma olasılıklarını artırırlar (Bleiziffer et al., 2007; Dang and Leong, 2006).

2.2.5. Doku mühendisliği ve gen terapi yaklaşımıyla onarılan dokular

Gen terapi ve doku mühendisliği yöntemlerinin sinerjik yaklaşımları; deri, kıkırdak, kemik, kan damarları, kas, karaciğer ve pankreas gibi birçok dokunun onarımında birlikte kullanılmaktadır.

2.2.5.1. Deri ve yara iyileşmesi

Derinin baskın hücreleri olan keratinositler ve fibroblastlar, deriden kolaylıkla izole edilebilir ve *in vitro*'da çoğaltılarak genetik olarak modifiye edilebilir. Bununla beraber, derideki yaraların iyileşmesinde sıklıkla kullanılan EGF (epidermal büyüme faktörü), farklı gen aktarım yöntemleriyle hücrelere aktarılabilir. Bir çalışmada EGF cDNA'sının, partikül bombardımanı ile kısmi kalınlıktaki yaralara aktarılmasıyla dokudaki EGF proteininin miktarı artmış ve iyileşme süreci hızlanmıştır (Andree et al., 1994). Diğer bir çalışmada, hEGF'i ifade eden plazmid, fibrin matris ile birleştirildikten sonra üzerine insan keratinositleri ekilmiştir. Oluşturulan yapı, farelerde oluşturulmuş yaralı dokuya implante edildiğinde, EGF ekspresyonunun kontrol grubuna göre 180 kat arttığı ve bu artışın 7 gün boyunca devam ettiği görülmüştür (Andree et al., 2001). PDGF- β (plateletten türevli büyüme faktörü) ile yapılan bir çalışmada, bu büyüme faktörü dermal fibroblastlara aktarıldıktan sonra hücreler PGA doku iskelelerine ekilmiştir. Oluşturulan matris ,

diyabetik bir farenin yara dokusuna implante edildiğinde kontrollere göre epitel dokusu oluşumu % 40 kadar hızlanmıştır (Breitbart et al., 2003).

2.2.5.2. Kemik

Tibial (kaval kemiği) kırıklarının onarılmasında ve birbirine kaynamayan kırık uçların tedavisinde BMP-2 ve BMP-7 genleriyle yapılan klinik uygulamalar FDA tarafından onaylanmıştır. Ayrıca kemik dokusunda damarlaşmayı desteklemek için VEGF cDNA'sını (vasküler endotelial büyüme faktörü) aktaran sistemler geliştirilmiştir. Menopoz sonrasında meydana gelen kemik erimesinin önlenmesinde, bu evredeki kemik yıkımına neden olduğu düşünülen IL-1 ve TNF- α 'nın baskılanması hedeflenmiştir. Bu amaca yönelik olarak, ovaryumu çıkartılmış farelere bu sitokinlerin antagonistlerini kodlayan genler aktarılmıştır. Sonuçta, farelerdeki kemik erimesinin büyük ölçüde azaldığı görülmüştür (Kofron and Laurencin, 2006).

2.2.5.3. Sinir

Sinir dokusunun yenilenmesi oldukça yavaş bir süreçtir. Nöroregeneratif süreci başlatacak faktörler nöral hücreler (nöronal progenitor hücreler ve nöral kök hücreler), sinir kılavuz kanalları yerine geçecek sinir doku iskeleleri ve nörotrofik faktörlerdir. Sinir yenilenmesinin gerçekleşmesi için hücrelerin NGF (sinir büyüme faktörü), BDNF (beyin türevli nörotrofik faktör), IGF-1 ve PDGF gibi nörotrofik faktörleri salgılaması gerekmektedir. Genetik olarak modifiye edilmiş fibroblastlar ve HEK-293 hücreleri bu faktörlerin salımı için ideal hücrelerdir. Periferik sinir sistemi yaralanmalarında, hasarlı sinirin primer olarak onarılamadığı durumlarda araya "sinirgrefti" veya "sinirkılavuz kanalları" konmaktadır. Sinir kılavuz kanalları yerine geçen sentetik materyaller laktat polimeri, polietilen ve silikon polimer tüpler gibi maddelerdir. Son yıllarda örümceğin ipek fiberleri, sinirin yapımı için yenilikçi bir madde olarak öne çıkmaktadır (Bleiziffer et al., 2007).

Nöronların genetik manipülasyonunda kullanılan vektörlerden HSV-1 (herpes simplex virus), bu alanda oldukça başarılı bir vektördür. Lomber motor nöronlarında işlev kaybı olan farelere, HSV-1 aracılığıyla nörotrofik bir faktör olan GDNF ve anti-apoptotik özellikte bcl-2 geni aktarıldıktan 5 ay sonra, genin

aktarıldığı distal nöronların kontrol gruplarına göre daha fazla işlev kazandıkları görülmüştür (Natsume et al.,2003).

2.2.5.4. Kan damarları

Yapay organ veya doku oluşumunda işlevsel kan damarları oluşumu ve damarağı büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla, *ex vivo* ve *in vivo* metodlar geliştirilmiştir. Örneğin, matris yapısına ekilen endotel hücreler damarlanmayı uyarıcı faktörlerle (VEGF gibi) genetik olarak modifiye edilerek ya da edilmeden, damarlanmış bir matris oluşumunu sağlarlar. Bununla birlikte, PDGF (plateletten türevli büyüme faktörü) geninin, kollajen ve PLGA doku iskelelerine hücreler kullanılmadan doğrudan aktarımıyla oluşturulan GAM yapısının implantasyonu, implantın yerleştirildiği dokuda damarlanmayı desteklemiştir (Bleiziffer et al., 2007).

2.3. Kıkırdak Doku Mühendisliği

Kıkırdak dokusu, yenilenmesi basit bir doku olarak gözüktüğü de, vücuttaki diğer dokulardan farklı olarak yenilenme için gerekli sinirsel bağlantıları az, kan ve lenf damarlarından yoksun bir dokudur. Kondrositlerin hareketsizliği ve çok zor çoğalabilmeleri, kıkırdak doku onarımını zorlaştıran faktörler arasında yer almaktadır. Subkondral kemiğe ulaşmayan, yalnızca artikular kıkırdak içinde kalan hasarlarda, zarar gören bölgede damarlaşmanın olmaması nedeniyle, iyileşme sürecini başlatacak kandaki ve kemik iliğindeki kök hücreler ve dokuda yerleşik olan kondrositler lezyonun gerçekleştiği bölgeye göç edemezler. Böylece hasarı giderebilecek onarıcı bir matris yapısı hücreler tarafından üretilmediği için defekt doldurulamaz ve hasar kalıcı hale gelir (Chung and Burdick 2008; Steinert et al., 2008).

Günümüzde, kıkırdak dokuda karşılaşılan belli başlı rahatsızlıklar şunlardır:

- Romatoid artrit (eklem iltihabı)
- Osteoartrit
- Travma
- Kalıtsal anormallikler

- Artroz (eklem yıpranması ya da yaşlanması)
- Kireçlenme (kalsifikasyon), kemikleşme (ossifikasyon), lifsel dejenerasyon
- İyi ya da kötü huylu tümörler

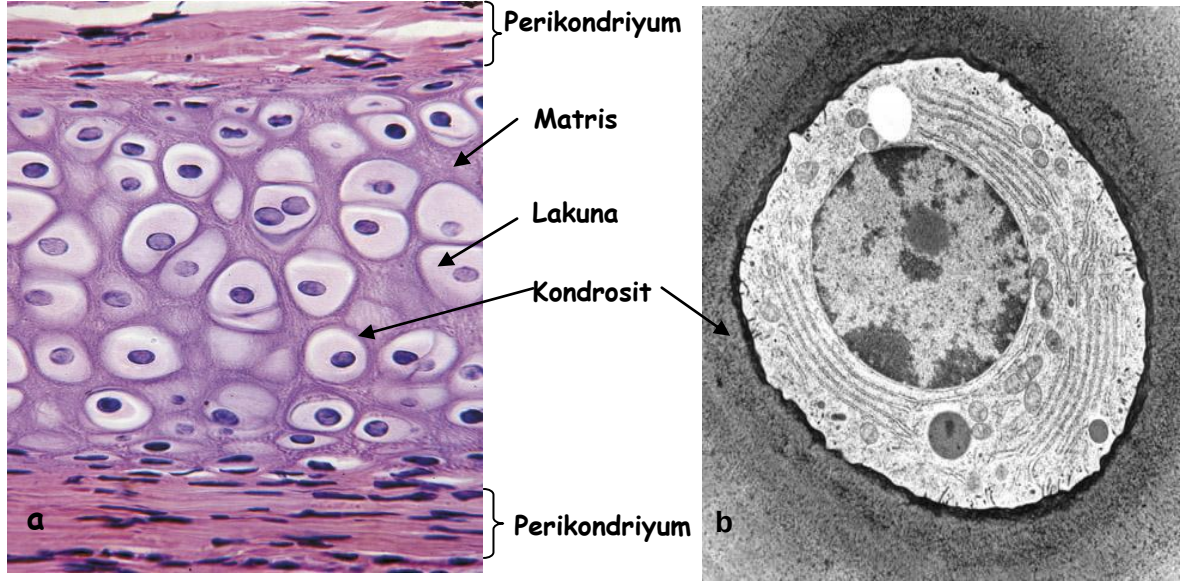
Yaralanmalar ve kazalar sonucunda en fazla hasar gören kıkırdak, artikular (eklem) kıkırdak olmaktadır. ABD’de her yıl ileri evre eklem hasarına sahip 250,000’den fazla kişiye diz kapağı ve kalça protezi ameliyatı yapılmaktadır. Ayrıca, yaşlanan nüfus ve artan obezite gibi problemlerin, gelecekteki osteoartrit vakalarının sayısında büyük artışa neden olacağı düşünülmektedir.

Eklem kıkırdağının onarılmasında popüler tedavi yöntemleri; Estetik ve ortopedik ameliyatlara, doku transplantasyonu ve protez uygulamalarıdır. Tüm bu tekniklerle, eklemdeki acı hafifletilip eklem fonksiyon kazandırılrsa da, klinik uygulamalarda bu tekniklerden uzun dönemli sonuçlar alınmasını engelleyen bazı dezavantajlar bulunmaktadır. En önemli sorun, bu tekniklerle oluşturulan kıkırdağın matris yapısının, biyokimyasal ve biyomekaniksel özellikleri bakımından hiyalin kıkırdağın gerisinde kalan ve temelde tip I kollajenden meydana gelen fibröz kıkırdak olmasıdır. Bu kıkırdak tipi, uzun süreli mekanik dayanıma sahip olmadığından zamanla ve yük artışıyla parçalanmaya eğilimlidir ve bu durum çözülmemesi osteoartrite yol açar. Söz konusu tedavilerin diğer olumsuzlukları, ameliyat sonrası gelişebilecek komplikasyonlar, dokunun alındığı bölgede hasar oluşması ve greft reddidir (Chung and Burdick, 2008). Tüm bu tedavilerin olumsuzluklarına çözüm getirmek üzere öngörülen yaklaşım “*doku mühendisliği ile kıkırdak dokusu üretilmesidir*”. Bu yaklaşımla uygun doku iskeleleri, büyüme faktörleri ve hücreler kullanılarak kıkırdak dokunun *in vitro* koşullarda oluşturulması sağlanır.

2.3.1. Kıkırdak doku fizyolojisi

Kıkırdak dokusu, destek dokusunun özel bir çeşididir. Ancak kıkırdak dokusunda diğer destek dokularda görülen kan ve lenf damarları ile sinirler bulunmaz. Kıkırdak “kondrosit” denilen hücrelerden ve bu hücrelerin sentezleyip salgıladıkları bir hücre dışı matristen (Ekstraselüler matris, ECM) oluşur. Kondrositler bu matris içinde “lakuna” adı verilen boşluklarda tek tek ya da tek bir kondrositin mitoz bölünmesiyle 8 hücreye varabilen “izogen gruplar” halinde bulunurlar (Şekil 2.14). Hücreler proteoglikan, glikozaminoglikan ve kollajen sentezi yaparak ECM’in

devamlılığını sağlarlar. Şekil 2.14'te hücrelerin sitoplazmalarında gözlenen açık alanlar, yağ damlacıkları ve glikojen depolarıdır.



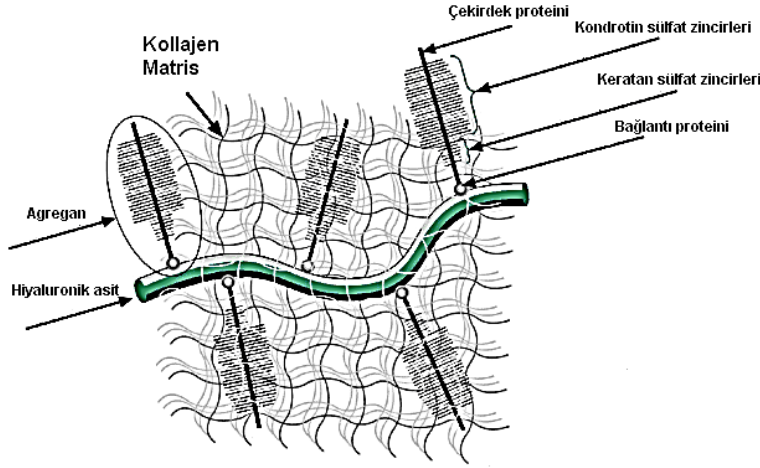
Şekil 2.14. Kıkırdak doku (a) histolojik kesit görüntüsü. Hücreler lakünler içerisinde yer almaktadır. Perikondrium şeklin üst ve alt kısmında pembe ile boyanmış kısımda gösterilmiştir (hemotoksilen-eozin boyaması) (b) Kondrosit elektron mikroskop görüntüsü.

Kıkırdakın avasküler yapısı hücrelerin beslenmesini de zorlaştırır. Oksijen ve besin alımı için gereken vasküler desteği kıkırdakın etrafındaki bağ dokusu olan “perikondrium” sağlar (Şekil 2.14.a). Besin maddeleri, perikondriumdaki kılcal damarlardan kıkırdak matrisine geçer ve difüzyonla hücrelere ulaşır. Kıkırdak matrisinin yapısındaki proteoglikanlara gevşek olarak bağlanan su molekülleri, matrise kolloidal bir özellik kazandırarak difüzyonu kolaylaştırır (Junqueira and Carneiro, 2005; Akay, 2006).

Hareketli eklem yüzeylerini örten artikular kıkırdakta perikondrium bulunmadığı için oksijen ve besin maddelerinin alımı, eklem boşluklarındaki sinoviyal sıvıdan difüzyonla gerçekleşir. Hücrelerde biriken metabolik artıklar ise difüzyonla perikondrium kılcallarına geçerek uzaklaştırılır (Junqueira and Carneiro, 2005).

Kıkırdak matrisi, esnek ve oldukça kıvamlı bir yapıya sahip yüksek oranda hidrate bir jeldir. Bu dokunun net kütlesinin % 60-80'i sudan oluşmaktadır. Kollajen,

hiyaluronik asit, proteoglikanlar ve az miktarda değişik glikoproteinler kıkırdak matrisinin bütün tiplerinde bulunan esas makromoleküllerdir. Agregan, kıkırdağın karakteristik proteoglikanıdır. Kıkırdak matrisinin esas glikozaminoglikanları ise “kondroitin sülfat” ve “keratan sülfat” tır. Glikozaminoglikan zincirleri, proteoglikan çekirdek proteinlerinden uzanır. Çekirdek proteinin bir ucunda bulunan polipeptid halkasına hiyaluronik asit molekülleri bağlanır. Proteoglikan molekülleri ise bağlayıcı bir protein aracılığıyla hiyaluronik asite bağlanır (Henrikson et al., 1997; Akay, 2006) (Şekil 2.15).

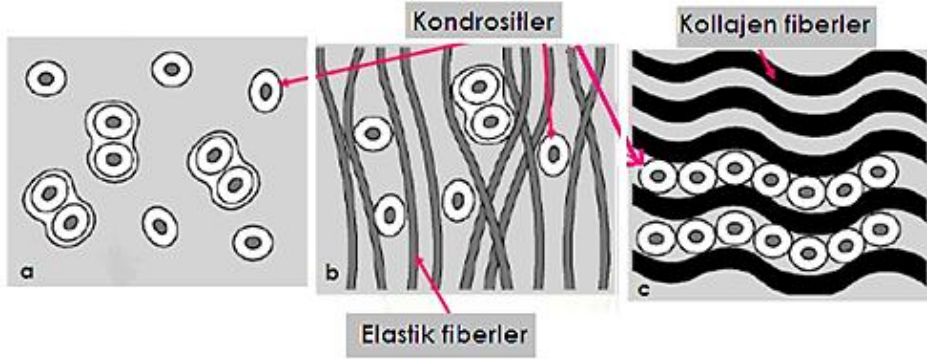


Şekil 2.15. Kıkırdak matrisinin moleküler yapılandırması

Kıkırdak dokusuna esnekliğini matris yapısındaki kollajen ve elastik lifler ile uzanan negatif yüklü glikozaminoglikan zincirlerine sıkıca bağlanan su molekülleri kazandırır. Bu esneklik sayesinde mekanik zorlanmalar karşısında kıkırdak dokusu şeklini korur. Kıkırdağın sert yapısı ise kollajen lifler ile proteoglikan matrisin glikozaminoglikan yan zincirleri arasındaki elektrostatik bağlar sayesinde kazanılır (Junqueira and Carneiro, 2005; Akay, 2006).

Kıkırdağın temel görevi yumuşak dokuları desteklemektir. Kıkırdağın düzgün yüzeyli ve esnek bir yapıya sahip olması, eklem yüzeylerine darbe emici ve kaygan bir özellik kazandırarak kemiğin hareketini kolaylaştırır. Hızlı büyüme yeteneği ve sertliği nedeniyle embriyonik dönemde iskelet görevini üstlenen kıkırdak dokusu, büyüme döneminde ise uzun kemiklerin büyüme ve gelişmelerini destekler. Kulak ve solunum yolu gibi bölgelerde ise esnek ve dayanıklı bir çerçeve gibi işlev göstererek organların kapanıp içine çökmesini engellemektedir.

Kıkırdak dokusunun bileşimindeki değişiklikler, üç tip kıkırdağın ortaya çıkmasında etkilidir. Hiyalin kıkırdak, fibröz kıkırdak ve elastik kıkırdak (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Kıkırdak doku tiplerinin şematik gösterimi (a) hiyalin kıkırdak, (b) elastik kıkırdak, (c) fibröz kıkırdak.

Üç tip kıkırdak içerisinde en yaygın bulunanı hiyalin kıkırdaktır (Şekil 2.16.a). Uzun kemiklerin boyuna büyümesinden sorumlu “epifizyal plak” hiyalin kıkırdaktan yapılmıştır. Bu nedenle “büyüme kıkırdağı” olarak da adlandırılır. Erişkin memelilerde ise kaburgaların göğüs kemiğine (sternum) tutunma bölgesinde, hareketli eklemlerde kemiğin yüzeyinde, burun, larinks, trake ve bronşlarda bulunan kıkırdak hiyalin kıkırdaktır (Junqueira and Carneiro, 2005).

Elastik kıkırdak; tip II kollajen, hiyaluronik asit, proteoglikanlar, elastik lifler ve elastik lamellerden oluşmaktadır. Elastik liflerdeki elastin nedeniyle sarımsıdır. Matrise ağ şeklinde dağılan elastik lifler, dokuya eğilip bükülebilir özellik veren elastik lifler kıkırdaktaki dejenerasyonu engeller. Elastik kıkırdak işitme kanalları duvarında, östaki borusunda, küçük dilde ve bronşiolde bulunur (Şekil 2.16.b).

Sıkı bağ dokusu ile hiyalin kıkırdak dokusu arasında bir yapıya sahip olan fibröz kıkırdak; tip II kollajen, hiyaluronik asit, proteoglikanlar ve tip I kollajenden oluşan bu kıkırdak tipi perikondrium içermez. Kıkırdak matrisinde yoğun olarak bulunan kollajen lifler, kondrositler arasında düzensiz demetler halinde ya da kondrositlere paralel şekilde dizilmişlerdir. Omurlararası disklerde (vertebral disk), diz eklemi içindeki yataklarda (menisküsler), kalça kemiklerinin birleşim yerinde (simfizis pubis) ve tendonların kemiklerle olan bağlantı yerlerinde bulunur (Akay, 2006; Junqueira and Carneiro, 2005) (Şekil 2.16.c).

2.3.2. Kıkırdak doku mühendisliğinde geleneksel yaklaşımlar

“Otolog kondrosit transplantasyonu” (autologous chondrocyte implantation= ACI) doku transplantasyonlarında yaşanan olumsuzluklara çözüm getirileceği düşüncesiyle, 1987’de Brittberg ve arkadaşları tarafından önerilen ve bu tarihten itibaren kıkırdak dokunun rejenerasyonu amacıyla kullanılmakta olan bir yöntemdir. Bu yöntemde, hastadan sağlıklı kondrositler alındıktan sonra, bu hücreler süspanse halde hasarlı olan bölgeye implante edilir. Daha sonra bu yöntem Carticel® adıyla piyasaya sürülmüştür. Bugüne kadar yaklaşık 12.000 hasta bu yöntemle tedavi olmuştur (Marlovits et al., 2006). Bu tedavi yaklaşımıyla, klinikte bazı iyi sonuçlar alınsa da rejeneratif özelliklere sahip, doğal hiyalin kıkırdak dokusunu taklit edebilecek bir yapı şu ana kadar geliştirilememiştir. Bunun en büyük nedeni, kondrositlerin *in vitro* koşullarda tek tabakalı kültür ortamlarında *in vivo*’daki fenotipik özelliklerinin büyük çoğunluğunu kaybetmeleri sonucu “de-differansiye” olmalarıdır. Sonuçta hücreler doğal kıkırdak yapısının oluşmasını sağlayan dokuya özgü matris proteinlerini sentezleyememekte ve doğal kıkırdak yapısı oluşmamaktadır. Ayrıca tedavinin ileri aşamalarında donörün yaşına bağlı olarak hücreler senesense uğramaktadır (Gelse and Schneider 2006; Chung and Burdick, 2008).

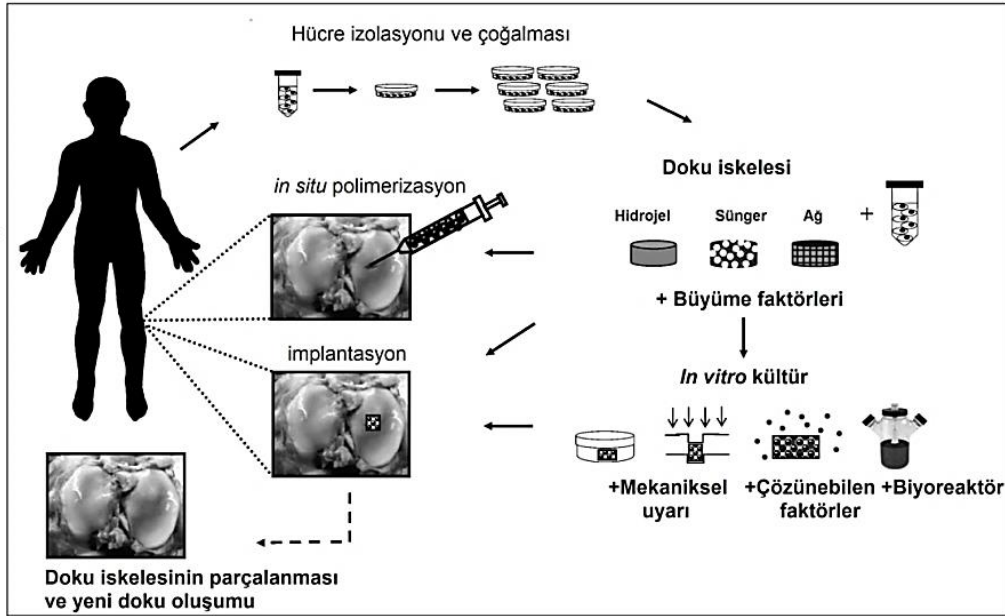
Araştırmacılar bu sorunları aşmak için kıkırdak doku mühendisliği yaklaşımına yönelmişlerdir. Doku mühendisleri *in vivo*’da rejenerasyonu en etkin şekilde gerçekleştirecek doğal kıkırdak yapısını, *in vitro* koşullarda üretmek için yoğun bir şekilde çalışmaktadır. Bu doğrultuda gerçekleştirilen temel yaklaşım şöyledir: Çeşitli yollarla elde edilmiş hücreler, biyoyumlu özellikte 3 boyutlu doku iskeleleri üzerine ekilir, kıkırdağa özgül büyüme faktörleri ve sitokinler varlığında kültüre edilir ve oluşturulan implant vücuda yerleştirilir. Bu yolla *in vitro* koşullarda olumlu sonuçlar elde edilmesine rağmen, *in vivo*’da hücrelerin farklılaşma özelliklerini kaybettikleri, senesense uğradıkları ve matris yıkımının gerçekleştiği görülmektedir.

Son yıllarda doku mühendisleri, oluşan bu sorunların önüne geçmek ve tedavide yeni yaklaşımlar geliştirmek amacıyla, kıkırdak dokusunun onarımını çeşitli yönlerden destekleyen morfojenetik proteinler, büyüme ve transkripsiyon faktörleri

gibi biyosinyal moleküller üzerinde derinlemesine çalışarak sürekli yeni bir faktörün etki mekanizmasını ortaya çıkarmaktadırlar (Steinert et al., 2008; Saraf and Mikos, 2006).

Günümüzde kırık doku onarımı ve rejenerasyonu için kullanılan doku mühendisliği yaklaşımları şöyle sıralanabilir;

- 1) Yeni izole edilmiş ya da kültürü yapılmış hücrelerin implantasyonu; herhangi bir doku iskelesi kullanmadan hücre gruplarının doğrudan hasarın olduğu bölgeye enjekte edilmesi.
- 2) *In vitro*'da üretilmiş hücre ve doku iskelesinden oluşan biyohibrit malzemenin implantasyonu; Otolog hücreler ya da allojenik hücrelerin bir doku iskelesi aracılığıyla hasarlı bölgeye implante edilmesi.
- 3) Kontrollü ilaç salım sistemleri ile doku mühendisliği teknikleri birleştirilerek kırık doku onarımının sağlanması.
- 4) Hücre-doku iskelesi-biyosinyal molekülü (büyüme faktörü ve genler) modeli ile biyoreaktör sistemleri kullanılarak gerçekleştirilen doku mühendisliği yaklaşımıyla *in vitro* ortamda yeni kırık doku oluşumunun sağlanması (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Kırık doku mühendisliğinde kullanılan yaklaşımların şematik gösterimi.

Yapılan tüm çalışmalar ve doku mühendisliğindeki son gelişmeler ışığında kırık doku rejenerasyonunda; uygun hücrelerin seçilmesi, özel olarak dizayn edilmiş doku iskelelerinin kullanımı, biyoreaktör kullanımı ile oluşturulan dokunun mekanik olarak uyarılması ve çeşitli büyüme faktörlerinin kullanılması gibi parametrelerin bir araya getirilmesiyle büyük bir gelişme kaydedilmiştir (Meyer, 2006).

2.3.3. Kırık doku mühendisliğinde gen terapi yaklaşımları

Kırık dokusu sınırlı bir yenilenme yeteneğine sahip olduğu için uygun hücreleri, biyomateryalleri ve biyosinyal faktörleri hasarlı bölgeye etkin şekilde aktaracak yaklaşımların geliştirilmesi gerekmektedir. Son araştırmalarda kırık doku yenilenme sürecine katkıda bulunacak biyoaktif ajanlar, proteinler ve nükleik asitler belirlenmiştir. Ancak bunların klinik uygulamalarını sınırlayıcı bazı problemler bulunmaktadır. Çoğu proteinin *in vivo*'da yarılanma ömürlerinin kısa olması, etkilerinin kısa sürmesine neden olmaktadır. Böylece hasarın olduğu bölgeye uzun zaman aralıklarında ve terapötik dozda ulaştırılamazlar. Ayrıca bu ajanların hedeflenmeyen organları etkilemeden aktarılmalı da oldukça güçtür. Ancak, uygun gen aktarım teknolojileri geliştirilerek bu sorunların aşılacağı düşünülmektedir.

2.3.3.1. Tedavide kullanılan aday genler ve terapötik etki mekanizmaları

Son yıllarda, kırık doku onarımını farklı yollarla destekleyecek özellikte birçok faktör tanımlanmıştır (Bkz. Çizelge 2.2). Bu faktörlerden bazıları (kondrojenezis düzenleyicileri olan SMAD'lar gibi) hücre içinde işlevsel olduklarından çözünmüş formda aktarılamazlar. Geliştirilen uygun bir gen aktarım stratejisiyle, bu faktörleri kodlayan genler hasarlı bölgedeki hücrelere aktararak, hücrelerin bu proteinleri lokal ve uzun süreli olarak sentezlemesi sağlanabilir. Protein lokal olarak üretilip salındığı için çevre dokular proteine çok fazla maruz kalmazlar.

Farklı kimyasal özellikteki proteinler, kırık doku onarımını değişik mekanizmalarla desteklerler. Bazıları kondrojenik farklılaşma, matris sentezi gibi anabolik olayların yönlendirilmesinde etkiliyken; bazıları da hasar görmüş dokudaki hücrelerin yaşlanması (senesens) veya apoptozun önlenmesi gibi katabolik süreçlerin

durdurulmasında etkilidir. Apoptoz ve senesens inhibitörleri, hasara uğramış bölgedeki hücre popülasyonunun korunmasını sağlar. Sitokinler gibi anti-inflamatuvarlar ise enflamasyonu başlatan tümör nekroz faktörü (TNF- α) ve bazı interlökinler gibi aracı molekülleri hedef alır (Steinert et al., 2008). TGF- β 1 gibi bazı büyüme faktörleri ise doku iyileşmesine çok yönlü etki edebilirler. Bu büyüme faktörü eklemlere aktarıldığında hem anti-inflamatuvar cevap oluşturmuş, hem de kondrositlerin yeni matris sentezlenmesini uyarmıştır.

Çok yönlü etki, farklı faktörlerin birlikte aktarılmasıyla da oluşabilir. Örneğin, anabolik bir büyüme faktörü ile (örneğin IGF-1), katabolik reaksiyon gösteren sitokinlerin bir inhibitörünün (örneğin IL-1) birlikte kullanılmasıyla; bir yandan matris parçalanması kontrol altına alınırken diğer yandan hasar görmüş kıkırdak matrisinin yeniden yapılandırılması sağlanmıştır (Haupt et al., 2005). (Kofron et al., 2005).

Çizelge 2.2. Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan aday genler ve etki mekanizmaları

Terapötik mekanizma	Gen ürünü
Kondrojenik farklılaşmayı uyaran faktörler	
Anabolik büyüme faktörleri	TGF β 1, 2, 3; BMP-2, -4, -7
Sinyal iletim faktörleri	Smad-4, -5
Transkripsiyon faktörleri	Sox9,-5,-6
Matris sentezini ve/veya hücre çoğalmasını destekleyen büyüme faktörleri	
Anabolik büyüme faktörleri	TGF- β 1, 2, 3; BMP-2, -4, -7
ECM bileşeni	tip II kollajen, COMP
GAG sentezi için gereken enzimler	GlcAT-1
Osteojenik ve hipertirofik farklılaşma inhibitörleri	
TGF- β /BMP inhibitörleri	Noggin, kordin
Terminal farklılaşma inhibitörleri	IHH, SHH, DHH
Sinyal iletim moleküller	Smad 6, 7
Anti-enflamatuvarlar	
	IL-1Ra, anti-TNF-antikorları, IL-4, -10, -11, -13
Senesens inhibisyonu	
Telomer kısalmasının inhibisyonu	hTERT
Serbest radikal antagonisti	NO-(iNOS) antagonisti
Apoptoz inhibisyonu	
	Bcl-2, Bcl-XL, PI-3 kinaz

2.3.3.2. Aktarımda kullanılan doku iskeleleri

Kıkırdak onarımının tedavisinde başarı sağlanması için seçilen hücre tipi kadar önemli olan bir diğer faktör de uygun bir doku iskelesinin kullanımıdır. Doku iskeleleri hücrelerin morfolojilerini korumaları için gereken 3 boyutlu konfigürasyona sahiptir. Hücrelere ve iyileşmekte olan dokuya mekanik desteği sağlayan fiberli yapı, hücreler arasındaki iletişimi kolaylaştırır. Yani doku iskeleleri kıkırdak matrisine benzer özellikler taşır ve kıkırdak rejenerasyonu için doku iskelelerini ideal hale getirir. Fibrin ve kollajen matrisler, sentetik hiyaluronik asit

süngerler, hidroksilapatit ve kitosan gibi çok sayıda polimer, kırıkta rejenerasyonunda hücre morfolojisini korumak için gerekli olan 3 boyutlu yapıyı sağlarlar (Saraf and Mikos, 2006). Yapılan araştırmalarda, doğal bir polisakkarit olan kitosanın DNA'nın nükleazlar tarafından parçalanmasına karşı güçlü bir koruma gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca kitosanın toksik ve hemolitik olmaması ve intravenöz yolla verildiğinde karaciğer dokularında birikmemesi, bu polimeri doku mühendisliği ve gen aktarımı için ideal kılan özelliklerindendir (Salem and Leong, 2006).

Gen tedavisi uygulamalarında tedavinin amacına uygun ve iyileşme süreci için ideal olacak bir doku iskelesi tasarlanmalıdır. Doku iskelesinin fabrikasyonunda seçilen malzemenin biyouyumlu ve tercihen biyobozunur olması önemlidir. Çünkü yabancı bir maddenin vücutta uzun süre kalması komplikasyon oluşturma riski taşır. Gen tedavisinde karşılaşılan en büyük problem yeterli sayıda hücreye gen aktarılamamasıdır. Bu nedenle transfeksiyon verimliliğini arttırmak için matris yapısı, modifiye hücrelerin yapışmasını ve büyümesini desteklemelidir. Matris aracılığıyla gerçekleştirilen gen tedavisinde, uzun süreli bir gen ekspresyonu sağlanması için seçilen malzemenin mekanik dayanımı daha fazla olmalıdır. Seçilen matrisin kimyasal yapısı DNA ile kompleks oluşturabilmesi açısından önemlidir. Böylece DNA, serumdaki parçalayıcı enzimlerden de korunmuş olur; Salem and Leong 2006; Laporte and Shea, 2007).

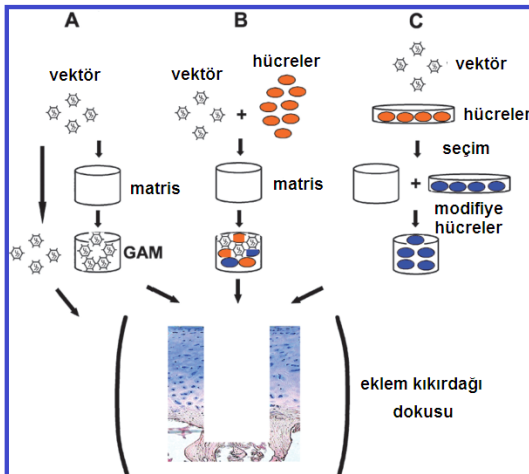
2.3.3.3. Artikular (eklem) kırıkta onarımında gen aktarım stratejileri

Artikular kırıkta onarımını gerçekleştirecek genlerin aktarımında pek çok strateji kullanılabilir. Başarılı bir aktarım stratejisinin geliştirilmesi için, kırıkta hasarının boyutu, oluşum nedeni ve dokuda hedeflenen biyolojik aktivite gibi bazı faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca gen terapi uygulamalarının kilit bileşeni olan vektör, ilgili cDNA'yı yüksek verimlilikle hedef hücrelere aktarmalı; istenen biyolojik yanıtın oluşması için, genin uygun sürede ve seviyede ifadenmesine olanak tanınmalıdır. Bunun yanında, hedef hücrenin doğal yapısının (yarılanma ömrü, bölünme özelliği, enfekte edilebilirliği) bilinmesi, hücreye uygun vektörün seçilerek aktarımdaki verimliliğin artırılması açısından önemlidir. Ortopedik gen terapi uygulamalarında şu ana kadar kullanılan vektörlerden

bazıları: Yalın DNA, katyonik lipozomlar, lipozom olmayan lipid FuGene 6, adenovirüsler, adeno bağımlı virüsler (AAV), herpes simplex virüsü (HSV) ve moloney murine lösemi retrovirüslerdir (MMLV) (Steinert et al., 2008).

Eklem içine gen aktarımında iki temel yaklaşım bulunmaktadır. *In vivo* gen aktarımı ve *ex vivo* gen aktarımı. *In vivo* gen aktarımında serbest haldeki vektör eklem boşluğuna enjekte edilir veya biyouyumlu bir matris ile birleştirilerek (gen ile aktive olmuş matris=GAM implantasyonu) kıkırdaktaki hasarlı bölgeye implante edilir (Şekil 2.18.a). Dokudaki hücreler vektörle karşılaşarak geni içlerine alır ve artık genetik olarak modifiye olmuş bu hücreler rejenerasyona etki edecek transgen ürünlerini salgılamaya başlarlar.

Ex vivo yaklaşım ise iki şekilde gerçekleştirilebilir. İlkinde kemik iliği gibi dokulardan izole edilmiş hücreler *in vitro* ortamda çoğaltılıp hücrelere güvenli vektörlerle genler aktarıldıktan sonra, modifiye olmuş hücreler seçilerek uygun bir matris yapısı ile birleştirilir (Şekil 2.18.c). İkincisinde ise izole edilmiş hücreler ve vektör birlikte matrisle birleştirilirler ve vücuda implante edilirler (Şekil 2.18.b). Seçilen tedavi yaklaşımına göre modifiye hücreler tüm dokuda ya da lokal olarak aktarılan genin ekspresyonunu gerçekleştirir. Böylece üretilen gen ürünleri, transplante edilmiş veya hasarlı bölgeye göç eden hücreler aracılığıyla kıkırdak onarımında etkili olurlar (Steinert et al., 2008).

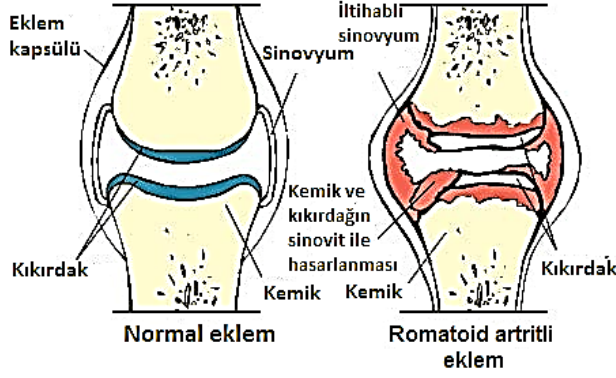


Şekil 2.18. Kıkırdak hasarlarının onarımında gen aktarım yaklaşımları: (a) Vektör veya GAM aracılığıyla *in vivo* gen aktarımı, (b) GAM'a hücreler ekilerek yapılan *ex vivo* gen aktarımı, (c) Modifiye hücrelerin matrise ekilmesiyle gerçekleşen *ex vivo* gen aktarımı.

Nixon ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yürütülen bir çalışmada, adenovirüslerin transfeksiyon verimlilikleri % 40-50 olarak tespit edilmişken, Madry ve arkadaşlarının viral olmayan bir vektör olan FuGene 6 ile yaptıkları bir çalışmada bu vektörün transfeksiyon verimliliği % 35' e kadar çıkabilmiştir (Saraf and Mikos, 2006).

2.3.3.4. Gen terapiyle artikular kıkırdak hasarlarının onarılması

Hasar görmüş artikular kıkırdakın tedavisinde *sinoviyal hücreler, kondrositler ve mezenkimal kök hücreler* olmak üzere üç temel hücre tipinin genetik modifikasyonu hedeflenir. Bu hücrelerin hedeflenmesinde farklı yöntemler kullanılır. Artikular kıkırdakın onarımında en basit yöntem, rekombinant vektörün doğrudan eklem içine enjeksiyonudur. Bu uygulamayla kıkırdak ve sinovyum olmak üzere iki doku hedeflenebilir. Ancak eklem kıkırdığında bulunan kondrositlerin yoğun bir matrisle çevrili olmaları, eklem iç taraflarında ve az sayıda olmaları nedeniyle, bu hücrelere başarılı bir gen aktarımı yapmak oldukça güçtür. Ancak birkaç çalışmada eklemlere enjeksiyonla verilen viral vektörler, kondrositlerin transdüksiyonunu sağlamış ve ilgili gen bu hücrelerce eksprese edilmiştir. *In vivo* yaklaşımla sinoviyal hücrelerin modifikasyonu daha kolaydır. Sinoviyal hücreler kondrositlerin aksine, ince bir hücre dizisi halinde kıkırdak dokusu hariç eklem tüm iç yüzeyini kapladığından, sinovyum, gen aktarımının uygulanması için daha uygun bir dokudur. Sinovyum vektörün veya modifiye hücrelerin enjeksiyonu sonucunda terapötik proteinler hücreler tarafından sentezlenerek eklem boşluğuna bırakılır ve bu proteinler kıkırdak ve çevredeki dokulara ulaşarak etkisini gösterir. Eklem içine enjeksiyona yönelik çalışmalar romatoid artrit (RA) üzerine yoğunlaşsa da, araştırma verileri osteoartritin tedavisinde de bu yöntemin etkili olduğunu göstermektedir (Steinert et al., 2008).



Şekil 2.19. Romatoid artritli oluşturdğu enflamasyon nedeniyle diz kapağı eklemde meydana gelen kıkırdak ve kemik hasarı.

Sinoviyal hücrelere gen aktarımı RA gibi hastalıklardan kaynaklanan, sinovyumdaki inflamasyonu bloke edici anti-enflamutavar etkili genlerin aktarımı için daha uygundur (Şekil 2.19). Çünkü sinoviyal hücrelere TGF- β 1 ve BMP-2 gibi büyüme faktörlerinin aktarılması, eklem fibrozisi ve kıkırdak yıkımı gibi istenmeyen durumlara yol açmıştır.

Kıkırdak dokusunun tedavisinde genetik olarak modifiye edilmiş kondrositlerin kullanılması diğer bir yaklaşımdır. Yapılan çalışmalarda, kondrositlerin kıkırdak onarımında kullanılabilirliğini arttırmak için çeşitli genlerle modifikasyonları sağlanmakta ve bu genleri aktarabilecek çeşitli vektör sistemleri geliştirilmektedir. Bazı lipid bazlı vektörlerin, DNA'nın kondrositler tarafından içeri alınmasını kolaylaştırdığı görülmüştür. Viral vektörlerle yapılan aktarımda ise genin ifade düzeyi artmaktadır (Steinert et al., 2008).

Tek tabaka halinde yayılmış kondrositlere adenoviral yolla aktarılan TGF- β 1, BMP-2, IGF-1 veya BMP-7, hücrelerin tip II kollagen ve proteoglikan üretimini uyarak, hücrelerin dedifferansiye olma eğilimlerinin azalmasını sağlamıştır (Smith et al 2000; Shuler et al 2001; Hideka et al 2003; Nixon et al 1999; Nixon et al 2000).

Kondrositlerin kıkırdak lezyonlarına aktarımında ilk yaklaşım modifiye edilmiş olarak süspanse halde verilmeleridir. Böyle sistemlerde, IGF-1 (Madry et al., 2001), FGF-2 (Madry et al., 2004) veya SOX-9 (Cucchiari et al., 2007) ile modifiye edilmiş hücreler, proteoglikanlar ve kollajen II tarafından zenginleştirilmiş

bir doku oluşturmışlardır. Modifiye hücrelerin süspanse halde aktarılmasına alternatif bir yöntem olarak, 3 boyutlu kültür sistemleri kullanılmıştır. Bu işlemde, hücreler tek tabaka halinde transdükte veya transfekte edildikten sonra, bir matrise ekilip sonrasında osteokondral veya kondral hasarlara aktarılırlar. Bu 3 boyutlu sistemler için, *in vitro* kondrosit fenotipinin korunmasını sağlayan genler BMP-2,-4,-7, IGF-1 ve SOX9'dur. Modifiye kondrositler bu sistemlerde aktarılan geni birkaç hafta boyunca eksprese ederler (Steinert et al., 2008).

Adenoviral vektörler ve IGF-1 ile yapılan *ex vivo* bir çalışmada, sıçanın eklem kıkırdığından izole edilmiş kondrositlere, IGF-1 cDNA içeren adenoviral vektörlerin transdüksiyonu ve modifiye edilmiş hücrelerin kısmi kalınlıkta kıkırdak hasarı olan eklem bölgesine implantasyonu sonucunda hasarlı bölgede kondrosit morfolojisinin korunduğu ve 8 hafta boyunca hiyalin kıkırdak benzeri doku üretildiği gösterilmiştir (Smith et al., 2000).

Bir *ex vivo* yaklaşımda, adenoviral virüsler aracılığıyla BMP-7 ile transdükte edilen kondrositler otolog fibrinden oluşan matrise ekildikten sonra tam kalınlıkta kıkırdak lezyonuna sahip atlara implante edilmişlerdir. Operasyon yapıldıktan dört hafta sonra, ilgisiz markır genlerin aktarıldığı kontrol defektleriyle karşılaştırıldığında, tedavi edilen defektlerde proteoglikan ve kollajence zengin matris oluşumu gözlenmiştir. Ancak 8 hafta sonra bu bölgeler birbirleriyle kıyaslandığında, kollajen II ve proteoglikan seviyeleri ve mekanik dayanımlarının neredeyse aynı olduğu görülmüştür. Bu durum, 8 aydan sonra defektli bölgede kalan implante edilmiş kondrositlerin sayısının azalmasına bağlanmıştır (Hideka et al., 2003).

Kondrositler hücre ve gen tabanlı kıkırdak onarımında çok eskiden beri kullanılmasına rağmen klinikteki kullanımını sınırlayıcı birçok olumsuz faktör bulunduğu bilinmektedir. Bunlar eklemden izole edilecek sağlıklı hücrelerin az sayıda olması, hücrelerin alındığı bölgede hasar oluşabilmesi ve kondrositlerin vücutta çoğalma sırasında farklılaşma özelliklerini yitirerek fenotipik özelliklerini kaybetmeleridir. Bu doğrultuda mezenkimal kök hücreler (MSC) ve projenitör hücrelerle yapılan çalışmalar ise, bu hücrelerin kondrositlere iyi bir alternatif olduğunu göstermektedir.

MSC'lerin *in vivo*'da kıkırdak onarımını sağlayacak hiyalin kıkırdak dokusunu oluşturmaları için bu hücreler, belirli faktörlerle kondrojenik yönde uyarılmalı; kemikleşme, fibrinleşme ve enflamasyon oluşmadan artikular kıkırdak fenotipi korunmalıdır. Mezenkimal kök hücrelerin *in vivo* ve *in vitro*'da kıkırdak dokusuna farklılaşmaları için uyarıcı faktörlerden TGF- β 1, 2, 3, ve BMP-2 en bilinenlerdir.

Osteokondral defektlere gen aktarımında; periosteal, perikondral ve kemik iliği kökenli MSC'ler kullanılmıştır (Steinert et al., 2008; Saraf and Mikos, 2006). Yapılan bir çalışmada, periosteal kökenli MSC'lere retroviral yolla BMP-7 aktarıldıktan sonra bu hücreler PLGA tabanlı doku iskelelerine ekilmişlerdir. Daha sonra oluşturulan bu GAM yapısı osteokondral defektli tavşana nakledilmiştir. İmplantasyondan 12 hafta sonra defektin iyileştiği gözlenmiştir (Mason et al.,2000). Aynı hayvan modeli kullanılarak yapılan bir başka çalışmada, kemik iliği kökenli MSC'lere lipozomal yolla GDF-5 (CDMP-1) geni aktarıldıktan sonra hücreler kollajen tip I kaynaklı hidrojele ekilmiştir. Kontrol genlerle yapılan aktarımla karşılaştırıldığında, kıkırdak dokusunun onarıldığı görülmüştür (Katayama et al.,2004).

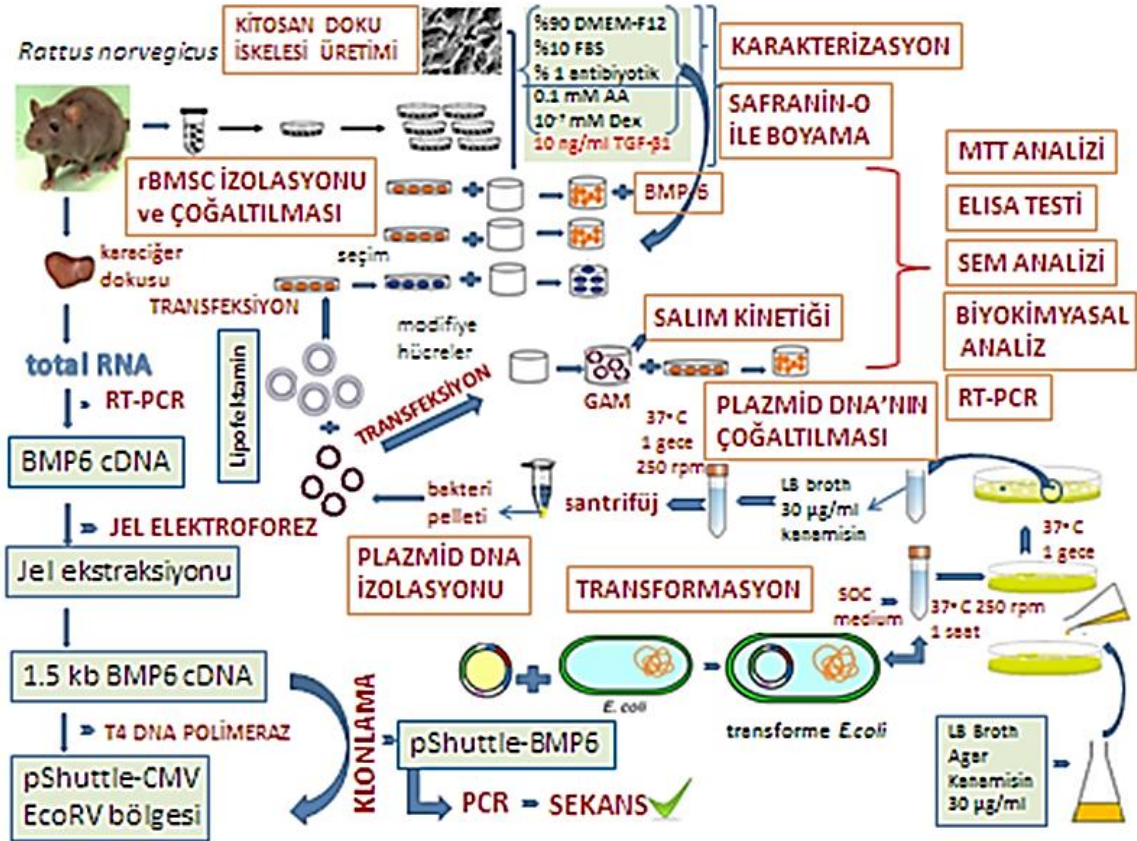
In vivo'da kondrojenezisi uyarmak amacıyla yapılan başka bir çalışmada, perikondriumdan izole edilmiş MSC'lere, adenoviral yolla BMP-2 ve IGF-1 aktarıldıktan sonra fibrin yapıştırıcıdan (fibrin glue) oluşan matris üzerine ekilmişler. Bu yapı, kısmi kıkırdak hasarının olduğu bölgeye implante edildiğinde kollajen II ve proteoglikanlarca zengin bir doku oluşmuştur (Gelse et al.,2003).

Çizelge 2.3. Artikular kırıldak hasarlarında yapılan gen aktarım çalışmaları (Steinert et al., 2008).

Terapötik cDNA	Aktarım yöntemi	Vektör	Hücreler	Matris	Hasar tipi	Denek canlı	Etki Süresi (hafta)
TGF-β	<i>ex vivo</i>	retroviral	NIH3T3	-	kondral	tavşan	6
BMP-7	<i>ex vivo</i>	retroviral	periosteal hücreler	PGA	osteokondral	tavşan	12
BMP-7	<i>ex vivo</i>	Adenoviral	kondrositler	fibrin	osteokondral	at	36
BMP-2	<i>in vivo</i>	plazmid DNA		col 1	osteokondral	tavşan	12
BMP-2, IGF-1	<i>ex vivo</i>	Adenoviral	perikondriyal hücreler	fibrin	kondral	sıçan	8
CDMP-1	<i>ex vivo</i>	Lipozomal	MKH	col 1	osteokondral	tavşan	8
IGF-1	<i>ex vivo</i>	Lipozomal	kondrositler	aljinat	osteokondral	tavşan	14
IGF-1	<i>ex vivo</i>	adenovirüs	kondrositler	fibrin	osteokondral	at	36
FGF-2	<i>ex vivo</i>	lipozomal	kondrositler	aljinat	osteokondral	tavşan	14
FGF-2	<i>in vivo</i>	AAV	-	-	osteokondral	tavşan	18
FGF-2	<i>ex vivo</i>	AAV	kondrositler	col 1+ periosteal doku	osteokondral	tavşan	12

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, ilk olarak sunulan tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen plazmid eldesi ve aktarımına yönelik çalışmalar açıklanmış, sonrasında mezenkimal kök hücre karakterizasyonu, kitosan doku iskelesi üretimi ve doku iskeleleriyle yürütülen hücre kültürü çalışmaları hakkında bilgi verilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalar, Şekil 3.1’de verilen akış şemasında özetlenmiştir.



Şekil 3.1. Deneysel çalışmalardaki aşamaların şematik gösterimi.

3.1. BMP6 cDNA'sının Eldesi, Plazmide Klonlanması ve Sekans Doğruluğunun Tayini

3.1.1. BMP6 cDNA'sının eldesi ve plazmide klonlanması

Yürütülen tez kapsamında, gen aktarım çalışmalarında kullanılan “pShuttle-rBMP6” plazmidi (Stratagene, USA) Dr. Gerald Hankins'den (Virginia Üniversitesi) temin edildi. Plazmid, Dr. Gerald Hankins'in de yer almış olduğu “*Comparison of osteogenic potentials of human rat BMP4 and BMP6 gene therapy using [E1-] and [E1-,E2b-] adenoviral vectors*” adlı çalışmada, pShuttle-CMV plazmidine BMP6 cDNA'sı klon olarak oluşturulmuştur (Li et al., 2006). BMP6 cDNA'sı eldesi için, öncelikle Sprague–Dawley (SD) sıçanının karaciğer dokusundan total RNA izole edilmiştir. 5'–TAGAT CTC CAC CATGCC CGG GCT GGG G–3' düz primeri ve 5'–AGA ATC ACA GCC CCT GCA A–3' ters primeriyle RT-PCR yürütülerek BMP6 cDNA'sına ait PCR ürünleri elde edilmiştir (Şekil 3.2). PCR ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra, elde edilen yaklaşık 1.5 kb'lık ürün jelden saflaştırılarak T4 DNA polimeraz ile kesilmiş, sonrasında pShuttle-CMV'nin EcoRV bölgesine klonlanmıştır. Sonuç olarak pShuttle-rBMP6 plazmidi (ifade vektörü) elde edilmiştir (Li et al., 2006).

3.1.2. Klonlanan genin sekans doğruluğunun tayini

BMP6 cDNA'sı klonunun plazmidteki varlığı ve nükleotid dizisinin doğrulanması için, pShuttle-rBMP6 plazmidinin çoklu klonlama bölgesi ve BMP6 cDNA'sı amplifiye edilmiş, elde edilen PCR ürünleri üzerinden otomatik dizi analizi (sekans analizi) yapılmıştır. BMP6 cDNA'sı ve aminoasit şifreleyen bölgeleri Şekil 3.2'de gösterilmektedir.

AGAGACTCTGACCTATTTTGTGACACCCGGGTGGTGTGGGCCCTC GAAGAAGGCTGG
 -R--D--S--D--L--F--L--L--D--T--R--V--V--W--A--S--E--E--G--W--
 CTGGAAATTCGACATCACAGCAACTAGCAATCTGTGGGTGGTGACACCGCAGCACAACATG
 -L--E--F--D--I--T--A--T--S--N--L--W--V--V--T--P--Q--H--N--M--
 GGACTCCAGCTGAGTGTGGTGACTCGGGACGGACTCCACATCAACCCCCGTGCGGCGGGC
 -G--L--Q--L--S--V--V--T--R--D--G--L--H--I--N--P--R--A--A--G--
 CTGGTGGGCAGAGACGGCCCTTACGACAAGCAGCCCTTCATGGTGGCCTTCTTCAAGGTG
 -L--V--G--R--D--G--P--Y--D--K--Q--P--F--M--V--A--F--F--K--V--
 AGCGAGGTCCACGTGCGCACCACCAGGTCAGCTCCAGTGGGCGTCGACAGCAGAGTCGC
 -S--E--V--H--V--R--T--T--R--S--A--S--S--R--R--R--Q--Q--S--R--
 AATCGGTCCACCAGTCGCAGGACGTGTCCCGGGGCTCCAGTGCTTCAGACTACAACAGC
 -N--R--S--T--Q--S--Q--D--V--S--R--G--S--S--A--S--D--Y--N--S--
 AGTGAGTTAAAAACAGCTTGCAAGAAGCATGAGCTTTACGTGAGCTTCCAGGACCTGGGA
 -S--E--L--K--T--A--C--K--K--H--E--L--Y--V--S--F--Q--D--L--G--
 TGGCAGGACTGGATCATCGC CCCAAAGGCTACGCTGCCAACTATTGTGACGGAGAGTGT
 -W--Q--D--W--I--I--A--P--K--G--Y--A--A--N--Y--C--D--G--E--C--
 TCCCTTCCTCTCAATGCACACATGAATGCCACCAACCACGCCATTGTACAGACCTTGGTCT
 -S--F--P--L--N--A--H--M--N--A--T--N--H--A--I--V--Q--T--L--V--
 CACCTTATGAATCCCAGTACGTCCCCAAACCATGCTGCGCACCAACCAAACTGAATGCC
 -H--L--M--N--P--E--Y--V--P--K--P--C--C--A--P--T--K--L--N--A--
 ATCTCGGTTCTTTACTTCGACGACAAC TCCAATGTCATCTTGAAAAAATACAGGAACATG
 -I--S--V--L--Y--F--D--D--N--S--N--V--I--L--K--K--Y--R--N--M--
 GTTGTGAGAGCTTGTGGATGT CATTGA GTGGAAGCCAGTTGCAGGGGCTGTGATTCTGCC
 -V--V--R--A--C--G--C--H--*--
 TCGGATTCCTAACATCTGCCTTAAAAACACGGGAAGCAGCACAGTGCAGCGGGACGATGAC
 ACTCAAAGCATCTCCTGCTGGTGCCTTAGCCCAAGGAGGATTTTACGAGGACCTTGTCTGA
 TGGCTTTCCAGTTGAGCAGTTGCTGGTCTGTAGGAAGCTGTAATGCTTGTAGCACAGGC
 CTGGAAACTACAGAAACATAGTGTCTCCTCCCCAGTCCCACCCAGACTAGCCTTAGCT
 TTTAGATCTAGCTGTTTGTGGTGTAAAGTAGGAGATAAACTTGAAGGAATATTAAATATCC
 CTGGTTGAAAGACAGATCTAGTGGTTCTACAGCACCCATCCCAGGGAGATTTTGCAGATA
 GCCGAATGGAGGAGAGGAGAACAACCTCTATTAGATTCCATTCCCAGCAAAGGGCAGCTCCC
 ACAGAACCTGCAGCCTGGCCATCACAGGGCTTTGTGGAGGTGCCTTCTGTCTACTGTTAG
 TTACCCGTTTTATGTTGACTCTTGGTGGTGTGAAAAATGTACTAATTTTCGGTCAAAACAA
 CTATAGCATTTCCACGCCATACTCCTCCCTTACTCACAGAATTC

Şekil 3.2. BMP6geni cDNA ve aminoasit şifreleyen bölgelerinin dizilimi.
 (<http://www.ensembl.org>)

3.1.2.1. pShuttle-rBMP6 plazmidinin çoklu klonlama bölgesinin amplifikasyonu

Elde edilen pShuttle-rBMP6 plazmidinin çoklu klonlama bölgesinin (Şekil 3.3) ve EcoRV bölgesine yerleştirilen BMP6 geninin amplifikasyonu, Çizelge 3.1’de belirtilen primerlerle 32 döngü polimeraz zincir reaksiyonu yürütülerek gerçekleştirilmiştir.

pShuttle-CMV Çoklu Klonlama Bölgesi

(888–1031 arasındaki sekanslar gösterilmektedir)

İleri primer bağlanma bölgesi

GGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAG...

...AGATCTGGTACCGTCGACGCGGCCGCTCGAGCCTAAGCTTCTAGATAAGATATC...

Geri primer bağlanma bölgesi

...CGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATACCAC

Şekil3.3. pShuttle-CMV’nin çoklu klonlama bölgesinin DNA dizisi ve bu bölgenin amplifikasyonu için tasarlanan primerlerin ileri ve geri bağlanma bölgeleri.

Çizelge 3.1. İleri ve geri amplifikasyon primerlerine ait nükleotid dizisi.

pShuttle-CMV’nin çoklu klonlama bölgesi içintasarlanan primerler	İleri primer	5' GGTCTATATAAGCAGAGCTG 3'	888-907
	Geri primer	5'GTGGTATGGCTGATTATGATCAG3'	1009-1031
BMP6 cDNA’in amplifikasyonu için tasarlanan ekzon içi primerler	İleri primer	5 ' CGATGATAACTCCAATGTCAT 3'	
	Geri primer	5' ATGACATTGGAGTTATCATCG 3'	

Reaksiyon, Saiki ve arkadaşlarının (Saiki et al., 1988) geliştirdiği yöntemde bazı değişiklikler yapılarak aşağıda açıklanan şekilde yürütülmüştür:

Öncelikle, Çizelge 3.2’de belirtilen hacimlerde kalıp DNA, tampon çözeltisi, MgCl₂, tersve düz primerler ve dNTP içeren reaksiyon karışımı bir PZR tüpü içinde hazırlanmıştır.Karışıma en son taq polimeraz enzimi eklenmiştir.

Çizelge 3.2. PZR için hazırlanan reaksiyon karışımı bileşimindeki maddeler ve kullanıldığı miktarlar (10x Reaksiyon Tamponu: 10 mM Tris HCl pH:9,0, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂,%0,1 Triton X 100, 0,2 mg/mL BSA veya Jelatin.)

pShuttle-rBMP6 kalıp DNA	3 µL
10 x Reaksiyon tamponu	5 µL
2.5 mM dNTP karışımı	1 µL
İleri primer	1µL (10pmol)
Ters primer	1 µL (10 pmol)
Steril H ₂ O	38,5 µL
Taq DNA polimeraz	0,5 µL (2,5 ünite)

Hazırlanan reaksiyon karışımı, DNA çift zincirinin açılması, olası proteaz kontaminasyonununönlenmesi ve ekzonükleaz aktivitesinin ortadan kaldırılması için 94°C’de 4 dk denatüre edilmiştir. Sonrasında, polimerizasyon işlemi DNA ısı döngüleyicide,[94°C^{1:00}; 58°C^{1:00}; 72°C^{2:00}]₃₂ PZRprogramı uygulanarak gerçekleştirilmiştir.En son döngüden sonra yarım kalan reaksiyonların tamamlanması için 72°C’de 7dk polimerizasyon sağlanmıştır.Amplifikasyon sonunda örnekler %1’lik agaroz jelde kontrol edilmiştir.

3.1.2.2.Otomatik DNA dizi analizi (Sekans analizi)

BMP6 cDNA dizisinin, pShuttle-CMV vektörüne klonlanmasının doğrulanması için otomatik dizi analizi yapılmıştır. Analiz reaksiyonu “ABI PRISM Big Dye Terminator V3.1 Cycle SequencingKit” kullanılarak ve üretici firmanın (Applied Biosystems, CA/USA) önerileridoğrultusunda bazı değişiklikler yapılarak aşağıdaki şekilde yürütülmüştür:

Çizelge 3.3. Dizi analizi reaksiyonunda kullanılan reaksiyon karışımı bileşimi.

PZR ürünü	3 µL
Big Dye Reaksiyon Karışımı	5 µL
Primer (10 pmol/µL)	0,5µL
Steril H ₂ O	8,5 µL
Toplam hacim	20 µL

Öncelikle Çizelge 3.3’de belirtilen bileşimde ve hacimlerde reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra reaksiyon tüpleri ısı döngüleyiciye yerleştirilerek 96°C 10 sn denatürasyon, 50°C’de 5 sn primer eşleşmesi (annealing), 60°C’de 4 dk primer uzaması (extension) koşullarında 25 döngüden oluşan reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

Döngüler tamamlandıktan sonra her bir tüpe 2 µL 3M sodyum asetat eklenmiş ve üzerlerine 50 µL soğuk % 95-100’lük etil alkol ilave edilmiştir. Daha sonra karışım 1,5 mL’lik Ependorf tüplere aktararak -20 °C’de 15 dk bekletilmiştir. Ardından, karışım 20 dk 13.000 rpm’de santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet üzerine 250 µL soğuk %70’lik etil alkol ilave edilmiştir. Oluşturulan süspansiyon 5 dk 13.000 rpm’de santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Pellet üzerine 20µL formamid ilave edilip vortekslenerek çözülmesi sağlanmıştır. Elde edilen örnek, kapiller elektroforez sisteminin tüplerine aktarılıp 95°C’de 5dk denatüre edildikten sonra 5 dk -20°C’de bekletilmiştir. Daha sonra örnekler kapiller elektroforez sisteminde yürütülmüştür.

3.2.E.coli Hücrelerinin Rekombinant Plazmidlerle Transformasyonu

Çalışmanın bu bölümünde, *E.coli* hücrelerinin elde edilen pShuttle-BMP6 plazmidile transformasyonu açıklanacaktır. Yüksek verimlilikteki kompetent (NEB 5-alpha F’ I^q Kompetent *E.coli*(High efficiency)) hücrelerine plazmidin transformasyonu gerçekleştirilmeden önce hücrelerinin canlılığı ve transformasyon kapasiteleri kontrol edilmiştir. *E.coli* hücrelerinin çoğaltılması için kullanılan besi ortamlarının hazırlanması Bölüm 3.2.1’de açıklanmıştır.

3.2.1. *E.coli* kültüründe kullanılan besi ortamlarının hazırlanması

- Çalışma kapsamında kullanılan pShuttle-CMV ifade vektörü kanamisin dirençlilik geni içerdiğinden, transformantların seçiminde kullanılacak katı ve sıvı seçici besi ortamları “kanamisin” (Invitrogen, ABD) antibiyotiği kullanılarak hazırlanmıştır. Antibiyotik konsantrasyonu, üretici firmanın önerisi doğrultusunda (NEB, ABD) 30 µg/mL olarak belirlenmiştir.
- Besi ortamlarının sterilizasyonu, 121°C 1 atm basınçta, 15 dk boyunca otoklavlanarak yapılmıştır.
- Besi ortamlarının tüplere ve Petri kaplarına aktarılması aseptik koşullarda gerçekleştirilmiştir.
- Besi ortamları hazırlandıktan sonra +4 °C’de saklanmıştır.

Hücrelerin çoğaltılacağı katı, sıvı ve kontrol besi ortamlarının hazırlanma şekli aşağıdaki gibidir:

LB- Kanamisin Broth sıvı besi ortamının hazırlanışı (250 mL için)

LB Broth (6,25 g),250 mL ultra saf su içerisinde çözülerek otoklavlanmıştır. Daha sonra 10 mg/mL konsantrasyondaki stok kanamisin çözeltisi, 0,45 µm çapındaki filtreden geçirilip steril edildikten sonra 48°C’ye kadar soğutulmuş besiyerine antibiyotikten 750 µL ilave edilmiştir.

LB- Agar kontrol katı besi ortamının hazırlanışı (250 mL için)

Agar (5 g) 250 mL ultra saf su içerisinde çözüldükten sonra otoklavlanmıştır. Besi ortamı biraz soğutulduktan sonra cam Petri kaplarına dökülüp katılaşması beklenmiştir.Besi ortamı katılaştıktan sonra ters çevrilmiştir.

LB-Kanamisin Agar katı besi ortamının hazırlanışı(250 mL için)

Agar (5 g) ve LB Broth (6,25 g) 250 mL saf su içerisinde çözülüp otoklavlanmıştır. Hazırlanan besi ortamı 48°C’ye kadar soğutulduktan sonra (30 µg/mL) 750 µL kanamisin eklenmiştir. Besi ortamları cam Petri kaplarına dökülerek katılaştıktan sonra ters çevrilmiştir.

3.2.2. Kompetent *E.coli* hücrelerinin canlılığının ve transformasyon kapasitelerinin pUC 19 kontrol DNA'sı ile test edilmesi

1. Daha önceden 80°C'de saklanmış olan iki tüp (50 µL) NEB kompetent *E.coli* hücreleri ve -20°C'de saklanmış bir tüp (50 µL) pUC 19 kontrol DNA'sı (10pg/µL) buz üzerinde 10 dk eritilmiştir.
2. Tüpler içindeki erimiş DNA karışımları, steril ve -20°C'de soğutulmuş pipet uçları kullanılarak yavaşça pipetlendikten sonra 1. tüpteki hücre karışımına 1pg (0,1 µL), 2. tüpteki hücre karışımına 100 ng (100µL) DNA eklenmiştir.
3. Tüpler 4-5 kez alt üst edilerek hücrelerin ve DNA'nın karışması sağlanmıştır.
4. DNA-hücre karışımı buzda 30 dk bekletilmiştir.
5. Karışıma 42°C'de 30 sn ısı şoku uygulanmıştır.
6. Karışım 5 dk buz üzerinde bekletilmiştir.
7. Karışım üzerine oda sıcaklığında bulunan 950 µLSOC besi ortamı (NEB) eklenmiştir.
8. Elde edilen transforme *E.coli*'lerin 37°C'de 1 sa 250 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyonu sağlanmıştır.

Transforme edilen *E.coli* hücrelerinin canlılıkları ve transformasyon verimliliklerinin kontrolü için, plazmid-hücre karışımının 100 µL'si, önceden 37°C'de ısıtılmış seçici katı besi ortamları (LB-Kanamisin Agar) ve kontrol katı besi ortamlarına (LB Broth-Agar) yayma ekim yöntemiyle ekilmiştir. Hazırlanan katı kültürler, 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmış, ertesi gün hücrelerin seçici besi ortamlarında ve kontrol besi ortamlarında koloni oluşturup oluşturmadıklarına bakılmıştır.

3.2.3. Kompetent *E.coli* hücrelerinin pShuttle-CMV ile transformasyonu

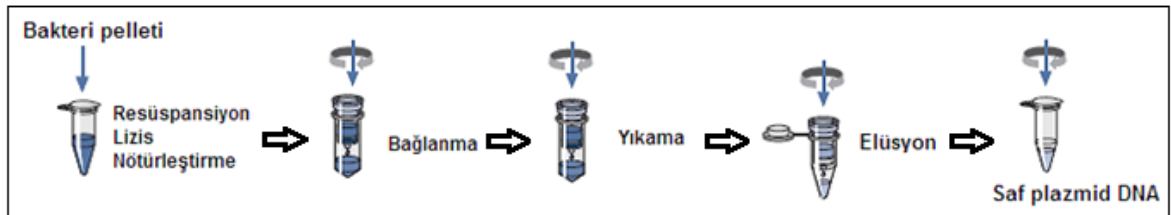
Kompetent *E.coli* hücrelerinin canlılığı ve transformasyonu doğrulandıktan sonra bir tüp (50 µL) hücre karışımı için 3 µL plazmid eklenerek Bölüm 3.2.3'de verilen protokolün aynısı uygulanarak SOC besi ortamı içerisinde süspanse halde transforme *E.coli* hücreleri üretilmiştir.

3.3. Transforme *E.coli* Hücrelerinin Katı Besi Ortamlarında Çoğaltılması ve Saklanması

SOC besi ortamı-transforme *E.coli* karışımının 100 µL'si seçici katı besi ortamına (LB-kanamisin-agar) yayma plak yöntemiyle ekilerek hücreler 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında elde edilen katı kültürlerden öze yardımıyla tek koloni alınarak taze hazırlanmış katı besi ortamlarına tek koloni ekim yapılmıştır. Sonrasında katı besi ortamları plazmid DNA izolasyonu yapılmak üzere +4°C'de kısa süreliğine saklanmıştır.

3.4. Transformant Kolonilerin Sıvı Besi Ortamlarında Çoğaltılması ve Kolonilerden Plazmid DNA İzolasyonunun Yapılması

Seçici (LB-kanamisin-agar içeren) besi ortamlarında üreyen koloniler, transformant kolonilerdir. Bu koloniler içerisinden tek bir koloni öze yardımıyla alınarak kanamisin içeren 10 mL LB besi ortamına inokule edilmiştir. Kültür, 37°C'de 250 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 16-18 sa inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde *E.coli* hücrelerinden Qiagen Plazmid Mini Kit (Qiagen, ABD) ile küçük ölçekte ve Qiagen Plazmid Midi kit ile büyük ölçekte plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. Qiagen Plazmid Mini Kit ile yapılan DNA izolasyonunun basamakları Şekil 3.4'te gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Plazmid DNA izolasyonun şematik olarak açıklaması.

İşlem basamakları şöyle açıklanabilir:

1. 10 mL'lik gecelik *E.coli* kültürleri 2500 rpm'de 10dk çöktürülmüş ve süpernatant atılmıştır.
2. Bakteri pelleti resüspansiyon tamponu ile kaldırılarak homojenize edilmiş ve süspansiyon Ependorf tüpüne aktarılmıştır.

3. Süspansiyon bakteri karışımı üzerine lizis tamponu eklenerek tüpler 4-6 kez alt üst edilmiş ve hücre lizisinin gerçekleşmesi sağlanmıştır.
4. Tüplere nötralizasyon tamponu eklenerek tüpler hızlıca 4-6 kez alt üst edilerek karıştırılmıştır.
5. Tüpler 13.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra, beyazsıkı bir pellet elde edilmiştir.
6. Süpernatant, Ependorf tüpüne yerleştirilen bir Qiaprep kolona (Qiagen, ABD) dökülerek 1 dk 13.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Bu aşamada plazmid DNA, kolona bağlanmıştır.
7. Kolon yeni bir tüpe alınarak nükleaz aktivitesini ortadan kaldıran bir tampon ile yıkandıktan sonra ve 10 dk 13.000 rpm'de santrifüjlenmiştir.
8. Bu işlemten sonra kolon tekrar yeni bir tüpe alınmış ve yıkama solüsyonu yıkanmıştır. Santrifüj işleminden (13.000 rpm'de 1 dk) sonra kontaminantların tüpün içine akarak kolondan uzaklaşması sağlanmıştır.
9. Kolon yeni bir santrifüj tüpüne alınarak 50 µL elüsyon tamponu yıkanmış ve saf plazmid DNA'nın kolondan tüp içine toplanması sağlanmıştır. Elde edilen ürünler % 1'lik agaroz jele yüklenerek elektroforezde yürütülmüş ve elde edilen plazmid DNA'nın görüntülenmesi için jelin 260 nm'de fotoğrafları çekilmiştir.

3.5. Sıçan Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücre (rBMSC) Eldesi ve Hücrelerle Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri, "Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM)"'nden temin edilmiştir. Hücreler, *Rattus norvegicus* türüne ait bir sıçandan kemik iliği aspirasyonu yöntemiyle izole edilmiştir.

Karakterizasyon çalışmaları kapsamında hücre morfolojileri görüntülenmiş, hücre üreme kinetiğinin belirlenmesi için hemositometrik sayım yapılarak hücrelerin özgül üreme hızı ve ikilenme süreleri hesaplanmıştır. Bunların yanısıra, mezenkimal kök hücreler kondrojenik farklılaşma davranışları bakımından incelenmiştir.

3.5.1. Hücre morfolojilerinin gözlemlenmesi

Hücrelerin gözlemlenmesi için iki tür boyama tekniği kullanılmıştır. Bunlardan biri “kristal viyole” ile hücre boyaması olup, bu boyamada hücreler optik mikroskop ile görüntülenmiştir. Diğer boyama ise floresan ışığa veren “Alexa fluor 488 phalloidin ve propidium iyodür” (Sigma, Almanya) ile yapılmış ve hücreler floresan mikroskopta (Olympus, ABD) incelenmiştir. Boyama işlemleri yapıldıktan sonra hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

Hücreler kristal viyole ile boyanırken, öncelikle üzerlerindeki ortam uzaklaştırılarak fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH: 7,4) ile iki kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hücreler, 250 µL aseton-metanol çözeltisi ile muamele edilerek 4°C’ de 20 dk fiksasyon edilmiştir. Fiksasyondan sonra, hücreler üzerine yaklaşık 500 µL kristal viyole çözeltisi [%20’lik (v/v) PBS/metanol çözeltisi kullanılarak hazırlanmış %0.5’lik (w/v)] damlatıldıktan sonra 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra, fazla boyanın ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla hücreler distile su ile yıkanmış ve optik mikroskopta fotoğrafları çekilmiştir (Serrano et al., 2004).

Hücrelerin floresan boya ile boyanması işleminde öncelikle, hücreler üzerindeki üreme ortamı uzaklaştırılıp daha sonra hücreler PBS tamponu ile yıkanmıştır. Ardından üzerlerine oda sıcaklığında %2,5 (v/v) glutaraldehit eklenerek hücrelerin 10 dk fiksasyonu sağlanmıştır. Daha sonra PBS ile 3 defa yıkama işlemi gerçekleştirilip hücre membranlarının geçirgenliğini arttırmak için malzemeler % 0.1’lik Triton X-100 çözeltisinde 5 dk bekletilmiştir. Sonrasında, Triton X-100 çözeltisi uzaklaştırılıp PBS ile 3 defa yıkama yapılmıştır. Hücre iskeletinin yeşile boyanması için, örnekler üzerine 400 µL Alexa Fluor 488 Phalloidin çözeltisi eklenmiş ve örnekler 20 dk karanlıkta inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda Alexa Fluor 488 Phalloidin çözeltisi uzaklaştırılarak, PBS ile üç defa yıkama yapılmıştır. Son olarak, çekirdeklerin kırmızıya boyanması için ortama 500 µL propidium iyodür çözeltisi (10 mg/mL’lik propidium iyodür stok çözeltisi ve PBS ile %0,1 derişiminde) eklenmiş ve örnekler karanlıkta 5 dk inkübe edilmiştir. Ortamdan propidium iyodür çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra örnekler PBS ile 3 defa daha yıkanarak, floresan mikroskopta görüntüleme yapılmıştır (Evangelista et al., 2007).

3.5.2. Hücre üremesine ait özgül üreme hızı ve hücre ikilenme süresinin hesaplanması

Hücreler tripan-mavisi metodu ile Neubauer hemositometresikullanılarak sayılmıştır. Hücrelerin 14 günlük inkübasyonu boyunca hemositometrik sayımları sonucunda, üstel üreme fazındaki hücrelerin özgül üreme hızı Eşitlik 4.1'den, ikilenme süresi ise Eşitlik 4.2'den hesaplanmıştır.

3.5.3. Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşma davranışlarının incelenmesi

Durgun ortamda tek tabakalı kültürlerde, mezenkimal kök hücrelerkondrojenik farklılaşmadavranışları bakımından değerlendirilmek üzere, Safranin O ile boyama yapılarak 21 günlük inkübasyon süresince gözlemlenmiştir.

3.5.3.1. Hücre kültür koşulları

Hücrelerin çoğaltılması için %90 Dulbecco's Modified Eagles' Medium F12 (DMEM-F12), %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin içeren büyüme ortamı hazırlanmıştır. Hücreler büyüme ortamı içeren flasklarda (NuncTM, Almanya) kültüre edilmiştir (Sigma, Almanya). Hücreler, flasklarda “doymunluk tabakası (confluent layer)” oluşturduklarında, % 0,25 tripsin-EDTA (Sigma, Almanya) ile yüzeyden kaldırılmıştır. FBS içeren DMEM-F12'nin eklenmesi ile tripsin inhibe edilmiş ve elde edilen hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Bu işlem sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve taze besi ortamı ile tekrar süspanse edilen hücreler, hemositometrik sayım sonrasında, hücre yoğunluğu 5×10^4 mL⁻¹/gözü olacak şekilde, 24 gözlü hücre kültür kaplarına (TCPS) ekilmiştir.

Kondrojenik farklılaşma ortamı, %90 DMEM-F12, %10 FBS, %1 streptomisin-penisilin, % 1 ITS⁺(10 mg/mL insulin, 5,5 mg/mL transferin, 5 ng/mL selenyum, 0,5 mg/mL sıgır serum albumin, 4,7 mg/mL linoleik asit; Sigma), 0,1 mM askorbik asit 2-fosfat, 10^{-7} mM deksametazon, 10 ng/mL TGF- β 1 eklenerek hazırlanmıştır.

Deney grubundaki hücreler üzerine 1 mL farklılaşma ortamı, kontrol grubundaki hücrelere ise 1 mL büyüme ortamı eklendikten sonra hücreler 37°C sıcaklığa, %95 neme ve %5 CO₂'ye sahip inkübatörde (Heraus Instruments, Almanya) kültüre edilmiştir. Inkübatördeki nemli hava sayesinde, kültür ortamının buharlaşma kaybı engellenmektedir. CO₂ ise kültür kabında bulunan bikarbonat sistemini dengede tutarak bir tampon görevi görmektedir.

Kültür ortamları, üç günde bir, ½ oranında taze ortamlarla değiştirilmiştir. Böylece hücreler tarafından üretilen büyüme faktörleri ortamdan tamamen uzaklaştırılmamıştır. Steril ortam gerektiren tüm işlemler laminar akış kabini (Bioair, Type II Laminer Akış Kabini, İtalya) yürütülmüştür.

3.5.3.2. Hücrelerin Safranin O ile boyanması

Hücreler kültürün 7, 14, 21 ve 28. günlerinde kondrojenik farklılaşmanın gözlenmesi amacıyla "safranin O" ile boyanmışlardır. Safranin O, kıkırdak dokusunun ekstrasellüler matrisi yapısında bulunan proteoglikanları ve glikozaminoglikanları boyar. Katyonik bir boya olduğu için nükleik asitlere de bağlanır. Boyama sonucunda sitoplazma grimsi yeşil, çekirdek siyah ve kıkırdak yapısı kırmızı renge boyanır. Hücreler bu teknikle boyanırken, önce hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış sonra hücreler PBS ile hazırlanmış % 0,1 glutraldehit çözeltisi ile 20 dk oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra hücreler önce PBS ile 3 defa yıkanıp sonra üzerlerine % 1 asetik asit eklenerek 10 sn bekletilmiştir. Asetik asit çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra % 0,1'lik safranin O çözeltisi ile hücreler 5 dk muamele edilerek boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak, PBS çözeltisi ile 2 kez yıkama yapıldıktan sonra hücreler optik mikroskopta gözlemlenmiştir.

3.6. Kitosan Doku İskelesi Üretimi ve Karakterizasyonu

Bu çalışmada kullanılan doku iskeleleri, Tıgılı ve grubunca belirlenen sentez koşullarında, dondurarak-kurutma (freeze-drying) tekniği ile üretilmiştir (Tıgılı et al., 2007). Çalışmada deasetilasyon derecesi (DD) %85'ten büyük kitosan (Sigma,

Almanya) kullanılmıştır. Kitosan, 0,2 molarlık seyreltik asetik asit içerisinde çözülerek % 2 (w/v) bileşime sahip kitosan jel karışımları elde edilmiştir. Elde edilen kitosan jel karışımları, safsızlıkların giderilmesi için filtre edildikten sonra 24 gözlü Petri kaplarına (TPP, İsviçre) dökülerek -20°C’de dondurulmuştur. Donmuş kitosan çözeltisi, 4 gün boyunca liyolifize edilmiş (Christ, Almanya) böylece gözenekli yapıda ve içsel bağlantıları olan kitosan doku iskeleleri elde edilmiştir. İskelelerin karakterizasyonuna yönelik çalışmalar daha önce grubumuzca yapılmıştır (Tıǧlı et al., 2007).

İskeleler hücre kültür çalışmalarında kullanılmak üzere Petri kaplarından çıkarılıp kesilerek, 5mm çapında ve 1mm kalınlığında, 96 gözlü kültür kaplarına uygun boyutlarda hazırlanmıştır. Kitosan sıcaklığa dayanıklı bir polimer olduğu için kitosan doku iskeleleri hazırlandıktan sonra 121°C’da 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.7. Plazmidin Sıçan Kemik İliğı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelere Aktarılması

Saf halde elde edilen pShuttle-BMP6 plazmidi iki farklı gen aktarım sistemi kullanılarak hücrelere aktarılmıştır. Bunlardan biri, katyonik bir lipozom olan “Lipofectamine 2000”dir. Diğer aktarım sistemi olarak plazmid emdirilmiş kitosan doku iskelesi kullanılmıştır.

3.7.1. Lipofektamin aracılığıyla gerçekleştirilen transfeksiyon

Transfekte edilecek hücreler gereken sayıda çoğaltıldıktan sonra, dördüncü pasajdaki hücreler 24 gözlü TCPS’ye, her bir gözde 2×10^5 hücre/mL olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler üzerine %90 DMEM F12, %10 serum içeren antibiyotiksiz büyüme ortamı konulmuştur. Ertesi gün %90-95 konfluent olan hücreler, katyonik lipid bazlı transfeksiyon ajanı olan Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, ABD) ile üretici firmanın önerdiği protokole göre transfekte edilmiştir. Her bir gözdeki hücreler için 0.8 µg plazmid DNA, 50 µL Opti-MEM besi ortamı (Invitrogen, ABD) ; 2 µL Lipofectamine 2000, 50 µL Opti-MEM besi ortamı içeren iki tüp reaksiyon karışımı hazırlanıp karışımlar 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra seyreltilmiş DNA içeren tüp içeriğı Lipofectamine 2000 içeren tüp ile karıştırılıp oda

ısısında 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında her bir kuyucuğa 100 µL reaksiyon karışımından eklenerek kültürler 37°C'daki % 5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Dört saat sonra hücreler üzerindeki karışım uzaklaştırılıp üzerlerine serumsuz besi ortamı (DMEM F12) eklenerek, hücreler tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Onsekiz saat sonra kültür ortamı 1:20 oranında taze besi ortamı ile değiştirilmiştir.

Transfeksiyonun etkinliği ve BMP6 geninin mezenkimal kök hücrelerde ifade olup olmadığı ELISA testiyle belirlenmiştir. Bunun için kültür ortamı değiştirilmeden önce, hücreler üzerindeki süpernatant toplanmış ve test yapılana kadar örnekler -80°C'de dondurularak saklanmıştır. Ertesi gün hücreler üzerindeki besi ortamı tamamen uzaklaştırılmış ve hücreler üzerine 100 µg/mL kanamisin içeren büyüme ortamı ile hazırlanmış seçici besi ortamı eklenmiştir. Hücreler seçici besi ortamında 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmış ve doku iskeleleriyle yürütülecek çalışmalardan hemen önce tripsinize edilerek kültüre hazır hale getirilmiştir.

3.7.2. Plazmidin kitosan doku iskelelerine emdirilmesi

pShuttle-rBMP6 plazmidi fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH: 7,4) ile sulandırılarak plazmid çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti 0,46 µm gözenek çapına sahip filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Plazmid çözeltisi, 96 gözlü hücre kültür kaplarındaki 5mm çaplı 1 mm kalınlığındaki steril doku iskelelerine, her bir iskelede 50 ng plazmid DNA olacak şekilde mikropipetle damlatılmıştır. Kültür kabı Parafilm ile sıkıca kapatıldıktan sonra, DNA'nın doku iskeleleriyle birleşmesi için iskeleler +4°C'de bir gece bekletilmiştir.

3.8.Kitosan Doku İskeleleriyle Yürütülen Hücre Kültürü Çalışmaları

Bu bölümde üç boyutluk kitosan doku iskeleleriyle, durgun ortamda yürütülen hücre kültür çalışmalarından söz edilecektir. Bu çalışmaların yürütülmesindeki temel amaç, BMP6 biyosinyal molekülünün gen terapi yöntemiyle hücrelere aktarılmasının *in vitro* kondrogenezi uyarması üzerindeki etkisinin incelenmesidir.

3.8.1. Hücre kültür koşulları ve örnek gruplarının hazırlanması

Hücrelerin kıkırdak dokusuna farklılaşmalarını uyaracak olan kondrojenik farklılaşma ortamı, %90 DMEM-F12, %10 FBS, %1 streptomisin-penisilin, % 1 ITS⁺, 0,1 mM askorbik asit 2-fosfat, 10^{-7} mM deksametazon eklenerek hazırlanmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak doku iskelelerinin üretilmesi, hazırlanması ve sterilizasyonu Bölüm 3.6'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Doku iskeleleri, 96 gözlü kültür kaplarına yerleştirildikten sonra 15 dk UV'ye maruz bırakılarak bir kez daha steril edilmiştir.

Çalışmalar 4 grup örnekle yürütülmüştür. Tüm gruptaki hücreler, her bir iskelede 5×10^4 /mL hücre olacak şekilde kitosan doku iskelelerine ekilmişlerdir. Birinci gruptaki kitosan doku iskelelerine yalnızca hücre ekilmiş, 2. grupta kitosan doku iskelesinde hücreler kültüre edilirlerken, farklılaşma ortamlarına iskele başına 20 ng olacak şekilde rekombinant BMP6 proteini (Cat. No: 507-BP, R&D Systems, ABD) eklenmiştir. Üçüncü gruptaki doku iskelelerine pShuttle-rBMP6 plazmidıyla modifiye edilmiş hücreler ekilmiştir. Dördüncü gruptaki örnekler ise, pShuttle-rBMP6 emdirilmiş kitosan doku iskelelerine mezenkimal kök hücreler ekilerek hazırlanmıştır. Hücreler kitosan doku iskelelerine ekildikten sonra her bir kuyucuğa 250 µL kondrojenik farklılaşma ortamı eklenmiş ve örnekler 37°C sıcaklığa, %95 neme ve %5 CO₂'ye sahip inkübatörde 21 gün süreyle durgun koşullarda kültüre edilmiştir. Besi ortamları 3 günde bir değiştirilmiştir.

3.8.2. Doku iskeleleriyle yürütülen hücre kültür çalışmaları kapsamında yapılan analizler ve gözlemler

Hücre kültür çalışmaları kapsamında yapılan analizler ve gözlemlerin (DNA salım çalışmaları, MTT analizi, ELISA testi, SEM analizi, RT-PCR analizi ve biyokimyasal analiz) uygulanış metodları hakkında bilgi verilmektedir.

3.8.2.1. DNA salım çalışmaları

Kitosan doku iskelesinin zamana karşı plazmid DNA salım profilinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla, kültürün 3, 5, 7, 9, 11, 14 ve 21. günlerinde, pShuttle-rBMP6 emdirilmiş doku iskelelerinin üzerinden bir miktar kültür ortamı bir tüpe alınarak analize kadar -80°C'de saklanmıştır. Alınan örneklerin, 260 nm dalga boyunda Nanodrop ND-1000 cihazıyla spektrofotometrik ölçümü yapılarak örneklerdeki kantitatif miktarlar elde edilmiş, bu verilerden belirtilen günlerde iskelelerden salınan plazmid DNA miktarı hesaplanmıştır.

3.8.2.2. Hücre üremesi ve mitokondriyal aktivite analizi (MTT yöntemi)

Kitosan doku iskelelerindeki mezenkimal kök hücrelerin durgun koşullar için mitokondriyal aktivite analizleri, kültürasyon süresince farklı zamanlarda (3, 5, 7, 9 ve 11. günlerde) yapılmıştır. Bu analizde 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) bileşiği kullanılmaktadır. Canlı hücrelerin mitokondirisi, bu bileşiği indirgeyerek formazan kristallerine dönüştürmektedir. Oluşan bu kristaller izopropil alkol ile çözündüğünde, ortaya çıkan mor renkli çözeltinin absorbands değeri, üremesini devam ettiren canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır.

MTT analizi için öncelikle doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmıştır. Daha sonra her bir göze 150µL serumsuz besi ortamı ve 15µL MTT çözeltisi (2,5 mg/mL PBS) eklenmiş ve hücreler 37°C'deki etüvde 3 sa boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinden sonra, doku iskeleleri üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve iskeleler başka bir 24 gözlü kültür kabına aktarılmıştır. Her bir göze 400 µL, 0,04 M HCL içeren izopropil alkol eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Optik yoğunluk, elde edilen çözeltiye 200 µL alınarak, 690 nm referans olmak üzere 540 nm'de mikropate okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Gerlier and Thomasset, 1986).

3.8.2.3. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile analiz

Mezenkimal kök hücrelerin doku iskeleleri üzerindeki morfolojileri, yapışma ve yayılma eğilimlerinin saptanması, hücrelerin morfolojik farklılaşmalarının değerlendirilmesi için, farklı haftalarda (1,2 ve 3.hafta) alınan örnekler, taramalı elektron mikroskop (SEM)(Zeiss Evo 50, Almanya) ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

SEM analizi için, doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, iskeleler ikişer kez PBS (pH: 7,4) ile yıkanmıştır. Daha sonra 1 mL %2,5'luk (v/v) gluteraldehit çözeltisi ile karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dk boyunca fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve örnekler analize kadar PBS içinde 4°C'de muhafaza edilmiştir.

SEM analizinden önce iskeleler üzerindeki PBS uzaklaştırılarak, iskeleler seri halde sulandırılmış etanol çözeltilerinde dehidrasyon işlemine tabi tutulmuştur. İskeleler sırasıyla, %30, %50, %70, %90 ve %100' lük (v/v) etanol çözeltilerinin her birinde 5'er dk bekletildikten sonra hekzametildisilazan (HMDS) içerisinde 5 dk daha bekletilmiştir. Sonrasında oda sıcaklığında kurutulan örnekler, altın-paladyum ile kaplanarak görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.8.2.4. ELISA (enzyme-linked immunoabsorbance assay) testi

Kültürün 3, 5, 7, 9, 11,14 ve 21. günlerinde, modifiye edilen hücrelerde BMP6 geninin ifadesinin saptanması ve hücreler tarafından üretilip kültür ortamına salınan BMP6 proteininin kantitatif olarak hesaplanması için, üretici firmadan sağlanan kitle (Cat # E90646Ra Uscn Life Science Inc.), firmanın önerdiği protokol uygulanarak ELISA testi yapılmıştır. Bu amaçla, BMP6 geninin aktarıldığı 3. ve 4. grup örnekler üzerindeki kültür ortamı, analizden bir gün önce serumsuz besi ortamı ile değiştirilmiştir. Ertesi gün örnekler üzerinden alınan süpernatant test edilmek üzere toplanmış ve örnekler analize kadar -80°C'de dondurularak saklanmıştır.

Test yapılmadan önce kit içinden çıkan standartlar oda sıcaklığına getirilmiştir. Sonrasında örnekler ve standartlar, BMP6'ya özgü biyotinle konjuge olmuş

poliklonal antikorlarla kaplı 96 gözlü kültür kaplarının gözlerine eklenmiştir. Ardından her bir göze, HRP (Horseradish Peroxidase) ile konjuge olmuş avidin eklenerek 37°C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra her bir göze TMB substratı eklendikten sonra; BMP6, biotinle konjuge olmuş antikor ve enzimle konjuge olmuş Avidin içeren gözlerde renk değişimi görülmüştür. Enzim-substrat reaksiyonu sülfirik asit çözeltisiyle durdurulmuş ve renk değişimi 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Standartlar için ölçülen optik yoğunluk değerleri kullanılarak Ek-1'de verilen kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Örneklerdeki BMP6 miktarı, ölçülen optik yoğunluklar ve oluşturulan standart eğri kullanılarak hesaplanmıştır.

3.8.2.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi

Kültürün 14. ve 21. günlerinde doku iskeleleri üzerinde üreyen mezenkimal kök hücrelerin; agregan, kollajen II ve BMP6 genlerinin ifade seviyeleri, Gen-TR firması tarafından yapılan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile belirlenmiştir.

Analizden önce, doku iskeleleri RNAaz içermeyen Ependorf tüplere alınarak, her birinin üzerine 250 µL trizol eklendikten sonra, örnekler 800 rpm'de 25-30 sn vortekslenmiş ve örnekler analiz edilene kadar -80°C'de dondurularak saklanmıştır. Hücrelerden toplam RNA izolasyonu için trizol içerisindeki örnekler homojenize edildikten sonra üzerlerine 100 µL kloroform eklenmiş ve oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edilmişlerdir. Sonrasında, örnekler 4°C'de 15 dk 12.000 xg'de santrifüjlenmiş ve süpernatant yeni bir RNAaz içermeyen Ependorf tüpe aktarılmıştır. Süpernatant üzerine 0,375 mL etanol ve 1 µL glikojen eklendikten sonra örnekler -20°C'de 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında, örnekler 4°C'de 10 dk boyunca 12.000 x g'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatant atılmış ve pellet %75'lik etanol ile yıkanmış ve hafifçe vortekslenmiştir. Örnekler 4°C'de 5 dk boyunca 7.500 xg'de santrifüjlendikten sonra süpernatant atılmış ve pelletler kurutulmuştur. Her bir pelletin üzerine 20 µL RNAaz içermeyen su eklenmiş ve örnekler -80°C'de bir sonraki aşama için saklanmıştır.

cDNA sentezi için öncelikle iki reaksiyon ortamı hazırlanmıştır. 1 µg RNA, 1 µL primer ve 9 µL RNAaz içermeyen distile su eklenerek oluşturulan birinci reaksiyon

ortamı 65°C’de 5 dk inkübe edilmiştir. Bu ortam buzda 5 dk bekletildikten sonra 5 µL 5X tampon, 1 µL deoksinükleotid trifosfat (dNTP), 1 µL Rnasein, 1 µL reverstranskriptaz enzimi ve 1 µL ditiotreitol (DTT) eklenerek oluşturulan ikinci reaksiyon ortamı ile birleştirilmiştir. Toplam 20 µL’lik reaksiyon, 25°C’de 10 dk, 42°C’de 50 dk ve 70°C’de 15 dk inkübe edilerek cDNA sentezi tamamlanmıştır. Sonrasında, her bir gen için cDNA örneklerinden 1, 1/10, 1/100 ve 1/1000 olacak şekilde standart eğri hazırlamak için seri dilisyonlar hazırlanmıştır. Ardından, örnekler RT-PCR cihazında (Corbet 6000) 94°C’de 2 dk ön denatürasyon, 94°C’de 5 s denatürasyon, 55°C’de 10 s primer bağlanması ve 72°C’de 20 s uzama koşullarında, toplam 40 döngü amplifikasyondan sonra gen ifadesinin kantifikasyonu için analiz edilmişlerdir. “Housekeeping gen” olarak kullanılan GAPDH, kollajen II, agregan ve BMP6 genleri için tasarlanmış primer dizileri Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.4.RT-PCR analizi için tasarlanmış primer dizileri, gen bankası erişim numaraları.

rAcan (NM_022190)	
rAcanF	5’-GGATGCCTTGGACACTTTCAC-3’
rAcanR	5’-CTCCTCACATTGCTCCTGGT-3’

rCol2A1 (NM_012929)	
rCol2A1F	5’-TTCTGGAGATCAGGGTACTTCT-3’
rCol2A1R	5’-GATTCCATTAGAGCCATCTTTGC-3’

rGapdh (NM_017008)	
rGapdhF	5’-AGTGCCAGCCTCGTCTCATAG-3’
rGapdhR	5’-TGACTGTGCCGTTGAACTTGC-3’

rBmp6 (NM_013107)	
rBmp6F	5’-AGTGCTTCAGACTACAACAG-3’
rBmp6R	5’-GGATTCATAAGGTGGACCAA-3’

3.8.2.6. Doku iskelelerinin biyokimyasal analizi

Kültürün 14. ve 21. günlerindeki dört grup hücre-doku iskelesinin, biyokimyasal içeriğinin belirlenmesi amacıyla, doku iskeleleri (her grup için n=2) öncelikle liyofilize edilmiştir. Sonrasında iskelelerin enzimatik olarak parçalanmasını sağlayacak pepsin çözeltisi hazırlanmıştır. Çözelti, 0,5 M'lık asetik asit içerisinde çözölmüş olan 3 mg/mL pepsin (Sigma, Almanya) ile hazırlanmıştır. İskelelerin kuru ağırlıkları ölçöldükten sonra her bir iskeleye 1 mL pepsin çözeltisi eklenerek, iskelelerin 45°C sıcaklıkta 18 sa boyunca enzimatik olarak parçalanması sağlanmıştır. İskeleler parçalandıktan sonra glikozaminoglikan (GAG) içeriğı, dimetilen mavisi (Sigma, Almanya) standart olarak sığır kondroitin sülfatı (Bkz. Ek 2) (Sigma, Almanya) kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Hashem et al., 2006).

İskele başına düşen DNA içeriğinin hesaplanması için öncelikle, enzimatik olarak parçalanmış iskeleler Hoechst 33258 boya (Sigma, Almanya) ile boyanarak floresan spektrofotometre ile ölçüm yapılmıştır. Elde edilen yoğunluk değeri, 1 µg sığır timus DNA'sı için ölçölen yoğunluk değeri kullanılarak, kütle cinsinden hesaplanmıştır (Kim et al., 1988). Ayrıca kuru iskelelerin bir gramındaki GAG miktarı mevcut veriler kullanılarak hesaplanmıştır.

3.8.2.7. İstatistiksel analiz

Çalışma sonuçları GraphPad Instant yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak değeriendirilmiştir. Üç ve daha fazla sayıdaki farklı deney gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) kullanılmıştır. İstatistiksel değeriendirmede en düşük $p < 0,05$ olduğı durum, istatistiksel olarak önemli fark olarak kabul edilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞILMASI

Tez kapsamında yapılan çalışmaların sonuçları 4 başlık altında sunulmuş ve gerekli tartışmalar yapılmıştır. İlk bölümde çalışmada kullanılan doku iskelesi, hücre ve biyosinyal molekülü seçimi ile ilgili bilgi verilmiştir. İkinci bölümde mezenkimal kök hücrelere BMP6 geni aktarımında kullanılmak üzere oluşturulan plazmidin gen haritası ve plazmidin doğrulanmasına yönelik olarak yapılan dizi analizinin sonuçları sunulmuştur. Üçüncü bölümde, plazmidin aktarılması için kullanılan gen aktarım sistemlerinin seçiminden söz edilmiş ve bu sistemlerle gerçekleştirilen gen aktarım çalışmalarının sonuçları sunularak sistemler aktarım verimlilikleri açısından değerlendirilmiştir. Son bölümde ise mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon çalışmalarına ait sonuçlar verildikten sonra kitosan doku iskeleleriyle durgun koşullarda yapılan hücre kültür çalışmalarının bulgularına yer verilmiş ve tüm bulgular literatürle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

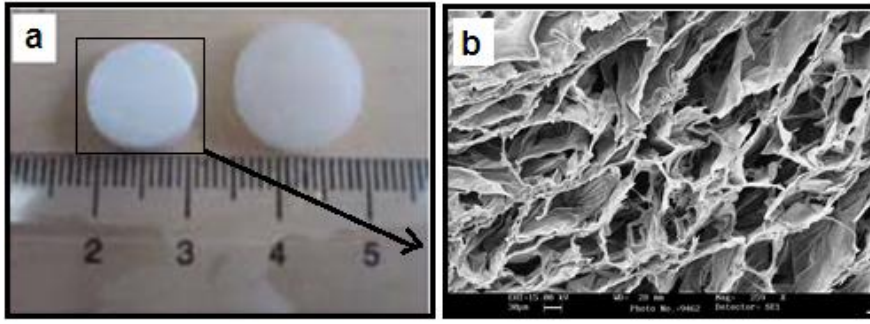
4.1. Kıkırdak Doku Üretimi İçin Doku İskelesi, Hücre ve Biyosinyal Molekülü (gen) Seçimi

Tez kapsamında yapılan çalışmada; kıkırdak doku üretimi için kıkırdak doku mühendisliği yaklaşımı kullanılmış, ancak biyosinyal moleküller sisteme geleneksel yöntemlerle verilmemiş, gen terapi yöntemi kullanılarak; hücrelerin biyosinyal moleküllerini sentezlemesi hedeflenmiştir. Çünkü yapılan bazı çalışmalarda, rekombinant proteinlerin yarılanma ömürlerinin kısa olması nedeniyle hücreler üzerinde yeterli uyarıcı etkiyi sağlayamadığı gösterilmiştir. Biyosinyal moleküllerin aktarılması için geliştirilen kontrollü salım sistemlerinde ise dozaj ayarlaması ve salımının kontrolü teknik olarak oldukça güçtür. Sunulan çalışmada gen aktarım sistemleri geliştirilerek, biyosinyal moleküllerin hücreler tarafından sentezlenmesi, kontrollü ve uzun süreli olarak doku mikroçevresine salınması sağlanmıştır.

4.1.1. Doku iskelesi fabrikasyonunda kullanılacak biyomalzemenin ve uygun üretim koşullarının seçimi

Doku mühendisliği uygulamalarında kitosanın doku destek malzemesi olarak seçilmesinde biyolojik, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin kolaylıkla kontrol edilebilmesi, biyouyumluluğu, antibakteriyal ve hidrofilik özellikleri ile enzimatik olarak parçalanabilmesi gibi parametreler en önemli nedenlerdir (Khor and Lim, 2003). Belirtilen bu özellikler göz önüne alındığında, sunulan bu çalışmada kıkırdak doku mühendisliği için uygun biyomalzeme olarak kitosan seçilmiştir.

Kitosandan doku iskelesi üretiminde daha önce grubumuzca gerçekleştirilmiş çalışmanın sonuçları kullanılmıştır (Tıgılı et al., 2007). Bu amaçla deasetilasyon derecesi (DD) % 85'den büyük olan kitosan kullanılarak % 2 (w/v) bileşime sahip olan kitosan-asetik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Dondurarak-kurutma işlemi sonrasında, bu parametrelerle hazırlanan kitosan doku iskelelerinin daha fazla içsel bağlantılara, daha büyük gözenek boyutuna (100µ civarı) ve uygun biyobozunurluk hızına sahip olduğu gösterilmiştir. Doku mühendisliği alanında kullanılan doku iskelelerinin içsel bağlantılı (interconnected) gözeneklere sahip olmasının, hücrelerin yayılması ve besin maddelerinin taşınımı açısından oldukça önemli olduğu bilinmektedir (Freyman et al., 2001; Arpornmaeklong et al., 2007). Ayrıca doku iskelelerinde gözeneklerin çok küçük olması durumunda, gözeneklerin hücreler tarafından tıkandığı; bunun da hücre penetrasyonunu ve ECM oluşumunu engellediği bilinmektedir (Salgado et al., 2004). Kitosan doku iskelelerinin kuru ve yaş haldeki görüntüleri ile kuru halinin SEM görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir. Çizelge 4.1'de aynı doku iskelelerinin genel özellikleri verilmiştir.



Şekil 4.1. Çalışma kapsamında hazırlanan doku iskelelerinin genel görüntüsü: (a) Kuru halde (sol tarafta), ıslak halde (sağ tarafta), (b) Dondurarak-kurutma tekniği ile üretilen kitosan doku iskelelerinin SEM görüntüsü (x250).

Çizelge 4.1. Çalışma kapsamında hazırlanan kitosan doku iskelelerinin temel özellikleri.

Doku iskelesi	Değerler
Gözenek boyut aralığı	30-150 μm
Ortalama gözenek çapı	100 μm
Gözeneklilik değeri (%)	$\%81,8 \pm 1,7$
Denge şişme oranı* (absorblanan su/kuru ağırlık)	$36,7 \pm 0,2$
Elastik modül (N/mm^2)*	$0,00917 \pm 0,0001$

*İstatiksel olarak % 95 güvenirlik seviyesi.

4.1.2. Kondrojenezi uyarmak için hücre tipinin seçimi

Kıkırdak doku mühendisliğinde otolog kondrositlerin kullanımını sınırlayıcı bazı faktörler bulunmaktadır. Donör ileri bir yaştaysa, alınan hücreler senesense (yaşlanma) uğramış olabilir. Ayrıca kondrositlerin eklem kıkırdağından izolasyonu hasta için ağrılı olabilir ve hücrelerin alındığı bölgede hasar kalabilir (Gelse and Schneider, 2006). Mezenkimal kök hücreler (MSC) ise kondrositlere nazaran elde edilmesi daha kolay olan hücreler olup kemik, kemik iliği, kas ve adipoz (yağ)

dokulardan türetilmektedirler. Kondrositlerin aksine farklılaşma potansiyellerini ancak çoklu pasajlardan sonra kaybedebilirler (Nesic et al., 2006). Kemik iliği ve adipoz dokulardan elde edilen MSC'ler *in vitro* ve *in vivo* kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmış ve çarpıcı sonuçlar elde edilmiştir (Wakitani et al.1994; Im 2005; Wang et al.2005; Jin et al.2007; Kisiday et al.2008). Mezenkimal kök hücreler çoklu üreme potansiyellerinden dolayı tercih edilmektedir. Fakat elde edilen hücrelerin sayıca az olması nedeniyle, hedef hücre sayısına ulaşılabilmesi için gerekli büyüme faktörleri varlığında *in vitro* çoğaltma basamaklarına ihtiyaç duyulmaktadır (Salgado et al., 2004). MSC'lerin farklılaşmasını uyaran birçok sinyal tespit edilmiştir. FGF'in mezenkimal kök hücrelerin bölünme hızını ve hayatta kalma süresini arttırdığı gözlenmiştir. BMP-2, MSC'leri kondrogenez için uyarırken TGF- β , kollajen II sentezini artırır. Ayrıca IGF'in de kondrogenezde rol aldığı bilinmektedir. Ayrıca BMP6'nın birçok çalışmada MSC'lerin kondrogenezini desteklediği gösterilmiştir (Hennig et al., 2007; Indrawattana et al., 2004; Estes et al., 2006). MSC'lerin kıkırdak dokusuna farklılaşabilmeleri, farklılaştıktan sonra fenotipik özelliklerini koruyabilmeleri ve izolasyonlarının kolay olması nedeniyle bu çalışma kapsamında sıçan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır.

4.1.3. Kondrogenezi uyuracak biyosinyal molekülün (genin) seçimi

Hücre biyolojisi ve moleküler biyolojideki araştırmalar sonucunda, hücre farklılaşmasının; çeşitli büyüme ve farklılaşma faktörleri, sitokinler ve transkripsiyon faktörlerinden oluşan bir grup biyosinyal molekülü aracılığıyla kontrol edildiği anlaşılmıştır. Bu moleküller yalnızca hücre farklılaşmasını değil aynı zamanda gen ifadesi düzenlenişini de etkilemektedirler. Ayrıca hücrelerin metabolik aktivitesine etki ederek anabolik ve katabolik süreçlerin dengelenmesinde merkezi bir rol oynarlar.

Embriyonik ekstremité tomurcuğunda gelişimsel süreç şu şekilde işler: farklılaşmamış mezenkimal kök hücreler önce bir araya gelir, sonra bu hücreler kondrojenik farklılaşmaya uğrar ve bu yapı üzerinden eklemler ve kemikler gelişir.

Gelişimin farklı aşamalarında kemik morfojenetik protein 2 ve 7 (BMP-2/-7), transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) ve kıkırdaktan türevli morfojenetik protein-1 (CDMP-1/GDF-5) embriyonik ekstremite tomurcuğunda, fetal büyüme plağında ve epifizyal kıkırdakta ve gelişmekte olan uzuvların eklem aralarında bulunur. Embriyonik iskelet oluşumundaki kondrogenez süreci, hasar görmüş yetişkin kıkırdağında da yenilenir. Ancak yetişkin kıkırdağının yenilenmesi morfojenetik faktörler ve sinyal moleküllerinin eksikliği nedeniyle tam olarak gerçekleşemez (Gelse and Schneider, 2006). Bu eksikliği gidermek amacıyla, kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında hücrelerin bu ajanlar tarafından uyarılması sağlanmaktadır. Büyüme faktörleri ve sinyal molekülleri hücre kültür ortamında destekleyici olarak kullanılabileceği gibi çeşitli yöntemlerle doku iskelelerine immobilize edilebilir ve/veya yüklenebilirler (Holland and Mikos, 2003). Diğer bir yöntem olarak bu molekülleri sentezleyen genler hücrelere aktararak bu faktörlerin hedef bölgelerde sürekli sentezi sağlanabilir. Bu yöntemle, büyüme faktörleri ve sinyal moleküllerinin lokal ve sürekli olarak salgılanarak, kıkırdak onarımını gerçekleştirmesi amaçlanır.

BMP-2, BMP-7, TGF- β , CDMP-1 ve CDMP-2 faktörlerinin, *in vitro*'da mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını uyardığı bilinmektedir. Ayrıca bu faktörlerin farklı mezenkimal dokulara enjeksiyonu da *in vivo* kıkırdak oluşumu uyarılmıştır. Bu çalışma kapsamında kullanılan ve TGF- β süper ailesinin bir alt grubu olan BMP6'nın (*bone morphogenetic protein 6*) ise hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını indüklediği ve kondrogenezde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Gelse and Schneider, 2006). Kameda ve arkadaşları, kondrositlerle pellet kültürlerinde yaptıkları bir çalışmada, BMP6'nın kondrogenezi desteklediğini bildirmişlerdir (Kameda et al., 2000). Pellet kültürlerinde yapılan bir diğer çalışmada, BMP6 varlığında insan kökenli mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmalarının geliştirildiği saptanmıştır (Sekiya et al., 2001). Ek olarak daha birçok çalışmada, mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmalarını sağlamak için BMP6'nın gerekliliği savunulmuştur (Hennig et al., 2007; Indrawattana et al., 2004; Estes et al., 2006). Kıkırdak doku oluşumunda, BMP6'nın üç boyutlu doku iskeleleriyle kombinasyonu ise, ilk kez Tıgılı ve

Gümüşderelioğlu (2009) tarafından yürütölen bir çalışmada incelenmiştir. Bu alışmada, BMP6 biyosinyal molekülu yüklenmiş kitosan doku iskelelerine, fare kökenli ATDC5 kondrojenik hücreleri ekilmiş, hücrelerin durgun ve dinamik koşullardaki kondrojenezine bakılmıştır. Hücrelerin dinamik koşullarda hipertrofik morfolojiden yoksun bir şekilde kondrojenik fenotiplerini korudukları sonucuna varılmıştır (Tığlı and Gümüşderelioğlu, 2009).

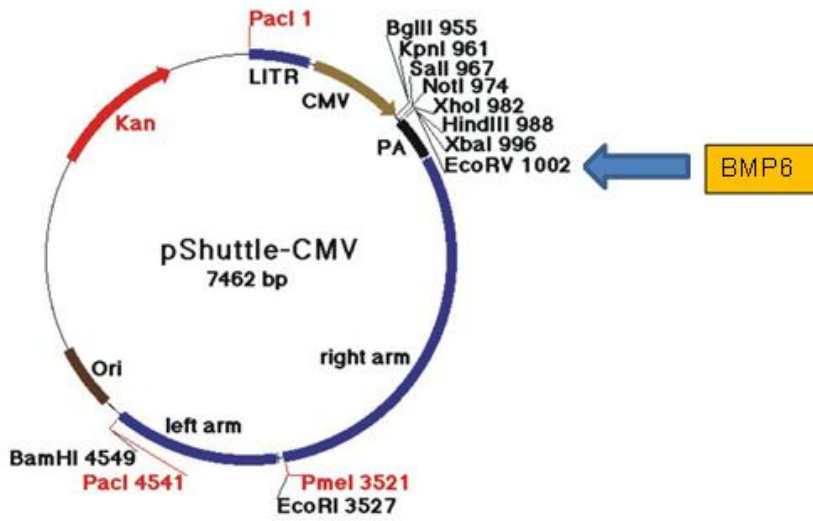
BMP-2, BMP-7, CDMP-1 ve TGF- β büyüme faktörlerini kodlayan genlerin çoğunluğu *in vivo* ve *ex vivo* kıkırdak rejenerasyonuna yönelik gen terapi çalışmalarında kullanılmıştır. Guo ve arkadaşları tarafından yürütölen TGF- β 1 geninin tavşan BMSC'lerine aktarıldığı bir çalışmada, transfeksiyondan sonra kıkırdağa özgü ECM bileşenlerinin ifadesinin arttığı, kıkırdak yıkımına neden olan MMP (metalloproteinaz) 1 ve 3'ün ifadesinin azaldığı belirlenmiştir (Guo et al., 2007). Primer kondrositlere üç boyutlu kitosan-jelatin aracılığıyla TGF- β 1'in aktarıldığı birdiğeralışmada kondrositlerin küresel morfolojilerini korudukları ve kıkırdağa özgü ECM bileşenlerini yüksek miktarda salgıladıkları gözlenmiştir (Guo et al., 2006). Osteokondral defektli tavşanlarla yapılan diğer bir çalışmada, kemik iliği kökenli MSC'lere lipozomal yolla GDF-5 (CDMP-1) geni aktarılmıştır. Ardından hücreler, kollajen tip I'den türevli hidrojeller üzerine ekilmiş ve oluşan hibrid yapı defektli bölgeye implante edildiğinde kıkırdak dokusunun onarıldığı görölmüştür (Katayama et al., 2004). Literatürde BMP-7 cDNA'sının hiyalin kıkırdak oluşumunu destekliğini gösteren çalışmalar da vardır (Grande et al., 2003; Mason et al., 2000). Ancak, literatürde kondrojenezi geliştirdiği bilinen BMP6'nın, kıkırdak doku oluşumuna yönelik olarak gen aktarım metodlarıyla aktarıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla sunulan çalışmada, kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik olarak uyarılması için BMP6 geni ile modifikasyonlarına karar verilmiştir.

4.2. Sıçan Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelere *in vitro* BMP6 Geni Aktarılması

In vitro doku mühendisliği çalışmalarında büyüme faktörleri rekombinant protein halinde kullanılsa da bu uygulamalar *in vivo* da pek başarılı olamamaktadır. Çünkü rekombinant proteinler vücuda aktarılırken bazı problemler yaşanmaktadır. Çoğu proteinin *in vivo*'da yarılanma ömrü kısa olduğu için etkinliği kısa sürmektedir ve böylece hasarın olduğu bölgeye terapötik dozda ulaşması için yüksek miktarda ve tekrarlanarak verilmesi gerekmektedir. Bu durum, hem tedavi maliyetlerinde artışa neden olmakta, hem de hedeflenen organlar için terapötik olan bu doz hedeflenmeyen organlarda hasara yol açabilmektedir. Ayrıca, rekombinant proteinler translasyon sonrası modifikasyonlardan yoksun olduklarından, gerekli konformasyonu kazanamamaktalar ve tedavide etkin olamamaktadırlar (Steinert et al., 2008; Gelse and Schneider 2006; Fu et al., 2000). Bunların yanında, eklem kıkırdığındaki sinoviyal hücrelere enjeksiyonla TGF- β 1 ve BMP-2 gibi büyüme faktörlerinin aktarılması sinovyum inflamasyonu, eklem fibrozisi ve osteofit gelişimi sonucu kıkırdak yıkımı gibi istenmeyen durumlara yol açmıştır (Steinert et al., 2008). İşte rekombinant proteinlerin tüm bu sınırlayıcı etkilerinin üstesinden gelebilmek için, bu proteinlerin doğal bir şekilde hücreler tarafından sentezlenmesi sağlanmalıdır. Bu amaç doğrultusunda, sunulan tez çalışmasında BMP6 rekombinant proteini yerine, bu proteinini kodlayan nükleik asit dizisinin (BMP6cDNA), *in vitro* ortamda rBMSC'lere aktarılmasına karar verilmiştir. Böylece hücreler ilgili proteinle modifiye edildikten sonra, bu hücrelerin BMP6 proteinini uzun süreli olarak mikroçevrelerine salması öngörülmüştür. Eğer bu çalışmada kitosan doku iskeleleriyle birlikte geliştirilen gen aktarım sistemi, *in vivo*'da kıkırdak hasarı olan bir bölgeye implante edilirse, hücreler uzun süreli olarak büyüme faktörünü saldıkları için bu faktörün tekrar tekrar vücuda verilmesine gerek kalmaz, ayrıca protein lokal olarak salgılandığı için hedeflenmeyen çevre dokular da en az şekilde zarar görmüş olur.

4.2.1. BMP6 geni içeren pShuttle-BMP6 plazmidinin oluşturulması ve klonlanan BMP6 cDNA dizisinin doğrulanması

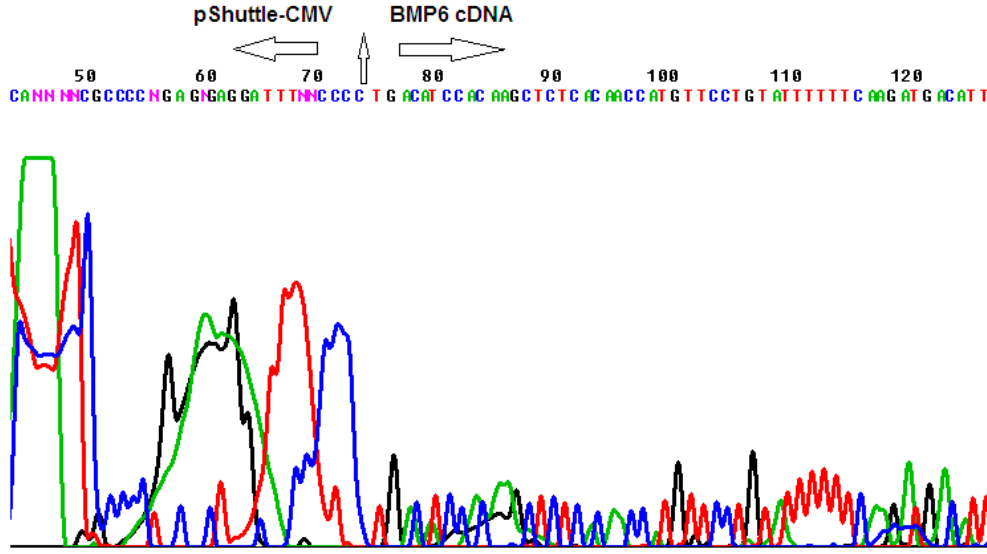
Çalışma kapsamında kullanılan pShuttle-BMP6 plazmidi Li ve arkadaşları tarafından, Bölüm 3.1’de anlatılan şekilde elde edilmiştir (Li et al., 2006). BMP6 cDNA belirtilen şekillerde hazırlandıktan sonra plazmidin EcoRV bölgesine klonlanmıştır. pShuttle-CMV plazmidinin gen haritası ve BMP6 cDNA’sının aktarıldığı bölge Şekil 4.2’de gösterilmektedir.



Şekil 4.2. pShuttle-CMV’nin gen haritası.

4.2.1.1. pShuttle-BMP6’nın DNA dizi analizi sonucu

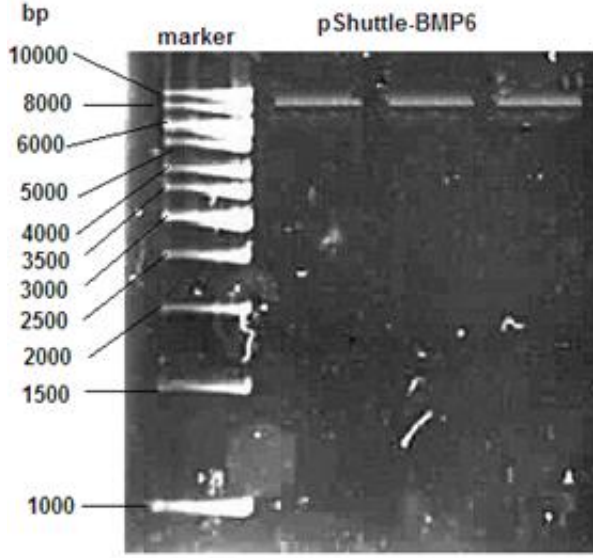
BMP6 cDNA klonunun plazmidteki varlığının doğrulanması için pShuttle-BMP6 plazmidinin dizi analizi yapılmıştır. Yapılan dizi analizi sonuçları BMP6 geninin cDNA dizisiyle karşılaştırıldığında, plazmidin BMP6 cDNA dizisini içerdiği doğrulanmıştır. Plazmide ve BMP6 genine ait baz dizilerinin bir kısmını içeren kromatogram görüntüsü Şekil 4.3’de sunulmaktadır. Yukarı doğru gösterilen ok, BMP6 cDNA sekans dizisinin başladığı noktadır.



Şekil 4.3. pShuttle-BMP6'nın sekans analizine ait kromatogram görüntüsünden bir kesit.

4.2.2. pShuttle-BMP6'nın saf halde elde edilmesi

Rekombinant plazmidin saf halde ve yüksek miktarlarda elde edilebilmesi için, plazmidler öncelikle kompetent *E.coli*'ye transforme edilmiş, bu hücreler kültüre edilerek plazmidin hücreler içerisinde çoğaltılması sağlanmıştır. Plazmidin transformasyonundan önce yüksek verimlilikteki kompetent *E.coli* hücrelerinin (NEB 5-alpha F' I^q Kompetent *E.coli* (High efficiency)), canlılıkları ve transforme edilebilirliği pUC 19 kontrol plazmidiyle Bölüm 3.2.2'de anlatılan şekilde test edilmiştir. Bu testin sonucunda, hücreler kanamisin içeren seçici besi ortamlarında üreyebildiklerinden canlı oldukları ve transformasyona uğrama kapasitesine sahip oldukları anlaşılmıştır. Böylece hücreler Bölüm 3.2.3'te anlatılan şekilde transforme edildikten sonra, seçici katı besi ortamlarında üreyen transforme koloniler, Bölüm 3.4'de anlatıldığı şekilde sıvı kültürlerde çoğaltılıp bu hücrelerden plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Saf haldeki pShuttle-BMP6 plazmidi % 1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra 260 nm dalga boyundaki UV ışıkta görüntülenmiştir (Şekil 4.4). Kullanılan marker 1 kb büyüklüğünde olup elde edilen plazmid DNA'nın yaklaşık 9500 bp'inden oluştuğu görülmektedir.



Şekil 4.4. pShuttle-BMP6'ya ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

4.3. Mezenkimal Kök Hücrelere Plazmidi Aktaracak Aktarım Yönteminin ve Vektörün Seçimi

Gen aktarımında temel olarak viral sistemler ve virüs harici sistemler olmak üzere iki vektör sisteminin kullanıldığı bilinmektedir. Virüslerin genetik materyalinin çevrili olduğu “kapsid” yapısı, protein yapıda olup genin aktarılacağı hücrenin zarındaki reseptörleri tanıyıp bağlanma özelliğindedir. Viral kapsidler, aynı zamanda taşıdıkları nükleik asitin vücut içinde parçalanmasını engelleyici bir koruma sağlarlar. Bu özellikleri nedeniyle viral vektörlerin aktarım verimlilikleri, virüs harici sistemlere göre daha yüksektir. Ancak, virüsler, taşıdıkları yabancı proteinler nedeniyle enfekte ettikleri hücrelerde immün cevap oluşturma riski taşımaktadırlar. Bu özellikleri de verimliliklerini kısıtlayan önemli bir faktördür (Laporte and Shea, 2007).

Viral olmayan vektörler ise taşıdığı nükleik asitleri hücrelere doğrudan aktaramazlar. Bu nedenle bu vektörlerin hücrelerin reseptörü tarafından tanınmaları için modifiye edilmeleri gerekmektedir. Bu nedenle viral olmayan vektörler aracılığıyla gerçekleşen transfeksiyon verimi daha düşüktür. Bununla

beraber, katyonik lipozomlar ve katyonik polimerler elektrostatik olarak DNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileşime girerek DNA'yı "lipopleks" ve "polipleks" denilen kompleksler oluşturmak üzere sıkıştırır ve yoğunlaştırır. Bu sistemler, büyük miktarlardaki DNA'nın yoğunlaştırılabilmesini sağlayabildiğinden, verimdeki azalma bu yolla dengelenebilir. Ayrıca DNA'nın katyonik polimerler tarafından kalkanlanması, serumdaki nükleazlar tarafından parçalanmasını engeller (Storrie and Mooney, 2006). Lipopleks ve polipleks sistemlerin sağladığı avantajlar ve viral vektörlerin immunojenite gibi dezavantajları göz önüne alınarak, bu çalışma kapsamında rBMSC'lere BMP6 genini aktarmak için viral vektörleri içermeyen iki farklı gen aktarım sistemi kullanılmıştır. Bunlardan biri, katyonik bir lipozom olan "Lipofectamine 2000"dir. Diğer aktarım sistemi olarak ise doğrudan kitosan doku iskelesi kullanılmıştır. Plazmid DNA, kitosan doku iskeleleriyle herhangi bir vektör kullanılmaksızın yalın halde birleştirilmiştir. Bu iki sistem transfeksiyon verimlilikleri açısından Bölüm 4.3.3'de karşılaştırılmıştır.

4.3.1. Lipofektamin ile mezenkimal kök hücrelere gen aktarımı

Lipofektamin 2000 memeli hücrelerine gen aktarımında kullanılan katyonik bir lipozomdur. Katyonik lipozomlar patojen özellikte olmayan, immünojenite taşımayan, biyouyumlu ve biyobozunur özellikte kolaylıkla sentezlenebilen kesecik sistemleridir (Birchall et al., 1999). Katyonik lipozomlar genellikle, DNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileşecek bir veya daha fazla azot atomu içeren bir baş grubu ile; azot atomlarıyla bağlantılı bir, iki ya da üç hidrokarbon zinciriden oluşan ve lipid ile nükleik asit arasında bağlantı kurulmasını sağlayan bir ara halkasından (spacer) oluşur. Lipozomlar, aralarında fiziksel bir boşluk yaratılan iki lipitten oluşur. İçte olan nötr yapıdaki lipid, yardımcı lipid olarak bilinir. Bu iki lipid tek tabakalı lipozom yapısını oluşturur. Katyonik lipozomların pozitif yüklü dış yüzeyi, negatif yüklü DNA ile elektrostatik etkileşime girerek lipozom/DNA kompleksi oluşumunu sağlar. Böylece nükleik asitler lipozom tarafından kalkanlanarak, negatif yüklü hücre zarının elektrostatik itme kuvvetine karşı koyulur ve hücre zarıyla temas sağlanır. Nötral yardımcı lipid aracılığıyla da lipozomun hücre zarıyla birleşimi gerçekleşir. Transgenin ifadesi için DNA hücre çekirdeğine

ulaşmalıdır. Aktif olarak bölünen hücrelerde, mitozun sonunda çekirdek zarının yeniden oluşumunu takiben transfekte DNA çekirdek tarafından yakalanır (Dalby et al., 2004).

Lipofektamin 2000 birçok çalışmada gen aktarımı ajanı olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Guo ve arkadaşları tarafından (2007) yapılan bir çalışmada, tavşan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreleri, tek tabakalı kültür ortamında Lipofektamin 2000 aracılığıyla TGF- β 1 ile kararlı bir şekilde transfekte edildikten sonra hücreler kitosan doku iskelelerine ekilmişlerdir. Ardından, gen ile modifiye olmuş kırık yapıları artikular kırık defektine implante edilmiştir. TGF- β 1, modifiye hücreler tarafından yeterli miktarlarda üretilmiş, implantasyondan 12 hafta sonra defektlerin yenilenmiş hiyalin kırık dokusuyla kapandığı yapılan analizlerle doğrulanmıştır.

Sunulan bu tez çalışması kapsamında, kondrogenezin uyarılması amacıyla kitosan doku iskelelerine ekilmek üzere, rBMSC'ler 24 gözlü hücre kültür kaplarında Bölüm 3.7.1'de anlatıldığı şekilde lipofektamin 2000 aracılığıyla transfekte edilmişlerdir. Daha sonra kararlı hücre hattı oluşumu için kanamisin içeren besi ortamında üç gün boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Plazmidi içine alan hücreler kanamisin dirençlilik genini ifade ettikleri için antibiyotikli kültür ortamında yaşarken, plazmidi içine almayan hücrelerin büyük kısmı antibiyotik direnci gösteremediklerinden ölmüşlerdir. Daha sonra hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırıldığında ortamla birlikte ölü hücreler yani transfekte olmayan hücreler de uzaklaşmıştır. Böylece kitosan doku iskelelerine ekilmek için tripsinize edilen hücrelerin büyük çoğunluğu transfekte hücrelerden oluşmuştur.

4.3.2. Gen ile aktifleşmiş kitosan aracılığıyla gen aktarımı

Bonadio ve arkadaşları insan paratiroid hormonu kodlayan geni aktardıkları kollajen matrislere, gen ile aktifleşmiş matris (GAM) adını vermişlerdir (Bonadio et al., 1999). Gen ile aktifleşmiş matris (GAM) teknolojisi özellikle doku mühendisliği uygulamaları için geliştirilmiş ilk gen aktarım yöntemidir (Bonadio, 2000). Bu yöntem, sistemik yolla veya enjeksiyonla yapılan aktarıma göre daha başarılı

bulunmuştur. Çünkü doğrudan yapılan enjeksiyonla bir hücre popülasyonunun veya vücuttaki özgül bir bölgenin hedeflenmesi oldukça güç iken, gen ile aktiveleştirilmiş polimerik doku iskeleleri defektli bir bölgeye implante edildiğinde, salınan vektör birincil olarak implant bölgesinde lokal bir gen ifadesini sağlar. Ayrıca polimerik doku iskelesi; vektörün veya yalın DNA'nın, terapötik kapasitesini düşüren serumdaki nükleazlardan, proteazlardan ve immün sistem saldırılarından büyük ölçüde korur. Bunların yanında, doku iskelesi tabanlı gen aktarım sistemleri vektörü uzun süre taşıyabildiklerinden, hücrelerin transfekte olma olasılıklarını artırırlar (Bleiziffer et al., 2007; Dang and Leong, 2006). GAM aracılığıyla yapılan plazmid DNA aktarımıyla, *in vivo*'da önemli miktarlarda rekombinant protein elde edilmiştir. Bonadio ve arkadaşları tarafından, köpektaki kemik defektinin iyileştirilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, iki haftalık periyod boyunca 1 mg plazmid DNA'dan pikogram seviyesinde rekombinant peptid üretildiği gösterilmiştir (Bonadio et al., 1999). Plazmid DNA taşıyıcısı matrisler olarak, kollajen (sünger ve jel) ve hiyaluronan gibi doğal polimerler ile PLGA [poli(laktid-ko-glikolid)] ve karboksimetil selüloz gibi sentetik polimerler kullanılabilir (Bonadio, 2000).

Kitosan ve kitosandan türevli matris yapıları ve kitosandan geliştirilen vektör sistemleri, doku mühendisliğinde gen aktarım sistemleri olarak oldukça ideal adaylardır. Kitosan doğal bir polikatyondur ve DNA'ya karşı güçlü bir affinite gösterir. Toksik ve hemolitik değildir. İntravenöz yolla verildiğinde karaciğer dokularında birikmez. Ayrıca yapılan çalışmalarda DNA'nın nükleazlar tarafından parçalamasına karşı güçlü bir koruma gösterdiği belirlenmiştir (Salem and Leong, 2006). Literatürde, kitosanın başarılı bir şekilde gen aktarım sistemi olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Periodental doku mühendisliğine yönelik olarak yürütülen bir çalışmada, PDGF'i (plateletten türevli büyüme faktörü) kodlayan geni içeren plazmid, kompleks koaservasyon aracılığıyla kitosanla yoğunlaştırılarak, plazmid-kitosan nanopartikülleri elde edilmiştir. Oluşturulan nanopartiküller, kitosan-kollajen doku iskeleleriyle birleştirilerek, plazmid DNA'nın üç boyutlu matris yapısına hapsedilmesi sağlanmıştır. Yapılan analizlerde plazmidin altı hafta boyunca iskelelerden salındığı ve bu sürede kitosan doku iskeleleri tarafından korunabildiği gösterilmiştir (Peng et al., 2009).

Sunulan tez çalışmasında kitosan polimerinin gen aktarımı için seçilmesinin nedenleri şunlardır: (1) Parçalanma ürünlerinin toksik olmaması ve kıkırdak ECM yapısı ile benzerlik göstermesi nedeniyle kıkırdak sentezi için uygundur. Yapılan çalışmalarda kitosanın parçalanma ürünlerinin kondroitin sülfat, dermatan sülfat, hiyaluronik asit, keratin sülfat, kollajen II gibi artikular kıkırdak bileşenlerinin yapısına katıldığı gösterilmiştir (Lu et al, 1999). (2) Plazmid DNA'yı yüksek verimlilikte hapsedebilen ve koruyabilen doğal katyonik bir matris özelliğindedir. (3) Bu polimerle kıkırdak oluşumunu destekleyen uygun gözeneklilikte ve yeterli mekanik dayanıma sahip üç boyutlu doku iskeleleri kolaylıkla üretilebilmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında Bölüm 3.7.2'de anlatılan şekilde üretilen BMP6 geni ile aktive olmuş kitosan doku iskelesi, hücrelerin farklılaşmalarını sağlayacak terapötik geni lokal ve uzun süreli olarak salan bir biyoreaktör özelliği taşıırken, hem de hücrelerin üzerinde yayılabileceği ve çoğalabileceği gözenekli ve yeterli mekanik dayanıma sahip doku destek yapısını oluşturur.

4.3.3. Aktarım metodunun transfeksiyon verimine olan etkisi

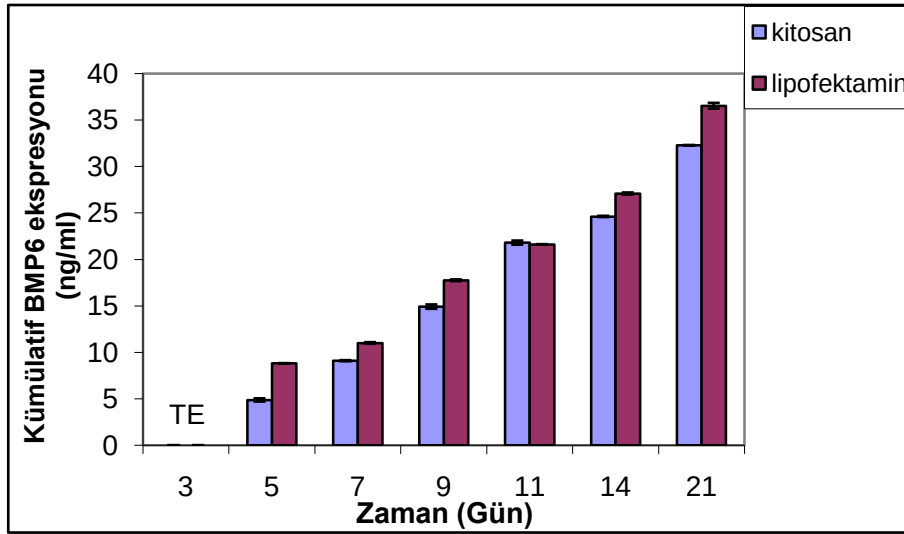
Kitosanın transfeksiyon verimliliğini etkileyen faktörlerden biri deasetilasyon derecesidir (DD). Yapılan bir çalışmada, DD azaldıkça kitosanın plazmid DNA bağlama kapasitesinin düştüğü rapor edilmiştir (Kiang et al., 2004). Ayrıca birçok çalışmada kitosandaki azot gruplarıyla, etkileşime girdiği DNA molekülündeki fosfat gruplarının birbirine oranının kitosanın gen aktarım verimliliğini etkileyen önemli bir faktör olduğu rapor edilmiştir (Ishii et al., 2001; Kiang et al., 2004; Lavertu et al., 2006).

Kitosanın transfeksiyon verimliliğini etkileyen bir diğer faktör molekül ağırlığıdır. Düşük molekül ağırlıklı kitosan ile yüksek molekül ağırlıklı kitosan transfeksiyon verimlilikleri açısından birbirleriyle kıyaslandığında düşük molekül ağırlıklı kitosanın plazmid DNA bağlama kapasitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kitosan ve lipofektamin birçok çalışmada transfeksiyon verimlilikleri açısından karşılaştırılmış ve bu çalışmalarda lipofektaminin transfeksiyon veriminin daha

fazla olduğu gösterilmiştir (Leong et al., 1998; MacLaughlin et al.1998).Bir diğer çalışmada ise yüksek moleküler ağırlıklı kitosanın transfeksiyon verimi, lipofektaminden daha azken, yüksek moleküler ağırlıklı kitosanın veriminin daha yüksek olduğu saptanmıştır (Supaprutsakul et al., 2010).

Yapılan çalışmada kullanılan iki farklı gen aktarım sistemi, elde edilen ELISA testi sonuçları baz alınarak karşılaştırılmıştır. ELISA testiyle 2 farklı yolla hazırlanan sistemlerin ürettiği BMP6 miktarları tayin edilmiştir. Bulunan değerler, ng/mL olarak zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Bu sonuçlar, iki yöntemin transfeksiyon verimliliği açısından da değerlendirilebilir.

Şekil 4.5'deki grafik incelendiğinde, 21 gün boyunca lipofektamin ile transfekte edilen hücrelerin sentezledikleri BMP6 miktarının, kitosan aracılığıyla transfekte edilen hücrelerin sentezledikleri protein miktarından biraz daha fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 4.5. Kitosan ile lipofektaminin transfeksiyon verimlerinin karşılaştırılması.

Bu veriler değerlendirildiğinde, iki gen aktarım sisteminin transfeksiyon verimliliklerinin birbirine yakın olduğu, ancak lipofektaminle biraz daha verimli bir aktarım gerçekleştirildiği sonucuna varılmıştır (Şekil 4.5). Çünkü lipofektamin 2000 aracılığıyla yapılan gen aktarımında, negatif yüklü plazmid DNA katyonik özellikte lipozom ile kompleks oluşturduğu için, kültür ortamındaki nükleazlardan korunmuş

olur. Oluşan plazmid DNA-lipozom kompleksleri hücre zarıyla birleşerek hücre içine alınır ve hücre bölünmesi esnasında doğrudan çekirdeğe aktarılır (Dalby et al., 2004). Transfekte olan hücreler seçici besi ortamında inkübe edilip seçildikten sonra kitosan doku iskelelerine ekildiği için, inkübasyona bırakılan hücrelerin çoğunluğu modifiye hücrelerden oluşmaktadır. Plazmid kitosan doku iskelelerine damlatıldığında ise, kitosan sınırlı bir bağlama kapasitesine sahip olduğu için plazmidin tümünü yapısına katamaz. Ayrıca hücreler, kitosandan salınan plazmid DNA'nın tümünü endositozla içeri alamaz. Plazmid DNA'nın bir kısmı nükleazlar tarafından parçalanır. Bununla beraber, Şekil 4.10'daki grafikte kitosanın yapısındaki plazmid DNA'nın tümünü bir anda salmadığı, 21 gün boyunca salıma devam ettiği görülmektedir. Böylece hücrelerin içine aldıkları protein miktarı iskelelerden salınan plazmid miktarına bağımlı olarak değişmektedir. Sonuçta bu çalışma kapsamında, lipofektamin daha verimli bir aktarım metodu gibi gözükse de ifadesinin modifiye hücrelerle sınırlı olması nedeniyle bu ajanla sürekli bir plazmid salımı gerçekleştirilemediği için, kitosanın *in vivo* uygulamalarda implant bölgesindeki hücrelerin de transfeksiyonunu sağlayarak daha yüksek bir transfeksiyon verimine sahip olduğu belirlenmiştir.

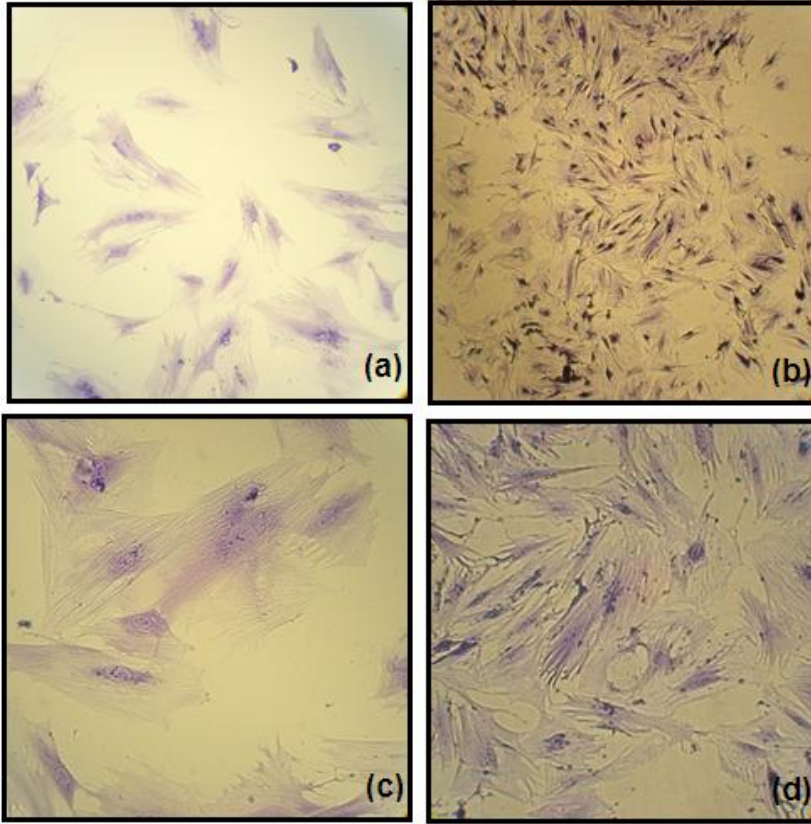
4.4. Sıçan Mezenkimal Kök Hücrelerinin Karakterizasyon Çalışmaları

4.4.1. Hücrelerin morfolojik gözlem sonuçları

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri, “Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM)”’nden temin edilmiştir. Hücreler, *Rattus norvegicus* türüne ait bir sıçandan kemik iliği aspirasyonu yöntemiyle izole edilmiştir.

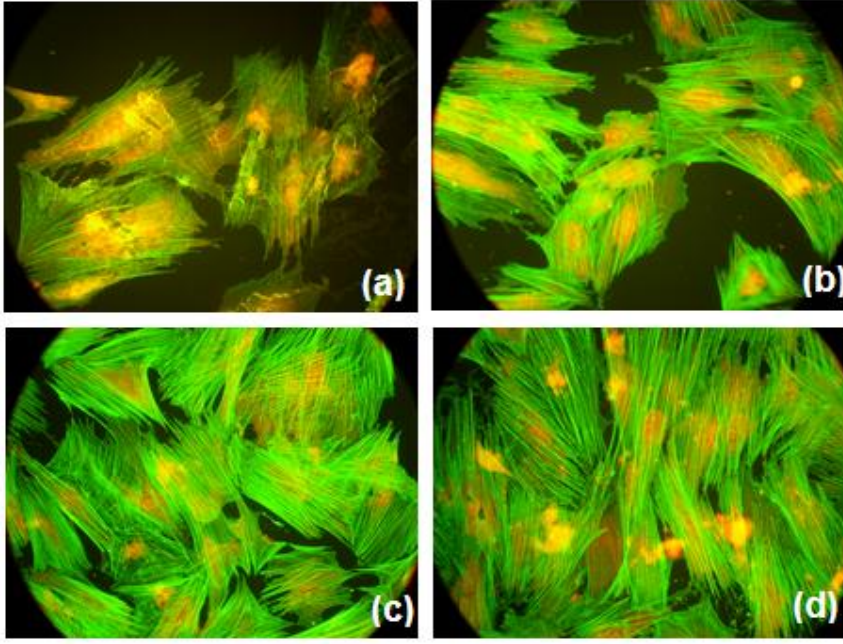
Hücrelerin kültürün 3. ve 7. günlerinde, kristal viyole ile boyandıktan sonra optik mikroskopta çekilmiş hücre fotoğrafları Şekil 4.6'da verilmiştir. Fotoğraflardan açıkça görülebileceği gibi, hücre iskeletleri açık mora, hücre çekirdekleri ise koyu mora boyanmıştır. Kültürün 3. günde hücreler mezenkimal kök hücrelere özgü

işsibir morfoloji göstermeye başlamışlar (Şekil 4.6.a,c) ve 7. günde sayıları artarak fibroblastik bir görünüm kazanmışlardır (Şekil 4.6.b,d).



Şekil 4.6. rBMSCs'nin kristal viyole görüntüleri : (a) 3.gün (x10), (b) 7.gün (x10), (c) 3.gün (x20), (d) 7. gün (x20).

Çalışma kapsamında hücreler, Alexa Fluor 488-Phalloidin ve Propidyum iyodür ile kültürün farklı günlerinde boyanarak floresan mikroskop ile görüntülenmişlerdir. Kültürün 1, 3, 7 ve 16. günlerinde çekilmiş fotoğraflar Şekil 4.7'de verilmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi floresan ışık altında hücre iskeletleri aktin filamentlerle etkileşen Alexa Fluor 488-Phalloidin nedeniyle yeşil, hücre çekirdekleri ise çekirdekteki nükleik asitlere bağlanan propidyum iyodürden dolayı kırmızı renktedir.



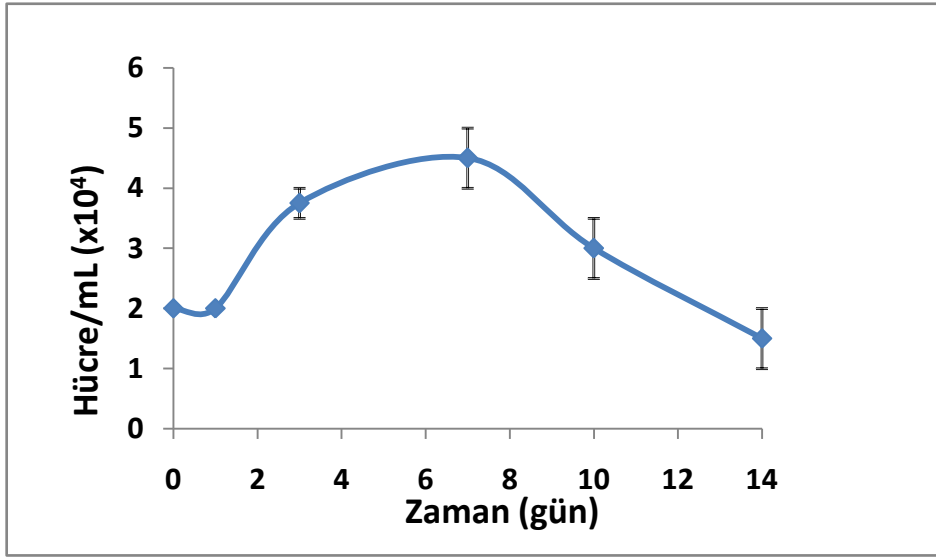
Şekil 4.7. rBMSC'nin floresan mikroskop görüntüleri : (a) 1. gün (x20), (b) 3. gün (x20), (c) 7. gün (x20), (d) 16. gün (x20).

Şekil 4.7'den takip edildiğinde, kültürün 1. gününde ECM yapısı yeni oluşmaya başlamıştır. Bu nedenle hücre çekirdekleri iskelet yapısına göre daha belirgin olarak gözükmemektedir (Şekil 4.7.a). Kültürün ilerleyen günlerinde hücreler daha fazla ECM sentezlemeye başladıkları için, aktin filamentleri oldukça yoğun bir şekilde görünmektedir (Şekil 4.7.c,d).

Farklı günlere ait hücre morfolojileri karşılaştırıldığında, 1. günden 16. güne kadar hücrelerin giderek uzamaya başladığı ve özellikle 7. gün (Şekil 4.7.c) ve 16. güne ait (Şekil 4.7.d) fotoğraflar karşılaştırıldığında, 16. günde hücrelerin daha iğsi morfolojiye ulaştıkları belirgin bir şekilde görülmektedir.

4.4.2. Hücre üremesine ait özgül üreme hızı ve hücre ikilenme süresinin hesaplanması

Hücrelerin 14 günlük inkübasyonu boyunca hemositometrik sayımları sonucu elde edilen hücre sayısına karşılık zaman grafiği çizilmiş, böylece hücre üreme grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Hemositometrik sayım sonucu elde edilen kemik iliği mezenkimal kök hücre üreme grafiği.

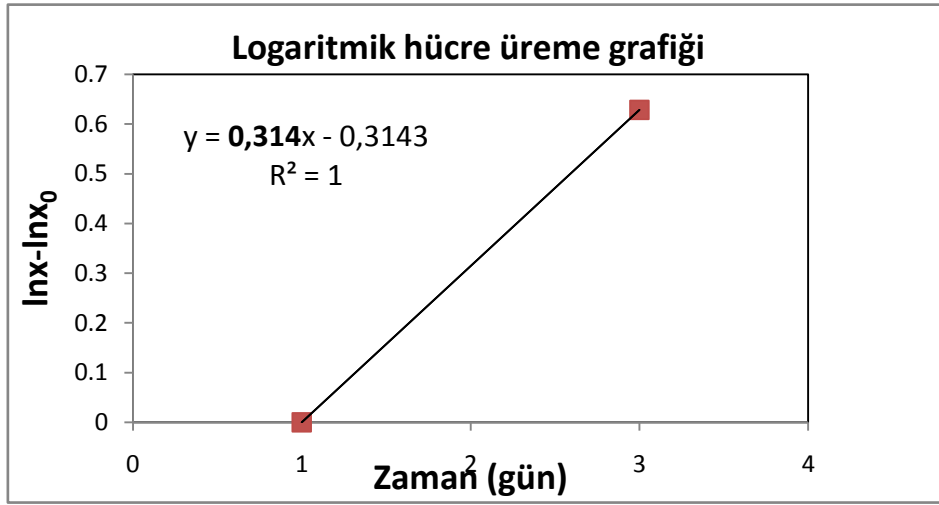
Hücre büyüme eğrisi sonucu, hücrelerin birinci ve üçüncü günler arasında üstel üreme fazında (logaritmik faz) oldukları belirlenmiştir. Hücrelerin üstel üreme fazındaki, özgül üreme hızı (μ) Eşitlik 4.1'den, ikilenme süresi (t_d) ise Eşitlik 4.2'den hesaplanmıştır.

$$\ln (x-x_0) = \mu (t - t_0) \quad (4.1)$$

$$t_d = \ln 2 / \mu \quad (4.2)$$

Eşitliklerdeki $\ln x_0$, $t=0$ (sa) zamanındaki başlangıç absorbans değerini; $\ln x$, $t=t$ (sa) zamanındaki absorbans değerini, μ özgül üreme hızını (sa^{-1}), t_d ise ikilenme süresini göstermektedir.

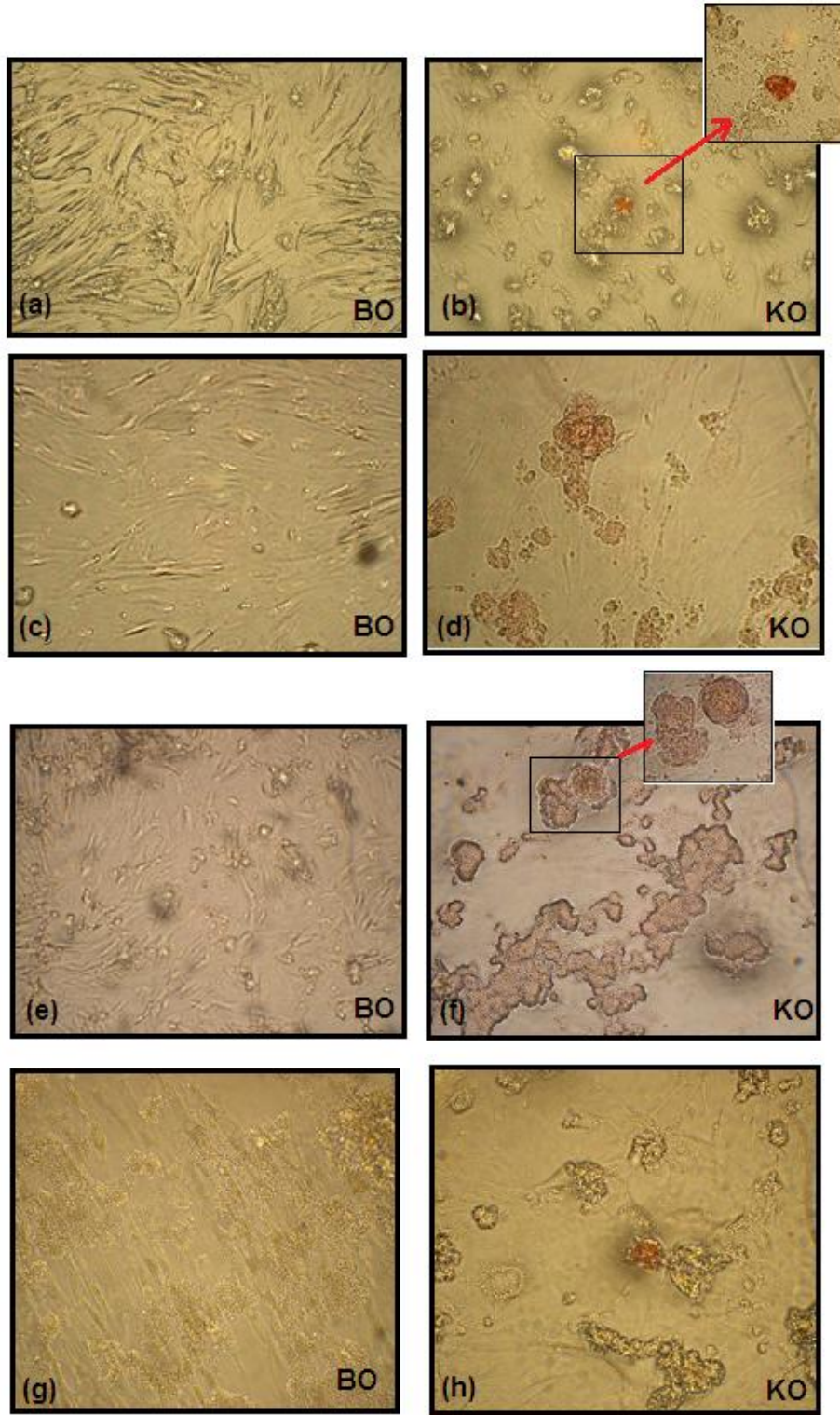
Özgül üreme hızlarının hesaplanması için Eşitlik 4.1'teki $\ln x - \ln x_0$ değerlerinin zamana karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen doğrunun (Şekil 4.9) eğimi (0.3143) "özgül üreme hızı" (μ) olarak tespit edilmiştir. Bu değer 24 saate bölünerek özgül üreme hızı $0,0131 \text{ sa}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Eşitlik 4.2 kullanılarak hesaplanan ikilenme süresi ise 52.9 saattir.



Şekil 4.9. Özgül üreme hızının hesaplanması için kullanılan ln x-t grafiği.

4.4.3. Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmalarına ilişkin gözlem sonuçları

Sunulan çalışmada, sıçan mezenkimal kök hücrelerinin kondrojenik potansiyellerinin görsel olarak değerlendirilmesi için bir grup hücre kontrol grubu olarak büyüme ortamında inkübe edilmiş ve diğer gruptaki hücreler kondrojenik farklılaşma ortamında büyütüldükten sonra Safranin-O ile boyanmıştır (Bkz. Bölüm 3.5.3.2). Boyama sonucunda sitoplazma grimsi yeşil, çekirdek siyah ve kıkırdak yapısı kırmızı tonlarında renk almıştır. Hücrelerin; kültürün 7, 14, 21 ve 28. günlerine ait optik mikroskop görüntüleri Şekil 4.10'da sunulmuştur. Bu fotoğraflar göz önüne alındığında, yalnızca büyüme ortamı (BO) ile inkübe edilmiş hücrelerin, ilk haftadan itibaren iğ şeklindeki mezenkimal kök hücre morfolojisini kazanmaya başladığı ve 28. gün sonunda da bu morfolojiyi koruduğu görülmektedir (Şekil 4.10.a,c,e,g).



Şekil 4.10. Kondrojenik ortam (KO) ve büyüme ortamında (BO) çoğaltılmış ve Safranin-O ile boyanmış rBMSCs'nin optik mikroskop görüntüleri : (a,b) 7. gün (x20), (c,d) 14. gün (x20), (e,f) 21. gün (x20), (g,h) 28. gün (x20).

Yedinci güne ait görüntülerde, kondrojenik farklılaşma ortamıyla (KO) inkübe edilmiş hücrelerin kontrol grubundaki hücrelerden farklı bir morfolojiye sahip olduğu gözlenmiştir. Hücreler içsi yapılarını kaybederek, küresel bir yapı kazanmaya başlamışlardır. Ayrıca görüntüde kırmızıya boyanmış bir hücre kitlesi de görülmektedir (Şekil 4.10.b). Ondördüncü gün sonunda kırmızıya boyanan alanlar artmış, küresel morfolojiye sahip daha büyük hücre kitlesi turuncuya boyanmıştır. Bunun yanında hücre yoğunluğunda azalma görülmektedir (Şekil 4.10.d). En fazla kırmızıya boyanmış ECM yapısı, 21. günde gözlenmiştir. Kültürün farklı bölgelerinde pembeye boyanmış birçok hücre kitlesine rastlanmıştır (Şekil 4.10.f). 28. gün sonunda ise kontrol grubunda hücre yoğunluğu oldukça fazla olmasına rağmen farklılaşmak üzere uyarılmış kültürde hücre yoğunluğu ve kırmızıya boyanmış alanlar oldukça azdır (Şekil 4.10.h).

Görüntülerden elde edilen veriler ışığında, kültürün ilerleyen günlerinde mezenkimal kök hücrelerin tipik morfolojisi olan iç şeklindeki yapının kaybolmaya başlaması, hücrelerin kondrositlere özgü küresel bir yapı kazanması ve kırmızı renk oluşumu; kıkırdağa özgü proteoglikanların ve GAG'ların sentezlendiğinin, dolayısıyla kondrojenik farklılaşmanın gerçekleştiğinin göstergesidir.

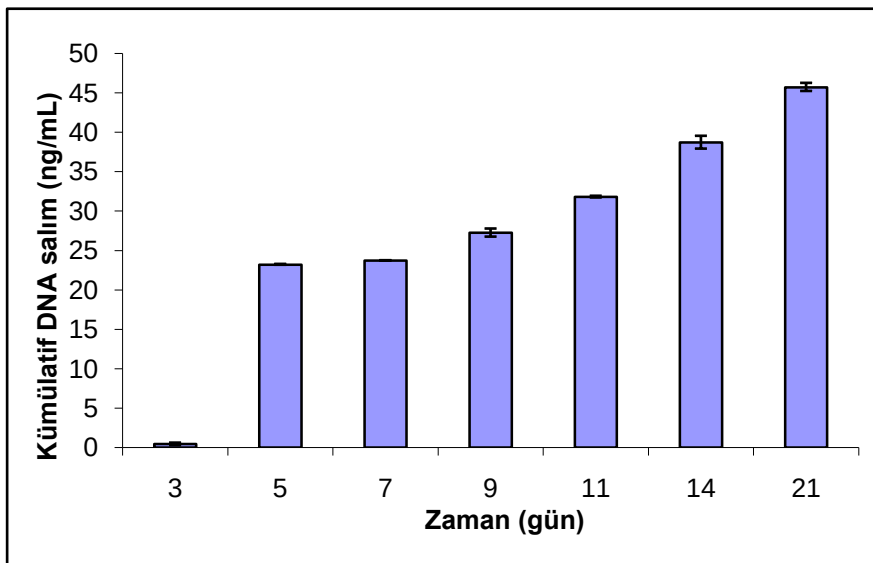
Kıkırdak dokusuna özgü ECM birikimi 7. günün sonunda görülmeye başlamış, 14. gün sonunda belirgin şekilde artmış ve 21. günün bitiminde en yoğun şekilde ortaya çıkmıştır. Bu da kıkırdağa özgü bileşenlerin sentezinden sorumlu genlerin ifadesindeki artıştan ileri gelmektedir. Bu bulgu, literatür bilgileriyle de örtüşmektedir (Sekiya et al., 2005). Ayrıca kondrojenik uyarıcı ile inkübasyonu gerçekleştirilmiş kültürler, kontrol gruplarıyla kıyaslandığında hücre yoğunluğunun daha az, hücre büyüklüğünün ise daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu da farklılaşmanın hücre metabolizmasını arttırıcı ancak çoğalmayı azaltıcı bir etkisi olduğunu kanıtlamaktadır. 28. günde ise farklılaşmış hücrelerin oldukça az görülmesi, büyük olasılıkla kondrositlerin *in vitro* koşullarda, tek tabakalı kültür ortamlarında fenotipik özelliklerinin büyük çoğunluğunu kaybetmeleri sonucu "de-differensiye" olmalarından kaynaklanmaktadır (Gelse and Schneider, 2006).

4.5. Kitosan Doku İskeleleriyle Yürütülen Hücre Kültürü Çalışmaları

Bu bölümde doku iskeleleriyle yürütülen hücre kültürü çalışmalarının değerlendirmesi amacıyla yapılan DNA salım çalışmaları, MTT analizi, ELISA testi, SEM analizi, RT-PCR analizi ve biyokimyasal analizine ait bulgulara yer verilmiş ve elde edilen bulgular tartışılmıştır. Çalışmalar 4 grup örnekle yürütülmüştür. Birinci gruptaki kitosan doku iskelelerine yalnızca hücre ekilmiş, ikinci gruptaki hücreler kültüre edilirlerken, farklılaşma ortamlarına iskele başına 20 ng olacak şekilde rekombinant BMP6 proteini (Cat. No: 507-BP, R&D Systems, ABD) eklenmiştir. Üçüncü gruptaki doku iskelelerine pShuttle-rBMP6 plazmidıyla modifiye edilmiş hücreler ekilmiştir. Dördüncü gruptaki örnekler ise, pShuttle-rBMP6 emdirilmiş kitosan doku iskelelerine mezenkimal kök hücreler ekilerek hazırlanmıştır.

4.5.1. Kitosan doku iskelelerinden plazmid DNA salımı

Mezenkimal kök hücre ekilmiş kitosan iskelelerinden plazmid DNA salımı, Bölüm 3.8.2.1’de anlatılan şekilde 21 gün boyunca kantitatif olarak izlenmiştir. Elde edilen verilerden çizilen, zamana karşı kümülatif DNA salım miktarını gösteren grafik Şekil 4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.11. Kitosan doku iskelerinin zamana karşı plazmid DNA salım profili.

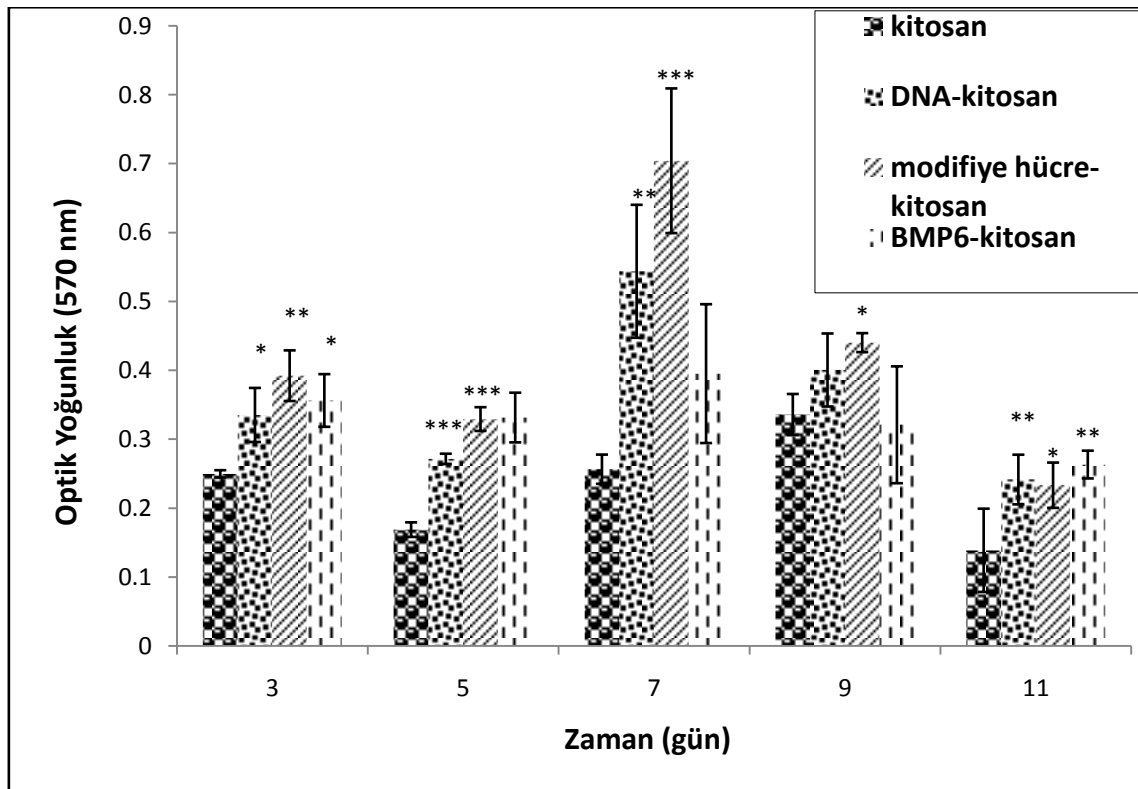
Şekil 4.11'deki grafik incelendiğinde kültürün 3. gününde iskelelerden salınan plazmid DNA miktarı oldukça az olmasına rağmen, kültürün 5. gününde salınan DNA miktarının doruk noktaya ulaştığı görülmektedir (22,5 ng/mL). Bu durum matris aracılığıyla gerçekleşen gen aktarım sistemlerinde, plazmid DNA'nın matristen serbest kalma kinetiğinin matrise bağlanma özelliğine bağlı olmasındandır (Laporte and Shea, 2007). Bu çalışmada kullanılan sistemde, plazmid DNA'nın kitosana bağlanması, yüzeye tutunma ve elektriksel çekimle (DNA negatif yüklü fosfat gruplarıyla, kitosandaki pozitif yüklü amin grupları arasındaki) gerçekleşmiştir. Böylece iskelenin iç yüzeylerine giremeyen ve iskele yüzeyine elektrostatik çekimle bağlanmış plazmid DNA'nın büyük bir kısmı, kültürün 5. gününde birden serbest kalmıştır (burst release=patlama serbest kalışı). Bu sonuç, literatürde yapılan bir çalışmanın verileriyle de uyumludur (T. Guo et al.,2006).

Kültürün 7. gününde ise iskelelerden çok az miktarda plazmid DNA salınmıştır. 7. günden 14. güne kadar plazmid DNA salımı artan miktarlarda devam etmiş, 21. günde, 14. günle aynı seviyede bir salım gerçekleşmiştir. Deneysel çalışmaların devam ettirildiği 21 gün boyunca DNA salımının devam ettiği görülmektedir. İskelelerden salınan pShuttle-BMP6 plazmidi, mezenkimal kök hücreler tarafından endositozla içeri alınmış ve bu hücreler genetik olarak modifiye olmuşlardır. Yapılan ELISA testinin sonucuna göre plazmid DNA yüklenmiş iskelelere ekilmiş hücrelerin 21 gün boyunca BMP6 proteinini sentezlemeleri genetik modifikasyonun gerçekleştiğinin kanıtıdır. Böylece kitosanın, plazmid DNA'yı kültür ortamına salınan parçalayıcı nükleaz enzimlerinden koruyabilen bir yapı olduğu görülmektedir. İlk hafta, plazmid DNA'nın büyük bir kısmının iskelelerden ani bir şekilde salınması ise avantajlı bir durumdur. Çünkü hücreler, kıkırdak dokusunu oluşturmak için, ilk hafta yüksek yoğunlukta büyüme faktörüne ihtiyaç duymaktadırlar. Doku iskelelerinden 5. günde salınan büyük miktardaki DNA, kıkırdak oluşumunun erken evrelerinde hücrelerin farklılaşması için gereken kısa süreli ancak yüksek seviyelerdeki BMP6 ifadesini sağlamıştır. Ayrıca, bu gen aktarım sistemi toksik olmaması nedeniyle hücre çoğalmasını desteklemiştir.

4.5.2. MTT analizi

Kitosan doku iskeleleri üzerinde üreyen kemik iliği kökenli sıçan mezenkimal kök hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri MTT analizi ile belirlenmiştir. MTT analizi ile hücrelerin metabolik aktiviteleri sonucu mitokondrilerinden salgılanan maddenin spektrofotometrik ölçümü yapıldığından, bu analizle dolaylı olarak hücre çoğalması da belirlenmektedir. Mitokondriden madde salgılanması, yalnızca canlı hücrelerde gözleneceği için ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile de ilişkilendirilmektedir. Ayrıca, bu analizle hücrelerin üremesi, canlılığı ve çeşitli malzemelerin hücreler üzerindeki etkisine (örneğin sitotoksite) yönelik bilgi edinilmesi mümkündür.

Hücrelerin doku iskelelerindeki üreme davranışları 11 günlük inkübasyon süresince izlenmiş ve sonuçlar MTT analizi ile 570 nm’de ölçülen optik yoğunluk değerleri olarak Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12. MTT analizi ile rBMSC’in saf kitosan, plazmid yüklenmiş kitosan ve BMP6 eklenmiş kitosan üzerindeki ve transfekte rBMSC’nin saf kitosan üzerindeki üreme davranışları (İstatistiksel önem farklılığı, n=3, * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 kitosan kontrol grubudur).

Yapılan MTT analizinde kontrol grubu olarak boş kitosan doku iskeleleri kullanılmıştır. Kontrol grubundaki hücreler hariç, tüm hücreler inkübasyon süresince BMP6 proteini ile etkileşmişlerdir. Bu nedenle, 3, 5, 7, 9 ve 11. günlerde, kitosan grubunda diğer gruplara göre hücre sayısının daha az olduğu görülmüştür. Bu durum, büyüme faktörü olan BMP6'nın hücrelerin üremesinde ve büyümesinde uyarıcı etkisinin bulunmasındandır.

BMP6 proteiniyle etkileşen tüm gruplarda hücre sayısı en yüksek 7. günde görülmüştür ve 7. günden sonra azalmaya başlamıştır. Mezenkimal kök hücrelerin 7.günde hızlı bir üreme göstermesi, BMP6 geninin ifadesine paralel olarak gerçekleşmektedir. Literatürde bu durumu destekleyen bir çalışmanın RT-PCR analizi sonuçlarına göre, BMP6 ile uyarılmış mezenkimal kök hücrelerin gen ifade seviyesi 7. güne kadar artmış, 7. günden sonra azalmaya başlamıştır (Sekiya et al.,2005). Çünkü hücreler kondrojenik olarak farklılaştıkça, mitojenik aktiviteleri yavaşlamaktadır. Kültürün 3, 5, 7 ve 9. günlerinde BMP6 içermeyen kitosan grubuyla serbest halde BMP6 içeren grup arasında hücre sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. Bu sonuç, serbest haldeki BMP6'nın parçalanmasından kaynaklanmaktadır (ELISA testine göre 5. günde kültür ortamında BMP6 proteini saptanamamıştır).

pShuttle-BMP6 rekombinant plazmidi içeren kitosan grubundaki hücre üremesi, 3. günde kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı değilken, 5.günde iskelelerden salınan plazmid DNA miktarının doruğa ulaşması nedeniyle, bu gruptaki hücre sayısı (bkz. DNA salım sonuçları) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanabilmiştir ($p<0.001$). Bu gruplar arasında 7. günde de istatistiksel olarak fark görülebilmiş ($p<0.01$), ancak 9. günde BMP6 ifade düzeyinin azalmasına bağlı olarak farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).

Kültürün 3, 5, 7 ve 9. günlerinde, lipofektaminletransfekte edilmiş grubun hücre sayısının, plazmid içeren kitosan grubundan daha yüksek olduğu görülmüştür. Onbirinci günde ise kitosan grubunda hücre kaybının çok fazla olması nedeniyle, bu grup hücre sayısı bakımından diğer gruplardan istatistiksel olarak farklıdır.

4.5.3. ELISA testi sonuçları

Transfekte edilmiş mezenkimal kök hücrelerin BMP6 ifade seviyeleri ve sentezledikleri BMP6 protein miktarları Bölüm 3.8.2.4’de anlatılan şekilde ELISA testiyle belirlenmiştir. Lipofektamin aracılığıyla ve kitosan doku iskeleleleri aracılığıyla BMP6 geni aktarılmış hücrelerin, 21 gün boyunca ürettikleri kümülatif BMP6 protein miktarlarını gösteren grafik Şekil 4.5’de verilmiştir. Verilen grafik takip edilirse, 3. günde hücrelerden alınan kültür ortamında protein tespit edilemediği görülmektedir. Hücreler 5. günden itibaren BMP6 proteini sentezlemeye başlamışlar ve 3 hafta boyunca BMP6 proteinini sentezlemeye devam etmişlerdir. Ayrıca grafikteki veriler dışında, BMP6’nın serbest halde kültür ortamına verildiği örnekler için 3. gün ve 5. günlerde ELISA testi yapılmıştır. Ancak 5. gün sonunda kültür ortamında BMP6 proteini saptanamamıştır. Bu da proteinin 5. gün sonunda yarılanma ömrünü tamamlayarak hücreler üzerindeki uyarıcı etkisinin ortadan kalktığını göstermektedir. BMP6’nın, mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını indüklediği literatürde çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Indrawattana et al., 2004; Estes et al., 2006; Hennig et al., 2007). Ancak bu çalışmaların tümünde, BMP6 proteini serbest halde verildiği için hücrelerin bu proteinle etkileşimi oldukça kısa sürmekte ve farklılaşma tam anlamıyla gerçekleşmeden proteinlerin ömrü tamamlanmaktadır.

Literatürdeki bilgilere göre, mezenkimal kök hücreler kıkırdak dokusuna farklılaşmak üzere uyarıldıklarında, gelişimlerinin ilk haftasında kıkırdağa özgü matris proteinleri üretilmeye başlanır. İkinci haftada bu proteinleri sentezleyen genlerin ifadesi artar ve 3. haftada bu genlerin ifadesi en yüksek düzeye ulaşır (Sekiya et al.,2005).

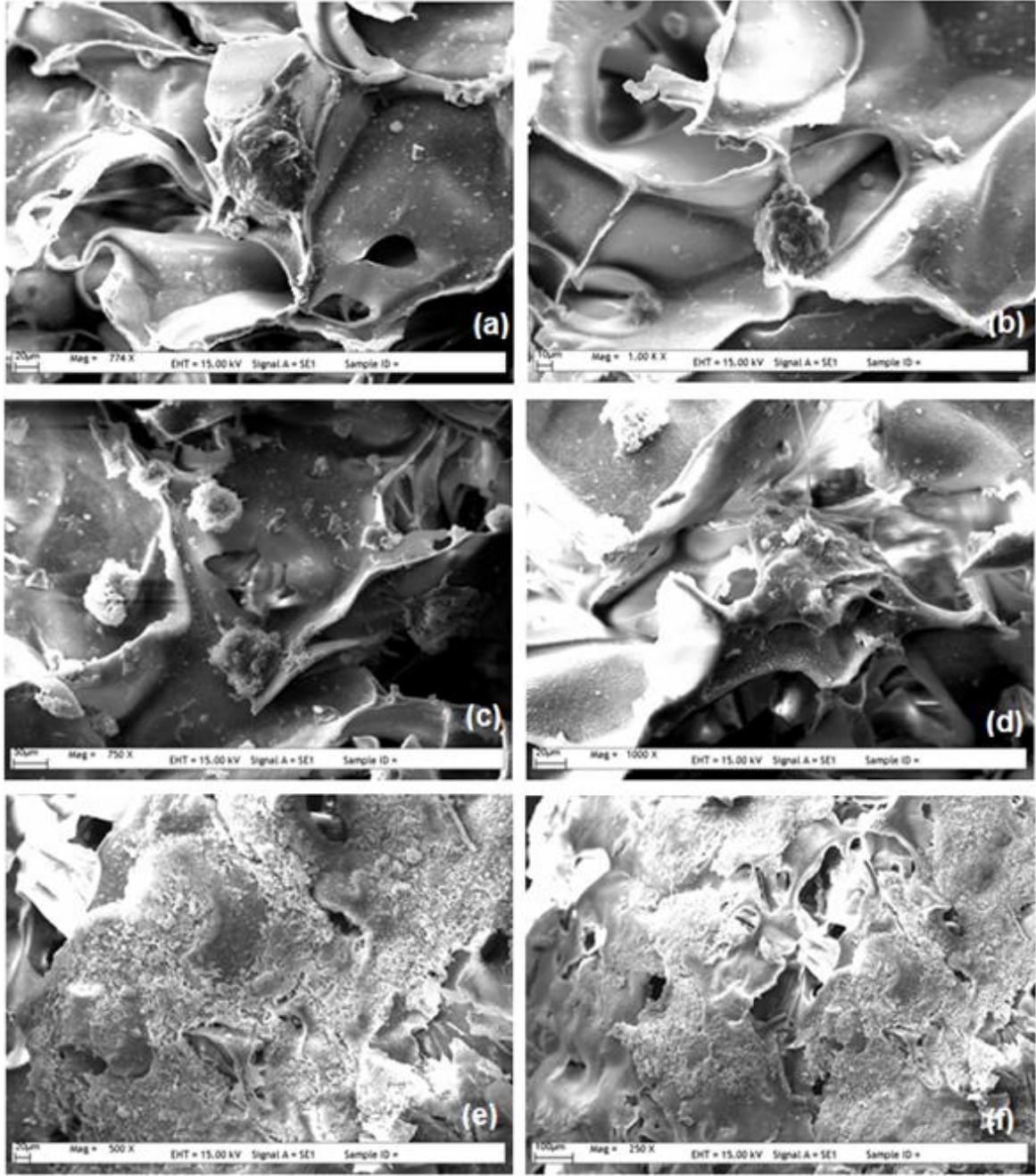
Bu çalışmada, transfekte edilen hücreler 3 hafta boyunca artan miktarlarda BMP6 ekspresyonunu gerçekleştirerek farklılaşma ve büyüme için gereken miktarda ve sürede protein sentezlemişlerdir.

4.5.4. SEM analizi

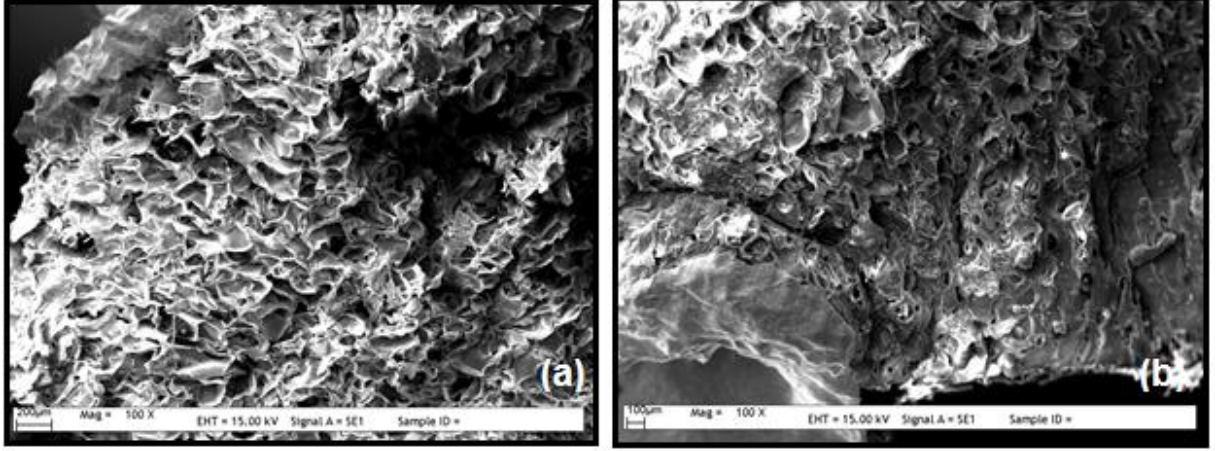
Kültürün 7, 14 ve 21. günlerinde dört gruptan alınan örnekler, mezenkimal kök hücrelerin doku iskeleleri üzerindeki morfolojileri, yapışma ve yayılma eğilimleri ile morfolojik farklılaşmalarının izlenmesi amacıyla SEM ile görüntülenmiş, örneklerin fotoğrafları çekilmiştir. Bu fotoğraflar Şekil 4.13-4.17’de sunulmuştur.

Fotoğraflarda, kitosan doku iskelelerinin gözenekli yapıda ve gözeneklerinin içsel bağlantılı olduğu görülmektedir. İlk haftadan itibaren mezenkimal kök hücrelerin iskelelere yapıştığı, yayıldığı ve sentezledikleri hücre dışı matris yapısıyla gözenekleri doldurmaya başladığı görülmektedir. Genel olarak, iskelelerin yüzeyinde bulunan hücreler yassılaştırmış, gözenekler içinde bulunan hücreler ise küresel şekildedir (Şekil 4.13).

Ondördünce günde, plazmid yüklenmiş kitosan doku iskeleleri, diğer kitosan doku iskeleleriyle kıyaslandığında gözeneklerin biraz daha küçülmüş olduğu görülmektedir (şekil 4.14). Ancak gözenekler, hücrelerin yapışması ve ortamdan besin almasına yetecek kadar büyüktür.

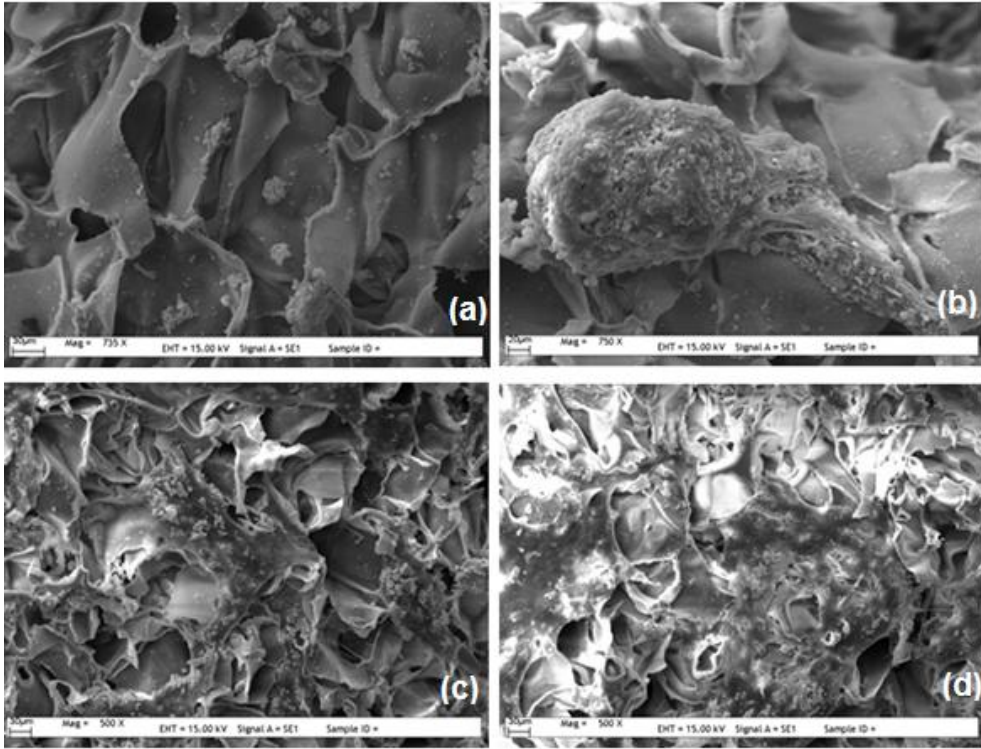


Şekil 4.13. Kitosan doku iskelelerinin 7. güne ait görüntüleri: (a) Plazmid emdirilmiş kitosan+ rBMSCs (x774), (b) Plazmid emdirilmiş kitosan+rBMSCs (x1000), (c) plazmid+rBMSCs (750), (d) plazmid+rBMSCs (x1000), (e) Serbest BMP6+rBMSCs (x500), (f) Serbest BMP6+rBMSCs (x250).

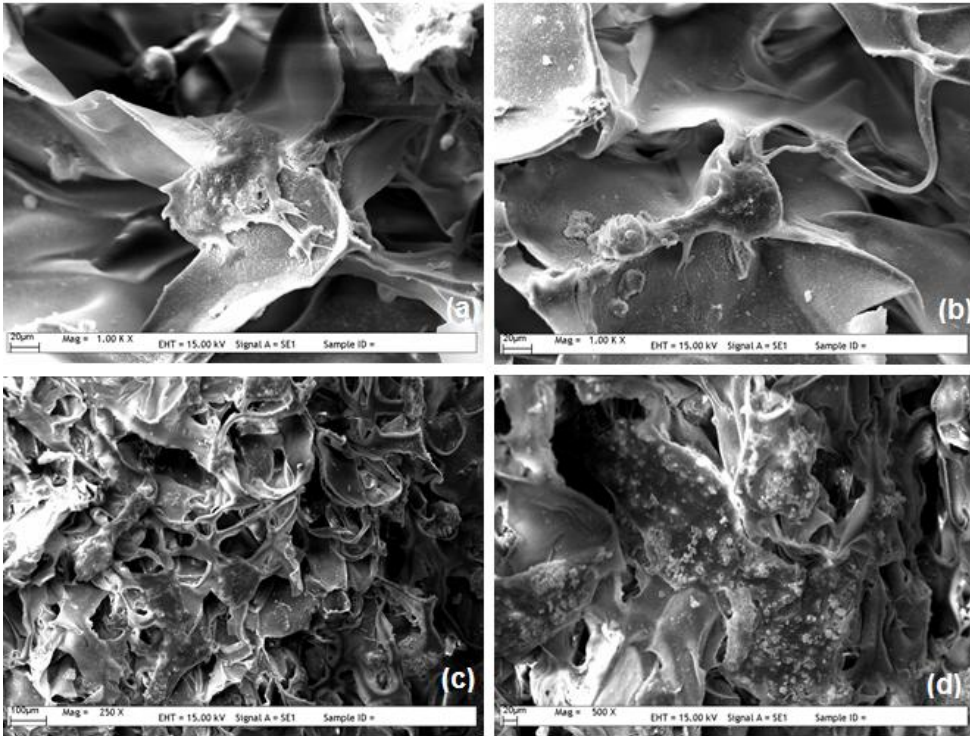


Şekil 4.14. Ondördüncü güne ait SEM görüntüleri (a) Plazmid emdirilmiş kitosan doku iskelesi (x100), (b) Plazmid içermeyen kitosan doku iskelesi (x100).

BMP6 içermeyen kitosan üzerinde, oldukça az sayıda yayılmış hücreye rastlanmıştır ve hücrelerin küresel morfoloji kazanamadıkları, hatta mezenkimal kök hücre morfolojisini kaybetmeye başladıkları görülmektedir (Şekil 4.15.a,b; 4.16.a). Ondördüncü günde, serbest BMP6 içeren kültür ortamında büyüyen hücrelerin kısmen farklılaştığı, bazı hücrelerin iğsi şekillerini kaybederek küresel kondrosit fenotipine dönüştükleri görülmektedir (Şekil 4.15.c,d). Ondördüncü günde, plazmid yüklenmiş kitosandaki ve saf kitosandaki modifiye hücrelerin, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında iskelenin gözenekleri boyunca daha geniş bir alanda yayıldığı, hücre dışı matris yapılarının daha gelişmiş olduğu ve morfolojilerinin küresel kondrosit morfolojisine daha yakın görülmektedir (Şekil 4.16.) Ayrıca yapışmış hücreler arasında bağlantılar olduğu görülmektedir. Bu gelişme, doku oluşumunun başladığının kanıtıdır (Şekil 4.16.a,b,c).

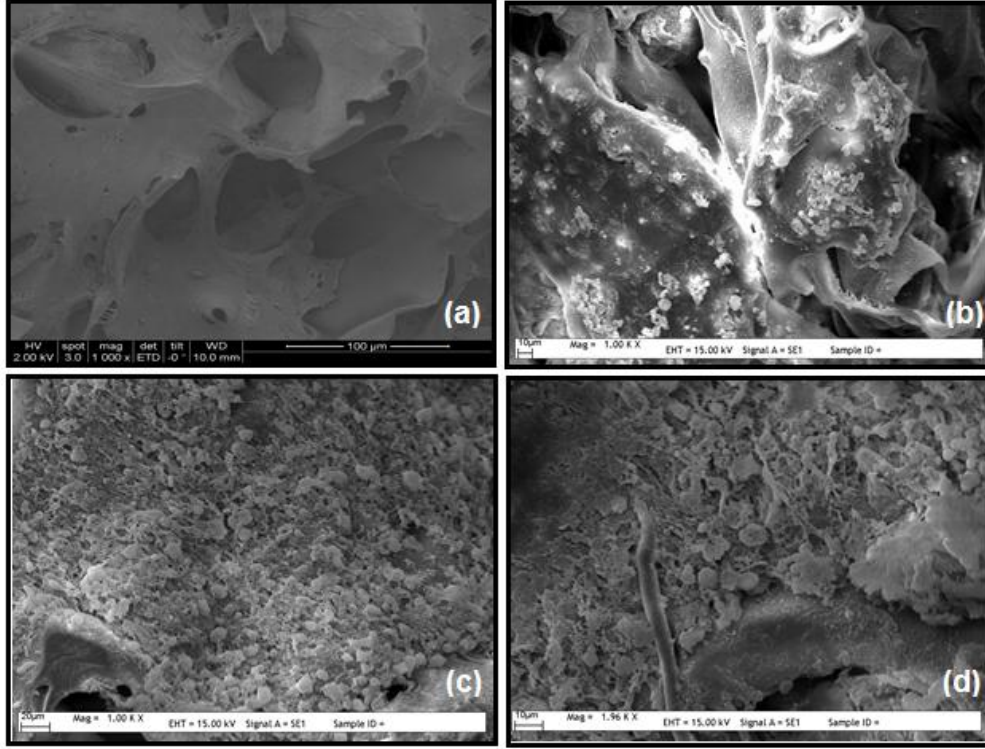


Şekil 4.15. Kitosan doku iskelelerinin 14. güne ait SEM görüntüleri: (a) rBMSCs (x735), (b) rBMSCs (x750), (c) BMP6+rBMSCs (x500), (d) BMP6+rBMSCs (x500).



Şekil 4.16. Modifiye hücreleri içeren kitosan doku iskelelerinin 14. güne ait SEM fotoğrafları:(a) Plazmid emdirilmiş kitosan+rBMSCs (x1000),(b) Plazmid emdirilmiş kitosan+rBMSCs (x1000), (c)Plazmid+rBMSCs(x250), (d)Plazmid+rBMSCs (x500).

Yirmibirinci güne ait fotoğraflarda, sadece hücre içeren saf kitosan grubu hariç, hücrelerin daha fazla çoğalmış ve kitosan doku iskelelerinin yüzeyine oldukça yayılmış oldukları görülmektedir. Hücreler üst üste yığılmaya başladıkları için, tek bir hücrenin morfolojisi belirgin olarak gözlenememektedir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17.rBMSCs ekilmiş kitosan doku iskelelerinin 21. güne ait SEM görüntüleri: (a) rBMSCs (x1000), b) BMP6+rBMSCs (x1000), c) Plazmid+ rBMSCs (x1000), d) Plazmid emdirilmiş kitosan+rBMSCs (x1960).

4.5.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analiz sonuçları

Yapılan tez çalışması kapsamında, dört grup doku iskelesi üzerinde üreyen hücrelerin, kültürün 14. ve 21. günlerindeki agregan, kollajen II ve BMP6 genlerinin ifade seviyelerinin belirlenmesi için Bölüm 3.8.2.5'de anlatılan şekilde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yürütülmüştür. Agregan (Acan) ve kollajen II ifadesi analizi (Col2A1), hücrelerin kıkırdığa farklılaşma durumlarının belirlenmesi için yapılmıştır. Agregan, kıkırdak ECM'sinin karakteristik proteoglikanıdır. Tip II kollajen ise kıkırdak ECM'sinde oldukça yoğun miktarda bulunan bir proteindir. Bu nedenle kıkırdak oluşumuna yönelik olarak yapılan

birçok çalışmada, kondrojenin belirlenmesi için bu iki gen sıklıkla incelenmiştir (Tong and Yao, 2007; Sekiya et al., 2005). BMP6 geninin ifade düzeyinin analizinde amaç öncelikle, kitosan ve lipofektamin aracılığıyla BMP6 geni aktarılmış hücrelerin, bu geni eksprese etmek üzere etkin bir şekilde modifiye olup olmadıklarını incelemektir. Ayrıca bu analizle, iki farklı yolla gerçekleşen gen aktarım sisteminin dolaylı olarak transfeksiyon veriminin belirlenmesi de hedeflenmiştir. Bununla beraber, kültürün ilk gününde BMP6 büyüme faktörü ile uyarılmış hücrelerin, genetik yolla uyarılmış hücrelere ve tüm hücrelerin kontrol grubuna göre ifade düzeylerinin kantitatif olarak karşılaştırılması da amaçlanmıştır.

Yapılan analizin sonuçları değerlendirilirken, örnekler ve haftalar kısaltılarak belirtilmiştir: 1. grup örnekler “K”, 2. grup örnekler “B”, 3. grup örnekler “M” ve 4. grup örnekler “D” olarak kısaltılmış, 2. haftaya ait örnekler “2”, 3.haftaya ait örnekler “3” olarak kısaltmaların yanında belirtilmiştir.Yapılan analiz incelendiğinde, çalışılan örneklerde Agregan (Acan) geninin ifadesinin ölçülemez düzeyde az olduğu anlaşılmıştır. Col2A1 için gen ifadesi yalnızca B2 örneğinde saptanmıştır. Bu nedenle karşılaştırmalı gen ifade analizinin yapılması mümkün olmamıştır. BMP6 gen ifade seviyesi tüm örneklerde çok düşük olmakla birlikte, BMP6 ile modifiye edilmiş M3 örneğinde hiç saptanamazken, M2 örneğinde çok az miktarda saptanmıştır. İleri bir RT-PCR yaklaşımı kullanılarak analiz, BMP6 ve GAPDH genleri için tekrarlandığında, karşılaştırmalı gen ifadesi elde edilmiştir. Ancak sonuçların arasında mantıklı bir ilişki olmadığı görülmektedir. B2 örneğine ait GAPDH ifadesinin diğer örneklere göre ortalama 3000 kat fazla olması, bu genin “house keeping gen” olması nedeniyle bu değer beklenenin oldukça üstünde bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. BMP6 ve GAPDH geni için karşılaştırmalı ve göreceli gen ifadesi.

Örnek	BMP6 göreceli gen ifadesi	BMP6 tekrar sayısı	GAPDH göreceli gen ifadesi	GAPDH Tkrar Sayısı	Karşılaştırmalı BMP6 İfadesi
B2	1,801	2	96,591	2	0,02
B3	15	1	30	2	0,5
D2	101,004	2	21	2	4893,65
D3	21,793	2	31	1	696,87
M2	58	2	110	2	0,53
K2	-	0	15	1	-
K3	-	0	16	1	-

Ayrıca BMP6 genine ait göreceli gen ifadesinin D2 ve D3 örneklerinde, M2 örneğine göre, oldukça fazla olması, hatta M3 örneğinde amplifikasyonun hiç saptanamaması mantıklı bir sonuç olarak değerlendirilmemiştir. Çünkü D ve T gruplarının her ikisi de modifiye hücrelerdir. Bununla beraber yapılan biyokimyasal analiz ile ELISA testi sonuçlarında, bu örnekler için alınan veriler birbirlerine yakın olduğu için, elde edilen kantitatif gen ifadesi güvenilir gözükmemektedir. Ayrıca *house keeping gen* olan GAPDH geni ifadesi için yapılan ilk analizde, bu genin ifadesi 20-30. döngüler arasında saptanabilmiştir. Ancak hücre veya dokudan izole edilen RNA analizlerinde GAPDH amplifikasyonunun 8-12. döngüler arasında saptanabilir olması beklenmektedir. Bu durum, hedef cDNA miktarının beklenenden en az 1000 kat daha az olduğunu göstermektedir. Düşük miktarda cDNA elde edilmesi örneklerin mRNA kalitesinin düşük olmasından ya da örnek miktarının az olmasından kaynaklanabilir. Ancak analizin yapıldığı günlere ait örneklerdeki MTT sonuçları ve SEM analizi, örnek miktarının analiz için yeterli olduğunu, dolayısıyla bu durumun, TRIzol prosedürüyle örneklerden ekstrakte edilmiş olan RNA miktarının düşük olmasından kaynaklandığı anlaşılmıştır.

Literatür araştırmalarından elde edilen bulgular, bu düşüncüyü destekler niteliktedir. Yapılan bir çalışmada, gen ekspresyonunun belirlenmesine yönelik analizler

için, polisakkarit tabanlı biyomalzemelerden RNA ekstraksiyonunun, tek tabakalı kültürlerde gelişen hücreler için kullanılan geleneksel tekniklerle yapılmasının, düşük kalitede RNA elde edilmesine yol açtığı gösterilmiştir (Wang and Stegamann, 2010). Çalışmada kitosan örneklerinden farklı yollarla yapılmış RNA ekstraksiyonu karşılaştırılmış ve buna göre TRIzol (Invitrogen, Carlsbad CA) yöntemiyle elde edilen RNA miktarının (0,89 µg), setil trimetilamonyum bromür (CTAB) ile elde edilen RNA miktarına (3,47 µg) göre oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum, TRIzol prosedürü uygulanırken gerçekleşen RNA kaybından kaynaklanmaktadır. Bu prosedür ile yapılan RNA ekstraksiyonu, katotrofik lizis tamponuyla dokunun sindirilmesi ve RNA içeren sıvı fazın organik fazdan ayrılarak RNA'nın çöktürülmesi prensibine dayanmaktadır. Örneğin sindirilmesinden sonra kalan büyük polisakkarit parçalar nükleik asitlere fiziksel olarak bağlanmaktadır. Ardından faz ayrılması sırasında ayrılan organik fazın santrifüj işleminden sonra uzaklaştırılması, RNA moleküllerinin de bu fazla birlikte atılmasına, böylece düşük miktarda RNA eldesine neden olmaktadır. Bunun yanında, küçük polisakkarit parçaların faz ayrılması sırasında sıvı faza geçmesi, RNA çöktürme aşamasında bu parçaların RNA ile birlikte çökmesine yol açmaktadır. CTAB ekstraksiyon tamponunun içermiş olduğu tuzlar ise RNA'yı bağlamakta ve aynı zamanda polisakkaritlerin çözünmesini sağlamaktadır. Böylece kloroform ekstraksiyonu aşamasında polisakkaritler ortamdan uzaklaştırılarak RNA ile birlikte çökmeleri engellenmiş olur (Wang and Stegamann, 2010).

Çeşitli çalışmalarda, RT-PCR analizi için polisakkarit tabanlı iskelelerden TRIzol yöntemi yapılan RNA ekstraksiyonunda, kullanılan TRIzol miktarının artırılması, örnek hazırlama esnasında; santrifüjleme, kesme ve parçalama gibi mekanik yollarla iskelelerinin parçalanmasıyla yüksek kalitede RNA elde edilebilmiş ve analizlerden sonuç alınabilmektedir.

4.5.6. Doku iskelelerinin biyokimyasal analizi

Hücre-doku iskelesi yapılarındaki hücrelerin kondrojenik aktivitelerinin sayısal olarak değerlendirilmesi ve kondrogenezin kantitatif belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.8.2.6'da anlatılan şekilde, kültürün 14. ve 21. günlerinde biyokimyasal analiz yapılmıştır. Biyokimyasal analiz sonuçlarına ait veriler Çizelge 4.3'te verilmektedir.

Çizelge 4.3. Kitosan, BMP6-kitosan, DNA-kitosan ve modifiye hücre kitosan durgun kültürdeki biyokimyasal bileşimleri (İstatistiksel önem farklılığı, n=3,* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 kitosan kontrol grubudur).

	14. GÜN	21. GÜN
	KİTOSAN	KİTOSAN
GAG (µg)	1,48±0,42	7,75±0,10
GAG (mg)/(g) kuru ağırlık	0,67±0,19	2,28±0,03
DNA µg	1,97±0,06	1,39±0,06
	BMP6-KİTOSAN	BMP6-KİTOSAN
GAG (µg)	2,77±0,37	9,23±0,10
GAG (mg)/(g) kuru ağırlık	0,77±0,10	3,18±0,04
DNA µg	2,20±0,01**	1,68±0,01***
	DNA-KİTOSAN	DNA-KİTOSAN
GAG (µg)	9,59±0,84**	10,89±0,26
GAG (mg)/(g) kuru ağırlık	4,17±0,36**	4,84±0,12***
DNA µg	1,79±0,07*	1,80±0,01***
	MODİFİYE-HÜCRE KİTOSAN	MODİFİYE-HÜCRE KİTOSAN
GAG (µg)	3,32±0,52	12,36±0,68*
GAG (mg)/(g) kuru ağırlık	1,48±0,23	3,75±0,21*
DNA µg	1,71±0,06**	1,98±0,08***

¹Doku

iskelelerinin başlangıç kuru ağırlığı ortalama 3 mg'dır.

Hücre-doku iskelesi yapılarındaki GAG içeriği belirlenirken, kitosanın yapısındaki GAG içeriği hesaba katılmamıştır. Dolayısıyla çizelgede verilen değerler tamamıyla hücrelerin sentezlediği GAG içeriklerini ifade etmektedir.

Çizelge 4.3'ten takip edilirse, 14. günde kitosan grubundaki doku iskelelerinin GAG içeriğinin diğer gruplardakine göre daha az olduğu görülmektedir. GAG birikiminin en fazla görüldüğü iskeleler, modifiye edilmiş hücreleri içeren DNA-kitosan (4,17 mg GAG/g kuru iskele) ve modifiye hücre-kitosan (3,32 mg GAG/g) iskelelerdir. DNA-kitosan iskelelerdeki GAG birikimi ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, farkın önemli derecede fazla olduğu görülmektedir ($p < 0,01$). Elde edilen veriler, ondördüncü güne kadar en yoğun GAG sentezinin kitosan aracılığıyla modifiye edilmiş hücreler tarafından gerçekleştirildiğini göstermektedir. Bu sonuç, DNA-kitosan doku iskelelerindeki hücrelerde GAG sentezinin gerçekleştiği zaman aralıklarında, kırırdağa özgü genlerinin uyarılmış ekspresyon düzeylerinin daha yüksek olduğunun kanıtıdır.

Yirmibirinci güne ait veriler incelendiğinde, tüm gruplardaki kitosan doku iskelelerindeki GAG birikiminde artış olduğu görülmektedir. Ayrıca, modifiye edilmiş hücreleri içeren iskelelerdeki GAG miktarları, normal hücreleri içeren iskelelerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksektir. En fazla GAG birikimi ise 14. gün sonundaki verilerle örtüşür nitelikte DNA-kitosan iskelelerde (4,84 mg GAG/g kuru iskele) görülmüştür ($p < 0,001$). Bu durum, DNA-kitosan iskelelerdeki hücrelerin kondrojenik aktivitelerinin daha fazla olduğunu kanıtlamaktadır. Yirmibirinci günde BMP6 ile uyarılmış üç grup, kontrol grubuyla DNA miktarları açısından kıyaslandığında, üç grubundan da kontrol grubundan önemli derecede yüksek DNA miktarlarına sahip olduğu görülmektedir ($p < 0,001$).

İskele başına düşen DNA içerikleri Bölüm 3.8.2.6'da açıklanan şekilde hesaplanmıştır. Ondördüncü günde BMP6-kitosan, DNA-kitosan ($p < 0,01$) ve modifiye-hücre kitosan ($p < 0,05$) gruplarındaki DNA miktarının, kontrol grubundaki iskelelerden fazla olduğu, bu gruplar arasında en yüksek DNA içeriğinin ise DNA-kitosan iskelelerde saptandığı görülmektedir. Bu sonuç, 14. günde iskelelerdeki

hücre sayısının en yüksek DNA-kitosan iskelelerde bulunduğunu göstermektedir. Yirmibirinci gündeki DNA miktarının, dolayısıyla da hücre sayısının en yüksek modifiye-hücre kitosan iskelelerde olduğu, bu değere en yakın DNA miktarına ise DNA-kitosan iskelelerin sahip olduğu görülmektedir. Bu iki değer istatistiksel olarak anlamlı derecede birbirinden farklıdır ($p<0,05$). Bu sonuç, hücre sayısı açısından değerlendirildiğinde; DNA-kitosan iskelelerdeki hücre sayısının daha az olduğu, sonucuna varılır. Bu durum, farklılaşmış hücre sayısının fazla olmasına bağlı olarak mitojenik aktivitenin bu iskelelerde daha yavaş olmasından kaynaklanabilir.

Sonuçlar, BMP6 büyüme faktörünün hücrelerin kondrojenik aktivitesini arttırıcı bir etkisinin olduğunu göstermektedir. Ayrıca DNA miktarlarının modifiye edilmiş hücreleri içeren iskelelerde, BMP6'nın serbest halde verildiği iskelelere göre önemli derecede yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum, BMP6'nın hücreler tarafından sentezlendiğinde, hücreler üzerindeki uyarıcı etkisinin daha fazla olduğunu kanıtlamaktadır.

Biyokimyasal analiz sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, kondrojenik olarak farklılaşmamak üzere iki farklı yolla modifiye edilen ve kitosan doku iskelelerine ekilen hücreler, kondrositlere farklılaşarak kondrogenezi uyarmışlardır. Kitosan ile modifiye edilmiş hücrelerde kondrojenik aktivitenin daha yüksek olduğu belirlenmiş, *in vitro* koşullarda üretilen BMP6 geni emdirilmiş kitosan-mezenkimal kök hücre yapısının, kırıkta rejenerasyonuna yönelik klinik çalışmalarda kullanılabileceği ispatlanmıştır.

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışmasında, kırık doku mühendisliğinde gen terapi uygulamalarına yönelik olarak, sıçan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreleri BMP6 geniyle modifiye edilmiş ve kitosan doku iskeleleri üzerine ekilerek, kondrojenik farklılaşma davranışları incelenmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen önemli bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- Gen aktarım çalışmalarında kullanılan pShuttle-BMP6 plazmidinin çoklu klonlama bölgesi ve BMP6 cDNA'sı amplifiye edilmiş, elde edilen PCR ürünleri sekanslanarak klonunun plazmidteki varlığı ve nükleotid dizisi doğrulanmıştır.
- pShuttle-BMP6 plazmidi kompetent *E.coli* hücrelerine transforme edilmiştir. Hücrelerin kanamisin antibiyotiği içeren seçici katı besi ortamlarında (LB Broth-Agar) üreyebilmesinden, transformasyon işleminin gerçekleştiği anlaşılmıştır.
- Transforme *E.coli* hücreleri kanamisin içeren sıvı besiyerlerinde kültüre edilmiş ve pShuttle-BMP6, hücreler içinde çoğaltılmıştır.
- Transforme *E.coli* hücrelerinden plazmid izolasyonu, plazmid DNA izolasyon kiti ile yapılmıştır. Elde edilen plazmid DNA, % 1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve agaroz jel görüntüsünde yaklaşık 9500 bp büyüklüğünde olduğu belirlenmiştir.
- Sıçan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin morfolojik karakterlerinin belirlenmesine yönelik olarak, optik mikroskoptaki gözlemleri kristal viyole ile boyanarak yapılmıştır. Hücreler 3. günde iğsi bir morfoloji göstermeye başlamışlar ve 7. günde mezenkimal kök hücrelere özgü tipik fibroblastik morfolojiyi kazanmışlardır. Hücrelerin floresan mikroskoptaki gözlemleri, Alexa Fluor 488-Phalloidin ve Propidyum iyodür ile boyanarak yapılmıştır. Hücreler kültür süresince giderek uzamışlar, 16. günde tamamen iğsi bir morfolojiye ulaştıkları ve gelişmiş bir hücre iskeletine sahip oldukları saptanmıştır.

- Mezenkimal kök hücrelerin hemositometrik sayımları yapılarak hücre üreme eğrisi elde edilmiş, hücrelerin üstel üreme fazındaki özgül üreme hızı $0,0131 \text{ sa}^{-1}$, ikilenme süresi ise 52.9 saat olarak belirlenmiştir.
- Kıkırdak dokusuna farklılaşmak üzere uyarılmış mezenkimal kök hücrelerin, kondrojenik farklılaşmalarının izlenmesine yönelik morfolojik gözlemleri, Safranin-O ile boyanarak yapılmıştır. Kıkırdak dokusuna özgü ECM birikimi ilk, 7. günün sonunda yapılan gözlemlerde görülmüş, 21. gün sonunda ECM birikimi en yoğun şekilde ortaya çıkmıştır. Hücreler iğsi yapılarını kaybetmiş ve kondrositlere özgü küresel morfolojiyi kazanmışlardır. Yirmisekizinci günde, hücreler büyük olasılıkla dedifferansiye olduklarından, fenotipik özelliklerini büyük ölçüde kaybetmişlerdir. Kondrojenik ortam ile inkübasyonu gerçekleştirilmiş kültürlerde kontrol grubuna göre, hücre sayılarının daha az, hücre büyüklüklerinin ise daha fazla olduğu saptanmıştır.
- Çalışma kapsamında, DD %85'ten büyük kitosanla % 2 (w/v) bileşimde hazırlanan kitosan-asetik asit çözeltisinden dondurarak-kurutma yöntemiyle, $\sim 100 \mu$ gözenek çapına, % 81,8 gözeneklilik değerine ve içsel bağlantılı gözeneklere sahip kitosan doku iskeleleri üretilmiştir.
- pShuttle-BMP6 plazmidi, öncelikle katyonik lipozom aracılığıyla mezenkimal kök hücrelere aktarılmış ve yapılan ELISA testiyle, hücreler tarafından salınan BMP6 proteini kantitatif olarak tayin edilmiş, böylece transfeksiyonun gerçekleşip BMP6 geninin hücrelerde eksprese olduğu belirlenmiştir.
- pShuttle-BMP6 plazmidi kitosan doku iskelelerine emdirilerek BMP6 geni ile aktifleşmiş kitosan doku iskeleleri elde edilmiştir. Hücre ekilmiş iskelelerden kültür ortamına salınan plazmid DNA, spektrofotometrik ölçüm yapılarak kantitatif olarak izlenmiştir. İskele yüzeyindeki plazmid DNA'nın büyük bir kısmı 5. gününde birden serbest kalmıştır (burst release=patlama serbest kalışı). Deneysel çalışmaların devam ettirildiği 21 gün boyunca, kitosan doku iskelelerinin plazmid DNA salımını gerçekleştirdiği sonucuna varılmıştır.

- Hücre kültürü çalışmaları 4 grup örnekle yürütülmüştür. Birinci gruptaki kitosan doku iskelelerine yalnızca hücre ekilmiş (kontrol grubu), ikinci gruptaki hücreler kültüre edilirlerken, farklılaşma ortamlarına iskele başına 20 ng olacak şekilde rekombinant BMP6 proteini eklenmiştir. Üçüncü gruptaki doku iskelelerine pShuttle-rBMP6 plazmidiyle modifiye edilmiş hücreler ekilmiştir. Dördüncü gruptaki örnekler ise, pShuttle-rBMP6 emdirilmiş kitosan doku iskelelerine mezenkimal kök hücreler ekilerek hazırlanmıştır.
- Hücrelerin doku iskelelerindeki üreme davranışlarının incelenmesi amacıyla, kültür süresince farklı zamanlarda (3, 5, 7, 9 ve 11. günlerde) yapılan MTT analizi sonucunda; analizin yapıldığı tüm günlerde, BMP6 ile etkileşmeyen kontrol grubundaki hücre sayısının en az olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç, BMP6 proteinin hücrelerin üremesinde ve büyümesindeki uyarıcı etkisinden kaynaklanmaktadır. BMP6 proteiniyle etkileşen grupların tümünde hücre sayısının en yüksek değerine 7. günde ulaşılmış ve 7. günden sonra değerler düşmeye başlamıştır. Literatürden elde edilen bilgiler ışığında, bu durumun BMP6 geninin ifadesine paralel olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Rekombinant BMP6 ile inkübe edilmiş hücrelerin üreme aktiviteleri, kontrol grubundaki hücrelere çok yakındır. Bu durum, rekombinant halde verilen BMP6 proteinin etkisinin kısa sürmesindendir. En yüksek üreme hızına sahip hücreler BMP6 ile modifiye edilmiş hücrelerdir. Lipid bazlı ajan kullanılarak modifiye edilmiş hücrelerin sayısı, kitosan aracılığıyla modifiye edilmiş olanlara göre daha çok artmıştır. Kitosan ile modifiye edilmiş hücrelerde 5.günde salınan DNA miktarının çok yüksek olması nedeniyle, 5. ve 7. günde hücre sayısı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanabilmiştir.
- Kültürün 3, 5, 7, 9, 11,14 ve 21. günlerinde, modifiye hücreler tarafından üretilip kültür ortamına salınan BMP6 proteininin kantitatif olarak hesaplanması için yapılan ELISA testinde, 5. günde hücreler tarafından BMP6 proteini sentezlendiği tespit edilmiş ve hücrelerin 21 gün boyunca artan miktarlarda BMP6 proteinini sentezlemeye devam ettikleri belirlenmiştir. Biyokimyasal analiz sonuçlarında modifiye hücrelerin sentezlediği GAG miktarlarının diğer gruplara daha yüksek olması bu hücreler tarafından sentezlenen BMP6 proteinin hücrelerin farklılaşması için yeterli olduğunu göstermektedir.

- BMP6'nın serbest halde kültür ortamına verildiği örnekler için 3. gün ve 5. günde yapılan ELISA testinin sonuçlarına göre, 5. gün sonunda kültür ortamında BMP6 proteini saptanamamış, bu veriden 5. gün sonunda proteinin yarılanma ömrünü tamamlayarak hücreler üzerindeki uyarıcı etkisinin ortadan kalktığı anlaşılmıştır.
- Kültürün 7, 14 ve 21. günlerinde yapılan SEM analizinde, mezenkimal kök hücrelerin ilk haftadan itibaren iskelelere yapıştığı, iskeleler üzerinde yayıldığı ve sentezledikleri hücre dışı matris yapısıyla gözenekleri doldurmaya başladıkları gözlemlenmiştir. Plazmid yüklenmiş kitosan doku iskeleleri, diğer kitosan doku iskeleleriyle kıyaslandığında gözenekler biraz daha küçülmüştür. Kontrol grubu olan kitosan üzerinde, 7. ve 14. günlerde oldukça az sayıda yayılmış hücreye rastlanmış ve 21. günde hücrelerin fibroblastik mezenkimal kök hücre morfolojisini tamamen kaybettikleri ve hipertrofik bir görünüm kazandıkları gözlemlenmiştir. Ondördüncü günde, serbest BMP6 içeren kültür ortamında büyüyen hücreler kısmen farklılaştıkları; modifiye hücrelerin ise diğer gruplar ile karşılaştırıldığında, iskeleler üzerinde daha homojen bir yayılma gösterdikleri, morfolojilerinin küresel kondrosit morfolojisine daha yakın olduğu, hücreler arası bağlantılara ve daha gelişmiş bir ECM yapısına ve sahip oldukları görülmüştür. Yirmibirinci günde, serbest BMP6 ile etkileşmiş hücrelerde ve özellikle modifiye hücrelerin olduğu iskelelerde, GAG birikiminin oldukça artmış olduğu görülmektedir.
- Hücre-doku iskelesi yapılarındaki hücrelerin; BMP6, kırıkta ECM'sine özgü kollajen 2 (Col2A1) ve aggregan (Acan) genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için kültürün 14. ve 21. günlerinde RT-PCR analizi yürütülmüştür. Ancak; Col2A1 ve aggregan genleri için gen ifadesi saptanamamış, BMP6 geni için ise çok az örnekte, yapılan diğer analizlerin verileriyle çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. GAPDH genine ait analiz bulguları da, örneklerden elde edilen cDNA miktarının beklenenden en az 1000 kat az olduğunu göstermektedir. Bu durumun, TRIzol prosedürüyle gerçekleştiren RNA ekstraksiyonu sırasında meydana gelen RNA kaybına bağlı olduğu düşünülmektedir. Literatürden elde edilen bilgiler de, TRIzol prosedürüyle polisakkarit tabanlı iskelelerden RNA ekstraksiyonunun düşük kalitede RNA elde edilmesine yol açabileceğini göstermektedir.

- Kondrojeninin kantitatif olarak değerlendirilmesi amacıyla kültürün 14. ve 21. günlerinde biyokimyasal analiz yapılmıştır. Analiz sonucuna göre, 14. günde ve 21. günde GAG birikiminin en fazla görüldüğü iskeleler, modifiye edilmiş hücreleri içeren DNA-kitosan ve modifiye hücre-kitosan iskelelerdir. Yirmibirinci günde tüm grublardaki kitosan doku iskelelerinde, GAG birikiminde artış olduğu görülmektedir. Ondrdc güne kadar ve 14. ile 21. gün arasında en az GAG sentezini kontrol grubundaki hücreler gerçekleştirmişlerdir. En yoğun GAG sentezi ise kitosan aracılığıyla modifiye edilmiş hücrelerce yapılmıştır. Bu durum; plazmid emdirilmiş kitosan doku iskelelerinden salımın sürekli gerçekleşmesiyle, her yeni oluşan hücrenin BMP6 geniyle modifiye olarak farklılaşıp kıkırdadığa özgü GAG'ları sentezlemeleri ve böylece GAG birikiminin katlanarak artmasından kaynaklanabilir. Lipid bazlı ajanla gerçekleştirilen gen aktarımında ise modifiye hücreler başlangıç miktarıyla sınırlıdır. Ondrdc gündeki DNA miktarının en yüksek olduğu iskeleler plazmid DNA-kitosan, en düşük DNA miktarının saptandığı iskeleler ise kontrol grubundaki iskelelerdir. Yirmibirinci gündeki DNA miktarı ise, en yüksek modifiye hücre-kitosan iskelelerde görülmüş; bu değere en yakın ancak istatistiksel olarak önemli derecede daha az DNA miktarına sahip iskele ise plazmid DNA-kitosan iskelelerdir. Bu durumun, DNA-kitosan iskelelerde farklılaşmış hücre sayısının fazla olmasına bağlı olarak, bu hücrelerdeki mitojenik aktivinin daha yavaş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Tüm bu verilerden, kondrojeninin en fazla kitosan-DNA grubundaki iskelelerde gerçekleştiği anlaşılmıştır.

Sonuç olarak sunulan tez kapsamında, kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere üretilen, BMP6 geni ile modifiye edilmiş sıçan mezenkimal kök hücreler ve üç boyutlu kitosan doku iskelelerden oluşan yapının, kondrojeninin sağlanması oldukça etkin sistemler olduğu ve klinik uygulamalarda kıkırdak onarımına yönelik olarak kullanımlarının değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır. Bu amaçla çalışmanın bir sonraki aşamasında, araştırmaların in-vivo düzeyde devam ettirilmesi uygun olacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akay, T., 2006, Genel Histoloji, Palme Yayıncılık, ISBN 975-7477-92-3, Ankara, 262s.
- Andree C., Swain, W.F., Page, C.P., Macklin, M.D., Slama, J., Hatzis, D., Eriksson, E., 1994, In vivo transfer and expression of a human epidermal growth factor gene accelerates wound repair. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 12188–92.
- Andree C., Voigt, M., Wenger, A., Erichsen, T., Bittner, K., Schaefer, D., Walgenbach, K.J., Borges, J., Horch, R.E., Eriksson, E., Stark, G.B., 2001, Plasmid gene delivery to human keratinocytes through a fibrin-mediated transfection system, *Tissue Engineering*, 7, 757–66.
- Arpornmaeklong, P., Suwatwirote, N., Pripatnanont, P., Oungbho, K., 2007, Growth and differentiation of mouse osteoblasts on chitosan-collagen sponges, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 36, 328-37.
- Birchall, J.C., Kellaway, I.W., Mills, S.N., 1999, Physico-chemical characterisation and transfection efficiency of lipid-based gene delivery complexes, *International journal of pharmaceutics* 1999;183(2):195-207.
- Bleiziffer, O., Eriksson, E., Yao, F., Horch, R.E., Kneser, U., 2007, Gene transfer strategies in tissue engineering, *J. Cell. Mol. Med.*, 11(2), 200-223.
- Boeckle, S., Wagner, E. 2006, Optimizing Targeted Gene Delivery: Chemical Modification of Viral Vectors and Synthesis of Artificial Virus Vector Systems, *The AAPS Journal*, 8(4), E731-E739.
- Bonadio, J., Smiley, E., Patil, P., Goldstein, S., 1999, Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration, *Nature Medicine*, 5, 753-759.
- Bonadio, J., Steven, A.G., Patil, P., Levy, R.J., 1998, Gene therapy for tissue repair and regeneration, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 5, 53-69.
- Bonadio, J., Tissue engineering via local gene delivery, 2000, *J Mol Med*, 78, 303-311.
- Breitbart, A.S., Laser, J., Parrett., B., Porti, D., Grant, R.T., Grande, D.A., Mason, J.M., 2003, Accelerated diabetic wound healing using cultured dermal fibroblasts retrovirally transduced with the platelet-derived growth factor β gene. *Ann Plast Surg.*, 51, 409–14.
- Chung, C., Burdick, J.A., 2008, Engineering Cartilage Tissue, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 243-262.

- Clouet, J., Vinatier, C., Merceron, C., Pot-Vaucel, M., Maugers, Y., Weiss, P., Grimandi, G., 2008, From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage, *Drug Discovery Today*.
- Cucchiaroni, M., Thurn, T., Weimer, A., et al., 2007, Restoration of the extracellular matrix in human osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX9, *Arthritis Rheum.*, 56(1), 158–167.
- Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E.C., Tilkins, M.L., Price, P.J., Ciccarone, V.C., 2004, Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications, *Methods*, 33, 95–103.
- Dang, J.M., Leong, K.W., 2006, Natural Polymers for Gene Delivery and Tissue Engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 487-499.
- Edelstein, M.L., Abedi, M.R., Wixon, J., 2007, Gene therapy clinical trials worldwide to 2007—an update, *The Journal of Gene Medicine*, 9, 833–842.
- Estes, B.T., Wu, A.W., Guilak, F., 2006, Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6, *Arthritis and Rheumatism*, 54, 1222-1232.
- Evangelista, M.B., Hsiong, S.X., Fernandes, R., Sampaio, P., Kong, H.-J., Barrias, C.C., Salema, R., Barbosa, M.A., Mooney, D.J., Granja, P.L., 2007, Upregulation of bone cell differentiation through immobilization within a synthetic extracellular matrix, *Biomaterials*, 28, 3644-3655.
- Freyman, T.M., Yannas, I.V., Gibson, L.J., 2001, Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering, *Progress in Materials Science*, 46, 273-282.
- Fu, K., Klivanov, A.M., Langer, R., 2000, Protein stability in controlled-release systems, *Nature Biotechnology*, 18, 24-25.
- Gelse, K., Schneider, H., 2006, Ex vivo gene therapy approaches to cartilage repair, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 259-284.
- Gelse, K., von der Mark, K., Aigner, T., et al., 2003, Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells, *Arthritis and Rheumatism*, 48(2), 430–441.
- Gene therapy net., 2011, [http:// genetherapynet.com/clinical-trials.html](http://genetherapynet.com/clinical-trials.html).
- Gene Therapy, 2011, Wikipedia-Gene therapy, [http:// en.wikipedia.org/wiki/Gene_therapy](http://en.wikipedia.org/wiki/Gene_therapy).
- Gerlier, D., Thomasset, N., 1986, Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation, *Journal of Immunological Methods*, 94, 57-63.

- Grande, D.A., Mason, J., Light, E., Dines, D., 2003, Stem cells as platforms for delivery of genes to enhance cartilage repair, *J. Bone Jt. Surg., Am.* 85-A (Suppl 2), 111– 116.
- Guo, C.-A., Liu, X.-G., Huo, J.-Z., Jiang, C., Wen, X.-J., Chen, Z.-R., 2007, Novel Gene-Modified-Tissue Engineering of Cartilage Using Stable Transforming Growth Factor-beta1-Transfected Mesenchymal Stem Cells Grown on Chitosan Scaffolds, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103(6), 547-556.
- Guo, T., Zhao, J., Chang, J., Ding, Z., Hong, H., Chen, J., Zhang, J., 2006, Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta1 for chondrocytes proliferation, 27(7), 1095-1103.
- Hashem, G., Zhang, Q., Hayami, T., Chen, J., Wang, W., Kapila, S., 2006, Relaxin and β -estradiol modulate targeted matrix degradation in specific synovial joint fibrocartilages: progesterone prevents matrix loss, 8(4), 1186-1978.
- Haupt, J.L., Frisbie, D.D., McIlwraith C.W., et al., 2005, Dual transduction of insulin-like growth factor-I and interleukin-1 receptor antagonist protein controls cartilage degradation in an osteoarthritic culture model. *J Orthop Res.*, 23(1), 118–126.
- Hennig, T., Lorenz, H., Thiel, A., Goetzke, K., Dickhut, A., Geiger, F., Richter, W., 2007, Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGF beta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6, *Journal of Cellular Physiology*, 211, 682-691.
- Henrikson, R.C., Kaye G.I., Mazurkiewicz, 1997, *NMS Histology*, Lippincott Williams & Wilkins, 3rd edition, ISBN 978-0683062250, USA, 425s.
- Hidaka, C., Goodrich, L.R., Chen, C.T., et al., 2003, Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7, *J Orthop Res.*, 21(4), 573–583.
- Im, G.I., 2005, Chondrogenesis from mesenchymal stem cells derived from adipose tissue on the fibrin scaffold, *Current Applied Physics*, 5, 438-443.
- Indrawattana, N., Chen, G.P, Tadokoro, M., Shann, L.H., Ohgushi, H. Tateishi, T., 2004, Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320, 914-919
- Ishii, T., Okahata, Y., Sato, T., 2001, Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1514, 51–64.
- Jin, X.B., Sun, Y.S., Zhang, K., Wang, J., Ju, X.D., Lou, S.Q., 2007, Neocartilage formation from predifferentiated human adipose derived stem cells in vivo, *Acta Pharmacologica Sinica*, 28, 663-671.

- Junqueira, L.C., Carneiro J., 2005, Basic Histology Text & Atlas, McGraw – Hill Medical; 11th edition, ISBN 978-0071440912, USA, 502p.
- Kameda, T., Koike, C., Saitoh, K., Kuroiwa, A., Iba, H., 2000, Analysis of cartilage maturation using micromass cultures of primary chondrocytes, *Development Growth & Differentiation*, 42, 229-236.
- Kars, 2004, Nisan, XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Non-Hodgkin lenfoma.
- Katayama, R., Wakitani, S., Tsumaki, N., et al., 2004, Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow, *Rheumatology (Oxford)*, 43(8), 980–985.
- Khor, E., Lim, L.Y., 2003, Implantable applications of chitin and chitosan, *Biomaterials*, 24, 2339-2349.
- Kiang, T., Wen, J., Lim, H.W., Leong, K.W., 2004, The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection, *Biomaterials*, 25, 5293–5301
- Kim, Y.J., Sah, R.L., Doong, J.Y., 1988, Grodzinsky A.J., Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258, *Analytical Biochemistry*, 174, 168–176.
- Kisiday, J.D., Kopesky, P.W., Evans, C.H., Grodzinsky, A.J., McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., 2008, Evaluation of adult equine bone marrow and adiposederived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures, *Journal of Orthopaedic Research*, 26, 322-331.
- Klug, W., Cummings, M.R., 2002, *Genetik Kavramlar*, 6.baskı, Öner, C. (ed.), Palme Yayıncılık, Ankara. pp. 587-588.
- Kofron, M.D., Laurencin, C.T., 2005, Orthopaedic applications of Gene Therapy, *Curr. Gene Ther*, 5, 37–61.
- Kofron, M.D., Laurencin, C.T., 2006, Bone tissue engineering by gene delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 555– 576.
- Laporte, L.D., Shea, L.D., 2007, Matrices and Scaffolds for DNA delivery in tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 292-307.
- Lavertu, M., Méthot, S., Tran-Khanh, N., Buschmann, M.D., 2006, High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation, *Biomaterials*, 27, 4815–4824.

- Learn.genetics, 2011, January., New Approaches to Gene Therapy, Genetic Science Center, [http://learn.genetics.utah.edu/content/tech/gene therapy/gtapproaches](http://learn.genetics.utah.edu/content/tech/gene%20therapy/gtapproaches)
- Leong, K.W., Mao, H.-Q., Truong-Le, V.L., Roy, K., Walsh, S.M., August, J.T., 1998, DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles, *Journal of Controlled Release*, 53, 183–193.
- Li, H., Li, J.Z., Pittman, D.D., Amalfitano, A., Hankins G.R., and Helm, G.A., 2006, Comparison of osteogenic potentials of human rat BMP4 and BMP6 gene therapy using [E1-] and [E1-,E2b-] adenoviral vectors, *Int. J. Med. Sci.*, 3, 97-105.
- Lu, J., Florence, P., Alain, M., Laurent S., Genevieve, G., 1999, Effects of chitosan on rat knee cartilages, *Biomaterials*, 20 , 1937–1944.
- MacLaughlin, F.C., Mumper, R.J., Wang, J., Tagliaferri, J.M., Gill, I., Hinchcliffe, M., Rolland, A.P., 1998, Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for *in vivo* plasmid delivery, *Journal of Controlled Release*, 56, 259-272.
- Madry, H., Emkey, G., Zurakowski, D., et al., 2004, Overexpression of human fibroblast growth factor 2 stimulates cell proliferation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation, *J Gene Med.*, 6(2), 238–245.
- Madry, H., Zurakowski, D., Trippel, S.B., 2001, Overexpression of human insulin-like growth factor-I promotes new tissue formation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation, *Gene Therapy*, 8(19), 1443–1449.
- Mammen, B., Ramakrishnan, T., Sudhakar, U., Vijayalakschmi. 2007. Principles of Gene Therapy, *Indian Journal of Dental Research*, 18(4), 196-200.
- Marlovits, S., Zeller, P., Singer, P., Resinger, C., Vecsei, V., 2006, Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation, *European Journal of Radiology*, 57, 24-31.
- Mason, J.M., Breitbart, A.S., Barcia, M., et al., 2000, Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering [In Process Citation], *Clinical Orthopaedics*, 379, 171–178.
- Meyer, U., Wiesmann, H.P., 2006, *Bone and Cartilage Engineering*, Springer, New York. 37p.
- Munson, J.M., Godbey, W.T., 2007, *Tissue Engineering. Gene Therapy*, CRC Press, Boca Raton. pp. 14.1-14.10.
- Natsume, A., Wolfe, D., Hu, J., Huang, S., Puskovic, V., Glorioso, J.C., Fink, D.J., Mata, 2003, Enhanced functional recovery after proximal nerve root injury by vectormediated gene transfer. *Exp Neurol.*, 184, 878–86.

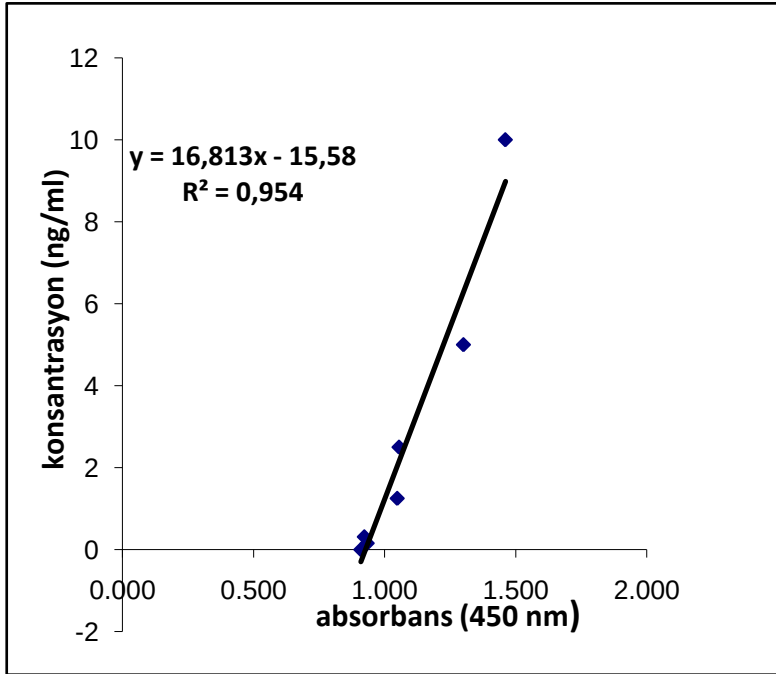
- Nazir, S.A., Metcalf J.P., 2005, Innate immune response to adenovirus, *J. Investig. Med.*, 53, 292-304.
- Nesic, D., Whiteside, R., Brittberg M., Wendt D., Martin I., Mainil-Varlet P., 2006, Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58 300– 322.
- Nixon, A.J., Fortier, L.A., Williams J., et al., 1999, Enhanced repair of extensive articular defects by insulin-like growth factor-I-laden fibrin composites, *J Orthop Res.*, 17(4), 475–487.
- Patel, P., 2009, April, Gene therapy, *Pharmaprojects Update Analysis*, 29(11), 1-3.
- Peng, L., Cheng, X., Zhuo, R., Lan, J., Wang, Y., Shi, B., Li, S., 2009, Novel gene-activated matrix with embedded chitosan/plasmid DNA nanoparticles encoding PDGF for periodontal tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research*, 90(2), 564-76.
repair, *Injury Int. J. Care Injured*, 39S1, S97-S113.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988, primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 239, 487-491.
- Salem, K.A., Leong, K.W., 2006, Gene Delivery from scaffolds. *Scaffolding in tissue engineering*. Peter, X.M., Elisseeff, J. (eds.), CRC Press, USA. pp. 317-328.
- Saraf, A., Mikos, A.G., 2006, Gene delivery strategies for cartilage tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006, 58, 592-603.
- Sekiya, I., Colter, D.C., Prockop, D.J., 2001, BMP-6 enhances chondrogenesis in subpopulation of human marrow stromal cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284, 411-418.
- Sekiya, I., Larson, B.L., Vuoristo, J.T., Reger, R.L., Prockop, D.J., 2005, Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma, *Cell and Tissue Research*, 320, 269–276.
- Serrano, M.C., Pagani, R., Vallet-Regí, M., Peña, J., Rámila, A., Izquierdo, I., Portolés, M.T. 2004, In vitro biocompatibility assessment of poly([var epsilon]-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts, *Biomaterials* 25, 5603-5611.
- Shuler, F.D., Georgescu H.I., Niyibizi, C., et al., 2000, Increased matrix synthesis following adenoviral transfer of a transforming growth factor beta1 gene into articular chondrocytes, *J Orthop Res.*, 18(4), 585–592.

- Smith, P., Shuler, F.D., Georgescu, H.I., et al., 2000, Genetic enhancement of matrix synthesis by articular chondrocytes: comparison of different growth factor genes in the presence and absence of interleukin-1, *Arthritis Rheum.*, 43(5), 1156–1164.
- Steinert, A.F., Nöth, U., Tuan, R.S., 2008, Concepts in gene therapy for cartilage repair, *Injury Int. J. Care Injured*, 39S1, S97-S113.
- Storrie, H., Mooney, D.J., 2006, Sustained delivery of plasmid DNA from polymeric scaffolds for tissue engineering. 58, 500-514.
- Supapruitsakul, S., Chotigeat, W., Wanichpakorn, S., Kedjarune-Leggat, U., 2010, Transfection efficiency of depolymerized chitosan and epidermal growth factor conjugated to chitosan–DNA polyplexes, *Journal of Materials Science*, 21, 1553–1561.
- Takeuchi, Y., Porter, C.D., Strahan, K.M., Preece, F., Gustafsson, K., Cosset, F.L., Weiss, R.A., Collins, K.L., 1997, Sensitization of cells and retroviruses to human serum by (α -3) galactosyltransferase, *Journal of Virology*, 71(8), 6174–6178.
- Tiğlı, R.S., Karakeçili, A., Gümüşderelioğlu, M., 2007, In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 1665-1674.
- Tiğlı, R.S., Gümüşderelioğlu, M., 2009, Chondrogenesis on BMP-6 Loaded Chitosan Scaffolds in Stationary and Dynamic Cultures, *Biotechnology& Bioengineering*, 104(3), 602-610.
- Tong, J.-C., Yao, S.-L., 2007, Novel Scaffold Containing Transforming Growth Factor- β 1 DNA for Cartilage Tissue Engineering, *J. Bioact. Compat. Polym.*, 22, 232–244.
- Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S.J., Young, R.G., Mansour, J.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., 1994, Mesenchymal Cell-Based Repair of Large, Full-Thickness Defects of Articular-Cartilage, *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 76A, 579-592.
- Wang, L., Stegemann, J.P., Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetlytrimethylammonium bromide, 2010, *Biomaterials*, 31, 1612–1618.
- Wang, Y.Z., Kim, U.J., Blasioli, D.J., Kim, H.-J., Kaplan, D.L., 2005, In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells, *Biomaterials*, 26, 7082-7094.
- Wolff, J.A., Lederberg, J., 1994, An early history of gene transfer and therapy, *Human Gene Therapy*, 5, 469-480.

EKLER

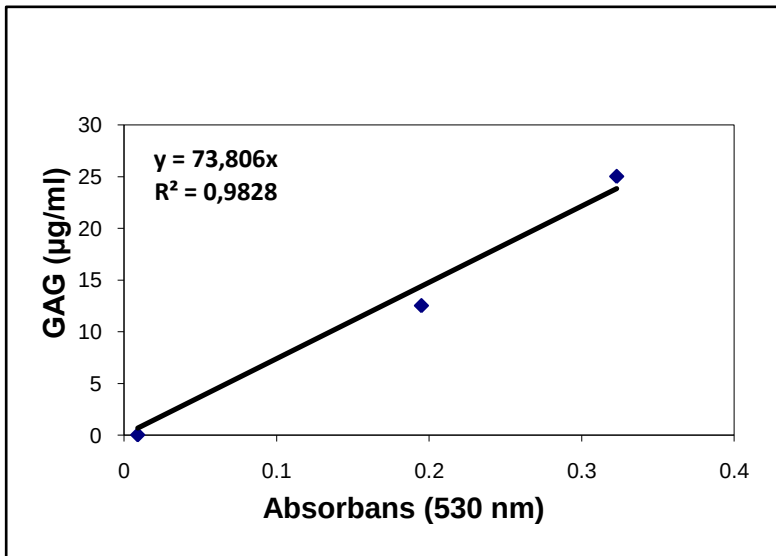
EK-1

BMP6 KALİBRASYON GRAFİĞİ



EK-2

KONDROİTİN SÜLFAT KALİBRASYON GRAFİĞİ



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gonca KARAGÖZ

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1983

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : AnkaraMamak Anadolu Lisesi

Lisans : Mersin Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce (ileri), Almanca (başlangıç)