

**Sıgırlarda Sinoviyal Sıvı Kaynaklı Mezenkimal Kök
Hücrelerinin Kondrojenik Farklılaşmasında
Potansiyel Adaylar Olarak BMP-9 ve TGF-β3**

Elif Ece AKGÜN

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ

Ortak Tez Danışmanı: Doç. Dr. Duygu MUTLUAY KÖSE

İkinci Danışman: Prof. Dr. Metin ERDOĞAN

Tez No:2022-007

Afyonkarahisar

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

**SIĞIRLARDA SİNOVİYAL SIVI KAYNAKLI MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELERİNİN KONDROJENİK FARKLILAŞMASINDA
POTANSİYEL ADAYLAR OLARAK BMP-9 ve TGF-β3**

**Hazırlayan
Elif Ece AKGÜN**

**Danışman
Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ**

**Ortak Tez Danışmanı
Doç. Dr. Duygu MUTLUAY KÖSE**

**İkinci Danışman
Prof. Dr. Metin ERDOĞAN**

**Tez No:2022-007
AFYONKARAHİSAR**

**Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: "19.SAĞ.BİL.11"**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Burdur Mehmet Akif Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı** ortak doktora programı çerçevesinde Elif Ece AKGÜN tarafından hazırlanan “Sığırlarda Sinoviyal Sıvı Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Kondrojenik Farklılaşmasında Potansiyel Adaylar Olarak BMP-9 ve TGF-β3” adlı tez çalışması Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca 08/07/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir

Başkan

Prof. Dr. Artay YAĞCI

Üye

Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ

Üye

Prof. Dr. Vural ÖZDEMİR

Üye

Prof. Dr. Yasemin ÖZNURLU

Üye

Prof. Dr. Şerife TÜTÜNCÜ

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

Elif Ece AKGÜN

ÖZET

Sığırlarda Sinoviyal Sıvı Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Kondrojenik Farklılaşmasında Potansiyel Adaylar Olarak BMP-9 ve TGF-β3

Sinoviyal sıvı mezenkimal kök hücreler invaziv olmayan yöntemlerle kolay bir şekilde elde edilebilmektedir. Kondrojenik farklılaşma kapasitelerinin yüksek olması sebebiyle hem tedavi amaçlı olarak hem de araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Eklem hastalıkları ile ilgili çalışmalarda eklem kıkırdağının doğal yapısının taklit edilebilmesi çalışmadan verimli bir sonuç elde etmek için önemlidir. Çalışmamızda transwell kültürde eklem doğal yapısını taklit edebilmek amacıyla üst tabakada kondrositler ve plaka tabanında sinoviyal sıvı mezenkimal kök hücreler yer aldı. Kıkırdağın parakrin salgısı sayesinde mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını artıracığı düşünüldü. Bu kültür sisteminde kondrojenik farklılaşma medyumuna ilave edilen TGF-β3 ve BMP-9 ile kültürlenerek kök hücrelerin kondrogenезisinin daha da artırılması amaçlandı. İzole edilen sığır sinoviyal sıvı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu doğrultuda hücrelerin farklılaşma potansiyelleri ve real-time PCR analizleri yapıldı. Aynı zamanda transwell kültürde kondrojenik farklılaşma medyumuyla yapılan 21 günlük uygulamadan sonra real-time PCR'da COL2A1, ACAN, SOX9 ve COL10A1 gen ifadelerine bakıldı. Ayrıca immunfloresan ve histolojik boyamalarla farklılaşma potansiyelleri doğrulandı. Sonuç olarak transwell kültürde biraraya getirilen kıkırdak ve sinoviyal sıvı mezenkimal kök hücrelerinin kondrojenik farklılaşmayı başarılı bir şekilde artırdığı görüldü. Aynı zamanda kondrojenik farklılaşma medyumuna ilave edilen TGF-β3 ve BMP-9'un farklılaşmayı daha da artırdığı tespit edildi. Ancak, TGF-β3 ve BMP-9'un farklı dozlarının biraraya getirilerek ya da tek başlarına kullanılarak etkilerinin tespit edilmesi kondrojenik farklılaşma mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi açısından önemlidir. Ayrıca farklı zaman dilimlerinin çalışmaya eklenmesi ve *in vivo* olarak test edilmesi çalışmanın önemini daha da artıracaktır.

Anahtar Kelimeler: BMP-9, Kondrojenik farklılaşma, Sinoviyal sıvı mezenkimal kök hücreler, TGF-β3, Transwell kültür.

SUMMARY

BMP-9 and TGF- β 3 as Potential Candidates for Chondrogenic Differentiation of Synovial Fluid Derived Mesenchymal Stem Cells in Bovine

Synovial fluid mesenchymal stem cells can be obtained easily by non-invasive methods. They are frequently used both for therapeutic purposes and in research due to their high chondrogenic differentiation capacity. It is important to imitate the natural structure of articular cartilage in studies related to joint diseases in order to obtain an efficient result from the study. In our study, in order to imitate the natural structure of the joint in transwell culture, chondrocytes in the upper layer and synovial fluid mesenchymal stem cells at the bottom of the plate were located. It was thought that thanks to the paracrine secretion of the cartilage, it would increase the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. In this culture system, it was aimed to culture the stem cells with TGF- β 3 and BMP-9 added to the chondrogenic differentiation medium and thus to further increase the chondrogenesis of the stem cells. Isolation and characterization studies of isolated bovine synovial fluid mesenchymal stem cells were performed. In this direction, differentiation potentials of these cells and real-time PCR analyzes were performed. At the same time, after 21 days of culturing with chondrogenic differentiation medium in the transwell system, COL2A1, ACAN, SOX9 and COL10A1 gene expressions were examined in real-time PCR. Besides, the differentiation potentials were confirmed by immunofluorescence and histological stainings. As a result, it was observed that cartilage and synovial fluid mesenchymal stem cells combined in transwell culture successfully increased chondrogenic differentiation. At the same time, it was determined that TGF- β 3 and BMP-9 added to the chondrogenic differentiation medium further increased differentiation. However, determining the effects of different doses of TGF- β 3 and BMP-9 by combining them or using them alone is important for a better understanding of the chondrogenic differentiation mechanism. In addition, adding different time periods to the study and testing the study in vivo will further increase its importance.

Keywords: BMP-9, Chondrogenic differentiation, Synovial fluid mesenchymal stem cells, TGF- β 3, Transwell culture.

ÖNSÖZ

Yapılan tez çalışmasında sinoviyal sıvı kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ve kondrositlerin transwell kültürde kondrojenik farklılaşması üzerine etkileri incelenmiş ve daha başarılı farklılaştırma protokollerinin oluşturulması için bilime katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesiyle yol gösterici olan, bilgi birikimiyle çalışmama farklı açılardan bakmamı sağlayan başta değerli danışman hocam Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ olmak üzere, Prof. Dr. Artay YAĞCI'ya, Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖZDEN AKKAYA, Dr. Öğr. Üyesi Özay GÜLEŞ'e ve ikinci tez danışmanım Prof. Dr. Metin ERDOĞAN'a,

Desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Vural ÖZDEMİR ve Doç. Dr. Mustafa Volkan YAPRAKÇI'ya, tez çalışmam sürecinde birikimleriyle beni yönlendiren kıymetli hocam Prof. Dr. İbrahim KILIÇ'a

Doktora eğitimim boyunca bilgilerini benimle paylaşan ve bana yardımcı olan arkadaşlarım Dr. Shah Nawaz'a ve Dr. Tayfun Dikmen'e ve yine tez çalışması süresince yardımını esirgemeyen arkadaşım Eda DEMİRTAŞ'a Veteriner Hekim Barış Bostancı'ya ve öğrencim Mehmet Emir YÜCEL'e teşekkürü borç bilirim.

Projemize maddi destek sağlayan Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine de teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak doktora sürecimin her aşamasında manevi destekleriyle yanımda olan arkadaşlarıma, hayatımın her anında beni destekleyen, sevgileri ve emekleri ile beni yalnız bırakmayan canım annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkürler.

Elif Ece AKGÜN

Afyonkarahisar

2022

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
SUMMARY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
GRAFİKLER DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1 Kök Hücreler	1
1.1.1.Sinoviyal Sıvı Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (SSMKH).....	4
1.2.Eklemin Anatomik Yapısı	6
1.3.Eklem Kıkırdağının Gelişimi.....	6
1.4.Eklem Kıkırdağının Histolojik Yapısı.....	7
1.5.Eklem Kapsülü ve Sinoviyal Sıvı.....	9
1.6.Kondrojenizisin Hücresel ve Moleküler Mekanizması.....	10
1.7.Ko-kültür	15
1.7.1.Transwell Ko-kültür	17
1.8.Problemin İfadesi.....	19
1.9.Hipotez, Amaç ve Hedefler	20
2.MATERYAL ve METOD	21
2.1.Etik Kurul Onayı	21
2.2.Cihazlar ve Kimyasallar	21
2.3.SSMKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü	24
2.4.Farklılaşma Çalışmaları.....	26
2.4.1.Osteojenik Farklılaşma ve Alizarin Red S Boyaması	26
2.4.1.1.Osteojenik Farklılaşma	26
2.4.1.2.Alizarin Red S Boyaması	26
2.4.2.Adipojenik Farklılaştırma ve Boyaması	26
2.4.2.1.Adipojenik Farklılaşma	26
2.4.2.2.Oil Red O Boyaması.....	27
2.5.Real-Time PCR	28

2.5.1.RNA İzolasyonu İçin Hücrelerin Toplanması ve Saklanması.....	29
2.5.2.RNA İzolasyonu	29
2.5.3.Komplement DNA (cDNA) Sentezi.....	30
2.5.4.Real-Time PCR Analizi.....	31
2.6.Sığır Eklem Kıkırdağından Kondrositlerin İzolasyonu ve Kültürü.....	32
2.7.Transwell Kültürde Kondrojenik Farklılaşma Çalışması	33
2.7.1.Kondrojenik Farklılaşma Medyumları	35
2.7.2.Kondrojenik Farklılaşmanın Alsiyan Mavisi Boyama, İmmunfloresan Boyama ve Real-Time PCR ile Gösterilmesi.....	36
2.7.2.1.Alsiyan Mavisi Boyama Yöntemi	36
2.7.2.2.İmmunfloresan Boyama	37
2.7.2.3.Real-Time-PCR	38
2.8.İstatistik	39
3.BULGULAR	40
3.1.SSMKH'lerin Karakterlerinin Belirlenmesi	40
3.1.1.SSMKH'lerin Morfolojisi	40
3.1.2.Farklılaştırma Çalışmaları	43
3.1.2.1.Adipojenik Farklılaşma	43
3.1.2.2.Osteojenik Farklılaşma	43
3.1.3.Real-Time PCR	44
3.2.Kondrosit Kültürü ve Karakterizasyonu.....	48
3.3.SSMKH'lerin Transwell Kültürde Kondrojenik Farklılaşması.....	50
3.3.1.Alsiyan Mavisi Boyama Yöntemi	50
3.3.2.İmmunfloresan Boyama	52
3.3.3.Real-Time PCR	54
4.TARTIŞMA.....	61
4.1.SSMKH'lerin Karakterizasyonu ve Farklılaşma Potansiyellerinin Belirlenmesi	61
4.2.Eklem Kıkırdağından Kondrositlerin İzole Edilerek Kültürlenmesi, Transwell Kültürün Oluşturulması ve TGF-β3 ve/veya BMP-9 İlave Edilmiş ya da Edilmemiş Kondrojenik Farklılaşma Medyumuyla Kültürlenmesi.....	62
4.3.Transwell Kültürde Kültürlenen Kök Hücrelerin Kondrojenik Farklılaşma Potansiyellerinin Real-Time PCR, İmmunfloresan ve Alsiyan Mavisi Boyamasıyla Değerlendirilmesi	65
5.SONUÇ ve ÖNERİLER	68
6.KAYNAKLAR	69
7.HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Δ	Delta
%	Yüzde
-	Eksi
/	Bölü
+	Artı
\pm	Artı eksi
\times	Çarpı
$^{\circ}\text{C}$	Derece
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikromolar
ACAN	Agrekan
ACVR2	Aktivin tip 2 reseptör
α -MEM	Alfa minimum esansiyel medyum
Bapx1	Homeobox homolog 1
β	Beta
BMP	Kemik morfojenetik protein
CD	Farklılaşma Kümeleri
cDNA	Komplementer deoksiribo nükleik asit
CHD	Kalsiyum (Ca^{+2}) bağımlı nöral kaderin
CMP	Kıkırdak matriks proteini
c-Myc	Avian myelostomatozis virüs onkojen hücre sel homologu
CO_2	Karbondioksit
COL	Kollajen
COL2A1	Kollajen tip-II alfa I
COMP	Kıkırdak oligometrik matriks proteini
Co-SMAD	R-SMAD ortak aracılı
Ct	Döngü eşiği
DAPI	4, 6-diamidino-2-fenilindol, dihidroklorür

DCN	Dekorin
DEPC	Dietil pirokarbonat
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun modifiye minimum esansiyel medyumu
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
Erk 1/2	Hücre dışı sinyal ayarlı kinaz 1/2
ERK	Hücre dışı sinyal düzenleyen kinazlar
FBS	Fötal sığır serumu
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
g	Çelim sabiti
GAG	Glikoz amino glikan
GAPDH	Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz
HBSS	Hank'in dengeli tuz solüsyonu
HEPES	1M 4-(2 hidroksi etil)-1-piperazinetansülfonik asit
HG-DMEM	Yüksek glikoz-Dulbecco'nun modifiye minimum esansiyel medyumu
IBMX	3-izobütil-1-metilxksantin
IF	İmmunfloresan
IL	İnterlökinler
IM	İndüksiyon medyumu
ITS	İnsülin Transferrin Selenyum
JNK	C-JunNH2-terminal kinazlar
LG-DMEM	Düşük glikoz- Dulbecco'nun modifiye minimum esansiyel medyumu
MAD	Mothers against decapentaplegic
MEK 1/2	Hücre dışı sinyal ayarlı kinaz-kinaz 1/2
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorit
MDU	Majör doku uyumluluğu kompleksi
MKH	Mezenkimal kök hücre
mL	Mililitre

mM	Milimol
MMP	Matriks metalloproteinaz
mRNA	Mesajcı RNA
n	Sayı
N-CAD	Kalsiyum bağımlı transmembran adezyon proteini
N-CAM	Nöral hücre yapışma molekülü
NEM	Non-esansiyel amino asit
ng	Nanogram
OA	Osteoartirit
OCT ^{3/4}	Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktör- ^{3/4}
p	Anlamlılık değeri
P	Pasaj
p38-MAPK	p38-mitojen-aktive protein kinaz
PBS	Tamponlu fosfat solüsyonu
PBST	Tween-20 içeren PBS
PCR	Polimer zincir reaksiyonu
PFA	Paraformaldehit
pmol	Pikomol
PTHrP	Paratiroid hormon ilişkili protein
RNA	Ribonükleik asit
RPM	Dakika başına tur sayısı
R-SMAD	Fosforile edilmiş reseptör regülasyonlu SMAD'lar
RUNX-2	Runt-ilişkili transkripsiyon faktör 2
SH	Standart hata
SHH	Sonik hedgehog
SMA	Small worm fenotip
SOX9	SRY-Box transkripsiyon faktörü 9
SSMKH	Sinoviyal sıvı mezenkimal kök hücre
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü-beta
TGFβR	TGF beta reseptörü
Tm	Sıcaklık değeri
Tris	Tris(hidroksimetil)-aminometan

U	Ünite
VEGF	Veziküler endotelyal büyüme faktörü
WNT	Wingless tip sinyal yolağı

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>SAYFA</u>
Şekil 1.1. Eklem kıkırdağının yapısı	8
Şekil 1.2. BMP-9 sinyal yolağının şematik gösterimi.....	14
Şekil 1.3. Transwell ko-kültürde yer alan SSMKH'ler ve kondrositler.....	18

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2. 1. Kullanılan cihazlar	21
Çizelge 2. 2. Kullanılan sarf malzeme ve kimyasallar	22
Çizelge 2. 3. SSMKH'lerin karakterizasyonunda kullanılan primerler ve özellikleri ...	28
Çizelge 2. 4. cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar ve miktarları	30
Çizelge 2. 5. Real-Time PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları	31
Çizelge 2. 6. Real-Time PCR analiz aşamaları	32
Çizelge 2.7. Deney gruplarının belirlenmesi	34
Çizelge 2. 8. İmmunfloresan boyamada kullanılan antikorlar	38
Çizelge 2. 9. Kondrojenik farklılaşma medyumuna uygulanan gruplarda kullanılan Real-Time PCR genleri, primer sekansları ve Tm değerleri	38
Çizelge 3. 1 SSMKH'lerde P0 ve P3'te mezenkimal ve hemapoyetik genlerin real-time PCR ile istatistiksel analizi	44
Çizelge 3. 2. Kondrojenik farklılaşmanın 21. gününde gen ifadesindeki kat değişimleri.	55

RESİMLER DİZİNİ

SAYFA

Resim 2. 1. Sinoviyal sıvının toplanması.....	25
Resim 2. 2 Sığır metatarsofalangeal ekleminden kıkırdak dokunun alınması.....	33
Resim 2. 3. Transwell Kültürde kondrojenik farklılaşma.....	34
Resim 3. 1. P0'da fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücreler.....	41
Resim 3. 2. P0'da iri ve geniş piramit şekilli hücreler.....	41
Resim 3. 3. Farklı pasajlarda fibroblast benzeri morfolojiye sahip SSMKH'ler.....	42
Resim 3. 4. Farklı pasajlarda fibroblast benzeri morfolojiye sahip SSMKH'ler.....	42
Resim 3. 5. SSMKH'lerin 21. günde adipojenik farklılaşması.....	43
Resim 3. 6. SSMKH'lerin 21. günde osteojenik farklılaşması.....	44
Resim 3. 7. Poligonal morfolojiye sahip P0 ve P1'deki kondrositler.....	48
Resim 3. 8. P1'de %80-90 konfluense ulaşmış kondrositler.....	49
Resim 3. 9. P1'de %80-90 konfluense ulaşmış kondrositler.....	49
Resim 3. 10. Transwell kültürde kondrojenik farklılaşmanın Alsiyan Mavisi boyama yöntemi ile gösterilmesi.....	51
Resim 3. 11. Transwell kültürde 1. grubun 21. günde COL II ifadesinin gösterilmesi.....	52
Resim 3. 12. Transwell kültürde 2. ve 3. grubun 21. günde COL II ifadesinin gösterilmesi.....	52
Resim 3. 13. Transwell kültürde 4. ve 5. grubun 21. günde COL II ifadesinin gösterilmesi.....	53
Resim 3. 14. Transwell kültürde 6. grubun 21. günde COL II ifadesinin gösterilmesi.....	53

GRAFİKLER DİZİNİ

SAYFA

Grafik 3. 1. P0 ve P3'te SSMKH'lerin CD44 ve CD73 gen ifadelerindeki kat değişimlerini gösteren kutu ve büyük grafiği.....	45
Grafik 3. 2. P0 ve P3'te SSMKH'lerin CD90 ve CD105 gen ifadelerindeki kat değişimlerini gösteren kutu ve büyük grafiği.....	46
Grafik 3. 3. P0 ve P3'te SSMKH'lerin CD34 ve CD45 gen ifadelerindeki kat değişimlerini gösteren kutu ve büyük grafiği.....	47
Grafik 3. 4. İkinci grup kutu grafiği	56
Grafik 3. 5. Üçüncü grup kutu grafiği	57
Grafik 3. 6. Dördüncü grup kutu grafiği.....	58
Grafik 3. 7. Beşinci grup kutu grafiği.....	59
Grafik 3. 8. Altıncı grup kutu grafiği	60

1. GİRİŞ

1.1 Kök Hücreler

Kök hücreler; genellikle tek bir hücreden ortaya çıkan, çeşitli hücre ve doku türlerine farklılaşabilen, çoğalma yeteneğiyle özelleşmiş farklılaşmamış hücre topluluğudur (Kolios ve Moodley, 2013).

Farklılaşma yeteneklerine göre kök hücreler beş gruba ayrılır. Bunlar; totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent kök hücreleridir. Totipotent kök hücreler, organizmadaki bütün hücrelere farklılaşma ve bölünebilme kabiliyetine sahiptir (Rajabzadeh vd., 2019; Zakrzewski vd., 2019). Zigot hücreleri, plasenta ve fetal hücrelere farklılaşabildiğinden totipotent kök hücreler olarak kabul edilirler (Larijani vd., 2012) Pluripotent kök hücreler, neredeyse tüm hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Blastosistin iç hücre kütlelerinde yer alan hücreler pluripotent hücreler olarak adlandırılır (Larijani vd., 2012). Bu hücreler, embriyonik kök hücre farklılaşmasının başlangıç döneminde mezoderm, endoderm ve ektoderm germ katmanlarından elde edilen hücreleri içerir. (Rajabzadeh vd., 2019). Multipotent kök hücreler, yakın ilişkili oldukları hücre ailesine farklılaşabilirler. Kemik iliği (Yoon vd., 2005) ve yağ doku (Zuk vd., 2002) kökenli kök hücreler buna örnektir. Oligopotent kök hücreler, kendini yenileyebilir ve 2'den fazla soy oluşturabilir (Kolios ve Moodley 2013). Bronkoalveolar kanal bağlantı hücrelerinin bronşiyolar epitel ve alveolar epitele farklılaşması örnektir (Kalra ve Tomar, 2014). Unipotent kök hücreler ise, kendini yenileyebilme özelliğine sahip olup sadece bir hücre türüne farklılaşabilir (Ilic ve Polak ,2011). Bağırsak kriptlerinde yer alan kök hücrelerin bağırsak epitel hücrelerine farklılaşması bu hücre tipi için örnek gösterilebilir (Umar, 2010).

Kök hücreler elde edildikleri kaynaklara göre embriyonik ve yetişkin kök hücreler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Embriyonik kök hücreler, endoderm, ektoderm ve mezodermden yani üç embriyonik katmandan köken alan ve bütün yetişkin hücreleri oluşturma potansiyeline sahip pluripotent kök hücrelerdir (Rippon ve Bishop 2004). Bu hücrelerin bütün yetişkin hücreleri oluşturma potansiyeli tedavi amaçlı olarak kullanılmasında umut verici gözükse de hem embriyonun yok edilmesiyle kaynaklı etik problem oluşturması (Rippon ve Bishop, 2004) hem de kanser hücrelerine dönüşme potansiyellerinden dolayı (Bieniasz vd., 2014) bu hücrelerin kullanımı ülkeler tarafından sınırlandırılmış ya da yasaklanmıştır.

Yetişkin kök hücreler, somatik hücreler ve germline hücreler olmak üzere iki gruba ayrılırlar ve somatik kök hücreler mezenkimal, hematopoietik ve organ kaynaklı hücreler olarak sınıflandırılırlar (Bongso ve Lee, 2005).

Hematopoietik kök hücre (HKH)'ler, kendini yenileme özelliğine sahip, hematopoietik bir sistemin tamamını üretebilen pluripotensi hücrelerdir. Bu hücreler, bir organizmanın hayatı boyunca sürekli olarak kan hücresi üretimini yani hematopoezisin meydana gelmesini sağlar (Fortier, 2005) ve CD34 yüzey belirtecini ifade eder (Sidney vd., 2014).

Mezenkimal kök hücre (MKH)'ler ise kolayca erişilebilmesi, izolasyonunun kolay olması, minimum kayıpla saklanabilmesi, allojenik ve otolog transplantasyonunun yapılabilmesi sebebiyle kök hücreler arasında önemli bir yere sahiptir (Parekkadan ve Milwid, 2010). Friendstein ve arkadaşları (1970) tek katmanlı kültürde kemik iliği potent hücrelerini ilk defa tanımladı. Daha sonra, Caplan (1991) kemik iliği kaynaklı stromal hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma kapasitelerini göstererek, bu hücreleri kök hücre olarak kabul etti ve MKH'ler olarak isimlendirdi.

Dominici ve arkadaşları (2016), multipotent mezenkimal stromal hücrelerini tanımlamak için 2016 yılında bir dizi kriterler yayınladı. Bu kriterler kapsamında;

1. Hücrelerin standart kültür koşullarında plastik yüzeye yapışabilmeleri,
2. Farklılaşma kümeleri (CD) 73, CD90 ve CD105 moleküllerini ifade ederken CD45, CD34, CD11b, CD14, CD19, CD79 ve HLA sınıf II moleküllerini ifade etmemeleri,
3. Bu hücrelerin en az üç yönde (osteojenik, adipojenik ve kondrojenik) farklılaşma yeteneği göstermeleri gereklidir.

MKH'ler yüzeye yapışma özelliğine sahip fibroblast benzeri ve iğ şeklindeki hücrelerdir (Koyama vd., 2011). MKH'ler kemik iliğinin yanı sıra; yağ doku (Zuk vd., 2001), amniyotik sıvı (Perin vd., 2008), diş (Gronthos vd., 2000), plasenta (Miao vd., 2006), göbek kordonu (Sarugaser vd., 2005), sinoviyal membran (De Bari vd., 2001) ve sinoviyal sıvı (Jones vd., 2004) gibi birçok dokudan elde edilebilmektedir. MKH'lerin anti enflamatuar ve immünmodülatör özelliklerinden dolayı doku iyileşmesi ve rejenerasyonunda önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca, MKH'ler çevresel sinyallere yanıt olarak hasarlı bölgelere göç eder ve parakrin faktörlerin etkisiyle doku yenilenmesini sağlayabilirler. Bu hücrelerin allojenik olarak transplantasyonu uygulandığında immün yanıtı düzenleyici yetenekleri sayesinde dokuda bağışıklık reddi oluşturmazlar (Patel vd., 2013).

MKH'ler; insan hekimliğinde otoimmün hastalıklar, Parkinson hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar, Tip I diyabet, karaciğer ve böbrek hastalıkları dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde rolü ve etkinliği araştırılmaktadır (Barky vd., 2017). Veteriner hekimlikte ise; göz hastalıkları (Villatoro vd., 2015), yara iyileşmesi (Martinello vd., 2018), solunum (Hao vd., 2018), kalp (Hensley vd., 2017), böbrek (Adin vd., 2001) ve karaciğer hastalıklarının (Matsuda vd., 2017) yanı sıra tendon ve ligament hasarları ile (Van Loon vd., 2014) menisküs (Walmsley vd., 2003) ve osteoartrit (Marinas-Pardo vd., 2018) gibi eklem hastalıklarının da tedavisinde umut vaad etmektedir.

1.1.1. Sinoviyal Sıvı Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (SSMKH)

Sinoviyal Sıvı Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (SSMKH)'ler günümüzde daha az invaziv yolla elde edilebilmesi (Zayed vd., 2018) ve elde edilirken kontaminasyon riskinin düşük olması (Murata vd., 2014) sebebiyle çalışmalarda tercih edilmektedir. SSMKH'ler; fibroblast benzeri ve mekik şekilli hücrelerdir (Koyama vd., 2011; Sekiya vd., 2012; Jia vd., 2019; Amemiya vd., 2020). Bu hücreler; osteojenik (Li vd., 2020), adipojenik (Morito vd., 2008; Li vd., 2020), kondrojenik (Jones vd., 2008) ve tenojenik farklılaşma (Murata vd., 2014) potansiyeline sahiptir.

SSMKH'lerinde; hiyaluranik asit sentezi için gerekli olan yüksek uridin difosfat glikoz dehidrogenaz enzimi bulunduğundan bu hücrelerin kondrojenik farklılaşma potansiyeli yüksektir (Prado vd., 2015). CD44 geni kondrojenik farklılaşma potansiyeli ile ilişkilidir ve SSMKH'lerde güçlü ifade olur (Amemiya vd., 2020). CD44 aynı zamanda eklem gelişimi sırasında iç bölge (interzone) ve kıkırdak yüzeyinde de ifade edilir (de Sousa vd., 2014). Yapılan çalışmalarla da SSMKH'lerinin kondrojenik farklılaşma potansiyelinin kemik iliği, sinoviyal membran ve yağ doku MKH'lerine göre daha yüksektir (Jorgenson vd., 2018).

SSMKH'lerin başta kemik iliği kök hücrelerinden köken aldığı düşünülse de ilerleyen çalışmalarda kaynağının; morfoloji, koloni oluşturma ve gen ifadelerindeki benzerliklerden dolayı sinoviyal membran kökenli olduğu anlaşıldı (Morito vd., 2008, Tang vd., 2015). Bununla birlikte, SSMKH'lerin kıkırdaktan köken alabileceği de düşünülmektedir ve bu konu ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (Morito vd., 2008).

Adipojenik ve osteojenik farklılaşma yönünden SSMKH'ler ve kemik iliği MKH'leri karşılaştırıldığında; SSMKH'lerin adipojenik farklılaşma kapasitesinin daha düşük

olduğu fakat her iki MKH tipinin osteojenik farklılaşma kapasitesinin aynı seviyelerde bulunduğu gösterilmektedir (Jones vd., 2008). Aynı zamanda, pluripotensi belirteçleri olan oktamer bağlayıcı transkripsiyon (OCT)³/₄ ve Sry-box transkripsiyon faktörü 2 (SOX2) yüzey belirteçlerinin, SSMKH'lerinde kemik iliği kaynaklı MKH'lerine oranla daha iyi ifade olmaktadır (Lee vd., 2015). Ayrıca, CD271 geni kemik iliği MKH'lerinde ifade olurken SSMKH'lerde ifade olmadığı görülmüştür (Jones vd., 2008). Bununla birlikte, SSMKH'ler incelendiğinde; CD73, CD90, CD105 ve CD44 genlerini ifade ederken, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 ve HLA-DR genlerini ifade etmedikleri bildirilmektedir (Amemiya vd., 2020).

Günümüzde, SSMKH'lerin otolog hücre olarak kullanılması, eklemin yapısında doğal olarak bulunması (Garcia vd., 2016), proliferasyon kapasitesinin yüksek olması (Lee vd., 2015) ayrıca Majör Doku Uyumluluğu Kompleksi (MDU) sınıf II antijen düzeyinin düşük olması sebebiyle (Ando vd., 2008; Shimomura vd., 2010; Neybecker vd., 2018; Li vd., 2020) kök hücre tedavilerinde iyi bir kaynak olarak kullanılmaktadır. SSMKH'ler eklemden meydana gelen hasarların tedavisinde ön plana çıkan kök hücrelerdir. Römatooid artritli farelere verilen SSMKH'lerin eklemdenki yangıyı azalttığı gözlenmektedir (Lee vd., 2015). Atlarda osteokondral hasarın tedavisinde SSMKH'lerin tedavi amaçlı kullanabileceği gösterilmektedir (Zayed vd., 2017). Yine tavşanlarda menisküs defekti modelinde SSMKH'lerin uygulanması sonrası defekt bölgesinde iyileşmeyi gösteren bulgular elde edilmiştir (Hatsushika vd., 2013).

Eklem hastalıklarının tedavisinde, SSMKH'lerin eklemden yer alan yapıların homeostazisini sağlamada önemli rolü bulunmaktadır. Tüm bu durumlar göz önüne alındığında, SSMKH'lerin invaziv olmayan yöntemlerle elde edilebilmesi araştırmacılara kolaylık sağladığı gibi tedavi sürecinin de başarıya ulaşmasına katkı sağlar.

1.2. Eklem Anatomik Yapısı

Bağ doku yapısında olan eklemler kemikleri ligamentlerle birbirine bağlar.

Eklemler üç gruptan oluşur. Bunlar;

- 1- Serbest şekilde hareket eden, eklem boşluğu ve eklem boşluğunu kaplayan sinoviyal membran ve eklem boşluğunda yer alan sinoviyal sıvıdan oluşan sinoviyal veya diartrodiyal eklemler;
- 2- Fibroz kıkırdak doku veya eklem kıkırdağı ile bağlı olan ve sınırlı harekete sahip kemiklerin yer aldığı eklem olan amfiartroz eklemler;
- 3- İki eklem arası fibröz bağ doku, kıkırdak ya da kemik dokunun bulunduğu harekete çok az izin veren ya da hiç hareket etmeyen eklem türü sinartroz eklemlerdir.

1.3. Eklem Kıkırdağının Gelişimi

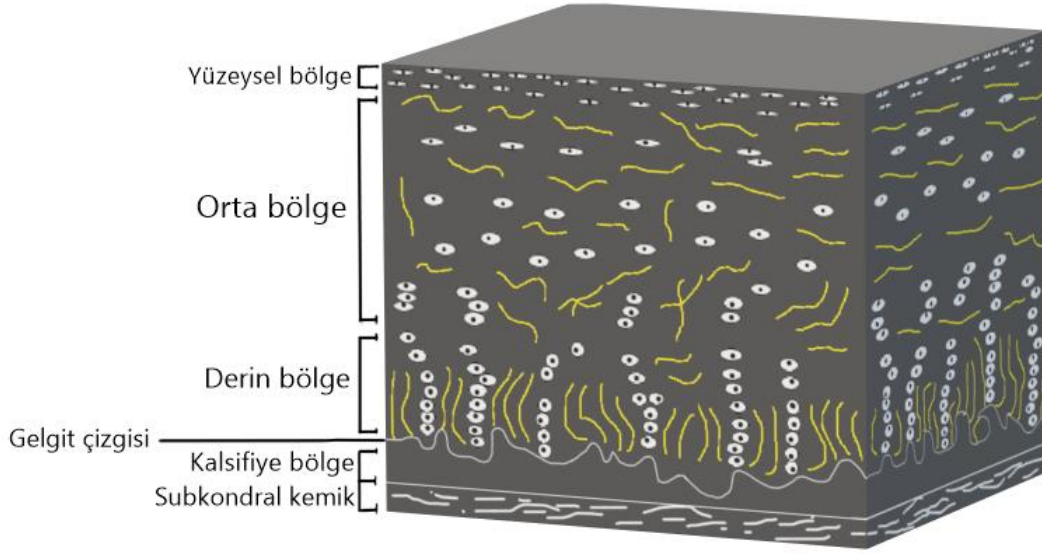
Omurgalı iskelet gelişimi, üç farklı embriyonik kaynaktan köken alarak meydana gelir. Bunlar; kraniyofasiyal kemikleri oluşturan nöral ektodermin nöral krista hücreleri, aksiyal iskeleti oluşturan paraksiyal mezoderm skleretomu ve ekstremite iskeletini oluşturan lateral plak mezodermal hücre ürünüdür (Olsen vd., 2000).

Omurlar ve kaburgalardaki kondrositler paraksiyal mezodermden gelişirken, uzun kemikler ve kondrositler, aynı zamanda hematopoietik ve kardiyovasküler soylara yol açan lateral plaka mezoderminden köken alırlar. İskelet, iskelet blastemi olarak adlandırılan ilkel, avasküler, yoğun şekilde paketlenmiş hücreli mezenşimden gelişir. Ortak öncü mezenkimal hücreler, kıkırdak merkezi, kas periferi ve kemiğin farklılaşmasını belirleyen kondrojenik, miyojenik ve osteojenik soylara bölünür. Çevre dokular, özellikle epitel doku, kıkırdak anlagenindeki mezenkimal progenitör hücrelerin kondrositlere farklılaşmasını etkiler. Kıkırdaklı nodüller blastumun ortasında belirir ve

aynı anda periferdeki hücreler perikondriyumu oluşturmak üzere düzleşir ve uzar. Vertebral kolonda, somitlerin notokord çevresindeki kısımlarından kıkırdak diskler çıkar ve perikondriyumdan nazal, auriküler kıkırdak ve embriyonik epifiz oluşur. Kıkırdak uzuvlarda, eklem kıkırdağı haline gelen bir dinlenme bölgesi olarak kalır veya kalsifiye olarak (büyüme plakası oluşumu) terminal hipertrofik farklılaşmaya uğrar ve yerini kemik doku alır (endokondral ossifikasyon) (Goldring ve Goldring, 2017).

1.4. Eklem Kıkırdağının Histolojik Yapısı

Kan damarları, sinir ve lenf damarı içermeyen eklem kıkırdağı, 4 bölgeden oluşmaktadır. Bu bölgeler; yüzeysel bölge, orta bölge, derin bölge ve kalsifiye bölgedir (Şekil 1.1). Yüzeysel bölge, eklem kıkırdak kalınlığının yaklaşık %10-20'sini oluşturur ve diğer katmanları koruyucu özelliğe sahiptir. Bu bölgede yüzeye paralel olarak seyreden kollajen fibrilleri bulunmaktadır. Yüzeysel tabakada kondrositlerin sayısı en üst düzeyde olup, şekilleri yassıdır ve derin tabakaya doğru yoğunlukları azalmaktadır. Aynı zamanda bu bölgede proteoglikan konsantrasyonu azdır ve kondrositler yüzeysel bölge proteini ile kollajen (COL) I salgılar. Orta bölge, kıkırdak hacminin %40-60'ını oluşturan en kalın bölgedir. Bu bölgede daha kalın kollajen ipliklere rastlanır ve kollajen iplikler eğik bir açıyla yer alırlar. Kondrositler yuvarlak şekilde olup sayıca daha azdır ve agrekan gibi proteoglikanları ve bol miktarda COL II 'yi ifade ederler. Derin bölge eklem kıkırdağının yaklaşık %30'unu oluşturur. Kondrositler sütunlar halinde dizilmiş olup yüzeye dik olarak seyreden kollajen fibrillere paralel olarak uzanır. Bu bölge, yüksek miktarda proteoglikan ve düşük miktarda su içerir. Derin ve kalsifiye bölgeler arasındaki bağlantı dalgalı bir gelgit çizgisi ile ayrılır. Kalsifiye bölgede kondrositler az miktarda bulunur ve hipertroftiktir. Derin bölgedeki kollajen fibriller subkondral kemiğe kalsifiye bölge aracılığıyla sabitlenir (Buckwalter vd., 2005; Sophia Fox vd., 2009).



Şekil 1.1. Eklem kıkırdağının yapısı (Elif Ece AKGÜN, 2022)

Eklem kıkırdağındaki su yaklaşık %80 ıslak ağırlığını oluştururken; COL'lar ve proteoglikanlar kuru ağırlığı oluşturur. Bununla birlikte, hücreler arası maddede; lipidler, fosfolipidler, COL olmayan proteinler ve glikoproteinler gibi makromoleküller de bulunur (Buckwalter vd., 2005, Sophia Fox vd., 2009). Kıkırdaktaki su eklem kayganlığını sağlar ve difüzyonla beslenmesine yardımcı olur (Newman 1998). COL, hücreler arası maddede en fazla miktarda bulunan yapısal makromoleküldür (Sophia Fox vd., 2009). Eklem kıkırdağında farklı tipte COL'lar bulunur ve bunların %90-95'i COL II'dir. Kıkırdakta bulunan diğer COL tipleri; COL III (yaklaşık %10), COL IX (%1), COL XI (%3) ve COL VI (<%1)'dir (Ng vd., 2017).

Eklem kıkırdağı agrekan, dekorin, biglikan ve fibromodulin gibi kıkırdağın normal fonksiyonu için gerekli olan proteoglikanlar içerir (Sophia Fox vd., 2009). Agrekan, eklem kıkırdağındaki ana proteoglikan olup, yapısında hiyaluronan ile bağlantı proteini bulundurur ve jel yapısı sayesinde kıkırdağa yük taşıma özelliğinde yardımcı olur (Kiani vd., 2002). Bu molekül eklem kıkırdağının düzgün işleyişinde önemlidir, çünkü kıkırdağa yük taşıma özellikleri kazandıran hidratlı bir jel yapısı (hyaluronan ve bağlantı proteini ile etkileşimi yoluyla) sağlar (Kiani vd., 2002).

COL ve proteoglikan olmayan proteinler olarak kıkırdak oligometrik matriks proteini (COMP), kıkırdak matriks proteini (CMP) veya matrillin-1, fibronektin gösterilebilir ve bu proteinlerin hücre-hücre ya da hücre-matriks etkileşimine katıldığı düşünülmektedir (Ng vd., 2017).

Erişkin kıkırdak hücrelerinin proliferatif etkileri az ya da hiç olmamasına karşın, kıkırdak hücreleri arası maddedeki bileşenlerin üretiminde ve eklem kıkırdağı homeostazında önemli role sahiptirler. Bu süreç kıkırdağı çevreleyen matriks içeriği, mekanik yük, hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler, yaşlanma ve yaralanmaya bağlı olarak değişir. Olgun kondrositler bol miktarda endoplazmik retikulum ve golgi kompleksi içerir. Kondrositler, perisellüler matriks (PSM) ile çevrenirler (Ulrich-Winther vd., 2003; Camarero-Espinosa vd., 2016). Kondrosit ve PSM birlikte kondronu oluşturur. PSM, kondrositlerin fenotipini ve bütünlüğünü korumada önemli bir rol oynar; kondrositin büyüme faktörleriyle biyokimyasal etkileşimlerini ve mekanik ortamını düzenler ve kondrosit mikroçevresinin korunmasını sağlar (Toh vd., 2016). Teritoriyal matriks, kondrositlerin veya kondrosit kümelerinin PSM'i ile birlikte çevreler. İnterteritoriyal matriks eklem kıkırdağının büyük bir kısmında yer alır ve yapısında kalın kollajen iplikler içerir (Buckwalter vd., 2005).

1.5. Eklem Kapsülü ve Sinoviyal Sıvı

Eklem kapsülü üç katmandan oluşur. En dışta yer alan fibröz katman, eklem için sabitlik ve esneklik sağlar. Alt katman olan subsinoviyum, damar ve sinir tellerinden zengin gevşek fibröz bağ dokusu özelliğindedir. Gevşek bağ dokuda bulunan damarlar, sinovyal sıvı haline gelen plazma ultrafiltratının kaynağıdır. En iç katman olan sinoviyal membran iki hücre tipinden meydana gelir. Bunlar Tip A ve B sinoviyositlerdir. A tipi sinoviyositler, fagositozdan sorumlu olan makrofaj benzeri hücrelerdir. B tipi sinoviyositler ise, hyaluronik asit yapımından sorumlu olan fibroblast benzeri hücrelerdir. Her iki hücre tipi de plazma proteinleri gibi büyük moleküllerin eklem sıvısına girmesini önler ve eklem kıkırdağının korunmasına katılır (MacWilliams ve

Friedrichs 2003). B tipi sinoviyositlerde yüksek üridin difosfoglikoz dehidrojenaz (UDPGD) aktivitesi ve CD55 gen ifadesi belirtilirken (Goldring ve Goldring, 2017), A tipi sinoviyositlerde makrofaj göstergesi olan CD163 ve CD68 gen ifadesi belirtilmektedir (Li vd., 2019). CD44 geni ise hyaluronik asit için birincil reseptördür. Sinovyal sıvı, hyaluronik asit ilaveli bir plazma ultrafiltratı olup viskoz yapıdadır. Bu sıvı, sinovyal membranın iç yüzeyinden salgılanır ve eklem kıkırdağının kayganlığını sağlayarak, kondrosit aktivasyonuna ve beslenmesine yardımcı olur (de Sousa vd., 2014). Sinovyal sıvı içerdiği hyaluronik asit, proteoglikan 4 (diğer adıyla lubrisin) ve yüzey aktif fosfolipidleri sayesinde kayganlığı sağlamaktadır (Schmidt vd., 2007). Sıvıda yer alan lubrisin eklem kayganlığını destekleyerek eklem yüzeyindeki proteinlerin patolojik depolanmasını azaltır (Scanzello ve Goldring, 2012). Hyaluronik asit ise eklem kıkırdağının korunmasında ve besinlerin kıkırdağa iletilmesinde önemli role sahiptir (Tamer, 2013).

Çekirdekli hücreler olan nötrofil, lenfosit, monosit ve makrofajlar da sinovyal sıvı içerisinde yer alır (MacWilliams ve Friedrichs, 2003).

1.6. Kondrojenезisin Hücresel ve Moleküler Mekanizması

Kondrojenезis süreci, MKH'lerin göçü, çoğalması ve yoğunlaşması ile başlar. Yoğunlaşma sırasında mezenkimal hücreler, kalsiyum bağımlı transmembran adezyon proteini nöral kaderin (N-CAD) (DeLise ve Tuan, 2002) ve nöral hücre yapışma molekülü (N-CAM) (Hall ve Miyake, 2000) gibi hücre yapışma moleküllerini ifade eder. N-CAD kıkırdak öncesi mezenkimal hücre yoğunlaşması esnasında hücre-hücre temasında rol alır. (Oberlender ve Tuan, 1994). Bu moleküllerin her ikisi de yoğunlaşan mezenkimal hücrelerde ifade olur, daha sonra farklılaşan kıkırdakta kaybolur ve sonrasında sadece perikondriumda görülebilir (DeLise vd., 2000).

MKH'ler bir araya gelip yoğunlaşmaya ve farklılaşmaya başladıkça COL tip I'in yerini COL tip II olarak hücreler arası madde üretimi hızla değişir. Tenaskin ve kondroitin sülfattan zengin agrekan gibi sülfatlanmış proteoglikanların üretiminde de artış meydana gelir (von der Mark vd., 1976; Doege vd., 1991). İntegrin aracılı sinyalleşme, kondrojenik farklılaşma sırasında kondrositik fenotipin oluşumunda ve korunmasında çok önemli bir rol oynar. Özellikle, fibronektin, vitronektin, osteopontin ve COL'lar için reseptörler, kıkırdağa özgü hücreler arası madde oluşumunda yer alabilir (Ghosh vd., 2009).

COL I, III ve V' i ifade eden mezenkimal hücrelerin bir araya gelerek yoğunlaşması ve kıkırdağa özgü COL II, IX ve XI ifade eden kondroprogenitör hücrelere farklılaşması sonucu kondrogenezis şekillenir (Goldring, 2012).

Hücre-hücre etkileşimi, kondrogenezisin yoğunlaşma aşamasında ayrılmaz bir rol oynarken, büyüme faktörleri [Dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β)'lar, Fibroblast büyüme faktörü (FGF)'ler] ve bunların efektörleri (SMAD'lar, MAPK'ler) kondrojenik aktivitenin devamını sağlamada önemli role sahiptirler (DeLise vd., 2000). TGF- β , embriyonik kondrogenezisin farklı aşamalarında gereklidir ve yaygın olarak MKH'lerin kondrojenik farklılaşması için kullanılır (Goldring vd., 2006). FGF sinyali embriyonik kıkırdak gelişimi için önemlidir. FGF-2, MKH'lerin çoğalması ve kondrojenik potansiyelini iyileştirmek için kullanılır (Solchaga vd., 2010). Kanonik ve kanonik olmayan wingless-tip (WNT) sinyal yolağı, farklı WNT'ler aracılığıyla kondrosit büyümesini ve metabolizmasını düzenler. Kanonik WNT sinyal yolağının en önemli bileşeni olan β -katenin sinyali, mezenkimal progenitör hücrelerin farklılaşmasını kontrol edebilir (Chen vd., 2021). Aynı zamanda WNT/ β -katenin sinyali, tip X kollajen alfa 1 (COL10A1) gen ifadesini artırarak kondrosit hipertrofisine aracılık edebilir (Dong vd., 2006).

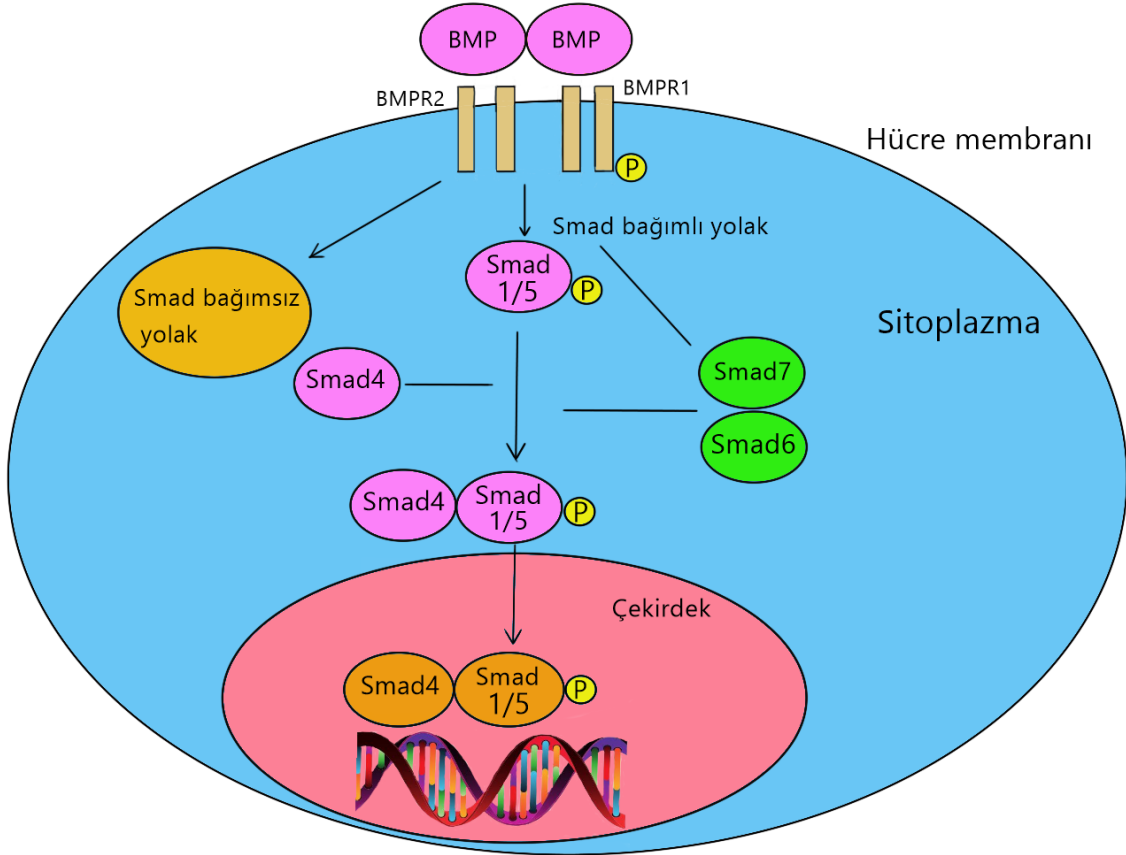
SRY-Box Transkripsiyon Faktör 9 (SOX9) proteini, COL II ile birlikte bütün kondrojenik öncü hücrelerde ve kondrositlerde ifade olur (Zhao vd., 1997). Kondrojenik farklılaşması sırasında COL9A1, agrekan, bağlantı proteini ve COL2A1'in ifadesi için SOX5 ve SOX6'da gereklidir (Dy vd., 2010). TGF- β , BMP'ler ve/veya hedgehog sinyali, kondrojenik farklılaşmanın ilk aşamalarında SOX9 ifadesini artırır (Song ve Park, 2020). SOX9, kondrosit hipertrofisini birkaç yolla baskılayabilir. Runt-ilişkili transkripsiyon faktör-2 (RUNX-2)'nin aktivasyonunu bloke edebilir; SOX9'un, kondrosit hipertrofisini desteklediği bilinen WNT sinyalini inhibe etmek için β -katenin ile etkileşime girebilir ya da COL10A1 ve veziküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi hipertrofik kondrositlerde bulunan genlerin ifadelerini doğrudan baskılayabilir (Li ve Dong, 2016).

TGF- β süper ailesi, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz gibi hücrel süreçler için çeşitli büyüme faktörlerini kapsar (Heldin vd., 1997; Shi ve Massagué, 2003) ve memelilerde; aktivin ve inhibitörler, nodal, miyostatin, kemik morfogenetik protein (BMP), büyüme/farklılaşma faktör (BFF)'leri ve anti-Müllerian hormon gibi çeşitli proteinleri içerir (Miyazawa vd., 2002).

TGF- β , hücre yüzey membranlarında TGF- β tip II reseptörü (TGF β R-II) ile bir ligand-reseptör kompleksi oluşturarak TGF- β tip I reseptörünü (TGF β R-I) aktive eder. Aktive edilmiş TGF β R-I, hücre içi SMAD 2 ve SMAD 3'ü fosforile eder ve daha sonra heteromerik bir kompleks oluşturmak üzere ortak aracı SMAD'a yani SMAD 4'e bağlanır (Massagué ve Wotton 2000; Miyazawa vd., 2002). Bu kompleks çekirdeğe girerek hedef genlerin promotörlerine bağlanarak onların transkripsiyonunu kontrol eder (Massagué vd., 2005). SMAD 2 ve SMAD 3 yolakları kondrogenesis için gereklidir ve hipertrofiyi engelleyerek kondrogenesisin yapısını korur (Ferguson vd., 2000; Song vd., 2009).

TGF- β sinyalinin aktivasyonunda, WNT proteini ve reseptörünün ifadesinin artmasının yanı sıra β -katenin agregasyonu eşlik eder. TGF- β ve WNT sinyal yolunun etkileşimi kondrosit farklılaşmasını uyarır (Chen vd., 2021). TGF- β aynı zamanda SMAD bağımsız olarak, mitojen aktivite protein kinaz (MAPK) alt üyeleri olan p38, hücre dışı sinyal ayarlı kinaz 1/2 (ERK 1/2) ve C-JunNH2-terminal kinaz (JNK)'ı aktive ederek MKH'lerin kondrojenesisini başlatır ve sürdürülmesini sağlar (Cleary vd., 2015).

BMP'ler, çeşitli hücreler tarafından salgılanan moleküllerdir ve TGF- β süper ailesinin üyeleridir. BMP'ler, iskelet oluşumu ve hematopoietik ve epitel hücre farklılaşması gibi embriyonik gelişimin çeşitli yönleri dahil olmak üzere kemik ve kıkırdak oluşumunda önemli rol oynarlar (Deng vd., 2018). BMP süper ailesi üyeleri, hidrofobik sinyal dizilimi ile daha büyük öncüler olarak sentezlenir ve kanonik 7-sisteinlere sahiptirler. Bunlardan her bir sistein, her dimer için moleküller arası bir disülfid bağlantısında yer alır (Reddi, 2003). BMP'ler, en az iki tip I ve iki tip II reseptör (BMPRI ve BMPRII) içeren transmembran reseptör serin kinazların heteromerik kompleksi aracılığıyla sinyal verir. Bir dizi BMP ligandı, BMP tip I reseptör (BMPRI)'lerine veya aktivin benzeri kinaz (ALK) 2, 3 veya 6'ya bağlanır (Brazil vd., 2015). Ligand bağlanması üzerine, reseptörler oligomerize olur ve BMPRII, BMPRI'yi aktive eder. Aktive edilmiş BMPRI/BMPRII kompleksi, reseptör SMAD'ları (SMAD 1,5,8) olarak adlandırılan bir dizi SMAD proteinini aktive eder (Goumans ve Mummery, 2000). Bu reseptör SMAD'lar daha sonra ortak aracı SMAD olan SMAD 4'e bağlanır ve hedef genlerin BMP'ye bağlı gen transkripsiyonuna aracılık etmek için çekirdekte birikir. I-SMAD'lar; R-SMAD'ların ve ortak aracı SMAD'ların işlevini zayıflatmak için antagonistik sinyaller olarak hareket eder (Cheng vd., 2016).



Şekil 1.2. BMP-9 sinyal yolğunın şematik gösterimi (Elif Ece AKGÜN, 2022)

SMAD bağımsız sinyal yolağında ise BMP'ler, p38/mitojen aktive edilmiş kinaz (MAPK) sinyal yolağının RUNX-2 tarafından aktive edilerek MKH'lerin kondrositlere farklılaşmasını sağlar (Wu vd., 2016). BMP sinyalinin önlenmesi kıkırdak oluşumunu baskılar (Kawakami vd., 1996).

BMP-2, BMP-3, BMP-4 ve BMP-7'nin kıkırdak homeostazının korunmasında kritik roller oynadığı bilinmektedir. BMP-2, BMP-4 ve BMP-7, SOX9 ifadesini düzenleyerek kondrojenik farklılaşmayı indükleyebilir ve RUNX-2'nin transkripsiyonunu düzenleyerek endokondral kemikleşmeyi uyarabilir (Chen vd., 2021). Kondrositlerin hipertrofinde rolü olan RUNX-2, prehipertrofik kondrositlerde ve perikondriumda ifade edilirken geç hipertrofik kondrositlerde daha az ifade edilir (Goldring ve Goldring, 2017).

BMP-9, SMAD1/5 (Şekil 1.2) veya SMAD'dan bağımsız sinyalleşmeyi indüklemek için tip II reseptör olan aktivin tip 2 reseptör A (ACVR2A) / aktivin tip 2 reseptör B (ACVR2B) ve kemik morfojenetik protein reseptörü II (BMPRII) ve tip I reseptör olan ALK1 ve/veya ALK2 aracılığıyla sinyal verir (Thielen vd., 2019). BMP-9'un hem kondrogenezisi artırdığı (Majumdar vd., 2001; Cheng vd., 2016) hem de hipertrofiye (Luu vd., 2007) yol açtığı bilinmektedir. BMP-9 sığır primer kondrositlerinde hipertrofiyi artırır ancak SMAD2/3 yolu üzerinden etki eden TGFβ1 ile bu hipertrofi önlenir (van Caam vd., 2015).

1.7. Ko-kültür

Ko-kültür sistemi, farklı ortamlarda yer alan iki hücre tipinin birbirleriyle olan ilişkilerinin belirlenmesi ve in vitro ortamda bunların hastalık ve sağlık durumlarını taklit ederek araştırıldığı kültür ortamıdır. İn vitro ko-kültür teknikleri, in vivo ortamları taklit etmek ve oktrin ile parakrin etkileşimleri gözlemlemek için kullanılmaktadır (Dodson vd., 1997).

Ko-kültür sistemleri, ilaçların etki mekanizmalarını ve potansiyel hedeflerini araştırmak için kullanılabilir; böylelikle tek tabakalı kültür yöntemlerinin ve hayvan modelleme çalışmalarının beraber yürütülmesine öncülük eder. Bu sistemler, indirekt yöntemler ve direkt yöntemler olmak üzere iki ana gruba ayrılır. İndirekt yöntemlerde hücreler, yalnızca salgı faktörleri aracılığıyla iletişime izin veren transwell kültür ve/veya kültür kapları kullanılarak uygulanır. Direkt ko-kültür yönteminde ise hücreler arasında doğrudan etkileşim söz konusudur (Venter ve Niesler, 2018).

Ko-kültür yönteminde kondrojenik farklılaşma çalışmaları da oldukça yaygındır. MKH'ler ve kondrositlerin bulunduğu direkt ko-kültür modelleriyle yapılan çalışmalar pelet ve aljinat kültür ağırlıklıdır ve birçok çalışma kemik iliği MKH'lerine dayanmaktadır (Mo vd., 2009; Giovannini vd., 2010; Wang vd., 2013). Bununla beraber, adipojenik MKH'ler (Hildner vd., 2009; Lv vd., 2012) ve sinoviyal membran kökenli MKH'lerde (Varshney vd., 2010) ko-kültür çalışmalarında kullanılmaktadır.

Ko-kültür sisteminde kondrositten salgılanan faktörler parakrin, jukstrakrin ve gap junction sinyal yolları aracılığıyla MKH'leri etkileyebilir (Hwang vd., 2007; Chen vd., 2009a). Ko-kültürde, kondrositlerden salgılanan paratiroid hormonu ile ilişkili protein (PTHrP)'in MKH'lerin kondrojenik farklılaşmasında hipertrofiyi engellediğinin gösterilmesi buna örnektir (Fischer vd., 2010).

Sağlıklı kıkırdak dokusu kullanılarak yapılan ko-kültür çalışmaları ile birlikte hastalıklı kıkırdak dokularıyla da çalışmalar devam etmektedir. MKH'ler ve kondrositler birlikte kültürlendiğinde, hücre-hücre etkileşiminin artmasıyla beraber kıkırdak onarımını olumlu yönde etkilediği gösterilmektedir (Leijten vd., 2013; Hubka vd., 2014). Aung ve arkadaşları (2011) büyüme faktörleri eklenmemiş kültür ortamında osteoartritlik kondrositlerin MKH'leri etkili bir şekilde uyardığını belirlediler. MKH'lerin kondrosit proliferasyonuna olan etkisinin olumlu yönde olduğu ifade edilirken (Wu vd., 2011; Acharya vd., 2012) kondrositlerin de MKH'lerin kondrojenik farklılaşmasını artırıcı etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Hwang vd., 2011; Zhang vd., 2016).

Ko-kültür sistemi kondrojenik farklılaşmayı her zaman olumlu yönde etkilemeyebilir. Sinoviyal membran kökenli MKH'ler ile kondrositlerin yer aldığı aljinat kültürde, farklılaşmayla beraber COLII gen ifadesi ve glikozaminoglikan miktarında artış tespit edilirken (Varshney vd., 2010), başka bir çalışmada ise pelet kültürde yer alan sinoviyal membran MKH'lerin ve kondrositlerin kıkırdak farklılaşmasında COLII ve ACAN gen ifadelerinde azalma gözlenmiştir (Wu vd., 2012).

1.7.1. Transwell Ko-kültür

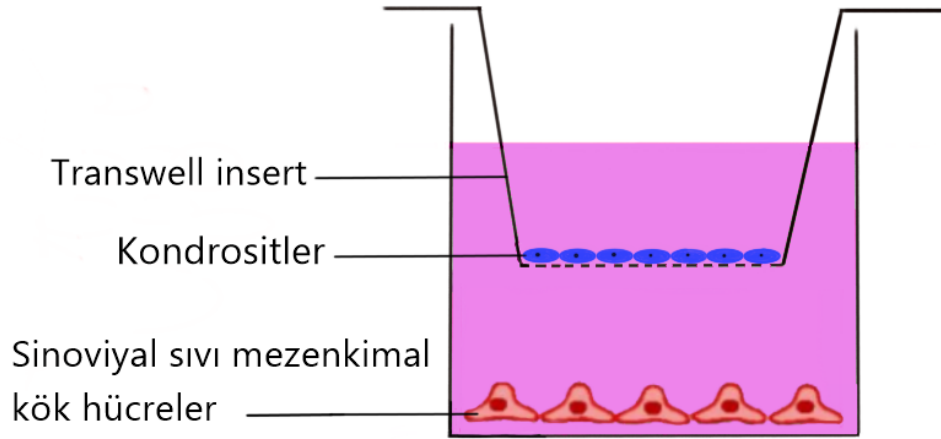
İndirekt ko-kültür modelinde, bir transwell kültür kullanarak farklı hücre tipleri fiziksel olarak incelenebilir (Grellier vd., 2009). İnsertlerde yer alan hücre popülasyonlarıyla, hücre-hücre temasının yokluğunda parakrin sinyaller aracılığıyla hücrel değişiklikleri takip etmek ve değerlendirmek mümkündür. Bu ko-kültür sistemiyle; iki hücre arasındaki sinyalleşme ve hücrel değişikliklerin tespitinin yapılabilmesi sebebiyle diğer ko-kültür yöntemlerine kıyasla daha fazla önem arz etmektedir (Renaud ve Martinoli 2016).

Transwell ko-kültür sisteminde de diğer ko-kültürler sistemlerinde olduğu gibi kondrojenik farklılaşma çalışmaları yürütülmektedir. Bu çalışmaların bir kısmı sadece transwell kültürde yer alan kök hücreler ve kondrositlerden meydana gelirken (Ahmed vd., 2007; Aung vd., 2011), bir kısmı ise transwell kültür ile koşullandırılmış medyum (Lee vd., 2012), aljinat (Xu vd., 2013) veya pelet kültür (Acharya vd., 2012) gibi diğer kültür sistemlerinin biraraya gelmesiyle oluşturulur.

Transwell kültürler arasında diğer ko-kültür sistemlerinde olduğu gibi kondrojenik farklılaşma açısından farklılıklar vardır. Murdoch ve arkadaşları (2007) transwell kültür sisteminin diğer ko-kültür yöntemlerine göre kondrojenik farklılaşmayı indüklemek için daha verimli bir sistem olduğunu belirtti. Kemik iliği MKH'leri ve kondrositler transwell kültürde bir araya getirildi ve COL2A1, ACAN ile SOX-9 kırkıdak genlerinin ifadelerindeki artış gösterilerek, farklılaşmanın ilk 7 günü boyunca hücrelerin hızlı çoğaldığı ve hücre dışı matris üretiminin arttığı ifade edildi. Kubosch ve arkadaşları ise (2016) sinoviyal membran MKH'leri ile kondrositleri kültürde bir araya getirdi ve kırkıdakların TGF- β salgısından dolayı sinoviyal membran MKH'lerinde meydana gelen kondrojenik farklılaşmayı artırdığını gösterdi. Diğer bir çalışmada ise, Ahmed ve arkadaşları (2007), transwell kültür sisteminde yer alan MKH'ler ve kondrositler TGF- β 3 eklenmiş kondrojenik farklılaşma medyumuyla kültürlendiğinde, kırkıdağ hipertrofiyi baskılayıcı etkisinden dolayı COL10A1 gen ifadesinde azalma tespit ettiler.

Yapılan bir çalışmada eklem kondrositleri ile büyüme plağı kondrositleri transwell kültürde bir araya getirildi. İnserte yer alan eklem kondrositlerinin TGF- β salgısı ile büyüme plağı kondrositlerinde meydana gelmiş olan matriks kalsifikasyonunu önlediği gösterildi (Jikko vd., 1999). Ayrıca, eklem kondrositlerinin salgıladığı parakrin faktörlerin MKH'ler de kondrogenезi indüklediği ve ko-kültürdeki MKH'lerin hipertrofisini önlediği belirtildi (Bian vd., 2011).

Bu çalışmaların aksine, transwell kültürde bir araya getirilen kondrositler ve MKH'lerin kondrojenik farklılaşmayı azalttığı da öne sürülmüştür (Lee vd., 2012; Xu vd., 2013). Çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasında farklılıklar ve çelişkiler bulunmaktadır. Ko-kültür sistemlerinde kondrojenik farklılaşma mekanizmasının iyi bir şekilde anlaşılabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda yer alan hücrelerin transwell kültürdeki yerleşimi Şekil 1.3'te gösterilmektedir.



Şekil 1.3. Transwell ko-kültürde yer alan SSMKH'ler ve kondrositler (Elif Ece AKGÜN, 2022)

1.8. Problemin İfadesi

Osteoartrit (OA), kıkırdak doku hasarı ile karakterize edilen en yaygın eklem hastalıklarından biridir. Bu hastalığın dünyada, 25 yaş ve üstü bireylerin %13,9'unu ve 65 yaş üstü bireylerin %33,6'sını etkilediği saptanmıştır (Nurul vd., 2021). Osteoartrit tedavilerinde, ilaçlarla ağrının giderilmesi ve hyaluronik asit enjeksiyonlarının yapılması gibi geleneksel tedavi yöntemleri uygulansa da kalıcı olarak iyileşme mümkün olmamaktadır (Kristjánsson ve Honsawek, 2014). OA tedavisinde aynı zamanda, otolog kıkırdak implantasyonu uygulamasıyla iyi sonuçlar elde edilmiş fakat kıkırdak dokusunun geç çoğalması ve uygulanan kıkırdağın dedifferensiyasyon olması gibi donörde hasara sebep olabilecek birtakım sorunları beraberinde getirmiştir (Harrell vd., 2019).

MKH'lerin farklılaşma kapasitesine sahip olmaları ve immünomodülatör özelliklerinden dolayı OA tedavilerinde geniş kapsamlı olarak araştırılmaktadır (Kong vd., 2017). Kemik iliği, sinoviyal sıvı, yağ doku gibi farklı dokulardan elde edilen MKH'ler osteoartrit tedavilerde umut ışığı olmaktadır (Cui vd., 2016; Zayed vd., 2017; Zhu vd., 2021). SSMKH'lerin, kondrojenik farklılaşma kapasitelerinin yüksek olması ve dokuya zarar vermeden kolaylıkla elde edilebilmesi sebebiyle (Chang vd., 2013) SSMKH'ler, tendon ve ligament hasarı (Van Loon vd., 2014), osteoartrit (Marinas-Pardo vd., 2018) ve romatoid artrit (Sarsenova vd., 2021) tedavilerinde tercih edilmektedir. Bununla birlikte, MKH'lerin kondrojenik farklılaşmasında ekzojen olarak TGF- β , BMP gibi büyüme faktörlerinin ilave edilmesi farklılaşma potansiyelinin artırılması açısından önemlidir (Kovermann vd., 2019). Transwell kültürde yer alan SSMKH'ler ve kondrositler doğal eklem yapısını taklit etmektedir (Kubosch vd., 2016). Kondrositlerin SSMKH'ler üzerinde kondrojenik farklılaşmayı artırıcı salgı maddelerinin yanısıra transwell kültüre eklenen TGF- β 3 ve BMP-9'un birlikte veya tek olarak kullanılmasının farklılaşmayı ne kadar tetiklediğini tespit etmek önemlidir. Bu sayede en uygun protokolün bulunması ve maddelerin farklılaşmadaki moleküler mekanizmasının tespiti ilerde yapılan çalışmalarda kolaylık sağlayacaktır.

1.9. Hipotez, Amaç ve Hedefler

Hipotez 1: SSMKH'ler kondrositlerle birlikte transwell kültürde kültüre edildiğinde kondrositlerin yaptığı salgılar SSMKH'lerin kondrojenik farklılaşmasını tetikler.

Hipotez 2: Transwell kültürde kondrojenik farklılaşma medyumuna ilave edilen TGF- β 3 ve/veya BMP-9 büyüme faktörleri kondrojenik farklılaşmayı artırır.

Amaç

Çalışmamızda SSMKH'ler ve kondrositlerin birlikte transwell kültür sisteminde kültüre edilmesinin ve bu kültür sistemine ilave edilen TGF- β 3 ve/veya BMP-9 büyüme faktörlerinin kondrojenik farklılaşmaya olan etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Hedef 1: SSMKH'leri izole etmek, MKH karakterlerini ve farklılaşma potansiyellerini göstermek

Hedef 2: Eklem kırırdağından kondrositleri izole etmek ve kültür ortamında çoğaltmak.

Hedef 3: Transwell kültürde SSMKH'leri ve kondrositleri birlikte transwell kültür sisteminde kültürlemek ve bu transwell kültür sistemine TGF- β 3 ve/veya BMP-9 ilave edilmiş ya da edilmemiş kondrojenik farklılaşma medyumuyla bu SSMKH'leri kültüre ederek kırırdağ hücrelerine farklılaştırmak.

Hedef 4: Transwell kültürde büyüme faktörlerinin ilave edildiği ya da edilmediği kondrojenik farklılaşma medyumuyla kültüre edilen grupların farklılaşma potansiyellerinin real-time PCR yöntemi, immunfloresan ve histolojik boyamalarla değerlendirilmesi.

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 30/04/2019 tarihinde onaylandı (AKÜHADYEK- 46-19).

2.2. Cihazlar ve Kimyasallar

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

Çizelge 2. 1. Kullanılan cihazlar

Cihaz	Üretici	Model/Katalog No
Buzdolabı	İndesit	
Buzdolabı	Uğur	
Çalkalamalı su banyosu	Nüve	ST 30
Çalkalayıcı	Biosan	MR-12
Derin dondurucu	Arçelik	
Derin dondurucu	Vestel	
Eksi seksen derin dondurucu	Panasonic	VIP Plus
Elektroforez jel sistemi	Thermo Scientific	Minicell Primo EC320
ELISA okuyucu	Thermo Scientific	Multiskan GO
Etüv	Nüve	EN 500
Floresan ataçmanlı ters mikroskop	Zeiss	Axio Observer Z1
Güç kaynağı	Thermo Scientific	400 P
Hassas terazi	Precisa	XB 220 A
Hücre dondurma konteynırı	Nalgene	5100-001
Jel görüntüleme sistemi	BioVision	Trans Illuminator 1000/20M
Karbondioksitli inkübatör	HeraCell	150i
Karbondioksitli inkübatör	Thermo Scientific	Forma Direct Heat
Kimyasal madde kabini	Detalab	
Kuru blok ısıtıcı	Biosan	TDB-100
Manyetik karıştırıcı	Biosan	MSH 300

Mikro santrifüj cihazı	Biosan	Combi Spin FVL-2400N
Mikro santrifüj cihazı	Thermo Scientific	MicroCL 17-R
Mikroskop kamerası	Olympus	DP25
Mikroskop kamerası	Zeiss	Axiocam 506 mono
Mini buzdolabı	Beko	
Nano drop plate	Thermo Scientific	N12391
Neubauer hemositometir lamı	İsolab	075.03.001
Otoklav	Nüve	OT 012
pH metre	Inolab	WTW pH720
Qubit florometri cihazı	In Vitrogen	Qubit 2.0
Real-Time PCR cihazı	Applied Biosystems	ViiA7
Santrifüj cihazı	Nüve	NF 800 R
Santrifüj cihazı	Thermo Scientific	IEC Micromax RF
Santrifüj cihazı	Thermo Scientific	SL 16R
Sınıf I biyogüvenlik kabini	Teknomar	Chemocell LRCX-UV
Sınıf II biyogüvenlik kabini	Thermo Scientific	MSC-Advantage
Sıvı azot tankı	Worthington	UN 1977
Ters faz kontrast mikroskop	Nikon	Eclipse TS100

Çizelge 2. 2. Kullanılan sarf malzeme ve kimyasallar

Ürün	Üretici	Katalog Numarası
0,1-10 ul pipet ucu	VWR	53509-070
0,2 mL santrifüj tüpü	Isolab	123.01.002
0,22 um filtre	Merck	MilliEx SLGP033RS
0,5 mL santrifüj tüpü	Isolab	3.078.03.001.500
1-200 ul pipet ucu	VWR	89041-376
1,5 mL koyu santrifüj tüpü	VWR	20170-063
1,5 mL santrifüj tüpü	Axygen	MCT-150-C
10 mL enjektör	Beybi	2.409.001
10 mL serolojik pipet	Corning	CLS4488-200EA
100-1250 ul pipet ucu	VWR	89041-370
15 mL steril santrifüj tüpü	VWR	525-0604
25 mL serolojik pipet	Corning	CLS4489-200EA
2 mL santrifüj tüpü	Eppendorf	Qiagen 1050299
4 kuyucuklu plaka	Thermo Scientific	Nunclon Delta 176740
5 mL serolojik pipet	Corning	CLS4487-200EA
6 kuyucuklu plaka	VWR	10861-554
50 mL steril santrifüj tüpü	VWR	525-0610
Absolut etanol	Merck	1.009.832.511
Alfa MEM	Lonza	BE02-02F
Alizarin Red S	Merck	A5533-25G

Alsiyan mavisi 8GX	Alfa Aesar	J60122
Amfoterisin-B (100X)	Biowest	L0009-100
Anti-COLII primer antikor	Abcam	ab185430
Asetik asit	TEKKİM	TK.010030.01000
Beta gliserofosfat	Sigma	G9422-10G
BMP-9	Peptotech	120-07-10UG
DAPI'li floresan kapatma medyumu	Abcam	ab104139
Deksametazon	Sigma	D4902-100MG
Di sodyum hidrojen fosfat dihidrat	Merck	1.065.801.000
Dimetil sülfoksit	Sigma	02650-100ML
DMEM-HG toz	Sigma	D5648-10L
DMEM-LG toz	Sigma	D5523-1L
Doku kültür kabı	VWR	7342321
FBS	Biowest	S181H-500
Goat anti-mouse Alexa Fluor sekonder antikor	Abcam	Ab150117
HBSS toz	Sigma	H2387-1L
IBMX	Gibco	PHZ1124
ITS-X	Gibco	51500-056
İndometasin	Sigma	I7378-5G
İnsülin	Sigma	I0516-5MG
İzopropil alkol	TEKKİM	TK.090250.02501
Keçi serumu	Abcam	ab7481
L-Askorbik asit	Sigma	A4403-100MG
L-Glutamin (200mM)	Gibco	25030-024
Non-esansiyel amino asit	Lonza	BE13-114E
Oil Red O	Merck	639K4517396
Paraformaldehit	Merck	1.040.051.000
Penisilin-streptomisin	Gibco	15140-122
Proline	Sigma	P5607-100G
Real-Time PCR Plate	VWR	83009-668
Sığır serum albumini	Santa Cruz	Sc-2323
Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	Merck	1.063.451.000
Sodyum hidrojen karbonat	VWR	27778-293
Sodyum hidroksit	Emboy	
Sodyum klorit	Merck	1.064.041.000
T25 hücre kültür kabı	VWR	10062-872
T75 hücre kültür kabı	VWR	10062-860
TAE buffer	Merck	1.060.231.000
Teksoll %96 alkol	TEKKİM	TK.200650.25001
TGF-β3	Peptotech	100-36E-10UG
Transwell insert	Millipore	MCHT06H48

Tripan mavisi	Sigma	T6146-25G
Tripsin-EDTA (10X)	Capricorn	TRY-1B10
Triton X-100	Biomatik	A4025-500ML
Tween-20	Sigma	P1379-500ML

2.3. SSMKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü

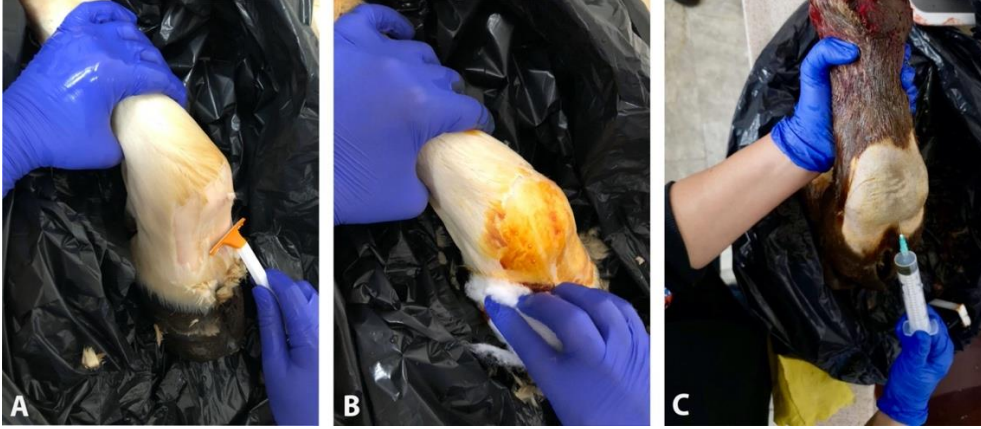
Mezbahada, kesilen sığırların metatarsofalangeal eklemi 1 saat içerisinde laboratuvarımıza getirildi. Laboratuvarımızda sığırın arka bacakları yıkandıktan sonra sinoviyal sıvının alınacağı bölge tıraş edildi ve povidon iyot ile bu bölge temizlenerek sterilizasyonu sağlandı. 21 gauge steril iğne ucu takılı 10 mL'lik enjektör ile metatarsofalangeal eklem içerisinde sinoviyal sıvı toplandı. Eklem büyüklüğüne bağlı olarak her bir eklem boşluğundan yaklaşık 3-6 mL sıvı elde edildi (Resim 2.1). Enjektör içerisindeki sinoviyal sıvı, sınıf II biyogüvenlik kabini içerisinde 50 mL' lik steril santrifüj tüpüne aktarıldı. Santrifüj tüpü içerisine, sinoviyal sıvı miktarının 1:2 oranında SSMKH kültür medyumu eklendi ve 300 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra SSMKH kültür medyumu ile hücre peleti süspanse edildi ve hücrelerin T 25 flasklara ekimi yapıldı.

Hücreler %5 CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörde inkübe edildi. Yaklaşık olarak 7-9 gün sonra hücrelerin %70-80 konfluense ulaştığı gözlemlendi ve hücreler pasajlandı.

SSMKH Kültür Medyumu

Yüksek Glikoz-Dulbecco'nun Modifiye Minimum

Esansiyel Medyumu (HG-DMEM)	38,95 mL
Fötal Sığır Serum (FBS) (%20)	10 mL
Antibiyotik (Penisilin-Streptomisin) (%1)	0,5 mL
Amfoterisin B (%0.1)	50 µL
L-Glutamin (%1)	0,5 mL



Resim 2. 1. Sinoviyal sıvının toplanması. **A.** Eklem bölgesinin tıraş edilmesi **B.** Bölgenin povidon iyot ile temizlenmesi **C.** Sinoviyal sıvının enjektör ile toplanması

T25 flaskta %70-80 konfluense ulaşılmış hücrelerin pasajlanması için; medyum flasktan uzaklaştırıldı ve hücreler steril fosfatlı tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Flask içerisine, 3mL Tripsin-EDTA (%0,05) solüsyonu eklenerek flaskın yüzeyine tutunmuş olan hücreler yüzeyden kaldırıldı. Tripsin-EDTA enzim aktivasyonu 3 mL %10 FBS içeren kültür medyumunu eklenerek durduruldu ve hücre süspansiyonu 15 mL' lik santrifüj tüpüne aktarıldı. 250 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 1mL'lik hücre kültür medyumuyla süspanse edildi. Süspansiyondan 30 µl alınarak 1 mL'lik ependorf tüpüne alındı ve üzerine aynı miktarda tripan mavisi solüsyonu eklendi. Karışımdan 10 µl alınarak Neubauer lamı üzerinde hücre sayımı gerçekleştirildi. Hücre sayısına bağlı olarak T 25 ya da T 75 flasklara hücrelerin ekimi yapıldı. Hücreler beşinci pasaja kadar çoğaltıldı.

2.4. Farklılaşma Çalışmaları

2.4.1. Osteojenik Farklılaşma ve Alizarin Red S Boyaması

2.4.1.1. Osteojenik Farklılaşma

Üçüncü pasajda SSMKH'ler 4 kuyucuklu plakalara 9×10^3 hücre/cm² yoğunlukta ekildi. Osteojenik farklılaşma medyumunu olarak %5 FBS, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin, 0,1 µM dekzametazon, 50 µM L-askorbik asit, 10 nM β-gliserofosfat içeren alfa minimum esansiyel medyum (α-MEM) kullanıldı. Negatif kontrol olarak; plakada bir kuyucuğa %5 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren α-MEM ilave edildi. 3 günde 1 medyum değişikliği yapıldı. Yirmi bir gün boyunca hücreler osteojenik farklılaştırma medyumunu içerisinde inkübe edildi (Pittenger vd., 1999).

2.4.1.2. Alizarin Red S Boyaması

Sinoviyal kökenli kök hücrelerin ostoesitlere farklılaştıklarını göstermek için, kuyucuklardaki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler Hank'in tamponlu tuz solüsyonu (HBSS) ile yıkandı ve %4 paraformaldehit ile tespit edildi. Distile su ile kuyucuklar yıkandı. 50 mL ultra saf distile su içerisinde çözdürülen ve 1 N NaOH ile pH'sı 4,2'ye ayarlanan Alizarin Red S boya solüsyonu ile hücreler 30 dk boyandı. Boya solüsyonu uzaklaştırıldı ve hücreler distile su ile yıkandı. Nikon ters faz kontrast mikroskop altında osteojenik hücre farklılaşması değerlendirildi ve Olympus DP25 mikroskop kamerası ile fotoğraflandı (Pittenger vd., 1999).

2.4.2. Adipojenik Farklılaştırma ve Boyaması

2.4.2.1. Adipojenik Farklılaşma

3. pasajda SSMKH'ler 4 kuyucuklu plakalara 9×10^3 hücre/cm² yoğunlukta olacak şekilde ekildi. Adipojenik farklılaşma için hücreler; 7 ve 15. günlerde adipojenik idame medyumunu (AMM) diğer günler ise adipojenik indüksiyon medyumunu (AIM); kullanılarak 21 gün süre ile kültüre edildi. Negatif kontrol için plakada bir kuyucuğa %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren düşük glikoz- Dulbecco'nun modifiye

minimum esansiyel medyumu (LG-DMEM) medyumu koyuldu. Medyum 3 günde 1 değiştirildi (Pittenger vd., 1999).

AIM

LG-DMEM	44,13 mL
%10 FBS	5 mL
%1 penisilin-streptomisin	0,5 mL
Amfoterisin-B (%0,1)	50 µL
1 µM Dekzametazon,	196 µL
500 µM İzobütil 4 hidroksibenzoat (IBMX)	50 µL
100 µM indometasin	25 µL
10 µg/mL insülin	50 µL

AMM

LG-DMEM	43,4 mL
%10 FBS	5 mL
%1 penisilin-streptomisin	0,5 mL
Amfoterisin-B (%0,1)	50 µL
10 µg/mL insülin	50 µL

2.4.2.2. Oil Red O Boyaması

Sinoviyal kökenli kök hücrelerin adipositlere farklılaştıklarını göstermek için, hücre kültür medyumu kuyucuklardan uzaklaştırıldıktan sonra hücreler PBS ile ve ardından %70'lik etanol ile yıkandı. %10 tamponlu nötral formaldehit ile hücreler 20 dk tespit edildi. Tespit solüsyonu uzaklaştırıldı. PBS ile ve ardından %70 etanol ile hücreler yıkandı. Her bir kuyucuğa 12 mM'lık stok solüsyon olarak hazırlanan ve 2/3 oranında ultra saf su ile seyreltilen Oil Red O boyama solüsyonu eklendi ve hücreler 25 dk

boyandı. Boya solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra hücreler önce %70'lik etanol ile ardından ultra saf distile su ile yıkandı. Hücrelerdeki boyanma Nikon ters faz kontrast mikroskop altında değerlendirildi ve Olympus DP25 mikroskop kamerası ile fotoğraflandı (Pittenger vd., 1999).

2.5. Real-Time PCR

Çalışmada Real-Time PCR ile MKH belirteçleri olan CD44, CD73, CD90, CD105 genlerinin ve hematopoietik belirteçler olan CD45 ve CD34 genlerinin ifadeleri 0. ve 3. pasajlarda SSMKH'ler de gösterildi. Kontrol geni olarak gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı. 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 Çizelge 2.3'te verildi.

Çizelge 2. 3. SSMKH'lerin karakterizasyonunda kullanılan primerler ve özellikleri

Gen	İleri (5'→3')	Geri (5'→3')	T _m (°C)
CD44	CAGCTGAGCCTGGCGCAGA TCGA	GCCCTTCTATGAACCCGTACC TGC	60
CD73	GGAAAYCCCATTCTTCTCA ACAGC	AATCAGRTTGCCCATGTTGCA	58
CD90	TGAACCCTACCATCGGCAT CG	CCCACTTCTTTGTGTCACGGG TC	60
CD105	GGGGATGTGTCAAGGCTGG AGC	ACCAGTTTGGAGTCGTAGGCC A	60
CD34	TTGCACTGGTCACCTCRGG GA	ATAGCCCTGGCCTCCACCGTT CTC	60
CD45	TAAAYGGAGATGCAGGRTC AA	TCCACAACAGACACGTTGGG A	58
GAPDH	TGGGCAAGGTCATCCCTGA GC	TCCACAACAGACACGTTGGG A	60

2.5.1. RNA İzolasyonu İçin Hücrelerin Toplanması ve Saklanması

Sıfırıncı ve üçüncü pasajda SSMKH'ler %70-80 konfluense ulaştıktan sonra flasklardan medyum uzaklaştırıldı. Flasklar steril PBS ile yıkandıktan sonra tripsin EDTA solüsyonu eklendi. Hücreler yüzeyden kalktığında aynı miktarda %10 FBS içeren medyum flaska eklendi ve santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 1 mL hücre kültür medyumunu eklenerek pelet süspanse edildi. Hücre süspanسیونu 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve mikro santrifüj cihazında 300 g'de 7 dk santrifüj edildi. Santrifüj edilen örneklerin süpernatantı tamamen uzaklaştırıldı ve santrifüj tüpü -80°C'de saklandı.

2.5.2. RNA İzolasyonu

SSKMH'lerden total RNA, RNA izolasyon kiti (TRIzol Reagent, Thermo 15596026) talimatlarına uyularak elde edildi.

-80°C'de saklanan örneklere 200 µl PBS eklendi. Daha sonra tüplerin üzerine 1000 µl Lizis Buffer eklendi. Pipetasyon yapıldıktan sonra 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüplere 200 µl kloroform: izoamil alkol etanol karışımı (49:1) eklendi ve iyice pipetaj yapıldı. İki dk inkübasyona bırakıldıktan sonra +4°C'de 12000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüjü takiben 2 faz halinde ve ortada beyaz katman içeren yapı elde edildi. Üstte RNA içeren kısım yeni santrifüj tüpüne aktarıldı. Elde edilen miktarın 1,25 katı kadar etanol eklendi ve pipetasyon yapılarak karıştırıldı. Kolon tüplerine 700 µl lizattan eklendi ve tüp, 12000 g'de 20 saniye santrifüj edildi. Kolon tüpünün altında kalan sıvı uzaklaştırıldı ve kolon tüpü tekrar santrifüj tüpüne yerleştirildi. Kalan lizat kolon tüpü üzerine aktarılarak işlemler tekrarlandı. Kolona 700 µl yıkama solüsyonu 1 eklendi ve 12000 g'de 20 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında kolon tüpte kalan sıvı uzaklaştırıldı. Kolona 600 µl yıkama solüsyonu 2 eklendi ve 12000 g'de 20 saniye santrifüj edildi. Tüpün dip kısmında kalan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra bu işlem bir kere

daha tekrarlandı. Kolon tüpün dip kısmındaki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra 17000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Tüpün alt kısmı atılarak başka bir santrifüj tüpüne yerleştirildi ve kolon filtresine 30 µl dietil pirokarbonatlı su eklendi. Santrifüj tüpleri 12000 g 1 dk santrifüj edildi ve santrifüj sonrası kolon atılarak tüplerin kapakları kapatıldı. Örneklerin her birinden 5 µl alınarak µDrop Plaka aracılığıyla DNA kontaminasyonu ve kimyasal kirliliği tespit edildi. Ayrıca total RNA miktarı belirlendi. Örnekler daha sonra komplement DNA sentezinde kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

2.5.3. Komplement DNA (cDNA) Sentezi

cDNA sentezinin ilk aşamasına başlamadan önce örnekler eşit miktarda RNA içermesini sağlayabilmek için sulandırılarak eşit hacime getirildi. Örneklerdeki DNA kontaminasyonunu önlemek için DNaz I ile örnekler muamele edildi.

Komplement DNA sentezi için A.B.T. cDNA sentez kitindeki talimatlar uygulandı. Çizelge 2.4.'deki kimyasallar kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan karışım 25 °C'de 10 dk, 37 °C'de 120 dk, 85 °C'de 5 dk inkübe edildi ve bir sonraki aşama için kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

Çizelge 2. 4. cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar ve miktarları

Kimyasallar	Miktar
10X reaksiyon tamponu	2 µL
Random heksamer (50 µm)	2 µL
dNTP karışımı (2,5 mM herbiri)	1 µL
Reverse transkriptaz (200 U/µl)	1 µL
RNAz inhibitörü	0,5 µL
RNAz içermeyen su	3,5 µL
1 µg RNA	10 µL

Toplam hacim**20 μ L**

2.5.4. Real-Time PCR Analizi

Real-time PCR analizi için 2X qPCR SYBR-Green Master Mix Rox kiti kullanıldı. Çizelge 2.5.'deki reaksiyon karışımı hazırlandı ve 96 kuyucuklu PCR plakalarının her bir kuyucuğuna 8,5 μ L olarak dağıtıldı. Karışımın üzerine her bir örneğin cDNA'sından 1,5 μ L eklendi ve plakaların üzeri optik geçirgen bir bant ile kapatıldı. Plakalar 2000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Karanlık ortamda real-time PCR cihazında analizler gerçekleştirildi. Her örnek için 2 tekrar uygulandı.

Çizelge 2. 5. Real-Time PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Kimyasallar	Miktar
2X qPCR Green Master Mix Karışım	5 μ L
İleri Primer	0,3 μ L
Geri Primer	0,3 μ L
Su	2,9 μ L
Toplam hacim	8,5 μL

Real-Time PCR aşamaları ayrılma, bağlanma ve uzama olmak üzere 3 aşamada ve 40 döngüde yapıldı ve olası DNA kontaminasyonu veya primer dimerleşmesi tespit edilmek üzere erime eğrisi analizi de gerçekleştirildi (Çizelge 2.6).

Çizelge 2. 6. Real-Time PCR analiz aşamaları

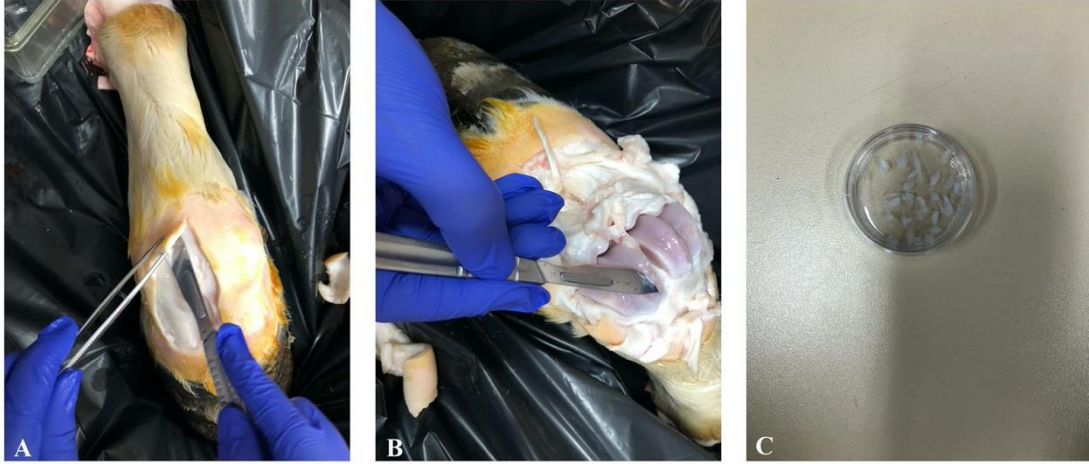
Döngü Sayısı	Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre
1	Düzenleme Aşaması	60	1 dk
		95	15 dk
40	PCR Aşaması	95	20 sn
		60*	30 sn
		72	45 sn
1	Erime Eğrisi	95	15 sn
		60	1 dk
		95	15 sn

*: SSMKH'lerin karakterizasyonu çalışmasında 60 °C, kondrojenik farklılaşmanın değerlendirilmesinde ise farklı genlere göre farklı sıcaklık belirlenmiş olup Çizelge 2.9'da gösterilmiştir.

2.6. Sığır Eklem Kıkırdığından Kondrositlerin İzolasyonu ve Kültürü

Mezbahadan laboratuvarımıza getirilen sığır arka ayakları yıkandıktan sonra metatarsofalangeal eklem bölgesi tıraşlandı ve povidon iyot ile bu bölgenin sterilizasyonu sağlandı. Metatarsofalangeal eklem açılarak bistüri yardımıyla kıkırdak dokusu eklem yüzeyinden alındı. Alınan doku %2 antibiyotik içeren PBS solüsyonu ile petri kabı içerisinde yıkandı ve sınıf II biyogüvenlik kabinine getirildi. Kıkırdak parçaları %0,05 tripsin içerisinde 37 °C'de 30 dk boyunca bekletildi. PBS ile yıkama aşamasından sonra %0,3'lük tip IA kollajenaz enzim solüsyonunda 37 °C'de 30 dk boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra PBS eklendi ve 250 g'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Doku parçaları yumuşadıktan sonra %0,06'luk tip IA kollajenaz enzim solüsyonuna konuldu ve bir gece 37 °C'de %5 CO²'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyonu takiben, serbest kalan hücreleri içeren enzim solüsyonu 70 µM'lik süzgeç

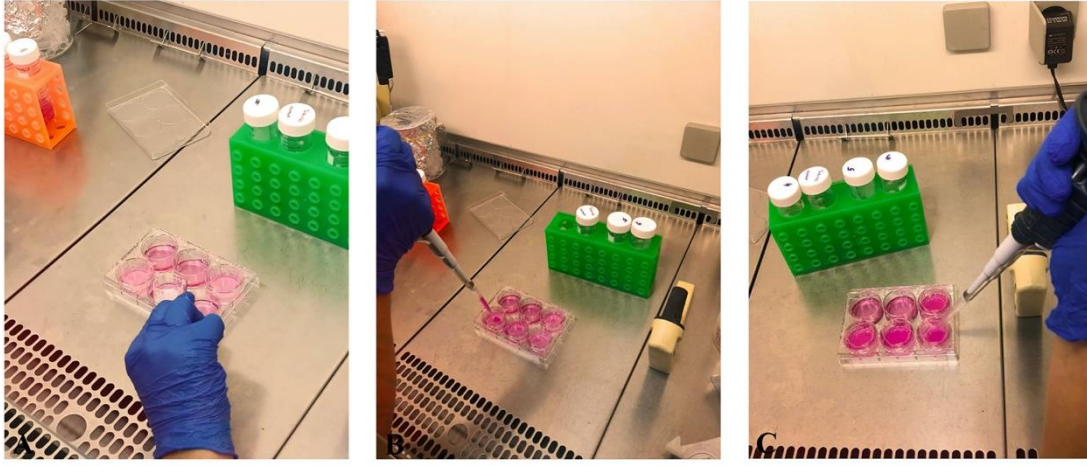
filtreden geçirildi ve 400 g'de 10 dk santrifüj edildi (Bernstein vd., 2009). Hücre peleti 1 mL medyum ile süspansiyon edildi ve hücrelerin T 25 flaska ekimi yapıldı. Hücreler %70-80 konfluense ulaştığında pasajlandı.



Resim 2. 2 Sığır metatarsofalangeal ekleminden kıkırdak dokunun alınması. **A.** Bistüri yardımıyla derinin uzaklaştırılması **B.** Kıkırdağın bistüri yardımıyla alınması **C.** Antibiyotikli PBS içerisinde kıkırdak dokusunun yıkanması

2.7. Transwell Kültürde Kondrojenik Farklılaşma Çalışması

Beşinci pasajda SSMKH'ler, 6 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna cm^2 'ye 15000 hücre konsantrasyonunda olacak şekilde ekildi. P0'da pasajlanarak toplanan kondrositler cm^2 'ye 15000 hücre konsantrasyonunda olacak şekilde Çizelge 2.7'de yer alan deney gruplarına göre transwell insertlerin üzerine ekildi, SSMKH'ler ise kuyucukların tabanında yer aldı. Deney gruplarında farklı büyüme faktörleri içeren kondrojenik farklılaşma medyumları kullanıldı. Kontrol gruplarında ise hücre kültür medyumları olarak %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %0,1 amfoterisin-b içeren HG-DMEM kullanıldı. Bu gruplar 2.7.1'de gösterildi. Farklılaşma ve kültür medyumları 21 gün boyunca uygulandı. Medyumlar 3 günde bir değiştirildi. Kondrojenik farklılaşma protokolü Mackay ve arkadaşlarının (1998) metodunun modifiye edilmesi ile uygulandı.



Resim 2. 3. Transwell Kültürde kondrojenik farklılaşma. **A.** Transwell insertlerin altı kuyucuklu plakaya yerleştirilmesi **B.** Kıkırdakların Transwell insert üzerine ekiminin yapılması **C.** Gruplara göre medyumların kuyucuklara ilave edilmesi

Çizelge 2.7. Deney gruplarının belirlenmesi

Deney Grupları

1.Grup: Negatif Kontrol	Sinoviyal sıvı kökenli MKH'ler hücre kültür medyumunda kültür edildi.
2. Grup	Sinoviyal sıvı kökenli MKH'ler 10 ng/mL TGF- β 3 içeren kondrojenik farklılaşma medyumunda kültür edildi.
3. Grup	Transwell kültürde sinoviyal sıvı kökenli MKH'ler ve kondrositler, hücre kültür medyumunda kültür edildi.
4. Grup	Transwell kültürde sinoviyal sıvı kökenli MKH'ler ve kondrositler, 10 ng/mL TGF- β 3 içeren kondrojenik farklılaşma medyumunda kültür edildi.
5. Grup	Transwell kültürde sinoviyal sıvı kökenli MKH'ler ve kondrositler, 10 ng/mL BMP-9 içeren kondrojenik farklılaşma medyumunda kültür edildi.
6.Grup	Transwell kültürde sinoviyal sıvı kökenli MKH'ler ve kondrositler, 10 ng/mL TGF- β 3 ve 10 ng/mL BMP-9 içeren kondrojenik farklılaşma medyumunda kültür edildi.

2.7.1. Kondrojenik Farklılaşma Medyumları

TGF- β 3 İçeren Kondrojenik Farklılaşma Medyumu

HG-DMEM	45,57 mL
FBS (% 2,5)	2,5 mL
Non-esansiyel amino asit (NEM) (% 1)	0,5 mL
Sodyum pirüvat (% 1)	0,5 mL
Amfoterisin-B (% 0,1)	50 μ L
Penisillin-streptomisin (% 1)	0,5 mL
ITS premix (6,25 μ g/ mL)	62,5 μ L (5 μ g/ μ L)
L-Proline (40 μ M)	20 μ L (100 mM)
L-Askorbik asit (50 μ M)	56 μ L (44,7 mM)
Dekzametazon (0,1 μ M)	196 μ L (0,0255 mM)
TGF- β 3 (10 ng/ mL)	20 μ L (25 μ g/ μ L)

BMP-9 İçeren Kondrojenik Farklılaşma Medyumu

HG-DMEM	45,57 mL
FBS (% 2,5)	2,5 mL
Non-esansiyel amino asit (NEM) (% 1)	0,5 mL
Sodyum pirüvat (%1)	0,5 mL
Amfoterisin-B (% 0,1)	50 μ L
Penisillin-streptomisin (%1)	0,5 mL
ITS premix (6,25 μ g/ mL)	62,5 μ L (5 μ g/ μ L)
L-Proline (40 μ M)	20 μ L (100 mM)
L-Askorbik asit (50 μ M)	56 μ L (44,7 mM)
Dekzametazon (0,1 μ M)	196 μ L (0,0255 mM)
BMP-9 (10 ng/ mL)	20 μ L (25 μ g/ μ L)

TGF- β 3 ve BMP-9 İçeren Kondrojenik Farklılaşma Medyumu

HG-DMEM	45,37 mL
FBS (%2,5)	2,5 mL
Non-esansiyel amino asit (NEM) (%1)	0,5 mL
Sodyum pirüvat (%1)	0.5 mL
Amfoterisin-B (%0,1)	50 μ L
Penisillin-streptomisin (%1)	0,5 mL
ITS premix (6,25 μ g/ mL)	62,5 μ L (5 μ g/ μ L)
L-Proline (40 μ M)	20 μ L (100 mM)
L-Askorbik asit (50 μ M)	56 μ L (44,7 mM)
Dekzametazon (0,1 μ M)	196 μ L (0,0255 mM)
TGF- β 3 (10 ng/ mL)	20 μ L (25 μ g/ μ L)
BMP-9 (10 ng/ mL)	20 μ L (25 μ g/ μ L)

2.7.2. Kondrojenik Farklılaşmanın Alsiyan Mavisi Boyama, İmmunfloresan Boyama ve Real-Time PCR ile Gösterilmesi

2.7.2.1. Alsiyan Mavisi Boyama Yöntemi

Yirmi bir gün boyunca kondrojenik farklılaşma medyumu ile inkübe edilen hücrelerin bulunduğu kuyucuklardan medyum uzaklaştırıldı ve hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Hücreler %4'lük paraformaldehit ile tespit edildi. Tespit edilen hücreler 3 defa 5'er dk PBS ve ardından musluk suyu ile yıkandı. Hücreler %1'lik Alsiyan Mavisi ile 15-20 dk boyandı. Boya kalıntısını uzaklaştırmak için hücreler önce PBS ve sonra musluk suyu ile yıkandı. Hücrelerin çekirdekleri Harris Hematoksileni ile 1 dk boyandı ve musluk suyu ile yıkandı. Hücrelerde kondrojenik farklılaşma Nikon ters faz kontrast mikroskop altında değerlendirildi ve Olympus DP25 mikroskop kamerası ile fotoğraflandı.

%1 Alsiyan Mavisi Solüsyonu Hazırlanması

Alsiyan mavisi	1 gr
Distile su	97 mL
Glasiyal asetik asit	3 mL

Alsiyan mavisi distile su içerisinde çözdürüldükten sonra asit ilave edilerek karıştırıldı. Boya solüsyonunun pH'sı 2,5'e ayarlandı ve filtre edilerek kullanıldı.

2.7.2.2. İmmunfloresan Boyama

Yirmi bir gün boyunca kondrojenik farklılaşma medyumuyla kültür edilen hücrelerde, COL II proteinin ifadesi immunfloresan boyama yöntemi ile gösterildi. Kuyucuklardan medyum uzaklaştırıldıktan sonra hücreler Tween 20 içeren PBS (PBST) yıkama solüsyonu ile yıkandı. Ardından hücreler %4 Paraformaldehit ile 30 dk tespit edildi. Üç kere 5 dk PBST ile yıkandı. %0,1'lik Triton-X solüsyonu ile inkübe edildi. Hücreler %10' luk keçi serumu ile 30 dk blokladı. Bloklamanın ardından kuyucuklardan sıvı çekilerek Anti-COL II primer antikor solüsyonu eklendi. Negatif kontrol için bloklama solüsyonu kullanıldı. Plakalar nem kabini içine koyularak +4°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün plaka nem kabini içerisinden çıkarıldı ve oda sıcaklığında bekletildi. PBST ile 3 kere 5 dk yıkandı ve karanlık ortamda plakanın tüm kuyucuklarına sekonder antikor ilave edilerek hücreler 1 saat süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Antikor uzaklaştırıldıktan sonra karanlık ortamda PBST ile 3 kere 5 dk yıkandı. Son olarak tüm kuyucuklara DAPI floresan kapatma medyumu damlatıldı ve 1 dk beklendi. Tüm kuyucuklar Zeiss Axio Z1 floresan ataçmanlı ters mikroskopta incelendi ve Zen 2 yazılımı kullanılarak fotoğraflandı. Çalışmada kullanılan primer ve sekonder antikor konsantrasyonları Çizelge 2.8'de gösterildi.

Çizelge 2. 8. İmmunfloresan boyamada kullanılan antikorlar

Primer Antikor	Üretici-Kat No.	Dilüsyon	Sekonder Antikor	Üretici-Kat No.	Dilüsyon	DAPI Üretici-Kat No.
Anti-COL II	Abcam	1/100	Goat Anti Mouse	Abcam	1/300	Abcam
	ab185430		Alexa Fluor 488	ab150117		ab104139

2.7.2.3. Real-Time PCR

Kondrojenik farklılaşma medyumuyla 21 gün boyunca kültür edilen hücreler toplandı ve Çizelge 2.9’da yer alan primerler kullanılarak real-time PCR analizi yapıldı. Real-time PCR analizi bölüm 2.5.’te anlatıldığı şekilde yapıldı. Kondrojenik farklılaşma sonrasında tüm gruplarda COL2A1, SOX9, ACAN ve COL10A1 gen ifadelerinin negatif kontrol grubuna göre kat değişimleri belirlendi.

Çizelge 2. 9. Kondrojenik farklılaşma medyumunu uygulanan gruplarda kullanılan Real-Time PCR genleri, primer sekansları ve Tm değerleri.

Gen	İleri (5’→3’)	Geri (5’→3’)	Tm (°C)
COL II	TTGGTGGAAACTTTGCTGC CCA	GGACCAGAAACACCGGGTT CAC	56
ACAN	GTGGTAAAAGGCATCGTG TTCC	TGGGATACCTCACAGTCTG ATCG	64
SOX9	AGCTCTGGAGACTGCTGA ACG	CTTGAAGATGGCGTTGGGC GA	64
COL10A1	TGCCACAAACAGCACTTTT GC	CCTCTCAGTGATACACCTTT ACC	56
GAPDH	TGGGCAAGGTCATCCCTG AGC	TCCACAACAGACACGTTGG GA	60

2.8. İstatistik

SSMKH'lerin karakterizasyonunu göstermek amacıyla 0. ve 3. pasajda elde edilen gen ifadesi kat değişimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) değerleri SPSS 22.0 programı kullanılarak analizi gerçekleştirildi. Aynı zamanda, kondrojenik farklılaşma gruplarında gen ifadesi kat değişimlerine göre aynı program kullanılarak analizler yapıldı.

Verilen normal dağılıp dağılmadığını göstermek amacıyla Shapiro-Wilk testi yapıldı. Denede grupları arasında ortalamalar karşılaştırılırken, normal dağılım gösteren veri grupları için Student's t-test, normal dağılım göstermeyen veri grupları içinse Kruskal-Wallis testleri kullanıldı. Post-hoc karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testi için Bonferroni düzeltmesi uygulandı. Grafikler, Graphpad 6.01 kullanılarak oluşturuldu.

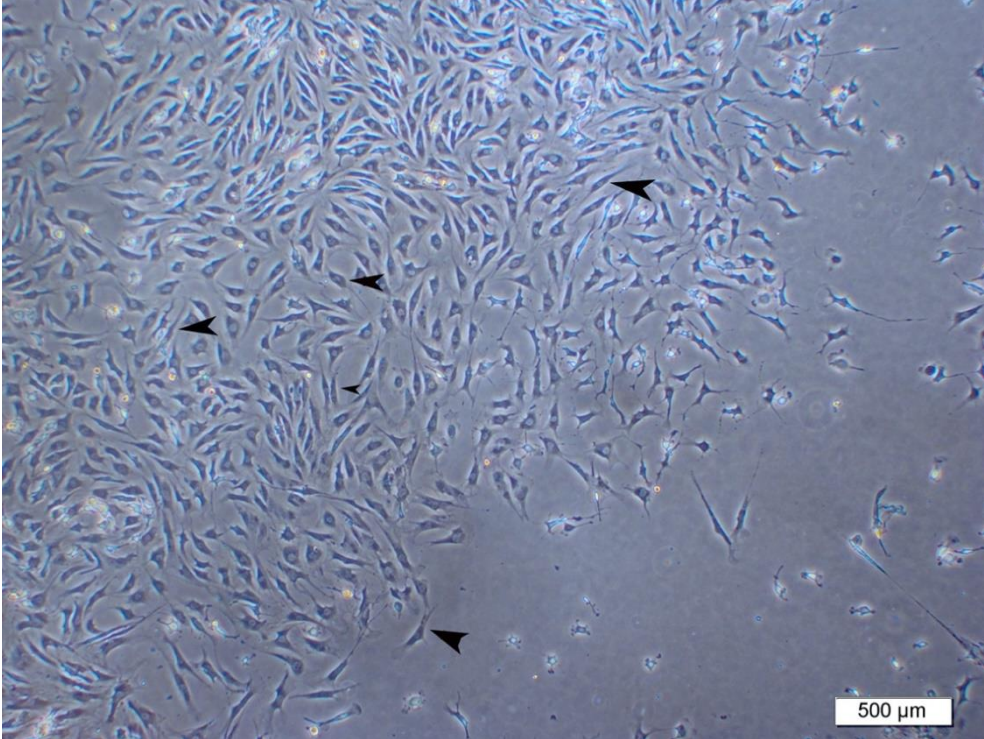
3. BULGULAR

3.1. SSMKH'lerin Karakterlerinin Belirlenmesi

SSMKH'lerin karakterizasyonu hücrelerin morfolojik özelliklerine; adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma potansiyellerine ile mezenkimal ve hemapoiyetik kök hücre belirteçlerini gen düzeylerinde ifade etmelerine göre değerlendirildi.

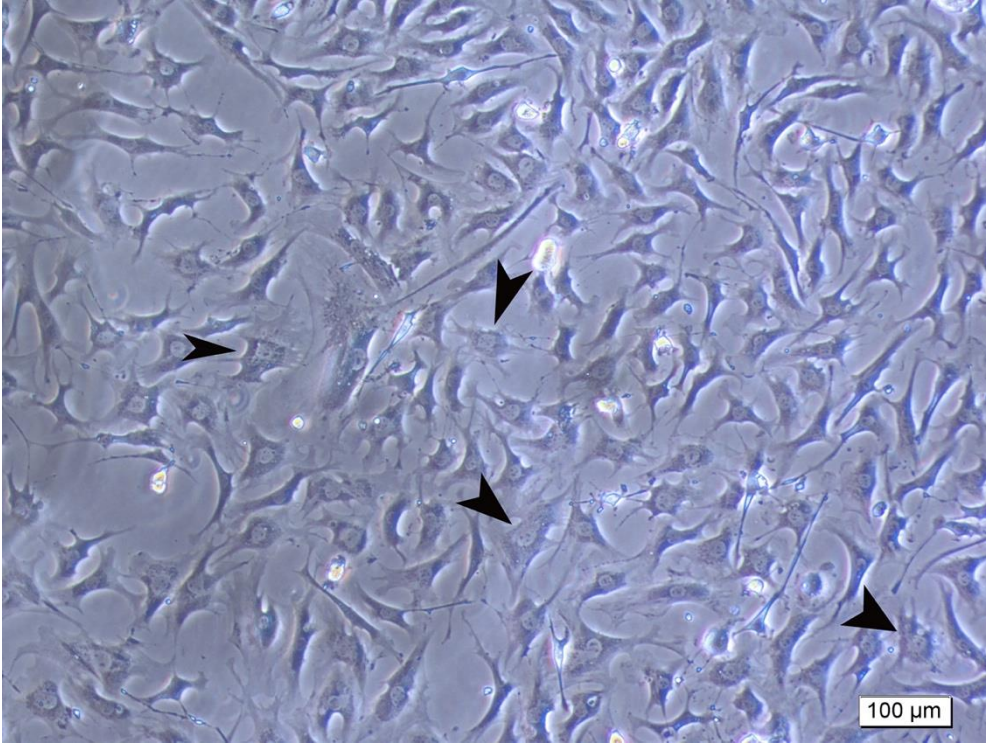
3.1.1. SSMKH'lerin Morfolojisi

Sinoviyal sıvıdan izole edilen hücreler flaska ekildikten 4 gün sonra hücre nişlerinin şekillenmeye başladığı görüldü. Yaklaşık 7 gün sonra ise hücre nişlerinin flask yüzeyini doldurarak %70-80 konfluense ulaştığı gözlemlendi. P0'da hücre nişlerindeki hücrelerin iki farklı morfolojik yapıya sahip olduğu tespit edildi. Mezenkimal hücrelerin mekik şekilli fibroblast benzeri bir morfolojiye sahip oldukları (Resim 3.1) gözlenirken daha iri ve



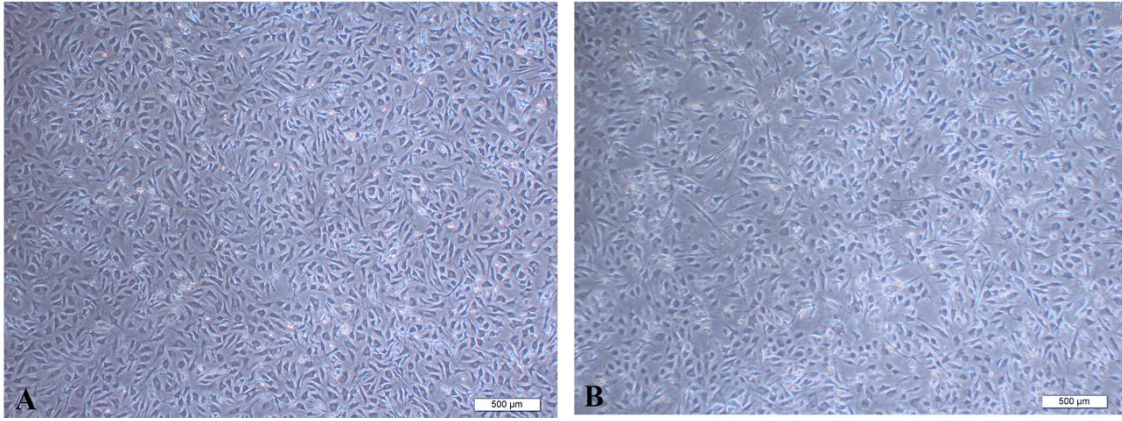
geniş,
yıldız
veya
piramit
şekilli
hücreleri
n de
bulunduğ
u (Resim
3.2)
görüldü.

Resim 3. 1. P0'da fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücreler. (Oklar). Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 500 μm

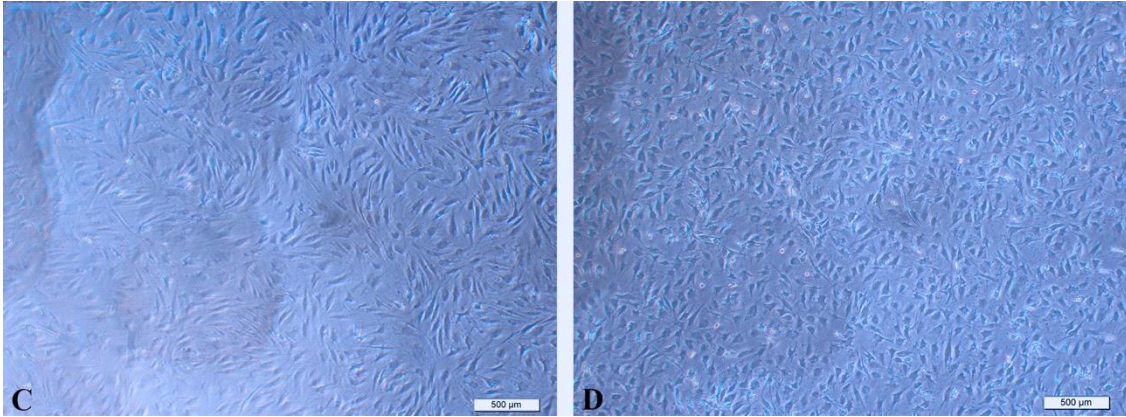


Resim 3. 2. P0'da iri ve geniş piramit şekilli hücreler. (Oklar). Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 100 μm

P1'den itibaren hücrelerin kısa sürede yüzeye tutundukları ve yaklaşık 2-3 günde konfluense ulaştıkları tespit edildi. Bununla birlikte ilerleyen pasajlarda fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin oranının arttığı görüldü. P3, P4, P5 ve P6'da da hücrelerin fibroblast benzeri morfolojilerini korudukları belirlendi (Resim 3.3, 3.4).



Resim 3. 3. Farklı pasajlarda fibroblast benzeri morfolojiye sahip SSMKH'ler. **A.**P3'de SSMKH'ler **B.** P4'te SSMKH'ler Ters faz kontrast mikroskop. Bar:500 µm



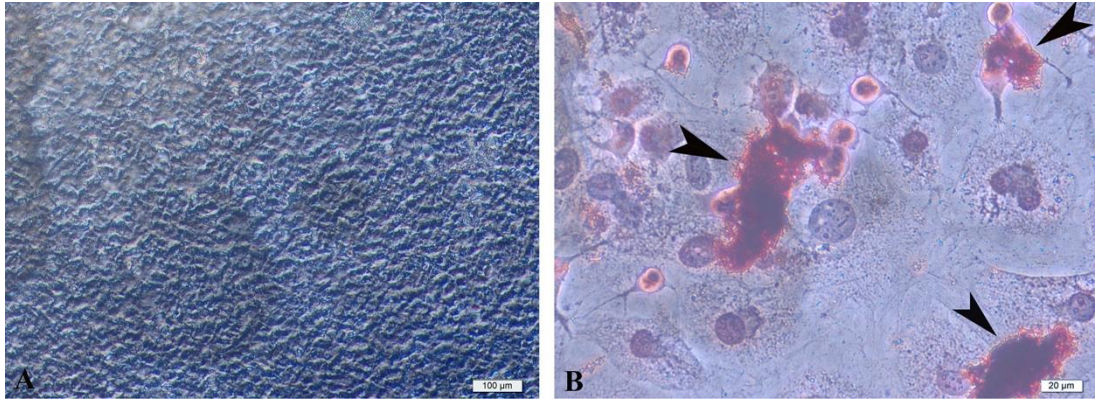
Resim 3. 4. Farklı pasajlarda fibroblast benzeri morfolojiye sahip SSMKH'ler. **C.**P5'te SSMKH'ler **D.** P6'da SSMKH'ler Ters faz kontrast mikroskop. Bar:500 µm

3.1.2. Farklılaştırma Çalışmaları

SSMKH'ler 3. pasaja ulaştıktan sonra adipojenik, osteojenik yönde farklılaştırıldı. Kondrojenik farklılaşma sonuçları ise 3.3'de gösterildi.

3.1.2.1. Adipojenik Farklılaşma

SSMKH'ler P3'te 4 kuyucuklu plakalara ekildi ve 21 gün boyunca adipojenik farklılaşma medyumu ile kültürlenerek yağ hücrelerine farklılaştırıldı. Oil Red O boyama yöntemi ile farklılaştırılan hücrelerin sitoplazmaları içerisindeki lipid damlacıklarının kırmızı renkte boyandığı gözlemlendi (Resim 3.4, B). Hücre kültürü medyumu ile kültürlenmiş negatif kontrol grubundaki hücrelerde ise boyanma gözlemlenmedi (Resim 3.4, A).

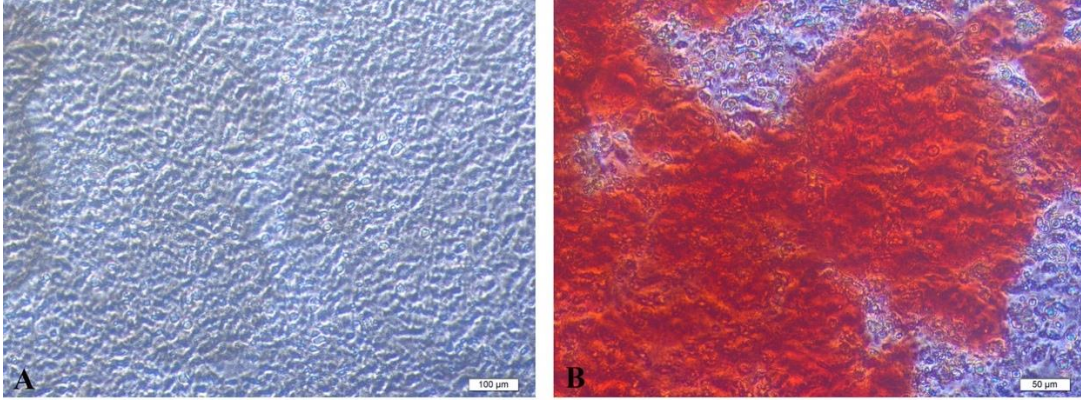


Resim 3. 5. SSMKH'lerin 21. günde adipojenik farklılaşması. **A:** Negatif kontrol. Bar: 100 µm. **B:** Adipojenik farklılaşma sonucunda hücre sitoplazmalarında lipid damlacıkları (Ok) kırmızı renkte görülmektedir. Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 20 µm

3.1.2.2. Osteojenik Farklılaşma

SSMKH'ler P3'te 4 kuyucuklu plakalara ekildi ve 21 gün boyunca osteojenik farklılaşma medyumu ile kültürlenerek osteojenik hücrelere farklılaştırıldı. Farklılaştırılan hücrelere Alizarin Red S boyama yöntemi uygulanarak hücrelerdeki kalsiyum birikimlerinin turuncu-kırmızı renkte boyandığı gözlemlendi (Resim 3.5, B).

Hücre kültürü medyumunu ile kültürlenmiş negatif kontrol grubundaki hücrelerde ise boyanma gözlenmedi (Resim 3.5, A).



Resim 3. 6. SSMKH'lerin 21. günde osteojenik farklılaşması. **A:** Negatif kontrol. Bar: 100 µm. **B:** Osteojenik farklılaşma sonucunda kalsiyum birikimlerinin turuncu-kırmızı renkte boyandığı görülmektedir. Ters faz kontrast mikroskop. Bar: 50 µm

3.1.3. Real-Time PCR

SSMKH'lerde MKH belirteçleri ile hemapoietik belirteçlerin gen ifadeleri belirlendi. Hücrelerin gen ifadelerindeki kat değişimleri P0 ve P3'te karşılaştırılarak gösterildi (Çizelge 3.1).

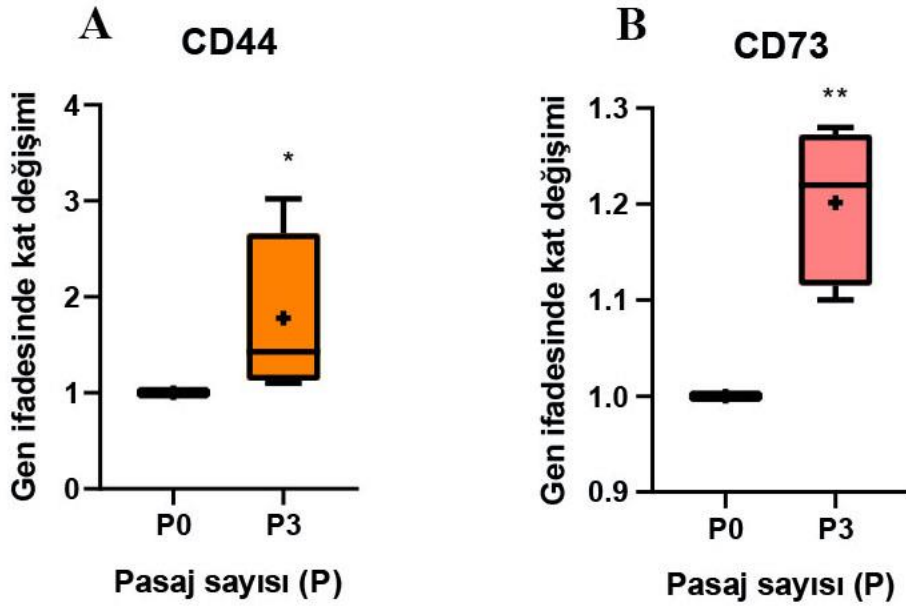
Çizelge 3. 1 SSMKH'lerde P0 ve P3'te mezenkimal ve hemapoietik genlerin real-time PCR ile istatistiksel analizi

GENLER	Ortalama ± Standart Hata		p
	P0	P3	
CD44	1,0 ^a	1,78 ± 0,33 ^b	0,048
CD73	1,0 ^a	1,20 ± 0,33 ^b	0,001
CD105	1,0	1,02 ± 0,16	0,115
CD90	1,0 ^a	1,36 ± 0,33 ^b	0,000

CD34	1,0 ^a	0,57 ± 0,06 ^b	0,002
CD45	1,0 ^a	0,57 ± 0,10 ^b	0,008

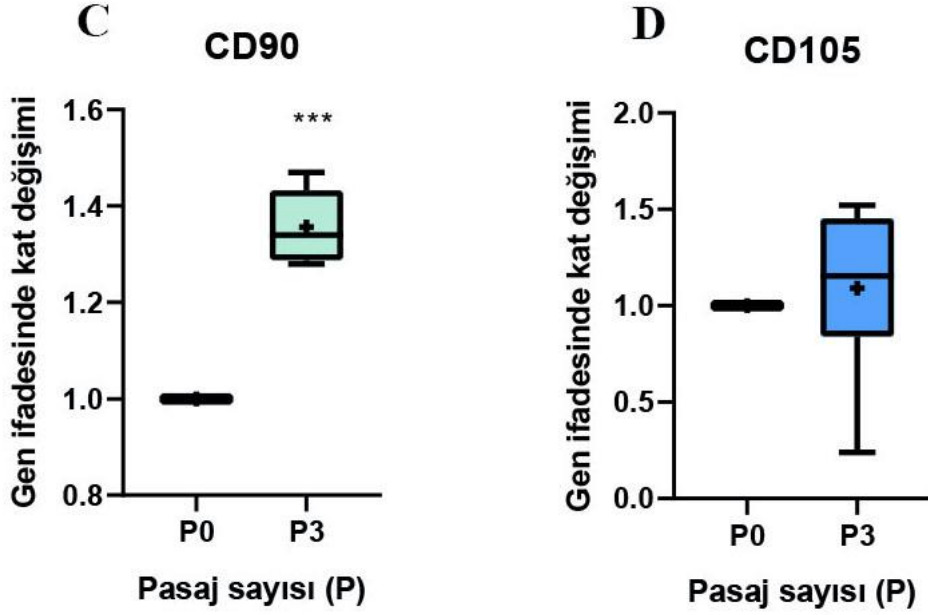
P0 ile karşılaştırılan P3'teki SSMKH'lerde CD44, CD73, CD90 gen ifadelerinde sırasıyla $1,78 \pm 0,33$, $1,20 \pm 0,33$, $1,36 \pm 0,33$ kat artışı olduğu ve bu kat artışları arasında istatistiki bir önem olduğu gözlemlendi. CD105 gen ifadesinde ise P0 ile karşılaştırıldığında $1,02 \pm 0,16$ kat artış saptanmasına rağmen bu kat artışının istatistiki olarak önemli olmadığı belirlendi (Çizelge 3.1) (Grafik 3.1 ve 3.2).

P0'ı ile karşılaştırıldığında P3'te SSMKH'lerin CD34 ve CD45 gen ifadelerinde istatistiki olarak önemli bir azalma gözlemlendi (Çizelge 3.1) (Grafik 3.3).

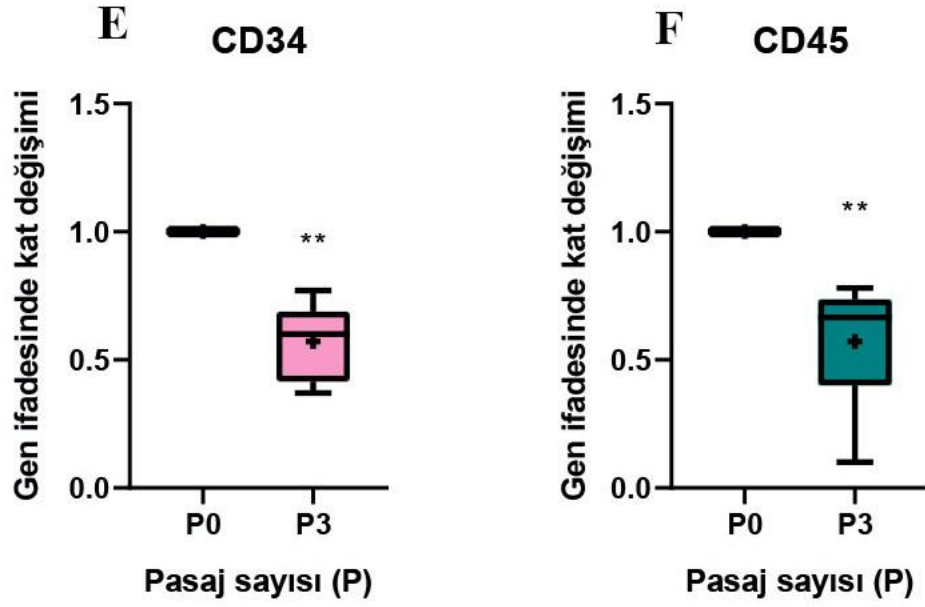


Grafik 3. 1. P0 ve P3'te SSMKH'lerin CD44 ve CD73 gen ifadelerindeki kat değişimlerini gösteren kutu ve bıyık grafiği. **A.** CD44 gen ifadesi **B.** CD73 gen ifadesi. Kutular çeyrekler

arası aralığı gösterir. '+' gen ifadelerinin kat artış ortalamasını gösterir. Bıyık minimum ve maksimum kat artışları gösterir (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).



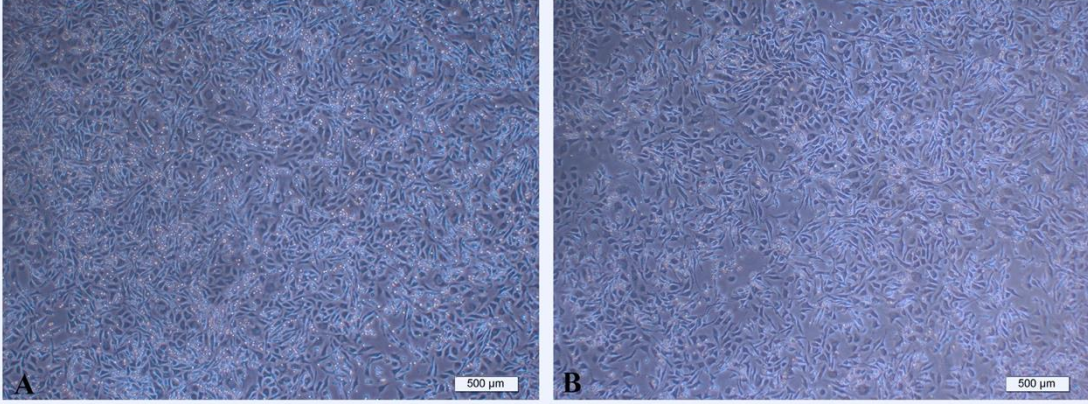
Grafik 3. 2. P0 ve P3'te SSMKH'lerin CD90 ve CD105 gen ifadelerindeki kat değişimlerini gösteren kutu ve bıyık grafiği. **C.** CD90 gen ifadesi **D.** CD105 gen ifadesi. Kutular çeyrekler arası aralığı gösterir. '+' gen ifadelerinin kat artış ortalamasını gösterir. Bıyık minimum ve maksimum kat artışları gösterir (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).



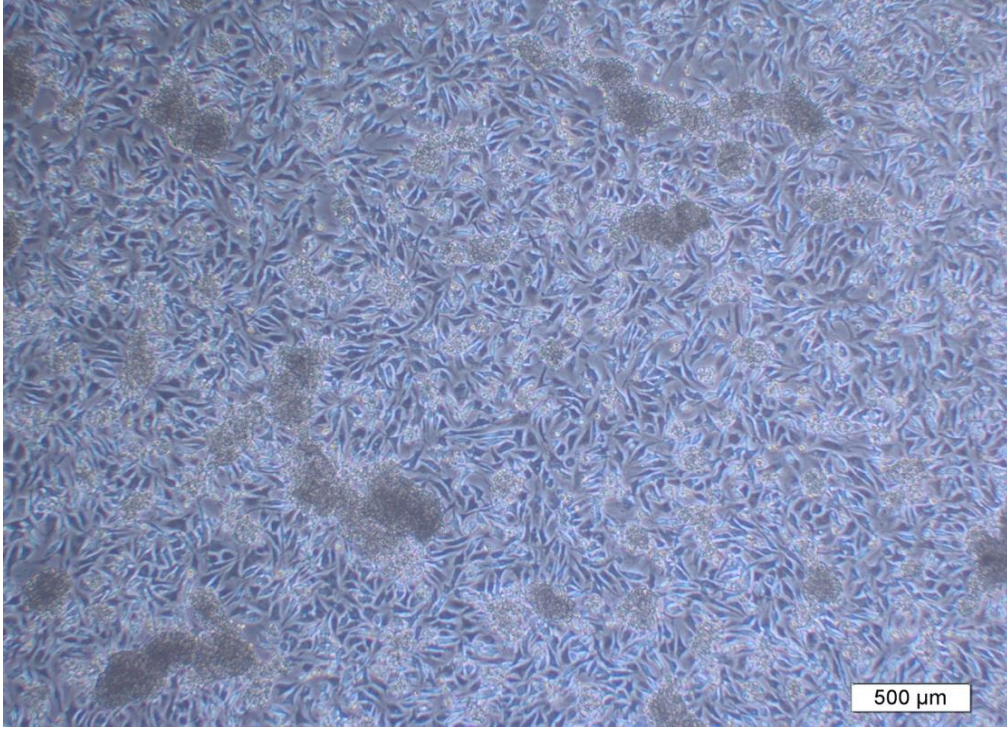
Grafik 3. 3. P0 ve P3'te SSMKH'lerin CD34 ve CD45 gen ifadelerindeki kat değişimlerini gösteren kutu ve bıyık grafiği. **E.** CD34 gen ifadesi **F.** CD45 gen ifadesi. Kutular eyrekler arası aralığı gösterir. '+' gen ifadelerinin kat artış ortalamasını gösterir. Bıyık minimum ve maksimum kat artışları gösterir (*p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001).

3.2. Kondrosit Kültürü ve Karakterizasyonu

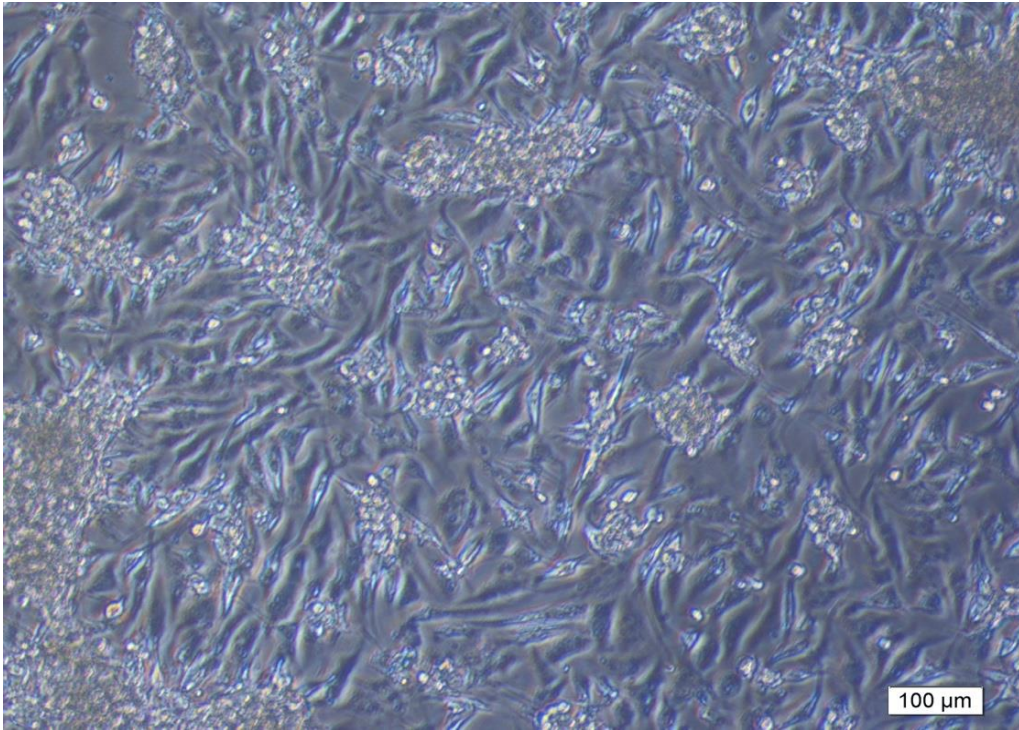
Eklem kırdağından enzimatik yöntem ile izole edilen kondrositlerin in vitro kültür şartlarında yaklaşık 5-6 gün sonra yüzeye tutundukları ve çoğalmaya başladıkları gözlemlendi. Kondrositlerin poligonal hücre morfolojisine sahip olduğu ve sitoplazmalarının granüler bir yapıda olduğu görüldü (Resim 3.7) ve (Resim 3.8). P0'da kondrositlerin 7-8 günde %80-90 konfluense ulaştığı gözlemlendi (Resim 3.6, A). P0'da konfluense ulaşan hücreler pasajlanarak transwell kültürde insert üzerine ekimi yapıldı.



Resim 3. 7. Poligonal morfolojiye sahip P0 ve P1'deki kondrositler. **A.** P0'da %80-90 konfluense ulaşmış kondrositler görülmektedir. **B.** P1'de %80-90 konfluense ulaşmış kondrositler görülmektedir. Ters faz kontrast mikroskop. Bar:500 µm



Resim 3. 8. P1'de %80-90 konfluense ulaşmış kondrositler. Ters faz kontrast mikroskop. Bar:500 µm



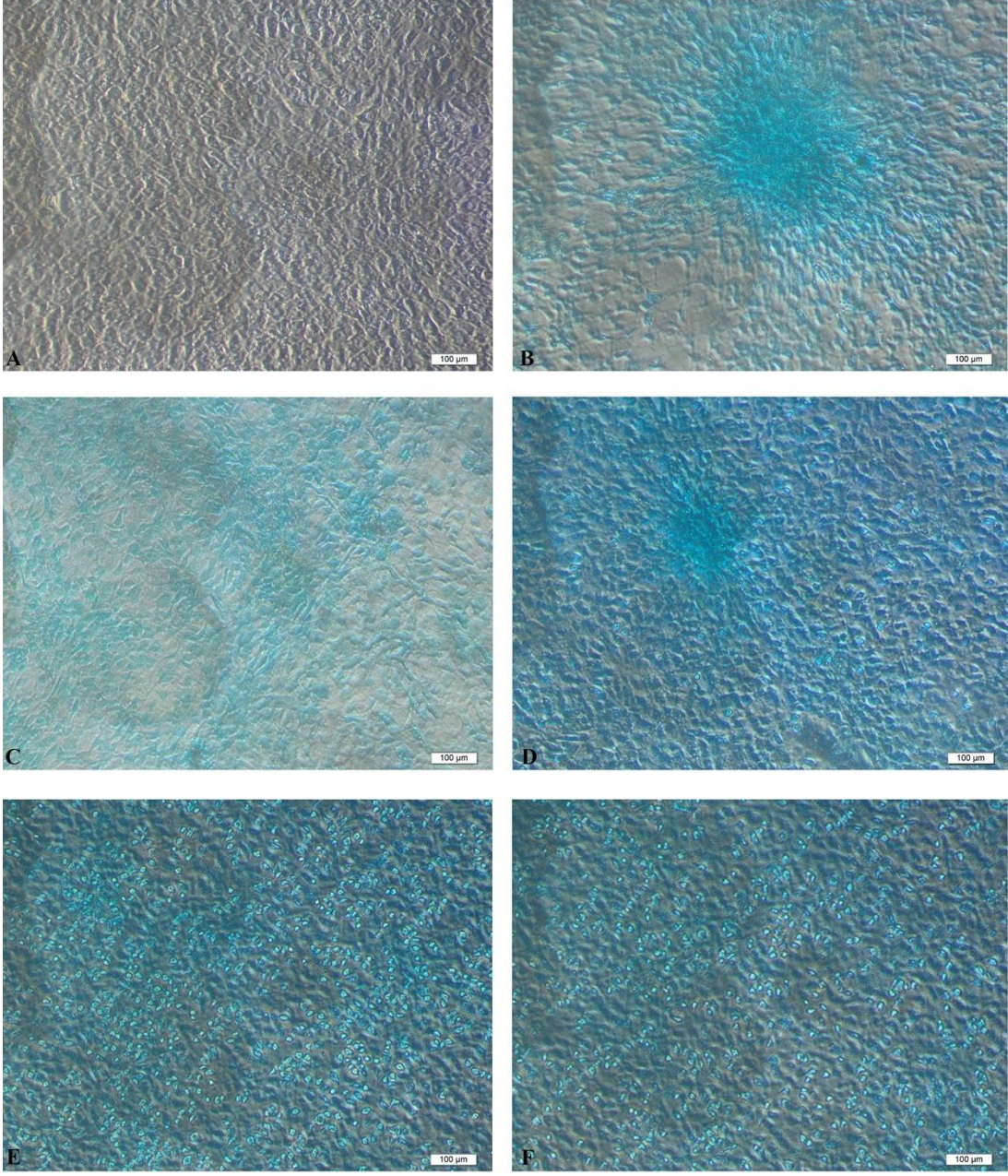
Resim 3. 9. P1'de %80-90 konfluense ulaşmış kondrositler. Ters faz kontrast mikroskop. Bar:100 µm

3.3. SSMKH'lerin Transwell Kültürde Kondrojenik Farklılaşması

SSMKH'ler ve kondrositler Çizelge 2.7'de belirtilen deney gruplarına göre 21 gün boyunca kondrojenik farklılaşma kültür medyumunu ile kültürlendi. Yirmi bir gün sonunda Alsiyan mavisi boyama yöntemi ile hücrelerde glikozaminoglikan birikimleri ve immunfloresan boyama yöntemi ile COLII protein ifadesi gösterildi. Real-time PCR analizi ile hücrelerde COL2A1, ACAN, SOX9 ve COL10A1 gen ifadeleri belirlendi.

3.3.1. Alsiyan Mavisi Boyama Yöntemi

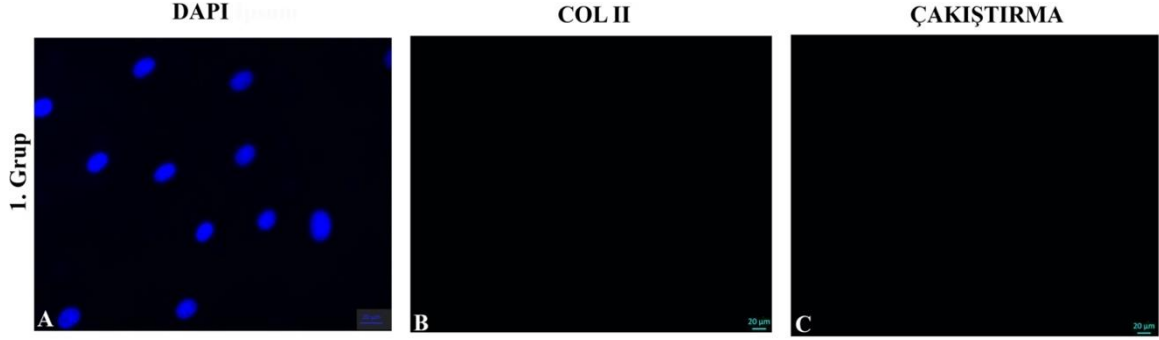
Deney gruplarında kondrojenik farklılaşmanın (Çizelge 2.7) gösterilmesi için 21 gün boyunca 6 kuyucuklu plakalardaki hücreler kondrojenik farklılaşma medyumunu ile kültürlendi. Alsiyan mavisi ile 1. grupta (negatif kontrol) hücrelerde boyanma görülmezken, diğerk gruplardaki hücrelerde glikozaminoglikan birikimlerinin mavi renkte boyandığı gözlendi (Resim 3.9).



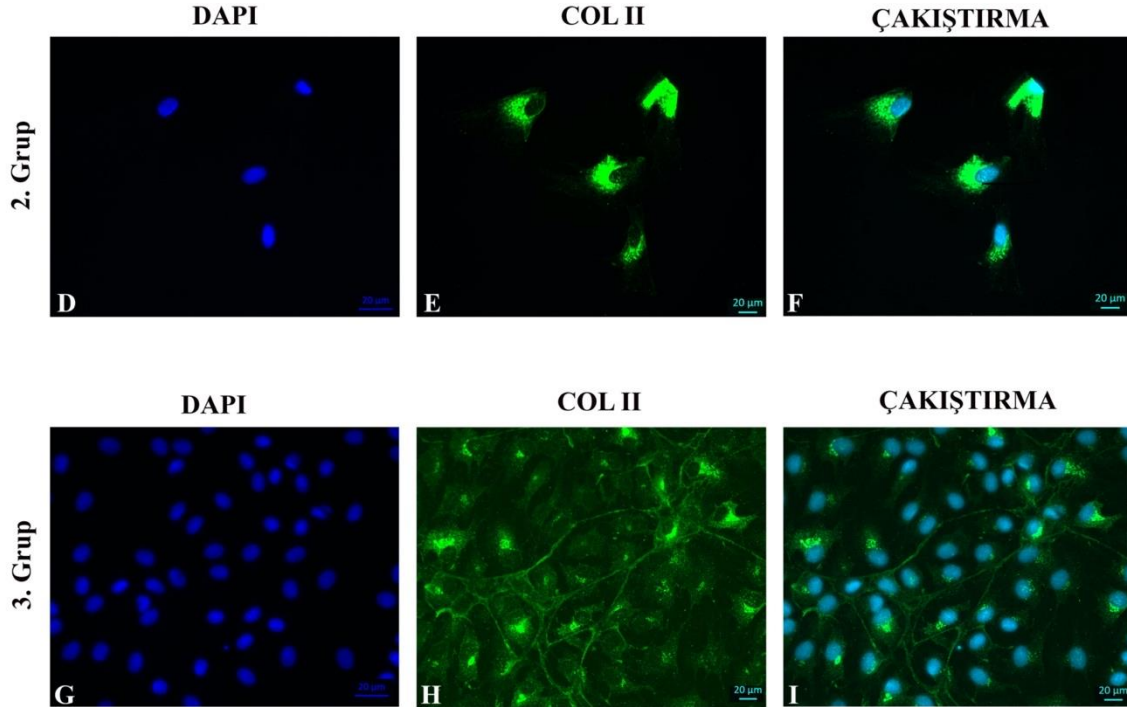
Resim 3. 10. Transwell kültürde kondrojenik farklılaşmanın Alsiyan Mavisi boyama yöntemi ile gösterilmesi. **A:** Negatif kontrol grubunda boyanma gözlenmedi. **B:** 2. Grup, **C:** 3. Grup, **D:** 4. Grup, **E:** 5. Grup ve **F:** 6. Grup'larda glikozaminoglikan birikiminin parlak mavi renkte boyandığı görüldü. Ters faz kontrast mikroskop. Bar:100 µm

3.3.2. Immunfloresan Boyama

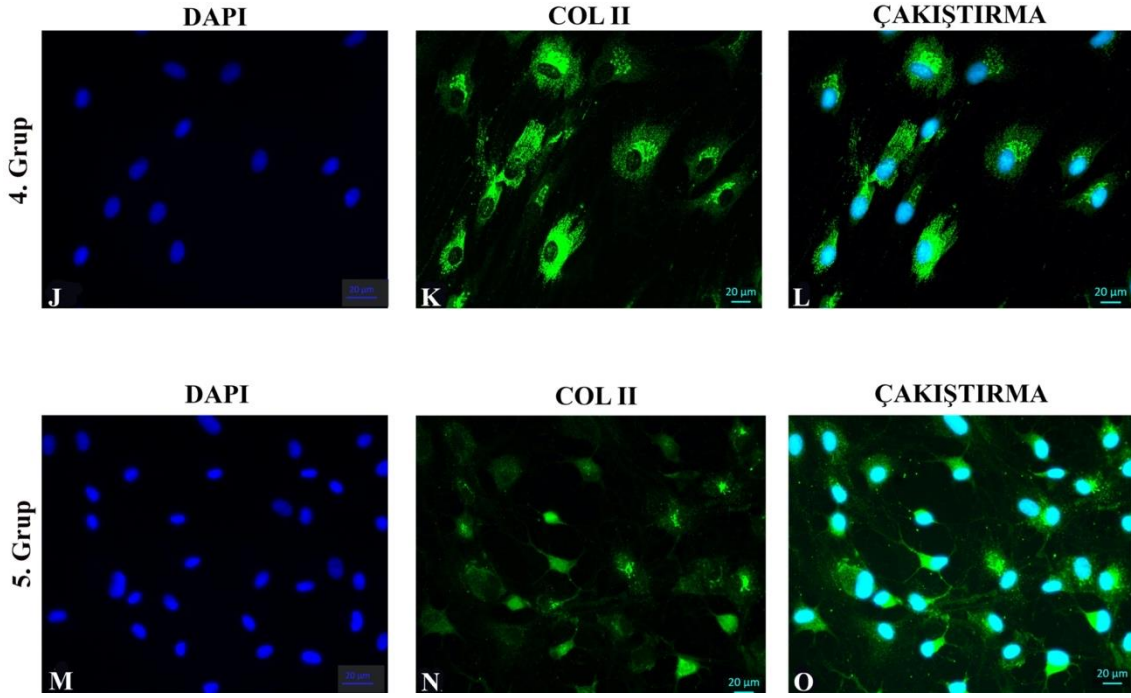
İmmunfloresan boyama ile Grup 2-6'da hücrelerin COL II'yi güçlü bir şekilde ifade ettiği (Resim 3.11, 3.12 ve 3.13), negatif kontrol grubunda (Resim 3.10) ise hücrelerin çok daha zayıf olarak COL II'yi ifade ettiği gözlemlendi.



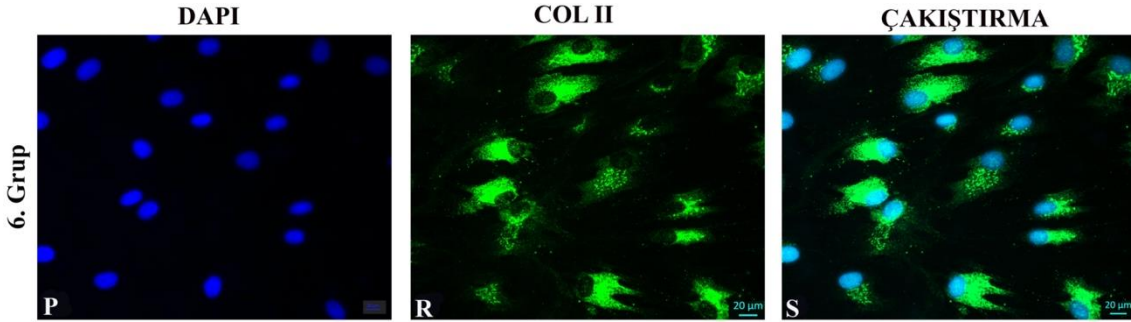
Resim 3. 11. Transwell kültürde 1. grubun 21. günde COL II ifadesinin gösterilmesi. A: DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. B: Hücrelerin sitoplazmalarında COL II protein ifadesi C: Çakıştırma. Floresan ataçmanlı ters mikroskop. Bar: 20 µm



Resim 3. 12. Transwell kültürde 2. ve 3. grubun 21. günde COL II ifadesinin gösterilmesi. D, G: DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. E, H: Hücrelerin sitoplazmalarında COL II protein ifadesi F, I: Çakıştırma. Floresan ataçmanlı ters mikroskop. Bar: 20 µm



Resim 3. 13. Transwell kültürde 4. ve 5. grubun 21. günde COL II ifadesinin gösterilmesi. **J, M:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **K, N:** Hücrelerin sitoplazmalarında COL II protein ifadesi **L, O:** Çakıştırma. Floresan ataçmanlı ters mikroskop. Bar: 20 µm



Resim 3. 14. Transwell kültürde 6. grubun 21. günde COL II ifadesinin gösterilmesi. **P:** DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. **R:** Hücrelerin sitoplazmalarında COL II protein ifadesi **S:** Çakıştırma. Floresan ataçmanlı ters mikroskop. Bar: 20 µm

3.3.3. Real-Time PCR

Kondrojenik farklılaşma sonrasında COL2A1, SOX9, ACAN ve COL10A1 gen ifadelerindeki kat değişimi olan p değerleri ile ortanca değerleri Çizelge 3.2’de gösterildi.

Çizelge 3. 2. Kondrojenik farklılaşmanın 21. gününde gen ifadesindeki kat değişimleri.

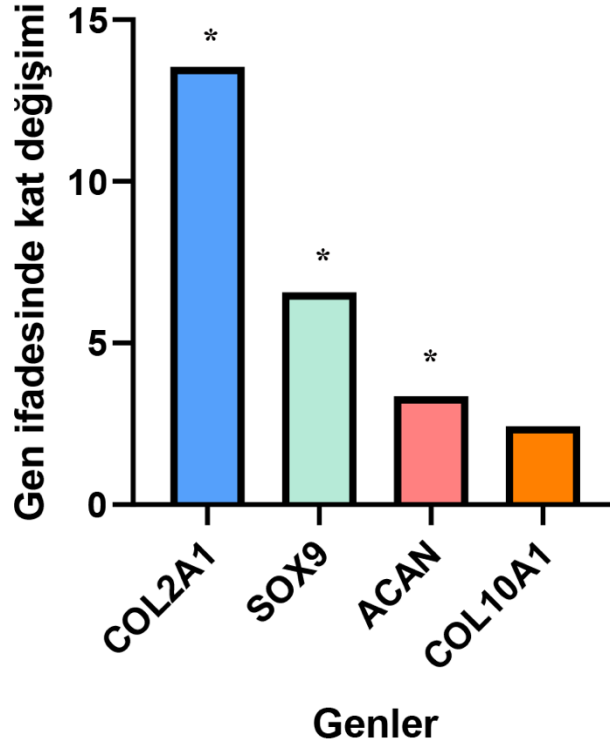
Gruplar Genler	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup	5. Grup	6. Grup	p
	n=6 Ortanca	n=6 Ortanca	n=6 Ortanca	n=6 Ortanca	n=6 Ortanca	n=6 Ortanca	
*COL2A1	1,0 ^c	13,54 ^b	12,32 ^b	36,45 ^{ab}	24,04 ^{ab}	91,52 ^a	0,000
**SOX9	1,0 ^b	6,57 ^{bc}	1,96 ^{bc}	5,10 ^{ac}	26,81 ^{ac}	120,14 ^a	0,004
ACAN	1,0 ^b	3,36 ^a	3,84 ^a	3,84 ^a	5,47 ^a	12,68 ^a	0,005
COL10A1	1,0	2,43	0,73	1,01	1,90	1,03	0,902

1. Grup: Kontrol; **2. Grup:** SSMKH'ler + kondrojenik medyum+10ng/mL TGF-β3; **3. Grup:** SSMKH'ler ve kondrositler + kültür medyum; **4. Grup:** SSMKH'ler ve kondrositler + kondrojenik medyum+10ng/mL TGF-β3; **5. Grup:** SSMKH'ler ve kondrositler + kondrojenik medyum+ 10ng/mL BMP-9; **6. Grup:** SSMKH'ler ve kondrositler + kondrojenik medyum+10ng/mL TGF-β3 + 10ng/mL BMP-9. ^{a-c} Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen ortalama değerler arasındaki farklar önemlidir.

*COL2A1'de 3. ve 6. grup arasındaki anlamlılık değeri (p<0,01), 2. ve 6. grup arası anlamlılık değeri (p<0,05)'dir.

**SOX9'da 3. ve 6. grup arasındaki anlamlılık değeri (p<0,01), 2. ve 6. grup arası anlamlılık değeri (p<0,05)'dir.

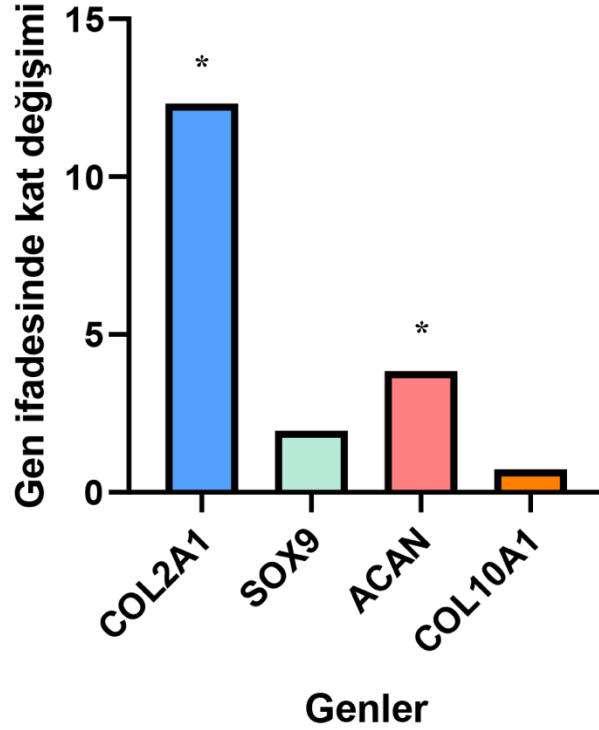
2. Grup



Grafik 3. 4. İkinci grup kutu grafiği. Yirmi bir gün boyunca kondrojenik farklılaşma medyumu uygulanan hücrelerde kondrojenik (COL2A1, SOX9, ACAN) ve hipertrofik (COL10A1) gen ifadelerinin gösterilmesi. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$)

Negatif kontrole grubuyla karşılaştırılan 2. grupta COL2A1, SOX9, ACAN, COL10A1 genlerinin kat ifadesindeki artışın sırasıyla 13,54, 6,57, 3,36 ve 2,43 olduğu belirlendi. Bunun yanı sıra, negatif kontrole göre COL2A1 ($p<0,05$), SOX9 ($p<0,05$) ve ACAN ($p<0,05$) gen ifadelerindeki kat artışının istatistiki olarak önemli olduğu tespit edildi. COL10A1 gen ifadelerinde ise artış gözlenmesine rağmen istatistiki olarak önemli bir fark belirlenmedi (Grafik 3.4).

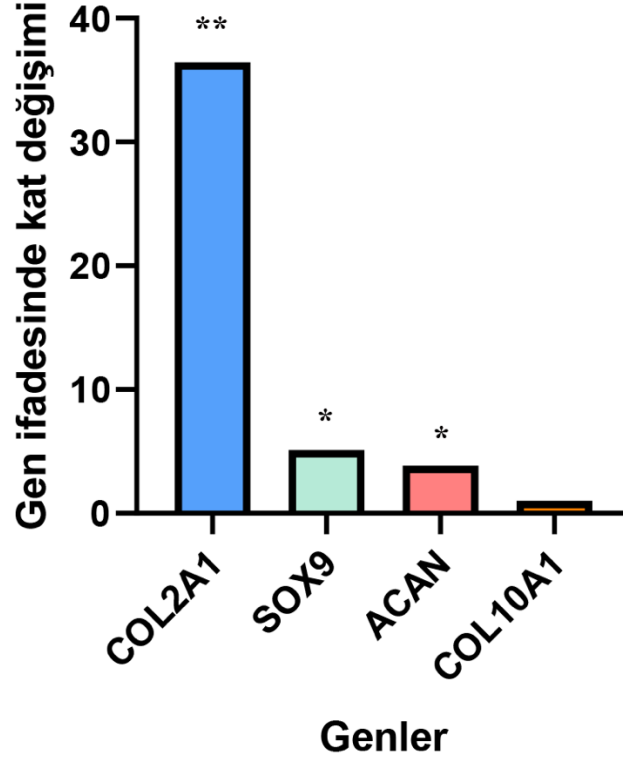
3. Grup



Grafik 3. 5. Üçüncü grup kutu grafiği. Hücrelerde kondrojenik (COL2A1, SOX9, ACAN) ve hipertrofik (COL10A1) gen ifadelerinin gösterilmesi. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$)

Negatif kontrol grubuyla karşılaştırılan 3. grupta COL2A1, SOX9, ACAN, COL10A1 genlerinin kat ifadesindeki artışın sırasıyla 12,32, 1,96, 3,84 ve 0,73 olduğu tespit edildi. COL2A1 ($p<0,05$) ve ACAN ($p<0,05$) gen ifadelerindeki kat değişiminin negatif kontrole göre anlamlı olarak arttığı belirlendi. COL10A1 ve SOX9 gen ifadelerinde ise artış olmasına rağmen istatistiki olarak önem gözlenmedi (Grafik 3.5).

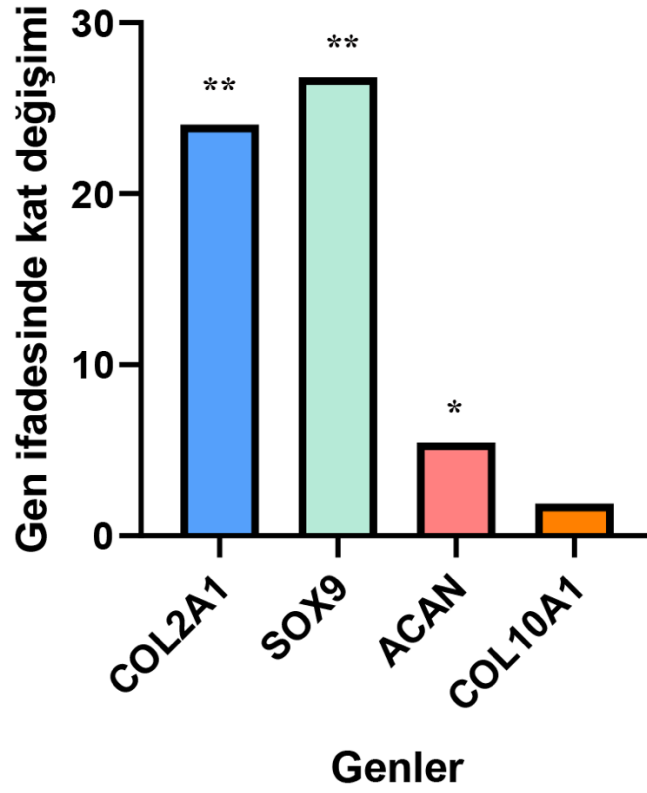
4. Grup



Grafik 3. 6. Dördüncü grup kutu grafiği. TGF- β 3 eklenmiş kondrojenik farklılaşma medyumuyla 21 gün boyunca kültürlenene hücrelerde kondrojenik (COL2A1, SOX9, ACAN) ve hipertrofik (COL10A1) gen ifadelerinin gösterilmesi. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

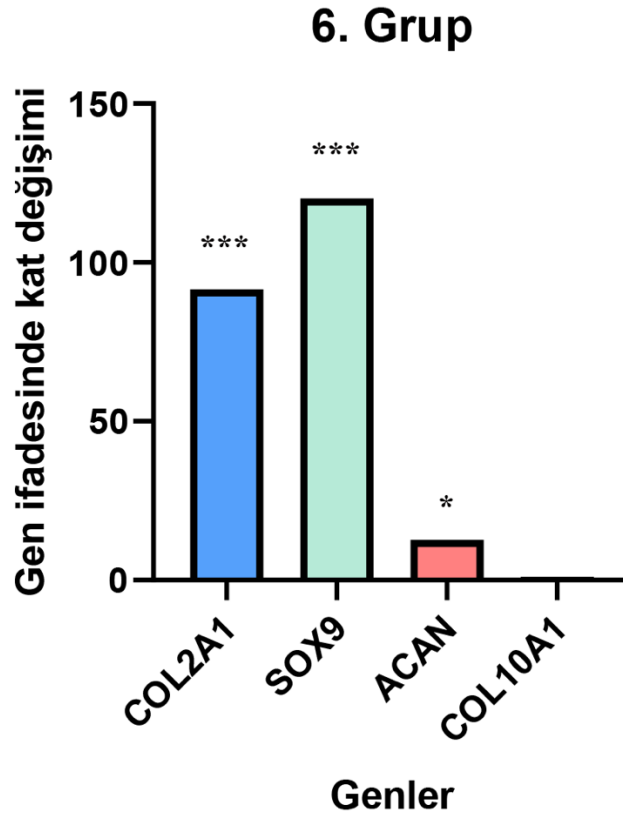
Negatif kontrol grubuyla karşılaştırılan 4. grupta COL2A1, SOX9, ACAN, COL10A1 genlerinin kat ifadesindeki artışın sırasıyla 36,45, 5,10, 3,84 ve 1,01 olduğu tespit edildi. COL2A1 ($p < 0,01$), SOX9 ($p < 0,05$) ve ACAN ($p < 0,05$) gen ifadelerindeki kat değişimlerinin negatif kontrole göre istatistiksel olarak arttığı belirlendi. COL10A1 gen ifadesinde ise artış olmasına rağmen istatistiksel önem gözlenmedi (Grafik 3.6).

5. Grup



Grafik 3. 7. Beşinci grup kutu grafiği. BMP-9 eklenmiş kondrojenik farklılaşma medyumuyla 21 gün boyunca kültürlenen hücrelerde kondrojenik (COL2A1, SOX9, ACAN) ve hipertrofik (COL10A1) gen ifadelerinin gösterilmesi. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$)

Negatif kontrol grubuyla karşılaştırılan 5. grupta COL2A1, SOX9, ACAN, COL10A1 genlerinin kat ifadesindeki artışın sırasıyla 24,04, 26,81, 5,47 ve 1,90 olduğu gözlendi. COL2A1 ($p<0,01$), SOX9 ($p<0,01$) ve ACAN ($p<0,05$) gen ifadelerindeki kat değişimlerinin 4. grupta benzer olarak negatif kontrole göre istatistiksel olarak artış gösterdiği tespit edildi. COL10A1 gen ifadesinde ise artış olmasına rağmen istatistiki olarak önem gözlenmedi (Grafik 3.7).



Grafik 3. 8. Altıncı grup kutu grafiği. BMP-9 eklenmiş kondrojenik farklılaşma medyumuyla 21 gün boyunca kültürlenen hücrelerde kondrojenik (COL2A1, SOX9, ACAN) ve hipertrofik (COL10A1) gen ifadelerinin gösterilmesi. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001)

Negatif kontrol grubuyla karşılaştırılan 6. grupta COL2A1, SOX9, ACAN, COL10A1 genlerinin kat ifadesindeki artışın sırasıyla 91,52, 120,14, 12,68 ve 1,03 olduğu belirlendi. COL2A1 (p<0,001), SOX9 (p<0,001) ve ACAN (p<0,05) gen ifadelerindeki kat değişimlerinin negatif kontrole göre istatistiksel olarak artış gösterdiği tespit edildi. COL10A1 gen ifadesinin ise artış göstermesine rağmen istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı (Grafik 3.8).

4. TARTIŞMA

4.1. SSMKH'lerin Karakterizasyonu ve Farklılaşma Potansiyellerinin Belirlenmesi

Steril şartlarda sığırların metatarsofalangeal eklemlerinden 3-6 mL sinoviyal sıvı toplandı. Sinoviyal sıvıdan izole edilen hücreler Prado ve arkadaşlarının (2015) protokollerine uygun bir şekilde %10 FBS'li HG-DMEM içeren kültür kaplarına ekildi ve 37⁰ C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildiler. Prado ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmada SSMKH'leri çeşitli kültür medyumlarında (HG-DMEM, MEM, RPMI-1640, DMEM-F12) kültüre etmişlerdir. Bu hücrelerin HG-DMEM içeren besiyerlerinde daha iyi çoğalma potansiyeli gösterdiklerini ve daha uzun süre farklılaşmadan kök hücre özelliklerini sürdürebildiklerini de çalışmalarında bildirdiler.

Sinoviyal sıvı kökenli hücrelerin kültür kaplarına ekildikten sonra kültür kaplarına tutundukları ve 4 gün sonra hücre nişlerini şekillendirdikleri gözlemlendi. Bu hücrelerin çoğunluğunun fibroblast benzeri bir morfolojiye sahip olduğu belirlendi. Ayrıca nişler içerisinde daha iri ve geniş, piramit şekilli hücrelere rastlandı. İlerleyen pasajlarda fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin kültür ortamında hakim olduğu ve morfolojilerini uzun süre korudukları gözlemlendi.

Harvanová ve arkadaşları (2011) bulgularımıza benzer olarak hücre nişlerinde iki farklı morfolojiye sahip hücre bulunduğunu bildirdiler. Çalışmalarında kültür ortamında fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücreleri ve az sayıda iri ve geniş şekilli hücreleri tarif ettiler. 10 gün sonra fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin kültür ortamında çoğunluğu oluşturduğunu belirttiler. Bununla birlikte, Prado ve arkadaşları (2015) ile Amemiya ve arkadaşları (2020) yaptıkları çalışmada sadece fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücreleri gözlemlədiler ve ilerleyen pasajlarda da hücrelerin bu morfolojilerini koruduklarını saptadılar.

MKH'leri tanımlamak için en önemli kriterlerden birisi bu hücrelerin çok yönlü (adipojenik, osteojenik ve kondrojenik) farklılaşma potansiyellerini göstermektir (Dominici vd., 2006). MKH'ler çalışmamızda uyguladığımız gibi genellikle 21 gün süre

ile farklılaştırma medyumları içerisinde inkübe edilerek osteojenik, adipojenik ve kondrojenik hücrelere farklılaştırılmaktadır (Shimomura vd., 2010; Garcia vd., 2016; Jia vd., 2017). Bununla birlikte farklı inkübasyon sürelerinin (7,14 ve 28 gün) uygulandığı farklılaştırma çalışmalarına (Murata vd., 2014; Fülber vd., 2016; Isobe vd., 2016; Burk vd., 2017; Neybecker vd., 2018) da rastlanmaktadır.

MKH'leri tanımlamak için en önemli kriterlerden diğeri de, bu hücrelerin CD 73, CD90 ve CD105 moleküllerini ifade etmeleri; CD45, CD34, CD11b, CD14, CD19, CD79 ve HLA sınıf II moleküllerini ifade etmemeleridir (Dominici vd., 2006). Bununla birlikte SSMKH'lerin CD44, CD90, CD73 ve CD105 moleküllerini ifade ettikleri, hematopoietik belirteçler olan CD34 ve 45'i ifade etmedikleri de çalışmalarda gösterildi (Hatakeyama vd., 2017; Li vd., 2020). Ayrıca, CD44 (Jones vd., 2008; Jones ve Crawford, 2014) ve CD90 (Krawetz vd., 2012) gen ifadelerinin kondrojenik farklılaşma potansiyelleri ile ilişkili olduğu da bildirilmektedir. Bu çalışmalarla uyumlu olarak araştırmamızda P0'a göre P3'teki hücrelerde MKH belirteçleri olan CD44, CD73, CD90 ve CD105 gen ifadelerinin arttığını ve hematopoietik hücre belirteçleri olan CD34 ve CD45 gen ifadelerinin ise azaldığını belirledik.

4.2. Eklem Kıkırdağından Kondrositlerin İzole Edilerek Kültürlenmesi, Transwell Kültürün Oluşturulması ve TGF- β 3 ve/veya BMP-9 İlave Edilmiş ya da Edilmemiş Kondrojenik Farklılaşma Medyumuyla Kültürlenmesi

Tek tabakalı kondrosit hücre kültüründe ilerleyen pasajlarda kondrositlerin dedifferansiye olduğu (Benya vd., 1978; Schulze-Tanzil vd., 2002), kondrosite özgü fenotipin kaybolduğu ve hücre morfolojilerinin fibroblast benzeri hücrelere benzediği bildirildi (Schulze-Tanzil vd., 2004; Schulze-Tanzil, 2009). Dolayısıyla eklem kıkırdağından izole edilen kondrositler P1'e kadar çoğaltıldı ve P1'deki hücreler Kubosch ve arkadaşlarının (2016) protokolüne benzer şekilde transwell kültürde kullanıldı.

Transwell ko-kültür sistemi; iki farklı hücre topluluğu arasındaki sinyalleşme tespitinin yapılabilmesi sebebiyle diğer ko-kültür yöntemlerine göre daha avantajlı gözükmektedir

(Renaud ve Martinoli, 2016). Gözenekli bir membran yapısına sahip transwell kültür, diğer kondrojenik farklılaşma yöntemlerine göre daha hızlı ve verimli farklılaşmayı sağlar ve kıkırdak matriksinin sentezini daha fazla artırır (Murdoch vd., 2007). Kondrosit peleti ile MKH'lerin biraraya getirildiği kokültür sisteminde kondrositlerden salgılanan paratiroid hormonu ile ilişkili protein (PTHrP)'in MKH'lerin kondrojenik farklılaşmasında hipertrofiyi engellediği de bilinmektedir (Fischer vd., 2010). Bununla beraber Ahmed ve arkadaşları (2007) tarafından da benzer şekilde tek tabakalı kültürlerde TGF- β 3'ün indüklediği hipertrofinin transwell ko-kültür sisteminde kondrositler tarafından baskılandığı gözlemlendi. Kıkırdak matriks oluşumu; kondrositler ile sinoviyal membran veya embriyonal kökenli kök hücreler veya uyarılmış pluripotent kök hücreler birlikte kültürlenmesinde, tek tabakalı kültüre kıyasla daha fazla meydana gelmektedir (Vats vd., 2006; Varshney vd., 2010; Wei vd., 2012). Ayrıca, en önemlisi, kondrositlerin ve SSMKH'lerin transwell ko-kültürde biraraya getirilmesi ile doğal eklem mekanizmasının taklit edilebilmesidir (Kubosch vd., 2016). Ancak, yapılan bir çalışmada transwell kültürde yer alan kondrositlerin ve aljinat boncuklar içerisinde bulunan MKH'lerin kıkırdak matriks oluşumunu önemli derecede azalttığı da bildirildi (Xu vd., 2013). Çalışmamızda, transwell ko-kültür sisteminin bu çeşitli avantajlarından dolayı (Vats vd., 2006; Ahmed vd., 2007; Aung vd., 2011; Kubosch vd., 2016) transwell kültürde insert üzerinde kondrositler ve kuyucuk tabanında ise SSMKH'ler yer alacak şekilde ko-kültür sistemini oluşturduk. Hücre-hücre temasının olmadığı indirek ko-kültürlerde, hücrelerden salgılanan çeşitli faktörlerle hücrelerin birbirlerini etkileyebilmeleri ve haberleşebilmeleri için genellikle transwell insertünün gözenek boyutları 0,4 μ m veya 3 μ m olarak tercih edilir (Renaud ve Martinoli, 2016). Kıkırdak hücrelerinin sadece salgılarının SSMKH'ler üzerindeki etkisini gözlemlemek için 0.4 μ m gözenek boyutunda transwell insertler kullandık. Transwell ko-kültür sisteminde yer alan kondrosit ve kök hücre oranları 1:3 (Meretoja vd., 2012), 3:7 (Meretoja vd., 2014), 3:1 (Zuo vd., 2013) olarak kullanıldığında kondrojenik farklılaşmada olumlu sonuçlar elde edilse de çok sayıda araştırmada 1:1 oranı kullanılarak daha optimal etkiler gözlemlendi (Chen vd., 2009b; Bian vd., 2011; Hwang vd., 2011). Biz de transwell ko-kültür sisteminde kondrosit- kök hücre oranını 1:1 olarak belirledik.

Kondrojenik farklılaştırma çalışmalarında kök hücrelerde kondrojenik farklılaşmayı başlatmak için genellikle TGF- β , IGF-1 ve BMP gibi büyüme faktörleri

kullanılmaktadır (Liu vd., 2010). Bu büyüme faktörlerinden TGF β 1'in, kondrositlerin terminal farklılaşmasını inhibe ettiği ve prehipertrofik kondrositlerin fenotipini sabit duruma getirdiği bildirilirken (Ballock vd., 1993), TGF- β 1 ve β 3'ün BMP-2 ile birlikte kondrogenezisi indüklediği gösterildi (Desancé vd., 2018). Bununla birlikte, TGF- β ailesinden TGF- β 3'ün Smad 2/3 ve BMP-9'un Smad 1/5 yolağı (van Caam vd., 2015) aracılığıyla kök hücrelerde kondrojenik farklılaşmayı indüklediği bilinmektedir. Bununla birlikte yalnızca TGF- β ile muamele edilen MKH'lere kıyasla, kondrosit ve MKH'lerin ko-kültürlerinde kondrojenik farklılaşma gen ifadelerinde (COL2A1, ACAN ve SOX9) artış tespit edildi (Cooke vd., 2011). Kondrojenik farklılaşma çalışmalarında TGF- β 3, 10ng/mL'lik konsantrasyonda yaygın olarak kullanıldığı (Qing vd., 2011; Wu vd., 2012; Hatakeyama vd., 2017; Jorgenson vd., 2018) için çalışmamızda bu dozu tercih ettik. Araştırmamızda, transwell ko-kültür sisteminde TGF- β 3 ve BMP-9 büyüme faktörlerini ya tek başlarına ya da birlikte kültür medyumuna ilave ederek çalışma gruplarını oluşturduk. Bu büyüme faktörleri ile 21 gün boyunca gruplara kondrojenik farklılaşma protokolünü uyguladık. Kontrol grubu ile karşılaştırılan tüm gruplarda kondrojenik farklılaşmanın indüklendiği hücrelerde COL II protein ifadesini immunfloresan boyama ile göstererek doğruladık (Resim 3.10,11,12,13).

BMP-9 hem kondrojenik hem de osteojenik potansiyele sahip bir büyüme faktörüdür (Lamplot vd., 2013). BMP-9'un farklı zaman dilimlerinde ve çeşitli dozlarda kondrojenik potansiyelinin değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır. BMP-9'un, 100 ng/mL'lik bir konsantrasyonda kullanıldığında pelet ve aljinat kültürde sırasıyla 14 ve 21 gün içerisinde kondroprogenitör ve kök hücreler üzerinde yüksek kondrojenik potansiyele sahip olduğu bildirildi (Majumdar vd., 2001; Morgan vd., 2020). Mikro kütle kültürü ile pluripotent kök hücreleri (C3H10T1/2 hücreleri) 10 ng/mL BMP-9 ilave edilmiş kondrojenik farklılaşma medyumuyla 4 gün süre ile kültürlendiğinde, 100ng/mL BMP-9 dozuna benzer şekilde güçlü bir kondrojenik farklılaşma potansiyeli sergilediği gösterildi (Cheng vd., 2016). Morgan ve arkadaşlarının (2020) yaptığı çalışmada; 50,100 ve 200 ng/mL gibi yüksek dozlarda BMP-9'un 4 günde kondroprogenitör hücrelerin yüksek düzeyde kondrojenik hücrelere farklılaşmasına neden olduğu fakat bu dozların yüksek hipertrofiye sebep olduğu bildirilirken; 6,12.5 ve 25 ng/mL gibi daha düşük BMP-9 dozlarının ise 4 gün içerisinde kondrojenik farklılaşmayı indüklemediği ve hipertrofiye yol açmadığı gösterildi. BMP-9'un değişik

kültür ortamlarında, farklı dozlarda ve inkübasyon sürelerinde kullanılması kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını etkileyen önemli faktörlerdir. Kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasında TGF- β 3 ve BMP-9'un etkilerini göstermek için 21 gün süreyle hücreleri kültürlediğimizden dolayı hipertrofik bir etkiye yol açmamak için BMP-9'un 10ng/mL olan düşük dozunu tercih ettik.

4.3. Transwell Kültürde Kültürlenmiş Kök Hücrelerin Kondrojenik Farklılaşma Potansiyellerinin Real-Time PCR, İmmunfloresan ve Alsiyan Mavisi Boyamasıyla Değerlendirilmesi

SOX9, kıkırdak farklılaşmasında ana kondrojenik transkripsiyon faktörü olarak kabul edilir ve COL2A1, COL9A1, COL11A2 ve ACAN genlerini aktive eder. Ayrıca, SOX9'un ACAN ile birlikte, COL2A1 gen ifadesini düzenleyerek kök hücrelerin kondrositlere farklılaşmasında rol oynadığı bilinmektedir (Dong vd., 2012). SOX9 kıkırdak gelişimi esnasında önemli rol oynar. Farelerde yapılan bir çalışmada, SOX9 geninin kıkırdak farklılaşmasının yoğunlaşma aşamasından önce çıkarılması kıkırdak gelişiminin durmasına sebebiyet verirken, yoğunlaşma aşaması sonrası SOX9 geninin inhibe edilmesi, kondrosit farklılaşmasının durmasına neden olduğu gösterildi (Akiyama vd., 2002). SOX9, WNT/ β -katenin-bağımlı promotörlerin aktivasyonunu ve β -katenin bozunmasını uyarır (Cheng ve Geneve, 2010) Böylece, kondrosit farklılaşmasını desteklerken kondrosit hipertrofini geciktirir (Akiyama vd., 2004). Hücrelerarası proteinlerden ACAN, COLII, COL9 ve COL11; SOX9 geni tarafından düzenlenir (Oh vd., 2014). ACAN, kıkırdak dokuda kondrosit-kondrosit ve kondrosit-matriks etkileşimlerinde önemli rol oynamaktadır (Doege vd., 1991; Kiani vd., 2002). *In vitro* olarak eklem kondrositleri ve MKH'lerin birlikte kültürlendiği ko-kültür sistemlerinde SOX9 gen ifadesinin arttığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Ahmed vd., 2007; Chen vd., 2009b; Lee ve Im, 2010; Lettry vd., 2010; Cooke vd., 2011; Zuo vd., 2013).

Çalışmamızda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 2. grupta SOX9 ($p<0,05$), COL2A1 ($p<0,01$), ve ACAN ($p<0,05$) gen ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış

saptandı. Hipertrofi göstergesi olan COL10A1 gen ifadesinde ise artış olmasına rağmen istatistiki olarak bir fark belirlenmedi. Dolayısıyla TGF-β3 içeren kondrojenik farklılaşma medyumuna ile SSMKH'lerin kültürlenmesi önceki çalışmalarla (Hatakeyama vd., 2017; Liang vd., 2018) uyumlu olarak hipertrofiye neden olmaksızın kondrogenezisi indüklemektedir.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 3. ve 4. grupta COL2A1, SOX9 ve ACAN gen ifadelerinde artış gözlemlendi 3. grupta COL2A1 ($p<0,05$) ve ACAN ($p<0,05$) gen ifadelerinde istatistiki olarak anlamlı bir fark görülürken, 4. grupta COL2A1 ($p<0,01$), SOX9 ($p<0,05$) ve ACAN ($p<0,05$) genlerinde istatistiki bir önemin olduğu saptandı. Dördüncü grupta SSMKH ile kondrositlerin birlikte kültürlendiği kültür medyumuna TGF-β3 ilave edildiğinde, ikinci ve üçüncü gruba göre özellikle COL2A1 gen ifadesinde istatistiki olarak önemli olmayan bir artış olduğu görüldü. Kondrositler ile synovial membran kökenli kök hücreler birlikte kültürlendiğinde kondrogenezisin indüklenmesinde kondrositlerden salgılanan TGF-β3'ün önemli olduğu ve transwell kültürde kondrositlerin TGF-β salgıladığı ve salgılanan TGF-β'nin kondrojenik farklılaşma esnasında kök hücrelerde SOX9, ACAN ve COL II seviyelerini arttırırken, hipertrofik belirteçlerin seviyelerini azalttığı bildirildi (Chen vd., 2009a; Kubosch vd., 2016). Özetle hem kondrositlerden parakrin olarak salgılanan hem de kültür medyumuna ilave edilen TGF-β3'ün kondrosit hipertrofisine yol açmadan ve COL2A1 ve SOX9 gen ifadelerinde istatistiki olarak önemli olmayan bir artışa neden olarak kondrogenezisi uyardığını düşünmekteyiz.

5. grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında COL2A1 ($p<0,01$), SOX9 ($p<0,01$) ve ACAN ($p<0,05$) gen ifadelerinde istatistiki olarak anlamlı bir artış belirlendi. COL10A1 gen ifadesinde ise artış olmasına rağmen istatistiki olarak fark gözlenmedi. Büyüme faktörü eklenmeyen 3. grup ile BMP-9 ilave edilen 5. grup karşılaştırıldığında SOX9, COL2A1 ve ACAN gen ifadelerinin istatistiki olarak önemli olmasada 5. grupta arttığı, hatta COL2A1 geni dışında kondrojenik belirteçlerdeki artışının TGF-β3 eklenen 4. gruba göre de daha fazla olduğu görüldü. BMP-9'un süreye ve doza bağlı olarak kondrogenezisi indüklerken aynı zamanda hipertrofiye yol açtığı ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (van Caam vd., 2015; Morgan vd., 2020). Kondrosit ve kök hücrelerin birlikte kültürlendiği transwell kültüre 10ng/mL gibi düşük bir dozda BMP-9 ilave

edildiğinde kondrosit hipertrofisine sebep olmaksızın kondrogenезisi indüklemektedir. Laboratuvarımızda yaptığımız çalışmada kondrositler ile kök hücrelerin birlikte kültürlendiği transwell kültürde BMP-9 ilave edilmesinin kondrosit hipertrofik belirteçlerden MMP-13 ve RUNX-2 gen ifadelerini önemli derecede artırmadığı görüldü (Akgün vd., 2022). Ancak BMP-9'un kondrojenik farklılaşma potansiyelinin daha iyi anlaşılması için SSMKH'lerinin kondrojenik farklılaştırma medyumuna sadece BMP-9 ilave edilerek kültürlendiği bir grubun daha oluşturulmasının uygun olacağını düşünüyoruz.

BMP-9 ve TGF- β 3'ün birlikte kondrojenik farklılaşma medyumunda kullanılarak hücrelerin kültürlendiği 6. grupta kontrol grubuna göre COL2A1 ($p < 0,001$), SOX9 ($p < 0,001$) ve ACAN ($p < 0,05$) gen ifadeleri bakımından istatistiksel olarak önemli bir artış gösterdi. COL10A1 gen ifadesinde ise artış olmasına karşın istatistiki olarak anlamlı değildi. Benzer şekilde yaptığımız farklı bir çalışmada BMP-9 ve TGF- β 3'ün birlikte kondrojenik farklılaşma medyumunda kullanılmasının hipertrofiye yol açmadığını belirledik (Akgün vd., 2022). 3. grup ile karşılaştırıldığında 6. grupta COL2A1 ($p < 0,01$) ve SOX9 ($p < 0,01$) gen ifadelerinde istatistiki olarak önemli bir fark gözlemlendi. 3. grupta kondrositler ile birlikte kök hücrelerin kültürlenmesi kondrogenезisi indüklemekle birlikte 3. grup ile karşılaştırılan 6. grupta BMP-9 ve TGF- β 3'ün birlikte kondrogenезis üzerine güçlü sinerjik etkisi görülüyor. Bununla birlikte 2. grup ile 6. grubu karşılaştırdığımızda yine 6. grupta COL2A1 ($p < 0,05$) ve SOX9 ($p < 0,05$) gen ifadesinin önemli derecede arttığı görülüyor. Bu durum sinerjik etkiye sadece büyüme faktörlerinin değil aynı zamanda kondrositlerinde katkıda bulunduğunu ortaya çıkarmaktadır. Bulgularımızla tutarlı olarak, TGF- β 3 birlikte kullanıldığında, BMP-2'nin, tek başına TGF- β 3 eklenmiş gruba göre COL II gen ifadesini daha fazla indüklediği rapor edildi (Schmitt vd., 2003). Diğer bir çalışmada ise, 10ng/mL BMP-2, 4, 7 'nin TGF- β 3 ile beraber kullanılmasının COL II gen ifadesini artırdığı bildirildi (Hennig vd., 2007). Dolayısıyla hem büyüme faktörleri (10ng/mL BMP-9 ve TGF- β 3) hem de kondrositler transwell kültürde kondrogenезis üzerine sinerjik bir etki göstermektedirler.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

- 1) SSMKH'ler güçlü kondrojenik farklılaşma potansiyeline sahiptir.
- 2) Kondrositler SSMKH'ler ile birlikte kültürlendiğinde hipertrofiye neden olmaksızın kondrogenezisi indüklemektedir.
- 3) Kondrositler ile SSMKH'lerin birlikte kültürlendiği transwell kültür sistemine TGF- β 3 eklendiğinde hipertrofiye neden olmaksızın kondrogenezisi indüklemektedir.
- 4) Kondrositler ile SSMKH'lerin birlikte kültürlendiği transwell kültür sistemine BMP-9 eklendiğinde hipertrofiye neden olmaksızın kondrogenezisi indüklemektedir
- 5) Hem büyüme faktörleri (TGF- β 3 ve BMP-9) hem de kondrositler birlikte özellikle COL2A1 ve SOX9 gen ifadelerini arttırarak SSMKH'lerin kondrojenik farklılaşması üzerine sinerjik etki gösterirler.

Gruplar arası anlamlı bir farkın olup olmadığını anlamak amacıyla pozitif kontrol grubu olarak sadece kondrositlerin bulunduğu bir grubun ilave edilmesi faydalı olacaktır.

BMP-9'un ilave edildiği kondrojenik farklılaştırma medyumu ile kültürlenmiş SSMKH grubu ve TGF- β 3 ve BMP-9'un ilave edildiği kondrojenik farklılaştırma medyumu ile kültürlenmiş SSMKH gruplarının kondrogenezis üzerine etkisi araştırılmalıdır. Ayrıca bu büyüme faktörlerinin farklı dozlarının ve uygulanma sürelerinin kondrojenik farklılaşma üzerine etkisinin araştırılması yeni protokollerin geliştirilmesi açısından önemlidir.

Bunlara ilaveten Transwell kültürün hipoksik şartlarda kültüre edilmesiyle kondrogenezis üzerine etkisi araştırılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Acharya, C., Adesida, A., Zajac, P., Mumme, M., Riesle, J., Martin I., Barbero, A. (2012). Enhanced chondrocyte proliferation and mesenchymal stromal cells chondrogenesis in coculture pellets mediate improved cartilage formation. *Journal of cellular physiology*, 227(1): 88–97.
- Adin, C. A., Gregory, C. R., Kyles, A. E., Cowgill, L. (2001). Diagnostic predictors of complications and survival after renal transplantation in cats. *Veterinary Surgery*, 30(6): 515-521
- Ahmed, N., Dreier, R., Göpferich, A., Grifka, J., Grässel, S. (2007). Soluble signalling factors derived from differentiated cartilage tissue affect chondrogenic differentiation of rat adult marrow stromal cells. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 20(5): 665–678.
- Akgün, E. E., Demirtaş, E., Özden Akkaya, Ö., Erdoğan, M., Altunbaş, K. (2022). Effect of Chondrogenic Differentiation Medium Supplemented with BMP-9 and TGF-β3 on Hypertrophy in Transwell Co-Culture. *Kocatepe Veterinary Journal*, 15 (2): 217-222.
- Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A., de Crombrughe, B. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & development*, 16(21): 2813–2828.
- Akiyama, H., Lyons, J. P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., Deng, J. M., Taketo, M. M., Nakamura, T., Behringer, R. R., McCrea, P. D., de Crombrughe, B. (2004). Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes & development*, 18(9): 1072–1087.
- Amemiya, M., Tsuji, K., Katagiri, H., Miyatake, K., Nakagawa, Y., Sekiya, I., Muneta, T., Koga, H. (2020). Synovial fluid-derived mesenchymal cells have non-inferior chondrogenic potential and can be utilized for regenerative therapy as substitute for synovium-derived cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 523(2): 465–472.
- Ando, W., Kutcher, J. J., Krawetz, R., Sen, A., Nakamura, N., Frank, C. B., Hart, D. A. (2014). Clonal analysis of synovial fluid stem cells to characterize and identify stable mesenchymal stromal cell/mesenchymal progenitor cell phenotypes in a porcine model: a cell source with enhanced commitment to the chondrogenic lineage. *Cytotherapy*, 16(6): 776–788.
- Andrews P. W. (2002). From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 357(1420): 405–417.
- Aung, A., Gupta, G., Majid, G., Varghese, S. (2011). Osteoarthritic chondrocyte-secreted morphogens induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis and rheumatism*, 63(1): 148–158.

- Barky, A. R., Ali, E. M. M., Mohamed, T. M. (2017). Stem cells, classifications and their clinical applications. *Am J Pharmacol Ther*, 1: 1-7
- Ballock, R. T., Heydemann, A., Wakefield, L. M., Flanders, K. C., Roberts, A. B., Sporn, M. B. (1993). TGF-beta 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. *Developmental biology*, 158(2): 414–429.
- Benya, P. D., Padilla, S. R., Nimni, M. E. (1978). Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell*, 15(4): 1313–1321.
- Bernstein, P., Dong, M., Corbeil, D., Gelinsky, M., Günther, K. P., Fickert, S. (2009). Pellet culture elicits superior chondrogenic redifferentiation than alginate-based systems. *Biotechnology progress*, 25(4): 1146–1152.
- Bian, L., Zhai, D. Y., Mauck, R. L., Burdick, J. A. (2011). Coculture of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes reduces hypertrophy and enhances functional properties of engineered cartilage. *Tissue engineering. Part A*, 17(7-8): 1137–1145.
- Bieniasz, M., Chmura, A. Kwiatkowski, A. (2014). Stem cells—general characteristic and sources. *MEDtube Science Jun*, 2: 8-14.
- Bongso, A., Lee, E. H. (2005). Stem cells: their definition, classification and sources. *Stem Cells: from bench to bedside*, 1.
- Brazil, D. P., Church, R. H., Surrae, S., Godson, C., Martin, F. (2015). BMP signalling: agony and antagonism in the family. *Trends in cell biology*, 25(5): 249-264
- Buckwalter, J. A., Mankin, H. J., Grodzinsky, A. J. (2005). Articular cartilage and osteoarthritis. *Instructional course lectures*, 54: 465–480.
- Burk, J., Glauche, S. M., Brehm, W., Crovace, A., Francioso, E., Hillmann, A., Schubert, S., Lacitignola, L. (2017). Characterisation and intracellular labelling of mesenchymal stromal cells derived from synovial fluid of horses and sheep. *Veterinary journal (London, England: 1997)*: 222, 1–8.
- Camarero-Espinosa, S., Rothen-Rutishauser, B., Foster, E. J., Weder, C. (2016). Articular cartilage: from formation to tissue engineering. *Biomaterials science*, 4(5): 734–767.
- Caplan A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 9(5): 641–650.
- Carballo, C. B., Nakagawa, Y., Sekiya, I., Rodeo, S. A. (2017). Basic Science of Articular Cartilage. *Clinics in sports medicine*, 36(3): 413–425.
- Chang, W., Park, S. I., Jun, S. Y., Lee, E. J., Ham, H. J., Bae, Y., Kim, R., Park, M. S., Chung, Y. A., Im, N., Yoo, S. S., Lee, M. Y., Kim, J., Hwang, K. C., Yoon, C., Maeng, L. S. (2013). Therapeutic potential of autologous mesenchymal stem cells derived from synovial fluid in patients with degenerative arthritis. *Animal Cells and Systems*, 17(5): 315-324.
- Chen, H., Tan, X. N., Hu, S., Liu, R. Q., Peng, L. H., Li, Y. M., Wu, P. (2021). Molecular Mechanisms of Chondrocyte Proliferation and Differentiation. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9: 664168.

- Chen, S., Emery, S. E., Pei, M. (2009a). Coculture of synovium-derived stem cells and nucleus pulposus cells in serum-free defined medium with supplementation of transforming growth factor-beta1: a potential application of tissue-specific stem cells in disc regeneration. *Spine*, 34(12): 1272–1280.
- Chen, W. H., Lai, M. T., Wu, A. T., Wu, C. C., Gelovani, J. G., Lin, C. T., Hung, S. C., Chiu, W. T., Deng, W. P. (2009b). In vitro stage-specific chondrogenesis of mesenchymal stem cells committed to chondrocytes. *Arthritis and rheumatism*, 60(2): 450–459.
- Cheng, A., Genever, P. G. (2010). SOX9 determines RUNX2 transactivity by directing intracellular degradation. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 25(12): 2680–2689.
- Cheng, A., Gustafson, A. R., Schaner Tooley, C. E., Zhang, M. (2016). BMP-9 dependent pathways required for the chondrogenic differentiation of pluripotent stem cells. *Differentiation; research in biological diversity*, 92(5): 298–305.
- Cleary, M. A., van Osch, G. J., Brama, P. A., Hellingman, C. A., Narcisi, R. (2015). FGF, TGF β and Wnt crosstalk: embryonic to in vitro cartilage development from mesenchymal stem cells. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 9(4): 332–342.
- Cooke, M. E., Allon, A. A., Cheng, T., Kuo, A. C., Kim, H. T., Vail, T. P., Marcucio, R. S., Schneider, R. A., Lotz, J. C., Alliston, T. (2011). Structured three-dimensional co-culture of mesenchymal stem cells with chondrocytes promotes chondrogenic differentiation without hypertrophy. *Osteoarthritis and cartilage*, 19(10): 1210–1218.
- Craft, A. M., Ahmed, N., Rockel, J. S., Baht, G. S., Alman, B. A., Kandel, R. A., Grigoriadis, A. E., Keller, G. M. (2013). Specification of chondrocytes and cartilage tissues from embryonic stem cells. *Development (Cambridge, England)*, 140(12): 2597–2610.
- Cui, G. H., Wang, Y. Y., Li, C. J., Shi, C. H., Wang, W. S. (2016). Efficacy of mesenchymal stem cells in treating patients with osteoarthritis of the knee: A meta-analysis. *Experimental and therapeutic medicine*, 12(5): 3390–3400.
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., Luyten, F. P. (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and rheumatism*, 44(8): 1928–1942.
- De Sousa, E. B., Casado, P. L., Moura Neto, V., Duarte, M. E., & Aguiar, D. P. (2014). Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem cell research & therapy*, 5(5): 112.
- Decker R. S. (2017). Articular cartilage and joint development from embryogenesis to adulthood. *Seminars in cell & developmental biology*, 62, 50–56.
- DeLise, A. M., Fischer, L., Tuan, R. S. (2000). Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis and cartilage*, 8(5): 309–334.
- DeLise, A. M., Tuan, R. S. (2002). Analysis of N-cadherin function in limb mesenchymal chondrogenesis in vitro. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 225(2): 195–204.

- Deng, Z. H., Li, Y. S., Gao, X., Lei, G. H., Huard, J. (2018). Bone morphogenetic proteins for articular cartilage regeneration. *Osteoarthritis and cartilage*, 26(9): 1153-1161.
- Desancé, M., Contentin, R., Bertoni, L., Gomez-Leduc, T., Branly, T., Jacquet, S., Betsch, J. M., Batho, A., Legendre, F., Audigié, F., Galéra, P., Demoor, M. (2018). Chondrogenic Differentiation of Defined Equine Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord Blood for Use in Cartilage Repair Therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2): 537.
- Dodson, M. V., Vierck, J. L., Hossner, K. L., Byrne, K., McNamara, J. P. (1997). The development and utility of a defined muscle and fat co-culture system. *Tissue & cell*, 29(5): 517-524.
- Doerge, K. J., Sasaki, M., Kimura, T., Yamada, Y. (1991). Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *The Journal of biological chemistry*, 266(2): 894-902.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. j., Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4): 315-317.
- Dong, S., Yang, B., Guo, H., Kang, F. (2012). MicroRNAs regulate osteogenesis and chondrogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 418(4): 587-591.
- Dong, Y. F., Soung do, Y., Schwarz, E. M., O'Keefe, R. J., and Drissi, H. (2006). Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *J. Cell. Physiol.* 208, 77-86.
- Dy, P., Smits, P., Silvester, A., Penzo-Méndez, A., Dumitriu, B., Han, Y., de la Motte, C. A., Kingsley, D. M., Lefebvre, V. (2010). Synovial joint morphogenesis requires the chondrogenic action of Sox5 and Sox6 in growth plate and articular cartilage. *Developmental biology*, 341(2): 346-359.
- Enomoto, H., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Nomura, S., Himeno, M., Kitamura, Y., Kishimoto, T., Komori, T. (2000). Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *The Journal of biological chemistry*, 275(12): 8695-8702.
- Ferguson, C. M., Schwarz, E. M., Reynolds, P. R., Puzas, J. E., Rosier, R. N., O'Keefe, R. J. (2000). Smad2 and 3 mediate transforming growth factor-beta1-induced inhibition of chondrocyte maturation. *Endocrinology*, 141(12): 4728-4735.
- Fischer, J., Dickhut, A., Rickert, M., Richter, W. (2010). Human articular chondrocytes secrete parathyroid hormone-related protein and inhibit hypertrophy of mesenchymal stem cells in coculture during chondrogenesis. *Arthritis and rheumatism*, 62(9): 2696-2706.
- Fortier L. A. (2005). Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary surgery: VS*, 34(5): 415-423.
- 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 and tissue kinetics*, 3(4): 393-403.

- Fülber, J., Maria, D. A., da Silva, L. C., Massoco, C. O., Agreste, F., Baccarin, R. Y. (2016). Comparative study of equine mesenchymal stem cells from healthy and injured synovial tissues: an in vitro assessment. *Stem cell research & therapy*, 7, 35.
- Garcia, J., Wright, K., Roberts, S., Kuiper, J. H., Mangham, C., Richardson, J., Mennan, C. (2016). Characterisation of synovial fluid and infrapatellar fat pad derived mesenchymal stromal cells: The influence of tissue source and inflammatory stimulus. *Scientific reports*, 6, 24295.
- Ghosh, S., Laha, M., Mondal, S., Sengupta, S., Kaplan, D. L. (2009). In vitro model of mesenchymal condensation during chondrogenic development. *Biomaterials*, 30(33): 6530–6540.
- Giovannini, S., Diaz-Romero, J., Aigner, T., Heini, P., Mainil-Varlet, P., Nesic, D. (2010). Micromass co-culture of human articular chondrocytes and human bone marrow mesenchymal stem cells to investigate stable neocartilage tissue formation in vitro. *European cells & materials*, 20, 245–259.
- Goldring, M. B., Tsuchimochi, K., Ijiri, K. (2006). The control of chondrogenesis. *Journal of cellular biochemistry*, 97(1): 33–44.
- Goldring M. B. (2012). Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 4(4): 269–285.
- Goldring, S., Goldring, M. (2017). Biology of the Normal Joint. *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology*, 10th Edition, Elsevier, Philadelphia (p.1-19).
- Goumans, M. J., Mummery, C. (2000). Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *The International journal of developmental biology*, 44(3): 253–265.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25): 13625–13630.
- Grellier, M., Bordenave, L., Amédée, J. (2009). Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends in biotechnology*, 27(10): 562–571.
- Hall, B. K., Miyake, T. (2000). All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 22(2): 138–147.
- Hao, Y., Ran, Y., Lu, B., Li, J., Zhang, J., Feng, C., Fang, J., Ma, R., Qiao, Z., Dai, X., Xiong, W., Liu, J., Zhou, Q., Hao, J., Li, R., Dai, J. (2018). Therapeutic Effects of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells on Canine Radiation-Induced Lung Injury. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 102(2): 407–416.
- Harvanová, D., Tóthová, T., Sarišský, M., Amrichová, J., Rosocha, J. (2011). Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells. *Folia biologica*, 57(3): 119–124.
- Harrell, C. R., Markovic, B. S., Fellabaum, C., Arsenijevic, A., Volarevic, V. (2019). Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future

perspectives. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 109: 2318–2326.

Hatakeyama, A., Uchida, S., Utsunomiya, H., Tsukamoto, M., Nakashima, H., Nakamura, E., Pascual-Garrido, C., Sekiya, I., Sakai, A. (2017). Isolation and Characterization of Synovial Mesenchymal Stem Cell Derived from Hip Joints: A Comparative Analysis with a Matched Control Knee Group. *Stem cells international*, 2017, 9312329.

Hatsushika, D., Muneta, T., Horie, M., Koga, H., Tsuji, K., Sekiya, I. (2013). Intraarticular injection of synovial stem cells promotes meniscal regeneration in a rabbit massive meniscal defect model. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 31(9): 1354–1359.

Heldin, C. H., Miyazono, K., ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390(6659): 465–471.

Hennig, T., Lorenz, H., Thiel, A., Goetzke, K., Dickhut, A., Geiger, F., Richter, W. (2007). Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *Journal of cellular physiology*, 211(3): 682–691.

Hensley, M. T., Tang, J., Woodruff, K., Defrancesco, T., Tou, S., Williams, C. M., Breen, M., Meurs, K., Keene, B., & Cheng, K. (2017). Intracoronary allogeneic cardiosphere-derived stem cells are safe for use in dogs with dilated cardiomyopathy. *Journal of cellular and molecular medicine*, 21(8): 1503–1512.

Hildner, F., Concaro, S., Peterbauer, A., Wolbank, S., Danzer, M., Lindahl, A., Gatenholm, P., Redl, H., van Griensven, M. (2009). Human adipose-derived stem cells contribute to chondrogenesis in coculture with human articular chondrocytes. *Tissue engineering. Part A*, 15(12): 3961–3969.

Hwang, N. S., Im, S. G., Wu, P. B., Bichara, D. A., Zhao, X., Randolph, M. A., Langer, R., Anderson, D. G. (2011). Chondrogenic priming adipose-mesenchymal stem cells for cartilage tissue regeneration. *Pharmaceutical research*, 28(6): 1395–1405.

Hwang, N. S., Varghese, S., Puleo, C., Zhang, Z., Elisseeff, J. (2007). Morphogenetic signals from chondrocytes promote chondrogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of cellular physiology*, 212(2): 281–284.

Hubka, K. M., Dahlin, R. L., Meretoja, V. V., Kasper, F. K., Mikos, A. G. (2014). Enhancing chondrogenic phenotype for cartilage tissue engineering: monoculture and coculture of articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 20(6): 641–654.

Ilic, D., Polak, J. M. (2011). Stem cells in regenerative medicine: introduction. *British medical bulletin*, 98: 117–126.

Isobe, Y., Koyama, N., Nakao, K., Osawa, K., Ikeno, M., Yamanaka, S., Okubo, Y., Fujimura, K., Bessho, K. (2016). Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 45(1): 124–131.

- Jia, Z., Liang, Y., Xu, X., Li, X., Liu, Q., Ou, Y., Duan, L., Zhu, W., Lu, W., Xiong, J., Wang, D. (2018). Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from synovial fluid by magnetic-activated cell sorting (MACS). *Cell biology international*, 42(3): 262–271.
- Jikko, A., Kato, Y., Hiranuma, H., Fuchihata, H. (1999). Inhibition of chondrocyte terminal differentiation and matrix calcification by soluble factors released by articular chondrocytes. *Calcified tissue international*, 65(4): 276–279.
- Jones, E., Crawford, A. (2014). High chondrogenic potential of synovial fluid-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 16(11): 1595–1596.
- Jones, E. A., Crawford, A., English, A., Henshaw, K., Mundy, J., Corscadden, D., Chapman, T., Emery, P., Hatton, P., McGonagle, D. (2008). Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level. *Arthritis and rheumatism*, 58(6): 1731–1740.
- Jones, E. A., English, A., Henshaw, K., Kinsey, S. E., Markham, A. F., Emery, P., McGonagle, D. (2004). Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 50(3): 817–827.
- Jorgenson, K. D., Hart, D. A., Krawetz, R., Sen, A. (2018). Production of Adult Human Synovial Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells in Stirred-Suspension Culture. *Stem cells international*, 2018, 8431053.
- Kalra, K., Tomar, P. (2014). Stem Cell: Basics, Classification and Applications. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2, 919-930.
- Kawakami, Y., Ishikawa, T., Shimabara, M., Tanda, N., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Kuwana, T., Ueki, A., Noji, S., Nohno, T. (1996). BMP signaling during bone pattern determination in the developing limb. *Development (Cambridge, England)*, 122(11): 3557–3566.
- Kiani, C., Chen, L., Wu, Y. J., Yee, A. J., Yang, B. B. (2002). Structure and function of aggrecan. *Cell research*, 12(1): 19–32.
- Kolios, G., Moodley, Y. (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration; international review of thoracic diseases*, 85(1): 3–10.
- Kong, L., Zheng, L. Z., Qin, L., Ho, K. (2017). Role of mesenchymal stem cells in osteoarthritis treatment. *Journal of orthopaedic translation*, 9: 89–103.
- Kovermann, N. J., Basoli, V., Della Bella, E., Alini, M., Lischer, C., Schmal, H., Kubosch, E. J., Stoddart, M. J. (2019). BMP2 and TGF- β Cooperate Differently during Synovial-Derived Stem-Cell Chondrogenesis in a Dexamethasone-Dependent Manner. *Cells*, 8(6): 636.
- Koyama, N., Okubo, Y., Nakao, K., Osawa, K., Fujimura, K., Bessho, K. (2011). Pluripotency of mesenchymal cells derived from synovial fluid in patients with temporomandibular joint disorder. *Life sciences*, 89(19-20): 741–747.

- Krawetz, R. J., Wu, Y. E., Martin, L., Rattner, J. B., Matyas, J. R., Hart, D. A. (2012). Synovial fluid progenitors expressing CD90+ from normal but not osteoarthritic joints undergo chondrogenic differentiation without micro-mass culture. *PLoS one*, 7(8): e43616.
- Kristjánsson, B., Honsawek, S. (2014). Current perspectives in mesenchymal stem cell therapies for osteoarthritis. *Stem cells international*, 2014, 194318.
- Kubosch, E. J., Heidt, E., Bernstein, A., Böttiger, K., Schmal, H. (2016). The transwell coculture of human synovial mesenchymal stem cells with chondrocytes leads to self-organization, chondrogenic differentiation, and secretion of TGFβ. *Stem cell research & therapy*, 7(1): 64.
- Lamplot, J. D., Qin, J., Nan, G., Wang, J., Liu, X., Yin, L., Tomal, J., Li, R., Shui, W., Zhang, H., Kim, S. H., Zhang, W., Zhang, J., Kong, Y., Denduluri, S., Rogers, M. R., Pratt, A., Haydon, R. C., Luu, H. H., Angeles, J., Shi L. L., He, T. C. (2013). BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis. *American journal of stem cells*, 2(1): 1–21.
- Larijani, B., Esfahani, E. N., Amini, P., Nikbin, B., Alimoghaddam, K., Amiri, S., Malekzadeh, R., Yazdi, N. M., Ghodsi, M., Dowlati, Y., Sahraian, M. A., Ghavamzadeh, A. (2012). Stem cell therapy in treatment of different diseases. *Acta medica Iranica*, 50(2): 79–96.
- Lee, C. S., Burns, O. A., Raghuram, V., Kalisvaart, J., Boyan, B. D., Schwartz, Z. (2012). Adipose stem cells can secrete angiogenic factors that inhibit hyaline cartilage regeneration. *Stem cell research & therapy*, 3(4): 35.
- Lee, J. S., Im, G. I. (2010). Influence of chondrocytes on the chondrogenic differentiation of adipose stem cells. *Tissue engineering. Part A*, 16(12): 3569–3577.
- Lee, W. J., Hah, Y. S., Ock, S. A., Lee, J. H., Jeon, R. H., Park, J. S., Lee, S. I., Rho, N. Y., Rho, G. J., Lee, S. L. (2015). Cell source-dependent in vivo immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow and synovial fluid of minipigs. *Experimental cell research*, 333(2): 273–288.
- Leijten, J. C., Georgi, N., Wu, L., van Blitterswijk, C. A., Karperien, M. (2013). Cell sources for articular cartilage repair strategies: shifting from monocultures to cocultures. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 19(1): 31–40.
- Lettry, V., Hosoya, K., Takagi, S., Okumura, M. (2010). Coculture of equine mesenchymal stem cells and mature equine articular chondrocytes results in improved chondrogenic differentiation of the stem cells. *The Japanese journal of veterinary research*, 58(1): 5–15.
- Li, F., Chen, J., Gong, M., Bi, Y., Hu, C., Zhang, Y., Li, M. (2020). Isolation and Characterization of Human Synovial Fluid-Derived Mesenchymal Stromal Cells from Popliteal Cyst. *Stem cells international*, 2020, 7416493.
- Li, F., Tang, Y., Song, B., Yu, M., Li, Q., Zhang, C., Hou, J., Yang, R. (2019). Nomenclature clarification: synovial fibroblasts and synovial mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*, 10(1): 260.

- Li, J., Dong, S. (2016). The Signaling Pathways Involved in Chondrocyte Differentiation and Hypertrophic Differentiation. *Stem cells international*, 2016, 2470351.
- Li, N., Gao, J., Mi, L., Zhang, G., Zhang, L., Zhang, N., Huo, R., Hu, J., Xu, K. (2020). Synovial membrane mesenchymal stem cells: past life, current situation, and application in bone and joint diseases. *Stem cell research & therapy*, 11(1): 381.
- Liang, Y., Idrees, E., Szojka, A., Andrews, S., Kunze, M., Mulet-Sierra, A., Jomha, N. M., Adesida, A. B. (2018). Chondrogenic differentiation of synovial fluid mesenchymal stem cells on human meniscus-derived decellularized matrix requires exogenous growth factors. *Acta biomaterialia*, 80: 131–143.
- Liu, C., Yang, Y., He, G. (2017). Efficacy and safety of umbilical cord-mesenchymal stem cells transplantation for treating osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 25: S389.
- Liu, X., Sun, H., Yan, D., Zhang, L., Lv, X., Liu, T., Zhang, W., Liu, W., Cao, Y., Zhou, G. (2010). In vivo ectopic chondrogenesis of BMSCs directed by mature chondrocytes. *Biomaterials*, 31(36): 9406–9414.
- Luu, H. H., Song, W. X., Luo, X., Manning, D., Luo, J., Deng, Z. L., Sharff, K. A., Montag, A. G., Haydon, R. C., He, T. C. (2007). Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 25(5): 665–677.
- Lv, X., Zhou, G., Liu, X., Liu, H., Chen, J., Liu, K., Cao, Y. (2012). Chondrogenesis by co-culture of adipose-derived stromal cells and chondrocytes in vitro. *Connective tissue research*, 53(6): 492–497.
- Mackay, A. M., Beck, S. C., Murphy, J. M., Barry, F. P., Chichester, C. O., Pittenger, M. F. (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue engineering*, 4(4): 415–428.
- Majumdar, M. K., Wang, E., Morris, E. A. (2001). BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *Journal of cellular physiology*, 189(3): 275–284.
- Massagué, J., Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *The EMBO journal*, 19(8): 1745–1754.
- Massagué, J., Seoane, J., Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes & development*, 19(23): 2783–2810.
- Matsuda, T., Takami, T., Sasaki, R., Nishimura, T., Aibe, Y., Paredes, B. D., Quintanilha, L. F., Matsumoto, T., Ishikawa, T., Yamamoto, N., Tani, K., Terai, S., Taura, Y., Sakaida, I. (2017). A canine liver fibrosis model to develop a therapy for liver cirrhosis using cultured bone marrow-derived cells. *Hepatology communications*, 1(7), 691–703.
- Miao, Z., Jin, J., Chen, L., Zhu, J., Huang, W., Zhao, J., Qian, H., Zhang, X. (2006). Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell biology international*, 30(9): 681–687.

- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T., Miyazono, K. (2002). Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 7(12): 1191–1204.
- MacWilliams, P. S., Friedrichs, K. R. (2003). Laboratory evaluation and interpretation of synovial fluid. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 33(1): 153–178.
- Marinas-Pardo, L., García-Castro, J., Rodríguez-Hurtado, I., Rodríguez-García, M. I., Núñez-Naveira, L., Hermida-Prieto, M. (2018). Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Horse Allo 20) for the treatment of osteoarthritis-associated lameness in horses: characterization, safety, and efficacy of intra-articular treatment. *Stem Cells and Development*, 27(17): 1147–1160.
- Martinello, T., Gomiero, C., Perazzi, A., Iacopetti, I., Gemignani, F., DeBenedictis, G. M., Ferro, S., Zuin, M., Martines, E., Brun, P., Maccatrozzo, L., Chiers, K., Spaas, J. H., Patruno, M. (2018). Allogeneic mesenchymal stem cells improve the wound healing process of sheep skin. *BMC veterinary research*, 14(1): 202.
- Meretoja, V. V., Dahlin, R. L., Kasper, F. K., Mikos, A. G. (2012). Enhanced chondrogenesis in co-cultures with articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 33(27): 6362–6369.
- Meretoja, V. V., Dahlin, R. L., Wright, S., Kasper, F. K., Mikos, A. G. (2014). Articular chondrocyte redifferentiation in 3D co-cultures with mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 20(6): 514–523.
- Mo, X. T., Guo, S. C., Xie, H. Q., Deng, L., Zhi, W., Xiang, Z., Li, X. Q., & Yang, Z. M. (2009). Variations in the ratios of co-cultured mesenchymal stem cells and chondrocytes regulate the expression of cartilaginous and osseous phenotype in alginate constructs. *Bone*, 45(1): 42–51
- Morgan, B. J., Bauza-Mayol, G., Gardner, O., Zhang, Y., Levato, R., Archer, C. W., van Weeren, R., Malda, J., Conlan, R. S., Francis, L. W., Khan, I. M. (2020). Bone Morphogenetic Protein-9 Is a Potent Chondrogenic and Morphogenic Factor for Articular Cartilage Chondroprogenitors. *Stem cells and development*, 29(14): 882–894.
- Morito, T., Muneta, T., Hara, K., Ju, Y. J., Mochizuki, T., Makino, H., Umezawa, A., Sekiya, I. (2008). Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology (Oxford, England)*, 47(8): 1137–1143.
- Murata, D., Miyakoshi, D., Hatazoe, T., Miura, N., Tokunaga, S., Fujiki, M., Nakayama, K., Misumi, K. (2014). Multipotency of equine mesenchymal stem cells derived from synovial fluid. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, 202(1): 53–61.
- Murdoch, A. D., Grady, L. M., Ablett, M. P., Katopodi, T., Meadows, R. S., Hardingham, T. E. (2007). Chondrogenic differentiation of human bone marrow stem cells in transwell cultures: generation of scaffold-free cartilage. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25(11): 2786–2796.

- 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 research & therapy*, 9(1): 329.
- Ng HY, Alvin Lee KX, Shen YF (2017) Articular Cartilage: Structure, Composition, Injuries and Repair. *JSM Bone and Joint Dis* 1(2): 1010.
- Nurul, A. A., Azlan, M., Ahmad Mohd Zain, M. R., Sebastian, A. A., Fan, Y. Z., Fauzi, M. B. (2021). Mesenchymal Stem Cells: Current Concepts in the Management of Inflammation in Osteoarthritis. *Biomedicines*, 9(7): 785.
- Oberlender, S. A., Tuan, R. S. (1994). Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 120(1): 177–187.
- Olsen, B. R., Reginato, A. M., Wang, W. (2000). Bone development. *Annual review of cell and developmental biology*, 16: 191–220.
- Parekkadan, B., Milwid, J. M. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annual review of biomedical engineering*, 12: 87–117
- Patel, D. M., Shah, J., Srivastava, A. S. (2013). Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem cells international*, 2013, 496218.
- Perin, L., Sedrakyan, S., Da Sacco, S., De Filippo, R. (2008). Characterization of human amniotic fluid stem cells and their pluripotential capability. *Methods in cell biology*, 86: 85–99.
- 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 (New York, N.Y.)*, 284(5411): 143–147.
- Prado, A. A., Favaron, P. O., da Silva, L. C., Baccarin, R. Y., Miglino, M. A., Maria, D. A. (2015). Characterization of mesenchymal stem cells derived from the equine synovial fluid and membrane. *BMC veterinary research*, 11: 281.
- Qing, C., Wei-ding, C., Wei-min, F. (2011). Co-culture of chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells in vitro enhances the expression of cartilaginous extracellular matrix components. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 44(4): 303–310.
- Rajabzadeh, N., Fathi, E., Farahzadi, R. (2019). Stem cell-based regenerative medicine. *Stem cell investigation*, 6: 19.
- Reddi A. H. (1994). Bone and cartilage differentiation. *Current opinion in genetics & development*, 4(5): 737–744.
- Reddi A. H. (2003). Cartilage morphogenetic proteins: role in joint development, homeostasis, and regeneration. *Annals of the rheumatic diseases*, 62 Suppl 2(Suppl 2): ii73–ii78.
- Renaud, J., Martinoli, M. G. (2016). Development of an Insert Co-culture System of Two Cellular Types in the Absence of Cell-Cell Contact. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (113): 10.3791/54356.

- Rippon, H. J., Bishop, A. E. (2004). Embryonic stem cells. *Cell proliferation*, 37(1): 23-34
- Sarsenova, M., Issabekova, A., Abisheva, S., Ruts kaya-Moroshan, K., Ogay, V., Saparov, A. (2021). Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Rheumatoid Arthritis. *International journal of molecular sciences*, 22(21): 11592.
- Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M. M., Davies, J. E. (2005). Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 23(2): 220–229.
- Scanzello, C. R., Goldring, S. R. (2012). The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone*, 51(2): 249–257.
- Schmidt, T. A., Sah, R. L. (2007). Effect of synovial fluid on boundary lubrication of articular cartilage. *Osteoarthritis and cartilage*, 15(1): 35–47.
- Schmitt, B., Ringe, J., Häupl, T., Notter, M., Manz, R., Burmester, G. R., Sittinger, M., Kaps, C. (2003). BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. *Differentiation; research in biological diversity*, 71(9-10): 567–577.
- Schulze-Tanzil G. (2009). Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft*, 191(4): 325–338.
- Schulze-Tanzil, G., de Souza, P., Villegas Castrejon, H., John, T., Merker, H. J., Scheid, A., Shakibaei, M. (2002). Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell and tissue research*, 308(3): 371–379.
- Schulze-Tanzil, G., Mobasheri, A., de Souza, P., John, T., Shakibaei, M. (2004). Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient Shc-Erk interaction and apoptosis. *Osteoarthritis and cartilage*, 12(6): 448–458.
- Sekiya, I., Ojima, M., Suzuki, S., Yamaga, M., Horie, M., Koga, H., Tsuji, K., Miyaguchi, K., Ogishima, S., Tanaka, H., Muneta, T. (2012). Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 30(6): 943–949.
- Shi, Y., Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6): 685–700.
- Shimomura, K., Ando, W., Tateishi, K., Nansai, R., Fujie, H., Hart, D. A., Kohda, H., Kita, K., Kanamoto, T., Mae, T., Nakata, K., Shino, K., Yoshikawa, H., Nakamura, N. (2010). The influence of skeletal maturity on allogenic synovial mesenchymal stem cell-based repair of cartilage in a large animal model. *Biomaterials*, 31(31): 8004–8011.
- Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S., Hopkinson, A. (2014). Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 32(6): 1380–1389.

- Solchaga, L. A., Penick, K., Goldberg, V. M., Caplan, A. I., Welter, J. F. (2010). Fibroblast growth factor-2 enhances proliferation and delays loss of chondrogenic potential in human adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. Part A*, 16(3): 1009–1019.
- Song, B., Estrada, K. D., Lyons, K. M. (2009). Smad signaling in skeletal development and regeneration. *Cytokine & growth factor reviews*, 20(5-6): 379–388.
- Song, H., Park, K. H. (2020). Regulation and function of SOX9 during cartilage development and regeneration. *Seminars in cancer biology*, 67(Pt 1): 12–23.
- Sophia Fox, A. J., Bedi, A., Rodeo, S. A. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports health*, 1(6): 461–468.
- Tamer T. M. (2013). Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdisciplinary toxicology*, 6(3): 111–125.
- Tang, H. C., Chen, W. C., Chiang, C. W., Chen, L. Y., Chang, Y. C., Chen, C. H. (2015). Differentiation Effects of Platelet-Rich Plasma Concentrations on Synovial Fluid Mesenchymal Stem Cells from Pigs Cultivated in Alginate Complex Hydrogel. *International journal of molecular sciences*, 16(8): 18507–18521.
- Thielen, N., van der Kraan, P. M., van Caam, A. (2019). TGF β /BMP Signaling Pathway in Cartilage Homeostasis. *Cells*, 8(9): 969.
- Toh WS, Foldager CB, Hui JH, Olsen BR, Spector M. Exploiting Stem Cell-Extracellular Matrix Interactions for Cartilage Regeneration: A Focus on Basement Membrane Molecules. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2016;11(8):618-625.
- Ulrich-Vinther, M., Maloney, M. D., Schwarz, E. M., Rosier, R., O'Keefe, R. J. (2003). Articular cartilage biology. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 11(6): 421–430.
- Umar S. (2010). Intestinal stem cells. *Current gastroenterology reports*, 12(5): 340–348.
- Van Caam, A., Blaney Davidson, E., Garcia de Vinuesa, A., van Geffen, E., van den Berg, W., Goumans, M. J., ten Dijke, P., van der Kraan, P. (2015). The high affinity ALK1-ligand BMP9 induces a hypertrophy-like state in chondrocytes that is antagonized by TGF β 1. *Osteoarthritis and cartilage*, 23(6): 985–995.
- Van der Kraan, P. M., Blaney Davidson, E. N., Blom, A., van den Berg, W. B. (2009). TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis and cartilage*, 17(12): 1539–1545.
- Van Loon, V. J., Scheffer, C. J., Genn, H. J., Hoogendoorn, A. C., Greve, J. W. (2014). Clinical follow-up of horses treated with allogeneic equine mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood for different tendon and ligament disorders. *Veterinary Quarterly*, 34(2): 92-97

- Varshney, R. R., Zhou, R., Hao, J., Yeo, S. S., Chooi, W. H., Fan, J., Wang, D. A. (2010). Chondrogenesis of synovium-derived mesenchymal stem cells in gene-transferred co-culture system. *Biomaterials*, 31(26): 6876–6891.
- Vats, A., Bielby, R. C., Tolley, N., Dickinson, S. C., Boccaccini, A. R., Hollander, A. P., Bishop, A. E., Polak, J. M. (2006). Chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells: the effect of the micro-environment. *Tissue engineering*, 12(6): 1687–1697.
- Venter, C., Niesler, C. (2018). A triple co-culture method to investigate the effect of macrophages and fibroblasts on myoblast proliferation and migration. *BioTechniques*, 64(2): 52–58.
- Villatoro, A. J., Fernández, V., Claros, S., Rico-Llanos, G. A., Becerra, J., Andrades, J. A. (2015). Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. *BioMed research international*, 2015.
- Von der Mark, H., von der Mark, K., Gay, S. (1976). Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluorescence. I. Preparation of collagen type I and type II specific antibodies and their application to early stages of the chick embryo. *Developmental biology*, 48(2): 237–249.
- Walmsley, J. P., Phillips, T. J., Townsend, H. G. G. (2003). Meniscal tears in horses: an evaluation of clinical signs and arthroscopic treatment of 80 cases. *Equine veterinary journal*, 35(4): 402–406
- Wang, M., Rahnama, R., Cheng, T., Grotkopp, E., Jacobs, L., Limburg, S., Kim, H. T., Kuo, A. C. (2013). Trophic stimulation of articular chondrocytes by late-passage mesenchymal stem cells in coculture. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 31(12): 1936–1942.
- Wei, Y., Zeng, W., Wan, R., Wang, J., Zhou, Q., Qiu, S., Singh, S. R. (2012). Chondrogenic differentiation of induced pluripotent stem cells from osteoarthritic chondrocytes in alginate matrix. *European cells & materials*, 23: 1–12.
- Wu, L., Leijten, J. C., Georgi, N., Post, J. N., van Blitterswijk, C. A., Karperien, M. (2011). Trophic effects of mesenchymal stem cells increase chondrocyte proliferation and matrix formation. *Tissue engineering. Part A*, 17(9-10): 1425–1436.
- Wu, L., Prins, H. J., Helder, M. N., van Blitterswijk, C. A., Karperien, M. (2012). Trophic effects of mesenchymal stem cells in chondrocyte co-cultures are independent of culture conditions and cell sources. *Tissue engineering. Part A*, 18(15-16): 1542–1551.
- Xu, L., Wang, Q., Xu, F., Ye, Z., Zhou, Y., Tan, W. S. (2013). Mesenchymal stem cells downregulate articular chondrocyte differentiation in noncontact coculture systems: implications in cartilage tissue regeneration. *Stem cells and development*, 22(11): 1657–1669.
- Xu, L., Wu, Y., Xiong, Z., Zhou, Y., Ye, Z., Tan, W. S. (2016). Mesenchymal Stem Cells Reshape and Provoke Proliferation of Articular Chondrocytes by Paracrine Secretion. *Scientific reports*, 6: 32705.
- Yoon, B. S., Lyons, K. M. (2004). Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *Journal of cellular biochemistry*, 93(1): 93–103.
- Yoon, Y. S., Wecker, A., Heyd, L., Park, J. S., Tkebuchava, T., Kusano, K., Hanley, A., Scadova, H., Qin, G., Cha, D. H., Johnson, K. L., Aikawa, R., Asahara, T., & Losordo, D. W. (2005).

- Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *The Journal of clinical investigation*, 115(2): 326–338.
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem cell research & therapy*, 10(1): 68.
- Zayed, M., Caniglia, C., Misk, N., Dhar, M. S. (2017). Donor-Matched Comparison of Chondrogenic Potential of Equine Bone Marrow- and Synovial Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells: Implications for Cartilage Tissue Regeneration. *Frontiers in veterinary science*, 3: 121.
- Zayed, M., Newby, S., Misk, N., Donnell, R., Dhar, M. (2018). Xenogenic Implantation of Equine Synovial Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells Leads to Articular Cartilage Regeneration. *Stem cells international*, 2018, 1073705.
- Zhang, L., Zheng, L., Fan, H. S., Zhang, X. D. (2017). A scaffold-filter model for studying the chondrogenic differentiation of stem cells in vitro. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 70(Pt 2): 962–968.
- Zhao, Q., Eberspaecher, H., Lefebvre, V., De Crombrughe, B. (1997). Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 209(4): 377–386.
- Zhu, C., Wu, W., Qu, X. (2021). Mesenchymal stem cells in osteoarthritis therapy: a review. *American journal of translational research*, 13(2): 448–461.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, 13(12): 4279–4295.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*, 7(2): 211–228.
- Zuo, Q., Cui, W., Liu, F., Wang, Q., Chen, Z., Fan, W. (2013). Co-cultivated mesenchymal stem cells support chondrocytic differentiation of articular chondrocytes. *International orthopaedics*, 37(4): 747–752.

