

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TGF β -3/IGF-1 İLAVE EDİLMİŞ KONDROSİT KAYNAKLI
KOŞULLANDIRILMIŞ MEDYUMUN AMNİYOTİK SIVI KAYNAKLI
HÜCRELERDE KONDROGENEZİS ÜZERİNE ETKİLERİ**

Shah NAWAZ

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM
DALI-BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI ORTAK
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ

ORTAK TEZ DANIŞMAN

Prof. Dr. Hakan ÖNER

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Metin ERDOĞAN

Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından
18-SAĞ.BİL-26 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2020-004

2020 - AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı-Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Ortak Doktora Programı

Çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:14.07.2020

Prof. Dr. Asuman ÖZEN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Artay YAĞCI
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Vural ÖZDEMİR
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Berrin ZİK
Bursa Uludağ Üniversitesi
Jüri Üyesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı-Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Ortak Doktora Programı öğrencisi Shah NAWAZ'ın “TGFβ-3/IGF-1 İlave Edilmiş Kondrosit Kaynaklı Koşullandırılmış Medyumun Amniyotik Sıvı Kaynaklı Hücrelerde Kondrojenesis Üzerine Etkileri” Başlıklı Tezi günü saat Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Esma KOZAN
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar.....	x
Şekiller	xiv
Tablolar	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Eklem Kıkırdığı Anatomisi	1
1.2. Eklem Kıkırdığı Gelişimi.....	1
1.3. Eklem Kıkırdığı Histolojisi.....	2
1.4. Koşullandırılmış Medyum	6
1.5. Kondrojenenezisin Hücresel ve Moleküler Mekanizması	7
1.6. Doku Mühendisliği.....	11
1.7. Aljinat Boncuklar.....	12
1.8. Amniyotik Sıvı Kaynaklı Kök Hücreler	13
1.9. Problemin İfadesi	15
Hipotez ve Amaç	17
2. GEREÇ VE YÖNTEM	19
2.1. Etik Onayı	19
2.2. Cihazlar ve Kimyasallar	19
2.3.RASKH'lerin İzole Edilmesi, Mezenkimal Karakterlerinin ve Farklılaşma Potansiyellerinin Belirlenmesi	22

2.3.1. Hayvanların Bakımı ve Gebe Bırakılması	22
2.3.2. RASKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü	23
2.3.2.1. Kullanılan Medyum ve Solüsyonlar	23
2.3.2.2. RASKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü Protokolü	23
2.3.2.3. Pasajlama (Alt Kültür) ve Hücre Sayımı	25
2.3.3. Farklılaştırma Çalışmaları	25
2.3.3.1. Adipojenik Farklılaştırma	26
2.3.3.1.1. Adipojenik Farklılaştırma Medyumları, Stok ve Çalışma Solüsyonu	26
2.3.3.1.1.1. Adipojenik Farklılaştırma Medyumları	26
2.3.3.1.1.2. Maintenance (İdame) Medyum	27
2.3.3.1.2. Adipojenik Farklılaştırma Protokolü	27
2.3.3.1.2.1. Adipojenik Farklılaştırma Analizi İçin Oil Red O Boyaması	28
2.3.3.1.2.1.1. Oil Red O Boyama Solüsyonunun Hazırlanması	28
2.3.3.1.2.1.2. Oil Red O Boyama Yöntemi	28
2.3.3.2. Osteojenik Farklılaştırma	29
2.3.3.2.1. Osteojenik Farklılaştırma Stok ve Çalışma Solüsyonları	29
2.3.3.2.3. Osteojenik Farklılaştırma Protokolü	30
2.3.3.2.2.1. Osteojenik Farklılaştırma Analizi için Alizarin Red S Boyaması	30
2.3.3.2.2.1.1. 80 mM Alizarin Red S (pH 4,2) Solüsyonunun Hazırlanması	30
2.3.3.2.2.1.2. Alizarin Red S Boyama Yöntemi	30
2.3.3.3. Kondrojenik Farklılaştırma	31
2.3.3.3.1. Kondrojenik Farklılaştırma Medyumu, Stok ve Çalışma Solüsyonları	31
2.3.3.3.1.1. Kondrojenik Farklılaştırma Medyumu	31
2.3.3.3.2. Kondrojenik Farklılaştırma Protokolü	32
2.3.3.3.2.1. RASKH'lerin Aljinat Jel İçerisine Enkapsülasyonu ve Hücrelerin 3 Boyutlu Kültürü	32
2.3.3.3.2.1.1. Aljinat Çözeltilisinin Hazırlanması	32
2.3.3.3.2.1.2. Jelasyon Çözeltilisinin Hazırlanması	33
2.3.3.3.2.1.3. Jeli Çözdürme Solüsyonunun Hazırlanması	33
2.3.3.3.2.1.4. RASKH'lerin Enkapsülasyon Yöntemi	34
2.3.3.3.2.1.5. Aljinat Boncuklar İçine Enkapsüle Edilen Kök Hücrelerin Kültürü	36
2.3.3.3.3. Kondrojenik Farklılaştırma Analizi için Alsiyan Mavisi Boyaması	36

2.3.3.3.3.1. Yayma (Froti) Preparatlarının Hazırlanması	36
2.3.3.3.3.2. % 1 Alsiyan Mavisi (pH 2,5) Solüsyonunun Hazırlanması	36
2.3.3.3.3.3. Alsiyan Mavisi Boyama Yöntemi.....	37
2.3.4. Mezenkimal Hücrelerin Karakterizasyonunun İmmunfloresan ve Real-Time PCR Metodları ile Gösterilmesi	37
2.3.4.1. İmmunfloresan ile Karakterizasyon	37
2.3.4.1.1. İmmunfloresan Boyama için Gerekli Solüsyonlar.....	37
2.3.4.1.2. Hücrelerde İmmunfloresan Boyama Yöntemi	38
2.3.4.2. Real-Time PCR Analizi	38
2.3.4.2.3. cDNA Sentezi.....	41
2.3.4.2.4. Real-Time PCR.....	41
2.4. Rat Eklem Kıkırdığından Kondrositlerin İzolasyonu ve Kültürü	43
2.4.1. Kondrosit Medyumu ve Kültürü	45
2.4.1.1. Kondrosit Kültür Medyumu	45
2.4.1.2. Kondrosit Kültürü	45
2.4.2. Kondrositlerin Karakterizasyonunun İmmunfluoresan ve Real-Time PCR Metodları ile Gösterilmesi	46
2.4.2.1. İmmunfloresan ile Karakterizasyon	46
2.4.2.2 Real-Time PCR Analizi	46
2.4.3. Kondrositlerden Koşullandırılmış Medyum Toplanması.....	47
2.5. RASKH'lerin Aljinat Jel İçerisine Enkapsülasyonu; Hücrelerin 3 Boyutlu Kültürü ve Deneysel Tasarım.	48
2.5.1. Deney Grupları.....	49
2.6. RASKH'nin Kondrojenik Potansiyelinin, İmmunohistokimya, Real-Time PCR ve Histolojik Boyamalarla Değerlendirilmesi.....	49
2.6.1. Yayma Preparatlarında İmmunohistokimya Boyama Yöntemi.....	49
2.6.1.1. İmmunohistokimya Boyama Yöntemi.....	50
2.6.2. Histolojik Boyamalar	50
2.6.3. Real-Time PCR analizi.....	50
2.7. İstatistik.....	51
3. BULGULAR	52

3.1. RASKH'lerin İzole Edilmesi ve Mezenkimal Kök Hücre Karakterlerinin ve Farklılaşma Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	52
3.1.1. Amniyotik Sıvıların Toplanması.....	52
3.1.2. Hücre İzolasyonu ve Kültürü.....	52
3.1.3. Farklılaştırma Çalışmaları.....	56
3.1.3.1. Osteojenik Farklılaştırma.....	56
3.1.3.2. Adipojenik Farklılaştırma.....	57
3.1.3.3. Kondrojenik Farklılaştırma.....	57
3.1.3.3.1. RASKH'lerin Aljinat Jel İçine Enkapsülasyonu ve Aljinat Boncuklar İçine Enkapsüle Edilen Kök Hücrelerin Kültürü.....	57
3.1.3.3.2. Aljinat Boncuklar İçine Enkapsüle Edilen Kök Hücrelerin Kondrojenik Farklılaştırması.....	59
3.1.4. Mezenkimal Hücrelerin Karakterizasyonunun İmmunfluoresan ve Real-Time PCR Metodları ile Gösterilmesi.....	61
3.1.4.1. İmmunofloresan Boyama ile Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu...61	
3.1.4.2. Real-Time PCR Analizi.....	62
3.1.4.2.1. Real-Time PCR.....	62
3.2. Kondrosit Kültürü ve Karakterizasyonu ile Koşullandırılmış Medyum Elde Edilmesi.....	70
3.2.1. Kondrositlerin İzolasyonu ve Kültürü.....	70
3.2.2. Kondrositlerin Karakterizasyonunun İmmunfluoresan ve Real-Time PCR Metodları ile Gösterilmesi.....	72
3.2.2.1. Kondrositlerde İmmunofloresan Boyama.....	72
3.2.2.2. PCR Analizi.....	73
3.2.3. Koşullandırılmış Medyumun Toplanması.....	76
3.3.RASKH'nin Kondrojenik Potansiyelinin Alsiyan Mavisi, İmmunohistokimya Boyama ve Real-Time PCR Yöntemleri ile Değerlendirilmesi.....	76
3.3.1. Alsiyan Mavisi Boyaması ile Değerlendirme.....	76
3.3.2. İmmunohistokimya Sonuçları.....	79
3.3.3. Real-Time PCR ile Değerlendirme.....	84
4. TARTIŞMA.....	93
4.1. RASKH'lerin İzole Edilmesi ve Mezenkimal Kök Hücre Karakterlerinin ve Farklılaşma Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	93

4.2. Kondrosit Kültürü ve Karakterizasyonu ile Koşullandırılmış Medyum Elde Edilmesi.....	96
4.3. Tek Başına veya TGF- β 3 ve/veya IGF-1 İlave Edilmiş Koşullandırılmış Medyum ile RASKH'lerin Kondrojenik Farklılaştırılması.....	101
4.4. RASKH'nin Kondrojenik Potansiyelinin Alsiyan Mavisi, İmmunohistokimya Boyama ve Real-Time PCR Yöntemleri ile Değerlendirilmesi	103
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	108
ÖZET.....	109
SUMMARY	110
KAYNAKLAR.....	111
ÖZGEÇMİŞ.....	131

ÖNSÖZ

Yapılan tez çalışmasında kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırmasında koşullandırılmış medyumun etkisi incelenmek istenmiş ve daha başarılı farklılaştırma protokollerinin oluşturulması için bilime katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

Bu süreçte; çalışmamda ve tezimi geliştirmemde bana sağladığı muazzam sosyal ve akademik destek için danışman hocam ve yol göstericim Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ'a tüm kalbimle minnet ve teşekkürlerimi iletmek isterim. Kendisi tüm doktora serüvenim boyunca bana her konuda destek vermiş ve bu süreci başarı ile sonlandırmama vesile olmuştur. Ayrıca, hayatımda çok önemli bir yere sahip olan; bana hem abilik, hem hocalık hem de babalık yapan hocalarım Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ ve Prof. Dr. Artay YAĞCI'ya en içten duygularıyla teşekkür etmek isterim. Akademik desteğinin yanı sıra çok değer verdiğim bir akıl hocası olarak hayatıma etkisi her daim sürecek olan Prof. Dr. Artay YAĞCI'ya bir kez daha minnetlerimi sunarım.

Bununla birlikte, yıllardır benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve tez sürecimde detaylı gözlemleriyle beni birçok hatadan kurtaran Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖZDEN AKKAYA'ya teşekkür etmek isterim. Desteği, güler yüzü ve ince düşünceleriyle kendisi benim için bir abla gibi olmuştur.

Beni her zaman hoşgörüsü ve desteği ile onurlandıran çalışmadaki moleküler analizlerin gerçekleştirilmesinde büyük katkı sahibi Doç. Dr. Metin ERDOĞAN'a; her zaman beni bir kardeşi gibi gören ve tez sürecimde de sürekli yanımda olan Prof. Dr. Vural ÖZDEMİR'e; bana diğer çalışmalarında her zaman destek veren ve yardımcı olan Prof. Dr. Aziz BÜLBÜL'e; bana her zaman yakın bir dost gibi davranan Dr. Öğr. Üyesi M. Volkan YAPRAKÇI'ya; beni her zaman neşelendiren ve moralimi yüksek tutmamda yardımcı olan Doç. Dr. Beytullah KENAR'a; tez yazımı esnasındaki revizyonlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Özay GÜLEŞ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Türkiye'de kaldığım süre içerisinde en iyi arkadaşım olan, bana her zaman mental ve teknik anlamda yardımlarını sunan kadim dostum Tayfun DİKMEN'e şükranlarımı sunmak isterim. Ayrıca doktora eğitimim süresince yanımda olan başta Elif Ece AKGÜN, Deniz BİRDAL, Ender Deniz ASMAZ ve Eda KARABÖCEK olmak üzere tüm dostlarıma minnettarım.

Aynı biçimde, laboratuvarımızın eski doktora öğrencilerinden olan Doç. Dr. ASM Golam KIBRIA'ya birlikte çalıştığımız süreçte bana öğrettikleri için; Yrd. Doç. Dr. Abdur Rahman SIAL'e beni Türkiye'de kök hücre biyolojisi çalışmam konusunda teşvik ettiği için teşekkür ederim. Yakın dostum Dr. Waqas AKBAR'a hem dostluğu hem de moleküler ve istatistiksel analizleri nasıl yapacağım konusunda yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca bana her zaman kapısı açık olan, sonsuz desteğiyle kendisini her zaman hatırlayacağım ve minnetle anacağım veteriner hekim Celalettin ÇANKAYA'ya şükranlarımı sunarım. Prof. Dr. İbrahim DEMİRKAN ve Prof. Dr. Gülcan AVCI'ya da Afyon Kocatepe Üniversitesi'ndeki maceram boyunca bana destekleri için teşekkür ederim.

Sayın dekanımız Prof. Dr. Turan CİVELEK'e ve bu çalışmayı gerçekleştirebilmem için laboratuvarımıza maddi destek sağlayan Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine de teşekkür ederim.

Son olarak, beni bugün olduğum kişi haline getiren babam merhum Mehar Said MUHAMMAD olmak üzere bana sağladığı dayanma gücü ve karşılıksız sevgi için annem Razia BİBİ, başta Ahmed NAWAZ olmak üzere sevgili kardeşlerim Dr. Allah NAWAZ, Sumaira SAFDAR'a ve özellikle de bana olan büyük inancı ve sonsuz desteği için sevgili nişanlım Dr. Farkhanda Tariq SATTI'ye şükranlarımı sunarım.

Shah NAWAZ

Veteriner Hekim

SİMGELER VE KISALTMALAR

Δ	Delta
(%)	Yüzde
(-)	Eksi
(/)	Bölü
(+)	Artı
($\pm$)	Artı eksi
($\times$)	Çarpı
$^{\circ}\text{C}$	Derece
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikromolar
3B	3 boyutlu
ACAN	Aggrekan
AF	Amniyotik sıvı
ALP	Alkalen Fosfotaz
ASKH	Amniyotik sıvı kaynaklı kök hücreler
Bapx1	Homeobox homolog 1
bFGF	Temel fibroblast büyüme faktörü
BMP	Kemik morfogenetik proteinleri
Cbfa1	Core-binding factor subunit alpha-1
CD	Farklılaşma Kümeleri
cDNA	Komplementer deoksiribo nükleik asit
CHD	Kalsiyum (Ca^{+2}) bağımlı nöral kaderin
CILP	Matrilin-1, kıkırdak ara katman proteini
CMP	Kıkırdak matriks proteini

c-Myc	Avian myelostomatosis virüs onkojen hücre sel homologu
CO ₂	Karbondioksit
COL	Kollajen
COL2A1	Kollajen tip-II alfa I
COMP	Kıkırdak oligometrik matriks proteini
Co-SMAD	R-SMAD ortak aracılı
CRBP	CREB bağlayıcı protein
CRE	Response element
CREB	CRE bağlayıcı protein
Ct	Döngü eşiği
DAB	3, 3'di-aminobenzidin
DAPI	4, 6-diamidino-2-fenilindol, dihidroklorit
DCN	Dekörin
DEPC	Dietil pirokarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECM	Ekstraselüler matriks
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
Erk 1/2	Hücre dışı sinyal ayarlı kinaz 1/2
ERK	Hücre dışı sinyal düzenleyen kinazlar
FBS	Fötal sığır serumu
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
g	Çelim sabiti
G	L-guluronik asit
GAG	Glikoz amino glikan
GAPDH	Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz
HBSS	Hank'in dengeli tuz solüsyonu
HEPES	1M 4-(2 hidroksi etil)-1-piperazinetansülfonik asit
HG-DMEM	Yüksek glikoz Dulbecco'nun modifiye Eagle medyum

IBMX	3-izobütil-1-metilxksantin
IF	İmmunfloresan
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGFBP	İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein
IHC	İmmunhistokimya
IL	İnterlökinler
IM	İndüksiyon medyum
ITS	İnsülin Transferrin Selenyum
JNK	C-JunNH2-terminal kinazlar
KM	Koşullandırılmış medyum
LG-DMEM	Düşük glikoz Dulbecco's modifiye minimum esansiyel medyum
M	(1→4)-β-D-mannuronik acid
MAD	Mothers Against Decapentaplegic
MEK ½	Hücre dışı sinyal ayarlı kinaz-kinaz 1/2
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorit
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
min	Dakika
MKH	Mezenkimal kök hücreler
mL	Millilitre
mM	Milimol
MMP	Matriks metaloproteinaz
mRNA	Mesajcı RNA
n	Sayı
NANOG	Nanog Homeobox
N-CAM	Ca ⁺² bağımsız nöral hücre adezyon molekülü
NEM	Non-esansiyel amino asit
ng	Nanogram
OA	Osteoarthritis
OCT-3/4	Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktör-3/4
p	Anlamlılık değeri

P	Pasaj
P13K-Akt	Fosfatidilinositol-3-kinaz-Akt
p38-MAPK	p38-mitojen-aktive protein kinaz
PBS	Tamponlu fosfat solüsyonu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF	Trombosit türevi büyüme faktörü
PFA	Paraformaldehit
PKA	Protein kinaz A
PKC α	Protein kinaz C alfa
pmol	Pikomol
PTHrP	Paratiroid hormon ilişkili protein
RAKSH	Rat amniyotik sıvı kökenli kök hücreler
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Dakika başına tur sayısı
R-SMAD	Fosforile edilmiş reseptör regülasyonlu SMAD'ler
RUNX2	Runt-iliskili transkripsiyon faktör
SH	Standart Hata
SHH	Sonik hedgehog
SMA	Small worm fenotip
SOX9	SRY-Box Transkripsiyon faktörü
SSEA-4	Safha spesifik embriyonik antijen-4
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü-beta
TNF- α	Tümör nekroz faktörü-alfa
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Ünit
VEGF	Veziküler endotelyal büyüme faktörü
β	Beta

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Amniyotik sıvının toplanması..	24
Şekil 2.2. Aljinat çözelti, jelasyon ve jel çözündürme solüsyonu.	34
Şekil 2.3. RASKH'lerin aljinat jel içerisine enkapsülasyonu ve hücrelerin 3 boyutlu kültürü.	35
Şekil 2. 4. Kondrojenesis sırasında olaylar dizisi.	35
Şekil 2.5. Real-Time PCR Aşamaları.	43
Şekil 2.6. 10 günlük yeni doğan ratlardan kırkırdak izolasyonunun gösterimi.	44
Şekil 2.7. Kondrosit kültürünün ve KM toplanmasının şematik gösterimi.	48
Şekil 3.1. P0'da hücre kültürünün farklı günlerinde niş görüntüleri.	53
Şekil 3.2. P0'da küçük ve yassı epitel benzeri hücreler (oklar).	54
Şekil 3.3. P0 'da fibroblast benzeri hücreler (oklar). Nikon İnverted Mikroskop.	54
Şekil 3.4. P0'da düzensiz sitoplazmik uzantıları ve 1 veya 2 çekirdekçisi bulunan ve genişlemiş stromal hücreler.	55
Şekil 3.5. P0'da belirgin olarak sıkıca paketlenmiş fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücreler.	55
Şekil 3.6. Farklı pasajlarda fibroblast benzeri morfolojiye sahip RASKH'ler.	56
Şekil 3.7. RASKH'lerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaştırılmaları.	58
Şekil 3.8. Tek tabakalı kültür ve aljinat boncuk kültürü arasında hücre morfolojisinin karşılaştırılması.	59
Şekil 3.9. Aljinat boncuklar içine enkapsüle edilen kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırılması.	60
Şekil 3.10. RASKH'lerde pluripotent kök hücre belirteçleri OCT3/4 ve SOX2 ifadeleri, immunfluoresan boyama.	61
Şekil 3.11. Örneklere ve genlere ait amplifikasyon eğrileri.	63
Şekil 3.12. Dört farklı gene ait melting curve grafiği.	63

Şekil 3.13. Farklı pasajlarda RASKH'lerin SOX2 ve OCT3/4 gen ifadelerindeki kat değişimlerini gösteren Kutu ve Whiskers (bıyık) grafiği.	66
Şekil 3.14. Farklı pasajlarda RASKH'lerin NANOG ve CD90 gen ifadelerindeki kat değişimlerini gösteren Kutu ve Whiskers (Bıyık) grafiği.	67
Şekil 3.15. Farklı pasajlarda RASKH'lerin CD105 ve C44 gen ifadelerindeki kat değişimlerini gösteren Kutu ve Whiskers (Bıyık) grafikleri.	68
Şekil 3.16. Farklı pasajlarda RASKH'lerin CD34 ve CD45 gen ifadelerindeki kat değişimlerini gösteren Kutu ve Whiskers (Bıyık) grafikleri.	69
Şekil 3.17. P1'de kondrositlerin morfolojisi. Poligonal morfolojiye sahip kondrosit.	70
Şekil 3.18. P3'te kondrositlerin morfolojisi. Poligonal morfolojilerini kaybetmiş, genişlemiş kondrositler.(oklar)..	71
Şekil 3.19. Poligonal morfoloji gösteren P0 ve P1' den kondrositler.	71
Şekil 3.20. COL-II ve TGF- β 3 ifade eden kondrositler. İmmunofloresan boyama.	72
Şekil 3.21. Farklı pasajlardaki (P1 ve P5) kondrositlerde SOX9, COL2A1, TGF- β 1, ACAN, COL10A1 ve RUNX2 belirteçlerinin gen düzeyinde ifadelerinin agaroz jel üzerinde gösterimi.	73
Şekil 3.22. Farklı pasajlarda kondrositlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerini gösteren Kutu ve Whiskers (bıyık) grafiği	75
Şekil 3.23. Pozitif kontrol.	77
Şekil 3.24. Pozitif kontrol.	77
Şekil 3.25. KM ve IM gruplarında aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen hücrelerin kondrojenik farklılaşması.	78
Şekil 3.26. KM+IGF-1 ve KM+TGF- β 3 gruplarında aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen hücrelerin kondrojenik farklılaşması.	78
Şekil 3.27. KM+IGF-1+TGF- β 3 ve KM+IM gruplarında aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen hücrelerin kondrojenik farklılaşması.	79
Şekil 3.28. Negatif kontrol.	80
Şekil 3.29. Pozitif kontrol.	80
Şekil 3.30. KM ve IM gruplarında aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen hücrelerin kondrojenik farklılaşması.	81

Şekil 3.31. KM+IGF-1 ve KM+TGF- β 3 gruplarında aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen hücrelerin kondrojenik farklılaşması..	82
Şekil 3. 32. KM+IGF-1+TGF- β 3 ve KM+IM gruplarında aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen hücrelerin kondrojenik farklılaşması..	83
Şekil 3.33. Tüm gruplarda kondrojenik genlerin ifadesinin grafiği.	84
Şekil 3.34. KM grubu Kutu ve Whiskers (bıyık) grafiği.	86
Şekil 3.35. KM+IGF-1 grubu Kutu ve Whiskers (bıyık) grafiği.	87
Şekil 3.36. KM+TGF- β 3 grubu Kutu ve Whiskers (bıyık) grafiği.	88
Şekil 3.37. KM+IGF-1+TGF- β 3 grubu Kutu ve Whiskers (bıyık) grafiği.	89
Şekil 3.38. IM grubu Kutu ve Whiskers (bıyık) grafiği.	90
Şekil 3.39. KM+IM grubu Kutu ve Whiskers (bıyık) grafiği.	91

TABLÖLAR

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Cihazlar.....	19
Tablo 2.2. Sarf ve Kimyasal Malzemeler.....	20
Tablo 2.3. Antikorlar ve Kitler.....	22
Tablo 2.4. RASKH'ler için test edilen genlerin listesi.....	39
Tablo 2.5. cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar ve miktarları.....	42
Tablo 2.6. Real-Time PCR Reaksiyon bileşenleri ve miktarları.	42
Tablo 2.7. Üç Aşamalı PCR Program Döngüsü.....	42
Tablo 2.8. Kondrositlerin ve deney gruplarının primer sekans, baz çift uzunluğu ve Tm değerleri ve Real-time PCR analizinde kullanılan genler.....	47
Tablo 3.1. RASKH'lerde Real-Time PCR ile pluripotent, mezenkimal ve hemapoietik genlerin ifadelerinde kat $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değişikliklerinin istatistiki analizi	65
Tablo 3.2. Farklı pasajlardaki (P1 ve P5) kondrositlerde SOX9, COL2A1, TGF- β 1, ACAN, COL10A1 ve RUNX2 belirteçlerinin gen düzeyinde ifadeleri, Real-Time PCR.....	74
Tablo 3.3. Gruplar arasında kondrojenik belirteçlerin kat ifadelerinin gen düzeyinde karşılaştırılması.	85

1. GİRİŞ

1.1. Eklem Kıkırdığı Anatomisi

Eklemler sinartroz, amfiartroz ve diartroz eklemler olmak üzere üç gruba ayrılır. Sinartroz eklemlerde, komşu iki kemik bağ doku veya kıkırdak bir yapı ile aralıksız bir şekilde birleşir. Bu eklem tipinde kemik yapılar eklemi oluşturuyorsa sinostoz olarak adlandırılır. Amfiartroz eklemlerde kemikler birbirine kıkırdak veya fibrokıkırdak doku ile bağlıdır. Diartroz eklemlerde komşu iki kemik arasında bir boşluk bulunur. Diartroz eklemlerin yapısında eklem kapsülü, eklem boşluğu ve eklem kıkırdığı bulunur. Perikondriyumun bulunmadığı eklem kıkırdığı düzgün bir yüzeye ve yaklaşık 2-5 mm kalınlığa sahiptir. Eklem kıkırdığı, viskoelastik özeliğe sahip düşük sürtünme katsayısı ile eklemlerin yüzeyinde aşınmaya dayanıklı kaygan bir yüzey oluşturarak yüklerin altta yatan subkondral kemiğe aktarımını kolaylaştırır. Hücreden fakir, sinir, kan ve lenf damarlarından yoksun ve hücreler arası matriksten zengin bir dokudur (Carballo ve ark., 2017; Juneja ve ark., 2020; Ulrich-Vinther ve ark., 2003)

1.2. Eklem Kıkırdığı Gelişimi

Kıkırdak ve kemikten oluşan omurgalı iskeleti, üç farklı embriyonik yapraktan köken alan hücrelerin ürünüdür. Kraniofasial iskelet kranial nöral krista hücreleri tarafından oluşturulur, Aksiyal iskelet paraksiyal mezodermden (somitler) köken alır ve ekstremiteler iskeleti lateral plak mezodermal hücrelerin ürünüdür (Olsen ve ark., 2000). Kondrojenesis adı verilen kıkırdak gelişimi esnasında öncelikli olarak lateral mezodermin somatoplöyresindeki mezenkimal hücreler kompakt bir nodül şekillendirir ve hızlı bir şekilde bölünerek önce prekondrositlere ve ardından da kondrositlere farklılaşırlar.

Kondrositlerin iki ana tipi vardır. Bunlar interzon olarak bilinen eklem bölgesinde bulunan ve fenotipik olarak stabil eklem kıkırdağını şekillendirecek periartiküler kondrositler ve proliferasyona uğrayan büyüme plakası kondrositleridir (Koyama ve ark., 2008). Büyüme plağı kondrositleri hipertrofiye uğrayarak kollajen (COL) tip X (COL-X)'u ifade edecekler ve yerini kemik dokusuna bırakacaklardır (Provot ve Schipani, 2005).

1.3. Eklem Kıkırdağı Histolojisi

Eklem kıkırdağı, hücreler arası matrikste bulunan kondrosit ve kollajen ipliklerin organizasyonu açısından 'normal' hiyalin kıkırdağından farklı, özel bir hiyalin kıkırdağı türüdür (Kheir ve Shaw, 2009). Normal eklem kıkırdağı yüzeysel, orta, derin ve kalsifiye olmak üzere dört farklı bölgeden oluşur. Her bir bölgede hücre morfolojisi ve hücreler arası madde kompozisyonu farklıdır (Bhosale ve Richardson, 2008; Pearle ve ark., 2005; Sophia Fox ve ark., 2009).

Eklem kıkırdağının % 10-20'sini oluşturan yüzeysel bölge eklem kayganlığından sorumludur. Yüzeysel bölgenin eklem boşluğuna bakan, hücre içermeyen üst kısmı lamina splendens olarak adlandırılır. Yüzeysel bölgede kollajen iplikler yüzeye paralel seyrederek; kondrositler küçük ve yassıdır. Bu bölgede kondrositler bol miktarda kollajen ve düşük miktarda proteoglikan salgırlar. Bu durum, bu bölgenin su içeriğinin çok yüksek olmasına neden olur (Bhosale ve Richardson, 2008; Jung, 2014). Sadece eklem kıkırdağının bu bölgesindeki kondrositler, bir proteoglikan olan superfisial zon proteini sentezler ve sinoviyal sıvıya salgırlar (Schumacher ve ark., 1994). Bununla birlikte, transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β) 1-3, kemik morfogenetik proteinleri (BMP) 1-6 (Anderson ve ark., 2000; Yamane ve ark., 2007) ve matriks metaloproteinaz (MMP) 1, 3, 8 ve 13 matriks yapımına katılıp, yıkımlanmasına katılmayan bu bölgede ifade olurlar (Tchetina, 2010; Tetlow ve ark., 2001).

Eklem kıkırdığının orta bölgesi, toplam kıkırdak hacminin % 40-60'ını oluşturur. Bu bölgede kalın kollajen iplikler rastgele seyreder. Proteoglikan miktarı yüzeyel bölgeden daha yüksektir ve kondrositler yuvarlak şekilli olmakla birlikte sayıca daha azdır (Bhosale ve Richardson, 2008; Jung, 2014; Sophia Fox ve ark., 2009). Eklem kıkırdığının derin bölgesi eklem kıkırdığının yaklaşık % 30'unu oluşturur. Eklem yüzeyine dik olarak uzanan iri çaplı kollajen iplikler içerir. Proteoglikan miktarı çok yüksektir. Dolayısıyla su miktarı çok düşüktür. Kondrositler iri ve az sayıdadır. Kollajen ipliklere paralel sütun şeklinde gruplar oluştururlar (Bhosale ve Richardson, 2008; Jung, 2014; Sophia Fox ve ark., 2009). Kalsifiye kıkırdak bölgesi derin bölgeden bir gelgit çizgisi ile ayrılır. Derin bölgenin kollajen iplikleri bu tabaka ile subkondral kemiğe sabitlenir. Kollajen iplikler kalındır ve yüzeye dik seyreder. Kondrositler azdır ve hipertroftiktir (Bhosale ve Richardson, 2008; Jung, 2014; Sophia Fox ve ark., 2009). Hidroksiapatit kristallerince zengin kalsifiye kıkırdak bölgesinde COL-X, Alkalen Fosfotaz (ALP) ve MMP 13 gibi hipertrofik belirteçlerinin ifadelerinin arttığı bildirilmektedir (Aigner ve ark., 2001; Pearle ve ark., 2005).

Eklem kıkırdığının beslenmesi, damarlaşmanın olmamasından dolayı sinoviyal sıvıdan basit difüzyon ile sağlanır. Sinoviyal sıvı; su, oksijen ve elektrolitler ile glikoz gibi besin maddeleri içerir (Huber ve ark., 2000; Ulrich-Vinther ve ark., 2003). Eklem kıkırdığında perikondriyumun bulunmaması nedeniyle interstisyel büyüme, ergenliğe kadar aktif kalarak bir şekilde hasarı telafi edebilmektedir. Ancak, ağırlık taşıyan yüzeyler ve eklem kıkırdığı üzerindeki hasarın derecesi, subkondral bölgeye kadar kıkırdığa uzunlamasına doğru ulaşıyorsa, kondrositler ve periferdeki kök hücreler hasarla baş edemez. Bunun sonucunda osteoartritisteki gibi fibröz bağ dokusunun veya fibröz kıkırdığın, hatta bazen kemiğin bile şekillenmesine yol açabilir. Bu gibi durumlar üzerine yapılan araştırmalar, kök hücreler ile kontrollü tedavinin, hasarlı parçanın iyileşmesine ve yenilenmesine yardımcı olabileceğini düşündürmüştür (Barry, 2003).

Gelişen fötusta kıkırdak dokusu, primer destek dokusu olarak iskelet görevi görür. Doğası gereği damar içermez ve perikondriyum adı verilen membranöz bir yapı içerisindeki kıkırdak yoğunlaşmasından kaynaklanır. Perikondriyumda mezenkimal hücrelerin yanı sıra

fibroblast hücreleri de bulunur. Kondrojenik merkezlerdeki veya perikondriumdaki mezenkimal hücreler, kondroblast adı verilen aktif olarak sentezlenen hücelere farklılaşır (Alford ve Cole, 2005). Bu hücreler genellikle perikondrium sınırının yakınında bulunan ve aktif salgılarıyla kendilerini çevreleyen düz veya yassı hücrelerdir. Glikozaminoglikanlar ve kollajen iplikler bakımından zengin olan hücrelerin salgısı viskoz bir matriks oluşturur. Bu matriks içerisinde lakun adı verilen boşluklarda yer alan bu hücreler kondrositler olarak adlandırılır (Banks, 1993). Eklem kıkırdağının farklı bölgelerinde kondrositlerin şekli, sayısı ve büyüklüğü değişir. Örneğin; yüzeysel bölgede kondrositler yassı, küçüktür ve derin bölgelere göre daha fazla sayıdadır (Sophia Fox ve ark., 2009). Kollajen ve proteoglikanların sentezi ve salgılanması ile ilişkili granüler endoplazmik retikulum ve golgi kompleksinden zengindirler (Revel ve Hay, 1963; Stockwell, 1978). Kondrositler, nadiren bölünebilen (Sophia Fox ve ark., 2009), metabolik olarak aktif hücrelerdir. Eklem kıkırdağının toplam hacminin %10'undan daha az bir hacmini kaplarlar (Bhosale ve Richardson, 2008; Ulrich-Vinther ve ark., 2003). Kondrositler hücreler arası matriks tarafından iletilen mekanik, elektrik ve fizikokimyasal sinyalleri alırlar ve metabolik aktivitelerini düzenleyerek cevap verirler (Huber ve ark., 2000). Kondrositlerin fonksiyonu kollajen ve proteoglikandan meydana gelen hücreler arası matriksi salgılamaktır. Hücreler arası matriksin çoğunluğunu kollajen iplikler oluşturur ve kollajen ipliklerin %90-95'i COL-II'dir. Küçük oranda olmak üzere COL I, IV, V, VI, IX ve XI' de bulunur (Sophia Fox ve ark., 2009). Kalsifiye bölge COL-X içerir (Bhosale ve Richardson, 2008).

Her kondrosit ince, perisellüler bir matriks ile çevrilidir. Bu matriks kondrosite hidrodinamik bir koruma sağlar (Bhosale ve Richardson, 2008); perisellüler matriks COL-VI içerir ayrıca proteoglikanlar ve hücre zarı ile ilişkili molekül ankorin CII (Ja, 1997) ve dekorin (DCN) gibi kollajen olmayan proteinlerden zengindir (Bhosale ve Richardson, 2008). Teritoriyal matriks, kondrositlerin veya kondrosit gruplarının perisellüler matriksini çevreler. Teritoriyal matriksteki ince kollajen fibrilleri kondrositin etrafını bir sepet gibi sarar. İnterteritoriyal matriks eklem kıkırdağının büyük bir kısmını kaplar. Kondrositlerin çevresinde bulunmaz. Daha kalın kollajen iplikler içerir ve bu iplikler eklem kıkırdağının bölgelerine göre farklı yönlerde seyrederek (Ja, 1997). Eklem kıkırdağında ikinci en büyük

yoğunluktaki grubu proteoglikanlar oluşturur. Eklem kıkırdığının fonksiyonunda önemli olan proteoglikanlar; aggrekan (ACAN), DCN, biglikan ve fibromodulindir. En büyük ve ağırlıkça en fazla bulunan 100 den fazla kondroitin sülfat ve keratan sülfat zincirine sahip olan ACAN'dır. Daha küçük ve az bulunan DCN ve biglikan sırasıyla 1 ve 2 dermatan sülfat zincirine sahipken, fibromodulin birkaç keratin sülfat zincirine sahiptir (Sophia Fox ve ark., 2009). Eklem kıkırdığının hücreler arası matriksinde kıkırdak oligometrik matriks proteini (COMP), kıkırdak matriks proteini (CMP) veya matrilin-1, kıkırdak ara katman proteini (CILP), fibronektin, fibrillin ve elastin gibi kollajen veya proteoglikan olmayan yapısal proteinler de bulunmaktadır (Ondrésik ve ark., 2017).

Transkripsiyon faktörü olan SRY-Box Transcription factor (SOX)9 kondrojenesis esnasında önemli bir rol üstlenir. Bu transkripsiyon faktörü tüm kondroprogenitor hücrelerde ve kondrositlerde bulunurken, hipertrofik kondrositlerde bulunmaz (Ng ve ark., 1997; Zhao ve ark., 1997). SOX9; COL-II, ACAN ve COL-X gibi kıkırdağa spesifik proteinlerin üretilmesi için gereklidir (Akiyama ve Lefebvre, 2011). Kondrositler kararsız bir fenotipe sahiptir. Bununla birlikte hipertrofik veya fibroblastik formlara tekrar farklılaşarak zayıf ve bozuk bir matriks oluşumunun şekillenmesine yol açabilirler (Hall, 2019). İdiopatik osteoartrit oluşum süreci gibi patolojik durumlarda hücreler arası matriks içerisinde bulunan kondrositler değişime uğrarlar. Bu değişim sonucu hücreler arası matrikste sağlıklı kondrositlerle birlikte, dejenere kondrositler ve çok sayıda fibroblast benzeri kondrositler şekillenir (Tesche ve Miosge, 2005). Fibroblast benzeri kondrositler, COL-II yerine COL-I ile birlikte DCN ve biglikan gibi proteoglikanları sentezlerler (Bock ve ark., 2001; Miosge ve ark., 2004; Miosge ve ark., 1998). Bununla birlikte kondrositler hacim ve büyüklüklerini arttırarak hipertrofiye uğrarlar. Hipertrofik kondrositler yüksek düzeyde COL-X, runt-ilişkili transkripsiyon faktör (RUNX2) ve MMP13 ifade ederler. Hipertrofik hücrelerde COL-II, ACAN ve SOX9 azalır (Rim ve ark., 2020).

1.4. Koşullandırılmış Medyum

Çok hücreli yapı olgusunun ortaya çıkışı, hücreler arası ortamın stabil olarak sürdürülebilmesine yönelik pek çok mekanizmanın geliştirilmesine önderlik etti. Hücrelerin, hücreler arasına maddeleri salgılayabilme ve zenginleştirebilme kabiliyetleri bilinmektedir. Hücreler arası ortamdaki maddelerin, hücresel aktivitelerin önemli düzenleyicileri olduğu da düşünülmektedir (Meier ve ark., 1973).

Kıkırdak doku, çevresindeki hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını etkileyebilen, büyük miktarda humoral faktörlerin salgılanmasından sorumlu, parakrin bir organ olarak tanımlanabilir (Bos ve ark., 2001). Benzer şekilde, eklem yüzeyinden izole edilen kondrositler, kök hücrelerin farklılaşma durumunu etkiler. Ayrıca kondrogenesis ve osteogenesisi yönlendirebilen humoral faktörleri ve interlökinleri salgılama potansiyelleri vardır (Hwang ve ark., 2007). Mezenkimal kök hücreler ve kondrositler arasında iyi bir iletişim potansiyelinin olduğu düşünülmektedir (Cooke ve ark., 2011). Kondrositler tarafından salgılanan faktörler, kök hücre farklılaşması sürecinde büyüme faktörlerine alternatif olarak da kullanılabilir (Alves da Silva ve ark., 2015). Bu nedenle, büyük miktarda kondrosit izole etmek ve bunları otolog terapötik yaklaşımlar için kullanmak yerine; kontrollü bir mikro ortamda, hücreler arasındaki etkileşim mekanizmasını kullanarak, hücrelerin büyüme faktörlerini salgılama potansiyellerinden yararlanıp bunu farklı dokulardan köken alan kök hücrelerin farklılaşması için kullanmak çok daha uygun bir yaklaşım olacaktır.

Koşullandırılmış medyum (KM), belirli koşullar altında sadece kültüre edilen hücrelerden toplanan medyumdur. Kültüre edilen hücreler tarafından ortama salgılanan çeşitli metabolitler (glikoz, amino asitler ve nükleositler), interlökinler (IL) (Fu ve ark., 2019), çok sayıda büyüme faktörü [(epidermal büyüme faktörü (EGF), TGF- β , insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF)] (Liu ve ark., 2012) ve paratiroid hormon–ilişkili protein (PTHrP) içerir (Fischer ve ark., 2010). Yapılan çalışmalarda, kondrositlerden elde edilen KM'nin içerdiği belirli metabolitler ve çözünmüş

faktörlerden dolayı, kondrositlerde kollajen ve mukopolisakkarit sentezini arttırdığı saptanmıştır (Meier ve ark., 1973).

Dolayısıyla eklem kıkırdağından izole edilen kondrositlerin kültürlerinden toplanan koşullandırılmış medyumun, kök hücrelerin kondrositlere farklılaşma potansiyellerini hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak arttırabileceğini düşünüyoruz. Bu moleküler, mekanizmanın daha iyi anlaşılabilmesi için kondrogenesis mekanizmasına iyi hakim olunması gerekmektedir.

1.5. Kondrogenesisin Hücresel ve Moleküler Mekanizması

Kondrogenesis, mezenkimal kök hücreler (MKH)'in yoğunlaşması ve çoğalması ile başlar. Daha sonra spesifik büyüme ve farklılaşma faktörlerinin kontrolü altında MKH'lerin kondroblastlara ve kondrositlere farklılaşmaları ile sonlanır. Hücre yoğunlaşması, hücrelerin göçü ile başlar ve bunu hücrelerin çoğalarak bir araya toplanması izler (Ahmed ve ark., 2007; Alford ve Cole, 2005; Delise ve ark., 2000; Goldring ve ark., 2006).

Kondrogenesis sürecinde kondroprogenitör hücrelerin yoğunlaşması belirli hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin tesisi ile tetiklenir. Belirli hücre-hücre bağlantıları ile kalsiyum (Ca^{+2}) bağımlı nöral kaderin (CHD) ve Ca^{+2} bağımsız nöral hücre adhezyon molekülü (N-CAM) gibi yapışma molekülleri arasındaki karşılıklı etkileşimlerin yanı sıra oluklu bağlantıların da bu sürecin önemli düzenleyicileri olduğu düşünülmektedir (Oberlender ve Tuan, 1994; Tavella ve ark., 1994; Widelitz ve ark., 1993). Hem CHD, hem de N-CAM yoğunlaşan mezenşimde ifade olurken, farklılaşan kıkırdakta kaybolmaktadır (Oberlender ve Tuan, 1994; Tavella ve ark., 1994; Widelitz ve ark., 1993). Hücre-hücre iletişimi MKH'lerin hücreler arası matriksi tarafından düzenlenmektedir. Yoğunlaşma süreci başlamadan hemen önce MKH'ler COL-I (Dessau ve ark., 1980), hyaluronan (Knudson ve Toole, 1985) ve fibronektinden (Dessau ve ark., 1980; Kulyk ve ark., 1989) zengin bir hücreler arası matriks üretirler. Yeni sentezlenmiş olan bu hücreler arası matriks hücre hareketliliğini inhibe ederek hücre-hücre etkileşimini sınırlı tutar. Fakat yoğunlaşma

başladığında hyaluronidaz aktivitesindeki artış, hücreler arası matriksteki hyaluronan miktarında düşüşe sebebiyet verir ve bu da daha yakın bir hücre-hücre etkileşimi sağlar (Knudson ve Toole, 1987; Toole ve ark., 1972). Mezenkimal hücreler yoğunlaşmaya ve yuvarlak kondrositlere farklılaşmaya başladıkça hücreler arası matriks üretiminde COL-I yerini hızla COL-II'ye bırakır ve olgun kıkırdığın kondrositlerinin etrafında kondroitin sülfattan zengin ACAN, tenaskin (TN) gibi sülfatlanmış proteoglikanlar görülür (Doege ve ark., 1991; von der Mark ve ark., 1976).

Hücre-hücre etkileşimine ek olarak hücre-matriks etkileşimleri de MKH'lerin yoğunlaşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Yoğunlaşma ile kondrojenize uğrayan hücreler, integrin adı verilen hücre membranına bağlı adhezyon reseptörleri ile hücreler arası matriksteki fibronektine bağlanırlar (Gehris ve ark., 1997; Stupack ve Chersesh, 2002). Fibronektin, yoğunlaşma sürecinin hemen öncesinde MKH'ler tarafından hücreler arası matrikste üretilir ve fibronektin ifadesi hücrel yoğunlaşmanın olduğu alanlarda artarken (Dessau ve ark., 1980; Kulyk ve ark., 1989) hücre farklılaşmasının devam ettiği alanlarda ise azalır (Delise ve ark., 2000). Fibronektinin matrikse bağlı bir translokasyon ile MKH'lerin hücrel yoğunlaşma alanlarına lokalize olmasını sağladığı ve bu sürecin amino terminal heparin bağlanma bölgesi aracılığı ile olduğu öngörülmektedir (Frenz, Akiyama, ve ark., 1989; Frenz, Jaikaria, ve ark., 1989).

Yoğunlaşmayı takip eden farklılaşma aşaması, fibronektinin sindekana bağlanmasına yardımcı olan hücre matriks etkileşimlerini kapsar. Kondrojeniz sırasında hücreler arası matriks sentezi, COMP yanında TN, matrilliner ve thrombospondinlerin ifadeleri ile ilişkilidir. Bunun yanı sıra, kondrojenizsin farklılaşma evresi esnasında COL-II, IX ve XI ortaya çıkarken, COL-I ve fibronektin ortamdaki kaybolur. Bu olaylar dizisi, kondroprogenitör hücrelerin olgun kondrositlere farklılaşmasına yol açar. Erken kondrojeniz sırasında kök hücreler başlangıçta latent kondrositlere farklılaşır. Hiyalin kıkırdakta, bu tip kondrositler stabil olarak korunur (Goldring ve ark., 2006; Hidaka ve Goldring, 2008; Mastrogiacomo ve ark., 2001). Kondrojeniz esnasında uzun ve fibroblast

benzeri kondroprogenitör hücreler, yuvarlak kondroblast ve kondrosit benzeri hücrelere dönüşürler (Matta ve ark., 2019).

Kondrogenezisin temel düzenleyicileri TGF- β süper ailesinin üyeleri, wiggless-tip (WNT) sinyal yolağının üyeleri, FGF ve IGF'dir (Keller ve ark., 2011). TGF- β süper aile üyelerinin 3 tip izoformu vardır. Bunlar: TGF- β 1, β 2 ve β 3'tür. Tüm izoformlar içerisinde en yüksek kondrojenik potansiyele sahip olanı TGF- β 3'tür ve hızlı hücre farklılaşmasına neden olur (Mueller ve ark., 2010).

TGF- β ve BMP'ler, hücre içi bölgelerinde serin / treonin kinaz aktivitesi içeren spesifik reseptörlerin hücre dışı bölgelerine bağlanır ve hücre içine sinyal iletimi için small worm fenotip (SMA) ve Mothers Against Decapentaplegic (MAD) ile ilgili (SMAD) proteinlere gereksinim duyarlar. Ligandın reseptöre bağlanması sonucu, bir alt birimin serin / treonin kalıntıları üzerindeki eş alt birime fosforilasyonuna neden olan reseptörün homodimerik kompleksleri oluşur. Bu süreç SMAD proteinlerinin fosforilasyonunu içeren bir dizi olayları başlatır. TGF- β yolağı, SMAD 2 ve SMAD 3 gerektirirken, BMP sinyali ise SMAD 1, 5 ve 8'e ihtiyaç duyar. Fosforile edilmiş reseptör regülasyonlu SMAD'ler (R-SMAD), bir heterokompleks oluşturmak için SMAD 4 ile reaksiyona girer. R-SMAD ve ortak aracılı SMAD'dan (Co-SMAD) oluşan bu kompleks, çekirdeğe girer ve hedef genlerin promotörlerine bağlanarak onların transkripsiyonunu kontrol eder (Massagué ve ark., 2005). Hücresel süreçlerin düzenlemesinde diğer yollara örnek olarak; hücre dışı sinyal düzenlenen kinazlar (ERK), C-JunNH2-terminal kinazlar (JNK) ve p38-mitojen-aktif protein kinaz (p38-MAPK) yolağı verilebilir (Danišovič ve ark., 2012). Protein kinaz A (PKA), önemli substratların Serin / Treonin kalıntılarının fosforilasyonu ve hedef genlerin promotörlerindeki siklik adenosin 3, 5p-monofosfat response element (CRE) bölgelerine bağlanan CRE bağlayıcı protein (CREB) yoluyla siklik adenosin 3, 5p-monofosfat (cAMP) duyarlı genlerin ifadesini indirek olarak düzenleyerek bu etkileri güçlendirir. PKA ayrıca kondrogenezisi, kondrogenezis esnasında mezenkimal hücrelerin sitozol ve membran fraksiyonlarındaki protein kinaz C alfa'nın (PKC α) aktivasyonu yoluyla da düzenler (Chang ve ark., 1998; Matta ve ark., 2019). Bununla birlikte PKA, transkripsiyon faktörü SOX9'u

fosforilize eder. Fosforilasyon SOX9'un çekirdeğe transferine ve bu genlerin transkripsiyonel aktivitelerinin artışına neden olur (Danišovič ve ark., 2012; Massagué ve ark., 2005). SOX ailesinin birçok üyesi (L-Sox5 ve Sox6) kondrojenizde rol oynamasına karşın, kondrojenik farklılaşmanın başlaması için gerekli olan transkripsiyon faktörü SOX9'dur. SOX9'un ifadesi, bagpipe homeobox homolog 1 (Bapx1) geninin ifadesini indükleyen sonik hedgehog (SHH) transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenir ve dolaylı olarak SOX9 ifadesini artırır. BMP'lerle işbirliği içinde, Bapx1 ve SOX9 arasında kondrojenik faktörlerin ifadesini etkileyen pozitif bir geri besleme mekanizması bulunmaktadır (Dong ve ark., 2012).

SOX9 ve RUNX2 arasındaki etkileşimler kondrojenizisin temel düzenleyicileridir. Ancak fonksiyonları bakımından farklılıklar göstermektedirler. SOX9 eklem kıkırdak oluşumunu sağlarken, RUNX2 hücrelerin hipertrofik olgunlaşmasında rol oynar (Goldring, 2012). Her iki faktör de mezenkimal hücre yoğunlaşması sürecinden terminal kondrosit hipertrofisine kadar tüm kondrojenik süreç boyunca ifade edilir. SOX9'un temel işlevi, kollajen tip-II alfa I (COL2A1) genini ve diğer kıkırdak belirteçlerinin gen ifadelerini aktive ederek hücre canlılığını sağlamaktadır (Dong ve ark., 2012). SOX9'un CREB bağlayıcı protein (CRBP) / p300 ile oluşturduğu kompleks, belirli kondrojenik genlerin ifadelerini SOX9'un karboksil terminal bölgesi aracılığıyla indüklemektedir (Eslaminejad ve ark., 2013).

IGF'ler iskelet gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. IGF'ler hücre proliferasyonunu uyarmanın yanı sıra apoptozu ve kondrojenik belirteçlerin ifadelerini de düzenler. IGF'lerin hücresel yanıtı, tirozin kinaz yapılı tip I reseptörü (IGF-IR) aracılığı ile gerçekleşir. IGF'lerin, reseptörlere bağlanma süreci dört sinyal yolunun aktivasyonu ile gerçekleşir. Bunlar; MAP kinaz, hücre dışı sinyal ayarlı kinaz-kinaz 1/2 (MEK 1/2), hücre dışı sinyal ayarlı kinaz 1/2 (Erk 1/2) ve fosfatidilinositol-3-kinaz -Akt (P13K-Akt)'dir (Longobardi ve ark., 2006; Phornphutkul ve ark., 2004).

Embriyonik dönemde, endokondral kemikleşme esnasında kondrosit farklılaşma süreçleri kemik oluşumuna neden olmaktadır. Olgunlaşan kondrositler çoğalır, metabolik

aktivitelerini arttırır ve COL-X'u biriktirip ALP üretirken hacimce büyür. Terminal farklılaşmanın son aşaması; mineralizasyon, vaskülarizasyon, kemik hücrelerinin ve kemik iliği hücrelerinin yaygınlaşması ile karakterizedir (Longobardi ve ark., 2006).

1.6. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, ilgilenilen dokuyu fonksiyonel olarak taklit edebilen bir biyolojik doku yapısı oluşturmak için hücreler, doku iskeleleri ve biyokimyasal sinyaller arasındaki etkileşimleri inceler. Doku mühendisliğindeki üç boyutlu çerçeveler ve iskeleler, karmaşık hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri için bir platform geliştirmeye yardımcı olur ve doğal hücreler arası matriksin özelliklerini taklit eder (Langer ve Tirrell, 2004). Steward ve ark. (2011), kondrojenesis sırasında üç boyutlu kültür için uygun iskele seçiminin çok önemli olduğunu; iskelenin proliferasyon ve farklılaşma gibi hücre fonksiyonları üzerine oldukça büyük etkilerinin olduğunu belirtmiştir. Stupack ve Cheresch (2002) iskelelerin hücre bağlantıları üzerinden sinyalleri hücre içerisine ileterek proliferasyon ve farklılaşma üzerine etkidiğini göstermiştir. Kıkırdak doku mühendisliğinde iskele içerisinde hücre adhezyonunun rolü muğlaktır ve iskele türü, kültür koşulları ve hücre farklılaşmasının aşamasına göre değişmektedir. Çalışmalar kollajen ve fibrin jeller gibi hücre bağlanmasını sağlayan adherent iskeleler ile aljinat ve agaroz hidrojeller gibi hücre bağlanmasını desteklemeyen, non-adherent iskeleler olmak üzere iki tip iskele tanımlamaktadır (Steward ve ark., 2011). Her iki tip iskelenin de kondrojeniziste başarılı sonuçlar verdiği kanıtlanmıştır. Kollajen iskeleler, integrin reseptörleri aracılığı ile hücre etkileşimini arttırırlar (Loeser, 2014; Nuernberger ve ark., 2011). Kollajen jel benzeri iskeleler kondrosit proliferasyonunu arttırsa da uzun süreli integrin bağlantıları düzleşmiş yapılara, kondrositlerin de-diferensiye olmasına ve fibroz kıkırdak veya kalsifiye kıkırdak gibi yapıların meydana gelmesine neden olur (Steward ve ark., 2011). Diğer yandan aljinat ve agaroz benzeri hidrojellerde de-diferansiyasyona yol açmadan hücre fenotipi korunur ve daha fazla glikoz amino glikan (GAG) üretimi sağlanır (Benya ve Shaffer, 1982).

1.7. Aljinat Boncuklar

Aljinat doğal olarak üretilen polisakkarittir ve biyouyumluluk ve kolay jelleşmesi gibi elverişli özellikleri nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılan bir biyomalzemedir. Yapay hidrojel hücreler arası matriks olarak kullanılır (Lee ve Mooney, 2012; Smidsrød ve Skja, 1990).

Yapısal olarak (1→4)-β-D-mannuronik acid (M) ve α-L-guluronik asit (G) birimlerine sahip olan sodyum aljinat, MM- veya GG-bloklarından oluşan homopolimerik dizileri ve birbirlerinin içine dağılmış MG- veya GM-bloklarını içeren heteropolimerik dizileri oluşturur (Aslani ve Kennedy, 1996; Haug ve Larsen, 1966; Haug ve ark., 1969; Sriamornsak ve ark., 2007). Sodyum aljinat, iki veya üç değerlikli katyonların varlığında iyonotropik jelasyonla birbirine bağlı gözenekli jeller oluşturur (Wang ve ark., 1993). İki değerlikli kalsiyum katyonu, bir yumurta viyolündeki yumurta gibi gulukonat yapılarına sığma yeteneğine sahiptir (Schettini ve ark., 2013). Sonuç olarak; kalsiyum, aljinat zincirlerini birleşme bölgeleriyle birbirine bağlar ve sırayla çözeltinin jelleşmesine yol açar. Normal koşullar altında Ca^{+2} iyonlarının mevcudiyetinde iyonotropik jelasyon yoluyla suda çözünmeyen sodyum aljinat jelinin olağanüstü kabiliyeti, hem makromoleküler ajanların (Bowersock ve ark., 1999; Mandal ve ark., 2010; Polk ve ark., 1994) hem de düşük molekül ağırlıklı terapötik ajanların kapsüllenmesini mümkün kılmıştır (Cui ve ark., 2001; González-Rodríguez ve ark., 2002; Halder ve ark., 2005). Gazların ve besin maddelerinin aljinat hidrojelinden rahat geçebilmesi sayesinde aljinat jel içerisine enkapsüle edilen hücreler canlılıklarını korurken, çoğalma ve farklılaşma yeteneklerini de kaybetmezler (Debnath ve ark., 2015). Aljinat boncuklarının boyutu, içerisindeki biyolojik materyali içerecek kadar büyük olmalıdır ve enkapsüle edilen hücrelerin aljinat içerisinde homojen olarak dağılması önemlidir (Andersen ve ark., 2015). Aljinat, düşük toksisiteye sahip olmakla birlikte bağlantı bölgelerinin olmaması vasıtasıyla hücrelerin küre şeklini korumasına yardımcı olur ve hücreler için bir immobilizasyon matriksi gibi hareket eder (Smidsrød ve Skja, 1990). Aljinat, bağlanma noktası içermiyor oluşu nedeniyle çoğu zaman farklılaştırmayı kuvvetlendirmek adına daha fazla hücre-matriks etkileşimi sağlayacak şekilde biyomateriyaller eklenerek

yapısal olarak modifiye edilir (Park ve ark., 2017; Stenvik ve ark., 2012). Çalışmalar, aljinat jel içine gömülmüş yetişkin eklem kondrositlerinin, enkapsülasyondan 8 ay sonra bile kollajenler ve proteoglikanlar açısından zengin bir matriks içerdiğini (Lindenhayn ve ark., 1999; Pittenger ve ark., 1999), ayrıca serum içermeyen kondrojenik indüksiyon ortamı kullanılarak aljinat boncukları içinde kültüre edilen MHK'ların COL2A1 ve COL10A1'i ifade ettiği belirtilmiştir (Ma ve ark., 2003). MHK'lar üzerinde yapılan çeşitli kondrojenik farklılaşma çalışmaları, aljinat boncukların kondrogenez için spesifik bir iskele olabileceğini savunmaktadır (Awad ve ark., 2004; Kurth ve ark., 2007; Steinert ve ark., 2003; Xu ve ark., 2008).

1.8. Amniyotik Sıvı Kaynaklı Kök Hücreler

Yenileyici tıptaki son keşifler, terapötik potansiyele sahip yeni kök hücre kaynaklarının araştırılmasını arttırdı (Loukogeorgakis ve De Coppi, 2017). Bu alandaki adaylardan birisi de amniyotik sıvıdır. Amniyotik sıvı, peptidler (Tong ve ark., 2009), büyüme faktörleri (Kurauchi ve ark., 1995; Merimee ve ark., 1984; Scott ve ark., 1989) antibakteriyel maddeler (Underwood ve ark., 2005), yavruya ait solunum yolu akıntıları, idrar ve gastrointestinal atıkların (Cananzi ve De Coppi, 2012) bileşiminden oluşur. Bu nedenle amniyotik sıvı, hem fötüs hem de amniyotik membrandan köken alan heterojen bir hücre popülasyonuna sahiptir (Chen ve ark., 2014; Klemmt ve ark., 2011; Loukogeorgakis ve De Coppi, 2017; Underwood ve ark., 2005). Bu hücre popülasyonu içinde kök hücrelerin varlığı (Klemmt ve ark., 2011) amniyotik sıvıyı, kök hücre çalışmaları ve yenileyici tıpta terapötik yaklaşımlar için ilgi çekici hale getirmiştir. Amniotik sıvı kaynaklı kök hücreler (ASKH) amniyosentez ile tanı amaçlı alınan amniyotik sıvıdan etik problemler olmadan kolayca elde edilebilmelerinin (Cananzi ve De Coppi, 2012) yanısıra immün modülasyon (Moorefield ve ark., 2011), yüksek proliferasyon (Zheng ve ark., 2008), multipotensi (Kim ve ark., 2007) ve düşük tümör oluşturma riski (Paolo De Coppi ve ark., 2007) gibi özellikleriyle ön plana çıkmaktadır. ASKH'lerin ayrıca cluster of differentiation (CD) 29, CD44 (Tsai ve ark., 2004; Weber ve ark., 2016), CD73 (Markmee ve ark., 2017), CD90, CD105 (Tsai ve ark., 2004), CD117 (Cananzi ve De Coppi, 2012), CD133 (Spitzhorn ve ark., 2017) ve safha spesifik

embriyonik antijen-4 (SSEA-4) (Moschidou ve ark., 2013) gibi mezenkimal kök hücre yüzey belirteçlerini ifade etmelerinin yanı sıra Nanog Homeobox (NANOG), SOX2 (Nawaz ve ark., 2020; Savickienė ve ark., 2016), oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktör-4 (OCT-4) (Moschidou ve Guillot, 2012; Prusa ve ark., 2003) ve avian myelostomatosis virüs onkojen hücrel homolog (c-Myc) (Moschidou ve Guillot, 2012) gibi pluripotent kök hücre belirteçlerini de ifade etmeleri, bu hücrelere embriyonik kök hücreler ile indüklenmiş pluripotent kök hücreler arasında bir geçiş formu özelliği kazandırır (Moschidou ve Guillot, 2012; Pappa ve Anagnou, 2009; Prusa ve ark., 2003). Bunun yanı sıra ASKH'lerde majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf II antijen düzeyinin düşük olmasına (De Coppi ve ark., 2007) bağlı olarak zayıf antijenik özellikleri bu hücrelerin allogenik uygulanmasını da mümkün kılar. Bu durum, yenileyici tıp alanına yeni bir açılım getirerek günümüzdeki ASKH'lerin terapötik yaklaşımlarına ilişkin çalışmalara farklı bir boyut kazandırmıştır. Günümüzde çeşitli hastalık ve rahatsızlıkların ASKH ile tedavisini amaçlayan araştırmalar, insan kaynaklı ASKH'lerin deney hayvanı modellerine uygulanması (Bollini ve ark., 2011; Dupont ve ark., 2010; Srivastava ve ark., 2018) şeklinde ortaya çıkmaktadır.

İnsanlarda ve çeşitli hayvanlarda yapılan çalışmalarda ASKH'lerin; adipositlere, kemik hücrelerine, kondrositlere (Kim ve ark., 2007; Nawaz ve ark., 2020); sinir hücrelerine (Kim ve ark., 2007), hepatositlere (De Coppi ve ark., 2007; Zheng ve ark., 2008) kas hücrelerine (De Coppi ve ark., 2007), akciğer epitel hücrelerine (Carraro ve ark., 2008) ve böbrek hücrelerine (Minocha ve ark., 2019; Perin ve ark., 2007) farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Bu nedenle ASKH'lerin yenileyici tıpta kardiyovasküler bozukluklar (Chiavegato ve ark., 2007; Weber ve ark., 2016), yara iyileşmesi (Skardal ve ark., 2012), akciğer hastalıkları (Buckley ve ark., 2011), kemik (Dupont ve ark., 2010) ve sinir (Pan ve ark., 2007) doku yenilenmesi gibi alanlarda kullanımına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır.

ASKH'nin kondrojenik potansiyele de sahip olduğunun keşfedilmesi insan ve hayvan sağlığında önemli bir problem olan eklem dejenerasyonlarının tedavisinde bir umut ışığı olmuş ve bu alana yönelik çalışmalara farklı bir boyut kazandırmıştır. Kunisaki ve ark. (2006) yaptıkları araştırmalarında ASKH'leri; insülin, transferrin, sodyum selenit (ITS),

deksametazon, L-prolin, askorbik asit ve TGF- β 2 ve IGF-1 içeren kültür ortamında kondrositlere farklılaştırmışlar ve fetal hiyalin kırıkla karşılaştırdıklarında bu hücrelerde benzer düzeyde GAG bulunduğunu gösterirken; COL-II konsantrasyonunun daha az miktarda olduğunu ortaya koymuşlardır. Daha sonraki çalışmalarda Kolambkar ve ark. (2007) TGF- β 1, TGF- β 3, BMP-2 gibi farklı büyüme faktörlerini de ilave ettikleri kondrojenik indüksiyon medyumunda 3 haftalık kültür sonrası ASKH'lerin kondrositlere farklılaştıklarını ve bu kondrositlerin GAG ve COL-II ürettiklerini belirlemişlerdir. Araştırmacılar, TGF- β ilavelerinin kondrojenik farklılaşmayı uyarırken, IGF-I ilavesinin de GAG üretimini artırdığını öne sürmüşlerdir (Kolambkar ve ark., 2007).

Yenileyici tıp alanına yönelik ilk olarak Kunisaki ve ark. (2006) koyun ASKH'lerinden kırıkta üretirken son yıllarda Zavatti ve ark. (2020) osteoartrit vakalarında hem ASKH hem de bu hücrelerden elde edilen eksozomların kırıkta onarımında başarılı olduğunu göstermişlerdir.

Bu hücrelerin kırıkta onarımında kullanılabileceğinin uzun süre önce ifade edilmesine rağmen (Kolambkar ve ark., 2007) bu alandaki çalışmalar yeterli düzeye ulaşamamış ve sınırlı kalmıştır. Bu nedenle ASKH'ler için eklem kırıkta defektlerinde ve osteoartrit (OA) tedavisinde basamak oluşturacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

1.9. Problemin İfadesi

Günümüzde kırıkta dokuda en sık görülen rahatsızlıklardan birisi OA'dır. OA; dünyadaki en yaygın kas-iskelet sistemi hastalıklarından biridir. OA, dünya genelinde kadınlarda 4.; erkeklerde ise 8. en sık görülen hastalıktır (Murray ve ark., 1996). 2017 yılında dünya genelinde 303 milyon insanı etkilediği saptandı (James ve ark., 2018). OA, en sık rastlanan sakatlık nedenleri sıralamasında 2012 yılında 15. sıradan 11. sıraya yükselmiştir (Vos ve ark., 2012) ve gelişmiş ülkelerde, OA yaşlı bireylerde, özellikle iş gücünde aktif olanlarda en sık görülen 10 sakatlıktan biridir (Palmer ve Goodson, 2015; WHO, 2020).

Yapılan çalışmalara göre, kıkırdak hasarını tamir etme veya yenilemede eklem kıkırdığının karmaşık yapısal ve fonksiyonel özellikleri nedeniyle %100 başarı sağlayan bir tedavi yöntemi henüz geliştirilememiştir (Kloppenburger ve Berenbaum, 2020). Kemik iliği, yağ doku, sinoviyal sıvı, amniyotik sıvı ve periferik kan gibi çeşitli kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin, osteoartritli hastaların tedavisinde güvenli ve etkili bir tedavi yöntemi olarak kullanılmıştır (Cui ve ark., 2016; Yubo ve ark., 2017; Zavatti ve ark., 2020). OA gelişimindeki hücreler göz önüne alındığında; yüksek proliferasyon ve farklılaşma potansiyeline sahip otolog MKH'leri baz alan hücreler tedavi yaklaşımları, cerrahi müdahalelerin prognozunda yenilikçi ve etkili bir yöntem olarak görülmektedir (Barry, 2003; Barry ve Murphy, 2004; De Girolamo ve ark., 2016). Ancak, OA tedavisinde otolog kondrosit implantasyonu uygulamalarından uzun dönemde iyi sonuçlar elde edilmiş ve bu yöntem altın standart olarak kabul edilmiştir (De Bari ve Roelofs, 2018). Ancak, otolog kondrosit tedavilerinde hem az miktarda doku ve hücre elde edilebiliyor olması; hem de donörde hasar ve morbidite riskini artırıyor olması gibi nedenler bu tedavi yöntemini sınırlandırmaktadır (Bedi ve ark., 2010; Brittberg ve ark., 2003). Ayrıca, uzun süreli tek tabakalı kondrosit kültüründe hücrelerin de-diferensiyasyona uğruyor olmaları nedeni ile tedavi için yeterli miktarda hücre elde edilememektedir (Stoddart ve ark., 2009).

Kıkırdak ve kondrositler, çeşitli humoral faktörler salgılayarak parakrin bir etki sergilerler (Bos ve ark., 2001). KM içerisine salgılanan bu humoral faktörler kondrositlerin fenotipinin korunması ve kendi kendini yenileyebilmesi için önemlidir (Solursh ve Meier, 1973). Buna ek olarak kondrositlerden elde edilen KM'nin, *in vitro* olarak hücrelerde hipertrofi ve COL-X sentezini belirgin bir şekilde azalttığı bilinmektedir (Fischer ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2015). Kondrositlerden elde edilen KM, farklı kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin kondrositlere farklılaşmasında etkilidir (Fischer ve ark., 2010; Liu ve ark., 2012). MKH'lerin kondrojenik farklılaşmasında TGF, FGF, IGF gibi büyüme faktörlerinin ekzojen olarak ilavesi baz alınan protokoller uygulanmaktadır (Fischer ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2015). Fakat bu yöntemler kondrojenesisin doğal mekanizmasını tam olarak taklit edememektedir. Kondrojenesisin doğal mekanizmasını taklit etmeye yönelik olarak kondrositlerden koşullandırılmış medyumun elde edildiği ve KM'nin *in vitro* olarak

kondrogenezis üzerine etkisinin gösterildiği az sayıda çalışma bulunmaktadır (Kazmierski ve ark., 2018; Liu ve ark., 2012; Zhao ve ark., 2017). Ancak KM ile birlikte TGF- β 3 ve IGF-1 gibi kondrogeneziste önemli olan faktörlerin kondrojenik farklılaşma üzerine etkilerinin gösterilmesi ve ayrıca moleküler tekniklerle ayrıntılı bir şekilde mekanizmanın ortaya konması gereklidir. Bununla birlikte kıkırdak yenilenmesi için geliştirilecek efektif bir protokol; kondrositlerin *in vivo* mikro çevrelerindeki hücresel olayları da mümkün olduğunca taklit etmelidir. Kondrositler tarafından salgılanan büyüme faktörleri ve intelökinler gibi kondrogenezisi indükleyebilen çeşitli salgı maddelerini içeren ve *in vivo* mikro çevreyi taklit edebilen KM; MKH'lerin farklılaşmasında kullanılabilir.

Hipotez ve Amaç

Hipotez I: Kondrosit kültüründen elde edilen birçok humoral faktörü içeren KM, MKH'lerin kondrojenik farklılaşmasını doğala yakın bir şekilde indükler.

Hipotez II: KM'nin TGF- β 3 ve/veya IGF-1 ilavesi ile kullanımı, MKH'lerin kondrojenik farklılaşmasını doğala yakın bir şekilde indükler.

Hipotez III: IM içerisinde kondrojenik farklılaşmayı indükleyen maddelere ilave olarak KM'nin eklenmesi, MKH'lerin kondrojenik farklılaşma potansiyellerini artırır.

Amaç

Çalışmamızda amacımız kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasında doğal fizyolojik mekanizmayı daha iyi taklit edebilmek için, KM'nin hem tek başına hem de TGF- β 3 ve/veya IGF-1 ile birlikte kullanımının kondrogenezise etkisini göstermek ayrıca, IM'ye KM'nin ilavesinin kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırma potansiyelini güçlendirip güçlendirmeyeceğini belirlemektir.

Hedef 1. Rat amniyotik sıvı kaynaklı kök hücreleri izole etmek; mezenkimal karakterlerini ve farklılaşma potansiyellerini değerlendirmek.

Hedef 2. Eklem kıkırdagından kondrositleri izole etmek ve kültüre etmek. Kondrosit kaynaklı koşullandırılmış medyum elde etmek için protokol geliştirmek.

Hedef 3: TGF- β 3 ve/veya IGF-1 ilave edilmiş veya edilmemiş koşullandırılmış medyumlarda RASKH'leri kültüre etmek.

Hedef 4: Büyüme faktörleri ilave edilmiş veya edilmemiş koşullandırılmış medyum ile indüklenen RASKH'lerin kondrojenik potansiyelinin immunohistokimya, Real-Time PCR ve histolojik boyamalarla değerlendirilmesi.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Etik Onayı

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (AKÜHADYЕК-51-19; 30.04.2019).

2.2. Cihazlar ve Kimyasallar

Tablo 2.1. Cihazlar

Araştırma Mikroskobu + Görüntüleme Sistemi	Olympus BX50 + Olympus DP 25
Biyogüvenlik Kabini	Teknomar Chemocell LRCX-UV- Türkiye
Otoklav	Nüve-Türkiye
Buzdolabı +4 °C	Indesit-İtalya
Mini Santrifüj	Biosan
Derin Dondurucu (-20)	Arçelik-Türkiye
Etüv EN500	Nüve-Türkiye
Faz kontrast İnverted Işık Mikroskobu	Nikon Eclipse TS100-Japonya
Fluoresan Ataçmanlı Araştırma Mikroskobu	Zeiss Axio observer Z1-Almanya
Güç Kaynağı	Thermo-ABD
Hemositometri	Neubauer improved cell İsolab
Hassas Terazı	Precisa XB 220A-İsviçre
Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı	Biosan
Karbondioksitli inkübatör	Thermo Scientific-361-ABD
Kriyostat	Leica
Sıvı Nitrojen Tankı	Wothington UN-1977-ABD
Mikrosantrifüj	Thermo MicroCL17R-ABD
Mikrosantrifüj	Thermo-MicroSL16R-ABD
UV Transilluminatörlü Jel Görüntüleme Sistemi	MicroDOC vilber lourmat-Fransa
Mikrodalga	Arçelik-Türkiye
Multi-Vorteks	Biosan
Otomatik Pipet	Ependorph
pH metre WTW pH 720	İsolab
Qubit 2.0 Fluorometri Cihazı	In Vitrogen-Thermo-ABD

Şarjlı Otomatik Pipetleyici
Sınıf II Biyogüvenlik Kabini
Soğutmalı Santrifüj
Step 1Plus Real Time PCR
Stereo Mikroskop
Su Banyosu
Derin Dondurucu (-80 °C)
Veriti 96 well Termal Cycler

Drummond Scientific-USA
Thermo MSC Advantage –USA
Nüve NF 800R-Türkiye
Thermo –ABD
Nikon SMZ 1500-Japonya
Nüve-Türkiye
Panasonic MDF-U700VX-Japan
Applied biosystem-Thermo-ABD

Tablo 2.2. Sarf ve Kimyasal Malzemeler

0,2 mL eppendorf	Isolab 123.01.002
1,5 mL eppendorf	VWR 20170-038- Güney Amerika
12 kuyucuklu hücre kültür plakası	VWR, 10062-894- Güney Amerika
3-izobütıl-1-metılksantin (IBMX)	Sigma, 15879- Almanya
4 kuyucuklu MillicellEZslide glasses	Merck, İrlanda
4 Kuyucuklu Plaka	Thermo, 176740-ABD
50 mL enjektör	PlusMED, SYR050FS
6 kuyucuklu hücre kültür plakası	VWR, 10062-892- Güney Amerika
Albumin	Sigma A9205
Alizarin Red-S	Merck,1.06278.0025-Almanya
Alsiyan mavisi 8 GX	Alfaesar J60122
Amfoterisin-B (0,25 mg/mL)	Capricon, AMP-B
Temel fibroblast büyüme faktör (b-FGF)	R&D Systems, 233-FB-ABD
β-gliserofosfat disodyum salt hydrate	Gibco-UK
Beta-2-Mercaptoethanol	Merck, 8.05740.0250- Almanya
Bovine Serum Albumin BSA	Santa Cruz, sc-2323-ABD
DAB peroksidaz substratı	Vector Labs SK-4100
Dekzametazon	Sigma, D4902-100 mg-Belçika
Distile Su	Koçak Farma, 6002716
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma, D2650-UK
Dietil Eter	VWR, 23819.367
DNase I	Thermo Scientific, EN0525
LG-DMEM	Sigma-Aldrich, D5523-1L-ABD
Filtreli pipet ucu	Axygen, TF-1000-L-F
Floroshield kapatma medyumı	Abcam-ab104139, UK
Formaldehit %37	Merck, 1.04002.2500-Almanya
Fötal bovine serum, FBS	Biowest,S181H-500
Glasial asetik asit	Tekkim TK 010030.01000-Türkiye
Hanks'in tamponlu tuz çözeltisi (HBSS),	Sigma-Aldrich, H9269-ABD
Hematoksilen	Merck, 70225752
HEPES tamponu (1M)	Multicell-330050-EL
İndometasin	Sigma,17378-5g, Belçika
İnsülin	Sigma 10516-5 mL-Almanya
İnsülin, transferrin ve sodium selenite (ITS-	Corning, 354351

premix)	
İzoamilalkol	Merck, 1.00979.2500- Almanya
İzopropanol	Merck, 1.09634.2511- Almanya
Kalsiyum klorür dehidrat (CaCl ₂ 2H ₂ O)	Merck, 1.02382.1000- Almanya
Keçi serumu	Abcam-ab7481-İngiltere
Kloroform	Merck, 1.02445.2500- Almanya
Kollajenaz tip IA	Gibco 17100-17-UK
Ksilen	Sigma, 16446- USA
L-Askorbik asit	Sigma, A4403-100 mg-USA
L-glutamin	Gibco, 25030-024-UK
L-Proline	Sigma, P5607-100G- USA
Maxima First Strand cDNA sentez kiti	Thermo, K1672- USA
MicroAmp™ Fast optical 96- kuyucuklu plaka	Thermo-4346906-USA
Mikrosantrifüj tüpü 15 mL	VWR, 10025-686- Güney Amerika
Mikrosantrifüj tüpü 50 mL	VWR, 10025-698- Güney Amerika
Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene, 5100-0001
Non-essential amino acid (NEAA)	Lonza, 114E-ABD
Nötral formalin	Merck, 1.04002.2500-Almanya
Oil Red O	Sigma 00625-100g-Almanya
Parafin	Merck, 107150-Almanya
Paraformaldehid	Merck, 1.04005.1000-Almanya
Penisilin-streptomisin (10,000 U/ mL)	Gibco, 15140-122- UK
Petri kabı 10 mm	VWR, 10062-880- Güney Amerika
Phosphate Buffer Saline (DPBS)	PAN Biotech, P04-36500
Poli-L lizin kaplı lam	VWR-631-0107- Güney Amerika
Polipropilen hücre süzgeci (70 µm)	VWR, ABD
Proteinaz K (20 mg/ mL)	Merck, 1.24568.0100-Almanya
Qubit RNA HS Assay Kit	Thermo Scientific, Q32855- ABD
TGF-β3	PEPROTECH, 100-36E
RNA kit (GeneJet RNA Purification)	Thermo, K0732- USA
Saf Alkol	Merck, 1.00983.2511- Almanya
Sodyum Aljinat	ODTÜ Mühendislik Bilimleri
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck, 1.06404.1000-Almanya
Sodyum Pirüvat	Capricorn, NPY-B-Almanya
Na-EDTA	VWR, 20309.296-1KG-Belçika
β-Gliserofosfat	Sigma G9422-10G, Almanya
Strip Tüpler ve Düz Strip Kapaklar	Axygen, PCR-0208-FCP-C
T25 Flask	VWR, 10062-872- Güney Amerika
T75 Flask	SARSTEDT, 83,3911.002
Tek Kullanımlık Serolojik Pipet (10 mL)	Cellstar-607180
Tek Kullanımlık Serolojik Pipet (25 mL)	VWR 612-3698
Tek Kullanımlık Serolojik Pipet (2 mL)	Cellstar-710180
4 Kuyucuklu EZ plaka	Millicell-PEZGS0416
Tripan Mavisi	Sigma-T8154-USA
Tripsin	Sigma T4799-25G
Tripsin-EDTA 10X	Biowest-X0930-100
Triton X 100	Biomatik A4025-500 ML-Almanya

Tween 20
HG-DMEM
 α -MEM 500 mL

Sigma, P1379-500M-ABD
Sigma, D5523-1L-ABD
Lonza, 12-169F

Tablo 2.3. Antikorlar ve Kitler

Anti-OCT3/4 (Fare monoklonal)	Santa Cruz -SC- 4579, ABD
Anti-SOX2 (Tavşan poliklonal)	Merck-AB5603
Anti-COL-II (Fare poliklonal)	Abcam-ab185430
Anti- TGF- β 3 (Tavşan poliklonal)	Abcam-ab15537
Sekonder Antikoru Goat anti-Mouse Texas Red conjugated	Abcam-ab6787
Sekonder Antikoru Goat anti-Rabbit Texas Red conjugated	Abcam-ab6719
ImmPress™ HRP Geniş Spektrumlu Reaktif kiti	Vector Lab MP 7500

2.3. RASKH'lerin İzole Edilmesi, Mezenkimal Karakterlerinin ve Farklılaşma Potansiyellerinin Belirlenmesi

2.3.1. Hayvanların Bakımı ve Gebe Bırakılması

RASKH'lerin izolasyonu için çalışmamızda 3-4 aylık Wistar ırkı dişi ratlar kullanıldı. Sıçanlara Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında ışık (12 saat aydınlık-12 saat karanlık), ısı (26–28 °C) ve nem (% 30–70) kontrollerinin yapıldığı odalarda bakıldı. Yem ve su *ad libitum* olarak sağlandı.

Ratların östrus siklusu vaginal sitoloji ile saat 08.00-09.00 arasında günlük olarak takip edildi. Her bir dişi rat, ikinci proöstrus döneminde saat 17.00'da çiftleştirilmek için erkek rat ile gece boyunca aynı kafeste tutuldu. Ertesi sabah vajinal smear'da sperm görülmesi başarılı bir çiftleşmenin olduğunu gösterdi ve sperm pozitif vajinal smear, gebeliğin 0. günü olarak kabul edildi. Hayvanların östrüs siklusları 7 gün boyunca vajinal smear yöntemi ile takip edildi ve bu süre zarfında vajinal sitolojilerinde lökosit görülen hayvanlar gebe olarak belirlendi.

2.3.2. RASKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü

2.3.2.1. Kullanılan Medyum ve Solüsyonlar

Hücre kültür medyumu

LG-DMEM	38,94 mL
FBS (% 20)	10 mL
Antibiyotik (Penisilin-streptomisin;10.000 U/ mL) (% 1)	0,5 mL
Amfoterisin B (0,25 mg/ mL) (% 0,1)	50 µL
L-Glutamin (% 1)	0,5 mL
FGF (5 ng/ mL)	10 µL (25 ng/ µL)

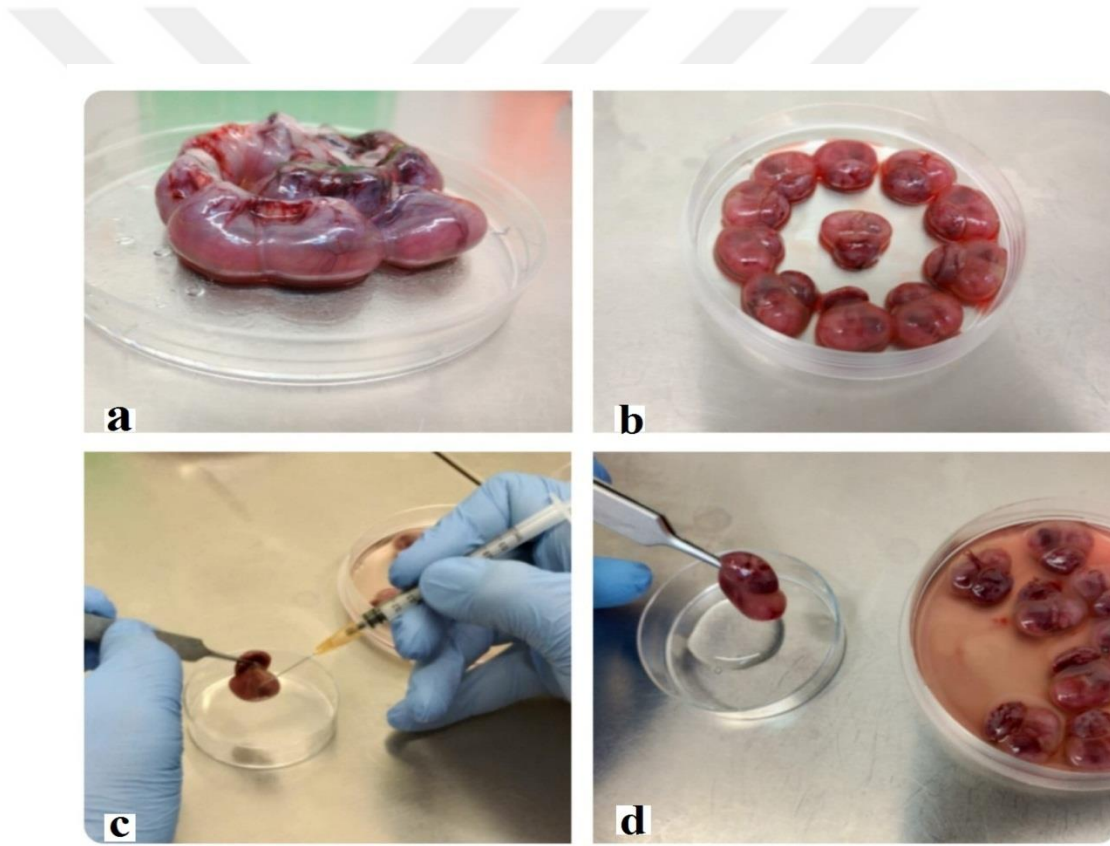
Yıkama solüsyonu

PBS	48,9 mL
Antibiyotik (Penisilin-streptomisin) (10.000 U/ mL) (% 2)	1 mL
Amfoterisin B (0,25 mg/ mL) % 0,2	100 µL

2.3.2.2. RASKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü Protokolü

Amniyotik sıvı izolasyonu ve kültürü için araştırmacılar (Minocha ve ark., 2019; Mun-Fun ve ark., 2015; Wang ve ark., 2017) tarafından belirtilen protokoller modifiye edilerek uygulandı. Amniyotik sıvı toplamak için gebe sıçanlar gebeliğin 17. gününde anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Sıçanlar %70 alkol içeren bir kabın içerisine konuldu ve dezenfeksiyonu yapılan sıçanlar sınıf I biyogüvenlik kabini içine alındı. Sıçanlara abdominal bölgenin median hattından ensizyon yapıldı. Fötüsü içeren uterus kornuları dikkatli bir şekilde petri kabı içerisindeki yıkama solüsyonuna alınarak temizlendi. Sınıf II kabine geçilerek petri kabındaki fötüsü içeren uterus duvarı açıldı ve fötüsler farklı bir steril petri kabına alındı. Fötüs çevresinde sadece amniyotik membran kalana kadar plasentaya ait tüm dokular dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Fötüsler iki kez steril tamponlu fosfat solüsyonu

(PBS) ile yıkandı ve 22 Gauge iğne kullanılarak fötusların amniyotik membranları delindi. Amniyotik sıvılar 15 mL steril polipropilen santrifüj tüpünde toplandı. Elde edilen amniyotik sıvı 250 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen pelet, fetal sığır serumu (FBS) içeren düşük glikoz Dulbecco's modifiye minimum esansiyel medyumunu (LG-DMEM) ile süspanse edildi ve daha sonra aynı medyum ile kültüre edildi. Hücreler 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi (Wang ve ark., 2017). Hücreler %70-80 konfluense ulaşana kadar 3 günde bir medyum değiştirildi. Konfluense ulaşan hücreler tripsin-EDTA ile pasajlandı. Hücreler 5. pasaja kadar aynı şekilde çoğaltıldı.



Şekil 2.1. Amniyotik sıvının toplanması. **a.** 17 günlük gebe ratlardan uterusun çıkarılması. **b.** Uterus ve koryon keseleri uzaklaştırılmış fötüs içeren amniyon keseleri. **c.** Fötüs içeren amniyon keselerinden amniyon sıvının petri kabı içerisine toplanması. **d.** Küçük petri kabında toplanan renksiz amniyotik sıvı.

2.3.2.3. Pasajlama (Alt Kùltür) ve Hùcre Sayımı

Hùcreler %70-80 konfluense ulaştıktan sonra flasklardaki medyum uzaklaştırıldı. Hùcreler, Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen Hank'in dengeli tuz solüsyonu (HBSS) ile yıkandı. Yıkama çözeltisi flasklardan uzaklaştırıldı. Flasklara önceden ısı 37 °C'ye getirilmiş tripsin-etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (10 cm² başına yaklaşık 0.5 mL) konuldu. Flasklar, 37 °C ve %5 CO₂'lik inkübatörde 3-5 dk bekletildi. Hùcrelerin yüzeyden ayrılması, inverted mikroskop altında takip edildi. Hùcrelerin yüzeyden ayrılmasını hızlandırmak için flaskın yanlarına elle hafifçe vuruldu. 'Tripsin-EDTA'yı inaktive etmek için enzim miktarıyla aynı hacimde FBS içeren hùcre kùltür medyumunu, flaska ilave edildi. Hùcre süspansiyonu, 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı. RASKH 250 g'de 10 min santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hùcre peleti, önceden ısıtılmış hùcre kùltür medyumunda (1 mL) yeniden süspanse edildi. Pipet yardımıyla süspanse edildikten sonra, 20 µL'lik bir numune alınıp mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Numunenin üzerine 20 µL tripan mavisi eklenip homojenize edildi. Karışımdan 10 µL alınıp toplam hùcre sayısı ve hùcre canlılık yüzdesi hemositometre (Neubauer improved cell counting chamber) ile belirlendi. Hùcre sayısı belirlendikten sonra kùltür kabı yüzey alanının büyüklüğüne göre hùcreler, kùltür kaplarına ekildi.

2.3.3. Farklılaştırma Çalışmaları

Pasaj 3 (P3)'teki RASKH'ler osteojenik ve adipojenik farklılaştırma amacıyla 9000 hùcre/cm² yoğunlukta 4 kuyucuklu plakalara ekildi. Kondrojenik farklılaştırma için ise hùcreler 4×10⁶ hùcre/ mL olacak şekilde aljinat boncuklar içersine gömüldü. Her farklılaştırma tipi için normal hùcre kùltür medyumunda kùltüre edilen birer kontrol grubu oluşturuldu.

2.3.3.1. Adipojenik Farklılaştırma

2.3.3.1.1. Adipojenik Farklılaştırma Medyumları, Stok ve Çalışma Solüsyonu

Dekzametazon Hazırlanması

2,55 mM Stok Solüsyon:

Dekzametazon	0,0137 g
%100 Etanol	13,7 mL

0,255 mM Çalışma Solüsyonu:

2,55 mM stok solüsyon	1 mL
LG-DMEM	9 mL

Solüsyon filtre edilir ve alikotlanıp -20 °C' de saklanır.

502,4 mM 3-izobütil-1-metilksantin (IBMX) hazırlanması

IBMX	251,1 mg
DMSO	2,249 mL

Solüsyon filtre edilir ve alikotlanıp -20 °C' de saklanır.

2.3.3.1.1.1. Adipojenik Farklılaştırma Medyumları

Farklılaştırma çalışmaları için kullanılacak indüksiyon medyumu LG-DMEM içinde aşağıdaki maddeler belirtilen oranlarda ilave edilerek hazırlandı.

LG-DMEM	44,13 mL
FBS (% 10)	5 mL
Penisillin-streptomisin (% 1)	500 µL
Amhoterisin-B(% 0,1)	50 µL

Dekzametazon (1 μ M)	196 μ L (0,255 mM)
IBMX (500 μ M)	50 μ L (502,4 mM)
İnsulin (10 μ g/ mL)	50 μ L
İndometasin (100 μ M)	25 μ L (200 mM)

İndüksiyon medyumunu 0,2 μ m filtreden geçirilir. + 4 °C’de buzdolabında saklanır.

2.3.3.1.1.2. Maintenance (İdame) Medyum

Farklılaştırma çalışmaları için kullanılacak idame medyumunu LG-DMEM içinde aşağıdaki maddeler belirtilen oranlarda ilave edilerek hazırlandı.

LG-DMEM	43,4 mL
FBS (% 10)	5 mL
Penisillin-streptomisin (% 1)	0,5 mL
Amfoterisin-B (% 0,1)	50 μ L
İnsulin (10 μ g/ mL)	50 μ L

+ 4 °C’de buzdolabında saklanır.

2.2.3.1.2. Adipojenik Farklılaştırma Protokolü

Pasaj 3’e kadar çoğaltılan RASKH’ler, her üç günde bir medyum değiştirilerek 21 gün boyunca indüksiyon medyumunu ile kültüre edildi. Sadece 7. ve 15. günlerde indüksiyon medyumunu, idame medyumunu ile değiştirildi. Hücreler, 21. günde % 10’luk nötral tamponlu formalin ile tespit edildi ve sitoplazmada yer alan yağ damlacıklarını göstermek için Oil Red O boyama yöntemi kullanıldı (Pittenger ve ark., 1999).

2.3.3.1.2.1 Adipojenik Farklılaştırma Analizi İçin Oil Red O Boyaması

2.3.3.1.2.1.1. Oil Red O Boyama Solüsyonunun Hazırlanması

12 mM Oil Red O Stok Solüsyonu

Oil Red O	60 mg
İzopropanol	20 mL

Oil red O stok solüsyonu elde etmek için boya, izopropanol alkolde çözdürülerek iyice karıştırıldı ve 20 dakika bekletildi.

Oil Red O Çalışma Solüsyonu

Çalışma solüsyonu 2/3 oranında deiyonize distile su ile dilue edilerek hazırlandı. Çözelti, filtre kağıdından geçirilerek süzüldü ve boya 2 saat içinde kullanıldı.

2.3.3.1.2.1.2. Oil Red O Boyama Yöntemi

21 günlük farklılaştırmayı takiben hücrelerden kültür medyumunu uzaklaştırıldı. Hücreler önce steril PBS ile ardından da %70 etanol ile yıkandı. Hücreler, % 10 tamponlu nötral formalin ile 20 min tespit edildi. Tespit sonrası hücreler tekrar sırasıyla PBS ve % 70 etanol ile yıkandı. Hücreler, çalışma solüsyonunda 25 min boyandı. Boyamayı takiben boya solüsyonu uzaklaştırıldı ve hücreler sırasıyla % 70 etanol ve deiyonize distile su ile yıkandı (Pittenger ve ark., 1999). Boyanan örnekler Nikon inverted mikroskop kullanılarak incelendi. Olympus DP25 kamera ile görüntüler fotoğraflandı.

2.3.3.2. Osteojenik Farklılaştırma

2.3.3.2.1. Osteojenik Farklılaştırma Stok ve Çalışma Solüsyonları

0,0255 mM Dekzametazon Çalışma Solüsyonu

0,255 mM çalışma solüsyonu	1 mL
α -MEM	9 mL

Solüsyon filtre edilir ve alikotlanarak -20 °C'de saklanır.

300 mM β -Gliserofosfat Stok Solüsyonu Hazırlanması

β -gliserofosfat disodyum salt hydrate	1,13 g
α -MEM	22 mL

Solüsyon filtre edilir ve alikotlanarak -20 °C'de saklanır.

44,7 mM Askorbik Asit Stok Solüsyonu Hazırlanması

L-askorbik asit	0,0394 g
α -MEM	5 mL

Solüsyon filtre edilir ve alikotlanarak -20 °C'de saklanır.

2.3.3.2.2. Osteojenik Farklılaştırma Medyumu

α -MEM	42,038 mL
FBS (% 5)	5 mL
Penisilin-streptomisin (% 1)	0,5 mL
Amfoterisin-B (% 0,1)	50 μ L
L-Glutamin (% 1)	0,5 mL
Dekzametazon 0,1 μ M	196 μ L (0,0255 mM)
L-Askorbik asit 50 μ M	56 μ L (44,7 mM)
β -gliserofosfat 10 mM	1,66 mL (300 mM)

2.3.3.2.3. Osteojenik Farklılaştırma Protokolü

Osteojenik farklılaştırma çalışmaları için, hücreler yukarıda belirtilen farklılaştırma medyumunda 21 gün boyunca kültüre edildi ve medyum 72 saatte bir değiştirildi. Yirmi bir günlük farklılaştırmayı takiben medyum uzaklaştırıldı ve hücreler % 4 paraformaldehit ile tespit edildi (Pittenger ve ark., 1999).

2.3.3.2.2.1. Osteojenik Farklılaştırma Analizi için Alizarin Red S Boyaması

2.3.3.2.2.1.1. 80 mM Alizarin Red S (pH 4,2) Solüsyonunun Hazırlanması

Çalışma Solüsyonu

Alizarin Red S	2 g
Distile su	100 mL

İyice karıştırıldıktan sonra % 10 amonyum hidroksit ile pH ~ 4,1- 4,3'e ayarlandı.

2.3.3.2.2.1.2. Alizarin Red S Boyama Yöntemi

Boyama için ilk olarak farklılaştırma medyumunu dikkatli bir şekilde aspire edildi ve arkasından hücreler Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen HBSS ile yıkandı. Hücreler, % 4 paraformaldehit (PFA) ile tespit edildi. Tespiti takiben PFA, hücrelerden uzaklaştırıldı ve hücreler distile su ile yıkandı. Hücreler, 30 min boyunca 80 mM Alizarin Red S (pH 4.2) ile boyandı. Süre sonunda boya çözeltisi dikkatlice uzaklaştırıldı ve hücreler hafifce distile su ile yıkandı. Inverted mikroskopta değerlendirildi ve boyama sonrasında kalsiyum birikimlerinin kırmızı renkte boyandığı gözlemlendi (Pittenger ve ark., 1999). Boyanan örnekler Nikon inverted mikroskop kullanılarak incelendi. Olympus DP25 kamera ile görüntüler fotoğraflandı.

2.3.3.3. Kondrojenik Farklılaştırma

Kondrojenik farklılaştırma protokolü Mackay ve ark. (1998)'nın metodunun modifiye edilmesi ile oluşturuldu.

2.3.3.3.1. Kondrojenik Farklılaşma Medyumu, Stok ve Çalışma Solüsyonları

25 ng/ μ L TGF- β 3 Stok Solüsyonu

TGF- β 3	25 μ g
HG-DMEM	1 mL

Solüsyon iyice karıştırıldı ve her bir ependorf tüpte 20 μ L olacak şekilde alıktlandı. -20 °C'de saklandı.

100 mM L-Proline Stok Solüsyonu

L-Proline	57,6 mg
HG-DMEM	5 mL

Solüsyon iyice karıştırıldı ve her bir ependorf tüpte 20 μ L olacak şekilde alıktlandı. -20 °C'de saklandı.

5 μ g/ μ L ITS Premix Stok Solüsyonunun Hazırlanması

ITS premix	10 mg
HG-DMEM	2 mL

Solüsyon iyice karıştırıldı ve her bir ependorf tüpte 62,5 μ L olacak şekilde alıktlandı. -20 °C'de saklandı.

2.3.3.3.1.1 . Kondrojenik Farklılaştırma Medyumu

HG-DMEM	45,57 mL
---------	----------

FBS (% 2,5)	2,5 mL
Non-esansiyel amino asit (NEM) (% 1)	0,5 mL
Sodyum pirüvat (% 1)	0,5 mL
Amfoterisin B (% 0,1)	50 µL
Penisillin-streptomisin (% 1)	0,5 mL
ITS premix (6,25 µg/ mL)	62,5 µL (5µg/ µL)
L-Proline (40 µM)	20 µL (100 mM)
L-Askorbik asit (50 µM)	56 µL (44,7 mM)
Dekzametazon (0,1 µM)	196 µL (0,0255 mM)
TGF-β3 (10 ng/ mL)	20 µL (25 µg/ µL)

2.3.3.3.2. Kondrojenik Farklılaştırma Protokolü

Aljinat boncuklar içerisine enkapsüle edilen RASKH'ler kondrojenik medyum içerisinde 21 gün boyunca kültüre edildi.

2.3.3.3.2.1. RASKH'lerin Aljinat Jel İçerisine Enkapsülasyonu ve Hücrelerin 3 Boyutlu Kültürü

Aljinat boncukların hazırlanması, RASKH'lerin aljinat jel içerisine enkapsülasyonu ve 3B kültürü çalışmaları Freshney (2010)'ın protokolü modifiye edilerek oluşturulmuştur.

2.3.3.3.2.1.1. Aljinat Çözeltisinin Hazırlanması

Aljinat Çözelti Solüsyonu

Sodyum Aljinat	1,5 g
Sodyum Klorür	0,87 g
Distile Su	100 mL

HEPES tampon solüsyonu (20 mM)

1 mL (1 M)

Distile su içerisinde 1,5 g sodyum aljinat tozu karıştırıldı ve solüsyona 1 mL, 1 M 4-(2 hidroksi etil)-1-piperazinetansülfonik asit (HEPES) eklendi. Solüsyonun pH'sı 7,4'e ayarlandı ve otoklavlandı.

2.3.3.3.2.1.2. Jelasyon Çözeltisinin Hazırlanması

Jelasyon Çözeltisi

Kalsiyum klorür dehidrat

7,5 g

Distile su

500 mL

HEPES tampon solüsyonu (5 mM)

1,25 mL (1 M)

Solüsyonun pH'sı; 1 M NaOH veya 1 M HCl ile 7,4'e ayarlandı.

Sodyum aljinatı küre şeklinde katılaştırabilmek için çapraz bağlayıcı çözelti olarak kalsiyum klorür solüsyonu kullanıldı. Bu solüsyon 102 mM CaCl_2 ve 5 mM HEPES karışımı ile hazırlandı. Solüsyonun pH'sı 7,4'e ayarlandı ve otoklavlandı.

2.3.3.3.2.1.3. Jeli Çözdürme Solüsyonunun Hazırlanması

Jeli Çözdürme Solüsyonu

EDTA

1,86 g (50 mM)

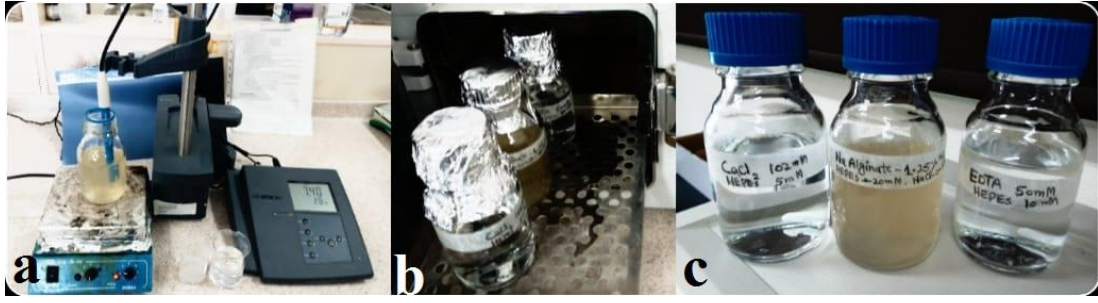
Distile Su

100 mL

HEPES tamponu 10 mM

500 μL (1 M)

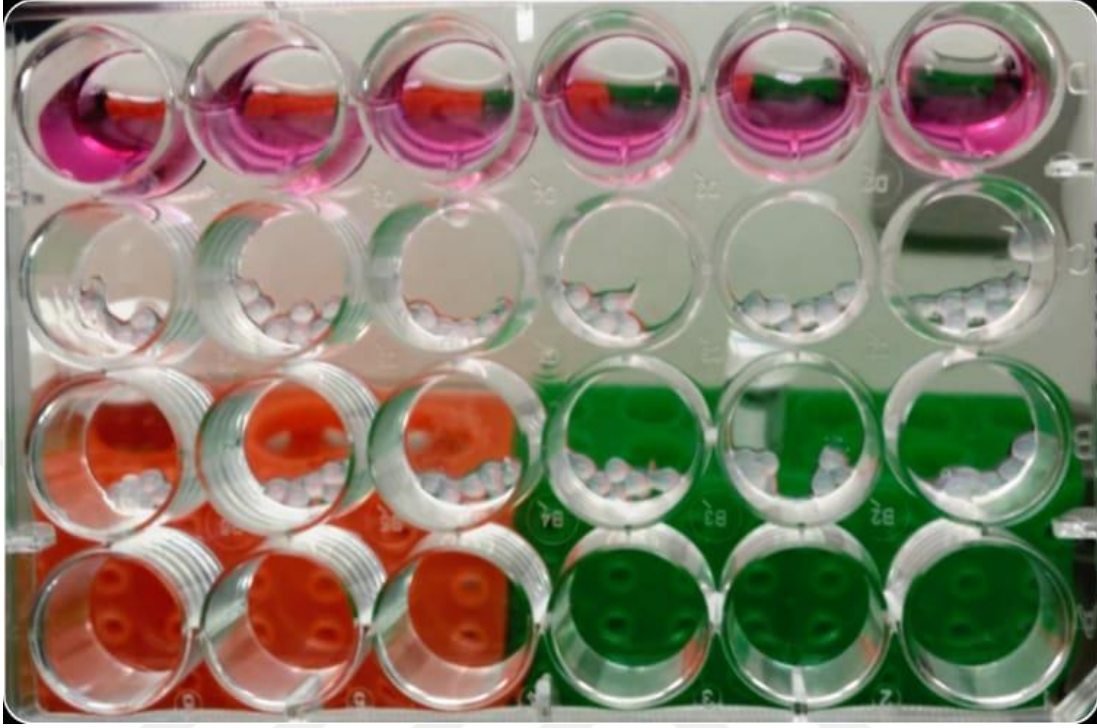
Sodyum aljinat kürelerinin içerisindeki hücrelerin serbest kalmasını sağlamak amacıyla jel çözdürme solüsyonu olarak 50 mM EDTA, 10 mM HEPES karışımı hazırlandı. Solüsyonun pH'sı 7,4'e ayarlandı ve otoklavlandı.



Şekil 2.2. Aljinat çözelti, jelasyon ve jel çözündürme solüsyonu. **a.** Jel hazırlama. **b.** otoklavlama. **c.** depolama süreci.

2.3.3.3.2.1.4. RASKH'lerin Enkapsülasyon Yöntemi

P3-P5'te RASKH'ler tripsinize edildi ve 400 g'de 10 min santrifüj edildi. Biyogüvenlik kabini içerisinde hücre peleti üzerine 4×10^6 hücre/mL konsantrasyonda % 1,5 sıvı aljinat solüsyonu eklenerek homojen bir süspansiyon elde edildi. RASKH içeren % 1,5 steril sıvı sodyum aljinat çözeltisi, 2 mL'lik bir pipet kullanılarak yavaşça jelasyon solüsyonuna damlatıldı. Her 1 mL sıvı sodyum aljinat çözeltisinden yaklaşık 18-19 aljinat boncuk elde edildi. Kök hücrelerin aljinat boncuklar içerisinde enkapsülasyonu için 10 min polimerize olmasına izin verildi. Aljinat boncuk oluşumundan sonra, jelasyon solüsyonu uzaklaştırıldı ve aljinat boncuklar 1 M NaCl çözeltisi ile iki kere dikkatlice yıkandı. İlk önce RASKH içeren aljinat boncuklar, 24-48 saat boyunca hücrelerin ortama adapte olması için % 20 FBS içeren LG-DMEM içinde kültüre edildi. Daha sonra LG-DMEM uzaklaştırıldı ve deneysel çalışma gruplarına göre hücrelerin enkapsüle olduğu aljinat boncuklar, uygun medyum içerisinde kültüre edildi.



Şekil 2.3. RASKH'lerin aljinat jel içerisine enkapsülasyonu ve hücrelerin 3 boyutlu kültürü.



Şekil 2. 4. Kondrojenesis sırasında olaylar dizisi. **a.** Tek tabakalı kültürde RASKH'ler. **b.** Aljinat boncuklar içinde RASKH'lerin enkapsülasyonu. **c.** Kondrojenizisin erken safhalarında kondensasyon. **d.** Hücreler arası matriksin salgılanması. **e.** Hücreler arası matriks depolanması. ve **e. f.** aljinat boncuk içerisinde hücrelerin morfolojilerinde belirgin değişiklik (Shah Nawaz, 2020).

2.3.3.3.2.1.5. Aljinat Boncuklar İçine Enkapsüle Edilen Kök Hücrelerin Kültürü

Aljinat boncuklar içerisine enkapsüle edilen RASKH'lerin kondrojenik farklılaştırılması için yukarıda özellikleri verilen kondrojenik farklılaştırma medyumunu kullanıldı (Ahmed ve ark., 2007; Mackay ve ark., 1998). 21 günlük farklılaştırma sürecinde farklılaştırma medyumunu 3 gün arayla değiştirildi. GAG'ları değerlendirmek için asidik pH'da (2,5) % 1 Alsiyan mavisi boyaması yapıldı.

2.3.3.3.3. Kondrojenik Farklılaştırma Analizi İçin Alsiyan Mavisi Boyaması

2.3.3.3.3.1. Yayma (Froti) Preparatlarının Hazırlanması

Poly-L lizin kaplı lamalar üzerine 2-3 aljinat boncuk yerleştirildi. Çözündürme solüsyonundan boncuklar üzerine 1-2 damla ilave edildi ve kısa bir süre boncukların çözülmesine izin verildi. Başka bir temiz lam yardımıyla ince bir tabaka halinde froti çekildi. Frotiler ilk önce 10 min inkübatörde (37 °C) kurumaya bırakıldı. Daha sonra frotiler 30 min oda sıcaklığında bekletildi. Froti çekilmiş lamalar oda sıcaklığında saklandı.

2.3.3.3.3.2. % 1 Alsiyan Mavisi (pH 2,5) Solüsyonunun Hazırlanması

Çalışma Solüsyonu

Alsiyan mavisi	1 g
Distile su	97 mL
Glasial asetik asit	3 mL

Boya, distile su içerisinde çözdürüldü ve asit ilave edilerek karıştırıldı. Boya solüsyonunun pH'sı 2,5'e ayarlandı ve kullanılmadan önce filtre edildi.

2.3.3.3.3. Alsiyan Mavisi Boyama Yöntemi

Preparat iki kez PBS ile yıkandıktan sonra % 4 PFA ile tespit edildi. Tespit edilen kesitler önce 3 defa 5'er min PBS ile; sonra da çeşme suyu ile 5 dakika yıkandı. Kesitler ardından 15-20 min Alsiyan Mavisi ile boyandı. Kesitlerdeki tüm boya kalıntısı uzaklaştırılana kadar PBS ile yıkandıktan sonra kesitler musluk suyuna alındı. Bir dakika Harris Hematoksilen ile boyanan kesitler, tekrar musluk suyunda yıkandı. Dereceli alkol serisinden geçirilerek dehidre edilen kesitler, ksilen ile şeffaflaştırıldı ve entellan kullanılarak kapatıldı. Boyanan kesitler Olympus BX50 ışık mikroskobu kullanılarak incelendi. Olympus DP25 kamera ile görüntüler fotoğraflandı (Chen ve ark., 2009; Mun-Fun ve ark., 2015).

2.3.4. Mezenkimal Hücrelerin Karakterizasyonunun İmmunfloresan ve Real-Time PCR Metodları ile Gösterilmesi

2.3.4.1. İmmunfloresan ile Karakterizasyon

PB3'teki RASKH'ler üzerinde SOX2 ve OCT3/4 ifadeleri immunofluoresan (İF) yöntemi kullanılarak gösterildi.

2.3.4.1.1. İmmunfloresan Boyama için Gerekli Solüsyonlar

PBST Yıkama Solüsyonu

% 0,1 Tween-20	100 µL
PBS	100 mL

Triton-X solüsyonu

Triton-X	100 µL
PBS	100 mL

% 10 Normal Keçi Serumı

Normal Keçi Serumı	1 mL
PBS	9 mL

-20 °C de saklanır.

2.3.4.1.2. Hücrelerde İmmunfloresan Boyama Yöntemi

RASKH'ler, kuyucuk başına 1×10^4 hücre konsantrasyonunda olacak şekilde 4 kuyucuklu Millicell EZ plakalara ekildi ve hücreler uygun kültür medyumlarında kültüre edildi. Hücreler yaklaşık % 70-80 konfluense ulaştığında, kültür medyumı aspire edildi ve hücreler PBST yıkama solüsyonu ile yıkandı. Hücreler oda sıcaklığında, % 4 PFA ile 30 min tespit edildi. Hücreler her biri 5 min olmak üzere 3 kere PBS ile yıkandı. Tespit edilen hücreler 10 min Triton-X solüsyonu ile inkübe edildi. Non spesifik antijenler % 10 normal keçi serumu kullanılarak bloklandı. RASKH'ler anti-SOX2 (1:50) ve anti-OCT 3/4 (1:50) primer antikorlarında bir gece 4 °C'de inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra hücreler, karanlıkta 1 saat süreyle Goat anti-Mouse Texas Red (1:1000) sekonder antikor veya Goat Anti-Rabbit Texas Red (1:1000) ile inkübe edildi. Üç kez 5'er min PBST ile yıkandıktan sonra kuyucuklara birer damla 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) uygulandı. İmmunfloresan boyama esnasında kullanılan sekonder antikor için primer antikor aşaması atlanarak bir negatif kontrol yapıldı. Lamel ile kapatıldıktan sonra preperatlar hızlıca karanlık odada Zeiss floresan ataçmanlı inverted mikroskop altında kontrol edildi ve Zen 2 yazılımı kullanılarak fotoğraflandı (Nawaz ve ark., 2020).

2.3.4.2. Real-Time PCR Analizi

P1, P3 ve P5'ten sonraki RASKH'ler toplandı. Toplanan hücreler, Ribonükleik asit (RNA) izolasyonu yapılabildiği kadar - 80 °C'de saklandı. Hücrelerde pluripotent, mezenkimal ve hemopoietik belirteçlerin analizi için tablo 2.4'te verilen primerler kullanıldı. Tüm primerler

Fast PCR 6.0 yazılımı yardımıyla tasarlandı (Kalender ve ark., 2009). Tüm primerler 10 pmol/ µL olacak şekilde seyreltildi ve her primerin erime sıcaklığını (T_m °C) belirlemek için gradient PCR yapıldı. Real-Time PCR çalışmaları için kullanılan her primerin nükleotit dizisi, baz uzunluğu ve T_m değeri, Tablo 2.4 'te verilmiştir. Test edilen tüm numuneler için kontrol (housekeeping) geni olarak gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı.

Tablo 2.4. RASKH'ler için test edilen genlerin listesi.

Gen	İleri (5'→3')	Geri (5'→3')	cDNA (bp)	T _m (°C)
SOX2	GGCGGAAAACCAAGACGCTC	TGTAGCTGCCGTTGCTCCAGC	177	58
OCT 3/4	CAGACAACCATCTGCCGCTTC G	CACCAGGGTCTCCGATTGCA	141	58
NANOG	TGCTACTGAGATGCTCTGCAC	CCTGAGAGAACACAGTCCGCA	197	58
CD90	GGTCCTTACTCTAGCCAACTTC AC	AACCAGCAGGCTTATGCCACC	151	58
CD105	GCGTCACACTTGAATGGCAAC C	GGATGAGAACGGCATCCCCA	180	58
CD44	GCATCCAACACCTCCCACTATG AC	CTGGTCCATCGAAGGAATTGGG TA	106	58
CD45	GATGTACCACCAGGGACTCAC AA	TGTAGAGGACTTCCGCAGCAC	244	58
CD34	GCCATCTCAGAGACCACGGTC	GGTGGAGTGTTCACCTTCTGGA	156	58
GAPDH	GAACGGATTGCGCCGTATCG GA	GATGTTAGCGGGATCTCGCTCC	232	58

2.3.4.2.1. RNA İzolasyonu

RASKH'leri içeren boncuklarından toplam RNA, RNA izolasyon kit üreticisinin talimatlarına uygun olarak izole edildi. Toplanan hücrelerde aşağıdaki şekilde RNA

izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen total RNA'lar, kalite ve miktar açısından değerlendirilmek üzere hem Multiskan Go cihazı ile hem de Qubit RNA HS Assay Kiti kullanılarak, Qubit 2.0 Florometre cihazıyla ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonrasında 260/280 oranı 1,8 ve üzeri olanlar çalışmada kullanılmıştır.

2.3.4.2.1.1. RNA İzolasyon Yöntemi

Hücreler bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 250 g'de 5 min boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet elde edildi. $2 \times 10^6 - 4 \times 10^6$ hücre içeren hücre süspansiyonu, soğuk PBS (Ca+2 / Mg+2 içermeyen; +4 °C) kullanılarak süspansiyon edildi ve 5 min boyunca 250 g'de tekrar santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. İki yüz µL PBS (Ca+2 / Mg+2 içermeyen), 10 µL Proteinaz K (20 mg / mL), 500 µL Lizis Tamponu ve pelet üzerine 60 mg zirkonyum boncuğu eklenerek homojenizatörde homojenize edildi. Elde edilen homojen hücre süspansiyonu 2 mL'lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve oda sıcaklığında 2 min inkübe edildi. Hücre karışımına 500 µL Tampon P ilave edildi, iyice vortekslenildi ve oda sıcaklığında 3 min süreyle inkübe edildi. Karışıma 200 µL miktarında Kloroform : İzooamilalkol (49:1) ilave edildi. Karışım alt-üst yapılarak karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 min daha bekletildi. Daha sonra hücre karışımı 4 °C 'de 12 min boyunca 12000 g'de santrifüj edildi ve süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı. Hücre karışımına süpernatant hacminin 1,25 katı kadar (% 96-100) etanol eklendi ve pipetleme ile karıştırıldı. Yedi yüz µL lizat, kolon tüplerine aktarıldı ve oda sıcaklığında 12000 g'de 20 saniye santrifüj edildi. Tüpün içeriği döküldü ve kolon tüpü tekrar santrifüj tüpüne yerleştirildi. Bu adım, tüm lizatlar kolona aktarılan kadar tekrarlandı. Kolona 700 µL yıkama tamponu çözeltisi ilave edildi, oda sıcaklığında 20 saniye boyunca 12000 g'de santrifüj yapıldı, tüp içeriği döküldü ve sütun tekrar tüp üzerine yerleştirildi. Yukarıdaki gibi benzer bir adım, kolona 600 µL yıkama tamponu-2 çözeltisi ilave edilerek iki kez tekrarlandı. Kolon tekrar 1 min boyunca maksimum hızda santrifüj edildi ve 1,5 mL eppendorf tüpün üzerine yerleştirildi. Kolonun merkezine yaklaşık 50-100 µL nükleaz içermeyen 65-70 °C 'deki ultra saf su veya dietil pirokarbonat (DEPC) su ilave edildi, oda sıcaklığında 1 min boyunca 12000 g'de

santrifüj edildi. İzole edilen RNA, komplementer deoksiribonükleik asit (cDNA) sentezine kadar -80 °C 'de saklandı.

2.3.4.2.2. RNA'dan Genomik DNA Kontaminasyonunun Giderilmesi

İzole edilen RNA'lardan DNA'yı uzaklaştırmak için RNaz içermeyen, DNaz I kullanıldı. Bunun için 1 µg total RNA, 1 µL MgCl₂ içeren 10X Reaksiyon Solüsyonu, 1 µL DNaz I (1 ünite), RNaz içermeyen DEPC ile muamele edilmiş su eklenerek toplam hacim 10 µL'ye tamamlandı. Karışım 30 min 37 °C'de inkübe edildi. Daha sonra tüplere 1 µL 50 mM EDTA eklendi ve 10 min 65 °C'de inkübe edildi ve DNaz I enzimi inhibe edildi.

2.3.4.2.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için Maxima First Strand cDNA sentez kiti kullanıldı. Bir µg RNA içeren tüplerin içerisine 1 µL Oligo (dT)₁₈ eklendi ve 5 min 65 °C'de bekletildi. cDNA sentezi için kullanılan kimyasallar Tablo 2.5'de verilmiştir. Reaksiyon karışımı iyice karıştırıldıktan sonra, önce 42 °C ' de 60 min ve sonra 70 °C ' de 5 min inkübe edildi. Hazırlanan cDNA, kullanıncaya kadar -80 °C 'de saklandı.

2.3.4.2.4. Real-Time PCR

Kantitatif PCR için RealQ Plus 2X Master Mix Green Rox-siz™ Kiti, Tablo 2.4 ile Tablo 2.8'de verilen primerler ve T_m değerleri ile kullanıldı. Real-Time PCR için Tablo 2.6'de verilen reaksiyon karışımı hazırlandı. Her örnek için analizler 3'er kez tekrar edildi ve istatistik analizlerde bu üç tekrarın ortalaması kullanıldı. Primer dimerleri ve DNA kontaminasyonunu belirlemek amacıyla erime eğrisi (melting curve) analizi yapıldı. Bu amaçla örnekler 95 °C'den 65 °C'ye kadar 0,5'er °C azaltılarak her döngüde ayrışmanın var olup olmadığı belirlendi. DNA kontaminasyonu olan örnekler tekrarlandı. Genlerin real

time PCR'daki analizi PCR ve melting curve olmak üzere iki aşamada gerçekleşmiştir. PCR aşaması ayrılma (denaturasyon), bağlanma (annealing) ve uzama (extention) olmak üzere 3 aşamada ve 40 döngüde yapılmıştır (Tablo 2.7; Şekil 2.5).

Tablo 2.5. cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar ve miktarları.

Kimyasallar	Miktar
5X reaksiyon tamponu	4 µL
Ribolock RNaz inhibitörü (20 ünite / µL)	1 µL
dNTP karışımı (10 mM)	2 µL
RevertAid H Minus M-MuL V Revers Traskriptaz (200 ünite / µL)	1 µL
1 µg RNA	12 µL
Toplam hacim	20 µL

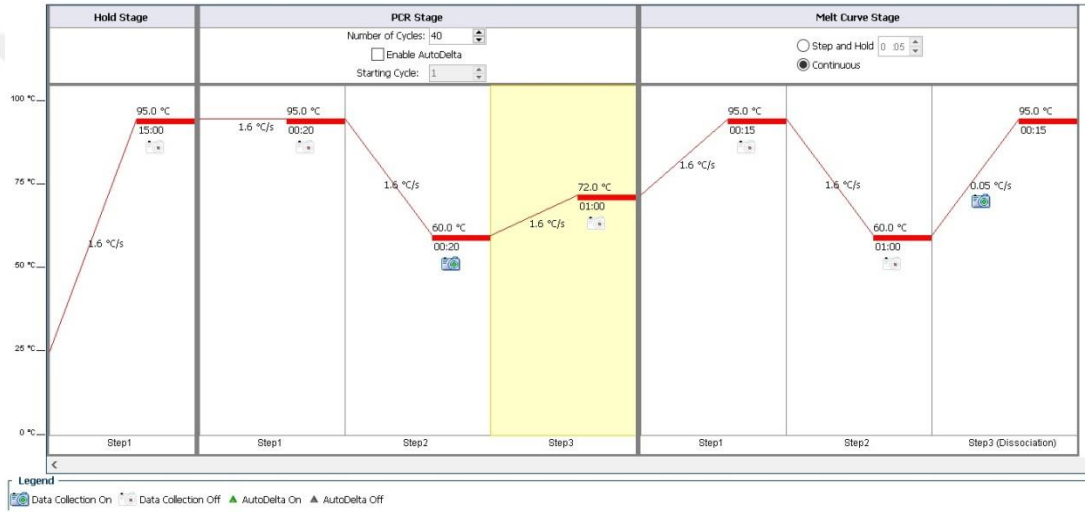
Tablo 2.6. Real-Time PCR Reaksiyon bileşenleri ve miktarları.

Kimyasal	Miktar
RealQ Plus 2X Master karışımı	10 µl
İleri primer (10 µM)	0,5 µl
Geri primer (10 µM)	0,5 µl
cDNA (5 ng)	2 µl
H ₂ O	7 µl
Toplam	20 µl

Tablo 2.7. Üç Aşamalı PCR Program Döngüsü.

Döngü	Sıcaklık	Döngü süresi
-------	----------	--------------

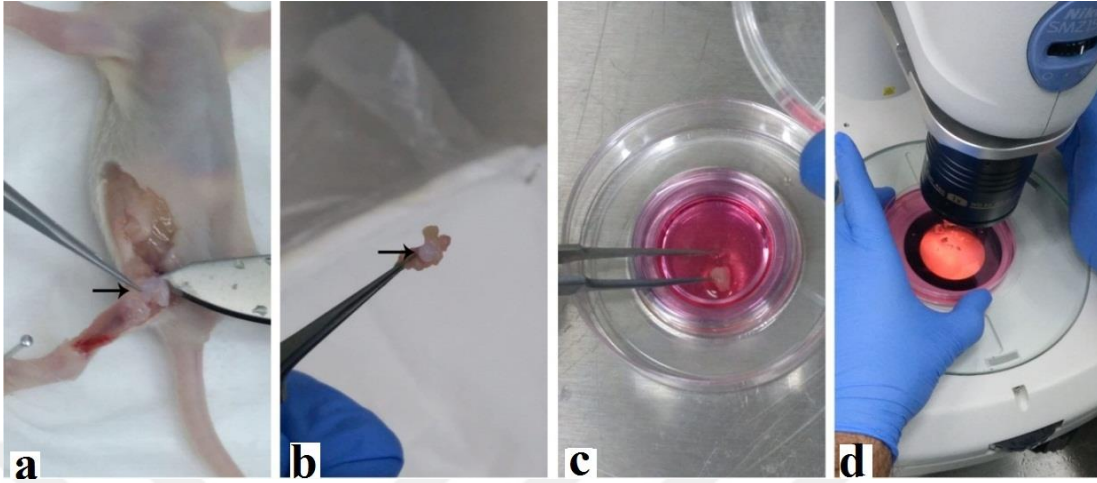
1	95 °C	15 min
	95 °C	15-30 saniye
40	58-62 °C	30 saniye
	72 °C	30 saniye



Şekil 2.5. Real-Time PCR Aşamaları.

2.4. Rat Eklem Kıkırdagından Kondrositlerin İzolasyonu ve Kültürü

Kondrosit izolasyonu için 10 günlük Wistar ırkı yavru sıçanların femur, humerus ve tibia kemiklerinin eklem kıkırdak dokuları toplandı. Kıkırdak dokularından steril koşullar altında, Choudhary, Adhikary ve ark. (2018)'in metodu modifiye edilerek kondrositler izole edildi.



Şekil 2.6. 10 günlük yeni doğan ratlardan kıkırdak izolasyonunun gösterimi. **a.** Femur-tibia eklem yüzeyi. **b.** Femur-tibia ekleminde izole edilen saydam kıkırdak parçası. **c.** Antibiyotikli HG-DMEM solüsyonu ile kıkırdak dokusunun yıkanması. **d.** Stereomikroskop altında steril pens, makas ve bistüri yardımı ile dokunun etrafındaki kemik ve bağ doku parçalarının uzaklaştırılması.

% 2 Tripsin Stok Solüsyonu Hazırlanması

Tripsin	20 mg
Ca ⁺² / Mg ⁺² içermeyen HBSS	1 mL

Hazırlanan solüsyon, 37 °C'de 10 min çalkalamalı su banyosunda aktive edildi ve sonra 0,22 µm filtre ile süzüldü.

Stok Tripsin Solüsyonundan % 0,05 Tripsin Çalışma Solüsyonu Hazırlanması

Tripsin Stok Solüsyonu	125 µL
HG-DMEM	4,875 mL

% 1 Kollajenaz Tıp IA Stok Solüsyonu Hazırlanması

Kollajenaz Tıp IA	10 mg
TESCA Buffer	1 mL

Hazırlanan solüsyon, 37 °C’de 10 min çalkalamalı su banyosunda aktive edildi ve sonra 0,22 µm filtre ile süzüldü.

% 0,3 Kollajenaz Tip IA Solüsyonu Hazırlanması

Kollajenaz Tip IA % 1 Stok Solüsyonu	900 µL
Kondrosit Kültür Medyumu	2,1 mL

% 0,06 Kollajenaz Tip IA Solüsyonu Hazırlanması

Kollajenaz Tip IA % 1 Stok Solüsyonu	300 µL
Kondrosit Kültür Medyumu	4,7 mL

2.4.1. Kondrosit Medyumu ve Kültürü

2.4.1.1. Kondrosit Kültür Medyumu

HG-DMEM	44,45 mL
FBS (% 10)	5 mL
Penisilin-Streptomisin (% 1)	0,5 mL
Amphotersin B (% 0,1)	50 µL

2.4.1.2. Kondrosit Kültürü

Eklem kıkırdak doku parçaları % 2 penisilin-streptomisin ve HG-DMEM içeren petri kabı içerisine konuldu (Şekil 2.1 a, b, c). Steromikroskop altında kemik ve bağ dokusuna ait yapılar uzaklaştırıldı. Steril bistüri yardımıyla kıkırdak parçaları yaklaşık 1 cm³’lük küçük parçalara ayrıldı (Şekil 2.1 d). Kıkırdak parçaları % 0,05 Tripsin ile 30 min inkübe edildi. İnkübasyonun ardından PBS ile yıkanan kıkırdak parçaları % 10 FBS içeren HG-DMEM ile

hazırlanan % 0,3'lük kollajenaz tip IA enzim solüsyonunda 37 °C'de 25 min boyunca inkübe edildi. Kıkırdak doku parçalarına PBS eklendi ve 250 g'de 5 min boyunca santrifüj edildi. Yumuşayan kıkırdak doku parçaları % 10 FBS ve % 0,06 kollajenaz tip IA ilave edilmiş HG-DMEM içeren petri kabına konuldu. Örnekler, 37 °C'de % 5 CO₂'li ortamda bir gece inkübe edildi. Kollajenaz tip IA enzim solüsyonu ile inkübasyondan sonra hücre ve doku kalıntılarını içeren enzim solüsyonu 70 µm polipropilen hücre süzgeç filtresinden geçirildi. Örnekler 400 g'de 10 min süreyle santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pelet 1 mL hücre kültür medyumuna ile süspanse edildi ve hücreler tripan mavisi ile boyanarak sayıldı. Hücreler 20000 hücre / cm² olacak şekilde hücreler kondrosit kültür medyumuna içeren flasklara ekildi ve 37 °C'de % 5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Her üç günde bir medyum değiştirildi (Bernstein ve ark., 2009). Hücreler % 80 konfluense ulaştınca pasajlandı.

2.4.2. Kondrositlerin Karakterizasyonunun İmmunfloresan ve Real-Time PCR Metodları ile Gösterilmesi

2.4.2.1. İmmunofloresan ile Karakterizasyon

P1'deki kondrositler üzerinde COL-II ve TGF-β3 ifadeleri İF yöntemi kullanılarak gösterildi. İF yöntemi bölüm 2.3.4.1 de anlatıldığı şekilde uygulandı. Kondrositler anti-COL-II (1:100) ve anti-TGF-β3 (1:100) primer antikorlarında bir gece 4°C'de inkübe edildikten sonra Goat anti-Mouse Texas Red (1:1000) sekonder antikoruna ile işaretlendi.

2.4.2.2 Real-Time PCR Analizi

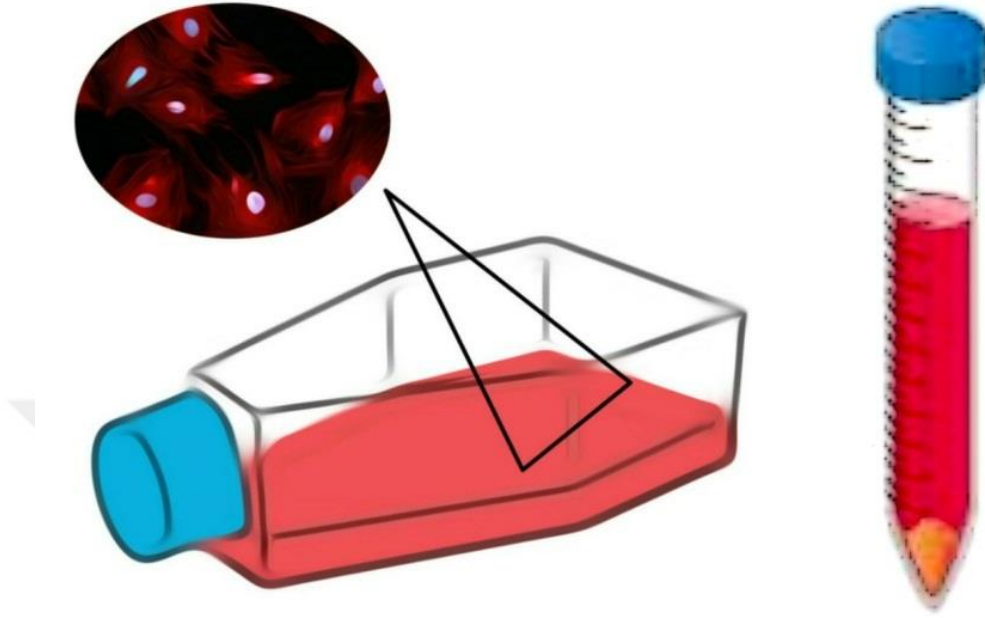
P3 ve P5'teki kondrositler toplandı ve hücrelerde spesifik kondrojenik genlerin (Tablo 2.8) ifadeleri Real-Time PCR analiz yöntemi ile gösterildi. Yöntem, bölüm 2.3.4.2 'de anlatıldığı şekilde uygulandı.

Tablo 2.8. Kondrositlerin ve deney gruplarının primer sekans, baz çift uzunluğu ve Tm değerleri ve Real-time PCR analizinde kullanılan genler.

Gen	İleri (5'→3')	Geri (5'→3')	cDNA (bp)	Tm (°C)
SOX9	GCAGACCAGTACCCGCATC TGC	TCCGCCTCCTCCACGAAGGGT C	107	62
TGF-β1	TGGCTGAACCAAGGAGACG GA	CATGGATGGTGCCCAGGTCA C	136	62
COL2A1	GTGCCCAGATGGGAGTCAT GCA	CCAGAGACACCAGGCTCGCCA	133	60
COL10A1	GACACAATACTTCATCCCAT AC	GGCTGATATTCTTGGTGGTCC	198	62
RUNX2	CCATGGTGGAGATCATCGC GGAC	GGGCTACAACCTTGAAGGCC A	132	62
ACAN	AGTCAGATACCCCATCCACA C	TGGCATAAAAGACCTCACCCT C	152	60

2.4.3. Kondrositlerden Koşullandırılmış Medyum Toplanması

P1 ve P2 kondrositlerden Alves da Silva ve ark. (2015)'in metodu modifiye edilerek KM'ler toplandı. Bunun için, kondrositler, % 70-80 konfluense ulaşılan kadar % 10 FBS içeren kondrosit kültür medyumunda kültüre edildi. Kültürün 3. gününde kondrositler yaklaşık % 70-80 konfluense ulaştığında kültür medyumunu yavaşça uzaklaştırıldı ve hücreler 5 mL steril fizyolojik tuz çözeltisi kullanılarak iki kere dikkatlice yıkandı. Kondrosit kültür medyumunu yerine düşük serum içeren medyum (% 0,2 FBS) kullanıldı. Bu medyum içerisine ayrıca 5 ng / mL insülin ve 5 µg / mL askorbik asit eklendi. Hücreler 48 h bu medyum ile inkübe edildi. İnkübasyonu takiben medyum toplandı ve 250 g ve 4 °C'de 10 min santrifüj edildi. Süpernatant, 50 mL'lik falkon tüplerine konuldu ve -80 °C'de saklandı. Toplanan tüm KM'lerde homojenizasyonu sağlamak için KM'ler +4 °C'de bekletilerek çözündürüldü ve KM'ler karıştırılarak 0,22 µm'lik filtreden geçirildi. Sık dondurma ve çözdürme işlemlerinden kaçınmak için örnekler alikotlandı ve -80 °C'de saklandı.



Şekil 2.7. Kondrosit kültürünün ve KM toplanmasının şematik gösterimi. (Shah Nawaz, 2020)

2.5. RASKH'lerin Aljinat Jel İçerine Enkapsülasyonu; Hücrelerin 3 Boyutlu Kültürü ve Deneysel Tasarım.

RASKH'ler yukarıda 2.3.3.3.2.1. bölümde belirtildiği şekilde aljinat boncuklar içerisine enkapsüle edildi ve 3 boyutlu (3B) olarak kültüre edildi. Çalışmada bölüm 2.5.1'de belirtilen deney grupları oluşturuldu.

Koşullandırılmış medyumun RASKH'lerin kondrojenezi üzerindeki etkisini belirlemek için, standart bir kondrojenik ortam kullanılarak pozitif kontrol ve 1. günde negatif kontrol dışında, çeşitli indüksiyon ve koşullandırılmış ortam içeren 6 deney grubu tasarlandı. Çalışmanın bu kısmında 2.3.3.3.2 daki protokol kullanıldı. Yayınlarda önerilen konsantrasyonlara göre hücreler kuyucuklara ekildi. Çeşitli indüksiyon ve koşullandırılmış medyumlar ile kültüre edilen aljinat boncuklar içerisine enkapsüle edilen hücrelerde GAG ve proteoglikan birikimi gösterilerek kondrogenenezisin varlığı değerlendirildi (Chen ve ark., 2009).

2.5.1. Deney Grupları

1. **Standart kondrojenik farklılaştırma medyum grubu (IM grubu):** RASKH'leri içeren aljinat boncukların 2.2.3.3.1 daki standart kondrojenik farklılaştırma medyumunda kültürü.
2. **Koşullandırılmış medyum grubu (KM grubu):** RASKH'leri içeren aljinat boncukların KM ve HG-DMEM (1:1) medyumunda kültürü.
3. **Koşullandırılmış medyum ve TGF- β 3 grubu (KM+TGF- β 3 grubu):** RASKH'leri içeren aljinat boncukların içerisinde 10 ng/ mL TGF- β 3 + KM ve HG-DMEM (1:1) medyumda kültürü.
4. **Koşullandırılmış medyum ve IGF-1 grubu (KM+IGF-1 grubu):** RASKH'leri içeren aljinat boncukların 100ng/ mL IGF-1 + KM ve HG-DMEM (1:1) medyumda kültürü.
5. **Koşullandırılmış medyum, IGF-1 ve TGF- β 3 grubu (KM+IGF-1+TGF- β 3 grubu):** RASKH'leri içeren aljinat boncukların 100 ng/ mL IGF-1 + 10ng/ mL TGF- β 3 + KM ve HG-DMEM (1:1) medyumda kültürü.
6. **Koşullandırılmış medyum + Standart kondrojenik farklılaştırma medyum grubu (1:1) (KM+IM grubu):** RASKH'leri içeren aljinat boncukların koşullandırılmış medyum ve kondrojenik farklılaştırma medyumunda kültürü (1:1).

2.6. RASKH'nin Kondrojenik Potansiyelinin, İmmunohistokimya, Real-Time PCR ve Histolojik Boyamalarla Değerlendirilmesi

2.6.1. Yayma Preparatlarında İmmunohistokimya Boyama Yöntemi

Yayma preparatlarının hazırlanması hakkında detaylı bilgi 2.3.3.3.1. bölümde verildi.

2.6.1.1. İmmunohistokimya Boyama Yöntemi

İmmunhistokimyasal (IHC) boyamada ImmPress™ HRP Geniş Spektrumlu Reaktif kiti [(ImmPress™ HRP Universal Reagent kit (MP 7500)] kullanıldı. İmmunohistokimyasal boyamalar kit üreticisinin belirttiği boyama protokolüne uygun olarak yapıldı.

Preparatlar 10 min % 96 alkol ile tespit edildi ve her biri 5 min olmak üzere 2 kere PBS ile yıkandı. Preparatlar, 20 min bloklandıktan sonra (horse blocking serum), anti-COL-II ve anti-TGF-β3 primer antikorları ile gece boyu +4 °C'de inkübe edildi. Ertesi gün, preparatlar, her biri 5'er min olmak üzere 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra 30 min boyunca sekonder antikor ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra preparatlar PBS içerisinde her biri 5'er min olmak üzere 2 kere yıkandı.

Taze hazırlanmış 3,3'di-aminobenzidin (DAB) substrat çözeltisi, üreticisinin talimatlarına göre aşağıda verildiği gibi hazırlandı. Antijen antikor reaksiyonunu belirlemek için DAB solüsyonu preparatlara damlatıldı. Renk oluşumu için 3-5 min beklendi. Preparatlar Olympus BX50 ışık mikroskop altında incelendi ve değerlendirmek için DP25 kamera ile görüntülerin fotoğrafları çekildi.

2.6.2. Histolojik Boyamalar

2.2.3.3.3. bölümünde bu metod detaylı olarak açıklandı.

2.6.3. Real-Time PCR analizi

Farklılaşma çalışmalarının sonundaki tüm deney grupları, spesifik kondrojenik belirteçler için karakterize edildi (Tablo 2.8). Çalışmanın bu kısmında bölüm 2.3.4.2.'de tarif edilenle aynı yöntem kullanıldı, fakat RNA izolasyonu yapılırken RASKH'leri içeren aljinat boncuklar bir kez PBS ile yıkandı ve toplandı. Daha sonra aljinat boncuklar, 5-10 min

boyunca pH 7,4'te 10 mM HEPES tamponu içeren 50 mM steril EDTA çözeltisi içerisinde çözdürüldü. Hücreler bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 250 g'de 5 min boyunca santrifüj edildi.

2.7. İstatistik

Deney gruplarının negatif kontrole göre gen ifadeleri ve P1 ile P3'teki kondrositlerin karakterizasyonu için PCR analizinde elde edilen Ct değerleri Rest 2009 programı kullanılarak analiz edildi. RASKH'lerin karakterizasyonu için 3 farklı pasajda elde edilen gen ifadesi kat değişimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması için istatistiksel analizler, SPSS 22 programı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygun dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk normalite testiyle araştırıldı. Parametrik veriler ortalama $\pm$ standart hata (SEM) şeklinde gösterildi. Normal dağılım gösteren gruplar arasındaki farkın önemliliği ANOVA; çoklu karşılaştırmalardaki farkın önemliliği ise post-hoc Tukey testi ile değerlendirildi. Bütün grafikler Graphpad 6.01 kullanılarak oluşturuldu.

3. BULGULAR

3.1. RASKH'lerin İzole Edilmesi ve Mezenkimal Kök Hücre Karakterlerinin ve Farklılaşma Potansiyellerinin Belirlenmesi

3.1.1. Amniyotik Sıvıların Toplanması

17 günlük gebe hayvanların her birinden ekstraembriyonik keseleri ile birlikte 8-12 adet fötüs elde edildi. Uterus ile birlikte koryon kesesi açıldıktan sonra içinde fötüsün bulunduğu amniyon kesesi ortaya çıkarıldı. Fötüslerin amniyon keselerinden yaklaşık olarak 4-6 mL amniyotik sıvı toplandı.

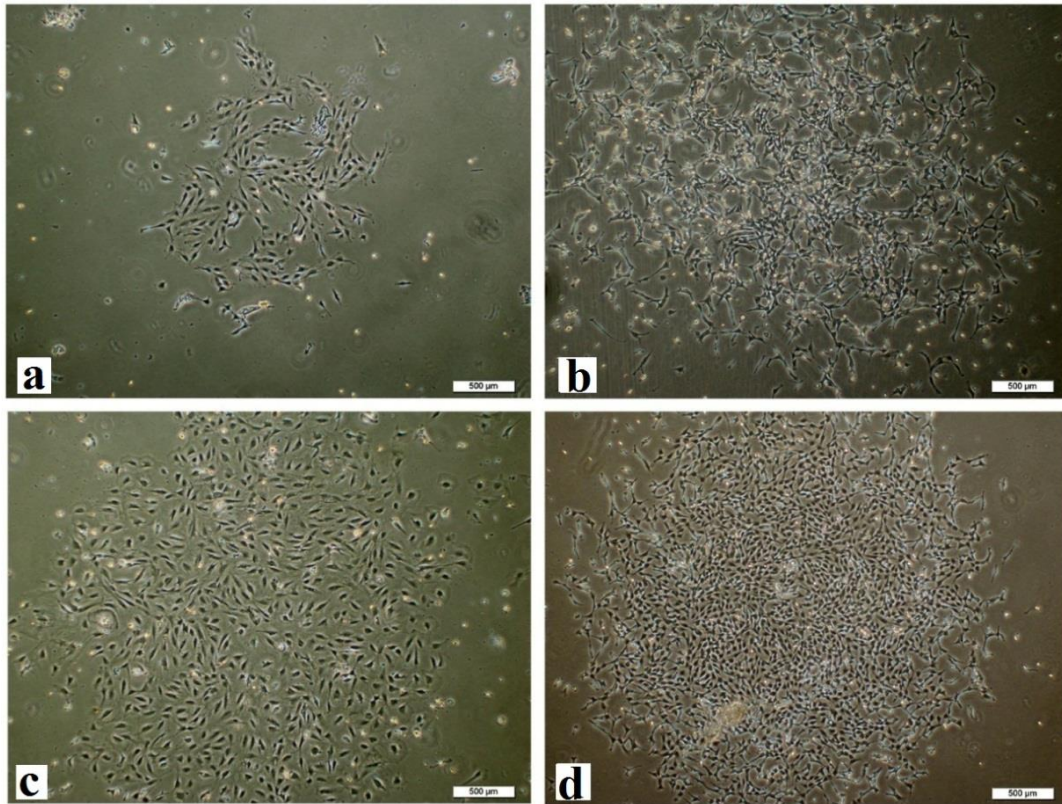
3.1.2. Hücre İzolasyonu ve Kültürü

Ratların amniyotik sıvılarından izole edilen hücreler uygun kültür medyumlarını içeren flasklara ekildi. Hücreler 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Hücreler ekildikten 4 gün sonra medyum değiştirildi. P0'da yüzeye tutunamayan hücreler medyum değişimi sırasında ortamdan uzaklaştırıldı. Geri kalan hücrelerin, ekildikten yaklaşık 48 saat içerisinde yüzeye tutundukları ve 5-7 gün sonra hücre nişleri oluşturmaya başladıkları gözlemlendi. Bu nişlerin farklı morfolojiye sahip hücreler içerdiği görüldü (Şekil 3.1). Yaklaşık 7-10 gün içerisinde hücre nişleri büyüyerek flaskın yüzeyini büyük ölçüde kapladı. P0'da hücre nişlerinde hücrelerin 4 farklı morfolojik tipte olduğu belirlendi. Bunlar:

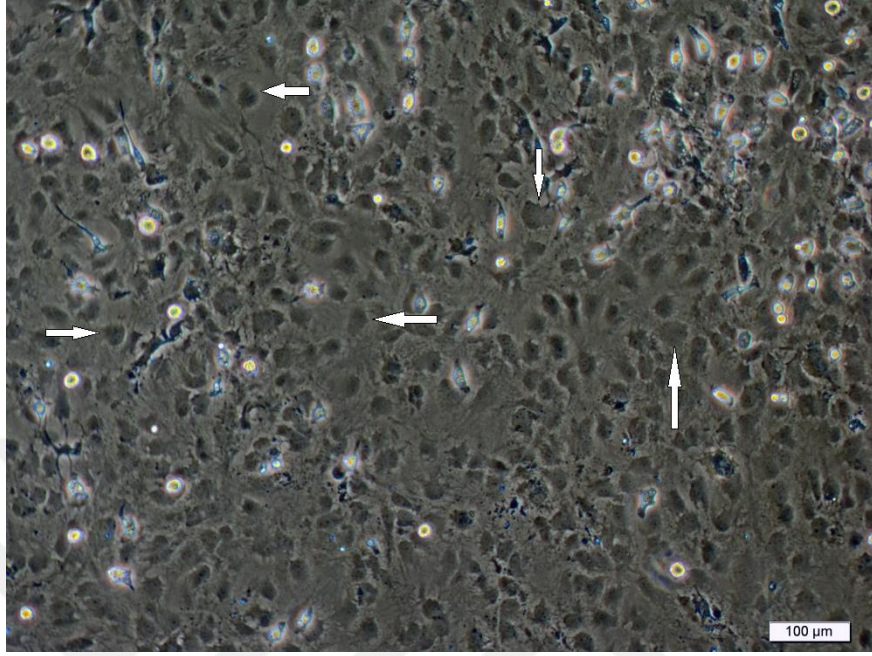
- 1- Küçük ve yassı epitel benzeri hücreler (Şekil 3.2),
- 2- Hızlı çoğalan fibroblast benzeri hücreler (Şekil 3.3),
- 3- Düzensiz sitoplazmik uzantıları ve 1 veya 2 çekirdekçisi bulunan ve genişlemiş stromal hücreler (Şekil 3.4).

4- Belirgin olarak sıkıca paketlenmiş fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücreler (Şekil 3.5).

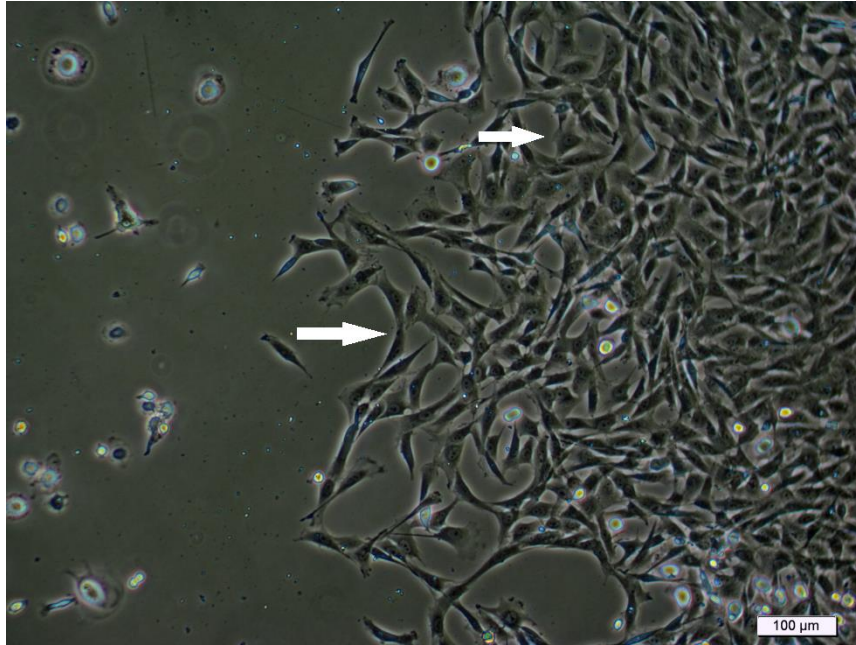
P0'da 12-15. günlerde hücreler %80 konfluense ulaştığında pasajlandı. Hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra, her bir T25 flaska 4×10^5 - 5×10^5 hücre ekildi. P1'de hücrelerin daha kısa sürede yüzeye tutundukları ve 5 gün içerisinde de %80 konfluense ulaştıkları gözlemlendi. P0'a göre P1'de hücre popülasyonu daha homojendi ve fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücreler çoğunlukta idi (Şekil 3.6).



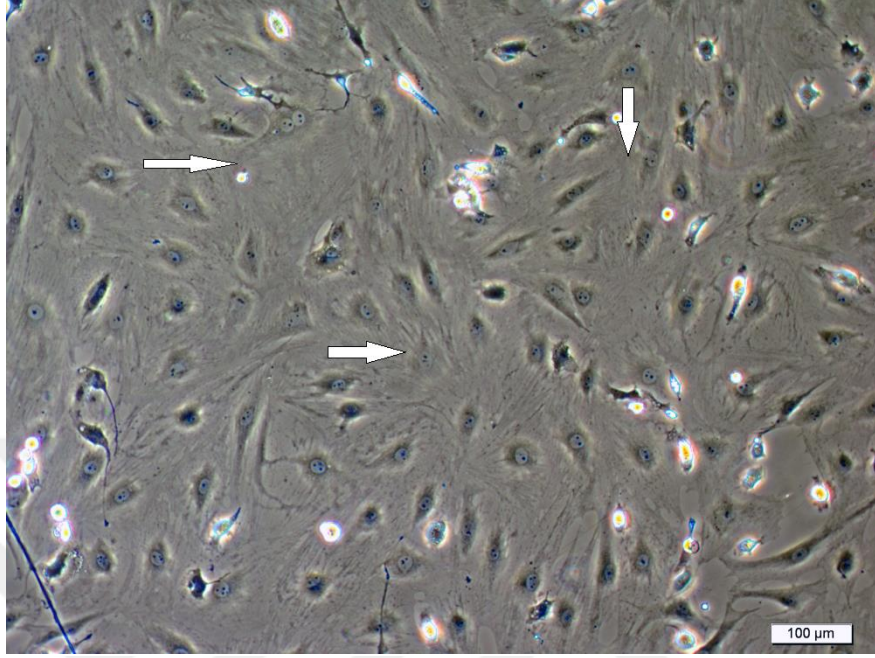
Şekil 3.1. P0'da hücre kültürünün farklı günlerinde niş görüntüleri. **a.** Yaklaşık 7-10 günlük inkübasyondan sonra gözlenen ilk fibroblast benzeri hücreleri içeren hücre nişi. **b.** 10-12. günlerde gevşek olarak bir araya toplanmış fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücre nişi. **c.** 10-12. günlerde sıkı olarak bir araya toplanmış fibroblast benzeri hücre nişi. **d.** 10-12. günlerde yassı stromal hücreleri içeren hücre nişi. Nikon İverted Mikroskop. Bar: 500 µm.



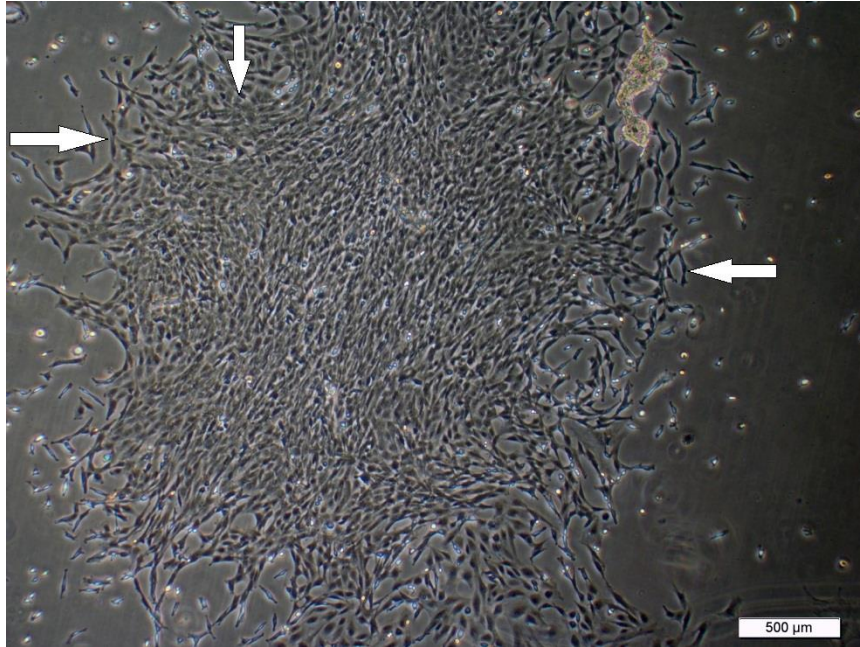
Şekil 3.2. P0'da küçük ve yassı epitel benzeri hücreler (oklar). Nikon İverted Mikroskop. Bar: 100 µm.



Şekil 3.3. P0,'da fibroblast benzeri hücreler (oklar). Nikon İverted Mikroskop. Bar: 100 µm.

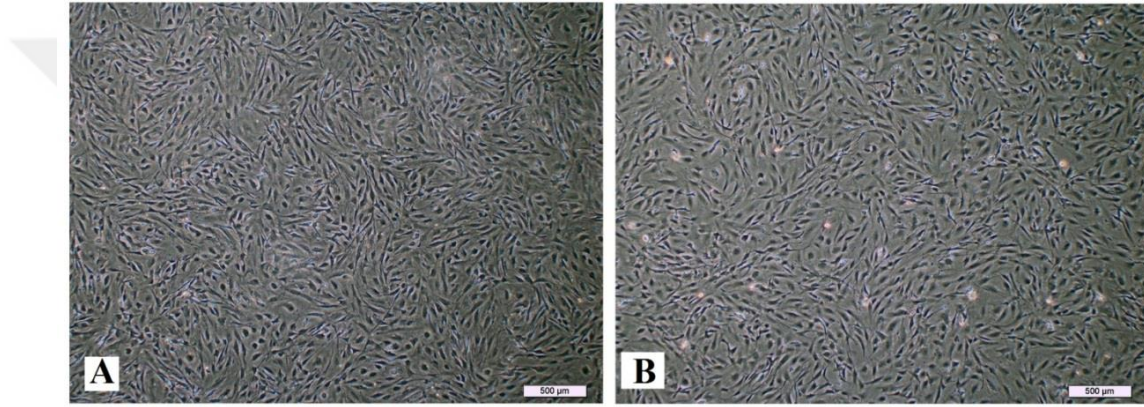


Şekil 3.4. P0'da düzensiz sitoplazmik uzantıları ve 1 veya 2 çekirdekçığı bulunan ve genişlemiş stromal hücreler (oklar). Nikon İnverted Mikroskop. Bar: 100 µm.



Şekil 3.5. P0'da belirgin olarak sıkıca paketlenmiş fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücreler (oklar). Nikon İnverted Mikroskop. Bar: 500 µm.

P1'de olduğu gibi daha sonraki pasajlarda da hücrelerin homojen bir şekilde fibroblast benzeri morfolojilerini korudukları saptandı (Şekil 3.6). Hücreler en fazla 5. pasaja kadar çoğaltıldı. Farklılaştırma çalışmaları için P3-P5 arasındaki RASKH'ler kullanıldı. RASKH'lerin kemik ve yağ hücrelerine farklılaştırılmalarında tek tabakalı hücre kültür yöntemi kullanılırken, kıkırdak hücrelerine farklılaştırmak için 3 boyutlu kültür yöntemi tercih edildi.



Şekil 3.6. Farklı pasajlarda fibroblast benzeri morfolojiye sahip RASKH'ler. **a.** % 80-90 konfluense ulaşan P3'teki hücreler. **b.** % 80-90 konfluense ulaşan P5'teki hücreler. Nikon İnverted Mikroskop. Bar: 500 µm.

3.1.3. Farklılaştırma Çalışmaları

Farklılaştırma medyumları ile RASKH'ler adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hatlara farklılaştırıldı ve bu hücre farklılaşmaları sırasıyla Oil Red O, Alizarin Red-S ve Alsiyan Mavisi gibi özel boyama yöntemleri ile hücreler boyanarak doğrulandı.

3.1.3.1. Osteojenik Farklılaştırma

RASKH'ler osteojenik farklılaştırma kültür medyumlarının içerisinde 21 gün süreyle inkübe edilerek kemik hücrelerine farklılaştırıldı. Bu hücreler Alizarin Red S boyama yöntemi

kullanılarak boyandı ve kemik hücrelerine farklılaştıkları doğrulandı. Farklılaşan bu hücrelerin granüler bir sitoplazma yapısına sahip olduğu ve hücrelerde kalsiyum birikiminin Alizarin Red S boyama yöntemi ile kırmızı renkte boyandığı gözlemlendi. (Şekil 3.7 b). Diğer yandan sadece hücre kültür medyumunu ile kültüre edilen negatif kontrol grubundaki hücrelerin Alizarin Red S boyama yöntemi ile boyanmadığı görüldü (Şekil 3.7 a).

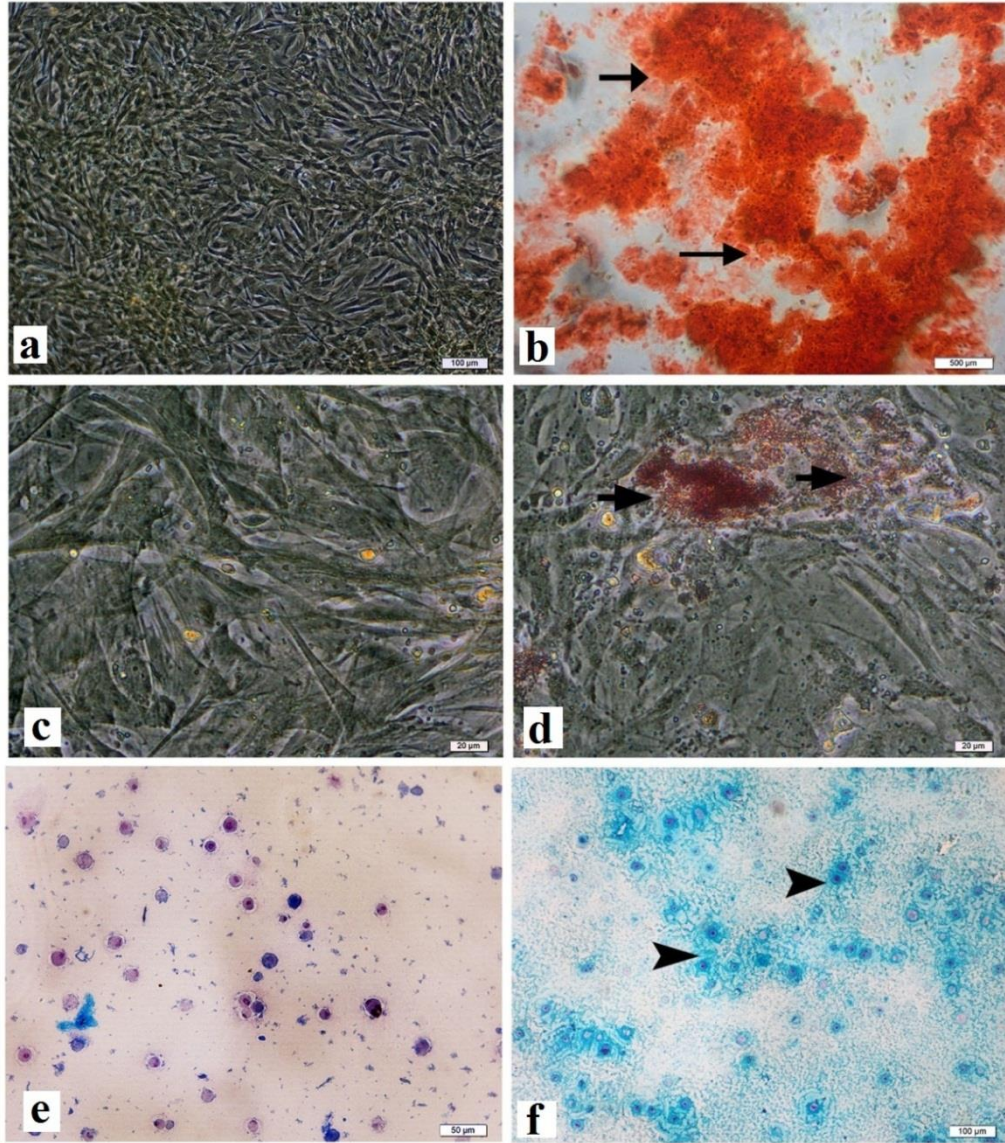
3.1.3.2. Adipojenik Farklılaştırma

RASKH'ler adipojenik farklılaştırma kültür medyumlarının içerisinde 21 gün süreyle kültüre edildikten sonra yağ hücrelerine farklılaştılar. Yağ hücrelerine farklılaşan bu hücrelerin sitoplazmalarında lipid damlacıklarının Oil Red O boyama yöntemi kullanılarak kırmızı renkte boyandığı belirlendi (Şekil 3.7 d). Diğer yandan sadece hücre kültür medyumunu ile kültüre edilen negatif kontrol grubundaki hücrelerin Oil Red O boyama yöntemi ile boyanmadığı gözlemlendi (Şekil 3.7 c).

3.1.3.3. Kondrojenik Farklılaştırma

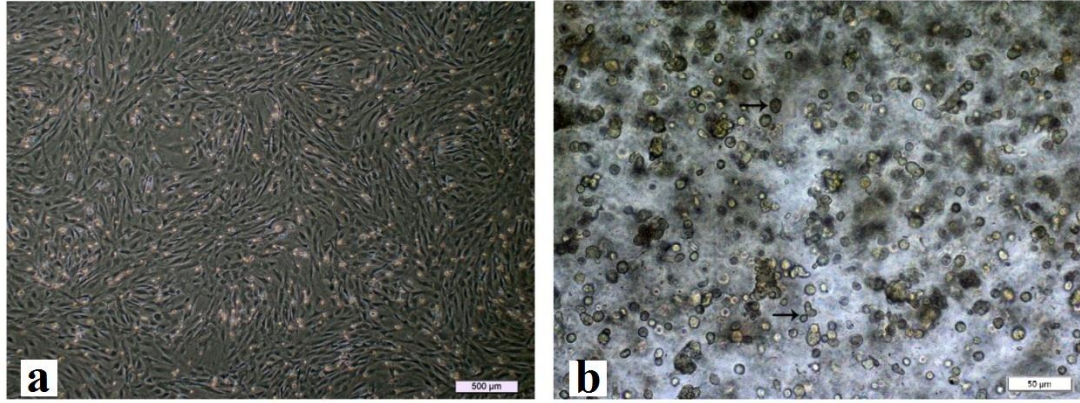
3.1.3.3.1. RASKH'lerin Aljinat Jel İçerisine Enkapsülasyonu ve Aljinat Boncuklar İçine Enkapsüle Edilen Kök Hücrelerin Kültürü

Kondrojenik farklılaştırma için RASKH'ler aljinat boncuklar içine enkapsüle edilerek 3 boyutlu ortamda kültüre edildiler (Şekil 3.9 a, b). İki mL'lik pipet kullanılarak 1 mL aljinat hücre karışımından 18-19 adet aljinat boncuk üretildi. Her bir boncuk ortalama 52-53 µL hacimdeydi ve her bir boncuğun yaklaşık 210000 hücre içerdiği hesaplandı. İnverted mikroskop altında aljinat boncuklar içine enkapsüle edilen hücrelerin jel içerisinde homojen olarak dağıldığı ve tek tabakalı kültür ile karşılaştırıldığı zaman aljinat içine enkapsüle edilen hücrelerin yuvarlak morfolojilerini korudukları görüldü (Şekil 3.8).



Şekil 3.7. RASKH'lerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaştırılmaları. **a. c. e.** Negatif kontroller. **b.** Osteojenik farklılaşmada hücrelerde kalsiyum birikimleri Alizarin Red S boyama yöntemi ile turuncu-kırmızı renkte boyanmaktadır. Oklar turuncu-kırmızı renkte boyanan kalsiyum birikimlerini göstermektedir. **d.** Adipojenik farklılaşmada hücrelerin sitoplazmalarında yağ damlacıkları Oil Red O ile turuncu-kırmızı renkte boyanmaktadır. Oklar kırmızı renkte boyanan yağ damlacıklarını göstermektedir. **f.** Aljinat boncuklarda enkapsüle edilen hücrelerin kondrojenik farklılaşması. Farklılaşan hücrelerin sitoplazmaları ve periferi Alsiyan Mavisi ile daha koyu mavi boyanmaktadır. Ok başları hücrelerin periferinde koyu mavi boyanan alanları göstermektedir. Nikon Inverted Mikroskop (a-d), Olympus BX50 Işık Mikroskobu (e,f). Bar: (a, b) 500 µm, (c, d) 20 µm, (e) 50 µm, (f) 100 µm.

Dördüncü günden itibaren aljinat boncuklar içerisinde bulunan hücrelerin kümelenmeler yapmaya başladıkları belirlendi (Şekil 3.3 e,f). Üçüncü hafta ile birlikte aljinat jellerin bütünlüğünü hala koruduğu, aljinat jel içerisindeki hücre yoğunluğunun arttığı ve hücrelerin yuvarlak morfolojilerini de sürdürdüğü gözlemlendi (Şekil 3.8. b).



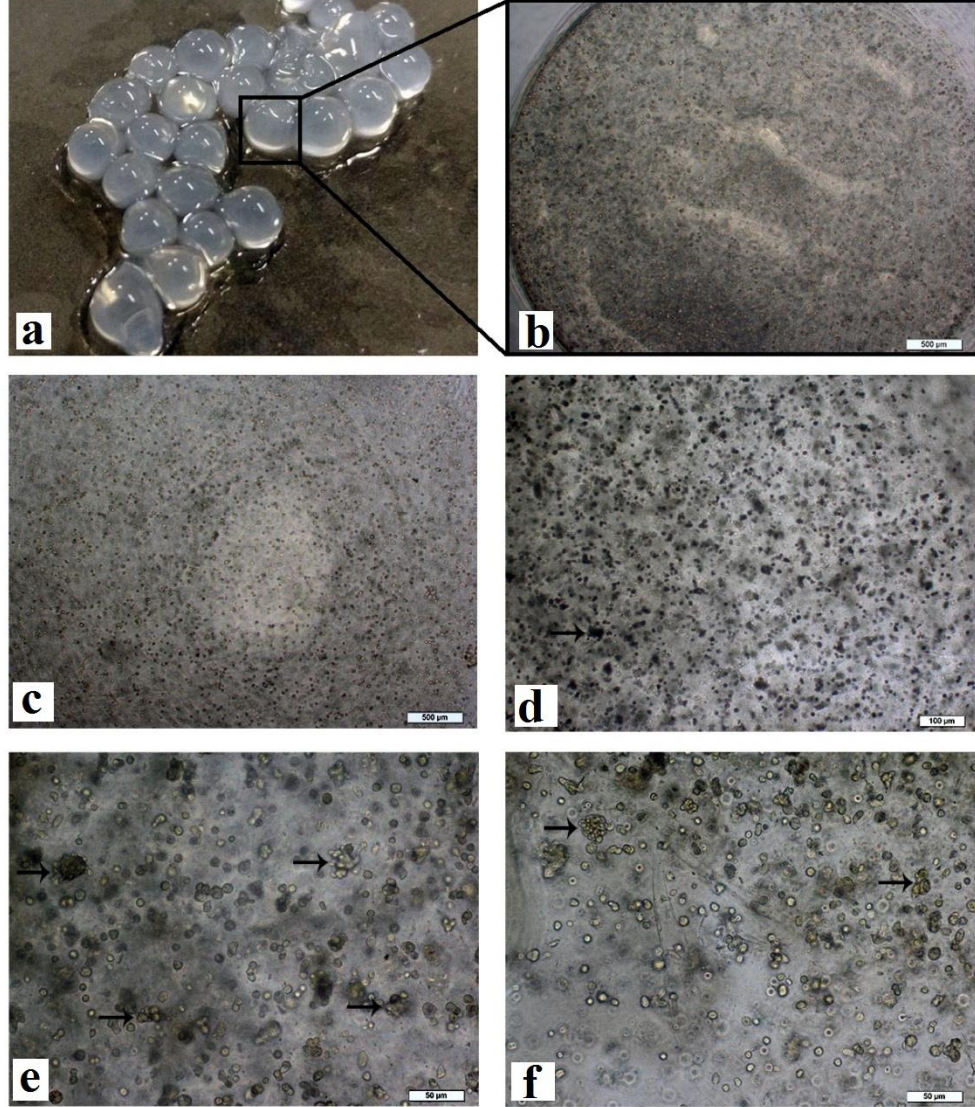
Şekil 3.8. Tek tabakalı kültür ve aljinat boncuk kültürü arasında hücre morfolojisinin karşılaştırılması. **a.** P3'te Fibroblast benzeri morfolojiye sahip RASKH'ler; tek tabakalı kültür. **b.** P3'te Aljinat boncuklar içerisinde yuvarlak, oval morfolojiye sahip RASKH'ler (oklar); aljinat boncuk kültürü. Nikon Inverted Mikroskop, Bar: (a) 500 µm, (b) 50 µm.

3.1.3.3.2. Aljinat Boncuklar İçine Enkapsüle Edilen Kök Hücrelerin Kondrojenik Farklılaştırması

Aljinat boncuklar içerisine enkapsüle hücreler, kondrojenik farklılaştırma medyumuna ile 21 gün süre ile kültüre edildiler. Bu süreçte hücrelerin canlılıklarını korudukları ve jel içerisinde homojen bir şekilde dağıldıkları gözlemlendi (Şekil 3.9).

Aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen RASKH'lerin kıkırdak hücrelerine farklılaşıp farklılaşmadıklarını doğrulamak için hücreler Alsiyan Mavisi ile boyandı. Normal kıkırdak matrisine benzer şekilde, kondrojenik farklılaştırmadan sonra aljinat jel içinde enkapsüle edilen hücrelerin sitoplazmalarının ve periferlerinin Alsiyan Mavisi ile koyu mavi renkte boyandığı gözlemlendi (Şekil 3.7 f). Negatif kontrol olarak aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen RASKH'ler normal hücre kültür medyumuna ile kültüre edildi. Negatif

kontrol grubunda aljinat jel içerisindeki hücreler ve çevresi Alsiyan Mavisi ile boyanmadı (Şekil 3.7 e).

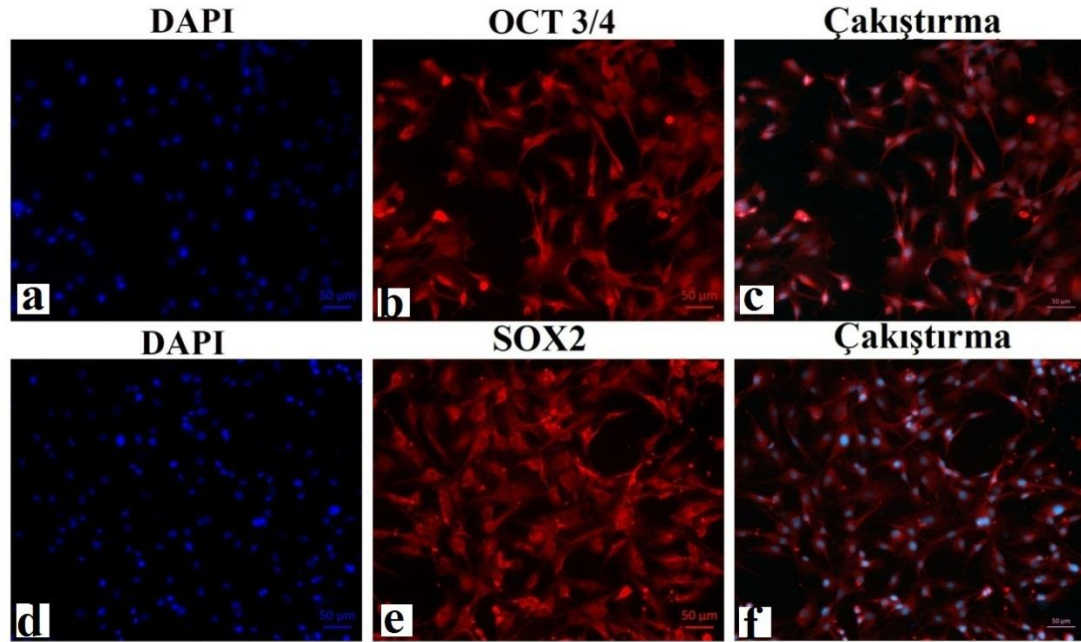


Şekil 3.9. Aljinat boncuklar içine enkapsüle edilen kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırılması. **a. b.** Kondrojenik farklılaştırma için RASKH'lerin enkapsüle edildiği aljinat boncuklar. **c.** 0.gün. **d.** 3.gün. **e.** 7.gün. **f.** 21. gün. Oklar hücre kümelenmesini göstermektedir. Nikon İverted Mikroskop. Bar: (b, c) 500 µm, (d) 100 µm, (e, f) 50 µm.

3.1.4. Mezenkimal Hücrelerin Karakterizasyonunun İmmunfloresan ve Real-Time PCR Metodları ile Gösterilmesi

3.1.4.1. İmmunofloresan Boyama ile Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

İF boyama ile P5'te RASKH'lerin SOX2 ve OCT3/4 gibi pluripotent kök hücre belirteçlerini güçlü bir şekilde ifade ettiği gösterildi. OCT3/4 ifadesi hücrelerin hem sitoplazmasında hem de nukleusunda görülürken, SOX2 ifadesi sadece hücrelerin sitoplazmasında gözlemlendi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. RASKH'lerde pluripotent kök hücre belirteçleri OCT3/4 ve SOX2 ifadeleri, immunfloresan boyama. **a. d.** DAPI. **b, e,** Texas Red. **c. f.** Çakıştırma. Zeiss floresan ataçmanlı inverted mikroskop. Bar: 50 µm.

3.1.4.2. Real-Time PCR Analizi

3.1.4.2.1. Real-Time PCR

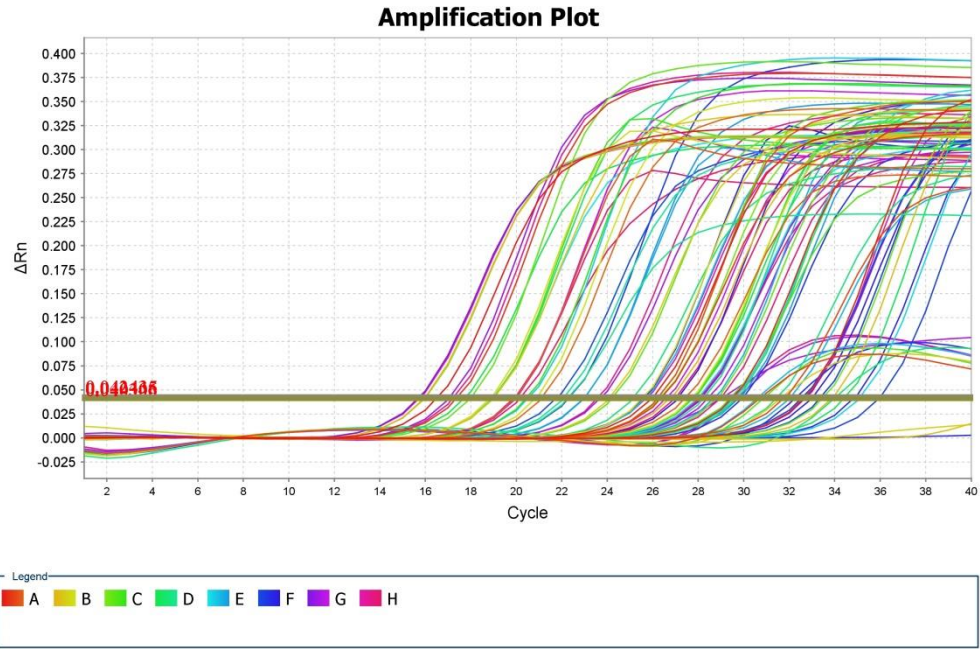
Gen ifade düzeyleri arasındaki en iyi farklılığı görmek için cDNA'lar 1/4 oranında sulandırılarak Real-Time PCR analizi yapıldı ve gen ifade düzeyinin belirleneceği en iyi sulandırma oranı 1:30 olarak belirlendi (Şekil 3.11).

Real-time PCR analizlerinde her gen ve her örnek için melting curve analizi yapıldı. Örneklerde DNA kontaminasyonu ile primer dimerleşmelerinin olmadığı görüldü (Şekil 3.12). Elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin messenger RNA (mRNA) ifade düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplandı (Pfaffl, 2001). Bu hesaplamada;

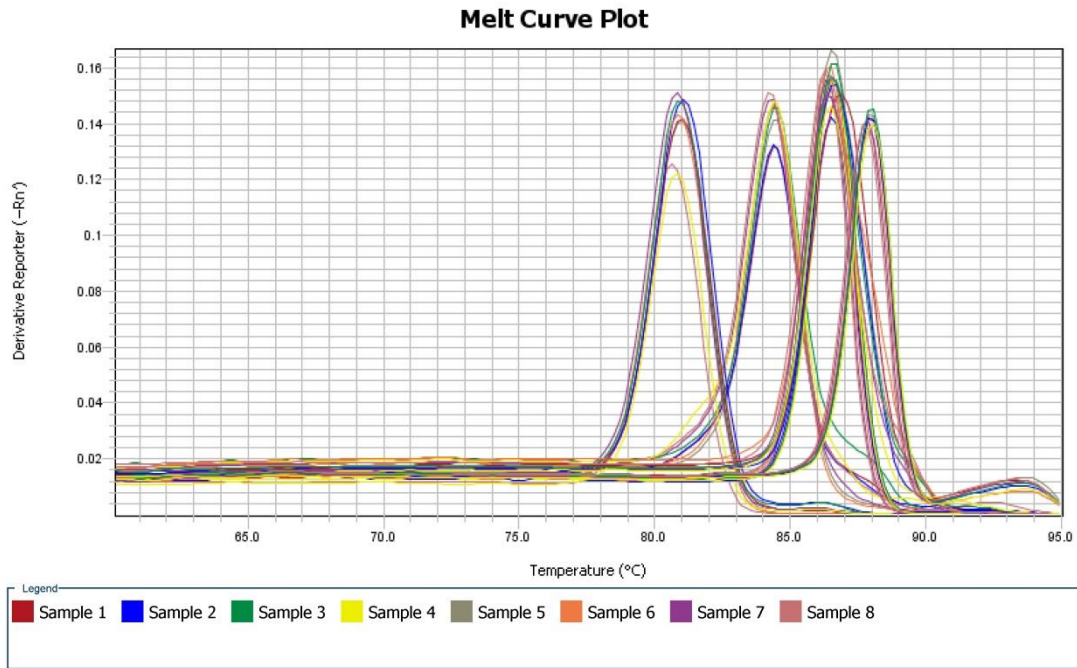
$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{deney grubu}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{kontrol grubu}}$$

formülü uygulanıp; hesaplanan değer her bir gen için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünde yerine konularak mRNA ifade düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Endojen kontrol (house keeping gene) olarak GAPDH geni kullanıldı ve her bir örneğe ait GAPDH gen düzeyine göre diğer genlerin ifade düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı.

Amplifikasyon eğrileri Real-Time PCR'da incelenen genlerin çoğalmalarına bağlı olarak kullanılan boyanın ölçülebilir düzeye gelmesiyle oluşmaktadır. İncelenen örneklerde gen ifadesi ne kadar fazla ise amplifikasyon eğrilerindeki Ct değeri o kadar düşük olmaktadır. Şekil 3.11 incelendiğinde farklı gen ve örneklerdeki Ct değerlerinin ve amplifikasyon eğrilerinin farklı olduğu görülmektedir. Bu durum her örnekteki ve her gendeki ifadenin farklı olduğunu işaret etmektedir.



Şekil 3.11. Örneklere ve genlere ait amplifikasyon eğrileri.



Şekil 3.12. Dört farklı gene ait melting curve grafiği.

Melting curve grafiği her gendeki PCR aşamasında primer dimerleri, primerlerin birden fazla bölgeye bağlanıp bağlanmadıkları ve DNA kontaminasyonunu göstermektedir. Şekil 3.12 incelendiğinde dört gende de dimerleşme, DNA kontaminasyonu ve primerlerin birden fazla bölgeye bağlanmadığı görülmektedir.

3.1.4.2.2. RASKH'lerde Pluripotent ve Mezenkimal Kök Hücre Belirteçlerinin Gen İfadeleri

Real-Time PCR analizi ile P1, P3 ve P5'te RASKH'lerin SOX2, NANOG ve OCT3/4 gibi pluripotent ve CD44, CD90 ve CD105 gibi mezenkimal kök hücre belirteçlerini gen düzeyinde ifade ettikleri saptandı. Ayrıca CD45 ve CD34 gibi hemapoiyetik genlerin P1 ile karşılaştırıldığı zaman, P3 ve P5'te bu genlerin ifadelerinin RASKH'lerde önemli derecede azaldığı belirlendi (Tablo 3.1). P1'e göre P3 ve P5 te RASKH'lerde SOX2 gen ifadesi sırasıyla $1,85 \pm 0,35$ ve $1,45 \pm 0,41$ kat artış gösterirken, pasajlar arasında istatistiki bir önem saptanmadı (Tablo 3.1), (Şekil 3.13 a). Aynı şekilde P1 ile karşılaştırıldığında P3 ve P5 te RASKH'lerde OCT3/4 gen ifadesi sırasıyla $1,59 \pm 0,80$ ve $3,68 \pm 1,66$ artış gösterirken, pasajlar arasında istatistiki bir önem belirlenmedi (Tablo 3.1) (Şekil 3.13 b).

NANOG gen ifadesi P1 ile karşılaştırıldığında P3 ve P5'te sırasıyla $1,50 \pm 0,24$ ve $2,92 \pm 0,57$ ($p < 0,01$) kat düzeyinde artış gösterdi. P3 ile P5 arasında RASKH'lerin NANOG gen ifadelerinin kat artışları arasında da istatistiki bir önem ($p < 0,01$) olduğu gözlemlendi (Tablo 3.1.) (Şekil 3.14 c).

P1 ile karşılaştırıldığında P3 ve P5'te RASKH'lerin mezenkimal kök hücre belirteçlerinden CD90 genini sırasıyla $1,51 \pm 0,29$ ve $1,49 \pm 0,34$; CD44 genini $1,60 \pm 0,38$ ve $2,60 \pm 0,70$ ve CD105 genini ise $3,28 \pm 0,76$ ve $2,86 \pm 0,27$ kat artış düzeyinde ifade ettikleri saptandı. Üç farklı pasaj birbirleri ile karşılaştırıldığı zaman CD90, CD44 gen ifadelerinde istatistiki olarak bir fark gözlenmedi (Tablo 3.1), (Şekil 3.14 d), (Şekil 3.15 e, f). Fakat P1 ile

karşılaştırıldığı zaman, CD105 geninin kat artışının hem P3 hemde P5'te istatistiki olarak önemli olduğu ($p<0,05$) saptandı (Tablo 3.1), (Şekil 3.14 d).

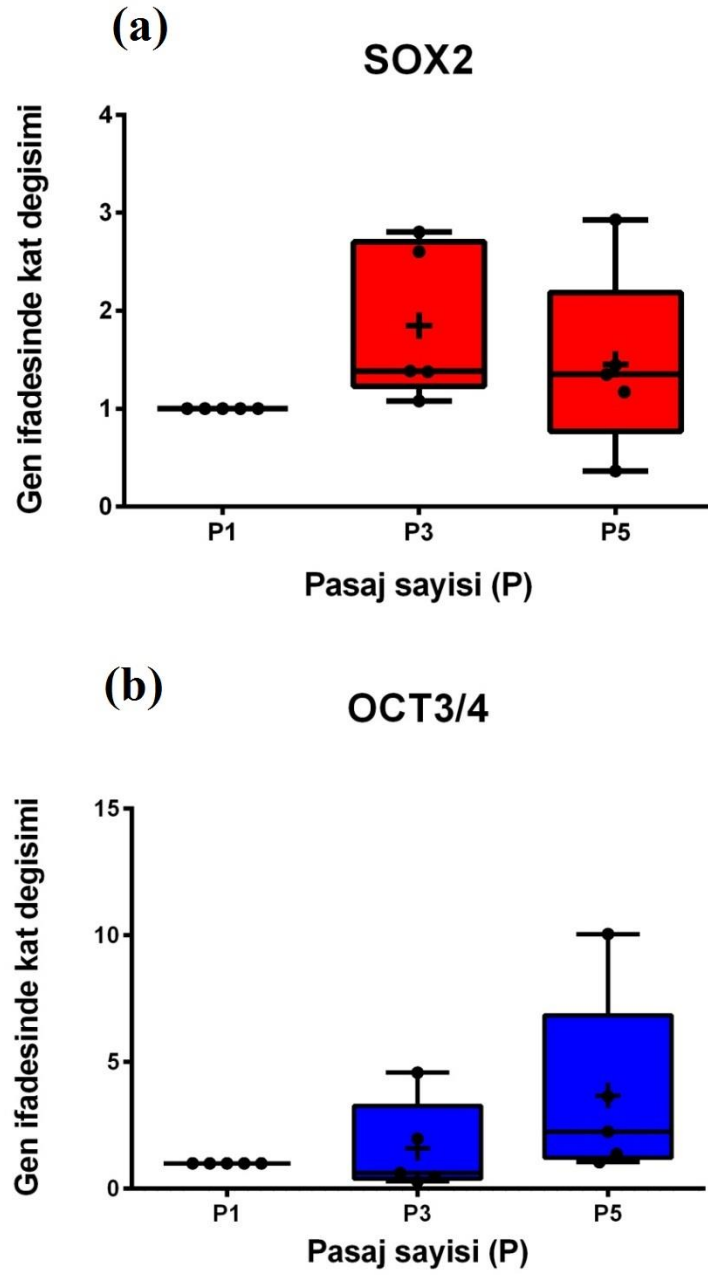
Tablo 3.1. RASKH'lerde Real-Time PCR ile pluripotent, mezenkimal ve hemapoietik genlerin ifadelerinde kat $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değişikliklerinin istatistiki analizi

GENLER	Ortalama $\pm$ Standart Hata			p	Sonuç
	P1	P3	P5		
SOX2	1,0	1,85 $\pm$ 0,35	1,45 $\pm$ 0,41	0,204	
OCT3/4	1,0	1,59 $\pm$ 0,80	3,68 $\pm$ 1,66	0,216	
NANOG	1,0a	1,50 $\pm$ 0,24a	**2,92 $\pm$ 0,57b	0,007	Artma
CD90	1,0	1,51 $\pm$ 0,29	1,49 $\pm$ 0,34	0,312	
CD44	1,0	1,60 $\pm$ 0,38	2,60 $\pm$ 0,70	0,084	
CD105	1,0	*3,28 $\pm$ 0,76b	*2,86 $\pm$ 0,27b	0,011	Artma
CD45	1,0a	***0,14 $\pm$ 0,042b	***0,27 $\pm$ 0,075b	0,000	Azalma
CD34	1,0a	*0,46 $\pm$ 0,18b	0,72 $\pm$ 0,11a	0,025	Azalma

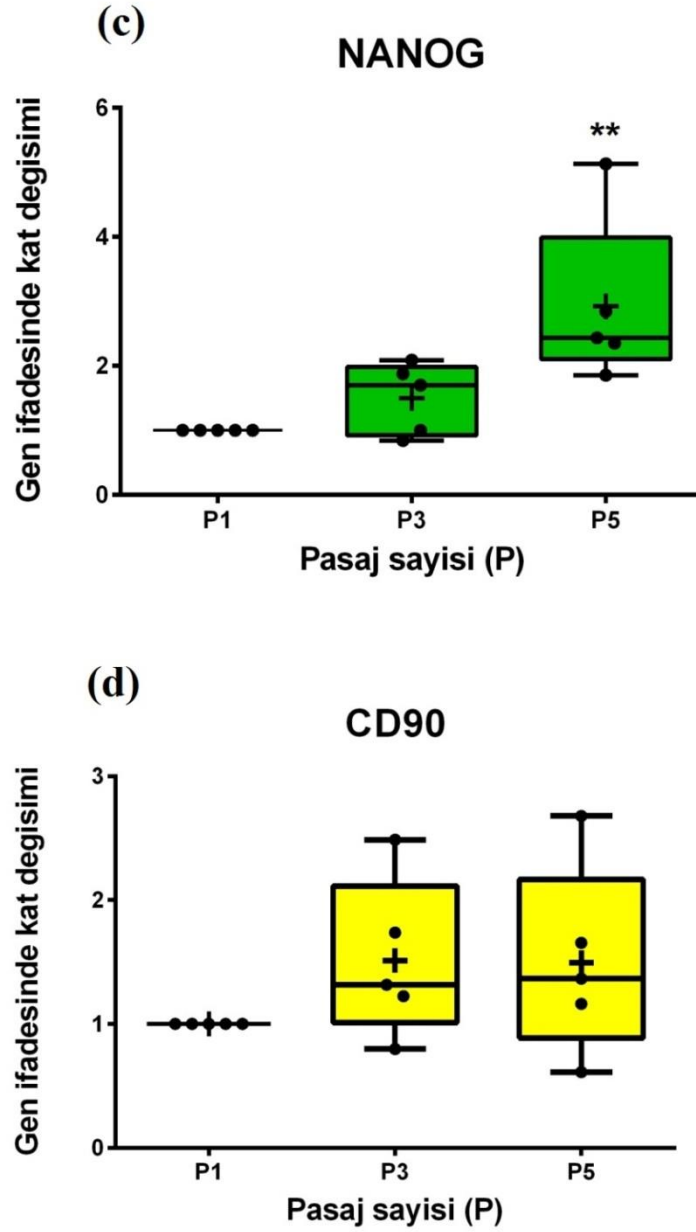
Aynı satırda farklı harfler (a, b, c) arasında istatistiksel farklılık vardır (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

NANOG gen ifadesi P1 ile karşılaştırıldığında P3 ve P5'te sırasıyla 1,50 $\pm$ 0,24 ve 2,92 $\pm$ 0,57 ($p<0.01$) kat düzeyinde artış gösterdi. P3 ile P5 arasında RASKH'lerin NANOG gen ifadelerinin kat artışları arasında da istatistiki bir önem ($p<0,01$) olduğu gözlemlendi (Tablo 3.1) (Şekil 3.14 c).

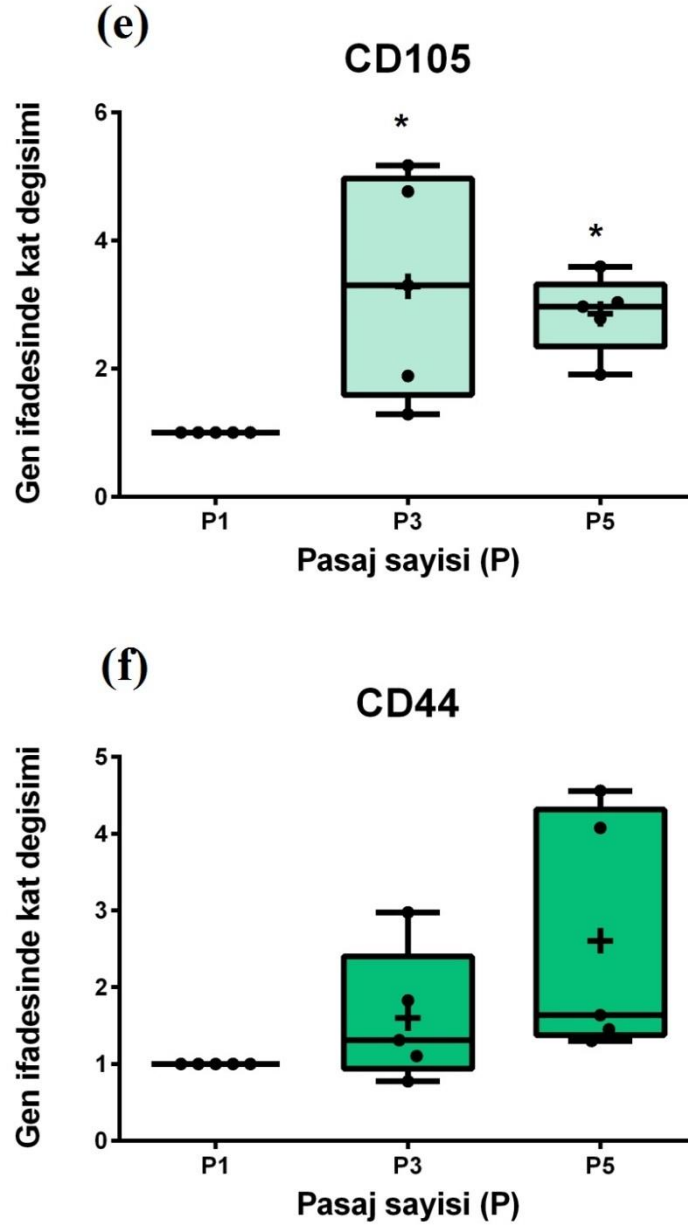
P1 ile karşılaştırıldığında P3 ve P5'te RASKH'lerin mezenkimal kök hücre belirteçlerinden CD90 genini sırasıyla 1,51 $\pm$ 0,29 ve 1,49 $\pm$ 0,34; CD44 genini 1,60 $\pm$ 0,38 ve 2,60 $\pm$ 0,70 ve CD105 genini ise 3,28 $\pm$ 0,76 ve 2,86 $\pm$ 0,27 kat artış düzeyinde ifade ettikleri saptandı. Üç farklı pasaj birbirleri ile karşılaştırıldığı zaman CD90, CD44 gen ifadelerinde istatistiki olarak bir fark gözlenmedi (Tablo 3.1), (Şekil 3.14 d), (Şekil 3.15 e, f). Fakat P1 ile karşılaştırıldığı zaman, CD105 geninin kat artışının hem P3 hemde P5'te istatistiki olarak önemli olduğu ($p<0,05$) saptandı (Tablo 3.1), (Şekil 3.14 d).



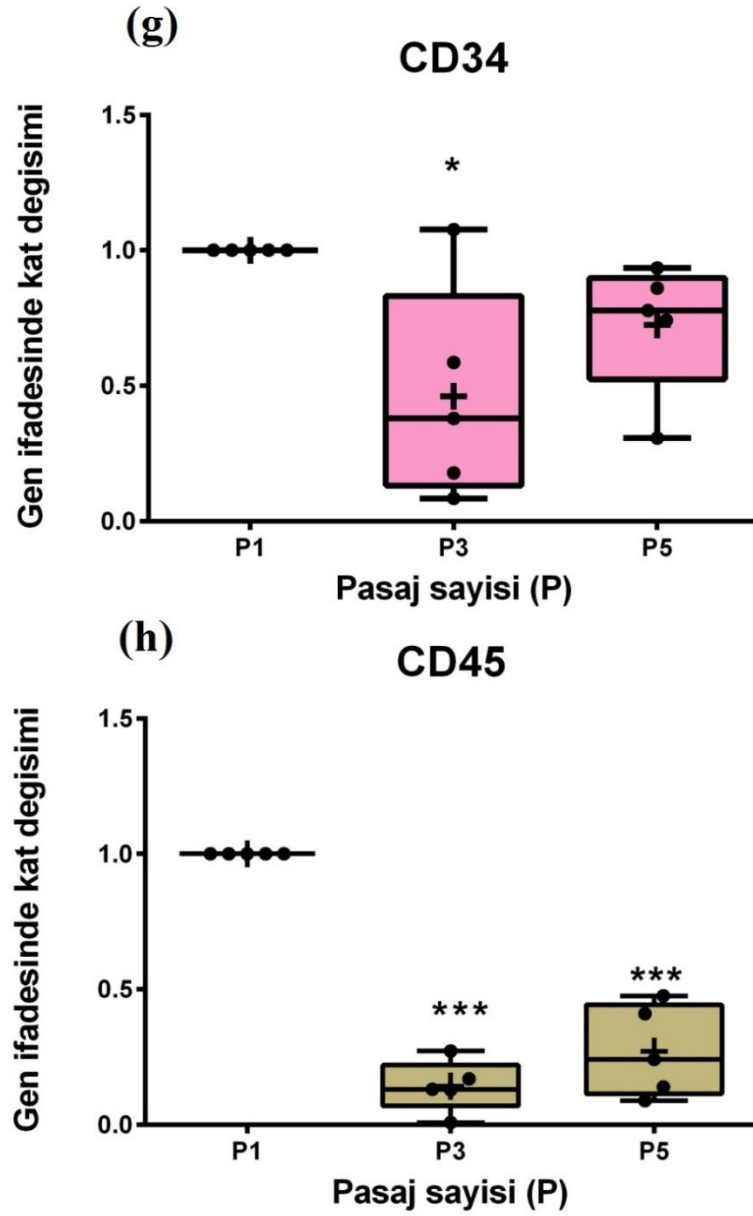
Şekil 3.13. Farklı pasajlarda RASKH'lerin SOX2 ve OCT3/4 gen ifadelerindeki kat değişimlerini gösteren Kutu ve Whiskers (bıyık) grafiği. **a.** SOX2 gen ifadesi. **b.** OCT3/4 gen ifadesi. Kutular çeyrekler arası aralığı gösterir. “+” her gen ifadesinin kat artış ortalamasını gösterir. Bıyık minimum ve maksimum kat artışları gösterir (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). $n=5$



Şekil 3.14. Farklı pasajlarda RASKH'lerin NANOG ve CD90 gen ifadelerindeki kat değişimlerini gösteren Kutu ve Whiskers (Bıyık) grafiği. c. NANOG gen ifadesi. d. CD90 gen ifadesi. Kutular çeyrekler arası aralığı gösterir. “+” her gen ifadesinin kat artış ortalamasını gösterir. Bıyık minimum ve maksimum kat artışları gösterir (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). $n=5$



Şekil 3.15. Farklı pasajlarda RASKH'lerin CD105 ve C44 gen ifadelerindeki kat değişimlerini gösteren Kutu ve Whiskers (Bıyık) grafikleri. **e.** CD105 gen ifadesi. **f.** CD44 gen ifadesi. Kutular çeyrekler arası aralığı gösterir. “+” her gen ifadesinin kat artış ortalamasını gösterir. Bıyık minimum ve maksimum kat artışları gösterir. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). $n=5$



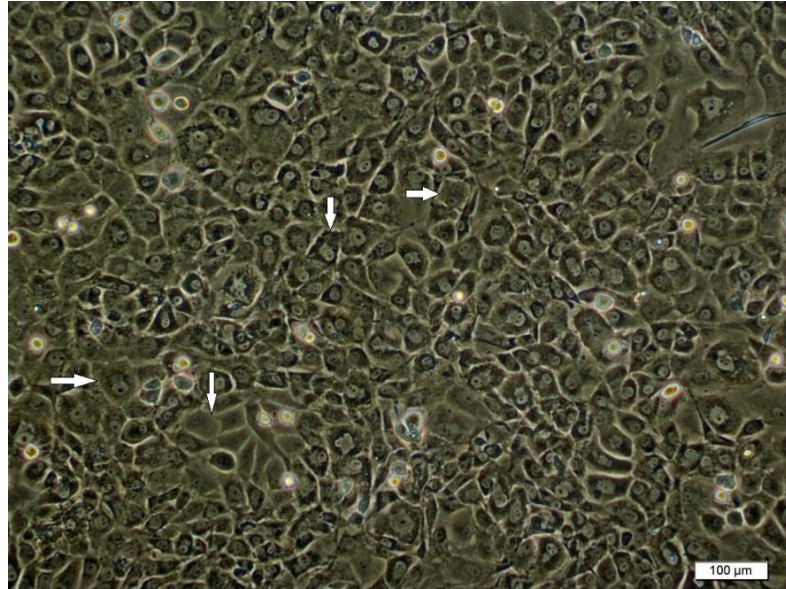
Şekil 3.16. Farklı pasajlarda RASKH'lerin CD34 ve CD45 gen ifadelerindeki kat değişimlerini gösteren Kutu ve Whiskers (Bıyık) grafikleri. **g.** CD34 gen ifadesi. **h.** CD45 gen ifadesi. Kutular çeyrekler arası aralığı gösterir. “+” her gen ifadesinin kat artış ortalamasını gösterir. Bıyık minimum ve maksimum kat artışları gösterir. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). $n=5$

RASKH'lerde hemapoietik kök hücre belirteçlerinden CD34 gen ifadesinin P1'e göre P3 ve P5'te sırasıyla $0,46 \pm 0,18$ ($p < 0,001$) ve $0,72 \pm 0,11$ kat azaldığı görüldü (Tablo 3.1) (Şekil 3.16 g). Aynı şekilde CD45 gen ifadesinin P1'e göre P3'te $0,14 \pm 0,042$ ($p < 0,001$) ve P5'te $0,27 \pm 0,075$ ($p < 0,001$) kat azaldığı saptandı (Şekil 3.16 h). P3 ve P5 arasında CD45 gen ifadesinin negatif kat artışları arasında farkın ise istatistiki olarak önemli olmadığı belirlendi (Tablo 3.1) (Şekil 3.16 h).

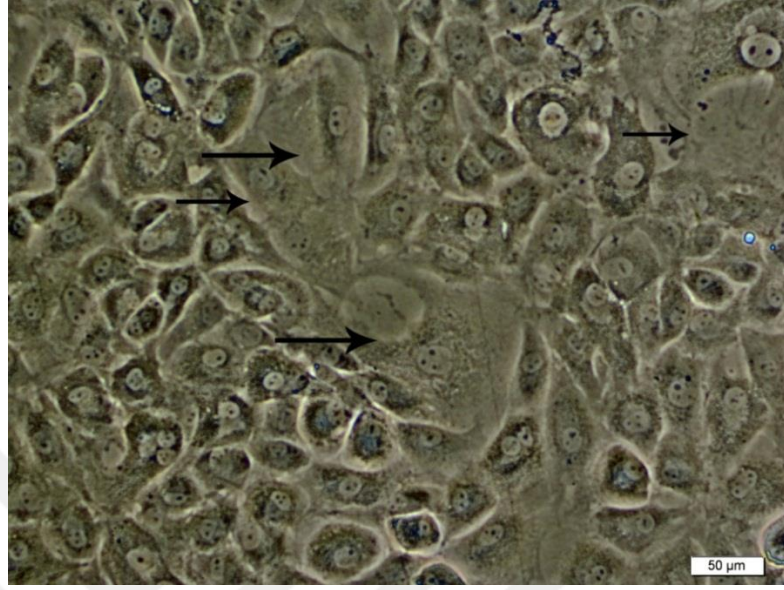
3.2. Kondrosit Kültürü ve Karakterizasyonu ile Koşullandırılmış Medyum Elde Edilmesi

3.2.1. Kondrositlerin İzolasyonu ve Kültürü

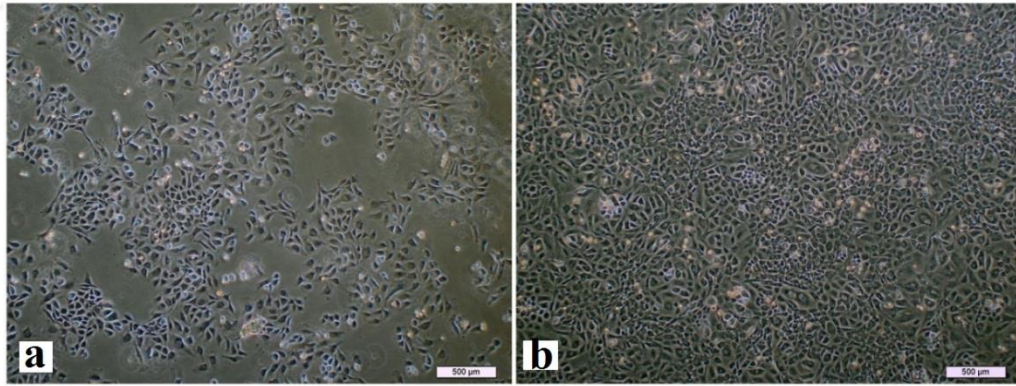
Eklem kıkırdagından enzimatik ayrıştırma ile kondrositler izole edildi. İzole edilen kondrositlerin, tek tabakalı kültür koşullarına hızlı bir şekilde adapte olduğu ve kültür ortamında hızla çoğaldıkları gözlemlendi. Kültüre edildikten 2-3 gün sonra hücrelerin yüzeye tutunduğu ve çoğalmaya başladığı gözlemlendi (Şekil 3.19 a).



Şekil 3.17. P1'de kondrositlerin morfolojisi. Poligonal morfolojiye sahip kondrosit. (oklar). Nikon inverted mikroskop. Bar: 100 µm.



Şekil 3.18. P3'te kondrositlerin morfolojisi. Poligonal morfolojilerini kaybetmiş, genişlemiş kondrositler (oklar) Nikon inverted mikroskop Bar: 50 µm.



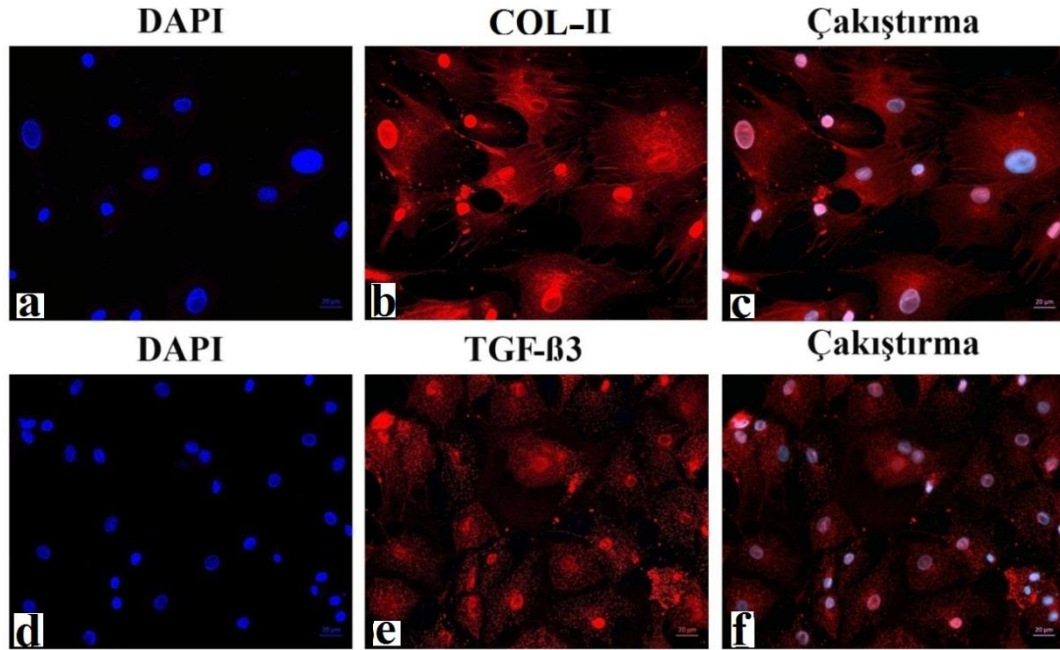
Şekil 3.19. Poligonal morfoloji gösteren P0 ve P1'den kondrositler. **a.** P0' da hızlı çoğalan kondrositler. **b.** %80-90 konfluense ulaşan P1' de kondrositler. Nikon inverted mikroskop. Bar: 500 µm.

P0'da kondrositlerin flasklara ekildikten 8-10 gün sonra %80-90 konfluense ulaştığı gözlenirken, P1 ve P2'de ise 5-6 günde konfluense ulaştıkları belirlendi. Çoğalan kondrositlerin poligonal bir morfolojiye ve granüler bir sitoplazmaya sahip oldukları (Şekil 3.17, 3.18), pasaj sayısı arttıkça hücrelerin bazılarının poligonal yapılarını kaybederek genişlemeye başlıyorlar (Şekil 3.18).

3.2.2. Kondrositlerin Karakterizasyonunun İmmunfloresan ve Real-Time PCR Metodları ile Gösterilmesi

3.2.2.1. Kondrositlerde İmmunfloresan Boyama

İF boyama ile kondrositlerin COL-II ve TGF- β 3'ü ifade ettiği gösterildi (Şekil 3.20). Kollajen II'nin hem çekirdekte hem de sitoplazmada güçlü bir şekilde ifade olduğu gözlemlendi (Şekil 3.20 b, c). TGF- β 3'ün hücre çekirdeğinin yanı sıra hücre sitoplazmasında granüler şekilde ifade olduğu görüldü (Şekil 3.20 e, f).

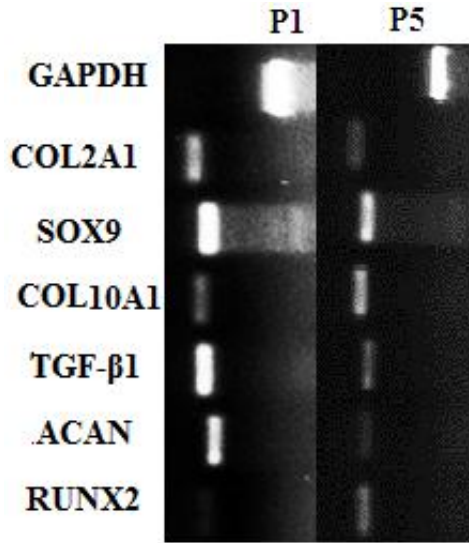


Şekil 3.20. COL-II ve TGF- β 3 ifade eden kondrositler. İmmunofloresan boyama. **a. d.** DAPI. **b. e.** Texas Red. **c. f.** Çakıştırma. Zeiss floresan ataçmanlı inverted mikroskop. Bar: 20 μ m.

3.2.2.2. PCR Analizi

Kondrositlerde SOX9, COL2A1, TGF- β 1, ACAN, COL10A1 ve RUNX2 belirteçlerinin ifadeleri agaroz jel üzerinde gösterildi (Şekil 3.21). Bu belirteçlerin gen ifadeleri de sayısal olarak Real-Time PCR ile belirlendi.

Kondrositlerde SOX9 gen ifadesinde kat artışı P1'de $27,96 \pm 6,35$ ve P5' de $0,07 \pm 0,03$; COL2A1 gen ifadesinde kat artışı P1'de $4,94 \pm 1,240$ ve P5' de $0,26 \pm 0,05$; TGF- β 1 gen ifadesinde kat artışı P1' de $143,3 \pm 44,59$ ve P5'de $0,01 \pm 0,003$ ve son olarak ACAN gen ifadesindeki kat artışı ise P1'de $273,2 \pm 84,65$ ve P5'te $0,08 \pm 0,05$ olarak belirlendi (Tablo 3.2). P1 ile karşılaştırıldığı zaman P5'te kondrositlerde SOX9 ($p < 0,001$), COL2A1 ($p < 0,01$), TGF- β 1 ($p < 0,01$) ve ACAN ($p < 0,01$) gen ifadeleri istatistiki olarak önemli derecede azaldı.



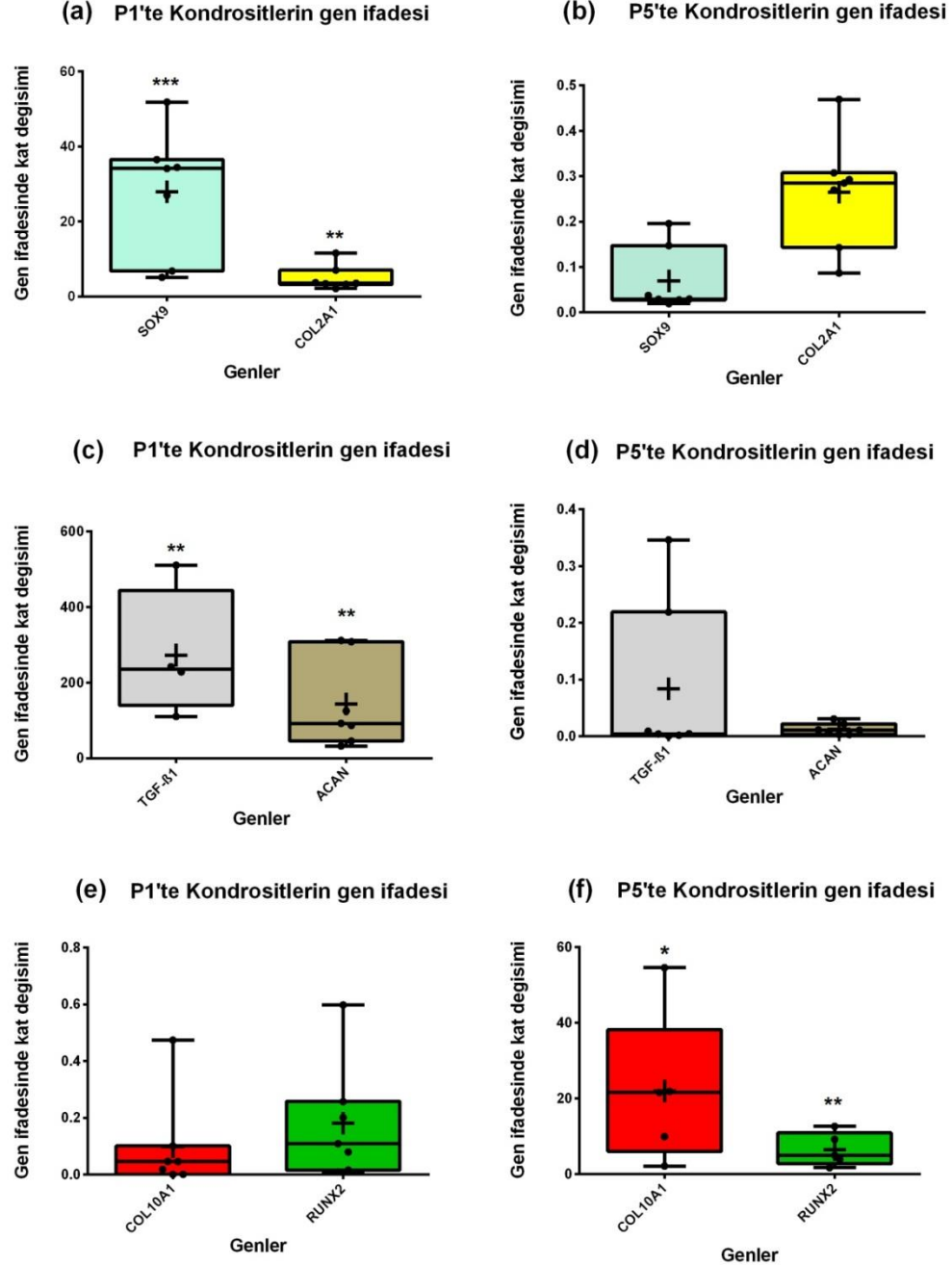
Şekil 3.21. Farklı pasajlardaki (P1 ve P5) kondrositlerde SOX9, COL2A1, TGF- β 1, ACAN, COL10A1 ve RUNX2 belirteçlerinin gen düzeyinde ifadelerinin agaroz jel üzerinde gösterimi.

Tablo 3.2. Farklı pasajlardaki (P1 ve P5) kondrositlerde SOX9, COL2A1, TGF- β 1, ACAN, COL10A1 ve RUNX2 belirteçlerinin gen düzeyinde ifadeleri, Real-Time PCR.

Genler	Ortalama $\pm$ Standart Hata		P
	P1	P5	
SOX9	***27,96 $\pm$ 6,35	0,07 $\pm$ 0,03	0,000
COL2A1	**4,94 $\pm$ 1,240	0,26 $\pm$ 0,05	0,002
TGF-β1	**143,3 $\pm$ 44,59	0,01 $\pm$ 0,003	0,007
ACAN	*273,2 $\pm$ 84,65	0,08 $\pm$ 0,05	0,001
COL10A1	0,10 $\pm$ 0,06	*22,01 $\pm$ 8,95	0,014
RUNX2	0,18 $\pm$ 0,07	**6,47 $\pm$ 1,97	0,003

(*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

Diğer yandan P1’de kondrositlerin COL10A1 ve RUNX2 gen ifaderinin kat artışı sırasıyla 0,10 $\pm$ 0,06 ve 0,18 $\pm$ 0,07 iken, P5 te COL10A1 ve RUNX2 gen ifadelerinin kat artışı sırasıyla 22,01 $\pm$ 8,95 ve 6,47 $\pm$ 1,97 oldu. P1 ile karşılaştırıldığı zaman P5’te kondrositlerde COL10A1 (p<0,05) ve RUNX2 (p<0,01) gen ifadeleri istatistiki olarak önemli derecede arttı (Şekil 3.22), (Tablo 3.2.).



Şekil 3.22. Farklı pasajlarda kondrositlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerini gösteren Kutu ve Whiskers (bıyık) grafiği. **a. b.** P1 ve P5'te kondrositlerin SOX9 ve COL2A1 gen ifadesi. **c. d.** P1 ve P5'te kondrositlerin TGF-β1 ve ACAN gen ifadesi. **e, f,** P1 ve P5'te kondrositlerin COL10A1 ve RUNX2 gen ifadesi. Kutular çeyrekler arası aralığı gösterir. “+” her gen ifadesinin kat artış ortalamasını gösterir. Bıyık minimum ve maksimum kat artışları gösterir. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) $n=7$.

3.2.3. Koşullandırılmış Medyumun Toplanması

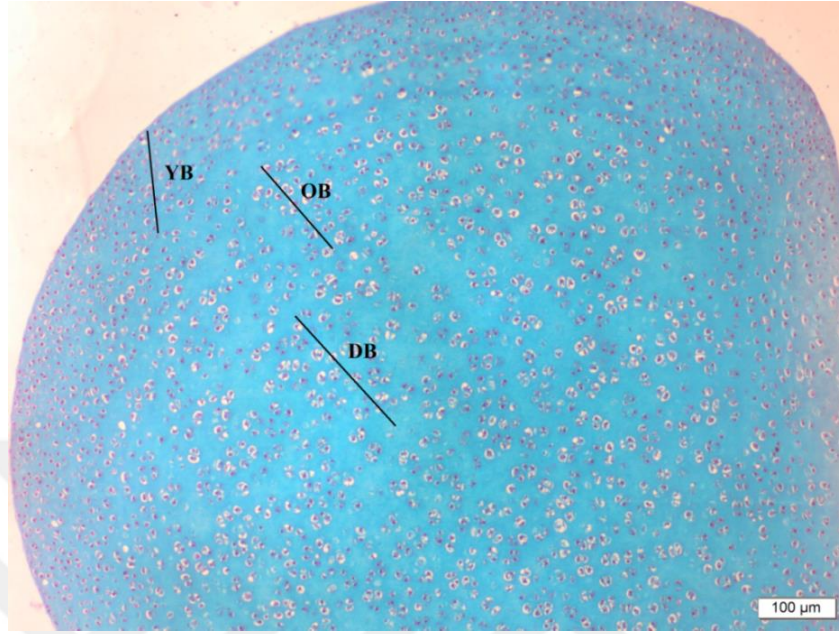
COL10A1 ve RUNX2 gibi hipertrofik belirteçlerin P5'te yüksek olmasından dolayı, KM toplanması için erken pasajlar (P1 ve P2) tercih edildi. Tüm örneklerden elde edilen KM, içerdiği parakrin salgıların homojen dağılımını sağlamak amacıyla karıştırıldı. Sonrasında KM santrifüj edilerek hücre kalıntıları uzaklaştırıldı. Süpernatant filtre edilip alikotlanarak -80 °C'de saklandı.

3.3.RASKH'nin Kondrojenik Potansiyelinin Alsiyan Mavisi, İmmunohistokimya Boyama ve Real-Time PCR Yöntemleri ile Değerlendirilmesi

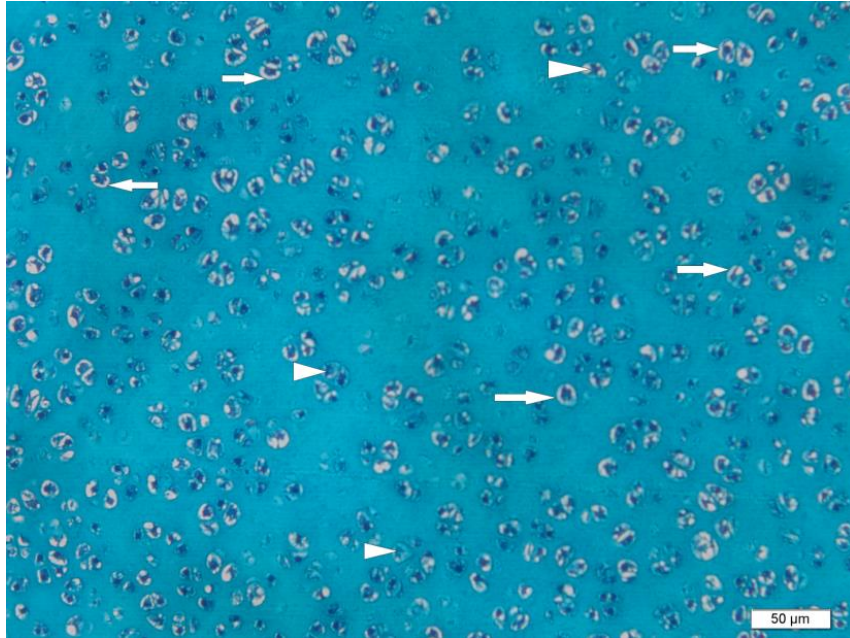
3.3.1. Alsiyan Mavisi Boyaması ile Değerlendirme

Aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen RASKH'lerin kondrojenik potansiyellerini göstermek için Alsiyan Mavisi ile aljinat jeller boyandı. Tüm gruplarda hücre sitoplazmasının ve hücrelerin periferinin Alsiyan Mavisi ile daha koyu mavi renkte boyandığı görüldü. Diğer bölgelerin ise açık mavi renkte boyandığı gözlemlendi (Şekil 3.25, 3.26 ve 3.27). Pozitif kontrol olarak normal eklem kıkırdağı dokusu Alsiyan Mavisi ile boyandı.

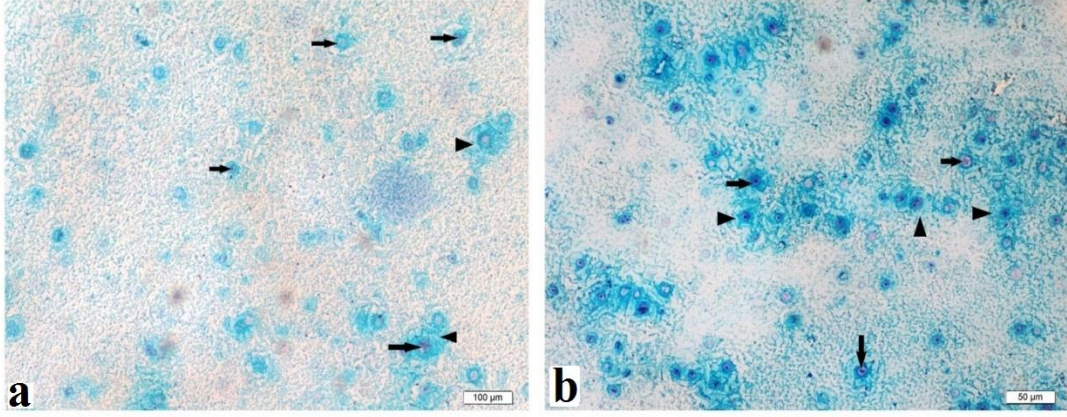
Eklem kıkırdağında Alsiyan Mavisi ile hücreler arası matriksin mavi renkte boyandığı gözlemlendi. Yüzeyel bölgenin daha soluk ve hücreden yoksun olduğu; küçük, yassı hücreler içerdiği gözlenirken; orta ve derin bölgenin ise daha koyu mavi renkte boyandığı ve daha büyük yuvarlak hücreler içerdiği belirlendi (Şekil 3.23). Eklem kıkırdak dokusunda kondrositlerin membranının etrafının çok ince bir perisellüler matriks ile çevrili olduğu, lakunların hemen çevresinin ise ince bir teritoryal matriks ile çevrelendiği saptandı (Şekil 3.24).



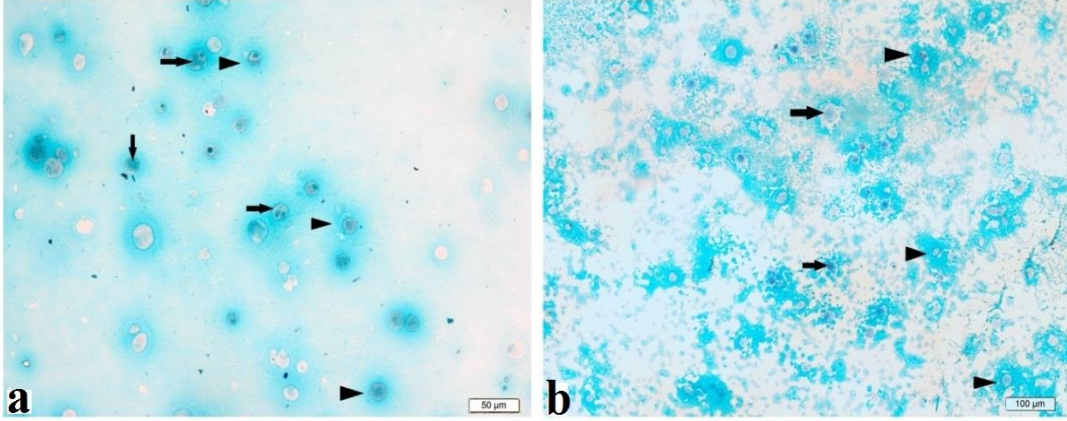
Şekil 3.23. Pozitif kontrol. Eklem kıkırdağı, (YB), yüzeysel bölge; (OB), orta bölge ve (DB), derin bölge. Alsiyan Mavisi Olympus BX50 ışık mikroskobu. Bar: 100 µm.



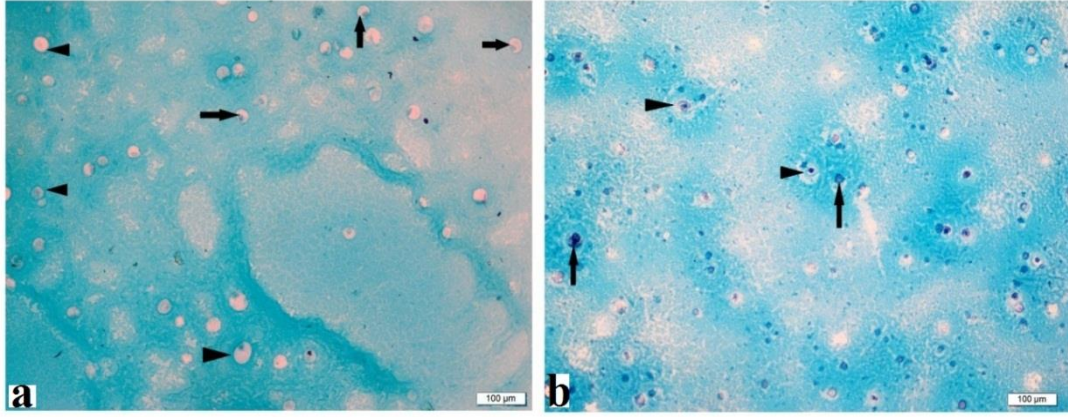
Şekil 3.24. Pozitif kontrol. Eklem kıkırdağı. Hücrelerin sitoplazması (oklar) ve çevresi (okbaşları) koyu mavi renkte boyandı. Alsiyan Mavisi, Olympus BX50 ışık mikroskobu. Bar: 50 µm.



Şekil 3.25. KM ve IM gruplarında aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen hücrelerin kondrojenik farklılaşması. **a.** KM grubu. **b.** IM grubu. Hücrelerin sitoplazması (oklar) ve çevresi (ok başları) koyu mavi renkte boyandı. Alsiyan Mavisi. Olympus BX50 ışık mikroskobu. Bar: (a) 100 µm, (b) 50 µm.



Şekil 3.26. KM+IGF-1 ve KM+TGF- β 3 gruplarında aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen hücrelerin kondrojenik farklılaşması. **a.** KM+IGF-1 grubu; **b.** KM+TGF- β 3 grubu. Hücrelerin sitoplazması (oklar) ve çevresi (ok başları) koyu mavi renkte boyandı. Alsiyan Mavisi. Olympus BX50 ışık mikroskobu. Bar: (a) 50 µm, (b) 100 µm.

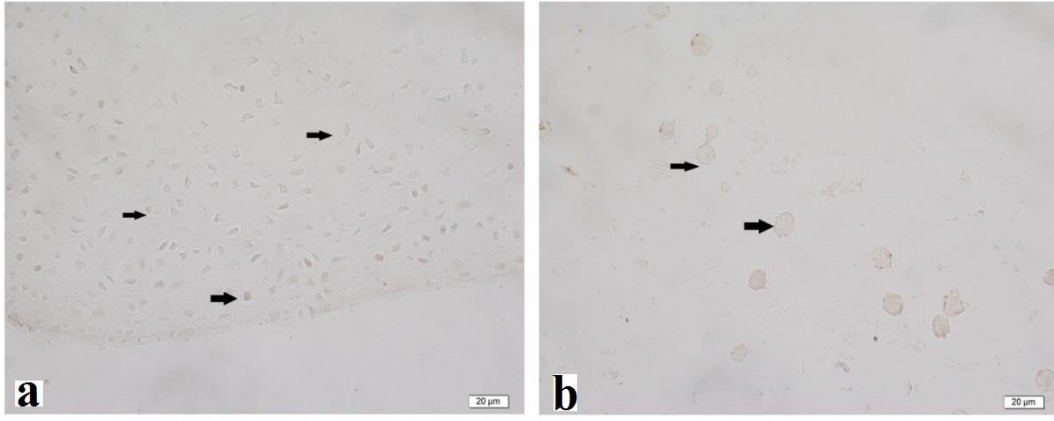


Şekil 3.27. KM+IGF-1+TGF- β 3 ve KM+IM gruplarında aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen hücrelerin kondrojenik farklılaşması. **a.** KM+IGF-1+TGF- β 3 grubu. **b.** KM+IM grubu. Hücrelerin sitoplazması (oklar) ve çevresi (ok başları) koyu mavi renkte boyandı. Alsiyan Mavisi. Olympus BX50 ışık mikroskobu. Bar: 100 μ m.

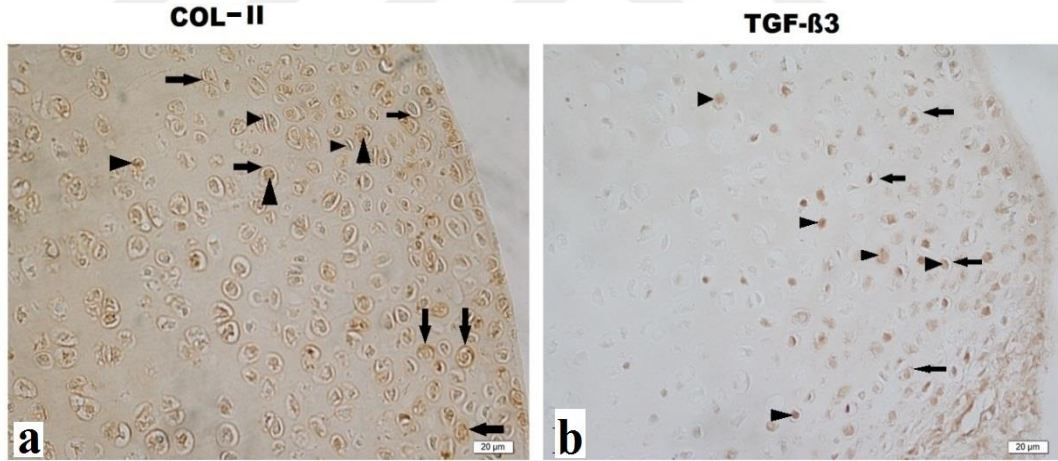
3.3.2. İmmunohistokimya Sonuçları

Tüm gruplarda 21 gün inkübasyondan sonra, aljinat içerisine enkapsüle edilen hücrelerin COL-II ve TGF- β 3'ü sitoplazmik olarak ifade ettikleri gözlemlendi. Negatif kontrol grubunda herhangi bir reaksiyon saptanmadı (Şekil 3.28). Aljinat içerisine enkapsüle edilen hücrelerin 3 boyutlu olarak aljinat jel içerisinde farklı derinliklerde bulunmalarından dolayı her iki proteinin immunreaksiyon ifadesi zayıf ve kuvvetli arasında değişti (Şekil 3.30, şekil 3.31, şekil 3.32).

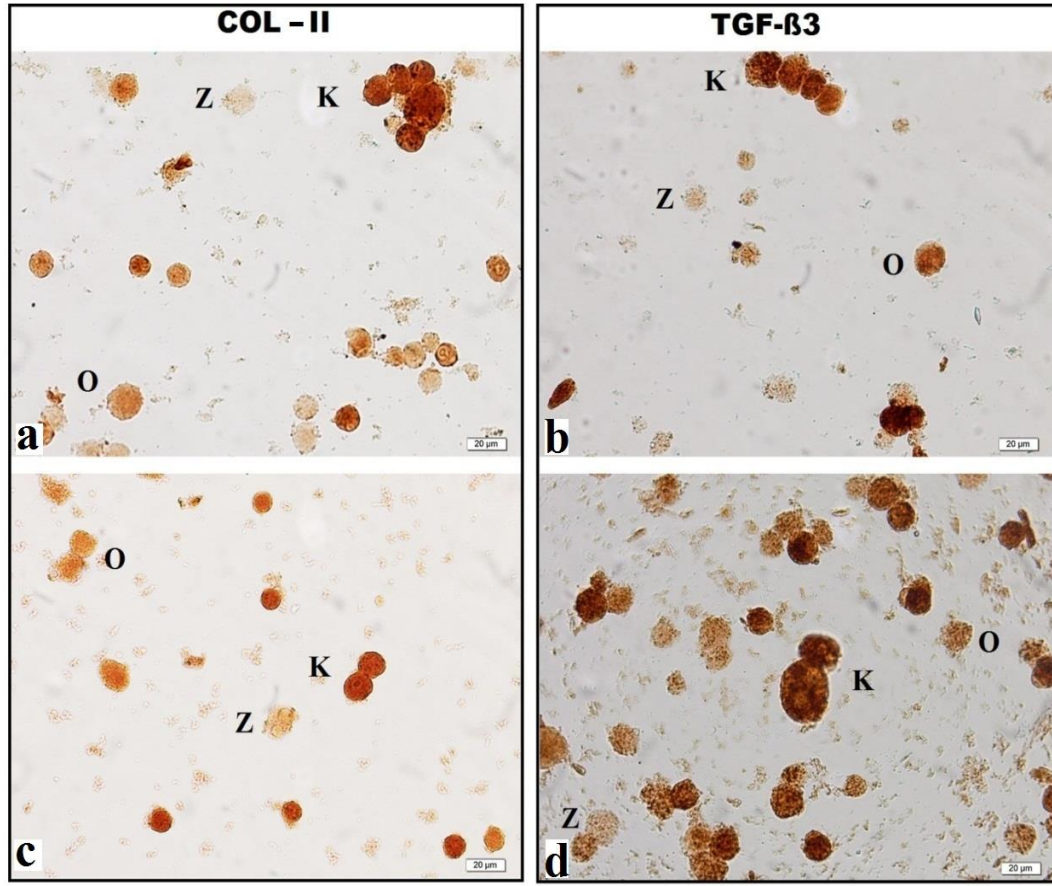
Pozitif kontrol olarak normal eklem kıkırdak doku kesitleri kullanıldı (Şekil 3.29). Eklem kıkırdak kesitlerinde TGF- β 3'ün kondrositlerin sitoplazmalarında ifade olduğu görüldü. Ayrıca TGF- β 3'ün çok zayıf olarak da teritorial matrikste ifade olduğu (Şekil 3.29 b); COL-II'nin ise kondrositlerin sitoplazmasında ve teritorial matrikste (Şekil 3.29 a) ifade olduğu saptandı.



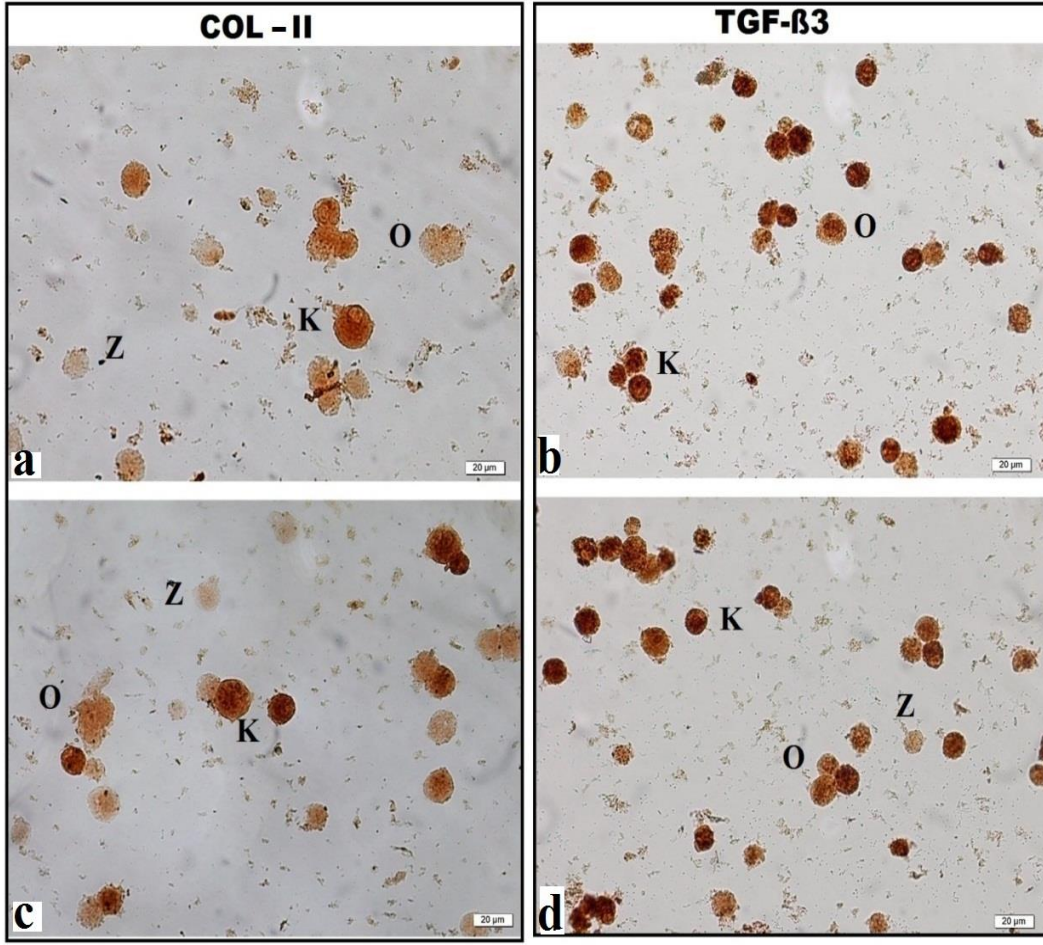
Şekil 3.28. Negatif kontrol. **a.** Eklem kıkırdağı, kondrosit sitoplazması (oklar). **b.** Aljinat Boncuk içerisine enkapsüle edilen hücreler. Hücre (oklar). İmmunohistokimya. Olympus BX50 ışık mikroskobu. Bar: 20 µm.



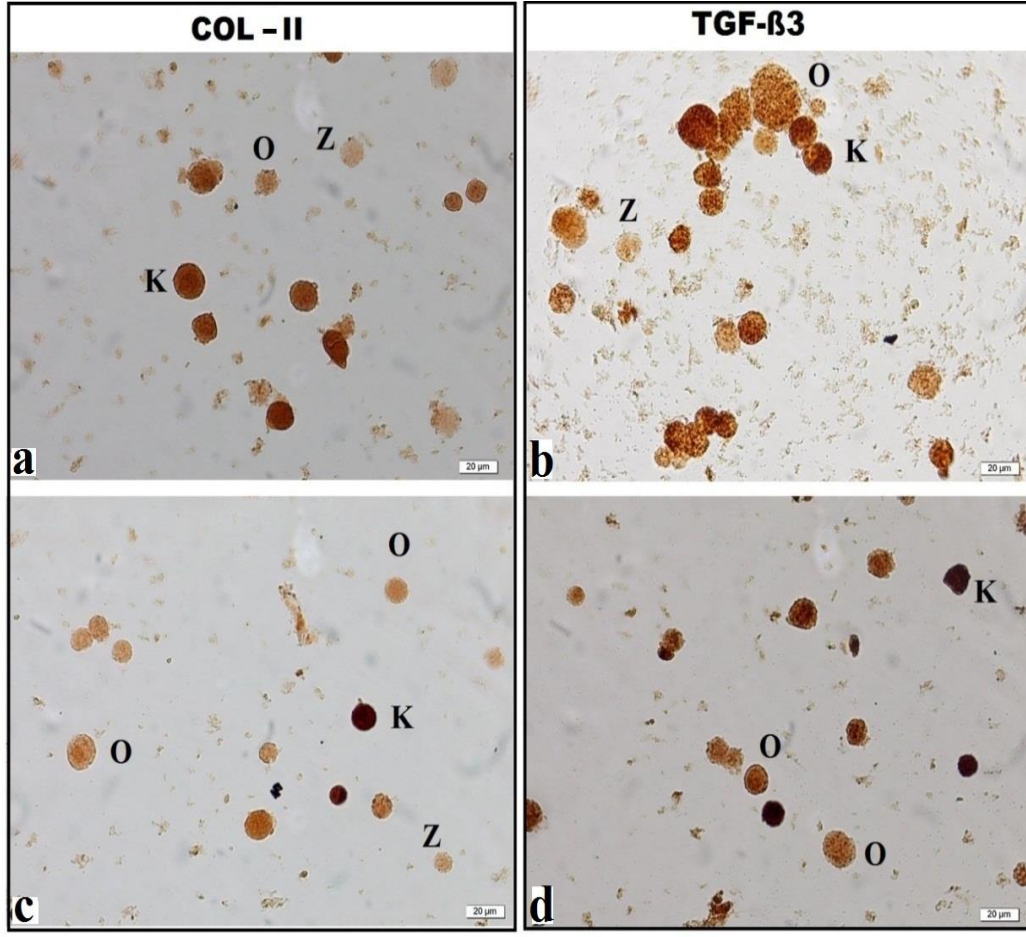
Şekil 3.29. Pozitif kontrol. Eklem kıkırdağı. **a.** COL-II ifadesi. **b.** TGF-β3 ifadesi. Teritoriyel matriks (oklar) ve kondrosit sitoplazması (ok başları). İmmunohistokimya. Olympus BX50 ışık mikroskobu. Bar: 20 µm.



Şekil 3.30. KM ve IM gruplarında aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen hücrelerin kondrojenik farklılaşması. Yirmi bir günlük inkübasyondan sonra aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen hücrelerde COL-II ve TGF- β 3 ifadesi, zayıf şiddette reaksiyon (Z), orta şiddette reaksiyon (O), kuvvetli şiddette reaksiyon (K). **a. b.** KM grubu. **c. d.** IM grubu. İmmunohistokimya. Olympus BX50 ışık mikroskobu. Bar: 20 μ m.



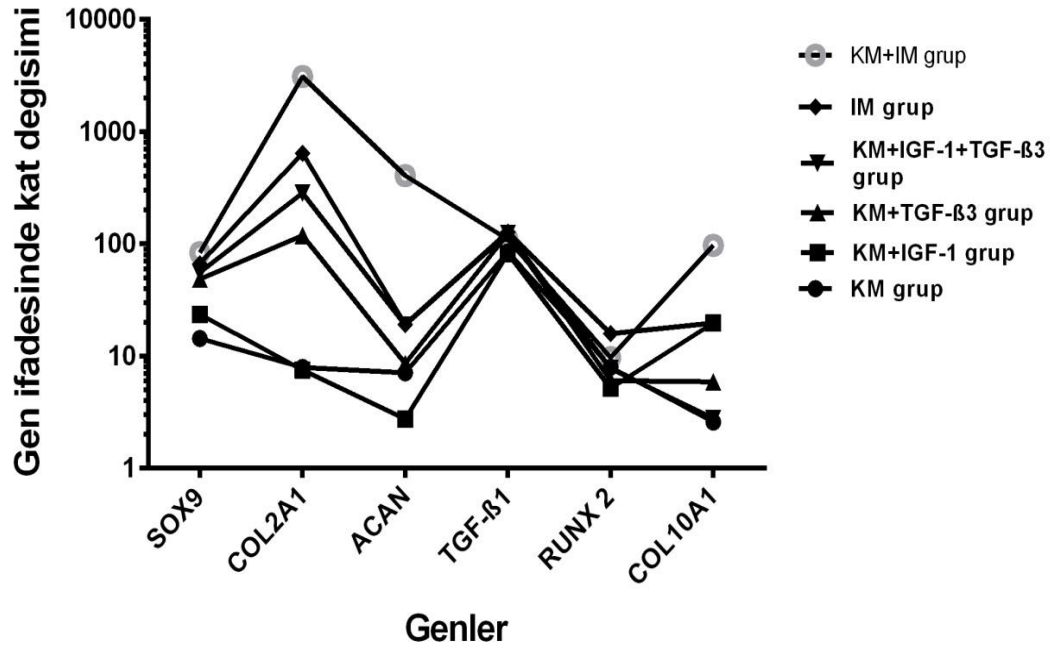
Şekil 3.31. KM+IGF-1 ve KM+TGF-β3 gruplarında aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen hücrelerin kondrojenik farklılaşması. Yirmi bir günlük inkübasyondan sonra aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen hücrelerde COL-II ve TGF-β3 ifadesi, zayıf şiddette reaksiyon (Z), orta şiddette reaksiyon (O), kuvvetli şiddette reaksiyon (K). **a. b.** KM+IGF-1 grubu. **c. d.** KM+ TGF-β3 grubu. İmmunohistokimya. Olympus BX50 ışık mikroskobu. Bar: 20 μm.



Şekil 3. 32. KM+IGF-1+TGF- β 3 ve KM+IM gruplarında aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen hücrelerin kondrojenik farklılaşması. Yirmi bir günlük inkübasyondan sonra aljinat boncuklar içerisinde enkapsüle edilen hücrelerde COL-II ve TGF- β 3 ifadesi. Zayıf şiddette reaksiyon (Z), orta şiddette reaksiyon (O), kuvvetli şiddette reaksiyon (K). **a, b,** KM+IGF-1+TGF- β 3 grubu. **c, d,** KM+IM grubu. İmmunohistokimya. Olympus BX50 ışık mikroskobu. Bar: 20 μ m.

3.3.3. Real-Time PCR ile Değerlendirme

Kondrogenezisin erken (COL2A1, SOX9, ACAN ve TGF- β 1) ve geç dönem (RUNX2 ve COL10A1) belirteçlerinin ifadeleri Real-Time PCR yöntemi ile sayısal değer olarak elde edildi. Verilerin normalizasyonu referans gen (GAPDH) ve negatif kontrol (kondrojenik genleri bazal düzeyde ifade eden RASKH'ler kullanıldı) kullanılarak yapıldı. Her gende, gen ifadesindeki kat değişimi p değeri ile birlikte ortalama ve standart hatası (SH) ayrı ayrı ilgili tabloda ve grafikte gösterildi (Tablo 3.3; Şekil 3.33).

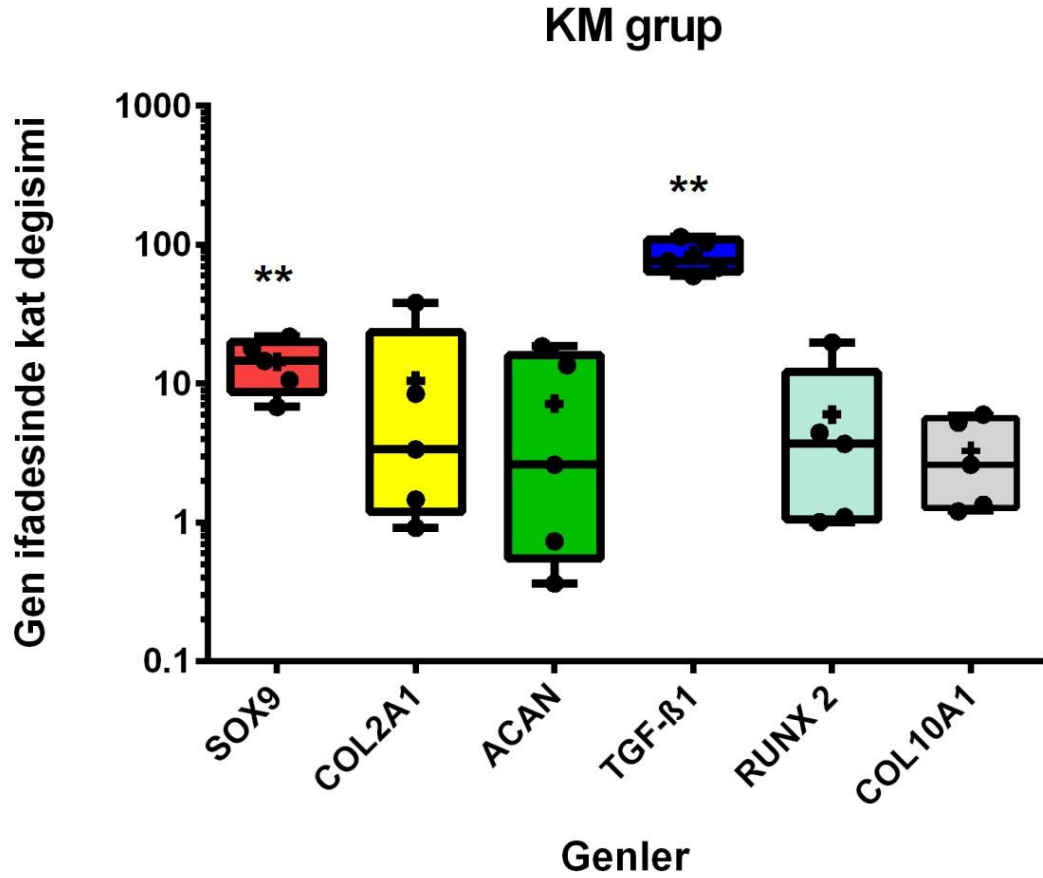


Şekil 3.33. Tüm gruplarda kondrojenik genlerin ifadesinin grafiği.

Tablo 3.3. Gruplar arasında kondrojenik belirteçlerin kat ifadelerinin gen düzeyinde karşılaştırılması.

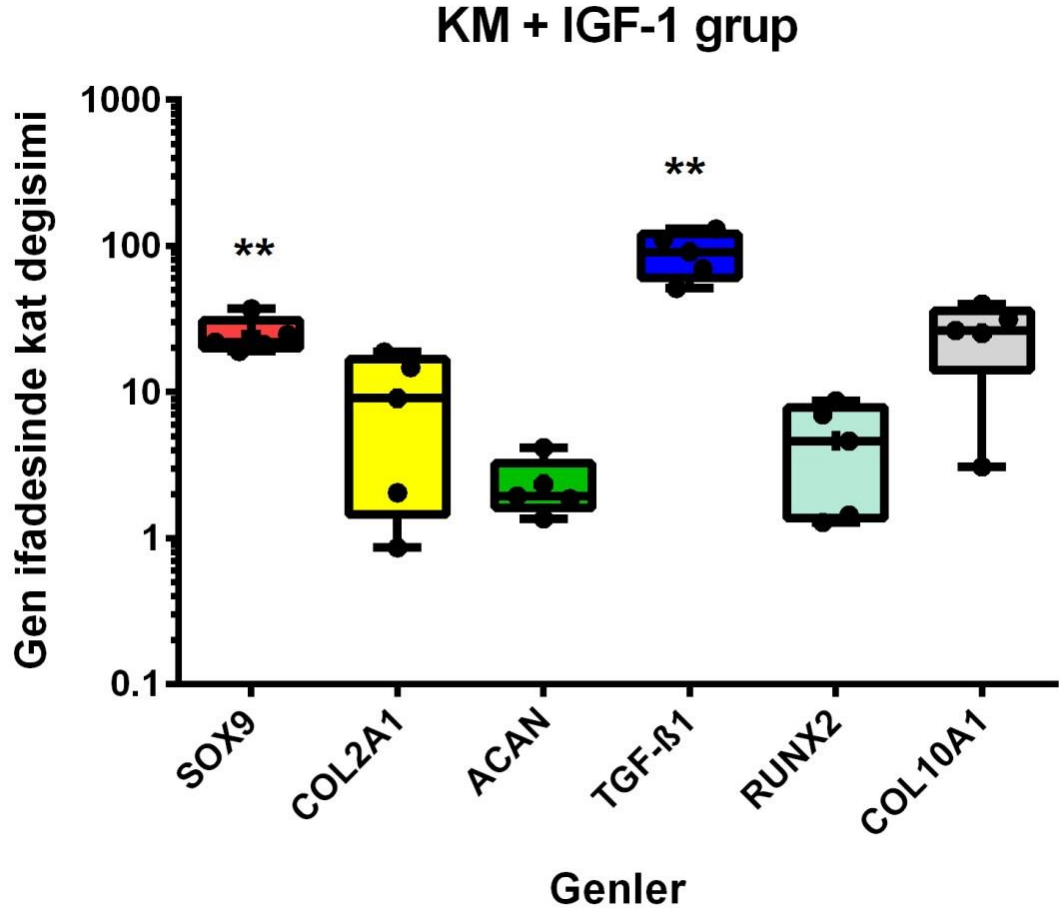
Gruplar Genler	KM	KM+IGF-1	KM+TGF- β 3	KM+IGF-1+TGF- β 3	IM	KM+IM	P
	(n:5) Ortalama $\pm$ SH	(n:5) Ortalama $\pm$ SH	(n:5) Ortalama $\pm$ SH	(n:5) Ortalama $\pm$ SH	(n:5) Ortalama $\pm$ SH	(n:5) Ortalama $\pm$ SH	
SOX9	14,36 $\pm$ 2,64 ^a	24,84 $\pm$ 3,23 ^{ab}	46,10 $\pm$ 8,68 ^{ab}	55,95 $\pm$ 7,10 ^{abc}	64,95 $\pm$ 7,63 ^{bc}	95,91 $\pm$ 19,79 ^{bc}	0,000
COL2A1	10,49 $\pm$ 7,06 ^a	09,10 $\pm$ 3,49 ^a	124,95 $\pm$ 9,28 ^{ab}	288,84 $\pm$ 57,72 ^{ab}	691,17 $\pm$ 67,90 ^b	3233,10 $\pm$ 219,52 ^c	0,000
ACAN	7,19 $\pm$ 3,75 ^a	02,34 $\pm$ 0,49 ^a	09,14 $\pm$ 2,56 ^a	19,28 $\pm$ 5,51 ^a	22,41 $\pm$ 12,57 ^a	515,52 $\pm$ 141,52 ^b	0,000
TGF- β 1	84,33 $\pm$ 10,34	90,87 $\pm$ 14,11	146,27 $\pm$ 42,45	130,15 $\pm$ 12,90	121,21 $\pm$ 23,86	108,72 $\pm$ 16,29	0,396
RUNX2	06,01 $\pm$ 3,51	04,62 $\pm$ 1,48	05,44 $\pm$ 2,26	09,32 $\pm$ 4,54	13,68 $\pm$ 3,76	06,85 $\pm$ 3,28	0,416
COL10A1	03,08 $\pm$ 2,03	25,30 $\pm$ 18,36	05,82 $\pm$ 2,26	02,69 $\pm$ 0,79	13,41 $\pm$ 7,32	59,53 $\pm$ 43,60	0,316

Aynı satırda farklı harfler (a,b,c) arasında istatistiksel farklılık vardır.



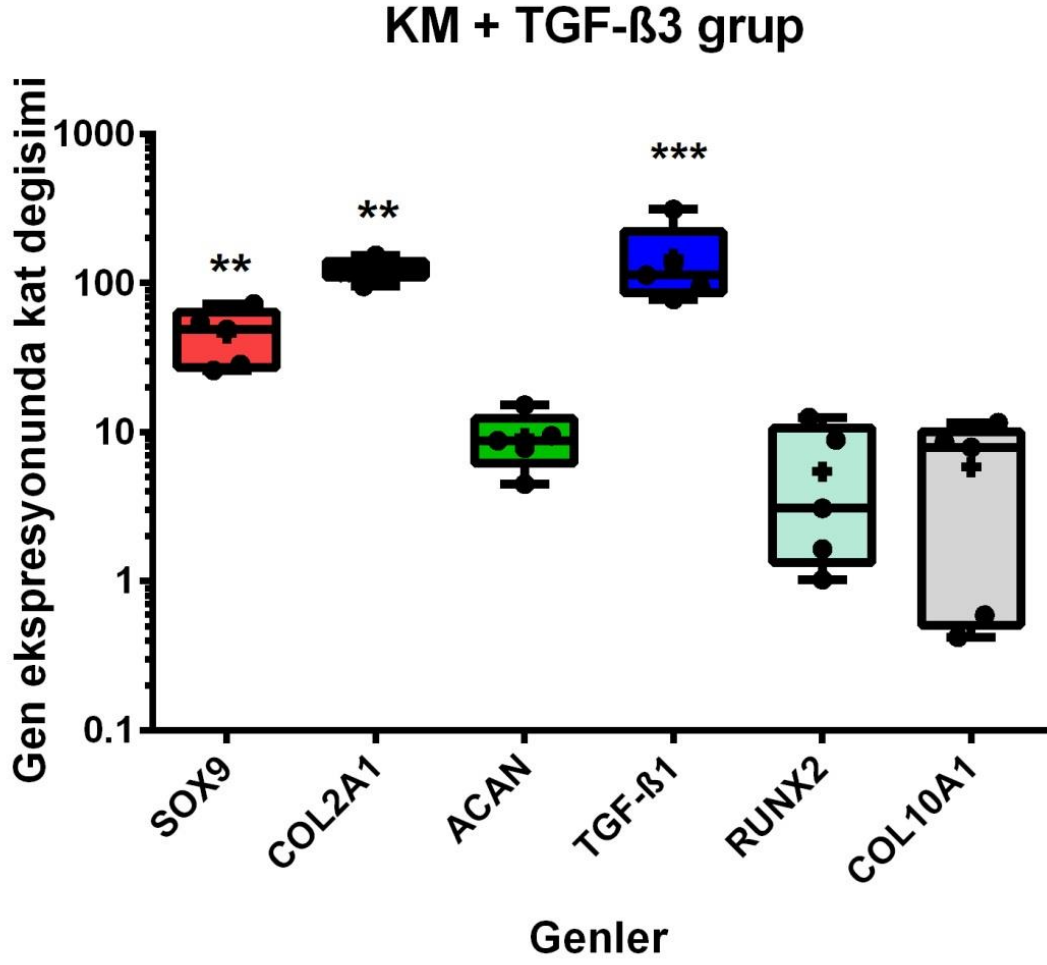
Şekil 3.34. KM grubu Kutu ve Whiskers (bıyık) grafiği. Aljinat boncuklar içinde enkapsüle edilen RASKH'lerin 21 gün boyunca koşullandırılmış medyum içinde kondrojenik hücelere farklılaştırılması. Farklılaşan kondrojenik hücelerde erken (COL2A1, SOX9, ACAN, TGF-β1) ve geç (RUNX2, COL10A1) kondrojenik belirteçlerin gen ifadeleri, Real-Time PCR. Kutular eyrekler arası aralığı gösterir. “+” her gen ifadesinin kat artış ortalamasını gösterir. Bıyık minimum ve maksimum kat artışları gösterir. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Negatif kontrol grubuna göre normalize edilmiş KM grubunda SOX9, COL2A1, ACAN, TGF-β1, RUNX2 ve COL10A1 genlerinin kat ifadesindeki artışın sırasıyla $14,36 \pm 2,64$, $10,49 \pm 7,06$, $7,19 \pm 3,75$, $84,33 \pm 10,34$, $6,01 \pm 3,51$ ve $3,08 \pm 2,03$ olduğu belirlendi. Bununla birlikte, negatif kontrole göre sadece SOX9 ($p < 0,01$) ve TGF-β1 ($p < 0,01$) gen ifadelerindeki kat artışının istatistiki olarak önemli olduğu bulundu (Şekil 3.34).



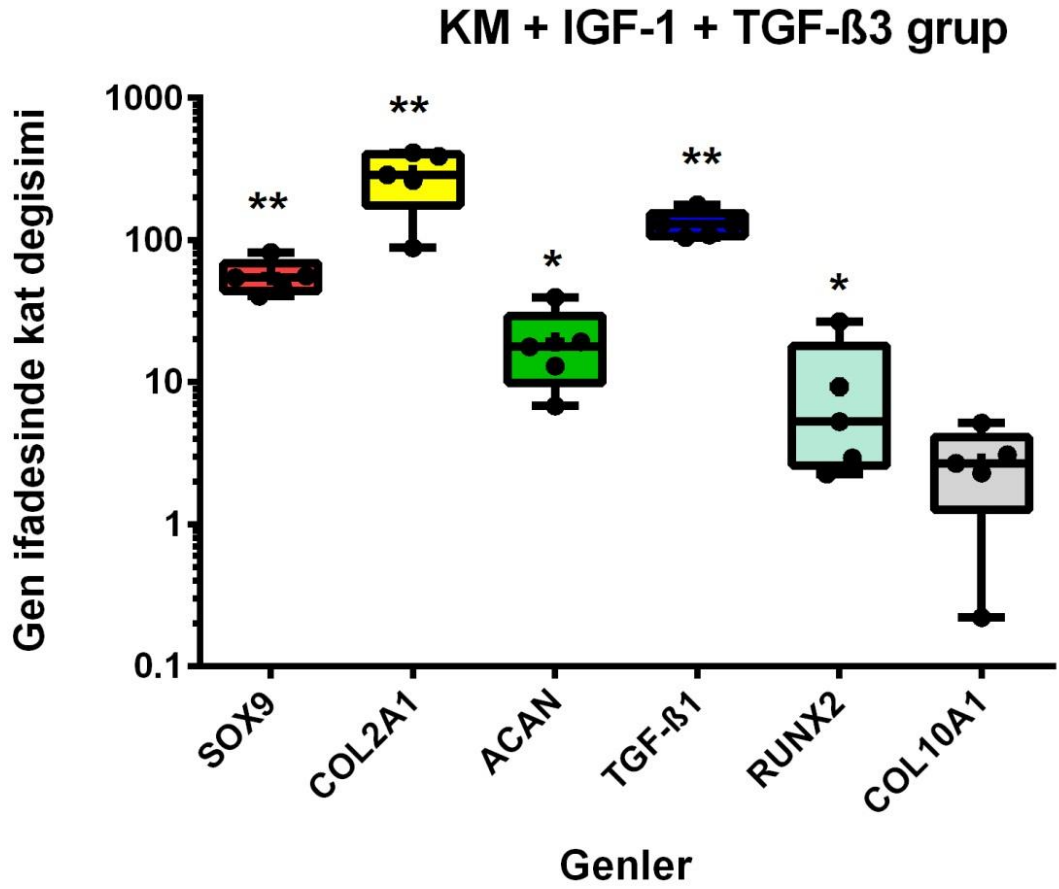
Şekil 3.35. KM+IGF-1 grubu Kutu ve Whiskers (bıyık) grafiği. Aljinat boncuklar içinde enkapsüle edilen RASKH'lerin 21 gün boyunca IGF-1 ilave edilen koşullandırılmış medyum içinde kondrojenik hücelere farklılaştırılması. Farklılaşan kondrojenik hücelerde erken (COL2A1, SOX9, ACAN, TGF-β1) ve geç (RUNX2, COL10A1) kondrojenik belirteçlerin gen ifadeleri, Real-Time PCR. Kutular çeyrekler arası aralığı gösterir. “+” her gen ifadesinin kat artış ortalamasını gösterir. Bıyık minimum ve maksimum kat artışları gösterir. (*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Negatif kontrol grubuna göre normalize edilmiş KM+IGF-1 grubunda SOX9, COL2A1, ACAN, TGF-β1, RUNX2 ve COL10A1 genlerinin kat ifadesindeki artışın sırasıyla $24,84 \pm 3,23$, $9,10 \pm 3,49$, $2,34 \pm 0,49$, $90,87 \pm 14,11$, $4,62 \pm 1,48$ ve $25,30 \pm 18,36$ olduğu saptandı. KM grubuna benzer olarak sadece SOX9 ve TGF-β1 gen ifadelerindeki kat artışının negatif kontrole göre istatistiki olarak önemli olduğu ortaya kondu ($p < 0,01$) (Şekil 3.35).



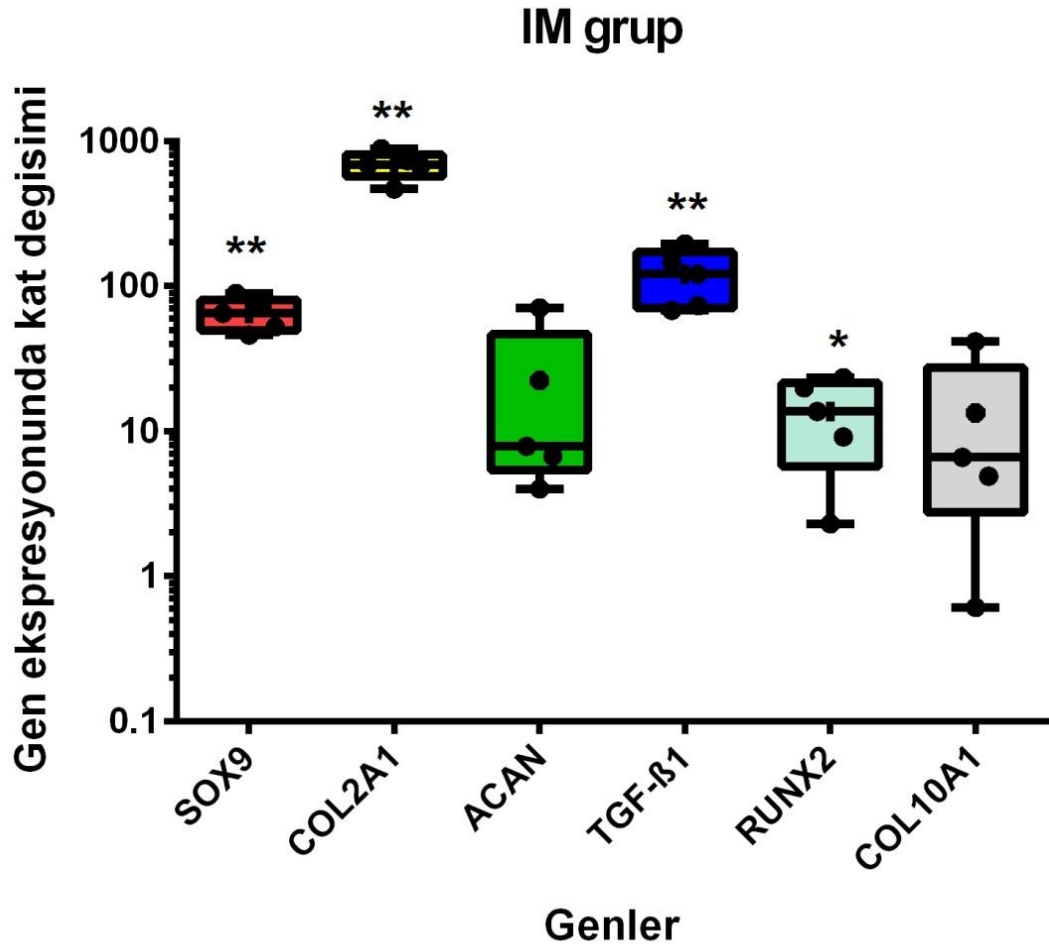
Şekil 3.36. KM+TGF- β 3 grubu Kutu ve Whiskers (bıyık) grafiği. Aljinat boncuklar içinde enkapsüle edilen RASKH'lerin 21 gün boyunca TGF- β 3 ilave edilen koşullandırılmış medyum içinde kondrojenik hücelere farklılaştırılması. Farklılaşan kondrojenik hücelerde erken (COL2A1, SOX9, ACAN, TGF- β 1) ve geç (RUNX2, COL10A1) kondrojenik belirteçlerin gen ifadeleri, Real-Time PCR. Kutular çeyrekler arası aralığı gösterir. “+” her gen ifadesinin kat artış ortalamasını gösterir. Bıyık minimum ve maksimum kat artışları gösterir (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Negatif kontrol grubuna göre normalize edilmiş KM+TGF- β 3 grubunda SOX9, COL2A1, ACAN, TGF- β 1, RUNX2 ve COL10A1 genlerinin kat ifadesindeki artışın sırasıyla $46,10 \pm 8,68$, $124,95 \pm 9,28$, $9,14 \pm 2,56$, $146,27 \pm 42,45$, $5,44 \pm 2,26$ ve $5,82 \pm 2,26$ olduğu belirlendi. SOX9, COL2A1 (p<0,01) ve TGF- β 1 (p<0,001) gen ifadelerinin negatif kontrole göre önemli derecede arttığı gözlemlendi (Şekil 3.36).



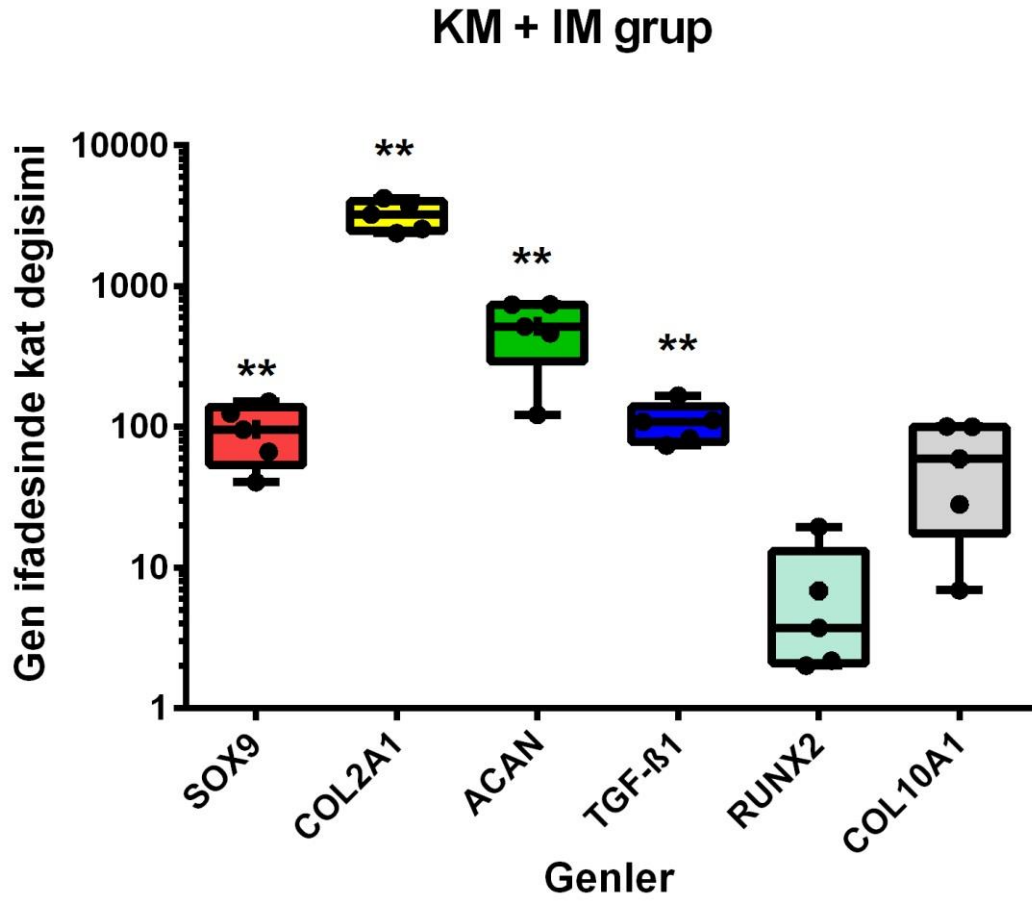
Şekil 3.37. KM+IGF-1+TGF- β 3 grubu Kutu ve Whiskers (bıyık) grafiği. Aljinat boncuklar içinde enkapsüle edilen RASKH'lerin 21 gün boyunca IGF-1 ve TGF- β 3 ilave edilen koşullandırılmış medyumunda kondrojenik hücrelere farklılaştırılması. Farklılaşan kondrojenik hücrelerde erken (COL2A1, SOX9, ACAN, TGF- β 1) ve geç (RUNX2, COL10A1) kondrojenik belirteçlerin gen ifadeleri, Real-Time PCR. Kutular çeyrekler arası aralığı gösterir. “+” her gen ifadesinin kat artış ortalamasını gösterir. Bıyık minimum ve maksimum kat artışları gösterir (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Negatif kontrol grubuna göre normalize edilmiş KM+IGF-1+TGF- β 3 grubunda SOX9, COL2A1, ACAN, TGF- β 1, RUNX2 ve COL10A1 genlerinin kat ifadesindeki artışın sırasıyla $55,95 \pm 7,10$, $288,84 \pm 57,72$, $19,28 \pm 5,51$, $130,15 \pm 12,90$, $9,32 \pm 4,54$ ve $2,69 \pm 0,79$ olduğu görüldü. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, SOX9, COL2A1, TGF- β 1 gen ifadelerinin ($p < 0,01$) düzeyinde, ACAN ve RUNX2 gen ifadelerinin ise ($p < 0,05$) düzeyinde arttığı belirlendi (Şekil 3.37).



Şekil 3.38. IM grubu Kutu ve Whiskers (bıyık) grafiği. Aljinat boncuklar içinde enkapsüle edilen RASKH'lerin 21 gün boyunca kondrojenik farklılaşma medyumunda kondrojenik hücrelere farklılaştırılması. Farklılaşan kondrojenik hücrelerde erken (COL2A1, SOX9, ACAN, TGF-β1) ve geç (RUNX2, COL10A1) kondrojenik belirteçlerin gen ifadeleri, Real-Time PCR. Kutular çeyrekler arası aralığı gösterir. “+” her gen ifadesinin kat artış ortalamasını gösterir. Bıyık minimum ve maksimum kat artışları gösterir (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Negatif kontrol grubuna göre normalize edilmiş IM grubunda SOX9, COL2A1, ACAN, TGF-β1, RUNX2 ve COL10A1 genlerinin kat ifadesindeki artışın sırasıyla $64,95 \pm 7,63$, $691,17 \pm 67,90$, $22,41 \pm 12,57$, $121,21 \pm 23,86$, $13,68 \pm 3,76$ ve $13,41 \pm 7,32$ olduğu saptandı. Negatif kontrole göre SOX9, COL2A1, TGF-β1 gen ifadelerinde ($p < 0,01$) düzeyinde ve RUNX2 gen ifadesinde ise ($p < 0,05$) düzeyinde önemli bir artış gözlemlendi (Şekil 3.38).



Şekil 3.39. KM+IM grubu Kutu ve Whiskers (bıyık) grafiği. Aljinat boncuklar içinde enkapsüle edilen RASKH'lerin 21 gün boyunca koşullandırılmış medyum ilave edilen kondrojenik farklılaşma medyumunda kondrojenik hücrelere farklılaştırılması. Farklılaşan kondrojenik hücrelerde erken (COL2A1, SOX9, ACAN, TGF-β1) ve geç (RUNX2, COL10A1) kondrojenik belirteçlerin gen ifadeleri, Real-Time PCR. Kutular çeyrekler arası aralığı gösterir. “+” her gen ifadesinin kat artış ortalamasını gösterir. Bıyık minimum ve maksimum kat artışları gösterir (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Negatif kontrol grubuna göre normalize edilmiş KM+IM grubunda SOX9, COL2A1, ACAN, TGF-β1, RUNX2 ve COL10A1 genlerinin kat ifadesindeki artışın sırasıyla $95,91 \pm 19,79$, $3233,10 \pm 219,52$, $515,52 \pm 141,52$, $108,72 \pm 16,29$, $06,85 \pm 3,28$ ve $59,53 \pm 43,60$ olduğu saptandı. Negatif kontrole göre SOX9, COL2A1, ACAN ve TGF-β1 gen ifadelerinde ($p < 0,01$) düzeyinde önemli bir artış gözlemlendi (Şekil 3.39).

Gruplar arası karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) uygulandı ve takiben post-hoc testi olarak Tukey'in testi kullanıldı. Tek yönlü varyans analizi ile SOX9, COL2A1 ve ACAN gen ifadelerinde gruplar arası istatistiki bir fark saptanırken; TGF- β 1, RUNX2 ve COL10A1 gen ifadelerinde gruplar arası bir önem gözlenmedi. Tukey testi ile SOX9 ve COL2A1 gen ifadelerinde KM grubu ile IM grubu ve KM grubu ile KM+IM grubu arasında sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,001$ düzeyinde istatistiki bir önem olduğu belirlendi. KM+IGF-1 grubu ile KM+IM grubu arasında SOX9 gen ifadesinde $p<0,001$ düzeyinde bir önem saptandı. COL2A1 gen ifadesinde KM+IM ile diğer gruplar arasında $p<0,001$ düzeyinde önem gözlenirken; KM+IGF-1 grubu ile IM grubu arasında $p<0,05$ düzeyinde istatistiki fark belirlendi.

Son olarak ACAN gen ifadesinde KM+IM ile diğer gruplar arasında $p<0,001$ düzeyinde önem görüldü (Tablo 3.3).

4. TARTIŞMA

4.1. RASKH'lerin İzole Edilmesi ve Mezenkimal Kök Hücre Karakterlerinin ve Farklılaşma Potansiyellerinin Belirlenmesi

Ratlarda gebeliğin 9-19. günleri arası gebeliğin orta dönemi olarak kabul edilmektedir. Gebe ratların, gebeliklerinin 13, 15, 17. ve 19. günleri insanlarda sırasıyla 5, 6, 7 ve 8. aylara denk gelmektedir (Zhao ve ark., 2019). Yapılan çalışmalarda amniyotik sıvıdan hücreleri izole etmek için çoğunlukla gebeliğin orta döneminde olan, 12 günlük (Antounians ve ark., 2019), 13-14 günlük (Loukogeorgakis ve De Coppi, 2017), 14 günlük (Pan ve ark., 2007; Y.-B. Zheng ve ark., 2012), 16 günlük (Bollini ve ark., 2011; Jang ve ark., 2015; Minocha ve ark., 2019), 17 günlük (Wang ve ark., 2017) ve gebeliğin son döneminde olan 20 günlük (Mun-Fun ve ark., 2015) gebe ratlar kullanıldı. Çalışmamızda gebeliğin 17. günündeki ratların amniyotik keselerinden topladığımız amniyotik sıvıdan hücreleri izole ettik.

Yapılan çalışmalarda amniyotik sıvıdan izole edilen hücreler yüksek oranda FBS (% 15-20) içeren, FGF ilave edilen (Pan ve ark., 2007; Wang ve ark., 2017), veya FGF ilavesiz (Minocha ve ark., 2019) kültür medyumuna ile 37 °C'de % 5 CO₂'li ortamda inkübe edildiler. Çalışmamızda % 20 FBS ve 5 ng/mL FGF içeren kültür medyumuna ile 37 °C'de % 5 CO₂'li ortamda kültüre edilen amniyotik sıvı kaynaklı hücrelerin iyi bir proliferasyon gösterdiğini belirledik. Önceki çalışmalarla tutarlı olarak P0'da plastik yüzeye tutunan amniyotik sıvı kaynaklı hücrelerin farklı embriyolojik kökenleri ile çeşitli morfolojilere sahip oldukları bildirildi (Chen ve ark., 2014). Bu hücrelerin hem fötüs hem de amniyotik membran kökenli olduğu bilinmektedir (Klemmt ve ark., 2011; Loukogeorgakis ve De Coppi, 2017; Underwood ve ark., 2005). Araştırmacıların bulgularına benzer şekilde (Bossolasco ve ark., 2006; Chen ve ark., 2014; Joo ve ark., 2012; Savickiene ve ark., 2015) P0'da yüzeye tutunan hücrelerin; farklı morfoloji ve büyüklükte oldukları, kültür ortamında epitel (Şekil 3.2) ve fibroblast (Şekil 3.3) benzeri

morfolojiye sahip hücreler ile büyük stromal hücrelerin (Şekil 3.4) bulunduğu görüldü. Ayrıca, çalışmamızda fibroblast benzeri hücelere morfolojik olarak benzeyen sıkıca paketlenmiş bir hücre tipi daha gözlemlendi (Şekil 3.5). Bu hücrelerin pasajlama esnasında diğer hücre tiplerine göre yüzeye daha uzun süre, sıkı bir şekilde tutundukları görüldü. Muhtemelen bu hücrelerin membranı üzerinde fazla sayıda ve farklı tipte adhezyon molekülleri bulunmaktadır. P1 ve ileriki pasajlarda kültüre edilen amniyotik sıvı kökenli hücrelerin çoğunlukla fibroblast benzeri morfolojiye sahip olduğunu ve diğer morfolojiye sahip hücrelerin miktarlarının azaldığını veya kaybolduğunu gözlemledik.

Cipriani ve ark. (2007) da bulgularımıza benzer şekilde, ilerleyen pasajlarda amniyotik sıvı kökenli hücrelerin çoğunluğunun fibroblast benzeri morfolojiye sahip olduğunu bildirdiler. Anabilim dalımızda yapılan önceki çalışmamızda Nawaz ve ark. (2020) sığır amniyotik sıvısında fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin yanı sıra, pansitokeratin ifade eden epitel hücreler ve nestin ifade eden nöral hücreler de gözlemlendi. Zhang ve ark. (2010), amniyotik sıvı kökenli hücrelerin ilk pasajlarında epitel, fibroblastik ve amniyotik sıvı tipi hücrelerin mevcut olmasına rağmen, ilk pasajdan sonra sadece fibroblastik ve amniyotik sıvı tipi hücreleri içeren kolonilerin hayatta kaldığını bildirmiştir. Uluslararası Hücresel Tedavi Derneğinin, Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi mezenkimal hücreleri tanımlamak için üç temel kriter tanımlamıştır (Dominici ve ark., 2006). (1), mezenkimal kök hücreler standart kültür koşullarında inkübe edildiklerinde plastik yüzeye tutunmalıdır. (2), CD105, CD73 ve CD90 yüzey moleküllerini ifade etmeli ve CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 ve HLA sınıf II yüzey moleküllerini ifade etmemelidir. (3), standart *in vitro* farklılaştırma koşulları altında osteoblastlara, yağ hücrelerine ve kondroblastlara farklılaşabilmelidirler. Bulgularımız RASKH'nin tüm kriterleri başarılı bir şekilde karşıladığını ayrıca yenileyici tıpta hücresel tedavi için potansiyel aday haline getirdiğini gösteren çok yönlü farklılaşma (Tsai ve ark., 2006) ve kendini yenileme (Murphy ve Atala, 2013) kabiliyetine sahip olduğunu göstermektedir.

Daha önceki araştırmalara (De Coppi ve ark., 2007; Petsche Connell ve ark., 2013; You ve ark., 2008) benzer şekilde, çalışmamızda RASKH'nin spesifik multipotent özellikleri ile mezenkimal kaynaklı olduğu belirlendi. RASKH'nin CD44, CD73, CD105

gibi mezenkimal kök hücre belirteçlerini (Phermthai ve ark., 2010) kuvvetli ifade ettiğini; ilk pasajdan sonra CD34 ve 45 belirteçlerinin ifadelerinin azaldığını saptadık.

Embriyonik kök hücrelerde pluripotensi ve kendini yenilemeyi düzenleyen NANOG, SOX2 ve OCT3/4 (Chen ve ark., 2014; Marcus ve ark., 2008) gibi transkripsiyon faktörlerini hücrelerin ifade ettiği Real-Time PCR ve immunfloresan yöntemleri ile gösterildi. Çalışmamızda pasaj sayısında artış (P1'den P5'e) ile hücre popülasyonundaki heterojenitenin azaldığı ayrıca, mezenkimal ve pluripotent gen ifadelerinin, özellikle de NANOG gen ifadesinin istatistiki olarak önemli şekilde arttığı gözlemlendi. OCT3/4 ifadesi P5'te artmış olmasına rağmen istatistiki bir önem saptanmadı.

Araştırmamızda P5'teki SOX2 gen ifadesindeki kat değişiminin, OCT3/4 ve NANOG gen ifadesindeki kat değişiminden nispeten daha düşük olduğu belirlendi. Chen ve ark. (2014) 15-17 haftalık gebe insanların amniyotik sıvısında bulgularımıza benzer sonuçlar bildirilmiştir.

Memeli kök hücrelerinde pluripotensiye devam ettiren anahtar belirleyici olarak kabul edilen sitoplazmik transkripsiyon faktörü olan OCT3/4'ün (Roubelakis ve ark., 2007) hem protein hem de gen ifadesi çalışmamızda gösterildi. Pasaj ilerledikçe OCT3/4 gen ifadesinin arttığı belirlendi. Prusa ve ark. (2003), siklin protein ifadesinin saptanması yoluyla OCT3/4 ifade eden hücrelerin, aktif olarak bölünen bir hücre rezervini temsil ettiğini bildirdiler. Bizim bulgularımızın aksine sığır (Nawaz ve ark., 2020) ve insan (Spitzhorn ve ark., 2017) amniyotik sıvısı kökenli kök hücreler üzerine yapılan çalışmalarda; OCT3/4 ifadesinin pasaj sayısındaki artışla azaldığı bildirildi. Çalışmamızda pasaj sayısındaki artış ile OCT3/4 gen ifadesinde nispi bir artışın gözlenmesi, hücrelerin heterojenitesindeki azalmaya bağlı olabilir. Minocha ve ark. (2019), amniyotik sıvı kökenli kök hücrelerde pluripotent belirteçler olan OCT4, NANOG ve SOX2 ifadelerini ve bu hücrelerin pluripotent doğasını vurgulayarak bu hücrelerin üç germ katmanına farklılaşan embriyoid cisimlere indüklenebildiğini öne sürdüler.

Mun-Fun ve ark. (2015)'nin sonuçlarına benzer şekilde çalışmamızda RASKH'lerin başarılı bir şekilde osteositlere, yağ hücrelerine ve kondrositlere

farklılaşabildiklerini gösterdik. Osteositlerin sitoplazmalarında kalsiyum birikimini Alizarin Red S, yağ hücreleri sitoplazmalarında lipid damlacıklarını Oil Red O ve kıkırdak dokunun hücreler arası matriksini boyayan Alsiyan Mavisi ile kondrositleri boyayarak hücre farklılaşmasını doğruladık.

Hem pluripotent hem de multipotent kök hücre belirteçlerini ifade etmelerinden dolayı, RASKH pluripotent kök hücreler (De Coppi ve ark., 2007) multipotent kök hücreler (Cananzi ve De Coppi, 2012) veya potansiyel pluripotent kök hücreler (Gao ve ark., 2013) olarak sınıflandırılabilir. Bu hücrelerin, karakteristik özelliklerine dayanarak doku mühendisliği ve hücre tedavileri için bir potansiyele sahip olduğunu ve muhtemel güçlü bir aday olduğunu düşünmekteyiz.

4.2. Kondrosit Kültürü ve Karakterizasyonu ile Koşullandırılmış Medyum Elde Edilmesi

Kondrosit farklılaşmasının ve aktivasyonunun hücre içi ve moleküler mekanizmalarını araştırmak için en güçlü araçlardan birisi kondrosit kültürüdür (Thirion ve Berenbaum, 2004). Yapılan birçok araştırmada (Choudhary ve ark., 2018; Copray ve ark., 1985; Nakagawa ve ark., 2002) neonatal dönemde (0-21 gün) (Groth-Vasselli ve Farnworth, 1986), sıçanların eklem kıkırdağından kondrositler izole edilmiştir. Bernstein ve ark. (2009) tarafından önerilen protokole bazı modifikasyonlar yapılarak 10 günlük neonatal sıçanların eklem kıkırdağından kondrositler başarılı bir şekilde izole edildi. Kondrosit primer hücre kültüründe hücrelerin ilk ekiminden sonra, önceki çalışmalara uyumu olarak tek katmanlı hücre kültürü ortamında kondrositlerin güçlü bir şekilde plastik yüzeye tutundukları ve yayıldıkları gözlemlendi (Şekil 3.17). Çalışmamızda hücrelerin ilk pasajlarında poligonal bir morfolojiye ve granüler bir sitoplazmaya sahip oldukları görüldü. Gosset ve ark. (2008), kemirgen kosta kıkırdağından izole edilen kondrositlerin de bulgularımıza benzer morfolojik özellikler sergilediğini bildirdiler. Araştırmamızda Real-Time PCR ve immüno Floresan yöntemleri ile kondrositlerin, kondrositlere spesifik gen ve proteinleri ifade ettikleri gösterildi. İF ile P1 kondrositlerinde de COL-II ve TGF- β 3 proteinlerini (Şekil 3.20) ve Real-Time PCR ile de TGF- β 1, SOX9, COL2A1, ACAN genlerini (Tablo 3.2; Şekil 3.21) güçlü bir şekilde ifade olduğu saptandı. Fakat

P5'te kondrositlerde aynı genlerin ifadesinin azaldığı; RUNX2 ve COL10A1 gibi hipertrofik genlerin ifadelerinin arttığı belirlendi. Sunulan çalışmada, tek katmanlı hücre kültüründe kondrositlere özgü genlerin ayrıntılı moleküler analizi yapılarak kondrosit gen ifadelerinde ki değişkenliğin hücre kültürü sırasında hücre morfolojisini nasıl etkilediği araştırıldı. Çünkü kondrositlerden koşullandırılmış medyum toplanmadan önce tek katmanlı kültürde kondrositlerin genetik profilini ve doğasını anlamak önemlidir. Schulze-Tanzil (2009), yeterli kondrosit çoğalması için tek tabakalı kültür koşullarının vazgeçilmez olduğunu dile getirmiştir. Yapılan çalışmada kondrositlerin tek tabakalı hücre kültüründe çoğaltılması esnasında, kültüre edilen hücrelerin konsantrasyonuna ve pasaj sayısına bağlı olarak kondrositlerin morfolojik görünümünün etkilendiği saptandı. Bu hücrelerin genişlediği, yaşlandığı ve muhtemelen hipertrofiye uğradığı gözlemlendi (Şekil 3.18). Stokes ve ark. (2002), tek katmanlı kondrosit hücrekültüründe yaşlanma ve de-differensiyasyon ile ilişkili çeşitli genlerin aktif hale geldiğini öne sürdüler. Benzer şekilde Ashraf ve ark. (2016), ise eklem kondrositlerinin *in vitro* çoğalması sırasında yaşlandığını ve de-differensiasyona uğradığını açıkladılar. Watt (1988) ve Schulze-Tanzil ve ark. (2002), bu tarz değişikliklerin, tek tabakalı hücre kültürü sırasında düşük hücre ekim yoğunluğundan kaynaklanabileceğini ileri sürdüler. Kondrositlerin tek tabakalı hücre kültürü esnasında, kondrosite özgü fenotiplerini kaybettikleri; morfolojilerinin daha fazla fibroblast hücrelerine benzediği ve kondrositlere spesifik olmayan bir sentez biçimi geliştirdikleri de bildirildi (Schulze-Tanzil, 2009; Schulze-Tanzil ve ark., 2004). Aynı zamanda Kang ve ark. (2007) da bizim bulgularımızla tutarlı olarak P5'e kadar kondrositlerin de-differensiasyona uğradığını gösterdiler. Dolayısıyla ilerleyen pasajlarda tek tabakalı hücre kültüründe kondrositlerdeki morfolojik değişikliklerin ve de-differentiasyon olayının, hücrenin genetik yapısındaki değişikliklerle ilişkili olabileceğini düşünüyoruz.

SOX9, kondrosite farklılaşmanın erken bir belirtecidir ve COL2A1 geni tarafından kodlanan COL-II proteini ve ACAN geni tarafından kodlanan agrekan proteini ifadesinin başlaması için gereklidir. Ayrıca SOX9 kondrositlerin kaderinin ve kök hücrelerin kondrosite farklılaşmanın belirlenmesinde de önemli bir rol oynar (Akiyama ve Lefebvre, 2011). Çalışmamızda P1 ile karşılaştırıldığı zaman hipertrofiye uğradıklarını düşündüğümüz P5'teki kondrositlerin SOX9 ifadelerinin azaldığını saptandı (Tablo 3.2). Bulgularımıza benzer olarak, Akiyama ve Lefebvre (2011)'nın yapmış oldukları bir

çalışmada büyüme plağında hipertrofiye uğramamış tüm kondrositlerin SOX9'u yüksek düzeyde ifade ettiğini belirttiler. Araştırmamızda COL2A1 geninin kodladığı COL-II proteininin spesifik olarak hücrelerin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde ifade olduğu gösterildi (Şekil 3.20). P1'e göre P5'te kondrositlerde COL2A1 ifadesindeki azalmanın SOX9 geni tarafından düzenlendiğini düşünüyoruz (Tablo 3.2). Horton ve ark. (1987), da bulgularımıza benzer olarak COL-II'nin, kondrositlere farklılaşmanın erken döneminde, fazla miktarda ve oldukça spesifik bir kondrosit ürünü olarak salgılandığını belirttiler. Ayrıca Kang ve ark. (2007) yine bulgularımızla uyumlu olarak hücrelerde P1'den P5'e doğru gittikçe COL-II ifadesinin azaldığını bildirdiler.

COL10A1 geni, hipertrofik kondrosite özgü moleküler bir belirteç olarak da bilinir (Warman ve ark., 1993) ve RUNX2 tarafından düzenlenir (Enomoto ve ark., 2000; Kim ve ark., 1999). Cbfa1 olarak da adlandırılan RUNX2, kondrosit hipertrofisinin güçlü bir indükleyicisi olarak kabul edilir (Ding ve ark., 2012). Takeda ve ark. (2001) hipertrofik olmayan kondrositlerde RUNX2'nin aşırı ifadesinin kondrosit hipertrofisine neden olduğunu bildirdiler. Benzer şekilde, Enomoto ve ark. (2000), Cbfa1'in, COL10A1 ile birlikte hipertrofik kondrositlerde ve prehipertrofik kondrositlerde ifade olduklarını belirttiler. Takeda ve ark. (2001), RUNX2 ve COL10A1 arasında *in vivo* korelasyonun mevcut olduğunu ve hipertrofik kondrositlerdeki RUNX2 ifadesinin artmasının transgenik farelerde COL10A1 ifadesini yükselttiğini tespit ettiler. Çalışmamızda P5'te kondrositlerin COL10A1 ve RUNX2 genlerini yüksek oranda ifade etmelerinden dolayı bu hücrelerin hipertrofiye uğradıklarını düşünüyoruz (Tablo 3.2). TGF- β süper ailesi, TGF- β 'lar ve ilişkili büyüme faktörlerinden oluşur ve proliferasyon, farklılaşma, matriks sentezi, apoptoz ve ERK 1/2 ve Smad2/3 sinyal yolları yoluyla kondrosit olgunlaşmasının düzenlenmesi dahil olmak üzere çeşitli hücre fonksiyonları için gereklidir (Ferguson ve ark., 2000; Pfeifer ve ark., 2019; Zhu ve ark., 2015).

In vitro çalışmalar, TGF- β 'nın embriyonik kondrositlerde, COL-X ve ALP gibi hipertrofik belirteçlerin ifadelerini ve hücre hipertrofisini inhibe ettiğini gösterdi (Ballock ve ark., 1993; Böhme ve ark., 1995; Chimal-Monroy ve de Leon, 2003; Ferguson ve ark., 2000). Çalışmamızda P5'teki kondrositlerde TGF- β 1 gen ifadesinin azalmasının bu hücrelerde COL2A1 ve ACAN gen ifadelerini de azalttığını düşünüyoruz (Tablo 3.2). Zhu ve ark. (2015) TGF- β 1'in sıçan kondrositlerinde COL-II ve agrekan ifadesini

uyardığını bildirdiler. Çalışmamızdaki bulgular bu çalışma bulgularıyla benzerlik göstermiştir. Bununla birlikte Roman-Blas ve ark. (2007), TGF- β 'nın OA'lı insanların ve sıgırların eklem kondrositlerinde COL2A1, aggrekan ve SOX9 ifadelerini uyaran Smad2/3 sinyal yolağını aktifleştirdiğini belirttiler. Çalışmamızda P5'te kondrositlerin TGF- β 1 ifadesinde meydana gelen anlamlı azalma ile COL10A1 gen ifadesindeki önemli bir artışın olması P5' teki kondrositlerin hipertrofisi ile ilişkili olabileceğini akla getirmektedir (Tablo 3.2).

Sunulan araştırmada kondrositlerin karakterizasyonu ile ilgili olarak sadece kondrositlere spesifik belirteçlerin, sayısal olarak gen ifadeleri gösterildi. Ancak bu genlerin kodladığı protein ifadelerinin “western blotting” tekniği kullanılarak belirlenmesi, gen ifadesi sonuçlarımızın desteklenmesi açısından önemli olacaktır. Ayrıca COL-I gen ve protein ifadelerinin belirlenmemiş olması da çalışmanın diğer bir eksik yönüdür. Çünkü yapılan bir çalışmada COL-I'in; COL-II, ACAN ve SOX9'daki azalmayla birlikte de-differensiyasyon olmuş kondrositlerde yoğun bir şekilde ifade olduğu bildirilmektedir (Schulze-Tanzil, 2009). Kondrosit de-diferensiyasyonu, kondrosit hipertrofisinden farklı bir olaydır. De-diferensiyasyon süreci, eklem kıkırdak dokusundaki kondrositlerin COL-II gibi hücreler arası matris moleküllerini sentezleme yeteneğini kaybetmesi ve bunun yerine tip-1 kollajenini ifade etmesi ile karakterizedir, ayrıca tek katmanlı hücre kültürü sırasında fibroblastlara spesifik bir proteoglikan olan versikan da bu süreçte üretilir (Binette ve ark., 1998). Uzun süreli hücre kültürlerinden sonra, eklem kondrositlerinin bir kısmı da hipertrofik transformasyona ve COL-X birikimine maruz kalabilir (Pacifci ve ark., 1991; Wu ve ark., 2014). Hipertrofik olan kondrositler COL-X'i ifade ederler (Warman ve ark., 1993). Dolayısıyla P5'te kondrositlerin hipertrofiyeye mi yoksa de-diferensiyasyona mı uğradığını ortaya koymak için COL-I ifadesini göstermek oldukça önemlidir. Sunulan çalışmada P5'te kondrositlerin tek tabakalı kültürde uzun süreli ve sürekli pasajlanmasının sonucu olarak, kondrosit kültüründe fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücreleri göremememize rağmen, COL10A1'in yoğun ifadesine bağlı olarak, kondrositlerin hipertrofiye uğradığını söyleyebiliriz. Aynı zamanda COL-II, ACAN ve SOX9 gibi genlerin ifadelerinin belirgin şekilde azalmasının da kondrosit de-differensiyasyonuna neden olduğunu söyleyebiliriz.

Kondrositlerin, eklem kıkırdak dokusunun fonksiyonunun sürdürülmesinde, kök hücrelerin farklılaşmasını etkileyebilen ve kondrogenesis ile osteogenezisi

yönlendirebilen humoral faktörlerin ayrıca interlökinlerin salgılanmasında rolleri vardır (Hwang ve ark., 2007; Phull ve ark., 2016). Bos ve ark. (2001), kıkırdığın, çevresine bol miktarda humoral faktörler salgılayan parakrin bir organ gibi fonksiyon gördüğünü bildirdiler. Ayrıca Alves da Silva ve ark. (2015), salgılanan çeşitli faktörlerin kök hücre farklılaşmasını tetiklemek için büyüme faktörlerine alternatif olarak kullanılabileceğini belirttiler. Kondrositler ve MKH'lar arasındaki iletişimin, daha çok fizyolojik seviyede çok sayıda biyokimyasal ve fiziksel sinyal geliştirme potansiyeline sahip olduğu varsayılmaktadır (Cooke ve ark., 2011).

Çalışmamızda SOX9, COL2A1 ve ACAN gibi kıkırdağa spesifik genlerin ifadelerinin korunduğu ve kondrosit hücre morfolojisinin değişime uğramadığı erken pasajlardaki (P1 ve P2) tek tabakalı kondrosit kültüründen koşullandırılmış medyum toplandı. Yapılan çalışmalarda kıkırdak doku kültüründen (Fu ve ark., 2019) veya kondrosit kültüründen (Alves da Silva ve ark., 2015; Kaźmierski ve ark., 2018) koşullandırılmış medyum toplanmıştır. Hem FBS içeren (Kaźmierski ve ark., 2018) hem de içermeyen (Alves da Silva ve ark., 2015) koşullandırılmış medyum kullanımının kök hücrelerinin kondrositlere farklılaşmasını indüklediği gösterildi. Alves da Silva ve ark. (2015)'in önerdiği şekilde kondrositler, insülin (5 ng/ mL), askorbik asit (5 µg/mL) ve FBS (%0,2) içeren HG-DMEM ile tek tabakalı olarak kültüre ettik. DeneySEL prosedürlerde homojen bir koşullandırılmış medyum elde etmek için, Fu ve ark. (2019) tarafından uygulanan yöntemle benzer olarak P1 ve P2'de ki tüm hücre flaklarından koşullandırılmış medyum toplandı, karıştırıldı, filtre edildi ve donduruldu. Liu ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada PGA/PLA iskeleye ekilip kültüre edilen kostal kondrositlerden elde edilmiş koşullandırılmış medyumda düşük seviyede TGF-β (1,2,3) , IGF-1 ve yüksek seviyede IGF-2, FGF-4 ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein (IGFBP4) bulunduğunu bildirdiler. Tek tabakalı kondrosit hücre kültüründen toplanan koşullandırılmış medyumda bulunan çeşitli büyüme faktörlerinin belirlenmesi önemlidir. Kondrojeniziste önemli rolü olan çeşitli büyüme faktörlerinin seviyelerinin tespitini proje önerimizde amaçlamadığımızdan ve yeterli miktarda proje desteğine sahip olmadığımızdan dolayı elde ettiğimiz koşullandırılmış medyum da özellikle TGF-β3, IGF-1 gibi büyüme faktörlerinin seviyelerini belirleyemedik. Dolayısıyla çalışmamızda Fu ve ark. (2019) arkadaşlarının uyguladığı şekilde deney gruplarında kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasında koşullandırılmış medyumun tek başına ve TGF-β3 ve IGF

-1 gibi kondrojenik büyüme faktörleri ile birlikte potansiyelini araştırmak için HG-DMEM ile koşullandırılmış medyum ile eşit miktarda dilüe edildi.

4.3. Tek Başına veya TGF- β 3 ve/veya IGF-1 İlave Edilmiş Koşullandırılmış Medyum ile RASKH'lerin Kondrojenik Farklılaştırılması

Kıkırdak gelişimi, mezenkimal kondroprogenitör hücrelerin yoğunlaşması ile başlayan ve kondrositlere farklılaşmaları ile sonuçlanan bir dizi karmaşık ve sıkı bir şekilde düzenlenen olayları içerir (Ahmed ve ark., 2007; Delise ve ark., 2000). Kondrojenenezisin yoğunlaşma süreci, belirli hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin kurulmasıyla tetiklenir, ayrıca kondrojenenezis ve kıkırdak gelişimi sırasında gen ifadesinin düzenlenmesinde hücreler arası ve hücre içi sinyal yolları da gereklidir (Delise ve ark., 2000). Çalışmamızda RASKH'lerin kondrojenik farklılaştırılması esnasında hücre-hücre etkileşimlerini arttırmak için iki farklı strateji uyguladık; (a) hücreler yüksek yoğunlukta, yani 4×10^6 hücre / mL olacak şekilde kültüre edildi; (b) aljinat kullanılarak 3B hücre kültür sistemi benimsendi. Yu ve ark. (2012), iskeleler kullanarak oluşturulan 3B kültür şartlarının, *in vivo* benzeri mikro ortamı taklit ettiğini; bu yüzden hücre-hücre ve hücre-hücreler arası matriks etkileşimlerinin arttığını dolayısıyla, 3B kültürün MKH'lerin kondrojenenezisini desteklediğini ve kondrojenik fenotipi koruduğunu bildirmişlerdir.

Aljinat, non-adherent bir iskeledir Steward ve ark. (2011). Aljinat, kondrojenenezis sürecindeki başarısı ile ve kültüre edilen hücrelerin kondrojenik fenotipini koruması ile bilinmektedir (Domm ve ark., 2002). Erickson ve ark. (2002) ve Ewa-Choy ve ark. (2017), MKH'lerin % 1,5 aljinat içinde kültüre edildiğinde yüksek canlılık oranına ve yuvarlak bir morfolojiye sahip olduklarına ek olarak agregat oluşturdıklarını bildirmişlerdir. Benzer şekilde çalışmamızda, RASKH'ler % 1,5 sodyum aljinat solusyonu ile enkapsüle edilerek kültüre edildi ve 21 günlük kondrojenik farklılaştırma esnasında hücrelerin yuvarlak morfolojilerini korudukları ve hücre agregatları şekillendirdikleri (Şekil 3.8) gözlemlendi. Ghahramanpoor ve ark. (2011), aljinat jelin besin maddeleri ve oksijenin kültüre edilen hücrelere geçebileceği yeterli miktarda porlara sahip olduğunu dolayısıyla aljinat içine enkapsüle edilen MKH'lerin yüksek hücre canlılığıyla çoğalabildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, aljinat enkapsülasyonunun lakun

oluşumuna ve COL- II ve proteoglikanlar gibi kıkırdığa özgü matriks bileşenlerinin üretimine yardımcı olduğu da belirtilmiştir (Ewa-Choy ve ark., 2017; Ghahramanpoor ve ark., 2011; Jahanbakhsh ve ark., 2020; Xu ve ark., 2008). Kondrositlerin, tutunmalarını ve çoğalmalarını destekleyen büyüme faktörlerini ürettikleri ve salgıladıkları bilinmektedir (Shen ve ark., 1985). Froger-Gaillard ve ark. (1989), tavşan eklem kondrositlerinin kendi proliferasyonlarını arttıran, insülin benzeri büyüme faktörleri ürettiğini bildirdiler. Başka bir çalışmada, IL-1 beta sitokininin etkisi altında insan eklem kondrositlerinin seçici olarak TGF- β 3 proteinini sentezlediği saptandı (Villiger ve ark., 1993). Büyüme faktörleri (TGF- β , FGF) gibi bazı sinyal moleküllerinin, hücreler arası haberleşme yoluyla kondrojenik aktivitenin başlatılmasından ve sürdürülmesinden sorumlu olduğu gösterildi (Delise ve ark., 2000). Hücreler arası haberleşme, hücre yüzeyi reseptörlerinin sitokinler ve büyüme faktörleri ile, kollajen ve proteoglikanlar gibi hücreler arası matriks ile veya komşu hücrelerin yüzey proteinleri ile etkileşimini içerir (Heng ve ark., 2004). Hücre-matriks reaksiyonlarının, hücreler arası matriks proteinleri betaglikan ve endoglycanı regüle ettikleri ve bu proteinlerin hücre yoğunlaşması sürecinde ortamdaki TGF- β 'nın hücre yüzeyindeki tip II reseptörüne bağlanmasını sağlayarak kondrojenезisi devam ettirdiği bilinmektedir (López-Casillas ve ark., 1994; López-Casillas ve ark., 1993). Tang ve ark. (2009), koyun MKH'lerinde TGF- β 3'ün *in vitro* olarak COL-II sentezini arttırdığını; *in vivo* olarak da kitosandan iskeleler içerisinde aynı hücrelerin yine TGF- β 3 ilavesiyle hyalin kıkırdak gelişimini tetiklediğini gösterdiler.

Benzer şekilde, Yoon ve Fisher (2008), IGF-1 ve reseptörünün kondrositler tarafından ifade edildiğini ve bunların kıkırdaktaki homeostazın temel aracısı olduklarını, ayrıca kondrositlerin canlılığını ve çoğalmalarını teşvik ettiğini bildirdiler. Diğer bir çalışmada, hem TGF- β 1'in hem de IGF-1'in 3B pelet kültüründe de-diferensiye olmuş insan kondrositlerinin yeniden kondrositlere farklılaşma kapasitesini ve agrekan sentezini arttırdığı gösterildi (Lochner et al. 2012).

Her ne kadar KM, içeriğinde başta TGF- β 3 ve IGF-1 olmak üzere birçok büyüme faktörü bulunsa da çalışmamızda sadece KM'nin kullanıldığı bir grubun yanısıra; aljinat boncuklar içerisinde RASKH'lerin TGF- β 3 ve/veya IGF-1 ilavesi ile kültüre edildiği gruplar oluşturuldu. Bu gruplarda TGF- β 3 ve IGF-1'in kondrojenезis üzerine etkilerinin hem ayrı ayrı, hem de birlikte incelenmesi hedeflendi. Ruiz ve ark. (2019),

MKH'lerin kondrojenik farklılaştırmasında TGF- β 3 ve IGF-1'i sırası ile 10 ng/mL ve 100 ng/mL miktarlarında kültüre medyumuna ilave ettiklerini bildirdiler. Biz de çalışmamızda kondrojenik farklılaşmayı göstermek için KM'ye aynı miktarlarda TGF- β 3 ve IGF-1'i ilave ettik. Ayrıca KM ile indüklenen kondrojenik gelişimin sonuçlarını, Mackay ve ark. (1998)'nin protokolüne göre hazırladığımız IM ile indüklenen kondrojenik gelişimin sonuçları ile karşılaştırdık. Son olarak, IM ve KM'nin 1:1 oranında kullanıldığı grubumuzda (KM+IM grubu) kondrojenik farklılaştırma üzerinde ikisinin karşılıklı sinerjik etkisini değerlendirdik.

4.4. RASKH'nin Kondrojenik Potansiyelinin Alsiyan Mavisi, İmmunohistokimya Boyama ve Real-Time PCR Yöntemleri ile Değerlendirilmesi

SOX9, kondrosite farklılaşmanın erken bir belirteçidir, kondroprogenitör hücrelerde bulunur ve gen ifadesindeki artış kondrojenik gelişim sürecine girildiğini gösterir (Akiyama ve Lefebvre, 2011; Ng ve ark., 1997; Zhao ve ark., 1997) . Horton ve ark. (1987), COL2A1 ifadesindeki artışın, kondrositlerin sentez aktivitesi ile ilişkili olduğunu belirttiler. Dong ve ark. (2012) SOX9'un, ACAN gibi diğer matris proteinleri ile birlikte COL2A1 ifadesini düzenleyerek kondrositlerin sağ kalımında; kök hücrelerin kondrositlere farklılaşmasında rol oynayabileceğini bildirdiler. ACAN geninin kodladığı aggregan; kıkırdak dokuda hücre-hücre ve hücre-matris etkileşiminde önemli bir role sahip olup hücreler arası matrisin çok önemli bir parçasıdır (Doege ve ark., 1991; Kiani ve ark., 2002). TGF- β 1'in erken dönem kondrojenik farklılaşma belirteci olup, SOX9, COL-II ve ACAN ile pozitif korelasyona sahip olduğu ve TGF- β 3 büyüme faktörünün etkisi altında ifadesinin arttığı bilinmektedir (Ruiz ve ark., 2019). TGF- β 3 kondrositler tarafından salgılanabilen bir büyüme faktörüdür (Liu ve ark., 2012)

Çalışmamızda KM grubunda farklılaşmakta olan hücrelerde GAG üretimi (Şekil 3.25 a); TGF- β 3 ve COL-II protein ifadeleri (Şekil 3.30 a, b) gösterildi. Kontrolle karşılaştırıldığında KM grubunda SOX9, COL2A1, ACAN ve TGF- β 1 gen ifadelerinde artış gözlenirken bu kat artışının istatistiki olarak sadece SOX9 ($p<0.01$) ve TGF- β 1 ($p<0.01$) genlerinde önemli olduğu gösterildi (Şekil 3.36). Özellikle SOX9 ve TGF- β 1 ifadelerinde anlamlı bir artış olması KM grubunda RASKH'lerin kondrojenik gelişim sürecine

girdiğini göstermektedir. Liu ve ark. (2012), PGA/PLA iskelelerinde kültüre edilen kondrositlerden toplanan KM ile kemik iliği kökenli kök hücrelerini başarılı bir şekilde kondrojenik hücrelere farklılaştırdıklarını bulgularımıza benzer şekilde bildirmelerine rağmen, yaptıkları ön çalışmalarında (veriler sunulmamıştır) tek katmanlı kültür sırasında kondrositlerin de-diferensiye olması nedeniyle, toplanan KM'nin kondrojenik farklılaşmayı indüklemek için yeterli olmadığını da rapor ettiler. Araştırmamızda kondrositlerin tek tabakalı kültürü sırasında P1'deki kondrojenik belirteçlerin gen ifadelerinin P5'e göre daha fazla olması, kondrositlerin erken pasajlarda de-diferensiye olmadığını gösterir (Tablo 3.2). Sonuçlarımız kondrositlerin P5'e kadar de-diferensiye olmadığını bildiren (Dehne ve ark., 2010)'nın çalışması ile de uyumludur. Bulgularımıza göre tek tabakalı kültürünün erken pasajlarında kondrositler de-diferensiye olmadıklarından bu pasajlarda toplanan KM ile kondrogenesis başarılı bir şekilde indüklenebilir. Aynı şekilde tek tabakalı kondrosit hücre kültüründen toplanan KM'nin yağ doku (Kazmierski ve ark., 2018) ve kemik iliği (Zhang ve ark., 2015) kökenli kök hücrelerde kondrojenik farklılaşmayı indüklediği bildirildi. Dolayısıyla ileride yapılacak çalışmalarda tek tabakalı ve 3B kültürlerin erken dönemlerinde toplanan KM'lerin içeriğinde bulunan büyüme faktörleri ve sitokinlerin karşılaştırmalı olarak analizlerinin yapılması önem arz etmektedir.

Goldring ve ark. (2006), TGF- β 3 ve IGF-1 gibi büyüme faktörlerinin hücre çoğalmasının modülasyonunda ve kondrogenesisin indüksiyonunda rol oynadığını öne sürmüştür. Çalışmamızda IGF-1 ve TGF- β 3'ün KM'ye ilavesinin kondrojenik farklılaşma üzerine etkisini göstermeye çalıştık. IGF-1'in, matriks proteinlerinin sentezinde rol oynadığı ve kondrojenik indüksiyonu sağladığı bilinmektedir (Longobardi ve ark., 2006; Phornphutkul ve ark., 2004).

Çalışmamızda KM+IGF-1 grubunda farklılaşmakta olan hücrelerde GAG üretimi (Şekil 3.26 a); TGF- β 3 ve COL-II protein ifadeleri (Şekil 3.31 a, b) gösterildi. Bu grupta kondrojenik belirteçlerin tamamında gen ifadesinde bir artış görülürken yalnızca SOX9 ve TGF- β 1 gen ifadelerindeki kat artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0,01$) (Şekil 3.35). Özellikle SOX9 ve TGF- β 1 ifadelerinde anlamlı bir artış olması KM grubuna benzer şekilde KM+IGF-1 grubunda da RASKH'lerin kondrogenesis sürecine girdiğini göstermektedir.

KM+TGF- β 3 grubunda da farklılaşmakta olan hücrelerde GAG üretimi (Şekil 3.26 b) ile TGF- β 3 ve COL-II protein ifadeleri (Şekil 3.31 c, d) gösterildi. Bu grupta kondrojenik belirteçlerin tamamında gen ifadesinde bir artış görülürken, SOX9, COL2A1 ($p<0,01$) ve TGF- β 1 ($p<0,001$) gen ifadelerindeki kat artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (Şekil 3.36). Bulgularımızla uyumlu olarak X. Zhao ve ark. (2017), KM'ye TGF- β 3 eklendiğinde COL2A1 gen ifadesinin arttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda KM+TGF- β 3 grubunda SOX9'un KM ve KM+IGF-1 grubuna göre daha yüksek düzeyde ifade olmasının, TGF- β 1 ve ACAN ile birlikte COL2A1 ifadesini de arttırdığını düşünmekteyiz.

KM+IGF-1+TGF- β 3 grubunda da farklılaşmakta olan hücrelerde GAG üretimi (Şekil 3.27 a); TGF- β 3 ve COL-II protein ifadeleri (Şekil 3.32 a, b) gösterildi. Bu grupta kondrojenik belirteçlerin ifadesinde artış görüldü ve SOX9, COL2A1, TGF- β 1 ($p<0,01$) ve ACAN ($p<0,05$) gen ifadelerindeki kat artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (Şekil 3.37). Desancé ve ark. (2018), TGF- β 'ların kondrojenik farklılaştırma sırasında COL2A1 ve ACAN gibi kondrojenik belirteçlerin gen ifadelerinin arttırdığını bildirmişlerdir. Kolambkar ve ark. (2007) ise kondrojenik farklılaşma ve GAG sentezi üzerine TGF- β ve IGF-1'in sinerjik etkisi olduğunu göstermişlerdir. Longobardi ve ark. (2006) IGF-1'in de TGF- β kadar kondrojenik indüksiyonda etkili olduğunu ve hem TGF- β 'nın hem de IGF-1'in birbirinden bağımsız sinyal mekanizmalarıyla kondrojenik farklılaşmayı indüklediğini rapor etmiştir. TGF- β 3 ve IGF-1'in birlikte kullanımının kondrojenik farklılaşmada sinerjik bir etki oluşturabileceğini düşünüyoruz. Çünkü iki büyüme faktörünün de KM'ye eklenmesinin kondrojenik süreçte rol oynayan tüm belirteçlerin ifadesini önemli ölçüde arttırdığı belirlendi.

IM grubunda da farklılaşmakta olan hücrelerde GAG üretimi (Şekil 3.25 b); TGF- β 3 ve COL-II protein ifadeleri (Şekil 3.30 c, d) gösterildi. Bu grupta tüm kondrojenik belirteçlerin ifadesinde artış görülürken SOX9, COL2A1 ve TGF- β 1 ($p<0,01$) gen ifadelerindeki kat artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 3.38). Literatürde benzer farklılaşma protokollerinin uygulandığı çalışmalarda olduğu gibi IM grubunda RASKH'lerin kondrositlere farklılaştığı ve farklılaşan hücrelerin kondrositlere spesifik belirteçleri yüksek seviyede ifade ettikleri gözlemlendi (Mackay ve ark., 1998; Zhao ve ark., 2017).

IM grubunda SOX9 gen ifadesi sadece KM grubuna göre istatistiki olarak önemli derecede artarken, COL2A1 hem KM hem de KM+IGF-1 gruplarına göre önemli derecede yükseldi (Tablo 3.3). Zhao ve ark. (2017) çalışmasında bulgularımızın aksine hem KM hem de KM+TGF- β 3 grubunda COL2A1 gen ifadesinin daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda KM medyumunu 1:1 oranında dilüe ederek kondrosit farklılaşmasında kullandık. Bu araştırmacıların ise KM'yi saf olarak kullandıkları anlaşılmaktadır. KM'nin dilüsyon oranına göre COL2A1 dahil tüm kondrojenik gen ifadelerinin değişebileceğini düşünüyoruz. Ayrıca bahsedilen çalışmada araştırmacılar, kök hücreleri kollajen iskelelerde kondrositlere farklılaştırmışlardır. Kullanılan iskele çeşidine göre de gen aktivitelerinin değişebileceğini ön görmekteyiz.

KM+IM grubunda da farklılaşmakta olan hücrelerde GAG üretimi (Şekil 3.27 b); TGF- β 3 ve COL-II protein ifadeleri (Şekil 3.32 c, d) gösterildi. Bu grupta tüm kondrojenik belirteçlerin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p < 0,01$) (Şekil 3.39). Dekzametazon, ITS premiks ve sodyum pirüvat gibi kondrojenik farklılaştırmada etkili olduğu bilinen (Mackay ve ark., 1998) bir takım etmenler KM içerisinde bulunmamaktadır.

Gen ifadelerinde gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; KM+IM grubunda COL2A1 ve ACAN gen ifadelerindeki kat artışının tüm gruplara göre istatistiki olarak önemli olduğu gözlemlendi. Bunun yanı sıra KM+IM grubunda SOX9 gen ifadesindeki kat artışının, KM, KM+IGF-1 ve KM+TGF- β 3 gruplarına göre istatistiki olarak anlamlı olduğu saptandı (Tablo 3.3). Özellikle dekzametazonun TGF- β ile uyarılan kondrojenik farklılaşma mekanizması yoluyla kıkırdığa spesifik genlerin ifadelerini arttırdığı bilinmektedir (Shintani ve Hunziker, 2011). Buna karşın KM içerisinde bulunan EGF, IGF, FGF, TGF- β 'ler (Liu ve ark., 2012), IL'ler (Fu ve ark., 2019) ve PTHrP (Fischer ve ark., 2010) IM içerisinde bulunmamaktadır. Ayrıca kondrositlerde COL-II ve TGF- β 3'ün protein ifadesini IF ile çalışmamızda gösterdik (Şekil 3.20). Dolayısıyla KM içerisinde COL-II ve TGF- β 3'ün de bulunduğunu düşünüyoruz. Ayrıca KM içerisinde bulunan büyüme faktörleri ve IL'ler gibi kondrogenezisi uyaran çeşitli faktörlerin, IM medyumunun kondrojenik potansiyelini arttırdığını varsaymaktayız.

Bütün gruplarda erken kondrojenesis ile ilişkili olduğu bilinen TGF- β 1 geni, farklı düzeylerde ifade olurken gruplar arasında TGF- β 1 gen ifadesindeki kat artışlarının istatistiki olarak önemli olmadığı belirlendi. Ruiz ve ark. (2019) TGF- β 1 gen ifadesinin kondrojenik farklılaşmanın terminal aşamasında azaldığını bildirdi. Bu da çalışmamızda 21 günlük farklılaştırma sürecinin sonunda hücrelerin terminal aşamaya girmediğine, yani ossifikasyon sürecine girilmediğine işaret etmektedir.

RUNX2 ve COL10A1 hipertrofik ve prehipertrofik kondrositlerde yüksek düzeyde ifade olmaktadır Enomoto ve ark. (2000). Çalışmamızda RUNX2 ve COL10A1'in tüm gruplarda ifade edildiği ancak sadece RUNX2 gen ifadesindeki kat artışının IM (Şekil 3.38) ve KM+IGF-1+TGF- β 3 (Şekil 3.37) gruplarında istatistiki olarak önemli olduğu belirlendi ($p<0,05$). Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında, RUNX2 ve COL10A1 genlerinin ifadelerindeki kat artışlarında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmadı. Ancak COL10A1 ifadesinde hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmasa da KM+IM ve KM+IGF-1 gruplarında bu genin ifadesinin diğer gruplara göre daha fazla arttığı görüldü (Tablo 3.3). KM'ye IGF-1 eklendiğinde COL10A1 ifadesini artırırken; KM'ye IGF-1 ile birlikte TGF- β 3'ün ilave edilmesi bu genin ifadesini önemli düzeyde düşürmüştür. Bu durum; IGF-1'in, COL10A1 ifadesini indüklediğini; TGF- β 3'ün ise IGF-1'in bu etkisini baskıladığını düşündürmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

KM, sınırlı bir kondrojenik potansiyele sahiptir. KM içerisinde bulunan büyüme faktörleri, sitokinler ve çeşitli kıkırdak doku hücreler arası matriks ürünlerinin ayrıntılı olarak belirlenmesi, KM'nin kondrojenik potansiyelinin daha iyi anlaşılması için önem arz etmektedir. Ayrıca kondrositlerin tek tabakalı ve 3B kültüründen elde edilen KM'ler arasında salgılanan sitokinler ve parakrin faktörler arasında bir fark olabilir. Bu yüzden tek tabakalı kültürden ve farklı iskele modelleri kullanılarak kültüre edilen hücrelerden elde edilecek KM'ler arasındaki içerik farklarının belirlenmesi de kondrojenik farklılaştırmada daha başarılı sonuçlar sağlayacak KM protokolünün geliştirilmesi için önemlidir. Kök hücrelerin kondrojenik farklılaşması üzerine KM'nin farklı dilüsyonlarda uygulanmasının etkisi araştırılmalıdır. Bütün bunların yanı sıra *in vitro* çalışmalarda IM'nin kondrojenik potansiyelinin yeterli olduğunu fakat KM ile birlikte IM'nin kullanımının kondrojenesis sürecinde çok önemli olan COL2A1 ve ACAN genlerinin ifadesini yüksek düzeyde arttırmasının bu kondrojenik potansiyeli daha da güçlendirdiğini göstermektedir. *In vitro* deneylerden elde edilen veriler, *in vivo* kıkırdak iyileşme modelleri üzerinde test edilerek desteklenmelidir.

ÖZET

TGF- β -3/IGF-1 İlave Edilmiş Kondrosit Kaynaklı Koşullandırılmış Medyumun Amniyotik Sıvı Kaynaklı Hücrelerde Kondrojenesis Üzerine Etkileri

Kıkırdak parakrin faaliyeti ile bilinen bir dokudur ve kondrositlerin salgıladığı, başta TGF- β 3 ve IGF-1 olmak üzere birçok humoral faktörün kondrojenik farklılaşmada rol aldığı düşünülmektedir. Kondrojenesis SOX9, COL2A1, TGF- β 3 ve ACAN gibi bazı belirteçlerin ifadesi ile karakterize edilebilmektedir. Her ne kadar kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırması için birçok protokol var olsa da, bu yöntemler doğal intrinsik mekanizmayı yeteri kadar taklit edememekte ve başarılı bir kıkırdak rejenerasyonunu sağlayamamaktadır. Kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasında doğal mekanizmayı daha iyi taklit edebilmek için koşullandırılmış medyumun hem tek başına hem de TGF- β 3 ve/veya IGF-1 ile birlikte kullanımının kondrojenese etkisini görmeyi ayrıca, koşullandırılmış medyuma standart kondrojenik indüksiyon medyumuna ilavesinin kondrojenesis potansiyeli üzerine etkisini göstermeyi amaçladık. Bu amaç doğrultusunda çalışmada rat amniyotik sıvı kaynaklı kök hücreler ve rat kondrositleri izole edildi. İzole edilen hücrelerin Real-Time PCR ve immunfloresan yöntemleri ile karakterizasyonları yapıldı. Karakterizasyon çalışmalarından sonra kondrositlerden, koşullandırılmış medyum elde edildi ve rat amniyotik sıvı kaynaklı kök hücreler aljinat boncuklar içerisinde TGF- β 3, IGF-1, koşullandırılmış medyum ve indüksiyon medyumunu kullanarak kıkırdak hücrelerine farklılaştırıldı. Farklılaştırma çalışmalarının sonuçları Real-Time PCR, immunfloresan ve immunohistokimyasal boyama yöntemleri ile desteklendi. Çalışmada koşullandırılmış medyumun, hem tek başına hem de IGF-1 ve/veya TGF- β 3 ilavesi ile kondrojenik farklılaşmayı başarılı bir şekilde indüklediği görüldü. Ancak, koşullandırılmış medyum ve kondrojenik indüksiyon medyumunun birlikte kullanımının COL-II, ACAN ve SOX9 ifadesi bakımından en iyi sonuçları verdiği görüldü. Sonuç olarak kondrojenik farklılaşma için standart indüksiyon medyumunda bulunan maddelerin, koşullandırılmış medyuma bulunan humoral faktörlerin etkisi ile daha iyi bir farklılaşma elde edildiği düşünülmektedir. Ancak koşullandırılmış medyum içerisindeki maddelerin ve miktarlarının belirlenmesi koşullandırılmış medyumun kondrojenik farklılaşma üzerine etki mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için önemlidir. Bunun yanı sıra çalışmadan elde edilen sonuçlar yapılacak in vivo çalışmalarla test edilmelidir.

Anahtar Sözcükler: Aljinat boncuk, Amniyotik sıvı kaynaklı kök hücreler, IGF-1, Koşullandırılmış medyum, TGF- β 3.

SUMMARY

The effects of Chondrocytes derived Conditioned Medium Supplemented with TGF β -3/ IGF-1 on Chondrogenesis in Amniotic fluid derived cells.

Cartilage is known for its paracrine activity and humoral factors released by chondrocytes especially TGF- β 3 and IGF-1 are considered to play vital role in chondrogenic differentiation. The chondrogenesis can be characterized by expression of certain markers like SOX9, COL2A1, TGF- β 1 and ACAN. Although, various protocols for chondrogenic differentiation of stem cells exist, yet these methods are unable to mimic intrinsic mechanisms of cartilage regeneration successfully. To better imitate the natural mechanism of chondrogenesis, conditioned media was opted for chondrogenic differentiation either with supplementation of TGF- β 3 and/or IGF-1 or alone. It was also aimed to demonstrate whether external supplementation of conditioned media with standard chondrogenic induction media affects its chondrogenesis potential or not. For this purpose, rat amniotic fluid derived stem cells and chondrocytes were isolated and were characterized by Real-Time PCR and immunofluorescence studies. Following the characterization of chondrocytes, conditioned media was collected and rat amniotic fluid derived stem cells were differentiated into chondrocytes in alginate beads using conditioned media with TGF- β 3 and/or IGF-1 supplementation or alone or with standard chondrogenic induction media. The results of differentiation studies were supported with Real-Time PCR, immunofluorescence and immunohistochemistry assays. The results showed that conditioned media have potential to induce chondrogenic differentiation successfully both alone and with the supplementation of TGF- β 3 and/or IGF-1. Nonetheless, joint use of conditioned media and standard chondrogenic induction media provided the best results for COL2A1, ACAN and SOX9 expressions. In conclusion, it is believed that the constituents of induction media facilitate better chondrogenic differentiation when combine with the humoral factors from conditioned media. Yet, it is important to validate the components of conditioned media and their exact amounts for better understanding mechanisms of conditioned media based chondrogenic differentiation. Besides, the results of the conducted study should be tested with further *in vivo* experiments.

Key Words: Alginate bead, Amniotic fluid derived stem cells, Conditioned media, IGF-1, TGF- β 3

KAYNAKLAR

- AHMED, N., DREIER, R., GÖPFERICH, A., GRIFKA, J., GRÄSSEL, S. (2007). Soluble signalling factors derived from differentiated cartilage tissue affect chondrogenic differentiation of rat adult marrow stromal cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **20** (5): 665-678.
- AIGNER, T., HEMMEL, M., NEUREITER, D., GEBHARD, P., ZEILER, G., KIRCHNER, T., MCKENNA, L. (2001). Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritic human articular knee cartilage: a study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, **44** (6): 1304-1312.
- AKIYAMA, H., LEFEBVRE, V. (2011). Unraveling the transcriptional regulatory machinery in chondrogenesis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, **29** (4): 390-395.
- ALFORD, J. W., COLE, B. J. (2005). Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *The American Journal of Sports Medicine*, **33** (2): 295-306.
- ALVES DA SILVA, M., COSTA-PINTO, A., MARTINS, A., CORRELO, V., SOL, P., BHATTACHARYA, M., FARIA, S., REIS, R., NEVES, N. M. (2015). Conditioned medium as a strategy for human stem cells chondrogenic differentiation. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **9** (6): 714-723.
- ANDERSEN, T., AUK-EMBLEM, P., DORNISH, M. (2015). 3D cell culture in alginate hydrogels. *Microarrays*, **4** (2): 133-161.
- ANDERSON, H. C., HODGES, P. T., AGUILERA, X. M., MISSANA, L., MOYLAN, P. E. (2000). Bone morphogenetic protein (BMP) localization in developing human and rat growth plate, metaphysis, epiphysis, and articular cartilage. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **48** (11): 1493-1502.
- ANTOUNIAN, L., TZANETAKIS, A., PELLERITO, O., CATANIA, V. D., SULISTYO, A., MONTALVA, L., MCVEY, M. J., ZANI, A. (2019). The Regenerative Potential of Amniotic Fluid Stem Cell Extracellular Vesicles: Lessons Learned by Comparing Different Isolation Techniques. *Scientific Reports*, **9** (1): 1-11.
- ASHRAF, S., CHA, B.-H., KIM, J.-S., AHN, J., HAN, I., PARK, H., LEE, S.-H. (2016). Regulation of senescence associated signaling mechanisms in chondrocytes for cartilage tissue regeneration. *Osteoarthritis and Cartilage*, **24** (2): 196-205.
- ASLANI, P., KENNEDY, R. A. (1996). Studies on diffusion in alginate gels. I. Effect of cross-linking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen. *Journal of Controlled Release*, **42** (1): 75-82.

- AWAD, H. A., WICKHAM, M. Q., LEDDY, H. A., GIMBLE, J. M., GUILAK, F. (2004). Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials*, **25** (16): 3211-3222.
- BALLOCK, R. T., HEYDEMANN, A., WAKEFIELD, L. M., FLANDERS, K. C., ROBERTS, A. B., SPORN, M. B. (1993). TGF- β 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. *Developmental Biology*, **158** (2): 414-429.
- BANKS, W. J. (1993). Applied Veterinary Histology: 3rd Ed. Mosby-Year Book, Inc, USA: 96-106 pp.
- BARRY, F. P. (2003). Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, **69** (3): 250-256.
- BARRY, F. P., MURPHY, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **36** (4): 568-584.
- BEDI, A., FEELEY, B. T., WILLIAMS III, R. J. (2010). Management of articular cartilage defects of the knee. *Journal of Bone and Joint Surgery*, **92** (4): 994-1009.
- BENYA, P. D., SHAFFER, J. D. (1982). Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, **30** (1): 215-224.
- BERNSTEIN, P., DONG, M., CORBEIL, D., GELINSKY, M., GÜNTHER, K. P., FICKERT, S. (2009). Pellet culture elicits superior chondrogenic redifferentiation than alginate-based systems. *Biotechnology Progress*, **25** (4): 1146-1152.
- BHOSALE, A. M., RICHARDSON, J. B. (2008). Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin*, **87** (1): 77-95.
- BINETTE, F., MCQUAID, D. P., HAUDENSCHILD, D. R., YAEGER, P. C., MCPHERSON, J. M., TUBO, R. (1998). Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. *Journal of Orthopaedic Research*, **16** (2): 207-216.
- BOCK, H., MICHAELI, P., BODE, C., SCHULTZ, W., KRESSE, H., HERKEN, R., MIOSGE, N. (2001). The small proteoglycans decorin and biglycan in human articular cartilage of late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, **9** (7): 654-663.
- BÖHME, K., WINTERHALTER, K. H., BRUCKNER, P. (1995). Terminal differentiation of chondrocytes in culture is a spontaneous process and is arrested by transforming growth factor- β 2 and basic fibroblast growth factor in synergy. *Experimental Cell Research*, **216** (1): 191-198.
- BOLLINI, S., POZZOBON, M., NOBLES, M., RIEGLER, J., DONG, X., PICCOLI, M., CHIAVEGATO, A., PRICE, A. N., GHIONZOLI, M., CHEUNG, K. K. (2011). In vitro and

in vivo cardiomyogenic differentiation of amniotic fluid stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, **7 (2)**: 364-380.

- BOS, P., VAN OSCH, G., FRENZ, D., VERHAAR, J., VERWOERD-VERHOEF, H. (2001). Growth factor expression in cartilage wound healing: temporal and spatial immunolocalization in a rabbit auricular cartilage wound model. *Osteoarthritis and Cartilage*, **9 (4)**: 382-389.
- BOSSOLASCO, P., MONTEMURRO, T., COVA, L., ZANGROSSI, S., CALZAROSSA, C., BUIATTIOTIS, S., SOLIGO, D., BOSARI, S., SILANI, V., DELILERS, G. L. (2006). Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Research*, **16 (4)**: 329.
- BOWERSOCK, T., HOGENESCH, H., SUCKOW, M., GUIMOND, P., MARTIN, S., BORIE, D., TORREGROSA, S., PARK, H., PARK, K. (1999). Oral vaccination of animals with antigens encapsulated in alginate microspheres. *Vaccine*, **17 (13-14)**: 1804-1811.
- BRITTBERG, M., PETERSON, L., SJOUM, E., TALLHEDEN, T., LINDAHL, A. (2003). Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation: a review of recent developments. *Journal of Bone and Joint Surgery*, **85 (3)**: 109-115.
- BUCKLEY, S., SHI, W., CARRARO, G., SEDRAKYAN, S., DA SACCO, S., DRISCOLL, B. A., PERIN, L., DE FILIPPO, R. E., WARBURTON, D. (2011). The milieu of damaged alveolar epithelial type 2 cells stimulates alveolar wound repair by endogenous and exogenous progenitors. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **45 (6)**: 1212-1221.
- CANANZI, M., DE COPPI, P. (2012). CD117+ amniotic fluid stem cells: state of the art and future perspectives. *Organogenesis*, **8 (3)**: 77-88.
- CARBALLO, C. B., NAKAGAWA, Y., SEKIYA, I., RODEO, S. A. (2017). Basic science of articular cartilage. *Clinics in Sports Medicine*, **36 (3)**: 413-425.
- CARRARO, G., PERIN, L., SEDRAKYAN, S., GIULIANI, S., TIOZZO, C., LEE, J., TURCATEL, G., DE LANGHE, S. P., DRISCOLL, B., BELLUSCI, S. (2008). Human amniotic fluid stem cells can integrate and differentiate into epithelial lung lineages. *Stem Cells*, **26 (11)**: 2902-2911.
- CHANG, S.-H., OH, C.-D., YANG, M.-S., KANG, S.-S., LEE, Y.-S., SONN, J.-K., CHUN, J.-S. (1998). Protein kinase C regulates chondrogenesis of mesenchymes via mitogen-activated protein kinase signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **273 (30)**: 19213-19219.
- CHEN, W. H., LAI, M. T., WU, A. T., WU, C. C., GELOVANI, J. G., LIN, C. T., HUNG, S. C., CHIU, W. T., DENG, W. P. (2009). In vitro stage-specific chondrogenesis of mesenchymal stem cells committed to chondrocytes. *Arthritis & Rheumatology*, **60 (2)**: 450-459.
- CHEN, Z., CHAN, M. K., STRELCHENKO, N., WANG, F., LIU, L., PERLE, M. (2014). Heterogeneity of stem cells in human amniotic fluid. *Journal of Regenerative Medicine*, **3 (1)**: 1-8.

- CHIAVEGATO, A., BOLLINI, S., POZZOBON, M., CALLEGARI, A., GASPAROTTO, L., TAIANI, J., PICCOLI, M., LENZINI, E., GEROSA, G., VENDRAMIN, I. (2007). Human amniotic fluid-derived stem cells are rejected after transplantation in the myocardium of normal, ischemic, immuno-suppressed or immuno-deficient rat. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **42** (4): 746-759.
- CHIMAL-MONROY, J., DE LEON, L. D. (2003). Differential effects of transforming growth factors beta 1, beta 2, beta 3 and beta 5 on chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells. *International Journal of Developmental Biology*, **41** (1): 91-102.
- CHOUDHARY, D., ADHIKARY, S., AHMAD, N., KOTHARI, P., VERMA, A., TRIVEDI, P. K., MISHRA, P. R., TRIVEDI, R. (2018). Prevention of articular cartilage degeneration in a rat model of monosodium iodoacetate induced osteoarthritis by oral treatment with Withaferin A. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **99**: 151-161.
- CIPRIANI, S., BONINI, D., MARCHINA, E., BALGKOURANIDOU, I., CAIMI, L., ZUCCONI, G. G., BARLATI, S. (2007). Mesenchymal cells from human amniotic fluid survive and migrate after transplantation into adult rat brain. *Cell biology International*, **31** (8): 845-850.
- COOKE, M., ALLON, A., CHENG, T., KUO, A., KIM, H., VAH, T., MARCUCIO, R., SCHNEIDER, R., LOTZ, J., ALLISTON, T. (2011). Structured three-dimensional co-culture of mesenchymal stem cells with chondrocytes promotes chondrogenic differentiation without hypertrophy. *Osteoarthritis and Cartilage*, **19** (10): 1210-1218.
- COPRAY, J., JANSEN, H., DUTERLOO, H. (1985). Effect of compressive forces on phosphatase activity in mandibular condylar cartilage of the rat in vitro. *Journal of Anatomy*, **140** (3): 479.
- CUI, G. H., WANG, Y. Y., LI, C. J., SHI, C. H., WANG, W. S. (2016). Efficacy of mesenchymal stem cells in treating patients with osteoarthritis of the knee: A meta-analysis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **12** (5): 3390-3400.
- CUI, J.-H., GOH, J.-S., PARK, S.-Y., KIM, P.-H., LEE, B.-J. (2001). Preparation and physical characterization of alginate microparticles using air atomization method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **27** (4): 309-319.
- DANIŠOVIČ, L., VARGA, I., POLÁK, Š. (2012). Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Tissue and Cell*, **44** (2): 69-73.
- DE BARI, C., ROELOFS, A. J. (2018). Stem cell-based therapeutic strategies for cartilage defects and osteoarthritis. *Current Opinion in Pharmacology*, **40**: 74-80.
- DE COPPI, P., BARTSCH, G., JR., SIDDIQUI, M. M., XU, T., SANTOS, C. C., PERIN, L., MOSTOSLAVSKY, G., SERRE, A. C., SNYDER, E. Y., YOO, J. J., FURTH, M. E., SOKER, S., ATALA, A. (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology*, **25**(1): 100-106.

- DE COPPI, P., BARTSCH, G., SIDDIQUI, M. M., XU, T., SANTOS, C. C., PERIN, L., MOSTOSLAVSKY, G., SERRE, A. C., SNYDER, E. Y., YOO, J. J. (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology*, **25** (1): 100-106.
- DE GIROLAMO, L., KON, E., FILARDO, G., MARMOTTI, A., SOLER, F., PERETTI, G., VANNINI, F., MADRY, H., CHUBINSKAYA, S. (2016). Regenerative approaches for the treatment of early OA. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, **24** (6): 1826-1835.
- DEBNATH, T., SHALINI, U., KONA, L. K., VIDYA SAGAR, J., KAMARAJU, S. R., GADDAM, S. (2015). Development of 3D alginate encapsulation for better chondrogenic differentiation potential than the 2D pellet system. *Journal of Stem Cell Research and Therapy*, **5** (4): 276.
- DEHNE, T., SCHENK, R., PERKA, C., MORAWIETZ, L., PRUSS, A., SITTINGER, M., KAPS, C., RINGE, J. (2010). Gene expression profiling of primary human articular chondrocytes in high-density micromasses reveals patterns of recovery, maintenance, re- and dedifferentiation. *Gene*, **462** (1-2): 8-17.
- DELISE, A. Á., FISCHER, L., TUAN, R. (2000). Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis and Cartilage*, **8** (5): 309-334.
- DESANCÉ, M., CONTENTIN, R., BERTONI, L., GOMEZ-LEDUC, T., BRANLY, T., JACQUET, S., BETSCH, J.-M., BATHO, A., LEGENDRE, F., AUDIGIÉ, F. (2018). Chondrogenic differentiation of defined equine mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood for use in cartilage repair therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, **19** (2): 537.
- DESSAU, W., VON DER MARK, H., VON DER MARK, K., FISCHER, S. (1980). Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis. *Development*, **57** (1): 51-60.
- DING, M., LU, Y., ABBASSI, S., LI, F., LI, X., SONG, Y., GEOFFROY, V., IM, H. J., ZHENG, Q. (2012). Targeting Runx2 expression in hypertrophic chondrocytes impairs endochondral ossification during early skeletal development. *Journal of Cellular Physiology*, **227** (10): 3446-3456.
- DOEGE, K. J., SASAKI, M., KIMURA, T., YAMADA, Y. (1991). Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *Journal of Biological Chemistry*, **266** (2): 894-902.
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D., HORWITZ, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, **8** (4): 315-317.
- DOMM, C., SCHÜNKE, M., CHRISTESEN, K., KURZ, B. (2002). Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. *Osteoarthritis and Cartilage*, **10** (1): 13-22.

- DONG, S., YANG, B., GUO, H., KANG, F. (2012). MicroRNAs regulate osteogenesis and chondrogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **418** (4): 587-591.
- DUPONT, K. M., SHARMA, K., STEVENS, H. Y., BOERCKEL, J. D., GARCÍA, A. J., GULDBERG, R. E. (2010). Human stem cell delivery for treatment of large segmental bone defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107** (8): 3305-3310.
- ENOMOTO, H., ENOMOTO-IWAMOTO, M., IWAMOTO, M., NOMURA, S., HIMENO, M., KITAMURA, Y., KISHIMOTO, T., KOMORI, T. (2000). Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *Journal of Biological Chemistry*, **275** (12): 8695-8702.
- ERICKSON, G. R., GIMBLE, J. M., FRANKLIN, D. M., RICE, H. E., AWAD, H., GUILAK, F. (2002). Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **290** (2): 763-769.
- ESLAMINEJAD, M. B., FANI, N., SHAHHOSEINI, M. (2013). Epigenetic regulation of osteogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in culture. *Cell Journal (Yakhteh)*, **15** (1): 1-10.
- EWA-CHOY, Y., PINGGUAN-MURPHY, B., ABDUL-GHANI, N., JAHENDRAN, J., CHUA, K. (2017). Effect of alginate concentration on chondrogenesis of co-cultured human adipose-derived stem cells and nasal chondrocytes: a biological study. *Biomaterials Research*, **21** (1): 19.
- FERGUSON, C. M., SCHWARZ, E. M., REYNOLDS, P. R., PUZAS, J. E., ROSIER, R. N., O'KEEFE, R. J. (2000). Smad2 and 3 mediate transforming growth factor- β 1-induced inhibition of chondrocyte maturation. *Endocrinology*, **141** (12): 4728-4735.
- FISCHER, J., DICKHUT, A., RICKERT, M., RICHTER, W. (2010). Human articular chondrocytes secrete parathyroid hormone-related protein and inhibit hypertrophy of mesenchymal stem cells in coculture during chondrogenesis. *Arthritis & Rheumatism*, **62** (9): 2696-2706.
- FRENZ, D. A., AKIYAMA, S. K., PAULSEN, D. F., NEWMAN, S. A. (1989). Latex beads as probes of cell surface-extracellular matrix interactions during chondrogenesis: evidence for a role for amino-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Developmental Biology*, **136** (1): 87-96.
- FRENZ, D. A., JAIKARIA, N. S., NEWMAN, S. A. (1989). The mechanism of precartilage mesenchymal condensation: a major role for interaction of the cell surface with the amino-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Developmental Biology*, **136** (1): 97-103.
- FRESHNEY, R. I. (2010). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. 6th Ed. John Wiley & Sons, USA: 414-416 pp.
- FROGER-GAILLARD, B., HOSSENLOPP, P., ADOLPHE, M., BINOUX, M. (1989). Production of insulin-like growth factors and their binding proteins by rabbit articular chondrocytes: relationships with cell multiplication. *Endocrinology*, **124** (5): 2365-2372.

- FU, Z., SONG, X., GUO, L., YANG, L., CHEN, C. (2019). Effects of Conditioned Medium From Osteoarthritic Cartilage Fragments on Donor-Matched Infrapatellar Fat Pad-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *The American Journal of Sports Medicine*, **47** (12): 2927-2936.
- GAO, L., THILAKAVATHY, K., NORDIN, N. (2013). A plethora of human pluripotent stem cells. *Cell Biology International*, **37** (9): 875-887.
- GEHRIS, A. L., STRINGA, E., SPINA, J., DESMOND, M. E., TUAN, R. S., BENNETT, V. D. (1997). The region encoded by the alternatively spliced exon IIIA in mesenchymal fibronectin appears essential for chondrogenesis at the level of cellular condensation. *Developmental Biology*, **190** (2): 191-205.
- GHAHRAMANPOOR, M. K., NAJAFABADI, S. A. H., ABDOUSS, M., BAGHERI, F., ESLAMINEJAD, M. B. (2011). A hydrophobically-modified alginate gel system: utility in the repair of articular cartilage defects. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **22** (10): 2365.
- GOLDRING, M. B. (2012). Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, **4** (4): 269-285.
- GOLDRING, M. B., TSUCHIMUCHI, K., IJIRI, K. (2006). The control of chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, **97** (1): 33-44.
- GONZÁLEZ-RODRIGUEZ, M., HOLGADO, M., SANCHEZ-LAFUENTE, C., RABASCO, A., FINI, A. (2002). Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release. *International Journal of Pharmaceutics*, **232** (1-2): 225-234.
- GOSSET, M., BERENBAUM, F., THIRION, S., JACQUES, C. (2008). Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nature Protocols*, **3** (8): 1253.
- GROTH-VASSELLI, B., FARNWORTH, P. N. (1986). A critical maturation period in neonatal-rat-lens development. *Experimental Eye Research*, **43** (6): 1057-1066.
- HALDER, A., MAITI, S., SA, B. (2005). Entrapment efficiency and release characteristics of polyethyleneimine-treated or-untreated calcium alginate beads loaded with propranolol-resin complex. *International Journal of Pharmaceutics*, **302** (1-2): 84-94.
- HALL, A. C. (2019). The role of chondrocyte morphology and volume in controlling phenotype—implications for osteoarthritis, cartilage repair, and cartilage engineering. *Current Rheumatology Reports*, **21** (8): 38.
- HAUG, A., & LARSEN, B. (1966, January). A study on the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. In *Proceedings of the Fifth International Seaweed Symposium, Halifax, August 25–28, 1965*, Pergamon. 271-277.
- HAUG, A., LARSEN, B. R., SMIDSRØD, O., PAINTER, T. (1969). Development of compositional heterogeneity in alginate degraded in homogeneous solution. *Acta Chemica Scandinavica*, **23**: 2955-2962.

- HENG, B. C., CAO, T., HAIDER, H. K., WANG, D. Z. M., SIM, E. K.-W., NG, S. C. (2004). An overview and synopsis of techniques for directing stem cell differentiation in vitro. *Cell and Tissue Research*, **315** (3): 291-303.
- HIDAKA, C., GOLDRING, M. B. (2008). Regulatory mechanisms of chondrogenesis and implications for understanding articular cartilage homeostasis. *Current Rheumatology Reviews*, **4** (3): 136-147.
- HORTON, W., MIYASHITA, T., KOHNO, K., HASSELL, J., YAMADA, Y. (1987). Identification of a phenotype-specific enhancer in the first intron of the rat collagen II gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **84** (24): 8864-8868.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Erişim: [https://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/#:~:text=Osteoarthritis,fingers%2C%20and%20lower%20spine%20region]. Chronica Rheumatic Conditions. Erişim Tarihi: 21.06.2020.
- HUBER, M., TRATTNIG, S., LINTNER, F. (2000). Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Investigative Radiology*, **35** (10): 573-580.
- HWANG, N. S., VARGHESE, S., PULEO, C., ZHANG, Z., ELISSEFF, J. (2007). Morphogenetic signals from chondrocytes promote chondrogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, **212** (2): 281-284.
- JA, B. (1997). Articular cartilage. Part I: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *J Bone Joint Surg am*, **79** (4): 600-611.
- JAHANBAKHS, A., NOURBAKHS, M. S., BONAKDAR, S., SHOKRGOZAR, M. A., HAGHIGHIPOUR, N. (2020). Evaluation of alginate modification effect on cell-matrix interaction, mechanotransduction and chondrogenesis of encapsulated MSCs. *Cell and Tissue Research*. [Electronic Journal].
- JAMES, S. L., ABATE, D., ABATE, K. H., ABAY, S. M., ABBAFATI, C., ABBASI, N., ABBASTABAR, H., ABD-ALLAH, F., ABDELA, J., ABDELALIM, A. (2018). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, **392** (10159): 1789-1858.
- JANG, Y., KIM, E.-K., SHIM, W.-S., SONG, K.-M., KIM, S. M. (2015). Amniotic fluid exerts a neurotrophic influence on fetal neurodevelopment via the ERK/GSK-3 pathway. *Biological Research*, **48**: 1-9.
- JOO, S., KO, I. K., ATALA, A., YOO, J. J., LEE, S. J. (2012). Amniotic fluid-derived stem cells in regenerative medicine research. *Archives of Pharmacal Research*, **35** (2): 271-280.
- JUNG, C. K. (2014). Articular cartilage: histology and physiology techniques in cartilage repair surgery. In: *Techniques in Cartilage Repair Surgery*. Shetty, A. A., Kim, S. J., Nakamura, N., & Brittberg, M. (eds). Springer, Berlin., 17-21. pp. Erişim: [https://books.google.com.tr/books?id=

4pO4BAAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=tr&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false]. Erişim Tarihi: 21.06.2020.

- JUNEJA, P., MUNJAL, A., & HUBBARD, J. B. (2020). Anatomy, Joints. In StatPearls. StatPearls Publishing. Erişim: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507893>] Erişim Tarihi: 21.06.2020.
- KALENDAR, R., LEE, D., SCHULMAN, A. H. (2009). FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. *Genes, Genomes and Genomics*, **3 (1)**: 1-14.
- KANG, S.-W., YOO, S. P., KIM, B.-S. (2007). Effect of chondrocyte passage number on histological aspects of tissue-engineered cartilage. *Bio-medical Materials and Engineering*, **17 (5)**: 269-276.
- KAŻMIERSKI, Ł., BAJEK, A., DĘBSKI, R., BODNAR, M., ROSZKOWSKI, K. (2018). Does the conditioned medium trigger the adipose-derived mesenchymal stem cells differentiation into Chondrocytes? *Medical Research Journal*, **3 (3)**: 148-152.
- KELLER, B., YANG, T., CHEN, Y., MUNIVEZ, E., BERTIN, T., ZABEL, B., LEE, B. (2011). Interaction of TGF β and BMP signaling pathways during chondrogenesis. *PloS One*, **6 (1)**: e16421.
- KHEIR, E., SHAW, D. (2009). Hyaline articular cartilage. *Orthopaedics and Trauma*, **23(6)**: 450-455.
- KIANI, C., LIWEN, C., WU, Y. J., ALBERT, J. Y., BURTON, B. Y. (2002). Structure and function of aggrecan. *Cell Research*, **12 (1)**: 19-32.
- KIM, I., OTTO, F., ZABEL, B., MUNDLOS, S. (1999). Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mechanisms of Development*, **80 (2)**: 159-170.
- KIM, J., LEE, Y., KIM, H., HWANG, K., KWON, H., KIM, S.-K., CHO, D., KANG, S., YOU, J. (2007). Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Proliferation*, **40 (1)**: 75-90.
- KLEMMT, P. A., VAFAIZADEH, V., GRONER, B. (2011). The potential of amniotic fluid stem cells for cellular therapy and tissue engineering. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **11 (10)**: 1297-1314.
- KLOPPENBURG, M., & BERENBAUM, F. (2020). Osteoarthritis year in review 2019: Epidemiology and therapy. *Osteoarthritis and Cartilage*, **28 (3)**: 242-248.
- KNUDSON, C. B., TOOLE, B. P. (1985). Changes in the pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm. *Developmental Biology*, **112 (2)**: 308-318.
- KNUDSON, C. B., TOOLE, B. P. (1987). Hyaluronate-cell interactions during differentiation of chick embryo limb mesoderm. *Developmental Biology*, **124 (1)**: 82-90.

- KOLAMBKAR, Y. M., PEISTER, A., SOKER, S., ATALA, A., GULDBERG, R. E. (2007). Chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells. *Journal of Molecular Histology*, **38** (5): 405-413.
- KOYAMA, E., SHIBUKAWA, Y., NAGAYAMA, M., SUGITO, H., YOUNG, B., YUASA, T., OKABE, T., OCHIAI, T., KAMIYA, N., ROUNTREE, R. B. (2008). A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis. *Developmental Biology*, **316** (1): 62-73.
- KULYK, W. M., UPHOLT, W. B., KOSHER, R. A. (1989). Fibronectin gene expression during limb cartilage differentiation. *Development*, **106** (3): 449-455.
- KUNISAKI, S. M., JENNINGS, R. W., FAUZA, D. O. (2006). Fetal cartilage engineering from amniotic mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells and Development*, **15** (2): 245-253.
- KURAUCHI, O., ITAKURA, A., ANDO, H., KUNO, N., MIZUTANI, S., TOMODA, Y. (1995). The concentration of hepatocyte growth factor (HGF) in human amniotic fluid at second trimester: relation to fetal birth weight. *Hormone and Metabolic Research*, **27** (07): 335-338.
- KURTH, T., HEDBOM, E., SHINTANI, N., SUGIMOTO, M., CHEN, F., HASPL, M., MARTINOVIC, S., HUNZIKER, E. B. (2007). Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate. *Osteoarthritis and Cartilage*, **15** (10): 1178-1189.
- LANGER, R., TIRRELL, D. A. (2004). Designing materials for biology and medicine. *Nature*, **428** (6982): 487.
- LEE, K. Y., MOONEY, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, **37** (1): 106-126.
- LINDENHAYN, K., PERKA, C., SPITZER, R. S., HEILMANN, H. H., POMMERENING, K., MENNICKE, J., SITTINGER, M. (1999). Retention of hyaluronic acid in alginate beads: aspects for in vitro cartilage engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, **44** (2): 149-155.
- LIU, J., LIU, X., ZHOU, G., XIAO, R., CAO, Y. (2012). Conditioned medium from chondrocyte/scaffold constructs induced chondrogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, **295** (7): 1109-1116.
- LOESER, R. F. (2014). Integrins and chondrocyte–matrix interactions in articular cartilage. *Matrix Biology*, **39**: 11-16.
- LONGOBARDI, L., O'REAR, L., AAKULA, S., JOHNSTONE, B., SHIMER, K., CHYTIL, A., HORTON, W. A., MOSES, H. L., SPAGNOLI, A. (2006). Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF- β signaling. *Journal of Bone and Mineral Research*, **21** (4): 626-636.

- LÓPEZ-CASILLAS, F., PAYNE, H. M., ANDRES, J. L., MASSAGUÉ, J. (1994). Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *The Journal of Cell Biology*, **124** (4): 557-568.
- LÓPEZ-CASILLAS, F., WRANA, J. L., MASSAGUÉ, J. (1993). Betaglycan presents ligand to the TGFβ signaling receptor. *Cell*, **73** (7): 1435-1444.
- LOUKOGEORGAKIS, S. P., DE COPPI, P. (2017). Concise review: amniotic fluid stem cells: the known, the unknown, and potential regenerative medicine applications. *Stem Cells*, **35** (7): 1663-1673.
- MA, H. L., HUNG, S. C., LIN, S. Y., CHEN, Y. L., LO, W. H. (2003). Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, **64** (2): 273-281.
- MACKAY, A. M., BECK, S. C., MURPHY, J. M., BARRY, F. P., CHICHESTER, C. O., PITTENGER, M. F. (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Engineering*, **4** (4): 415-428.
- MANDAL, S., KUMAR, S. S., KRISHNAMOORTHY, B., BASU, S. K. (2010). Development and evaluation of calcium alginate beads prepared by sequential and simultaneous methods. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **46** (4): 785-793.
- MARCUS, A. J., COYNE, T. M., RAUCH, J., WOODBURY, D., BLACK, I. B. (2008). Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. *Differentiation*, **76** (2): 130-144.
- MARKMEE, R., AUNGSUCHAWAN, S., NARAKORNSAK, S., TANCHAROEN, W., BUMRUNGKIT, K., PANGCHAIDEE, N., POTHACHAROEN, P., PUANINTA, C. (2017). Differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid to cardiomyocyte-like cells. *Molecular medicine reports*, **16** (5): 6068-6076.
- MASSAGUÉ, J., SEOANE, J., WOTTON, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes & Development*, **19** (23): 2783-2810.
- MASTROGIACOMO, M., CANCEDDA, R., QUARTO, R. (2001). Effect of different growth factors on the chondrogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Osteoarthritis and Cartilage*, **9**: 36-40.
- MATTA, C., BOOCOCK, D. J., FELLOWS, C. R., MIOSGE, N., DIXON, J. E., LIDDELL, S., SMITH, J., MOBASHERI, A. (2019). Molecular phenotyping of the surfaceome of migratory chondroprogenitors and mesenchymal stem cells using biotinylation, glycocapture and quantitative LC-MS/MS proteomic analysis. *Scientific Reports*, **9** (1): 1-15.
- MEIER, S., SOLURSH, M., VAEREWYCK, S. (1973). Modulation of extracellular matrix production by conditioned medium. *American Zoologist*, **13** (4): 1051-1060.

- MERIMEE, T. J., GRANT, M., TYSON, J. (1984). Insulin-like growth factors in amniotic fluid. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **59** (4): 752-755.
- MINOCHA, E., CHATURVEDI, C. P., NITYANAND, S. (2019). Renogenic characterization and in vitro differentiation of rat amniotic fluid stem cells into renal proximal tubular-and juxtaglomerular-like cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, **55** (2): 138-147.
- MIOSGE, N., HARTMANN, M., MAELICKE, C., HERKEN, R. (2004). Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. *Histochemistry and Cell Biology*, **122** (3): 229-236.
- MIOSGE, N., WALETZKO, K., BODE, C., QUONDAMATTEO, F., SCHULTZ, W., HERKEN, R. (1998). Light and electron microscopic in situ hybridization of collagen type I and type II mRNA in the fibrocartilaginous tissue of late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, **6** (4): 278-285.
- MOOREFIELD, E. C., MCKEE, E. E., SOLCHAGA, L., ORLANDO, G., YOO, J. J., WALKER, S., FURTH, M. E., BISHOP, C. E. (2011). Cloned, CD117 selected human amniotic fluid stem cells are capable of modulating the immune response. *PloS One*, **6** (10): e26535.
- MOSCHIDOU, D., GUILLOT, P. V. (2012). Reprogramming human amniotic fluid stem cells to functional pluripotency by manipulation of culture conditions. *Nature Protocol Exchange* [Electronic Journal].
- MOSCHIDOU, D., MUKHERJEE, S., BLUNDELL, M. P., JONES, G. N., ATALA, A. J., THRASHER, A. J., FISK, N. M., DE COPPI, P., GUILLOT, P. V. (2013). Human mid-trimester amniotic fluid stem cells cultured under embryonic stem cell conditions with valproic acid acquire pluripotent characteristics. *Stem Cells and Development*, **22** (3): 444-458.
- MUELLER, M. B., FISCHER, M., ZELLNER, J., BERNER, A., DIENSTKNECHT, T., PRANTL, L., KUJAT, R., NERLICH, M., TUAN, R. S., ANGELE, P. (2010). Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF- β isoforms and chondrogenic conditioning. *Cells Tissues Organs*, **192** (3): 158-166.
- MUN-FUN, H., FERDAOS, N., HAMZAH, S. N., RIDZUAN, N., HISHAM, N. A., ABDULLAH, S., RAMASAMY, R., CHEAH, P. S., THILAKAVATHY, K., YAZID, M. N. (2015). Rat full term amniotic fluid harbors highly potent stem cells. *Research in Veterinary Science*, **102**: 89-99.
- MURPHY, S. V., ATALA, A. (2013). Amniotic fluid and placental membranes: unexpected sources of highly multipotent cells. *Seminars in Reproductive Medicine*, **31** (1): 62-68.
- NAKAGAWA, T., YASUDA, T., HOSHIKAWA, H., SHIMIZU, M., KAKINUMA, T., CHEN, M., MASAKI, T., NAKAMURA, T., SAWAMURA, T. (2002). LOX-1 expressed in cultured rat chondrocytes mediates oxidized LDL-induced cell death—possible role of dephosphorylation of Akt. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **299** (1): 91-97.

- NAWAZ, S., AKKAYA, Ö. Ö., DIKMEN, T., ALTUNBAŞ, K., YAĞCI, A., KIBRIA, A. G., ERDOĞAN, M., ÇELİK, H. A. (2020). Molecular characterization of bovine amniotic fluid derived stem cells with an underlying focus on their comparative neuronal potential at different passages. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, **228**: 151452.
- NG, L.-J., WHEATLEY, S., MUSCAT, G. E., CONWAY-CAMPBELL, J., BOWLES, J., WRIGHT, E., BELL, D. M., TAM, P. P., CHEAH, K. S., KOOPMAN, P. (1997). SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Developmental Biology*, **183 (1)**: 108-121.
- NUERNBERGER, S., CYRAN, N., ALBRECHT, C., REDL, H., VÉCSEI, V., MARLOVITS, S. (2011). The influence of scaffold architecture on chondrocyte distribution and behavior in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts. *Biomaterials*, **32 (4)**: 1032-1040.
- OBERLENDER, S. A., TUAN, R. S. (1994). Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme. *Cell Adhesion and Communication*, **2 (6)**: 521-537.
- OLSEN, B. R., REGINATO, A. M., WANG, W. (2000). Bone development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **16 (1)**: 191-220.
- ONDRÉSIK, M., OLIVEIRA, J. M., REIS, R. L. (2017). Knee articular cartilage. In: *Regenerative Strategies for the Treatment of Knee Joint Disabilities*. OLIVEIRA, J. M., REIS, R. L., (eds). Springer, International publishing, Cham., 3-20 pp. Erişim: [https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-319-44785-8.pdf]. Erişim Tarihi: 21.06.2020.
- PACIFICI, M., GOLDEN, E. B., ADAMS, S. L., SHAPIRO, I. M. (1991). Cell hypertrophy and type X collagen synthesis in cultured articular chondrocytes. *Experimental Cell Research*, **192 (1)**: 266-270.
- PALMER, K. T., GOODSON, N. (2015). Ageing, musculoskeletal health and work. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, **29 (3)**: 391-404.
- PAN, H.-C., CHENG, F.-C., CHEN, C.-J., LAI, S.-Z., LEE, C.-W., YANG, D.-Y., CHANG, M.-H., HO, S.-P. (2007). Post-injury regeneration in rat sciatic nerve facilitated by neurotrophic factors secreted by amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Journal of Clinical Neuroscience*, **14 (11)**: 1089-1098.
- PAPPA, K. I., ANAGNOU, N. P. (2009). Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regenerative. Medicine*, **4 (3)**: 423-433.
- PARK, H., KIM, D., LEE, K. Y. (2017). Interaction-tailored cell aggregates in alginate hydrogels for enhanced chondrogenic differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **105 (1)**: 42-50.
- PEARLE, A. D., WARREN, R. F., RODEO, S. A. (2005). Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clinics in Sports Medicine*, **24 (1)**: 1-12.

- PERIN, L., GIULIANI, S., JIN, D., SEDRAKYAN, S., CARRARO, G., HABIBIAN, R., WARBURTON, D., ATALA, A., DE FILIPPO, R. (2007). Renal differentiation of amniotic fluid stem cells. *Cell Proliferation*, **40** (6): 936-948.
- PETSCHÉ CONNELL, J., CAMCI-UNAL, G., KHADEMOSSEINI, A., JACOT, J. G. (2013). Amniotic fluid-derived stem cells for cardiovascular tissue engineering applications. *Tissue Engineering Part B Reviews*, **19** (4): 368-379.
- PFEIFER, C. G., KARL, A., KERSCHBAUM, M., BERNER, A., LANG, S., SCHUPFNER, R., KOCH, M., ANGELE, P., NERLICH, M., MUELLER, M. B. (2019). TGF- β Signalling is Suppressed under Pro-Hypertrophic Conditions in MSC Chondrogenesis Due to TGF- β Receptor Downregulation. *International Journal of Stem Cells*, **12** (1): 139.
- PERMTHAI, T., ODGLUN, Y., JULAVIJITPHONG, S., TITAPANT, V., CHUENWATTANA, P., VANTANASIRI, C., PATTANAPANYASAT, K. (2010). A novel method to derive amniotic fluid stem cells for therapeutic purposes. *BMC Cell Biology*, **11** (1): 79.
- PHORNPHUTKUL, C., WU, K.-Y., YANG, X., CHEN, Q., GRUPPUSO, P. A. (2004). Insulin-like growth factor-I signaling is modified during chondrocyte differentiation. *Journal of Endocrinology*, **183** (3): 477-486.
- PHULL, A.-R., EO, S.-H., ABBAS, Q., AHMED, M., KIM, S. J. (2016). Applications of chondrocyte-based cartilage engineering: an overview. *BioMed Research International*, **2016**: 1879837.
- PITTENGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MOORMAN, M. A., SIMONETTI, D. W., CRAIG, S., MARSHAK, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **284** (5411): 143-147.
- POLK, A., AMSDEN, B., DE YAO, K., PENG, T., GOOSEN, M. (1994). Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **83** (2): 178-185.
- PROVOT, S., SCHIPANI, E. (2005). Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **328** (3): 658-665.
- PRUSA, A. R., MARTON, E., ROSNER, M., BERNASCHEK, G., HENGSTSCHLAGER, M. (2003). Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Human Reproduction*, **18** (7): 1489-1493.
- REVEL, J.-P., HAY, E. D. (1963). An autoradiographic and electron microscopic study of collagen synthesis in differentiating cartilage. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, **61** (1): 110-144.
- RIM, Y. A., NAM, Y., JU, J. H. (2020). The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, **21** (7): 2358.

- ROMAN-BLAS, J. A., STOKES, D. G., JIMENEZ, S. A. (2007). Modulation of TGF- β signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, **15** (12): 1367-1377.
- ROUBELAKIS, M. G., PAPPAS, K. I., BITSIKA, V., ZAGOURA, D., VLAHO, A., PAPADAKI, H. A., ANTSAKLIS, A., ANAGNOU, N. P. (2007). Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, **16** (6): 931-952.
- RUIZ, M., MAUMUS, M., FONTENEAU, G., PERS, Y.-M., FERREIRA, R., DAGNEAUX, L., DELFOUR, C., HOUARD, X., BERENBAUM, F., RANNOU, F. (2019). TGF β i is involved in the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and is dysregulated in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, **27** (3): 493-503.
- SAVICKIENĖ, J., BARONAITĖ, S., ZENTELYTĖ, A., TREIGYTĖ, G., NAVAKAUSKIENĖ, R. (2016). Senescence-associated molecular and epigenetic alterations in mesenchymal stem cell cultures from amniotic fluid of normal and fetus-affected pregnancy. *Stem cells International*, **2016**: 2019498.
- SAVICKIENE, J., TREIGYTE, G., BARONAITĖ, S., VALIULIENE, G., KAUPINIS, A., VALIUS, M., ARLAUSKIENE, A., NAVAKAUSKIENE, R. (2015). Human amniotic fluid mesenchymal stem cells from second-and third-trimester amniocentesis: differentiation potential, molecular signature, and proteome analysis. *Stem Cells International*, **2015**.
- SCHETTINI, E., SANTAGATA, G., MALINCONICO, M., IMMIRZI, B., MUGNOZZA, G. S., VOX, G. (2013). Recycled wastes of tomato and hemp fibres for biodegradable pots: Physico-chemical characterization and field performance. *Resources, Conservation and Recycling*, **70**: 9-19.
- SCHULZE-TANZIL, G. (2009). Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, **191** (4): 325-338.
- SCHULZE-TANZIL, G., DE SOUZA, P., CASTREJON, H. V., JOHN, T., MERKER, H.-J., SCHEID, A., SHAKIBAEI, M. (2002). Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell and Tissue Research*, **308** (3): 371-379.
- SCHULZE-TANZIL, G., MOBASHERI, A., DE SOUZA, P., JOHN, T., SHAKIBAEI, M. (2004). Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient Shc-Erk interaction and apoptosis. *Osteoarthritis and Cartilage*, **12** (6): 448-458.
- SCHUMACHER, B. L., BLOCK, J., SCHMID, T., AYDELOTTE, M., KUETTNER, K. (1994). A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **311** (1): 144-152.
- SCOTT, S. M., BUENAFLO, G. G., ORTH, D. N. (1989). Immunoreactive human epidermal growth factor concentrations in amniotic fluid, umbilical artery and vein serum, and placenta in full-term and preterm infants. *Neonatology*, **56** (5): 246-251.

- SHEN, V., RIFAS, L., KOHLER, G., PECK, W. A. (1985). Fetal rat chondrocytes sequentially elaborate separate growth-and differentiation-promoting peptides during their development in vitro. *Endocrinology*, **116** (3): 920-925.
- SHINTANI, N., HUNZIKER, E. B. (2011). Differential effects of dexamethasone on the chondrogenesis of mesenchymal stromal cells: influence of microenvironment, tissue origin and growth factor. *European Cells and Materials*, **22**: 302-319.
- SKARDAL, A., MACK, D., KAPETANOVIC, E., ATALA, A., JACKSON, J. D., YOO, J., SOKER, S. (2012). Bioprinted amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds. *Stem Cells Translational Medicine*, **1** (11): 792-802.
- SMIDSRØD, O., SKJÅ, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, **8**: 71-78.
- SOLURSH, M., MEIER, S. (1973). A conditioned medium (CM) factor produced by chondrocytes that promotes their own differentiation. *Developmental Biology*, **30** (2): 279-289.
- SOPHIA FOX, A. J., BEDI, A., RODEO, S. A. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*, **1** (6): 461-468.
- SPLITZORN, L.-S., RAHMAN, M. S., SCHWINDT, L., HO, H.-T., WRUCK, W., BOHNDORF, M., WEHRMEYER, S., NCUBE, A., BEYER, I., HAGENBECK, C. (2017). Isolation and molecular characterization of amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells obtained from caesarean sections. *Stem Cells International*, **2017**: 5932706.
- SRIAMORNSAK, P., THIRAWONG, N., KORKERD, K. (2007). Swelling, erosion and release behavior of alginate-based matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **66** (3): 435-450.
- SRIVASTAVA, M., AHLAWAT, N., SRIVASTAVA, A. (2018). Amniotic fluid stem cells: a new era in regenerative medicine. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, **68** (1): 15-19.
- STEINERT, A., WEBER, M., DIMMLER, A., JULIUS, C., SCHÜTZE, N., NÖTH, U., CRAMER, H., EULERT, J., ZIMMERMANN, U., HENDRICH, C. (2003). Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate. *Journal of Orthopaedic Research*, **21** (6): 1090-1097.
- STENVIK, J., SLETTA, H., GRIMSTAD, Ø., PUKSTAD, B., RYAN, L., AUNE, R., STRAND, W., TØNDERVIK, A., HELGE TORP, S., SKJÅK-BRÆK, G. (2012). Alginates induce differentiation and expression of CXCR7 and CXCL12/SDF-1 in human keratinocytes—The role of calcium. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **100** (10): 2803-2812.
- STEWART, A. J., LIU, Y., WAGNER, D. R. (2011). Engineering cell attachments to scaffolds in cartilage tissue engineering. *Journal of Management*, **63** (4): 74-82.

- STOCKWELL, R. (1978). Chondrocytes. *Journal of Clinical Pathology. Supplement (Royal College of Pathologists)*, **12**: 7-13.
- STODDART, M. J., GRAD, S., EGLIN, D., ALINI, M. (2009). Cells and biomaterials in cartilage tissue engineering. *Regenerative Medicine*, **4** (1): 81-98.
- STOKES, D. G., LIU, G., COIMBRA, I. B., PIERA-VELAZQUEZ, S., CROWL, R. M., JIMÉNEZ, S. A. (2002). Assessment of the gene expression profile of differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis. *Arthritis & Rheumatism*, **46** (2): 404-419.
- STUPACK, D. G., CHERESH, D. A. (2002). Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *Journal of Cell Science*, **115** (19): 3729-3738.
- TAKEDA, S., BONNAMY, J.-P., OWEN, M. J., DUCY, P., KARSENTY, G. (2001). Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Development*, **15** (4): 467-481.
- TANG, Q. O., SHAKIB, K., HELIOTIS, M., TSIRIDIS, E., MANTALARIS, A., RIPAMONTI, U., TSIRIDIS, E. (2009). TGF- β 3: a potential biological therapy for enhancing chondrogenesis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **9** (6): 689-701.
- TAVELLA, S., RAFFO, P., TACCHETTI, C., CANCEDDA, R., CASTAGNOLA, P. (1994). N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis. *Experimental Cell Research*, **215** (2): 354-362.
- TCHETINA, E. V. (2011). Developmental mechanisms in articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Arthritis*, **2011**: 683970.
- TESCHE, F., MIOSGE, N. (2005). New aspects of the pathogenesis of osteoarthritis: the role of fibroblast-like chondrocytes in late stages of the disease. *Histology and Histopathology*, **20** (1): 329-337.
- TETLOW, L. C., ADLAM, D. J., WOOLLEY, D. E. (2001). Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis & Rheumatism*, **44** (3): 585-594.
- THIRION, S., BERENBAUM, F. (2004). Culture and phenotyping of chondrocytes in primary culture *Methods in Molecular Medicine*, **100**: 1-14.
- TONG, X.-L., WANG, L., GAO, T.-B., QIN, Y.-G., QI, Y.-Q., XU, Y.-P. (2009). Potential function of amniotic fluid in fetal development—novel insights by comparing the composition of human amniotic fluid with umbilical cord and maternal serum at mid and late gestation. *Journal of the Chinese Medical Association*, **72** (7): 368-373.

- TOOLE, B. P., JACKSON, G., GROSS, J. (1972). Hyaluronate in morphogenesis: inhibition of chondrogenesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **69** (6): 1384-1386.
- TSAI, M. S., HWANG, S. M., TSAI, Y. L., CHENG, F. C., LEE, J. L., CHANG, Y. J. (2006). Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. *Biology of Reproduction*, **74** (3): 545-551.
- TSAI, M. S., LEE, J. L., CHANG, Y. J., HWANG, S. M. (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human Reproduction*, **19** (6): 1450-1456.
- ULRICH-VINTHER, M., MALONEY, M. D., SCHWARZ, E. M., ROSIER, R., O'KEEFE, R. J. (2003). Articular cartilage biology. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, **11** (6): 421-430.
- UNDERWOOD, M. A., GILBERT, W. M., SHERMAN, M. P. (2005). Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *Journal of Perinatology*, **25** (5): 341.
- VILLIGER, P., KUSARI, A., TEN DIJKE, P., LOTZ, M. (1993). IL-1 beta and IL-6 selectively induce transforming growth factor-beta isoforms in human articular chondrocytes. *The Journal of Immunology*, **151** (6): 3337-3344.
- VON DER MARK, H., VON DER MARK, K., GAY, S. (1976). Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluorescence: I. Preparation of collagen type I and type II specific antibodies and their application to early stages of the chick embryo. *Developmental Biology*, **48** (2): 237-249.
- VOS, T., FLAXMAN, A. D., NAGHAVI, M., LOZANO, R., MICHAUD, C., EZZATI, M., SHIBUYA, K., SALOMON, J. A., ABDALLA, S., ABOYANS, V. (2012). Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, **380** (9859): 2163-2196.
- WANG, M., LI, H., SI, J., DAI, J., SHI, J., WANG, X., GUO, L., SHEN, G. (2017). Amniotic fluid-derived stem cells mixed with platelet rich plasma for restoration of rat alveolar bone defect. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **49** (3): 197-207.
- WANG, Z. Y., ZHANG, Q. Z., KONNO, M., SAITO, S. (1993). Sol–gel transition of alginate solution by the addition of various divalent cations: ¹³C-nmr spectroscopic study. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, **33** (4): 703-711.
- WARMAN, M. L., ABBOTT, M., APTE, S. S., HEFFERON, T., MCINTOSH, I., COHN, D. H., HECHT, J. T., OLSEN, B. R., FRANCOMANO, C. A. (1993). A type X collagen mutation causes Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *Nature Genetics*, **5** (1): 79-82.
- WATT, F. M. (1988). Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture. *Journal of Cell Science*, **89** (3): 373-378.

- WEBER, B., KEHL, D., BLEUL, U., BEHR, L., SAMMUT, S., FRESE, L., KSIAZEK, A., ACHERMANN, J., STRANZINGER, G., ROBERT, J. (2016). In vitro fabrication of autologous living tissue-engineered vascular grafts based on prenatally harvested ovine amniotic fluid-derived stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **10** (1): 52-70.
- WIDELITZ, R. B., JIANG, T. X., MURRAY, B. A., CHUONG, C. M. (1993). Adhesion molecules in skeletogenesis: II. Neural cell adhesion molecules mediate precartilaginous mesenchymal condensations and enhance chondrogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, **156** (2): 399-411.
- WU, L., GONZALEZ, S., SHAH, S., KYUPELYAN, L., PETRIGLIANO, F. A., MCALLISTER, D. R., ADAMS, J. S., KARPERIEN, M., TUAN, T.-L., BENYA, P. D. (2014). Extracellular matrix domain formation as an indicator of chondrocyte dedifferentiation and hypertrophy. *Tissue Engineering Part C: Methods*, **20** (2): 160-168.
- XU, J., WANG, W., LUDEMAN, M., CHENG, K., HAYAMI, T., LOTZ, J. C., KAPILA, S. (2008). Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in three-dimensional alginate gels. *Tissue Engineering Part A*, **14** (5): 667-680.
- YAMANE, S., CHENG, E., YOU, Z., REDDI, A. H. (2007). Gene expression profiling of mouse articular and growth plate cartilage. *Tissue Engineering*, **13** (9): 2163-2173.
- YOON, D. M., FISHER, J. P. (2008). Effects of exogenous IGF-1 delivery on the early expression of IGF-1 signaling molecules by alginate embedded chondrocytes. *Tissue Engineering Part A*, **14** (7): 1263-1273.
- YOU, Q., CAI, L., ZHENG, J., TONG, X., ZHANG, D., ZHANG, Y. (2008). Isolation of human mesenchymal stem cells from third-trimester amniotic fluid. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, **103** (2): 149-152.
- YU, D.-A., HAN, J., KIM, B.-S. (2012). Stimulation of chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *International Journal of Stem Cells*, **5** (1): 16.
- YUBO, M., YANYAN, L., LI, L., TAO, S., BO, L., LIN, C. (2017). Clinical efficacy and safety of mesenchymal stem cell transplantation for osteoarthritis treatment: a meta-analysis. *PloS one*, **12** (4): e0175449.
- ZAVATTI, M., BERETTI, F., CASCIARO, F., BERTUCCI, E., MARALDI, T. (2020). Comparison of the therapeutic effect of amniotic fluid stem cells and their exosomes on monoiodoacetate-induced animal model of osteoarthritis. *Biofactors*, **46** (1): 106-117.
- ZHANG, S., GENG, H., XIE, H., WU, Q., MA, X., ZHOU, J., CHEN, F. (2010). THE heterogeneity of cell subtypes from a primary culture of human amniotic fluid. *Cellular & Molecular Biology Letters*, **15** (3): 424-439.

- ZHANG, X., XUE, K., ZHOU, J., XU, P., HUANG, H., LIU, K. (2015). Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived stem cells cultured in the supernatant of elastic cartilage cells. *Molecular Medicine Reports*, **12** (4): 5355-5360.
- ZHAO, M., LIU, T., PANG, G. (2019). Intercellular wireless communication network between mother and fetus in rat pregnancy-a study on directed and weighted network. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **17** (1): 40.
- ZHAO, Q., EBERSPAECHER, H., LEFEBVRE, V., DE CROMBRUGGHE, B. (1997). Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **209** (4): 377-386.
- ZHAO, X., HWANG, N. S., BICHARA, D. A., SARIS, D. B., MALDA, J., VACANTI, J. P., POMERANTSEVA, I., SUNDBACK, C. A., LANGER, R., ANDERSON, D. G. (2017). Chondrogenesis by bone marrow-derived mesenchymal stem cells grown in chondrocyte-conditioned medium for auricular reconstruction. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **11** (10): 2763-2773.
- ZHENG, Y.-B., ZHANG, X.-H., HUANG, Z.-L., LIN, C.-S., LAI, J., GU, Y.-R., LIN, B.-L., XIE, D.-Y., XIE, S.-B., PENG, L. (2012). Amniotic-fluid-derived mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-1 receptor antagonist improve fulminant hepatic failure. *PloS One*, **7** (7): e41392.
- ZHENG, Y. B., GAO, Z. L., XIE, C., ZHU, H. P., PENG, L., CHEN, J. H., CHONG, Y. T. (2008). Characterization and hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid and human bone marrow: a comparative study. *Cell Biology International*, **32** (11): 1439-1448.
- ZHU, Y., TAO, H., JIN, C., LIU, Y., LU, X., HU, X., WANG, X. (2015). Transforming growth factor- β 1 induces type II collagen and aggrecan expression via activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Smad2/3 signaling pathways. *Molecular Medicine Reports*, **12** (4): 5573-5579.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler



Shah Nawaz

H/No 274-E, Street no, 11 Sector G-6/2, Islamabad Pakistan.

Histoloji ve Embriyoloji ABD, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Türkiye

00905315161882

00923344211241

_los_1527@hotmail.com

Doğum Tarihi: 15/07/1986 | Uyrük - Pakistan

EĞİTİM

2016-2020

DOKTORA

Histoloji ve Embriyoloji , Veteriner Fakültesi.Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyonkarahisar, Türkiye

2010-2015

VETERİNER HEKİM

PMAS Arid Agriculture Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Rawalpindi, PAKİSTAN

YAYINLAR

1. Li, Kun, Lihong Zhang, Houqiang Luo, Khalid Mehmood, Muhammad Shahzad, Jiakui Li, Muhammad Usman Naseer, and **Shah Nawaz**. "Besnoitiosis: An Emerging Parasitic Disease in Yaks (*Bos grunniens*) and Tibetan Sheep (*Ovis aries*) on the Qinghai Tibetan Plateau, China." *Pakistan Veterinary Journal* 39, no. 3 (2019). [https://DOI: 10.29261/pakvetj/2019.086](https://doi.org/10.29261/pakvetj/2019.086)
2. Umar, S., **S. Nawaz**, M. Shahzad, M. T. Munir, and M. A. A. Shah. "Emerging issue of gangrenous dermatitis in broilers." *J Avian Res* 1, no. 2 (2015): 17-19.
3. AKKAYA, Özlem ÖZDEN, Tayfun DİKMEN, and **Shah NAWAZ**. "Investigation of Sox2, β -III Tubulin

and Nestin Expressions in Neuropsheres Differentiated from Bovine Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells by Immunofluorescence Staining." *Kocatepe Veteriner Dergisi* 12.3: 1-1 (2019)
<https://doi.org/10.30607/kvj.594550>

4. **Nawaz, Shah**, Özlem Özden Akkaya, Tayfun Dikmen, Korhan Altunbaş, Artay Yağci, ASM Golam Kibria, Metin Erdoğan, and Hacı Ahmet Çelik. "Molecular characterization of bovine amniotic fluid derived stem cells with an underlying focus on their comparative neuronal potential at different passages." *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* (2019): 151452. <https://DOI: 10.1016/j.aanat.2019.151452>

ULUSLARARASI KONGRELER

1. **Shah NAWAZ**, Korhan ALTUNBAS, Ozlem Ozden AKKAYA, ASM Golam KIBRIA, Tayfun DIKMEN, Hacı Ahmet CELİK and Artay YAGCI. Harvesting and Characterization of stem cells from Bovine Amniotic fluid. One Health conference (OHC-2017) 13-15, Nov. 2017 UVAS Lahore Pakistan.
2. **Shah Nawaz**, Korhan Altunbas, Volkan Yaprakci, Artay Yagci, Metin Erdogan. Canine olfactory epithelium derived stem cells and their characterization.1st International Anatomy conference 13-16, Sep.2017 Sandikli, Turkey.
3. ASM Golam KIBRIA, Korhan ALTUNBAS, Ozlem Ozden AKKAYA, **Shah NAWAZ**, Tayfun DIKMEN and Artay YAGCI. Amniotic fluid derived stem cells and its multilineage differentiation. One Health conference (OHC-2017) 13-15, Nov. 2017 UVAS Lahore Pakistan.
4. Korhan ALTUNBAS, **Shah NAWAZ**, Mustafa Volkan YAPRAKÇI, Özlem Özden AKKAYA, Artay YAĞCI. Isolating Lamina propria derived stem cells from canines. 3rd International conference on science, ecology and technology 14-16 Aug, 2017 Rome, Italy.
5. Artay Yağcı, Metin Erdoğan, **Shah Nawaz**, Korhan Altunbas. Gene expression in canine olfactory stem cells. 3rd International conference on science, ecology and technology 14-16 Aug, 2017 Rome, Italy.
6. Rahman, Saima, T.N. Pasha, M. Akram, A.D. Yasir and **SHAH Nawaz**. Supplementation of Exogenous Enzymes and Organic Acid in Broiler Diets. Federation of Asian Veterinary Association (FAVA) 28-30, Nov. 2014 at Singapore.

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

14/07/2020

Shah NAWAZ