



**AMNİYOTİK SIVI KAYNAKLI KÖK
HÜCRELERİN OSTEOJENİK
FARKLILAŞMASININ OPTİMİZASYONUNDA
ADAYLAR: TGF- β 3, 17 β -ESTRADIÖL VE
OSTEOPROTEGERİN**

Doktora Tezi
Danışman: Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ
İkinci Danışman: Prof. Dr. Metin ERDOĞAN

Tez No: 2021-007
Afyonkarahisar

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

AMNİYOTİK SIVI KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN
OSTEOJENİK FARKLILAŞMASININ OPTİMİZASYONUNDA
ADAYLAR: TGF- β 3, 17 β -ESTRADIOL VE
OSTEOPROTEGERİN

Hazırlayan
Tayfun DİKMEN

Danışman
Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ

Ortak Tez Danışmanı
Prof. Dr. Jale ÖNER

İkinci Danışman
Prof. Dr. Metin ERDOĞAN

Tez No: 2021-007
AFYONKARAHİSAR

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji **Anabilim Dalı'nda** Tayfun DİKMEN tarafından hazırlanan “Amniyotik Sıvı Kaynaklı Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasının Optimizasyonunda Adaylar:TGF- β 3, 17 β -Estradiol ve Osteoprotegerin” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 10/09/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Unvan, Ad, Soyad

İmza

Üye

Unvan, Ad, Soyad

İmza

Üye

Unvan, Ad, Soyad

İmza

Üye

Unvan, Ad, Soyad

İmza

Üye

Unvan, Ad, Soyad

İmza

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... / / tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

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.

...../...../.....

İmza

Tayfun DİKMEN

ÖZET

Amniyotik Sıvı Kaynaklı Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasının Optimizasyonunda Adaylar: TGF- β 3, 17 β -Estradiol ve Osteoprotegerin

Kemik doku, organik ve inorganik maddelerden oluşan kompleks bir dokudur. Hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler, iz elementler gibi birçok unsurun etki gösterdiği kemik dokuda 100'ün üzerinde hastalık ve sendrom tanımlanmıştır. Her biri karmaşık ve farklı yaklaşımlar gerektiren bu hastalıklar, kemik rejenerasyonu ile ilgili girişimlere ihtiyaç duyan bireylerde yenilikçi hücresel tedavi yaklaşımlarında problemlere sebep olabilecek potansiyeldedir. Çalışmada osteoblast hücre hattı olan hfOB hücreleri üzerinde TGF- β 3 ve 17 β -estradiol kullanarak kemik metabolizmasında önemli role sahip olan osteoprotegerin (OPG) proteinin üretimi artırılarak yüksek seviyede OPG içeren koşullandırılmış medyum (KM) elde edildi. Elde edilen yüksek seviyede OPG içeren KM'nin yanı sıra TGF- β 3, 17 β -estradiol ve standart hfOB KM kullanılarak amniyotik sıvı kaynaklı kök hücrelerde (ASKKH) osteojenik farklılaştırma çalışmaları yapıldı. On dört ve yirmi bir günlük farklılaştırma çalışmalarının ardından hücreler real-time PCR yöntemi ile osteojenik belirteçler olan SPP1, RUNX2, COL1 ve DCN gen ifadeleri bakımından incelendi. Hücrelerde ayrıca Alizarin Red S boyamasının sayısal değerlendirmesi yapılarak kalsiyum birikimi seviyeleri belirlendi. Elde edilen veriler 17 β -estradiolün ASKKH'leri hızla osteojenik farklılaşmanın ileri safhalarına taşıdığını ve mineralizasyonu arttırdığını gösterdi. Öte yandan TGF- β 3 ve OPG'nin ise hücrelerin daha uzun süre erken osteoblastogenezis safhasında kalmasına yardımcı olduğu ve hücrelerde mineralizasyon miktarını düşük seviyelerde tuttuğu görüldü. Daha hızlı kemikleşme ve yüksek oranda mineralizasyonun amaçlandığı durumlarda 17 β -estradiol daha başarılı sonuçlar vaat ederken hücrelerin erken osteoblastogenezis safhasında tutulmasının fayda sağlayacağı veya ekstansif mineralizasyonun sorun yaratacağı durumlarda ise TGF- β 3 ve OPG'nin daha yararlı olabileceği düşünülmektedir. Çalışmadan elde edilen veriler diğer erken ve geç osteogenezis belirteçlerinden elde edilecek veriler ile zenginleştirilmeli; belirlenecek farklı zaman aralıkları ile hücrelerin osteogenezisin hangi aşamasında ne kadar süre ile kaldığı belirlenmeli ve elde edilecek sonuçlar *in vivo* çalışmalar ile test edilmelidir.

Anahtar Kelimeler: 17 β -estradiol, Amniyotik sıvı kaynaklı kök hücreler, Koşullandırılmış medyum. Osteojenik farklılaştırma, Osteoprotegerin, TGF- β 3.

SUMMARY

Potential Candidates on Optimization of Osteogenic Differentiation of Amniotic Fluid Derived Stem Cells: TGF- β 3, 17 β -Estradiol and Osteoprotegerin

Bone is a complex tissue which comprises of both organic and inorganic substances. There are numerous factors known to effect the tissue like hormones, growth factors, cytokins, trace elements, etc. and over 100 diseases and syndroms had been identified related with the the tissue. These pathological states which require complex and unique treatments, have the potential to stimulate severe adverse effects in innovative cellular therapy approaches. In the study, production of osteoprotegerin (OPG), a very important protein for bone metabolism, is promoted in osteoblast cell line hfOB cells under the influence of TGF- β 3 and 17 β -estradiol and the condition mediums (CM) were collected as OPG rich CM. Amniotic fluid derived stem cells (AFSCs) were differentiated into osteogenic lineage using OPG rich CM, TGF- β 3, 17 β -estradiol and standart hfOB CM. The cells were analysed with real-time PCR after 14 and 21 day differentiations for gene expressions of osteogenic markers SPP1, RUNX2, COL1 and DCN. Furthermore, Alizarin Red S quantification were performed on differentiated cells to determine their calcium deposition levels. The data suggested that, 17 β -estradiol hastens the osteogenic differentiation progress and helps cells to reach late osteogenesis rather quickly while also augmenting the mineralisation of cells. In other respects, TGF- β 3 and OPG assists cells to stay in early osteoblastogenesis stage for a longer period and keeps mineralisation in low levels. In circumstances that enhanced bone formation and greater mineralisation is intended, 17 β -estradiol offers promising results while TGF- β 3 and OPG seems to be more prefferable in situations which extensive mineralisation is undesirable and use of early osteoblastogenic cells would be beneficiary. Data from the study should be further expanded with other early and late osteogenic markers and it also should be determined how long the cells remain in which stage of osteogenesis by setting different time intervals. Finally, the results of those studies should be tested with *in vivo* studies.

Keywords: 17 β -estradiol, Amniotic fluid stem cells, Conditioned medium, Osteogenic differentiation, Osteoprotegerin, TGF- β 3.

ÖNSÖZ

Yapılan tez çalışmasında amniyotik sıvı kaynaklı kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasında farklı kondisyonlara sahip bireyler için farklı durumlarda kullanılabilen osteojenik farklılaştırma metotlarının oluşturulmasına katkıda bulunmak amaçlandı.

Bu süreçte tez çalışmam ve doktora eğitimim boyunca bana yol gösteren, tecrübelerini aktaran ve her zaman desteklerini sunan, başta danışman hocam Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ olmak üzere, Prof. Dr. Artay YAĞCI ve Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖZDEN AKKAYA'ya; ikinci tez danışmanım Prof. Dr. Metin ERDOĞAN'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitimimin ders döneminde bilgilerinden faydalandığım ortak doktora programı hocalarım Prof. Dr. Jale ÖNER, Prof. Dr. Hakan ÖNER ve Doç. Dr. Duygu MUTLUAY'a; tez çalışmam sürecinde bana sağladıkları yardımlardan dolayı Prof. Dr. Gülcan AVCI ve Doç. Dr. İlkay DOĞAN'a, desteklerini her zaman hissettiğim hocalarım Prof. Dr. Vural ÖZDEMİR, Prof. Dr. Aziz BÜLBÜL, Dr. Öğr. Üyesi M. Volkan YAPRAKCI ve Dr. Öğr. Üyesi Özay GÜLEŞ'e teşekkür ederim.

Uzun saatler boyunca yorulmak bilmeden çalıştığımız laboratuvar arkadaşım, yakın dostum ve kardeşim Dr. Shah NAWAZ'a; kendisinden çok şey öğrendiğim laboratuvarımızın eski öğrencilerinden Prof. Dr. ASM Golam KİBRİA'ya; çalışmada arkadaşlığı yaptığımız fakültemiz doktora öğrencileri Elif Ece AKGÜN ve Eda KARABÖCEK'e en içten teşekkürlerimi iletmek isterim.

Projemize maddi destek sağlayan Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine de teşekkür ederim.

Son olarak bana moral veren, beni gülümseten ve içimi ısıtan tüm arkadaşlarıma, sevdiklerime; en çok da koşulsuz destekleri ve fedakarlıklarıyla kardeşim Ege ve annem Filiz'e sonsuz teşekkürler.

Tayfun Dikmen

Afyonkarahisar

2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
SUMMARY.....	II
ÖNSÖZ SAYFASI.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
ŞEKİLLER.....	XI
TABLolar.....	XVI
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kemik Doku ve Hücreleri.....	2
1.1.1. hFOB 1.19 Hücre Hattı.....	4
1.2. Kemik Doku Homeostazisi.....	5
1.2.1. RANK/RANKL/OPG.....	6
1.2.2. Osteoprotegerin.....	8
1.3. Kök Hücre.....	10
1.3.1. Amniyotik Sıvı Kaynaklı Kök Hücreler.....	14
1.3.2. Kök Hücrelerin Parakrin Etkileri.....	16
1.3.2.1. Koşullandırılmış Medyum.....	18
1.3.3. Kök Hücrelerde Osteojenik Farklılaştırma.....	20
1.3.3.1. TGF- β 3.....	22
1.3.3.2. 17 β -Estradiol.....	23

1.4. Problemin İfadesi.....	24
1.5. Hipotez, Amaç ve Hedefler.....	26
2. MATERYAL ve METOT.....	29
2.1. Etik Kurul Onayı.....	29
2.2. Cihazlar ve Kimyasallar.....	29
2.3. Hayvanların Gebe Bırakılması.....	32
2.4. ASKKH'lerin İzolasyonu.....	33
2.5. Hücre Kültürü.....	35
2.6. Büyüme Eğrisi Analizi.....	35
2.7. Çoklu Farklılaştırma Çalışmaları.....	36
2.7.1. Osteojenik Farklılaştırma ve Doğrulanması.....	36
2.7.1.1. Osteojenik Farklılaştırma.....	36
2.7.1.2. Alizarin Red S Boyaması.....	37
2.7.2. Adipojenik Farklılaştırma ve Doğrulanması.....	37
2.7.2.1. Adipojenik Farklılaştırma.....	37
2.7.2.2. Oil Red O Boyaması.....	38
2.7.3. Kondrojenik Farklılaştırma ve Doğrulanması.....	38
2.7.3.1. Kondrojenik Farklılaştırma.....	38
2.7.3.2. Alsiyan Mavisi Boyaması.....	39
2.8. hfOB 1.19 Hücre Kültürü.....	39

2.9. hfOB Hücrelerinden Koşullandırılmış Medyum Eldesi.....	39
2.10. Sandviç ELISA.....	40
2.11. Osteojenik Farklılaştırma Deney Çalışmaları.....	43
2.12. Alizarin Red S Boyamasının Sayısal Değerlendirmesi.....	45
2.13. Real-Time PCR.....	46
2.13.1. RNA İzolasyonu İçin Örneklerin Hazırlanması.....	48
2.13.2. RNA İzolasyonu.....	48
2.13.3. DNA Kontaminasyonu ve Kimyasal Kirliliğin Kontrolü.....	50
2.13.4. RNA Miktar Tayini.....	50
2.13.5. Komplement DNA Sentezi.....	51
2.13.6. Real-Time PCR Analizi.....	51
2.14. İmmunfloresan Boyama.....	53
2.15. İstatistiksel Analizler.....	55
3. BULGULAR.....	57
3.1. ASKKH'lerin Karakterizasyonu.....	57
3.1.1. Hücre Morfolojisi.....	57
3.1.2. Büyüme Eğrisi Analizi.....	61
3.1.3. Çoklu Farklılaştırma Çalışmaları.....	62
3.1.3.1. Osteojenik Farklılaştırma.....	62
3.1.3.2. Adipojenik Farklılaştırma.....	63

3.1.3.3. Kondrojenik Farklılaştırma.....	64
3.1.4. Real-Time PCR.....	65
3.1.5. İmmunfloresan Boyama.....	69
3.2. Sandviç ELISA.....	70
3.3. Osteojenik Farklılaştırma Deney Çalışmaları.....	73
3.3.1. Alizarin Red S Boyaması.....	73
3.3.2. İmmunfloresan Boyama.....	78
3.3.3. Alizarin Red S Boyamasının Sayısal Değerlendirmesi.....	86
3.3.5. Real-Time PCR Analizi.....	89
4. TARTIŞMA.....	103
4.1. ASKKH'lerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....	103
4.1.1. Hücre Morfolojisi.....	103
4.1.2. Büyüme Eğrisi.....	104
4.1.3. Çoklu Farklılaştırma Çalışmaları.....	105
4.1.4. Real-Time PCR ve İmmunfloresan Boyama.....	105
4.2. Sandviç ELISA.....	109
4.3. Osteojenik Farklılaştırma Deney Çalışmaları.....	110
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	121
6. KAYNAKLAR.....	123
7. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.....	139

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

(%)	Yüzde
(-)	Eksi
(/)	Bölü
(+)	Artı
(±)	Artı-eksi
(x)	Çarpı
Δ	Delta
μ	Mikron
μg	Mikro gram
μL	Mikro litre
μM	Mikro molar
AIM	Adipojenik indüksiyon medyumu
ALCAM	Aktive lökosit adhezyon molekülü
α	Alfa
α-MEM	Alfa minimum esansiyel medyum
ALP	Alkalın fosfataz
AMM	Adipojenik idame medyumu
ANOVA	Varyans analizi
ASKKH	Amniyotik sıvı kaynaklı kök hücreler
β	Beta
BMP	Kemik morfojenik protein
BSA	Sığır seum albumini
°C	Santigrat derece
C3	Tamamlayıcı Bileşen 3
Ca	Kalsiyum
Cbfa	Çekirdek bağlayıcı faktör
CD	Farklılaşma yığılım molekülü
cDNA	Komplement deoksiribo nükleik asit
cm ²	Santimetrekare
c-myc	Avian myelostomatozis virüs onkojen homologu
CO ₂	Karbon dioksit
COL	Kollajen
Ct	Döngü eşiği
DAPI	4, 6-diamino-2-fenilindol, dihidroklorit
DCN	Dekorin
DEPC	Dietil pirokarbonat
dk	Dakika
DMEM-HG	Yüksek glukoz-Dulbecco'nun modifiye minimum esansiyel medyumu

DMEM-LG	Düşük glukoz-Dulbecco'nun modifiye minimum esansiyel medyumunu
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ECM	Ekstra selüler matriks
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ELISA	Enzime bağlı bağışıklık testi
ER	Östrojen reseptör
ERK	Ekstraselüler reseptör kinaz
FBS	Fötal sığır serumu
Fc	Kristalize edilebilir kısım
FGF	fibroblast büyüme faktörü
FRZ	Frizzled
g	Çelim sabiti
HBSS	Hank'in dengeli tuz solüsyonu
HEGF	Heparan bağlayıcı epidermal büyüme faktörü
IBMX	İzobütül 4 hidroksibenzoat
ICAM	İntraselüler adhezyon molekülü
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
IL	İnterleukin
kDa	Kilo dalton
KGF	Keratinosit büyüme faktörü
KM	Koşullandırılmış medyum
LRP	Lipoprotein reseptör ilişkili protein
Mg	Magnezyum
MgCl₂	Magnezyum klorit
MITF	Mikroftalmi ilişkili transkripsiyon faktör
miRNA	Mikro ribonükleik asit
μM	Mikro molar
μ	Mikron
μg	Mikro gram
μL	Mikro litre
MKK6	Mutajen aktive edilmiş protein kinaz kinaz
mL	Mililitre
mM	Mili molar
N	Normal
NaOH	Sodyum hidroksit
NCID	Notch hücre içi domaini
NFATC1	Aktive T hücresi nükleer faktörü 1
bFGF	basic fibroblast büyüme faktörü
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
Ng	Nanogram
NGF	Nöral büyüme faktörü

nM	Nano molar
Nm	Nano metre
OCN	Osteokalsin
OCT	Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü
OD	Optik yoğunluk
OPG	Osteoprotegerin
OSX	Osteriks
p	Anlamlılık değeri
P	Pasaj
PBS	Tamponlu fosfat solüsyonu
PBST	PBS Tween-20
PCR	Polimer zincir reaksiyonu
PDGF	Platelet kökenli büyüme faktörü
PFA	Paraformaldehit
Pg	Piko gram
pH	Hidrojen gücü
PIGF	Plasenta büyüme faktörü
pmol	Piko molar
RANK	reseptör aktivatör nükleer kappa
RANKL	Reseptör aktivatör nükleer kappa B ligand
RNA	Ribo nükleik asit
rpm	Dönüş/dakika
RUNX2	Runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 2
SH	Standart hata
Smad	Small mohers against decapentaplegic
SOX2	Sry-box transkripsiyon faktörü 1
SPP1	Salgılanmış fosfoprotein 1
SSEA	Safha spesifik embriyonik antijen
SV40	simian virüsü 40
TGFBR	TGF beta reseptörü
TGF-β3	Transforme edici büyüme faktörü-β
Tm	Sıcaklık değeri
TNF	Tümör nekroz faktörü
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü
TRAF	Tümör nekroz faktör reseptörü ilişkili faktör
TRAIL	Tümör nekroz faktör-ilişkili apoptoz indükleyici ligand
TRAP	Tartrat-rezistant asit fosfataz
U	Ünite
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
Wnt	kanatsız/entegre

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1.1.	Kemik rezorpsiyonu ve yeni kemik yapımı.....	3
Şekil 1.2.	RANK/RANKL/OPG ve osteoklastogenezis.....	8
Şekil 1.3.	Kök hücrelerin sınıflandırılması.....	11
Şekil 2.1.	Amniyon sıvısının toplanması.....	34
Şekil 2.2.	Sandviç ELISA.....	43
Şekil 2.3.	Alizarin Red S boyamasının sayısal olarak değerlendirilmesi.....	46
Şekil 2.4.	DNA kontaminasyonu ve kimyasal kirliliğin kontrolü.....	50
Şekil 2.5.	EZSlides plakalara ekilen hücreler.....	54
Şekil 3.1.	P0'da fibroblast benzeri hücreler.....	58
Şekil 3.2.	P0'da stromal hücreler.....	58
Şekil 3.3.	P0'da epitel benzeri morfolojiye sahip hücreler.....	59
Şekil 3.5.	P0'da çarşaf benzeri senesent hücreler.....	60
Şekil 3.6.	ASKKH'lerin farklı pasajlardaki morfolojileri.....	61
Şekil 3.7.	ASKKH'lerde büyüme eğrisi grafiği.....	62
Şekil 3.8.	ASKKH'lerde osteojenik farklılaşmanın Alizarin Red S boyaması ile gösterilmesi.....	63
Şekil 3.9.	ASKKH'lerde adipojenik farklılaşmanın Oil Red O boyaması ile Gösterilmesi.....	64

Şekil 3.10.	ASKKH'lerde kondrojenik farklılaşmanın Alsiyan Mavisi boyaması ile gösterilmesi.....	65
Şekil 3.11.	P1, P3 ve P5'teki hücrelerde mezenkimal kök hücre belirteçlerinin Real-time PCR analizi.....	67
Şekil 3.12.	P1, P3 ve P5'te pluripotent kök hücre belirteçlerinin real-time PCR analizi.....	68
Şekil 3.13.	P1, P3 ve P5'te hematopoietik belirteçlerin real-time PCR analizi.....	69
Şekil 3.14.	ASKKH'lerde OCT ^{3/4} protein ifadesi.....	70
Şekil 3.15.	ASKKH'lerde SOX2 protein ifadesi.....	70
Şekil 3.16.	Dördüncü derece polinomial fit standart eğrisi.....	71
Şekil 3.17.	OPG ELISA ölçümü sonuçları.....	72
Şekil 3.18.	Pozitif kontrol grubunda 14 ve 21. günlerde Alizarin Red S boyaması.....	74
Şekil 3.19.	17β-estradiol grubunda 14 ve 21. günlerde Alizarin Red S boyaması.....	74
Şekil 3.20.	TGF-β3 grubunda 14 ve 21. günlerde Alizarin Red S boyaması.....	75
Şekil 3.21.	TGF-β3+17β-estradiol grubunda 14 ve 21. günlerde Alizarin Red S Boyaması.....	75
Şekil 3.22.	hfN grubunda 14 ve 21. günlerde Alizarin Red S boyaması.....	76
Şekil 3.23.	hfO grubunda 14 ve 21. günlerde Alizarin Red S boyaması.....	76
Şekil 3.24.	OPN grubunda 14 ve 21. günlerde Alizarin Red S boyaması.....	77
Şekil 3.25.	OPO grubunda 14 ve 21. günlerde Alizarin Red S boyaması.....	77

Şekil 3.26.	Pozitif kontrol grubunda 14 ve 21. günlerde immunloresan boyama ile gösterilen COL1 ifadesi.....	78
Şekil 3.27.	Pozitif kontrol grubunda 14 ve 21. günlerde immunloresan boyama ile gösterilen osteopontin ifadesi.....	79
Şekil 3.28.	17 β -estradiol grubunda 14 ve 21. günlerde immunloresan boyama ile gösterilen COL1 ifadesi.....	79
Şekil 3.29.	17 β -estradiol 14 ve 21. günlerde immunloresan boyama ile gösterilen osteopontin ifadesi.....	80
Şekil 3.30.	TGF- β 3 grubunda 14 ve 21. günlerde immunloresan boyama ile gösterilen COL1 ifadesi.....	80
Şekil 3.31.	TGF- β 3 grubunda 14 ve 21. günlerde immunloresan boyama ile gösterilen osteopontin ifadesi.....	81
Şekil 3.32.	TGF- β 3 + 17 β -estradiol grubunda 14 ve 21. günlerde immunloresan boyama ile gösterilen COL1 ifadesi.....	81
Şekil 3.33.	TGF- β 3 + 17 β -estradiol grubunda 14 ve 21. günlerde immunloresan boyama ile gösterilen osteopontin ifadesi.....	82
Şekil 3.34.	hfN grubunda 14 ve 21. günlerde immunloresan boyama ile gösterilen COL1 ifadesi.....	82
Şekil 3.35.	hfN grubunda 14 ve 21. günlerde immunloresan boyama ile gösterilen osteopontin ifadesi.....	83

Şekil 3.36.	hfO grubunda 14 ve 21. günlerde immunloresan boyama ile gösterilen COL1 ifadesi.....	83
Şekil 3.37.	hfO grubunda 14 ve 21. günlerde immunloresan boyama ile gösterilen osteopontin ifadesi.....	84
Şekil 3.38.	OPN grubunda 14 ve 21. günlerde immunloresan boyama ile gösterilen COL1 ifadesi.....	84
Şekil 3.39.	OPN grubunda 14 ve 21. günlerde immunloresan boyama ile gösterilen osteopontin ifadesi.....	85
Şekil 3.40.	OPO grubunda 14 ve 21. günlerde immunloresan boyama ile gösterilen COL1 ifadesi.....	85
Şekil 3.41.	OPO grubunda 14 ve 21. günlerde immunloresan boyama ile gösterilen osteopontin ifadesi.....	86
Şekil 3.42.	Alizarin Red S boyamasının sayısal değerlendirmesinden elde edilen Kalsiyum birikimi miktarları (14. gün).....	87
Şekil 3.43.	Alizarin Red S boyamasının sayısal değerlendirmesinden elde edilen Kalsiyum birikimi miktarları (21. Gün).....	88
Şekil 3.44.	Osteojenik farklılaştırma deney gruplarında iki zaman aralığında GAPDH, SPP1, RUNX2, COL1 ve DCN belirteçlerinin gen düzeyinde ifadelerinin agaroz jel üzerinde gösterimi.....	89
Şekil 3.45.	On dördüncü günde osteojenik belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişiminin karşılaştırması.....	91

Şekil 3.46.	Yirmi birinci gün örneklerinde osteojenik belirteçlerin karşılaştırması.....	92
Şekil 3.47.	Pozitif kontrol grubunda osteojenik belirteçlerin ifadesinde belirlenen zaman aralıklarında farkı.....	93
Şekil 3.48.	TGF- β 3 grubunda osteojenik belirteçlerin ifadesindeki kat değişiminin belirlenen zaman aralıklarında farkı.....	94
Şekil 3.49.	17 β -estradiol grubunda osteojenik belirteçlerin ifadesindeki kat değişimlerinin belirlenen zaman aralıklarında farkı.....	95
Şekil 3.50.	TGF- β 3 + 17 β -estradiol grubunda osteojenik belirteçlerin ifadesinde belirlenen zaman aralıklarında farkı.....	96
Şekil 3.51.	hfN grubunda osteojenik belirteçlerin ifadesinde belirlenen zaman aralıklarında farkı.....	97
Şekil 3.52.	hfO grubunda osteojenik belirteçlerin ifadesinde belirlenen zaman aralıklarında farkı.....	98
Şekil 3.53.	OPN grubunda osteojenik belirteçlerin ifadesinde belirlenen zaman aralıklarında farkı.....	99
Şekil 3.54.	OPO grubunda osteojenik belirteçlerin ifadesinde belirlenen zaman aralıklarında farkı.....	101

TABLolar

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Kullanılan cihazlar.....	29
Tablo 2.2. Kullanılan sarf malzeme ve kimyasallar.....	30
Tablo 2.3. ASKKH'lerin karakterizasyonunda ve osteojenik farklılaştırma çalışmalarının değerlendirilmesinde kullanılan primerler ve özellikleri.....	47
Tablo 2.4. Real-time PCR analizi aşamaları.....	52
Tablo 2.5. İmmunfloresan boyama çalışmalarında kullanılan antikorlar.....	53
Tablo 3.1. ASKKH'lerde P1, P3 ve P5'te real-time PCR ile hücrelerde gen ifadelerinin analizi.....	65
Tablo 3.2. Sandviç ELISA ile elde edilen OPG ölçümleri.....	72
Tablo 3.3. Alizarin Red S boyamasının değerlendirmesi sonucu elde edilen değerler.....	87
Tablo 3.4. Osteojenik farklılaşmanın 14. gününde gen ifadesindeki kat değişimleri.....	90
Tablo 3.5. Osteojenik farklılaşmanın 21. gününde gen ifadesindeki kat değişimleri.....	90
Tablo 3.6. Pozitif kontrol grubunda osteojenik belirteçlerin iki zaman aralığında karşılaştırılması.....	94
Tablo 3.7. TGF-β3 grubunda osteojenik belirteçlerin iki zaman aralığında karşılaştırılması.....	95
Tablo 3.8. 17β-estradiol grubunda osteojenik belirteçlerin iki zaman aralığında karşılaştırılması.....	96

Tablo 3.9.	TGF- β 3 + 17- β estradiol grubunda osteojenik belirteçlerin iki zaman aralığında karşılaştırılması.....	97
Tablo 3.10.	hfN grubunda osteojenik belirteçlerin iki zaman aralığında karşılaştırılması.....	98
Tablo 3.11.	hfO grubunda osteojenik belirteçlerin iki zaman aralığında karşılaştırılması....	99
Tablo 3.12.	OPN grubunda osteojenik belirteçlerin iki zaman aralığında karşılaştırılması..	100
Tablo 3.13.	OPO grubunda osteojenik belirteçlerin iki zaman aralığında karşılaştırılması..	101

1. GİRİŞ

1.1. Kemik Doku ve Hücreleri

Kemik doku, bilinen en eski omurgalılarından beri var olan buna rağmen temel yapı ve organizasyon bakımından milyonlarca yıllık bu süreçte çok az değişiklik göstermiş bir destek dokusudur (Hall 1991). Kemik doku hem organik hem de inorganik maddelerden oluşan, bu nedenle de hormonlardan minerallere; büyüme faktörlerinden maruz kaldığı basınca kadar birçok etmenden etkilenen oldukça kompleks bir yapıya sahiptir (Courteix vd. 1998, Rodan 1998).

Embriyonik olarak mezodermden köken alan kemik doku, iki yolla meydana gelir. İntramembranöz ve endokondral ossifikasyon adı verilen bu süreçlerin her ikisi de mezenkimal prekürsörlerle başlasa da kemikleşme şekilleri farklılık gösterir. Basitçe açıklamak gerekirse yassı kemikler, kafatası, klavikula gibi kemiklerin oluşturulduğu intramembranöz ossifikasyonda mezenkimal doku doğrudan kemik dokuya farklılaşırken aksiyal iskeletin bir bölümünün ve uzun kemiklerin oluşturulduğu endokondral ossifikasyonda ise mezenkimal doku önce kıkırdığa farklılaşır. Bu kıkırdak dokuda zamanla hipertrofiye olan kondrositlerce salgılanan büyüme faktörlerinin etkisiyle damarlaşma meydana gelir ve matriks mineralize olarak ossifikasyona uğrar (İnt. Kyn. 1; Kierszenbaum, 2006).

Kemik doku 4 ana hücreden meydana gelir. Bunlar osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır. Osteoprogenitör hücreler fibroblast benzeri morfolojiye sahip, osteoblastlara farklılaşma yönünde koşullanmış öncü hücrelerdir. Periosteum, endosteum ve havers kanallarında hazır durumda bulunan bu hücreler gerekli durumlarda uyarılarak farklılaşmaları tetiklenir ve osteoblastlara dönüşerek yeni kemik oluşumuna katılırlar (Topaloğlu vd., 2017). Osteoblastlar kemik iliğinde bulunan mezenkimal hücrelerden farklılaşan, osteopontin, osteokalsin

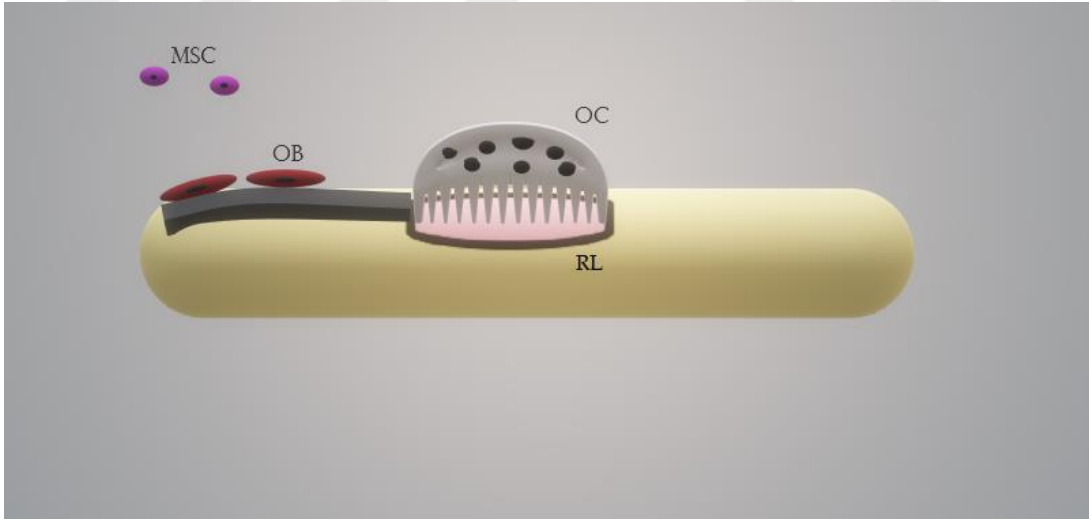
(OCN), osteoprotegerin (OPG) gibi kemik doku için hayati öneme sahip proteinlerin üretimi ve yeni kemik yapımından sorumlu hücre tipidir (Katagiri ve Takahashi 2002). Yüksek oranda polarize hücreler olan osteoblastlar kemik oluşumu bölgelerinde bir dizi şeklinde dağılım gösterirler ve osteoidleri oluşturup, bu osteoidlerin mineralizasyonunu sağlarlar (Kierszenbaum, 2006).

Osteoblastlar zamanla ürettikleri matriks içerisine gömülürler ve burada olgunlaşarak osteositleri meydana getirirler. Mineralize matriks içerisindeki lakünlerde bulunan bu hücreler, uzun sitoplazmik uzantılara sahiptir. Osteositler bu uzantılar ile kanalikuli osseiler boyunca ilerler ve komşu lakündeki diğer osteositlerle oluklu bağlantılar kurarlar. Bu hücreler kemiğin yeniden modellenmesinde doğrudan bir rol almaya da önemli bir fonksiyona sahiptir. Osteositler, osteoblastların terminal farklılaşma safhasındaki hücreler olarak bir noktada yeni kemik oluşumunun son safhasındaki hücrelerdir. Bu hücreler buldukları bölgede lokal olarak osteoblast farklılaşmasını inhibe eder ve osteoklast formasyonunu indükleyerek kemik yıkımını hızlandırmak suretiyle kemik yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin korunmasına hizmet eder (Han vd. 2018, Loissele vd. 2013). Osteositler ile ilgili yapılan son çalışmalar bu hücrelerin kemik metabolizmasında önemli role sahip olan reseptör aktivatör nükleer kapp B ligand (RANKL) proteini sentezlediğini ve dolayısıyla da osteoklastogenezisi indüklediğini göstermiştir (Nakashima vd. 2011, Xiong vd. 2015). Osteositler aynı zamanda kemik morfojenik protein (BMP) antagonisti olan sklerostin proteinini sentezleyerek osteoblastogenezisi inhibe eder ve kemik yenilenmesini düzenler (ten Dijke vd. 2008).

Kemik dokunun üçüncü ve son ana hücresi ise kemik yıkımlanmasından sorumlu osteoklastlardır. Osteoklastlar trabeküler yüzeylerde ve kompakt kemiklerin iç yüzeyinde bulunan, kemik matriksini rezorbe etmekle görevli, çok çekirdekli, fagositik hücrelerdir. Osteoklastlar kemik iliğinde bulunan monosit-makrofaj ailesine bağlı progenitörlerden farklılaşırlar (Udagawa et al. 1990). Osteoklastlar yüksek düzeyde tartrat-rezistant asit fosfataz (TRAP) ifade etmeleriyle karakterize hücrelerdir. Monosit-makrofaj ailesinden progenitörlerden farklılaşmalarına rağmen

başta kristalize edilebilir kısım (Fc) ve tamamlayıcı bileşen 3 (C3) reseptörleri olmak üzere birçok makrofaj spesifik antijeni içermezler (Chambers 2000). Osteoklastlar salgıladıkları asit ve katepsin K gibi proteolitik enzimler ile kemik dokudaki organik ve inorganik bileşikleri hidrolize eder. Osteoklastlar tarafından üretilen eroziv ürünler, osteoklastın apikal yüzeyindeki pedozomları ile sıkıca çevreleyip kemik üzerindeki diğer bölgelerden ayırdığı “rezorpsiyon lakünü” adı verilen bölgeye salgılanır (Charles ve Aliprantis 2014).

Osteoklastik aktivitenin ardından kemik doku yıkımlanır ve sonrasında çeşitli mekanizmalarla rezorpsiyon lakününün olduğu bölgeye mezenkimal kök hücrelerin göçü ve göç eden kök hücrelerin osteoblastik farklılaşması indüklenir. Bu hücreler osteoblastlara farklılaştığında yüzeyde tekrar osteoidleri oluşturur ve zamanla bölgeyi tekrar mineralize eder (Şekil 1.1) (Charles ve Aliprantis 2014).



Şekil 1.1. Kemik rezorpsiyonu ve yeni kemik yapımı. Osteoklastlar (OC) kemik yüzeyine apikal yüzeylerindeki pedozomları ile tutunur. Bu pedosomlar ile çevrelediği kemik yüzeyini sıkıca kapatır ve rezorpsiyon lakünü (RL) adı verilen bu bölgeye salgılarını aktararak kemiği yıkımlar. Çeşitli mekanizmalarla, yıkımlanan yüzeye mezenkimal kök hücrelerin (MSC) göçü ve bu hücrelerin osteoblastlara (OB) farklılaşması sağlanır. Osteoblastlar bir dizi halinde bölgeye lokalize olup osteoidleri oluşturur ve mineralize eder.

1.1.1. hFOB 1.19 Hücre Hattı

Human fetal osteoblastic (hFOB) 1.19 (ATCC CRL-11372), simian virüsü 40 (SV40) büyük T antijeninin sıcaklığa duyarlı bir mutantını (tsA58) kodlayan bir genin transfeksiyonu ile koşullu olarak ölümsüzleştirilen insan fetal osteoblastik hücre hattıdır. Hücre hattı, bir abort vakasını takiben elde edilen dişi bir fetusa ait ekstremitelerden izole edilen hücrelerden elde edilmiştir (İnt. Kyn. 2).

hFOB 1.19 hücreleri preosteoblastik hücreler olup, hücre kültürünün erken safhalarında CD13, CD29, CD73, CD90, CD 105 gibi bazı mezenkimal kök hücre belirteçlerinin yanı sıra pluripotent kök hücre belirteci OCT-4 bakımından da pozitiflik gösteren potent hücrelerdir. Ayrıca herhangi bir indüksiyon olmaksızın sadece kültür ortamının sıcaklığının 39,5 °C'ye getirilmesi ile bu hücreler olgunlaşmakta ve hücrelerin osteojenik belirteçlerinin ifadesinde artış görülmektedir. Bu özellikleri ile hFOB 1.19 hücreleri osteojenik farklılaştırma çalışmaları için oldukça uygun bir hücre hattıdır (Yen vd. 2007). Hücrelerin östrojen reseptör (ER) α 'nın hem 46 hem de 77 kDa'lık izoformlarını ifade ettiği bilinmektedir (Foo vd. 2007). Ayrıca kısa süreli bir osteojenik farklılaştırma süreci sonunda hFOB hücrelerinin ER α , ER β ve ER benzeri reseptör γ genlerini ifade ettiği gösterilmiştir (Thent vd. 2020).

Bu özellikleri vasıtasıyla hFOB hücreleri çeşitli kimyasal ajanların kemik metabolizmasına etkisinin incelenmesinde (Aditama vd. 2021, Sun vd. 2021), osteojenik farklılaştırma çalışmalarında (Kazimierczak vd. 2021, Pal vd. 2020) ve hatta *in vivo* kemik yenilenmesi ile ilgili çalışmalarda (Sarkar ve Bose 2020) sıklıkla tercih edilen bir hücre hattıdır.

1.2. Kemik Doku Homeostazisi

Kemik doku, osteoblastlar ve osteoklastların karşılıklı aktiviteleri ve osteositlerin düzenleyici rolü ile normal fizyolojik durumda sürekli bir yenilenme sürecindedir. Özellikle kalsiyum metabolizmasının da önemli bir faktör olduğu kemik dokuda homeostazis, temel olarak osteoblastlar ve osteoklastların “Ying-Yang”ı andıran ilişkileri ile sağlansa da dengeye etki eden birçok unsur bulunmaktadır. Kemik gelişimi tamamlanıp iskelet nihai büyüklüğüne ulaştıktan sonra kemik yapımı ve yıkımı arasında güçlü bir denge söz konusudur (Rodan 1998).

Osteoblastlar tarafından kemik dokunun kütlesinin belirlenmesi 3 ana sinyal yolağı vasıtasıyla gerçekleşir. Bunlar reseptör aktivatör nükleer kappa B (RANK)/RANKL/OPG, kanatsız/entegre (Wnt)/ β -catenin ve Jagged1/Notch1 yolaklarıdır. Osteoklastlar için ise tanımlanmış, dördü osteoklastogenezis ile, üçü de osteoklast aktivasyonu ile ilişkili olmak üzere en az 7 sinyal yolağı söz konusudur. Bunlar osteoklastogenezis ile ilişkili olarak (1) Nükleer faktör kappa B (NF-kB) kinaz/NF-kB, (2) c-jun-amino terminal kinaz/aktivatör protein 1, (3) avian myelostomatozis virüs onkojen homologu (c-myc) ve (4) kalsineurin/ Aktive T hücresi nükeer faktörü (NFATC1); osteoklast aktivasyonu ile ilişkili olarak da (5) Rous Sarkoma Onkojen (Src), (6) Mutajen aktive edilmiş protein kinaz kinaz (MKK6) (MAPK6)/p38/mikroftalmi ilişkili trasnkripsiyon faktör (MITF) ile (7) Src ve ekstraselüler sinyal-regüle kinaz yolaklarıdır (Silva ve Branco 2011).

Kemik yapımı ve yıkımına etkiyen faktörler arasında kemik doku hücrelerinin ürettiği ürünlerden dokunun maruz kaldığı basınca varana dek birçok tanımlanmış etmen bulunmaktadır. Parathormon (Poole ve Reeve 2005), kalsitonin (Davey vd. 2008), büyüme hormonu (Isaksson vd. 1982), androjenler (Wiren vd. 2006), östrojen (Hong vd. 2006), glukokortikoidler (Weinstein vd. 1998) gibi hormonlar; transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) (Balooch et al. 2005), fibroblast büyüme faktörü (FGF) (Takei vd 2015), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) (Yao vd. 2004)

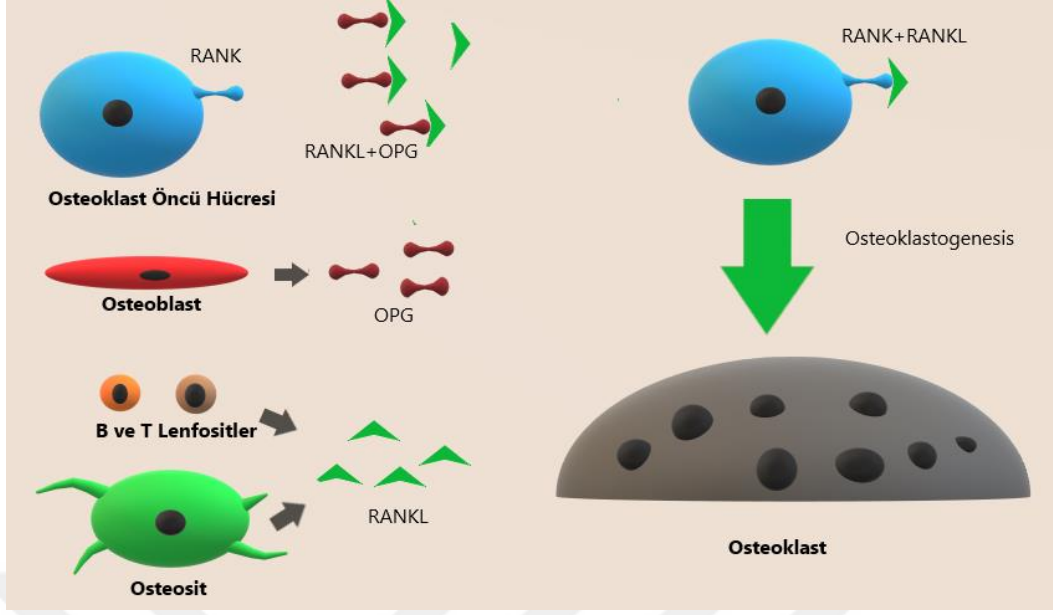
gibi büyüme faktörleri; kalsiyum, sodyum (Teucher vd. 2008), demir (Medeiros vd. 2004), fosfor (Feinblatt vd. 1970), magnezyum (Liu vd. 2017) başta olmak üzere birçok iz element ve bunların yanı sıra kemiğin maruz kaldığı mekanik yük (You vd. 2008) gibi onlarca faktör bu kompleks dokunun homeostazisinde söz sahibidir.

Ancak bu etmenlerin neredeyse tamamı etkilerini kemik doku hücreleri üzerinden gerçekleştirir. Osteositlerin görece daha dolaylı bir rol aldığı bu sistemde ana etkiler genelde osteoblastik veya osteoklastik aktivite üzerinedir. Özellikle RANK, RANKL ve OPG sistemi ve bu sistem dahilinde RANKL/OPG oranı, kemik yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin korunmasında kilit faktör olarak görülmektedir (Kurban ve Mehmetoğlu 2007, Wright vd. 2009).

1.2.1. RANK/RANKL/OPG

Osteoblastlar ve osteoklastlar arasındaki aktivite dengesi RANKL/OPG dengesine bağlıdır. RANK, osteoklast öncü hücreleri üzerinde bulunan bir reseptördür. Bu reseptöre, tümör nekroz faktörü (TNF) ailesinden bir protein olan RANKL bağlandığında osteoklast öncü hücreleri aktifleşir ve hücreler olgunlaşarak osteoklastlara farklılaşır (Lam vd. 2001). RANKL, osteositler de dahil olmak üzere birkaç farklı hücre tarafından sentezlenebilse de üretilen RANKL'ın büyük bir kısmı B ve T lenfositler tarafından sentezlenir (Kawai vd. 2006, Nakashima vd. 2011, Xiong vd. 2015). OPG ise osteoblastlar tarafından sentezlenen, çözünebilir bir tuzak reseptör proteinidir. OPG, RANKL ile bağlanarak RANKL'ın RANK'a bağlanmasını engellemek suretiyle osteoklastların olgunlaşma yönünde uyarılmasının önüne geçer (Simonet vd. 1997, Tong vd. 2019).

RANKL, RANKL 1, 2 ve 3 olmak üzere üç izoforma sahiptir. Bunlardan tip 2 osteoklastogenezisi düzenleyici etkiye sahiptir. Bu izoform hem çözünebilir hem de membranöz formda bulunsa da osteoklastogenezisi uyarma kapasitesi çözünebilir formda daha düşüktür (Nakashima vd. 2000). RANKL'nin OPG'ye yakalanmadan osteoklastların yüzeyinde bulunan RANK'a bağlanmasıyla tümör nekrozis faktör reseptörü ilişkili faktör (TRAF) 2, 5 ve 6 açığa çıkar ve osteoklastogenik süreç başlar (Şekil 1.2). Bunlardan özellikle TRAF 6 osteoklastlar için hayati önem taşır. TRAF'ların etkisiyle NF-kB'nin aktivasyonu ve çekirdek translokasyonu gerçekleşir. NF-kB, c-Fos'un ifadesinin artmasını sağlar ve ifadesi artan c-Fos, aktive T hücresi nükleer faktörü 1'i (NFATC1) tetikleyerek osteoklastojenik genlerin transkripsiyonunu sağlar. Farelerde yapılan çalışmalar NFATC1'in osteoklastogenezisin esas düzenleyicisi olduğunu göstermiştir. Ancak, kemik dokudaki muhtemelen denge politikasının bir başka örneği olarak NFATC1 sadece osteoklastogenezis ile ilişkili değildir. Protein, aynı zamanda osteoblastların normal fonksiyon gösterebilmesi için elzem olan osteriks (OSX) için de önemli bir pozitif düzenleyicidir (Boyce ve Xing 2008, Boyce ve Xing 2007, Silva ve Branco 2011).



Şekil 1.2. RANK/RANKL/OPG ve osteoklastogenezis. Osteoklast öncü hücreleri üzerinde bulunan RANK, osteoblastlar tarafından üretilen tuzak reseptör proteinleri olan OPG'ye yakalanmadan RANKL ile kompleks oluşturduğunda osteoklast aktivasyonu gerçekleşir ve öncü hücreler olgun osteoklastlara farklılaşır.

Normal fizyolojik durumda RANKL/OPG oranı denge içerisinde. Fakat osteoporozis gibi bazı patolojik durumlarda bu denge RANKL lehine bozulur ve bunun sonucunda osteoklastogenezis, osteoblastogenezise galip gelerek yeni kemik yapımından daha fazla miktarda kemik yıkımına sebep olur (McClung 2007).

1.2.2. Osteoprotegerin

OPG, akciğer, karaciğer, timus, kalp gibi birçok dokunun yanı sıra esas olarak kemik dokuda osteoblastlar tarafından sentezlenen TNF Reseptör (TNFR) ailesinden bir proteindir. Çözünabilir bir glikoprotein olan OPG, 7 fonksiyonel bölge oluşturan 380 adet amino asitten meydana gelir (Baud'huin vd. 2013). OPG, hem 60 kDa boyutunda monomer hem de 120 kDa boyutunda dimer halinde bulunabilir. Ancak dimerik formda RANKL'a affinitesinin daha yüksek olması nedeniyle RANKL'ın RANK yerine OPG ile bağlanabilmesi için OPG'nin dimerizasyonu gereklidir

(Schneeweis vd. 2005). OPG üzerindeki 7 bölgeden 1, 2, 3 ve 4; sisteinden zengin N-terminal domainlerdir (alan bölgeleridir) ve RANKL ile bağlanmada etkindirler. Diğer alan bölgeleri olan 5, 6 ve 7 ise OPG'nin dimerizasyonu ile ilişkilidir (Baud'huin vd. 2013, Schneeweis vd. 2005).

OPG daha önce de bahsedildiği üzere RANKL için bir tuzak reseptör olup ona bağlanarak RANK/RANKL kompleks oluşumunu engeller ve osteoklastogenezisi inhibe eder. OPG'nin yeterli düzeylerde sentezlenmemesi osteoporozis, romatoid artrit, periodontitis gibi patolojik durumlara yol açabildiği gibi OPG geninde meydana gelen mutasyonlar da Paget hastalığına neden olabilir (Reid ve Holen 2009, Whyte vd. 2002). Ayrıca kemik kırıklarının prognozunda da OPG'nin önemli bir etken olduğu bilinmektedir (Köttstorfer vd. 2014). OPG, kemik doku dışında da bazı patojenik durumlarla da ilişkilidir. Özellikle endotel hücrelerin hayatta kalmasında önemli bir role sahip olmasıyla atherosklerozis, koroner arter hastalığı, iskemik felç gibi durumlarda da OPG'nin rolü bulunmaktadır. Araştırmalar bu gibi durumlarda serum OPG seviyelerinin artış gösterdiğini bildirmiş fakat bu artışın patojenik olmaktan ziyade koruma amaçlı olduğu anlaşılmıştır (Reid ve Holen 2009, Whyte vd. 2002).

OPG'nin vasküler sistem üzerindeki etkileri kanser vakalarında negatif etki göstermesine neden olur. OPG, anjiyogenezisi destekleyici özelliği ile tümör dokularının hızla damarlaşmasına yardımcı olur. Ayrıca RANKL'ın yanı sıra tümör nekroz faktör-ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) için de tuzak reseptör görevi görüyor olması tümör hücrelerinde TRAIL ile indüklenen apoptozisi engellemesine neden olur. Bunların yanı sıra kanser vakalarında görülen kemik metastazlarında da OPG'nin önemli rolü vardır (Corey vd. 2005, Fili vd. 2009, Holen ve Shipman 2006).

Geniş etki alanı ve düzenlediği mekanizmaların önemi göz önünde bulundurulduğunda OPG'nin pozitif ve negatif düzenleyicilerinin rollerinin

anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Vitamin D3, interleukin (IL) -1 α , IL-1 β , TNF α , TNF β , BMP2, TGF- β ve 17 β -estradiol, Wnt 3, Wnt 4, Wnt 16 osteoblastlarda OPG üretimini arttırdığı bilinen faktörlerden bazılarıdır. Prostaglandin E2, paratiroid hormon, glukokortikoidler ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) 1 ise bilinen önemli OPG inhibitörleri arasında yer almaktadır (Kobayashi vd. 2015, Silva ve Branco 2011).

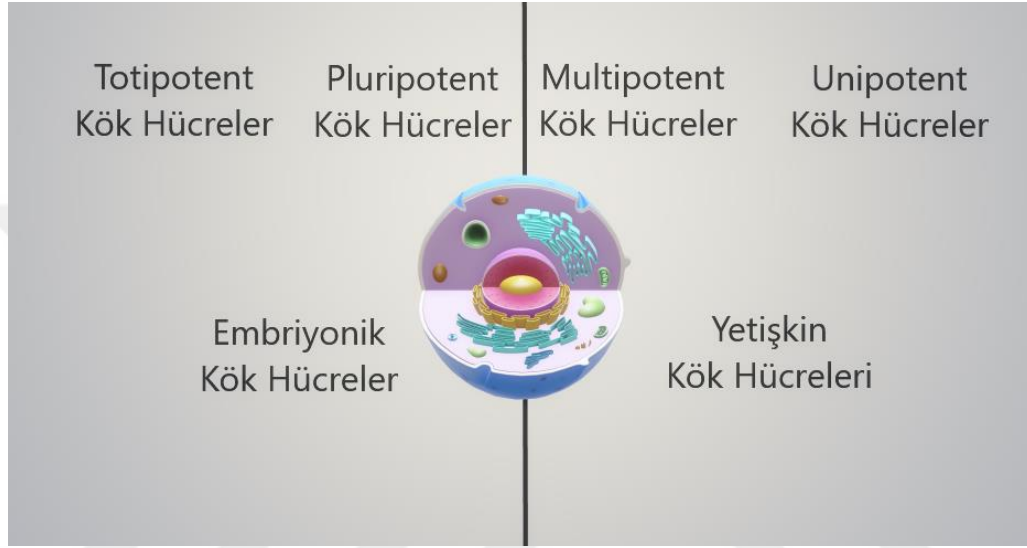
1.3. Kök Hücre

Kök hücreler kendini yenileme ve özelleşmiş hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Araştırmacılar kök hücre teriminin ilk kullanımının 19. yüzyıla kadar tarihlenebildiğini ve terime ilk defa Alman biyolog Ernst Haeckel'in 1868 tarihli "Yaratılışın Doğal Tarihi" adlı eserinde Türkçe tam karşılığı kök hücre olan "Stammzelle" adıyla rastlandığını belirtmektedir. Haeckel'in bu eserinde kök hücre için tüm çok hücreli organizmaların evrimleştiği tek hücreli ataları tanımını kullandığı aktarılmıştır. Haeckel, 1877 tarihli "Antropojeni" adlı kitabında ise bu görüşünü ilerletip döllenmiş ovositin de bir kök hücre olduğunu söyleyerek kök hücre tanımını hem tüm çok hücrelilerin evrimleştiği ortak ata hücre hem de organizmadaki diğer tüm hücreleri oluşturan döllenmiş ovosit için kullanmıştır (Ramalho-Santos ve Willenbring 2007).

Kök hücre terimi her ne kadar 100 yılı aşkın süredir kullanılıyor olsa da modern anlamda kök hücrenin genel tanımının 1979'da Lajtha (Lajtha 1979) tarafından yapıldığı ve bu tanıma göre kök hücrelerin kendilerini yenileme, fonksiyonel hücre tiplerine farklılaşabilme, uzun süre hayatta kalabilme özelliklerini ihtiva ediyor olması gerektiği belirtilmiştir (Slack 2018).

Kök hücreler sınıflandırılırken elde edildikleri kaynağa göre embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler olmak üzere ikiye; farklılaşma potansiyellerine göre ise

totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent kök hücreler olmak üzere dörde ayrılmaktadır (Şekil 1.3). Totipotent hücreler uygun şartlar altında ait olduğu canlıya ait tüm hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeline sahip hücrelerken, unipotent hücreler tek bir özelleşmiş hücre tipine farklılaşabilme kabiliyetine sahip kök hücrelerdir (Can 2008).



Şekil 1.3. Kök hücrelerin sınıflandırılması. Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent; elde edildikleri kaynağa göre de embriyonik ve yetişkin kök hücreler olarak sınıflandırılabilir. Totipotent ve pluripotent kök hücreler embriyonik; multipotent ve unipotent hücreler ise yetişkin kök hücrelerdir.

Kök hücre çalışmalarında totipotent ve pluripotent kök hücre kullanımı ile ilgili etik problemler bulunmaktadır. Bu hücrelerin izolasyonu için bir embriyonun yok edilmesi etik bir sorun olmakla beraber bazı ülkelerde bu hücrelerin kullanımı yasal olarak yasaklanmış veya sınırlandırılmıştır (Robertson 2001). Bu durum göz önünde bulundurulduğunda araştırmacılar için hala yeterli derecede potent olan multipotent karakterdeki yetişkin kök hücreleri bu alanda tercih edilmektedir. Yetişkin kök hücreleri, kemik iliği, yağ dokusu, göbek kordonu (Kern vd. 2006), amniyotik sıvı (Streubel vd. 1996), olfaktör mukoza (Murrell vd. 2005), sinoviyal sıvı (Neybecker vd. 2018) gibi birçok doku ve vücut sıvısından izole edilebilmektedir. Yetişkin kök hücreler germline hücreleri ve somatik hücreler olarak

iki ana dala ayrılırlar. Spermatogonia ve ovogonia germline hücreleri olarak; somatik yetişkin kök hücreler ise hemapoietik hücreler, mezenkimal hücreler ve organ kaynaklı hücreler olarak sınıflandırılır. (Bongso ve Lee 2005).

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society for Cellular Treatment) 2009 yılında yayınladığı beyan ile multipotent mezenkimal stromal hücreler için minimum kriterleri ilan etmiştir. Bu beyana göre bu hücreler standart kültür koşullarında plastik yüzeylere tutunabilmeli; osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma kabiliyetinde olmalı ve son olarak farklılaşma yığılım molekülü (CD) 73, CD90, CD105 gibi mezenkimal belirteçleri ifade ederken CD34, CD45, CD14 gibi bazı yüzey moleküllerini ifade etmemelidir. Fakat yapılan beyanda bu kriterlerin insan hücreleri için oluşturulduğu ve ileride yapılan çalışmalar ile ifade edilen belirteçler bakımından modifikasyonlara gidilebileceği bilgisine de yer verilmiştir (Dominici vd 2006).

Birçok hücre tipine farklılaşabilmeleri, yüksek proliferasyon kapasitesine sahip olmaları ve anti enflamatuar özellikleri ile geleneksel tedavi yaklaşımları ile sonuç alınamayan veya sınırlı iyileşme elde edilebilen durumlarda kök hücreler yüksek potansiyele sahip, potansiyel tedavi araçları olarak görülmektedir. Bu alandaki potansiyellerini daha iyi ortaya koyabilmek adına Alzheimer hastalığı, amyotrofil lateral sklerozis (Duma vd. 2019), multiple skleroz (Harris vd. 2018), tip 1 diyabet (Carlsson vd. 2015), osteoporozis (Kurosawa vd. 2020) gibi hastalıkların yanı sıra yenileyici tıp alanında da tendon hasarları (Crovace vd. 2007), osteoartritis (Garza vd. 2020), kemik iyileşmesi (Ding vd. 2019) gibi durumlarda kök hücrelerin tedavi potansiyelleri klinik araştırmalar ile incelenmektedir.

Araştırmacıların bu kaynak çeşitliliğine rağmen klinik çalışmalarda çoğunlukla kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreleri kullandığı göze çarpmaktadır. PubMed veri tabanında aratıldığında kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler hakkında yıllık 5000 civarı yeni makalenin yayınlandığı; bunların da 180-300

kadarının klinik araştırmalar olduğu görülmektedir (İnt. Kyn. 3). 2014-2018 yılları arasında yapılan klinik araştırmalar incelendiğinde kemik iliğinin belirgin şekilde en çok tercih edilen kök hücre kaynağı olduğu görülmektedir. Kemik iliğini göbek kordonu ve yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin takip ettiği; diğer kaynakların ise çok daha nadiren tercih edildiği bildirilmiştir (Kabat et al. 2020). Kemik iliğinde potent kök hücrelerin varlığı ilk defa 1970 yılında izole ettiği hücreleri fibroblastlara farklılaştırmayı başaran Alexander Friedenstein tarafından gösterilmiştir (Friedenstein vd. 1970).

Araştırmacıların klinik araştırmalarda kemik iliği kaynaklı kök hücreleri tercih etmesinin altında, kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin varlığının görece daha uzun zamandır biliniyor olmasının sonucu olarak bu hücrelerle çeşitli alanlarda çok sayıda çalışma yapılıp oldukça büyük bir veri havuzu oluşmuş olmasındır.

Kök hücre tedavilerinde istenen başarı düzeyine ulaşılabilmesi için farklı kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin biyolojik özellikleri, tmrojeniteleri, immunojeniteleri gibi parametreler ve farklı hücre tiplerine farklılaşabilme kabiliyetleri ile bu farklılaşmaları düzenleyen i ve dış faktörlerin belirlenmesi; daha sonra da bu hücrelerin farklı hastalık modellerinde terapötik etkinliklerinin araştırılması gerekmektedir.

Her ne kadar kemik iliği kaynaklı kök hücreler hücresel tedavi yaklaşımlarında başı çekse de araştırmacılar tarafından ilgi gören kök hücre kaynaklarından birisi de amniyotik sıvı kaynaklı kök hücrelerdir (Roubelakis vd. 2007).

Amniyotik sıvı hücreleri arasında hematopoietik progenitör hücrelerin varlığı ilk defa 1993 yılında bildirilmiştir (Torricelli vd. 1993). Daha sonra mezenkimal karakterleri onaylanacak olan bu hücreler arasında diğer progenitörlerin varlığı ise amniyotik sıvıdan izole edilen hücrelerin myojenik farklılaşma kabiliyetinde olduğunu saptayan

Streubel ve arkadaşlarının (1996) çalışması ile fark edilmiştir (Fauza 2004). Amniyotik sıvı kaynaklı kök hücreler her ne kadar hala kullanımı çok az olsa ve biyogenezlerinin anlaşılması adına nispeten daha az çalışma yapılmış olsa da keşfedildikleri tarihten itibaren araştırmacılar tarafından ilgi görmüş ve potansiyelleri araştırılmıştır (Fauza 2004, Nawaz vd. 2020, Roubelakis vd. 2007).

1.3.1. Amniyotik Sıvı Kaynaklı Kök Hücreler

Amniyotik sıvının bir kök hücre kaynağı olarak keşfinin ardından bu alanda da çalışmalar hızlanmıştır. Özellikle doğum esnasında izole edildiğinde hiçbir invaziv protokol uygulanmaması veya amniyosentez ile minimal invaziv tekniklerle elde edilebiliyor olması sayesinde amniyotik sıvı kaynaklı kök hücrelerin (ASKKH) izolasyonunda etik bir problem ile karşılaşılmamaktadır (Fauza 2004, Holden 2007). Yapılan çalışmalar, bu etik avantajın yanı sıra potansiyelleri bakımından da ASKKH'lerin oldukça potent olduğunu göstermektedir (Roubelakis vd. 2007).

Amniyotik sıvının büyük bölümü sudan oluşmaktadır. Amniyotik sıvıya fetusa ait oral, nazal, trakeal, pulmoner sıvılara ek olarak gebeliğin ikinci trimesterinden itibaren fetusa ait idrar da dahil olmaktadır. Buradan gelen fetal kaynaklı hücrelerin yanı sıra amniyotik sıvıda anne kaynaklı olarak amniyotik membranlar ve bağ doku kaynaklı hücreler de bulunmaktadır. Bu bağlamda amniyotik sıvı hem anneye hem de yavruya ait heterojen bir hücre popülasyonunu içerir (Bossolasco vd. 2006, Klemmt vd. 2011, Loukogeorgakis ve De Coppi 2017, Underwood vd. 2005). Amniyotik sıvıdaki hücreler arasında endoderm, mezoderm ve ektoderm kaynaklı hücrelerin bulunması bu hücrelerin potansiyelini artırır (Valli vd. 2010).

Gebeliğin henüz ilk safhasında amniyotik sıvıdaki hücreler primer vitellüs kesesi, plasenta veya fetal membranlardan köken alır. Bu aşamada henüz fetusun hücre kompozisyonuna katkısı yoktur. Gebelik ilerledikçe hücre sayısı ve çeşitliliği

artarken hücre popülasyonuna fetus da katkı yapmaya başlar. İkinci trimesterden itibaren fetal periderm veya epidermis, amniyon, trofoblast ile birlikte fetusun sindirim kanalı, üriner ve ürogenital sistemi kaynaklı hücreler de amniyotik sıvıdaki hücre popülasyonuna katılır. Amniyotik sıvı içerisindeki hücrelerin büyük çoğunluğunun fötal kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Gosden 1983).

Araştırmacılar amniyotik sıvıda heterojen bir hücre popülasyonu olduğunu belirterek farklı morfolojik tiplerde hücreler tarif etmiştir. Bossolasco ve arkadaşları (2006) insan amniyotik sıvı kaynaklı hücrelerde epitel benzeri hücreler ve büyük düzensiz sınırları olan stromal hücreler olmak üzere iki morfoloji tarif etmiştir. Yine insan amniyotik sıvı kaynaklı hücrelerde Pipino vd. (2015) epitel benzeri ve fibroblast benzeri olmak üzere iki tip morfoloji bildirmiştir. Ferdaos ve arkadaşları ise (2008) sıçan amniyotik sıvı kaynaklı kök hücrelerde fibroblast benzeri, epitel benzeri ve trofoblast benzeri olmak üzere 3 tip morfoloji tanımlamıştır. Nawaz (2020) yine sıçan amniyotik sıvı kaynaklı kök hücrelerde kültür esnasında epitel benzeri hücreler, stromal hücreler, fibroblast benzeri hücreler ve sıkıca paketlenmiş fibroblast benzeri hücreler olmak üzere 4 tip morfoloji belirlemiş; ilerleyen pasajlarda ise fibroblast benzeri morfolojinin hakim morfoloji olduğunu bildirmiştir. Görüldüğü üzere farklı hayvan türlerinden ve gebeliğin farklı zaman aralıklarında toplanan hücrelerde ASKKH'ler için farklı morfolojik tipler bildirilmektedir.

Amniyotik sıvıdaki hücreler immunohistokimyasal boyama yöntemi ile protein ifadeleri yönünden incelendiğinde epitel, mezenkimal ve kas kaynaklı hücrelerin yanı sıra nöral ve glial hücrelerin varlığı da tespit edilmiştir (Gosden 1983). PCR çalışmalarında ise amniyotik sıvı kaynaklı kök hücrelerin gen düzeyinde endotelial, epiteliyal, ektodermal, endodermal ve mezodermal belirteçleri ifade ettiği gösterilmiştir (Valli vd. 2010).

ASKKH'ler yetişkin kök hücreler olarak değerlendirilmektedir. ASKKH'ler multipotent ve non-tümörejenik özelliklerinin yanı sıra (De Coppi vd. 2007, You vd.

2008b) CD44, CD73, CD90, CD105, CD117, CD133 ve safha spesifik embriyonik antijen (SSEA)-4 gibi önemli mezenkimal kök hücre belirteçlerini ifade ederler (Phermthai vd. 2010). Her ne kadar multipotent hücreler olarak sınıflandırılırsalar da hem anneye hem de fetusa ait hücreler içeriyor olmasının da yardımıyla ASKHH'ler Nanog, Sry-box transkripsiyon faktörü 2 (SOX2), oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü (OCT) ³/₄ ve c-Myc gibi pluripotent hücre belirteçlerini de ifade etmektedir. Bu durum, ASKHH'lerin hücre potensiyeli bakımından embriyonik kök hücreler ile indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin arasında konumlandırılmasını sağlar (Bossolasco vd. 2006, Prusa vd. 2003, Roubelakis vd. 2007). ASKHH'ler, kendilerini yenileyebilme özelliklerine ek olarak osteoblastlar, kondrositler gibi mezodermal hücre tiplerine ve hatta nörojenik farklılaşma kabiliyetleri ile ektodermal hücrelere de farklılaşabilirler (Tsai vd. 2004).

Sinir doku iyileşmesi (Pan vd. 2006), diyafram rejenerasyonu (Kunisaki vd. 2006), akut böbrek hasarı (Hauser vd. 2010), amfizem (Li vd 2014), kemik rejenerasyonu (Steigman vd. 2009) gibi birçok alanda ASKHH'lerin terapötik potansiyelleri araştırılmış ve umut vaat eden sonuçlar bildirilmiştir.

Yenileyici hücre tedavilerinde ve kök hücre araştırmalarında genellikle kemik iliği ve yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler tercih edildiğini görüyoruz. Ancak ASKHH'ler, yenileyici tıpta yukarıda bahsettiğimiz yönleri ile önemli bir hücre tedavisi adayı olarak karşımıza çıkmaktadır.

1.3.2. Kök Hücrelerin Parakrin Etkileri

İlaç tedavisi veya cerrahi sağıltım ile sonuç alınamayan birçok hastalık ve yaralanmada kök hücre tedavisi artan potansiyelleri ile umut vaat eden bir tedavi yaklaşımı olmuştur. Yapılan çalışmalar ilerledikçe bu araştırmalarda terapötik etkinin hücre kaynaklı olmaktan çok hücrelerin parakrin etkileri vasıtasıyla olduğu

anlaşılmıştır. Organ hasarlarında kök hücre tedavisi uygulandığında 72 saatten kısa sürede akut düzelme belirtileri görülmesi, prognozdaki bu gelişimin farklılaşma kaynaklı olamayacağını göstermektedir. Zira bu süre anlamlı bir farklılaşma için oldukça kısadır. Bununla birlikte araştırmaların kök hücre naklini takip eden süreçte transplantasyon sonrasında sadece %1-5 arası bir hücre canlılığı bildirmiş olması ve buna rağmen terapötik etkinin görülmesi kök hücrelerin etkilerini parakrin yollarla gösterdiğine işaret etmektedir (Crisostomo vd. 2008). Thum ve arkadaşları 2005'te yaptıkları çalışmada kök hücre tedavisinin başarısının ardında apoptotik kök hücrelerin olabileceğini söyleyerek "Dying stem cells (Ölen kök hücreler)" hipotezini ileri sürmüştür (Thum vd. 2005). Wollert ve arkadaşlarının (2004) yaptığı çalışmada tedavi amaçlı enjekte edilen kök hücrelerin %5-25'inin apoptotik halde oluşunun gösterilmiş olması bu hipoteze dikkatleri yoğunlaştırmıştır. Thum'un hipotezi; Ankersmit ve arkadaşlarının (2009) bir myokard infarktüsü modeli üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalarda radyasyona tabi tutarak apoptozise uğratılan hücrelerin uygulandığı deneklerde daha yüksek oranda iyileşmenin görüldüğünü göstermesiyle onaylanmıştır. Ayrıca kök hücrelerden elde edilen koşullandırılmış medyum gibi ürünler ile *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda benzer fonksiyonel gelişimlerin gözlenmesi kök hücrelerin etkilerinin kompleks parakrin faaliyetlerinin sonucu oluştuğuna işaret eder (Crisostomo vd. 2008).

Hücrelerin apoptozise uğrarken ürettikleri salgılarının belirli koşullarda normal hücrelere göre daha başarılı sonuçlar sağlaması, hücrelerin stres koşulları altında daha yüksek seviyelerde anti-apoptotik ve proliferasyon indükleyici salgılar üretmesiyle ilişkilidir. Yangı, hipoksi, radyasyon gibi durumlara maruz kalan hücreler apoptozise giderken mikro çevrelerinde bu duruma sebebiyet veren etkenlerle savaşmaya ve etraflarında kendi yerlerini dolduracak yeni hücrelerin oluşumunu sağlamaya çalışırlar (Salomon vd. 2013).

Kök hücreler yukarıda bahsedildiği gibi hipoksi (Salomon vd. 2013), radyasyon (Ankersmit vd. 2009), düşük hava basıncında kültür (Caneparo vd. 2020) veya hücre çoğalmasını engelleme (Liao vd. 2000) gibi çeşitli baskılayıcı faktörler altında anti-

enflamatuar IL'ler, proliferasyon indükleyici faktörler gibi salgılar yapmaktadır. Kök hücreler normal kültür koşullarında da büyüme faktörleri, IL'ler, enzimler gibi çeşitli materyalleri üretir ve salgılar (Dowling ve Clynes 2011). Kök hücreler normal koşullar altında yüksek miktarlarda IGF-1, VEGF, TGF- β , hepatosit büyüme faktörü, BMP 2, BMP 6, FGF 2, FGF 7 gibi büyüme faktörleri; IL-1, IL-6, IL-11 gibi sitokinler ve TNF α , matriks metalloproteinazlar, anjiogenin, adrenomedullin gibi proteinleri sentezler. Bu salgılar hücre göçü, hücre proliferasyonu, hücre stabilizasyonu, hücre gelişimi ve farklılaşması, matriks moleküllerini degrades etme, anjiyogenezis ve hücreleri apoptoze karşı koruma gibi fonksiyonlara sahiptir (Gnecchi vd. 2008, Nagaya vd. 2005).

Kök hücreler ve diğer hücrelerin bu parakrin özelliklerinden yararlanmak için koşullandırılmış medyum (KM) ve eksozom gibi hücreSEL ürünler son yıllarda araştırmacıların çalışmalarında sıklıkla kullandığı materyaller haline almıştır (Bogatcheva ve Coleman 2019, Colao vd. 2018). PubMed veritabanı kullanılarak araştırıldığında koşullandırılmış medyum ile ilgili ilk çalışmaların 1980'lerde görülmeye başlandığı ve özellikle 2010'larda bu çalışmaların ivme yakalayarak yıllık 800-900 makaleye kadar vardığı; geçtiğimiz sene ise literatüre KM ile ilgili 1391 yeni makalenin girdiği görülmektedir. Eksozomlar ile ilgili yapılan çalışmaların ise 2000'lerin başında henüz başladığı görülür. Yine eksozomlarla ilgili 2010 yılında sadece 282 makale yayınlandığı fakat 2020 yılında bu konuda 4200'ün üzerinde yeni makale yayınlandığı görülebilmektedir.

1.3.2.1. Koşullandırılmış Medyum

Hücreler kültür şartları altında devam eden metabolik aktiviteleri sonucu birçok ürün üretir ve *in vitro* ortamda bu ürünleri içerisinde kültüre edildikleri ortama bırakırlar. Metabolik artıklar gibi hücrelerin ürettiği diğer ürünler de hücreler tarafından içinde buldukları kültür medyumuna salgılanırlar. Belirli koşullar altında kültüre edilen hücreler tarafından üretilip salgılanan; büyüme faktörleri, enzimler, sitokinler gibi

proteinler; mikro ribonükleik asitler (miRNA)'lar gibi non-coding ribo nükleik asitler (RNA) ve ekstraselüler veziküller bakımından zengin kültür medyumuna koşullandırılmış medyum adı verilir (Dowling ve Clynes 2011).

Koşullandırılmış medyumun içeriği kültüre edilen hücre tipi, kültür medyumuna ilave edilen ajanlar, kültür şartları gibi etmenlere göre değişiklik gösterir. Kültüre edilen bazı kök hücre tiplerinin kültür süresi ve hücre ekim yoğunluğuna göre değişmekle beraber VEGF, platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), IGF-1, IGF-2, HGF, keratinosit büyüme faktörü (KGF), FGF, heparan bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HEGF), plasenta büyüme faktörü (PIGF), nöral büyüme faktörü (NGF), TGF- β gibi büyüme faktörleri; IL-6, IL-10, IL-27, IL-17E, IL-13 gibi anti enflamatuar sitokinler; IL-8, IL-9 ve IL-1b gibi proinflamatuar sitokinler ve leptin, anjiogenin, fraktalkin, adrenomedullin gibi bazı diğer sitokinleri içerdiği bilinmektedir (Gnecchi vd. 2008, Pawitan 2014).

Özelleştirilmiş hücrelerden elde edilen KM'de içerdiği büyüme faktörleri ve diğer proteinler ile araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir hücresel ürün olarak karşımıza çıkmaktadır. Örneğin osteoblastlardan elde edilen KM'de FGF, VEGF, TGF- β , TGF beta reseptörü (TGFBR) 1, TGFBR3, osteonektin, Smad 4, intraselüler adhezyon molekülü (ICAM), aktive lökosit adhezyon molekülü (ALCAM), aktivin, IL-6, IL,9, IL-27, vb. birçok faktörün varlığı bildirilmiştir (Chen vd. 2014b).

KM, amaca göre manüple edilebilir bir kaynaktır. Örneğin hipoksik koşullarda kültüre edilen hücreler ortama bol miktarda anti-apoptotik, anti-enflamatuar ve proliferasyon indükleyici ürün salgılar ve bu şekilde elde edilen KM yenileyici yaklaşımlarda kullanılabilir bir ürün haline gelir (Chen vd. 2014, Jun vd. 2014).

Özelleşmiş hücrelerden elde edilen KM, kök hücre farklılaşmasının indüklenmesinde başarılı sonuç veren bir üründür. Özelleşmiş hücrelerden elde edilen KM kullanılarak

osteositlerden elde edilen KM ile osteojenik farklılaştırma (Heino vd. 2004), kondrositlerden elde edilen KM ile kondrojenik farklılaştırma (Nawaz 2020) gibi çalışmaların yanı sıra testiküler hücrelerden elde edilen KM ile embriyonik kök hücrelerden ovosit içeren ovaryum benzeri yapılar oluşturulması (Lacham-Kaplan vd. 2006) gibi kompleks amaçlarla çalışmalar yürütülebilmektedir. KM'nin elde edilmesinde hücreler normal kültür medyumları ile kültüre edilebileceği gibi kullanılan kültür medyumuna belirli amaçlar doğrultusunda büyüme faktörleri, hormonlar, vitamin ve mineraller gibi farklı ajanlar da ilave edilebilir (Chian vd. 1995, Kondo vd. 1994, Steinbichler vd. 2016, Xiao vd. 2012, Nawaz 2020). İlave edilen bu ürünler, kültüre edilen hücrelerde uyardıkları sinyal yolları ile hücrelerin ürettikleri ürünlerin çeşitliliğini, miktarını ve karakterini değiştirerek elde edilen KM'nin içeriğini belirli amaçlar doğrultusunda manüple edilmesini sağlar.

1.3.3. Kök Hücrelerde Osteojenik Farklılaştırma

Kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasında öne çıkan 5 ana sinyal yolağı vardır. Bunlar TGF- β /BMP sinyal yolağı, Wnt/ β -catenin sinyal yolağı, Hedhehog sinyal yolağı, MAPK, ekstraselüler reseptör kinaz (ERK) sinyal yolağı ve Notch sinyal yolağıdır (Huang vd. 2007).

TGF- β ailesi proteinleri TGFBR 1 ve 2'yi aktive ederek Smad proteinlerinin fosforilasyonunu sağlar. BMP 2, 4, 5 ve 7 ise kök hücrelerin osteoblastik farklılaşmasını ve kemik formasyonunu tetikler. BMP proteinleri hücre membranındaki BMP reseptörlerine bağlanır ve hücre içi Smad proteinlerini aktive eder. Smad proteinlerinden Smad 1 ve 5 osteoblast farklılaşması ile ilişkilendirilir. Smad 1, 5 ve 8'in BMP'ler tarafından uyarılmasını takiben R-Smad ve Smad 4 nükleus içerisine lokalize olur ve Runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (RUNX2) ile OSX transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlar (Büttner vd. 2013, Hu vd. 2013).

Wnt proteinleri 19 adet glikoproteinden oluşan bir protein grubudur. Bu proteinler embriyonik gelişimde, organ ve kemik oluşumunda rol alır. Wnt 1, 2, 3 ve 3a (klasik Wnt proteinleri) Frizzled (FRZ)/ lipoprotein reseptör ilişkili protein (LRP) reseptörü üzerinden Wnt/ β -catenin sinyal yolunu uyarır. Wnt 4, 5a, 5b, 6, 7a ve 11 (non-klasik Wnt proteinleri) ise Fzd reseptörüne bağlanarak hücre içi kalsiyum seviyesini kontrol eden heterotrimetik G proteinini aktive eder. Wnt'lerin Fzd/LRP reseptörünü aktive etmesiyle beraber RUNX2 ve OSX promotörleri uyarılır ve bu transkripsiyon faktörleri aktive olur (Yuan vd. 2016b). Hedhehog sinyal yolağı da BMP ve Wnt yolakları ile birlikte uyarıldığında osteojenik farklılaşma ve matriks mineralizasyonunu sağlar. Transport protein 80, hedhehog/Smo/Ptch1-Gli sinyalizasyonunu uyararak kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşması yolunda uyarım verir (Montgomery vd. 2014, Shi vd. 2015, Yuan vd. 2016a).

ERK/MAPK sinyal yolağı ERK, p38 ve c-Jun proteinleri vasıtasıyla kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasında rol alır. ERK 5 ve ERK 1/2, c-Fos ve c-Jun'un ifadesini sağlar. Kök hücrelerin *in vitro* osteojenik farklılaşması sürecinde 7-11 günler arasında ERK aktivitesi görülür ve c-Jun önderliğinde kök hücrelerin farklılaşması arttırılır. On üç ila on yedinci günler arasında ise hücreler arası matriks sentezi ve kalsiyum birikimi hızı artar. ERK 1/2'nin etkisiyle laminin, matriks protein 5 gibi proteinlerin indüklediğı alkalın fosfataz (ALP) ve çekirdek bağlayıcı faktör (Cbfa)-1'in ifadesi artarak matriks mineralizasyonu ve osteojenik farklılaşma indüklenir (Jiang ve Hua 2016, Wang vd. 2016).

Notch sinyalizasyonu ise osteoblastların farklılaşmasını inhibe ederken bu hücrelerin proliferasyonunu arttırıcı yönde bir görev üstlenir. Bu sinyal yolağının aktivasyonu ile osteokalsin (OCN) ve osteopontin ifadeleri regüle edilerek osteoblast farklılaşması inhibe edilir. Notch hücre içi domaini (NICD)'nin hücresele seviyede yüksek ifadesi erken osteoblastların proliferasyonunu uyarır. Notch sinyal yolağının uyarılması aynı zamanda siklin D ve siklin E'nin ifadesini arttırmak suretiyle de osteoblast proliferasyonunu uyarmaktadır (Engin vd. 2008, Hilton vd. 2008, Kohn vd. 2015).

Araştırmacılar osteojenik farklılaşma sırasında görülen hücreleri olgunlaşmamış osteoprogenitrler, olgun osteoprogenitrler, preosteoblastlar, osteoblastlar ve osteositler olarak sınıflandırmış ve bu safhalarda görülen belirteçleri tanımlamışlardır. Buna göre olgunlaşmamış osteoprogenitrler düşük seviyede osteopontin, normal düzeyde RUNX2 ve iyi derecede, salgılanmış fosfoprotein 1 (SPP1) ifade eder. Olgun osteoprogenitrler yine düşük miktarda osteopontin ve normal düzeyde RUNX2 ifade ederken SPP1'in yanı sıra kollajen (COL) 1'de ifade eder. Preosteoblast safhasından itibaren bu proteinlere ek olarak ALP, ve OSX ifadesi de hücrelerde görülmeye başlar. Osteoblastlarda ALP ve osteopontin seviyeleri daha yüksek gözlenirken diğer safhalarda görülen belirteçlere ek olarak önceki safhalarda ifade edilmeyen Phex ve OCN'nin de ifadesi görülür. Osteositlerde ise ALP, OCN, COL1 ve OSX ifadeleri kaybolurken Phex, osteopontin, RUNX2 ve SPP1 ifadesi devam eder (Huang vd. 2007).

Kök hücrelerin *in vitro* osteojenik farklılaştırmasında klasik olarak deksametazon, askorbik asit, β -gliserofosfat gibi ürünler kullanılmaktadır (Jaiswal et al. 1997). Ancak osteojenik etkisi olduğu bilnen bazı proteinler, hormonlar, vitaminler ve iz elementler de osteojenik farklılaşma çalışmalarında kullanılmış ve bunların kök hücrelerde osteojenik farklılaşma potansiyeline etkisi araştırılmıştır (An vd. 2017, Hong vd. 2006, Song vd. 2011). Özellikle seks hormonları, BMP'ler ve TGF- β ailesi proteinleri bu tarz çalışmalarda ilgi odağıdır (Hong vd. 2006, Karbanodv vd. 2010).

1.3.3.1. TGF- β 3

TGF- β 3, TGF- β süper ailesine dahil bir sitokindir. TGFB3 geni tarafından kodlanan protein embriyogenezis, farklılaşma ve organ gelişimi gibi olaylarda önemli role sahiptir. Protein, ayrıca hücre adhezyonu ve ekstraselüler matriks (ECM) formasyonu gibi önemli işlevlerde rol alan molekülleri regüle eder (Herpin vd. 2004).

TGF- β 3 kök hücrelerin *in vitro* ortamda çeşitli hücre tiplerine farklılaşmasında etkin rol alan bir proteindir. Kök hücrelerin kondrojenik (Contentin vd. 2017), tenojenik (Chun vd. 2017) ve osteojenik (Karbanodvá vd. 2010) hücrelere farklılaşmasında TGF- β 3'ün rolünün olduğu bilinmektedir.

Osteojenik farklılaşma sürecinde TGF- β 1, TGFBR2'ye bağlanır ve sonrasında ALK/TGFBR1 reseptörünü aktive eder. TGF- β 1 ve β 3 hem TGF- β sinyalizasyonu sonrası Smad 1, 5 ve 8 vasıtasıyla hem de ERK sinyalizasyonu ile RUNX2 ve OSX ifadesinin artmasını sağlar. Özellikle mezenkimal kök hücrelerin osteoblast öncü hücrelerine farklılaşmasında TGF- β 3; TGF- β 1 ve bazı BMP ailesi proteinleri ile birlikte oldukça önemli bir rol üstlenir (Grafe vd. 2018).

TGF- β 3 osteojenik farklılaşmayı uyarıcı etkileri göz önünde bulundurularak araştırmacılar tarafından *in vitro* osteojenik farklılaşma çalışmalarında tercih edilen ajanlar arasında yer almıştır (Karbanodvá vd. 2010).

1.3.3.2. 17 β -Estradiol

Bir steroid hormon olan 17 β -estradiolün (diğer adları ile oestradiol veya E2) biyosentezi sürecinde androstenedion, aromataz enzimi ile estrona aromatize edilir. Sonrasında da estronun 17- β hidroksisteroid dehidrojenaz ile etkileşimi sonucunda 17 β -estradiol oluşur. Bu hormon dişi bireylerde reproduktif olarak aktif oldukları süreçte büyük oranda ovaryumlarda granuloza hücreleri tarafından üretilir. Erkek bireylerde ise 17 β -estradiolün bir kısmı testislerde üretilir. Seks hormonlarının üretim merkezlerinden biri olan adrenal korteksin zona retikularis katmanı da bu hormonun üretildiği bölgelerdendir. Ayrıca yağ doku, kemik, karaciğer ve beyin dokularında da periferik aromatisasyon sonucu düşük miktarlarda 17 β -estradiol üretimi gerçekleşir (Melmed vd. 2015).

17 β -estradiol, çeşitli metabolik aktivitelerin yanı sıra hücre gelişimi ve farklılaşması ile de ilişkilidir. Embriyonik kök hücreler ve mezenkimal kök hücrelerde bulunan ER α ve β üzerinden etkisini gösteren 17 β -estradiol kök hücrelerde nöral (Brännvall vd. 2002), adipojenik ve osteojenik (Hong vd. 2006) farklılaşmalar üzerine etkilidir.

Osteojenik farklılaşmada ER α ve ER β üzerinden etki gösteren 17 β -estradiol, Cbfa1, OCN gibi önemli osteojenik belirteçlerin ifadelerini artırır. Ayrıca mezenkimal kök hücrelerin adipojenik farklılaşmasını inhibe edip osteojenik farklılaşma yönünde uyarılmalarını sağlar. Kemik hücreleri hem ER α 'yı hem de ER β 'yı içeren hücrelerdir. Osteojenik farklılaşma sürecinde ER β miktarı stabil kalırken farklılaşma süreci ilerledikçe ER α miktarında bir artış görülür. *İn vitro* koşullarda yürütülen çalışmalarda kültür ortamına 17 β -estradiol ilavesinin farklılaşan hücrelerde ALP aktivitesini, kalsiyum birikim miktarını, OCN ve Cbfa1 gibi önemli osteojenik belirteçlerin ifadesini arttırıcı etki gösterdiği bildirilmiştir (Dang vd. 2002, Hong vd. 2006, Wang vd. 2006)

1.4. Problemin İfadesi

Kök hücrelerin osteojenik farklılaşma kabiliyetleri ve osteojenik farklılaşma kapasitesini etkileyen faktörler hala önemli bir araştırma alanıdır. Farklı büyüme faktörleri, iz elementler, hormonlar gibi birçok etmenin kök hücrelerin osteojenik farklılaşma kabiliyetine etkileri, doğurduğu sonuçlar ve bu etkilerin hangi mekanizmalarla gerçekleştiği birçok *in vitro* çalışma ile ortaya konulmaktadır. Kök hücrelerin kullanıldığı *in vitro* çalışmaların yanı sıra *in vivo* deneyler ve klinik araştırmalar ile de daha başarılı osteojenik farklılaşma protokollerinin arayışı sürmektedir (Guo vd. 2020, Xie vd. 2020, Yu vd. 2018). Yenileyici tıp için önemli ve gelişime açık bir konu olan kemik iyileşmesinde daha başarılı sonuçlar alabilmek için osteojenik farklılaşma protokollerinin optimizasyonu önemlidir.

Kemik doku ile alakalı 100'ün üzerinde hastalık ve sendrom tanımlanmıştır. Blount hastalığı, juvenil Paget hastalığı, Kienbock hastalığı, kompleks letal osteokondrodizplazi gibi nadir hastalıkların yanı sıra osteoporozis gibi oldukça yaygın olup prevalansı hızla artan hastalıklar da bu listede yer almaktadır (İnt Kyn. 4).

Uluslararası Osteoporozis Vakfının verilerine göre dünya genelinde 200 milyondan fazla kadının osteoporozis ile mücadele ettiği, 50 yaşın üzerindeki her üç kadından ve her beş erkekten birinin osteoporozis kaynaklı kemik kırıklarından muzdarip olduğu belirtilmektedir. Yine aynı vakfın açıklamalarında her yıl 8,9 milyondan fazla kişinin osteoporozis kaynaklı kemik kırıkları yaşadığı ve özellikle kalça kırıklarında tedavi sonrasında hastaların %60'ının bir yıl içerisinde tekrar medikal yardım ihtiyacı duyduğu bildirilmektedir (İnt Kyn. 5).

Kök hücre tedavilerinin vaat ettiği başarılı sonuçlardan faydalanmak isteyen bir diğer alan da kemik kırıklarının tedavisinde prognozu daha iyi hale getirme amacıyla olan ortopedidir. Sadece Amerika Birleşik Devletlerinde yılda 2 milyon civarı hasta kemik kırıkları ile yüzleşmektedir. Vertebral ve spinal kırıklar yaklaşık %30-50 prevalans ile en sık karşılaşılan kırık tipleridir ve 50 yaş üstü bireylerde artan morbidite ve mortalite ile seyrederek. Yine elli yaş üstü bireylerde daha nadiren görülen kalça kırıklarında ise 6 ay içerisinde görülen %20 mortalite ile çok daha yüksek bir ölüm oranı karşımıza çıkmaktadır. Her ne kadar genç bireylerde kırık iyileşmelerinde yüksek bir iyileşme oranı olsa da osteoporozis hastaları, diyabet hastaları, sigara içenler gibi bazı risk gruplarında tam kaynamama veya tam iyileşmeme gibi durumların görülme oranı %15'i bulabilmektedir (İnt. Kyn 6).

Kök hücreler ve biyomateryallerin kullanımı ile son yıllarda kemik iyileşmesi alanında hatırı sayılır bir ilerleme kaydedilmiştir (Wang vd., 2019). Ancak farklı hastalık ve/veya sendroma sahip bireylerde patolojik durumlarından dolayı kemik iyileşmesi, hücre farklılaşması gibi olaylarda farklılıklar görülebilir. Yang ve

arkadaşlarının (2015) ankilozan spondilit hastalarının ligamentlerinden elde edilen fibroblastların osteoartrit hastalarından izole edilen fibroblastlara göre daha ileri seviyede bir osteojenik farklılaşma gösterdiğini ortaya koyması bu farklılıklara örnek teşkil etmektedir. Bu gibi kemik dokuda görülebilen başta osteoporozis olmak üzere birçok hastalık ve sendromun varlığı ve bunların komplike yapıları, kemik rejenerasyonu alanında bu hasta gruplarına spesifik stratejilerin oluşturulması gerekliliğini ortaya çıkartmaktadır.

Kemik kırıklarında hedeflenen yeni kemik oluşumunu hızlandırmak, mineralizasyonu arttırmak gibi amaçlar ile uygulanan farklı protokoller (Vanhatupa vd. 2015, Yang vd. 2015) farklı kemik doku hastalıklarından muzdarip bireylerde etkisini göstermeyebilir veya daha kötüsü, negatif etkilere sebebiyet verebilir. Geleneksel tedavi yaklaşımlarına göre çok daha avantajlı görünen bu yöntemler farklı özellikteki bireylerde yan etkilere sebep olarak tıbbın esas ilkelerinden olan “*primum non nocere*” ile ters düşecek sonuçlar doğurabilir.

Bu nedenle farklı durumlar için farklı osteojenik farklılaştırma protokollerinin optimizasyonu büyük önem taşımaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasında kullanılan büyüme faktörleri, hormonlar, koşullandırılmış medyum gibi materyaller ile oluşturulan farklılaştırma protokollerinde kullanılan maddelerin ilavesi ile elde edilen sonuçlar, bu maddelerin birbirleri ile etkileşimleri, farklı zaman aralıklarında sergiledikleri farklı özellikler ve bu etkilerin altında yatan moleküler mekanizmaların açığa çıkarılması, bu alandaki ilerlemeler için büyük önem taşımaktadır.

1.5. Hipotez, Amaç ve Hedefler

Hipotez 1: *In vitro* koşullarda TGF- β 3 ve 17 β -estradiol hfOB hücrelerinde OPG miktarını artırır.

Hipotez 2: Osteoblast hücrelerinden elde edilen KM, ASKKH'lerde osteojenik farklılaşmayı indükler.

Hipotez 3: Yüksek seviyede OPG içeren KM, ASKKH'lerde osteojenik farklılaşmayı indükler.

Hipotez 4: TGF- β 3, 17 β -estradiol, KM ve yüksek seviyede OPG içeren KM, ASKKH'lerin osteojenik farklılaşması sürecinde farklı özellikler gösterir.

Amaç: Çalışmamızda hfOB hücrelerinden elde edilen iki farklı KM ile birlikte TGF- β 3 ve 17 β -estradiol kullanarak oluşturduğumuz ayrı osteojenik farklılaştırma medyumları ile indüklenen ASKKH'lerin osteojenik farklılaşması sonrasında kalsiyum birikimi; SPP1, RUNX2, COL1 ve DCN gen ifadeleri gibi çeşitli parametreleri karşılaştırmak suretiyle farklı açılardan bu protokollerin osteojenik kapasitelerini değerlendirmeyi amaçladık.

Gerekçe: Kemik doku komplike doğası gereği farklı durumlarda farklı ihtiyaçlar gösteren bir dokudur. Dolayısıyla gerekli durumlarda açığa çıkan bu ihtiyaçlara göre farklı osteojenik farklılaşma protokolleri oluşturabilmek bu durumların idaresinde kolaylık sağlayacaktır.

Hedef 1: Gebe sıçanlardan gebeliğin 17. gününde toplanan amniyon sıvısından başarılı bir şekilde ASKKH'leri izole etmek ve mezenkimal karakterlerini göstermek.

Hedef 2: hfOB hücrelerinde TGF- β 3 ve 17 β -estradiolün OPG üretimine *in vitro* etkisini belirlemek.

Hedef 3: Standart kültür koşullarında hfOB kültür medyumuna ve yüksek OPG üretim kapasitesi gösteren medyumla kültüre edilen hücrelerden elde edilen KM'ler ile osteojenik farklılaştırma çalışmaları yapıp ASKKH'lerde osteojenik farklılaşmayı indüklemek.

Hedef 4: Standart osteojenik farklılaştırma medyumuna ayrı ayrı ve kombinasyon halinde TGF- β 3 ve 17 β -estradiol ilavesi yaparak ASKKH'lerde osteojenik farklılaşmayı indüklemek.

Hedef 5: ASKKH'lerin osteojenik farklılaşmasında standart hfOB-KM, yüksek OPG içeren KM'den ayrıca standart osteojenik farklılaşma medyumuna TGF- β 3 ve 17 β -estradiolün ayrı ayrı ve birlikte ilave edilmesi şeklinde oluşturulan farklılaştırma grupları arasında osteojenik farklılaşma bakımından karşılaştırmalar yapmak.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi, Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu tarafından 11/06/2018 tarihinde onaylandı (AKÜHADYEK-92-18).

2.2. Cihazlar ve Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, sarf malzemeler ve kimyasallar Tablo 2.1 ve Tablo 2.2’de belirtilmektedir.

Tablo 2.1. Kullanılan cihazlar.

Üretici	Model/Katalog No	Cihaz
Applied Biosystems	Veriti 96 well Cycler	Isıl döngüleyici
Applied Biosystems	ViiA7	Real-time PCR cihazı
Arçelik		Derin dondurucu
Beko		Mini buzdolabı
Biosan	Combi Spin FVL-2400N	Mikro santrifüj cihazı
Biosan	MR-12	Çalkalayıcı
Biosan	TDB-100	Kuru blok ısıtıcı
Biosan	MSH 300	Manyetik karıştırıcı
BioVision	Trans Illuminator 1000/20M	Jel görüntüleme sistemi
Deltalab		Kimyasal madde kabini
Drummond	4-131-201-E	Şarjlı otomatik pipetleyici
Gilson	Pipetman F144801	0,2-2 µL pipet
Gilson	Pipetman F144802	1-10 µL pipet
Gilson	Pipetman F123601	20-100 µL pipet
Gilson	Pipetman F123602	200-1000 µL pipet
HeraCell	150i	Karbondioksitli inkubatör
In Vitrogen	Qubit 2.0	Qubit florometri cihazı
Inolab	WTW pH720	pH metre

İndesit		Buzdolabı
İsolab	075.03.001	Neubauer hemositometri lamı
Nalgene	5100-001	Hücre dondurma konteynırı
Nikon	Eclipse TS100	Ters faz kontrast mikroskop
Nüve	ST 30	Çalkalamalı su banyosu
Nüve	NF 800 R	Santrifüj cihazı
Nüve	OT 012	Otoklav
Nüve	EN 500	Etüv
Olympus	DP25	Mikroskop kamerası
Panasonic	VIP Plus	Eksi seksen derin dondurucu
Precisa	XB 220 A	Hassas terazi
Teknomar	Chemocell LRCX-UV	Sınıf I biyogüvenlik kabini
Thermo Scientific	MicroCL 17-R	Mikro santrifüj cihazı
Thermo Scientific	Forma Direct Heat	Karbondioksitli inkubatör
Thermo Scientific	MSC-Advantage	Sınıf II biyogüvenlik kabini
Thermo Scientific	IEC Micromax RF	Santrifüj cihazı
Thermo Scientific	SL 16R	Santrifüj cihazı
Thermo Scientific	Multiskan GO	ELISA okuyucu
Thermo Scientific	N12391	Nano drop plate
Thermo Scientific	400 P	Güç kaynağı
Thermo Scientific	Minicell Primo EC320	Elektroforez jel sistemi
Uğur		Buzdolabı
Vestel		Derin dondurucu
Worthington	UN 1977	Sıvı azot tankı
Zeiss	Axio Observer Z1	Floresan ataçmanlı ters mikroskop
Zeiss	Axiocam 506 mono	Mikroskop kamerası

Tablo 2.2. Kullanılan sarf malzeme ve kimyasallar.

Üretici	Katalog Numarası	Ürün
Abcam	ab104139	DAPI'li floresan kapatma medyumu
Abcam	ab6308	Anti-Col1 primer antikor
Abcam	ab6719	Goat anti-rabbit Texas Red sekonder antikor
Abcam	ab6787	Goat anti-mouse Texas Red sekonder antikor
Abcam	ab7481	Keçi serumu
Abcam	ab33046	Anti-osteopontin primer antikor
Alfa Aesar	J60122	Alsiyan mavisi 8GX
Axygen	MCT-150-C	1,5 mL santrifüj tüpü
Beybi	2.409.001	10 mL enjektör
Biogems	5022822-10G	17β-Estradiol

Biomatik	A4025-500ML	Triton X-100
Biomax	D00320PR	Agaroz
Biowest	L0009-100	Amfoterisin-B (100X)
Biowest	S181H-500	FBS
Capricorn	TRY-1B10	Tripsin-EDTA (10X)
Capricorn	DMEM-12-HXA	DMEM-F12
Corning	CLS4488-200EA	10 mL serolojik pipet
Corning	CLS4487-200EA	5 mL serolojik pipet
Corning	CLS4489-200EA	25 mL serolojik pipet
Emboy		Sodyum hidroksit
Eppendorf	Qiagen 1050299	2mL santrifüj tüpü
Gibco	51500-056	ITS-X
Gibco	25030-024	L-Glutamin (200mM)
Gibco	15140-122	Penisilin-streptomisin
Gibco	PHZ1124	IBMX
Isolab	123.01.002	0,2 mL santrifüj tüpü
Isolab	3.078.03.001.500	0,5 mL santrifüj tüpü
Lonza	BE02-02F	Alfa MEM
Lonza	BE13-114E	Non-esansiyel amino asit
Merck	Millicell PEZGS0416	4 kuyucuklu EZ Slide
Merck	MilliEx SLGP033RS	0,22 um filtre
Merck	1.009.832.511	Absolut etanol
Merck	AB5603	Anti-Sox2 primer antikor
Merck	639K4517396	Oil Red O
Merck	1.040.051.000	Paraformaldehit
Merck	1.065.801.000	Di sodyum hidrojen fosfat dihidrat
Merck	1.064.041.000	Sodyum klorit
Merck	1.063.451.000	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
Merck	1.060.231.000	TAE buffer
Merck	A5533-25G	Alizarin Red S
Peprotech	100-36E-10UG	TGF-β3
R&D Systems	0233-FB	Temel fibroblast büyüme faktörü
Santa Cruz	Sc-2323	Sığır serum albumini
Santa Cruz	Sc-5279	Anti-Oct 3/4 primer antikor
Sigma	02650-100ML	Dimetil sülfoksit
Sigma	T6146-25G	Tripan mavisi
Sigma	I7378-5G	İndometasin
Sigma	G9422-10G	Beta gliserofosfat
Sigma	I0516-5MG	İnsülin
Sigma	D4902-100MG	Deksametazon
Sigma	A4403-100MG	L-Askorbik asit
Sigma	H2387-1L	HBSS toz
Sigma	D5523-1L	DMEM-LG toz
Sigma	D5648-10L	DMEM-HG toz

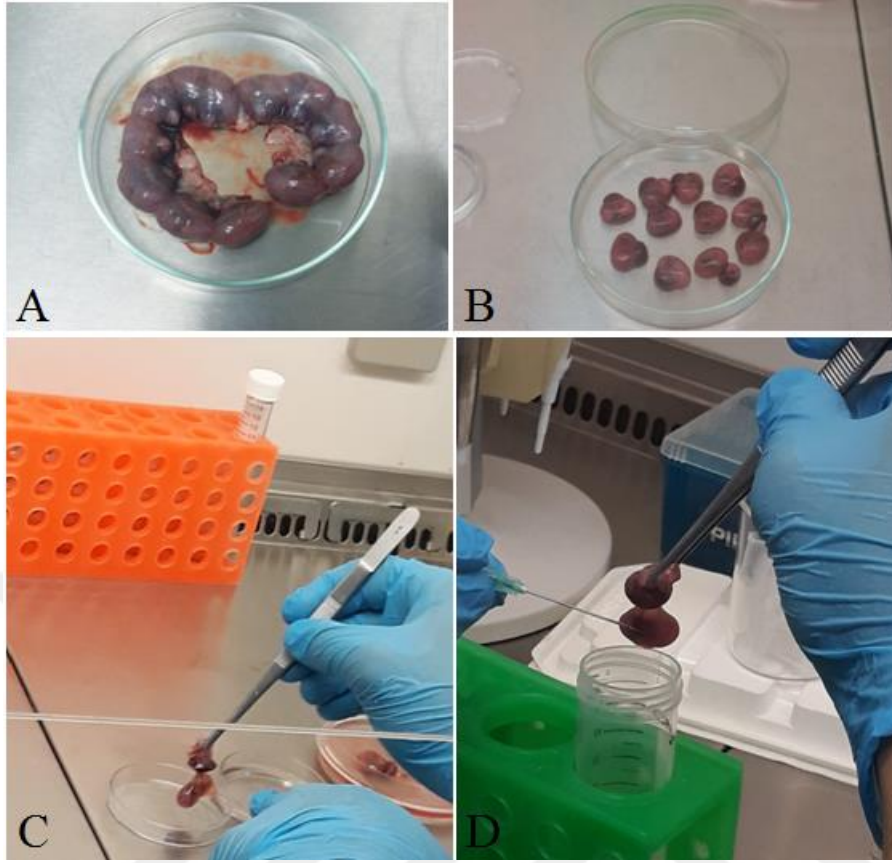
Sigma	P5607-100G	Proline
Sigma	P1379-500ML	Tween-20
TEKKİM	TK.200650.25001	Teksoll %96 alkol
TEKKİM	TK.010030.01000	Asetik asit
TEKKİM	TK.090250.02501	İzopropil alkol
Thermo Scientific	Nunclon 167008	96 kuyucuklu plaka
Thermo Scientific	Nunclon Delta 176740	4 kuyucuklu plaka
TPP	99500	Vakum filtrasyon sistemi
VWR	10062-872	T25 hücre kültür kabı
VWR	10062-860	T75 hücre kültür kabı
VWR	525-0610	50 mL steril santrifüj tüpü
VWR	525-0604	15 mL steril santrifüj tüpü
VWR	7342321	Doku kültür kabı
VWR	89041-376	1-200 µL pipet ucu
VWR	89041-370	100-1250 µL pipet ucu
VWR	53509-070	0,1-10 µL pipet ucu
VWR	20170-063	1,5 mL koyu santrifüj tüpü
VWR	27778-293	Sodyum hidrojen karbonat
VWR	83009-668	Real Time PCR Plate

2.3. Hayvanların Gebe Bırakılması

Çalışmada ASKKH'lerin izolasyonu için 4 adet 2-4 aylık Wistar ırkı dişi ratlar kullanıldı. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama Araştırma Merkezinde 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsünde, 26-28°C sıcaklık ve %30 ila 70 nem oranındaki kontrollü ortamda *ad libitum* su ve yem sağlanmış şekilde ratların bakımı gerçekleştirildi. Ratlarda günlük olarak aynı saatlerde (09:00-09:30) vaginal yıkama yöntemi ile östrus siklusları belirlendi. Vajinal sitoloji sonuçlarına göre proöstrus safhasında olduğu gözlenen dişi ratlar aynı gün akşam 17:00'da erkek ratla aynı kafese alınarak çiftleşmelerine izin verildi. Ertesi gün vaginal sitolojisinde sperm gözlenen ratların gebeliğin sıfırncı gününde oldukları kabul edildi ve bu hayvanların yedi gün süre ile östrus takiplerine devam edildi. Bu süreçte sürekli diöstrus gösteren ratların gebeliği doğrulandı.

2.4. ASKKH'lerin İzolasyonu

Gebeliğin 17. gününde dişi ratlar genel anestezi altında servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Yüzde 70 alkol içeren bir beher içerisinde dezenfekte edilen ratlar sınıf I biyogüvenlik kabinine aktarıldı. Sınıf I biyogüvenlik kabin içerisinde steril şartlarda sıçanın abdomeni orta hat boyunca ensize edilerek açıldı. Steril forseps ve makas yardımıyla içerisinde fetusların bulunduğu uterus çıkarılarak bir petri kabına konuldu (Şekil 2.1, A). Yıkama solusyonu [%2 penisilin-streptomisin ve %0,2 amfoterisin-B içeren PBS (Ca ve Mg içermeyen, pH 7.2)] ile dokular yıkanarak petri kabı içerisinde sınıf II biyogüvenlik kabinine taşındı. Yıkama solüsyonu içeren steril bir petri kabında amniyon kesesine zarar vermeden uterus ve koryon uzaklaştırıldı. Amniyotik kese içerisinde yer alan fetuslar ayrı bir steril petri kabına aktarıldı (Şekil 2.1, B). Örnekler en az iki kere yıkama solüsyonu ile yıkanarak kan ve diğer doku parçalarından arındırıldı. Amniyotik membran üzerinde vaskülarizasyonun az olduğu bir bölge seçilerek 22 gauge steril iğne ucu yardımıyla amniyotik membran delindi ve amniyon sıvısı 50 mL'lik steril santrifüj tüpü içerisinde toplandı (Şekil 2.1; C, D).



Şekil 2.1. Amniyon sıvısının toplanması. **A:** Uterus dokusu steril bir petri kabına alındı. **B:** İçerisinde fetus bulunan amniyon kesesi ayrı bir petri kabına aktarıldı. **C:** Örnekler antibiyotikli yıkama solüsyonlarından geçirilerek yıkandı. **D:** Amniyon kesesi 22 gauge iğne ile delindi ve amniyon sıvısı steril bir santrifüj tüpü içerisine toplandı.

Toplanan amniyon sıvısı 250 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet ASKKH kültür medyumu [%20 fötal sığır serumu (FBS), %1 penisilin-streptomisin, %0,1 amfoterisin-B, %1 L-glutamin, 20 ng/mL basic FGF (bFGF) içeren düşük glikoz-Dulbecco'nun modifiye minimum esansiyel medyumu (DMEM-LG)] ile süspanse edilerek 25 cm²'lik flasklara hücrelerin ekimi yapıldı.

2.5. Hücre Kültürü

Hücreler %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde ve 37 °C' de inkübe edildi. Ekim işleminden 48 saat sonra ilk medyum değişikliği yapıldı. Günlük olarak ters faz kontrast mikroskop altında hücreler gözlemlendi ve hücreler %70-80 konfluense ulaşana kadar 3 günde bir kültür medyumunu değiştirildi. Konfluense ulaşan hücreler pasajlandı.

Hücrelerin pasajlanması için kültür kaplarından medyum uzaklaştırıldı ve flask steril PBS ile yıkandı. Hücreleri içeren kültür kaplarına tripsin-EDTA solüsyonu (%0,05 tripsin, %0,02 EDTA) eklendi. Hücreler 37°C'de yaklaşık 5 dk inkübe edilerek yüzeyden ayrılması sağlandı. Ters faz kontrast mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlemlendikten sonra tripsin-EDTA aktivitesini durdurmak için kültür kabına %10 FBS içeren hücre kültür medyumunu ilave edildi. Hücreler 15 mL'lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve 250 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre peleti 1 mL hücre kültür medyumunu ile süspansiyon edildi. Bu süspansiyondan 30 µL örnek alınarak eşit miktarda tripan mavisi boya solüsyonu (%0,4) ile iyice karıştırıldı. Bu karışımdan 10 µL alınarak Neubauer lamı üzerinde 4 farklı karede hücre sayımı yapıldı. Hücreler 25 cm²'lik yeni kültür kaplarına 5x10⁴ hücre/flask konsantrasyonunda ekilerek pasajlama işlemi tamamlandı. Bu işlem beşinci pasaja kadar sürdürüldü.

2.6. Büyüme Eğrisi Analizi

ASKKH'lerin farklı pasajlardaki çoğalma profilini belirlemek amacıyla 3 ve 5. pasajlarda büyüme eğrisi analizleri yapıldı. Bu çalışma için farklı hayvanlardan izole edilen hücrelerden toplanan örnekler, içerisinde ASKKH kültür medyumunu bulunan 4 kuyucuklu plakalara 15x10³ hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekildi. Hücreler 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Her üç günde bir medyum değişikliği yapıldı.

Çalışmada her bir örnek için 14'er kuyucuk kullanıldı. İki günde bir kuyucukların 2'ser tanesinden hücreler toplanarak sayıldı ve ortalama değerleri not edildi. On dört günün sonunda tüm zaman aralıklarında yapılan sayımlara dayanarak büyüme eğrisi grafikleri oluşturuldu.

2.7. Çoklu Farklılaştırma Çalışmaları

Çalışmamızda üçüncü pasajdaki ASKKH'lerin çok yönlü farklılaşma potansiyelleri değerlendirildi. *In vitro* kültür ortamında hücreler özel farklılaştırma medyumları kullanılarak osteojenik, adipojenik ve kondrojenik hücrelere farklılaştırıldılar. Farklılaştırma deneyleri 4 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler üzerinde yapıldı. Her çalışmada bir kuyucuk negatif kontrol olarak ayrıldı. ASKKH'lerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmaları sırasıyla Alizarin Red S, Oil Red O ve Alsiyan mavisi boyamaları ile doğrulandı.

2.7.1. Osteojenik Farklılaştırma ve Doğrulanması

2.7.1.1. Osteojenik Farklılaştırma

Üçüncü pasajdaki hücreler 4 kuyucuklu plaklara 15×10^3 hücre/cm² yoğunluğunda ekildi. Negatif kontrol için ayrılan kuyucuğa hücre kültür medyumunu (%5 FBS, %1 penislin-streptomisin içeren α -MEM) ilave edildi. Diğer kuyucuklara ise α -MEM içerisinde %5 FBS, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin, 0,1 μ M dekzametazon, 50 μ M L-askorbik asit ve 10 nM β -gliserofosfat içeriğinde hazırlanmış olan osteojenik farklılaştırma medyumunu eklendi. Her 3 günde bir medyum değişikliği yapılarak 21 gün boyunca hücreler osteojenik farklılaştırma medyumunu içerisinde inkübe edildi (Pittenger vd. 1999).

2.7.1.2. Alizarin Red S Boyaması

Osteojenik farklılaştırmanın doğrulanması için Alizarin Red S boyama yöntemi tercih edildi. Boya solüsyonu 1 gram Alizarin Red S'in 50 mL ultra saf distile su içerisinde çözündürülüp 1 N NaOH ile pH'ı 4,2'ye ayarlanarak hazırlandı. Boya solüsyonu kullanılmadan önce filtrelendi. Farklılaştırma çalışmalarının sonrasında kuyucuklardaki medyum uzaklaştırıldı. Hank'in dengeli tuz solüsyonu (HBSS) ile yıkama işleminden sonra hücreler % 4 paraformaldehit (PFA) ile tespit edildi. Yüzde 4 PFA solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra distile su ile kuyucuklar yıkandı. Hücreler 80 mM Alizarin Red S (pH:4,2) ile 30 dakika boyandı. Boya solüsyonu uzaklaştırıldı ve kuyucuklar ultra saf distile su ile yıkandı. Hücrelerdeki boyanma profili ters faz kontrast mikroskop altında değerlendirildi ve mikroskop kamerası ile fotoğraflandı (Pittenger vd. 1999).

2.7.2. Adipojenik Farklılaştırma ve Doğrulanması

2.7.2.1. Adipojenik Farklılaştırma

Üçüncü pasajdaki hücreler 4 kuyucuklu plaklara 15×10^3 hücre/cm² yoğunluğunda ekildi. Negatif kontrol için ayrılan kuyucuğa hücre kültürü medyumunu (%10 FBS, %1 penislin-streptomisin içeren DMEM-LG) eklendi. Adipojenik farklılaştırma için hücreler 1, 3, 5, 9, 11, 13, 17 ve 19. günlerde adipojenik indüksiyon medyumunu (AIM); 7 ve 15. günlerde ise adipojenik idame medyumunu (AMM) kullanılarak toplamda 21 gün süre ile kültüre edildi. AIM DMEM-LG içerisinde %10 FBS, %1 penislin-streptomisin, 1 μ M dekzametazon, 500 μ M izobütil 4 hidroksibenzoat (IBMX), 100 μ M indometasin ve 10 μ g/mL insülin içerecek şekilde; AMM ise DMEM-LG içerisinde %10 FBS, %1 penislin-streptomisin ve 10 μ g/mL insülin kompozisyonunda hazırlandı (Pittenger vd. 1999).

2.7.2.2. Oil Red O Boyaması

Adipojenik farklılaştırmayı doğrulamak için Oil Red O boyaması yapıldı. Boyama için 60 mg Oil Red O, 20 mL izopropil alkol içerisinde çözündürülerek 12 mM'lık stok solüsyon hazırlandı. Sonrasında stok solüsyonunun 2/3 oranında ultra saf distile su ile dilüe edilmesiyle boyama solüsyonu hazırlandı. Boyama solüsyonu hazırlanmasının ardından filtre edildi ve en az 2 saat dinlendirildi. Hücre kültür medyumunu kuyucuklardan uzaklaştırıldıktan sonra önce PBS ile sonrasında da %70'lik etanol ile yıkama yapıldı. Yüzde 10 tamponlu nötral formaldehit kullanılarak hücreler 20 dk süre ile tespit edildi. Tespit solüsyonu uzaklaştırıldı ve önce PBS ile sonra %70'lik etanol ile birer yıkama daha yapıldı. Yıkamadan sonra kuyucuklara Oil Red O boyama solüsyonu ilave edildi ve 25 dk beklendi. Boyama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra hücreler önce %70'lik etanol ile sonrasında ultra saf distile su ile yıkandı. Hücrelerdeki boyanma profili ters faz kontrast mikroskop altında değerlendirildi ve mikroskop kamerası ile fotoğraflandı (Pittenger vd. 1999).

2.7.3. Kondrojenik Farklılaştırma ve Doğrulanması

2.7.3.1. Kondrojenik Farklılaştırma

Üçüncü pasajdaki hücreler 4 kuyucuklu plaklara 15×10^3 hücre/cm² yoğunluğunda ekildi. Negatif kontrol için ayrılan kuyucuğa hücre kültürü medyumunu (%5 FBS, %1 penislin-streptomisin içeren DMEM-HG) koyuldu. Diğer kuyucuklara ise DMEM-HG içerisinde %5 FBS, 0,1 mM deksametazon, 50 mM L-askorbik asit, %1 ITS-premix, 1 mM sodyum pirüvat, 0,35 mM proline, %1 non esansiyal amino asit, %1 penislin streptomisin ve 10 ng/mL TGF- β 3 içeriğinde hazırlanan kondrojenik farklılaştırma medyumunu ilave edildi. Yirmi bir gün süre ile 3 günde bir medyum değişikliği yapılarak hücreler kondrojenik farklılaştırma medyumunu içerisinde inkübe edildi.

2.7.3.2. Alsiyan Mavisi Boyaması

Kondrojenik farklılaştırma sürecinde oluşan glikozaminoglikan formasyonunu görüntülemek için alsiyan mavisi boyama yöntemi kullanıldı. Boya solüsyonunu hazırlamak için 1 gram alsiyan mavisi 97 mL distile su içerisinde çözdürüldü. Alsiyan mavisi tamamen çözüldükten sonra karışıma 3 mL asetik asit ilave edildi. Solüsyonun pH'ı 2,5'a ayarlandı ve filtrelendi. Hücreler %95'lik metanol ile 20 dk tespit edildikten sonra alkol kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve distile su ile yıkama yapıldı. Ardından alsiyan mavisi solüsyonu ile 30 dk boyama uygulandı. Kuyucuklar tekrar distile su ile yıkandıktan sonra ters faz kontrast mikroskop altında incelendi ve mikroskop kamerası ile fotoğraflandı (Kibria 2018).

2.8. hfOB 1.19 Hücre Kültürü

Çalışmada osteoblast hücre hattı olan hfOB 1.19 hücreleri (ATCC, 1.19 CRL-11372, pasaj 7) kullanıldı. Hücreler 75 cm² yüzey alanına sahip kültür kaplarına 1x10⁶ hücre/kültür kabı yoğunluğunda ekildi. Hücreler %10 FBS, %1 penislin-streptomisin ve 2,5 mM L-glutamin içeren DMEM F-12 içeriğinde hazırlanmış olan hfOB kültür medyumu ile kültüre edildi.

2.9. hfOB Hücrelerinden Koşullandırılmış Medyum Eldesi

Freshney'in yöntemine benzer şekilde hfOB hücrelerinden KM elde edildi (Freshney 2005). Hücreler, pasajlandıktan sonra hfOB kültür medyumu içeren kültür kaplarında 24 saat kültüre edildi. Bu sürenin sonunda kültür medyumu uzaklaştırıldı ve kültür kapları steril PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra kültür kaplarına serum içermeyen hfOB kültür medyumu gruplara özgü eklemeler yapılarak kültür kaplarına koyuldu ve hücreler 48 saat süre ile inkubasyona bırakıldı. Sürenin sonunda kültür medyumu toplanarak 50 mL'lik steril santrifüj tüplerinde toplandı ve 1000 g'de 10

5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant 50 mL'lik yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve tekrar kullanılana kadar -80°C'de saklandı.

KM elde etmek için 4 deney grubu oluşturuldu. Oluşturulan gruplar aşağıda gösterilmiştir.

- 1- Kontrol Grubu: hfOB medyumunu kullanıldı.
- 2- TGF-β3 Grubu: hfOB kültür medyumuna 10 ng/mL TGF-β3 eklendi.
- 3- 17β-estradiol Grubu: hfOB kültür medyumuna 10 nM 17β-estradiol eklendi.
- 4- TGF-β3 + 17β-estradiol Grubu: hfOB kültür medyumuna 10 ng/mL TGF-β3 ve 10 nM 17β-estradiol eklendi.

Bu gruplardan elde edilen koşullandırılmış medyumlarda sandviç ELISA yöntemi ile OPG seviyeleri karşılaştırıldı. Sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere, OPG seviyesi en yüksek çıkan grup ve kontrol grubundan KM elde edilmesine devam edilerek, toplanan örnekler daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -80°C'de saklandı. KM örnekleri hücre kültüründe tekrar kullanılmadan önce 0,22 µ'luk filtreden geçirildi.

2.10. Sandviç ELISA

Koşullandırılmış medyum örneklerinde daha sonraki osteojenik farklılaştırma deneylerinde kullanılmak üzere hangi gruptan daha yüksek OPG seviyesinin elde edildiğini görmek için sandviç ELISA yöntemi ile protein seviyeleri ölçüldü. Bu işlem için ticari bir ELISA kiti (Abcam, ab100617), üreticisinin talimatları takip edilerek kullanıldı. Analizin öncesinde reaktif solüsyonlar aşağıdaki şekilde hazırlandı:

- Yıkama Solüsyonu:

20X yıkama solüsyonu oda sıcaklığında içerisindeki kristaller kaybolana kadar bekletildi.

20X Yıkama Solusyonu	20 ml
Distile Su	380ml

- Biyotinlenmiş OPG Saptama Antikoru:

Antikor içeren viyal santrifüj edildikten sonra 100 µL “Assay Diluent B” ilave edildi. Pipetaj yaptıktan sonra hafifçe çalkalayarak “konsantre antikor solüsyonu” haline getirildi. Konsantre antikor solüsyonu, kullanılmadan önce “Assay Diluent B” ile 80 kat dilüe edilerek kullanıldı.

- 1X Assay Diluent B:

5X solüsyondan bir miktar alındı ve distile su ile 5 kat sulandırıldı.

- 1X HRP-Streptavidin Solüsyonu:

500X HRP-Streptavidin içeren viyal santrifüj edildikten sonra 1X Assay Diluent B ile 500 kat sulandırıldı.

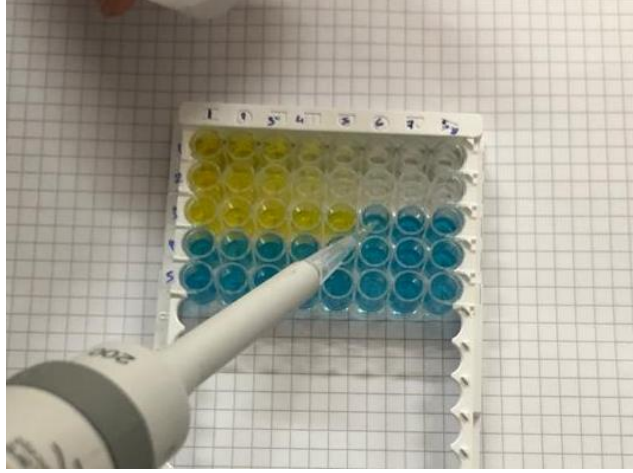
Standart solüsyonlarının hazırlanışı:

- OPG standart viyali santrifüj edildi.
- 200 µL 1X Assay Diluent B stok standarda eklendi ve 1,5 mL’lik santrifüj tüpüne aktarıldı.
- Tüp yavaşça karıştırıldı.
- 1’den 7’ye kadar 1,5 mL’lik santrifüj tüpleri numaralandırıldı.
- 545,6 µL 1X Assay Diluent B’ye 10 µL stok standart eklendi ve karıştırıldıktan sonra 1 numaralı tüpe aktarıldı.
- Tüm tüplere 400 µL 1X Assay Diluent B eklendi.
- 1 numaralı tüpten 200 µL alındı ve 2 numaralı tüpe aktarılıp iyice karıştırıldı.

- 2 numaralı tüpten 200 μ L alındı ve 3 numaralı tüpe aktarılıp iyice karıştırıldı.
- Bu şekilde tüm tüpler doldurularak standart solüsyonları hazırlandı.

Sandviç ELISA protokolü:

1. Tüm materyaller oda sıcaklığına getirildi.
2. Kuyucuklara 100'er μ L standart veya örnek eklendi.
3. Her standart basamağı ve örnek için 2 tekrar yapıldı.
4. Plakanın üzeri kapatıldı ve 2,5 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkube edildi.
5. Solüsyonlar kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve 4 kez 300 μ L yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Son yıkamadan sonra plaka ters çevrilerek kağıt havlu üzerine vurularak yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı.
6. Bütün kuyucuklara 100 μ L biyotinlenmiş OPG saptama antikoru eklendi. Çalkalayıcı üzerinde 1 saat oda sıcaklığında inkube edildi.
7. Solüsyonlar kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve 4 kez 300 μ L yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Son yıkamadan sonra plaka ters çevrilerek kağıt havlu üzerine vurularak yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı.
8. Bütün kuyucuklara 100 μ L 1X HRP-Streptavidin solüsyonu eklendi ve 45 dk çalkalayıcı üzerinde inkube edildi.
9. Solüsyonlar kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve 4 kez 300 μ L yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Son yıkamadan sonra plaka ters çevrilerek kağıt havlu üzerine vurularak yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı.
10. Bütün kuyucuklara 100 μ L TMB One-Step Substrate Reaktif eklendi. Karanlıkta 30 dk çalkalayıcı üzerinde inkube edildi.
11. Bütün kuyucuklara 50 μ L Stop Solüsyonu eklendi ve kısa süre içerisinde 450 nm'de okuma yapıldı (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Sandviç ELISA. Stop solüsyonun ilavesinin hemen ardından kuyucuklarda gözlenen renk değişimi (**Mavi:** stop solüsyonu eklenmemiş kuyucuklar. **Sarı:** Stop solüsyonu eklenmiş kuyucuklar) gözlemlendikten sonra örnekler 450 nm’de ELISA okuyucuda okutuldu.

Kullanılan kitin sensitivitesi 1pg/mL iken ölçüm aralığı 1,23 pg/mL ile 900 pg/mL arasındadır. Okumada standartlardan elde edilen değerler ile CurveExpert 1.3 yazılımı kullanılarak bir standart eğrisi oluşturuldu. Oluşturulan dördüncü derece polinomial fit standart eğrisi kullanılarak aynı programda diğer örneklerden elde edilen okuma değerleri girildi ve örneklerde bulunan OPG miktarı pg/mL olarak belirlendi.

2.11. Osteojenik Farklılaştırma Deney Çalışmaları

TGF- β 3, 17 β -estradiol ve yüksek seviyede OPG içeren KM’nin osteojenik farklılaştırma üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla ASKKH’ler ile osteojenik farklılaştırma çalışmaları yapıldı. Çalışmalarda real-time PCR örnekleri elde etmek için 25 cm²’lik hücre kültür kaplarına; Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikim miktarlarını belirlemek amacıyla 4 kuyucuklu plakalara; immunfloresan boyamalar için ise 4 kuyucuklu EZslides’lara 5. pasajdaki ASKKH’lerin ekimi yapıldı.

Hücrelerin %70-80 konfluense ulaşmasının ardından deney gruplarına göre belirlenen medyumlar ile 14 ve 21 günlük farklılaştırma çalışmaları yapıldı. Çalışmalarda 4 kuyucuklu plakalara 15×10^3 hücre/cm² yoğunluğunda; 25 cm²'lik kültür kaplarına ise 35×10^4 hücre/kültür kabı yoğunluğunda ekim yapıldı. Hücreler %5 CO₂ ve 37°C ortamında, her 3 günde bir medyum değişikliği yapılarak kültüre edildi.

Çalışma grupları:

1. Pozitif Kontrol Grubu (Poz Kont): Hücreler standart osteojenik medyumla kültüre edildi.
2. TGF-β3 Grubu (TGF): Osteojenik medyuma 10 ng/mL TGF-β3 ilave edildi.
3. 17β-estradiol grubu (Est): Osteojenik medyuma 10 nM 17β-estradiol eklendi.
4. TGF-β3 + 17β-estradiol Grubu (TGF-Est): Osteojenik medyuma 10 ng/mL TGF-β3 ve 10 nM 17β-estradiol ilave edildi.
5. hfOB-KM + Normal Medyum Grubu (hfN): Hücreler hfOB'lerden elde edilen KM ve standart ASKKH kültür medyumunun 1:1 oranında karıştırılması ile elde edilen medyumla kültüre edildi.
6. hfOB-KM + Osteojenik Medyum Grubu (hfO): Hücreler hfOB'lerden elde edilen KM ve osteojenik farklılaştırma medyumunun 1:1 oranında karıştırılması ile elde edilen medyumla kültüre edildi.
7. OPG-KM + Normal Medyum Grubu (OPN): Hücreler yüksek OPG konsantrasyonuna sahip gruba ait KM'nin ASKKH büyüme medyumuna ile 1:1 karıştırılmasından elde edilen medyumla kültüre edildi.
8. OPG-KM + Osteojenik Medyum Grubu (OPO): Hücreler yüksek OPG konsantrasyonuna sahip gruba ait KM'nin osteojenik farklılaştırma medyumuna ile 1:1 karıştırılmasından elde edilen medyumla kültüre edildi.
9. Negatif Kontrol Grubu (Neg): Hücreler ASKKH medyumuna ile kültüre edildi.

2.12. Alizarin Red S Boyamasının Sayısal Değerlendirmesi

Dört kuyucuklu plakalarda ASKKH'lerde 14 ve 21 gün süre ile yapılan osteojenik farklılaştırma çalışmalarının ardından daha önce 2.6.1.2. numaralı başlıkta tarif edilen yöntemle Alizarin Red S boyaması yapıldı. Boyama sonrasında yapılan fotoğraflama işlemi sonrasında Alizarin Red S boyaması sayısal olarak değerlendirildi (Gregory vd. 2004).

Alizarin Red S Boyama Sayısal Değerlendirme Protokolü

1. Kuyucuklara 800µl %10'luk asetik asit solüsyonu eklendi.
2. Plakalar hafifçe sallanılarak 30 dk oda sıcaklığında inkube edildi.
3. Sürenin sonunda kuyucukların yüzeyi iyice kazınarak içerikleri 1.5 mL'lik santrifüj tüplerine alındı (Şekil 2.3, A).
4. Tüpler 30 sn vortekslendi.
5. Tüplerin ağzı parafilmle sıkıca kapatıldı ve tüpler kuru blok ısıtıcıda 85 °C'ye kadar ısıtıldı (Şekil 2.3, B).
6. Örnekler buz blokları üzerinde 5 dk soğutuldu.
7. Örnekler 17000 g'de 15 dakika santrifüj edildi (Şekil 2.3, C).
8. Her bir tüpten 500 µl süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı.
9. Yeni tüplere 200 µl %10'luk amonyum hidroksit solüsyonu eklendi ve solüsyon iyice pipete edildi.
10. 96 kuyucuklu plakalara her örnekten üç tekrar olacak şekilde her kuyucuğa 150µl örnek eklendi (Şekil 2.3, D).
11. ELISA okuyucuda 405 nm de okuma yapıldı.



Şekil 2.3. Alizarin Red S boyamasının sayısal olarak değerlendirilmesi. **A:** Kuyucuklar asetik asit ile inkube edildikten sonra yüzeyleri iyice kazınarak içerikleri santrifüj tiplerine aktarıldı. **B:** Örnekler kuru blok ısıtıcıda 85°C'ye kadar ısıtıldı. **C:** Örnekler 17000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. **D:** Örnekler amonyum hidroksit ilavesinden sonra iyice pipete edildi ve 96 kuyucuklu plakalara her örnekten üç tekrar olacak şekilde her kuyucuğa 150µl örnek eklendi.

Örneklere ait kuyucuklarda elde edilen okuma değerlerinden boş (blank) kuyucukların ortalama değerleri çıkartıldı. Daha sonra deney gruplarından elde edilen okumalar negatif kontrol örneklerinden elde edilen okumaların ortalamasına göre karşılaştırılarak optik yoğunluk (OD) değerleri elde edildi. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı:

$$OD = \left(\frac{\text{Örnek Absorbans Değeri}}{\text{Kontrol Absorbans Değeri}} \right) \times 100$$

2.13. Real-Time PCR

Çalışmada hem ASKKH'lerin karakterizasyonunda hem de osteojenik farklılaştırma deney gruplarının değerlendirilmesinde real-time PCR analizleri kullanıldı. ASKKH'lerin karakterizasyonu kapsamında 1, 3 ve 5. pasajdaki hücrelerde pluripotent hücre belirteçleri olan SOX2, Nanog ve OCT 3/4 genlerinin; mezenkimal

hücre belirteçleri olan CD90, CD105 ve CD44 genlerinin ve hematopoietik belirteçler olan CD45 ve CD34 genlerinin ifadeleri incelendi. Osteojenik farklılaştırma çalışmalarından elde edilen örneklerde ise COL1, DCN, RUNX2 ve SPP1 genlerinin ifadeleri gösterildi. Tüm çalışmalarda referans gen olarak GAPDH geni kullanıldı. Kullanılan belirteçlerin primerleri FastPCR Professional 6.1.2 beta yazılımı yardımıyla tasarlandı (Kalendar vd., 2009). Primerler, kullanılmadan önce 10 pmol/μL konsantrasyonuna seyreltildi ve her birinin erime sıcaklığı (T_m) gradient PCR ile tespit edildi. Çalışmada kullanılan primerlerin dizilimleri ve T_m değerleri Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3. ASKKH'lerin karakterizasyonunda ve osteojenik farklılaştırma çalışmalarının değerlendirilmesinde kullanılan primerler ve özellikleri.

Gen	İleri (5'→3')	Geri (5'→3')	T _m (°C)
SOX2	GGCGGAAAACCAAGACGCTC	TGTAGCTGCCGTTGCTCCAGC	58
OCT 3/4	CAGACAACCATCTGCCGCTTCG	CACCAGGGTCTCCGATTGCA	58
NANOG	TGCTACTGAGATGCTCTGCAC	CCTGAGAGAACACAGTCCGCA	58
CD90	GGTCCTTACTCTAGCCAACTTCAC	AACCAGCAGGCTTATGCCACC	58
CD105	GCGTCACACTTGAATGGCAACC	GGATGAGAACGGCATCCCCA	58
CD44	GCATCCAACACCTCCCACTATGAC	CTGGTCCATCGAAGGAATTGGGTA	58
CD45	GATGTACCACCAGGGACTCACAA	TGTAGAGGACTTCCGCAGCAC	58
CD34	GCCATCTCAGAGACCACGGTC	GGTGGAGTGTTCCACTTCTGGA	58
COL1	AAACGGGAGGGCGAGTGCTGTC	CCAGGCTGTCCAGGGATGCCA	60
SPP1	TGACCCATCTCAGAAGCAGAA	ACAGAATCCTCGCTCTCTGCA	60
RUNX2	CCATGGTGGAGATCATCGCGGAC	GGGCTACAACCTTGAAGGCCA	60
DCN	GCATATTCTCAAGGTCTGCCCA	CCACAACGGTGATGCTATTGAAGC	60

GAPDH	GAACGGATTGGCCGTATCGGA	GATGTTAGCGGGATCTCGCTCC	58-
			60

2.13.1. RNA İzolasyonu İçin Örneklerin Hazırlanması

ASKKH'lerin karakterizasyonu için belirtilen pasajların sonunda, osteojenik farklılaştırma çalışmaları için ise deneyin sonlandırıldığı gün pasajlama işleminde tarif edildiği şekilde hücreler tripsin-EDTA solüsyonu yardımıyla yüzeyden ayrıldı. Tripsin-EDTA aktivasyonu FBS içeren medyum eklenerek durduruldu ve örnekler santrifüj edildi. Her bir örnek için hücre peleti 1 mL kültür medyumunu ile süspanse edildi ve 1,5 mL'lik ayrı bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Mikro santrifüj cihazında 10 dk 300 g'de santrifüj edilen örneklerin süpernatantı tamamen uzaklaştırıldı ve dipte kalan pelet 1,5 mL santrifüj tüpü içerisinde RNA izolasyonu yapılana kadar dondurularak -80°C'de saklandı.

2.13.2. RNA İzolasyonu

Total RNA ekstraksiyonu, ticari bir kit yardımıyla (TRIzol Reagent, Thermo 15596026) üreticisinin talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirildi. Bu süreçte aşağıda belirtilen protokol uygulandı:

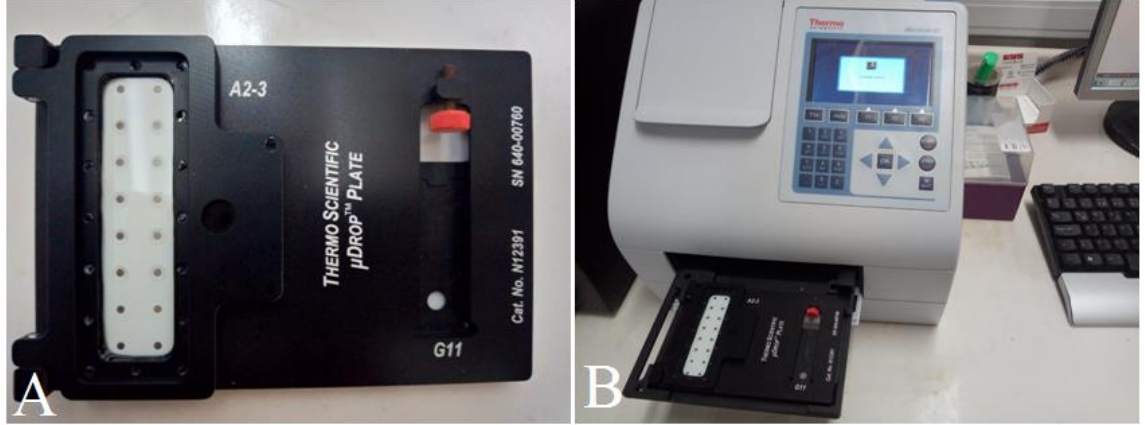
- Hücre peleti santrifüj edildi ve tüpte kalan sıvı varsa çıkartıldı.
- Örnekler 200 µl PBS eklendi.
- Örneklerin üzerine 1000 µl Lizis Buffer eklendi. İyice pipetaj yapıldıktan sonra 10 dk oda sıcaklığında inkube edildi.
- Tüplere 200 µl kloroform : izoamil alkol alkol karışımı (49:1) eklendi ve iyice pipetaj yapıldı. İki dk inkube edildi.

- Tüpler 4°C'ye getirilen mikro santrifüj cihazında 12000 g'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda ortada beyaz bir katman ile ayrılmış 2 faz halinde altta DNA, üstte RNA içeren kısımlar kalacak şekilde ayrıştırma yapıldı. Hattın üst kısmında kalan RNA içeren sıvı yeni tüplere aktarıldı.
- Tüplere, toplanan örnek miktarının 1,25 katı kadar saf alkol eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Bir kolon tüpe elde edilen lizattan 700 µl eklendi ve tüp, 12000 g 'de 20 saniye santrifüj edildi. Kolon tüpün alt kısmına geçen sıvı uzaklaştırıldı. 5. basamakta toplanan lizatın tamamı kullanılabildiği kadar işleme devam edildi.
- Kolona 700 µl yıkama solüsyonu 1 eklendi ve 12000 g 'de 20 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında dibeye geçen sıvı uzaklaştırıldı.
- Kolona 600 µl yıkama solüsyonu 2 eklendi ve 12000 g 'de 20 saniye santrifüj edildi. Tüpün altına geçen sıvı uzaklaştırıldıktan sonra işlem bir kez daha tekrarlandı.
- Kolon 17000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Kolon tüpün alt haznesi çıkartılıp üst kısım 1.5 ml'lik yeni bir santrifüj tüpü üzerine oturtuldu. Kolon filtresinin tam ortasına 30 µl DEPC su (60°C) eklendi.
- Tüpler 12000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve dietil pirokarbonat'lı (DEPC) su içerisinde RNA içeren solüsyonun alttaki santrifüj tüpüne geçmesi sağlandı.

1,5 ml'lik santrifüj tüpüne çöken RNA solüsyonunda DNA olup olmadığı belirlendikten ve kimyasal kirlilik kontrolü yapıldıktan sonra (2.13.3. numaralı basamak), örnekler bu tüpler içerisinde -80°C'de saklandı.

2.13.3. DNA Kontaminasyonu ve Kimyasal Kirliliğin Kontrolü

RNA izolasyonu işlemi sonrasında elde edilen örnekler MultiScanGo (Thermo Scientific) cihazında μ Drop Plaka kullanılarak DNA kontaminasyonu ve kimyasal kirlilik yönünden kontrol edildi. Plaka üzerindeki yuvalardan iki tanesine blank örnek olarak 5 μ L DEPC su damlatıldı. Diğer yuvalara da her bir RNA örneğinden 5'er μ L damlatıldı ve plaka kapatıldı (Şekil 2.4, A). Cihaza yerleştirilen plakada DNA, RNA varlığı için 260/280 nm'de; kimyasal kirlilik için ise 260/230 nm'de okuma yapıldı (Şekil 2.4, B).



Şekil 2.4. DNA kontaminasyonu ve kimyasal kirliliğin kontrolü. A. μ Drop plakasının yuvalarına 4'er μ L örnek damlatıldı. B. ELISA okuyucuda absorbans değerleri okutuldu.

2.13.4. RNA Miktar Tayini

Kontrollerin ardından 260/280 nm'de yapılan okumada 1,9'dan; 260/230nm'de yapılan okumada da 1,5'ten yüksek sonuç alınan örnekler kullanıldı. Total RNA miktarının tayini için Qubit RNA HS Assay Kiti firmanın talimatlarına göre, Qubit 2.0 Florometre cihazıyla ölçüldü. İşlem sonrasında cDNA izolasyonu aşamasına

geçilmeden önce örneklerde eşit hacim içerisinde eşit miktarda total RNA olmasını sağlayacak şekilde sulandırmalar yapıldı.

2.13.5. Komplement DNA Sentezi

Komplement DNA (cDNA) sentezi öncesinde RNA örneklerindeki olası DNA kontaminasyonunu elimine etmek için RNAaz içermeyen, DNAaz I ile örnekler muamele edildi. İşlem için 1 µg total RNA, 1 µL MgCl₂ içeren 10X Reaksiyon Solüsyonu, 1 µL DNaz I (1 ünite), RNaz içermeyen DEPC su eklenerek toplam 10 µL hacminde solüsyon hazırlandı. Santrifüj sonrası, tüpler içerisinde hazırlanan karışım, 37 °C'de 30 dk inkübe edildi. Sonrasında tüplere 1 µL 50 mM EDTA eklenmesinin ardından örnekler 10 dk 65 °C'de inkübe edildi ve DNaz I enzimi inhibe edildi.

Maxima First Strand cDNA sentez kiti, cDNA çalışmalarında üreticisinin talimatlarına uygun şekilde kullanıldı. Bir µg RNA içeren santrifüj tüplerine 1 µL Oligo (dT)18 eklendi ve örnekler 5 dk süre ile 65 °C'de inkübe edildi. cDNA sentezi için 5 µL 5X reaksiyon buffer solüsyonu, 1 µL Ribolock RNaz inhibitörü (20 U/ µL), 2 µL 10 mM dNTP karışımı, 1 µL RevertAid H Minus M-MuLV Revert Transkriptaz (200 U/ µL) ve içerisinde 1 µg RNA'dan oluşan toplam 20 µL hacimdeki reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımı karıştırıldıktan sonra örnekler ilk olarak 42°C 'de 60 dakika; ardından da 70°C' de 5 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA kullanılabilecek kadar -80°C'de muhafaza edildi.

2.13.6. Real-Time PCR Analizi

Analizler Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Teşhis ve Analiz Laboratuvarında bulunan Applied Biosystems ViiA 7 cihazı kullanılarak yapıldı. Çalışmada her örnek için iki tekrar uygulandı. İki tekrar arasında fark görülen örneklerde 3. tekrara gidildi.

Çalışma öncesinde cDNA örnekleri 1/10 oranında sulandırıldı. Analizlerde RealQ Plus 2X Master Mix Green Rox kiti kullanıldı. Doksan altı kuyucuklu PCR plakalarının kuyucuklarına 6,25 µL RealQ Master Mix karışımı, 0,25 µL ileri primer, 0,25 µL geri primer, 2 µL cDNA ve 3,75 µL su içeriğindeki reaksiyon karışımı eklendi. Üzeri optik geçirgen bir film bant ile kapatılan plaka 1700 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek kabarcık oluşumunun önüne geçildi. Ardından karanlık ortamda real-time PCR cihazına koyulan örneklerde analizler yapıldı.

Real-time PCR analizinde ayrılma, bağlanma ve uzama olmak üzere 3 aşamada toplam 40 döngü yapıldı ve olası bir DNA kontaminasyonu veya primer dimerleşmesi varsa görebilmek adına erime eğrisi analizi de gerçekleştirildi (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. Real-time PCR analizi aşamaları.

Aşama	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Düzenleme Aşaması	1	60°C	1 dk
		95°C	15 dk
PCR Aşaması	40	95°C	20 sn
		58-60°C*	30 sn
		72°C	45 sn
Erime Eğrisi	1	95°C	15 sn
		60°C	1 dk
		95°C	15 sn

*: ASKKH’lerin karakterizasyonu çalışmalarında 58°C, osteojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi çalışmalarında 60°C.

Elde edilen sonuçlar Quant Studio Real Time PCR Software (v1.3) ile görüntülendi ve MS Office Excel programına aktarıldı. Analiz edilen örneklerde diğer genlerin Ct değerleri ile referans geni (GAPDH) Ct değerleri arasındaki fark hesaplanarak delta Ct (ΔCt) değerleri elde edildi. ASKKH’ler için P3 ve P5 sonuçlarından elde edilen

ΔCt 'lerin P1'den elde edilen ΔCt 'lere; osteojenik farklılaşma çalışmalarında ise deney grubu örneklerinin ΔCt 'lerin negatif kontrol grubu ΔCt 'lerine göre farkı hesaplanarak delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) değerleri elde edildi. Ardından gen ifadesindeki kat değişimi ($2^{\Delta\Delta Ct}$) belirlenerek bu değerler doğrultusunda istatistik analiz yapıldı. Veriler ortalama \pm standart hata (SH) şeklinde gösterildi.

2.14. İmmunfloresan Boyama

Araştırmada hem ASKKH'lerde pluripotent hücre belirteçleri SOX2 ve OCT $\frac{3}{4}$ proteinlerinin ifadeleri hem de osteojenik farklılaştırma deney gruplarında COL1 ve osteopontin protein ifadeleri immunfloresan boyama yöntemi ile gösterildi.

Her iki çalışma için de hücreler 4 kuyucuklu EZSlides plakalara ekildi (Şekil 2.5). Osteojenik farklılaştırma deney grupları için hücrelerin önce %70-80 konfluense ulaşması beklendi. Daha sonra hücrelerde daha önce belirtilen deney grupları çerçevesinde bu gruplara özel kültür medyumları ile farklılaştırma çalışmaları yapıldı. Farklılaşma çalışmasının son gününde immunfloresan boyama gerçekleştirildi. Her iki çalışmada da kullanılan sekonder antikolar için birer negatif kontrol boyaması yapıldı. Çalışmada kullanılan primer ve sekonder antikolar ile konsantrasyonları tablo 2.5'te belirtilmiştir.

Tablo 2.5. İmmunfloresan boyama çalışmalarında kullanılan antikolar.

Primer Antikor	Üretici-Kat. No.	Dilüsyon	Sekonder Antikor	Üretici-Kat. No.	Dilüsyon
Anti-Sox2	Merck AB5603	1/50	Goat Anti-Rabbit Texas Red	Abcam-ab6719	1/1000
Anti-OCT3/4	Santa Cruz Sc-5279	1/50	Goat Anti-mouse Texas Red	Abcam-ab6787	1/1000
Anti-Osteopontin	Abcam Ab 33046	1/250	Goat Anti-Rabbit Texas Red	Abcam-ab6719	1/1000
Anti-Kollajen 1	Abcam ab 6308	1/250	Goat Anti-mouse Texas Red	Abcam-ab6787	1/1000



Şekil 2.5. EZSlides plakalara ekilen hücreler.

Tüm antikor ve bloklama solüsyonları %0,1 tween-20 içeren PBS'e %1 sığır serum albumini (BSA) ilave edilerek hazırlanan karışımda dilüe edildi. Yıkama işlemleri için hem nonspesifik bağlanma nedenli arka plan boyamasını minimize etmek hem de membran permeabilizasyonu sağlamak için %0,1 tween-20 içeren PBS (PBST) kullanıldı. Boyamada aşağıda verilen protokol takip edildi:

1. Kuyucuklardan kültür medyumu uzaklaştırıldı ve PBST ile yıkama yapıldı.
2. Kuyucuklara 500 µL %4 PFA eklendi ve hücreler 30 dk tespit edildi.
3. Paraformaldehit uzaklaştırıldı ve 3 kez 5'er dk PBST ile yıkama yapıldı.
4. Hücreler 10 dk %0,1 triton-X ilave edilmiş PBS ile inkübe edildi.
5. PBST ile 3 kez yıkama yapıldı.
6. BSA'lı PBST içerisinde hazırlanan %10'luk keçi serumu ile 30 dk bloklama yapıldı.

7. Bloklama solüsyonu kuyucuklardan çekildikten sonra kuyucuklara primer antikor solüsyonları eklendi. Negatif kontrol için ayrılan kuyucuklarda bloklama solüsyonu bırakıldı ve herhangi bir primer antikor solüsyonu eklenmedi.
8. Plakaların kapakları kapatıldı ve örnekler bir nem kabini içerisinde +4°'de bir gece inkubasyona bırakıldı.
9. Ertesi gün nem kabininin kapağı açılarak plakaların oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
10. Sonrasında kuyucuklardaki primer antikor solüsyonları uzaklaştırıldı.
11. PBST ile 3 kez 5 dk yıkama yapıldı.
12. Örnekler karanlık odaya taşındı ve bundan sonraki basamaklar karanlık ortamda uygulandı.
13. Yıkamalar sırasında karanlık ortamda sekonder antikor solüsyonları hazırlandı.
14. Kuyucuklara (negatif kontrol dahil) sekonder antikor solüsyonları eklendi ve örnekler 1 saat oda sıcaklığında inkubasyona bırakıldı.
15. PBST ile 3 kez 5 dk yıkama yapıldı.
16. Son yıkamanın ardından PBST uzaklaştırıldı ve EZSlides plakanın klipsleri açılarak plastik haznesi çıkartıldı.
17. Hücrelerin bulunduğu kısımların sınırlandırılmış olduğu bir lam halini alan plakada her bölmeye birer damla DAPI floresan kapatma medyumu damlatıldı.
18. 1dk beklendikten sonra örneklerin üzeri lamel ile kapatıldı.
19. Boyamanın hemen ardından örnekler floresan ataçmanlı ters mikroskop altında incelendi ve fotoğraflandı.

2.15. İstatistiksel Analizler

Çalışmada tüm istatistiksel analizler SPSS (v20) programı kullanılarak yapıldı. Tüm çalışmalarda grup içi örneklerde normal dağılımı göstermek için Shapiro-Wilk normalite testi uygulandı. Gruplar içerisinde aykırı değer olmadığını ve verinin

normal dağılım gösterdiğinin belirlenmesinden sonra istatistiksel değerlendirmeler yapıldı.

ASKKH'lerin karakterizasyonu ve osteojenik farklılaştırma deney çalışmalarında yapılan real-time PCR sonuçları, Alizarin Red S boyamasının sayısal değerlendirmesinde elde edilen OD değerleri ve sandviç ELISA verilerinin istatistiksel değerlendirmeleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. ASKKH'lerin karakterizasyonunda, sandviç ELISA testinde ve Alizarin Red S boyamasının sayısal değerlendirmesinde elde edilen OD değerlerinin gruplar arası karşılaştırmaları Tukey'in çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilirken osteojenik farklılaştırma deney çalışmalarından elde edilen PCR sonuçlarının pozitif kontrol grubuna göre istatistiksel farkı ise Dunnet'in çoklu karşılaştırma testi ile belirlendi.

ASKHH'lerin karakterizasyonunda değerlendirilen her bir genin farklı pasajlardaki ifadeleri arasındaki farkın belirlenmesinde; P3 ve P5'teki hücrelerin büyüme eğrilerinin karşılaştırılmasında ve osteojenik farklılaştırma deney gruplarında bir genin aynı grup içerisinde farklı zaman aralıklarındaki ifadesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde t testi kullanıldı.

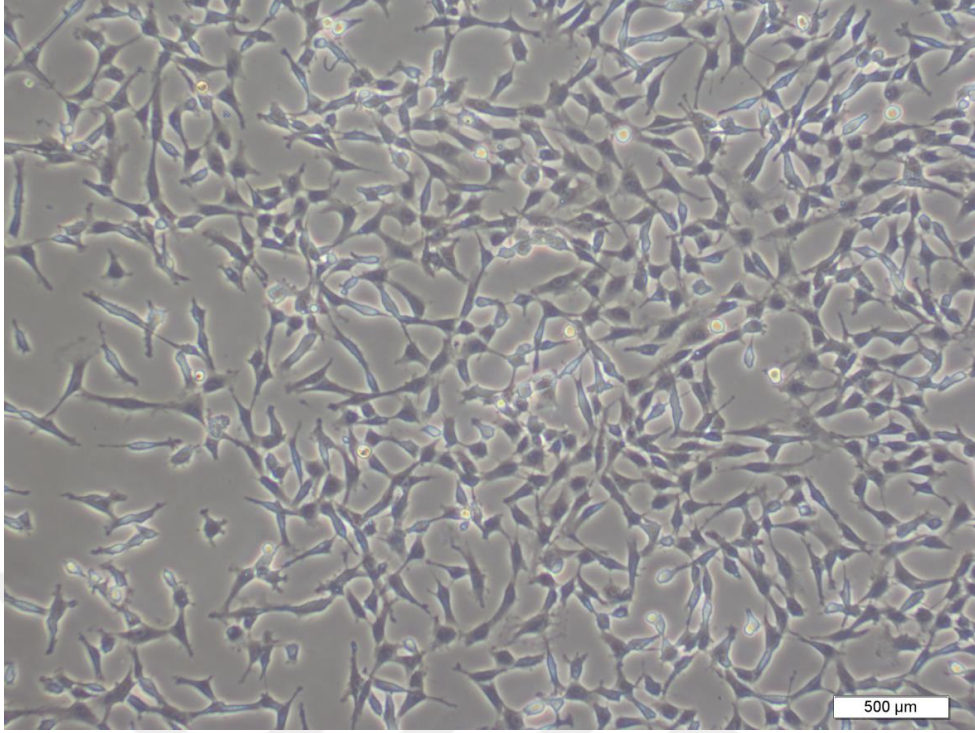
3. BULGULAR

3.1. ASKKH'lerin Karakterizasyonu

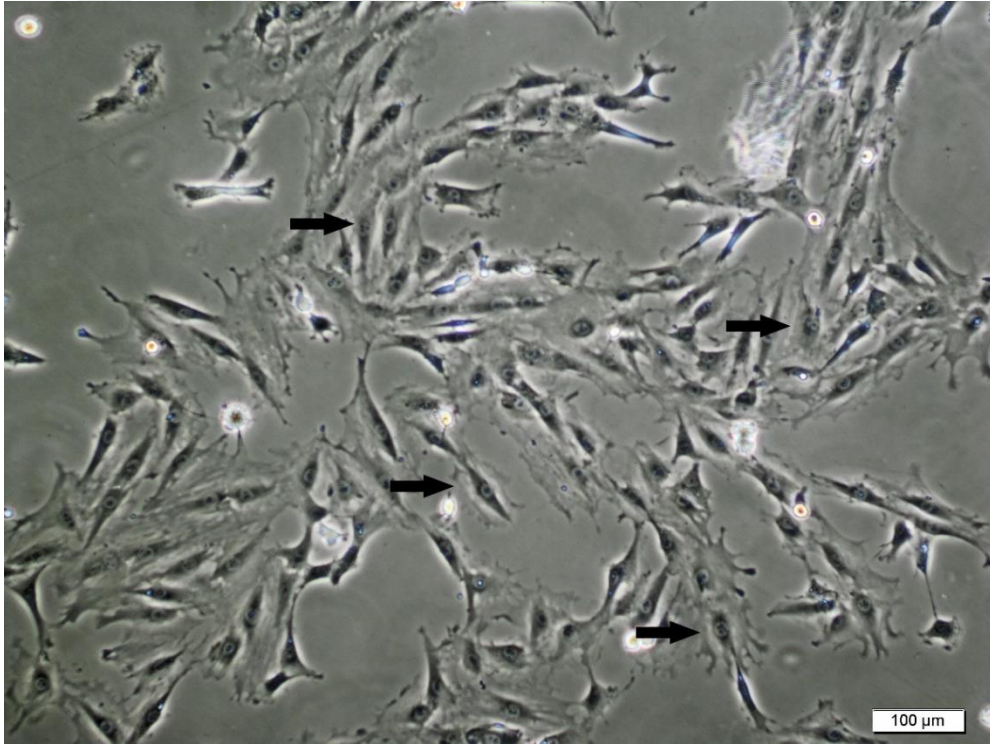
ASKKH'lerin karakterizasyonu amacıyla farklı pasajlardaki hücre morfolojileri incelendi, hücrelerin 3. ve 5. pasajlarda büyüme eğrileri gösterildi, çoklu farklılaştırma çalışmaları yürütüldü ve hem real-time PCR hem de immunfloresan boyama yöntemleri ile bazı önemli belirteçlerin gen ve protein ifadeleri belirlendi.

3.1.1. Hücre Morfolojisi

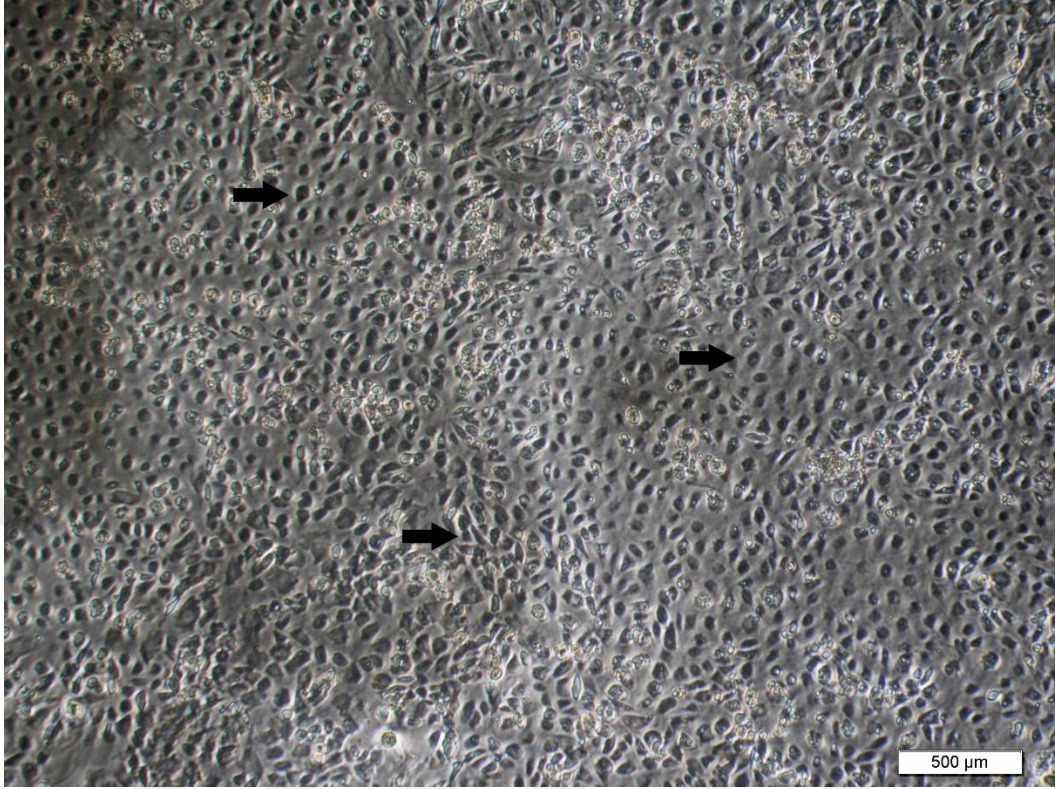
ASKKH'ler izole edilip kültüre edildiklerinde hücrelerin kısa sürede yüzeye tutunduğu gözlemlendi. Pasaj (P) sıfırda hücreler yaklaşık 7-8 gün inkube edildikten sonra hücre nişlerinin oluşmaya başladığı saptandı. Yüzeye tutunan farklı morfolojilerde hücrelerin varlığı tespit edildi. Nişler içerisinde fibroblast benzeri hücreler (Şekil 3.1), stromal hücreler (Şekil 3.2) ve epitel benzeri hücreler (Şekil 3.3) olmak üzere 3 tip morfolojide hücreler görüldü. Genellikle nişlerin aynı morfolojiye sahip hücrelerden oluştuğu gözlemlendi. Bununla birlikte az sayıda da heterojen morfolojiye sahip hücre nişi tespit edildi.



Şekil 3.1. P0'da fibroblast benzeri hücreler. Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 500µm.

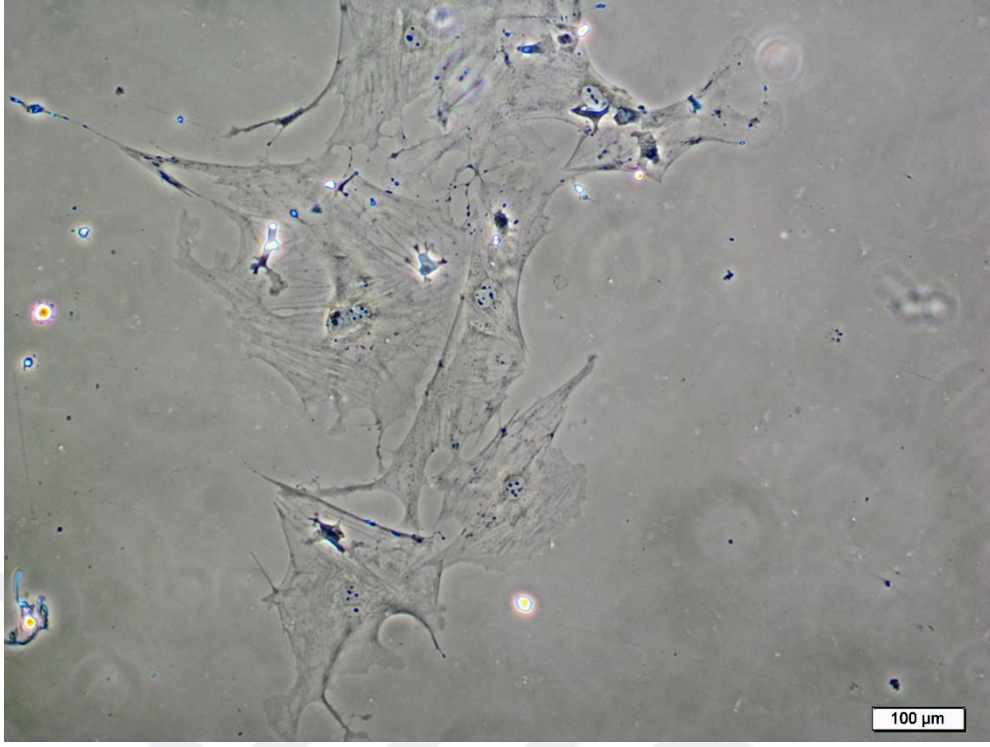


Şekil 3.2. P0'da stromal hücreler (Oklar). Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 100µm.



Şekil 3.3. P0'da epitel benzeri morfolojiye sahip hücreler (**Oklar**). Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 500µm.

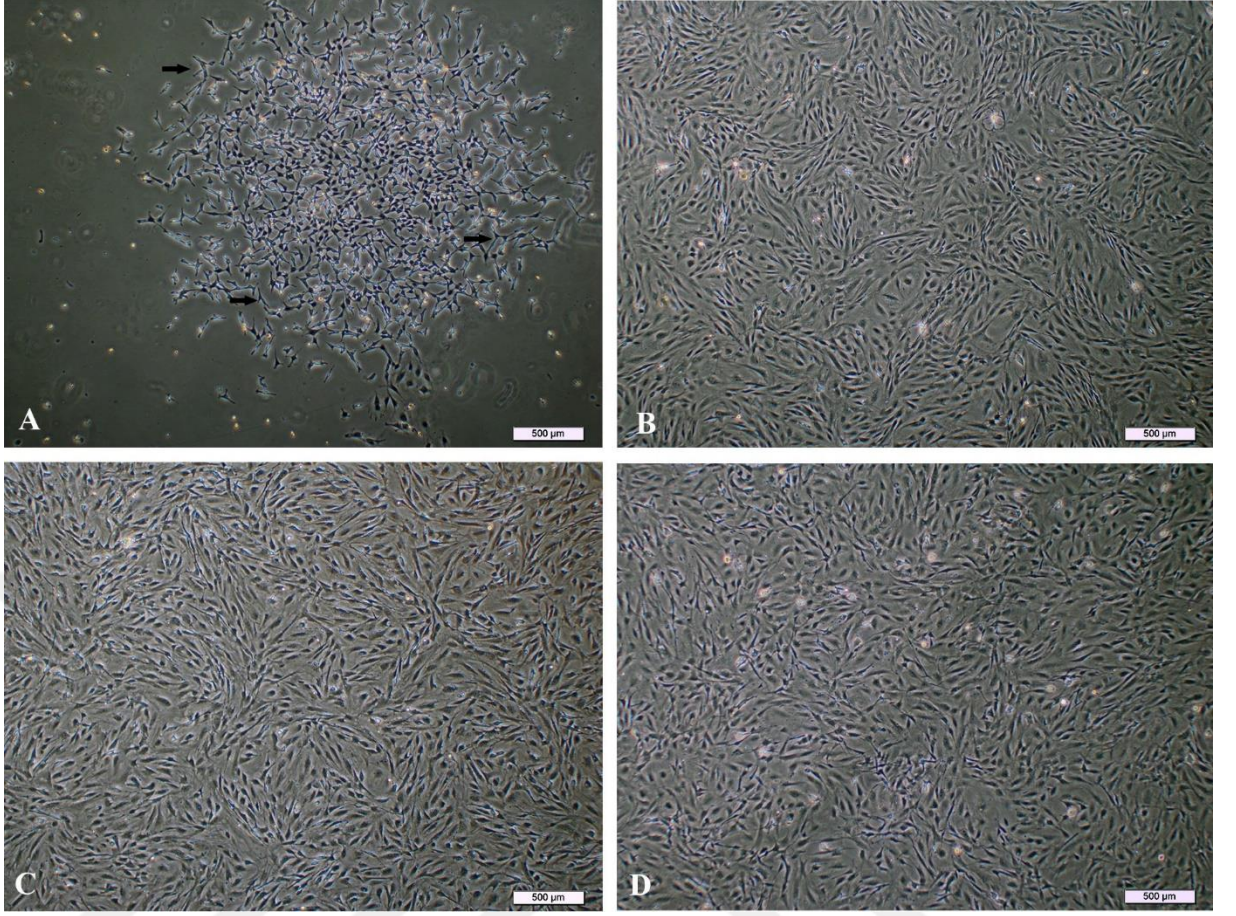
Ayrıca P0'da az sayıda yaşlı (senesent) hücrelerin flask yüzeyine yayılarak çarşaf benzeri morfoloji gösterdiği saptandı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. P0’da çarşaf benzeri senesent hücreler. Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 100 μm.

P1’den sonra hücrelerin yüzeye kısa süre içerisinde tutunduğu gözlemlendi. Kısa süre içerisinde nişler oluşturmaya başlayan hücrelerin yaklaşık 5-6 günlük süre sonunda %70-80 konfluense ulaştığı saptandı. Fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin hakim hücre tipi olduğu görüldü (Şekil 3.6, B).

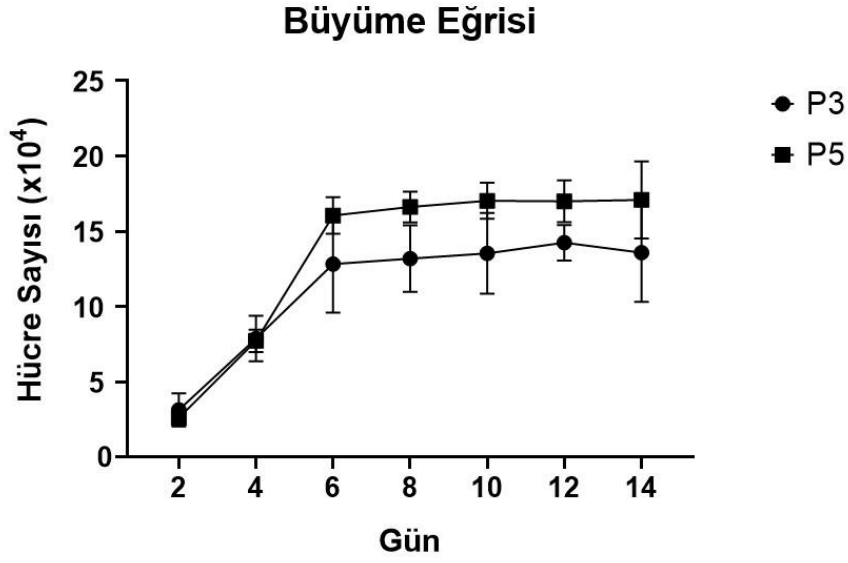
Hücreler her üç günde bir medyum değişikliği yapılarak %70-80 konfluense ulaşana kadar kültüre edildi. P2’den itibaren hücrelerin 3-4 günde konfluense ulaştığı saptandı. Bu pasajdan itibaren tüm pasajlarda hücrelerin fibroblast benzeri morfolojilerini korudukları gözlemlendi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. ASKKH'lerin farklı pasajlardaki morfolojileri. **A:** P0'da fibroblast benzeri hücrelerden oluşan hücre nişi. **Oklar:** Fibroblast benzeri hücreler. **B:** P1. **C:** P3.**D:** P5. Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 500 µm.

3.1.2. Büyüme Eğrisi Analizi

ASKKH'lerin 3 ve 5. pasajlarda proliferasyon eğrileri belirlendi ve karşılaştırma yapılarak değerlendirildi. Bu pasajlar arasında büyüme eğrileri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir fark gözlenmedi ($p > 0,05$). Her iki pasajda da hücrelerin ekim sonrasında hızla logaritmik faza girdiği, 6. günden sonra ise plato fazında seyrettiği gözlemlendi (Şekil3.7).



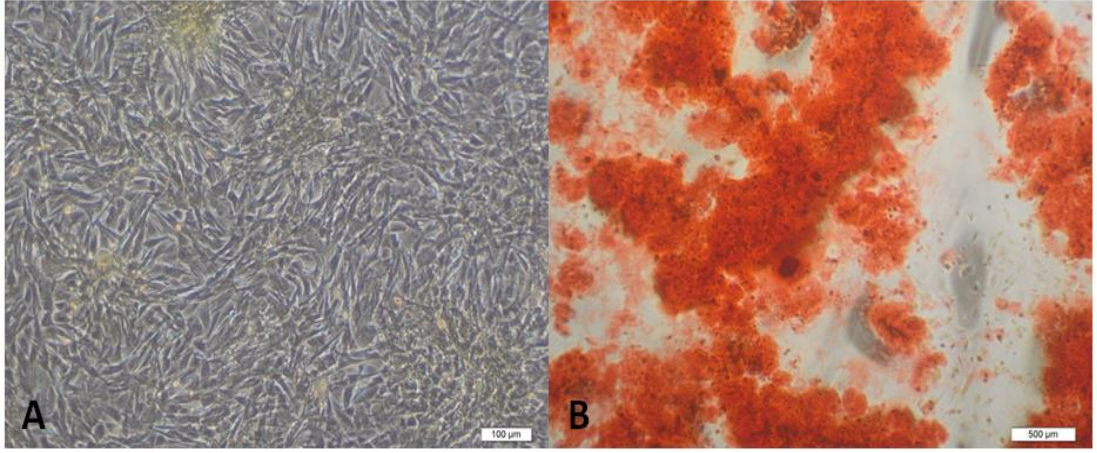
Şekil 3.7. ASKKH'lerde büyüme eğrisi grafiği.

3.1.3. Çoklu Farklılaştırma Çalışmaları

Çalışmada ASKKH'lerin karakterizasyonu kapsamında osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaştırma çalışmaları yürütüldü. P3'te ASKKH'lerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma potansiyeline sahip oldukları gösterildi.

3.1.3.1. Osteojenik Farklılaştırma

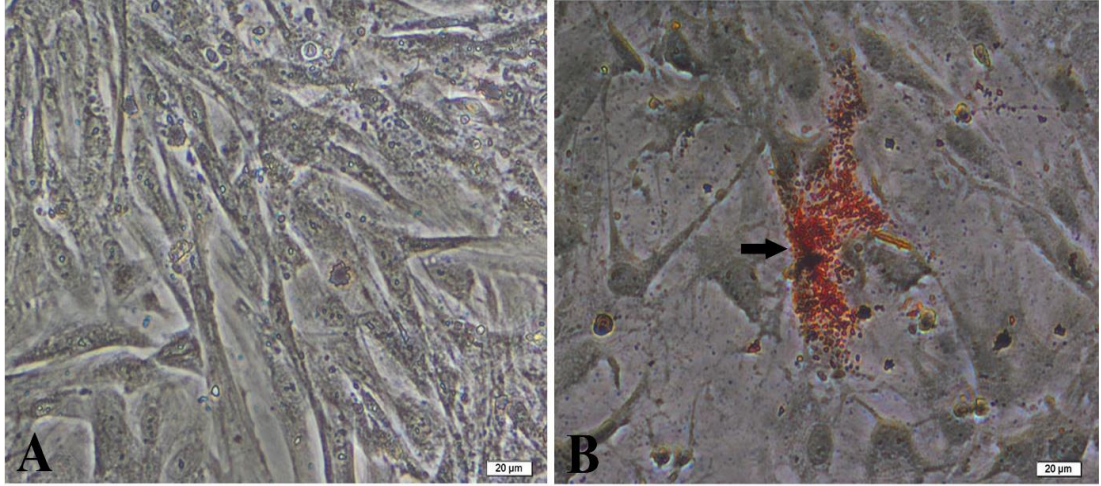
P3'te 4 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler 21 gün süre ile osteojenik farklılaştırma medyumu içerisinde osteojenik hücelere farklılaştırıldı. Alizarin Red S boyaması sonucunda negatif kontrol grubundaki hücrelerde herhangi bir boyanma gözlenmezken osteojenik yönde farklılaşan hücrelerde kalsiyum birikimlerinin kırmızı-turuncu renkte boyandığı görüldü (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. ASKKH'lerde osteojenik farklılaşmanın Alizarin Red S boyaması ile gösterilmesi. **A:** Kontrol grubunda hücrelerde boyanma görülmedi. Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 100 µm. **B:** Osteojenik yönde farklılaştırılmış hücrelerde kırmızı-turuncu renkte kalsiyum birikimleri gözlemlendi. Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 500µm.

3.1.3.2. Adipojenik Farklılaştırma

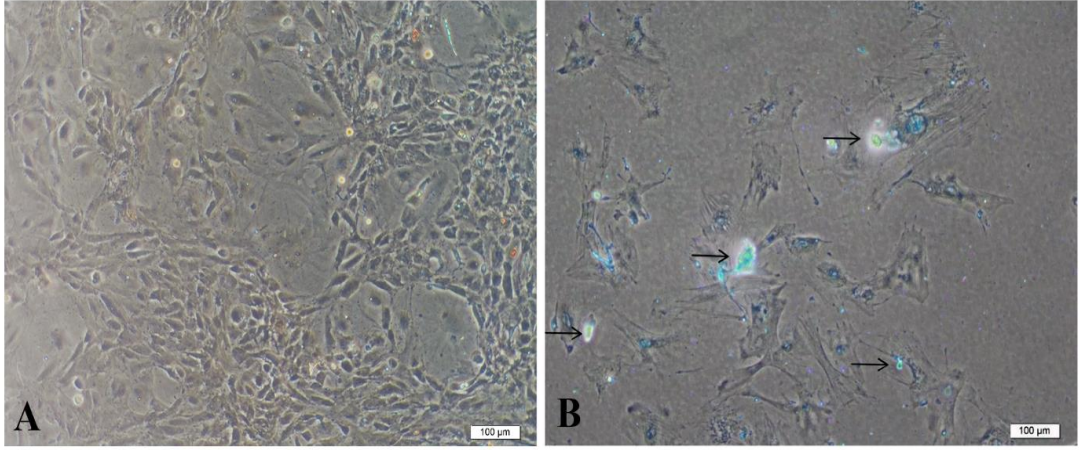
ASKKH'ler P3'te 4 kuyucuklu plakalara ekildi ve adipojenik farklılaştırma medyumları içerisinde 21 gün süre ile adipojenik hücelere farklılaştırıldı. Oil Red O boyaması sonucunda negatif kontrol grubunda hücrelerin sitoplazmalarında herhangi bir boyanma görülmezken adipojenik yönde farklılaşan hücrelerin sitoplazmalarındaki yağ damlacıklarının parlak kırmızı renkte boyandığı gözlemlendi (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. ASKKH’lerde adipojenik farklılaşmanın Oil Red O boyaması ile gösterilmesi. **A:** Kontrol grubunda hücrelerde boyanma görülmedi. **B:** Adipojenik yönde farklılaştırılan hücrelerin sitoplazmalarında kırmızı renkte boyanan yağ damlacıkları (**Ok**) gözlemlendi. Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 20µm.

3.1.3.3. Kondrojenik Farklılaştırma

P3’te 4 kuyucuklu plakalara ekimi yapılan hücrelerin kondrojenik farklılaştırma medyumunu içerisinde 21 gün süre ile kondrojenik hücrelere farklılaştırıldı. Alsiyan mavisi ile boyama sonucunda negatif kontrol grubu hücrelerinde herhangi bir boyanma gözlenmezken kondrojenik yönde farklılaşan hücrelerde glikozaminoglikan birikimlerinin mavi renkte boyandığı görüldü (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. ASKHH'lerde kondrojenik farklılaşmanın Alsiyan Mavisi boyaması ile gösterilmesi. **A:** Kontrol grubundaki hücrelerde boyanma görülmedi. **B:** Kondrojenik farklılaştırmaya tabi tutulan hücrelerde parlak mavi renkte glikoz amino glikan birikimleri (**Oklar**) gözlemlendi. Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 100µm.

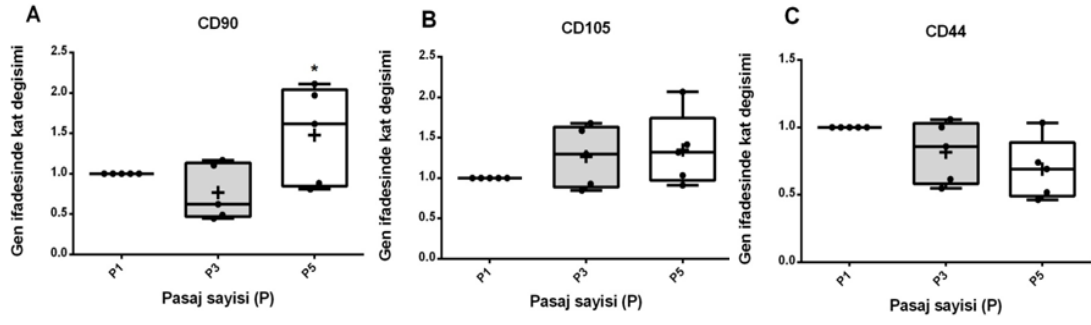
3.1.4. Real-Time PCR

ASKKH'lerde mezenkimal kök hücre belirteçlerinin yanı sıra bazı pluripotent ve hemapoietik belirteçlerin gen ifadeleri belirlendi. P3 ve P5'te hücrelerin gen ifadelerindeki kat değişimleri, P1'deki hücrelerin gen ifadeleri karşılaştırılarak değerlendirildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. ASKKH'lerde P1, P3 ve P5'te real-time PCR ile hücrelerde gen ifadelerinin analizi.

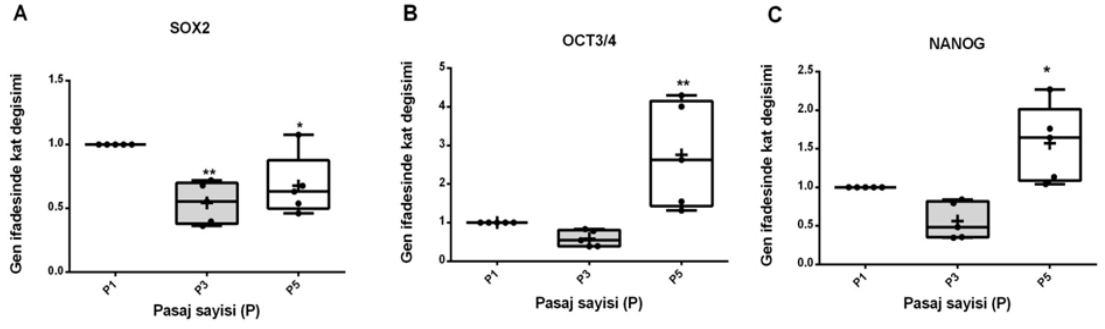
Gen	Pasaj			<i>p</i>
	P1	P3	P5	
	Ortalama \pm SH			
SOX2	1a	0,54 \pm 0,07 b	0,68 \pm 0,1b	0,002
OCT	1a	0,59 \pm 0,09a	2,76 \pm 0,61b	0,002
NANOG	1a	0,56 \pm 0,1a	1,57 \pm 0,22b	0,001
CD90	1a	0,77 \pm 0,15a	1,48 \pm 0,27b	0,04
CD105	1a	1,27 \pm 0,17	1,35 \pm 0,2	0,27
CD44	1	0,82 \pm 0,1	0,69 \pm 0,1	0,06
CD34	1a	0,47 \pm 0,13b	0,58 \pm 0,13b	0,01
CD45	1a	0,52 \pm 0,09b	0,25 \pm 0,05c	< 0,001

P1 ve P3'teki hücrelerde mezenkimal kök hücre belirteçlerinden CD90 gen ifadesindeki kat değişimleri arasında bir fark gözlenmezken ($p > 0,05$), P3 ve P5'teki hücreler arasında bu gen ifadesindeki kat değişiminde istatistiki olarak önemli bir artış olduğu görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 3.11, A). P3 ve P5'teki hücrelerde CD105 gen ifadesi, P1'deki hücrelerin gen ifadesi ile karşılaştırıldığında daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak bir fark saptanmadı ($p > 0,05$) (Şekil 3.11, B). CD44 gen ifadesindeki kat değişiminde de benzer olarak pasajlara göre anlamlı bir değişim olmadığı gözlemlendi ($p > 0,05$) (Şekil 3.11, C).



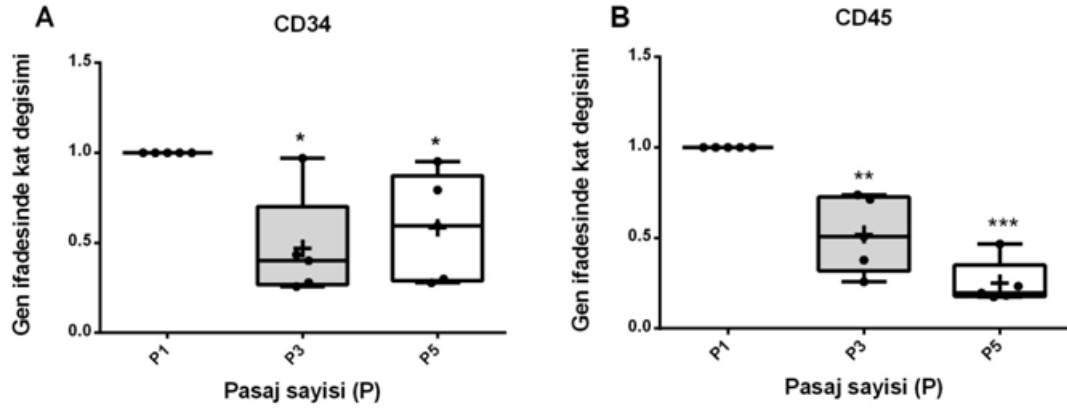
Şekil 3.11. P1, P3 ve P5'teki hücrelerde mezenkimal kök hücre belirteçlerin real-time PCR analizi. **A:** CD90 ifadesinde 1 ve 3. pasajlarda fark görülmezken beşinci pasajda anlamlı bir artış görüldü. **B:** CD105 gen ifadesinde bir artış görülse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. **C:** CD44 gen ifadesinde pasajlara göre anlamlı bir değişim gözlenmedi. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

ASKKH'ler mezenkimal karakterinin yanı sıra bazı pluripotent hücre belirteçleri yönünden de analiz edildi. Bu amaçla OCT $\frac{3}{4}$, SOX2 ve NANOG gen ifadeleri real-time PCR ile değerlendirildi. SOX2 gen ifadesindeki kat değişiminin P1 ile karşılaştırıldığında ilerleyen pasajlarda azaldığı görüldü. Hem P3'te ($p < 0,01$) hem de P5'te ($p < 0,05$) P1'e göre bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. P3 ve P5'te ise SOX2 gen ifadesindeki kat değişimleri arasında istatistiki olarak bir fark görülmedi ($p > 0,05$) (Şekil 3.12, A). P1 ve P3 arasında OCT $\frac{3}{4}$ gen ifadelerindeki kat değişimlerinde bir fark gözlenmezken ($p: 0,7$), P1 ve P5 arasında önemli bir fark belirlendi ($p < 0,01$). Ayrıca P3 ile P5 arasında da OCT $\frac{3}{4}$ gen ifadesindeki kat değişiminin anlamlı olarak arttığı görüldü ($p < 0,01$) (Şekil 3.12, B). NANOG için de benzer şekilde P1 ve P3 arasında fark tespit edilmedi ($p > 0,05$). P5 örneklerinde ise gen ifadesinde kat değişiminin hem P1 ($p < 0,05$) hem de P3'e göre ($p < 0,001$) önemli bir artış gösterdiği saptandı (Şekil 3.12, C).



Şekil 3.12. P1, P3 ve P5'te pluripotent kök hücre belirteçlerinin real-time PCR analizi. **A:** SOX2 gen ifadesindeki kat artışında ilerleyen pasajlarda istatistiksel olarak önemli bir düşüş görüldü. **B:** OCT ¾ gen ifadesindeki kat değişiminde P1 ve P3'te fark görülmezken P5'te anlamlı bir artış görüldü. **C:** NANOG gen ifadesindeki kat değişiminde P1 ve P3 arasında fark görülmezken P5'te önemli bir artış görüldü. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

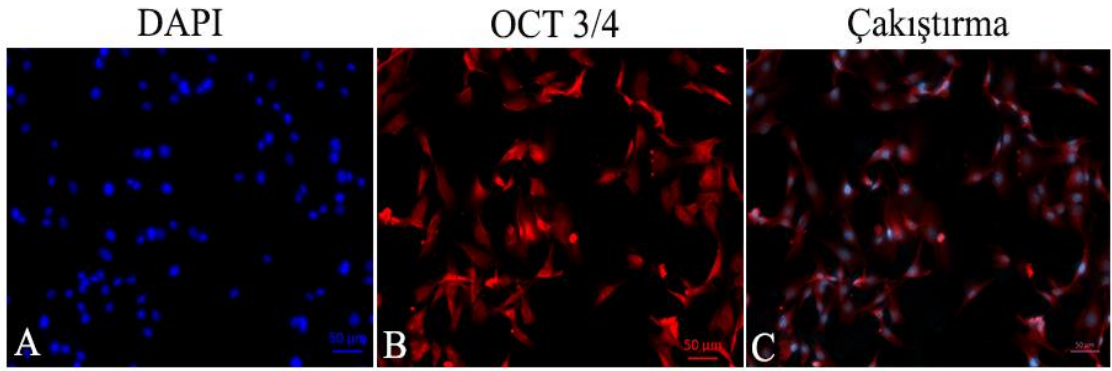
ASSKH'ler hemapoyetik belirteçler CD34 ve CD45 bakımından değerlendirildi. CD34 gen ifadesinin pasaj sayısı ilerledikçe düşüş gösterdiği görüldü. Bu düşüşün hem P3'te ($p < 0,05$) hem de P5'te ($p < 0,05$) P1'e göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. CD34 gen ifadesindeki kat değişiminin P3 ile P5 arasında önemli olmadığı belirlendi ($p > 0,05$) (Şekil 3.13, A). CD45 gen ifadesindeki kat değişiminin ilerleyen pasajlarda azalma gösterdiği saptandı. Bu genin ifadesinin hem P3 ($p < 0,001$) hem de P5'te ($p < 0,001$) P1'e göre önemli olarak azaldığı görüldü. Ayrıca P5'te de P3'e göre anlamlı bir düşüş tespit edildi ($p < 0,05$) (Şekil 3.13, B).



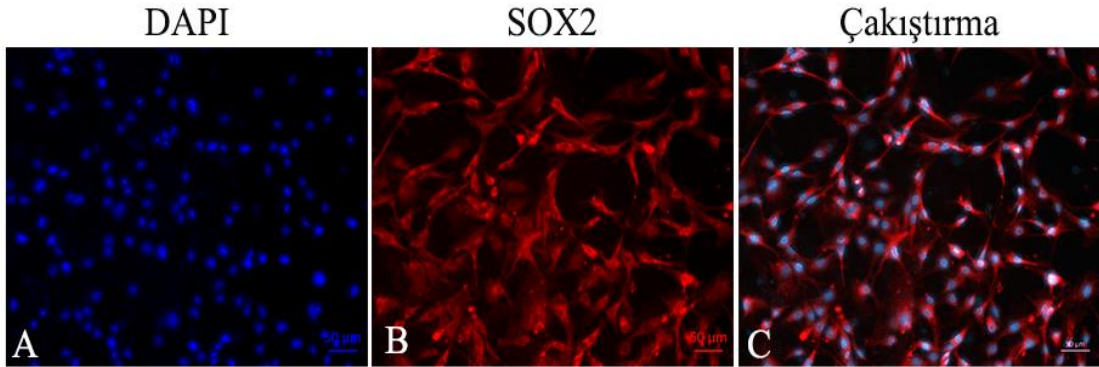
Şekil 3.13. P1, P3 ve P5'te hematopoietik belirteçlerin real-time PCR analizi. **A:** CD34 gen ifadesindeki kat değişimini P3 ve P5'te birinci pasaja göre anlamlı bir düşüş gösterdi. **B:** CD45 gen ifadesindeki kat değişimi hem P3 hem de P5'te önemli olarak azaldı. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

3.1.5. İmmunfloresan Boyama

ASKKH'lerde P5'te pluripotent kök hücre belirteçleri olan SOX2 ve OCT $\frac{3}{4}$ protein ifadeleri immunfloresan boyama ile gösterildi. OCT $\frac{3}{4}$ proteininin hem çekirdekte hem de sitoplazmada ifade olduğu (Şekil 3.14); SOX2 proteininin ise sadece sitoplazmada ifade olduğu gözlemlendi (Şekil 3.15).



Şekil 3.14. ASKKH'lerde OCT $\frac{3}{4}$ protein ifadesi. P5'te ASKKH'lerde yapılan immunfloresan boyamada OCT $\frac{3}{4}$ proteinin hem çekirdeklerde hem de sitoplazmada ifade olduğu gözlemlendi. **A:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B:** OCT 3/4 protein ifadesi. **C:** Çakıştırma. Floresan ataçmanlı ters mikroskop. Bar: 50 μ m.



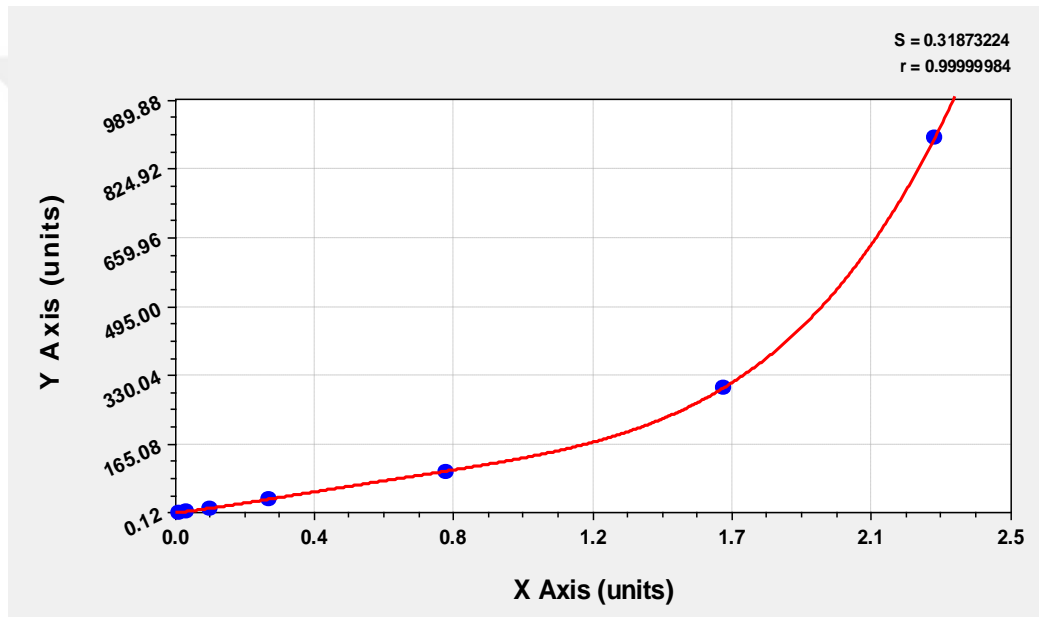
Şekil 3.15. ASKKH'lerde SOX2 protein ifadesi. P5'te ASKKH'lerde SOX2 proteininin sitoplazmada ifade olduğu görüldü. **A:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B:** SOX2 protein ifadesi. **C:** Çakıştırma. Floresan ataçmanlı ters mikroskop. Bar: 50 μ m.

3.2. Sandviç ELISA

Çalışmada TGF- β 3 ve 17 β -estradiol'ün tek başlarına ve birlikte kullanımının osteoblastlar tarafından salgılanan OPG seviyelerine etkileri incelendi. Deney

gruplarından toplanan KM örneklerinde sandviç ELISA yöntemi ile hfOB hücrelerinden sentezlenen OPG seviyeleri ölçüldü.

Standart okumalarının ortalamaları girilerek Growth Expert 1.3 yazılımı yardımıyla standart eğrileri oluşturuldu. R^2 değeri 1'e en yakın olan ($R^2=0,99999984$) 4. derece polinomiyal fit standart eğrisi tercih edilerek analizin kalan basamaklarında kullanıldı (Şekil 3.16).



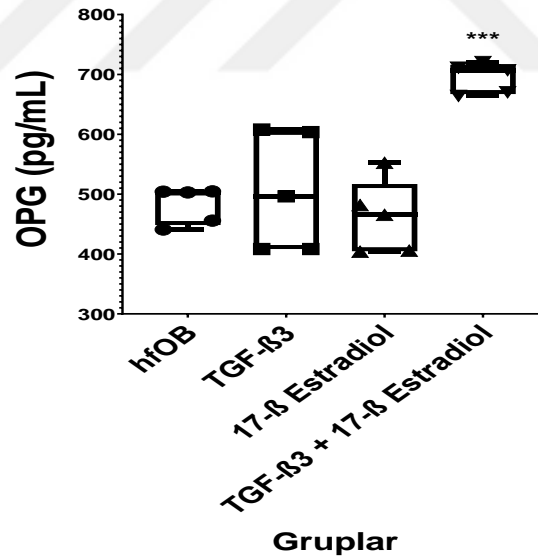
Şekil 3.16. Dördüncü derece polinomiyal fit standart eğrisi.

Standart eğrisine göre tüm örneklerin pg/mL cinsinden OPG konsantrasyonları belirlendi. Kontrol grubunda ortalama $418,7 (\pm 30,87)$ pg/mL değerinde OPG konsantrasyonu ölçüldü. TGF- $\beta 3$ grubunda $504,9 (\pm 98,84)$ pg/mL; 17β -estradiol grubunda ise $461,8 (\pm 61,43)$ pg/mL değerinde ortalama OPG seviyeleri tespit edildi. TGF- $\beta 3$ ve 17β -estradiol'ün birlikte ilave edildiği gruba ait örneklerde ise ortama $694,8 (\pm 25,71)$ pg/mL seviyesinde OPG saptandı.

Tablo 3.2. Sandviç ELISA ile elde edilen OPG ölçümleri.

Grup	OPG (pg/mL)
Kontrol	418,7 (± 30,87) a
TGF-β3	504,9 (± 98,84) a
17β-Estradiol	461,8 (± 61,43) a
TGF-β3 + 17β-Estradiol	694,8 (± 25,71) b

TGF-β3 ve 17-β estadiolün ayrı ayrı ilave edildiği gruplarda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmedi ($p > 0,05$). TGF-β3 ve 17β-estradiolün birlikte kullanıldığı grupta ölçülen OPG seviyesinde ise kontrol grubu örneklerine göre anlamlı bir artış görüldü ($p < 0,001$). Ayrıca bu grupta elde edilen ölçümler hem TGF-β3 ilave edilen gruba ($p: < 0,001$) hem de 17β-estradiol ilave edilen gruba ($p: < 0,001$) göre de anlamlı derecede daha yüksekti (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. OPG ELISA ölçümü sonuçları. TGF-β3 ve 17β-estradiolün birlikte ilave edildiği grupta ölçülen OPG seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir artış görüldü (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

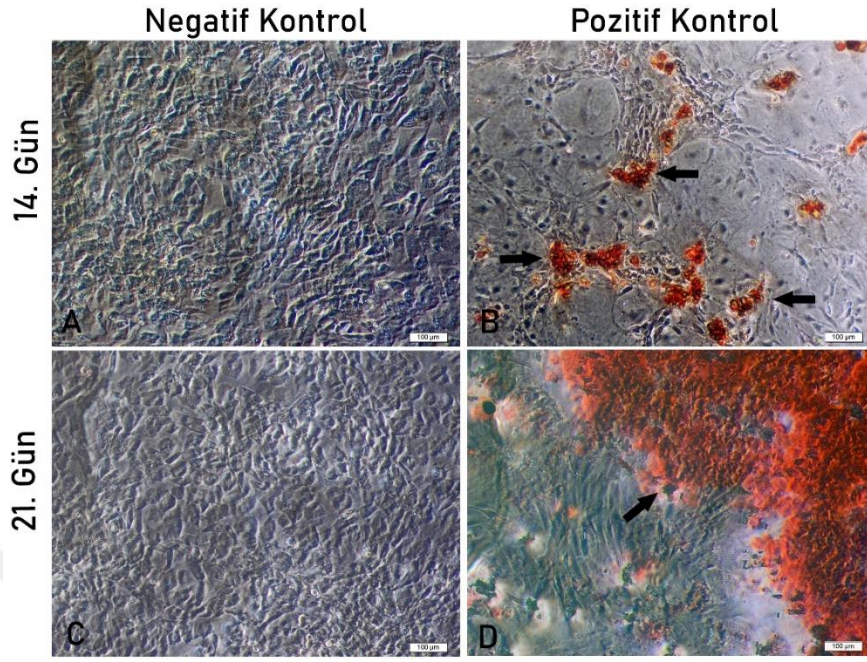
ELISA sonuçları değerlendirildiğinde TGF- β 3 ve 17 β -estradiolün birlikte kullanıldığı gruptan (4. grup) toplanan KM, yüksek OPG seviyesindeki KM olarak kabul edildi.

3.3. Osteojenik Farklılaştırma Deney Çalışmaları

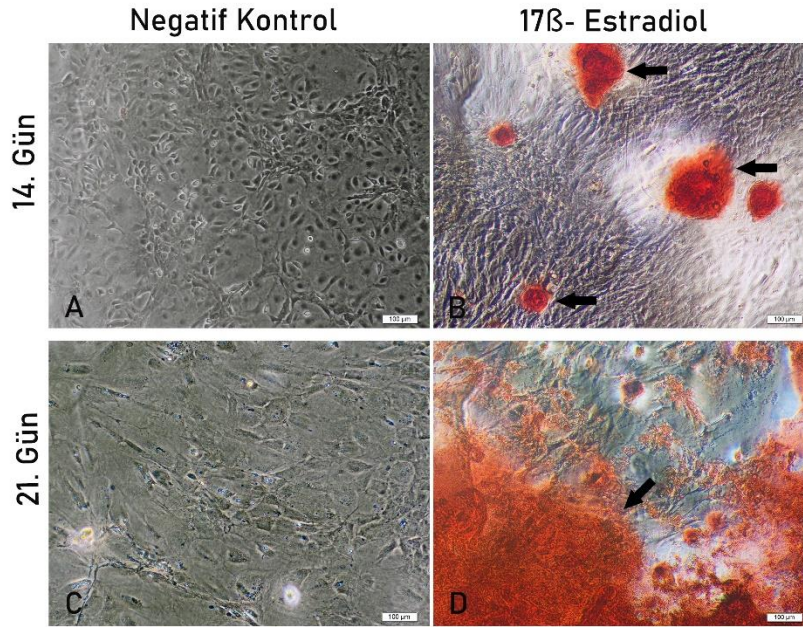
Deney gruplarında 14 ve 21 günlük osteojenik farklılaştırmayı takiben Alizarin Red S boyaması ile hücrelerde kalsiyum birikimi ve immunfloresan boyama ile COL1 ile Osteopontin protein ifadeleri gösterildi. Kalsiyum birikim miktarları “materyal metod başlık numarası” kısmında belirtilen yöntemle sayısal olarak değerlendirildi. Real-time PCR ile osteojenik belirteçler olan SPP1, RUNX2, COL1 ve DCN gen ifadeleri ölçüldü.

3.3.1. Alizarin Red S Boyaması

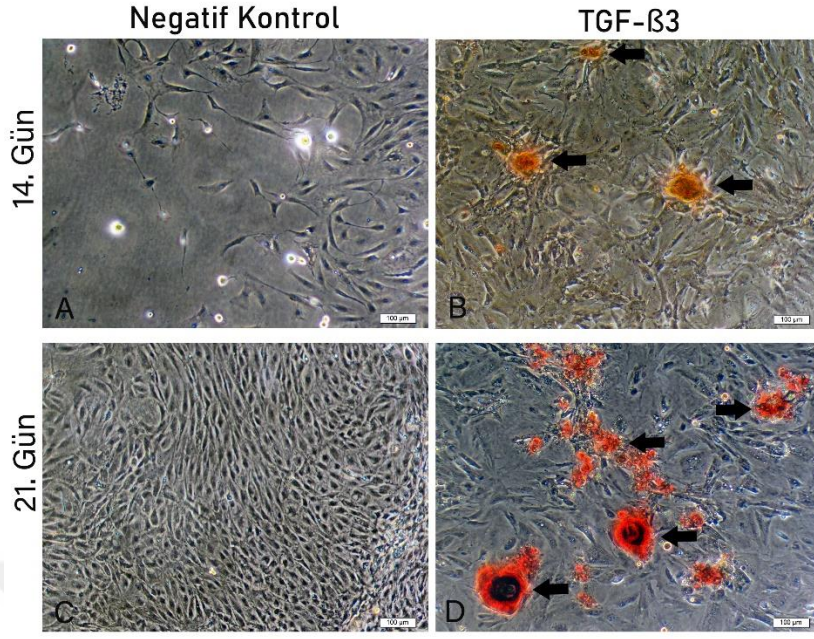
Tüm gruplarda hem 14 hem de 21. günlerde hücrelerde Alizarin Red S ile boyanmış kalsiyum birikimleri gözlemlendi. Negatif kontrol hücrelerinde ise herhangi bir boyanma görülmedi.



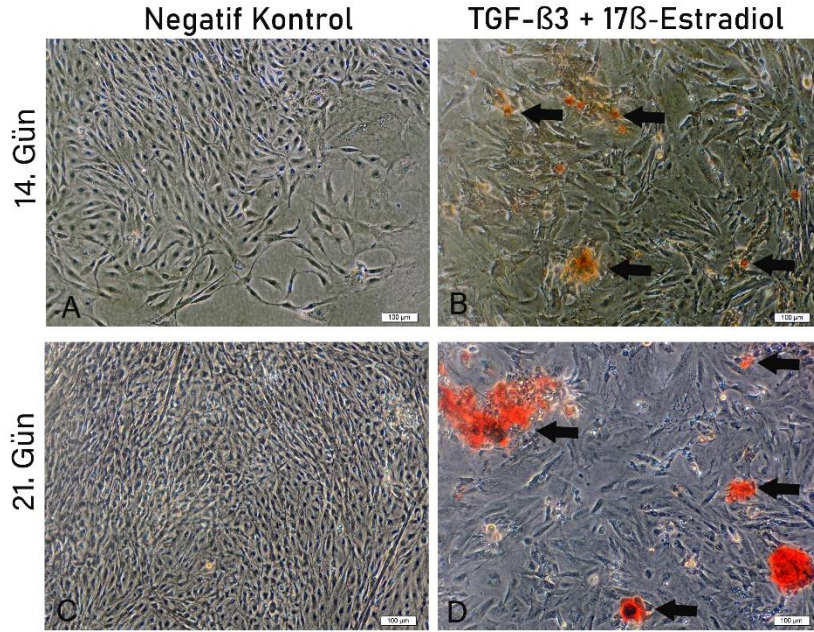
Şekil 3.18. Pozitif kontrol grubunda 14 ve 21. günlerde Alizarin Red S boyaması. Negatif kontrol gruplarında boyanma gözlenmezken (A, C) hem 14. gün (B) hem de 21. günde (D) Alizarin Red S ile turuncu-kırmızı boyanan kalsiyum birikimleri (Oklar) görüldü. Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 100µ.



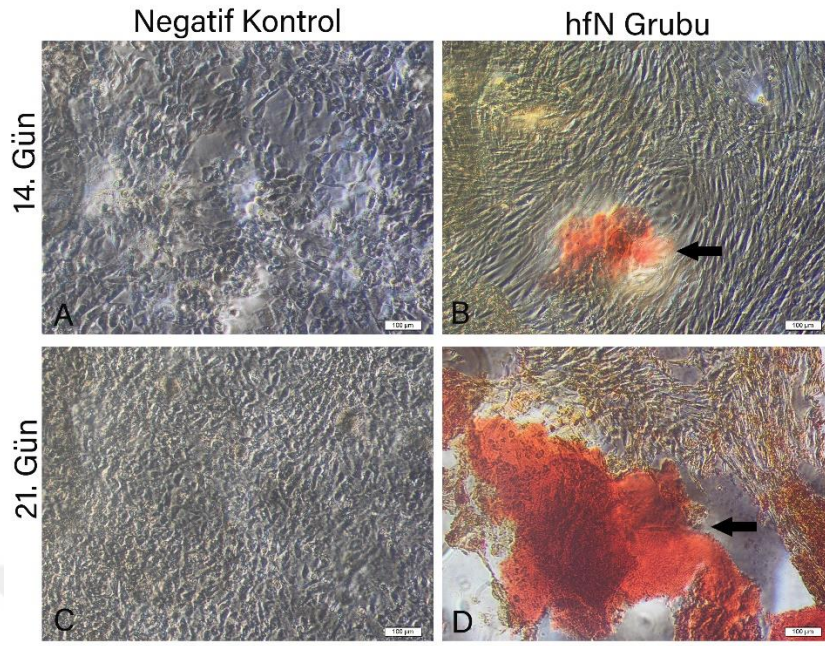
Şekil 3.19. 17β-estradiol grubunda 14 ve 21. günlerde Alizarin Red S boyaması. Negatif kontrol gruplarında boyanma gözlenmezken (A, C) hem 14. gün (B) hem de 21. günde (D) Alizarin Red S ile turuncu-kırmızı boyanan kalsiyum birikimleri (Oklar) belirlendi. Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 100µ.



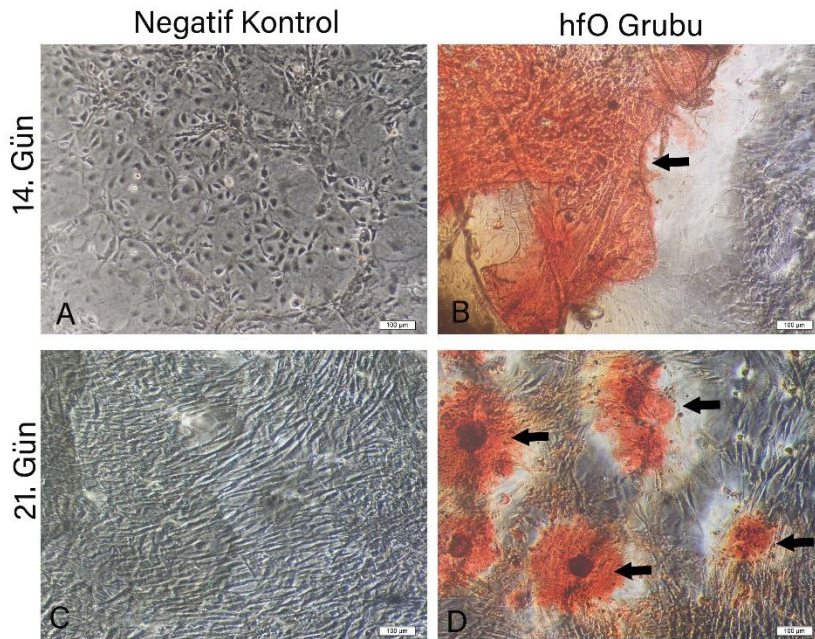
Şekil 3.20. TGF- β 3 grubunda 14 ve 21. günlerde Alizarin Red S boyaması. Negatif kontrol gruplarında boyanma gözlenmezken (A, C) hem 14. gün (B) hem de 21. günde (D) Alizarin Red S ile turuncu-kırmızı boyanan kalsiyum birikimleri (Oklar) gözlemlendi. Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 100 μ .



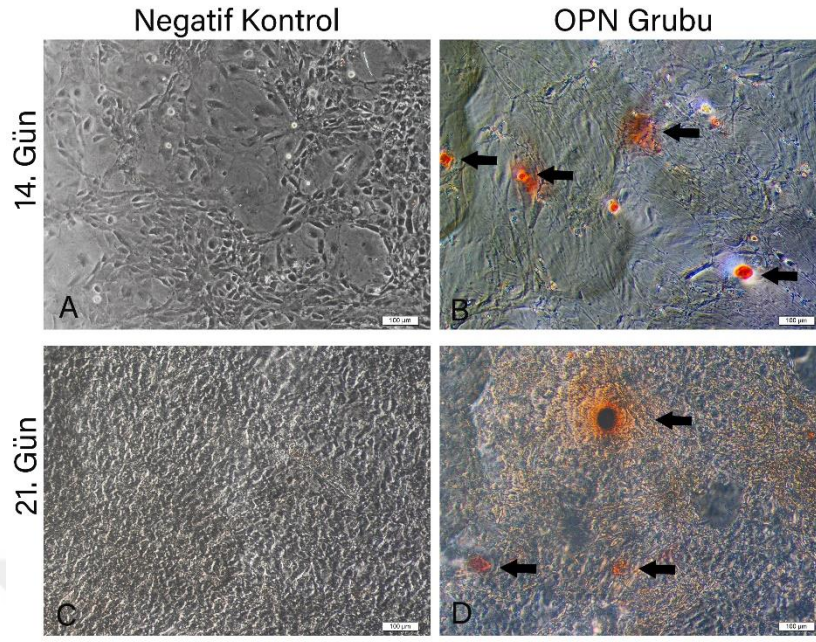
Şekil 3.21. TGF- β 3 + 17 β -estradiol grubunda 14 ve 21. günlerde Alizarin Red S boyaması. Negatif kontrol gruplarında boyanma gözlenmezken (A, C) hem 14. gün (B) hem de 21. günde (D) Alizarin Red S ile turuncu-kırmızı boyanan kalsiyum birikimleri (Oklar) gözlemlendi. Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 100 μ .



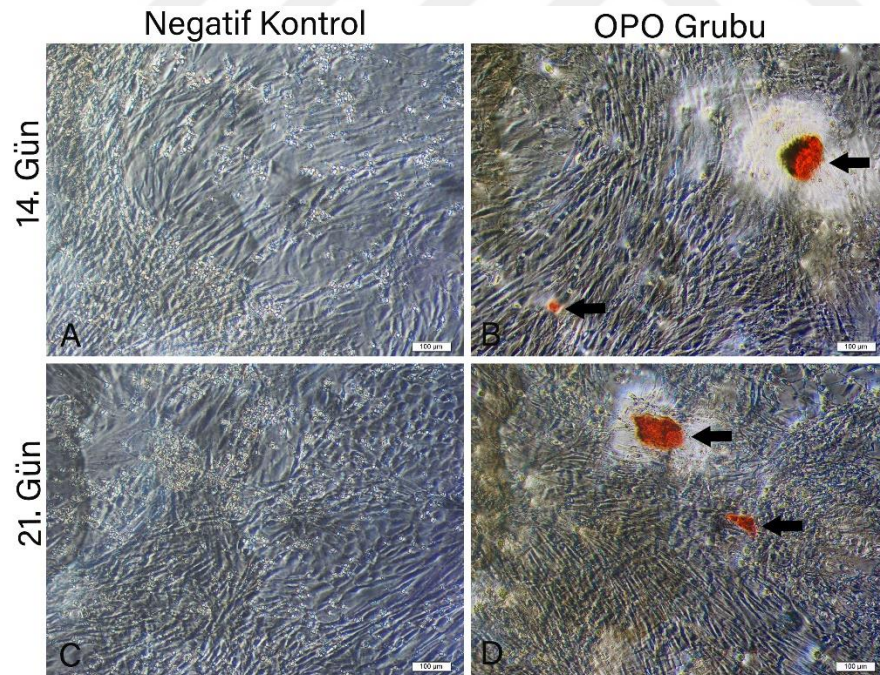
Şekil 3.22. hfN grubunda 14 ve 21. günlerde Alizarin Red S boyaması. Negatif kontrol gruplarında boyanma gözlenmezken (**A**, **C**) hem 14. gün (**B**) hem de 21. günde (**D**) Alizarin Red S ile turuncu-kırmızı boyanan kalsiyum birikimleri (**Oklar**) gözlemlendi. Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 100µ.



Şekil 3.23. hfO grubunda 14 ve 21. günlerde Alizarin Red S boyaması. Negatif kontrol gruplarında boyanma gözlenmezken (**A**, **C**) hem 14. gün (**B**) hem de 21. günde (**D**) Alizarin Red S ile turuncu-kırmızı boyanan kalsiyum birikimleri (**Oklar**) belirlendi. Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 100µ.



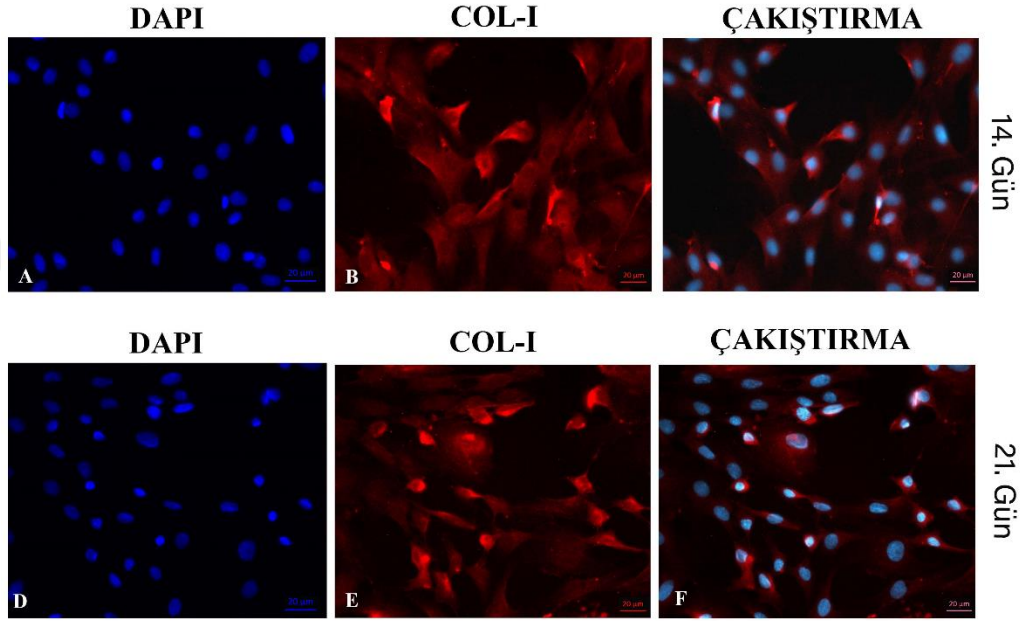
Şekil 3.24. OPN grubunda 14 ve 21. günlerde Alizarin Red S boyaması. Negatif kontrol gruplarında boyanma gözlenmezken (**A**, **C**) hem 14. gün (**B**) hem de 21. günde (**D**) Alizarin Red S ile turuncu-kırmızı boyanan kalsiyum birikimleri (**Oklar**) tespit edildi. Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 100 μ .



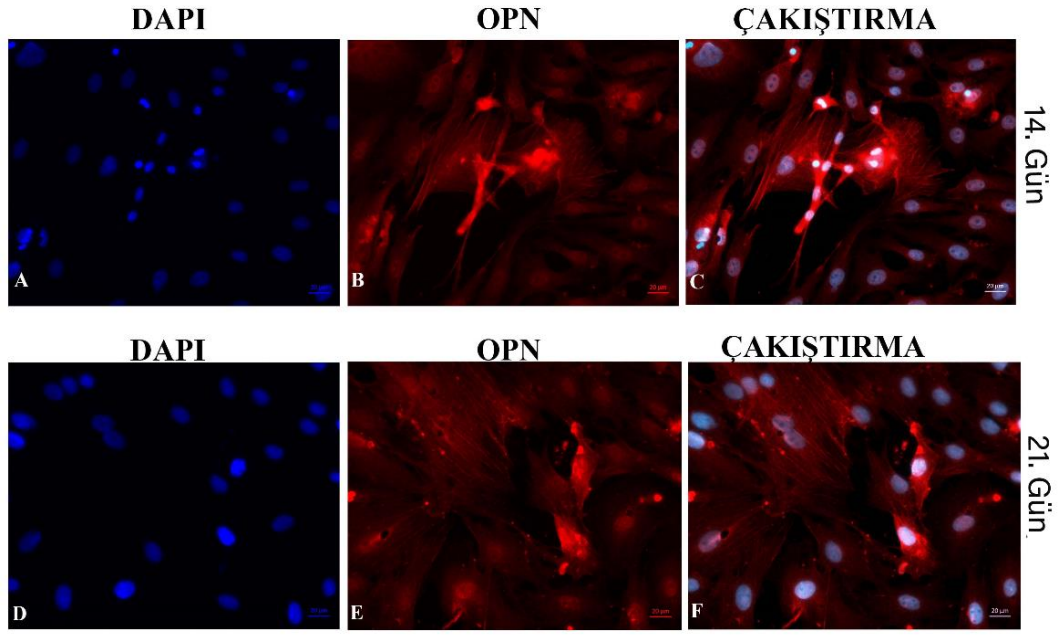
Şekil 3.25. OPO grubunda 14 ve 21. günlerde Alizarin Red S boyaması. Negatif kontrol gruplarında boyanma gözlenmezken (**A**, **C**) hem 14. gün (**B**) hem de 21. günde (**D**) Alizarin Red S ile turuncu-kırmızı boyanan kalsiyum birikimleri (**Oklar**) görüldü. Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 100 μ .

3.3.2. İmmunfloresan Boyama

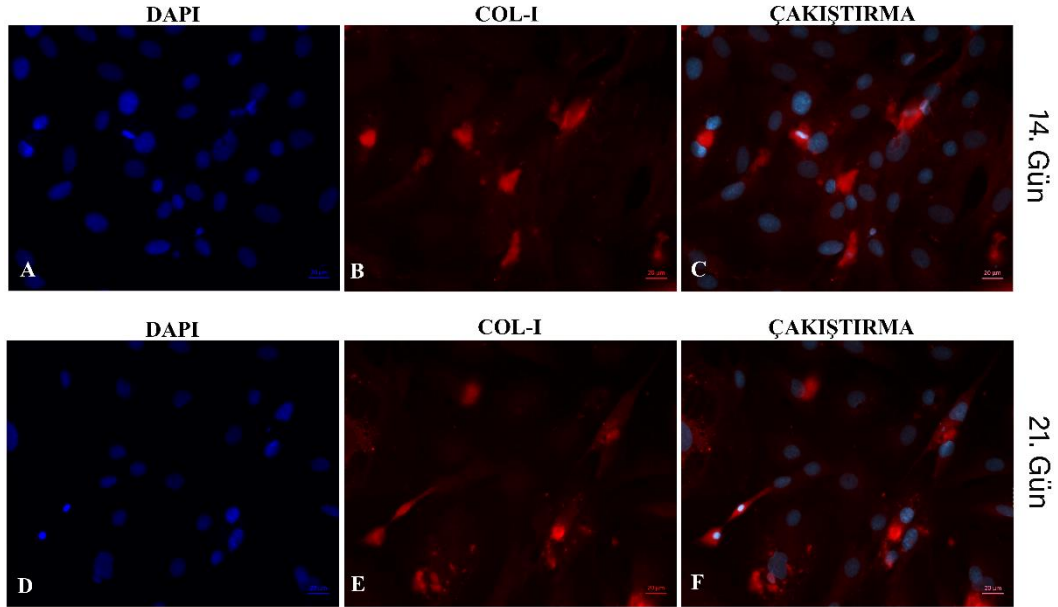
Tüm gruplarda hem 14 hem de 21. günlerde hücrelerin sitoplazmalarında COL1 ve osteopontinlerinin ifade olduğu belirlendi.



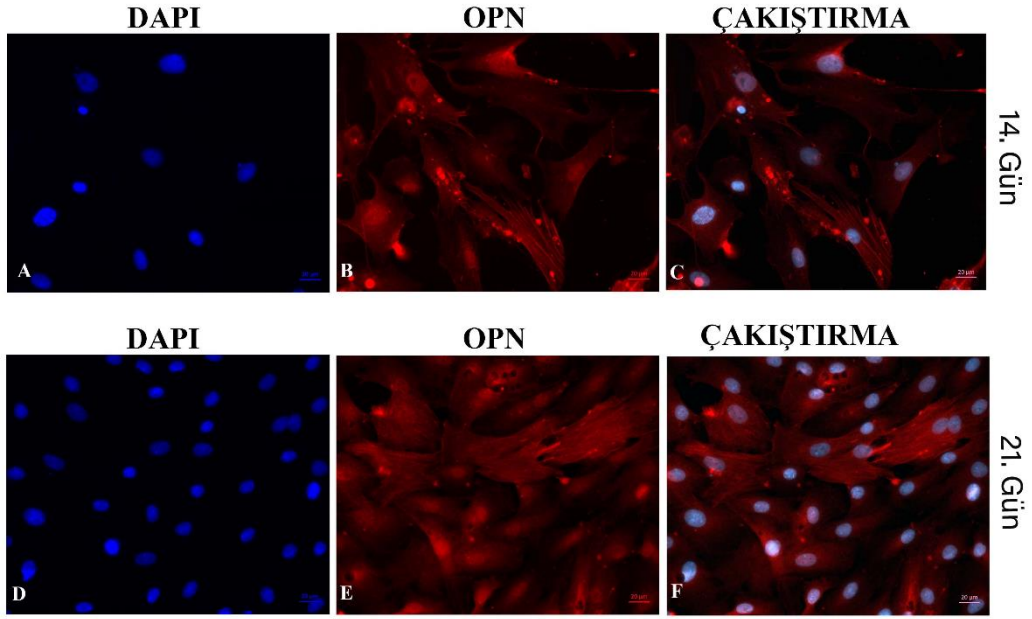
Şekil 3.26. Pozitif kontrol grubunda 14 ve 21. günlerde immünfloresan boyama ile gösterilen COL1 protein ifadesi. **A, B, C:** 14. gün. **D, E, F:** 21. gün. **A, D:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B, E:** Hücrelerin sitoplazmalarında COL1 protein ifadesi. **C, F:** Çakıştırma. Floresan ataçmanlı ters mikroskop. Bar: 20µ.



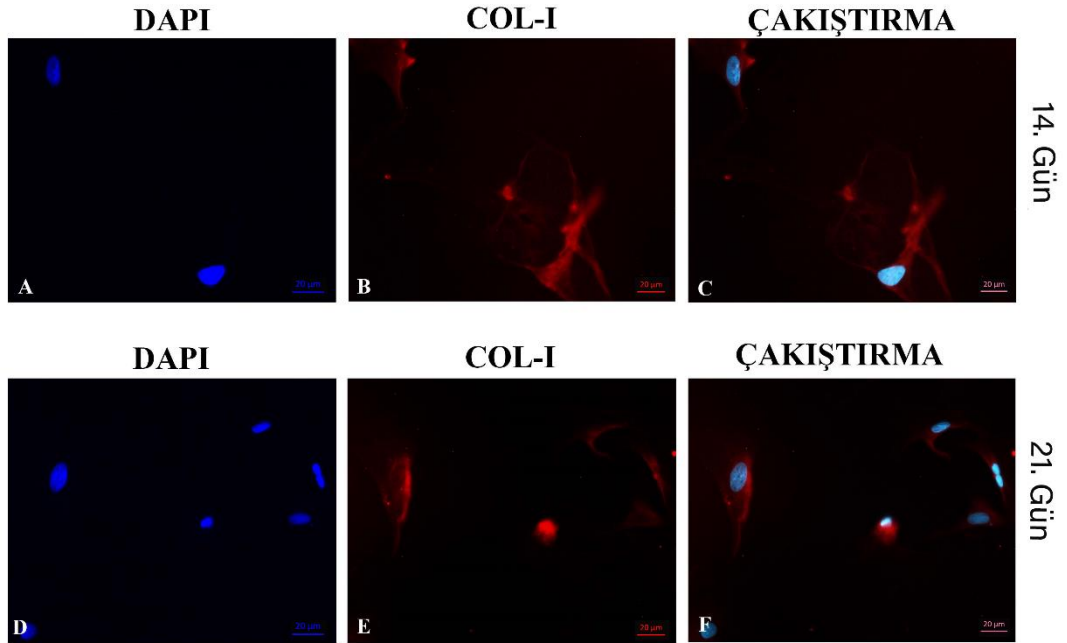
Şekil 3.27. Pozitif kontrol grubunda 14 ve 21. günlerde immunfloresan boyama ile gösterilen osteopontin ifadesi. **A, B, C:** 14. gün. **D, E, F:** 21. gün. **A, D:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B, E:** Hücrelerin sitoplazmalarında osteopontin protein ifadesi. **C, F:** Çakıştırma. Floresan ataçmanlı ters mikroskop. Bar: 20µ.



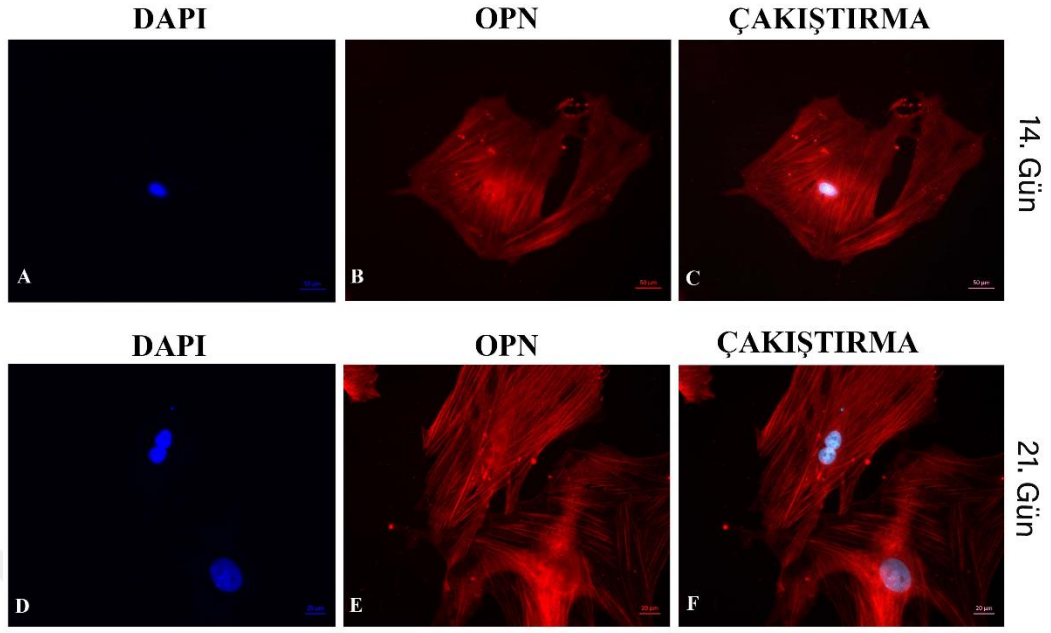
Şekil 3.28. 17β-estradiol grubunda 14 ve 21. günlerde immunfloresan boyama ile gösterilen COL1 protein ifadesi. **A, B, C:** 14. gün. **D, E, F:** 21. gün. **A, D:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B, E:** Hücrelerin sitoplazmalarında COL1 protein ifadesi. **C, F:** Çakıştırma. Floresan ataçmanlı ters mikroskop. Bar: 20µ.



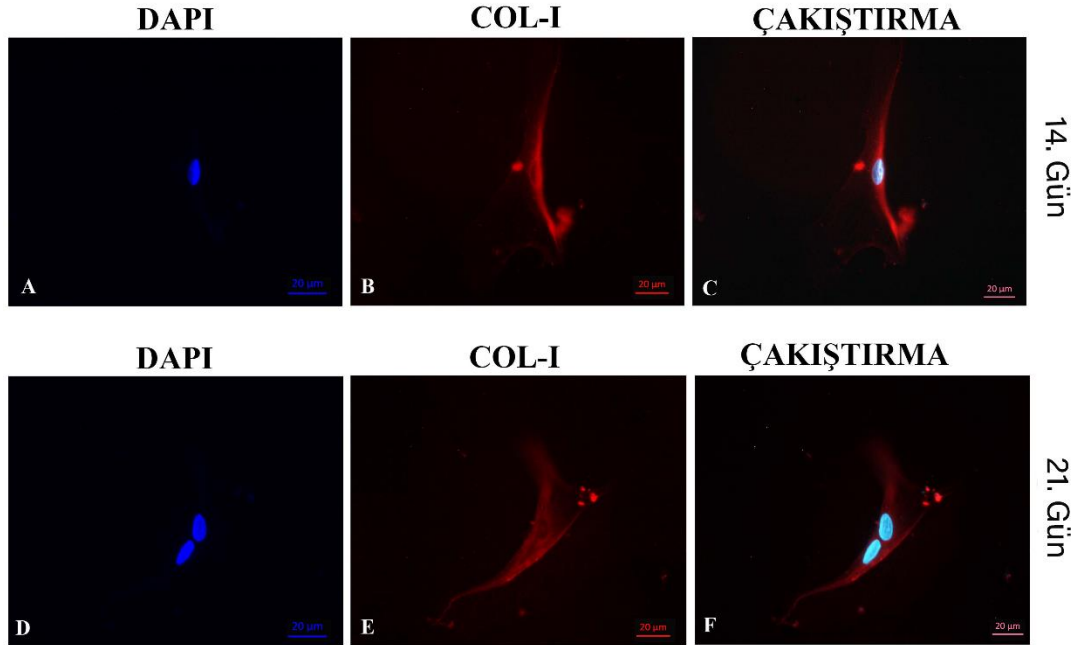
Şekil 3.29. 17 β -estradiol grubunda 14 ve 21. günlerde immunfloresan boyama ile gösterilen osteopontin ifadesi. **A, B, C:** 14. gün. **D, E, F:** 21. gün. **A, D:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B, E:** Hücrelerin sitoplazmalarında osteopontin protein ifadesi. **C, F:** Çakıştırma. Floresan ataçmanlı ters mikroskop. Bar: 20 μ .



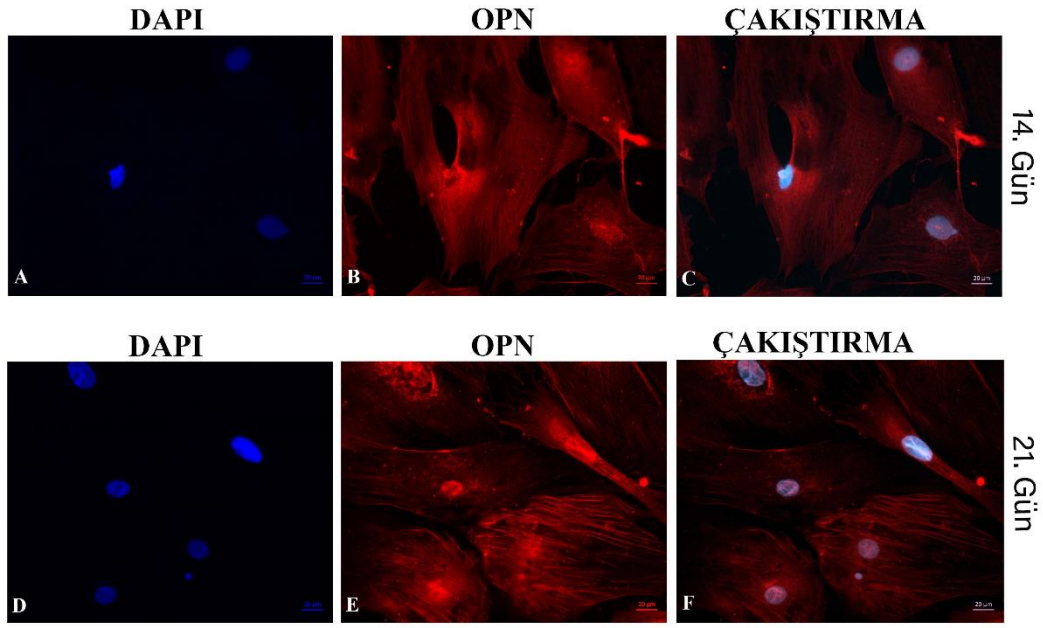
Şekil 3.30. TGF- β 3 grubunda 14 ve 21. günlerde immunfloresan boyama ile gösterilen COL1 ifadesi. **A, B, C:** 14. gün. **D, E, F:** 21. gün. **A, D:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B, E:** Hücrelerin sitoplazmalarında COL1 protein ifadesi. **C, F:** Çakıştırma. Floresan ataçmanlı ters mikroskop. Bar: 20 μ .



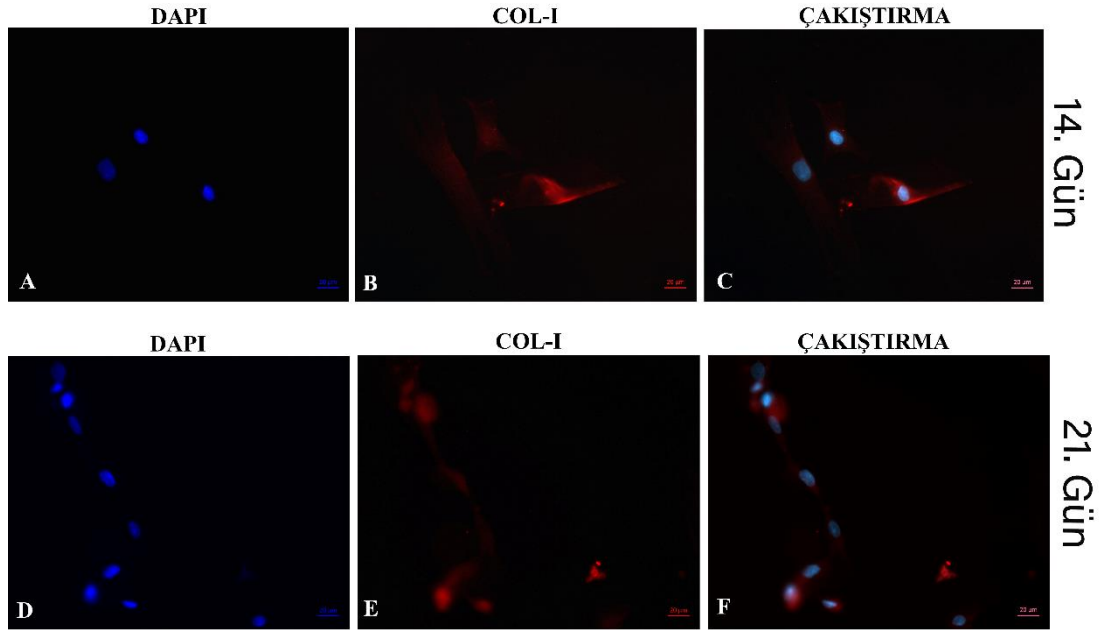
Şekil 3.31. TGF-β3 grubunda 14 ve 21. günlerde immunfloresan boyama ile gösterilen osteopontin ifadesi. **A, B, C:** 14. gün. **D, E, F:** 21. gün. **A, D:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B, E:** Hücrelerin sitoplazmalarında osteopontin protein ifadesi. **C, F:** Çakıştırma. Floresan ataçmanlı ters mikroskop. Bar: 20μ.



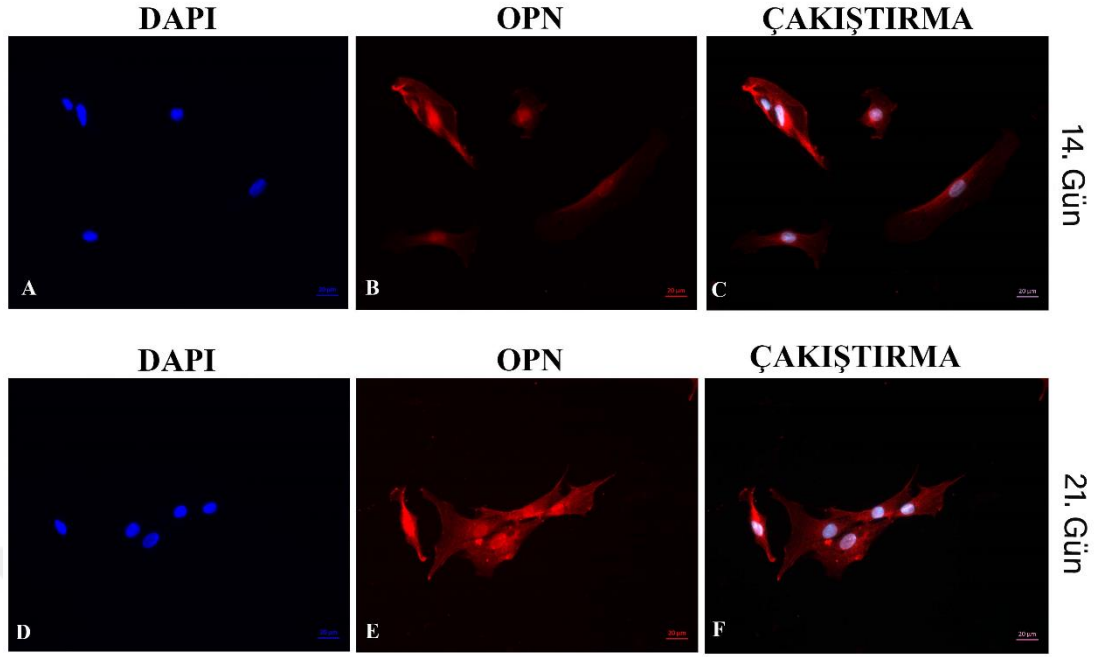
Şekil 3.32. TGF-β3+17β-estradiol grubunda 14 ve 21. günlerde immunfloresan boyama ile gösterilen COL1 ifadesi. **A, B, C:** 14. gün. **D, E, F:** 21. gün. **A, D:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B, E:** Hücrelerin sitoplazmalarında COL1 protein ifadesi. **C, F:** Çakıştırma. Floresan ataçmanlı ters mikroskop. Bar: 20μ.



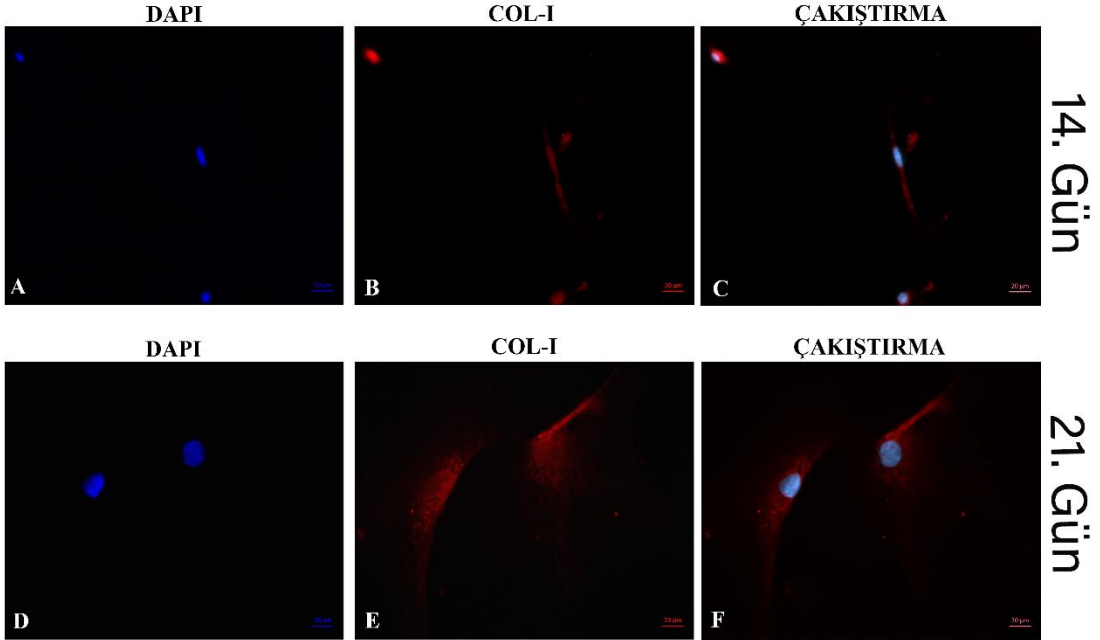
Şekil 3.33. TGF- β 3+17 β -estradiol grubunda 14 ve 21. günlerde immunfloresan boyama ile gösterilen osteopontin ifadesi. **A, B, C:** 14. gün. **D, E, F:** 21. gün. **A, D:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B, E:** Hücrelerin sitoplazmalarında osteopontin protein ifadesi. **C, F:** Çakıştırma. Floresan ataçmanlı ters mikroskop. Bar: 20 μ .



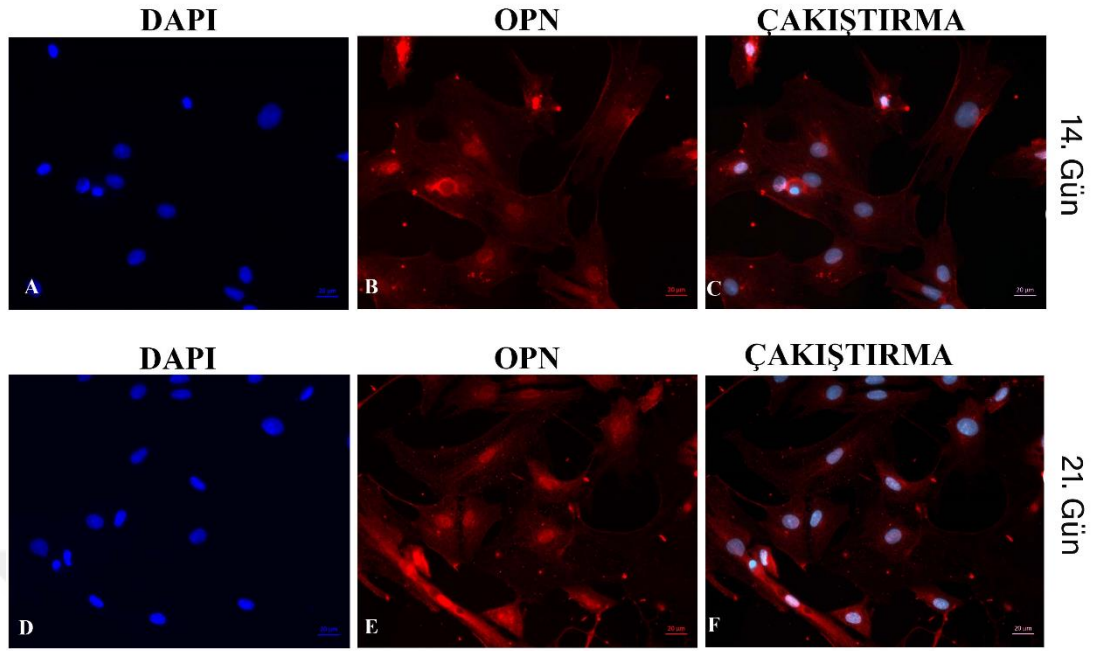
Şekil 3.34. hfN grubunda 14 ve 21. günlerde immunfloresan boyama ile gösterilen COL1 ifadesi. **A, B, C:** 14. gün. **D, E, F:** 21. gün. **A, D:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B, E:** Hücrelerin sitoplazmalarında COL1 protein ifadesi. **C, F:** Çakıştırma. Floresan ataçmanlı ters mikroskop. Bar: 20 μ .



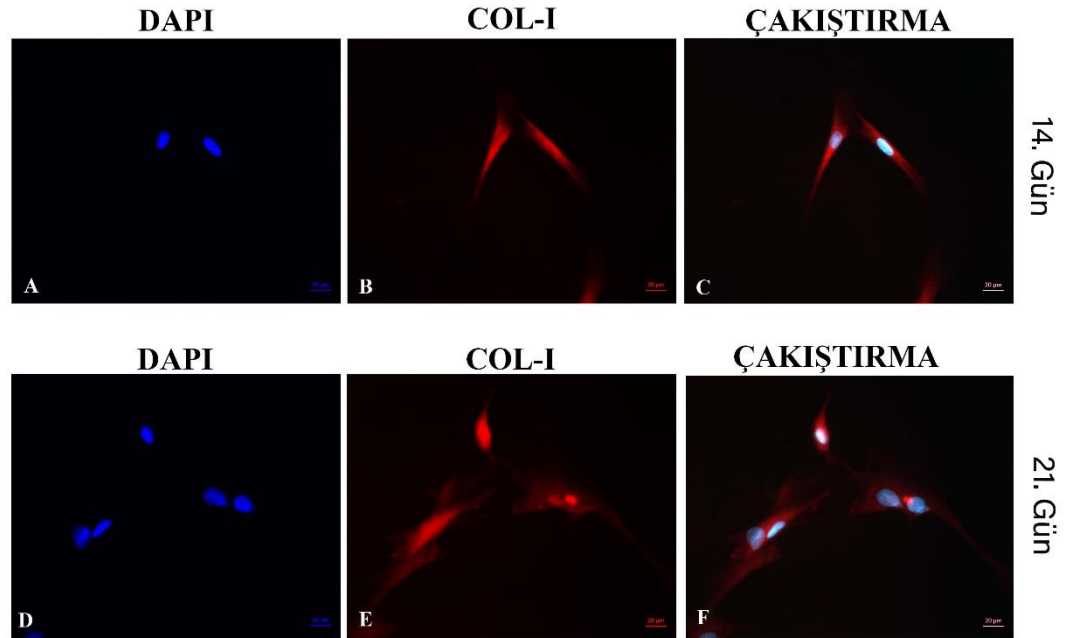
Şekil 3.35. hfN grubunda 14 ve 21. günlerde immunfloresan boyama ile gösterilen osteopontin ifadesi. **A, B, C:** 14. gün. **D, E, F:** 21. gün. **A, D:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B, E:** Hücrelerin sitoplazmalarında osteopontin protein ifadesi. **C, F:** Çakıştırma. Floresan ataçmanlı ters mikroskop. Bar: 20µ.



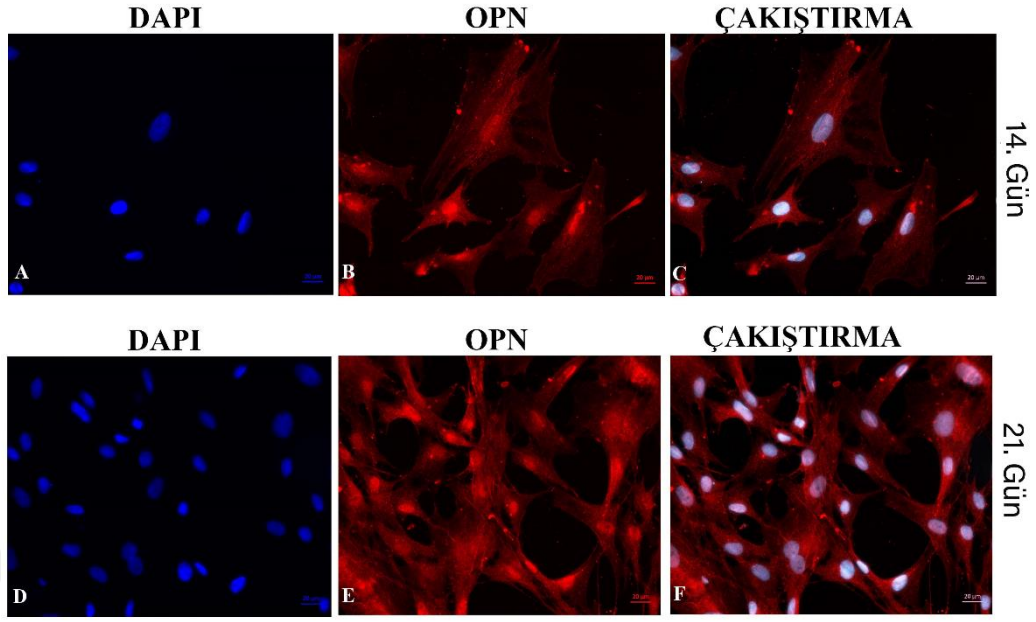
Şekil 3.36. hfO grubunda 14 ve 21. günlerde immunfloresan boyama ile gösterilen COL1 ifadesi. **A, B, C:** 14. gün. **D, E, F:** 21. gün. **A, D:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B, E:** Hücrelerin sitoplazmalarında COL1 ifadesi. **C, F:** Çakıştırma. Floresan ataçmanlı ters mikroskop. Bar: 20µ.



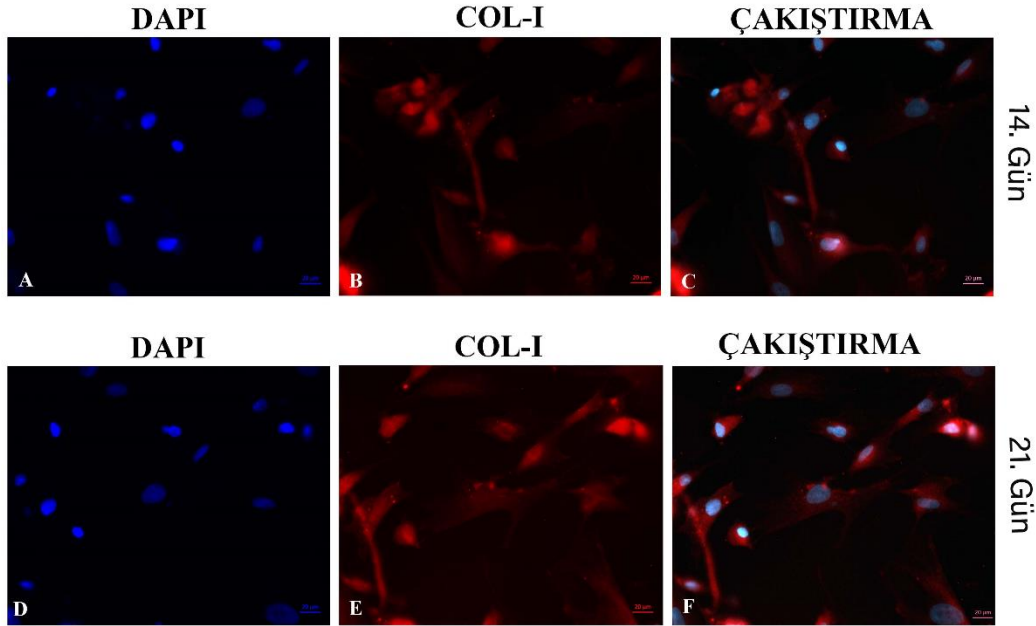
Şekil 3.37. hfO grubunda 14 ve 21. günlerde immunfloresan boyama ile gösterilen OPN ifadesi. **A, B, C:** 14. gün. **D, E, F:** 21. gün. **A, D:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B, E:** Hücrelerin sitoplazmalarında osteopontin ifadesi. **C, F:** Çakıştırma. Bar: 20 μ .



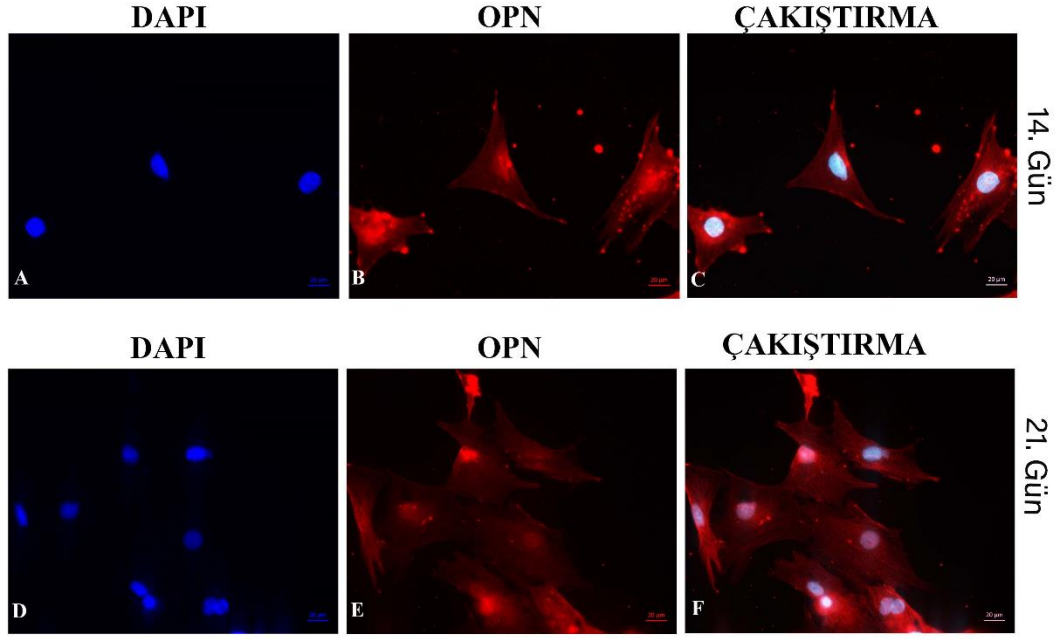
Şekil 3.38. OPN grubunda 14 ve 21. günlerde immunfloresan boyama ile gösterilen COL1 ifadesi. **A, B, C:** 14. gün. **D, E, F:** 21. gün. **A, D:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B, E:** Hücrelerin sitoplazmalarında COL1 ifadesi. **C, F:** Çakıştırma. Bar: 20 μ .



Şekil 3.39. OPN grubunda 14 ve 21. günlerde immunfloresan boyama ile gösterilen OPN ifadesi. **A, B, C:** 14. gün. **D, E, F:** 21. gün. **A, D:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B, E:** Hücrelerin sitoplazmalarında osteopontin ifadesi. **C, F:** Çakıştırma. Bar: 20µ.



Şekil 3.40. OPO grubunda 14 ve 21. günlerde immunfloresan boyama ile gösterilen COL1 ifadesi. **A, B, C:** 14. gün. **D, E, F:** 21. gün. **A, D:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B, E:** Hücrelerin sitoplazmalarında COL1 ifadesi. **C, F:** Çakıştırma. Bar: 20µ.



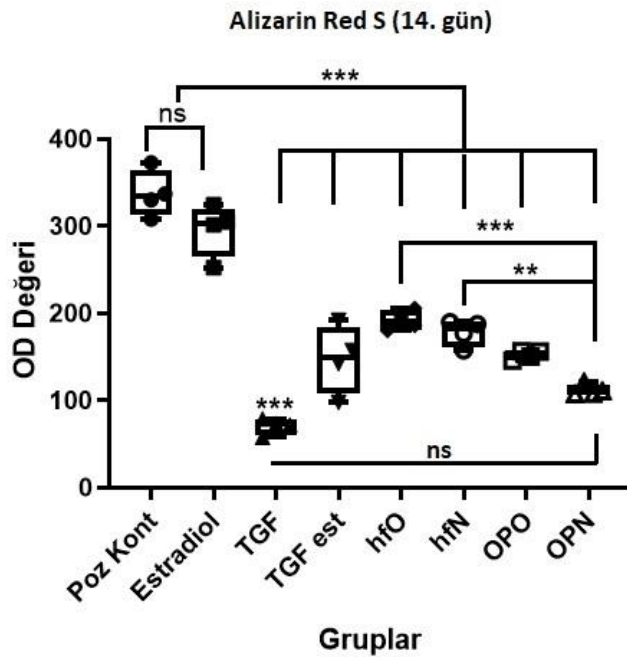
Şekil 3.41. OPO grubunda 14 ve 21. günlerde immunfloresan boyama ile gösterilen OPN ifadesi. **A, B, C:** 14. gün. **D, E, F:** 21. gün. **A, D:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **B, E:** Hücrelerin sitoplazmalarında osteopontin ifadesi. **C, F:** Çakıştırma. Bar: 20 μ .

3.3.3. Alizarin Red S Boyamasının Sayısal Değerlendirmesi

Hücrelerin on dört ve yirmi bir günlük osteojenik farklılaştırma çalışmalarında elde edilen sayısal veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. On dördüncü günde en yüksek kalsiyum birikimi pozitif kontrol grubunda ($337,1 \pm 26,8$) ve 17β -estradiol grubunda ($295,9 \pm 30,62$) tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmadı. On dördüncü günde pozitif kontrol grubu ve 17β -estradiol grubu verileri diğer grupların verileri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli derecede bir fark olduğu ($p < 0,001$) belirlendi. On dördüncü günde en düşük sayısal veriler TGF- $\beta 3$ grubunda ($70,47 \pm 9$) belirlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında TGF- $\beta 3$ grubu verilerinin OPN grubu hariç tüm gruplardan istatistiksel olarak önemli derecede daha düşük olduğu ($p < 0,001$) gözlemlendi (Tablo 3.3; Şekil 3.42.).

Tablo 3.3. Osteojenik farklılaştırılan hücrelerde kalsiyum birikimi seviyelerinin sayısal değerlendirilmesi. **Poz Kont:** Pozitif kontrol grubu; **Est:** 17 β -estradiol grubu; **TGF:** TGF- β 3 grubu; **TGF-Est:** TGF- β 3 + 17 β -estradiol grubu; **hfO:** hfOB kültür medyumumu + osteojenik medyum grubu; **hfN:** hfOB kültür medyumumu + ASKKH kültür medyumumu grubu; **OPO:** Osteoprotegerin KM + osteojenik medyum grubu; **OPN:** Osteoprotegerin KM + ASKKH kültür medyumumu grubu. Aynı sütundaki farklı harfler arasında istatistiksel fark vardır.

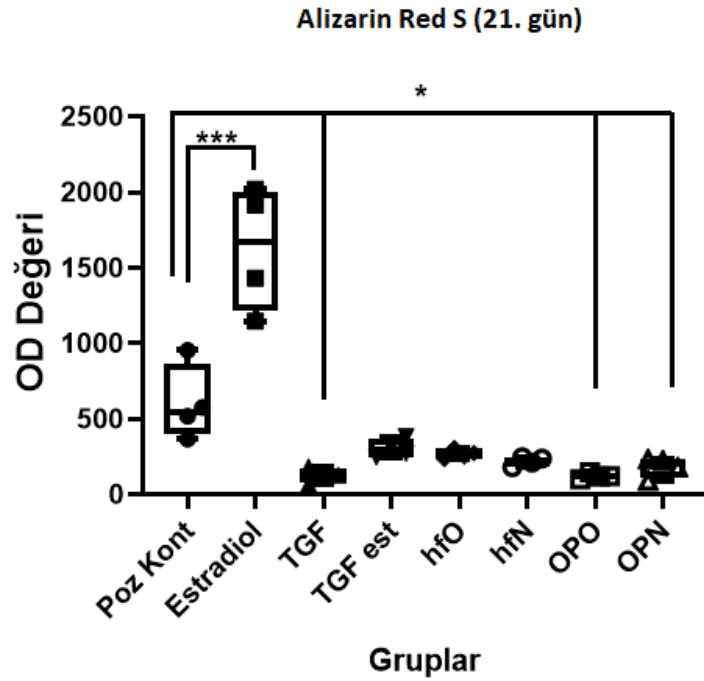
Grup/Gün	14. Gün	21. Gün
Poz Kont (Ort \pm SH)	337,1 \pm 26,8 a	603 \pm 249 a
Est (Ort \pm SH)	295,9 \pm 30,62 a	1628 \pm 410 b
TGF (Ort \pm SH)	70,47 \pm 9 c	131 \pm 47,7 c
TGF-Est (Ort \pm SH)	147 \pm 38,9 d	304 \pm 60 a, c
hfO (Ort \pm SH)	192 \pm 11,42 d	267 \pm 31,4 a, c
hfN (Ort \pm SH)	178 \pm 14,8 d	219 \pm 30,1 a, c
OPO (Ort \pm SH)	152 \pm 5,13 d, e	122 \pm 18,6 c
OPN (Ort \pm SH)	111,5 \pm 6,28 c, e	181 \pm 64,5 c



Şekil 3.42. Osteojenik farklılaştırılan hücrelerde kalsiyum birikimi seviyelerinin sayısal değerlendirilmesi (14. gün). On dördüncü günde en yüksek kalsiyum birikimi verileri pozitif kontrol grubu ve 17 β -estradiol grubunda saptandı. En düşük sayısal veri TGF- β 3 grubunda belirlendi.

Çalışmamızda 21. günde diğer gruplara kıyasla 17 β -estradiol grubunda istatistiki olarak oldukça yüksek seviyede kalsiyum birikimi (1628 \pm 410) tespit edildi (p

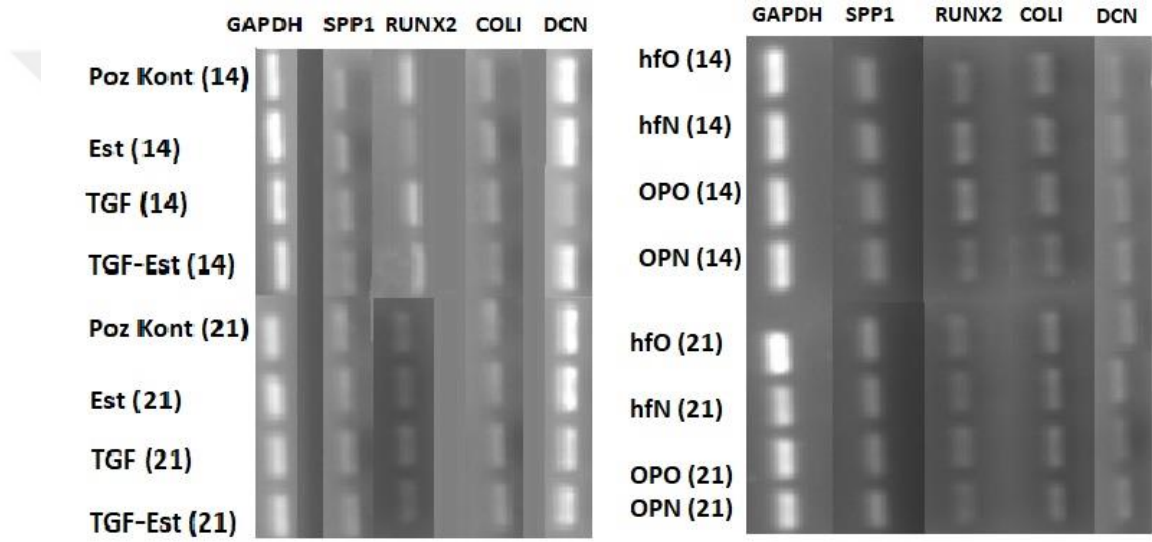
<0,001). Yirmi birinci günde pozitif kontrol grubunda ölçülen kalsiyum birikimi seviyesinin 17 β -estradiol grubuna göre istatistiki olarak önemli derecede daha düşük olduğu (p <0,001), ancak TGF- β 3, OPO ve OPN gruplarının kalsiyum birikim seviyelerinden ise istatistiksel olarak daha yüksek olduğu (p<0,05) belirlendi. Araştırmamızda 21. günde kalsiyum birikimi miktarı yönünden en düşük sayısal veriler OPO grubunda ($122 \pm 18,6$) elde edildi. Fakat bu sonucun 17 β -estradiol ve pozitif kontrol grubu haricinde diğer gruplara göre istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturmadığı saptandı (Tablo 3.3, Şekil 3.43).



Şekil 3.43. Osteojenik farklılaştırılan hücrelerde kalsiyum birikimi seviyelerinin sayısal değerlendirilmesi (21. gün). Yirmi birinci günde en yüksek kalsiyum birikimi değerleri 17 β -estradiol grubundan elde edildi. En düşük sonuç ise OPN grubunda saptandı.

3.3.4. Real-Time PCR Analizi

Osteojenik farklılaşma çalışmaları kapsamında 8 adet grupta SPP1, RUNX2, COL1 ve DCN gen ifadeleri negatif kontrol grubu örneklerindeki aynı gen ifadeleri ile karşılaştırılarak gen ifadesindeki kat değişimi değerleri elde edildi ve bu değerler ile istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. Değerlendirmeler 14 ve 21. günler için ayrı ayrı yapıldı ve sonuçları sırasıyla tablo 3.4 ve tablo 3.5'te verildi.



Şekil 3.44. Osteojenik farklılaştırma deney gruplarında iki zaman aralığında GAPDH, SPP1, RUNX2, COL 1 ve DCN belirteçlerinin gen düzeyinde ifadelerinin agaroz jel üzerinde gösterimi.

On dördüncü günde gruplar arası karşılaştırmada hem SPP1 hem de DCN gen ifadelerindeki kat değişiminde 17 β -estradiol grubunda anlamlı bir artış olduğu görüldü ($p < 0,001$). RUNX2 gen ifadesindeki kat artışında TGF- β 3 grubunda oldukça yüksek ve anlamlı bir artış saptandı ($p < 0,001$). KM kullanılan tüm gruplarda (OPO, hfO, hfN, OPN) COL1 gen ifadesindeki kat değişiminde artış gözlemlense de bu artışın sadece hfO ($p < 0,01$) ve OPN ($p < 0,001$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (Tablo 3.4, Şekil 3.5).

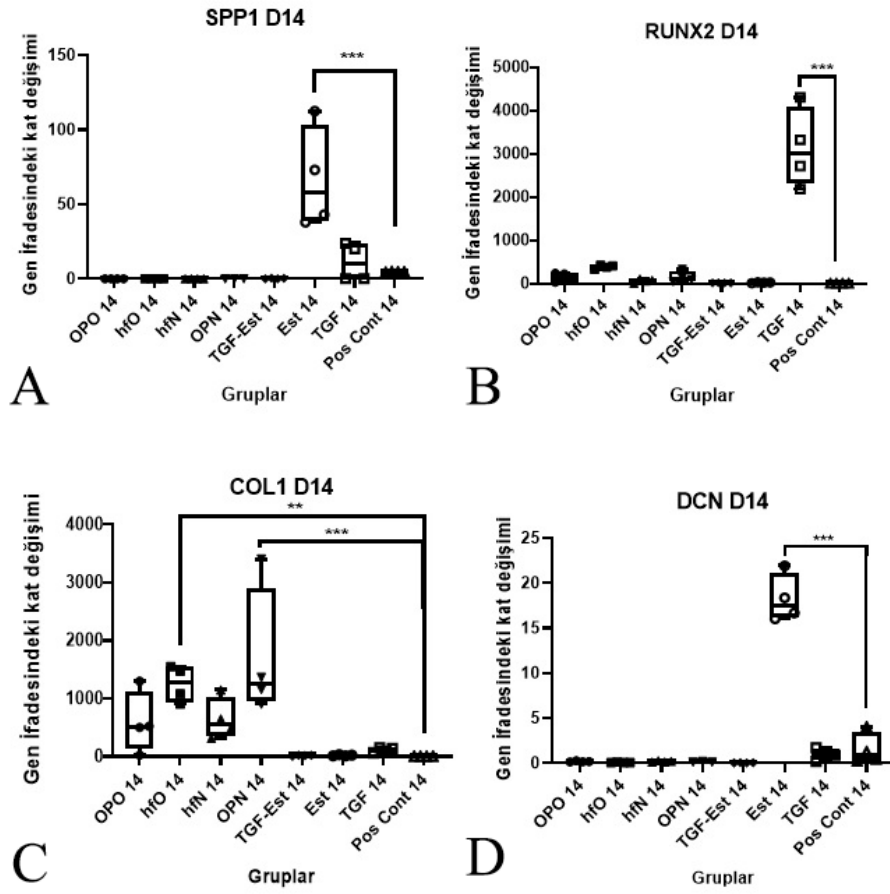
Tablo 3.4. Osteojenik farklılaşmanın 14. gününde gen ifadesindeki kat değişimleri. **O. OPO:** Osteoprotegerin KM + osteojenik medyum; **hfO:** hfOB kültür medyum + osteojenik medyum; **hfN:** hfOB kültür medyum + ASKKH kültür medyum; **OPN:** Osteoprotegerin KM + ASKKH kültür medyum; **TGF-Est:** Osteojenik medyum + 10 ng/mL TGF-β3 + 10 nM 17-β estradiol; **Est:** Osteojenik medyum + 10 nM 17-β estradiol; **TGF:** Osteojenik medyum + 10 ng/mL TGF-β3; **Poz Cont:** Osteojenik medyum. Aynı satırda farklı harfler (a, b, c) arasında istatistiksel farklılık vardır. Ort: Ortalama, SH: standart hata.

Grup →	OPO 14	hfO 14	hfN 14	OPN 14	TGF-Est 14	Est 14	TGF 14	Poz Cont 14	
Gen ↓	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	P
SPP1	0,0224 ± 0,008 a	0,026 ± 0,007 a	0,027 ± 0,008 a	0,003 ± 0,0004 a	0,243 ± 0,272 a	66,7 ± 34,3 b	11,1 ± 12,6 a	4,75 ± 0,2 a	<,001
RUNX2	150 ± 102 a	382 ± 44 a	61,5 ± 42,9 a	148 ± 1274 a	14,1 ± 1,24 a	21,7 ± 7,83 a	3129 ± 911 b	1,92 ± 0,2 a	<,001
COL1	590 ± 528 a	1255 ± 310 b	645 ± 363 a	1708 ± 1145 b	20,9 ± 7,11 a	25,2 ± 10,5 a	114 ± 39,2 a	4,12 ± 1,09 a	<,001
DCN	0,183 ± 0,05 a	0,082 ± 0,028 a	0,181 ± 0,028 a	0,147 ± 0,035 a	0,045 ± 0,014 a	18,2 ± 2,63 b	0,95 ± 0,61 a	1,49 ± 1,77 a	<,001

Tablo 3.5. Osteojenik farklılaşmanın 21. gününde gen ifadesindeki kat değişimleri **OPO:** Osteoprotegerin KM + osteojenik medyum; **hfO:** hfOB kültür medyum + osteojenik medyum; **hfN:** hfOB kültür medyum + ASKKH kültür medyum; **OPN:** Osteoprotegerin KM + ASKKH kültür medyum; **TGF-Est:** Osteojenik medyum + 10 ng/mL TGF-β3 + 10 nM 17-β estradiol; **Est:** Osteojenik medyum + 10 nM 17-β estradiol; **TGF:** Osteojenik medyum + 10 ng/mL TGF-β3; **Pos Cont:** Osteojenik medyum. Aynı satırda farklı harfler (a, b, c) arasında istatistiksel farklılık vardır. Ort: Ortalama, SH: standart hata.

Grup →	OPO 21	hfO 21	hfN 21	OPN 21	TGF-Est 21	Est 21	TGF 21	Poz Cont 21	
Gen ↓	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	Ort ± SH	P
SPP1	0,023 ± 0,03 a	0,025 ± 0,01 a	0,0544 ± 0,02 a	0,009 ± 0,004 a	0,931 ± 0,21 a	136 ± 82,5 b	0,567 ± 0,35 a	0,478 ± 0,52 a	<,001
RUNX2	418 ± 396 a	224 ± 34,2 b	324 ± 164 b	173 ± 108 b	71,6 ± 10,1 b	5,69 ± 2 b	161 ± 53,4 b	83,7 ± 42,6 b	0,022
COL1	18 ± 6,27 a	458 ± 83,2 b	542 ± 188 b	194 ± 172 a	87,5 ± 15 a	9,26 ± 3,79 a	39,5 ± 2,94 a	12,3 ± 2,5 a	<,001
DCN	0,064 ± 0,07 a	0,174 ± 0,015 a	0,184 ± 0,1 a	0,353 ± 0,273 a	5,81 ± 0,98 a	22,6 ± 11 b	0,338 ± 0,25 a	12,3 ± 2,5 c	<,001

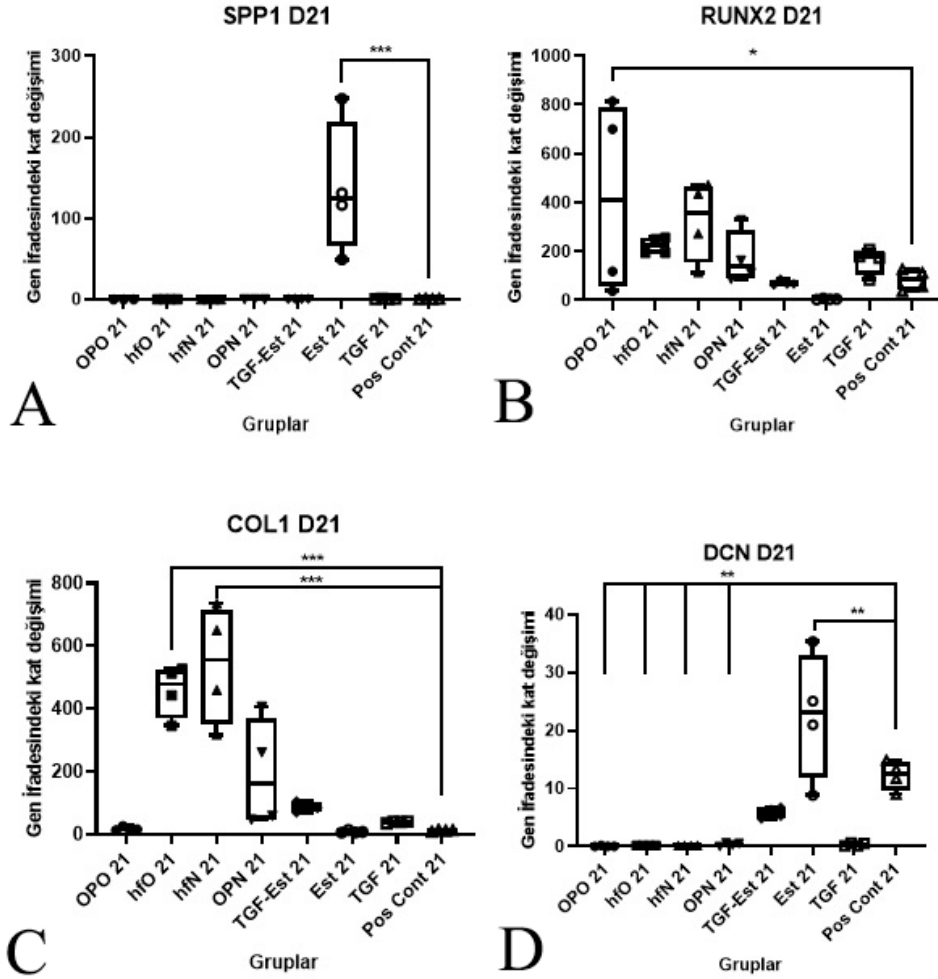




Şekil 3.45. On dördüncü günde osteojenik belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişiminin karşılaştırması. **A:** 17 β -estradiol grubunda pozitif kontrol grubuna göre SPP1 gen ifadesindeki kat değişiminde anlamlı bir artış görüldü. **B:** RUNX2 gen ifadesindeki kat değişiminin TGF- β 3 grubunda oldukça yüksek olduğu ve pozitif kontrol grubuna göre farkın önemli olduğu saptandı. **C:** COL1 gen ifadesindeki kat değişimlerinde hfO ve OPN gruplarında önemli bir artış görüldü. **D:** DCN gen ifadesinde ise 17 β -estradiol grubunda pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında önemli bir artış saptandı (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001).

Yirmi birinci günde, 14. gün gruplarına benzer şekilde SPP1 ve DCN gen ifadelerindeki kat değişiminde 17 β -estradiol grubunda pozitif kontrol grubuna göre anlamlı bir artış tespit edildi (sırasıyla p <0,001 ve p <0,01). KM kullanılan gruplarda DCN gen ifadesindeki kat değişiminde pozitif kontrole göre anlamlı bir azalma görüldü (p <0,01). Ayrıca DCN gen ifadesindeki kat değişiminin 14. güne göre istatistiki olarak daha az anlamlı olduğu gözlemlendi. RUNX2 gen ifadesindeki kat

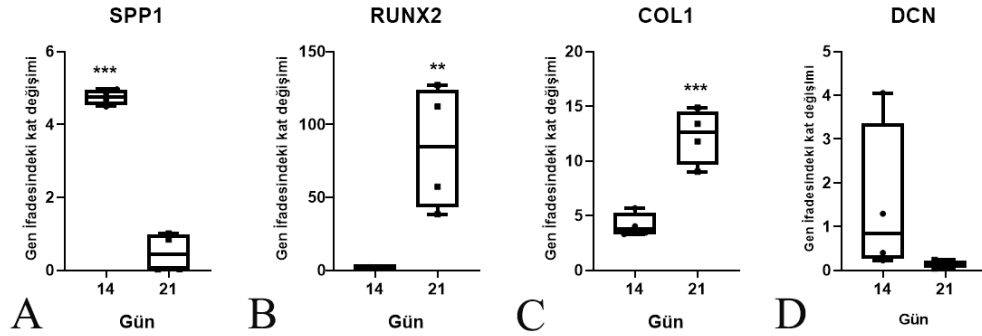
değişiminde en yüksek veriler OPO grubundan elde edildi. OPO grubunda RUNX2 gen ifadesindeki kat değişimi pozitif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derece artış gösterirken ($p < 0,05$) en düşük değerler Est grubundan elde edildi. COL1 gen ifadesinde ise hfO ve hfN gruplarında pozitif kontrole göre anlamlı bir artış belirlendi ($p < 0,001$) (Tablo 3.5, Şekil 3.46).



Şekil 3.46. Yirmi birinci gün örneklerinde osteojenik belirteçlerin karşılaştırması. **A:** 17 β -estradiol grubunda pozitif kontrol grubuna kıyasla SPP1 gen ifadesindeki kat değişiminde anlamlı bir artış görüldü. **B:** RUNX2 gen ifadesindeki kat değişiminin OPO grubunda pozitif kontrol grubuna kıyasla anlamlı derece artmış olduğu gözlemlendi. **C:** COL1 gen ifadesinde hfO ve hfN gruplarında anlamlı bir artış görüldü. **D:** DCN gen ifadesinde ise 17 β -estradiol grubunda pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış gözlenirken KM kullanılan dört grupta da pozitif kontrole göre anlamlı bir düşüş belirlendi (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Çalışmada gruplar arası karşılaştırmanın yanında; aynı grup içerisinde incelenen genlerin 14 ve 21. günlerde ifadeleri de analiz edildi.

Pozitif kontrol grubunda 14 ve 21. günlerde gen ifadesindeki kat değişimleri karşılaştırıldığında SPP1 gen ifadesinin 14. günde anlamlı olarak arttığı görüldü ($p < 0,001$) (Şekil 3.47, A). RUNX2 ve COL1 genlerindeki kat değişimlerinin ise 21. gün örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlendi (sırasıyla $p < 0,01$ ve $p < 0,001$) (Şekil 3.47; B, C). DCN belirteci için ise her ne kadar 14. gün örneklerinde daha yüksek sonuçlar elde edilmiş olsa da iki zaman aralığında elde edilen sonuçlar arasında önemli bir fark görülmedi (Şekil 3.47, D). Elde edilen sonuçlar Tablo 3.6.'de verildi.



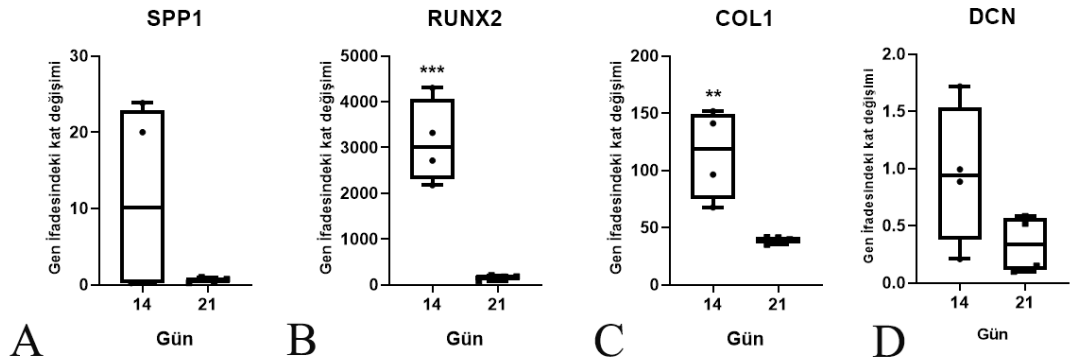
Şekil 3.47. Pozitif kontrol grubunda osteojenik belirteçlerin ifadesinde belirlenen zaman aralıklarında farkı. **A:** SPP1 belirteci için gen ifadesindeki kat değişiminin 14. günde anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. **B:** RUNX2 ifadesindeki kat değişiminde 21. günde anlamlı bir artış görüldü. **C:** COL1 ifadesindeki kat değişiminde 21. günde önemli bir artış gözlemlendi. **D:** DCN genindeki kat değişiminde 14. günde daha yüksek sonuçlar elde edilse de bu fark anlamlı değildi (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Tablo 3.6. Pozitif kontrol grubunda osteojenik belirteçlerin iki zaman aralığında karşılaştırılması.

Poz Kont	G14 (ort ± SH)	G21 (ort ± SH)	Anlamlılık	P
SPP1	4,74 ± 0,2	0,47 ± 0,5	***	<,001
RUNX2	1,91 ± 0,2	83,74 ± 42,58	**	0,009
COL1	4,11 ± 1	12,26 ± 2,5	***	<,001
DCN	1,5 ± ,17	0,14 ± 0,08	ns	0,18

*ns: istatistiksel olarak önemli değil.

TGF-β3 grubunda 14 ve 21. günlerde gen ifadesindeki kat değişimleri karşılaştırıldığında SPP1’de 14. günde daha yüksek sonuçlar görülse de istatistiki olarak önemli bir artış tespit edilmedi (Şekil 3.48, A). RUNX2 ve COL1 genlerinin kat değişimlerinde 14. gün örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlendi (sırasıyla p <0,001 ve p <0,01) (Şekil 4.48; B, C). DCN gen ifadesindeki kat değişiminde ise 14. günde daha yüksek sonuçlar elde edilmiş olsa da iki zaman aralığında elde edilen sonuçlar arasında istatistiki olarak önemli bir fark belirlenmedi (Şekil 3.48, D). Elde edilen sonuçlar Tablo 3.7’de verildi.

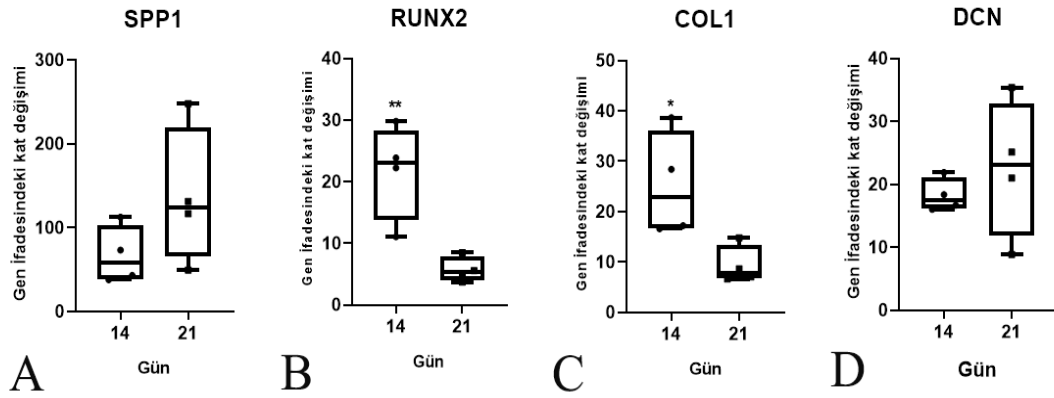


Şekil 3.48. TGF-β3 grubunda osteojenik belirteçlerin ifadesindeki kat değişiminin belirlenen zaman aralıklarında farkı. **A:** SPP1 ifadesindeki kat değişiminde iki zaman aralığı arasında fark görülmedi **B:** RUNX2 ifadesindeki kat değişiminde 14. günde anlamlı bir artış saptandı. **C:** COL1 ifadesindeki kat değişiminde 14. günde anlamlı bir artış gözlemlendi. **D:** DCN genindeki kat değişiminde 14. günde daha yüksek sonuçlar elde edilse de bu farkın istatistiki olarak önemli olmadığı tespit edildi (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Tablo 3.7. TGF- β 3 grubunda osteojenik belirteçlerin iki zaman aralığında karşılaştırılması.

TGF Grubu	G14 (ort \pm SH)	G21 (ort \pm SH)	Anlamlılık	P
SPP1	11,09 \pm 12,6	0,56 \pm 0,35	ns	0,146
RUNX2	3129 \pm 920	71,65 \pm 10,15	***	<,001
COL1	114,2 \pm 39,25	39,47 \pm 2,94	**	0,009
DCN	0,95 \pm 0,61	0,33 \pm 0,24	ns	0,115

17 β -estradiol grubu örneklerinde 14 ve 21. günlerde gen ifadesindeki kat değişimleri karşılaştırıldığında SPP1 gen ifadesinde bir fark görülmedi (Şekil 3.49, A). RUNX2 ve COL1 için genlerindeki kat değişimlerinde 14. gün örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlendi (sırasıyla p <0,01 ve p <0,05) (Şekil 3.49; B, C). DCN gen ifadesindeki kat değişiminde ise iki zaman aralığında elde edilen sonuçlar arasında istatistiki olarak önemli bir fark görülmedi (Şekil 3.49, D). Elde edilen sonuçlar Tablo 3.8.'de verildi.

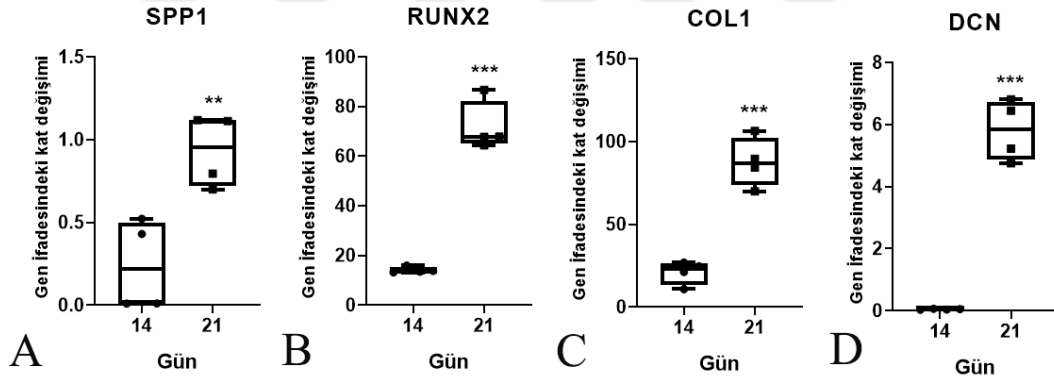


Şekil 3.49. 17 β -estradiol grubunda osteojenik belirteçlerin ifadesindeki kat değişimlerinin belirlenen zaman aralıklarında farkı. **A:** SPP1 gen ifadesindeki kat değişiminde iki zaman aralığı arasında fark görülmedi **B:** RUNX2 ifadesindeki kat değişiminde 14. günde önemli bir artış görüldü. **C:** COL1 ifadesindeki kat değişiminde 14. günde önemli bir artış gözlemlendi. **D:** DCN gen ifadesindeki kat değişiminde ise iki zaman aralığında elde edilen sonuçlar arasında istatistiki olarak bir fark tespit edilmedi (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Tablo 3.8.17 β -estradiol grubunda osteojenik belirteçlerin iki zaman aralığında karşılaştırılması.

Est Grubu	G14 (ort \pm SH)	G21 (ort \pm SH)	Anlamlılık	P
SPP1	66,7 \pm 34,26	136,3 \pm 82,4	ns	0,17
RUNX2	21,74 \pm 7,82	5,68 \pm 2	**	0,007
COL1	25,21 \pm 10,48	9,25 \pm 3,78	*	0,029
DCN	18,24 \pm 2,62	22,6 \pm 10,97	ns	0,47

TGF- β 3 + 17 β -estradiol grubunda 14 ve 21. günlerde gen ifadesindeki kat değişimleri karşılaştırıldığında SPP1 gen ifadesindeki kat değişimi yönünden 21. günde anlamlı bir artış gözlemlendi (p <0,01) (Şekil 3.50, A). RUNX2, COL1 ve DCN genlerinin ifadesindeki kat değişimlerinde de benzer şekilde 21. günde istatistiksel olarak önemli artışlar gözlemlendi (p <0,001) (Şekil 3.50; B, C, D). Elde edilen sonuçlar Tablo 3.9.'da verildi.

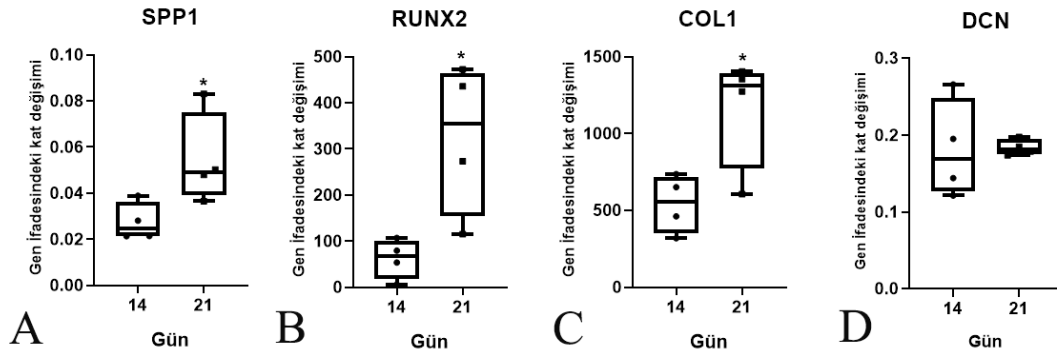


Şekil 3.50. TGF- β 3 + 17 β -estradiol grubunda osteojenik belirteçlerin ifadesinde belirlenen zaman aralıklarında farkı. **A:** SPP1 belirteci için kat değişiminde 21. gün örneklerinde anlamlı bir artış gözlemlendi. **B:** RUNX2 ifadesinde 21. günde anlamlı bir artış görüldü. **C:** COL1 ifadesinde 21. günde anlamlı bir artış belirlendi. **D:** DCN belirteci için iki zaman aralığında elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında 21. günde anlamlı bir artış olduğu görüldü (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Tablo 3.9. TGF- β 3 + 17- β estradiol grubunda osteojenik belirteçlerin iki zaman aralığında karşılaştırılması.

TGF Est Grubu	G14 (ort \pm SH)	G21 (ort \pm SH)	Anlamlılık	P
SPP1	0,242 \pm 0,2	0,93 \pm 0,2	**	0,007
RUNX2	14 \pm 1,24	71,65 \pm 10,15	***	<,001
COL1	20,85 \pm 7,1	87,5 \pm 15	***	<,001
DCN	0,045 \pm 0,014	5,8 \pm 0,977	***	<,001

hfN grubu örneklerinde 14 ve 21. günlerde gen ifadesindeki kat değişimleri karşılaştırıldığında sonuçlarda SPP1 belirteci bakımından 21. günde anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0,05$) (Şekil 3.51, A). RUNX2 ve COL1 belirteçlerinde de benzer şekilde 21. gün örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 3.51; B, C). DCN belirteci için yapılan değerlendirmelerde ise anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Şekil 3.51, D). Elde edilen sonuçlar Tablo 3.10'da verildi.

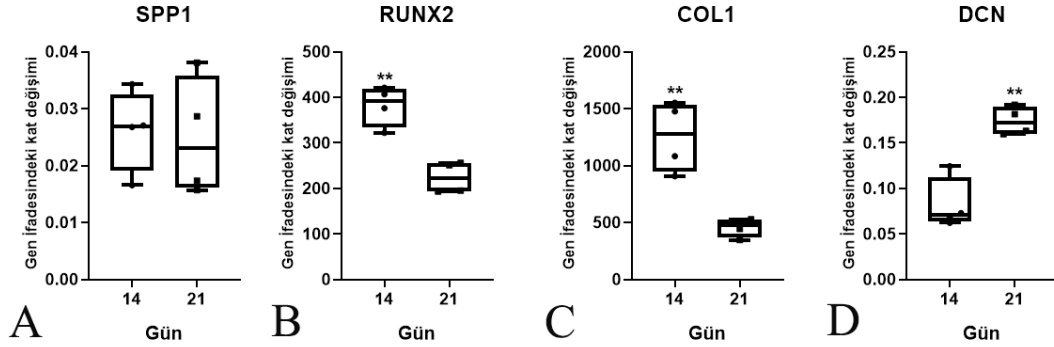


Şekil 3.51. hfN grubunda osteojenik belirteçlerin ifadesinde belirlenen zaman aralıklarında farkı. **A:** SPP1 belirteci için kat değişiminde 21. gün örneklerinde anlamlı bir artış gözlemlendi. **B:** RUNX2 ifadesinde 21. günde anlamlı bir artış görüldü. **C:** COL1 ifadesinde 21. günde anlamlı bir artış belirlendi. **D:** DCN belirteci için iki zaman aralığında elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlemlenmedi (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Tablo 3.10. hfN grubunda osteojenik belirteçlerin iki zaman aralığında karşılaştırılması.

hfN Grubu	G14 (ort ± SH)	G21 (ort ± SH)	Anlamlılık	P
SPP1	0,027 ± 0,008	0,054 ± 0,02	*	0,047
RUNX2	61,48 ± 42,8	324,2 ± 164,1	*	0,021
COL1	541,7 ± 188	1159 ± 372,8	*	0,025
DCN	0,181 ± 0,06	0,183 ± 0,01	ns	0,948

hfO grubu örneklerinde 14 ve 21. günlerde gen ifadesindeki kat değişimleri karşılaştırıldığında sonuçlarda SPP1 belirteci bakımından anlamlı bir fark yoktu (Şekil 3.52, A). RUNX2 ve COL1 belirteçlerinde şekilde elde edilen sonuçların 14. gün örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü ($p < 0,01$) (Şekil 3.52; B, C). DCN belirteci için yapılan değerlendirmelerde ise 21. günde gen ifadesindeki kat değişiminin anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlendi ($p < 0,01$) (Şekil 3.52, D). Elde edilen sonuçlar Tablo 3.11.'de verildi.

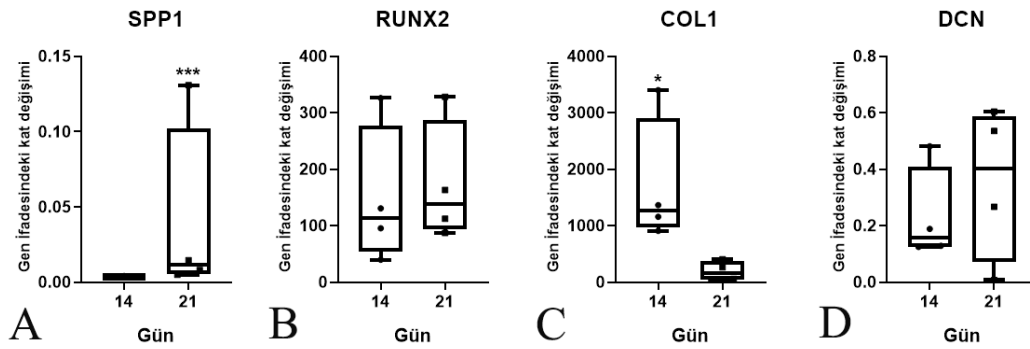


Şekil 3.52. hfO grubunda osteojenik belirteçlerin ifadesinde belirlenen zaman aralıklarında farkı. **A:** SPP1 belirteci için kat değişiminde anlamlı bir fark görülmedi. **B:** RUNX2 ifadesinde 14. günde anlamlı bir artış görüldü. **C:** COL1 ifadesinde 14. günde anlamlı bir artış belirlendi. **D:** DCN belirteci için ise 21. gün örneklerinde gen ifadesindeki kat değişiminin anlamlı derecede arttığı gözlemlendi (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Tablo 3.11. hfO grubunda osteojenik belirteçlerin iki zaman aralığında karşılaştırılması.

hfO Grubu	D14 (ort ± SH)	D21 (ort ± SH)	Anlamlılık	P
SPP1	0,026 ± 0,007	0,025 ± 0,01	ns	0,853
RUNX2	381,7 ± 44	223,9 ± 34,21	**	0,001
COL1	125,5 ± 310	457,9 ± 83,2	**	0,003
DCN	0,082 ± 0,028	0,174 ± 0,015	**	0,001

OPN grubu örneklerinde 14 ve 21. günlerde gen ifadesindeki kat değişimleri karşılaştırıldığında sonuçlarda SPP1 belirteci için gen ifadesindeki kat değişiminin 21. günde anlamlı derecede arttığı belirlendi ($p < 0,001$) (Şekil 3.53, A). RUNX2 belirteci için alınan sonuçlarda iki zaman aralığı için bir fark gözlenmedi (Şekil X.9, B). COL1 belirteçlerinde ise elde edilen sonuçların 14. gün örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 3.53, C). DCN belirteci için yapılan değerlendirilmelerde iki zaman aralığı karşılaştırıldığında sonuçlar arasında bir fark gözlenmedi (Şekil 3.53, D). Elde edilen sonuçlar Tablo 3.12.'de verildi.



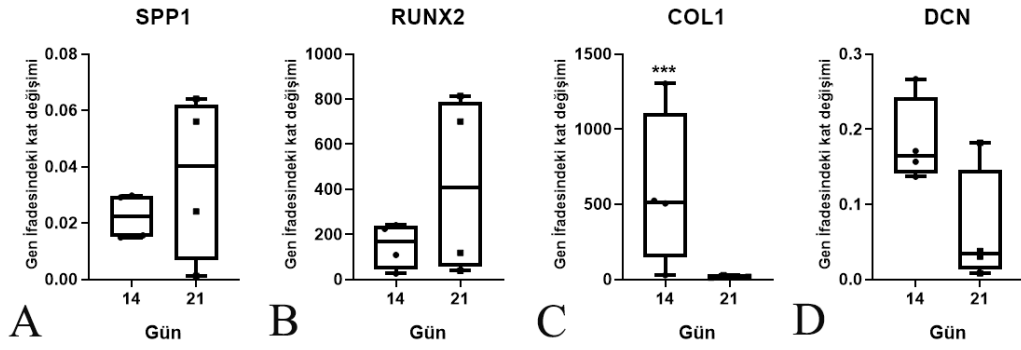
Şekil 3.53. OPN grubunda osteojenik belirteçlerin ifadesinde belirlenen zaman aralıklarında farkı. **A:** SPP1 belirteci için 21.günde anlamlı bir artış görüldü. **B:** RUNX2 ifadesinde iki zaman aralığında elde edilen sonuçlar arasında bir fark gözlenmedi. **C:** COL1 ifadesinde 14.

günde anlamlı bir artış belirlendi. **D:** DCN belirteci için ise iki zaman aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Tablo 3.12. OPN grubunda osteojenik belirteçlerin iki zaman aralığında karşılaştırılması.

OPN Grubu	D14 (ort ± SH)	D21 (ort ± SH)	Anlamlılık	P
SPP1	0,00363 ± 0,0004	0,0396 ± 0,06	***	<,001
RUNX2	148 ± 124	173 ± 108	ns	0,826
COL1	1708 ± 1145	194 ± 172	*	0,011
DCN	0,231 ± 0,17	0,353 ± 0,27	ns	0,456

OPO grubu örneklerinde 14 ve 21. günlerde gen ifadesindeki kat değişimleri karşılaştırıldığında sonuçlarda SPP1 belirteci için gen ifadesindeki kat değişimi bakımından iki zaman aralığı arasında fark olmadığı görüldü (Şekil 3.54., A). RUNX2 belirteci için alınan sonuçlarda 21. günde sayısal bir artış görülse de bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 3.54, B). COL1 belirteçlerinde ise elde edilen sonuçların 14. gün örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü (p <0,001) (Şekil 3.54, C). DCN belirteci için yapılan değerlendirilmelerde iki zaman aralığı karşılaştırıldığında sonuçlar arasında bir fark gözlenmedi (Şekil 3.54, D). Elde edilen sonuçlar Tablo 3.13.'de verildi.



Şekil 3.54. OPO grubunda osteojenik belirteçlerin ifadesinde belirlenen zaman aralıklarında farkı. **A:** SPP1 belirteci için zaman aralıkları arasında bir fark gözlenmedi. **B:** RUNX2 ifadesinde iki zaman aralığında elde edilen sonuçlar arasında bir fark gözlenmedi. **C:** COL1 ifadesinde 14. günde anlamlı bir artış belirlendi. **D:** DCN belirteci için ise iki zaman aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Tablo 3.13. OPO grubunda osteojenik belirteçlerin iki zaman aralığında karşılaştırılması.

OPO Grubu	D14 (ort ± SH)	D21 (ort ± SH)	Anlamlılık	P
SPP1	0,0224 ± 0,0041	0,0364 ± 0,0146	ns	0,066
RUNX2	150 ± 102	418 ± 396	ns	0,051
COL1	590 ± 528	18 ± 6,27	***	<,001
DCN	0,183 ± 0,057	0,0646 ± 0,079	ns	0,616

4. TARTIŞMA

4.1. ASKKH'lerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

4.1.1. Hücre Morfolojisi

Amniyon sıvısı içerisindeki hücre popülasyonuna fetusun katkı yapması ikinci trimesterden sonra görülür. İkinci trimesterden itibaren fetal periderm veya epidermis, amniyon ve trofoblast ile birlikte fetüsün sindirim kanalı, üriner ve ürogenital sistemi kaynaklı hücreler de amniyotik sıvıdaki hücre popülasyonuna katılır (Gosden 1983). Bu nedenle araştırmacılar çoğunlukla ASKKH izolasyonu için bu trimesteri tercih etmektedirler. Sıçanlarda gebelik sürecinde 9 ile 19. günler arası ikinci trimester olarak kabul edilir. (Zhao vd. 2019). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda Antounians ve arkadaşları (2019) gebeliğin 12. gününü; Bollini ve arkadaşları (2011) 16. günü; Wang ve arkadaşları (2017) 15-17. günleri, Nawaz (2020) ise 17. günü kök hücre izolasyonu için kabul ederler. Çalışmamızda gebeliğin ikinci trimesteri içerisindeki 17. günde hücre izolasyonları gerçekleştirildi.

Araştırmacılar, amniyon sıvısının fetal ve maternal kaynaklardan köken alan hücre tiplerini içeriyor olmasından dolayı ASKKH'lerde heterojen bir morfoloji bildirmektedirler. Bossolasco ve arkadaşları (2006) insan ASKKH'lerinde epitel benzeri hücreler ve stromal hücreler olmak üzere iki tip morfoloji tarif etmektedirler. İnsan ASKKH'lerinde yapılan çalışmalarda Pipino ve arkadaşları (2005) epitel benzeri ve fibroblast benzeri hücreler olmak üzere iki tip morfoloji bildirirken, Savickiene ve arkadaşları (2015) ikinci ve üçüncü trimesterde izole ettikleri insan ASKKH'lerinde epitel benzeri, fibroblast benzeri ve stromal hücreler olmak üzere 3 tip morfoloji tanımladılar. Nawaz (2020) ise sıçan ASKKH'lerinde epitel benzeri, fibroblast benzeri ve stromal hücrelerin varlığını bildirirken bunlara ek olarak "sıkıca paketlenmiş fibroblast benzeri hücreler" olmak üzere bir tip morfoloji daha tanımlamıştır. Çalışmamızda da hücre izolasyonunun ardından hücrelerde literatürle

uyumlu şekilde heterojen bir morfoloji görüldü. ASKHH'lerde izolasyonu takiben fibroblast benzeri, epitel benzeri ve stromal hücreler olmak üzere 3 tip hücre morfolojisi tespit edildi. P3'ten itibaren hücre morfolojisinin homojen hal aldığı ve hücrelerin fibroblast benzeri morfolojiye sahip olduğu görüldü. İlerleyen pasajlarda da fibroblast benzeri morfolojinin korunduğu gözlemlendi. Nawaz (2020) ve Savickiene (2015) de benzer şekilde izole ettikleri ASKHH'lerde ilerleyen pasajlarda hem insanlarda hem de sıçanlarda ASKHH'lerin morfolojisinin homojen olduğunu ve fibroblast benzeri morfolojinin hakim morfoloji haline geldiğini bildirdiler.

4.1.2. Büyüme Eğrisi

Çalışmamızda P3 ve P5'teki ASKHH'lerin büyüme eğrilerini oluşturarak iki pasaj arasında proliferasyon modellerini karşılaştırdık. Gao ve arkadaşları (2014) insan ASKHH'lerinde yaptıkları çalışmada 4, 8, 24 ve 31. pasajlarda büyüme eğrisi grafikleri oluşturarak yalnızca 31. pasajda proliferasyon bakımından bir fark olduğunu gözlemlədiler. Benzer şekilde You ve arkadaşları (2009) da insan ASKHH'lerinde 2, 5 ve 8. pasajdaki hücrelerde yaptıkları büyüme eğrisi analizinde bu pasajlar arasında fark olmadığını saptadılar. Minocha ve arkadaşları (2019) ise sıçan ASKHH'lerinde büyüme eğrisi analizlerinde 2 ve 8. pasajlar arası bir fark olmadığını, hücrelerin hızla logaritmik faza girdikten sonra 6. günde pik yaptığını ve sonrasında plato fazında seyrettiğini saptadılar.

Çalışmamızda P3 ve P5'te oluşturulan büyüme eğrileri karşılaştırıldığında P5 hücrelerinde daha yüksek hücre sayıları elde edilse de iki pasaj arasında istatistiki bir fark görülmedi ve büyüme eğrisi grafiklerinin benzer bir model sergilediği görüldü. Her iki pasajda da hücrelerin 2. günden itibaren logaritmik çoğalma gösterdiği ve 6. gündeki pikten sonra Minocha ve arkadaşlarının (2019) bulgularına benzer şekilde plato fazına girdiği belirlendi. Literatürdeki diğer çalışmalarda daha ileri pasajlara kadar büyüme eğrilerinin oluşturulduğu görülse de çalışmamızda sonraki safhalarda yapılacak araştırmalarda bu iki pasajdan birini seçmenin bize avantaj sağlayıp

sağlamayacağını görmek amacıyla sadece 3 ve 5. pasajdaki hücrelerde büyüme eğrileri analiz edildi. Hücrelerin benzer çoğalma modeli sergilemesi ve iki pasajdaki büyüme eğrileri arasında istatistiki bir fark olmaması üzerine daha sonraki çalışmalarda iki pasajdaki hücrelerin de kullanabileceği görüldü.

4.1.3. Çoklu Farklılaştırma Çalışmaları

Mezenkimal kök hücreler çoklu farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir ve en azından osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma kapasitesinde olmalıdır (Dominici vd. 2006). Araştırmacılar kemik iliği (Pittenger vd. 1999), yağ doku, idrar (Kang vd. 2015), kalvaryum (Kobayashi vd. 2000) gibi birçok kaynaktan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma kapasitelerini ortaya koydular. Benzer şekilde insan (Pipino vd. 2015), sıçan (Nawaz 2020), at (Kibria vd. 2020), sığır (Rossi vd. 2014) gibi farklı türlerin amniyotik sıvılarından elde edilen ASKHH'lerin de çoklu farklılaşma potansiyeline sahip olduğu bildirildi.

Çalışmamızda da yapılan bilimsel yayınlar ile uyumlu şekilde ASKHH'lerde üçüncü pasajda yapılan farklılaşma çalışmalarında hücrelerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma potansiyeline sahip oldukları sırasıyla Alizarin Red S boyamasıyla gösterilen kalsiyum birikimleri, Oil Red O boyamasıyla belirlenen yağ damlacıkları ve alsiyan mavisi ile tespit edilen glikozaminoglikan oluşumu ile ispatlandı.

4.1.4. Real-Time PCR ve İmmunfloresan Boyama

Çalışmada genifadesi incelenen mezenkimal ve hematopoietik belirteçler Uluslararası Hücresel Tedavi Derneğinin belirlediği mezenkimal stromal hücreler için minimum kriterler baz alınarak seçildi (Dominici vd. 2006). Dominici ve

arkadaşları (2006) mezenkimal stromal hücrelerde belirli mezenkimal kök hücre belirteçlerin pozitif; belirli hematopoietik belirteçlerin ise negatif ifadesinin gerekli olduğunu belirlediler. Yayınlanan bu beyanda, tanımlanan belirteçlerin ifadelerinin insan türüne spesifik olarak belirlendiği ifade edilmektedir. Makalede ayrıca belirteçlerin ifadelerinin akım sitometri analizlerine göre pozitif veya negatif olması gerektiği belirtilirken ileride yapılacak çalışmalardan elde edilen verilere göre kriterlerin modifiye edilebileceği bilgisine de yer verilmektedir (Dominici vd. 2006).

Araştırmamızda P1, P3 ve P5'teki hücrelerde mezenkimal kök hücre belirteçleri olan CD44, CD90 ve CD105; pluripotent kök hücre belirteçleri olan NANOG, SOX2 ve OCT ³/₄ ile hematopoietik hücre belirteçleri olan CD34 ve CD45 genlerinin ifadeleri real-time PCR analizleri ile belirlendi.

Phermthai ve arkadaşları (2010), akım sitometri analizi ile P18'deki insan ASKHH'lerin mezenkimal kök hücre belirteçlerini yüksek düzeyde; CD90 proteinini ise zayıf olarak ifade ettiğini gösterdiler. Nawaz (2020) ise P1, P3 ve P5'te sıçan ASKHH'lerinde hücrelerin CD90, CD44 ve CD105 genlerini ifade ettiğini bildirdi. CD90 ve CD44 gen ifadelerinde pasajlar arası anlamlı bir fark görmeyen Nawaz; CD105 geni için ise P3 ve P5'te P1'e göre anlamlı derecede daha yüksek bir gen ifadesi elde edildiğini tespit etti. Araştırmamızda bu çalışmalar ile uyumlu şekilde ASKHH'lerin mezenkimal kök hücre belirteçlerini her üç pasajda da ifade ettiği belirlendi. CD105 ve CD44 genlerinin ifadesindeki kat değişiminde pasajlar arası fark gözlenmezken CD90 geninin ifadesindeki kat değişiminin P5'te önemli düzeyde arttığı görüldü. CD90; hücre-hücre etkileşimi, hücre tanınması ve hücre adhezyonu ile ilişkilendirilen bir belirteçtir ve önemli bir kök hücre belirteci olarak kabul edilmektedir (Mercati vd. 2009). Araştırmacılar ayrıca farklı pasajlardaki ASKHH'lerde CD44 belirtecinin ifade edildiğini bildirdiler (Phermthai vd. 2010, Pipino vd. 2015, Roubelakis vd. 2007) Corradetti ve arkadaşları (2013) araştırmalarında CD44'ün farklı pasajlardaki sıçır ASKHH'lerinde sabit bir şekilde ifade edildiğini gösterdi. Çalışmamızda CD90 ifadesinde P5'te diğer pasajlara göre bir artış görülse de Nawaz (2020) sıçan ASKHH'lerinde CD 90 geni için P1, P3 ve

P5 arasında istatistiki olarak bir fark bildirmedi. Ancak CD105 geni için ise P3 ve P5'te P1'e göre daha yüksek gen ifadesi tespit etti. Poggi ve arkadaşları (2004), yaptıkları çalışmada fetusun cinsiyetinin amniyotik sıvı içerisinde bulunan bazı sitokinlerin seviyesi üzerinde etkili olduğunu gösterdiler. Katsara ve arkadaşları (2011) da donörün cinsiyetinin kemik iliği kaynaklı kök hücrelerde koloni oluşturma kapasitesi, mezenkimal kök hücre sayısı ve farklılaşma kapasitesi üzerine etkisinin olduğunu bildirdiler. Çalışmamızdaki mezenkimal belirteçlerin gen ifade verileri ile Nawaz (2020)'in verileri arasında gözlenen bu farklılığın fetusların cinsiyet kompozisyonları arasındaki farktan kaynaklanıyor olabileceğini düşünüyoruz.

Mezenkimal stromal hücreler için belirlenen minimum kriterler gereği hücreler hematopoietik belirteçler olan CD34 ve CD45'i ifade etmemelidir (Dominici vd. 2006). Phermthai ve arkadaşları (2010) P18'deki insan ASKHH'lerin CD34 ve CD45 için akım sitometri analizi sonuçlarında bu belirteçleri protein düzeyinde ifade etmediklerini belirttiler. Nawaz (2020) ise çalışmasında sıçan ASKHH'lerinde CD34 ve CD45 gen ifadelerinde pasaj sayısındaki artış ile birlikte bir azalma meydana geldiğini bildirdi.

Çalışmamızda P1, P3 ve P5'teki hücrelerde CD34 ve CD45 gen ifadeleri değerlendirildiğinde her iki belirteç için de P3 ve P5 hücrelerinde hematopoietik belirteçlerin gen ifadesinin P1'e göre önemli derecede azalma gösterdiği belirlendi. Ayrıca CD45 gen ifadesindeki kat değişiminin P3 ile P5 arasında da anlamlı derece azaldığı tespit edildi. Mezenkimal kök hücrelerin hücre kültürü başlangıcında CD34 pozitif oldukları fakat kültür şartlarında bu hücrelerin elimine olarak kültüre edilen hücrelerin zamanla CD34 negatif hale geldiği belirtilmektedir (Lin vd. 2012). Kaiser ve arkadaşları (2007), izole ettikleri kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde CD34 ve CD45 protein ifadeleri yönünden pozitif sonuçlar elde ettiler ve daha sonrasında CD34 ve CD45 pozitif hücreleri seçerek bu hücreler ile yaptıkları çalışmalarda CD34 ve CD45 pozitif hücrelerin de adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitesinde olduğunu gösterdiler. Çalışmamızda da P1'den itibaren

hematopoietik belirteçlerde anlamlı azalmalar görmemiz diğer çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

ASKKH'lerin SOX2, OCT $\frac{3}{4}$, NANOG gibi bazı pluripotent kök hücre belirteçlerini ifade ettiği bilinmektedir (Bossolasco et al. 2006, Phermthai et al. 2010). Çalışmamızda da benzer şekilde sıçan ASKKH'lerinin bu belirteçleri gen düzeyinde ifade ettiği gösterildi. SOX2 gen ifadesindeki kat değişiminde P5'te anlamlı bir azalma görülse de hem OCT $\frac{3}{4}$ hem de NANOG belirteçleri için P5'te önemli derece artışlar tespit edildi. Çalışmamızda real-time PCR bulgularımızla uyumlu olarak, immunfloresan boyama tekniği ile ASKKH'lerin pluripotent kök hücre belirteçleri olan SOX2 ve OCT $\frac{3}{4}$ 'ün protein düzeyinde de ifade ettiği gösterildi. SOX2 ve NANOG belirteçleri pluripotensi için önemli role sahiptir. Bu belirteçler diğer pluripotensi belirteçlerinin pozitif yönde regülasyonunu sağlar (Niwa vd. 2009). OCT $\frac{3}{4}$ ise kök hücrelerin kendilerini yenileyebilme kabiliyeti açısından çok önemli bir belirteçtir (Zaehres vd. 2005). Embriyonik kök hücrelerde OCT $\frac{3}{4}$ ifadesindeki azalma, pluripotensinin kaybı ve dediferensiyasyonla sonuçlanmaktadır (Thomson vd. 2011). SOX2, mezoderm farklılaşmasını inhibe ederken ektoderm farklılaşmasını arttırıcı etki gösterir (Johansson ve Simonsson 2010, Thomson vd. 2011b). Buna ek olarak Thomson ve arkadaşları (2011) embriyonik kök hücrelerde SOX2'nin azalıp OCT $\frac{3}{4}$ 'ün artması ile mezodermal farklılaşma potansiyelinin arttığını belirlediler. NANOG'un embriyonik gelişim sürecinde hematopoiezisi inhibe ettiği gösterildi (Sainz de Aja vd. 2019). Bu durum çalışmamızda ilerleyen pasajlarda artan NANOG ifadesi ile yine ilerleyen pasajlarda önemli derecelerde azalma gösteren hematopoietik belirteçler arasındaki negatif korelasyonu açıklamaktadır.

Bilimsel çalışmalardan elde edilen bulgular ışığında, çalışmamızda ASKKH'lerde ilerleyen pasajlarda OCT $\frac{3}{4}$ ifadesinin artması ve SOX2 ifadesinin azalması bu kök hücrelerin mezodermal farklılaşma kapasitelerinin arttığını göstermektedir. Kemik doku mezoderminden köken aldığı için osteojenik farklılaştırma çalışmaları için araştırmamızda P5'teki sıçan ASKKH'lerinin kullanımının daha doğru olacağı düşünüldü. OCT $\frac{3}{4}$ ve SOX2 ifadelerinin mezodermal farklılaşma kabiliyetini

arttırma ihtimalinin yanı sıra hem hematopoitik belirteçlerin P5'te daha düşük seviyede ifade edilmesi hem de P5'e kadarki hücre kültürü sürecinde ilerleyen safhalarda kullanılmak üzere daha fazla sayıda hücre elde edilebilecek olması nedenleriyle farklılaştırma çalışmalarında P5'teki hücrelerin kullanımına karar verildi.

4.2. Sandviç ELISA

hfOB hücrelerinden elde edilen KM'de TGF- β 3 ve 17 β -estradiol'ün OPG üretimi üzerine etkileri analiz edildi. Osteojenik farklılaştırma çalışmalarında 10 nM 17 β -estradiol (Hong vd. 2006) ve 10 ng/mL TGF- β 3 (Karbanodvá vd. 2010) kullanılmaktadır. hfOB'lerde de OPG seviyesinin belirlenmesinde çalışmamızda bu dozlar kullanıldı. 17 β -estradiolün, ER α transfekte edilmiş hfOB hücreleri üzerinde OPG üretimini arttırıcı etkileri daha önce gösterildi (Hofbauer vd. 1999, Saika vd. 2001). TGF ailesi proteinleri de osteoblastlar için OPG'nin pozitif regülatörleri arasında gösterilse de (Silva and Branco 2011) araştırmalarda daha çok TGF- β 1'in tercih edildiği görülmektedir (Murakami vd. 1998). hfOB hücreleri üzerinde özellikle TGF- β 3'ün OPG üzerine etkisinin araştırıldığı tek çalışma ise laboratuvarımızda yapıldı (Dikmen, 2021).

Çalışmada serum içermeyen medyum kullanılarak elde edilen KM'de TGF- β 3 ve 17 β -estradiolün tek başlarına OPG üretimini az miktarda arttırsa da istatistiki olarak anlamlı olmadığı görüldü. TGF- β 3 ve 17 β -estradiol birlikte kullanıldığında ise OPG seviyelerinde önemli derecede bir yükseliş belirlendi. KM örneklerinden elde ettiğimiz bu bulgular standart hfOB kültür medyumu ile yaptığımız çalışmanın sonuçları ile paralellik göstermektedir. TGF- β 3 veya 17 β -estradiolün tek başına uygulandığında bir etki gözlenmemesi; sadece birlikte kullanıldıklarında bir artış saptanması ER'lerin ifadesi ile ilişkili olabilir. Hem Hofbauer ve arkadaşları (1999) hem de Saika ve arkadaşları (2001) ER α transfekte edilmiş hfOB hücrelerinde OPG seviyelerinde sadece 17 β -estradiol kullanarak anlamlı artışlar bildirdiler. hfOB

hücrelerinin her ne kadar ER α 'yı ifade ettiği bilinse de (Foo et al. 2007) muhtemelen bu ifadenin derecesi yeterli değildir. ER α 'nın osteojenik farklılaşma sürecindeki hücrelerde ifadesinin yükseldiği (Wang vd. 2006) ve TGF- β 3'ün de erken osteoblast farklılaşmasında etkili olduğu bilinmektedir (Grafe vd.. 2018). TGF- β 3'ün etkisiyle hfOB'lerin farklılaşması indüklenmiş ve bu süreçte ER α ifadesinde bir artış meydana gelmiş olabilir. Bu durum da 17 β -estradiolün osteojenik farklılaşma sürecinde artan ER α vasıtasıyla OPG üretimi üzerindeki etkisini göstermesini sağlamış olabilir. Bu yöndeki soru işaretlerini ortadan kaldırmak için, hfOB'lerde ve osteojenik farklılaşma sürecindeki hücrelerde (1) TGF- β 3'ün etkisi ile ER'lerinin ifadeleri belirlenmeli, (2) 17 β -estradiolün bu süreçte ER'lerin ifadesinde değişikliğe neden olup olmadığı moleküler düzeyde belirlenmeli, (3) ER'lerin ifadesi yönünden bir değişiklik saptanması halinde bunun OPG seviyeleri ile korelasyonu tespit edilmelidir.

4.3. Osteojenik Farklılaştırma Deney Çalışmaları

Osteojenik farklılaştırma deney çalışmalarında pozitif kontrol grubunda kök hücrelerin *in vitro* osteojenik farklılaşmasında kullanılan klasik metod uygulandı ve hücreler, içerisinde deksametazon, β -gliserofosfat ve askorbik bulunan farklılaştırma medyumunu ile kemik hücrelerine farklılaştırıldı (Jaiswal vd. 1997).

Kök hücrelerde osteojenik farklılaşma üzerine etkili olduğu bilinen diğer materyaller arasında 17 β -estradiol (Hong vd. 2006), TGF- β 3 (Karbanodvá vd. 2010) ve osteoblastlardan elde edilen KM (Zhong vd. 2019) de bulunmaktadır. Çalışmada TGF- β 3 ve 17 β -estradiol için konsantrasyonlar mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması üzerine yapılmış önceki çalışmalar baz alınarak belirlendi ve TGF- β 3 için 10 ng/mL (Karbanodvá vd. 2010), 17 β -estradiol için ise 10 nM (Hong vd. 2006) konsantrasyon kullanıldı.

Soma hücrelerinden elde edilen KM'nin, kök hücreleri bu hücre soylarına farklılaştıracak şekilde uyardığı görülmektedir. Kondrositlerden elde edilen KM ile kondrojenik farklılaşma (Nawaz 2020), osteoblastlardan elde edilen KM ile osteojenik farklılaşma (Zhong vd. 2019), üroepitelial hücrelerden elde edilen KM ile idrar kesesi hücrelerine farklılaştırma (Tian vd. 2010) gibi farklı alanlardaki çalışmalarda soma hücrelerinden elde edilen KM'lerin 1:1 oranında dilüe edilerek kullanımlarının kök hücrelerde farklılaşmayı başarılı bir şekilde indüklediği bildirildi. Çalışmamızda osteoblast hücre hattından elde edilen iki farklı KM (standart KM ve yüksek OPG içeren KM), farklı gruplarda hem standart osteojenik farklılaştırma medyumu (hfO, OPO) hem de standart kültür medyumu (hfN, OPN) ile 1:1 oranında dilüe edilerek kullanıldı.

Araştırmada normal koşullarda kültüre edilen hfOB'lerden toplanan KM'nin yanı sıra, yüksek seviyede OPG içeren KM de kullanıldı. OPG, RANKL için bir tuzak reseptör olsa da aynı zamanda erken osteoblastogenezis için önemli bir belirteç olarak görülmektedir (Tong vd. 2019). Çalışmamızda OPG üretimini *in vitro* şartlarda arttırarak toplanan, yüksek seviyede OPG içeren KM'nin osteojenik farklılaşma sürecine etkisi de incelendi.

COL1 ve osteopontin, kök hücrelerde osteojenik farklılaşma için kullanılan pozitif belirteçlerdendir (Zhou ve Lin 2014). Osteojenik farklılaşmanın onaylanması için en sık kullanılan yöntem ise Alizarin Red S boyamasıdır. Farklılaşan hücrelerde Alizarin Red S ile boyanan kalsiyum birikimlerinin varlığı osteojenik farklılaşmayı doğrular (Jaiswal vd. 1997). Çalışmada tüm gruplarda her iki zaman aralığında da COL1 ve osteopontin proteinlerinin hücreler tarafından ifade edildiği immün floresan boyama tekniği ile tespit edildi. Tüm gruplarda her iki zaman aralığında Alizarin Red S boyaması ile farklı yoğunluklarda kalsiyum birikimleri gözlemlendi. Böylelikle tüm gruplarda osteojenik farklılaşmanın farklı seviyelerde indüklendiği belirlendi.

Araştırmamızda deney gruplarında real-time PCR analizi ile SPP1, RUNX2, COL1 ve DCN gen ifadeleri incelendi. Ayrıca bu belirteçlerin her deney grubunda kendi içerisinde 14 ve 21. gün sonuçları da istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Belirlenen zaman aralıkları arasında osteojenik farklılaşma sürecindeki farkların gösterildiği akademik genellikle ALP aktivitesi ve kalsiyum birikim miktarları üzerinden kantitatif karşılaştırmaların yapıldığı görülmektedir (Karadjian vd. 2020, Widholz vd. 2019). Ancak araştırmamızda farklı olarak, hücrelerin osteojenik farklılaşma süreçlerinde uğradıkları değişimi moleküler düzeyde değerlendirdik.

Araştırmacılar, hem kemik iliği (Hong vd. 2006) hem de yağ doku kaynaklı kök hücrelerde (Hong vd. 2007) 10 nM 17 β -estradiolün Cbfa1 ve OCN gibi önemli osteojenik belirteçlerin ifadelerini arttırdığını gösterdiler. Ayrıca bu iki çalışmada 17 β -estradiolün farklılaşan hücrelerde kalsiyum birikim miktarı ve ALP aktivitesini yükselttiği ve bu hücrelerde ER β 'nin ifadesinin kaybolduğu bildirildi. Taşkiran ve Evren (2011) de benzer şekilde 17 β -estradiolün farklılaşan hücrelerde ALP aktivitesini ve kalsiyum birikim miktarını arttırdığını gösterdiler. Kaivosoja ve arkadaşları (2015) ise erkeklerde 17 β -estradiolün metabolize edilmesini sağlayan dehidroepiandrosteron hormonu kullanarak yaptıkları osteojenik farklılaştırma çalışmasında RUNX2 ve COL1 ifadesinde pozitif kontrole göre bir fark görmediklerini fakat SPP1 ifadesinde 21. günde pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında önemli derece bir artış gördüklerini bildirdiler.

17 β -estradiol grubunda 14 ve 21. günlerde elde edilen veriler karşılaştırıldığında RUNX2 ve COL1 ifadelerindeki kat değişimi seviyelerinin 14. günde istatiki olarak önemli derece daha yüksek olduğu görüldü. DCN ve SPP1 genleri için ise iki zaman aralığında bir fark gözlenmedi. Gruplar arası karşılaştırmada ise Kaivosoja ve arkadaşlarına (2015) benzer şekilde çalışmamızda da COL1 ve RUNX2 genlerinin ifadesindeki kat değişiminde 17 β -estradiol grubu ile pozitif kontrol arasında anlamlı bir değişim görülmesi de bu çalışmadan farklı olarak sadece 21. günde değil; hem 14 hem de 21. günde SPP1 ifadesindeki kat değişiminin pozitif kontrole göre önemli derecede daha yüksek olduğu tespit edildi. Çalışmamızda ayrıca DCN geni için de

hem 14 hem de 21. günlerde 17 β -estradiol grubunda önemli derecede artış saptandı. Mineralize kemik matriksinde yüksek seviyede DCN proteini bulunmaktadır (Fisher vd. 1983). Kollajenin iplikleşmesinde ve kollajen ipliklerinin kalınlaşmasında rolü olan DCN'in mineralizasyon ile de ilişkili olduğu ve osteojenik farklılaşma sürecinde TGF- β ailesi proteinlerinin biyoaktivitesini arttırdığı öne sürülmektedir. Bununla birlikte DCN'in osteoidlerin henüz kalsifiye olmamış bölgelerinde lokalize olduğu ve bu lokalizasyondan sonra mineralizasyonun gerçekleşmesinin ardından DCN protein ifadesinin kaybolduğu bildirildi (Fisher vd. 1983, Hoshi vd. 1999, Takeuchi vd. 1994, Yan vd. 2011). Araştırmamızda Alizarin Red S boyamasının sayısal değerlendirmesi ile deney gruplarında kalsiyum birikim seviyeleri belirlendi. Yirmi birinci günde 17- β estradiol grubunda en yüksek kalsiyum birikimi seviyesinin görülmüş olması da DCN ile ilgili bu görüşleri desteklemektedir.

Elde edilen sonuçlar daha çabuk mineralizasyonun sağlandığı ve hücrelerin daha hızlı olgunlaştığı bir farklılaştırmanın hedeflendiği araştırmalarda 17 β -estradiol'ün önemli bir potansiyel aday olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak bu potansiyelin daha iyi anlaşılabilmesi için (1) OCN, Phex gibi osteositlerde ifade olduğu bilinen geç dönem osteogenezis belirteçlerinin ifadeleri de araştırılmalı, (2) bulgular *in vivo* deneylerle test edilmelidir.

TGF- β 3 literatürde daha çok kondrojenik farklılaşma çalışmalarında kullanılsa da (Contentin vd. 2017, Nawaz 2020) kök hücrelerin osteojenik (Karbanodvá vd. 2010, Tapp vd. 2008) ve tenojenik (Chun vd. 2017) farklılaşmalarında da kullanılan bir proteindir. TGF- β 3 mezenkimal kök hücrelerin preosteoblastlara farklılaşmasını uyarır ve RUNX2'nin transkripsiyonunu sağlar (Grafe vd. 2018). Karbanodvá ve arkadaşları (2010), diş pulpası kaynaklı kök hücrelerde yaptıkları çalışmada TGF- β 3'ün osteojenik farklılaşmayı minimal düzeyde indüklediğini belirtti ve TGF- β 3'ün tek başına kullanıldığında farklılaşan hücrelerde kollajen ipliklerinin gözlenmesine rağmen mineralizasyonun şekillenmediğini bildirdi. Tapp ve arkadaşları (2008) ise yağ dokusu kaynaklı kök hücrelerde TGF- β 3 kullanarak yaptıkları osteojenik

farklılaşmada Alizarin Red S ile boyanmış kalsiyum birikimlerini gösterdi ve bazı ekstraselüler matriks proteinlerinde de artış gördüklerini bildirdi.

Çalışmamızda TGF- β 3 grubunda özellikle 14. günde diğer gruplara kıyasla oldukça düşük miktarda olsa da kalsiyum birikimlerinin varlığı tespit edildi. Ayrıca 14. günde RUNX2 ifadesindeki kat değişimi bakımından yapılan istatistiksel değerlendirmede elde edilen değerlerin diğer gruplara kıyasla oldukça önemli derecede yüksek olduğu saptandı. Osteojenik farklılaşmanın ilk safhalarında RUNX2 yüksek seviyelerde ifade olurken farklılaşma süreci ilerledikçe RUNX2 ifadesi azalma gösterir ve hücreler osteositlere farklılaştığında RUNX2 ifadesi artık görülmez. Bu yönü ile RUNX2 erken osteoblastogenezis belirteci olarak tanımlanır (Xu vd. 2015).

Çalışmamızda TGF- β 3 grubunda iki zaman aralığında yapılan gen ifadesindeki kat değişimi karşılaştırmasında COL1 ve RUNX2 genleri için elde edilen sonuçların 14. günde istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek düzeyde olduğu görüldü. Araştırmada en düşük mineralizasyon 14. günde TGF- β 3 grubunda saptandı. Ayrıca 14. günde TGF- β 3 grubunda RUNX2 gen ifadesindeki kat değişiminin de gruplar arasında en yüksek seviyede olduğu gözlemlendi. Çalışmanın 21. gününde ise TGF- β 3 grubunda yine pozitif kontrol ve 17 β -estradiol grubuna göre düşük seviyede kalsiyum birikimi gözlenirken RUNX2 seviyesinin pozitif kontrole yakın seviyeye gerilediği belirlendi.

Bu sonuçlar TGF- β 3'ün ASKKH'lerin preosteoblastlara farklılaşmasını indüklediğini ve hücrelerin pozitif kontrol grubuna kıyasla erken osteoblastogenezis safhasında daha uzun süre kaldığını düşündürmektedir. Erken osteoblastogenezisin hedeflendiği; bu dönemdeki hücrelerin veya bu hücrelerin ürettiği salgıların kullanılacağı çalışmalarda TGF- β 3 ile yapılacak 14 günlük farklılaşmanın avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir. Bu çıkarımı destekleyebilmek için (1) TGF- β 3'ün farklılaşan hücrelerde proliferasyon üzerine etkisinin olup olmadığı, (2) BMP 2 gibi diğer erken osteojenik belirteçlerin ifade düzeylerinin saptanması (3) farklı zaman

aralıkları belirlenerek erken osteoblastogenezis sürecinin ne zaman sonlandığının belirlenmesi önem arz etmektedir.

Araştırmada her ne kadar 17 β -estradiolün etkisi ile SPP1 ve DCN; TGF- β 3'ün etkisiyle de RUNX2 seviyelerinde artışlar görülmüş olsa da TGF- β 3 ve 17 β -estradiol birlikte kullanıldığında her iki zaman aralığında da birbirlerinin etkilerini baskıladıkları saptandı. Bu mekanizmanın ER'ler üzerinden gerçekleşen TGF- β – 17 β -estradiol etkileşiminden kaynaklanıyor olması muhtemeldir. Her ne kadar osteojenik farklılaşma üzerine TGF- β 3 ve 17 β -estradiol'ün birlikte kullanımının *in vitro* etkileri gösterilmemiş olsa da farklı alanlardaki bazı çalışmalarda bu ikilinin etkileşimlerinin incelendiği görülmektedir. Örneğin Matsuda ve arkadaşları (2001) insan embriyonik böbrek hücre hattı olan 293T hücrelerinde 17 β -estradiolün ER α üzerinden gösterdiği etki ile TGF- β sinyalizasyonunu inhibe ettiğini bildirdiler. Benzer şekilde Yamamoto ve arkadaşları (2002) da ER α ve β 'nın, ortamda 17 β -estradiol varlığında TGF- β sinyalizasyonunu inhibe ettiğini gösterdiler. Hernández-Vega ve Camacho-Arroyo (2021) ise glioblastoma hücreleri ile yaptıkları çalışmada 17 β -estradiol ve TGF- β 'nın ER α , Smad2 ve Smad3'ü negatif yönde regüle ettiğini belirtip ve 17 β -estradiolün, TGF- β 1 ile indüklenen kollajen 4 sentezini engellediğini aktardılar. Önemli bir osteojenik protein olan BMP 3'ün kollajen 4 ile yüksek bağlanma kapasitesinde olduğu bilinmektedir (Paralkar vd. 1990). Osteojenik farklılaşma sürecinde ER β ifadesinin sabit kaldığı ve ER α ifadesinin arttığı da görülmektedir (Wang vd. 2006). McDougall ve arkadaşları (2002) ER β geni silinmiş farelerde yaptıkları çalışmada ER β 'nin kemik iyileşmesi için önemli olmadığını gösterdiler. Bununla birlikte 17 β -estradiol ile farklılaştırılan kök hücrelerde farklılaşma sürecinde ER β 'nin ifadesinin kaybolduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Hong vd. 2007, Hong vd. 2006).

Bu bilgiler ve bulgularımız ışığında benzer bir inhibisyon mekanizmasının osteojenik farklılaşma sürecindeki hücrelerde de tetiklenmiş olabileceği akıllara gelmektedir. Bu mekanizmanın çözülebilmesi için (1) osteojenik farklılaşma sürecinde 17 β -estradiol ve TGF- β 3'ün etkisi ile ER α ve β ifadelerinde bir değişim olup olmadığı

belirlenmeli, (2) *in vitro* olarak ER α ve ER β genleri silinen hücrelerde 17 β -estradiol ve TGF- β 3'ün osteojenik farklılaşmaya etkileri incelenmeli ve (3) osteojenik farklılaşma sürecindeki hücrelerde de 17 β -estradiolün diğer çalışmalara benzer şekilde TGF- β 3 sinyalizasyonu inhibe edip etmediği araştırılmalıdır.

Zhong ve arkadaşları (2019), indüklenmiş pluripotent hücreler üzerinde yaptıkları çalışmada farklı oranlarda dilüe edilmiş osteoblast KM'leri ile yaptıkları osteojenik farklılaşma çalışmalarında osteojenik belirteçlerin ifadeleri ile beraber ALP aktivitesinin arttığını gösterdiler ve immunfloresan boyama tekniği sonrası pozitif hücre sayımı yaparak farklılaşan hücreler arasında RUNX2 pozitif hücre miktarında da bir artış gördüklerini bildirdiler. Çalışmada 1:1 oranında dilüe edilen KM grubunda 14 günün sonunda ALP aktivitesi ve COL1 gen ifadelerinin yanı sıra RUNX2 pozitif hücre sayısında da önemli derece artış gördüklerini belirten Zhong ve arkadaşları aynı çalışmada %30 oranında KM kullanılan grupta ise yukarıda belirtilen parametrelerin dışında ALP, RUNX2 ve OCN gen ifadelerinde de anlamlı artışlar gördüler ve bütün analizlerinde en yüksek sonuçları %30'luk KM grubundan elde ettiler. Bu sonuçların 1:1 dilüsyon kullanılan gruba göre istatistiksel olarak farklı olup olmadığını ise belirtmediler.

Araştırmamızda Zhong ve arkadaşlarına (2019) benzer şekilde KM kullanılan gruplarda COL1 ve RUNX2 belirteçleri için 14 ve 21. günlerde pozitif kontrole göre daha yüksek gen ifadeleri saptandı. Fakat COL1 ifadesindeki bu artışlar 14. günde hfO ve OPN; 21. günde ise hfO ve hfN gruplarında istatistiksel olarak anlamlıydı. RUNX2 ifadesindeki artışların da sadece 21. günde OPO grubu için istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. KM kullanılan gruplarda SPP1 geni için her iki zaman aralığında da pozitif kontrole göre istatistiksel bir fark görülmezken DCN için 21. günde KM kullanılan tüm gruplarda gen ifadesindeki kat değişiminin pozitif kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azalma gösterdiği tespit edildi. Ayrıca 14. günde KM kullanılan tüm gruplarda; 21. günde ise OPG-KM kullanılan gruplarda (OPN ve OPO) kalsiyum birikimi miktarlarının pozitif kontrole göre önemli derecede daha düşük olduğu gözlemlendi.

KM kullanılan gruplardaki yüksek COL1 seviyelerinin KM içerisinde bulunan ekstraselüler matriks proteinlerinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Bu hususta toplanan KM'ler içerisinde bulunan çeşitli ekstraselüler matriks proteinlerinin saptanarak miktarlarının belirlenmesi ve COL1 gen ifadesi ile ilişkilerinin araştırılması gerekmektedir. Her ne kadar COL1 seviyelerinin KM kullanılan gruplarda yüksek olduğu gözlemlense de DCN seviyelerinin özellikle 21. günde pozitif kontrole kıyasla önemli derecede daha az olması kalsiyum birikimi miktarlarındaki düşük sonuçlarla da bağdaşmaktadır.

Çalışmamızda DCN ifadesi ile kalsiyum birikim miktarları arasında bir ilişki olabileceğinin görülmesine ek olarak RUNX2 ifadesi ile mineralizasyon seviyesi arasında da bir negatif korelasyon dikkat çekmektedir. Kalsiyum birikim miktarları bakımından hem 14. günde (TGF- β 3 grubu) hem de 21. günde (OPO grubu) en düşük sonuçların elde edildiği grupların aynı zamanda bu zaman aralıklarında RUNX2'nin en yüksek düzeyde ifade edildiği gruplar olması bu görüşü desteklemektedir. Erken osteoblastogenezis belirteci olan RUNX2'nin artış gösterdiği ve osteojenik farklılaşma sürecinin ilerleyen safhalarında daha yüksek sonuçlar elde etmenin beklendiği kalsiyum birikimi miktarının ise düşük seviyelerde olduğu bu gruplarda hücrelerin belirlenen zaman aralıkları içerisinde osteojenik farklılaşmanın erken safhalarında tutulabilmesi görüldü. Bu da 21. günde yüksek OPG içeren KM'nin osteojenik farklılaştırma medyumuna TGF- β 3 ilavesi ile yapılan farklılaştırmaların anksilozan spondilit gibi yüksek mineralizasyon ve ektopik ossifikasyon ile seyreden hastalıklara sahip bireylerde kullanılabilir daha uygun bir farklılaşma metodu olabileceği fikrini akıllara getirmektedir. Bu görüşün desteklenmesi için (1) farklılaşması indüklenen hücrelerin salgıları da incelenmeli ve bu tür hastalıklara etki edebilecek olası sitokinler tanımlanmalı; (2) hücrelerin farklı zaman aralıkları eklenerek incelemeler genişletilmeli ve (3) elde edilen bulgular *in vivo* deneyler ile test edilmelidir.

Wang ve Wang (2021), izole ettikleri sıçan kemik iliği kaynaklı kök hücrelerini farklı konsantrasyonlarda OPG ilave ederek farklılaştırarak; OPG'nin farklılaşan hücrelerde hem osteojenik belirteçlerin ifadesini hem de osteoblast proliferasyonunu arttırdığını gösterdiler. Çalışmamızda her ne kadar bu hususta bir veri toplanmamış olsa da Wang ve Wang'ın çalışması ile uyumlu olarak OPG-KM kullanılan gruplarda farklılaştırma çalışmaları sırasında hücrelerde yüksek seviyede proliferasyon görüldü ve bu nedenle osteojenik farklılaştırma deney çalışmaları için başta 5×10^5 hücre/flask olarak planlanan ekim konsantrasyonu tüm gruplarda $3,5 \times 10^5$ hücre/flask konsantrasyonu olacak şekilde revize edildi. Ayrıca 21. günde OPG-KM'nin standart osteojenik farklılaştırma medyumunu ile dilüe edilerek kullanıldığı OPO grubunda RUNX2 geni ifadesindeki kat değişimi yönünden anlamlı derece yüksek sonuçlar elde edildi.

Osteojenik farklılaşmanın erken dönemlerinde hücre proliferasyonu devam ederken farklılaşma süreci ilerledikçe proliferasyon yavaşlar ve nihayetinde durur (Infante ve Rodríguez 2018). Çalışmamızda elde edilen sonuçlar OPG-KM'nin pre-osteoblastlarda proliferasyonu arttırdığı ve 21. günde dahi osteojenik farklılaşmanın ileri safhalarına geçilmediğini gösteriyor olabilir. Bu konuya açıklık getirebilmek için (1) OPG-KM'nin farklılaşmakta olan hücreler üzerinde proliferatif etki gösterip göstermediği istatistiksel olarak ortaya konmalı, (2) değişik zaman aralıklarında farklılaşmakta olan ASKKH'lerde ALP ve BMP 2 gibi erken osteoblastogenezis belirteçlerinin ifade düzeyleri belirlenmeli, (3) farklı zaman aralıklarında erken ve geç osteojenik belirteçlerinin ifadeleri incelenerek hücrelerin ne kadar süre erken osteoblastogenezis safhasında kaldıkları ve geç osteogenezis safhasına ne zaman ulaşabildikleri belirlenmelidir.

Araştırmamızda gen ifadesi düzeyinde yapılan değerlendirmelerde standart KM ve OPG-KM'nin kültür medyumunu ile dilüe edildiği gruplarda (hfN, OPN) analiz edilen genlerin neredeyse tamamında (OPN grubunda COL1 hariç) 21. günde gen ifadesindeki kat değişimi bakımından daha yüksek seviyede sonuçlar saptandı. Bu iki

grupta DCN genindeki artışların istatistiki olarak önem arz etmediği görülse de diğer genlerdeki artışlar istatistiksel olarak önemli düzeydeydi.

Toplanan KM'lerin standart osteojenik farklılaştırma medyumu ile dilüe edilerek kullanıldığı gruplarda (hfO, OPO) ise daha farklı bir sonuç karşımıza çıktı. Bu gruplarda COL1'in ifadesinin 14. günde anlamlı düzeyde artış gösterdiği saptandı. hfO grunda COL1'e ek olarak RUNX2 gen ifadesinin de 14. günde istatistiki olarak anlamlı derecede daha yüksek seviyede olduğu görüldü. Bunlara ek olarak KM kullanılan tüm gruplarda mineralizasyonun az olması, DCN ifadelerindeki düşük sonuçlar ile örtüşmektedir.

Farklı zaman aralıklarında osteojenik farklılaşmanın moleküler düzeyde değerlendirildiği çalışmalarda genel olarak COL1, ALP, BMP 7 gibi genlerin ifadesinin 7 ila 14. günlerde yüksek seviyede seyrettikten sonra 21. günde azalma gösterdiği görülmektedir (Choi vd. 2011, Zou vd. 2008). Wang ve arkadaşları (2015) bu genler ile birlikte RUNX2'nin ifadesinin de 14. günde artış gösterdiğini fakat bu artışın ilerleyen günlerde de devam ettiğini gösterdi. Çalışmamızdaki pozitif kontrol grubundan elde edilen veriler bu çalışmalardaki standart yöntemle farklılaştırılan hücrelerin verileri ile uyuşmaktadır.

TGF- β 3 ve 17 β -estradiol'ün birlikte kullanıldığı grupta (TGF-Est) tüm belirteçler için 21. günde 14. gün sonuçlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülürken KM'lerin kültür medyumu ile dilüe edildiği gruplarda (hfN, OPN) da genel olarak 21. gündeki ifade düzeylerinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu gruplardaki hücrelerde de Alizarin Red S ile boyanan kalsiyum birikimlerinin varlığını ve osteopontin ile COL1 protein ifadelerinin hücrelerde gösterilmiş olması ASKKH'lerde osteojenik farklılaşmanın indüklenebildiğini gösterse de osteojenik farklılaşma sürecinin daha yavaş işlediği tahmin edilmektedir.

Bu durum projemizin veriliş tarihinden sonra yayınlanan Zhong ve arkadaşlarının (2019) makalesinde belirtildiği üzere osteoblastlardan elde edilen KM'nin farklı dilüsyonlarda kullanımının kök hücreler üzerinde farklı düzeylerde etkiler yaratıyor olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle mekanizmanın daha iyi anlaşılabilmesi için (1) standart kültür medyumu ve osteojenik medyumlar farklı dilüsyonlarda karıştırılan KM'lerin kullanımının ASKKH'lerin osteojenik farklılaşması üzerine etkileri gösterilmeli, (2) KM içerisinde yer alan büyüme faktörleri, sitokinler, ekstraselüler matriks proteinleri gibi maddelerin tanımlanarak miktarlarının belirlenmesi önemlidir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

1) *In vitro* koşullarda TGF- β 3 ve 17 β -estradiolün birlikte kullanımı hfOB hücrelerinde OPG üretimini arttırmaktadır.

2) Osteoblastlardan elde edilen KM ve yüksek seviyede OPG içeren KM, ASKKH'lerde osteojenik farklılaşmayı indükleyebilme kabiliyetine sahiptir.

3) TGF- β 3, 17 β -estradiol, KM ve yüksek seviyede OPG içeren KM ASKKH'lerin osteojenik farklılaşması sürecinde farklı özellikler sergilemektedir.

3a) 17 β -estradiol ASKKH'lerin hızla farklılaşmanın ileri safhalarına geçmesine yardımcı olur ve mineralizasyonu artırır.

3b) TGF- β 3 ise hücrelerin daha uzun süre erken osteblastogenezis safhasında kalmasına yardımcı olur ve sınırlı bir mineralizasyon sağlar.

3c) TGF- β 3 ve 17 β -estradiol ASKKH'lerin osteojenik farklılaşmasında birlikte kullanıldığında birbirlerinin etkisini sınırlar.

3d) hfOB'lerden elde edilen KM'ler ile yapılan osteojenik farklılaştırmada hücreler yüksek seviyede COL1 ifade etse de düşük seviyede DCN ifade eder ve sınırlı mineralizasyon gösterir.

3e) OPG, ASKKH'lerin farklılaştırma çalışmalarının 21. gününde dahi erken osteoblastogenezis safhasında kalmasına yardımcı olur.

Farklı erken ve geç osteogenezis belirteçleri kullanılarak çeşitli zaman aralıklarında kök hücrelerde osteojenik farklılaşma değerlendirilmeli; farklılaştırmada kullanılan KM ve büyüme faktörlerinin osteojenik farklılaşma sürecinde rol oynayan sinyal yollarına etkileri araştırılmalı ve bulgular *in vivo* çalışmalar ile desteklenmelidir.



6. KAYNAKLAR

- Aditama, A.P.R., Ma'arif, B., Laswati, H., Agil, M. (2021) In vitro and in silico analysis of phytochemical compounds of 96% ethanol extract of semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) leaves as a bone formation agent. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, 32(4): 881–7.
- An, S., Gong, Q., Huang, Y. (2017) Promotive effect of zinc ions on the vitality, migration, and osteogenic differentiation of human dental pulp cells. *Biol. Trace Elem. Res.*, 175(1): 112–21.
- Ankersmit, H.J., Hoetzenecker, K., Dietl, W., Soleiman, A., Horvat, R., Wolfsberger, M., Gerner, C., Hacker, S., Mildner, M., Moser, B. (2009) Irradiated cultured apoptotic peripheral blood mononuclear cells regenerate infarcted myocardium. *Eur. J. Clin. Invest.*, 39(6): 445–56.
- Antounians, L., Tzanetakis, A., Pellerito, O., Catania, V.D., Sulisty, 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. *Sci. Rep.* 9(1): 1–11.
- Balooch, G., Balooch, M., Nalla, R.K., Schilling, S., Filvaroff, E.H., Marshall, G.W., Marshall, S.J., Ritchie, R.O., Derynck, R., Alliston, T. (2005) TGF- β regulates the mechanical properties and composition of bone matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(52): 18813 LP – 18818.
- Baud'huin, M., Duplomb, L., Teletchea, S., Lamoureux, F., Ruiz-Velasco, C., Maillason, M., Redini, F., Heymann, M-F., Heymann, D. (2013) Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 24(5): 401–9.
- Bogatcheva, N. V., Coleman, M.E. (2019) Conditioned medium of mesenchymal stromal cells: a new class of therapeutics. *Biochem.*, 84(11): 1375–89.
- Bollini, S., Pozzobon, M., Nobles, M., Riegler, J., Dong, X., Piccoli, M., Chiavegato, A., Price, A.N., Ghionzoli, M., Cheung, K.K. (2001) In vitro and in vivo cardiomyogenic differentiation of amniotic fluid stem cells. *Stem Cell Rev. Reports.* 7(2): 364–80.
- Bongso, A., Lee, E.H. (2005) Stem cells: their definition, classification and sources. *Stem Cells from bench to bedside.* World Scientific Singapore, 1.
- Bossolasco, P., Montemurro, T., Cova, L., Zangrossi, S., Calzarossa, C., Buiatitot, S., Soligo, D., Bosari, S., Silani, V., Delilieri, G.L. (2006) Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res.*, 16(4): 329–36.
- Boyce, B.F., Xing, L. (2007) Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res. Ther.*, 9(1): 1–7.
- Boyce, B.F., Xing, L. (2008) Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys.*, 473(2): 139–46.
- Brännvall, K., Korhonen, L., Lindholm, D. (2002) Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Mol. Cell. Neurosci.*, 21(3): 512–20.

- Büttner, M., Möller, S., Keller, M., Huster, D., Schiller, J., Schnabelrauch, M., Dieter, P., Hempel, U. (2013) Over-sulfated chondroitin sulfate Derivatives induce osteogenic differentiation of hMSC independent of BMP-2 and TGF- β 1 signalling. *J. Cell. Physiol.*, 228(2): 330–40.
- Can, A. (2008) A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turk J Hematol.*, 25(2): 57–9.
- Caneparo, C., Baratange, C., Chabaud, S., Bolduc, S. (2020) Conditioned medium produced by fibroblasts cultured in low oxygen pressure allows the formation of highly structured capillary-like networks in fibrin gels. *Sci. Rep.*, 10(1): 1–11.
- Carlsson, P-O., Schwarcz, E., Korsgren, O., Le Blanc, K. (2015) Preserved β -cell function in type 1 diabetes by mesenchymal stromal cells. *Diabetes. Am Diabetes Assoc*, 64(2): 587–92.
- Chambers, T.J. (2000) Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J. Pathol.*, 192(1): 4–13.
- Charles, J.F., Aliprantis, A.O. (2014) Osteoclasts: more than ‘bone eaters.’ *Trends Mol. Med.*, 20(8): 449–59.
- Chen, L., Xu, Y., Zhao, J., Zhang, Z., Yang, R., Xie, J., Liu, X., Qi, S. (2014) Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS One. Public Library of Science San Francisco, USA*, 9(4): e96161.
- Chen, X., Lu, J., Ji, Y., Hong, A., Xie, Q. (2014) Cytokines in osteoblast-conditioned medium promote the migration of breast cancer cells. *Tumor Biol.*, 35(1): 791–8.
- Chian, R., Lapointe, S., Sirard, M. (1995) Capacitation in vitro of bovine spermatozoa by oviduct epithelial cell monolayer conditioned medium. *Mol. Reprod. Dev.*, 42(3): 318–24.
- Choi, M.H., Noh, W.C., Park, J.W., Lee, J.M., Suh, J.Y. (2011) Gene expression pattern during osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells in vitro. *J. Periodontal Implant Sci.* 41(4): 167–75.
- Chun, S., Lee, K. min., Lee, S.Y. (2017) Tenogenic differentiation of tonsil-derived mesenchymal stem cells. *Foot Ankle Orthop.*, 2(3): 2473011417S000144.
- Colao, I.L., Corteling, R., Bracewell, D., Wall, I. (2018) Manufacturing exosomes: a promising therapeutic platform. *Trends Mol. Med.*, 24(3): 242–56.
- Contentin, R., Branly, T., Desancé, M., Concari, M., Jacquet, T., Rakic, R., Bertoni, L., Jacquet, S., Mallein-Gerin, F., Denoix, J-M. (2017) Improvement of the chondrocyte-specific phenotype upon equine bone marrow mesenchymal stem cell differentiation. Influence of TGF- β 1 or TGF- β 3, associated with BMP-2 and type I collagen siRNAs. 19èmes journées françaises Biol. Tissus Minéralisés.
- Corey, E., Brown, L.G., Kiefer, J.A., Quinn, J.E., Pitts, T.E.M., Blair, J.M., Vessella, R.L. (2005) Osteoprotegerin in prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res. AACR*, 65(5): 1710–8.
- Corradetti, B., Meucci, A., Bizzaro, D., Cremonesi, F. (2013) Mesenchymal stem cells from amnion and amniotic fluid in the bovine. *Reproduction.* 145(4): 391–400.

- Costa-Rodrigues, J., Teixeira, C.A., Sampaio, P., Fernandes, M.H. (2010) Characterisation of the osteoclastogenic potential of human osteoblastic and fibroblastic conditioned media. *J. Cell. Biochem.*, 109(1): 205–16.
- Courteix, D., Lespessailles, E., Loiseau, Peres, S., Obert, P., Germain, P., Benhamou, C.L. (1998) Effect of physical training on bone mineral density in prepubertal girls: A comparative study between impact-loading and non-impact-loading sports. *Osteoporos. Int.*, 8(2): 152–8.
- Crisostomo, P.R., Markel, T.A., Wang, Y., Meldrum, D.R. (2008) Surgically relevant aspects of stem cell paracrine effects. *Surgery.*, 143(5): 577–81.
- Crovace, A., Lacitignola, L., Rossi, G., Francioso, E. (2007) Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study. *Vet. Res.*, 31:281
- Dang, Z.C., Van Bezooijen, R.L., Karperien, M., Papapoulos, S.E., Löwik, C. (2002) Exposure of KS483 cells to estrogen enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis. *J. Bone Miner. Res.* 17(3): 394–405.
- Davey, R.A., Turner, A.G., McManus, J.F., Chiu, W.S.M., Tjahjono, F., Moore, A.J., Atkins, G.J., Anderson, P.H., Ma, C., Glatt, V., MacLean, H.E., Vincent, C., Bouxsein, M., Morris, H.A., Findlay, D.M., Zajac, J.D. (2008) Calcitonin receptor plays a physiological role to protect against hypercalcemia in mice. *J. Bone Miner. Res.*, 23(8): 1182–93.
- 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. *Nat. Biotechnol.*, 25(1): 100–6.
- Dikmen, T. (2021) The Effects of TGF- β 3, 17- β Estradiol and Bisphenol A on Osteoprotegerin Production in Osteoblasts. *Kocatepe Vet. J.* 14(2): 217–24.
- Ding, L., Tang, S., Liang, P., Wang, C., Zhou, P., Zheng, L (2019). Bone regeneration of canine peri-implant defects using cell sheets of adipose-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich fibrin membranes. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 77(3): 499–514.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E.M. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.*, 8(4): 315–7.
- Dowling, P., Clynes, M. (2011) Conditioned media from cell lines: A complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers. *Proteomics.*, 11(4): 794–804.
- Duma, C., Kopyov, O., Kopyov, A., Berman, M., Lander, E., Elam, M., Arata, M., Weiland, D., Cannell, R., Caraway, C. (2019) Human intracerebroventricular (ICV) injection of autologous, non-engineered, adipose-derived stromal vascular fraction (ADSVF) for neurodegenerative disorders: results of a 3-year phase 1 study of 113 injections in 31 patients. *Mol. Biol. Rep.*, 46(5): 5257–72.
- Engin, F., Yao, Z., Yang, T., Zhou, G., Bertin, T., Jiang, M.M., Chen, Y., Wang, L., Zheng, H., Sutton, R.E. (2008) Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nat. Med.*, 14(3): 299–305.

- Fauza, D. (2004) Amniotic fluid and placental stem cells. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, 18(6): 877–91.
- Feinblatt, J., Belanger, L.F., Rasmussen, H. (1970) Effect of phosphate infusion on bone metabolism and parathyroid hormone action. *Am. J. Physiol. Content.*, 218(6): 1624–31.
- Ferdaos, N., Nathan, S., Nordin, N. (2008) Prospective full-term-derived pluripotent amniotic fluid stem (AFS) cells. *Med J Malaysia.*, 63(Suppl A): 75–6.
- Fili, S., Karalaki, M., Schaller, B. (2009) Mechanism of bone metastasis: the role of osteoprotegerin and of the host-tissue microenvironment-related survival factors. *Cancer Lett.*, 283(1): 10–9.
- Fisher, L.W., Termine, J.D., Dejter, S.W., Whitson, S.W., Yanagishita, M., Kimura, J.H., Hascall, V.C., Kleinman, H.K., Hassell, J.R., Nilsson, B. (1983) Proteoglycans of developing bone. *J. Biol. Chem.* 258(10): 6588–94.
- Foo, C., Frey, S., Yang, H.H., Zellweger, R., Filgueira, L. (2007) Downregulation of β -catenin and transdifferentiation of human osteoblasts to adipocytes under estrogen deficiency. *Gynecol. Endocrinol.* 23(9): 535–40.
- Freshney, R.I. (2005). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5. Baskı. John Wiley and Sons Inc., Amerika Birleşik Devletleri.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., Lalykina, K.S. (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.*, 3(4): 393–403.
- Gao, Y., Zhu, Z., Zhao, Y., Hua, J., Ma, Y., Guan, W. (2014) Multilineage potential research of bovine amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* 15(3): 3698–710.
- Garza, J.R., Campbell, R.E., Tjoumakaris, F.P., Freedman, K.B., Miller, L.S., Santa Maria, D., Tucker, B.S. (2020) Clinical efficacy of intra-articular mesenchymal stromal cells for the treatment of knee osteoarthritis: a double-blinded prospective randomized controlled clinical trial. *Am. J. Sports Med.*, 48(3): 588–98.
- Gnecchi, M., Zhang, Z., Ni, A., Dzau, V.J. (2008) Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ. Res. Am Heart Assoc*, 103(11): 1204–19.
- Golam Kibria, A.S.M. (2018). Amniotik Membran Kaynaklı Kök Hücreleri Üzerine Trombositten Zengin Plazmanın Etkisi, 99s, Afyonkarahisar.
- Gosden, C.M. (1983) Amniotic fluid cell types and culture. *Br. Med. Bull.*, 39(4): 348–54.
- Grafe, I., Alexander, S., Peterson, J.R., Snider, T.N., Levi, B., Lee, B., Mishina, Y. (2018) TGF- β Family Signaling in Mesenchymal Differentiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 10(5): a022202.
- Hall, B. K. (1991). Bone, embryonic development. *Human Biol* 1 : 781-790.

- Han, Y., You, X., Xing, W., Zhang, Z., Zou, W. (2018) Paracrine and endocrine actions of bone - The functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Bone Res.*, 6(1): 1–11.
- Harris, S.A., Enger, R.J., Riggs, B.L., Spelsberg, T.C. (1995). Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res.*(2):178-86. doi: 10.1002/jbmr.5650100203.
- Harris, V.K., Stark, J., Vyshkina, T., Blackshear, L., Joo, G., Stefanova, V., Sara, G., Sadiq, S.A. (2018) Phase I trial of intrathecal mesenchymal stem cell-derived neural progenitors in progressive multiple sclerosis. *EBioMedicine.*, 29: 23–30.
- Hauser, P. V., De Fazio, R., Bruno, S., Sdei, S., Grange, C., Bussolati, B., Benedetto, C., Camussi, G. (2010) Stem cells derived from human amniotic fluid contribute to acute kidney injury recovery. *Am. J. Pathol.*, 177(4): 2011–21.
- Heino, T.J., Hentunen, T.A., Väänänen, H.K. (2004) Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. *Exp. Cell Res.*, 294(2): 458–68.
- Hernández-Vega, A.M., Camacho-Arroyo, I. (2021) Crosstalk between 17 β -Estradiol and TGF- β Signaling Modulates Glioblastoma Progression. *Brain Sci.* 11(5): 564
- Herpin, A., Lelong, C., Favrel, P. (2004) Transforming growth factor- β -related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev. Comp. Immunol.*, 28(5): 461–85.
- Hilton, M.J., Tu, X., Wu, X., Bai, S., Zhao, H., Kobayashi, T., Kronenberg, H.M., Teitelbaum, S.L., Ross, F.P., Kopan, R. (2008) Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nat. Med.*, 14(3): 306–14.
- Hofbauer, L.C., Khosla, S., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Spelsberg, T.C., Riggs, B.L. (1999) Estrogen Stimulates Gene Expression and Protein Production of Osteoprotegerin in Human Osteoblastic Cells. *Endocrinology.* 140(9): 4367–70.
- Holden, C. (2007) Versatile stem cells without the ethical baggage? American Association for the Advancement of Science.
- Holen, I., Shipman, C.M. (2006) Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer. *Clin. Sci. Portland Press Ltd.*, 110(3): 279–91.
- Hong, L., Colpan, A., Peptan, I.A., Daw, J., George, A., Evans, C.A. (2007) 17- β estradiol enhances osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng.* 13(6): 1197–203.
- Hong, L.I.U., Colpan, A., Peptan, I.A. (2006) Differentiations of Human Mesenchymal Stem Cells., *Tissue Engineering*, 13(6): 1197-1203.
- Hoshi, K., Kemmotsu, S., Takeuchi, Y., Amizuka, N., Ozawa, H. (1999) The primary calcification in bones follows removal of decorin and fusion of collagen fibrils. *J. bone Miner. Res.* 14(2): 273–80.

- Hu, N., Jiang, D., Huang, E., Liu, X., Li, R., Liang, X., Kim, S.H., Chen, X., Gao, J-L., Zhang, H. (2013) BMP9-regulated angiogenic signaling plays an important role in the osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *J. Cell Sci.*, 126(2): 532–41.
- Huang, W., Yang, S., Shao, J., Li, Y-P. (2007) Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front. Biosci.*, 12: 3068.
- Infante, A., Rodríguez, C.I. (2018) Osteogenesis and aging: lessons from mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 9(1): 1–7.
- Isaksson, O.G., Jansson, J.O., Gause, I.A. (1982) Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* (80-), 216(4551): 1237 LP – 1239.
- Int. Kay. 1, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539718/>, 20.07.2021
- Int. Kay. 2, <https://www.atcc.org/products/crl-11372>, 15.07.2021
- Int. Kay. 3, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>, 20.07.2021
- Int. Kay. 4, https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_Simple.php?lng=EN, 01.08.2021
- Int. Kay. 5, <https://www.osteoporosis.foundation/facts-statistics>, 01.08.2021
- Int. Kay. 6, <https://www.osteopharma.com/bone-fracture-facts/>, 01.08.2021
- Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., Bruder, S.P. (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem.* 64(2): 295–312.
- Jiang, Z., Hua, Y. (2016) Hydrogen sulfide promotes osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells via p38-MAPK signaling pathway under proper tension stimulation. *Arch. Oral Biol.*, 72: 8–13.
- Johansson, H., Simonsson, S. (2010) Core transcription factors, Oct4, Sox2 and Nanog, individually form complexes with nucleophosmin (Npm1) to control embryonic stem (ES) cell fate determination. *Aging.* 2(11): 815.
- Jun, E.K., Zhang, Q., Yoon, B.S., Moon, J-H., Lee, G., Park, G., Kang, P.J., Lee, J.H., Kim, A., You, S. (2014) Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through TGF- β /SMAD2 and PI3K/Akt pathways. *Int. J. Mol. Sci.*, 15(1): 605–28.
- Kabat, M., Bobkov, I., Kumar, S., Grumet, M. (2020) Trends in mesenchymal stem cell clinical trials 2004-2018: Is efficacy optimal in a narrow dose range? *Stem Cells Transl. Med.*, 9(1): 17–27.
- Kaiser, S., Hackanson, B., Follo, M., Mehlhorn, A., Geiger, K., Ihorst, G., Kapp, U. (2007) BM cells giving rise to MSC in culture have a heterogeneous CD34 and CD45 phenotype. *Cytherapy.* 9(5): 439–50.
- Kaivosoja, E., Sariola, V., Chen, Y., Kontinen, Y.T. (2015) The effect of pulsed electromagnetic fields and dehydroepiandrosterone on viability and osteo-induction of human mesenchymal stem cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 9(1): 31–40.

- Kang, H.S., Choi, S.H., Kim, B.S., Choi, J.Y., Park, G.B., Kwon, T.G., Chun, S.Y. (2015) Advanced properties of urine derived stem cells compared to adipose tissue derived stem cells in terms of cell proliferation, immune modulation and multi differentiation. *J. Korean Med. Sci.* 30(12): 1764–76.
- Karadjian, M., Senger, A.S., Essers, C., Wilkesmann, S., Heller, R., Fellenberg, J., Simon, R., Westhauser, F. (2020) Human platelet lysate can replace fetal calf serum as a protein source to promote expansion and osteogenic differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cells.* 9(4): 918.
- Karbanodva, J., Soukup, T., Suchaneek, J., Mokry, J. (2010) Osteogenic differentiation of human dental pulp-derived stem cells under various ex-vivo culture conditions. *Acta Medica (Hradec Kralove).*, 53(2): 79–84.
- Katagiri, T., Takahashi, N. (2002) Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.*, 8(3): 147–59.
- Katsara, O., Mahaira, L.G., Iliopoulou, E.G., Moustaki, A., Antsaklis, A., Loutradis, D., Stefanidis, K., Baxevanis, C.N., Papamichail, M., Perez, S.A. (2011) Effects of donor age, gender, and in vitro cellular aging on the phenotypic, functional, and molecular characteristics of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 20(9): 1549–61.
- Kawai, T., Matsuyama, T., Hosokawa, Y., Makihira, S., Seki, M., Karimbux, N.Y., Goncalves, R.B., Valverde, P., Dibart, S., Li, Y.P., Miranda, L.A., Ernst, C.W.O., Izumi, Y., Taubman, M.A. (2006) B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am. J. Pathol.*, 169(3): 987–98.
- Kazimierczak, P., Koziol, M., Przekora, A. (2021) The Chitosan/Agarose/NanoHA Bone Scaffold-Induced M2 Macrophage Polarization and Its Effect on Osteogenic Differentiation In Vitro. *Int. J. Mol. Sci.*
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., Bieback, K. (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.*, 24(5): 1294–301.
- Kibria, A.S.M.G., Nawaz, S., Akkaya, .., Dikmen, T., Yaci, A. (2020) Easy Isolation, Propagation, Characterization and Multilineage Differentiation of Equine Amniotic Fluid Derived Stem Cells. *J. Res. Vet. Med.* 39(2): 135–42.
- Kierszenbaum, A.L. (2006). *Histoloji ve Hcre Biyolojisi*. Palme Yayıncılık, Ankara.
- Klemmt, P.A.B., Vafaizadeh, V., Groner, B. (2011) The potential of amniotic fluid stem cells for cellular therapy and tissue engineering. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 11(10): 1297–314.
- Kobayashi, H., Gao, Y., Ueta, C., Yamaguchi, A., Komori, T. (2000) Multilineage differentiation of Cbfa1-deficient calvarial cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273(2): 630–6.
- Kobayashi, Y., Thirukonda, G.J., Nakamura, Y., Koide, M., Yamashita, T., Uehara, S., Kato, H., Udagawa, N., Takahashi, N. (2015) Wnt16 regulates osteoclast differentiation in conjunction with Wnt5a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 463(4): 1278–83.

- Kohn, A., Rutkowski, TP., Liu, Z., Mirando, A.J., Zuscik, M.J., O'Keefe, R.J., Hilton, M.J. (2015) Notch signaling controls chondrocyte hypertrophy via indirect regulation of Sox9. *Bone Res.*, 3(1): 1–12.
- Kondo, Y., Oka, H., Abe, A., Tanabe, A. (1994) Dose-related effects of β -estradiol on chicken T cell activity. *Japanese Poult. Sci.*, 31(5): 327–34.
- Köttstorfer, J., Thomas, A., Gregori, M., Kecht, M., Kaiser, G., Eipeldauer, S., Sarahrudi, K. (2014) Are OPG and RANKL involved in human fracture healing? *J. Orthop. Res.*, 32(12): 1557–61.
- Kunisaki, S.M., Fuchs, J.R., Kaviani, A., Oh, J-T., LaVan, D.A., Vacanti, J.P., Wilson, J.M., Fauza, D.O. (2006) Diaphragmatic repair through fetal tissue engineering: a comparison between mesenchymal amniocyte- and myoblast-based constructs. *J. Pediatr. Surg.*, 41(1): 34–9.
- Kurban, S., Mehmetoğlu, I. (2007) Osteoprotegerin, rank ve rank ligand. *Türk Biyokim. Derg.*, 32(4): 178–84.
- Kurosawa, S., Doki, N., Senoo, Y., Kishida, Y., Nagata, A., Yamada, Y., Konishi, T., Kaito, S., Yoshifuji, K., Matsuyama, N. (2020) Bone turnover markers as an aid to monitor osteoporosis following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann. Hematol.*, 99(8): 1873–82.
- Lacham-Kaplan, O., Chy, H., Trounson, A. (2006) Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. *Stem Cells.*, 24(2): 266–73.
- Lajtha, L.G. (1979) Stem cell concepts. *Differentiation.*, 1979;14(1–3): 23–33.
- Lam, J., Teitelbaum, S.L., Fremont, D.H., Lam, J., Nelson, C.A., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L., Fremont, D.H. (2001) Crystal structure of the TRANCE / RANKL cytokine reveals determinants of receptor- ligand specificity, *J Clin Invest.*, 108(7): 971–9.
- Li, Y., Gu, C., Xu, W., Yan, J., Xia, Y., Ma, Y., Chen, C., He, X., Tao, H. (2014) Therapeutic effects of amniotic fluid-derived mesenchymal stromal cells on lung injury in rats with emphysema. *Respir. Res.*, 15(1): 1–14.
- Liao, D-F., Jin, Z-G., Baas, AS., Daum, G., Gygi, S.P., Aebersold, R., Berk, B.C. (2000) Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 275(1): 189–96.
- Lin, C.S., Ning, H., Lin, G., Lue, T.F. (2012) Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy.* 14(10): 1159–63.
- Liu, G., Miao, J., Sun, S., Luo, Z., Xia, Z., Guo, B., Liu, F., Chen, Y., Ying, D., Miao, B. (2017) The effect of dietary magnesium and caseinphosphopeptides on bone metabolism in rats. *Food Funct.*, 8(12): 4487–95.
- Loiselle, A.E., Jiang, J.X., Donahue, H.J. (2013) Gap junction and hemichannel functions in osteocytes. *Bone*, 54(2): 205–12.
- 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): 1663–73

- Matsuda, T., Yamamoto, T., Muraguchi, A., Saatcioglu, F. (2001) Cross-talk between transforming growth factor- β and estrogen receptor signaling through Smad3. *J. Biol. Chem.* 276(46): 42908–14.
- McClung, M. (2007) Role of RANKL inhibition in osteoporosis. *Arthritis Res. Ther.*, 9(SUPPL.1): 1–6.
- McDougall, K.E., Perry, M.J., Gibson, R.L., Bright, J.M., Colley, S.M., Hodgins, J.B., Smithies, O., Tobias, J.H. (2002) Estrogen-induced osteogenesis in intact female mice lacking ER β . *Am. J. Physiol. Metab.* 283(4): E817–23.
- Medeiros, D.M., Stoecker, B., Plattner, A., Jennings, D., Haub, M. (2004) Iron deficiency negatively affects vertebrae and femurs of rats independently of energy intake and body weight. *J. Nutr.*, 134(11): 3061–7.
- Melmed, S., Polonsky, K.S., Larsen, P.R., Kronenberg, H.M. (2015) *Williams Textbook of Endocrinology E-Book*. 13. Baski. Elsevier Health Sciences. Kanada
- Mercati, F., Pascucci, L., Ceccarelli, P., Dall’Aglia, C., Pedini, V., Gargiulo, A.M. (2009) Expression of mesenchymal stem cell marker CD90 on dermal sheath cells of the anagen hair follicle in canine species. *Eur. J. Histochem.* 53(3).
- Millis, A.J.T., Hoyle, M., Field, B. (1977) Human fibroblast conditioned media contains growth-promoting activities for low density cells. *J. Cell. Physiol.*, 93(1): 17–24.
- 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. *Vitr. Cell. Dev. Biol.* 55(2): 138–47.
- Montgomery, S.R., Nargizyan, T., Meliton, V., Nachtergaele, S., Rohatgi, R., Stappenbeck, F., Jung, M.E., Johnson, J.S., Aghdasi, B., Tian, H. (2014) A novel osteogenic oxysterol compound for therapeutic development to promote bone growth: activation of hedgehog signaling and osteogenesis through smoothed binding. *J. Bone Miner. Res.*, 29(8): 1872–85.
- Murakami, T., Yamamoto, M., Yamamoto, M., Ono, K., Nishikawa, M., Nagata, N., Motoyoshi, K., Akatsu, T. (1998) Transforming growth factor- β 1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252(3): 747–52.
- Murrell, W., Féron, F., Wetzig, A., Cameron, N., Splatt, K., Bellette, B., Bianco, J., Perry, C., Lee, G., Mackay-Sim, A. (2005) Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, 233(2): 496–515.
- Nagaya, N., Kangawa, K., Itoh, T., Iwase, T., Murakami, S., Miyahara, Y., Fujii, T., Uematsu, M., Ohgushi, H., Yamagishi, M. (2005) Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation.*, 112(8): 1128–35.
- Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-Hora, M., Feng, J.Q., Bonewald, L.F., Kodama, T., Wutz, A., Wagner, E.F. (2011) Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat. Med.*, 17(10): 1231–4.
- Nakashima, T., Kobayashi, Y., Yamasaki, S., Kawakami, A., Eguchi, K., Sasaki, H., Sakai, H. (2000) Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble

- receptor activator of NF- κ B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 275(3): 768–75.
- Nawaz, S. (2020). TGF β -3/IGF-1 İlave Edilmiş Kondrosit Kaynaklı Koşullandırılmış Medyumun Amniyotik Sıvı Kaynaklı Hücrelerde Kondrogenesis Üzerine Etkileri, 132s, Afyonkarahisar.
- Nawaz, S., Akkaya, Ö.Ö., Dikmen, T., Altunbaş, K., Yağci, A., Kibria, A.S.M.G., Erdoğan, M., Çelik, H.A. (2020) Molecular characterization of bovine amniotic fluid derived stem cells with an underlying focus on their comparative neuronal potential at different passages. *Ann. Anatomy-Anatomischer Anzeiger.*, 228: 151452.
- Neybecker, P., Henrionnet, C., Pape, E., Mainard, D., Galois, L., Loeuille, D., Gillet, P., Pinzano, A. (2018) In vitro and in vivo potentialities for cartilage repair from human advanced knee osteoarthritis synovial fluid-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.*, 9(1): 1–15.
- Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., Adachi, K. (2009) A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*. 460(7251): 118–22.
- Pal, S., Porwal, K., Rajak, S., Sinha, R.A., Chattopadhyay, N. (2020) Selective dietary polyphenols induce differentiation of human osteoblasts by adiponectin receptor 1-mediated reprogramming of mitochondrial energy metabolism. *Biomed. Pharmacother.*, 127: 110207.
- Pan, H-C., Yang, D-Y., Chiu, Y-T., Lai, S-Z., Wang, Y-C., Chang, M-H., Cheng, F-C. (2006) Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human amniotic mesenchymal stem cell. *J. Clin. Neurosci.*, 13(5): 570–5.
- Paralkar, V.M., Nandedkar, A.K., Pointer, R.H., Kleinman, H.K., Reddi, A.H. (1990) Interaction of osteogenin, a heparin binding bone morphogenetic protein, with type IV collagen. *J. Biol. Chem.* 265(28): 17281–4.
- Pawitan, J.A. (2014) Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res. Int. Hindawi*, 2014.
- Phermthai, 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 Biol.*, 11(1): 1–9.
- Pipino, C., Pierdomenico, L., Di Tomo, P., Di Giuseppe, F., Cianci, E., D'Alimonte, I., Morabito, C., Centurione, L., Antonucci, I., Mariggio, M.A. (2015) Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid-derived cells: a morphological and proteomic approach. *Stem Cells Dev*, 24(12): 1415–28.
- 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* (80-). 284(5411): 143–7.
- Poggi, S.H., Spong, C.Y., Ghidini, A., Ossandon, M. (2004) Gender differences in amniotic fluid cytokine levels. *J. Matern. Neonatal Med.* 15(6): 367–71.

- Poole, K.E.S., Reeve, J. (2005) Parathyroid hormone - A bone anabolic and catabolic agent. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5(6 SPEC. ISS.): 612–7.
- Prusa, A., Marton, E., Rosner, M., Bernaschek, G., Hengstschlager, M. (2003) Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum. Reprod.*, 18(7): 1489–93.
- Ramalho-Santos, M., Willenbring, H. (2007) On the Origin of the Term “Stem Cell.” *Cell Stem Cell.*, 1(1): 35–8.
- Reid, P., Holen, I. (2009) Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). *Eur. J. Cell Biol.*, 88(1): 1–17.
- Robertson, J.A. (2001) Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues. *Nat. Rev. Genet.*, 2(1): 74–8.
- Rodan, G.A. (1998) Commentary Bone homeostasis. *Commentary.*, 95(November): 13361–2.
- Rossi, B., Merlo, B., Colleoni, S., Iacono, E., Tazzari, P.L., Ricci, F., Lazzari, G., Galli, C. (2014) Isolation and in vitro characterization of bovine amniotic fluid derived stem cells at different trimesters of pregnancy. *Stem cell Rev. reports.* 10(5): 712–24.
- Roubelakis, M.G., Pappa, K.I., Bitsika, V., Zagoura, D., Vlahou, A., Papadaki, H.A., Antsaklis, A., Anagnostou, 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 Dev.*, 16(6): 931–52.
- Saika, M., Inoue, D., Kido, S., Matsumoto, T. (2001) 17 β -Estradiol Stimulates Expression of Osteoprotegerin by a Mouse Stromal Cell Line, ST-2, via Estrogen Receptor- α . *Endocrinology* 142(6): 2205–12.
- Sainz de Aja, J., Menchero, S., Rollan, I., Barral, A., Tiana, M., Jawaid, W., Cossio, I., Alvarez, A., Carre˜no, Tarragona, G., Badia, Careaga, C. (2019) The pluripotency factor NANOG controls primitive hematopoiesis and directly regulates Tal1. *EMBO J.* 38(7): e99122.
- Salomon, C., Ryan, J., Sobrevia, L., Kobayashi, M., Ashman, K., Mitchell, M., Rice, G.E. (2013) Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis. *PLoS One.*, 8(7): e68451.
- Sarkar, N., Bose, S. (2020) Controlled release of soy isoflavones from multifunctional 3D printed bone tissue engineering scaffolds. *Acta Biomater.*, 114: 407–20.
- Savickiene, J., Treigyte, G., Baronaite, S., Valiulienė, G., Kaupinis, A., Valius, M., Arlauskienė, A., Navakauskienė, R. (2015) Human amniotic fluid mesenchymal stem cells from second- and third-trimester amniocentesis: differentiation potential, molecular signature, and proteome analysis. *Stem Cells Int.* 2015.
- Schneeweis, L.A., Willard, D., Milla, M.E. (2005) Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF- κ B ligand. *J. Biol. Chem.*, 280(50): 41155–64.
- Shi, Y., Chen, J., Karner, C.M., Long, F. (2015) Hedgehog signaling activates a positive feedback mechanism involving insulin-like growth factors to induce osteoblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 112(15): 4678–83.

- Silva, I., Branco, J. (2011) Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta Reumatol. Port.*, 36(3): 209–18.
- Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Lüthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trall, G., Sullivan, J., ... Boyle, W.J. (1997) Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.*, 89(2): 309–19.
- Slack, J.M.W. (2018) What is a stem cell? *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, 7(5): 1–15.
- Song, I., Kim, B-S., Kim, C-S., Im, G-I. (2011) Effects of BMP-2 and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of adipose stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 408(1): 126–31.
- Steigman, S.A., Ahmed, A., Shanti, R.M., Tuan, R.S., Valim, C., Fauza, D.O. (2009) Sternal repair with bone grafts engineered from amniotic mesenchymal stem cells. *J. Pediatr. Surg.*, 44(6): 1120–6.
- Steinbichler, T.B., Metzler, V., Pritz, C., Riechelmann, H., Dudas, J. (2016) Tumor-associated fibroblast-conditioned medium induces CDDP resistance in HNSCC cells. *Oncotarget.*, 7(3): 2508.
- Streubel, B., Martucci-Ivessa, G., Fleck, T., Bittner, R.E. (1996) In vitro transformation of amniotic cells to muscle cells--background and outlook. *Wien. Med. Wochenschr.*, 146(9–10): 216–7.
- Sun, L-J., Li, C., Wen, X., Guo, L., Guo, Z-F., Liao, L., Guo, Y. (2021) Icariin stimulates hFOB 1.19 osteoblast proliferation and differentiation via OPG/RANKL mediated by the estrogen receptor. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 22(1): 168–75.
- Takei, Y., Minamizaki, T., Yoshiko, Y. (2015) Functional diversity of fibroblast growth factors in bone formation. *Int. J. Endocrinol.*, 2015.
- Takeuchi, Y., Kodama, Y., Matsumoto, T. (1994) Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity. *J. Biol. Chem.* (51): 32634–8.
- Tapp, H., Hanley Jr, E.N., Deepe, R., Ingram, J.A., Scannell, B., Norton, H.J., Gruber, H.E. TGF- β 3 and Three-dimensional Culture of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Stimulate a Disc-like Proteoglycan and Collagen Rich Extracellular Matrix. 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. Şubat 2009 Las Vegas, Amerika Birleşik Devletleri.
- Taskiran, D., Evren, V. (2011) Stimulatory effect of 17 β -estradiol on osteogenic differentiation potential of rat adipose tissue-derived stem cells. *Gen. Physiol. Biophys.* 30(2): 167.
- ten Dijke, P., Krause, C., De Gorter, D.J.J., Löwik, C.W.G.M., Van Bezooijen, R.L. (2008) Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling. *JBJS. LWW*, 90: 31–5.
- Teucher, B., Dainty, J.R., Spinks, C.A., Majsak-Newman, G., Berry, D.J., Hoogewerff, J.A., Foxall, R.J., Jakobsen, J., Cashman, K.D., Flynn, A. (2008) Sodium and bone health: impact of moderately high and low salt intakes on calcium metabolism in postmenopausal women. *J. bone Miner. Re. s.*, 23(9): 1477–85
- Thent, Z.C., Ruth Anisah Froemming, G., Binti Mohd Ismail, A., Baharom Syed Ahmad Fuad, S, Muid S. (2020) Phytoestrogens by inhibiting the non-classical oestrogen receptor, overcome

- the adverse effect of bisphenol A on hFOB 1.19 cells. *Iran. J. Basic Med. Sci.*, 23(9): 1155–63.
- Thomson, M., Liu, S.J., Zou, L.N., Smith, Z., Meissner, A., Ramanathan, S. (2011) Pluripotency circuit members mediate germ layer fate choice of embryonic stem cells. *Cell*. 145(6): 875.
- Thomson, M., Liu, S.J., Zou, L.N., Smith, Z., Meissner, A., Ramanathan, S. (2011) Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell*. 145(6): 875–89.
- Thum, T., Bauersachs, J., Poole-Wilson, P.A., Volk, H-D., Anker, S.D. (2005) The dying stem cell hypothesis: immune modulation as a novel mechanism for progenitor cell therapy in cardiac muscle. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 46(10): 1799–802.
- Tian, H., Bharadwaj, S., Liu, Y., Ma, P.X., Atala, A., Zhang, Y. (2010) Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into bladder cells: potential for urological tissue engineering. *Tissue Eng. Part A*. 16(5): 1769–79.
- Tong, X., Gu, J., Song, R., Wang, D., Sun, Z., Sui, C., Zhang, C., Liu, X., Bian, J., Liu, Z. (2019) Osteoprotegerin inhibit osteoclast differentiation and bone resorption by enhancing autophagy via AMPK/mTOR/p70S6K signaling pathway in vitro. *J. Cell. Biochem.*, 120(2): 1630–42.
- Tong, X., Gu, J., Song, R., Wang, D., Sun, Z., Sui, C., Zhang, C., Liu, X., Bian, J., Liu, Z. (2019) Osteoprotegerin inhibit osteoclast differentiation and bone resorption by enhancing autophagy via AMPK/mTOR/p70S6K signaling pathway in vitro. *J. Cell. Biochem.* 120(2): 1630–42.
- Topaloğlu, U., Ketani, M.A., GÜNEY SARUHAN, B., (2017). Kemik Doku ve Kemikleşme Çeşitleri. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10(1), 62-71.
- Torricelli, F., Brizzi, L., Bernabei, P.A., Gheri, G., Di Lollo, S., Nutini, L., Lisi, E., Di Tommaso, M., Cariati, E. (1993) Identification of hematopoietic progenitor cells in human amniotic fluid before the 12th week of gestation. *Ital. J. Anat. Embryol. Arch. Ital. di Anat. ed Embriol.*, 98(2): 119–26.
- Tsai, M., Lee, J., Chang, Y., Hwang, S. (2004) Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum. Reprod.*, 19(6): 1450–6.
- Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Tanaka, H., Sasaki, T., Nishihara, T., Koga, T., Martin, T.J., Suda, T. (1990) Origin of osteoclasts: Mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87(18): 7260–4.
- Underwood, M.A., Gilbert, W.M., Sherman, M.P. (2005) Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J. Perinatol.*, 25(5): 341–8.
- Valli, A., Rosner, M., Fuchs, C., Siegel, N., Bishop, C.E., Dolznig, H., Mädel, U., Feichtinger, W., Atala, A., Hengstschläger, M. (2010) Embryoid body formation of human amniotic fluid stem cells depends on mTOR. *Oncogene.*, 29(7): 966–77.

- Wang, L., Li, Z., Wang, Y., Wu, Z., Yu, B. (2015) Dynamic expression profiles of marker genes in osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chinese Med. Sci. J.* 30(2): 108–13.
- 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 Biochim. Biophys. Sin.* 49(3): 197–207.
- Wang, Q., Chen, B., Cao, M., Sun, J., Wu, H., Zhao, P., Xing, J., Yang, Y., Zhang, X., Ji, M. (2016) Response of MAPK pathway to iron oxide nanoparticles in vitro treatment promotes osteogenic differentiation of hBMSCs. *Biomaterials.*, 86: 11–20.
- Wang, Q., Yu J.H., Zhai H.H., Zhao Q.T, Chen J.W., Shu, L., Li D.Q., Liu D.Y., Dong, C., Ding, Y.. (2006) Temporal expression of estrogen receptor alpha in rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 347(1): 117–23.
- Wang, W., Wang, B. (2021) Expression of angiogenesis-related proteins in bone marrow mesenchymal stem cells induced by osteoprotegerin during osteogenic differentiation in rats. *Int. Immunopharmacol.* 98: 107821.
- Wang, X., Rivera-Bolanos, N., Jiang, B., Ameer, G. A. (2019). Advanced functional biomaterials for stem cell delivery in regenerative engineering and medicine. *Advanced Functional Materials*, 29(23), 1809009.
- Weinstein, R.S., Jilka, R.L., Parfitt, A.M., Manolagas, S.C. (1988) Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids: potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J. Clin. Invest.*, 102(2): 274–82.
- Whyte, M.P., Obrecht, S.E., Finnegan, P.M., Jones, J.L., Podgornik, M.N., McAlister, W.H., Mumm, S. (2002) Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N. Engl. J. Med. Mass Medical Soc*, 347(3): 175–84.
- Widholz, B., Tsitlakidis, S., Reible, B., Moghaddam, A., Westhauser, F. (2019) Pooling of patient-derived mesenchymal stromal cells reduces inter-individual confounder-associated variation without negative impact on cell viability, proliferation and osteogenic differentiation. *Cells.* 8(6): 633.
- Wiren, K.M., Toombs, A.R., Semirale, A.A., Zhang, X. (2006) Osteoblast and osteocyte apoptosis associated with androgen action in bone: Requirement of increased Bax/Bcl-2 ratio. *Bone.*, 38(5): 637–51.
- Wollert, K.C., Meyer, G.P., Lotz, J., Lichtenberg, S.R., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D. (2004) Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet.*, 364(9429): 141–8.
- Wright, H.L., McCarthy, H.S., Middleton, J., Marshall, M.J. (2009) RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr. Rev. Musculoskelet. Med.*, 2(1): 56–64.
- Xiao, L., Du, Y., Shen, Y., He, Y., Zhao, H., Li, Z. (2012) TGF-beta 1 induced fibroblast proliferation is mediated by the FGF-2/ERK pathway. *Front Biosci (Landmark Ed).*, 17: 2667–74.

- Xiong, J., Piemontese, M., Onal, M., Campbell, J., Goellner, J.J., Dusevich, V., Bonewald, L., Manolagas, S.C., O'Brien, C.A. (2015) Osteocytes, not osteoblasts or lining cells, are the main source of the RANKL required for osteoclast formation in remodeling bone. *PLoS One.*, 10(9): e0138189.
- Xu, J., Li, Z., Hou, Y., Fang, W. (2015) Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Am. J. Transl. Res.* 7(12): 2527.
- Yamamoto, T., Saatcioglu, F., Matsuda, T. (2002) Cross-talk between bone morphogenic proteins and estrogen receptor signaling. *Endocrinology.* 143(7): 2635–42
- Yan, J., Stringer, S.E., Hamilton, A., Charlton, Menys, V., Götting, C., Müller, B., Aeschlimann, D., Alexander, M.Y. (2011) Decorin GAG Synthesis and TGF- β Signaling Mediate Ox-LDL–Induced Mineralization of Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31(3): 608–15.
- Yang, M., Yuan. H., Miao, M., Xu, W. (2015). The osteogenic potential of ligament fibroblasts is greater in ankylosing spondylitis patients than in patients with osteoarthritis. *Z Rheumatol*, 74:340–345 DOI 10.1007/s00393-014-1394-z.
- Yao, Z., Lafage-Proust, M., Plouët, J., Bloomfield, S., Alexandre, C., Vico, L. (2004) Increase of both angiogenesis and bone mass in response to exercise depends on VEGF. *J. Bone Miner. Res.*, 19(9): 1471–80.
- Yen, M., Chien, C-C., Chiu, I., Huang, H-I., Chen, Y-C., Hu, H-I., Yen, BL. (2007) Multilineage Differentiation and Characterization of the Human Fetal Osteoblastic 1.19 Cell Line: A Possible In Vitro Model of Human Mesenchymal Progenitors. *Stem Cells.*, 25(1): 125–31.
- You, L., Temiyasathit, S., Lee, P., Kim, C.H., Tummala, P., Yao, W., Kingery, W., Malone, A.M., Kwon, R.Y., Jacobs, C.R. (2008) Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone.*, 42(1): 172–9.
- You, Q., Cai, L., Zheng, J., Tong, X., Zhang, D., Zhang, Y. (2008) Isolation of human mesenchymal stem cells from third-trimester amniotic fluid. *Int. J. Gynecol. Obstet.*, 103(2): 149–52.
- You, Q., Tong, X., Guan, Y., Zhang, D., Huang, M., Zhang, Y., Zheng, J. (2009) The biological characteristics of human third trimester amniotic fluid stem cells. *J. Int. Med. Res.* ;37(1): 105–12.
- Yuan, X., Cao, J., He, X., Serra, R., Qu, J., Cao, X., Yang, S. (2016) Ciliary IFT80 balances canonical versus non-canonical hedgehog signalling for osteoblast differentiation. *Nat. Commun.*, 7(1): 1–13.
- Yuan, Z., Li, Q., Luo, S., Liu, Z., Luo, D., Zhang, B., Zhang, D., Rao, P., Xiao, J. (2016) PPAR γ and Wnt signaling in adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 11(3): 216–25.
- Zaehres, H., Lensch, M.W., Daheron, L., Stewart, S.A., Itskovitz, Eldor, J., Daley, G.Q. (2005) High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* (3): 299–305.
- 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. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 17(1): 1–15.

- Zhong, S., He, X., Li, Y., Lou, X. (2019) Conditioned medium enhances osteogenic differentiation of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Regen. Med.* 16(2): 141–50.
- Zou, L., Chen, L., Li, H., Mygind, T., Kassem, M., Bünger, C. (2008). Effect of hyaluronan on osteogenic differentiation of porcine bone marrow stromal cells in vitro. *Journal of Orthopaedic Research* 26(5): 713-720.

