T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

IN VİTRO OSTEOARTRİT MODELİNDE MİTOKONDRİ TRANSFERİNİN HÜCRE CANLILIĞI VE MAKROFAJ POLARİZASYONUNA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Candan ALTUNTAŞ

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2025

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

IN VİTRO OSTEOARTRİT MODELİNDE MİTOKONDRİ TRANSFERİNİN HÜCRE CANLILIĞI VE MAKROFAJ POLARİZASYONUNA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Candan ALTUNTAŞ

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Gökhan DURUKSU

Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi- Proje No: 2022-TDK-2948

Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)-Proje No: 123S367

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Onay Belge No: GOKAEK-2021/22.17

KOCAELİ

2025

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: *In vitro* Osteoartrit Modelinde Mitokondri Transferinin Hücre Canlılığı ve Makrofaj Polarizasyonuna Etkilerinin İncelenmesi

Tez Yazarı: Candan ALTUNTAŞ

Tez Savunma Tarihi: 29.05.2025

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Gökhan DURUKSU

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Kök Hücre Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ tezi olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		
ÜNVANI	**ADI SOYADI**	**İMZA**
BAŞKAN (ÜYE)	**Prof. Dr. Yusufhan YAZIR**	
DANIŞMAN	**Doç. Dr. Gökhan DURUKSU**	
ÜYE	**Prof. Dr. Murat KASAP**	
ÜYE	**Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI**	
ÜYE	**Prof. Dr. Feray KÖÇKAR**	
ÜYE	**Doç. Dr Ferda TOPAL ÇELİKKAN**	

Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim 3Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

../../….

Prof. Dr. Murat Kasap

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

In vitro Osteoartrit Modelinde Mitokondri Transferinin Hücre Canlılığı ve Makrofaj Polarizasyonuna Etkilerinin İncelenmesi

Amaç

Yaşa ve çeşitli fiziksel zorlamalara bağlı yaygın bir eklem hastalığı olan osteoartrit, kıkırdak dejenerasyonuna neden olarak ağrı ve sakatlığa yol açar. Ağrı tedavisi mevcut olsa da kıkırdak rejenerasyon seçenekleri sınırlıdır. Ekzojen mitokondri transferi yeni bir rejeneratif yaklaşımdır. Bu çalışmanın amacı ekzojen mitokondri transferinin osteoartritik kondrositlerde hücresel fonksiyon, oksidatif stres, inflamasyon, apoptoz ve ATP seviyeleri üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

Yöntem

Sinovyal sıvıdan izole edilen mezenkimal kök hücrelerden (MKH) kondrojenik farklılaşma sonrası ficoll temelli kondrosit izolasyonu yapılmış ve izole edilen kondrositlerin karakterizasyonları Alcian Blue boyaması, agrekan, kolajen tip2, COMP ve prolaktin gen ekspresyon seviyeleri ve immünofloresan işaretleme ile (kolajen tip2 ve agrekan) yapıldı. Kimyasal olarak indüklenmiş makrofaj farklılaşmasını takiben M1-makrofaj koşullandırılmış ortam ve doğrudan M1 makrofajlar ile kondrositler ile birlikte kullanılarak iki enflamatuar model oluşturuldu. Çalışmada insan Wharton jeli ve insan kemik iliği MKH'lerinden mitokondrilerin bu modellere transferi analiz edilerek karşılaştırıldı. Transfer etkileri mitokondriyal membran potansiyeli, hücre canlılığı, apoptoz, gen ekspresyonu ve oksidatif durumu ve ATP seviyeleri incelenerek değerlendirildi.

Bulgular

Sinoyal sıvı MKH'lerinden kondrojenik farklılaşma sonrası ficoll temelli kondrosit izolasyonu sonucunda elde edilen kondrositlerin kondrosit karakterizasyonuna sahip olduğu doğrulandı. Mitokondri izolasyonundan önce İKİ-MKH'lerin iWJ-MKH'leri beta galaktosidaz enzim

aktiviteleri incelenerek yaşlılık fenotipleri belirlendi ve İKİ-MKH'lerin iWJ-MKH'lerine göre daha yoğun boyandığı belirlendi. Mitokondri takibi yüksek transfer verimliliği gösterdi (iWJ-MKH'ler için %99,62, iKİ-MKH'ler için %91,34). Geç apoptoz, iWJ-MKH'lerin mitokondrilerinin transferinden sonra M1-makrofaj koşullandırılmış ortam ile modelde %5,58'den %2,93'e önemli ölçüde azalmıştır. TNF-α ve IL-1β ekspresyonu mitokondri aktarımından sonra azalmıştır. Ki-67 ekspresyonu, transfer sonrasında artan ATP üretimi ve azalan HMOX-1 ekspresyon seviyelerine paralel olarak indüklenmiştir. Enflamatuar modellerden sonra hücrelerdeki ATP seviyelerinde görülen 2,5 ve 5 katlık düşüş, iWJ-MKH'ler mitokondri transferinden sonra kullanılan enflamatuar modele bağlı olarak 3,1 ve 100 kat iyileşti. ROS seviyeleri değişmeden kalmasına rağmen, MDA seviyeleri azaldı ve kolajen tip 2 ekspresyonu arttı.

Sonuç

Mitokondri transferi, enflamatuar osteoartrit modellerinde kondrosit disfonksiyonunun temel yönlerini iyileştirmiştir. Bu bulgular, hasarlı kondrosit sağlığını ve işlevini doğrudan iyileştirerek osteoartriti tedavi etmek veya yavaşlatmak için terapötik potansiyelini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Osteoartrit, Kondrojenik farklılaşma, Mitokondri transferi, Makrofajlar, Mezenkimal kök hücreler

ABSTRACT

Investigation The Effects Of Mitochondria Transfer On The Cell Viability and The Macrophage Polarization in an *In Vitro* Model of Osteoarthritis

Objective

Osteoarthritis, a common age-related joint disease, causes cartilage degeneration, leading to pain and disability. While pain management exists, cartilage regeneration options are limited. Exogenous mitochondria transfer is a novel regenerative approach. This study aimed to investigate the effects of exogenous mitochondrial transfer on cellular function, oxidative stress, inflammation, apoptosis and ATP levels in osteoarthritic chondrocytes.

Methods

Ficoll-based isolation of chondrocytes was performed from mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from synovial fluid. Following this, the characterization of isolated chondrocytes was conducted using Alcian Blue staining, as well as analysis of aggrecan, collagen type 2, COMP and prolactin gene expression levels, and immunofluorescent labelling of collagen type 2 and aggrecan. The present study established two inflammatory models. The first model was established using chemically induced macrophage differentiation, followed by M1-macrophage conditioned media. The second model was established using direct M1 macrophages in combination with chondrocytes. The study compared mitochondria from Wharton's jelly (WJ-) and bone marrow (BM-) MSCs by analyzing their transfer to these models. Transfer effects were evaluated by mitochondrial membrane potential, cell viability, apoptosis, gene expression, and oxidative state.

Results

After chondrogenic differentiation from synovial fluid MSCs, ficoll-based chondrocyte isolation confirmed that the chondrocytes obtained was chondrocyte characterization. Before mitochondrial isolation, senescence phenotypes were determined by examining the beta

galactosidase enzyme activities of the hWJ-MSCs of the hBM-MSCs and it was determined that hBM-MSCs stained more intensely than hWJ-MSCs. Mitochondria tracking showed high transfer efficiencies (99.62% for WJ-MSCs, 91.34% for BM-MSCs). Late apoptosis was significantly reduced after transfer of WJ-MSCs mitochondria from 5.58% to 2.93% in the model with M1-macrophage conditioned medium. Expression of TNF-α and IL-1β was reduced after mitochondrial delivery. The expression of Ki-67 was induced in parallel with increased ATP production and reduced HMOX-1 expression levels after the transfer. A decrease of 2.5- and 5-fold in ATP levels in cells after the inflammatory models were recovered after WJ-MSCs mitochondria transfer by 3.1- and 100-fold depending on the inflammatory model used. Although ROS levels remained unchanged, MDA levels decreased, and collagen type-2 expression increased.

Conclusion

Mitochondria transfer improved key aspects of chondrocyte dysfunction in inflammatory osteoarthritis models. These findings support its therapeutic potential for treating or slowing osteoarthritis by directly improving damaged chondrocyte health and function.

Keywords: Osteoarthritis, Chondrogenic differentiation, Mitochondria transfer, Macrophages, Mesenchymal stem

TEŞEKKÜR

Doktora tezimi, Türkiye Cumhuriyeti'nin kuruluşundan itibaren toplumsal hayatın her alanında kadının yer almasını savunan, "Ey kahraman Türk kadını! Sen omuzlar üzerinde göklere yükselmeye layıksın" diyerek Türk kadınını onurlandıran Gazi Mustafa Kemal Atatürk'ün ilham verici sözlerinden güç alan tüm Türk kadınlarına ithaf ediyorum.

Akademik bilgi ve donanımını benimle her zaman cömertçe paylaşan, rehberliği ve desteğiyle yolumu aydınlatan, öğrencisi olmaktan her zaman büyük bir gurur duyduğum değerli danışmanım **Doç. Dr. Gökhan DURUKSU**'ya, doktora eğitimim boyunca, yalnızca akademik anlamda değil, her konuda desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen; bana sonsuz bir güven veren ve "Stres altında cevher mücevher olur" sözüyle ömrüm boyunca aklımda kalacak bir rehberlik sunan Sayın bölüm başkanım **Prof. Dr. Yusufhan YAZIR**'a şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitimim süresince akademik bilgi birikimlerini ve samimi desteklerini esirgemeyen değerli bölüm hocalarım **Prof. Dr. Meltem Göksel ŞAHİN**'e**, Doç. Dr. Gülçin GACAR**'a**, Doç. Dr. Serap MERT**'e**, Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI**'na teşekkür ederim. Bilimsel bakış açımı geliştirmeme ve bu süreçte kendimi daha fazla ileriye taşımama sağladıkları katkılar için minnettarım.

Tez çalışmam boyunca bana destek veren, çalışmamda motivasyonumu artıran ve gerektiğinde benimle birlikte çözüm arayan güler yüzlü ekip arkadaşlarım **Selenay Hümeyra FURAT**, **Ahmet ÖZTÜRK, Can KILIÇ, Canan ÖZTÜRK, Deren ASLAN, Bahar AYDOĞDU, Merzet AYDEMİR, Hilal ÇAĞLAYAN, Gamze LİMAN, Rabia Sema SUSOY, Elif Nur UZUNHASANOĞLU, Özge KÖSEOĞLU, Melike KARTAL, Yahya KIRANSOY, Yağmur GEDİK, Eylül KARAALAN, Yağmur YILMAZ, Dilbar ALAKBARLİ, Derya EYÜBOĞLU, Emine YILMAZ, Tülin BURHANOĞLU**, **Nergiz ERDOĞAN**, **Burcu AKARSU, Fatih HUNÇ ve Gülşen ÇELEBİ**'ye teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olup beni destekleyen, sabrı ve sevgisiyle bana güç veren canım eşim **Barış ALTUNTAŞ** ve biricik kızım **Nehir ALTUNTAŞ**'a sonsuz teşekkür ederim. En zor anlarımda bile bana inanmaktan hiç vazgeçmedikleri için ve bu yolculuğu birlikte daha güzel kıldıkları için minnettarım. Hayatımın her anında yanımda olup, bana koşulsuz sevgi ve destek veren, bu yolculukta gücümü ve motivasyonumu hiç eksik etmeyen sevgili annem **Emir Kadın**

AKDIR ve babam **Hıdır AKDIR**'a sonsuz teşekkür ederim. Verdiğiniz emekler, gösterdiğiniz sabır ve bana her zaman inandığınız için minnettarım.

Doktora eğitimim sırasında, Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2211-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında destek sağlayan TÜBİTAK'a, 100/2000 öncelikli alanlar doktora burs desteği sağlayan YÖK'e, teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje Numarası: 2022-TDK-2948) ve TÜBİTAK 1002-A Hızlı Destek Programı (Proje Numarası: 123S367) tarafından desteklenmiştir.

ORİJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bilim Uzmanlığı tezi olarak hazırlayıp sunduğum **"*In vitro* Osteoartrit Modelinde Mitokondri Transferinin Hücre Canlılığı ve Makrofaj Polarizasyonuna Etkilerinin İncelenmesi''** başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

29 /05 /2025

Candan ALTUNTAŞ

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **vi**
TEŞEKKÜR ..... **viii**
ORİJİNALLİK BİLDİRİMİ ..... **x**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xiv**
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **xvii**
TABLOLAR LİSTESİ ..... **xix**
1.GİRİŞ **1**
1.1 Osteoartrit **2**
1.2. Osteoartrit Risk Faktörleri **4**
1.3. Osteoartrit ve Enflamasyon **5**
1.4. Osteoartrit ve Makrofaj İlişkisi **6**
1.5. Tedavi Seçenekleri **10**
1.6. Osteoartritte Hücresel Tedaviler **11**
1.6.1. Kök Hücre 11
1.6.1.1.Farklılaşabilme Potansiyellerine Göre Kök Hücreler 12
1.6.1.2.Elde Edildikleri Yere Göre Kök Hücreler 13
1.6.2. Osteoartrit ve Mezenkimal Kök Hücre 15
1.7. Osteoartrit ve Mitokondri **19**
2.AMAÇ **24**
3.YÖNTEM **26**
3.1. Deney Grupları **26**
3.2. Deney Akışı **27**
3.3. Hücre Kültürü **28**
3.4. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu **29**
3.4.1. Akım sitometrik Analiz 29
3.4.2. Farklılaştırma Deneyleri 30
3.4.2.1. Adipojenik farklılaştırma 30
3.4.2.2. Osteojenik farklılaştırma 31
3.4.2.3. Kondrojenik farklılaştırma 31
3.5. Makrofaj Farklılaştırılması ve Kondisyonlanmış Besiyer Hazırlığı **33**

3.6. In Vitro Osteoartrit Modeli Oluşturma **34**
3.7. Mitokondri İzolasyonu ve Hasar Modeline Transferi **34**
3.7.1. X-gal Boyama 34
3.7.2. iWJ-MKH ve iKİ-MKH'lerinden Mitokondri İzolasyonu 35
3.7.3. MitoTracker Red Boyaması 35
3.7.4. TMRM (Tetrametilhodamin metal ester) Boyaması 36
3.7.5. Falloidin Boyaması 36
3.7.6. Hasar Modeline Mitokondri Transferi 36
3.8. Mitokondri Transferinin Hasar Modeli Üzerindeki Etkinliğinin İncelenmesi **37**
3.8.1. Real Time PCR (qRT-PCR) Analizi 37
3.8.2. IL1-β ve IL-4'ün ELISA Ölçümü 40
3.8.3. Apoptoz Ölçümü 41
3.8.4. ROS (Reaktif Oksijen Türleri) Ölçümü 41
3.8.5. Hücre Canlılık Ölçümü 42
3.8.6. TBARS (Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler, MDA) Ölçümü 42
3.8.7. Adenozin trifosfat (ATP) Ölçümü 43
3.9. İstatistiksel Analizler **44**
4.BULGULAR **45**
4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları **45**
4.1.1. Mezenkimal Kök Hücrelerinin Kültürü ve Çoğaltılması 45
4.1.2. Hücre Karakterizasyon Çalışmaları 46
4.1.2.1. Kök hücre immünofenotiplemesi 46
4.1.2.2. Kök hücrelerin farklı hücre tiplerine farklılaşmaları 47
4.1.2.3. U937 hücrelerinin M1 makrofaja farklılaşması 48
4.1.2.4. iSS-MKH'ların kondrojenik farklılaşması, kondrosit izolasyonu ve karakterizasyonu 52
4.1.3. Uygulanacak mitokondri konsantrasyonunun WST-8 ile belirlenmesi 54
4.1.4. iWJ-MKH ve iKİ-MKH'lerinden Mitokondri İzolasyonu ve Akım Sitometride İncelenmesi 55
4.1.5. Mitokondri Transfer Etkinliğinin Konfokal Mikroskobunda İncelenmesi 57
4.1.6. Osteoartrit Hasar Modeli İçin Ko-kültür Oluşturulması 59
4.2. Mitokondri Transferinin Hasar Modeli Üzerindeki Etkinliğinin İncelenmesi **61**

4.2.1. Mitokondri Transferinin Hasarlı Kondrositlerdeki Apoptoz Durumu 61
4.2.2. Mitokondri Transferinin ROS Seviyesi Üzerindeki Etkisi 64
4.2.3. Mitokondri Transferinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi 66
4.2.3. Mitokondri Transferinden Sonra Gen Ekspresyon Profilleri 66
4.2.4. Deney Grupları Arasındaki ATP Seviyeleri..... 74
4.2.5. TBARS Ölçümüyle Oksidatif Hasar Düzeyleri 74
5.TARTIŞMA 76
5.1.Sınırlılıklar **..... 90**
6.SONUÇ VE ÖNERİLER 92
7.KAYNAKLAR..... 94
8.ÖZGEÇMİŞ 119
EKLER..... 123
EK.1 Etik kurul onayı**..... 123**
EK 2. Tez Denetleme Listesi**..... 124**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACAN: Agrekan

Act-β: Beta Aktin

ADAMTS: Bir Disintegrin ve Trombospondin Motifli Metaloproteinaz

ADP: Adenozin Difosfatı

AMPK: Adenozin Monofosfat-Aktive Protein Kinaz

ARG: Arginaz

ASKH: Amniyotik Sıvı Kök Hücre

ATP: Adenozin trifosfat

BCA: Bikinkoninik Asit

BMP: Kemik Morfogenetik Protein

BSA: Sığır Serum Albümini

CCK-8: Hücre Canlılık Analizi

cDNA: Komplementer Deoksiribonükleik Asit

CIA: Kolajen Kaynaklı Artrit

Col2: Tip II Kolajen

Cyt-C: Sitokrom Kompleksi

DAPI: 4,6-diamidine-2'-phenylindole

DC-FDA: 2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate

DMEM-F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiriboz Nükleik Asit

ECM: Ekstraselüler Matriks

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit

EGTA: Etilen Glikol Tetraasetik Asit

EKH: Embriyonik Kök Hücre

ELİSA: Enzime Bağlı İmmünosorbent Analizi

FBS: Fetal Sığır Serumu

FITC: Fluoresan İzotiyosiyonat

HIF-1α: Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa

HKH: Hematopoetik Kök Hücreler

HLA-DR: İnsan Lökosit Antijen

HRP: Horseradish peroksidaz

IFN-γ: İnterferon Gamma

IL-1R1: İnterlökin-1 Reseptör 1

IL-1β: İnterlökin-1 beta

IL-4: İnterlökin-4

IL-6: İnterlökin-6

ITS: İnsülin-Transferrin-Sodyum Selenit

iKİ-MKH: İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre

iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

iSS-MKH: İnsan Sinovyal Sıvı Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre

iWJ-MKH: İnsan Wharton Jeli Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre

JNK: c-Jun N-Terminal Kinaz

LC-3: Mikrotübül İlişkili Protein 1 Hafif Zincir 3

LPS: Lipopolisakkarit

MKH: Mezenkimal kök hücre

MMP: Matriks Metaloproteinaz

mRNA: Mesajcı RNA

mtDNA: Mitokondrial Deoksiriboz Nükleik Asit

NADH: Nikotinamid-Adenin Dinükleotidi

NEAA: Gerekli Olmayan Aminoasit

NKH: Nöral Kök Hücreler

OA: Osteoartrit

OXPHOS: Oksidatif Fosforilasyon

PBS: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

PFA: Paraformaldehit

PI: Propidium iyodür

PKH: Pluripotent Kök Hücre

PMA: Phorbol 12-miristat

RNA: Ribonükleik Asid

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

RT-PCR: Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SHE: Standart Hidrojen Elektrot

TBARS: Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler

TGF-β: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta 1

TIMP-1: Metalloproteinazların Doku İnhibitörü 1

TMRM: Tetramethylrhodamine, Metil Ester

TNF-α: Tümör Nekroz Faktörü Alfa

uPKH: Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre

α-MEM: Minimum Essential Medium

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. OA gelişimindeki risk faktörleri……6
Şekil 1.2. Makrofaj tipleri ve fonksiyonları……9
Şekil 1.3. Kök hücre sınıflandırılması…… 12
Şekil 1.4. MKH kendini yenileme ve farklı hücre tiplerine farklılaşabilme özellikleri……... 16
Şekil 1.5. Hücre temelli tedavi olarak MKH'nin kıkırdak rejenerasyonundaki yeri……19
Şekil 1.6. Mitokondri yapısı…… 21
Şekil 1.7. Mitokondri fonksiyonlarına genel bir bakış…… 22
Şekil 3.1. Deney grupları……..27
Şekil 3.2. Tez çalışmasının deney akışı……28
Şekil 3.3. Ficoll yöntemiyle kondrosit izolasyonu……... 33
Şekil 3.4. ELISA analizinde kullanılan standartların hazırlanışı…… 42
Şekil 3.5. ATP ekstraksiyonu……... 45
Şekil 4.1. Kullanılacak hücrelerin morfolojik fotomikrografları…… 46
Şekil 4.2. iSS-MKH immünofenotiplemesi……..47
Şekil 4.3. iKİ-MKH immünofenotiplemesi…… 47
Şekil 4.4. iWJ-MKH immünofenotiplemesi……48
Şekil 4.5. MKH'ların Oil Red O, Alizarin Red S ve Alcian Blue boyamalarını gösteren fotomikrograf…… 49
Şekil 4.6. M1 makrofaj farklılaşma aşamaları……..50
Şekil 4.7. M1 makrofaj farklılaşmasında kullanılan strateji 1……..50
Şekil 4.8. M1 makrofaj farklılaşmasında kullanılan strateji 2……..51
Şekil 4.9. M1 makrofaj farklılaşmasında kullanılan strateji 3……..52
Şekil 4.10. M1 makrofaj farklılaşmasında IL-4 ve IL-1β konsantrasyonları……... 52
Şekil 4.11. 15 ve 21 günlük kondrojenik farklılaşma sonrası Alcian Blue (mavi) boyamaları53
Şekil 4.12. İzole edilen kondrositlerin gen ifade profilleri……...54
Şekil 4.13. iSS-MKH ve kondrosit hücrelerinde agrekan ve kolajen tip 2 antikorlarıyla immünofloresan işaretleme……...55
Şekil 4.14. Kondrosit hücrelerine uygulanacak olan mitokondri konsantrasyonunun WST-8 ile belirlenmesi……...56

Şekil 4.15. TMRM boyaması sonrası akım sitometri analizi……... 56
Şekil 4.16. MitoTracker Red boyaması sonrası akım sitometri analizi……57
Şekil 4.17. iWJ-MKH ve iKİ-MKH'lerinde X-gal boyaması…….. 58
Şekil 4.18. Mitokondri uygulanmayan hücrelerin DAPI ve falloidin boyamalarını gösteren fotomikrograf…… 59
Şekil 4.19. Mitotracker Red ile boyanarak mitokondri transferi yapılan grupların fotomikrograftı……..59
Şekil 4.20. TMRM ile boyanarak mitokondri transferi yapılan grupların fotomikrograftı..... 60
Şekil 4.21. *In vitro* osteoartrit hasar modeli oluşturma…….61
Şekil 4.22. Mitokondri transferi sonrası deney grupları arasındaki IL-1β ve IL-4 seviyelerinin ELISA sonuçları……61
Şekil 4.23. Hasar grubu 1 apoptoz analiz sonucu……62
Şekil 4.24. Hasar grubu 2 apoptoz analiz sonucu……64
Şekil 4.25. Geç apoptozun toplam apoptoza oranının sütun grafiği……65
Şekil 4.26. ROS ölçümlerinin akım sitometri sonuçları……... 66
Şekil 4.27. Akım sitometri sonucunda elde edilen ROS seviyelerinin median floresans yoğunluk grafiği……67
Şekil 4.28. WST-8 analiz sonucunda hücre canlılık profilleri…… 67
Şekil 4.29. BAX-1 ve BCL-2 gen ekspresyon profilleri…….. 68
Şekil 4.30. ACAN, Kolajen tip 2, SOX9 gen ekspresyon profilleri……....69
Şekil 4.31. IL-1β, IL-4, TNF-α gen ekspresyon profilleri……...71
Şekil 4.32. HIF-1α, HMOX-1, Ki-67 gen ekspresyon profilleri…….. 73
Şekil 4.33. NOX-4 ve MCT4 gen ekspresyon profilleri……..74
Şekil 4.34. ATP ölçüm sonuçları……..75
Şekil 4.35. Hücre kültür mediumunda MDA konsantrasyon öçümleri……... 76

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Hücre kültüründe kullanılan besiyer içerikleri……...30

Tablo 3.2. RT-PCR içerikleri**……...**40

Tablo 3.3. qRT-PCR basamakları**……**40

Tablo 3.4. qRT-PCR'da kullanılan genlere ait primer sekansları **……** 41

Tablo 4.1. HG1 ve mitokondri uygulama gruplarında Annexin V- FITC ölçümü……. 64

Tablo 4.2. HG2 ve mitokondri uygulama gruplarında Annexin V- FITC ölçümü……..65

1.GİRİŞ

Osteoartrit en yaygın kas iskelet sistemi hastalığından biridir ve dünya genelinde engelliliğin önde gelen nedenlerindendir. Osteoartrit çoğunlukla 50 yaşın üzerindeki bireyleri etkiler. Osteoartritin patogenezi henüz belirlenememiş karmaşık bir süreçtir. Başlıca klinik semptomları kronik ağrı, eklem dengesizliği, sertlik, eklem deformasyonları ve radyografik eklem alan daralmasıdır. Osteoartritteki patolojik olaylar moleküler, hücresel ve doku düzeylerinde meydana gelir. Sonuç olarak kıkırdak yıkımını, sub-kondral sklerozu, sinovyal enflamasyonu, ligament ve menisküs gibi diğer eklem yapılarına zarar vererek ağrıya ve eklem fonksiyonunun kaybına neden olur. Kıkırdak bozulması, eklem bozulmasına neden olan tek olay olmasa da osteoartrit patogenezindeki rolü önemlidir. Patolojik olaylara katkıda bulunan diğer bir faktör, eklem kıkırdağında apoptoz ve otofaji arasındaki dengesizliktir (Blanco ve Rego-Perez, 2018).

Eklem kıkırdağı esas olarak doku sıvısı, kolajen tip II (Col2) ve proteoglikanlardan oluşur. Islak ağırlığın %65-80'i kıkırdak doku sıvısıdır. Bu yüksek sıvı içeriği, besinlerin ve oksijenin kıkırdak matriksinden hücrelere yayılmasını sağlar. Col2, kıkırdak ıslak ağırlığının %15-22'sini ve proteoglikanlar da %4-7'sini oluşturur. Tip V, VI, IX, X, XI, XII, XIV kolajenler, dekorin, biglikan, fibromodulin, lumikan, epifikan ve perlekan gibi diğer kolajenler ve proteoglikanlar da küçük bir kısmı (%5'ten az) oluşturur. Eklem kondrositleri, eklem kıkırdağındaki tek hücre tipidir ve hücre dışı ortamın oluşturulmasından ve korunmasından sorumludur (Xia ve ark., 2014). Kondrositler hipoksik bir ortamda bulunur ve hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa (HIF-1α), hipoksik tepkinin düzenlenmesinde hayati bir rol oynar, kondrositlerin hayatta kalması ve büyümesinin durmasını düzenleyen dokudaki hücresel oksijenasyon düşüşlerine yanıt verir. HIF-1α'nın aktivasyonu, kondrositlerin otofajisini, apoptozunu ve hücre dışı matriks çevresini düzenleyebilir, enflamatuvar sitokinleri azaltabilir. Ayrıca osteoartritin mitokondriyal fonksiyonunu düzenleyen kondrogenik fenotipi koruyabilir ve sonuçta kıkırdak bozulmasını geciktiren daha yoğun bir kolajen matriks oluşur. Bu nedenle, HIF-1α, kondrosit enflamasyonu ve metabolizmasını düzenlediği için osteoartritte önemli bir terapötik hedeftir (Lane ve ark., 2015). Kondrositler mitokondri açısından zengin olmasa da mitokondriyal disfonksiyon ve

metabolik bozukluk osteoartritin başlaması ve ilerlemesinde tanımlayıcı bir özelliktir (He ve ark., 2020). HIF-1α'nın kondrositlerde hayatta kalmayı teşvik etmesinin, mitokondri tarafından oksijen tüketiminin baskılanmasıyla gerçekleşebileceği düşünülmektedir (Long, 2019). Kondrosit mitokondriyal solunumunun uyarılması, redoks homeostazının korunmasıyla sonuçlanan hücresel oksijen türlerinin üretimi ve tüketimi üzerinde bir etkiye sahiptir (Lane ve ark., 2015; Zeng ve ark., 2022).

Kıkırdaktan başlayarak zaman içinde tekrarlayan mikro- ve majör- travmalar sonucunda kondrosit yapım/yıkımı arasındaki denge bozulur, kıkırdak metabolizması ile matriks moleküllerinin sentezi hızlanır. Zamanla eklem bölgesinde Col2 başta olmak üzere yapısal proteinler azalır ve hasarlanma başlar. Bu katabolik sürecin sonucunda kondrositler apoptoza girer ve geri dönüşü olmayan dejenerasyon gerçekleşir. Osteoartrit patogenezi, mekanik etkiler ile hücresel ve enflamatuvar faktörler arasındaki karmaşık etkileşimin sonucunda gelişmektedir. Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin temel öğelerinden olan makrofajlar, enflamasyon ve konak savunmasında merkezi bir rol oynar. Organizmadaki iç ve dış değişikliklere yanıt vererek fizyolojik homeostazın sağlanmasını kontrol eden makrofajlar, kan ve diğer dokularda yaygın bir dağılım gösterirler. Makrofajlar enflamatuvar sinyallere yanıt olarak zararlı endojen ve yabancı maddeleri tanıma ve yok etme işlevlerini yerine getirirler. Farklı etkilere yanıt olarak işlevlerini polarize olarak hızla değiştirebilen oldukça heterojen hücrelerdir (Chen ve ark., 2020). Aktive makrofajlar, enflamatuvar kemik hastalığında kemik kaybında önemli rol oynayan pro-enflamatuvar sitokinleri salgılayabilir. Aynı zamanda mikroorganizmalara karşı organizmanın savunmasında, anti-tümör immün yanıtlarında, anti-enflamatuvar cevapta, doku onarımında ve homeostazda rol oynarlar; ancak bazı durumlarda enflamasyonu ve tümör büyümesini de teşvik edebilirler.

1.1 Osteoartrit

Osteoartrit (OA) görülme sıklığı çok yüksek olan eklem hastalıklarından biridir. Dünya genelinde yaklaşık olarak 300 milyon OA'lı hastanın olduğu bilinmektedir (Cisternas ve ark., 2016). Yaşlı bireylerde engelliliğin en önemli nedenlerinden olan OA; eklem ağrılarına, işlev kaybına ve yaşam kalitesinde ciddi bir azalmaya neden olur. Toplumsal ölçekte OA'nın tıbbi maliyetlerinin yıllık olarak ortalama 303 milyar dolara mal olduğu belirlenmiştir (Abramoff ve Caldera, 2020). OA genellikle eklem hastalığı olarak bilinse de aslında enflamatuvar ve metabolik faktörlerden oluşan çok daha karmaşık bir süreçtir.

Eklem kıkırdağı, su (>%70) ve esas olarak Col2, agrekan veya diğer proteoglikanlardan oluşan organik hücre dışı matriks bileşenlerinden oluşur. Kondrositler, öncelikle hücre dışı matriksin bileşenleri üzerindeki reseptörler aracılığıyla, periselüler matriksteki mekanik stresi ve değişiklikleri tespit eder. Mekanik veya enflamatuvar uyarıya yanıttaki değişiklik, agrekanaz ve kolajenazın yukarı regülasyonuyla sonuçlanır. Ayrıca, dinlenme halindeki kondrositlerdeki reseptörler, periselüler matriksin benzersiz bileşimi sayesinde belirli matriks bileşenleriyle etkileşime girmekten korunur. Hücre matriksinde Col2 içeren ağlar, proteoglikanlarla kaplandıkları için genellikle bozulmazlar. Kıkırdak matriksini parçalayan ana enzimler, matriks metaloproteinaz (MMP) ve Disintegrin ve Trombospondin Motifli Metaloproteinaz (ADAMTS)'dır. MMP'ler MMP-1 ve MMP-13 kolajenazlarını (substrat olarak Col2'ye karşı etkili), MMP-3'ü (güçlü bir agrekanaz) ve MMP aktivatörünü içerir (Troeberg ve Nagase, 2012). Kıkırdak erozyonunda proteoglikan azalmasının önemi, OA modelinde nakavt fareler kullanılarak yapılan çalışmada gösterilmiştir; bu çalışmada, birincil agrekanaz olan ADAMTS-5 ifadesinin korunduğu tespit edilmiştir (Glasson ve ark., 2005). Bununla birlikte, MMP-13 nakavt farelerde kıkırdak erozyonunun inhibe olduğu ve agrekan azalmasının tek başına OA ilerlemesini yönlendirmediği belirlenmiştir (Little ve ark., 2009). Kolajen ağı parçalanmaya başladığında, geri dönüşü olmayan kıkırdak parçalanması devam eder ve enflamasyon oluşur. Prostaglandin E2, MMP'nin kıkırdak dejenerasyonu için çok önemli olduğu OA ile ilişkili başlıca katabolik faktörlerden biridir (Jang ve ark., 2021).

OA'da, kondrosit kaybı ve fenotipik değişimle birlikte, kıkırdak dokusu katabolik fenotip ve hipertrofik farklılaşma süreçlerine bağlı olarak kademeli olarak kaybolur. Bu süreç, kıkırdak hücrelerinin küme oluşumunu ve farklılaşmasını içerir. Subkondral kemiğin yeniden şekillenmesi, osteoblastları ve duyu sinirlerini içeren yapılarda yer alan kan damarlarının gelişmesiyle ortaya çıkar. Vasküler kanallar kemik ve kıkırdak arasındaki biyokimyasal iletişimi kolaylaştırmaktadır. Çoklu uyarılara yanıt olarak kondrositler fenotipi değiştirir ve faktörlerin bir alt kümesini (sitokinler, kemokinler, alarminler, hasarla ilişkili moleküler model ve adipokinler gibi) ifade eder. Tüm bu aracılar parakrin faktörler olarak görev yapar, kıkırdak yıkımının kısır döngüsünü başlatır, sinovyal sıvıya ulaşır ve faktörün sinovyal makrofajları ve fibroblastlarının üretimi ile enflamatuvar bir süreci tetikler. Vasküler kanallarda duyusal sinir sonlanmaları vardır ve eklem kıkırdağının ilgili innervasyonu, geniş bir yapısal hastalık şiddeti aralığında OA ile ilişkili tibiofemoral ağrıya katkıda bulunabilir (Houard ve ark., 2013; Suri ve ark., 2007).

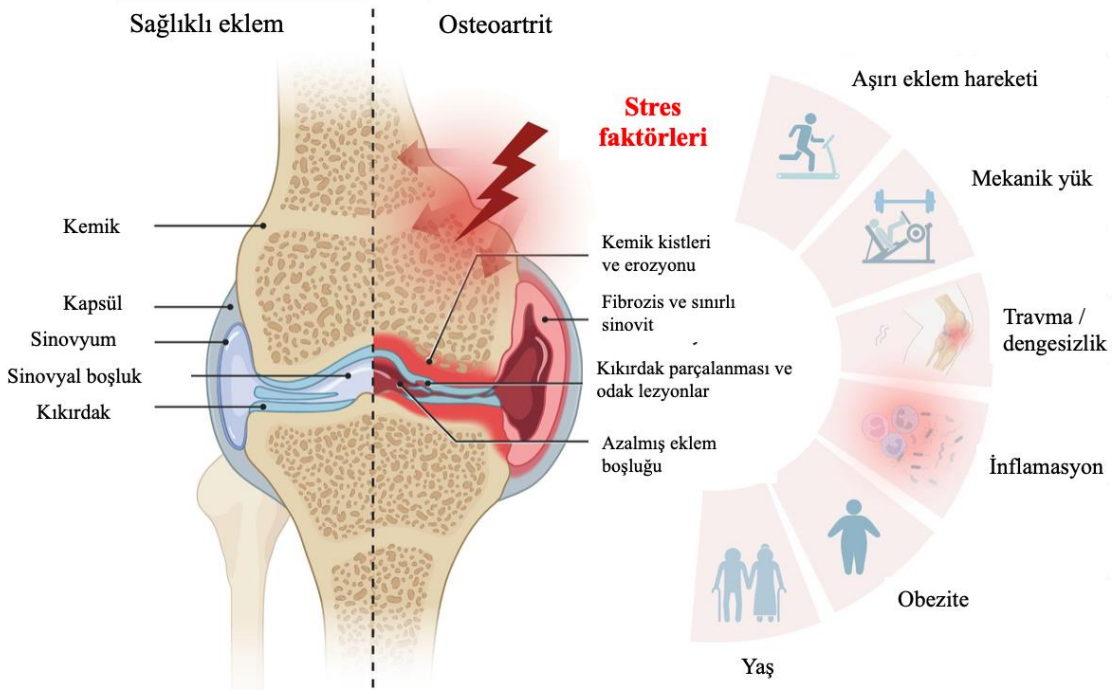
Hastalığın patolojisinde en dikkat çekici olan, ciddi şekilde bozulan eklem kıkırdağıdır. Eklem kıkırdağı, uzun kemiklerin ucunda ve omurlar arası disklerin içinde bulunan pürüzsüz kıkırdaktır. Ağır yükleri taşıyamazken, artikülasyon için düşük bir sürtünme yüzeyi sağlar. Kıkırdak içindeki kolajenin yarı ömrü uzun olmasına rağmen küçük yaralanmalarda bile çok yavaş iyileşir. En belirgin değişiklikler kıkırdakta olmasına rağmen, sinovyum, eklem bağları ve subkondral kemik de dahil olmak üzere eklemin tamamının etkilenmesidir (Mobasheri ve Batt, 2016). Aktif sinovyal enflamasyon ve sistemik enflamasyon OA patojenezinde önemli rol oynamaktadır. Bilinen 2 teori vardır. Birincisi, bozulmuş kıkırdağın sinovyal hücreler içinde yabancı cisim olarak tanınarak reaksiyona neden olmasıdır. Bu durum metaloproteinazların üretimine, sinovyal anjiyogeneze ve enflamatuvar sitokinlerin üretimine yol açarak daha fazla kıkırdak yıkımına neden olabilir. İkincisi ise OA'nın ilerlemesinde aktive sinovyal makrofajların ve doğuştan gelen bağışıklık sisteminin merkezi bir rol oynadığının ileri sürülmesidir (Berenbaum, 2013).

Sistemik enflamasyon da OA patogenezinde rol oynayabilir. Yapılan bir çalışmada vücut ağırlığının el OA gelişimi için güçlü bir risk faktörü olduğu bulunmuştur (Yusuf ve ark., 2010). Diz, insanlardaki en büyük sinovyal eklemdir ve kemik yapılar (distal femur, proksimal tibia ve patella); kıkırdak (menisküs ve serbest kıkırdak); bağlar, intrapatellar yağ yastığı ve sinovyumdan oluşur. Sinovyum, kıkırdağı kayganlaştıran ve besleyen sinovyal sıvının üretiminden sorumludur. Bununla birlikte, bu eklemin sık kullanımı ve üzerindeki yüksek stres göz önüne alındığında, özellikle OA olmak üzere ağrılı durumların sık görüldüğü bir bölgedir. OA'nın hastalık değerlendirmesi genellikle yavaştır ve yıllar sürebilir. Ardışık olarak, hastalık aşamalardan geçebilir veya zaman içinde kademeli evrim göstererek hastalığın şiddetini ve semptomlarını daha da kötüleştirebilir (Jang ve ark., 2021).

1.2. Osteoartrit Risk Faktörleri

OA, genel olarak iki tipte sınıflandırılabilir. Birincil tipte bilinen bir neden yoktur. İkincil tip ise travma, obezite veya hastalık gibi diğer durumların neden olduğu tiptir. OA hastalarında en belirgin semptom, ağrıdır. Yapılan bir çalışmada, OA hastalarının ağrılarının iki şekilde oluştuğu belirlenmiştir (sürekli bir ağrı ve aralıklı yoğun ağrı) (Hawker ve ark., 2008). Ağrılar sonucunda, hasta belirli hareketlerden kaçınır. Ağrı dışındaki diğer semptomlar arasında eklem şişmesi, eklem kilitlenmesi, kramp ve hareket edildiğinde eklemlerde deformite yer alır. Sistemik semptomların görülmesi beklenmez (ateş, kilo kaybı

veya anormal kan testi sonuçları) çünkü böyle durumlar olduğunda enfeksiyon veya malignite gibi durumlardan şüphelenilmektedir (Altman ve ark., 1991). Genel olarak, yaşam kalitesi birçok alanda önemli ölçüde etkilenmektedir. Fiziksel kısıtlamalar, yaşam kalitesinin azalmasına neden olmanın ötesinde, ruh sağlığı üzerinde de olumsuz etkiler oluşturmaktadır. (Abramoff ve Caldera, 2020).



Şekil 1.1. OA gelişimindeki risk faktörleri (Abramoff ve Caldera, 2020; Musumeci ve ark., 2015).

1.3. Osteoartrit ve Enflamasyon

OA hastalarının çoğunda sinovyal enflamasyon ve kondrositlerin pro-enflamatuvar/katabolik durumu ile karakterize edilen nispeten düşük dereceli enflamasyon mevcuttur (van den Bosch, 2021). Grandi ve arkadaşları, OA hastalarında enflamasyonun tutarlı bir şekilde arttığı ve IL-1R1, TNF-RII'yi eksprese ettiği ve JNK, SMAD1/5 sinyal yolakları ile etkileşimde olduğunu göstermiştir (Grandi ve ark., 2020). Deshmuck ve arkadaşları, yeni küçük moleküllü lorecivivint'in, kondrosit farklılaşmasının artması ve kıkırdak bozulmasının azalmasıyla ilişkili olan NFκ-B ve STAT3 sinyallemesini inhibe ederek anti-enflamatuvar kapasiteler sergilediğini gösterdi (Deshmukh ve ark., 2019). Düşük dereceli sinovyal enflamasyon temel olarak makrofajların temel düzensiz hücre tipi olarak ortaya çıktığı doğuştan gelen bağışıklık efektör hücrelerinin aktivasyonu ile karakterize edilir. T hücrelerinin sinovyumda mevcut olduğu belirlenmiş olmasına rağmen, OA

genellikle bir otoimmün hastalık olarak kabul edilmez. Makrofajlar genel olarak doku homeastazının korunmasında kritik aracılar olarak kabul edilir ve sonuç olarak düzensizlik oluştuğunda OA'nın patolojisi ve semptomolojisinde rol oynadıkları düşünülmektedir.

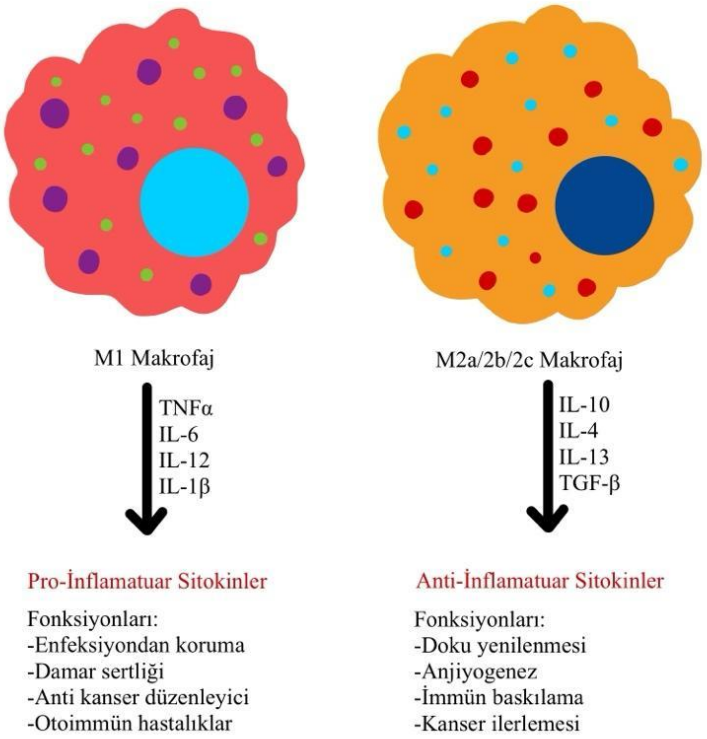
1.4. Osteoartrit ve Makrofaj İlişkisi

Merkezi sinir sistemi mikrogliaları, kemik osteoklastları, akciğerlerdeki alveoler ve karaciğerdeki Kupffer hücreleri gibi hücreler dokularda özel makrofajlar olarak bulunur ve bunların hepsi doku homeostazisinin korunmasında önemli bir rol oynar (Shapouri-Moghaddam ve ark., 2018). Monositler, beyaz kan hücrelerinin yaklaşık %5-10'unu oluşturan kemik iliği kaynaklı bir popülasyondur ve makrofajların çoğu polarize olmuş monositlerdir. Monositlerin yaklaşık iki günlük bir ömrü vardır, ancak dokulara göç edip makrofajlara dönüştüklerinde bu süre birkaç aya kadar uzar ve onların uzun süre işlev görmesini sağlar (Sica ve ark., 2015). Makrofajlar sıklıkla bağışıklık fonksiyonlarını uygulayarak konakçının mikroorganizmalara karşı savunmasından sorumludur, ancak aynı zamanda otoimmün hastalıklar ve kötü huylu (malign) tümörlerle de yakından ilişkilidirler (Kadomoto ve ark., 2021). Önceki araştırmalarda makrofajların yalnızca tek bir türde var olduğu düşünülüyordu, ancak son araştırma bulguları, makrofajların birden fazla alt tipinin olduğunu göstermektedir. Makrofaj alt tipleri hakkında hala cevaplanmamış birçok soru olduğundan, mevcut araştırmalar M1 ve M2 makrofajlarına odaklanmaktadır. Makrofajlar, M1 ve M2 olmak üzere iki farklı duruma geçebilir ve bu durumları, bulundukları dokuya ve çevresel sinyallere bağlı olarak değişebilir. Yani, M1 tipi makrofajlar M2'ye dönüşebilir veya tam tersi de gerçekleşebilir. Bu dönüşüm, makrofajların bulundukları mikro çevreye ve bağışıklık tepkisinin gereksinimlerine bağlı olarak gerçekleşir. 2000'li yıllardan beri M1 makrofajlarının pro-enflamatuvar, M2 makrofajlarının ise anti-enflamatuvar olduğu bilinmektedir (Kadomoto ve ark., 2021).

M1 makrofajlar klasik olarak en bilinen makrofajlardır ve lipopolisakkarit (LPS) ve interferon gamma (IFN-γ) tarafından indüklenir ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) gibi pro-enflamatuvar sitokinler ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) salgılarlar (Bashir ve ark., 2016). Bu salgılar bakteri, virüs ve malign tümör hücreleri gibi mikroorganizmaları öldürme yeteneğine sahiptir; ölü hücreler fagositoz yoluyla makrofajlar tarafından alınır (Belgiovine ve ark., 2016; Qiu ve ark., 2019). Makrofajlar tarafından alınan yabancı maddeler veziküller halinde lizozomlarla birleşir ve

lizozomlarda bulunan hidrolitik enzimlerin etkisiyle parçalanır. Bu nedenle, M1 makrofajlarının enfeksiyon savunması ve anti-kanser etkileri insan vücudunda homeostazın korunmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Aşırı immün yanıtlar kronik enflamasyona ve enflamatuvar hastalıklara yol açabilir ve bu nedenle M1 makrofajlarının fonksiyonu düzenli olmalıdır (Li ve ark., 2018). M1 makrofajlar CD80, CD86, CD68 ve CD16/32'yi aşırı eksprese eder (Yunna ve ark., 2020).

M2 makrofajlar doku onarımı ve immün toleransta rol oynar. M2 makrofajları, sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü STAT-6'nın aktivasyonu yoluyla IL-4 ve IL-13 gibi sitokinler tarafından indüklenir. Enflamatuvar yanıtı baskılamak için IL-10, arginaz (ARG) ve dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF-β) salgılar (Bashir ve ark., 2016). M2 makrofajları aynı zamanda hücrede artıkları temizleyerek ve hem yara iyileşmesini hem de anjiyogenezi tetikleyerek etki gösteren güçlü fagositlerdir. M2 makrofajlar ayrıca organların ve yumuşak dokuların korunmasında ve bağışıklık dengesinin düzenlenmesinde rol oynar. Bununla birlikte, malignite çalışmalarında, tümörle ilişkili makrofajların (TAM'ların) sıklıkla M2 fenotipine sahip olduğu ve tümör ilerlemesini teşvik ettiği bilinmektedir. Bu durum, M2 makrofajlarının tümör gelişimi açısından olumsuz bir etkisi olabileceğini göstermektedir (Belgiovine ve ark., 2016). Makrofajlar, fenotiplerine bağlı olarak farklı fonksiyonlara sahip olup, insan sağlığının korunmasında, hastalıkların iyileşmesinde veya kötüleşmesinde anahtar rol oynarlar. Bu nedenle hem sistemik hem de lokal tedavilerde makrofaj polaritesinin yönetilmesi önemlidir (Kadomoto ve ark., 2021).



Şekil 1.2. Makrofaj tipleri ve fonksiyonları (Kadomoto ve ark., 2021).

Sinovyum, iki farklı doku katmanından oluşur ve eklemde sinovyal sıvının üretimi ve tutulmasında önemli bir rol oynar. İlk katman, intimal astar katmanı olarak adlandırılır ve iki veya üç katmandan oluşan makrofaj ve fibroblast benzeri sinoviyositleri içerir. İkinci katman, sinovyal alt astar katmanı olup fibröz bağ dokusu ve kan damarlarından oluşur ve az sayıda lenfosit ve makrofaj içerir (Culemann ve ark., 2019; Smith ve ark., 2003). İntimal astarda polarize makrofajların birikmesi sinovyal enflamasyonun temel morfolojik özelliğidir ve çoğunlukla proliferatif sinovyal dokuya işaret eder (Daghestani ve ark., 2015). OA'da kıkırdak parçaları, agrekan, fibronektin ve hücre içi proteinler, nekrotik hücreler, makrofaj aktivasyonunu uyaran ve enflamatuvar sitokinler ve kemokinler üreten hasarla ilişkili moleküler modeller Damage associated moleculer pattern (DAMP'ler) görevi görür. Ek olarak, hasar görmüş menisküslerden salınan doku artıkları ve bu artıkların salgıladığı moleküller, OA sırasında sinovyal enflamasyonun tetiklenmesinde rol oynayabilir. Bu tür aracılar yalnızca ek makrofajları ve lenfositleri toplamakla kalmaz, aynı zamanda makrofajlar ve kondrositler tarafından enflamatuvar sitokinlerin ve metaloproteinazların sentezini de artırır. Bunu, kondrositler ek sitokinler ve proteolitik enzimler ürettikçe, daha

fazla sinovyal enflamasyona neden olan ve sonunda kıkırdak bozulmasını artıran, zarar veren bir döngü izler. Makrofajlar doğuştan gelen bağışıklıkta çok önemli bir rol oynar ve onların polarize fenotipleri OA'nın ilerlemesi ile ilişkilidir. Ancak bunun gerçekleştiği spesifik mekanizma açıklığa kavuşturulamamıştır (H. Zhang ve ark., 2020). Mahon ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışma, temel kalsiyum fosfat kristallerinin M1 benzeri makrofaj farklılaşmasını indüklediğini ve enflamatuvar makrofaj fonksiyonlarını düzenleyen glikolitik enerji metabolizmasına doğru bir kaymaya yol açtığını ortaya koymuştur (Mahon ve ark., 2020).

Başka bir çalışmada, OA hastalarından alınan sinovyal sıvıda kıkırdak hücre dışı matriks proteini lumikan'ın arttığı ve LPS kaynaklı TLR4 sinyalinin yükseldiği ortaya konmuştur. Bu durum, M1 benzeri makrofaj ekspresyonunun artması ve M2 benzeri makrofaj belirteçlerinin azalmış ekspresyonu ile ilişkili bulunmuştur (Barreto ve ark., 2020). Bu çalışmalar, OA ile ilişkili enflamasyonda makrofajların anahtar aracılar olarak önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca, bu hücrelerin modüle edilmesinin veya özelliklerini değiştiren faktörlere müdahale edilmesinin mümkün olduğunu desteklemektedir (van den Bosch, 2021). Bir başka çalışmada ise, SPECT-CT (tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi) kullanılarak etarfolatid (steorid içermeyen antiinfiamatuvar bir ilaç) ile tespit edilen OA eklemlerinin %76'sında aktifleştirilmiş makrofajların toplandığı belirlenmiştir. Bu makrofajların miktarlarının, diz ağrısı, osteofitler, eklem aralığı daralması ve eklem boşluğu gibi OA semptomlarıyla önemli ölçüde ilişkili olduğu görülmüştür. Daghestani ve arkadaşları bol miktarda aktif makrofajın OA ekleminde yapısal ilerlemeye (CD163 ve CD14) ve ağrıya (CD14) aracılık ettiğini göstermektedir (Daghestani ve ark., 2015). Sıçan modellerinde yapılan çalışmalarda, makrofajların OA ilerlemesi boyunca, SPECT-CT görüntüleme kullanılarak özellikle erken aşamalarda aktive edildiği gösterilmektedir (Piscaer ve ark., 2011; Siebelt ve ark., 2013). Ayrıca makrofajları hedef alan tedavilerin, enflamasyonu ve OA'nın ilerlemesini azaltma yeteneği olduğu gösterilmiştir.

Makrofajların sinovyal hücre kültürlerinden anti-CD14-konjuge manyetik boncuklarla çıkarılması, OA'da yıkıcı işlevler oynayan MMP'ler veagrekanazların yanı sıra IL-1 ve TNF-α üretiminin azalmasıyla sonuçlanmıştır (Bondeson ve ark., 2006). Kolajenazın indüklediği bir fare modelini kullanan Bondeson ve arkadaşları OA gelişiminde makrofajların kemotaksisinden sorumlu olan TGF-β ve IL-1β dahil çeşitli kemokinler tanımlamıştır. Bu

grup aynı zamanda klodronat lipozomların eklem içi enjeksiyonu yoluyla astar makrofajların seçici olarak tükenmesinin kıkırdak hasarını ve osteofit oluşumunu iyileştirdiğini belirlemiştir. Belirlenen bu etki mekanizması MMP-3 ve MMP-9 ekspresyonundaki güçlü bir azalma ile düzenlenmiştir; bu da kıkırdak hasarına neden olan MMP'lerin üretimi için sinovyal makrofajların aktivasyonunun gerekli olduğunu düşündürmektedir (Blom ve ark., 2004; Blom ve ark., 2007). Bu çalışmalar, aktifleştirilmiş makrofajların OA ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını ve makrofajları hedeflemenin OA'yı önlemek için uygun bir yaklaşım olduğunu öne sürmektedir. Ancak OA'da polarize makrofajların rolleri belirlenmemiştir (H. Zhang ve ark., 2020). OA gelişimi sırasında sinovyumda ve eklem boşluğunda makrofajlar birikir ve polarize olur (M1 veya M2). Rekombinant insan IL-1Rα'nın (M2 belirteci) eklem içi enjeksiyonlarının, deneysel bir köpek OA modelinde osteofitlerin ve kıkırdak lezyonlarının gelişimine karşı koruma sağladığı belirlenmiştir (Caron ve ark., 1996). OA hastalarının sinovyal sıvısında ve periferik kanında makrofajların varlığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Kraus ve arkadaşları, iki OA hastasının sinovyal sıvı hücrelerinde immün boyama yoluyla M1 (iNOS) ve/veya M2 (TGF-β) makrofaj belirteçlerinin varlığını belirlemişlerdir (Kraus ve ark., 2016). Liu ve arkadaşları, sinovyal sıvı ve periferik kandaki M1/M2 makrofaj oranının diz OA hastalarında sağlıklı kontrollere göre belirgin şekilde daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca diz OA hastalarında M1/M2 makrofaj oranının Kellgren-Lawrence derecesi ile pozitif korelasyon gösterdiğini göstermişlerdir; bu da M1/M2 makrofaj dengesizliğinin diz OA'sının hastalık seviyesini tanımlayabildiğini göstermektedir (Liu ve ark., 2018).

1.5. Tedavi Seçenekleri

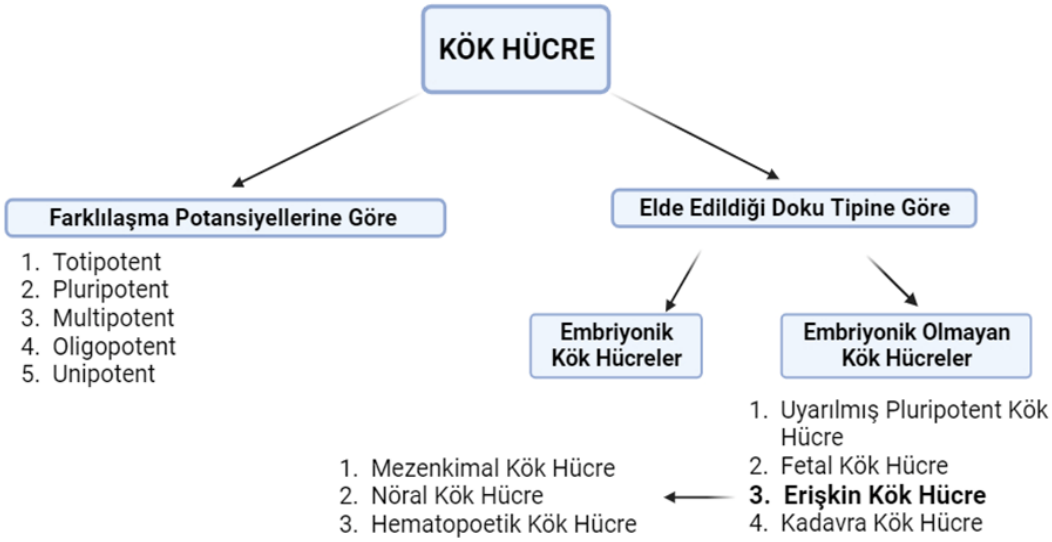
Tedavi seçeneklerinde kalıcılığı kanıtlanmış kesin bir çözüm yolu henüz bulunmamaktadır. Tedaviler, genel olarak değişebilir ve risk faktörlerinin azaltılması, intraartiküler tedavi, fiziksel modaliteler, alternatif tedaviler ve cerrahi tedaviler olarak sınıflandırılabilir. Tedavide öncelikle ağrı ve eklem sertliğinin azaltılmasına odaklanılır. Daha sonra fiziksel işlevselliğin sürdürülmesine odaklanılmaktadır (Abramoff ve Caldera, 2020). Fizik tedavi, egzersizlerle kilo verme ve yaşam tarzı değişiklikleri ağrıyı hafifletebilir, fiziksel işlevselliği ve yaşam kalitesini artırabilir. Ancak bunların hiçbiri eklem kıkırdağını yenileme potansiyeline sahip değildir. Bu nedenle yenilikçi tedavi seçenekleri geliştirilmektedir. Son zamanlarda hücresel tedaviler popüler hale gelmektedir.

1.6. Osteoartritte Hücresel Tedaviler

Güncel tedavi seçenekleri arasında yer alan hücresel tedavilerde hasar görmüş eklem kıkırdağını yeniden oluşturmak için çeşitli hücre tipleri kullanılmaktadır. Otolog kondrosit implantasyonu, kısmi kıkırdak lezyonları için cerrahi bir teknik olarak önerilmektedir ve geleneksel hücre bazlı tedavilerde en yüksek başarı oranına sahiptir (Nam ve ark., 2018). Ancak hasarlı kıkırdak bölgesi ile sınırlı olduğundan genel OA tedavisinde kullanımı uzun vadede zordur (Jang ve ark., 2021). Otolog kondrositlerin kıkırdak lezyonlarını tedavi etmesine izin vermek için mekanik, biyolojik ve kimyasal yapı iskelesi bazlı yaklaşımlar da geliştirilmektedir. Yapı iskeleleri kullanıldığında kondrositler farklılaşmaya daha az eğilimlidir ve daha uygun kıkırdak üretilebilir. Ancak sınırlı sayıdaki birincil kondrositlerin terapötik sınırlamaları olduğu görülmektedir (Caron ve ark., 2012). Kıkırdak doku mühendisliğindeki biyolojik faktörler arasında uygun hücresel kaynağın seçilmesi, kıkırdak rejenerasyonunda önemli rol oynamaktadır (Emami ve ark., 2023). Bu eksiklikleri gidermek için kök hücre bazlı tedaviler geliştirilmektedir.

1.6.1Kök Hücre

Kök hücre terimi ilk kez 1890'larda Artur Pappenheim tarafından kullanılmıştır (Ramalho-Santos ve Willenbring, 2007). Kök hücreler insan vücudundaki her dokuyu oluşturma yeteneğine sahiptir, dolayısıyla doku yenilenmesi ve onarımında terapötik kullanım için büyük bir potansiyele sahiptir. Hücrelerin “kök hücre” tanımına girebilmesi için iki temel özelliği taşıması gerekir. İlk olarak kök hücrelerin, kaynak hücrenin aynısını üretebilmesi için sınırsız *kendini yenileme* yeteneğine sahip olması gerekir. Bu özellik aynı zamanda kontrolsüz bir şekilde bölünen kanser hücreleri için de geçerlidir. Kanser hücrelerinin aksine kök hücre bölünmesi oldukça sıkı bir şekilde düzenlenir. Diğer bir temel özellik ise farklı doku tipine özgü hücre tiplerine *farklılaşabilmes*idir (Biehl ve Russell, 2009). Genellikle köken aldığı doku tipine göre "embriyonik" ve "embriyonik olmayan" kök hücre olarak iki ana kategoride incelenir. Kök hücreler, farklı hücre tiplerine farklılaşma potansiyellerine göre sınıflandırılır. Bu beş ana sınıflandırma totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotenttir (Kalra ve Tomar, 2014; Tian ve ark., 2023).



Şekil 1.3. Kök hücre sınıflandırılması. Biorender (www.biorender.com) kullanılarak oluşturulmuştur.

1.6.1.1.Farklılaşabilme Potansiyellerine Göre Kök Hücreler

Totipotent kök hücreler: Bireyi oluşturan tüm hücre tiplerine farklılaşarak tam bir birey oluşturabilirler. Örnek olarak, yumurtanın döllenmesi sırasında oluşan zigot ve zigotun bölünmesi sonucu oluşan ilk birkaç hücre gösterilebilir.

Pluripotent kök hücreler: Bireyi oluşturan tüm hücre tiplerine farklılaşabilirler ancak tam bir birey oluşturma potansiyelleri bulunmamaktadır. Örnek olarak, blastosistteki iç hücre kitlesinden köken alan embriyonik kök hücreler verilebilir. Embriyonik kök hücre farklılaşmasının başlangıç aşamalarında, mezoderm, endoderm ve ektoderm olmak üzere üç germ tabakasından oluşan hücreler yer alır.

Multipotent kök hücreler: Birden fazla hücre tipine farklılaşabilir ancak bireyi oluşturan tüm hücre tiplerine farklılaşamazlar (tipik olarak *in vitro* 8-15 geçiş). Örneğin, hematopoietik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler, amniyotik sıvı kök hücreleri, amniyotik epitel hücreleridir (Rosner ve ark., 2023).

Oligopotent kök hücreler: Oligopotent kök hücreler kendini yenileyebilir ve belirli bir dokuda iki veya daha fazla soy oluşturabilir. Hematopoetik kök hücreler hem miyeloid hem de lenfoid soylara farklılaşabildikleri için oligopotent kök hücrelerin tipik bir örneğidir (Kolios ve Moodley, 2013; Marone ve ark., 2002).

Unipotent kök hücreler: Unipotent hücreler yalnızca bir tür terminal hücreye farklılaşabilir. Örneğin, iskelet kası kök hücreleri yalnızca çizgili kas hücrelerine, spermatogenik kök hücreler ise yalnızca spermlere farklılaşabilir.

1.6.1.2.Elde Edildikleri Yere Göre Kök Hücreler

Embriyonik Kök Hücreler (EKH'ler): EKH'ler, süresiz olarak kendini yenileyebilen ve vücuttaki herhangi bir doku tipine farklılaşabilen, rejeneratif uygulamalar için potansiyel sağlayan pluripotent kök hücrelerdir. İmmün reddi, tümör oluşumu ve etik sorunlar nedeniyle EKH'lerin klinik tedavide kullanımı sınırlıdır (Yu ve ark., 2023). EKH'ler embriyonik gelişiminde insan blastosistinin iç hücre kitlesinde bulunur (Dupont ve ark., 2019). TRA1-81, CD29, CD24, CD49f, CD90, CD133 ve CD326 yüzey proteinleri bu hücrelerde pozitif, CD9, CD10, CD56, CD117 ve CD16 yüzey proteinleri ise negatiftir (Sundberg ve ark., 2009).

Embriyonik Olmayan Kök Hücreler*: 4 farklı embriyonik olmayan kök hücre vardır.*

Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler (uPKH): Olgun somatik hücrelerin *in vitro* pluripotent kök hücrelere doğrudan yeniden programlanması, embriyo ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır böylece etik sorunlar için çok önemli bir çözüm olmuştur. uPKH'ler hastanın kendi somatik hücrelerinden çoğaltılabilir ve hastayla genetik olarak eşleşen hücreler elde edilmesine olanak sağlar (Lv ve ark., 2023). CD105, CD73, CD90, CD146, CD144 ve CD44 yüzey proteinleri UPKH'lerde pozitif, CD34, CD14 ve CD45 yüzey proteinleri ise negatif olması ile karakterize edilir (Gao ve ark., 2017).

Fetal Kök Hücreler: "Fetal kök hücreler" ve "perinatal kök hücreler" olarak yaygın olarak iki isimlendirme kullanılmaktadır. Ancak "Fetal" hem bu hücrelerin fetal kökenini hem de toplanma zaman aralığını tanımlarken, "perinatal" terimi yalnızca belirli bir zaman dilimiyle ilgilidir ve aynı zamanda anne hücrelerini de içerebilir. Amniyotik sıvı kök hücreleri (ASKH'leri) adı verilen çok güçlü bir fetal kök hücre varlığına ilişkin tüm bilgiler, genellikle hamileliğin 16. haftası civarında yapılan amniyosentez çalışmalarından elde edilmiştir. Ayrıca, fetal hücrelerin birikmiş mutasyon oranının daha az olduğu düşünülmektedir (Rosner ve ark., 2023).

Kadavra Kök Hücreleri: Ölen donörlerden izole edilen kök hücreler kadavra kök hücreleri olarak tanımlanır. Son çalışmalar, uygun depolama koşullarının (kadavra heparinizasyonu

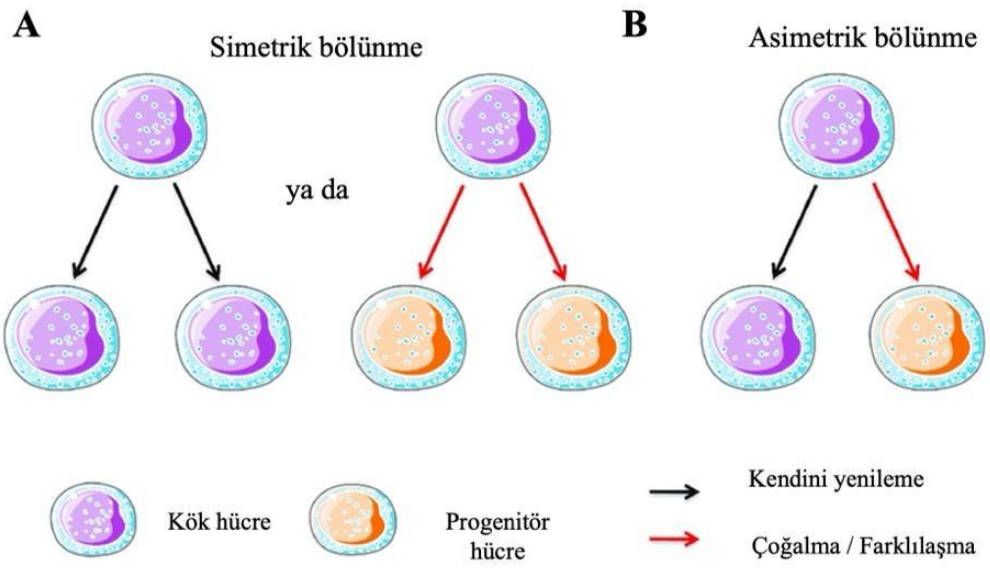
veya sıvı nitrojen depolaması gibi) korunmasıyla donörün ölümünden uzun süre geçmesine rağmen kök hücrelerin toplanmasının ve kullanılmasının mümkün olduğu gösterilmiştir (Ciesla ve Tomsia, 2021).

Erişkin Kök Hücreler: 3 grup altında toplanır.

Nöral Kök Hücreler (NKH'ler): Yetişkin NKH'lerin çoğunluğu, çoğalmayan ve farklılaşmamış bir durumda kalır ve bazen yeni nöronlar üretmek için aktif bir duruma geçiş yapar (Kaise ve Kageyama, 2024). Nestin, GFAP, GLAST, vimentin yüzey proteinleri NKH'lerde pozitif olması ile karakterize edilir (Radecki ve Samanta, 2022).

Hematopoetik Kök Hücreler (HKH'ler): Hematopoietik sistem, oksijen taşıyan kırmızı kan hücreleri, megakaryosit üreten trombositler ve patojenlerle savaşan doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık hücreleri (monositler, nötrofiller, T lenfositleri ve B lenfositleri dahil) dahil çeşitli hücre tiplerinden oluşur (Wilkinson ve Nakauchi, 2020). CD45, CD34, CD133 ve CD14 yüzey proteinleri HKH'lerde pozitif olması ile karakterize edilir (Martins ve ark., 2009).

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH'ler): Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) Friedenstein ve meslektaşları tarafından, yetişkin kemik iliği dokularından izole edilerek hızla büyüyen, fibroblast benzeri popülasyon olarak tanımlandı. İnsan MKH'leri plastiğe yapışan bir hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreleri karakterize etmek için genel olarak iki yöntem kullanılır. İlk olarak, akım sitometrik analizle MKH'lara spesifik olan yüzey belirteçlerine bakılır (cluster of differentiation; CD). Bu hücreler, CD73, CD90 ve CD105 yüzey belirteçleri pozitif, CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79a, CD19 ve HLA-DR yüzey belirteçleri negatif olması ile karakterize edilir. İkinci olarak, MKH'lerin *in vitro* ortamda farklı hücre tiplerine (osteoblastlara, adipositlere, kondrositlere) farklılaşması için uyarılmasıyla karakterizasyonu tamamlanır. MKH'ler iskelet kası dokusu yağ dokusu, rahim ağzı dokusu, adet kanı, göbek kordon, Wharton jeli, sünnet derisi, karaciğer, akciğer, plasenta, göbek kordonu kanı, tendon, sinovyal sıvı, amniyon, diş pulpası ve periodontal bağ dahil birçok dokudan kolayca izole edilmektedir (Farkhad ve ark., 2021).



Şekil 1.4. MKH kendini yenileme ve farklı hücre tiplerine farklılaşabilme özellikleri.

1.6.2. Osteoartrit ve Mezenkimal Kök Hücre

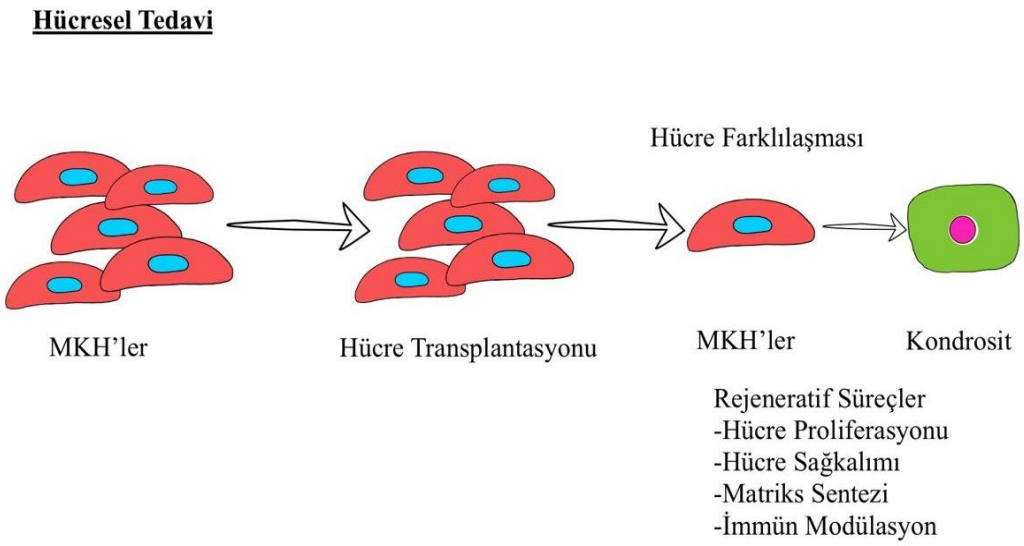
MKH'ler immün modülasyon, hematopoez ve doku onarımında hayati roller oynar. Hücrelerin mikro çevresi genellikle hücreler arası matriksi, diğer hücreleri, sitokinleri ve humoral bileşenleri ifade eder. Aynı zamanda hücrelerin etkileşiminin de gerçekleştiği yerdir. Mikro ortamın stabilitesi hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını, metabolizmasını ve fonksiyonel aktivitelerini sürdürmek için çok önemlidir. Mikro çevre bileşenlerindeki anormal değişiklikler hücre fonksiyonlarını etkileyebilir. Bazı hastalıklarda MKH'ler mikro çevre ile etkileşime girebilir ve hastalığın ilerlemesini hızlandırabilir. MKH'ler, büyüme faktörleri, sitokinler ve hücre dışı matriks dahil olmak üzere hücrenin hayatta kalmasını destekleyen çeşitli faktörleri salgılayabilir. Yağdan elde edilen MKH'ler vasküler endotel hücreleri üzerinde etki gösterebilir, anjiyogenezi ve olgunlaşmayı teşvik edebilir (Yudi Han ve ark., 2019). Ek olarak, miyokardiyal iskemi-reperfüzyon ve felç gibi birçok yaralanma modelinde, yağdan türetilmiş kök hücre eksozomları, anjiyogenezi teşvik edebilir ve doku hasarını azaltabilir (Yang ve ark., 2018). Kemik iliği MKH'leri, kolajen kaynaklı artrit (Collagen-induced arthritis; CIA) sıçanlarının eklem iltihabını iyileştirebilir, kemik hasarını önleyebilir ve T ve B hücrelerinin oran ve fonksiyonunu, kemik metabolik faktörlerini ve kondrositlere kendi kendine farklılaşmasını düzenleyerek kıkırdak hasarını onarabilir (Gao ve ark., 2020; Liu ve ark., 2022).

Kıkırdak defektlerinin onarımı ortopedistlerin karşılaştığı önemli zorluklardan biridir. Kıkırdağın doğal avasküler doğası ve olgun kondrositlerin çoğalması nedeniyle kıkırdağın kendini onarma yeteneği büyük ölçüde sınırlıdır. Şu anda kemik iliği stimülasyonu ve osteokondral transplantasyon gibi klinik olarak uygulanan kıkırdak onarım tekniklerinin sınırlamaları vardır. Kemik iliği uyarımı ile üretilen fibrokartilaj yeterince güçlü değildir ve osteokondral transplantasyon için greftlerin entegre edilmesi zordur. MKH'ler, kondrositlere farklılaşabildikleri için hasarlı kıkırdak onarımı için yeni bir strateji sunmaktadır. Entegre bir kıkırdak rekonstrüksiyon ünitesi, birincil hücre kaynakları olarak kullanılan kemik iliği-MKH'ler, yağ dokusu-MKH'ler ve sinovyal-MKH'ler ile hücreleri, yapı iskelelerini ve uyarıcı faktörleri içerir. Bunlar arasında, kemik iliği-MKH'ler *in vitro* ve *in vivo* daha iyi kondrojenik kapasite sergilemektedir. Sinovyal MKH'ler ve kemik iliği MKH'ler, yağ dokusu MKH'lere göre daha iyi proliferasyon ve farklılaşma potansiyeli ve daha az hipertrofi göstermektedir. Kıkırdak rekonstrüksiyonu birden fazla uyarıcı faktörün birleşimini gerektirir; Kondrositlerin ve MKH'lerin ortak kültürünün, MKH'lerin tek başına uygulanmasından daha etkili olduğu belirlenmiştir (Yudi Han ve ark., 2019; Zou ve ark., 2018). MKH'lerin çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneği, bunların rejeneratif tıpta bir araç olarak kullanılmasına olanak sağlar. Mezenkimal kök hücrelerin birçok hastalık ve klinik duruma karşı tedavi olarak başarıyla kullanıldığı bilinmektedir. Şu anda, dünya çapında kemik ve kıkırdak onarımı, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, karaciğer hastalığı, bağışıklıkla ilgili hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve omurilik yaralanmaları dahil olmak üzere çeşitli hastalıkları tedavi etmek için MKH'leri kullanan 950'den fazla klinik çalışma bulunmaktadır. MKH'ler, hücre bazlı tedavinin klinik uygulamasında umut verici sonuçlar göstermiştir. MKH'lerin çeşitli ortopedik durumlarda kemik rejenerasyonu üzerindeki etkinliği geniş çapta gösterilmiştir. Doğrudan enjeksiyon yoluyla implante edilen veya kemik onarımını ve fonksiyonlarını destekleyen osteojenik matriks veya iskelelerle birleştirilen çeşitli MKH kaynakları kullanılarak kemik kırığı onarımı için farklı aşamalarda (I, II veya III) çeşitli klinik denemeler yapılmıştır (Mohd Noor ve ark., 2021).

Hidrojeller ve elektrospun yeni biyoaktif üç boyutlu (3D) scaffoldlar (yapı iskeleleri) ile ilgili çalışmaları sürekli olarak gelişme göstermektedir. Bu iskeleler kıkırdak yenilenmesi için optimal bir üç boyutlu mikro ortam sağlar. Ayrıca hidrojeller, yüksek su içerikleri, biyouyumlulukları ve hücre dışı matrikse benzer özellikleriyle MKH çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenlemektedir (Yang ve ark., 2017). Enjekte edilebilir hidrojeller, geniş kıkırdak defekti alanlarının minimal invaziv tedavisine olanak sağlar (Liu ve ark., 2017). Bu

nedenle MKH'ler ve uyarıcı faktörlerle yüklü hidrojeller, kıkırdak hasarının onarımı için oldukça etkilidir. Elektrospun yapı iskelelerinin geliştirilmesi, nanoliflerin düzenlenmesinin aynı zamanda hücre farklılaşmasını da etkilediğini ve kıkırdak onarımına farklı bir yaklaşım sağladığını göstermektedir (Girao ve ark., 2018). Uyarıcı faktörler kıkırdak mühendisliği için gereklidir ve kıkırdak oluşumunun başlatılmasından, hızlandırılmasından ve/veya artırılmasından sorumludur. Yaygın uyarıcı faktörler arasında BMP-2/-4, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-1 ve TGF-β1/-β3 yer alır (Y. Han ve ark., 2019).

Kıkırdak onarımı için MKH uygulamasının ilk klinik öncesi denemesi 1994'te gerçekleştirilmiştir. MKH'ler, tavşan femur kıkırdağında tam kalınlıktaki bir hasarı tedavi etmek için bir kolajen jeline ekilmiş ve bir kontrol grubunda gözlemlenenlerden daha iyi sonuçlarla sonuçlanmıştır. Bu hasar modeli daha sonra kıkırdak rejenerasyonu için klasik bir kıkırdak hasar modeli olarak kullanılmış; daha sonra, kıkırdak hasarına yönelik MKH bazlı tedaviyi değerlendirmek için hem hayvan modellerinde hem de insanlarda çok sayıda deneme yapılmıştır (de Windt ve ark., 2017; Wakitani ve ark., 1994). Yürütülen klinik araştırmalara rağmen, MKH bazlı kıkırdak rekonstrüksiyonu için ticari olarak mevcut herhangi bir ürün bulunmamaktadır. Çeşitli çalışmalar, çoğaltılmış MKH'lerin *in vivo* olarak insan eklem kıkırdağına verildiği hasar üzerindeki etkilerini araştırmaktadır. Çoğaltılmış otolog kemik iliği MKH'lerin transplantasyonu, kronik diz osteoartriti olan hastalarda kıkırdak kalitesini iyileştirmiştir (Orozco ve ark., 2013; Wakitani ve ark., 2002). Ancak klinik iyileşme için anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. MKH'ler ağırlıklı olarak kıkırdak onarımı amacıyla test edilmiş olsa da daha yeni çalışmalarda, anti-enflamatuvar aracılar ürettikleri ve parakrin tarzda onarıcı özellikler tetikledikleri belirlenmiştir. OA gelişimi sırasında adipoz dokudan köken almış stromal hücrelerin uygulanmasından sonra etkileri incelenmiş ve ortaya çıkan birçok makale, deneysel OA'nın indüksiyonundan sonra eklem içi adipoz dokudan köken almış stromal hücrelerin enjeksiyonunun patolojiyi iyileştirdiğini göstermiştir (Desando ve ark., 2013; ter Huurne ve ark., 2012).



Şekil 1.5. Hücre temelli tedavi olarak MKH'nin kıkırdak rejenerasyonundaki yeri (Mohd Noor ve ark., 2021).

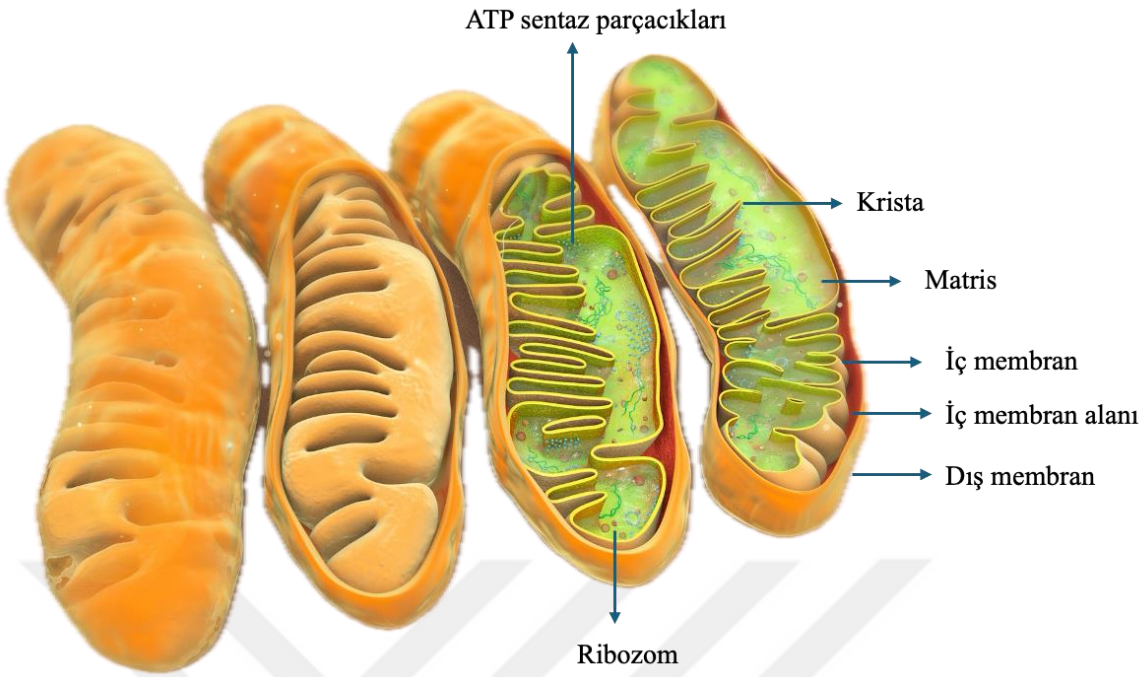
MKH'lerin koruyucu etkilerinin doğrudan kondrogenezin sonucu olmadığı parakrin etkilere dayandığına dair kanıtlar biriktiği için Chen ve arkadaşları, bir sıçan OA modelinde MKH'lerden gelen sekretomun OA gelişimine karşı etkisini incelemiştir (Chen ve ark., 2019). İnsan MKH kültürlerinden yapılan şartlandırılmış ortamın (KO) enjeksiyonu, kıkırdak dejenerasyonunun azalmasına ve subkondral kemikte toplam hacme karşı kemik hacminin azalması ve trabeküler sayının azalması gibi farklı değişikliklere neden olmuştur. MKH kültürlerinden yapılan şartlandırılmış ortamın, kıkırdak matriks fragmanları agrekan ve kolajen tip II ekspresyonunun azalmasını tersine çevirirken, MMP-13 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı, TIMP-1 ekspresyonunu artırdığı ve otofaji belirteçleri LC-3 ve Beclin-1'in azalan ekspresyonunu tersine çevirdiği belirlenmiştir. Bununla uyumlu olarak Niada ve arkadaşları adipozdan dokudan köken alan stromal hücrelerin sekretomunun TNF-α kaynaklı kondrosit hipertrofisini ve katabolik belirteçlerin ifadesini azalttığını göstermiştir (Niada ve ark., 2019).

Ragni ve arkadaşları, multipleks protein tespiti ile birlikte OA mikro çevresini taklit eden enflamatuvar koşullar altında kültürlenen insan adipoz dokudan köken alan MKH'lar tarafından salgılanan hücre dışı veziküllerde bulunan miRNA'ları analiz etmişlerdir. Kıkırdak matriks bozulmasını azaltan, makrofaj polarizasyonunu M2 benzeri hücrelere polarize ederek kondroprotektif ve anti-enflamatuvar olan birkaç olası protein ve miRNA belirlemişlerdir. Dejeneratif süreçlerle ilişkili miRNA'lar da tanımlanmış olmasına rağmen, genetik ağırlığın puanlanması, kıkırdak ve sinovyumun korunmasında rol oynayan hücre dışı

veziküller tarafından taşınan miRNA'ların baskınlığı gösterilmiştir (Ragni ve ark., 2020). Ko ve arkadaşları SOX6 ve SOX9 ile transfekte edilmiş insan adipoz dokudan köken alan MKH'ların, *in vitro* olarak BMP7 ve TGF-β içeren kültürlere benzer kondrojenik kapasitelere sahip olduğunu göstermiştir. Keçilerde medial menisektomi ameliyatından sonra bu hücrelerin eklem içi enjeksiyonu, salin veya transfekte edilmemiş insan adipoz dokudan köken alan MKH'ların enjekte edildiği eklemlerle karşılaştırıldığında kıkırdak dejenerasyonunu ve osteofit oluşumunu önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (Ko ve ark., 2019). Yapılan pek çok çalışma, düşük sayıdaki kök hücrelerin OA patolojisini ve semptomlarını iyileştirmede etkili olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalar ayrıca, kök hücrelerin anti-enflamatuvar etkilerinin, pro-enflamatuvar OA ortamı tarafından artırıldığını ortaya koymaktadır (Manferdini ve ark., 2013; Manferdini ve ark., 2016; Pers ve ark., 2016; Schelbergen ve ark., 2014; van den Bosch, 2021).

1.7. Osteoartrit ve Mitokondri

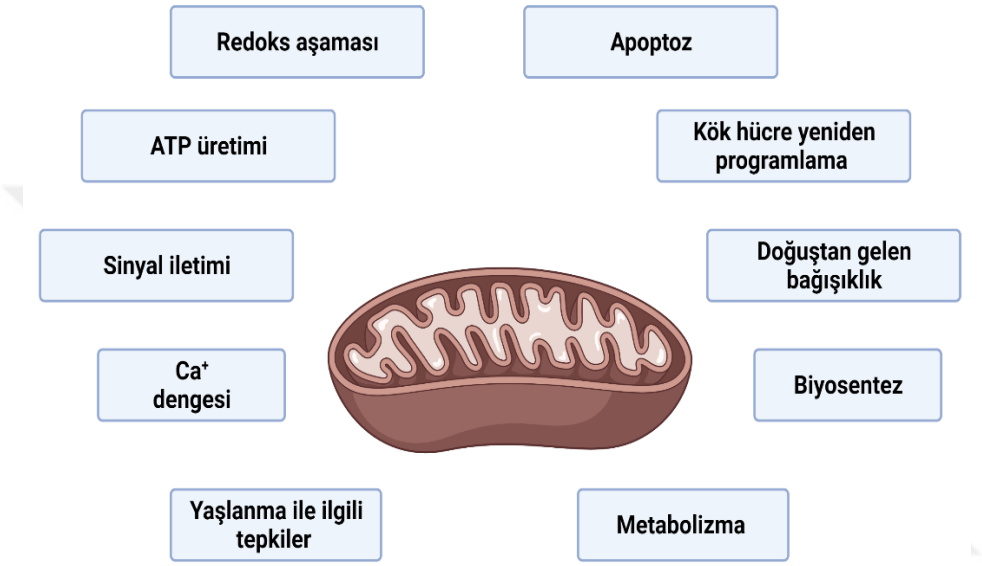
Mitokondri, hücresel homeostaziyi düzenlemek için çeşitli fonksiyonları olan bir organeldir. Yaklaşık 0,5-1 µm çapında ve 7 µm uzunluğundadır. Şekilleri ve sayıları dokuya göre değişir. Küreler, çubuklar ya da ipliksi cisimler şeklinde görünebilirler. Hücre başına düşen mitokondri sayısı enerji gereksinimlerine bağlı olarak değişir: iskelet kası veya böbrek gibi aerobik metabolik işlevleri yerine getirme kapasitesi yüksek olan dokularda daha fazla sayıda mitokondri bulunur.



Şekil 1.6. Mitokondri yapısı.

Mitokondrilerin her biri bir fosfolipid çift tabakadan oluşan iki membranı vardır. Bu iki zar, görünüş ve fiziko-kimyasal özellikler bakımından oldukça farklıdır. İç zar mitokondriyal matriksi çevreler ve kıvrımlar oluşturarak kristalar meydana getirir. Bu, oksidatif fosforilasyonun ana enzimatik mekanizmasını taşıyan iç zarın yüzeyini artırmaya yarar. İç ve dış zarlar farklı fosfolipid bileşimleri ve protein-lipid oranları ile karakterize edilir. Dış zar için bu oran yaklaşık 50:50'dir ve proteinin çok az enzimatik veya taşıma işlevine sahip olduğu düşünülmektedir. İç zarda ise protein-lipit oranı 80:20'dir. Dış zar iyonlara ve daha büyük moleküllere karşı geniş ölçüde geçirgendir. İç mitokondriyal zar iyonlara ve küçük moleküllere daha az geçirgendir, bu nedenle matriksin sitozolik ortamdan ayrılmasıyla bölümlenme sağlanır. Bu bölümlendirme, oksitlenebilir substratlardan elde edilen serbest enerjinin dönüşümünün merkezi bir özelliğidir. İç mitokondriyal zar aslında bir elektrik yalıtkanı ve kimyasal bariyerdir. Belirli moleküllerin bu bariyeri geçmesine izin vermek için kompleks iyon taşıyıcıları mevcuttur. İç zara gömülü, sitozol ve mitokondriyal matriks arasında anyon alışverişine izin veren birkaç antiport sistemi vardır. Bunlara örnek olarak fosfat-OH^- değiştirici, adenin nükleotid translokaz (özellikle adenozin difosfatı (ADP) adenozin trifosfat (ATP) ile değiştirir), mono-, di- ve tri-karboksilat taşıyıcıları ve

aspartat-glutamat mekiği verilebilir (Krauss, 2001). Enerji üretiminin en iyi bilinen yeri veya hücrenin "güç merkezi" olmalarının yanında mitokondriler, hücre büyümesi ve apoptozis, hücre içi kalsiyum seviyesi, redoks dengesi, bağışıklık tepkisi ve organeller arası iletişim için gerekli moleküllerin biyosentezini kontrol etmek gibi birçok olayda kilit rol oynar (Disha ve ark., 2024; Suh ve Lee, 2024). Mitokondriler dinamik organellerdir ve füzyon-fizyon olaylarıyla şekillerini sürekli değiştirirler (Giacomello ve ark., 2020; Kleele ve ark., 2021).



Şekil 1.7. Mitokondri fonksiyonlarına genel bir bakış (Xingjia Mao ve ark., 2020). Biorender (www.biorender.com/) kullanılarak oluşturulmuştur.

Son zamanlarda, mitokondrinin yalnızca hücresel metabolizma için enerji sağlayan hücrelerde güç merkezi olarak hareket etmekle kalmayıp, aynı zamanda kondrosit fizyolojisini sürdürmekten sorumlu çok önemli yollarda yer aldığı bulunmuştur. Bu nedenle, mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun osteoartrit patogenezi ile ilişkili olduğunu vurgulamaktadır. Ancak günümüzde, osteoartrit için etkili müdahaleler veya hastalığı modifiye edici tedaviler yoktur. Mevcut farmakolojik tedaviler, hastalığın ilerlemesini durdurmak yerine semptomların giderilmesi ve işlevin restorasyonu ile sınırlıdır. Bu yüzden önleme ve tedavi için potansiyel moleküler hedefler tasarlamak amacıyla osteoartrit patogenezi ile ilgili moleküler mekanizmaları daha iyi anlamaya ihtiyaç vardır.

Ökaryotik hücrelerde hücresel metabolizma ve enerji üretiminden sorumlu organel olan mitokondri, hücresel homeostazın korunmasında önemli bir rol oynar. Oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) adı verilen bir süreç aracılığıyla evrensel enerji birimi olan

ATP'nin birincil kaynağıdırlar. Mitokondri, enerji üretiminin yanı sıra apoptoz, kalsiyum sinyali ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlere katkıda bulunur. Mitokondriyal fonksiyon ve metabolizmadaki bozulmalar, kanser, nörodejeneratif bozukluklar ve metabolik bozukluklar gibi çok sayıda hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, mitokondriyal disfonksiyonun altında yatan mekanizmaların kapsamlı bir şekilde anlaşılması, bu durumlar için etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından çok önemlidir (Qi ve ark., 2023). Mitokondri, enerji üretiminin yanı sıra hücre farklılaşması, yaşlanma ve hücre ölümü dahil olmak üzere birçok hücresel fonksiyonda da önemli roller oynar. Son araştırmalar, mitokondriyal fonksiyon değişikliğinin OA patogenezi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Liu ve ark., 2019). Son yıllarda yapılan çalışmalar, mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun ve bozulmuş enerji metabolizmasının OA patogenezine önemli katkısını ortaya çıkarmıştır. Mitokondriyal fonksiyonun bozulması, kıkırdak bozulmasına ve kondrosit apoptozuna katkıda bulunan ROS birikimine yol açar. Araştırmalar, yüksek mitokondriyal ROS seviyelerinin kıkırdak dejenerasyonunu hızlandırabildiğini ve OA gelişimini kolaylaştırabildiğini göstermiştir (Sun ve ark., 2021). OA hastalarından izole edilen kondrositlerde, mitokondriyal membran potansiyelinde azalma ve ROS üretiminde artış olur böylece oksidatif stres ve hücre ölümü gerçekleşir.

Normal kondrositlerde mitokondri, redoks reaksiyonunu düzenleyerek sinyal iletimi, protein katlanmasını kolaylaştırmak için moleküler şaperonlar gibi biyokimyasal reaksiyonlar için kofaktörler sağlamada ve AMPK sinyali ve kalsiyum sinyali gibi sinyal iletimi için ligandlar üretmede rol oynar (X. Mao ve ark., 2020). Mitokondride depolanan kalsiyum, hücrelerde kalsiyum homeostazisinin korunmasına yardımcı olur ve mitokondri, hücre dışı matrikste kalsiyumunun hareket etmesini sağlar. Kıkırdak mineralizasyonunun, "matriks vezikülleri" olarak bilinen ve kalsiyum fosfat içeren granüllerle ilişkili olduğu doğrulanmıştır. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu temel olarak ATP üretiminin azalması, oksidatif stresin artması, kalsiyum düzensizliği, mitokondriyal membranın geçirgenliğinin artması ve kıkırdak dejenerasyonuyla sonuçlanan mtDNA değişimleri olarak kendini gösterir. Kondrosit hasarı, temel olarak MMP-3, MMP-13 ve nitrik oksit miktarındaki artışlara neden olur. Bu durum, hücre dışı matriks katabolizması ve anabolizması arasındaki dengesizlikle sonuçlanan OA'yı indükleyen enflamatuvar süreçlerin oluşmasına yol açar (Cheleschi ve ark., 2015; X. Mao ve ark., 2020). Hayvan çalışmaları, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile OA arasındaki bağlantıyı daha da doğrulamıştır. Örneğin, OA'nın fare modelini kullanan bir araştırma, mitokondriyal solunumun engellenmesinin, kıkırdak

yıkımının ve enflamasyonun artmasına neden olduğunu doğrulamıştır (Yi ve ark., 2022). Araştırmacılar, yeni mitokondri oluşumundan sorumlu süreç olan mitokondriyal biyogenezin OA'daki potansiyelini araştırmıştır. Yapılan bir çalışma, mitokondriyal biyogenez indükleyicisi ile tedavinin, bir sıçan OA modelinde mitokondriyal fonksiyonun artmasına ve kıkırdak sağlığının iyileşmesine yol açtığını ortaya çıkarmıştır (Gao ve ark., 2022). Bu çalışmalar, mitokondriyal disfonksiyonun ve değişen metabolizmanın OA'nın gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynadığını vurgulamakta ve böylece mitokondriyal metabolizmayı hedeflemenin potansiyel bir terapötik strateji olarak umut vaat ettiğini öne sürmektedir. Ancak OA'de mitokondriyal disfonksiyonun altında yatan mekanizmaları tam olarak anlamak ve mitokondriyal metabolizmayı hedef alan etkili tedaviler geliştirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Alexandra E. Porter ve arkadaşlarının çalışmasında, mitokondriyal granüllerin, mineralizasyonu kolaylaştırmak için kalsiyum ve fosfat iyonu kümelerinin hücre dışı matrikse taşınmasına katkıda bulunduğunu belirlenmiştir. Ayrıca, Lehninger AL, mitokondrinin kemikte yer almak üzere hücre dışı matrikse kalsiyum fosfat salabileceğini öne sürmüştür (Boonrungsiman ve ark., 2012; Lehninger, 1977). Brian Glancy ve arkadaşları kalsiyumun elektron taşıma zincirinde neredeyse her adımı aktive ettiğini ve oksidatif yollarda NADH, Cyt-C, kompleks III ve kompleks IV gibi enzimleri aktive ettiğini göstermiştir (Bender ve Kadenbach, 2000; Glancy ve ark., 2013; Murphy ve ark., 1990).

2.AMAÇ

Klinikte güncel tedavi yaklaşımlarının temelinde yer alan modaliteler, genel olarak farmakolojik, farmakolojik olmayan ve cerrahi yaklaşımlar olmak üzere üç başlıkta sınıflandırılabilir (Bannuru ve ark., 2019; McGrory ve ark., 2016). Bu tedavi yaklaşımları doku yenilenmesi sağlamada yetersizdir ve her birinin kendi sınırlamaları vardır. Bu nedenle, doku koruması veya yenilenmesine daha uzun vadeli bir klinik çözüm sağlamak için doku mühendisliği ve rejeneratif tıp gibi yeni tedaviler geliştirmeye yönelik çalışma alanlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Wang ve ark., 2022). Biyoterapi ve gen tedavisi, son dönemlerde en çok çalışılan seçeneklerdendir. Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler (Kİ-MKH), Wharton jeli kaynaklı mezenkimal kök hücreler (WJ-MKH), embriyonik kök hücreler (EKH) ve uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH) dahil kök hücreler, mitokondri transferi için donör hücre olarak kullanılabileceği ve önemli bir avantaj sağlayabileceği çok sayıda çalışma ile doğrulanmıştır (Hsu ve ark., 2016; Li ve ark., 2014). Osteoartrit tedavisinde eklem içine doğrudan MKH enjeksiyonunun, hücre sağkalımı ve konakçı dokuya entegrasyonunda çok etkili olmadığı yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Diekman ve Guilak, 2013; Wang ve ark., 2022). Bu yüzden hücresel tedavide kullanılan yöntemlerin daha detaylı incelenme ihtiyacı gün yüzüne çıkmıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, osteoartrit hasarında mitokondrinin etkilendiği gösterilmiştir. Ancak bir mitokondri transferinin hastalığın moleküler mekanizması üzerine etkisi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, M1 makrofaj kaynaklı pro-enflamatuar bir ortam kullanılarak oluşturulan iki farklı *in vitro* osteoartrit modelinde, mitokondri transferinin hem kondrositlerin hücre canlılığı ve fonksiyonları üzerindeki etkilerinin hem de enflamatuvar M1 makrofajların fenotipik polarizasyonuna olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda tez çalışmasının hedefleri;

Hedef 1: iSS-MKH'lerin farklılaşmasıyla elde edilen kondrosit hücreleriyle birlikte U937 hücre hattının polarizasyonuyla elde edilen M1 makrofaj hücrelerini ve bu M1

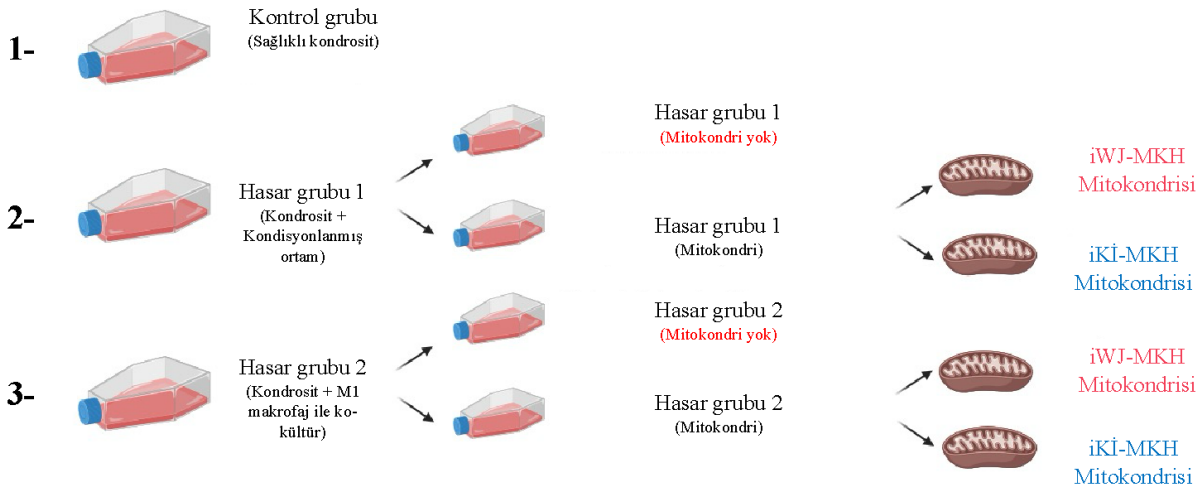
makrofajların kondisyonlanmış ortamlarını ayrı ayrı ortak kültürde kullanılarak oluşturulacak iki farklı *in vitro* osteoartrit modelinin karşılaştırılması,

Hedef 2: iWJ-MKH ve iKİ-MKH'den izole edilen mitokondrilerin model hücrelerine transfer edilmesinin ardından, farklı membran potansiyellerine sahip bu mitokondrilerin kondrosit sağ kalımı üzerindeki etkisinin ve hücrelerin ROS seviyesini ne ölçüde değiştirdiğinin incelenmesi,

Hedef 3: Osteoartrit modeli hücrelerine mitokondri transferi sonrasında ortamdaki M1 makrofajların polarizasyonun değişimine mitokondri transferinin etkisinin incelenmesidir.

3.YÖNTEM

3.1. Deney Grupları



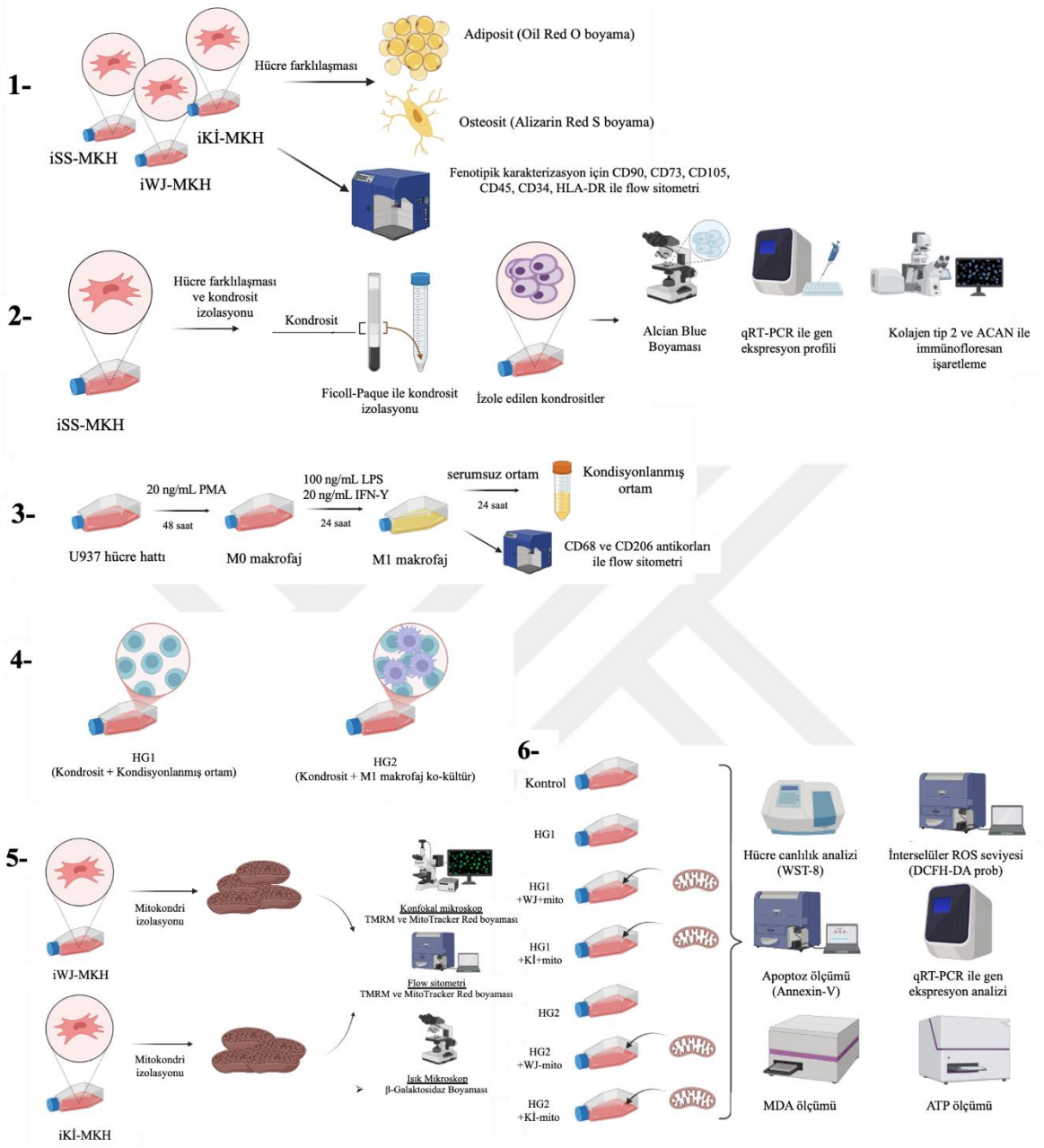
Şekil 3.1. Deney grupları. Biorender (www.biorender.com/) kullanılarak oluşturulmuştur.

Kontrol grubu (1. grup); Normal besiyeri içerisinde kültüre edilen hasar verilmemiş kondrosit hücreleri içeren grup. Mitokondri transferi yapılmadı.

Hasar grubu 1 (2. grup); Makrofaj hücreleri içermeyen, makrofaj hücreleriyle kondisyonlanmış besiyeri içerisinde kültüre edilen kondrosit hücreleri içeren grup. Doğrudan olmayan (indirekt) kondrosit hücre hasarı oluşturulan ve mitokondri verilen/verilmeyen alt-gruplardan oluşmaktadır. Mitokondri transferi sonrasında hücre hasarı oluşturan süreç devam etmektedir. Modelde yalnız kondrosit hücreler olacağından analizlerde makrofajın sayısı ya da doğrudan etkisi olmayacaktır. 3. grup ile veriler karşılaştırılarak modeller arasındaki farkın olup olmadığı belirlendi.

Hasar grubu 2 (3. grup); Makrofaj hücreleri (M1) içeren normal besiyeri içerisinde kültüre edilen kondrosit hücreleri içeren grup. Doğrudan (direkt) kondrosit hücre hasarı oluşturulan ve mitokondri verilen/verilmeyen alt-gruplardan oluşmaktadır. Mitokondri transferi sonrasında hücre hasarı oluşturan süreç devam etmektedir. Fizyolojik duruma en yakın kültür modelidir.

3.2. Deney Akışı



Şekil 3.2. Tez çalışmasının deney akışı. Biorender (www.biorender.com/) kullanılarak oluşturulmuştur.

3.3. Hücre Kültürü

Bu tez çalışması için etik onay, Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 21 Aralık 2021 tarihli GOKAEK-2021/22.17 referans numarasıyla verildi. Tez kapsamında kullanılacak olan hücre hatları, U937 insan monosit hücresi, insan sinovyal sıvı kaynaklı (iSS-MKH), insan Wharton Jeli kaynaklı (iWJ-MKH) ve insan kemik iliği kaynaklı (iKİ-MKH) mezenkimal kök hücrelerdir. Hücreler, Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Araştırma Merkezi (KÖGEM) hücre koleksiyonundan alındı. Hücreler -152ºC dolaptan çıkarıldıktan hemen sonra 37ºC su banyosunda çözdürülerek 300x*g*'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı ve pelet 1 mL besiyeri ile süspanse edildi. Süspanse hücrelerden 20 µL alınarak, 20 µL tripan mavisi boyası (Gibco, %0,4 Trypan Blue Solution, Katalog No.1525006) ile 1:1 oranında karıştırıldı ve Thoma lamında (hemositometre) sayımı gerçekleştirildi. Elde edilen hücre sayısına göre belirlenen flasklara (Nest Scientific, Katalog No. 707001) ekim yapılarak, 37 ºC sıcaklıkta ve %5 CO_2 içeren inkübatörde, uygun besiyerlerinde kültüre edildi. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra Fosfat tamponlu salin (PBS, Capricon Katalog No. PBS-10XA) ile 2 kere yıkanarak 3 mL tripsin-EDTA (%0.25 (w/v), Gibco, Katalog No. T4049) eklendi ve 3 dakika 37ºC sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 3mL besiyer ilave edilerek falkon tüplere (NEST, Katalog No. 601002) aktarıldı ve 300x*g*'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler kriyo tüplerde (MEDPOINT, Katalog No. MP-002-CT) %5 DMSO (Dimetil Sülfoksit, Serva, Katalog No. 20385.02), %35 FBS (Gibco, Katalog No. 16000044) ve %60 bazal medium içeren dondurma sıvıyla -152ºC'de donduruldu.

Tablo 3.1. Hücre kültüründe kullanılan besiyer içerikleri

HÜCRE TİPİ	**BESİYER İÇERİĞİ**
iSS-MKH	1x MEM-α bazal medium (Gibco, Katalog No. A10490-01) %10 FBS %1 penisillin-streptomisin (Gibco, Katalog No. 15140122) %1 NEAA (non essential amino acid) (Gibco, Katalog No. 11140050
iWJ-MKH	1x DMEM F12 bazal medium (Thermo Fisher Scientific, Katalog No. 11320033) %10 FBS %1 penisilin-streptomisin

iKİ-MKH	1x DMEM F12 bazal medium %10 FBS %1 penisilin-streptomisin
U937	1x RPMI 1640 bazal medium ((Thermo Fisher Scientific, Katalog No. 11875093) %10 FBS %1 penisilin-streptomisin
iSS-MKH kaynaklı kondrosit	1x DMEM F12 bazal medium %10 FBS %1 penisilin-streptomisin %1 NEAA (non essential amino acid) 50 µM Askorbik asit (Wako Chemicals) %1 Glutamax (Gibco Katalog No. 25030)

3.4. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu

Elde edilen kök hücrelerin saf kültür olduğunun doğrulanması için yapılan karakterizasyon çalışmalarında, akım sitometri analizi ve farklılaştırma deneyleri yapılmış ve aralarında korelasyon sağlanmıştır.

3.4.1. Akım sitometrik Analiz

Hücrelerin yüzeylerinde spesifik olarak bulunan proteinlerin incelenmesi için akım sitometri analizi kullanıldı. Bu doğrultuda; izole edilen MKH'ler ayrı ayrı pasaj 3'e geldiklerinde; tripsin-EDTA ile kaldırılarak hücreler sayıldı. Her belirteç için 2×10^5 hücre, akım sitometri tüplerine aktarıldı. Hücreler yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, belirlenen yüzey belirteçlerine özel floresan FITC ve PE– konjuge; Mezenkimal kök hücreler, pozitif çıkması beklenen anti-CD73 (BD Biosciences, Katalog No. 550257), anti-CD90 (BD Biosciences, Katalog No. 555596), anti-CD105 (BD Biosciences, Katalog No. 560839) ve negatif çıkması beklenen anti-HLA- DR (BD Biosciences, Katalog No. 340688), anti-CD45 (BD Biosciences, Katalog No. 55482) ve anti-CD34 (BD Biosciences, Katalog No. 345802), insan monoklonal antikorları ile U937 hücre hattında oluşturulan M1 makrofaj polarizasyonu için anti-CD68 (BD Biosciences, Katalog No. 556078), M2'ye polarizasyonu için ise CD206 (BD Biosciences, Katalog No. 550889) monoklonal antikorları ile oda ısısında (karanlıkta) 45 dakika inkübe edildi. Süre sonunda tekrar yıkama solüsyonu ilave edilerek ve 300x*g*'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra yıkama işlemi tamamlanan hücreler, 350 µL yıkama solüsyonu ile yeniden homojenize edilerek analize

hazır hale getirildi. FACS Calibur (BD Biosciences) akım sitometri cihazında okutulan örnekler, Cell Quest (BD Biosciences) programı kullanılarak analiz edildi (Karaoz ve ark., 2009).

3.4.2. Farklılaştırma Deneyleri

Mezenkimal kök hücrelerin üç germ tabakasına farklılaşma yeteneğinden yola çıkılarak farklılaştırma deneyleri gerçekleştirilmiş ve hücrelerin saf kültür olduğu, akım sitometri analizine ek olarak bu yöntemle de doğrulanmıştır. İzole edilen MKH'ler pasaj 3'e geldiklerinde; MKH karakterizasyonunun minimum kriterlerinden olan adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücrelere farklılaşabilme yeteneği incelendi (Candan Altuntaş ve ark., 2025).

3.4.2.1. Adipojenik farklılaştırma

Sitoplazmik lipid damlacığı birikimi ile gözlemlenebilen adipojenik farklılaşmada, hücrelerin %80 doluluğa ulaşması beklendikten sonra, 1×10^5 hücre 6 kuyucuklu plakalardaki (Nest Scientific, Katalog No. 703003) coverslipler üzerine ekildi. Kültür ortamı adipojenik farklılaştırma besiyeri [DMEM-F12, %10 FBS, 10^{-6} M deksametazon (Sigma-Aldrich), 200 µM indometazin (Sigma-Aldrich), 0,5 mM izobutilmetilksantin (Sigma-Aldrich) ve 10 µg/mL insülin (Invitrogen, Gibco)] ile 3 gün arayla değiştirildi ve hücreler 21 gün boyunca gözlemlendi (Karaoz ve ark., 2010). Kontrol grubu hücrelerinin kültürü ise MKH besiyeri ile sürdürülmüştür. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırıldı, coverslipler PBS ile üç kez yıkandı ve sırayla; %4 paraformaldehit (PFA, Sigma, Katalog No. 158127) solüsyonunda 15 dakika (4°C'de) hücreler fikse edildi. Adipojenik boyama için; dH_2O ile Oil Red O solüsyonu (ScienCell, Katalog No. 0843a) hazırlandı. Fikse edilen hücreler, hazırlanan Oil Red O boya solüsyonuda 50 dakika süreyle boyamaya bırakıldı. Boyanmış lipid damlacıkları ve hücre morfolojisindeki değişimler faz-kontrast mikroskobu altında değerlendirilerek fotoğraflandı ve hücrelerin adipojenik farklılaşma düzeyleri incelendi.

3.4.2.2. Osteojenik farklılaştırma

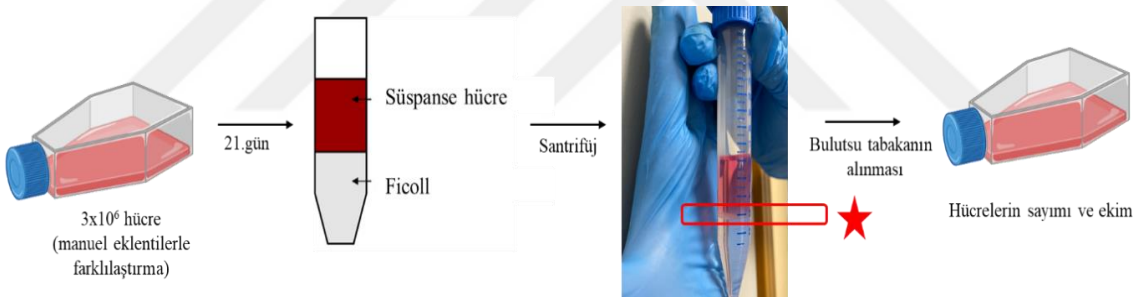
Mineralize matriks oluşumu ile gözlemlenebilen osteojenik farklılaştırmada, hücrelerin %80 doluluğa ulaşması beklendi ve 1×10^5 hücre, 6 kuyucuklu plakalarda coverslip üzerine ekildi. Kültür ortamı osteojenik farklılaştırma besiyeri [DMEM-F12, %10 FBS, %1 Pen/Strep, 0.1 µM deksametazon, 10 mM β-gliserofosfat (Sigma-Aldrich), ve 0.05 mM askorbat-2-fosfat ile haftada iki gün değiştirildi ve 21 gün hücreler gözlemlendi. Kontrol grubu hücrelerinin kültürü ise MKH besiyeri ile sürdürülmüştür. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırıldı, coverslipler PBS ile üç kez yıkandı ve sırayla; %4 PFA solüsyonunda 15 dakika (4°C'de) hücreler fikse edildi. Osteojenik boyama için, distile su ile %2 'lik Alizarin Red-S boya solüsyonu (ScienCell, Katalog No. 0223) hazırlandı (Duruksu ve Aciksari, 2018). Örnekler PBS ile yıkandıktan sonra, hazırlanmış Alizarin Red-S boya solüsyonunda 30 dk süreyle boyamaya bırakılıp, tekrar PBS ile yıkama yapıldı. Kalsifiye nodüller ve hücre morfolojisindeki değişimler faz-kontrast mikroskobu altında değerlendirilerek fotoğraflandı ve hücrelerin osteojenik farklılaşma düzeyleri incelendi.

3.4.2.3. Kondrojenik farklılaştırma

Proteoglikanlarla zenginleşmiş matriks ve Col2 ve Col9 ile gözlemlenebilen kondrojenik farklılaştırmada, mikropellet kültür yöntemi kullanıldı. Hücreler %80 doluluğa ulaştığında, $1x10^6$ hücre 15 mL'lik falkon tüpüne alındı ve 300x*g*'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp dipte kalan pellet kondrojenik farklılaştırma mediumuna (10 ng/mL transforming growth factor-β1 (Biosource PHG0021), 50 mg/L ascorbate-2-phosphate, 100 nM dexamethazone, 100 µg/mL sodium pyruvate (Sigma-Aldich), 5% proline (Sigma-Aldich), 1× ITS (BD-Biosciences), 1% antibiyotik/antimikotik içeren DMEM-F12 kültür medyumuna alınarak 21 gün boyunca haftada iki gün değiştirildi (Hassan ve ark., 2018). Kondrojenik boyama için; süre sonunda falkon dibinde kompakt bir yapı halinde olan peletten kesit alındı ve Alcian Blue boyası (ScienCell, Katalog No. 8378) ile boyandı. Faz-kontrast mikroskobu altında fotoğraflandı ve hücrelerin kondrojenik farklılaşma düzeyleri incelendi.

3.4.2.3.1. Kondrojenik farklılaşma sonrası kondrosit izolasyonu

Kondrojenik farklılaşmanın validasyonu Alcian Blue boyası ile gösterildi. Kondrosit izolasyonu düşük yoğunluklu mononükleer hücreler için kullanılan ficoll (Sigma-Aldrich, Katalog No. GE17-1440-02) ile yapıldı. Ficoll ile yapılan deneyde protokol, Ray ve arkadaşlarının yaptığı çalışma baz alınarak gerçekleştirildi (Candan Altuntaş ve ark., 2025; Ray ve ark., 1982). Kısaca, farklılaşma süresi sonunda hücreler tripsinle muamele edilerek kaldırıldı ve 300x*g*'de 5 dakika santrifüj sonrası pelet süspanse edildi. Süspanse edilen hücreler 1:1 oranında ficoll ile yavaşça karıştırılarak 400x*g*'de 30 dakika santifüj edildi. Falkonda oluşan bulutsu tabaka dikkatli bir şekilde diğer fazları almadan temiz bir falkona aktarıldı. Üzerine 10 mL PBS eklenip 250x*g*'de 10 dakika santrifüj edildi ve bu basamak 3 kere tekrarlandı. En son basamakta elde edilen pelet süspanse edildikten sonra thoma lamında sayılarak flasklara ekildi. Elde edilen kondrositlerin Alcian Blue boyaması yapıldı ve ek olarak SOX9, Col2, prolaktin ve COMP genlerinin ifadesi qRT-PCR ile analiz edilerek kondrosit izolasyonu doğrulandı (Candan Altuntaş ve ark., 2025).



Şekil 3.3. Ficoll yöntemiyle kondrosit izolasyonu.

3.4.2.3.2. Kondrositlerin immünofloresan işaretlenmesi

İzole edilen kondrositler ve izole edilmeyen iSS-MKH'ler 6 kuyucuklu plakalara 15x10^4 hücre olarak ekilip 1 gece 37ºC %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler %0,1 Tween 20 (Sigma-Aldrich, Katalog No. 8221840050) içeren PBS

(PBS-T) ile yıkandı ve %4 PFA ile 15 dakika oda ısısında bekletilerek fikse edildi. Fikse edilen hücreler tekrar PBS-T ile yıkandı ve %0,5 Triton X100 (Sigma-Aldrich, Katalog No. X100-5mL) içeren PBS ile 10 dakika bekletilerek permeabilizasyon yapıldı. Tekrar PBS-T ile yıkanan hücreler daha sonra superblock (ScyTek, Katalog No. AAA-IFU) serumla oda ısısında 25 dakika bloke edildi. Bloklama sonrası örnekler tekrar yıkanmadan doğrudan primer antikorlara alındı. Primer antikor olarak anti-tip 2 kolajen (abcam, Katalog No. ab185420) ve anti-Agrekan (abcam; Katalog No. ab3778) kullanılarak oda ısısında 1 buçuk saat bekletildi. Süre sonunda PBS-T ile yıkanan hücreler uygun sekonder antikor (goat anti mouse IgG; Alexa flour647, abcam; Katalog No. ab150115) ile 1 buçuk saat oda ısısında karanlıkta bekletildi. Süre sonunda hücreler önce PBS-T ile sonra dH_2O ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan hücreler DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride Katalog No. 10236276001) ile kapatılarak konfokal mikroskopta (Leica TCS SP8) fotoğraflandı (Kılıç ve ark., 2025) .

3.5. Makrofaj Farklılaştırılması ve Kondisyonlanmış Besiyer Hazırlığı

In vitro osteoartrit modeli oluşturmak için pro-enflamatuar sitokinlerin salınmasını sağlayan M1 makrofajlarla kondisyonlanmış besiyer kullanılması hedeflenen bu deney planında insan monositi olan U937 hücreleri kullanıldı. U937 hücrelerini makrofaj benzeri hücrelere (M0) farklılaştırmak için Phorbol 12-miristat (PMA, Santa Cruz Biyoteknoloji Katalog No. P8139-1MG) eklenerek 24 saat inkübe edildi. PMA işleminden sonra, süspanse U937 hücreleri, M0 hücrelerine farklılaşarak adherent forma dönüştü. M0 hücreleri daha sonra 24 saat daha lipopolisakkarit (LPS, Sigma-Aldrich, Katalog No. 437627-5MG) ve interferon gama (IFN-γ, Sigma-Aldrich, Katalog No. 01-172) ile kültür edilerek M1 makrofaj fenotipine polarize edildi (Abdulhadi, 2014). Monositlerin makrofajlara farklılaşması, faz kontrast mikroskobu altında incelenip ve M1 makrofaj farklılaşma yüzey belirteci olan CD68, M2 makrofaj farklılaşma yüzey belirteci olan CD206 monoklonal antikoru akım sitometrisinde analiz edildi. M1 makrofajlara farklılaşan monosit hücreleri akım sitometrisinde doğrulandıktan sonra model oluşturmak için kullanıldı. M1 makrofajlara farklılaşan hücreler yıkandı ve inflamatuar olarak kondisyonlanmış ortam (KO) üretmek amacıyla 24 saat boyunca serumsuz RPMI besiyerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda KO toplandı, 0,22 μm filtreden süzülerek -80ºC'de muhafaza edildi.

(Tarricone ve ark., 2020). M1 farklılaşma verimi, M1/(M1+M2) * 100 formülü kullanılarak hesaplandı.

3.6. *In Vitro* Osteoartrit Modeli Oluşturma

iSS-MKH'lerinden kondrojenik farklılaştırma yapılarak kondrosit izolasyonu yapıldı. Kondrosit izolasyonu düşük yoğunluklu mononükleer hücreler için kullanılan ficoll ile yapıldı (Ray ve ark., 1982). Makrofaj içermeyen kültürlerde (HG1), ilk önce $1x10^6$ kondrosit hücresi ekilerek kondisyonlanmış besiyeri kullanılarak inkübe edildi. Makrofaj içeren kültürlerde (HG2) ise $1x10^6$ kondrosit hücresi doğrudan M1 makrofaj hücresi ile beraber ko-kültür edildi. Her iki grup hücre kültürleri 24 saat 37ºC'de inkübe edilerek hasar modeli oluşturuldu (Abdulhadi, 2014; Shen ve ark., 2022; Topoluk ve ark., 2018; Wolfe ve ark., 2016). İnkübasyonu takiben osteoartrit modeli validasyonu için ko-kültür sonrasında hücrelerin hasar gördüklerini göstermek için hasar belirteci olan IL1-β sitokini incelendi. Bu sitokinin hem gen ekspresyonuyla hücrelerde kontrole göre arttığı hem de ELISA ile ortama salınmış olan miktarının kontrole göre değiştiği belirlendi. Kontrol grubu olarak kondisyonlanmış ortamla veya doğrudan makrofajla ortak kültür edilmemiş (sağlıklı) kondrosit hücre kültürü kullanıldı.

3.7. Mitokondri İzolasyonu ve Hasar Modeline Transferi

3.7.1. X-gal Boyama

Hasar gruplarına uygulanacak mitokondriler için kullanılan iWJ-MKH ve iKİ-MKH'lerinin yaşlılık morfolojisinde oluştuğu bilinen beta-galaktosidaz enzim aktivitesindeki miktarını ölçmek için Senescence Cells Histochemical Staining Kitin (Sigma-Aldrich, Katalog No. CS0030-1KT) önerdiği protokol kullanıldı. 6 kuyucuklu plakalara $2x10^5$ hücre ekildi ve bir gece CO_2'li ortamda 37ºC'de inkübe edildi. Hücrelerin inkübasyon sonrası besiyeri uzaklaştırıldı ve 2 kere 1 mL 1x PBS ile yıkandı. Yıkanan hücrelere 1.5 mL 1x fiksasyon tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 6-7 dakika inkübe edildi. Süre sonunda hücreler 3 kere 1x PBS ile yıkandı. Kit içerisinde bulunan Staining solüsyonu, Reagent B, Reagent C ve X-gal solüsyonu, dH_2O içerisine eklendi ve 0,22 µm filtreden geçirildi ve her örneğe 1 mL eklenerek 37ºC'de 1 gece CO_2'siz boyunca mavi renge dönene

kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tekrar 1x PBS ile yıkandıktan sonra örnekler ışık mikroskopta incelenerek fotoğraflandı (Kavanagh ve ark., 2021). Yaşlanma morfolojisi gösteren hücrelerin koyu mavi renk boyanması pozitif boyama olarak yorumlanırken, yaşlanma belirtisi göstermeyen hücrelerin beyaz/sarı renk bir boyama göstermesi negatif boyama olarak yorumlandı.

3.7.2. iWJ-MKH ve iKİ-MKH'lerinden Mitokondri İzolasyonu

Hasar gruplarına, kontrol gruplarına ve tedavi gruplarına uygulanacak olan iWJ-MKH ve iKİ-MKH'lerden 1×10^6 hücre Thoma lamında sayılıp ayrı ayrı ependorf tüpüne alınarak 300×*g*'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant ortamdan uzaklaştırılıp elde edilen pelet Standart Hidrojen Elektrot (SHE) tamponu (0,25 M sukroz, 20 mM HEPES (pH 7.4), 2 mM EGTA, 10 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$ ve %0,1 BSA) içinde önce pipetaj yapıldı ve daha sonra insülin enjektörü kullanılarak iyice homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası tekrar 4ºC'de 3 dakika boyunca 1100×*g*'de santrifüj edildi. Temiz bir santrifüj tüpüne süpernatant aktarılarak mitokondriyi çöktürmek için 4ºC 'de 15 dakika 12.000×*g*'de santrifüj edildi. Elde edilen mitokondri peleti, 500 µL SHE tamponu içinde yeniden homojenize edilerek 12.000×*g*'de 10 dakika boyunca 4ºC'de santrifüj edildi. İzole edilmiş mitokondrinin protein konsantrasyonunu belirlemek için bikinkoninik asit (SMART BCA, İntron, Lot no. 201410651) analizi yapıldı ve 562 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında ölçüm alındı (Kim ve ark., 2018).

3.7.3. MitoTracker Red Boyaması

MitoTracker Red boyası (Thermo Fisher Scientific, Katalog No. M46752), mitokondrideki membran potansiyeline bağlı hücre canlılığını belirlemek ve hücrelerin sahip olduğu mitokondri miktarını ve hücre içerisindeki dağılımını belirlemek için kullanılmaktadır. Bu boya, DMSO içerisinde çözülerek 1mM stok solüsyon hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyon içerisinden son konsantrasyon 500 nM olacak şekilde uygun miktar alınıp PBS ile seyreltilerek boyama solüsyonu elde edildi. Hazır olan boya karanlık ortamda örnek üzerine damlatılarak 30 dakika 37ºC'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler boya uzaklaştırılarak kapatma medyumu DAPI ile kapatıldı ve konfokal

mikroskopta (Leica TCS SP8) 581/644 nm'de incelenerek fotoğraflandı (Presley ve ark., 2003).

3.7.4. TMRM (Tetrametilhodamin metal ester) Boyaması

TMRM boyası (Thermo Fisher Scientific, Katalog No. T668), mitokondrideki membran potansiyelinde meydana gelen farklılıkları belirlemek için kullanıldı. Bu boya DMSO içerisinde çözülerek 100 µM stok solüsyon şeklinde hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyon içerisinden son konsantrasyon 10 µM olacak şekilde uygun miktar alınıp PBS ile seyreltilerek boyama solüsyonu elde edildi. Hazır olan boya karanlık ortamda örnek üzerine damlatılarak 30 dakika 37ºC'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler boya uzaklaştırılarak kapatma medyumu DAPI ile kapatılarak konfokal mikroskopta (Leica TCS SP8) 552/574 nm'de incelenerek fotoğraflandı (Bonora ve ark., 2018).

3.7.5. Falloidin Boyaması

Falloidin (Sigma-Aldrich Katalog No. P5282), aktin filamentlerini (Fibröz-aktin, F-aktin olarak) boyamak için kullanılan oldukça seçici bir bisiklik peptittir (Manautou ve ark., 2010). Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra PFA ile 15 dakika fikse edildi. Fiksasyon sonunda PBS ile tekrar yıkanan hücreler dehidrat etmek için asetona (Sigma-Aldrich Katalog No. 1000141011) batırılıp çıkarıldı ve permabilizasyon için %0,1 Triton-X-100 ile 10 dakika bekletildi. Tekrar PBS ile yıkandı. Hücrelere son konsantrasyonu 50 µg/mL olacak şekilde boya damlatıldı ve 40 dakika bekletildi. PBS ile tekrar yıkandı ve kapatma medyumu DAPI ile kapatılarak ve konfokal mikroskopta (Leica TCS SP8) incelenerek fotoğraflandı.

3.7.6. Hasar Modeline Mitokondri Transferi

Mitokondri transferinde iki farklı hücreden izole edilen mitokondriler yukarıda belirtilen gruplara uygulandı. Transfer işlemi katyonik polimerler kullanılarak gerçekleştirildi. Mitokondrilerin iSS-MKH'lere (hasar grupları ve mitokondri uygulama grupları) transferi için 2,5 µg protein eşdeğerinde mitokondri 10 µL dilüsyon tampon çözeltisi içerisinde sulandırılıp 10 µL kompleks içerisinde 8-10 kez hızlıca pipetlendi. Oda sıcaklığında 20 dakika boyunca mitokondri-katyonik kompleks oluşması için yapılan

inkübasyon sonunda elde edilen kompleksin tamamı hücrelere verildi. Mitokondri eklenmiş besiyeri 24 saat sonra yenilenerek 48 saat boyunca 37ºC'de inkübasyona devam edildi. Ortamda serbest dolaşan mitokondriler uzaklaştırıldı. Mitokondri transferinden sonra daha önce belirtilen protokole uygun olarak TMRM boyası ile hasarlı membran varlığı ve MitoTracker Red boyası ile tekrar total mitokondri varlığı konfokal mikroskopta gösterildi (Kılıç ve ark., 2025; Kim ve ark., 2018). Böylece kondrosit hücrelerine mitokondri transferinin gerçekleştiği gösterildi.

3.8. Mitokondri Transferinin Hasar Modeli Üzerindeki Etkinliğinin İncelenmesi

3.8.1. Real Time PCR (qRT-PCR) Analizi

Hasar gruplarının kontrol grubuyla karşılaştırılmasıyla yapılacak olan Real time PCR (qRT-PCR) analizinde öncelikle RNA izolasyon kitinin (Sigma-Aldrich, Katalog No. 83913-1EA) protokolüne uygun olarak RNA izolasyonu yapıldı (Altuntas ve ark., 2022). İzole edilen RNA örnekleri picodrop ile konsantrasyonları ölçülerek ve son konsantrasyonu 1000 µg'lık komplementer DNA (cDNA), cDNA sentez kiti (Revertaid First Strand cDNA Synthesis, Thermo Fisher Scientific, Katalog No. K1621) kullanılarak sentezlendi. Kondrogenez belirteçleri Agrekan, Kolajen tip 2, Sox9 (Xia ve ark., 2014); anti-apopototik Bcl-2 (Wang ve ark., 2019); pro-apopototik Bax-1; pro-enflamatuvar IL-1β, TNF-α (Xia ve ark., 2014); anti-enflamatuvar IL-4; hücre proliferasyonu belirteci Ki-67 (Pessler ve ark., 2008), osteoartritte hipoksik kondrosit fonksiyonu, HIF-1α ekspresyonunun düzensizliği ve mitofaji aracılı apoptoz aktivasyonuna yol açtığı için HIF-1α (Lu ve ark., 2021), HMOX ve NOX4 genleri Real Time PCR (LightCycler-II 480, Roche) cihazı kullanılarak çalışıldı. Gen ekspresyon seviyeleri housekeeping gen (referans gen) olan Aktin-β'ya karşı değerlendirildi.

Tablo 3.2. RT-PCR içerikleri

Reaksiyon İçerikleri	**Son Konsantrasyon**
Kalıp RNA	1000 ng
Oligo(dT) Primer (100 µM)	30 nM
RNAz uzaklaştırılmış su	x
65 ºC 5 dakika	
5X reaksiyon tamponu	1X
Ribolock RNAz inhibitör (20 U/µL)	1,25 U
dNTP mix (10 Mm)	2 µL
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1 U
Son hacim	20 µL
42 ºC 60 dakika 70 ºC 5 dakika	

Tablo 3.3. qRT-PCR basamakları

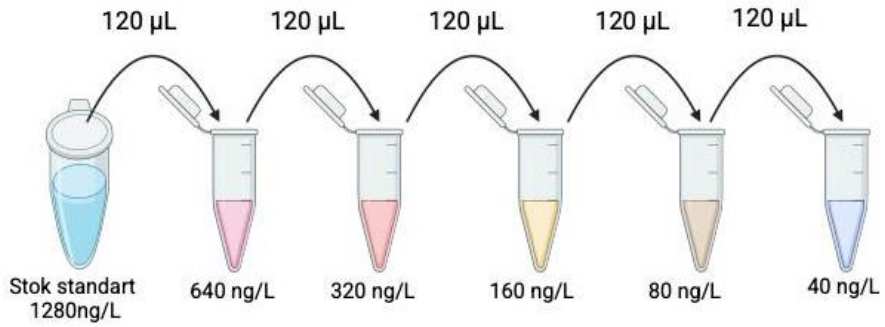
Basamak	**Döngü**	**Tm**	**Süre**
1	1	95ºC	30 sn
2	45	95ºC	15 sn
		60ºC	60 sn
3	1	65ºC-95ºC	5 sn

Tablo 3.4. qRT-PCR'da kullanılan genlere ait primer sekansları

PRİMERLER	**SEKANS (5'-3')**
Aktin-β ileri	5' AGA GAA GCT GTG CTA TGT TG 3'
Aktin-β geri	5' GTA CTC CTG CTT GCT GAT CC 3'
Agrekan (ACAN) ileri	5' GTC TCA CTG CCC AAC TAC CC 3'
Agrekan (ACAN) geri	5' TCG AGG GTG TAG CGT GTA GA 3'
Kolajen tip 2α1 ileri	5' ACG GCG AGA AGG GAG AAG TTG 3'
Kolajen tip 2α1 geri	5' GGG GGT CCA GGG TTG CCA TTG 3'
Sox9 ileri	5' TGA AGA AGG AGA GCG AGG AA 3'
Sox9 geri	5' GGG GCT GGT ACT TGT AAT CG 3'
IL-1β ileri	5' AGT TGA CGG ACC CCA AAA G 3'
IL-1β geri	5' AGC TGG ATG CTC TCA TCA GG 3'
IL-4 ileri	5' CAC CGA GTT GAC CGT AAC AG 3'
IL-4 geri	5' GCC CTG CAG AAG GTT TCC 3'
Ki-67 ileri	5' CTC CCT TAA GAC GGC AGT GTA TTA G 3'
Ki-67 geri	5' GAA GGC TCT GTC TCA GTA TCT GAA GTT 3'
HIF-1α ileri	5' GCT TTA ACT TTG CTG GCC CC 3'
HIF-1α geri	5' TTC AGC GGT GGG TAA TGG AG 3'
NOX4 ileri	5' ATG TTG GGC CTA GGA TTG TG 3'
NOX4 geri	5' GAG AAG TTC AGG GCG TTC AC 3'
Bcl-2 ileri	5' TTG TTC AAA CGG GAT TCA CA 3'
Bcl-2 geri	5' ACA AAA CCC CAC AGC AAA AG 3'
HMOX-1 ileri	5' ATG CCC CAG GAT TTG TCA GA 3'
HMOX-1 geri	5' AGA GGA TGC TGC TGA AGG AA 3'
Bax-1 ileri	5' CCC TTT TGC TTC AGG GTT TC 3'
Bax-1 geri	5' GCC ACT CGG AAA AAG ACC TC 3'
TNF-α ileri	5' CAG CCT CTT CTC CTT CTT GAT 3'
TNF-α geri	5' GCC AGA GGG CTG ATT AGA GA 3'

3.8.2. IL1-β ve IL-4'ün ELISA Ölçümü

Hasar modeli oluşturulduktan ve mitokondri transferi yapıldıktan sonra meydana gelen biyokimyasal değişimleri analiz etmek için ELISA ölçümü (kolorimetrik ölçüm) yapıldı. Bu ölçümde hücreler %70 doluluğa ulaştığında 6 kuyucuklu plakalara ekim yapıldı. Pro-enflamatuvar IL-1β (BT LAB, Katalog No. E0143Hu); anti-enflamatuvar IL-4 (BT LAB, Katalog No. E0092Hu) ölçümleri ELISA kitlerinin protokolleri doğrultusunda yapıldı. Kit içerisindeki malzemeler öncelikle oda ısısına getirilerek belirlenen oranlarda standart solüsyonlar hazırlandı. Standart kuyucuklarına 50 µL standart solüsyonu eklendi. Standart solüsyonun eklendiği kuyucuklar biyotinlenmiş antikor içerdiğinden, ayrıca ek bir antikor ilavesi yapılmadı. Örnek kuyucuklarına 40 µL örnek eklendikten sonra 10 µL insan IL-1β ya antikoru eklendi ve örnek kuyucuklarına, standart kuyucuklara 50 µL streptavidin-HRP eklenerek homojen edildi. Plaka 37°C'de 60 dakika karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda plaka 300 µL yıkama tamponuyla 30 saniye ile 1 dakika süreyle 5 kez yıkama tamponuyla yıkandı. Plaka son kez yıkandıktan sonra havlu kâğıtta biraz daha kuruması için bekletildi. Kuruduktan sonra her bir kuyucuğa 50 µL substrat solüsyonu A eklendi ve ardından her kuyucuğa 50 µL substrat solüsyonu B eklenerek 37°C'de 10 dakika karanlıkta inkübe edildi. 50 µL durdurma solüsyonu eklenerek mavi rengin sarıya dönüşmesiyle 10 dakika içinde 450 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucu (Versamax, ABD) kullanılarak okutuldu (Saglam ve ark., 2015). Aynı protokol IL-4 antikoru içeren ELISA kiti için de tekrarlandı.



Şekil 3.4. ELISA analizinde kullanılan standartların hazırlanışı (BT LAB).

3.8.3. Apoptoz Ölçümü

Apoptoz analizleri için Annexin V-FITC/PI Apoptoz kitinin (Elabscience, Katalog No. E-CK-A211) talimatları kullanıldı. *In vitro* osteoartrit modeli oluşturulan ve mitokondri transferi yapılan hücreler, 48 saat sonra flask yüzeyinden %0,25 tripsin-EDTA ile muamele edilerek kaldırılıp 15 mL santrifüj tüplerine alındı ve 300x*g*'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantı uzaklaştırılan hücreler yeniden süspanse edilerek Thoma lamında sayıldı. Her bir deney grubu için $2x10^5$ hücre ayrı ayrı santrifüj tüplerine alınıp 300x*g*'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı, hücreler PBS ile yıkandı ve tekrar santrifüj yapılarak 500 µL 1× Annexin V Binding Buffer eklenerek süspanse edildi. Süspansiyon sonrası her bir gruba 5 µL Annexin-V FITC ve 5 µL PI eklenerek yavaşça hücreler vortekslendi ve apoptozun indüklenmesini sağlamak için oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitince FACS Calibur (BD Biosciences) cihazında örnekler okutuldu. Okuma sonucunda elde edilen veriler Cell Quest programı (BD Biosciences) kullanılarak canlı, erken-geç apoptotik ve nekrotik hücre oranları analiz edildi.

3.8.4. ROS (Reaktif Oksijen Türleri) Ölçümü

ROS ölçümü için diklorühidrofluorodiasetat (DC-FDA, 2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Sigma-Aldrich, Katalog No. 4091-99-0) yöntemi kullanıldı. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara $2x10^5$ hücre olacak şekilde ekildi ve bir gece inkübe edildi. Deney gruplarına mitokondri uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonunda hücreler iki kez PBS ile yıkandı ve serumsuz besiyerinde çözünmüş son konsantrasyon 10 µM olacak şekilde DC-FDA eklendi ve 30 dakika 37ºC %5 CO_2 inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler PBS ile yıkandı ve FACS Calibur (BD Biosciences) akım sitometri cihazında FL-1 (yeşil florasan, 480/510 nm) ayarında pozitif boyanan hücreler sayıldı (Hafer ve ark., 2008). Akım sitometri analizinde elde edilen veriler negatif kontrol örneği referans alınarak belirlenen floresans ışıma eşiğinin üstündeki hücre sayısının (olay), cihaza verilen deney grubuna ait örnekteki tüm hücre sayısına oranlanarak %ROS ifadesi olarak verilmiştir. %ROS olarak sunulan ham veriler FlowJo programında (BD Biosciences) işlenerek analiz edilmiştir. Gerçekleştirilen analizler ile deney gruplarındaki ROS düzeyleri median floresans yoğunluk olarak hesaplanarak gruplar arası istatistiksel karşılaştırma buna uygun olarak ANOVA ile ilgili literatürde belirtildiği şekliyle gerçekleştirilmiştir (Yu ve ark., 2021).

3.8.5. Hücre Canlılık Ölçümü

WST-8 (CCK8/Elabscience Katalog No. CK-A362), hücre çoğalmasını ve canlılık oranlarını belirlemek için kullanılan kolorimetrik bir ölçüm yöntemidir. Bu yöntem, hücre ortamında formazan kristallerinin çözünmesiyle turuncu renk değişimi oluşturarak gözlemlenir. Bu ölçümü gerçekleştirmek için her bir deney grubundan $15x10^3$ hücre, üçer tekrarlı olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara (Nest Scientific, Katalog No.7001003) ekildi. Kör okuma olarak hücre içermeyen ancak %10 WST-8 reaktifi içeren hücre besiyeri kullanıldı. Hücrelerin inkübasyonu tamamlandıktan sonra her kuyucuktaki besi ortamı uzaklaştırılarak kuyucuklar PBS ile yıkandı ve %10 WST-8 reaktifi içeren hücre besiyeri ile değiştirildi. Kültür ortamında 37°C 'de %5 CO_2 ortamında 2 saat turuncu renk değişimi kontrol edilerek inkübe edildi. Süre sonunda mikroplaka okuyucuda (Versamax, ABD) 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü (Turac ve ark., 2018).

3.8.6. TBARS (Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler, MDA) Ölçümü

TBARS ölçümü, lipid peroksidasyonunu ölçmek için kullanılmaktadır. Bu ölçüm oksidatif stres seviyelerinin iyi bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Aguilar Diaz De Leon ve Borges, 2020). TBARS kolorimetrik analiz (Elabscience, Katalog No. BC-K298-M) kitine ait protokole uygun şekilde gerçekleştirildi. Hücreler tripsin ile kaldırılıp 300x*g*'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırılıp ve PBS ile yıkanan hücreler tekrar 300x*g*'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Her bir hücre peleti 180 µL ekstraksiyon solüsyonu eklenerek pipetaj yapılıp 10000x*g*'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatanttan BCA ile protein konsantrasyonu ölçüldü. 15 mL'lik falkonlara farklı konsantrasyonlardaki 0,1 mL standart çözelti alındı. Her falkona 0,1 mL berraklaştırıcı solüsyon ardından 4 mL kromojenik ajan eklendi. Falkonların kapak kısımları parafilm ile kapatılarak tamamen karıştırılıp, 100°C'de 60 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında falkonlar oda sıcaklığında soğuması için distile su ile bekletildi ve ardından 1600×*g*'de 10 dakika santrifüj edildi. Süspanse edilen peletin 0,25 mL'lik süpernatantı, bir mikropipet yardımıyla 96 kuyucuklu plakaya aktarıldı. Aktarılan örnekler mikroplaka okuyucuyla (Versamax, ABD) 532 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Örneklerin protein eşdeğerleri BCA kiti ile belirlendi ve TBARS ölçüm sonuçları protein konsantrasyonlarına oranlanarak grafik oluşturuldu.

3.8.7. Adenozin trifosfat (ATP) Ölçümü

ATP, hücrelerde enerji taşıyıcısı olarak kullanılan bir koenzimdir ve hücrelerin ATP değeri, hücre işlevselliklerinin iyi bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir. ATP miktarı, ATP kolorimetrik ölçüm (Elabscience, Katalog No. E-BC-K157-S) kitinin protokolü doğrultusunda gerçekleştirildi. Hücreler ekstraksiyon solüsyonu ile kazınarak kaldırılıp 300x*g* 5 dakika santrifüj yapıldı ve 10000x*g*'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatanttan BCA ile protein konsantrasyonu ölçüldü. 1,5 mL ependorf tüpüne 30 µL 1 mmol/L ATP standart uygulama solüsyonu alınarak 330 µL kontrol çalışma solüsyonu eklenerek kör,1,5 mL ependorf tüpüne 30 µL 1 mmol/L ATP standart uygulama solüsyonu alınarak 330 µL tespit çalışma solüsyonu alınarak standart tüp, 1,5 mL ependorf tüpüne 30 µL örnek süpernatant alınarak 330 µL kontrol çalışma solüsyonu eklenerek kontrol tüpü, 1,5 mL ependorf tüpüne 30 µL örnek süpernatanı alındı ve 330 µL tespit çalışma solüsyonu eklenerek örnek tüpü hazırlandı. Hazırlanan karışımlar iyice homojenize edildikten sonra 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Her tüpe 50 µL protein çöktürücü eklenerek 3 saniye karıştırılıp 10000×*g*'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Ölçüm yapmak için 300 µL süpernatant alındı ve her kuyucuğa 500 µL kromojenik ajan çalışma solüsyonu eklendi. 5 saniye boyunca tamamen karıştırılması sağlanarak oda ısısında 2 dakika bekletildi ve her kuyucuğa 500 µL stop solüsyonu eklendi. Mikroplaka okuyucuyla (Versamax) 636 nm dalga boyunda okutuldu. Elde edilen sonuçlar analiz edildiğinde milyondaki hücre sayısına (HG1 için $1x10^5$ hücre, HG2 için $2x10^5$ ($1x10^5$ kondrosit+$1x10^5$ M1 makrofaj)) bölünerek kontrol grubuna göre kat hesabı yapıldı ve grafik oluşturuldu.



Şekil 3.5. ATP ekstraksiyonu. Biorender (www.biorender.com) kullanılarak oluşturulmuştur.

3.9. İstatistiksel Analizler

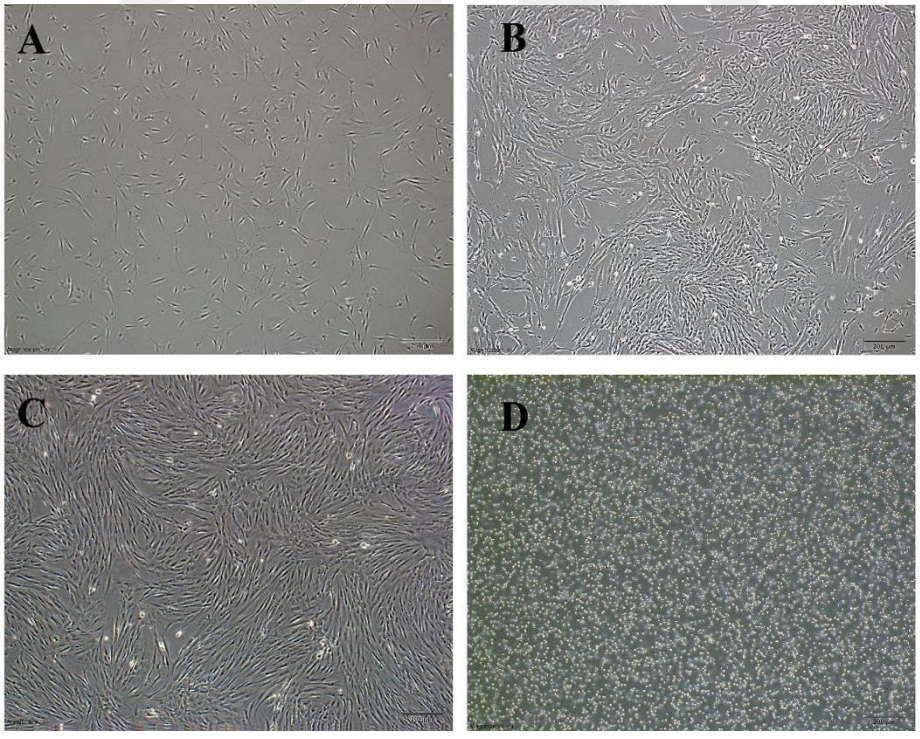
Deney grupları üç tekrarlı olarak şekilde (n=3) çalışıldı. Real time PCR (qRT-PCR) analizinde hasar grupları ve kontrol grubuyla yapılan çalışma sonunda cihazın otomatik olarak hesapladığı Cp değerleri kullanılarak Graph-Pad Prism8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programında analiz edildi. Analizlerden alınan verilerin istatistiksel olarak değerlendirmesi Minitap 14 programında çoklu grup analizleri için parametrik tek yönlü ANOVA testi kullanılarak yapıldı ve elde edilen sonuçlar $p<0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Kilic ve ark., 2023).

4.BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.1.1. Mezenkimal Kök Hücrelerinin Kültürü ve Çoğaltılması

Çalışmada insan sinovyal sıvı mezenkimal kök hücre (iSS-MKH), insan kemik iliği mezenkimal kök hücre (iKİ-MKH), insan Wharthon Jeli mezenkimal kök hücre (iWJ-MKH), insan monosit hücresi (U937) kullanıldı. Hücreler -152°C dondurucudan çıkartıldığında 37°C su banyosunda ısı şokuyla çözdürüldü. Besiyer eklenen hücreler kültür kaplarına ekilerek 37°C 'de, %5 CO_2 de büyütüldü. Kültür kaplarında hücre yoğunluğu faz kontrast mikroskobunda takip edilerek %70-80 aralığında olduğunda hücreler %0,25 Tripsin-EDTA ile 3 dakika inkübe edilerek kaldırılıp santrifüj yapıldı ve pelet tekrar süspanse edilerek hücre sayımı yapıldı. Hücre sayısına göre hücreler flasklara aktarılarak pasajlandı ve çoğalması sağlandı.

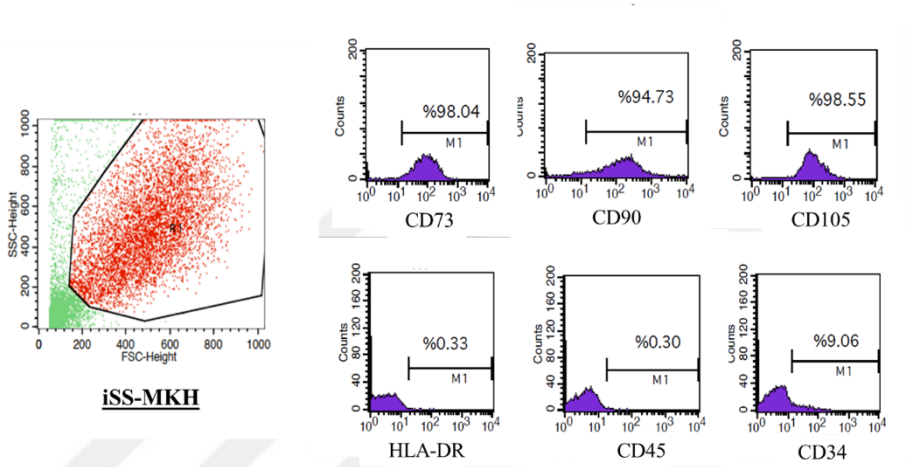


Şekil 4.1. Kullanılacak hücrelerin morfolojik fotomikrografları. iSS-MKH (A), iWJ-MKH (B), iKİ-MKH (C), U937 hücresi (D) (Ölçüm çubukları: 200 µm).

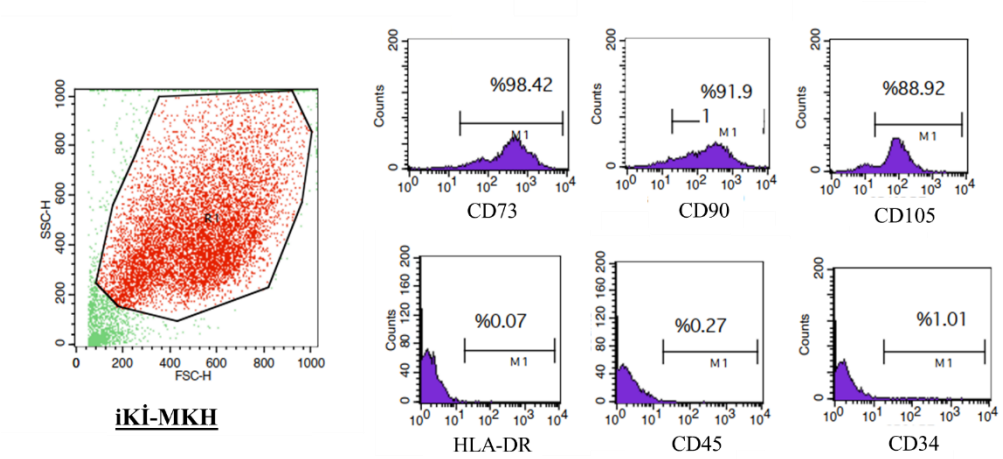
4.1.2. Hücre Karakterizasyon Çalışmaları

4.1.2.1. Kök hücre immünofenotiplemesi

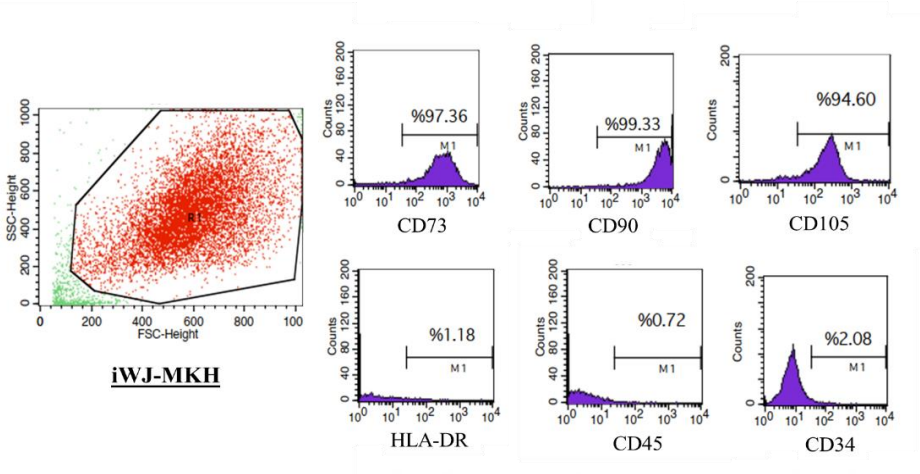
Hücreler pasajlanıp çoğaltıldıktan sonra kök hücre belirteçleri akım sitometrik analizlerle incelendi. Mezenkimal kök hücre belirteçleri olan anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105 yönünden pozitif, hematopoietik belirteçler olan anti-CD34, anti-CD45 ve anti-HLA-DR yönünden negatif sonuçlar göstererek kök hücre popülasyonu olduğu doğrulandı.



Şekil 4.2. iSS-MKH immünofenotiplemesi. Akım sitometrik analizlerle belirlenen immünofenotipik özellikleri anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105, anti-HLA-DR, anti-CD45, anti-CD34 değerlerinin sırasıyla %98,04, %94,73, %98,55, %0,33, %0,30, %9,06 oranlarında olduğu belirlendi.



Şekil 4.3. iKİ-MKH immünofenotiplemesi. Akım sitometrik analizlerle belirlenen immünofenotipik özellikleri anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105, anti-HLA-DR, anti-CD45, anti-CD34 değerlerinin sırasıyla %98,42, %91,9, %88,92, %0,07, %0,27, %1,01 oranlarında olduğu belirlendi.



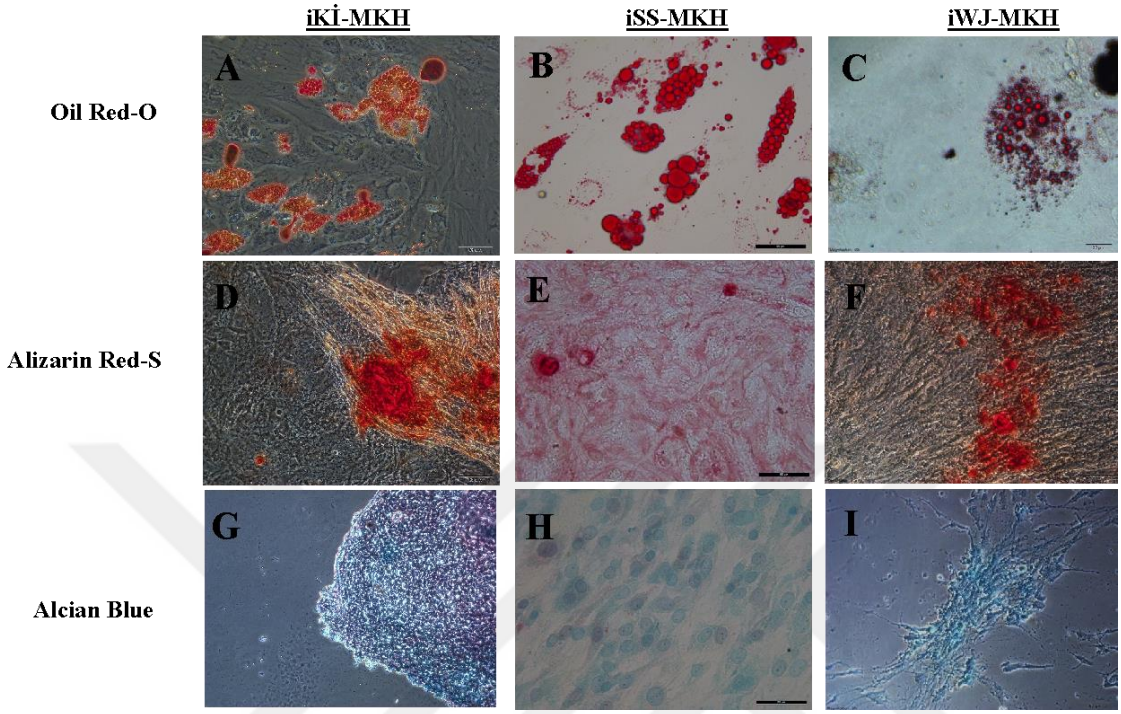
Şekil 4.4. iWJ-MKH immünofenotiplemesi. Akım sitometrik analizlerle belirlenen immünofenotipik özellikleri anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105, anti-HLA-DR, anti-CD45, anti-CD34 değerlerinin sırasıyla %97,36, %99,33, %94,60, %0,72, %2,08, %1,18 oranlarında olduğu belirlendi.

4.1.2.2. Kök hücrelerin farklı hücre tiplerine farklılaşmaları

Kök hücre karakterizasyonları akım sitometrik analizlerle doğrulanan hücreler korelasyon sağlaması açısından; osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaştırma süreçlerine alındı ve süreç tamamlandığında uygun histokimyasal boyalarla boyanarak farklılaşma potansiyelleri incelendi. İncelemeler sonucunda kullanılacak olan kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin olduğu ve dolayısıyla akım sitometri analizleriyle korelasyon göstererek kök hücre olduğu doğrulandı.

Adipojenik farklılaşma için 21. gün sonunda Oil Red O boyası ile lipit damlacıkları kırmızı renkte boyanarak her 3 kök hücre tipinde de farklılaşmanın olduğu belirlendi. Osteojenik farklılaşma için Alizarin Red S boyası ile kalsiyum nodülleri boyanan hücreler 21. gün sonunda kiremit kırmızısı renginde boyanarak 3 hücrenin de farklılaşmaya gittiği belirlendi. Kondrojenik farklılaşma sürecine dahil edilen hücreler 21. gün sonunda Alcian

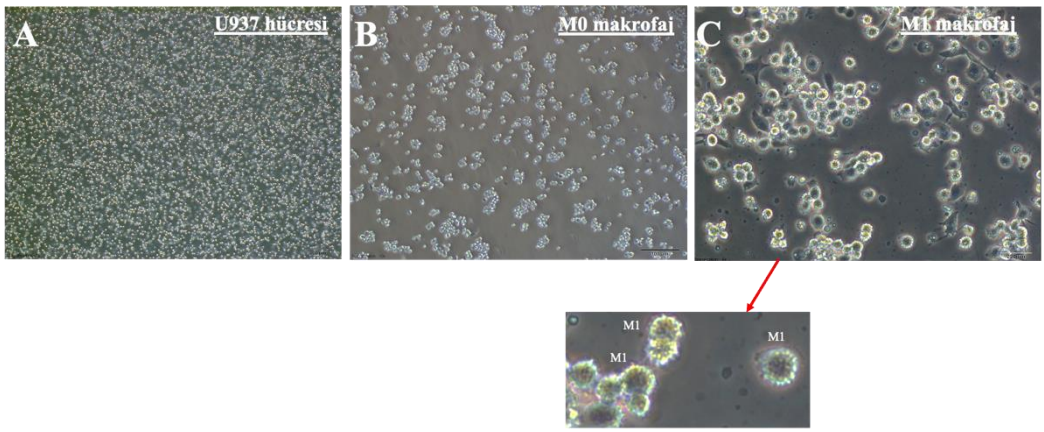
Blue ile boyanarak glikozaminoglikanlar (GAG) mavi, hücre çekirdeği ise kırmızı boyandı ve hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğu doğrulandı.



Şekil 4.5. MKH'ların Oil Red O, Alizarin Red S ve Alcian Blue boyamalarını gösteren fotomikrograf. iKİ-MKH'lerin adipojenik (A), osteojenik (D), kondrojenik (G) farklılaşmaları; iSS-MKH'lerinin adipojenik (B), osteojenik (E), kondrojenik (H); iWJ-MKH'lerin adipojenik (C), osteojenik (F), kondrojenik (I) farkılaştırılmaları. (Ölçüm çubukları: 50 µm).

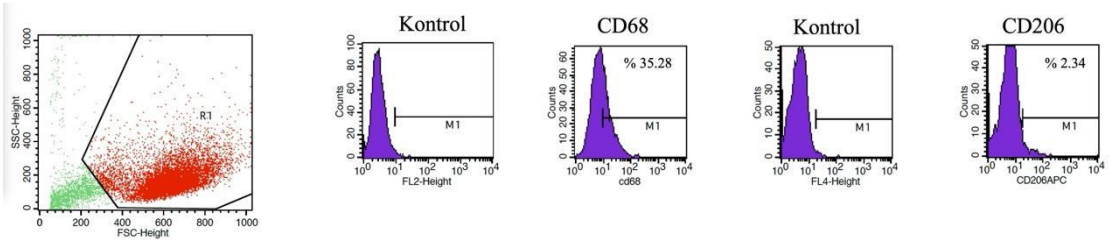
4.1.2.3. U937 hücrelerinin M1 makrofaja farklılaşması

U937 hücrelerinin M1 makrofaja farklılaşmalarıyla ilgili 3 strateji denendi. Bu stratejiler akım sitometride CD68 ve CD206 belirteçleri incelenerek doğrulandı. CD68 M1 makrofaj için, CD206 M2 makrofaj belirteci için kullanıldı. Akım sitometriye ek olarak, ELİSA tekniği kullanılarak IL-4 ve IL1-β seviyeleri belirlendi ve en uygun makrofaj farklılaşma stratejisi seçildi.



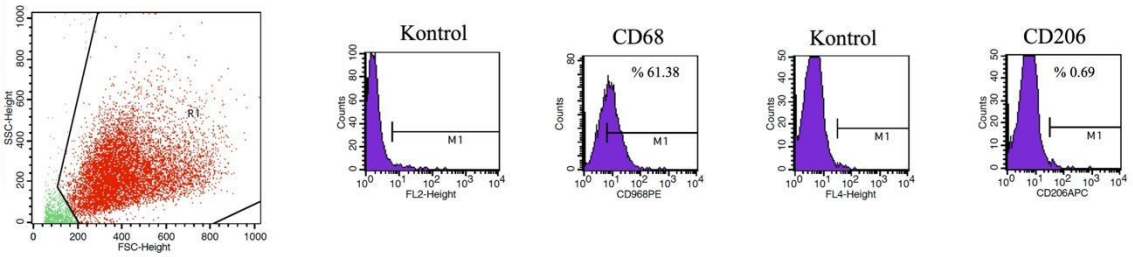
Şekil 4.6. M1 makrofaj farklılaşma aşamaları. U937 monosit hücre (A), 20 ng/mL PMA sonrası M0 makrofaj (B), 100 ng/mL LPS ve 20 ng/mL IFN- γ sonrası M1 makrofaj (C). (Ölçüm çubukları 200 µm (A) 100 µm (B) 50 µm (C)).

U937 hücreleri 20 ng/mL PMA ile 48 saat inkübe edildi. M0 makrofajlara polarize olan U937 hücrelerinin 48 saat sürenin sonunda besiyerleri tazelendi ve hücrelere 100 ng/mL LPS ve 20 ng/mL IFN-γ uygulanarak 24 saat inkübe edildi. Serumsuz besiyerine alınan hücreler 24 saat kondisyonlanmış ortam elde edebilmek için inkübe edildi ve süre sonunda toplanan besiyerler 0,22 µm filtre ile süzüldü (bu stratejide LPS ve IFN- γ uygulamasından sonra toplamda 48 saat geçti). Hücre büyütme kaplarında tutunmuş halde bulunan hücreler tripsinle muamele edilerek, CD68 ve CD206 belirteçleri incelendi ve sırasıyla %2,55, %10,33 olarak belirlendi. U937 hücreleri M1 ve M2 makrofaj hücre tiplerine farklılaştıkları zaman farklılaşma verimi M1 için %9,68 (M1/M1+M2 *100) olduğu hesaplandı. (**Strateji 1**).



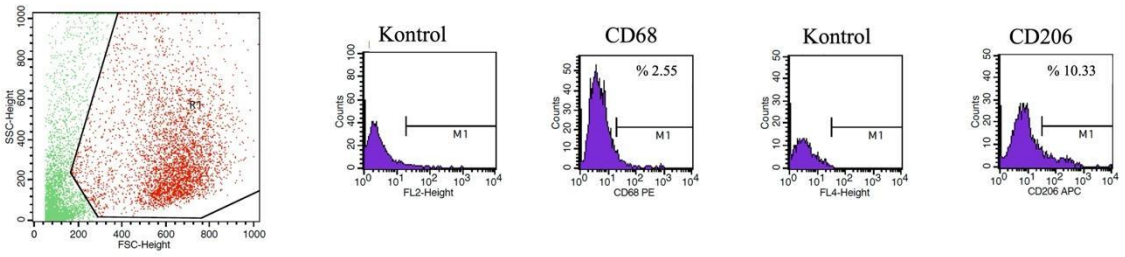
Şekil 4.7. M1 makrofaj farklılaşmasında kullanılan strateji 1. Farklılaşma sonrası akım sitometri kullanılarak CD68 ve CD206 seviyelerinin belirlenmesi.

U937 hücreleri 20 ng/mL PMA ile 48 saat inkübe edildi. M0 makrofajlara polarize olan U937 hücrelerine 48 saat sürenin sonunda besiyerleri tazelenerek 100 ng/mL LPS ve 20 ng/mL IFN-γ uygulanarak 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda hücreler kondisiyonlanmış ortam toplamak için bekletilmeden CD68 ve CD206 belirteçleri incelendi ve sırasıyla %61,38, %0,69 olarak belirlendi. U937 hücreleri M1 ve M2 makrofaj hücre tiplerine farklılaştıkları zaman farklılaşma verimi M1 için %98,89 (M1/M1+M2 *100) olduğu hesaplandı. (**Strateji 2**).



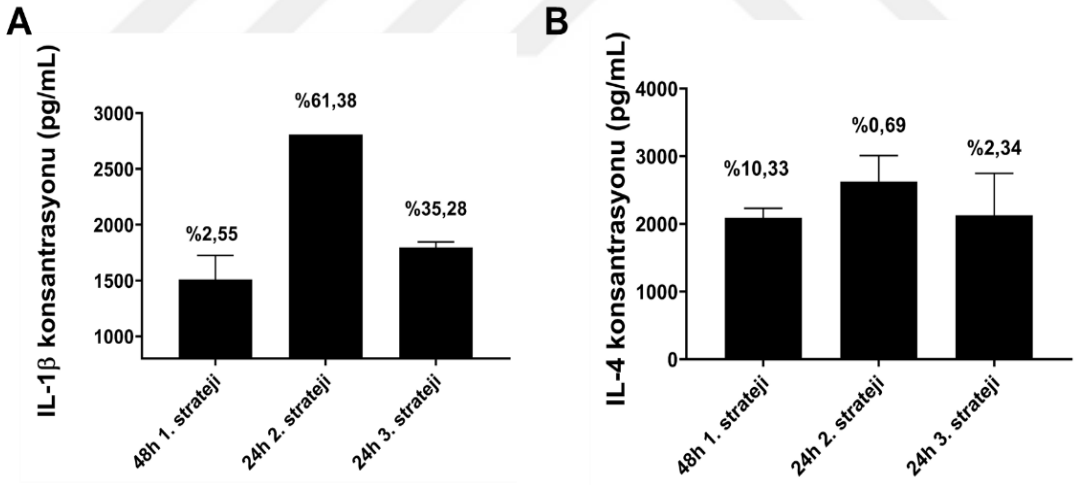
Şekil 4.8. M1 makrofaj farklılaşmasında kullanılan strateji 2. Akım sitometri kullanılarak CD68 ve CD206 seviyelerinin belirlenmesi.

U937 hücreleri 100 ng/mL PMA ile 48 saat inkübe edildi. M0 (matür) makrofajlara polarize olan U937 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonunda, besiyeri tazelendi ve hücreler 10 ng/mL LPS ve 20 ng/mL IFN-γ ile muamele edilerek 24 saat boyunca inkübe edildi. Süre sonunda hücreler kondisiyonlanmış ortam toplamak için bekletilmeden CD68 ve CD206 belirteçleri incelendi ve sırasıyla %35,28, %2,34 olarak belirlendi. U937 hücreleri M1 ve M2 makrofaj hücre tiplerine farklılaştıkları zaman farklılaşma verimi M1 için %93,78 (M1/M1+M2 *100) olduğu hesaplandı. (**Strateji 3**).



Şekil 4.9. M1 makrofaj farklılaşmasında kullanılan strateji 3. Akım sitometri kullanılarak CD68 ve CD206 seviyelerinin belirlenmesi.

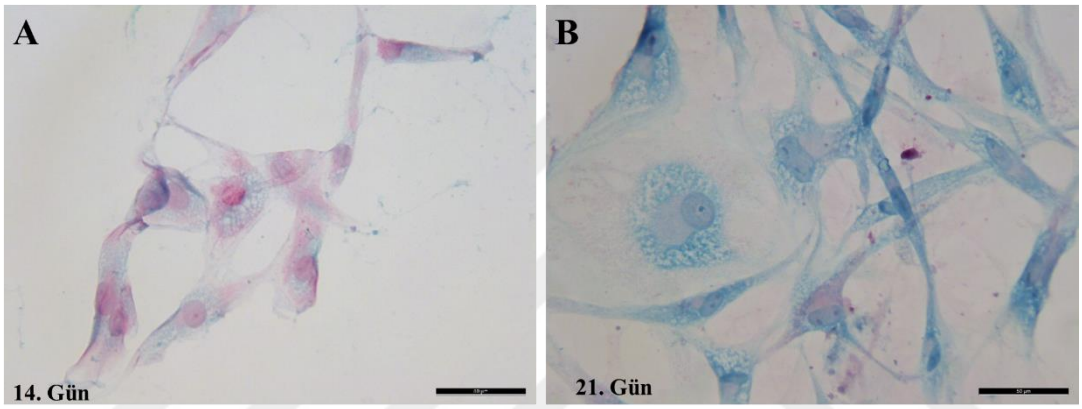
Üç farklı farklılaşma stratejisi kullanılarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda, elde edilen besiyeri ELISA tekniği ile analiz edildi. M1 ve M2 makrofajlar tarafından salgılanan IL-1β (pro-inflamatuar) ve IL-4 (anti-inflamatuar) belirteçleri incelendi ve akım sitometri sonuçlarıyla korelasyon gösterdi. Sonuçlar, en uygun farklılaşma stratejisinin %61,38 M1 makrofaj ve %0,69 M2 makrofaj oranı ile 2. strateji olduğunu ortaya koydu. Bu doğrultuda, deney gruplarında kullanılacak makrofaj farklılaşmaları belirlenen protokole göre gerçekleştirildi.



Şekil 4.10. M1 makrofaj farklılaşmasında IL-4 ve IL-1β konsantrasyonları. Kullanılan stratejilerdeki besi ortamlarının ELİSA tekniğiyle IL-4 ve IL1-β konsantrasyonlarının belirlenmesi.

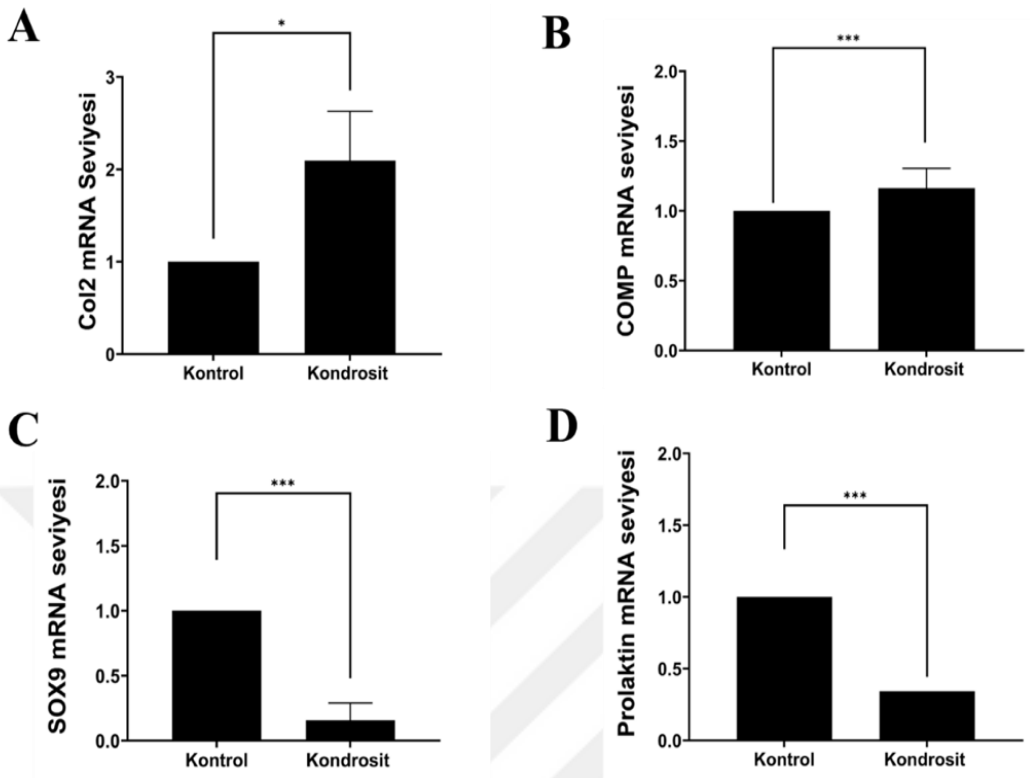
4.1.2.4. iSS-MKH'ların kondrojenik farklılaşması, kondrosit izolasyonu ve karakterizasyonu

15 ve 21 gün süren kondrojenik farklılaşma süresinin sonunda glikozaminoglikanların belirlenmesi için Alcian Blue boyaması yapıldı ve hücrelerin kondrosite farklılaştığı belirlendi. 15 günlük farklılaşma görüntülerinde olgun kondrositlerin olmadığı sitoplazmada GAG boyamasının 21 gün süren farklılaşmadaki boyamalara göre az biriktiği belirlendi. 21 gün farklılaşmanın sonunda olgun kondrositlerin oluştuğu sitoplazmada biriken GAG'ların boyanmasıyla analiz edildi.



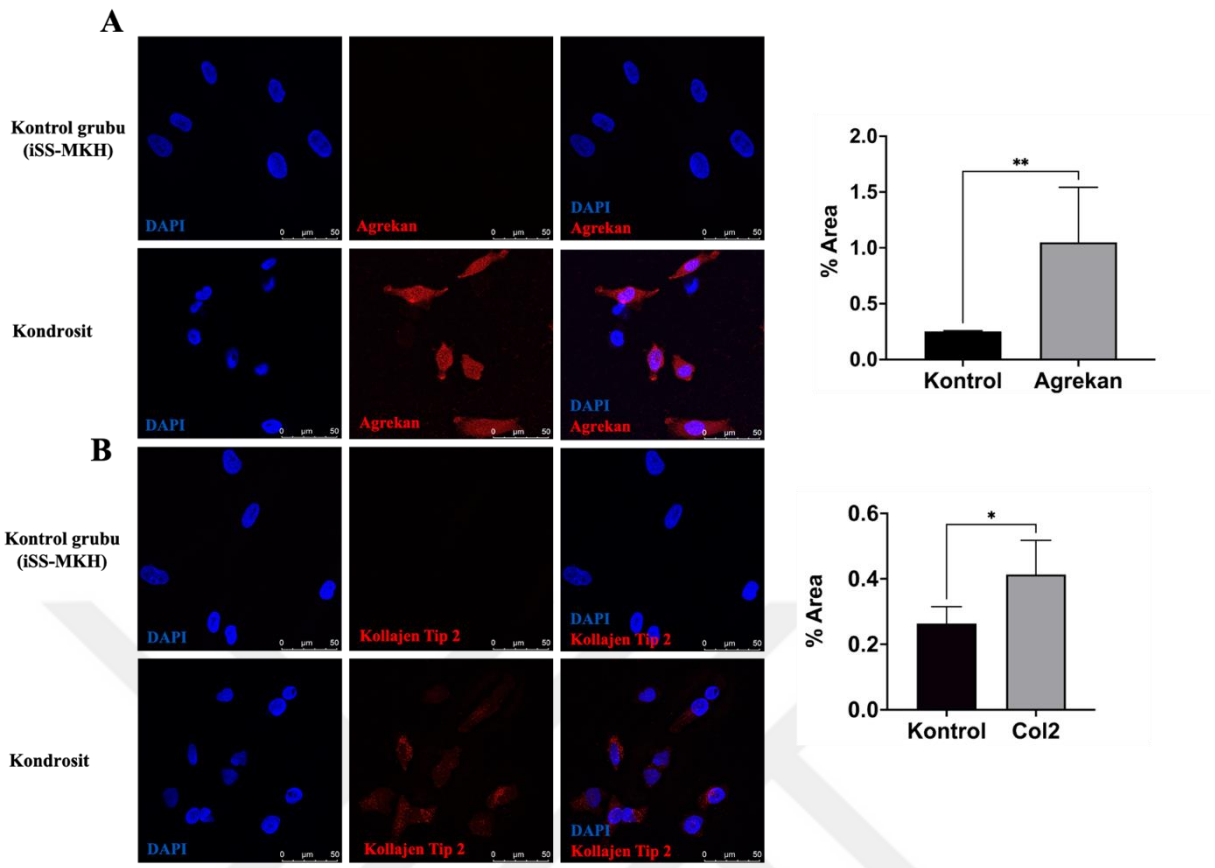
Şekil 4.11. 15 ve 21 günlük kondrojenik farklılaşma sonrası Alcian Blue (mavi) boyamaları. Olgun olmayan kondrositlerin 15 günlük boyamasında sitoplazmada biriken GAG miktarı (A) ve 21 gün sonunda tamamen olgunlaşarak sitoplazmada biriken GAG miktarlarını gösteren fotomikrograf (B). Hücre çekirdekleri nuclear fast (pembe) ile boyandı (Ölçüm çubukları: 50 µm)

Bu doğrultuda 21 gün süren farklılaşma sürecinden sonra ficoll kullanılarak kondrositler izole edildi. İzole edilen kondrositlerin olgun kondrositler olduğunu belirlemede kondrogenez sürecinde yer alan belirteçler olduğu için kıkırdak oligomerik matriks proteini (COMP), transkripsiyon faktörü Sox9 (SOX9), kolajen tip 2 (Col2), prolaktin genlerinin gen ekspresyon analizleri qRT-PCR tekniğiyle incelendi. Farklılaşmamış iSS-MKH kontrol grubu olarak değerlendirilerek izole edilen kondrositler karşılaştırıldı. Kontrol grubuna göre Col2 ifadesinde 2 kat, COMP ifadesinde 1,1 kat artış olduğu; SOX9 ifadesinde 10 kat, prolaktin ifadesinde ise 3 kat azalış olduğu istatistiksel olarak anlamlı şekilde belirlendi.



Şekil 4.12. İzole edilen kondrositlerin gen ifade profilleri. Kontrol grubu olarak kondrojenik farklılaştırma yapılmamış iSS-MKH'leri ile iSS-MKH'lerinin farklılaştırılmasıyla izole edilen kondrositlerdeki gen ekspresyon farklılıkları karşılaştırıldı ($p \leq 0,05$, $^{**}p < 0,01$ ve $^{***}p < 0,001$).

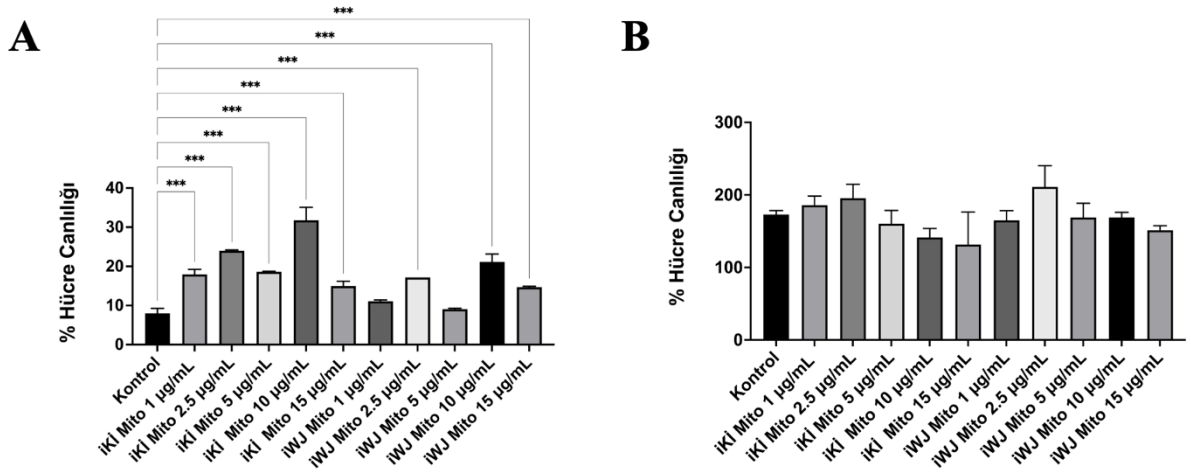
İzole edilen kondrositlerin karakterizasyonlarını doğrulamak için Col2 ve Agrekan antikorlarıyla immünofloresan işaretleme yapıldı. iSS-MKH'leri kontrol grubu olarak kullanıldı. İşaretleme sonunda hücreler konfokal mikroskopta görüntülendi. Konfokal mikroskop ile elde edilen floresan görüntülerin nicel analizi, ImageJ programında Threshold analizi kullanılarak gerçekleştirildi. Analiz sonucunda, hedef sinyalin (Col2 ve agrekan) hücrelerde bulunduğu alan içerisindeki yüzdesi (% Area) hesaplandı. Elde edilen verilerden gruplar arasındaki farklılıkları karşılaştırmak amacıyla sütun grafiği oluşturuldu. Col2 ve Agrekan yüzdelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı pozitiflik gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.13. iSS-MKH ve kondrosit hücrelerinde agrekan (A) ve kolajen tip 2 (B) antikorlarıyla immünofloresan işaretleme (Ölçek Çubuğu: 50 µm).

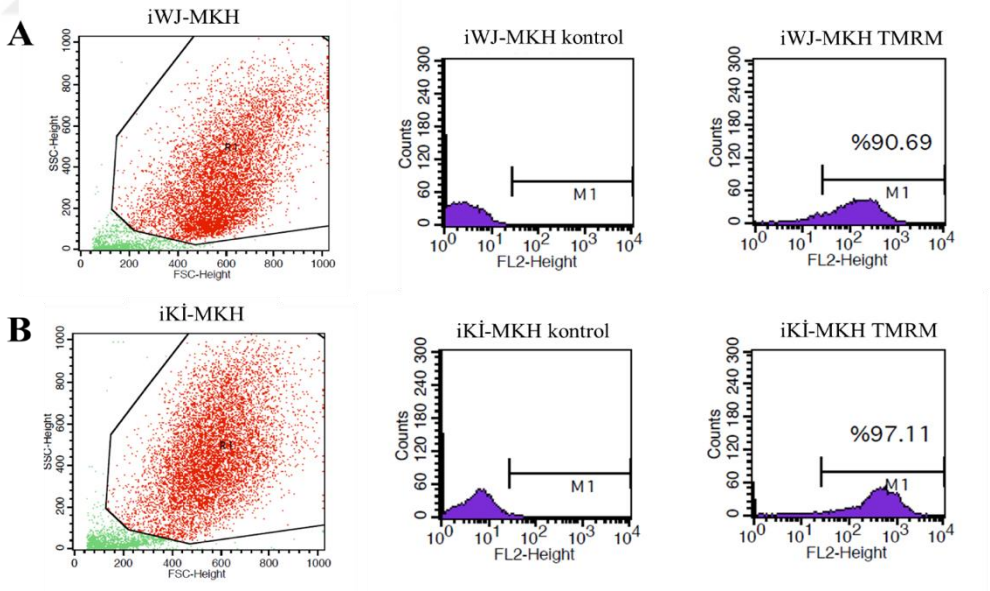
4.1.3. Uygulanacak mitokondri konsantrasyonunun WST-8 ile belirlenmesi

10.000 kondrosit hücresi 96 kuyucuklu plakalara her grup 3 tekrarlı olacak şekilde ekilerek 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücrelere farklı konsantrasyonlarda iWJ-MKH ve iKİ-MKH mitokondrileri (1 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL) verilerek 48 saat inkübe edildi. %10 WST solüsyonu hazırlanarak hücrelere verildi ve 2 saat sonra 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ölçüm sonucunda uygulanan farklı dozlardaki mitokondrilerin toksik etki göstermediği sonuçların kontrole yakın olduğu belirlendi. Bu nedenle literatürde uygulandığı bilinen 2,5 µg/mL mitokondri konsantrasyonu deney planında kullanılarak hasar modellerinde ki mitokondri etkinlikleri incelendi.

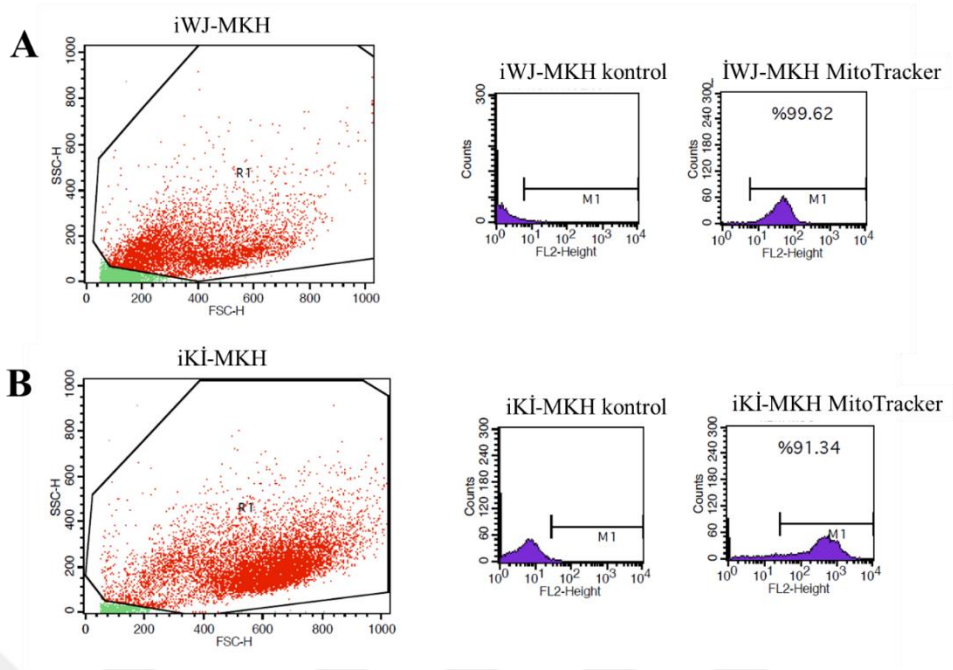


Şekil 4.14. Kondrosit hücrelerine uygulanacak olan mitokondri konsantrasyonunun WST-8 ile belirlenmesi. Kontrol grubunda mitokondri uygulanmayan kondrosit hücreleri kullanıldı ve mitokondri uygulanan grupların canlılık oranları kontrol grubuyla kıyaslanarak analiz yapıldı. iWJ-mitokondrisi ve iKİ-mitokondrisi farklı dozlarda HG1 (A) ve HG2 (B) uygulanarak en uygun konsantrasyon belirlendi. (*p ≤ 0,05, **p < 0,01 ve ***p < 0,001).

4.1.4. iWJ-MKH ve iKİ-MKH'lerinden Mitokondri İzolasyonu ve Akım Sitometride İncelenmesi



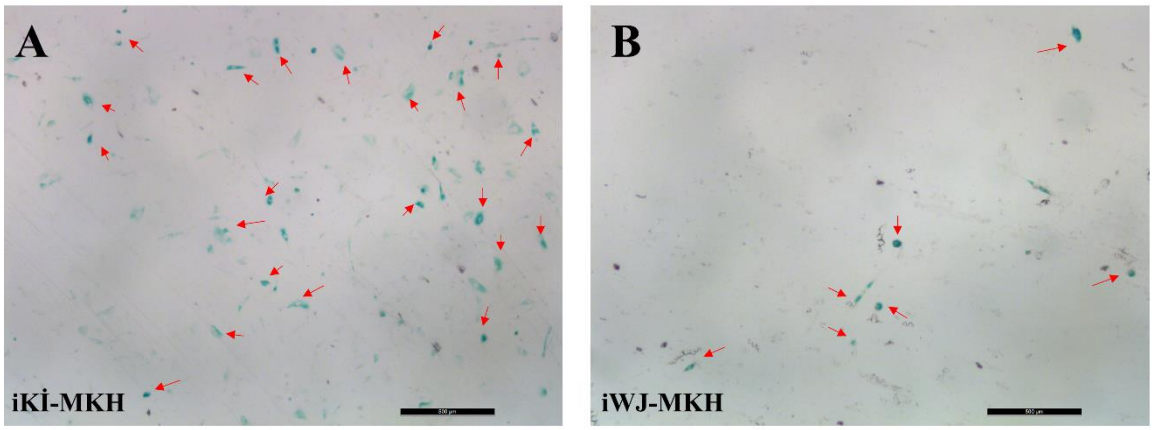
Şekil 4.15. TMRM boyaması sonrası akım sitometri analizi. iWJ-MKH (A) ve iKİ-MKH (B).



Şekil 4.16. MitoTracker Red boyaması sonrası akım sitometri analizi. iWJ-MKH (A) ve iKİ-MKH (B).

Mitokondri izolasyonu için %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra iWJ-MKH ve iKİ-MKH'leri sayılarak $3x10^6$ hücre kullanıldı. Sayılan hücreler izolasyon öncesi son konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde TMRM, 500 nM olacak şekilde ise Mitotracker Red boyaması yapıldı ve 30 dakika 37ºC'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler akım sitometride FL-2 kanalında (kırmızı florasan) FACS Calibur (BD Biosciences) cihazında okuma yapıldı ve kontrol grubu olarak herhangi bir boyama yapılmamış hücre analiz edildi. iWJ-MKH'lerinde TMRM boya sonrası %90,69, iKİ-MKH'lerinde ise %97,11 oranında MitoTracker Red ile boyama sonrası ise iWJ-MKH'lerinde %99,62, iKİ-MKH'lerinde ise %91,34 oranında pozitif olduğu belirlendi.

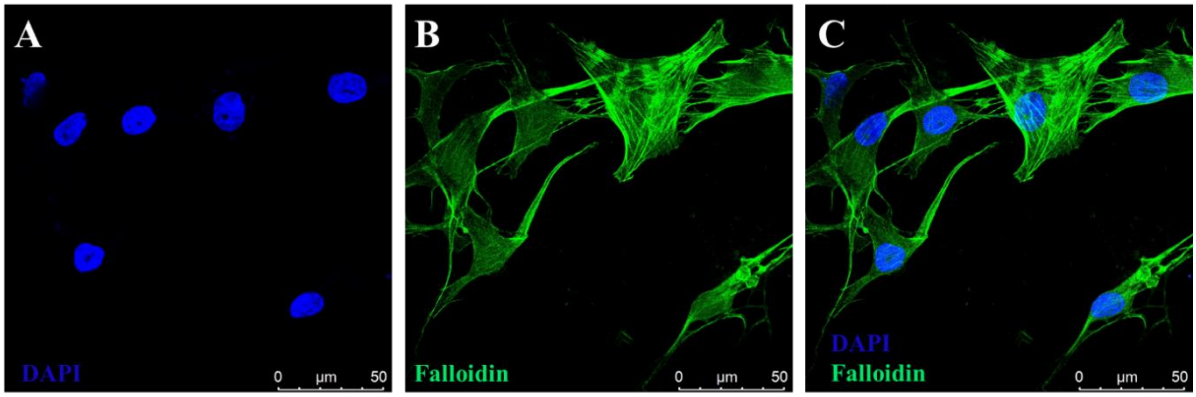
Mitokondri izolasyonu yapılan iWJ-MKH ve iKİ-MKH'lerinde yaşlılık morfolojisinin oluştuğu beta-galaktosidaz enzim aktivitesi X-gal boyama sonrası görüntülendi. iKİ-MKH'lerinde iWJ-MKH'lerine kıyasla yoğun bir mavi renk boyanması gözlemlendi.



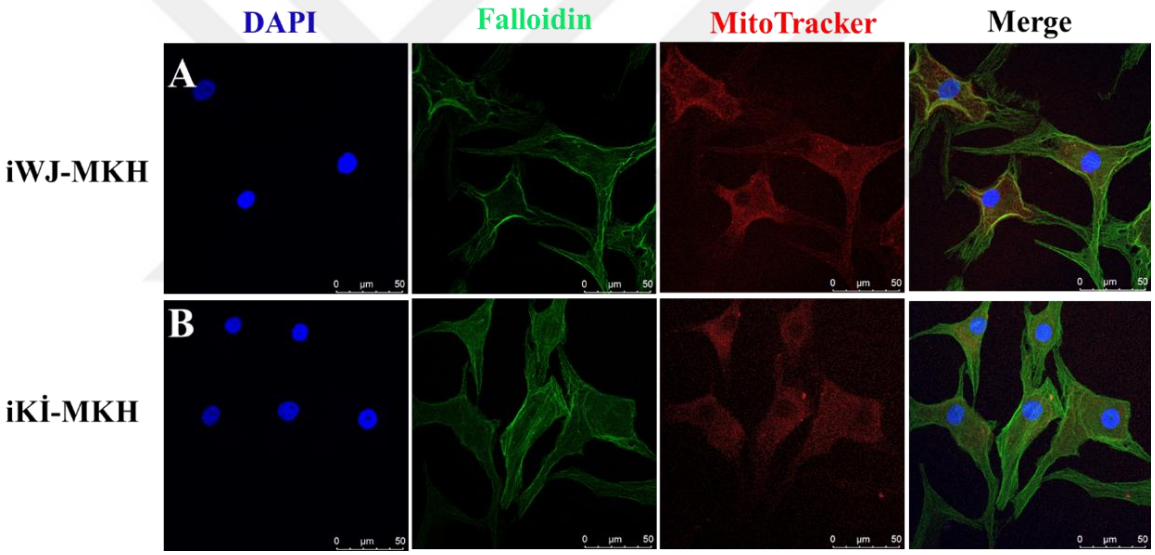
Şekil 4.17. iWJ-MKH ve iKİ-MKH'lerinde X-gal boyaması. X-gal (mavi) boyaması hücrelerin yaşlılık morfolojisinde oluşturduğu beta-galaktosidaz enzim aktivitesini göstermektedir. A: iKİ-MKH, B: iWJ-MKH (Ölçüm çubuğu: 500 µm)

4.1.5. Mitokondri Transfer Etkinliğinin Konfokal Mikroskobunda İncelenmesi

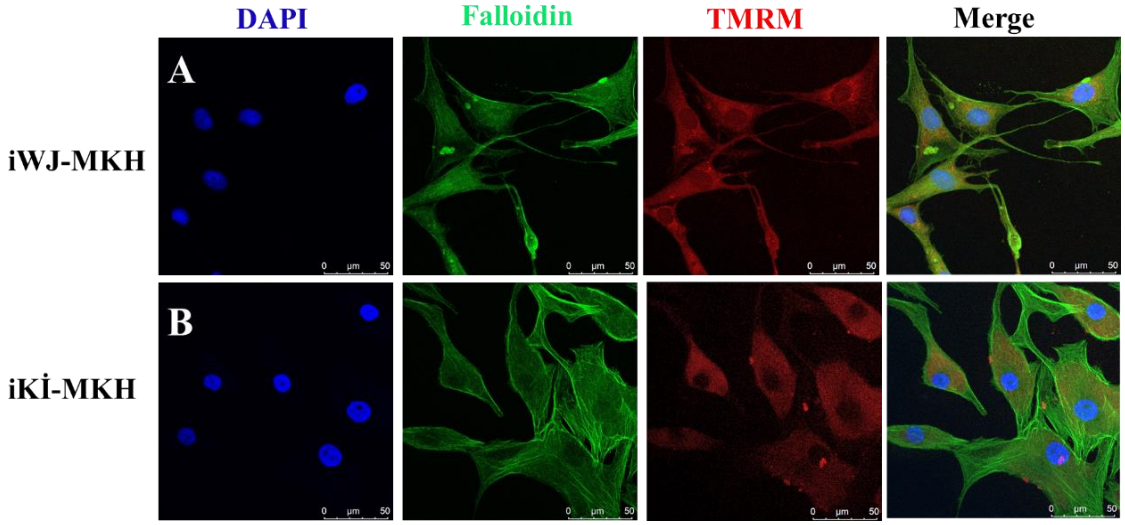
Mitokondrilerin izolasyonundan önce son konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde TMRM (kırmızı), 500 nM MitoTracker Red (kırmızı) boyasıyla boyandı. Boyandıktan sonra izole edilen mitokondriler 2,5 µg/mL olacak şekilde hasar grubu 1'e uygulandı. Transferden 48 saat sonra PFA ile fiksasyon yapıldı ve hücre hatlarının belirli olması ve sitoplazmaya geçtiğinin gösterilmesi için hücreler falloidin-FITC boyasıyla (yeşil) boyanarak DAPI ile kapatıldı. Kontrol gruplarında mitokondri transferinin yapılmadığı ve transfer yapılan gruplarda ise TMRM ve MitoTracker Red ile boyanarak mitokondrilerin hücrelere sağlıklı bir şekilde transfer olduğu ve hücre çekirdeğinin periferine lokalize olduğu belirlendi.



Şekil 4.18. Mitokondri uygulanmayan hücrelerin DAPI ve falloidin boyamalarını gösteren fotomikrograf. DAPI ile hücre çekirdekleri (A) falloidin-FITC ile F-aktinler boyandı (B) Merge (C) (Ölçüm çubukları: 50 µm).



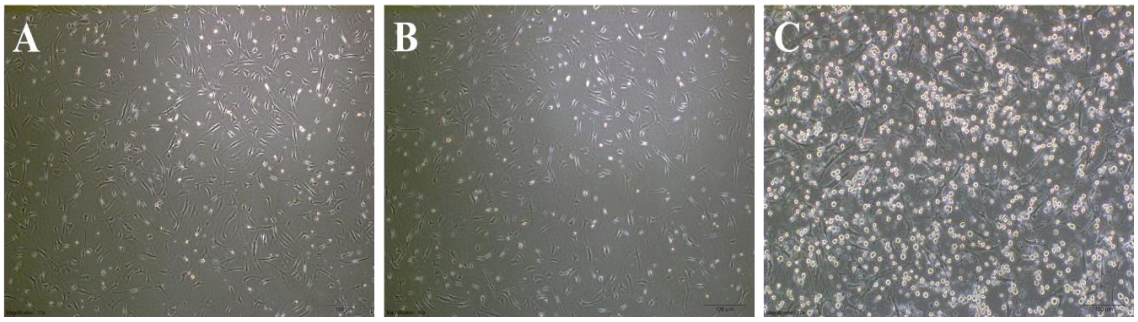
Şekil 4.19. Mitotracker Red ile boyanarak mitokondri transferi yapılan grupların fotomikrografı. iWJ-MKH mitokondrilerinin transferi yapılan grup (A), iKİ-MKH mitokondrilerinin transferi yapılan grup (B) DAPI ile hücre çekirdekleri (mavi), falloidin ile F-aktinler (yeşil), Mitotracker Red (kırmızı) ile mitokondriler. Ölçüm çubukları: 50 µm.



Şekil 4.20. TMRM ile boyanarak mitokondri transferi yapılan grupların fotomikrografı. iWJ-MKH mitokondrilerinin transferi yapılan grup (A), iKİ-MKH mitokondrilerinin transferi yapılan grup (B) DAPI ile hücre çekirdekleri (mavi), falloidin ile F-aktinler (yeşil), Mitotracker Red (kırmızı) ile mitokondriler. Ölçüm çubukları: 50 µm.

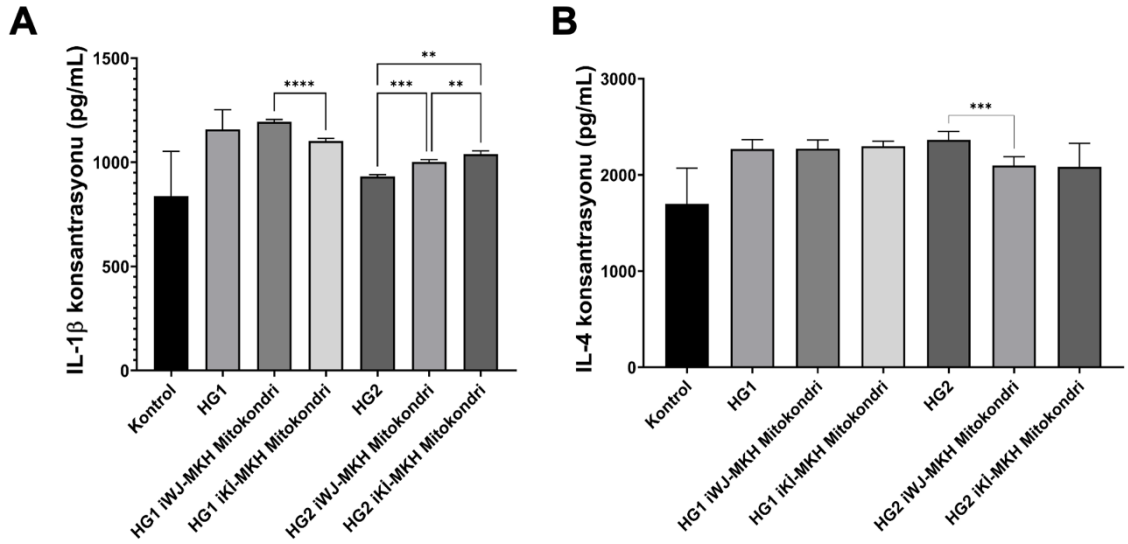
4.1.6. Osteoartrit Hasar Modeli İçin Ko-kültür Oluşturulması

Ficoll kullanılarak izole edilen kondrositler ve makrofaj farklılaşmasıyla elde edilen M1 makrofajlar ko-kültür edildi. Hücreler sayılarak 1:1 olacak şekilde hasar grubu 2 oluşturuldu. Hasar grubu 1, kondrosit hücreleri makrofaj farklılaşmasında elde edilen kondisyonlanmış ortam besiyer olarak kullanılarak oluşturuldu. Kontrol grubu olarak kondisyonlanmış ortamla veya doğrudan makrofajla ko-kültür edilmemiş (sağlıklı) kondrosit hücre kültürü kullanıldı.



Şekil 4.21. *In vitro* osteoartrit hasar modeli oluşturma. Hasar oluşturulmayan kondrosit hücrelerinin olduğu grup; kontrol grubu (A), Kondisyonlanmış ortamla kondrosit hücrelerinde oluşturulan hasar grubu; hasar grubu 1 (B), Doğrudan M1 makrofajla ko-kültür edilen kondrosit hücrelerinin oluşturduğu hasar grubu; hasar grubu 2 (C) gösteren fotomikrograf. (Ölçüm çubukları: 100 µm).

Deney grupları oluşturulduktan sonra mitokondri transferinin sonunda hücre besi ortamı ELISA analiziyle sitokin konsantrasyonları belirlendi. Hasar modellerinde ve mitokondri uygulanan gruplarda IL-1β seviyeleri incelendiğinde HG1'de artış belirlendi. HG1 WJ-MKH mitokondrisi transfer edilen gruplarda kendi aralarında anlamlı olduğu ve HG1'e göre düştüğü belirlendi. HG2'de ise IL-1β seviyeleri grup içinde anlamlı olmasına rağmen kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık belirlenmedi. IL-4 konsantrasyonları karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre hasar oluşturulan gruplarda IL-4 konsantrasyonlarında farklılık belirlenmedi.

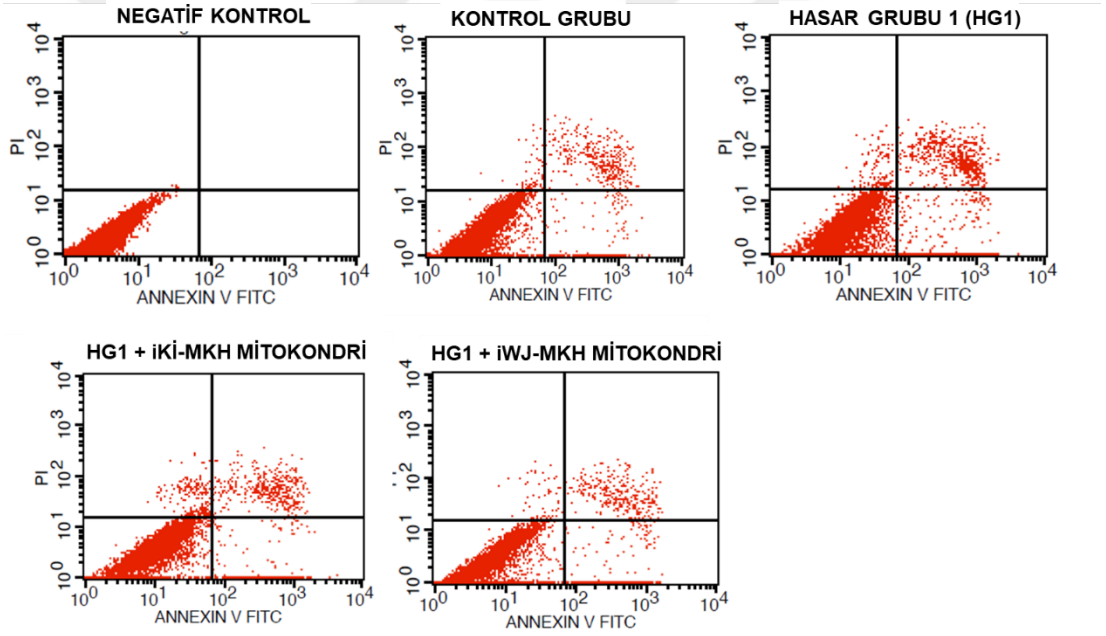


Şekil 4.22. Mitokondri transferi sonrası deney grupları arasındaki IL-1β ve IL-4 seviyelerinin ELISA sonuçları.

4.2. Mitokondri Transferinin Hasar Modeli Üzerindeki Etkinliğinin İncelenmesi

4.2.1. Mitokondri Transferinin Hasarlı Kondrositlerdeki Apoptoz Durumu

Ko-kültür yapıldıktan 24 saat sonra mitokondri transferi gerçekleştirildi ve transfer sonrası 48 saat bekletilerek apoptoz ölçümü için Annexin V-FITC ölçümü yapıldı. Akım sitometride FL-1 (yeşil floresan) kanalında okutularak analiz edildi. Toplam apoptoz (Yukarı sağ+aşağı sağ alanlarının toplamı) oranı ve geç apoptoz (yukarı sağ alanı) oranları belirlendi ve tablo haline getirilerek % ölüm oranı (geç apoptoz/ toplam apoptoz) hesaplandı.

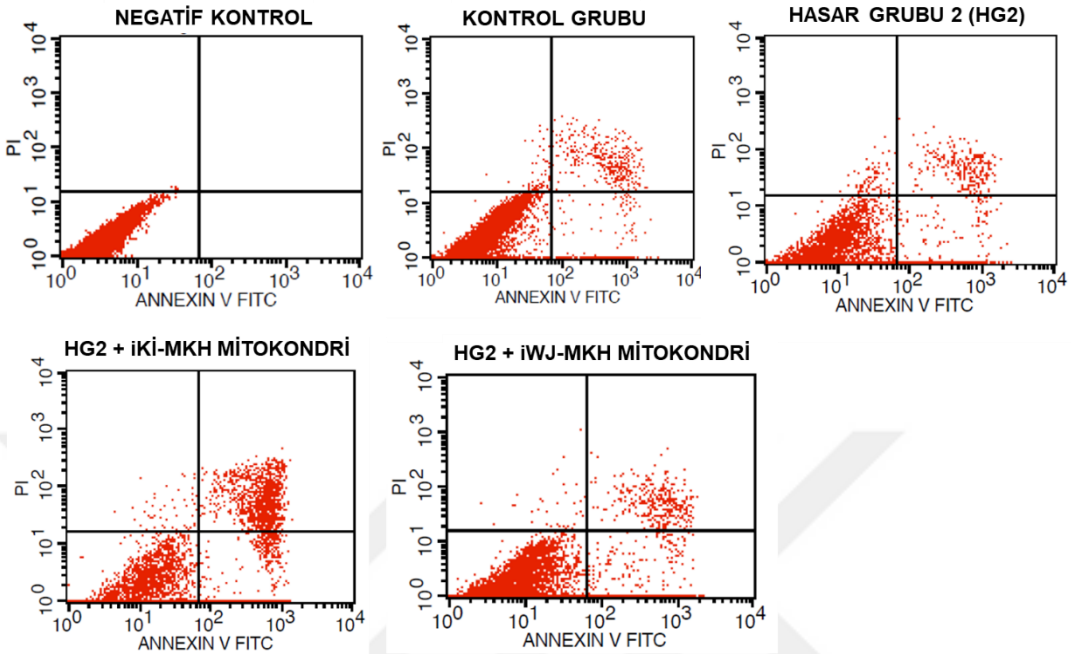


Şekil 4.23. Hasar grubu 1 apoptoz analiz sonucu. Kontrol grubu olarak, hasar oluşturulmamış sağlıklı kondrosit hücreleri kullanıldı. Kondisyonlanmış ortamla oluşturulan hasar modelinde (HG1) mitokondri uygulamasından 48 saat sonra Annexin V-FITC FL-2 kanalında ölçüm yapıldı.

Tablo 4.1. Hasar grubu 1 ve mitokondri uygulama gruplarında Annexin V- FITC ölçümü.

DENEY GRUPLARI	**TOPLAM APOPTOZ (%)**	**GEÇ APOPOTOZ (%)**	**(GEÇ APOPTOZ /TOPLAM APOPTOZ)* (%)**
Hasar Grubu 1 (HG1)	11,66	5,58	47
HG1+iWJ-MKH mitokondrisi	13,3	2,93	22
HG1+iKİ-MKH mitokondrisi	7,17	4,15	57

Kondisyonlanmış ortamla yapılan hasar grubu 1 örneklerine mitokondri uygulanmayan grup ve mitokondri uygulanan gruplar arasında apoptoz ilişkisi incelendi. Toplam apoptoz miktarı HG1, iWJ-MKH mitokondrisi uygulanan grupta ve iKİ-MKH mitokondrisi uygulanan grupta sırayla %11,66, %13,3, %7,17 oranlarında olduğu, geç apoptoz oranlarının ise sırayla %5,58, %2,93, %4,15 oranlarında olduğu belirlendi. Geç apoptoz oranı toplam apoptoz oranına bölünüp 100 ile çarpıldığında geri dönüşü olmayacak şekilde apoptoza uğrayan hücre yüzdesi belirlendi. Bu hesaplamalara göre sırayla geri dönüşü olmayacak şekilde apoptoza giden hücre yüzdeleri %47, %22 ve %57 oranları elde edildi.



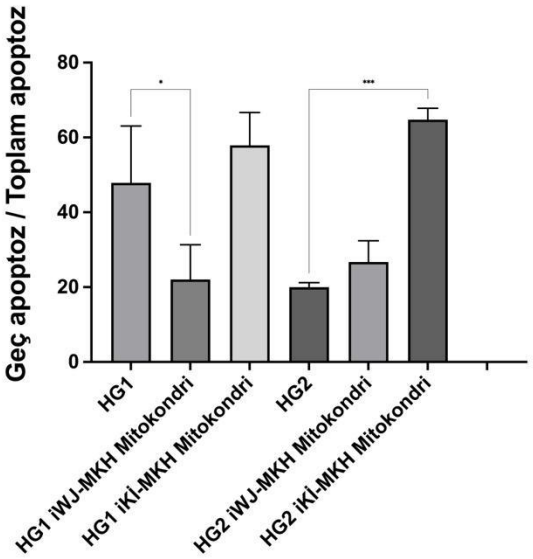
Şekil 4.24. Hasar grubu 2 apoptoz analiz sonucu. Kontrol grubu olarak, hasar oluşturulmamış sağlıklı kondrosit hücreleri kullanıldı. Kondisyonlanmış ortamla oluşturulan hasar modelinde (HG2) mitokondri uygulamasından 48 saat sonra Annexin V- FITC FL-2 kanalında ölçüm yapıldı.

Tablo 4.2. Hasar grubu 2 ve mitokondri uygulama gruplarında Annexin V- FITC ölçümü

DENEY GRUPLARI	**TOPLAM APOPTOZ (%)**	**GEÇ APOPOTOZ (%)**	**(GEÇ APOPTOZ /TOPLAM APOPTOZ)* (%)**
Hasar Grubu 2 (HG2)	12,70	2,54	20
HG2+iWJ-MKH mitokondrisi	12,05	3,22	26
HG2+iKİ-MKH mitokondrisi	19,56	12,67	64

M1 makrofajla ko-kültür yapılarak oluşturulan hasar grubu 2 örneklerine mitokondri uygulanmayan grup ve mitokondri uygulanan gruplar arasında apoptoz ilişkisi incelendi.

Toplam apoptoz miktarı HG2, iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta ve iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta sırayla %12,70, %12,05, %19,56 oranlarında olduğu, geç apoptoz oranlarının ise sırayla %2,54, %3,22, %12,67 oranlarında olduğu belirlendi. Geç apoptoz oranı toplam apoptoz oranına bölünüp 100 ile çarpıldığında geri dönüşü olmayacak şekilde apoptoza uğrayan hücre yüzdesi belirlendi. Bu hesaplamalara göre sırayla geri dönüşü olmayacak şekilde apoptoza giden hücre %20, %26 ve %64 oranları elde edildi.

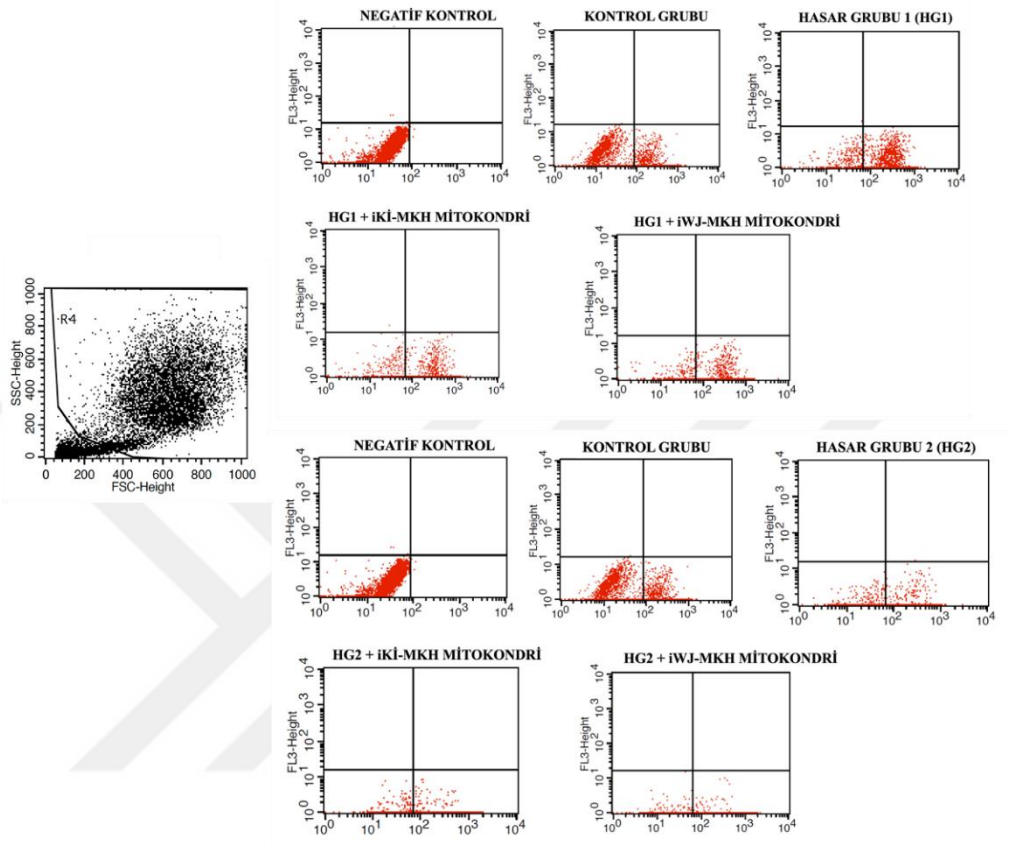


Şekil 4.25. Geç apoptozun toplam apoptoza oranının sütun grafiği (*p ≤ 0,05, **p < 0,01 ve ***p < 0,001).

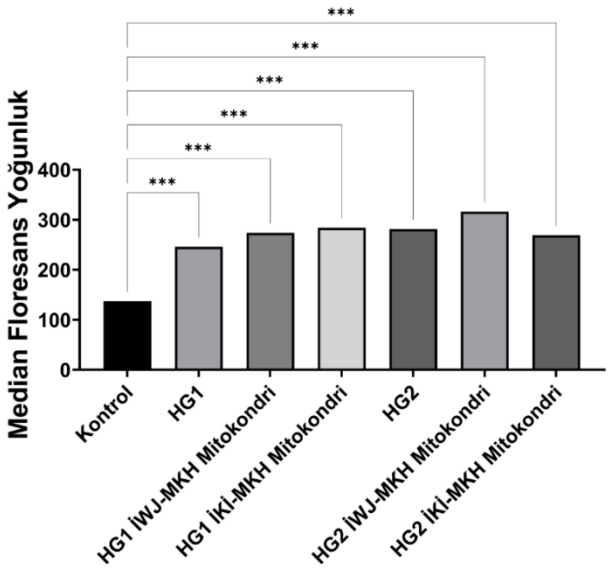
4.2.2. Mitokondri Transferinin ROS Seviyesi Üzerindeki Etkisi

Mitokondri transferinden 48 saat sonra hücrelere 10 µM DC-FDA eklendi ve 30 dk 37ºC %5 CO_2 inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılıp santrifüj yapıldı, sonrasında PBS ile süspanse edilerek akım sitometri tüplerine aktarıldı ve FL-1 kanalında okutulan örnekler analiz edildi. Akım sitometri analiziyle elde edilen veriler median floresan yoğunluk hesabı yapılarak sütun grafiği haline getirildi. Bu analiz sonucuna göre median floresan yoğunluk kontrol grubunda 137; HG1'de 245,8; HG1 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta 273,8, HG1 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta 283,8 oranlarında olduğu belirlendi. Aynı şekilde HG2'de 281,3; HG2+ iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta 316,2, HG2 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen

grupta 268,9 oranlarında olduğu belirlendi. İstatistiksel analizleri yapıldığında *p ≤ 0,05, **p < 0,01 ve ***p < 0,001 kabul edildi.



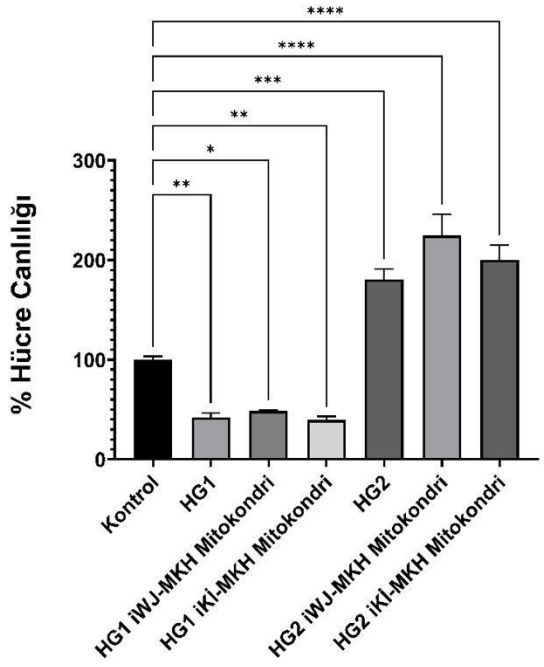
Şekil 4.26. ROS ölçümlerinin akım sitometri sonuçları.



Şekil 4.27. Akım sitometri sonucunda elde edilen ROS seviyelerinin median floresans yoğunluk grafiği. (*p ≤ 0,05, **p < 0,01 ve ***p < 0,001).

4.2.3. Mitokondri Transferinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

Hasar modelleri arasında mitokondri uygulamalarının hücre canlılığı üzerinde nasıl etki ettiğinin belirlenmesi için %10 WST-8 analizi yapılarak aralarındaki ilişkiler değerlendirildi. Kontrol grubu hücrelerine göre değerlendirildiğinde HG1 hücrelerinin tamamında hücre canlılıklarının azaldığı, HG1'de mitokondrisi transfer edilmesinin hücre canlılığı üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlendi. HG2'de bunun tam tersi hücre proliferasyonunda ciddi bir artış olurken, mitokondri transferi gerçekleştirilen gruplar arasında iWJ-MKH mitokondrisinin hücre canlılığını artırdığı, iKİ-MKH mitokondrilerinin etkisinin olmadığı istatistiksel olarak anlamlı şekilde belirlendi.

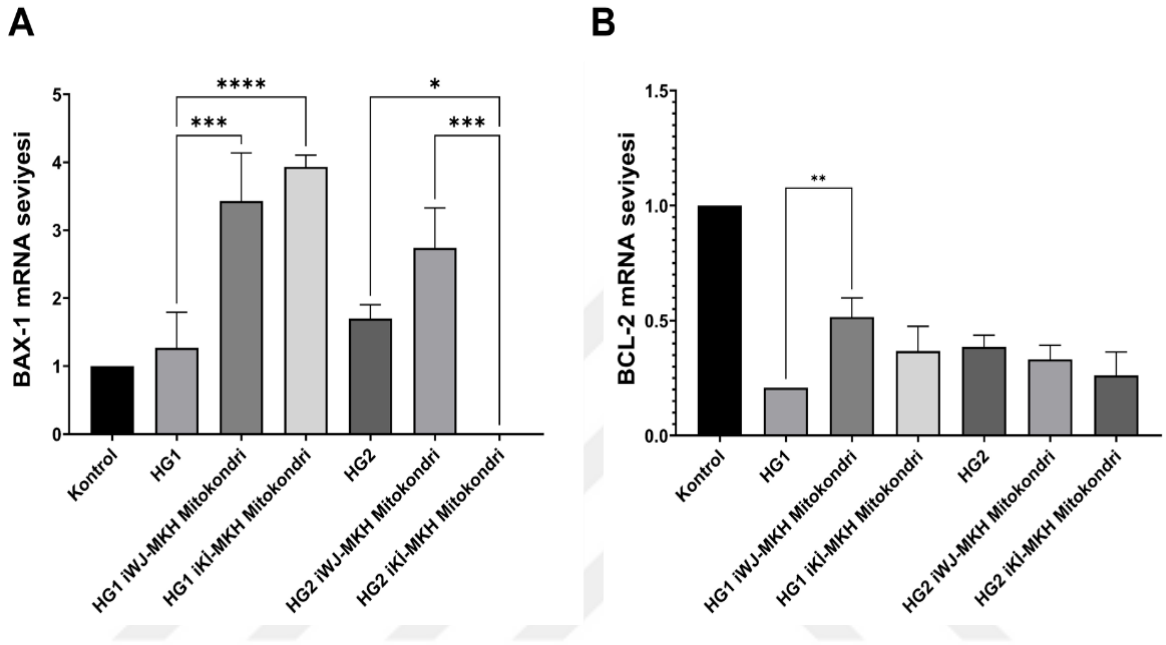


Şekil 4.28. WST-8 analiz sonucunda hücre canlılık profilleri (*p ≤ 0,05, **p < 0,01 ve ***p < 0,001).

4.2.3. Mitokondri Transferinden Sonra Gen Ekspresyon Profilleri

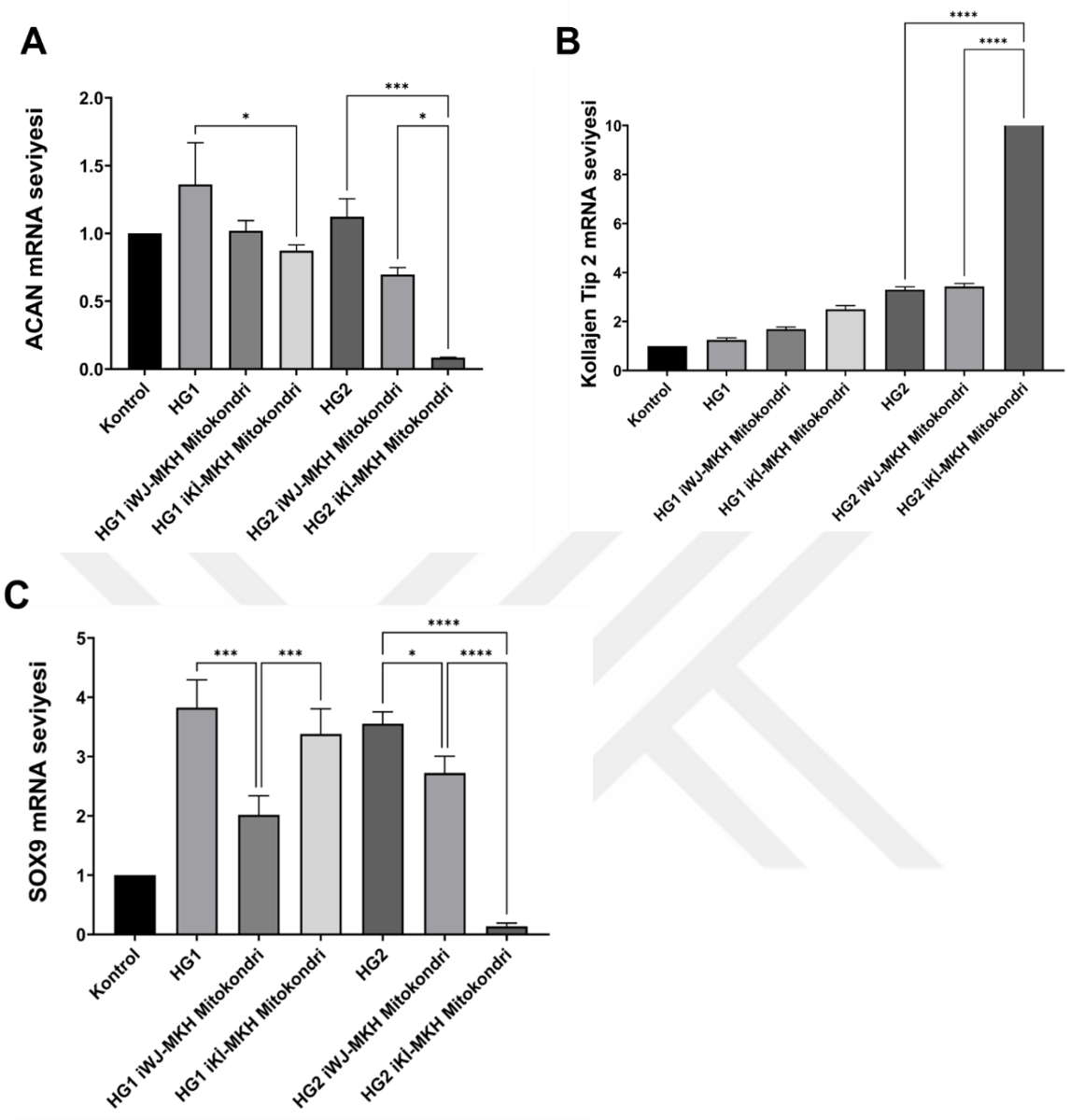
Mitokondri transferinden sonra hasar grupları arasındaki gen ekspresyon profil farklılıkları belirlendi. Bu farklılıkların belirlenmesinde kontrol grubu olarak sadece

kondrositlerin olduğu ve hasar yapılmayan grup kullanıldı. RNA izolasyonundan sonra cDNA analizi yapıldı ve son konsantrasyonu 1 µg/mL olacak şekilde qRT-PCR reaksiyonu kuruldu. Roche LC480-II cihazının otomatik olarak hesapladığı değerler kullanıldı. Normalizasyon için Aktin-β kullanıldı.



Şekil 4.29. BAX-1 (A)ve BCL-2 (B) gen ekspresyon profilleri. (*p ≤ 0,05, **p < 0,01 ve ***p < 0,001)

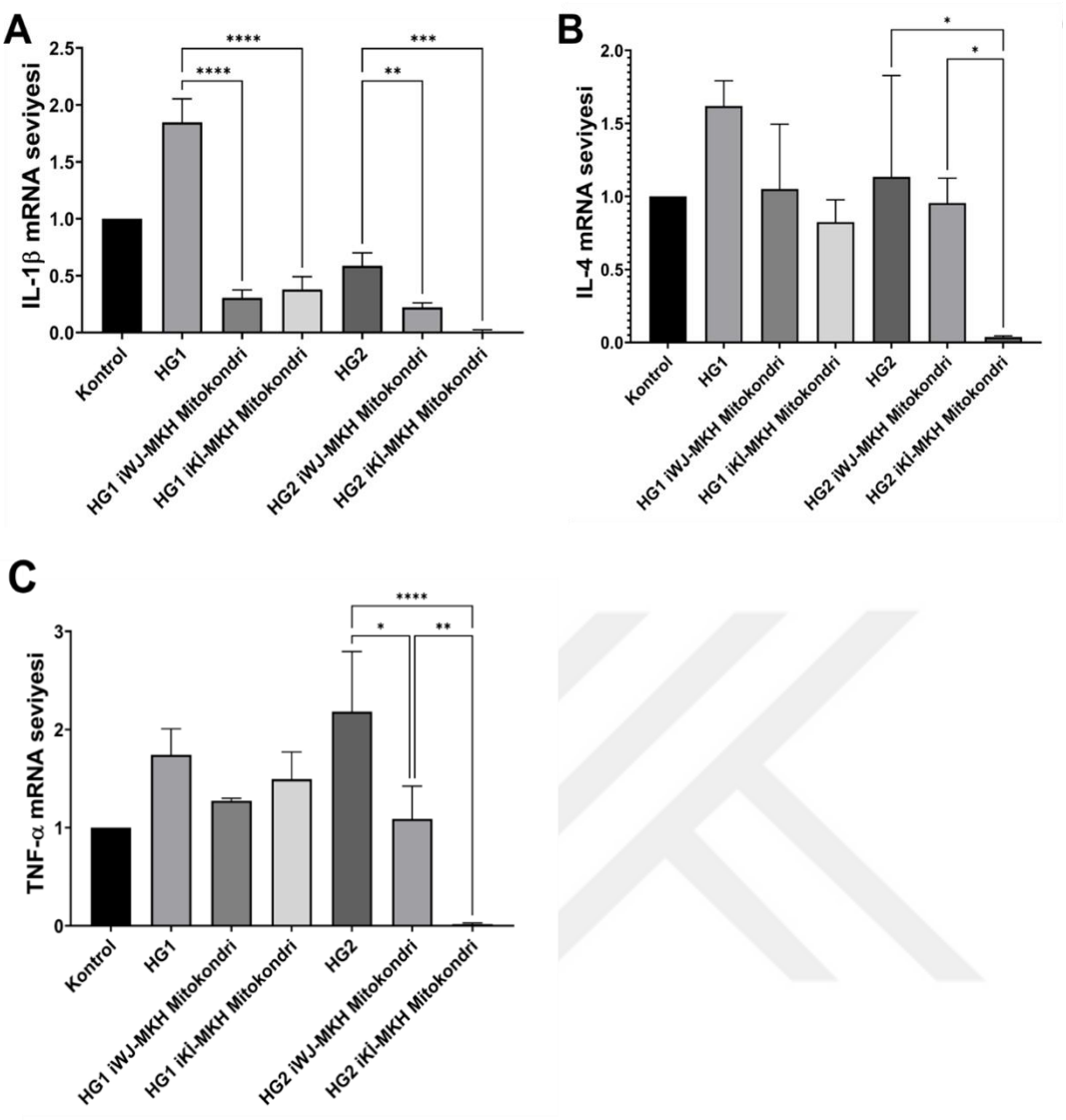
Deney grupları arasında BCL-2 gen ekspresyon profilleri incelendi ve kontrol grubuyla HG1 (kondisyonlanmış ortam bulunan) karşılaştırıldığında 5 kat, HG1 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 2 kat, HG1+iKİ MKH mitokondrisi transfer edilen grup 3,3 kat azaldı. Kontrol grubuyla HG2 (M1 makrofajla ko-kültür yapılan) karşılaştırıldığında 3,3 kat, HG2 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 3,3 kat, HG2 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 5 kat azaldı. BAX-1 gen ekspresyon sonuçlarında, kontrol grubuyla HG1 karşılaştırıldığında 1,2 kat, HG1 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 3,4 kat, HG1 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 3,9 kat arttı. Kontrol grubuyla HG2 karşılaştırıldığında 1,6 kat, HG2 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 2,7 kat arttı, HG2 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 333,3 kat azaldı.



Şekil 4.30. ACAN (A), Kolajen tip 2 (B), SOX9 (C) gen ekspresyon profilleri. (*p ≤ 0,05, **p < 0,01 ve ***p < 0,001)

Deney grupları arasında kondrojenez sürecinde etkili olduğu bilinen ve kondrositlerde çeşitli derecelerde ifade bulan ACAN (agrekan), SOX9 ve Col2 genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlendi. ACAN gen ekspresyonunda (A), kontrol grubuyla HG1 karşılaştırıldığında 1,3 kat artış, HG1 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup arasında 1,1 kat HG1 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta 1,4 kat azalma olduğu belirlendi. Kontrol grubuyla HG2 karşılaştırıldığında 1,1 kat, HG2 iWJ-MKH mitokondrisi transfer

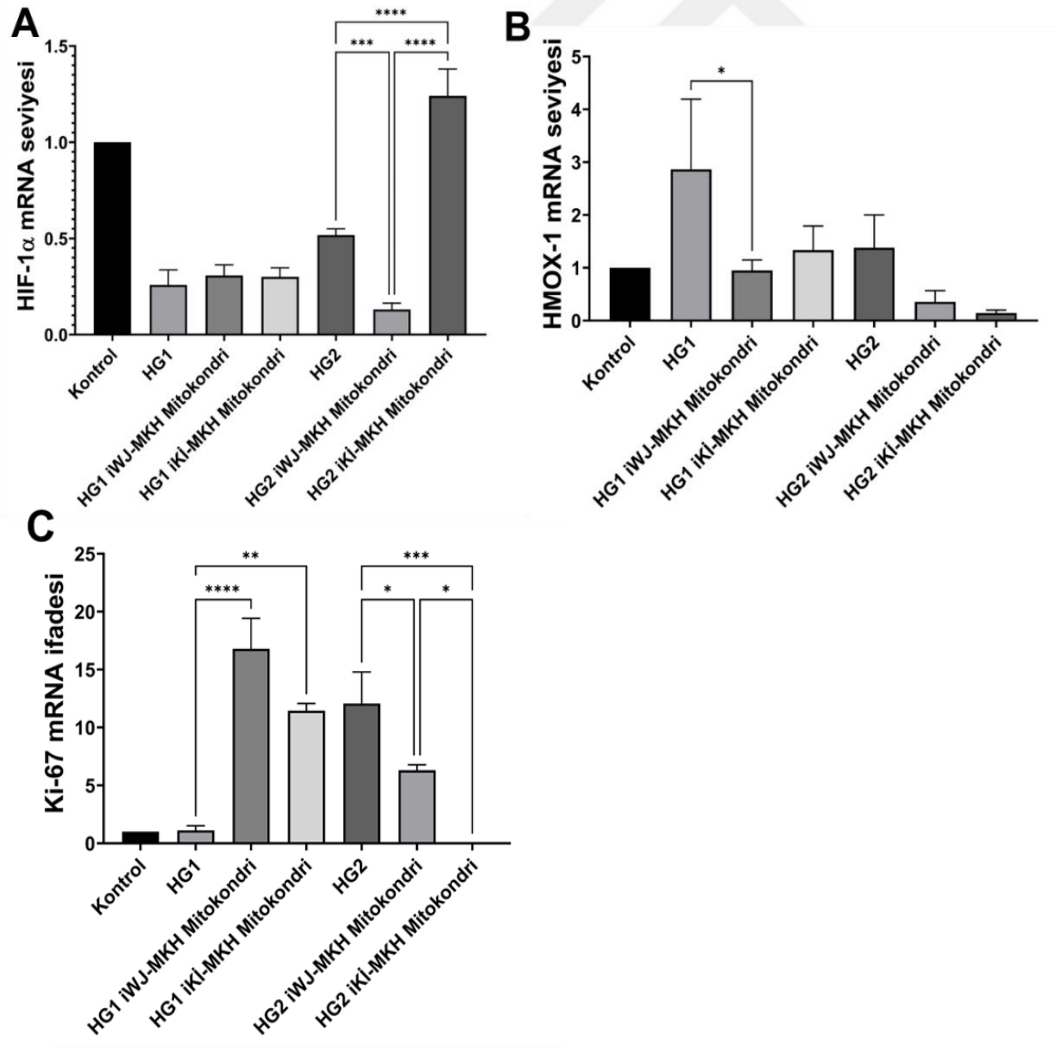
edilen grup 1,6 kat, HG2 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 12,5 kat azaldı. SOX9 gen ekspresyonunda (B) HG1 kontrolle karşılaştırıldığında 3,8 kat, HG1 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 2 kat, HG1 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 3,3 kat arttı. Kontrol grubuyla HG2 karşılaştırıldığında 3,5 kat, HG2 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 2,7 kat arttı, HG2 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 10 kat azaldı. Col2 gen ekspresyonunda (C) HG1 karşılaştırıldığında 1,2 kat, HG1 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 1,6 kat, HG1 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 2,5 kat arttı. Kontrol grubuyla HG2 karşılaştırıldığında 3,3 kat, HG2 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 3,4 kat, HG2 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 132 kat arttı.



Şekil 4.31. IL-1β (A), IL-4 (B), TNF-α (C) gen ekspresyon profilleri. ($p \leq 0,05$, $^{**}p < 0,01$ ve $^{***}p < 0,001$)

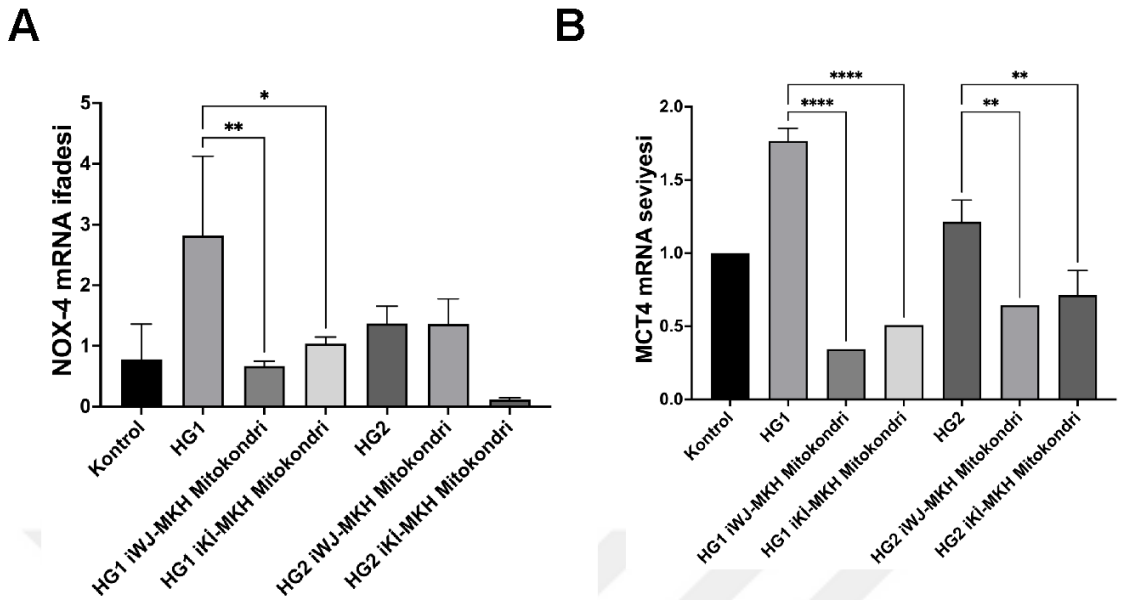
IL-1β gen ekspresyonunda (A) HG1 karşılaştırıldığında 1,8 kat arttı, HG1 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 3,3 kat, HG1 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 3,3 kat azaldı. Kontrol grubuyla HG2 karşılaştırıldığında 2 kat, HG2 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 5 kat, HG2 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 100 kat azaldı. IL-4 gen ekspresyonunda (B) HG1 karşılaştırıldığında 1,6 kat, HG1 iWJ-MKH mitokondrisi

transfer edilen grup 1 kat arttı, HG1 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta 1,2 kat azaldı. Kontrol grubuyla HG2 karşılaştırıldığında 1,1 kat arttı, HG2 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 1,1 kat, HG2 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 33 kat azaldı. TNF-α gen ekspresyonunda (C) HG1 karşılaştırıldığında 1,7 kat arttı, HG1 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 1,2 kat, HG1 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 1,4 kat arttı. Kontrol grubuyla HG2 karşılaştırıldığında 2,1 kat arttı, HG2 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta herhangi bir değişiklik belirlenmedi ve HG2 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta 100 kat azaldı.



Şekil 4.32. HIF-1α (A), HMOX-1 (B), Ki-67 (C) gen ekspresyon profilleri. ($p \leq 0,05$, **$p < 0,01$ ve ***$p < 0,001$)

HIF-1α gen ekspresyonunda (Şekil 4.32, A) kontrol grubu HG1 karşılaştırıldığında 5 kat, HG1 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 3,3 kat, HG1 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 3,3 kat azaldı. Kontrol grubuyla HG2 karşılaştırıldığında 2 kat, HG2 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 10 kat azaldı. HG2 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta 1,2 kat arttı. HMOX-1 gen ekspresyonunda (Şekil 4.32, B) kontrol grubu HG1 karşılaştırıldığında 2,8 kat arttı, HG1 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 1,1 kat azaldı, HG1 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 1,3 kat arttı. Kontrol grubuyla HG2 karşılaştırıldığında 1,3 kat arttı, HG2 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 3,3 kat, HG2 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 10 kat azaldı. Ki-67 gen ekspresyonunda (Şekil 4.32, C) HG1 karşılaştırıldığında 1,1 kat, HG1 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 16,8 kat, HG1 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 11,4 kat arttı. Kontrol grubuyla HG2 karşılaştırıldığında 12 kat arttı, HG2 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 6,3 kat arttı. HG2 iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grup 100 kat azaldı

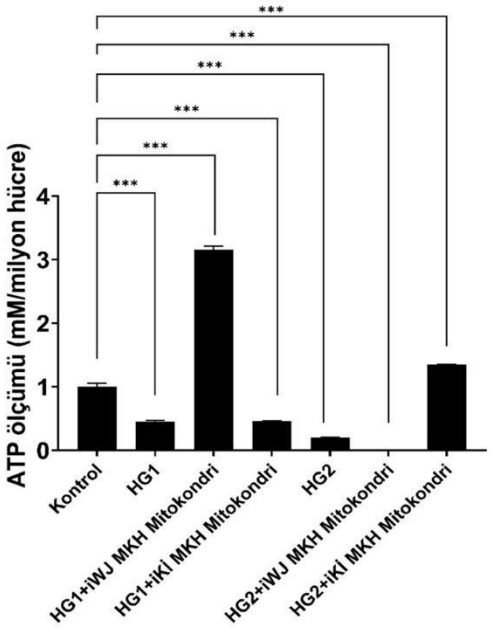


Şekil 4.33. NOX-4 (A) ve MCT4 (B), gen ekspresyon profilleri. ($p \leq 0,05$, $^{**}p < 0,01$ ve $^{***}p < 0,001$)

NOX-4 (Şekil 4.33, A) gen ekspresyonunda kontrol grubu HG1 karşılaştırıldığında 2,8 kat arttı, bu artışın aksine iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta 1,6 kat azaldı. iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta ise bir değişiklik olmadı. Kontrol grubuyla HG2 karşılaştırıldığında 1,3 kat arttı. HG2 iWJ-MKH mitokondrisi transfer edildiğinde ise HG2 ye benzer şekilde 1,3 kat artış belirlendi. Bu artışların aksine iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta NOX-4 ifadesi 10 kat azaldı. MCT4 gen ekspresyonunda (Şekil 4.33, B) HG1 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 1,7 kat arttı. iWJ-MKH mitokondrisi transfer edildiğinde ise 3,3 kat iKİ-MKH mitokondrisi transfer edildiğinde ise kontrol grubuna göre 1,4 kat MCT4 gen ifadesi azaldı.

4.2.4. Deney Grupları Arasındaki ATP Seviyeleri

Deney gruplarında mitokondri transferi gerçekleştirildikten 48 saat sonra hücrelerin içerdiği ATP miktarı kolorimetrik olarak ölçüldü. Ölçüm spektrofotometride 636 nm'de gerçekleştirildi. Ölçüm sonunda kontrol grubuna göre HG1'de 2,5 kat azaldı. Mitokondri uygulanan gruplardan iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta 3,1 kat ATP miktarı artarken iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta HG1 sonucuna benzer şekilde 3,1 kat azaldı. HG2 analiz edildiğinde kontrol grubuna göre 5 kat azalırken, iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta 100 kat, iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta ise kontrol grubuna göre 1,3 kat arttı.

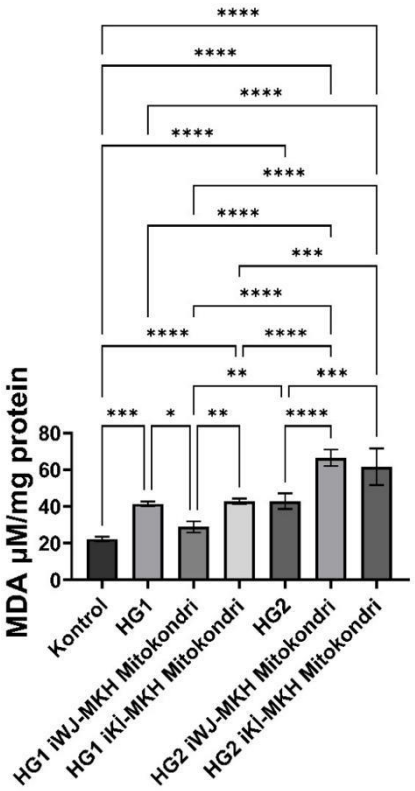


Şekil 4.34. ATP ölçüm sonuçları (mM/milyon hücre) (*p ≤ 0,05, **p < 0,01 ve ***p < 0,001).

4.2.5. TBARS Ölçümüyle Oksidatif Hasar Düzeyleri

Sağlıklı kondrositlerin kontrol olarak kullanıldığı gruba göre HG1'de anlamlı bir artış belirlendi. HG1'in iWJ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta anlamlı bir azalış gösterirken, iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen grupta HG2'ye bir fark belirlenemedi. Kontrol grubuna göre HG2'de anlamlı bir artış belirlendi. HG2'de iWJ-MKH mitokondrisi

transfer edilen ve iKİ-MKH mitokondrisi transfer edilen gruplarda HG2'ye göre anlamlı bir artış olduğu belirlendi.



Şekil 4.35. Hücre kültür mediumunda MDA konsantrasyon öçümleri (µm/mg protein) ($p \leq 0,05$, $^{**}p < 0,01$ ve $^{***}p < 0,001$).

5.TARTIŞMA

Osteoartrit (OA), yol açtığı ağrı, yorgunluk, uyku bozuklukları, depresyon ve sakatlık gibi kalıcı sorunlarla insanların günlük yaşamlarını olumsuz etkileyen ve yaşam kalitelerini düşüren bir hastalıktır. Sürekli artan ekonomik maliyetiyle dikkat çeken bir sağlık sorunudur. Günümüz tedavi yaklaşımlarının etkinliği sınırlı kalmakta ve ileri yaştaki hastaların eşlik eden hastalıkları (örneğin kardiyovasküler hastalıklar vd.) nedeniyle güvenli kullanımları sorun teşkil edebilmektedir (Hawker, 2019). OA patolojik belirtileri eklem kıkırdağının bozulması, sinovyal kese kalınlaşması, subkondral osteosklerozu ve osteofit oluşumudur. OA'da yer alan hücreler kondrositler, osteoblastlar, osteoklastlar, sinovyal fibroblastlar, T hücreleri, makrofajlar ve mezenkimal kök hücrelerdir (MKH'ler). Dendritik hücreler ve makrofajlar gibi doğuştan gelen immün hücrelerin OA patogenezinde önemli rolleri vardır. Kıkırdağın kan damarı içermemesi, osteokondral yaralanmalarda karşılaşılan en önemli sorunlardan biridir. Bu durum, besinlerin kan yoluyla eklem kıkırdağına ulaşımını engellediği için hasarlı kıkırdağın yenilenme potansiyeli oldukça sınırlamaktadır. Geleneksel tedavi yöntemleri arasında ilaçlar veya eklem değişimi yer almaktadır. İlki yalnızca ağrıyı ve diğer semptomları hafifletirken ikincisinin yüksek cerrahi risk, travma ve yüksek maliyet gibi dezavantajları bulunmaktadır. Günümüzde eklem kıkırdağının hasarını ve dejeneratif hastalıklarını tersine çevirecek etkin bir tedavi henüz bulunmamaktadır. Bu nedenle kıkırdak onarımı kapasitesine sahip mezenkimal stromal hücreler tedavi seçenekleri arasında göze çarpmaktadır (Li ve ark., 2020). MKH'ler sadece OA dokusunun dinamik dengesinde ve onarımında önemli bir rol oynamakla kalmayıp aynı zamanda bağışıklık sistemini de düzenleyerek onarım sürecini desteklemektedir. Bu nedenle MKH'ler OA tedavisi için güncel tedavi yaklaşımlarında en çok tercih edilen yeni potansiyel terapötik ajanlar olarak kabul edilmektedir (Luo ve ark., 2023).

OA hastalarında, enflamasyon kaynaklı mitokondriyal hasar yaygın bir durumdur. Bu hasar, kondrositlerde mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olarak oksidatif stresi tetiklemektedir. Oksidatif stres ise ROS 'un aşırı üretimi ile karakterizedir ve mitokondrilerin hareketliliği ile hasarlı mitokondrilerin uzaklaştırılması (mitofaji) gibi süreçlerde aksamalara yol açmaktadır. OA'da mitokondriyal işlev bozukluğunun hayati önemi anlaşıldıkça, mitokondri transplantasyonu umut vadeden ve yenilikçi bir tedavi yaklaşımı olarak öne

çıkmaktadır (Qi ve ark., 2024). Enerji üretimini destekleyerek anabolik ve katabolik metabolizmaları dengeleyen, hasarlı mitokondrileri sağlıklı olanlarla değiştirerek oksidatif stresi azaltan ve kondrosit fonksiyonlarını iyileştiren mitokondri transplantasyonu, OA için potansiyel bir tedavi sunmanın yanı sıra mitokondri hedefli ilaç bazlı tedavilere de önemli bir alternatif oluşturmaktadır (Qi ve ark., 2024). Bununla birlikte, mitokondri transplantasyonunun terapötik etkilerinin altında yatan mekanizmaları tam olarak aydınlatmak için ayrıntılı araştırmaların yapılması çok önemlidir. Mitokondri transplantasyonu sürecinde kullanılacak sağlıklı mitokondrilerin elde edileceği hücre kaynağının doğru seçimi kritik bir öneme sahiptir. Bu doğrultuda, tez çalışmasında iki farklı mezenkimal kök hücre tipinden, iWJ-MKH'ler ve iKİ-MKH'lerden izole edilen mitokondrilerin nakil sonrası kondrosit canlılığı ve hücresel işlevleri üzerine olan etkileri incelenmiştir (C. Altuntaş ve ark., 2025).

Elde edilen bulgular sonucunda, iWJ-MKH, iSS-MKH ve iKİ-MKH‘lerinin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaştırma potansiyellerinin izolasyon sonrasında *in vitro* kültür sırasında da korunduğu ve akım sitometri analizleriyle hücrelerin literatürde tanımlanmış MKH belirteçlerini taşıdıkları belirlendi (Chopra ve ark., 2019; Semerci Sevimli ve ark., 2023; Walter ve ark., 2020). iSS-MKH‘leri kondrosit hücrelerine farklılaştırılarak OA enflamasyon modelleri oluşturuldu. Enflamasyon modeli oluşturulurken makrofaj hücreleri kaynağı olarak makrofaj öncülü monositik hücre kaynaklı U937 hücre hattı kullanılmıştır. Makrofajların monosit hücrelerden farklılaşması ve polarizasyonu için literatürde farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. Protokollerindeki bu büyük değişkenliğin yanı sıra, hücre hatlarının kimyasal ajanlarla gerçekleştirilen indüksiyona verdikleri tepkilerdeki farklılıklar hakkında kısıtlı bilimsel veri bulunmamaktadır. M1 polarize aktif makrofaj hücrelerinin U937 hücre hattından kimyasal indüksiyonuyla gerçekleştirilen farklılaştırma deneyleri, mevcut deney protokollerinin optimizasyonu ile gerçekleştirildi. Makrofaj hücre farklılaştırma deneyleri, hücrelerin fenotipik ve metabolik karakterizasyonu gerçekleştirilerek optimize edildi: Akım sitometri analizinde hücrelerin M1 makrofajlara özgün CD68 ve M2 makrofajlara özgün CD206 antikorları açısından incelenmesi sonucunda, tez çalışması için en uygun farklılaşma protokolünün 48 saat boyunca 20 ng/mL PMA uygulanması ve ardından yeni bir besiyerine alınarak 24 saat boyunca 100 ng/mL LPS ve 20 ng/mL IFN-γ uygulanması olduğu belirlendi (Abdulhadi,

2014; Kuno ve ark., 2020; Nascimento ve ark., 2022). Ayrıca makrofaj farklılaştırma deneyleri sonrasında toplanan koşullu besiyerleri (monosit hücre süspansiyonları) ELISA metoduyla analiz edilerek karakterizasyonları gerçekleştirildi. M1 makrofajlar pro-enflamatuar sitokinler salgılarken, M2 makrofajlar anti-enflamatuar sitokinler salgılamaktadır. Aktif M1 makrofaj hücresine özgü metabolik aktivitenin belirlenmesi pro-inflamatuar IL-1β düzeyinin ve aktif M2 makrofaj hücresine özgü metabolik etkinliğin belirlenmesi ise anti-inflamatuar IL-4 sitokin düzeyinin ELISA ile analiz edilmesiyle gerçekleştirilmiştir (J. Zhang, X. Liu, ve ark., 2020; J. Zhang, Y. Rong, ve ark., 2020). Sonuçlarımız, M1 makrofaj farklılaşması yapılan hücrelerde ölçülen en yüksek IL-1β ifadesinin Xie ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada belirtilen farklılaşma protokolünün uygulanmasıyla elde edilebildiğini gösterdi (Xie ve ark., 2021).

In vitro çalışmalarda iSS-MKH'lerin periosteum, yağ veya kas dokusu kökenli MKH'lerden daha fazla kıkırdak matriksi salgıladıkları göstermiştir (Sack ve ark., 1994). Diğer çalışmalar, SS-MKH'lerin kıkırdak oluşturma konusunda kemik iliği, yağ veya iskelet kası kaynaklı MKH'lerden daha büyük bir yeteneğe sahip olduğunu doğrulamıştır (de Sousa ve ark., 2014). Kondrojenik farklılaşma için önemli bir değerlendirme kriteri, kültür sırasında hücre dışı matrikste biriken glikozaminglikan (GAG) miktarıdır. GAG miktarını belirlemek için Alcian Blue boyaması tercih edilen bir yöntemdir (Lindenmair ve ark., 2014). Tez çalışmasında iSS-MKH'larında kondrojenik farklılaşması sonrasında 15 ve 21 gün sonunda Alcian Blue boyaması ile GAG miktarları belirlendi. GAG erken kondrojenik farklılaşma döneminde (15 gün) sitoplazmada daha az birikirken ileri kondrojenik farklılaşma döneminde (21 günde) sitoplazmada daha yoğun bir şekilde birikmektedir (Hernández-Bule ve ark., 2017; Prosser ve ark., 2019; Vincent ve ark., 2025). Böylece hem GAG boyaması hem de gen ekspresyon analizleriyle iSS-MKH'ların kondrojenik farklılaşmanın gerçekleştiği doğrulandı. 21 günün sonrasında kondrositlere farklılaşan hücreler ficoll yöntemiyle izole edildi. Literatürde in vitro ortamda ve hücrelerin farklılaşmasıyla elde edilen kondrositlerin izolasyonu ile ilgili yeterli bilgi bulunmaması önem bir eksikliktir. *In vivo* ortamda kondrosit izolasyonunda pronaz E, kolajenaz 2, kolajenaz D, tripsin, kolajen 6 gibi enzimler kullanılmaktadır (Castro ve ark., 2020; He ve ark., 2023; Korpershoek ve ark., 2023; Li ve ark., 2023; Sebastian ve ark., 2021; Textor ve ark., 2023). Ficoll temelli izolasyonlar gradiyent oluşturarak faz farkıyla izolasyon

yapılmasını temel almaktadır. Çalışmada bu prensip temel alınarak 21 gün sonunda elde edilen olgun kondrositler besiyerle süspanse edilerek ficoll ile karıştırılıp çeşitli santrifüj aşamalarından geçerek gradiyent farkından oluşan bulutsu tabakadan elde edildi (Candan Altuntaş ve ark., 2025). İzolasyonu yapılan kondrositlerin GAG boyamaları dışında gen ekspresyon analizleriyle de doğrulanması gerektiği için Col2, SOX9, COMP, prolaktin genleri incelendi. Elde edilen verilere göre 21 gün sonunda olgun kondrositlerde gözlemlenen gen ekspresyon analizleri, hücre dışı matriksin GAG ile boyanmasıyla karakterize edilen bu hücrelerde Col2 ve COMP genlerinin aktivitesinde artış, prolaktin ve Sox9 genlerinin aktivitesinde ise düşüş olduğunu ortaya koymuştur. Literatür kondrojenik koşullar oluştuğunda tüm süreçte COMP, COL1A1 gen ekspresyonlarının arttığını, SOX9 gibi erken kondrojenik farklılaşma belirteci olan genlerin ekspresyonlarının azaldığı elde edilen verilerle uyum göstermiştir (Akiyama, 2008; Lefebvre ve Smits, 2005). Col2 ve ACAN antikorlarıyla immünoflorasan işaretleme yapıldığında farklılaşmamış iSS-MKH'lerinde farklılaştırma yapılıp izole edilen kondrositler karşılaştırıldı ve kondrositlerde her iki antikorunda ekspresyonlarının farklılaşmamış hücrelere göre daha fazla ifade bulduğu belirlendi. Literatür incelendiğinde iSS-MKH'lerinin doğal hallerinde yani farklılaştırılmamış hallerinde Col2 ve agrekan gen ekspresyonlarının düşük veya hiç olmadığı belirtilmiştir (Fahy ve ark., 2014; Zayed ve ark., 2016).

Kıkırdak, düşük hücresel içeriğe sahip olması nedeniyle kondrosit hücrelerinin izolasyonu sırasında daha fazla dokuya ihtiyaç duyulmaktadır (Cope ve ark., 2019). Kıkırdak dokusundan elde edilen hücrelerin fenotipleri *in vitro* koşullarda hızla değiştiğinden proliferasyonları sınırlıdır (Nicholson ve ark., 2007; Zien ve ark., 2001). OA'da sinoviyositler, mononükleer hücreler veya kondrositler IL-1β ve TNF-α gibi pro-enflamatuar sitokinlerin ortamda olmasından dolayı protein yıkımıyla ilişkili enzimler artmaktadır. *In vitro* OA modeli oluşturulması sırasında pro-enflamatuar sitokinlerin indüksiyonu yaygın olarak kullanılmaktadır (Johnson ve ark., 2016). Model oluşturmada kondrositlerin OA hastalarından alınan sinovyal sıvı ile uyarılmasıyla oluşturulabilmektedir. Bu model oluşturulduğunda IL-6, IL-8, IFN-γ gibi pro-enflamatuar sitokinlerin ekspresyonları da artmaktadır. Ancak sinovyal sıvı hacminin sınırlı olması nedeniyle OA modelinin tekrarlanabilirliği düşüktür (Hoff ve ark., 2013). Hücre ve doku kültür ortamına eklenen sitokinlerin kullanılmasıyla oluşturulan OA modellerinde kondrositlerin Col2 ve

agrekan ekspresyonlarında azalma ve MMP-13 ekspresyonunda artış gibi OA benzeri sonuçlar sağladığı çeşitli çalışmalarla doğrulanmıştır (Miyaki ve ark., 2009; Novakofski ve ark., 2012; Yang ve ark., 2014). İnsan ve fare OA sinovyal dokusunda M1 polarize makrofajların göç ettiği ancak M2 polarize makrofajların toplanmadığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2018). İlgili çalışmada yer alan transgenik fare modelinde sinovyal makrofaj M1 polarizasyonunun kolajenaz kaynaklı OA'yı şiddetlendirdiğini, M2 polarizasyonunun ise OA gelişimini zayıflattığı belirlenmiştir. Bu bulgular, sinovyal M1 ve M2 makrofajlarının OA gelişimindeki kritik rolünü tanımlamaktadır. Wu ve arkadaşları, Fas-FasL kaynaklı apoptozun (MaFIA)-transgenik fare modelinde küçük molekül (AP20187) ile uyarılan makrofaj tükenmesini takiben osteofit oluşumunun azaldığını göstermiştir. Makrofaj tükenmesi, sinovyal enflamasyonu artırarak OA'nın tedavisini başarısız kılmaktadır. Bu çalışmalar, OA'da M1 ve M2 makrofajları arasında bir dengesizliğin meydana geldiğini ve makrofaj yeniden programlanmasının altında yatan mekanizmaların daha fazla araştırılmasının, OA'yı önlemek için uygun bir yaklaşım sağlayacağını ileri sürmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda *in vivo* odaklanlanılmış, *in vitro* makrofaj kondrosit ko-kültürüyle oluşturulan OA modelleriyle ilgili yeterince çalışma yapılmamıştır. Bu tez çalışmasında, kondrosit ve U937 hücrelerinin M1 makrofaja indüklenmesiyle oluşturulan ko-kültür OA modeli (Hasar grubu 2) ve M1 makrofaja farklılaştırıldıktan sonra kondisyonlanmış ortamla oluşturulan OA modeli (Hasar grubu 1) karşılaştırıldı. IL-1β ve TNF-α uygulanarak *in vitro* OA enflamasyon modeli oluşturulan bir çalışmada da bizim bulgularımızla benzer şekilde enflamasyonun kontrole göre IL-4 seviyesinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Ortamdaki pro-enflamatuar sitokinlerin anti-enflamatuar özellikteki IL-4'ün üretiminde artışa yol açmaktadır. Bu durumun ortaya çıkmasında hasar ve enflamasyonla ilişkili hücre sinyal yolaklarının karşılıklı etkileşiminin rol oynadığı düşünülmektedir (Manning ve ark., 2010).

Yapılan çalışmalar, mitokondriyal işlev bozukluğu ile OA arasında belirgin bir ilişki olduğunu göstermektedir (He ve ark., 2020) Özellikle He ve arkadaşlarının (2020) araştırması, artan mitokondriyal reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin kıkırdak dejenerasyonunu hızlandırdığını ve OA gelişimine katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca hayvan deneyleri de mitokondriyal disfonksiyonun sinovit ve kıkırdak hasarını tetiklediğini desteklemektedir (Yi ve ark., 2022). Temporomandibular eklem OA'sı üzerine

yapılan bir başka çalışmada ise mitokondriyal ROS kaynaklı oksidatif stresin HIF-1α/TFRC yolunu aktive ederek ferroptoza ve kıkırdak yıkımına neden olduğu saptanmıştır (Chen ve ark., 2024). Doktora tez çalışmasında elde edilen önemli sonuçlardan biri kondrosit hücrelerinde transfer edilen TMRM ve MitoTracker Red işaretli mitokondrilerin çekirdek periferine lokalize olduğunun gösterilmiş olmasıdır. Bu yerleşim aktarılan mitokondrilerin hücre içindeki işlevselliği konusunda bilgi vermektedir. Mitokondriler hem fiziksel konumları hem de işlevleri itibarıyla hücre çekirdeğiyle yakın bir etkileşim içindedir. Kromatinin yeniden düzenlenmesinde rol oynayan metabolitleri üreterek gen ifadesini etkileyebilirler. Özellikle enerji üretimi için mitokondriyal oksidatif metabolizmaya yoğun bir şekilde bağımlı olan kalp ve kas gibi yüksek mitokondri yoğunluğuna sahip dokular daha fazla uyarılmış mitokondriyal sinyalleşme mekanizmalarına sahiptirler (Picard, 2015). Çalışmada iki farklı kök hücre kaynağından mitokondri elde edilmiştir: Genç dokulardan elde edilmiş mezenkimal kök hücrelerin mitokondrisi (iWJ-MKH) ve yaşlanmış bireyin dokularından elde edilmiş mezenkimal kök hücrelerin mitokondrisi (iKİ-MKH). Genç MKH'lerden (iWJ-MKH) elde edilen mitokondrilerin transferi, mitokondri hasarının görece daha az olmasına bağlı olarak (güçlü TMRM boyaması) hücrelerde apoptoz seviyesini arttırıcı bir etki oluşturmazken HG1'de transfer sonrası apopotoz seviyelerinde azalma olduğu belirlendi. Bu azalmanın aksine yaşlı MKH'lardan (iKİ-MKH) elde edilmiş mitokondrilerin transferinin hücre apoptozunu arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu durum ileride mitokondri temelli bir OA tedavisi oluşturulduğunda mitokondri sağlığının ve genç hücrelerden elde edilmesinin önemini göstermektedir. Sağlıklı mitokondrilerin kullanılması OA modeli hücrelerinin canlılığını desteklerken yaşlı hücrelerden elde edilen kusurlu mitokondrilerin hücre canlılığı üzerinde olumsuz ve apoptozu arttırıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Deney gruplarına ve sağlıklı kondrosit hücrelerine uygulanan farklı dozlardaki mitokondri oranlarında en iyi ifadeyi 2,5 µg/mL konsantrasyonda olduğu yapılan WST-8 analiziyle belirlenmiştir. Aerobik (mitokondriyal) solunum sırasında fizyolojik olarak ROS üretilmektedir. Ancak stres altında olmayan normal hücrelerde bu ROS üretimi sınırlı düzeydedir. Stres koşullarında (iskemik, hipoksik, enflamatuar, kimyasal vd.) ROS üretimi elektron kaçağına bağlı olarak artmaktadır (Angelova ve Abramov, 2016; Murphy, 2009). Makrofaj kaynaklı çevresel enflamatuar stresle oluşturulan kondrosit hasar modeli uygulanan bu tez çalışmasında deney gruplarındaki hücreler oksidatif strese maruz

bırakılmıştır. Bu hücrelerde mitokondriyal fonksiyon bozukluğun artan ROS seviyeleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu kanıtlanan OA'da glikolizin kondrositler için temel ATP kaynağı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle uzun süreli glikoliz inhibisyonu OA'nın ilerlemesini hızlandırmaktadır. Wu ve arkadaşlarının bir çalışmasında OA'nın mitokondriyal oksidatif fosforilasyon üzerindeki etkisi incelenmiş, OA gruplarında hücre içi ATP sevilerinde önemli bir azalış olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca mitokondrideki değişikliklerin oksidatif hasarla sonuçlanmasına rağmen yapılan incelemelerde hasarlı kondrositler ve OA gruplarda hücresel ROS miktarlarında bir fark olmadığı görülmüştür. Bu durumun hem endojen hem de ekzojen kaynaklardan meydana gelebileceğini belirtmişlerdir (Wu ve ark., 2023). Tez çalışması sonucunda OA'lı hasar gruplarında kontrol grubuna göre ATP üretiminin azaldığı literatürle uyumlu şekilde bulunmuştur. OA modellerinde yapılan klinik öncesi çalışmalar, eklem kıkırdağındaki mitokondriyal disfonksiyonun hastalığın ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını ve ekzojen mitokondri uygulamasının hücre içi ATP seviyelerini artırarak kondrosit sağkalımını desteklediğini göstermiştir (H. Zhang ve ark., 2020). Benzer şekilde, murin modellerinde yapılan bir çalışmada, mitokondri transplantasyonunun enflamatuar yanıtları azalttığı ve kıkırdak dokusunu koruduğu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2018). Ayrıca kas-iskelet sistemi hastalıkları kapsamında, mitokondri transferinin kas distrofilerinde ve travmatik kas yaralanmalarında rejeneratif süreci hızlandırdığına dair literatürde veriler bulunmaktadır (Alway ve ark., 2023). Klinik düzeyde ise mitokondri nakli henüz deneysel aşamada olsa da kalp kası iskemisi ve nörolojik hastalıklar gibi alanlarda güvenliğini test eden erken çalışmalar umut verici sonuçlar ortaya koymuştur (Jang ve ark., 2024). Bu sonuçlar, mitokondri transplantasyonunun OA gibi dejeneratif eklem hastalıkları için potansiyel bir tedavi seçeneği olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, OA'ya özgü klinik çalışmaların sınırlı sayıda olması, bu terapötik yaklaşımın fizyolojik etkilerinin daha kapsamlı bir şekilde incelenmesi gerektiğini göstermektedir.

Kondrosit hücrelerinde hasar oluşturulduğunda ATP üretiminde azalma olması, ROS seviyelerinde artış ve apoptoz ilişkilerinin literatürü doğrulayacak şekilde olmasının yanında gen ekspresyonlarındaki farklılıkları da laboratuvarda yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Bu doğrultuda, öncelikle anti-apoptotik protein BCL-2, mitokondriyal dış membran

geçirgenliğinde önemli bir yere sahiptir. BCL-2 apoptozu önler ve sonuçta hücrenin hayatta kalması sağlanır. BCL-2 proteininin inhibe ederek mitokondriyal apoptozun temel düzenleyicisi olduğu bildirilmiştir (Czabotar ve Garcia-Saez, 2023). Mitokondriyal dış membran geçirgenliğini değiştirerek kaspaz kaskatının aktivatörlerinin sitozole salınması ve apoptozunu engellemektedir. Çalışmamızda hasar modelleri sonrasında tüm gruplarda (HG1 ve HG2) BCL-2 kapasitesi düşerek hücrelerin apoptoza eğilimlerinin arttığı görülmüştür. Osteoartrit tanısı almış kıkırdak dokusunda BCL-2 seviyesinin sağlıklı kıkırdak dokularına göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2000). Mitokondri uygulamasını takip eden süreçte BCL-2 seviyesinin artması beklenmektedir. Bu durum HG1 grubunda uygulanan mitokondri transferinde gözlemlenmekte ve her iki kaynaktan gelen mitokondrilerin etkili oldukları yapılan çalışmalarla bulunmuştur ($p<0,05$). Ancak mitokondri kaynağının iWJ-MKH ya da iKİ-MKH olması sonuçlar üzerinde istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark oluşturmamıştır. Mitokondri uygulanan HG2 gruplarında BCL-2 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma gözlemlenmiştir. Bu durum, diğer analizlerde gözlemlenen sonuçlarla paralellik göstermektedir. BCL ailesi proteinleri apoptozu modüle ederken apoptozu indükleyen pro-apoptotik protein BAX ve anti-apoptotik protein BCL-2 etkin olarak çalışmaktadır (Sun ve ark., 2002; van Delft ve Huang, 2006). BAX proteini apoptoz sürecinde mitokondriyal yolun aktivasyonundan sorumludur (Wang ve ark., 2019). Çalışmamızda HG1 ve HG2 modellerinde BAX-1 ekspresyonu önemli derecede artmıştır. Ancak mitokondri uygulaması sonrasında BAX-1'in düşmesi beklenirken BAX ifadesi önemli derecede artmıştır. Hem apoptotik hem de anti-apoptotik gen ekspresyonlarının artması sonuçların yorumlanmasını zorlaştırmaktadır. Ancak çalışmamızdaki hücre canlılık ve apoptoz ölçümlerinde gözlemlendiği gibi hücre popülasyonu üzerinde mitokondri aktarımının olumsuz bir etki göstermediği hatta desteklediği görülmüştür. Hasar sonrasında ortamda IL-1β'nın artması BAX ifadesini uyararak apoptozu uyarması beklenirken yalnız HG1'de önemli ölçüde IL-1β artışı gözlemlenmiştir. Bu durum mitokondri aktarımıyla osteoartrit patogenezinde merkezi bir rol oynayan IL-1β uyarılmasının kontrol altına alındığını göstermektedir. Artan BAX-1 ve ROS seviyesi doğrudan dışarıdan aktarılan mitokondrilerin hücreler üzerindeki etkisiyle açıklanabilir. Hücrelerde olması gereken ve hücre tarafından miktarları regüle edilen mitokondrilerin dış bir etkiyle sayılarının artması sonrasında hücrelerde toplam ROS üretimi ve BAX seviyesinin yükselmesi gerçekleşebilirken hücrede mitokondri başına bu değerlerin

düşük kaldığı ve bu yüzden apoptotik yolakların yükselen BCL-2 seviyesine bağlı olarak düştüğü sonucuna varılmıştır. Nitekim hücre ölümünde gözlemlenen bir diğer faktör olan TNF-α seviyesi HG1 sonrasında artan BAX seviyesine karşın artmadığı gözlemlenmiştir.

IL-1β baskılanması, klinik öncesi çalışmalarda OA tedavisi için umut vadeden bir yaklaşım olarak öne çıkmış ve güçlü bir teorik hedef oluşturmuştur. IL-1β'nin, MMP'ler ve ADAMTS gibi protein matriksi parçalayan enzimlerin üretimini tetikleyerek, kolajen ve proteoglikanlar gibi kıkırdak matris bileşenlerinin sentezini engelleyerek ve sinovite katkıda bulunarak OA patogenezinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Fan ve ark., 2007). Ancak, IL-1β inhibitörleri (örneğin, Canakinumab) ile yapılan klinik çalışmalarda elde edilen ağrı ve işlevdeki iyileşmeler genellikle sınırlı kalmış ve her zaman klinik açıdan anlamlı düzeyde olmamıştır (Schieker ve ark., 2020). Bu durumun olası nedenleri arasında dozaj, tedavi zamanlaması veya uygulama yolu gibi faktörler öne sürülsede, asıl nedenin OA'nın karmaşık ve çok faktörlü yapısı olduğu düşünülmektedir. Mitokondri aktarımının, özellikle HG2 modelinde, yalnız hasar gören kondrositlere değil pro-enflamatuar M1 makrofajları da etkileyerek anti-inflamatuar M2'ye polarizasyonlarını desteklemektedir. Yapılan çalışmalar, makrofajlardaki mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin (mtROS) temizlenmesinin hem mitokondriyal işlevi iyileştirebileceğini hem de makrofajların inflamatuvar M1 fenotipinden iyileştirici M2 fenotipine geçişini teşvik edebileceğini ortaya koymuştur (Wang ve ark., 2025). Dolayısıyla hasar alan bir bölgeye yapılacak mitokondri nakli hasar almış dokuların onarılması için destekleyici olmasının yanında aynı zamanda M1 makrofaj polarizasyonunu M2 tipi olacak şekilde modüle ederek ortamın karakteristiğini proinflamatuardan antienflamatuvar nitelikte olmasını sağlayacaktır. *In vitro* kokültür çalışmalar bu öngörüyü desteklemektedir.

Pro-enflamatuvar bir faktör olan TNF-α'nın HG1 ve HG2 hasar gruplarında kontrole göre önemli ölçüde artmış olduğu ve mitokondri uygulaması sonrasında düştüğü görülmüştür. Kondisyonlanmış ortamla uyarılan hasar sonrasında apoptozu engelleme sürecinde iWJ-MKH kaynaklı mitokondrilerin iKİ-MKH mitokondrilerine göre daha etkin oldukları belirlenmiştir. Mitokondri aktarımı diğer hasar grubunda da etkili olsa da iWJ-MKH kaynaklı mitokondrilerin daha etkili olduğu durumu makrofajın doğrudan eklendiği HG2 hasar grubunda gözlemlenmemiş ve TNF-α iKİ-MKH kaynaklı mitokondriler tarafından önemli ölçüde baskılanmıştır. IL-1β ve TNF-α, osteoartritte anahtar pro-

enflamatuar sitokinler olarak kabul edilir (Kapoor ve ark., 2011). IFN-γ ya da LPS ile uyarılmış sinoviyum kaynaklı M1 makrofajların kondisyonlanmış ortamlarının kondrositlerin farklılaşmasını önemli ölçüde inhibe ettiği ve M1 makrofajlarının anti-kondrojenik etkilere sahip olduğu önceki çalışmalarla bilinmektedir (Fahy ve ark., 2014). IFN-γ ve TNF-α ile uyarılan M1 makrofaj, ACAN ve Col2A1 gen ekspresyonunu inhibe ederken IL-1β, IL-6 ve ADAMTS-5'i düzenleyerek osteoartrit patolojisinde etkin rol oynamaktadır (Utomo ve ark., 2016; H. Zhang ve ark., 2020). Hasar sonrasında IL-1β tarafından indüklenen kondrositlerin, makrofajlarda STAT3 aktivasyonunu tetikleyerek IL-6 salgılanmasına ve gelişmiş bir enflamatuar amplifikasyon döngüsüne yol açtığı bildirilmiştir (Limagne ve ark., 2016; H. Zhang ve ark., 2020). Çalışmalar, osteoartritin ilerlemesinde IL-1β'nın TNF-α'dan daha önemli olabileceğini işaret etmektedir (Blasioli ve Kaplan, 2014). IL-1β'nın bloke edilmesine yönelik klinik çalışmalar kısmen olumlu sonuçlar vermişken, TNF-α blokörleri aynı düzeyde etkili olmamıştır (Lopez-Armada ve ark., 2006). IL-1β ekspresyonundaki bir artış, özellikle TNF-α'yı hedef alan anti-apoptotik, negatif düzenleyicilerin salınmasını tetikleyebileceği ve bu durumun da TNF-α'nın ekspresyonunun azalmasına yol açabileceği sonucuna varılmıştır. İki farklı hasar modeli sonrasında hücrelerde beklentilerin tersine ACAN ekspresyonu artmış ve mitokondrilerin aktarımı sonrasında bu ekspresyonun düştüğü gözlemlenmiştir. Bu durum beklentilerin tam tersi olsa da hasar sonrasını takip eden 48 saat içerisinde yapılan analizin bu sonucu doğurduğu düşünülmektedir. Kondrogenez sürecinde ACAN ekspresyonu daha ileri süreçlerde uyarıldığından elde edilen bulgular osteoartritin daha erken aşamadaki patogenezini göstermektedir. Nitekim Col2 ekspresyonu hasar sonrasında mitokondri aktarımı ile beklentiler doğrultusunda daha fazla artarak kıkırdak matriksinin sentezini desteklemiştir. Her iki modelde iKİ-MKH kaynaklı mitokondri aktarımlarının daha etkin olduğu bulunmuştur. Hasarlı kondrositlerin makrofaj hücreleri ile birlikte kültürü daha önce değerlendirilmiştir (Samavedi ve ark., 2017). Sonuçlar, tek başına hasarlı kondrosit kültürüne kıyasla ACAN ve SOX9'un önemli ölçüde daha yüksek gen ifadesinin gözlendiğini göstermiştir. Özellikle, protein düzeyinde SOX9 veya ACAN'da önemli bir fark olmadığı buna ek olarak, Col2 seviyelerinde mRNA veya protein düzeyinde önemli bir farklılık gözlemlenmediği belirtilmiştir. Deneylerimizde ACAN ve SOX9 ekspresyonu her iki hastalık modelinde de (HG1 ve HG2) artmıştır. Bu artmış gen ifadesinin, enflamasyon ve hücresel hasar nedeniyle normal matriks proteinlerinin kaybını telafi eden hücrelere bağlı

olabileceği belirtilmiştir (Fukui ve ark., 2001; Samavedi ve ark., 2017). Çalışmamızda, mitokondri transferi etkisini SOX9 ve ACAN ekspresyonlarını azaltarak göstermiştir. Bu durumda, kondrosit katabolizmadan anabolizmaya geçerek yanıt verebilir ve makrofaj polarizasyon durumu kritik bir rol oynayabilir (Fahy ve ark., 2014; Samavedi ve ark., 2017). M1-makrofajların COL2a1 ve ACAN ekspresyonlarını azalttığı çok sayıda çalışmada bildirilmiştir, ancak M2 makrofajların OA'daki etkisi hala yetersiz kalmıştır (Zhao ve ark., 2023).

Oksidatif stresi düzenleyen ve osteoartritte antioksidanların altında yatan mekanizmayı incelemek için HIF-1α ve NOX4'ün mRNA ekspresyonları incelendi. HIF-1α'nın stabilizasyonunun mitofajiyi artırarak osteoartriti hafiflettiği diğer çalışmalarda bulunmuştur (Hu ve ark., 2020). NOX-4'ün gen ekspresyonu oksidatif stresin derecesi ile ilişkili olup NOX-4'ün indüklediği ROS üretiminin osteoartritte önemli bir rol oynadığına işaret etmektedir (Drevet ve ark., 2018). Mitokondri ve NOX ekspresyonu hücre içi ROS seviyesi için belirleyicidir. Aşırı indüklenen ROS, osteoartrit de dahil yaşa bağlı hastalıklarla sıkı bir şekilde ilişkilidir (Hu ve ark., 2020). HIF-1, hipoksi ile indüklenen transkripsiyonel hedef genleri aktive ederek kolajen tip II ve Sox9 aktivitesini yükseltebilir. Ayrıca HIF-1α'nın, mitofajiyi artırarak hipoksinin neden olduğu hücre dışı matriks bozulmasını inhibe ettiği yine aynı çalışmalarda belirtilmiştir. Çalışmamızda HG1 hasarı sonrasında NOX4'ün arttığı ve HG1 hasarını takiben mitokondri aktarımı sonrasında NOX4 seviyesi normal seviyesine ulaştığı görülmüştür. Özellikle iWJ-MKH kaynaklı mitokondrilerin daha etkin oldukları bulunmuştur. NOX4'teki düşüşe bağlı olarak HIF-1α ekspresyonundaki artışın yalnız HG2 grubuna iKİ-MKH mitokondrisinin transferi sonucunda gerçekleştiği görüldü. Bu durum da HG1'de farklı süreçlerin rol oynadığını göstermektedir. HIF-1α seviyesinin HG1'de artmaması özellikle ACAN ekspresyonunun HG1 sonrasında mitokondri uygulanan gruplarda artmasıyla ilgili olabilir.

MCT4'ün laktat metabolizması üzerinde büyük öneme sahiptir. Laktat, enerji metabolizmasında çok önemli bir faktördür, tümörlerde ve çevredeki hücrelerde enerji dinamiklerini düzenler sonuç olarak gen düzenleme ve transkripsiyonda önemli bir sinyal molekülüdür (Jiang ve ark., 2025). Normal şartlarda olgun somatik hücrelerde enerji metabolizmasında mitokondri aktivitesi merkezi bir rol oynamaktadır. Ancak yalnız glikolizin olduğu ve oksidatif fosforilasyonun gerçekleşmediği ortamda glikoliz sırasında

oluşan NADH birikimi gözlemlenmektedir. Bu süreçte NADH'ın indirgenerek tekrar NAD+ dönüşebilmesi için laktat metabolizması oldukça önemlidir. Bu süreçte MCT4'ün kritik görevi olduğundan laktat metabolizmasının önemli bir belirteci olarak çalışmada kullanılmıştır. Eğer mitokondri de sorun olursa oksidatif fosforilasyon kullanılamayacak sadece glikoliz yapılabilecektir. Kontrol grubuna göre HG1'de MCT4 ifadesinin yüksek olması, hasardan dolayı hücrenin mitokondrial disfonksiyonu gerçekleştiği ve bunun sonucunda oksidatif fosforilasyonu etkin kullanamadığı düşünülmektedir. Mitokondri transferi yapılan gruplarda ise MCT4 ifadesinin düşmesi laktik asit yolunu kullanmasının gerek olmadığını ve oksidatif fosforilasyonu enerji üretiminde tekrar kullanmaya başladığını göstermektedir. HG2'de ise benzer şekilde MCT4 ifadesi yükselmiştir. Bu durum oksidatif fosforilasyonunun düştüğünü işaret etmektedir. HG2'de varolan anti-apoptotik koşulların sonucu olarak MCT4'teki artış HG1'deki ifadeye göre daha düşük kalmıştır. Ancak her durumda iki farklı hücre kaynaklı mitokondri uygulaması sonrasında HG2'de de MCT4 ifadesi düşmüştür. Bu bulgu HG1'de olduğu gibi mitokondri aktivitenin arttığını işaret etmektedir.

Lipid oksidasyonunu gösteren MDA ölçümleri kontrol grubuna göre HG1'de önemli ölçüde artarken HG1'e eşlik eden iWJ-MKH mitokondrisi transferi sonrasında MDA'nın düştüğü gözlemlendi. MDA seviyesindeki düşüşün iKİ-MKH mitokondri transfer edilen gruplarda etkisiz kalmasının mitokondri sağlığıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak HG2 grubunda kontrole göre artan MDA seviyesi ve hatta bu değerlerin mitokondri aktarımları sonrasında daha da artması beklentilerin dışında gerçekleşmiştir. HG2 gruplarında artan M2 makrofaj etkinliği sonrasında hücre canlılığının desteklendiği diğer analizlerimizle gösterildi. Bu durum hücrenin oksidatif strese yanıt olarak uyarılan anti-oksidan savunma mekanizmalarındaki artışa bağlı olabileceğini düşündürmektedir (Chiang ve ark., 2021). Önceki ölçümlerimiz arasında yer alan HMOX-1 ekspresyon analizleri bu durumu doğrulamaktadır. HG2 sonrası mitokondri transfer edilen gruplarda HMOX-1 gen ekspresyonunda artış gözlemlenmezken HG1'de HMOX ekspresyonu artmış olarak bulundu. Mitokondri aktarımı sonrasında enflamatuvar belirteçlerin düşmesi ve Ki-67 gibi hücre proliferasyonlarının HG1 hasarı oluşturulmuş ve mitokondri aktarılmış gruplarda 10-15 kat artmış olması açık bir şekilde mitokondri aktarımının hücreler üzerindeki olumlu etkisini göstermektedir. Ancak zayıf matriks protein sentezlerinin ROS süreciyle ilgili

oldukları ve erken zamanda bakılan gen ekspresyonlarının düşük seviyede olmasıyla ilişkili olduğu düşünülebilir. Bu sonuçtaki önemli nokta, mitokondri transferinin hasarlı mitokondrilerden kaynaklanabilecek ROS seviyesini artırarak hücreleri olumsuz etkilemediğinin gözlemlenmesiydi. Beklentimiz, MDA seviyelerinde azalma ve HMOX-1 seviyelerinde artış ile birlikte hücrelerdeki ROS seviyesinde azalma olmasına rağmen, mitokondri transferi yapılan gruplarda ROS seviyesi önemli ölçüde değişmemiştir. Bunun makul bir açıklaması 48 saat olan sınırlı inkübasyon süresi olabilir. Bu nedenle, ROS seviyesindeki düşüş 48 saatten daha sonraki zamanlarda yapılan analizlerde gözlemlenmiş olabilir. Yüksek reaktiviteleri nedeniyle ROS, hücrenin temel bileşenleri olan lipitler, proteinler ve DNA için ciddi bir tehdit oluştururlar. ROS'un başlattığı lipit peroksidasyonu, hücre zarlarındaki çoklu doymamış yağ asitleri hedef alan ve özellikle mitokondriyal iç ve dış zarlarda hasara yol açan zincirleme bir reaksiyonu tetiklemektedir. Bu reaksiyonun toksik bir son ürünü olan MDA, oksidatif stresin ve lipit hasarının güvenilir bir biyobelirteci olarak kabul edilmektedir. İlginç bir şekilde, hasar gören mitokondriler enerji üretimindeki verimliliklerini kaybetmenin yanı sıra, daha fazla ROS üreterek oksidatif stres döngüsünü derinleştirebilirler. Ayrıca, MDA'nın mitokondriyal işlev üzerindeki doğrudan olumsuz etkileri de belirlenmiştir; çalışmalar MDA'nın mitokondriyal solunum enzimlerini inhibe edebildiğini ve mitokondriyal zar potansiyelini düşürebildiğini göstermektedir. Mitokondri transferinin bu kısıtlayıcı ve dejenere zincirleme reaksiyonu keserek mitokondri başına ROS üretimini azaltıcı bir etki göstermiştir. Nitekim nakil sonrasında hücrelerde daha fazla mitokondri bulunmasına karşın ROS seviyesinin değişmemesi mitokondri transferinin hücre canlılığını destekleyici yönünü göstermektedir.

Yaşlanma, mitokondriyal proteinlerin hem miktarını hem de türünü değiştirerek mitokondriyal işlevlerin bozulmasına ve yaşa bağlı hastalıkların ortaya çıkmasına zemin hazırlar. Yaşlanmanın bir sonucu olarak, mitokondriyal solunum zincirinin (OXPHOS) temel bileşenleri olan Kompleks I, III ve IV gibi yapıların bazı alt birimlerinin protein seviyelerinde azalma görülür. Bu durum, ATP üretiminde düşüşe ve enerji metabolizmasının sekteye uğramasına yol açar. Aynı zamanda, yaşla birlikte artan mitokondriyal DNA (mtDNA) hasarı ve mutasyon birikimi, mtDNA tarafından kodlanan proteinlerin sentezini azaltır veya işlevsiz proteinlerin üretimine neden olur. Dahası, sitrik asit döngüsü gibi merkezi mitokondriyal metabolik yollardaki bazı enzimlerin protein seviyeleri veya

aktiviteleri yaşlanmadan etkilenir, bu da ara metabolitlerin birikmesine ve enerji üretiminin verimsizleşmesine katkıda bulunur. Yapılan çeşitli proteomik analizler, özellikle yüksek enerji talebi olan kas, beyin ve kalp gibi yaşlı hayvan ve insan dokularında mitokondriyal protein içeriğinde önemli değişiklikler olduğunu kanıtlamıştır (Ingram ve Chakrabarti, 2016; Lu ve ark., 2022; Staunton ve ark., 2011). Mitokondri aktarımının OA üzerindeki olumlu etkileri farklı deneysel yaklaşımlarla bu tez çalışmasında gösterilmiştir. Ancak hangi mitokondrinin (iWJ-MKH ya da iKİ-MKH kaynaklı) OA tedavisinde daha etki olarak kullanılabileceği bu tez çalışması kapsamında cevap aranan önemli sorulardan biridir. Elde edilen deneysel bulgular, iWJ-MKH ve iKİ-MKH mitokondrisi uygulanan gruplar arasında mitokondriyal etkinlik açısından belirgin bir fark olmadığını göstermektedir. Bu durumun olası nedenleri arasında, MKH'ların güçlü antioksidan savunma sistemlerine sahip olmaları ve olgun somatik hücrelere kıyasla yaşlanma süreçlerini (mitokondriyal yaşlanma dahil) daha yavaş deneyimlemeleri sayılabilir. Mitokondrinin apoptoz, otofaji, hücre çoğalması ve diğer temel hücresel süreçlerdeki kritik rolü göz önüne alındığında, insan vücudundaki hastalıkların gelişiminde önemli bir faktör olduğu söylenebilir. Bu nedenle mitokondri, organizmaya özgü özelliklerini hedef alarak yeni terapötik stratejiler geliştirmek amacıyla daha derinlemesine incelenmelidir. Nitekim ROS, sirtuinler, mitokondriyal katlanmamış protein yanıtı ve mitokondriyal transfer gibi mekanizmalar, MKH yaşlanmasını hedef alan mitokondriyal yaşlanma karşıtı yaklaşımlar olarak literatürde vurgulanmaktadır (Branco ve ark., 2023). Bu bağlamda, nakil için gerekli yüksek kaliteli mitokondrilerin MKH'lardan elde edilmesi umut vadeden bir strateji olarak öne çıkmaktadır. Yakın zamanda yayınlanan ve yaşa bağlı makular dejenerasyonun tedavisine yönelik MKH transplantasyonunu konu alan çalışmada iki farklı MKH (insan endometriyum kaynaklı MKH (iE-MKH) ve iWJ-MKH) mitokondrileri retinal pigment epitel hücrelerine aktarılarak etkinlikleri karşılaştırılmıştır (Kılıç ve ark., 2025). Bu çalışmada hücre sağkalımı üzerinde her iki mitokondri grubunun etkili olduğu ancak iWJ-MKH mitokondrilerin hücre canlılığını daha iyi desteklediği bulunmuştur. İlginç olarak iE-MKH mitokondrilerin transplantasyonu sonrasında hücre fonksiyonlarını daha iyi desteklediği ve bu desteğinin arkasında yatan sebebin sahip olduğu yüksek anti-oksidan mekanizmasının olduğu gösterilmiştir. Doğası gereği endometriyum dokusu yüksek pro-oksidatif özellik sergilediğinden iE-MKH ve iWJ-MKH kaynaklı mitokondriler farklı özellikler taşıması beklenmektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan mt-iWJ-MKH ve iKİ-MKH'lerin mitokondrileri arasındaki farkın hücresel ROS seviyelerine

etkileri dışında belirleyici olmamaları hücrelerin kaynaklandığı dokuların pro-oksidatif koşullarının yüksek olmamasıyla ilişkilendirilebilir. Hücrelerin taşıdığı epigenetik faktörlerin nakil sonrasında tedavi etkinlikleri üzerinde belirleyici olmaları gibi mitokondrilerin kaynaklandığı hücrelerin de mitokondri tedavi etkinliği üzerinde etkilerinin olduğu bulunmuştur. Doğrudan epigenetik olmasa da oksidatif koşullar belirleyici olmaktadır. Ancak diğer faktörlerin de mitokondri tedavi etkinliği üzerinde etkili olmadıkları anlamına gelmemektedir.

5.1.Sınırlılıklar

Bu tez çalışması, kondrositlerin biyolojik özellikleri ve mitokondri transferi hakkında önemli bulgular sağlarken, bazı sınırlamalara sahiptir. Mitokondriyal transfer sırasında hücre içinde aktive olan sinyal yolları tam olarak aydınlatılmamıştır ve bu da mevcut anlayışta önemli bir boşluktur. Bu moleküler mekanizmaların kapsamlı bir şekilde anlaşılması, transferin hücresel etkilerinin aydınlatılması için zorunludur. Ancak, mevcut tez çalışmasında bu karmaşık sinyal yollarını kapsamlı bir şekilde araştırılamamıştır. Araştırma bulgularının klinik uygulamaya aktarılması hem hayvan modellerinin hem de mümkünse klinik ortamların kullanıldığı ek *in vivo* çalışmaların yürütülmesiyle geliştirilmelidir.

Çalışmanın diğer bir sınırlılığı ise makrofaj polarizasyonunu etkin bir şekilde kontrol edilememesidir. Özellikle M1 polarize makrofajın IL-1β etkisi altında in vitro ortamda M2 polarize makrofaja dönüşmesi kontrolü sağlanmasında zorluklar yaşanmıştır. Bu sebeple HG1 modeli beklendiği gibi çalışması kondisyonlanmış ortamın üzerinde tam kontrolün sağlanmasıyla ilişkilendirilebilir. Ancak HG2 modellinde makrofajlardaki plastisitenin kontrol edilememesi çalışmada elde edilen veriler açısından zorluk yaratmıştır. Benzer durumun in vivo çalışmada da gözlemlenmesi beklenmelidir.

Mitokondri nakli üzerinde yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bu açıdan nakil için kullanılan tampon çözeltiler ve sıvılar değişkenlik göstermektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan SHE tamponu literatürde en sık kullanıldığı gözlemlenen çözelti olduğu için tercih edilmiştir. Ancak mitokondri izolasyon, saklama ve transferi konuları ile ilgili olarak detaylı bir araştırma ya da geliştirilmiş bir ürün portföyünün bulunmaması elde edilen bulguların

niteliğini sınırlamaktadır. Bu konudaki araştırmaların ve ürünlerin çeşitlenmesiyle mitokondri transplantasyonunun çok daha iyi bir noktaya ilerleyebileceği düşünülmektedir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

iSS-MKH'lerin farklılaşmasıyla elde edilen kondrosit hücreleriyle birlikte U937 hücre hattının polarizasyonuyla elde edilen M1 makrofaj hücrelerini (HG2) ve bu M1 makrofajların kondisyonlanmış ortamlarını (HG1) ayrı ayrı ortak kültürde kullanılarak oluşturulan iki *farklı in vitro* osteoartrit modeli karşılaştırıldı. iWJ-MKH ve iKİ-MKH'lerinden izole edilen mitokondrilerin model hücrelerine transfer sonrasında farklı membran potansiyellerine sahip bu mitokondrilerin; kondrosit sağ kalımına, hücrelerin ROS seviyelerine etkilerinin ve HIF-1α ifadesinin kontrol gruplarıyla mitokondri transferi yapılan gruplar arasındaki değişimi incelendi.

Sonuç olarak, tez çalışmasından elde edilen veriler, *in vitro* OA modeli oluşturmada M1 polarize makrofaj kaynaklı kondisyonlanmış ortamla gerçekleştirilen osteoartritik kondrosit (HG1) hücre deneylerinden elde edilen verilerin insan OA patogenezini hastalık doğasını aktif M1 makrofaj ko-kültürü ile oluşturulan modele göre (HG2) daha iyi yansıttığını göstermektedir. Makrofaj ko-kültürüyle elde edilen deney gruplarındaki sonuçların aktif M1 makrofajın ortamdaki hasarı düzeltmek için M2 makrofaja polarize olabileceğini düşündürmektedir.

Her iki mitokondri kaynağının OA tedavisine yönelik kullanılabileceği yapılan çalışmalarla görülmüştür. Ancak nitelik olarak iWJ-MKH mitokondrilerinin yaşlılık belirtilerini dolayısıyla ROS üretimini iKİ-MKH mitokondrilerine göre daha az gerçekleştirdiğinden OA tedavisinde beklenen etkiyi gözlemlemek amacıyla iWJ-MKH kaynaklı mitokondrilerin kullanılması daha iyi bir seçenek olduğu belirlenmiştir. Ancak farklı hücre tiplerinin mitokondri izolasyonunda kullanılması ve mitokondri izolasyonu amacıyla farklı metotların geliştirilmesi sonucunda değişik sonuçların elde edilme olasılığı bulunmaktadır.

Gelecekteki araştırmalarda, hem hücre izolasyonu ve kültür protokollerinin iyileştirilmesi hem de omik analiz ve canlı hücre görüntüleme gibi ileri tekniklerle sinyal yolaklarının detaylandırılması önerilmektedir. Mitokondri transferinin umut verici *in vitro* sonuçları göz önüne alındığında, gelecekteki çalışmalar bu stratejiyi 3D kıkırdak

organoidleri veya biyomekanik stimülasyon içeren biyoreaktör sistemleri gibi fizyolojik olarak daha uygun modellerde uygulamaya odaklanabilir. Bu yaklaşımlar *in vivo* eklem mikro çevresini daha iyi yansıtabilir ve osteoartrit için mitokondriyal bazlı tedavilerin translasyonel potansiyelini artırabilir.

7.KAYNAKLAR

Abdulhadi, F. H. S. (2014). Differentiation of U-937 monocytes to macrophage-like cells polarized into M1 or M2 phenotypes according to their specific environment: A study of morphology, cell viability, and cd markers of an in vitro model of human macrophages.

Abramoff, B., & Caldera, F. E. (2020). Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Med Clin North Am, 104*(2), 293-311. doi:10.1016/j.mcna.2019.10.007

Aguilar Diaz De Leon, J., & Borges, C. R. (2020). Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *J Vis Exp*(159). doi:10.3791/61122

Akiyama, H. (2008). Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod Rheumatol, 18*(3), 213-219. doi:10.1007/s10165-008-0048-x

Altman, R., Alarcon, G., Appelrouth, D., Bloch, D., Borenstein, D., Brandt, K., . . . Feldman, D. (1991). The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 34*(5), 505-514.

Altuntas, C., Alper, M., Keles, Y., Sav, F. N., & Kockar, F. (2022). Hypoxic regulation of ADAMTS-2 and -3 (a disintegrin and matrix metalloproteinase with thrombospondin motifs 2 and 3) procollagen N proteinases by HIF-1alpha in endothelial cells. *Mol Cell Biochem*. doi:10.1007/s11010-022-04549-3

Altuntaş, C., Duruksu, G., Hunç, F., & Yazir, Y. (2025). Mitochondria transfer from mesenchymal stem cells into osteoarthritic chondrocytes ameliorate cellular functions and alleviate both inflammation and oxidative stress. *Tissue Cell, 96*, 102990. doi:10.1016/j.tice.2025.102990

Altuntaş, C., Duruksu, G., Hunç, F., & Yazır, Y. (2025). A novel isolation method for chondrocytes differentiated from synovial fluid-derived mesenchymal stem cell. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 27*(1), 397-410.

Alway, S. E., Paez, H. G., & Pitzer, C. R. (2023). The role of mitochondria in mediation of skeletal muscle repair. *Muscles, 2*(2), 119-163.

Angelova, P. R., & Abramov, A. Y. (2016). Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology. *Free radical biology and medicine, 100*, 81-85.

Bannuru, R. R., Osani, M. C., Vaysbrot, E. E., Arden, N. K., Bennell, K., Bierma-Zeinstra, S. M. A., . . . McAlindon, T. E. (2019). OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage, 27*(11), 1578-1589. doi:10.1016/j.joca.2019.06.011

Barreto, G., Senturk, B., Colombo, L., Bruck, O., Neidenbach, P., Salzmann, G., . . . Rottmar, M. (2020). Lumican is upregulated in osteoarthritis and contributes to TLR4-induced pro-inflammatory activation of cartilage degradation and macrophage polarization. *Osteoarthritis Cartilage, 28*(1), 92-101. doi:10.1016/j.joca.2019.10.011

Bashir, S., Sharma, Y., Elahi, A., & Khan, F. (2016). Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. *Inflammation research, 65*, 1-11.

Belgiovine, C., D'Incalci, M., Allavena, P., & Frapolli, R. (2016). Tumor-associated macrophages and anti-tumor therapies: complex links. *Cell Mol Life Sci, 73*(13), 2411-2424. doi:10.1007/s00018-016-2166-5

Bender, E., & Kadenbach, B. (2000). The allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase activity is reversibly switched on by cAMP-dependent phosphorylation. *FEBS letters, 466*(1), 130-134.

Berenbaum, F. (2013). Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and cartilage, 21*(1), 16-21.

Biehl, J. K., & Russell, B. (2009). Introduction to stem cell therapy. *The Journal of cardiovascular nursing, 24*(2), 98.

Blanco, F. J., & Rego-Perez, I. (2018). Mitochondria and mitophagy: biosensors for cartilage degradation and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage, 26*(8), 989-991. doi:10.1016/j.joca.2018.05.018

Blasioli, D. J., & Kaplan, D. L. (2014). The roles of catabolic factors in the development of osteoarthritis. *Tissue Eng Part B Rev, 20*(4), 355-363. doi:10.1089/ten.TEB.2013.0377

Blom, A. B., van Lent, P. L., Holthuysen, A. E., van der Kraan, P. M., Roth, J., van Rooijen, N., & van den Berg, W. B. (2004). Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage, 12*(8), 627-635. doi:10.1016/j.joca.2004.03.003

Blom, A. B., van Lent, P. L., Libregts, S., Holthuysen, A. E., van der Kraan, P. M., van Rooijen, N., & van den Berg, W. B. (2007). Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis Rheum, 56*(1), 147-157. doi:10.1002/art.22337

Bondeson, J., Wainwright, S. D., Lauder, S., Amos, N., & Hughes, C. E. (2006). The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther, 8*(6), R187. doi:10.1186/ar2099

Bonora, M., Ito, K., Morganti, C., Pinton, P., & Ito, K. (2018). Membrane-potential compensation reveals mitochondrial volume expansion during HSC commitment. *Exp Hematol, 68*, 30-37 e31. doi:10.1016/j.exphem.2018.10.012

Boonrungsiman, S., Gentleman, E., Carzaniga, R., Evans, N. D., McComb, D. W., Porter, A. E., & Stevens, M. M. (2012). The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 109*(35), 14170-14175.

Branco, A., Moniz, I., & Ramalho-Santos, J. (2023). Mitochondria as biological targets for stem cell and organismal senescence. *European Journal of Cell Biology, 102*(2), 151289.

Caron, J. P., Fernandes, J. C., Martel-Pelletier, J., Tardif, G., Mineau, F., Geng, C., & Pelletier, J. P. (1996). Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum, 39*(9), 1535-1544. doi:10.1002/art.1780390914

Caron, M. M., Emans, P. J., Coolsen, M. M., Voss, L., Surtel, D. A., Cremers, A., . . . Welting, T. J. (2012). Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis Cartilage, 20*(10), 1170-1178. doi:10.1016/j.joca.2012.06.016

Castro, C. M., Corciulo, C., Solesio, M. E., Liang, F., Pavlov, E. V., & Cronstein, B. N. (2020). Adenosine A2A receptor (A2AR) stimulation enhances mitochondrial metabolism and mitigates reactive oxygen species-mediated mitochondrial injury. *FASEB J, 34*(4), 5027-5045. doi:10.1096/fj.201902459R

Cheleschi, S., Cantarini, L., Pascarelli, N. A., Collodel, G., Lucherini, O. M., Galeazzi, M., & Fioravanti, A. (2015). Possible chondroprotective effect of canakinumab: an in vitro study on human osteoarthritic chondrocytes. *Cytokine, 71*(2), 165-172.

Chen, B. Y., Pathak, J. L., Lin, H. Y., Guo, W. Q., Chen, W. J., Luo, G., . . . Liu, C. (2024). Inflammation Triggers Chondrocyte Ferroptosis in TMJOA via HIF-1alpha/TFRC. *J Dent Res, 103*(7), 712-722. doi:10.1177/00220345241242389

Chen, W., Sun, Y., Gu, X., Hao, Y., Liu, X., Lin, J., . . . Chen, S. (2019). Conditioned medium of mesenchymal stem cells delays osteoarthritis progression in a rat model by protecting subchondral bone, maintaining matrix homeostasis, and enhancing autophagy. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 13*(9), 1618-1628.

Chen, Y., Jiang, W., Yong, H., He, M., Yang, Y., Deng, Z., & Li, Y. (2020). Macrophages in osteoarthritis: pathophysiology and therapeutics. *Am J Transl Res, 12*(1), 261-268. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32051751

Chiang, S. K., Chen, S. E., & Chang, L. C. (2021). The Role of HO-1 and Its Crosstalk with Oxidative Stress in Cancer Cell Survival. *Cells, 10*(9). doi:10.3390/cells10092401

Chopra, N., Dutt Arya, B., Jain, N., Yadav, P., Wajid, S., Singh, S. P., & Choudhury, S. (2019). Biophysical Characterization and Drug Delivery Potential of Exosomes from Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells. *ACS Omega, 4*(8), 13143-13152. doi:10.1021/acsomega.9b01180

Ciesla, J., & Tomsia, M. (2021). Cadaveric Stem Cells: Their Research Potential and Limitations. *Front Genet, 12*, 798161. doi:10.3389/fgene.2021.798161

Cisternas, M. G., Murphy, L., Sacks, J. J., Solomon, D. H., Pasta, D. J., & Helmick, C. G. (2016). Alternative Methods for Defining Osteoarthritis and the Impact on Estimating Prevalence in a US Population-Based Survey. *Arthritis Care Res (Hoboken), 68*(5), 574-580. doi:10.1002/acr.22721

Cope, P. J., Ourradi, K., Li, Y., & Sharif, M. (2019). Models of osteoarthritis: the good, the bad and the promising. *Osteoarthritis Cartilage, 27*(2), 230-239. doi:10.1016/j.joca.2018.09.016

Culemann, S., Gruneboom, A., Nicolas-Avila, J. A., Weidner, D., Lammle, K. F., Rothe, T., . . . Kronke, G. (2019). Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint. *Nature, 572*(7771), 670-675. doi:10.1038/s41586-019-1471-1

Czabotar, P. E., & Garcia-Saez, A. J. (2023). Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol, 24*(10), 732-748. doi:10.1038/s41580-023-00629-4

Daghestani, H. N., Pieper, C. F., & Kraus, V. B. (2015). Soluble macrophage biomarkers indicate inflammatory phenotypes in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol, 67*(4), 956-965. doi:10.1002/art.39006

de Sousa, E. B., Casado, P. L., Moura Neto, V., Duarte, M. E., & Aguiar, D. P. (2014). Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem Cell Res Ther, 5*(5), 112. doi:10.1186/scrt501

de Windt, T. S., Vonk, L. A., Slaper-Cortenbach, I. C., van den Broek, M. P., Nizak, R., van Rijen, M. H., . . . Saris, D. B. (2017). Allogeneic mesenchymal stem cells stimulate cartilage

regeneration and are safe for single-stage cartilage repair in humans upon mixture with recycled autologous chondrons. *Stem cells, 35*(1), 256-264.

Desando, G., Cavallo, C., Sartoni, F., Martini, L., Parrilli, A., Veronesi, F., . . . Grigolo, B. (2013). Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis research & therapy, 15*(1), 1-16.

Deshmukh, V., O'Green, A. L., Bossard, C., Seo, T., Lamangan, L., Ibanez, M., . . . Yazici, Y. (2019). Modulation of the Wnt pathway through inhibition of CLK2 and DYRK1A by lorecivivint as a novel, potentially disease-modifying approach for knee osteoarthritis treatment. *Osteoarthritis Cartilage, 27*(9), 1347-1360. doi:10.1016/j.joca.2019.05.006

Diekman, B. O., & Guilak, F. (2013). Stem cell-based therapies for osteoarthritis: challenges and opportunities. *Curr Opin Rheumatol, 25*(1), 119-126. doi:10.1097/BOR.0b013e32835aa28d

Disha, B., Mathew, R. P., Dalal, A. B., Mahato, A. K., Satyamoorthy, K., Singh, K. K., . . . Govindaraj, P. (2024). Mitochondria in biology and medicine - 2023. *Mitochondrion, 76*, 101853. doi:10.1016/j.mito.2024.101853

Drevet, S., Gavazzi, G., Grange, L., Dupuy, C., & Lardy, B. (2018). Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis. *Exp Gerontol, 111*, 107-117. doi:10.1016/j.exger.2018.07.007

Dupont, G., Yilmaz, E., Loukas, M., Macchi, V., De Caro, R., & Tubbs, R. S. (2019). Human embryonic stem cells: Distinct molecular personalities and applications in regenerative medicine. *Clin Anat, 32*(3), 354-360. doi:10.1002/ca.23318

Duruksu, G., & Aciksari, A. (2018). Guiding the Differentiation Direction of Pancreatic Islet-Derived Stem Cells by Glycated Collagen. *Stem Cells Int, 2018*, 6143081. doi:10.1155/2018/6143081

Emami, A., Namdari, H., Parvizpour, F., & Arabpour, Z. (2023). Challenges in osteoarthritis treatment. *Tissue Cell, 80*, 101992. doi:10.1016/j.tice.2022.101992

Fahy, N., de Vries-van Melle, M. L., Lehmann, J., Wei, W., Grotenhuis, N., Farrell, E., . . . van Osch, G. J. (2014). Human osteoarthritic synovium impacts chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells via macrophage polarisation state. *Osteoarthritis Cartilage, 22*(8), 1167-1175. doi:10.1016/j.joca.2014.05.021

Fan, Z., Söder, S., Oehler, S., Fundel, K., & Aigner, T. (2007). Activation of interleukin-1 signaling cascades in normal and osteoarthritic articular cartilage. *The American journal of pathology, 171*(3), 938-946.

Farkhad, N. K., Mahmoudi, A., & Mahdipour, E. (2021). How similar are human mesenchymal stem cells derived from different origins? A review of comparative studies. *Current stem cell research & therapy, 16*(8), 980-993.

Fukui, N., Purple, C. R., & Sandell, L. J. (2001). Cell biology of osteoarthritis: the chondrocyte's response to injury. *Curr Rheumatol Rep, 3*(6), 496-505. doi:10.1007/s11926-001-0064-8

Gao, J., Zhang, G., Xu, K., Ma, D., Ren, L., Fan, J., . . . Zhang, L. (2020). Bone marrow mesenchymal stem cells improve bone erosion in collagen-induced arthritis by inhibiting osteoclasia-related factors and differentiating into chondrocytes. *Stem Cell Research & Therapy, 11*(1), 1-14.

Gao, S.-J., Li, D.-Y., Liu, D.-Q., Sun, J., Zhang, L.-Q., Wu, J.-Y., . . . Mei, W. (2022). Dimethyl fumarate attenuates pain behaviors in osteoarthritis rats via induction of Nrf2-mediated mitochondrial biogenesis. *Molecular Pain, 18*, 17448069221124920.

Gao, W. X., Sun, Y. Q., Shi, J., Li, C. L., Fang, S. B., Wang, D., . . . Fu, Q. L. (2017). Effects of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells on differentiation, maturation, and function of dendritic cells. *Stem Cell Res Ther, 8*(1), 48. doi:10.1186/s13287-017-0499-0

Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., & Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology, 21*(4), 204-224.

Girao, A. F., Semitela, A., Ramalho, G., Completo, A., & Marques, P. A. (2018). Mimicking nature: fabrication of 3D anisotropic electrospun polycaprolactone scaffolds for cartilage tissue engineering applications. *Composites Part B: Engineering, 154*, 99-107.

Glancy, B., Willis, W. T., Chess, D. J., & Balaban, R. S. (2013). Effect of calcium on the oxidative phosphorylation cascade in skeletal muscle mitochondria. *Biochemistry, 52*(16), 2793-2809.

Glasson, S. S., Askew, R., Sheppard, B., Carito, B., Blanchet, T., Ma, H. L., . . . Morris, E. A. (2005). Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature, 434*(7033), 644-648. doi:10.1038/nature03369

Grandi, F. C., Baskar, R., Smeriglio, P., Murkherjee, S., Indelli, P. F., Amanatullah, D. F., . . . Bhutani, N. (2020). Single-cell mass cytometry reveals cross-talk between inflammation-dampening and inflammation-amplifying cells in osteoarthritic cartilage. *Sci Adv, 6*(11), eaay5352. doi:10.1126/sciadv.aay5352

Hafer, K., Iwamoto, K. S., & Schiestl, R. H. (2008). Refinement of the dichlorofluorescein assay for flow cytometric measurement of reactive oxygen species in irradiated and bystander cell populations. *Radiat Res, 169*(4), 460-468. doi:10.1667/RR1212.1

Han, Y., Li, X., Zhang, Y., Han, Y., Chang, F., & Ding, J. (2019). Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells, 8*(8). doi:10.3390/cells8080886

Han, Y., Ren, J., Bai, Y., Pei, X., & Han, Y. (2019). Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R. *The international journal of biochemistry & cell biology, 109*, 59-68.

Hassan, G., Bahjat, M., Kasem, I., Soukkarieh, C., & Aljamali, M. (2018). Platelet lysate induces chondrogenic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Cell Mol Biol Lett, 23*, 11. doi:10.1186/s11658-018-0080-6

Hawker, G., Stewart, L., French, M., Cibere, J., Jordan, J., March, L., . . . Gooberman-Hill, R. (2008). Understanding the pain experience in hip and knee osteoarthritis–an OARSI/OMERACT initiative. *Osteoarthritis and cartilage, 16*(4), 415-422.

Hawker, G. A. (2019). Osteoarthritis is a serious disease. *Clin Exp Rheumatol, 37*(Suppl 120), 3-6.

He, Q., Yang, J., Pan, Z., Zhang, G., Chen, B., Li, S., . . . Wang, H. (2023). Biochanin A protects against iron overload associated knee osteoarthritis via regulating iron levels and NRF2/System xc-/GPX4 axis. *Biomed Pharmacother, 157*, 113915. doi:10.1016/j.biopha.2022.113915

He, Y., Wu, Z., Xu, L., Xu, K., Chen, Z., Ran, J., & Wu, L. (2020). The role of SIRT3-mediated mitochondrial homeostasis in osteoarthritis. *Cell Mol Life Sci, 77*(19), 3729-3743. doi:10.1007/s00018-020-03497-9

Hernández-Bule, M., Trillo, M. A., Martínez-García, M., Abilahoud, C., & Úbeda, A. (2017). Chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells by radiofrequency electric stimulation. *J Stem Cell Res Ther, 7*(407), 2.

Hoff, P., Buttgereit, F., Burmester, G. R., Jakstadt, M., Gaber, T., Andreas, K., . . . Rohner, E. (2013). Osteoarthritis synovial fluid activates pro-inflammatory cytokines in primary human chondrocytes. *Int Orthop, 37*(1), 145-151. doi:10.1007/s00264-012-1724-1

Houard, X., Goldring, M. B., & Berenbaum, F. (2013). Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep, 15*(11), 375. doi:10.1007/s11926-013-0375-6

Hsu, Y. C., Wu, Y. T., Yu, T. H., & Wei, Y. H. (2016). Mitochondria in mesenchymal stem cell biology and cell therapy: From cellular differentiation to mitochondrial transfer. *Semin Cell Dev Biol, 52*, 119-131. doi:10.1016/j.semcdb.2016.02.011

Hu, S., Zhang, C., Ni, L., Huang, C., Chen, D., Shi, K., . . . Xiao, J. (2020). Stabilization of HIF-1alpha alleviates osteoarthritis via enhancing mitophagy. *Cell Death Dis, 11*(6), 481. doi:10.1038/s41419-020-2680-0

Ingram, T., & Chakrabarti, L. (2016). Proteomic profiling of mitochondria: what does it tell us about the ageing brain? *Aging (Albany NY), 8*(12), 3161.

Jang, J., Kang, K. W., Kim, Y. W., Jeong, S., Park, J., Park, J., . . . Ko, J. H. (2024). Cardioprotection via mitochondrial transplantation supports fatty acid metabolism in ischemia-reperfusion injured rat heart. *Korean J Physiol Pharmacol, 28*(3), 209-217. doi:10.4196/kjpp.2024.28.3.209

Jang, S., Lee, K., & Ju, J. H. (2021). Recent Updates of Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment on Osteoarthritis of the Knee. *Int J Mol Sci, 22*(5). doi:10.3390/ijms22052619

Jiang, T., Zhang, J., Zhao, S., Zhang, M., Wei, Y., Liu, X., . . . Zhang, G. (2025). MCT4: a key player influencing gastric cancer metastasis and participating in the regulation of the metastatic immune microenvironment. *J Transl Med, 23*(1), 276. doi:10.1186/s12967-025-06279-8

Johnson, C. I., Argyle, D. J., & Clements, D. N. (2016). In vitro models for the study of osteoarthritis. *Vet J, 209*, 40-49. doi:10.1016/j.tvjl.2015.07.011

Kadomoto, S., Izumi, K., & Mizokami, A. (2021). Macrophage Polarity and Disease Control. *Int J Mol Sci, 23*(1). doi:10.3390/ijms23010144

Kaise, T., & Kageyama, R. (2024). Transcriptional control of neural stem cell activity. *Biochem Soc Trans, 52*(2), 617-626. doi:10.1042/BST20230439

Kalra, K., & Tomar, P. C. (2014). Stem cell: basics, classification and applications. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics, 2*(7), 919-930.

Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J. P., & Fahmi, H. (2011). Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol, 7*(1), 33-42. doi:10.1038/nrrheum.2010.196

Karaoz, E., Aksoy, A., Ayhan, S., Sariboyaci, A. E., Kaymaz, F., & Kasap, M. (2009). Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol, 132*(5), 533-546. doi:10.1007/s00418-009-0629-6

Karaoz, E., Dogan, B. N., Aksoy, A., Gacar, G., Akyuz, S., Ayhan, S., . . . Sariboyaci, A. E. (2010). Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol, 133*(1), 95-112. doi:10.1007/s00418-009-0646-5

Kavanagh, K., Sherrill, C., Ruggiero, A., Block, M., Vemuri, R., Davis, M., & Olivier, A. (2021). Biomarkers of senescence in non-human primate adipose depots relate to aging. *Geroscience, 43*, 343-352.

Kilic, K. C., Yazir, Y., Ozturk, A., Halbutogullari, Z. S., Mert, S., Gacar, G., & Duruksu, G. (2023). Investigation of impacts of decellularized heart extracellular matrix and VEGF on cardiomyogenic differentiation of mesenchymal stem cell through Notch/Hedgehog signaling pathways. *Tissue Cell, 84*, 102195. doi:10.1016/j.tice.2023.102195

Kılıç, K. C., Duruksu, G., Öztürk, A., Rençber, S. F., Kılıç, B., & Yazır, Y. (2025). Therapeutic potential of adult stem cells-derived mitochondria transfer combined with curcumin administration into ARPE-19 cells in age-related macular degeneration model. *Tissue and Cell, 93*, 102687.

Kim, H. A., Lee, Y. J., Seong, S. C., Choe, K. W., & Song, Y. W. (2000). Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. *J Rheumatol, 27*(2), 455-462. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10685814

Kim, M. J., Hwang, J. W., Yun, C. K., Lee, Y., & Choi, Y. S. (2018). Delivery of exogenous mitochondria via centrifugation enhances cellular metabolic function. *Sci Rep, 8*(1), 3330. doi:10.1038/s41598-018-21539-y

Kleele, T., Rey, T., Winter, J., Zaganelli, S., Mahecic, D., Perreten Lambert, H., . . . Pedrazzini, T. (2021). Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis. *Nature, 593*(7859), 435-439.

Ko, J. Y., Lee, J., Lee, J., Ryu, Y. H., & Im, G. I. (2019). SOX-6, 9-Transfected Adipose Stem Cells to Treat Surgically-Induced Osteoarthritis in Goats. *Tissue Eng Part A, 25*(13-14), 990-1000. doi:10.1089/ten.TEA.2018.0189

Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration, 85*(1), 3-10. doi:10.1159/000345615

Korpershoek, J. V., Rikkers, M., & Vonk, L. A. (2023). Isolation of Chondrons from Hyaline Cartilage. *Methods Mol Biol, 2598*, 21-27. doi:10.1007/978-1-0716-2839-3_3

Kraus, V. B., McDaniel, G., Huebner, J. L., Stabler, T. V., Pieper, C. F., Shipes, S. W., . . . Mitchell, P. (2016). Direct in vivo evidence of activated macrophages in human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage, 24*(9), 1613-1621. doi:10.1016/j.joca.2016.04.010

Krauss, S. (2001). Mitochondria: Structure and role in respiration. *Encyclopedia of life sciences*, 1-6.

Kuno, S., Srinoun, K., & Penglong, T. (2020). The effects of Phorbol 12-myristate 13-acetate concentration on the expression of miR-155 and miR-125b and their macrophage function-related genes in the U937 cell line. *J Toxicol Sci, 45*(12), 751-761. doi:10.2131/jts.45.751

Lane, R. S., Fu, Y., Matsuzaki, S., Kinter, M., Humphries, K. M., & Griffin, T. M. (2015). Mitochondrial respiration and redox coupling in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther, 17*(1), 54. doi:10.1186/s13075-015-0566-9

Lefebvre, V., & Smits, P. (2005). Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today, 75*(3), 200-212. doi:10.1002/bdrc.20048

Lehninger, A. L. (1977). Mitochondria and biological mineralization processes: an exploration. *Horizons in Biochemistry and Biophysics, 4*, 1-30.

Li, C., Xu, M. M., Wang, K., Adler, A. J., Vella, A. T., & Zhou, B. (2018). Macrophage polarization and meta-inflammation. *Transl Res, 191*, 29-44. doi:10.1016/j.trsl.2017.10.004

Li, F., Chen, J., Gong, M., Bi, Y., Hu, C., Zhang, Y., & Li, M. (2020). Isolation and Characterization of Human Synovial Fluid-Derived Mesenchymal Stromal Cells from Popliteal Cyst. *Stem Cells Int, 2020*, 7416493. doi:10.1155/2020/7416493

Li, J., Fan, C., Lv, Z., Sun, Z., Han, J., Wang, M., . . . Shi, D. (2023). Microtubule stabilization targeting regenerative chondrocyte cluster for cartilage regeneration. *Theranostics, 13*(10), 3480-3496. doi:10.7150/thno.85077

Li, X., Zhang, Y., Yeung, S. C., Liang, Y., Liang, X., Ding, Y., . . . Lian, Q. (2014). Mitochondrial transfer of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells to

airway epithelial cells attenuates cigarette smoke-induced damage. *Am J Respir Cell Mol Biol, 51*(3), 455-465. doi:10.1165/rcmb.2013-0529OC

Limagne, E., Lancon, A., Delmas, D., Cherkaoui-Malki, M., & Latruffe, N. (2016). Resveratrol Interferes with IL1-beta-Induced Pro-Inflammatory Paracrine Interaction between Primary Chondrocytes and Macrophages. *Nutrients, 8*(5). doi:10.3390/nu8050280

Lindenmair, A., Nurnberger, S., Stadler, G., Meinl, A., Hackl, C., Eibl, J., . . . Wolbank, S. (2014). Intact human amniotic membrane differentiated towards the chondrogenic lineage. *Cell Tissue Bank, 15*(2), 213-225. doi:10.1007/s10561-014-9454-9

Little, C. B., Barai, A., Burkhardt, D., Smith, S. M., Fosang, A. J., Werb, Z., . . . Thompson, E. W. (2009). Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum, 60*(12), 3723-3733. doi:10.1002/art.25002

Liu, B., Zhang, M., Zhao, J., Zheng, M., & Yang, H. (2018). Imbalance of M1/M2 macrophages is linked to severity level of knee osteoarthritis. *Experimental and therapeutic medicine, 16*(6), 5009-5014.

Liu, H., Li, Z., Cao, Y., Cui, Y., Yang, X., Meng, Z., & Wang, R. (2019). Effect of chondrocyte mitochondrial dysfunction on cartilage degeneration: A possible pathway for osteoarthritis pathology at the subcellular level. *Molecular medicine reports, 20*(4), 3308-3316.

Liu, J., Gao, J., Liang, Z., Gao, C., Niu, Q., Wu, F., & Zhang, L. (2022). Mesenchymal stem cells and their microenvironment. *Stem Cell Research & Therapy, 13*(1), 429.

Liu, M., Zeng, X., Ma, C., Yi, H., Ali, Z., Mou, X., . . . He, N. (2017). Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone research, 5*(1), 1-20.

Long, F. (2019). Less Is More: Ditching Mitochondria Saves Hypoxic Cartilage. *Dev Cell, 49*(5), 656-658. doi:10.1016/j.devcel.2019.05.030

Lopez-Armada, M. J., Carames, B., Lires-Dean, M., Cillero-Pastor, B., Ruiz-Romero, C., Galdo, F., & Blanco, F. J. (2006). Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-

1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage, 14*(7), 660-669. doi:10.1016/j.joca.2006.01.005

Lu, J., Peng, Y., Zou, J., Wang, J., Lu, S., Fu, T., . . . Zhang, J. (2021). Hypoxia inducible factor-1α is a regulator of autophagy in osteoarthritic chondrocytes. *Cartilage, 13*(2_suppl), 1030S-1040S.

Lu, X., Gong, Y., Hu, W., Mao, Y., Wang, T., Sun, Z., . . . Lai, D. (2022). Ultrastructural and proteomic profiling of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes reveal aging signatures in striated muscle. *Cell Death & Disease, 13*(4), 296.

Luo, P., Yuan, Q., Wan, X., Yang, M., & Xu, P. (2023). Effects of Immune Cells and Cytokines on Different Cells in OA. *J Inflamm Res, 16*, 2329-2343. doi:10.2147/JIR.S413578

Lv, S., He, E., Luo, J., Liu, Y., Liang, W., Xu, S., . . . Cai, X. (2023). Using Human-Induced Pluripotent Stem Cell Derived Neurons on Microelectrode Arrays to Model Neurological Disease: A Review. *Adv Sci (Weinh), 10*(33), e2301828. doi:10.1002/advs.202301828

Mahon, O. R., Kelly, D. J., McCarthy, G. M., & Dunne, A. (2020). Osteoarthritis-associated basic calcium phosphate crystals alter immune cell metabolism and promote M1 macrophage polarization. *Osteoarthritis Cartilage, 28*(5), 603-612. doi:10.1016/j.joca.2019.10.010

Manautou, J., Campion, S., & Aleksunes, L. (2010). Comprehensive Toxicology.

Manferdini, C., Maumus, M., Gabusi, E., Piacentini, A., Filardo, G., Peyrafitte, J. A., . . . Facchini, A. (2013). Adipose-derived mesenchymal stem cells exert antiinflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from osteoarthritis patients through prostaglandin E2. *Arthritis & Rheumatism, 65*(5), 1271-1281.

Manferdini, C., Paolella, F., Gabusi, E., Silvestri, Y., Gambari, L., Cattini, L., . . . Lisignoli, G. (2016). From osteoarthritic synovium to synovial-derived cells characterization: synovial macrophages are key effector cells. *Arthritis research & therapy, 18*(1), 1-13.

Manning, K., Rachakonda, P. S., Rai, M. F., & Schmidt, M. F. (2010). Co-expression of insulin-like growth factor-1 and interleukin-4 in an in vitro inflammatory model. *Cytokine, 50*(3), 297-305.

Mao, X., Fu, P., Wang, L., & Xiang, C. (2020). Mitochondria: Potential Targets for Osteoarthritis. *Front Med (Lausanne), 7*, 581402. doi:10.3389/fmed.2020.581402

Mao, X., Fu, P., Wang, L., & Xiang, C. (2020). Mitochondria: potential targets for osteoarthritis. *Frontiers in medicine, 7*, 581402.

Marone, M., De Ritis, D., Bonanno, G., Mozzetti, S., Rutella, S., Scambia, G., & Pierelli, L. (2002). Cell cycle regulation in human hematopoietic stem cells: from isolation to activation. *Leuk Lymphoma, 43*(3), 493-501. doi:10.1080/10428190290011967

Martins, A. A., Paiva, A., Morgado, J. M., Gomes, A., & Pais, M. L. (2009). Quantification and immunophenotypic characterization of bone marrow and umbilical cord blood mesenchymal stem cells by multicolor flow cytometry. *Transplant Proc, 41*(3), 943-946. doi:10.1016/j.transproceed.2009.01.059

McGrory, B., Weber, K., Lynott, J. A., Richmond, J. C., Davis, C. M., 3rd, Yates, A., Jr., . . . American Academy of Orthopaedic, S. (2016). The American Academy of Orthopaedic Surgeons Evidence-Based Clinical Practice Guideline on Surgical Management of Osteoarthritis of the Knee. *J Bone Joint Surg Am, 98*(8), 688-692. doi:10.2106/JBJS.15.01311

Miyaki, S., Nakasa, T., Otsuki, S., Grogan, S. P., Higashiyama, R., Inoue, A., . . . Asahara, H. (2009). MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. *Arthritis Rheum, 60*(9), 2723-2730. doi:10.1002/art.24745

Mobasheri, A., & Batt, M. (2016). An update on the pathophysiology of osteoarthritis. *Annals of physical and rehabilitation medicine, 59*(5-6), 333-339.

Mohd Noor, N. A., Abdullah Nurul, A., Ahmad Mohd Zain, M. R., Wan Nor Aduni, W. K., & Azlan, M. (2021). Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells as potential treatments for osteoarthritis. *Cells, 10*(6), 1287.

Murphy, A. N., Kelleher, J., & Fiskum, G. (1990). Submicromolar Ca2+ regulates phosphorylating respiration by normal rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria by different mechanisms. *Journal of Biological Chemistry, 265*(18), 10527-10534.

Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical journal, 417*(1), 1-13.

Musumeci, G., Aiello, F. C., Szychlinska, M. A., Di Rosa, M., Castrogiovanni, P., & Mobasheri, A. (2015). Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *International journal of molecular sciences, 16*(3), 6093-6112.

Nam, Y., Rim, Y. A., Lee, J., & Ju, J. H. (2018). Current Therapeutic Strategies for Stem Cell-Based Cartilage Regeneration. *Stem Cells Int, 2018*, 8490489. doi:10.1155/2018/8490489

Nascimento, C. R., Rodrigues Fernandes, N. A., Gonzalez Maldonado, L. A., & Rossa Junior, C. (2022). Comparison of monocytic cell lines U937 and THP-1 as macrophage models for in vitro studies. *Biochem Biophys Rep, 32*, 101383. doi:10.1016/j.bbrep.2022.101383

Niada, S., Giannasi, C., Gomarasca, M., Stanco, D., Casati, S., & Brini, A. T. (2019). Adipose-derived stromal cell secretome reduces TNFα-induced hypertrophy and catabolic markers in primary human articular chondrocytes. *Stem cell research, 38*, 101463.

Nicholson, I. P., Gault, E. A., Foote, C. G., Nasir, L., & Bennett, D. (2007). Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) extends the lifespan of canine chondrocytes in vitro without inducing neoplastic transformation. *Vet J, 174*(3), 570-576. doi:10.1016/j.tvjl.2007.07.009

Novakofski, K. D., Torre, C. J., & Fortier, L. A. (2012). Interleukin-1alpha, -6, and -8 decrease Cdc42 activity resulting in loss of articular chondrocyte phenotype. *J Orthop Res, 30*(2), 246-251. doi:10.1002/jor.21515

Orozco, L., Munar, A., Soler, R., Alberca, M., Soler, F., Huguet, M., . . . García-Sancho, J. (2013). Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation, 95*(12), 1535-1541.

Pers, Y. M., Rackwitz, L., Ferreira, R., Pullig, O., Delfour, C., Barry, F., . . . Consortium, A. (2016). Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Transl Med, 5*(7), 847-856. doi:10.5966/sctm.2015-0245

Pessler, F., Ogdie, A., Diaz-Torne, C., Dai, L., Yu, X., Einhorn, E., . . . Schumacher, H. R. (2008). Subintimal Ki-67 as a synovial tissue biomarker for inflammatory arthropathies. *Ann Rheum Dis, 67*(2), 162-167. doi:10.1136/ard.2007.071670

Picard, M. (2015). Mitochondrial synapses: intracellular communication and signal integration. *Trends in neurosciences, 38*(8), 468-474.

Piscaer, T. M., Muller, C., Mindt, T. L., Lubberts, E., Verhaar, J. A., Krenning, E. P., . . . Weinans, H. (2011). Imaging of activated macrophages in experimental osteoarthritis using folate-targeted animal single-photon-emission computed tomography/computed tomography. *Arthritis Rheum, 63*(7), 1898-1907. doi:10.1002/art.30363

Presley, A. D., Fuller, K. M., & Arriaga, E. A. (2003). MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 793*(1), 141-150. doi:10.1016/s1570-0232(03)00371-4

Prosser, A., Scotchford, C., Roberts, G., Grant, D., & Sottile, V. (2019). Integrated multi-assay culture model for stem cell chondrogenic differentiation. *International Journal of Molecular Sciences, 20*(4), 951.

Qi, Z., Zhu, J., Cai, W., Lou, C., & Li, Z. (2023). The role and intervention of mitochondrial metabolism in osteoarthritis. *Mol Cell Biochem*. doi:10.1007/s11010-023-04818-9

Qi, Z., Zhu, J., Cai, W., Lou, C., & Li, Z. (2024). The role and intervention of mitochondrial metabolism in osteoarthritis. *Mol Cell Biochem, 479*(6), 1513-1524. doi:10.1007/s11010-023-04818-9

Qiu, P., Liu, Y., & Zhang, J. (2019). Review: the Role and Mechanisms of Macrophage Autophagy in Sepsis. *Inflammation, 42*(1), 6-19. doi:10.1007/s10753-018-0890-8

Radecki, D. Z., & Samanta, J. (2022). Endogenous Neural Stem Cell Mediated Oligodendrogenesis in the Adult Mammalian Brain. *Cells, 11*(13). doi:10.3390/cells11132101

Ragni, E., Perucca Orfei, C., De Luca, P., Colombini, A., Vigano, M., & de Girolamo, L. (2020). Secreted Factors and EV-miRNAs Orchestrate the Healing Capacity of Adipose Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis. *Int J Mol Sci, 21*(5). doi:10.3390/ijms21051582

Ramalho-Santos, M., & Willenbring, H. (2007). On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell, 1*(1), 35-38. doi:10.1016/j.stem.2007.05.013

Ray, R. L., Ehrlich, M. G., & Mankin, H. J. (1982). Isolation of proliferating chondrocytes from bovine growth-plate cartilage by rate-zonal centrifugation in a Ficoll density gradient. *J Bone Joint Surg Am, 64*(8), 1221-1224. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7130233

Rosner, M., Horer, S., Feichtinger, M., & Hengstschlager, M. (2023). Multipotent fetal stem cells in reproductive biology research. *Stem Cell Res Ther, 14*(1), 157. doi:10.1186/s13287-023-03379-4

Sack, U., Kuhn, H., Ermann, J., Kinne, R. W., Vogt, S., Jungmichel, D., & Emmrich, F. (1994). Synovial tissue implants from patients with rheumatoid arthritis cause cartilage destruction in knee joints of SCID. bg mice. *J Rheumatol, 21*(1), 10-16.

Saglam, O., Unal, Z. S., Subasi, C., Ulukaya, E., & Karaoz, E. (2015). IL-6 originated from breast cancer tissue-derived mesenchymal stromal cells may contribute to carcinogenesis. *Tumour Biol, 36*(7), 5667-5677. doi:10.1007/s13277-015-3241-5

Samavedi, S., Diaz-Rodriguez, P., Erndt-Marino, J. D., & Hahn, M. S. (2017). A Three-Dimensional Chondrocyte-Macrophage Coculture System to Probe Inflammation in Experimental Osteoarthritis. *Tissue Eng Part A, 23*(3-4), 101-114. doi:10.1089/ten.TEA.2016.0007

Schelbergen, R., Van Dalen, S., Ter Huurne, M., Roth, J., Vogl, T., Noel, D., . . . Blom, A. (2014). Treatment efficacy of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis is driven by high synovial activation and reflected by S100A8/A9 serum levels. *Osteoarthritis and cartilage, 22*(8), 1158-1166.

Schieker, M., Conaghan, P. G., Mindeholm, L., Praestgaard, J., Solomon, D. H., Scotti, C., . . . Ridker, P. M. (2020). Effects of interleukin-1β inhibition on incident hip and knee replacement: exploratory analyses from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals of internal medicine, 173*(7), 509-515.

Sebastian, A., McCool, J. L., Hum, N. R., Murugesh, D. K., Wilson, S. P., Christiansen, B. A., & Loots, G. G. (2021). Single-Cell RNA-Seq Reveals Transcriptomic Heterogeneity and Post-Traumatic Osteoarthritis-Associated Early Molecular Changes in Mouse Articular Chondrocytes. *Cells, 10*(6). doi:10.3390/cells10061462

Semerci Sevimli, T., Sevimli, M., Qomi Ekenel, E., Altug Tasa, B., Nur Soykan, M., Demir Gucluer, Z., . . . Eker Sariboyaci, A. (2023). Comparison of exosomes secreted by synovial fluid-derived mesenchymal stem cells and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in culture for microRNA-127-5p expression during chondrogenesis. *Gene, 865*, 147337. doi:10.1016/j.gene.2023.147337

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S. A., Mardani, F., . . . Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol, 233*(9), 6425-6440. doi:10.1002/jcp.26429

Shen, P., Jia, S., Wang, Y., Zhou, X., Zhang, D., Jin, Z., . . . Yang, Y. (2022). Mechanical stress protects against chondrocyte pyroptosis through lipoxin A4 via synovial macrophage M2 subtype polarization in an osteoarthritis model. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 153*, 113361.

Sica, A., Erreni, M., Allavena, P., & Porta, C. (2015). Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci, 72*(21), 4111-4126. doi:10.1007/s00018-015-1995-y

Siebelt, M., Jahr, H., Groen, H. C., Sandker, M., Waarsing, J. H., Kops, N., . . . Weinans, H. (2013). Hsp90 inhibition protects against biomechanically induced osteoarthritis in rats. *Arthritis Rheum, 65*(8), 2102-2112. doi:10.1002/art.38000

Smith, M. D., Barg, E., Weedon, H., Papengelis, V., Smeets, T., Tak, P. P., . . . Ahern, M. J. (2003). Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints. *Ann Rheum Dis, 62*(4), 303-307. doi:10.1136/ard.62.4.303

Staunton, L., O′ Connell, K., & Ohlendieck, K. (2011). Proteomic profiling of mitochondrial enzymes during skeletal muscle aging. *Journal of aging research, 2011*(1), 908035.

Suh, J., & Lee, Y. S. (2024). Mitochondria as secretory organelles and therapeutic cargos. *Exp Mol Med, 56*(1), 66-85. doi:10.1038/s12276-023-01141-7

Sun, K., Jing, X., Guo, J., Yao, X., & Guo, F. (2021). Mitophagy in degenerative joint diseases. *Autophagy, 17*(9), 2082-2092. doi:10.1080/15548627.2020.1822097

Sun, X. M., Bratton, S. B., Butterworth, M., MacFarlane, M., & Cohen, G. M. (2002). Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *J Biol Chem, 277*(13), 11345-11351. doi:10.1074/jbc.M109893200

Sundberg, M., Jansson, L., Ketolainen, J., Pihlajamaki, H., Suuronen, R., Skottman, H., . . . Narkilahti, S. (2009). CD marker expression profiles of human embryonic stem cells and their neural derivatives, determined using flow-cytometric analysis, reveal a novel CD marker for exclusion of pluripotent stem cells. *Stem Cell Res, 2*(2), 113-124. doi:10.1016/j.scr.2008.08.001

Suri, S., Gill, S. E., de Camin, S. M., McWilliams, D. F., Wilson, D., & Walsh, D. A. (2007). Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases, 66*(11), 1423-1428.

Tarricone, E., Mattiuzzo, E., Belluzzi, E., Elia, R., Benetti, A., Venerando, R., . . . Brun, P. (2020). Anti-Inflammatory Performance of Lactose-Modified Chitosan and Hyaluronic Acid

Mixtures in an In Vitro Macrophage-Mediated Inflammation Osteoarthritis Model. *Cells, 9*(6). doi:10.3390/cells9061328

ter Huurne, M., Schelbergen, R., Blattes, R., Blom, A., de Munter, W., Grevers, L. C., . . . Jorgensen, C. (2012). Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism, 64*(11), 3604-3613.

Textor, M., Hoburg, A., Lehnigk, R., Perka, C., Duda, G. N., Reinke, S., . . . Geissler, S. (2023). Chondrocyte Isolation from Loose Bodies-An Option for Reducing Donor Site Morbidity for Autologous Chondrocyte Implantation. *Int J Mol Sci, 24*(2). doi:10.3390/ijms24021484

Tian, Z., Yu, T., Liu, J., Wang, T., & Higuchi, A. (2023). Introduction to stem cells. *Prog Mol Biol Transl Sci, 199*, 3-32. doi:10.1016/bs.pmbts.2023.02.012

Topoluk, N., Steckbeck, K., Siatkowski, S., Burnikel, B., Tokish, J., & Mercuri, J. (2018). Amniotic mesenchymal stem cells mitigate osteoarthritis progression in a synovial macrophage-mediated in vitro explant coculture model. *J Tissue Eng Regen Med, 12*(4), 1097-1110. doi:10.1002/term.2610

Troeberg, L., & Nagase, H. (2012). Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta, 1824*(1), 133-145. doi:10.1016/j.bbapap.2011.06.020

Turac, G., Duruksu, G., & Karaoz, E. (2018). The Effect of Recombinant Tyrosine Hydroxylase Expression on the Neurogenic Differentiation Potency of Mesenchymal Stem Cells. *Neurospine, 15*(1), 42-53. doi:10.14245/ns.1836010.005

Utomo, L., Bastiaansen-Jenniskens, Y. M., Verhaar, J. A., & van Osch, G. J. (2016). Cartilage inflammation and degeneration is enhanced by pro-inflammatory (M1) macrophages in vitro, but not inhibited directly by anti-inflammatory (M2) macrophages. *Osteoarthritis and cartilage, 24*(12), 2162-2170.

van Delft, M. F., & Huang, D. C. (2006). How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res, 16*(2), 203-213. doi:10.1038/sj.cr.7310028

van den Bosch, M. H. J. (2021). Osteoarthritis year in review 2020: biology. *Osteoarthritis Cartilage, 29*(2), 143-150. doi:10.1016/j.joca.2020.10.006

Vincent, R., Foston, M., Hammond, W. B., Collins, G. L., & Arinzeh, T. L. (2025). Synthesis and Characterization of Glycosaminoglycan Mimetic Variants to Promote Chondrogenesis. *ACS Omega*.

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. *JBJS, 76*(4), 579-592.

Wakitani, S., Imoto, K., Yamamoto, T., Saito, M., Murata, N., & Yoneda, M. (2002). Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis and cartilage, 10*(3), 199-206.

Walter, S. G., Randau, T. M., Hilgers, C., Haddouti, E. M., Masson, W., Gravius, S., . . . Schildberg, F. A. (2020). Molecular and Functional Phenotypes of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Depend on Harvesting Techniques. *Int J Mol Sci, 21*(12). doi:10.3390/ijms21124382

Wang, B., Liu, W., Li, J. J., Chai, S., Xing, D., Yu, H., . . . Jiang, Q. (2022). A low dose cell therapy system for treating osteoarthritis: In vivo study and in vitro mechanistic investigations. *Bioact Mater, 7*, 478-490. doi:10.1016/j.bioactmat.2021.05.029

Wang, B. W., Jiang, Y., Yao, Z. L., Chen, P. S., Yu, B., & Wang, S. N. (2019). Aucubin Protects Chondrocytes Against IL-1beta-Induced Apoptosis In Vitro And Inhibits Osteoarthritis In Mice Model. *Drug Des Devel Ther, 13*, 3529-3538. doi:10.2147/DDDT.S210220

Wang, X., Guo, Z., Chen, L., Sun, J., Kwan, K. Y. H., Jones, M., . . . Makvandi, P. (2025). Synergistic Modulating of Mitochondrial Transfer and Immune Microenvironment to Attenuate Discogenic Pain. *Advanced Science*, 2500128.

Wilkinson, A. C., & Nakauchi, H. (2020). Stabilizing hematopoietic stem cells in vitro. *Curr Opin Genet Dev, 64*, 1-5. doi:10.1016/j.gde.2020.05.035

Wolfe, A. R., Trenton, N. J., Debeb, B. G., Larson, R., Ruffell, B., Chu, K., . . . Ueno, N. T. (2016). Mesenchymal stem cells and macrophages interact through IL-6 to promote inflammatory breast cancer in pre-clinical models. *Oncotarget, 7*(50), 82482.

Wu, X., Liyanage, C., Plan, M., Stark, T., McCubbin, T., Barrero, R. A., . . . Prasadam, I. (2023). Dysregulated energy metabolism impairs chondrocyte function in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage, 31*(5), 613-626. doi:10.1016/j.joca.2022.11.004

Xia, B., Di, C., Zhang, J., Hu, S., Jin, H., & Tong, P. (2014). Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. *Calcif Tissue Int, 95*(6), 495-505. doi:10.1007/s00223-014-9917-9

Xie, J. W., Wang, Y., Xiao, K., Xu, H., Luo, Z. Y., Li, L., . . . Huang, Z. Y. (2021). Alpha defensin-1 attenuates surgically induced osteoarthritis in association with promoting M1 to M2 macrophage polarization. *Osteoarthritis Cartilage, 29*(7), 1048-1059. doi:10.1016/j.joca.2021.04.006

Yang, B., Kang, X., Xing, Y., Dou, C., Kang, F., Li, J., . . . Dong, S. (2014). Effect of microRNA-145 on IL-1beta-induced cartilage degradation in human chondrocytes. *FEBS Lett, 588*(14), 2344-2352. doi:10.1016/j.febslet.2014.05.033

Yang, J., Zhang, Y. S., Yue, K., & Khademhosseini, A. (2017). Cell-laden hydrogels for osteochondral and cartilage tissue engineering. *Acta biomaterialia, 57*, 1-25.

Yang, Y., Cai, Y., Zhang, Y., Liu, J., & Xu, Z. (2018). Exosomes secreted by adipose-derived stem cells contribute to angiogenesis of brain microvascular endothelial cells following oxygen–glucose deprivation in vitro through microRNA-181b/TRPM7 axis. *Journal of Molecular Neuroscience, 65*, 74-83.

Yi, N., Mi, Y., Xu, X., Li, N., Chen, B., Yan, K., . . . Kuang, G. (2022). Nodakenin attenuates cartilage degradation and inflammatory responses in a mice model of knee osteoarthritis by regulating mitochondrial Drp1/ROS/NLRP3 axis. *International Immunopharmacology, 113*, 109349.

Yu, D., Zha, Y., Zhong, Z., Ruan, Y., Li, Z., Sun, L., & Hou, S. (2021). Improved detection of reactive oxygen species by DCFH-DA: New insight into self-amplification of fluorescence signal by light irradiation. *Sensors and Actuators B: Chemical, 339*, 129878.

Yu, L., Wen, H., Liu, C., Wang, C., Yu, H., Zhang, K., . . . Liu, N. (2023). Embryonic stem cell-derived extracellular vesicles rejuvenate senescent cells and antagonize aging in mice. *Bioact Mater, 29*, 85-97. doi:10.1016/j.bioactmat.2023.06.011

Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., & Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol, 877*, 173090. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173090

Yusuf, E., Nelissen, R. G., Ioan-Facsinay, A., Stojanovic-Susulic, V., DeGroot, J., Van Osch, G., . . . Kloppenburg, M. (2010). Association between weight or body mass index and hand osteoarthritis: a systematic review. *Annals of the rheumatic diseases, 69*(4), 761-765.

Zayed, M., Schumacher, J., Misk, N., & Dhar, M. (2016). Effects of pro-inflammatory cytokines on chondrogenesis of equine mesenchymal stromal cells derived from bone marrow or synovial fluid. *The Veterinary Journal, 217*, 26-32.

Zeng, C. Y., Wang, X. F., & Hua, F. Z. (2022). HIF-1alpha in Osteoarthritis: From Pathogenesis to Therapeutic Implications. *Front Pharmacol, 13*, 927126. doi:10.3389/fphar.2022.927126

Zhang, H., Cai, D., & Bai, X. (2020). Macrophages regulate the progression of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage, 28*(5), 555-561. doi:10.1016/j.joca.2020.01.007

Zhang, H., Lin, C., Zeng, C., Wang, Z., Wang, H., Lu, J., . . . Pan, J. (2018). Synovial macrophage M1 polarisation exacerbates experimental osteoarthritis partially through R-spondin-2. *Annals of the rheumatic diseases*, annrheumdis-2018-213450.

Zhang, J., Liu, X., Wan, C., Liu, Y., Wang, Y., Meng, C., . . . Jiang, C. (2020). NLRP3 inflammasome mediates M1 macrophage polarization and IL-1beta production in inflammatory root resorption. *J Clin Periodontol, 47*(4), 451-460. doi:10.1111/jcpe.13258

Zhang, J., Rong, Y., Luo, C., & Cui, W. (2020). Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes prevent osteoarthritis by regulating synovial macrophage polarization. *Aging (Albany NY), 12*(24), 25138-25152. doi:10.18632/aging.104110

Zhao, K., Ruan, J., Nie, L., Ye, X., & Li, J. (2023). Effects of synovial macrophages in osteoarthritis. *Front Immunol, 14*, 1164137. doi:10.3389/fimmu.2023.1164137

Zien, A., Aigner, T., Zimmer, R., & Lengauer, T. (2001). Centralization: a new method for the normalization of gene expression data. *Bioinformatics, 17 Suppl 1*, S323-331. doi:10.1093/bioinformatics/17.suppl_1.s323

Zou, J., Bai, B., & Yao, Y. (2018). Progress of co-culture systems in cartilage regeneration. *Expert Opin Biol Ther, 18*(11), 1151-1158. doi:10.1080/14712598.2018.1533116

EK 2. Tez Denetleme Listesi

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen şekilde (yazının yönüne dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun şekilde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Romen rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde yazıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde yazıldı.
- Ana metin satır aralığı 1,5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar alfabetik sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.
- Lisansüstü eğitim sırasında yapmış olduğu yayınlar ve bildiriler eklendi.
- Teze ait intihal raporu eklendi.

…… / ….. / 2025 …… / ….. / 2025

Candan ALTUNTAŞ Doç. Dr. Gökhan DURUKSU