

Hücrelerinden Arındırılmış Hayvansal Dokuların Rejeneratif Tedavilerde Kullanımı

Yavuz Emre ARSLAN ¹  Meliha Merve HIZ ² Tuğba SEZGİN ARSLAN ³

¹ Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, TR-17100 Çanakkale - TÜRKİYE

² Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, TR-17100 Çanakkale - TÜRKİYE

³ Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı, TR-17100 Çanakkale - TÜRKİYE

Article Code: KVFD-2014-11663 Received: 02.06.2014 Accepted: 21.10.2014 Published Online: 27.10.2014

Özet

Çoklu potansiyele sahip adipoz mezenkimal kök hücreler, yağ dokusunda bulunan ve hematopoietik olmayan hücre hatlarıdır. Adipoz mezenkimal kök hücrelerin osteojenik, kondrojenik ve adipojenik fenotipler dâhil birçok soya farklılaşma yetenekleri vardır. Yüksek derecede plastisiteye sahip olmaları ve izolasyon kolaylığından ötürü doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları için büyük bir potansiyel taşımaktadırlar. Hücreleri, matrikse bağlı çözünür faktörleri ve iskele desteklerini kullanan doku mühendisliği yaklaşımı, fonksiyon gösteremeyen doku ve organların rejenerasyonu, tamiri veya replasmanı için umut vericidir. Üç-boyutlu iskeleler, transplante edilen hücrelerin yapışabileceği bir yüzey ve yeni doku veya organ oluşumuna rehberlik eden fiziksel bir destek olarak görev yaptığından dolayı gereklidir. Özellikle tüm doku ve organların hücrelerinden arındırılmasıyla elde edilen hücre dışı matrikslerin üç-boyutlu iskele olarak doku mühendisliği stratejilerinde kullanılması giderek ilgi görmektedir. Bu bağlamda, insan adipoz mezenkimal kök hücrelerin deselülerize tüm doku veya organlar üzerindeki davranışlarının incelenmesinin rejeneratif tıba katkı sağlaması beklenmektedir. Bu derleme hayvansal dokuların deselülerizasyonu, elde edilen matriksler üzerinde kök hücrelerin davranışları ve bu matrikslerin insan/hayvan kliniği açısından potansiyel kullanımı hakkında güncel bir bakış açısı sunmaktadır.

Anahtar sözcükler: Deselülerizasyon, Hücre dışı matriks, Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre, Biyomalzeme, Doku mühendisliği, Rejeneratif tıp

The Use of Decellularized Animal Tissues in Regenerative Therapies

Abstract

Human adipose-derived mesenchymal stem cells are nonhematopoietic cells found in the adipose tissue that have multipotent characteristics. Human adipose-derived mesenchymal stem cells have ability to differentiate into multiple lineages, including osteogenic, adipogenic and chondrogenic phenotypes. Because of their high degree of plasticity and ease of isolation, they have a great potential for tissue engineering and regenerative medicine applications. Tissue engineering, using cells, soluble matriks-bound factors and supporting scaffolds, is a promising approach for regeneration, repairing and replacement of malfunctioning tissues and organs. Three-dimensional scaffolds are essential to serve as an adhesive substrate for the transplanted cells and a physical support to guide the formation of new tissues or organs. Particularly, the use of extracellular matrices prepared by decellularized whole tissue and organ as three-dimensional constructs have drawn increasing attention as a tissue engineering strategy. In this context, it is expected that investigating the cellular behaviour of human adipose-derived mesenchymal stem cells on decellularized whole tissue and organ will have a positive impact on regenerative medicine. This review offers a current perspective about decellularization of animal tissues, stem cells' behaviors on obtained matrices and potential use of these matrices in human and/or animal clinic.

Keywords: Decellularization, Extracellular matrix, Adipose derived mesenchymal stem cell, Biomaterial, Tissue engineering, Regenerative medicine

GİRİŞ

Rejeneratif tıp, yaşlanma, hastalık veya travmaya bağlı zarar görmüş doku ve organların işlevselliğinin onarılmasını

ya da iyileştirilmesini konu alan disiplinlerarası bir araştırma alanıdır. Rejeneratif tıbbın önemli bileşenlerinden biri olan doku mühendisliği ise hücre transplantasyonu, malzeme bilimi ve fonksiyonel biyolojik yapıların geliştirilmesinde



İletişim (Correspondence)



+90 286 2180018/2339



emre.arslan@comu.edu.tr

kullanılan mühendislik biliminin prensiplerini takip etmektedir. Doku mühendisliği stratejileri genel olarak hücrelerinden arındırılmış matrisler ve hücre/matriks yapıları olarak iki kategoride incelenebilir ^[1,2]. Hücre Dışı Matriks (HDM) bileşimine sahip biyolojik iskeleler klinikte sıklıkla birçok doku ve organın rejenerasyonu için kullanılmaktadır. Bileşiminde birçok biyoaktif molekül içeren HDM, dokuda hücrelerin bir arada tutulması ve dinamik hücresel davranışların düzenlenmesi gibi görevlerinin yanı sıra koruyucu ve destekleyici fonksiyonlara da sahiptir. Hücre dışı matrislerin bileşiminde bulunan yapısal ve fonksiyonel moleküllerin karakterizasyonu tamamıyla yapılmamasına rağmen kollajen, elastin, laminin, fibronektin ve glikozaminoglikanlar gibi özel içerikler izole edilmişler ve birçok uygulamada kullanılmışlardır. Geniş ölçekte *in vivo* fonksiyona sahip HDM, doku-organ morfogenezini ve yara iyileşmesinde de görevlidir. Hücrelerinden arındırılmış HDM yapıları hücresel infiltrasyonu ve konak ile bütünleşmeyi destekler, yara izi oluşumunu önler ve işleme bağlı olarak immün yanıtın minimal düzeylerde kalmasını sağlar. Hücre Dışı Matriks temelli doku mühendisliği iskeleleri vücut içinde parçalanır ve matriksin yeniden şekillenmesini destekleyerek hasarlı veya nekroze olmuş dokuların rejenerasyonunu hızlandırır ^[3-5]. Kök hücreler ve HDM arasındaki etkileşimler, soy-spesifik farklılaşmanın indüklenmesi ve kimyasal/yapısal sinyaller sayesinde mezenkimal kök hücrelerin (MKH) biyolojik fonksiyonlarını sürdürebilmesi için gereklidir. Hücre Dışı Matriks tarafından oluşturulan biyofiziksel ve kimyasal sinyaller kök hücre adezyonunda, göçünde, yayılmasında, farklılaşmasında ve matriksin yeniden modellenmesinde kritik rol oynar ^[6]. Bu yüzden doku veya organların deselülerizasyon işlemleri sırasında takip edilen ve *Tablo 1*'de ayrıntıları verilen fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlerin hücre dışı matrikse en az zararlı veya hiç zarar vermeyecek şekilde tasarlanması önemlidir.

Adipoz kaynaklı kök hücreler (AKH'ler), yağ dokusunun stromal vasküler fraksiyonunda bulunan MKH popülasyonlarıdır. Lipit depolama ve adipokin salgısı gibi

iyi bilinen rolleri olan beyaz adipoz doku (BAD), yüksek miktarlarda bulunabilme ve izolasyon kolaylığı gibi avantajlarından ötürü kemik iliğine alternatif bir MKH kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır. AKH'ler BAD içerisinde perivasküler boşluklara yerleşmişlerdir ve artan enerji ihtiyacına yanıt olarak BAD büyümesini sağlamak amacıyla fizyolojik olarak adipogenezini başlatırlar. AKH'lerin adipogenez dışında *Şekil 1*'de de görüldüğü üzere osteoblastlara, kondroblastlara, miyositlere, nöronlara ve diğer hücre tiplerine *in vitro* koşullarda farklılaşması indüklenebilmektedir ^[9].

Hayvanlar üzerinde yürütülen çalışmalarda, adipoz doku kaynaklı otolog mezenkimal kök hücreler kullanılarak hasarlı doku tedavisi gerçekleştirilmektedir. Nicpoń ve ark.^[8], köpeklerde dirsek eklem bozukluğu tedavisinde adipoz doku kaynaklı otolog mezenkimal kök hücrelerin kullanıldığı grubun, non-steroid antiinflamatuvar ilaçla tedavisi devam eden kontrol grubuna göre klinik semptomlarında daha hızlı bir gerilemenin olduğunu bildirmiştir. Otolog kök hücre tedavi sürecinde istenmeyen hiçbir yan etki görülmemesi, adipoz kaynaklı kök hücre tedavisinin insan kliniğine de güvenle uygulanabileceğini göstermektedir ^[8,9]. İlave olarak AKH'ler, diğer hücre tiplerine oranla indük-

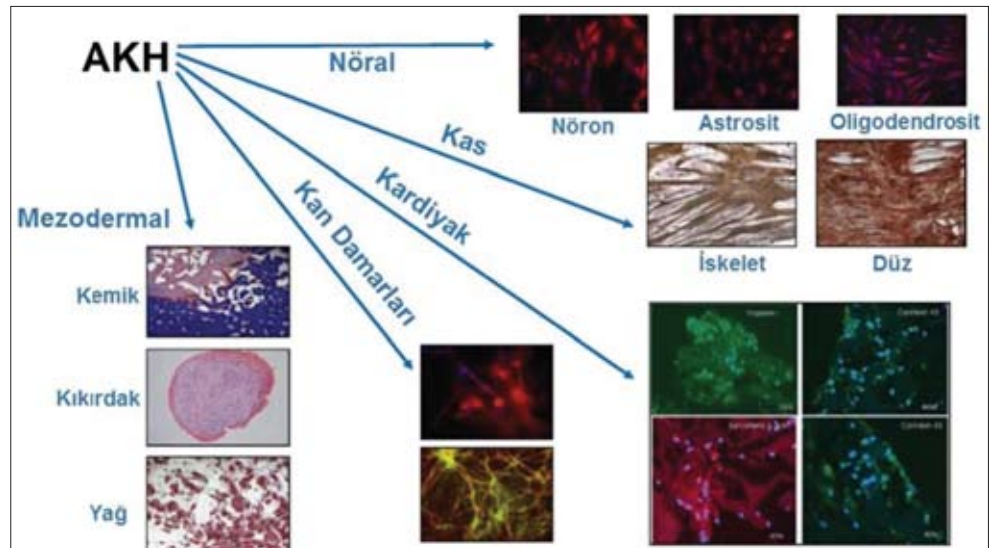
Tablo 1. Doku ve organları hücrelerinden arındırma teknikleri ^[7]

Table 1. The decellularization techniques of tissue and organs ^[7]

Fiziksel	Enzimatik	Kimyasal
Mekanik Çalkalama	Tripsin	Alkali/Asit
Dondurma / Çözme	Endonükleazlar	Hipotonik ve Hipertonik Çözeltiler "EDTA-EGTA"
Sonikasyon	Ekzonükleazlar	İyonik Olmayan Deterjanlar "Triton X-100"
		İyonik Deterjanlar "Sodyum-Dodesil Sülfat (SDS)"
		Zwitteriyonik Deterjanlar "CHARPS" "Sülfobetainin -10 ve 16 (SB-10, SB-16)" "Tri(n-butil) fosfat"

Şekil 1. Adipoz kaynaklı kök hücrelerin çoklu-soy farklılaşma kapasitesi ^[13]

Fig 1. The multilineage differentiation capacity of adipose derived stem cells ^[13]



lenmiş pluripotent kök hücelere (iPS) daha yüksek verimle yeniden programlanabilirler. Adipoz kaynaklı kök hücreler, immün ayrıcalıklı hücrelerdir ve doku tamirini kolaylaştıran immünomodülatör, anjiyojenik, antiapoptotik ve hematopoetik faktörleri salgırlar. AKH'lerin çoklu-soy farklılaşma kapasitesi, eşsiz immünobiyolojik özellikleri ve sekrotomları rejeneratif tıp için büyük terapötik potansiyel sunmaktadır [9].

Doku mühendisliği, yara iyileşmesi ve doku yeniden modellenmesi sırasındaki biyolojik süreçleri taklit etmek amacıyla doku tamirinde anahtar bir faktör olarak HDM bileşenlerinin kullanılması hususuna dikkat çekmektedir. Hücre Dışı Matriks, hücreler için sadece yapısal destek sağlamakla kalmaz aynı zamanda hücre fizyolojisi ve fenotipi için önemli biyokimyasal ipuçlarını da bünyesinde barındırır [5,10,11]. Hücre-HDM ilişkisinin hücre davranış üzerine etkisi primer hücre hatları için tüm yönleriyle tarif edilmesine rağmen, kök hücrelerin matriks üzerindeki davranışları ile ilgili çalışmalara yeni başlanmıştır. Bu ilişkilerin araştırılması, yönlendirmenin veya başka hücre hatlarına farklılaşmanın önlenmesi bakımından gereklidir. Örneğin; kollajen tip I üzerine ekilmiş embriyonik kök hücreler kendini yenileme kabiliyetini korurken erişkin MKH'ler osteojenik farklılaşmaya doğru gitmektedir. Bir başka çalışmada, kollajen tip I ve II bileşimli hidrojeller içerisine ekilmiş MKH'lerin kondrojenik farklılaşmaya gittiği gözlenmiştir. İlave olarak, kollajen tip IV ve laminin, glial hücre farklılaşmasını inhibe ederek nöral progenitör hücrelerin nöronlara farklılaşmasını tetikleyebilmektedir [12].

Bu yazı ile güncel rejeneratif tıp konuları içerisinde yer alan hayvansal dokuların deselülerizasyon teknikleri hakkında temel bilgilerin verilmesi ve elde edilen HDM'lerin biyolojik özelliklerinin irdelenmesi amaçlanmaktadır. Bu bilgiler ışığında insan/hayvan kök hücrelerinin bu matriksler üzerindeki davranışları (osteojenik, kondrojenik ve adipojenik) değerlendirilerek ortopedi/travmatoloji ve plastik cerrahi (onko-cerrahi vb.) gibi potansiyel disiplinler-arası klinik çalışmaların yaygınlaşmasına katkı sağlanması hedeflenmiştir.

KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN DESELÜLERİZE MATRİKSLER

Kök hücrelerin kemik doku mühendisliğinde kullanılmasıyla birlikte, hem hayvan hem de insan hekimliğinde ortopedik hastalıkların tedavisinde yeni ufukların açılacağı düşünülmektedir [14-16]. ABD'de, enfeksiyonlar, travma, tümör rezeksiyonu, anormal gelişim ve konjenital malformasyon sonucunda oluşan kemik hasarlarının tamirinde yıllık 500.000'in üzerinde kemik grefti kullanılmaktadır. Bu sayının yaşlı nüfus ile doğru orantılı olarak artacağı tahmin edilmektedir. Klinikte, hastalıklı ya da hasarlı kemik dokusunun replasmanında osteojenik, osteo-kondüktif ve osteo-indüktif özelliklerinden dolayı otolog kemik greftleri sıklıkla

kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemin, donör saha morbiditesi, şiddetli kalıcı ağrı ve yeterince elde edilememesi gibi olumsuz yönleri bulunmaktadır. Bu nedenlerle son yıllarda otolog kemik greftine alternatif olarak polimerler, kollajen süngerler, seramikler ve metallerin kullanılabilirliği yönünde araştırmalar yoğunlaşmaktadır. Nitekim bu amaçla yapılan çalışmalarda, potansiyel kemik greft malzemelerinin osteojenik özelliklerini araştırmak için osteo-progenitör hücreler *in vitro* koşullarda özellikli iskeleler üzerinde kültüre edilmiş ve iskelelerin ekili hücrelerin osteojenik farklılaşması ve yayılması üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Nitekim HDM-titanyum örgü kompozit iskelelerin MKH'lerin osteojenik farklılaşması ve yayılmasını tetiklediği gösterilmiştir [17]. Kemik allogreftlerinde yeniden kolonileşmeyi destekleyen ve yeniden doku canlanmasını indükleyen yapıları üretmek için geliştirilmiş birçok yöntem bulunmaktadır. Bu nedenle MKH'ler yüklü kemik allogreftinden yapılmış kompozit bir iskele anjiyojenez ve osteo-indüktiviteyi tetikleyen ve büyüme faktörlerini salan bir sistem olarak önerilebilir [18]. Osteojenik faktörlerin ve MKH'lerin kullanıldığı biyolojik ajanlar ile kemik rejenerasyonu günümüzde klinik bir gerçeklik haline gelmiştir. Tuğlu ve ark., erişkin Wistar sıçanlarında oluşturulan yapay defektlerin tedavisinde kök hücre ekili biyomalzemeler kullanmışlar ve kök hücre/biyomalzeme yapısının kontrol grubuna göre osteoid üretimini arttırması ile yeni kemik dokusu oluşumunu ve tedavi sürecini kısalttığını bildirmişlerdir [16]. Hayvan modellerinde MKH transplantasyonunun heyecan verici bulgularının insan kliniği için de umut verici olduğu görülmektedir [16,19].

Büyük ölçekte kemik defektlerinin tamirinde kullanılan doku mühendisliği yapıları geliştirilirken üç önemli bileşenin anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Bunlar;

- I. MKH'ler
- II. Osteo-kondüktif matriks
- III. İndüktif faktörlerdir [20].

Kemik doku mühendisliğinde diğer önemli bir strateji ise kemik dokusu tamiri ve rejenerasyonunda görevli sinyal moleküllerini sağlayan ve mikroçevreyi taklit edebilen yapıların ortaya konulmasıdır [21,22]. Bu amaçla geliştirilen ve kemik grefti yedeği olarak kullanılan demineralize kemik matriksleri (DKM), oto ve allogreftlerin sınırlamalarını aşmak ve tedavi sürecini hızlandırmak açısından önemlidir.

Osteo-kondüktif özellikte DKM allojenik kemiğin asit ekstraksiyonu sonucunda üretilir ve yapısında büyüme faktörleri, kollajen olmayan proteinler ve tip I kollajeni barındırır. DKM'nin osteo-indüktif etkisinin hayvan çalışmalarıyla açık bir şekilde ortaya konulması ve klinikte DKM ürünlerine yoğun bir ilginin olmasına karşın insan hekimliğinde benzer uygulamaların sınırlı sayıda olduğu görülmektedir [23]. Ayrıca, son zamanlarda hücre temelli tedaviler için gözenekli hidroksiapatit iskeleleri çalışılmaya

başlanmıştır. Bu araştırmalar sonucunda etkin bir iskele geliştirebilmek için hücre tutunması, yayılması ve farklılaşmasına olanak sağlayan üç-boyutlu birbiri ile bağlantılı gözenekli yapıların gerekliliği vurgulanmaktadır [24].

KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN DESELÜLERİZE MATRİKSLER

Otolog kondrositlerin kullanıldığı kıkırdak doku tamiri prosedürleri, cerrahi müdahale öncesi defekt bölgesinde sıklıkla fibrokartilaj oluşumu ile sonuçlanan sağlıklı kıkırdak dokusu hasarları gibi birçok dezavantaj içerir. Bu nedenle, rejenerasyon kalitesini arttırmak için erişkin MKH'ler alternatif bir kaynak olarak karşımıza çıkmaktadır. MKH'lerin artiküler kıkırdak tamirinde kullanılması göz önüne alındığında hiyalin artiküler kıkırdakta bulunan hücreler gibi hipertropiye ve terminal farklılaşmaya karşı direnç gösteren kararlı kondrositlerin kök hücrelerden elde edilmesi büyük önem taşımaktadır [25]. Hücreler doku rejenerasyonunda hayati bir rol üstlenmektedir ve HDM gibi biyofiziksel sinyallerden etkilenirler. Hücrelerin özellikli ürünleri olan HDM, yalnızca fiziksel sinyaller oluşturmakla kalmayıp aynı zamanda biyolojik sinyaller de oluşturur. HDM bir sitokin deposu olarak görev yapabilir ve hücre-matriks etkileşimini ayarlayarak kök hücrelerin yaşamsal süreçlerini etkiler. Mühendisliği yapılmış doku ürünlerinin uzun dönem kararlılığı ve canlılığı doğal HDM bileşimine benzerliği ile doğru orantılıdır. Bu yüzden HDM, hücre davranışlarının düzenlenmesinde ve doku rejenerasyonunda önemli bir rol oynar [26]. Kıkırdak HDM'den üretilen iskele, hücreleri küresel fenotipte tutabilen ancak kondrojenin indüklenmesi için harici büyüme faktörlerine ihtiyaç duyan alginat gibi hidrojellerin aksine doğrudan kondrojenik farklılaşmayı etkileyen kondroindüktif bir çevre sağlamaktadır. Kıkırdak kaynaklı matriks (KKM) iskele insan AKH'lerin ve kemik iliği MKH'lerin çoğalmasını, kondrojenik farklılaşmasını ve kıkırdak matriksi biriktirmesini teşvik etmektedir. Harici büyüme faktörü yokluğunda KKM yapıları, domuz ve insan kondrositlerine benzer şekilde AKH'lerde kıkırdağa özgü genlerin ifadesini ve kıkırdak proteinlerinin sentezini arttırabilir [27]. Yumuşak doku rejenerasyonu ve konak doku ile implant uyumunu arttırmak amacıyla hücrel infiltrasyon ve canlılığı koruyan, yapısal olarak dayanıklı, hücre sinyalleşmesini teşvik edebilen ve yüksek miktarda gözenekli tipik biyo-iskeleler tasarlanmaktadır. Güncel çalışmalar birçok doku mühendisliği uygulamasına adapte edilebilen, düşük maliyetli, biyolojik olarak aktif ve yüksek ölçüde işlenebilir doğal kollajen köpükler üzerine odaklanmıştır. Dokuya özgü HDM kaynaklı köpükleri üretmek için insan HDM'nin kullanılmasına dair geniş ölçüde çalışmalar hala yoktur ve hücrelerinden arındırılmış insan dokularının biyo-iskele üretiminde ilginç bir kaynak olabileceği düşünülmektedir. HDM'in karmaşık mikroçevresi doku rejenerasyonu için kritik olan ve dokuya özgü canlılık, yayılma, göç etme ve farklılaşma gibi geniş çapta hücrel davranışa rehberlik edebilir [28].

PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ İÇİN DESELÜLERİZE MATRİKSLER

Meme kanseri tedavisinde lumpektomi veya mastektomi işlemleri sonucu oluşan yumuşak doku kayıplarının tekrar eş değeri ile doldurulması önemli bir cerrahi işlem durumundadır. Klinik raporlar ve temel araştırmalara göre de adipoz mezenkimal kök hücreler yağ greftleme işleminde önemli bir rol oynamaktadır. Hücrel bileşenler için mikroçevrenin oluşturulmasında HDM'in kullanılması ise adipoz doku tamiri için önemli diğer bir işlemidir. Plastik cerrahide kullanılan "benzeriyle değiştir" kuralına göre adipoz dokudan elde edilen HDM biyo-taklit bir iskele olarak fonksiyon gösterebilir [29]. Bu yüzden, özellikle yanık veya kanser tedavilerinde hasarlı dokunun rezeksiyonu sonucu oluşan boşluğu doldurmasının yanı sıra yağ dokusunun doğal şeklini alarak yeniden oluşumunu kolaylaştıran malzemelerin geliştirilmesi önemli bir klinik ihtiyaç haline gelmiştir. Klinisyenler, lippektomi sonucu elde edilen adipoz dokunun vücudun farklı bölgelerindeki deri altı boşluklara doğrudan transplantasyonu veya "lipotransfer" olarak adlandırılan bir yöntem ile bu sorunu çözmeye başlamışlardır. Son zamanlarda, biyokimyasal ve biyomekaniksel HDM ipuçlarının (sinyal molekülleri, yapısal proteinler ve glikozaminoglikanlar) kök hücrelerin farklılaşmasında uyarıcı bir rol oynadığı gösterilmesine rağmen, yapının adipogenezisi nasıl indüklediğine dair yeteri kadar araştırma yapılmamıştır [30]. Bu alanda yapılacak yeni çalışmaların plastik ve rekonstrüktif cerrahide önemli olacağı düşünülmektedir.

KÖK HÜCRE FARKLIlaşMASININ MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

Mezenkimal kök hücrelerin fizyolojik koşullarda osteojenik ya da kondrojenik farklılaşması hormonlar (paratiroid hormonu, östrojen, glukokortikoidler vb.) veya büyüme faktörleri [kemik morfogenetik proteini (BMP), dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) ve fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF2)] tarafından indüklenir [31]. Bununla birlikte osteojenik farklılaşma, harici bir uyarıcı (lityum) tarafından da indüklenebilir [32]. Mezenkimal kök hücrelerin uyarıcıya bağlı kondrojenik, osteojenik veya adipojenik farklılaşmasının yönünü sinyal molekülleri belirler. Adipojeniz, kondrojeniz ve osteojenez aşamalarında sırasıyla PPAR γ 2 (peroksizom proliferatör-aktif edici reseptör- γ 2), Sox9 (SRF-kutu 9) ve Runx2 (Runt ilgili transkripsiyon faktörü 2) farklılaşmayı başlatan ana transkripsiyon faktörleridir [33-35]. MKH'lerin farklılaşmasında Wnt/ β -katenin sinyal yolağında bulunan β -kateninin fosforlanarak yıkılması ya da sitoplazma konsantrasyonunun artmasıyla çekirdekte lokalize olması farklılaşmanın yönünü belirleyen temel mekanizmadır [33,34]. Wnt proteininin alt grupları hücre zarında kendine ait reseptörlere bağlanıp hücre dışı sinyalin hücre içi sin-

yale dönüşmesini ve hedef gen ifadesinin değişmesini tetikler^[33-35].

Osteoprogenitör hücrelerin osteoblast ve kondrositlere dönüşümü Wnt/ β -katenin sinyal yolağında β -katenin molekülünün konsantrasyonuna ve çekirdekte lokalizasyonuna bağlı olarak değişir^[36,37]. Wnt sinyal yolağı üzerinden β -katenin'in düşük konsantrasyonu kondrositlere, yüksek konsantrasyonu ise osteoblastlara farklılaşmayı sağlar. Kondrojenik farklılaşma ve kırık oluşumunu SRY (sex determining region Y)-box 9 (Sox9); osteojenik farklılaşma ve endokordiyal ossifikasyonunu ise TGF-ailesi üyesi olan BMP2 aktive eder^[38]. Adipojenik farklılaşma için ise PPAR γ 2 ifadesi sonucu β -katenin molekülünün yıkıcı kompleksle parçalanmasıyla Wnt/ β -katenin sinyal yolağının inaktive olması gereklidir. Osteoblastlarda Wnt/ β -katenin sinyal yolağında β -katenin ifadesinin kaybı osteoblastların adipositlere farklılaşmasına neden olur^[39]. TGF- β ailesinin en büyük alt grubunu BMP oluşturmaktadır^[40]. Osteoprogenitör hücrelerin osteoblast farklılaşması sırasında BMP-2, BMP-4, BMP-6 ve BMP-7 ifadelerinin artması Runx2'nin de aktivasyonunu sağlar^[40,41]. Kondroosteoprogenitör hücrelerin BMP-2'nin immobilize edildiği alümina kaplı nano geçirgen yüzeylerde osteojenik farklılaşmaya gitmesi BMP-2'nin osteoblast farklılaşmasındaki ana kontrol noktası olduğunun göstergesidir^[42]. BMP-2, heteromerik reseptörü üzerinden Smad proteinleri aktive ederek Runx2 gen ifadesini arttırmaktadır^[43]. Runx2 ise osteoblast farklılaşmasından sorumlu olan gen bölgelerinin promotörlerinde bulunan OSE2 (osteoblast-specific cis-acting element 2) bölgelerine bağlanarak osteoblastlara özgü genlerin ifadesini başlatır^[44]. Ayrıca, pre-osteoblastların olgun osteoblastlara ve osteositlere farklılaşmasını bir transkripsiyon faktörü olan Osterix (Osx) düzenler^[45]. MKH'lerden osteoblastlara farklılaşma Runx2, alkalen fosfataz (ALP), Tip I Kollajen (Col I), osteopontin (OPN) ve osteokalsin (OC) gibi genlerinin ifadelerindeki artış ile karakterizedir^[46-48]. Kondrojenin erken aşamalarında hiyalüronik asit (HA) ve kondroitin sülfat (CS) kondrojenik bir transkripsiyon faktörü olan Sox9'un ifadesini arttırırken; kollajen tip-1 (fibroblastik işaretçi) ifadesinin azalmasına neden olmaktadır. Öncül kondrositlerin belirlenmesinde ise Sox9 biyolojik bir işaretçi proteini olarak tercih edilmektedir. Kondrosit farklılaşmasında Sox9 ve β -katenin molekülünün fiziksel etkileşimleri sonucu kondrosit farklılaşması gerçekleşebileceği gibi osteoprogenitör hücreler de oluşabilmektedir. Bu noktada farklılaşmanın yönünü β -katenin çekirdek lokalizasyonu belirlemektedir. Kondrosit farklılaşmasında β -katenin çekirdek lokalizasyonu daha azdır ve kondrosite özgü olan CD44, CD151 yüzey işaretçileri ile agrekan, tip-2 kollajen, tip-4 kollajen gibi kondrositlere özgü proteinlerin ifadesi de artar. Sox9 proteininin miktarının azalmasıyla kondrositlerin proliferatif bölgeden hipertropik farklılaşması için Runx2/3 ifadesinin artması sonucu, β -katenin aracılı Wnt sinyal yolağının aktivasyonu ile^[49,50] alkalen fosfataz ve kollajen tip-10 (Col X/Col10A1) ifadesi artmaktadır^[51,52]. Terminal farklılaşmasını tamam-

layan kondrositler apoptoza giderek kırık dokusunun mineralizasyonu ile kemik yapısına dönüşebilir^[53]. Kemik dokusuna farklılaşma sonucu kan damarlarının invazyonu için vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve kırık dokunun parçalanması için matriks metallo proteinazlar salgılanır^[54]. Adipojenik farklılaşmada ise kondrojenik ve osteojenik farklılaşmanın aksine Wnt sinyal yolağını aktive eden β -katenin ifadesinin azalması söz konusudur. Öncül adipositlerde Wnt10b, Wnt10a, ve Wnt6 hücre yüzeyinde bulunan Fzd ve LRP sinyal reseptörlerine bağlanarak β -katenin'in hipometile durumda kalmasını sağlayan GSK3 β 'yi inhibe ederek Wnt/ β -katenin yolağı üzerinden T-hücre faktör (TCF) ile WNT hedef genlerinin ifade olmasını sağlar^[55]. Adipositlerin olgunlaşmasında GSK3 β tarafından aktive edilen proteozomal kompleksin β -katenin'leri yıkması gerekir. Bu işlem TNF α 'nın hücre yüzeyindeki TNF α reseptörüne (TNFR1) ya da WNT5B'nin kendine ait hücre reseptörüne bağlanmasıyla β -katenin'lerin parçalanması sonucu gerçekleşir^[56]. Preadipoz dokuda MAP kinaz ve GSK3 β , bir transkripsiyon faktörü olan CCAAT/enhancer-binding protein β 'nin (C/EBP β) fosforlanması ve C/EBP β 'nin konformasyonel değişimiyle adipojenizden sorumlu genlerin PPAR γ arttırıcı bölgelerine bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunu sağlar^[57]. Peroksizom Proliferatör Cevap Elementleri (PPRE) olarak bilinen DNA dizisine ise transkripte olan PPAR γ ve C/EBP α ile Retinoid X Reseptör (RXR) gibi koaktivatörlerin bağlanması ile adipojenik farklılaşmadan sorumlu genlerin ifadesi gerçekleşir^[56]. Bu kompleks, adipositlerde ALBP (Adiponectin), FABP4 (Fatty Acid Transporter), Glut4 (Glukoz Transporter-4), LEP (Leptin) ve LPL (Lipoprotein Lipaz) genlerinin ifadesini arttırır^[58].

SONUÇ

Doku mühendisliği uygulamaları, organ ve doku rejenerasyonu/tamirine gereksinim duyan hastalar için umut verici bir tedavi yaklaşımı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bağlamda son zamanlarda giderek önemi artan hayvansal kaynaklı tüm doku ve organların hücrelerinden arındırılmasıyla elde edilen HDM üç-boyutlu iskelelerin terapötik uygulamalarda sıklıkla kullanılmaya başlandığı görülmektedir. Bahsi geçen yaklaşımda osteojenik, kondrojenik ve adipojenik fenotipler dâhil birçok soya farklılaşma yeteneğine sahip AKH'ler *ex vivo* şartlarda deselülerize edilen doku ve organlar üzerine ekildikten sonra özel şartlar altında yeniden farklılaştırılarak çoğaltılmakta ve oluşan doku benzeri yeni yapılar transplante edilmektedir. HDM bileşimine sahip biyolojik iskeleler çoğalma ve farklılaşma gibi hücre davranışları düzenlerken aynı zamanda anjiyojenez ve parankimal hücrelerin tutunması için destek görevi de görmektedirler. Diğer taraftan deselülerize matrikslerden farklı yapısal, mekaniksel ve biyolojik özelliğe sahip hidrojeller üretilebilir. Koruyucu ve destekleyici fonksiyonlara sahip bu hidrojeller kemik ve kırık dokusu mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca meme kanseri hastalarının tedavisi

için uygulanan lumpektomi veya mastektomi gibi cerrahi işlemler sonrasında meydana gelen yumuşak doku kayıplarının giderilmesinde kök hücrelerin ve otogreftlerin kullanılmasını konu alan çalışmalar kişiye özgü tedavi yaklaşımı açısından ilgi çekicidir. Memeli HDM'lerinin yapısal ve fonksiyonel özellikleri canlıda homeostazinin sağlanması için önemlidir ve bu yapıların klinikte başarılı bir terapötik ajan olarak kullanılmasının da anahtarıdır. HDM biyo-iskeleleri konu alan rejeneratif tıp stratejileri temel olarak etkili bir deselülerizasyon, kök hücrelerin bu yapıya ekimi, vaskülarizasyon, farklılaşmanın qRT-PCR ile karakterizasyonu ve hücre/iskele yapısının transplantasyonu basamaklarını içermektedir. Birçok hastalığın tedavisinde kullanılma potansiyeli olan bu yapıların üretilmesinde deselülerizasyon işleminin optimizasyonu kritiktir. Deselüerizasyon fiziksel, kimyasal ve enzimatik işlemlerin bir dizi kombinasyonu ile gerçekleştirilir. Yapısal ve fonksiyonel özelliklerini koruyan hücresiz HDM biyo-iskeleler elde etmek için ılıman koşulları sağlayan protokollerin oluşturulması beklenir. Doku veya organların deselüerizasyon işlemleri sırasında takip edilen fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemler üretilecek iskelelerin mekanik davranış ve hücresel cevaplara ev sahipliği yapma gibi birçok önemli parametresini etkilemektedir. Deselüerizasyon işlemi sırasında adeziv proteinlerin ve glikozaminoglikanların zarar görmesi iskelenin kendi biyo-aktivitesini ve iskele üzerinde hücre göçünü yavaşlatabilmektedir. Kollajen ağının kırılması ile mekanik davranış ve iskelenin kollajen lif kinematığı değişebilmektedir. Bu durum da iskelelerin taşıma kapasitesini etkilemekte ve hücrelerin maruz kaldığı mekanik mikroçevreyi değiştirebilmektedir. Deselüerizasyon işlemlerine maruz kalan iskelelerin mekaniksel davranışı ve biyo-aktivitesiyle ilişkili diğer önemli bir faktör ise yapının bozulmasıdır. Sert kimyasal yöntemler, HDM iskelelerin *in vivo* koşullarda enzimatik bozulma direncini düşürmekte ve bu da iskelelerin mekaniksel gücünde azalmalara sebebiyet vermektedir. Rejeneratif tıpta kullanılmak üzere bir dizi onaylı deselüerizasyon protokolü ile üretilmiş HDM temelli biyo-iskele mevcuttur. Özellikle insan dermisi (Alloderm®, LifeCell, Corp.), domuz ince barsak altmukozası (SurgiSIS®, Cook Biotech, Inc.; Restore®, DePuy Orthopaedics, Inc.), domuz mesane (ACell, Inc.) ve domuz kalp kapakçıkları (Synergraft®, CryoLife, Inc.) göze çarpan önemli ticari ürünlerdir. Ayrıca yeni deselüerizasyon protokollerinin geliştirilmesi bu alana yönelik yapılan klinik çalışmalar için anlamlı ve önemlidir.

Son gelişmeler doku mühendisliğinin klinik uygulamalarda geniş bir yer tutabileceğini göstermekte ve yakında gelecekte ise kök hücre biyolojisi, doku mühendisliği ve çekirdek transfer teknikleri alanlarındaki büyük ilerlemeler sayesinde nitelikli rejeneratif tıp ürünlerinin raflarda yer alabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Koh CJ, Atala A:** Tissue engineering, stem cells, and cloning: Opportunities for regenerative medicine. *J Am Soc Nephrol*, 15 (5): 1113-1125, 2004.
- Inanç B, Arslan YE, Sükran S, Elçin AE, Elçin YM:** Periodontal ligament cellular structures engineered with electrospun poly(DL-lactide-co-glycolide) nanofibrous membrane scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 90 (1): 186-195, 2009.
- Flynn L, Semple JL, Woodhouse KA:** Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, 79 (2): 359-369, 2006.
- Choi JS, Kim BS, Kim JY, Kim JD, Choi YC, Yang HJ, Park K, Lee HY, Cho YW:** Decellularized extracellular matrix derived from human adipose tissue as a potential scaffold for allograft tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, 97 (3): 292-299, 2011.
- Elçin YM, Parmaksız M, Elçin AE, Arslan YE:** Decellularization of bovine small intestinal submucosa for regenerative medicinal applications. *International Patent Application, WIPO NO: PCT/TR2013/000106*.
- He H, Liu X, Peng L, Gao Z, Ye Y, Su Y, Zhao Q, Wang K, Gong Y, He F:** Promotion of hepatic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells on decellularized cell-deposited extracellular matrix. *Biomed Res Int*, 2013: 406871, 2013. DOI: 10.1155/2013/406871.
- Badyalak SF, Taylor D, Uygun K:** Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng*, 13, 27-53, 2011.
- Nicpoń J, Marycz K, Grzesiak J, Śmieszek A, Toker ZY:** The advantages of autologous adipose derived mesenchymal stem cells (AdMSCs) over the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) application for degenerative elbow joint disease treatment in dogs - Twelve cases. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 20 (3): 345-350, 2014. DOI: 10.9775/kvfd.2013.10105
- Ong WK, Sugii S:** Adipose-derived stem cells: Fatty potentials for therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 45 (6): 1083-1086, 2013.
- Hidalgo-Bastida LA, Cartmell SH:** Mesenchymal stem cells, osteoblasts and extracellular matrix proteins: Enhancing cell adhesion and differentiation for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, 16 (4): 405-412, 2010.
- Arslan YE, Sezgin Arslan T:** Keratin extraction and producing its hydrolysates. national patent application. *Turkish Patent Institute No: 2014/02104*.
- Santiago JA, Pogemiller R, Ogle BM:** Heterogeneous differentiation of human mesenchymal stem cells in response to extended culture in extracellular matrices. *Tissue Eng Part A*, 5 (12): 3911-3922, 2009.
- Nagata T, Mitsumori T, Iwaguro H:** Adipose tissue-derived stem and regenerative cells for tissue regeneration. *J Oral Biosci*, 55, 127-131, 2007.
- Tang M, Chen W, Liu J, Weir MD, Cheng L, Xu HHK:** Human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on calcium phosphate scaffold for bone regeneration. *Tissue Eng Part A*, 20 (7-8): 1295-1305, 2014.
- Marycz K, Toker Ny, Śmieszek A, Nicpoń J:** The morphology and proliferation rate of canine and equine adipose derived mesenchymal stem cells cultured with flunixin meglumine-*in vitro*. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 20 (2): 201-207, 2014. DOI: 10.9775/kvfd.2013.9402
- Tuğlu MI, Özdal-Kurt F, Koca H, Sarac A, Barut T, Kazanç A:** The contribution of differentiated bone marrow stromal stem cell-loaded biomaterial to treatment in critical size defect model in rats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (5): 783-792, 2010.
- Thibault RA, Baggett LS, Mikos AG, Kasper FK:** Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on pregenerated extracellular matrix scaffolds in the absence of osteogenic cell culture supplements. *Tissue Eng Part A*, 16 (2): 431-440, 2010.
- Schubert T, Xhema D, Vériter S, Schubert M, Behets C, Delloye C, Gianello P, Dufrane D:** The enhanced performance of bone allografts using osteogenic-differentiated adipose-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 32 (34): 8880-8891, 2011.
- Jones E, Yang X:** Mesenchymal stem cells and bone regeneration: Current status *Injury*, 42: 562-568, 2011.
- Overman JR, Helder MN, ten-Bruggenkate CM, Schulten EAJM,**

- Klein-Nulend J, Bakker AD:** Growth factor gene expression profiles of bone morphogenetic protein-2-treated human adipose stem cells seeded on calcium phosphate scaffolds *in vitro*. *Biochimie*, 95 (12): 2304-2313, 2013.
- 21. Lu Z, Roohani-Esfahani SI, Wang G, Zreiqat H:** Bone biomimetic microenvironment induces osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Nanomedicine*, 8 (4): 507-515, 2012.
- 22. Elçin YM, Arslan YE, Elçin AE, Aktaş Z, Akar AR:** Development of macro and/or micro-porous matrix structures for hard and soft tissue engineering applications. National Patent Application, *Turkish Patent Institute*, No: 2011/01600.
- 23. Sawkins MJ, Bowen W, Dhadda P, Markides H, Sidney LE, Taylor AJ, Rose FRAJ, Badylak SF, Shakesheff KM, White LJ:** Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. *Acta Biomater*, 9 (8): 7865-7873, 2013.
- 24. Krishnamurthy G, Murali MR, Hamdi M, Abbas AA, Raghavendran HB, Kamarul T:** Characterization of bovine-derived porous hydroxyapatite scaffold and its potential to support osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Ceramics International*, 40(1): 771-777, 2014.
- 25. Peltari K, Steck E, Richter W:** The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury*, 39S1, 58-65, 2008.
- 26. Chang CH, Chen CC, Liao CH, Lin FH, Hsu YM, Fang HW:** Human acellular cartilage matrix powders as a biological scaffold for cartilage tissue engineering with synovium-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*, 102 (7): 2248-2257, 2014.
- 27. Rowland JR, Lennon DP, Caplan AI, Guilak F:** The effects of crosslinking of scaffolds engineered from cartilage ECM on the chondrogenic differentiation of MSCs. *Biomaterials*, 34, 5802-5812, 2013.
- 28. Yu C, Bianco J, Brown C, Fuetterer L, Watkins JF, Samani A, Flynn LE:** Porous decellularized adipose tissue foams for soft tissue regeneration. *Biomaterials*, 34 (13): 3290-3302, 2013.
- 29. Wang L, Johnson JA, Zhang Q, Beahm EK:** Combining decellularized human adipose tissue extracellular matrix, adipose-derived stem cells for adipose tissue engineering. *Acta Biomater*, 9 (11): 8921-8931, 2013.
- 30. Young DA, Choi YS, Engler AJ, Christman KL:** Stimulation of adipogenesis of adult adipose-derived stem cells using substrates that mimic the stiffness of adipose tissue. *Biomaterials*, 34 (34): 8581-8, 2013.
- 31. Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D:** Transcriptional regulation of osteoblasts. *Cells Tissues Organs*, 189 (1-4): 144-152, 2009.
- 32. Satija NK, Sharma D, Afrin F, Tripathi RP, Gangenahalli G:** High throughput transcriptome profiling of lithium stimulated human mesenchymal stem cells reveals priming towards osteoblastic lineage. *PLoS One*, 8 (1): e55769, 2013.
- 33. James AW:** Review of signaling pathways governing MSC osteogenic, adipogenic differentiation. *Scientifica (Cairo)*, 2013, 684736, 2013.
- 34. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ:** Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci*, 66 (2): 236-253, 2009.
- 35. Takada I, Kouzmenko AP, Kato S:** Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: Implications for targeted therapies. *Expert Opin Ther Targets*, 13 (5): 593-603, 2009.
- 36. Cai SX, Liu AR, He HL, Chen QH, Yang Y, Guo FM, Huang YZ, Liu L, Qiu HB:** Stable genetic alterations of β -Catenin, ROR2 regulate the Wnt pathway affect the fate of MSCs. *J Cell Physiol*, 229 (6): 791-800, 2014.
- 37. Zou L, Zou X, Li H, Mygind T, Zeng Y, Lü N, Bünnger C:** Molecular mechanism of osteochondroprogenitor fate determination during bone formation. *Adv Exp Med Biol*, 585, 431-441, 2006.
- 38. Liao J, Hu N, Zhou N, Lin L, Zhao C, Yi S, Fan T, Bao W, Liang X, Chen H, Xu W, Chen C, Cheng Q, Zeng Y, Si W, Yang Z, Huang W:** Sox9 potentiates BMP2-induced chondrogenic differentiation, inhibits BMP2-induced osteogenic differentiation. *PLoS One*, 9 (2): e89025, 2014.
- 39. Song L, Liu M, Ono N, Bringham FR, Kronenberg HM, Guo J:** Loss of wnt/ β -catenin signaling causes cell fate shift of preosteoblasts from osteoblasts to adipocytes. *J Bone Miner Res*, 27 (11): 2344-2358, 2012.
- 40. Zhu F, Friedman MS, Luo W, Woolf P, Hankenson KD:** The transcription factor osterix (SP7) regulates BMP6-induced human osteoblast differentiation. *J Cell Physiol*, 227 (6): 2677-2685, 2013.
- 41. Qi H, Aguiar DJ, Williams SM, La Pean A, Pan W, Verfaillie CM:** Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (6): 3305-3310, 2003.
- 42. Song Y, Ju Y, Morita Y, Xu B, Song G:** Surface functionalization of nanoporous alumina with bone morphogenetic protein 2 for inducing osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 37, 120-126, 2014.
- 43. Galindo M, Pratap J, Young DW, Hovhannisyan H, Im HJ, Choi JY, Lian JB, Stein JL, Stein GS, van Wijnen AJ:** The bone-specific expression of runx2 oscillates during the cell cycle to support a G1-related anti-proliferative function in osteoblasts. *J Biol Chem*, 280 (21): 20274-20285, 2005.
- 44. Shui C, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S:** Changes in runx2/cbfa1 expression, activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*, 18 (2): 213-221, 2003.
- 45. Sinha KM, Zhou X:** Genetic, molecular control of osterix in skeletal formation. *J Cell Biochem*, 114 (5): 975-984, 2013.
- 46. Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein G:** Regulatory controls for osteoblast growth, differentiation: Role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 4 (1-2): 1-41, 2004.
- 47. Marie PJ:** Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys*, 473 (2): 98-105, 2008.
- 48. Taşçene N, İşğüder Z, Salmanoğlu B:** Osteopontin expression in polarized MDCK cells. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 20 (5): 671-674, 2014. DOI: 10.9775/kvfd.2014.10815
- 49. Si Y, Inoue K, Igarashi K, Kanno J, Imai Y:** Autoimmune regulator aire is a novel regulator of chondrocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 437 (4): 579-584, 2013.
- 50. Michigami T:** Current understanding on the molecular basis of chondrogenesis. *Clin Pediatr Endocrinol*, 23 (1): 1-8, 2014.
- 51. Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, McCreary PD, de Crombrughe B:** Interactions between Sox9, beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev*, 18 (9): 1072-1087, 2004.
- 52. Ning B, Wang P, Pei X, Kang Y, Song J, Wang D, Zhang W, Ma R:** Dual function of β -catenin in articular cartilage growth, degeneration at different stages of postnatal cartilage development. *Int Orthop*, 36 (3): 655-664, 2012.
- 53. Michigami T:** Regulatory mechanisms for the development of growth plate cartilage. *Cell Mol Life*, 70 (22): 4213-4221, 2013.
- 54. Mackie EJ, Tatarczuch L, Mirams M:** The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte, endochondral ossification. *J Endocrinol*, 211 (2): 109-121, 2011.
- 55. Prestwich TC, Macdougald OA:** Wnt/ β -catenin signaling in adipogenesis, metabolism. *Curr Opin Cell Biol*, 19 (6): 612-617, 2007.
- 56. Cristancho AG, Lazar MA:** Forming functional fat: A growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(11): 722-734, 2011.
- 57. Tang QQ, Lane MD:** Adipogenesis: From stem cell to adipocyte. *Ann Rev Biochem*, 81, 715-736, 2012.
- 58. Teven CM, Liu X, Hu N, Tang N, Kim SH, Huang E, Yang K, Li M, Gao JL, Liu H, Natale RB, Luther G, Luo Q, Wang L, Rames R, Bi Y, Luo J, Luu HH, Haydon RC, Reid RR, He TC:** Epigenetic regulation of mesenchymal stem cells: a focus on osteogenic, adipogenic differentiation. *Stem Cells Int*, 2011, 201371, 2011.