



İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal stromal hücrelerin kıkırdak ve kemik hücrelerine farklılaşma potansiyelinin değerlendirilmesi

Evaluation of differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells to cartilage and bone cells

Emine KILIÇ,^{1,2} Taşkın CEYHAN,³ Duygu Uçkan ÇETİNKAYA¹

¹Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi; ²Hemosoft Bilişim ve Eğitim Hizmetleri Ltd. A.Ş., Hacettepe Teknokent/Beytepe Kampüsü; ³Özel Çevre Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Bölümü

Amaç: Bu çalışmada, sağlıklı insan kemik iliğinden ayrılarak çoğaltılan mezenkimal destekdoku (stromal) hücrelerinin (MSH) fiziksel özelliklerine ve yüzey antijenlerine göre tanımlanması, osteoblast ve kondroblast yönünde farklılaşma potansiyelinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışma planı: Yaşları dört ay ile 18 yıl arasında değişen 10 kemik iliği transplantasyon vericisinden toplanan kemik iliğinin 1-3 ml'sinden gradiyent yöntemiyle mononükleer hücreler ayrıldı ve içinde %10 fetal dana serumu bulunan tüplerde kültüre edildi. Tabana yapışma gösteren fibroblastik görüntüde olan hücreler çoğaltıldı. Akım sitometri aygıtı ile hücrelerin yüzey antijenlerine göre immünofenotiplendirmesi yapıldı. Tanımlanan mezenkimal stromal hücrelerin osteoblast ve kondroblast uyarıcı medyumları kullanılarak kondroblast ve osteoblasta farklılaşması incelendi. Osteoblastlar Alizarin kırmızısı, kondroblastlar ise Alsiyan mavisi ile boyanarak mikrofotografları çekildi.

Sonuçlar: Canlı-dışı (*in vitro*) çoğaltılan MSH'lerin biçim ve yapışma özellikleri yaşa bağlı farklılık göstermedi. Destekdoku kaynaklı olabilecek hücrelerde karakteristik CD105, CD44, CD166, CD29, CD90 ve CD73 antikorlarına karşı %90-99 arası pozitif sonuç, hematopoietik hücelere özgü CD45, CD34, CD14 ve HLA-DR antikorlarına karşı negatif (%0-5) sonuç elde edildi. Hücre tipine özel besiyerlerinde çoğaltılan MSH'lerin, ilerleyen altkültürler (pasajlar) de dahil olmak üzere, tüm altkültürlerde (p1-15) osteoblast ve kondroblast hücrelerine farklılaştığı gözlemlendi.

Çıkarımlar: Mezenkimal destekdoku hücrelerin, kemik iliği aktarımı, kalıtsal hastalıklar ve organ hasarında; ortopedide kullanılması düşünülen biyomalzemelerin biyolojik etkilerinin canlı-dışı incelemesinde; kemik ve kıkırdak dokusundaki hasarlı bölgelerin tamirinde kullanılması mümkün görünmektedir.

Anahtar sözcükler: Kemik iliği; hücre kültürü teknikleri; hücre farklılaşması; mezenkimal kök hücre; osteoblast; rejenerasyon.

Objectives: This study was designed to identify the characteristics and surface antigen properties of mesenchymal stromal cells (MSC) isolated and cultured from bone marrow of healthy subjects and to assess their differentiation potential to osteoblast and chondroblast lineage cells.

Methods: Mononuclear cells were isolated by density-gradient separation from 1-3 ml of bone marrow collected from 10 donors of bone transplantation aged between 4 months and 18 years. These mononuclear cells were cultured in flasks containing %10 fetal calf serum, which resulted in growth of fibroblast-like cells showing adhesion onto the culture flask. Physical properties of the cells were identified and flow cytometric immunophenotyping was performed to specify surface antigen properties. Differentiation of mesenchymal stromal cells in specific media to chondroblasts and osteoblasts was evaluated. Osteoblasts and chondroblasts were stained with Alizarin red and Alcian blue, respectively, and microphotographed.

Results: *In vitro* yield of MSCs showed no age-related differences in terms of morphological and adhesive properties. While cells of stromal origin showed strong positivity (90% to 99%) to characteristic CD105, CD44, CD166, CD29, CD90, and CD73 antibodies, hematopoietic cells remained negative (0% to 5%) to CD45, CD34, CD14, and HLA-DR antibodies. It was observed that MSCs produced in cell-specific media differentiated to osteoblasts and chondroblasts in all passages (p1-15) tested, including late passages.

Conclusion: It seems that the use of MSCs would provide promising treatment strategies in bone marrow transplantation, inherited diseases, and organ repair; in *in vitro* assessment of biological effects of biomaterials in orthopedics; and in repair of bone and cartilage injuries.

Key words: Bone marrow; cell culture techniques; cell differentiation; mesenchymal stem cells; osteoblasts; regeneration.

Kemik hasarlarının tedavisinde kullanılan otojen kemik yamalarının (greftlerinin) elde edilmesi zor olup, hasta rahatsızlığını artıran bir işlemdir. Aynı şekilde, kırıkta hasarlarında otojen veya allojen doku nakli veya yapay (sentetik) tıbbi ürünlerin kullanımı da oldukça zor cerrahi girişimler gerektirmektedir. Ayrıca, otojen veya allojen yama alınacak kemik ve kırıkta bölgelerinin sınırlı olması nedeniyle yamalar yetersiz kalmaktadır. Bu sorunların giderilmesinde otojen veya allojen erişkin kökhücrelerin kullanım üstünlükleri son yıllarda sıklıkla gündeme gelmektedir.^[1]

Kökhücrelerin bölünerek benzer hücreler meydana getirme ve yüksek farklılaşma özelliği sayesinde hasarlı doku tamiri mümkün görünmektedir. Böylece, doku kaybı ile işlevlerini yitirmiş olan organların iyileşmesinde katkılarının olabileceği düşünülmektedir. Son zamanlarda konuyla ilgili çalışmalar hız kazanmış, miyokard, böbrek, kemik dokusu ve eklem kırıkta hasarlarında kökhücrelerin tedavi amaçlı kullanılabilirliği bildirilmiştir.^[2-7] Mezenkimal kökhücreler, yeni isimlendirme ile mezenkimal stromal hücreler (MSH)^[8] kolay çoğalma, yüksek farklılaşma ve bağışıklık baskılayıcı (immünsupresif) özellikleri nedeniyle bu amaç için çok uygun hücreler olarak gözükmekte ve kemik iliğinden kolaylıkla elde edilebilmektedir.^[9] Mezenkimal stromal hücrelerin kemik iliği dahil tüm dokularda çok az sayıda bulunması nedeniyle deneysel veya klinik olarak kullanımı için canlı-dışı (*in vitro*) kültür besiyerine ekilmesi gerekir. Çoğalan hücrelerin istenilen doku yönünde farklılaşmasını sağlamak için de gerekli büyüme faktörleri veya diğer uyarıların ortama eklenmesi gerekmektedir.

Bu önçalışmada, sağlıklı vericilerden çekilmiş kemik iliğinden MSH'lerin ayrılması ve canlı-dışı çoğaltılması tekniği, daha sonra da osteoblast ve kondroblastta farklılaşma kapasiteleri araştırıldı.

Hastalar ve yöntem

Etik kurul onayı alınarak Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Bölümü/Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi'nde, HLA 6/6 uygun kemik iliği vericilerinden, yaşları, 4 ay ile 18 yaş arasında olan 10 sağlıklı vericinin kemik iliği çalışmaya alındı. Ameliyathane koşullarında toplanan (300-800 ml) kemik iliğinin yaklaşık 1-3 ml'si çalışma için kullanıldı.

MSH'lerin ayrılması

Alınan kemik iliği örneğindeki mononükleer hücreler yoğunluk derecelendirmeli ayrıştırma yöntemiy-

le elde edildi. Kemik iliği 1:2 oranında PBS (phosphate-buffered saline) ile seyreltildi ve yoğunluğu 1.077 gr/ml olan Ficoll üzerine tabakalandırıldıktan sonra 2000 rpm'de 15 dakikada ayrıştırıldı. Toplanan hücreler iki kez PBS ile yıkandıktan sonra canlılıkları trypan boyası, hücre sayısı Thoma lamında ve hücre sayım aygıtı (Nucleocounter YC-100 System, ChemoMetec A/S, Danimarka) ile belirlendi. Daha sonra hücreler 25 cm²'lik tüplerde (flask) 2x10⁶ hücre/cm² olacak şekilde %10 FCS (Biological Industries, İsrail), %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içeren 5 ml DMEM-LG (Biological Industries, İsrail) ortam içine ekildi ve 37 °C, %5 CO₂ ve nemli ortamda ekilerek çoğaltıldı.

Kültürler 24 ve 48 saat sonra ortamı yenilenerek tüp tabanına yapışmayan hücrelerin ayrılması sağlandı. Her gün düzenli olarak ters çevrilmiş ışık mikroskopuyla kontrol edilip 3-4 günde bir besiyeri değiştirilerek çoğaltmaya devam edildi. Hücreler 7-12 gün sonra, yarı yayılmış durumda tüp tabanını %70-80 kapladığında %0.25'lik tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırıldı. Sonraki ekimler 2x10³ hücre/cm² olacak şekilde 75 cm²'lik tüplere yapılarak hücreler geliştirildi.^[10]

MSH'lerin immünofenotiplendirilmesi (Akım sitometri çalışması)

İnsan kemik iliğinden ayrılan hücreler akım sitometri aygıtında özgün antikorlar ile tanımlandı. Antikor paneline stromal kökenli hücrelere özgü CD105, CD44, CD166, CD29, CD90 ve CD73 antikorları (Becton Dickinson, ABD) yanında hematopoietik hücrelere özgü CD45, CD34, CD14 (Becton Dickinson) ve HLA-DR (Chemicon, ABD) antikorları konuldu. Çalışmalar Beckman Coulter Epix Elite ESP (Beckman Coulter, ABD) akım sitometri aygıtında çözümlendi.^[11]

Osteoblast farklılaşması: Tripsin enzimi etkisine bırakılmış olan üçüncü ekimdeki (pasaj) MSH'ler 9.6 cm²'lik polipropilen petri kaplarına 2x10³ hücre/cm² olacak şekilde ekildi. Hücreler, tabana tam yayılmış durumdayken DMEM-LG (Euroclone, İngiltere) içirisine 10% FCS (Euroclone), 100 nM deksametazon (Sigma, ABD), 10 mM beta-gliserofosfat (Sigma) ve 0.2 mM askorbik asit (Sigma) ilave edilerek hazırlanmış osteoblast farklılaşma ortamı içine alındı ve 21 gün süresince 3-4 gün aralıklarla ortam değiştirilerek takip edildi. Bu süre sonunda farklılaşan hücreler Alizarin kırmısı ile boyanarak belirlendi.^[12]

Kondroblast farklılaşması: 2.5×10^5 sayıda MSH'ler 15 ml'lik polipropilen tüplere konuldu. Tüp 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücre topağı (pellet) oluşturuldu. Tüp içerisindeki hücreler 37°C de 5% CO_2 'li ve nemli etüv içerisinde 24 saat kuluçkalığa bırakıldı. Kuluçkalık sonunda DMEM-HG (Euroclone) içerisine 100 nM deksametazon (Sigma), 10 ng/ml TGF- β 3 (Peprotech, ABD), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ askorbik asit (Sigma) ve 50 mg/ml ITS+Premix (Becton Dickinson) ilave edilerek hazırlanan kırıkta oluşma besiyeri ilave edildi ve 21 gün süresince 3-4 gün aralıklarla ortam değiştirilerek takip edildi. Bu süre sonunda farklılaşması beklenen hücre topağından 5 μm kalınlığında donmuş (frozen) kesitler alındı. Alınan kesitlerde kondroblast farklılaşması Alsiyan mavisi ile boyanarak belirlendi.^[13]

Sonuçlar

On kemik iliği numunesinin hepsinden (%100) MSH elde edildi.

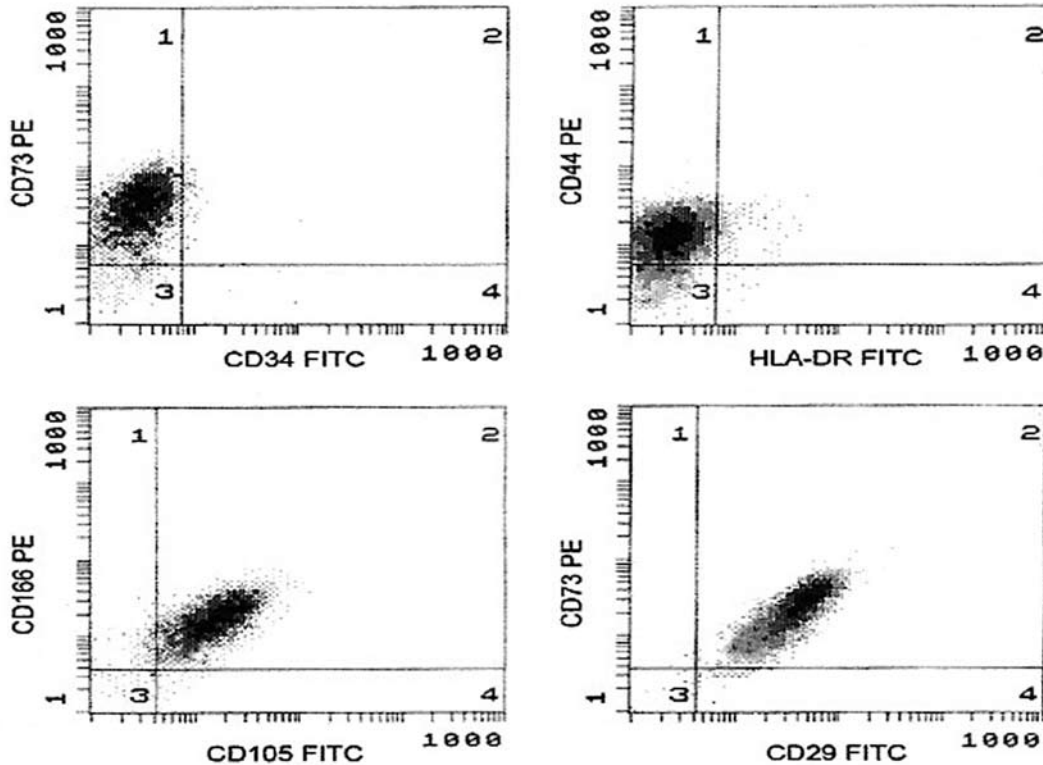
MSH'lerin fiziksel özellikleri: Hücrelerin biçimleri, kültüre konulduktan 24 saat sonra ışık veya zıt faz mikroskopi ile incelenerek belirlendi. İğ şeklinde ve fibroblast benzeri hücre topluluklarının tüp tabanına yapışmış oldukları gözlemlendi (Şekil 1). Canlı-dışı ortamda çoğaltılan hücrelerin 15 kez özelliklerini yi-



Şekil 1. Mezenkimal stromal hücrelerin kültürde morfolojik görünümünün mikrofotografı (x40).

tirmeden çoğaltıldığı görüldü. Hücre biçimlerinde, çoğalma hızında ve ekimlerin ilerletilmesinde yaşla ilgili bir farklılık gözlenmedi.

İmmünofenotiplendirme: Ayrılan mononükleer hücreler kültürde çoğaltıldıktan sonra akım sitometri aygıtı ile yüzey antijenleri belirlendi. Hücrelerin %90-99'unun MSH'lerin stromal ve yapışma özelliklerini gösteren CD105, CD166, CD73, CD29, CD90 ve CD44 antikorları ile pozitif sonuç verirken, hema-

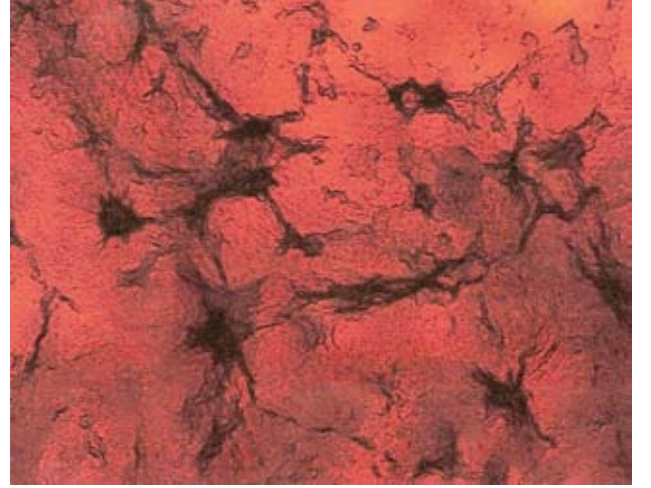


Şekil 2. Mezenkimal stromal hücrelerin immünofenotiplendirilmesi (x10).

topoietik hücelere özgü olan CD45, CD34, CD14 ve HLA-DR antikörler ile %0-5 oranında pozitif sonuç verdiği saptandı (Şekil 2).

Osteoblast ve kondroblasta farklılaşma: Mezenkimal stromal hücelerin ortamları içine katılan farklı uyaranlarla uyarılmaları sonrası osteoblast ve kondroblast geliştiği gözlemlendi. Çalışmalarda üçüncü veya dördüncü ekim hüceleri kullanıldı Ancak, birinci ve 15. ekim (n=3) hücelerin aynı potansiyeli taşıdığı izlendi. Hücelere farklılaşma ortamı içinde kültüre edildikten sonra her gün düzenli olarak kontrol edildi. İğ şeklindeki osteoblast benzeri hücelere iğsi yapısını kaybederek uzantılı dikdörtgen şeklinde üst üste çoğaldı. Bu nedenle, yedinci ve onuncu günlerde hücre hatları net olarak ayırt edilemedi. Yirmi bir gün sonunda, ışık mikroskobu ile hücelere arasında siyah kalsiyum apatit taneleri gözlemlendi. Alizarin kırmızısı ile boyanarak MSH'lerin osteoblast olarak farklılaştığı sonucuna varıldı (Şekil 3).

Kondroblast farklılaşması için, MSH'lerden oluşturulan topak üzerine 21 gün süresince kondroblasta farklılaştırma ortamı ilave edildi ve süre bitiminde hücre topağı dondurularak kesitler hazırlandı. Daha sonra Alsiyan mavisi ile boyanarak MSH'lerin kondroblast olarak farklılaştığı görüldü (Şekil 4, 5). Çalışmamızda da, hücre topağı elde edilerek çoğaltılan ve kırık yapılarını uyaran faktörlerle kuluçkaya bira-



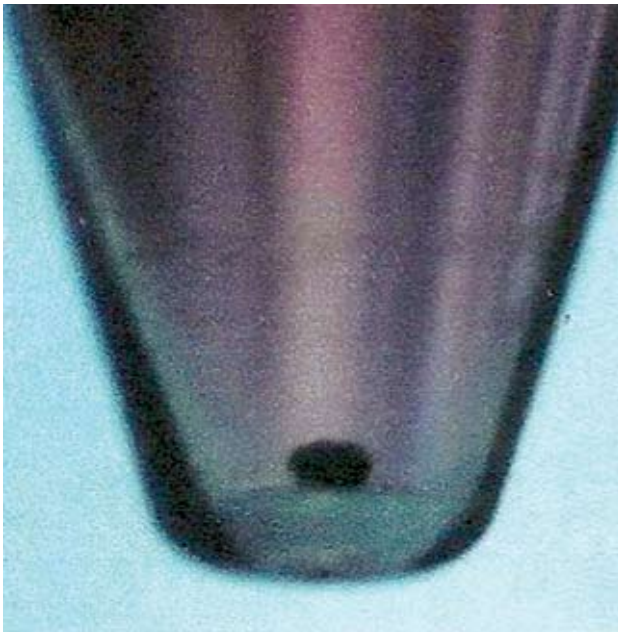
Şekil 3. Osteoblasta farklılaşan mezenkimal stromal hücelerin mikrofotografı (Alizarin kırmızısı x 10).

kılan hücelerin dört gün içerisinde kırık hücelere dönüştüğü gözlemlendi.

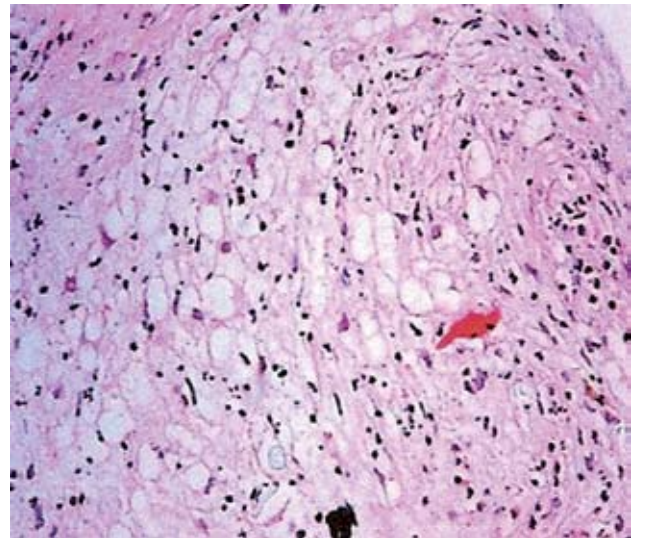
Yaşları 4 ay ile 18 yaş arasında olan sağlıklı vericilerden alınan kemik iliğinden ayrılan MSH'lerin osteoblast ve kondroblasta farklılaşmasında yaşla ilgili bir farklılık gözlemlenmedi. Yetişkin yaşta alınan kemik iliğindeki MSH'lerin kemik ve kırık hücelere oluşturma özellikleri çocukluk döneminde alınanlarla aynı bulundu.

Tartışma

Çalışmamız, çocuklarda bazı genetik hastalıkların tedavisi amaçlı Pedi-Stem Projesi dahilinde yapılan temel araştırmaların bir bölümüdür. Aldığımız numunelerin hepsi başarılı olarak çoğaltıldı (%100).



Şekil 4. Mezenkimal stromal hücelerin kondroblasta farklılaştırılması için oluşturulan hücre peleti (x10).



Şekil 5. Kondroblasta farklılaşan mezenkimal stromal hücelerin mikrofotografı (Alsiyan mavisi x 10).

Daha önce de, erişkin fare ve fare fetus kalvaryum hücrelerini çoğaltma tekniğini kullanarak yaptığımız bir deneysel çalışmada erişkin fare ve fare fetus kalvaryum osteoblastlarını çoğaltma tekniğini tanımlamıştık.^[14] On erişkin farenin ikisinde kısmen, dördünde başarılı kültür elde edilmişti. Fetus kalvaryum kültürlerinde ise, sekiz farenin altısında tam, birinde kısmen, birinde ise başarısız kültür elde edildi.^[14] Bir başka çalışmamızda ise, sıçan kemik iliği stromal hücreleri arasından osteoblast benzeri hücreleri ayırarak tanımlamış ve kültürde başarı oranını %93.8 bulmuştuk.^[15] Şimdiki çalışmamızda ise, kemik iliği MSH'den osteoblast farklılaşması yönünde uyarılan 10 örneğin tamamında osteoblastların geliştiği izlendi.

Yöntemimizde, hücreleri ayırmak için 1-3 ml kemik iliği numunesi kullanıldı. Bunun için en uygun miktarın 1-2 ml olduğu, fazla olması durumunda içinde bulunan kan hücreleri oranının artacağı, bunun da kültürdeki progenitor hücrelerin miktarını azaltacağı bildirilmiştir.^[16] Bunu önlemek amacıyla alınan örnek miktarı düşük tutulmuştur.

Küçük yaşlarda MSH'lerin bağ dokusu hücrelerine dönüşmesi daha fazla olmaktadır.^[11,17] Bu açıdan, çalışmamızda yaşla ilgili bir fark görülmedi. Yeni yetişkinin kemik iliğindeki MSH'lerin sayısı bin ile yüzbin arasında olup, alıcının yaşı ile azalmaktadır.^[18]

Kökhücrelerin özelliklerinin tanımlanmasındaki hızlı gelişmeler, insan doku hücrelerinin kökhücrelerinden farklılaştırılarak elde edilebileceği yönünde ümit vermektedir.^[6,11,17,19] Mezenkimal stromal hücrelerin bağ doku hücrelerine farklılaşma potansiyeli bulunduğu gösterilmesi, bu hücreleri iskelet sistemi bozuklukları tedavisinde kullanılacak önemli hücreler haline getirmiştir.^[6,20,21] Kemik iliğindeki stromal hücrelerin kırıkta dahil olmak üzere birçok bağ dokusu hücresi oluşturma özelliği olduğu saptanmıştır.^[11,21,22] Dekametazon kullanılarak yapılan kültürlerde 16. günde kondrosit nodülleri, 21. günde mineralize kemik nodülleri saptanmıştır.^[23]

Mezenkimal stromal hücrelerin kaynağı olarak en sık kemik iliği ve lipoaspirasyon materyalleri kullanılmaktadır.^[6] Bu çalışmada, vericilerden toplanan kemik iliğindeki mononükleer hücreler arasından yapışıcı karakterleri nedeniyle ayrılabilen MSH'lerin canlı-dışı kültürlerde çoğaltılmasıyla yeterli sayıda

hücre elde edilmiştir.^[11,17] Stromal hücreler, kemik iliğindeki mononükleer hücrelerin %2-3'ünü oluşturmaktadır.^[11] Dönüşme potansiyeli olan MSH'lerin tarif edilmesi için taşınması gereken minimal özelliklerden biri yapışma özelliğidir.^[21] Hücrelerin az olması önemli potansiyel taşıyan bu hücrelerin klinik amaçlı kullanımı için engel oluşturmaktadır.^[17] Uluslararası kabul edilmiş standartlarda, hastalara verilebilecek hücreleri çoğaltma şartlarını oluşturmak için ciddi ekonomik ve teknik altyapı gerekmektedir.^[20]

Uzun süre kültürlerde çoğaltılan hücrelerde bu-laşma, telomer kısalması, hücre genetik bozukluğu ve kanser yapma gibi özelliklerin gelişme olasılığı da başka bir sorun oluşturmaktadır.^[24,25] Son yıllarda MSH tedavilerinde bu sorunlarla karşılaşılmamıştır. Hastaların uzun süreli takip sonuçlarının izlenmesi gerekmektedir. Yine de çok tekrarlanan ekimler yerine erken ekimlerin kullanımı önerilmektedir. Yakın zamanda bildirilen bazı hayvan deneylerinde malignite potansiyeline de değinilmektedir.^[24]

İnsan kemik iliği, hematopoietik ve endotel hücreler yanında kemik dokusu oluşturma potansiyeli bulunan osteoprogenitor hücrelerin öncülleri olan MSH'nin de bulunduğu farklı hücreler topluluğundan oluşmaktadır. Mezenkimal stromal hücreler, kemik proteini depolayan ve TGF- β 'ya yanıt veren, fakat hematopoietik büyüme etmenlerine yanıt vermeyen ayrı bir hücre grubu içermektedir.^[26,27] Mezenkimal stromal hücrelerden osteojenik progenitor özelliği olanların iki tür olduğu; bunlardan az farklılaşmış ama çok sayıda hücre ile koloni meydana getiren hücrelerin β -fibroblastik büyüme faktörü (β -FGF) ve transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) ve D₃ vitaminine yanıt vererek arttığı, sayıca daha az ama çok farklı küme oluşturan hücrelerde β -FGF yanıtının ortadan kalktığı gösterilmiştir.^[14,26]

Kemik iliği hücrelerini iki gruba ayırmak mümkündür. Birinci hücre grubu olan MSH'lerin tanımlanması için yüzeylerinde STRO-1, CD105, CD73 ve CD90 antijenlerinin varlığı gereklidir.^[20,28,29] İkinci grup olan hematolojik hücre grubunu tanımlayan önemli yüzey antijeni CD34'tür. Hematolojik hücre grubu için CD45, CD34, CD14 yüzey antijenleri karakteristiktir. Yüzey antijen tayiniyle ilgili bulgularımız literatür ile uyumludur.

Çalışmamızda canlı-dışı kültür ortamında çoğaltılan ve osteoblast farklılaşma ortamı ile uyarılan, kalsiyum depozitlerini oluşturan hücreler Alizarin

kırmızısı ile boyanarak gösterildi. Bu amaçla farklı yöntemler kullanılmıştır.^[30] Daha önce yaptığımız bir araştırmada osteoblast benzeri hücreler pikrotiyonin boyası ile boyanmıştı.^[14] Kalsiyum birikintileri von Kossa tekniği ile boyanarak da gösterilmiştir.^[31] Osteoblastik karakterli hücreleri tanımlamak için, bu hücreler tarafından ortaya konan alkalen fosfataz aktivitesi, tip-1 kolajen oluşturma, D₃ vitamini ile uyandırılabilen kemik gla proteni, osteokalsinin tayini gibi yöntemler vardır.^[32] Bu şekilde osteoblastik hücre soylarının varlığı saptanmaktadır.

Canlı-dışı kıkırdak farklılaşmasının uyarılması için ise, canlı-içi (*in vivo*) ortamı simüle eden üçboyutlu kültür ortamı geliştirilmiştir;^[16] bu amaçla biyoreaktörlerin kullanılması devreye girmiştir.

Önemli bulgumuz, kıkırdak hücreleri farklılaştırma işleminden sonra topaktan alınarak hazırlanan kesitlerde hücre dizilişinin canlı kıkırdak dokusundaki gibi olmasıdır. Yassı kondrositlere kıkırdak hücre topağının yüzeyel tabakalarında, daha yuvarlak olanlarına ise derin bölgelerinde rastlanmıştır.

Osteoblast ve kondroblastlar, ortopedide yeni üretilen biyomalzemelerin biyolojik etkilerinin incelenmesinde kullanılmaktadır.^[33] Doku hasarlarının giderilmesi için hücrelerin eriyebilen polimer kalıplar üzerinde hasarlı bölgeye nakledilerek, yenileyici olarak kullanılması hedeflidir. Mezenkimal kökhücreleri, özellikle bağ doku kökenli hücrelere kolayca farklılaşma özelliğinden dolayı kemik, kıkırdak defektleri onarımı için uygun gözükmektedir.^[34]

Canlı-dışı deneylerden elde edilen bu bulgular, MSH'nin canlı-içi ortamda da farklılaşabileceğini düşündürmektedir. Farklılaşma için gerekli uyarının organizmanın hasarlı bölgesinin yakın çevresinden salınan çözünür faktörlerden sağlanabileceği bildirilmektedir. Yapılan çalışmalar, hasarlı dokulardan salınan kemokin, sitokin ve diğer çözünür faktörlerin kökhücrelerin göçü, çoğalması ve ihtiyaç olan yönde farklılaşmasında rol oynayabileceğini öne sürmektedir.^[2,3]

Sonuç olarak, klinikte, yüksek riskli transplanstasyonlarda ve/veya sistemik, ilerleyici bozukluklarda kullanımına başlanmış ve laboratuvarımızda bu amaçla önçalışmaları yapılmakta olan bu hücreler, ortopedide kullanılabilecek materyallerin biyolojik etkilerinin canlı-dışı incelemesinde, daha ilerde de kemik ve kıkırdaktaki hasarlı bölgelerin tamiri amacıyla kullanılabilir. Az sayıda da olsa, konuyla ilgili yürütülen klinik uygulamalar bu hücrelerin güveni-

lirliği yönünden ümit verici gözükse de, bu hücrelerin yenileyici tıp amaçlı kullanımını yeterince deneyim kazanıldıktan sonra düşünülmalıdır.

Destek

Bu çalışma, Devlet Planlama Teşkilatı'nın 03 K 120 570 numaralı "Mezenkimal Kök Hücre Plastisitesi" ve 2006 K 120 640 numaralı "Pediatrik Kök Hücre Araştırma, Geliştirme ve Hücresel Tedavi Merkezi Alt Yapı Oluşturma-PEDİ-STEM" isimli projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Holtorf HL, Jansen JA, Mikos AG. Flow perfusion culture induces the osteoblastic differentiation of marrow stroma cell-scaffold constructs in the absence of dexamethasone. *J Biomed Mater Res A* 2005;72:326-34.
- Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002;369-91.
- Lakshmi U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood Rev* 2005;19:29-38.
- De Silva R, Lederman RJ. Delivery and tracking of therapeutic cell preparations for clinical cardiovascular applications. *Cytotherapy* 2004;6:608-14.
- Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 2004;104:3581-7.
- Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:568-84.
- Lee JW, Kim YH, Kim SH, Han SH, Hahn SB. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Med J* 2004;45 Suppl:41-7.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393-5.
- Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 2004;22:377-84.
- Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 1992;13:81-8.
- Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998;176:57-66.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.

13. Ichinose S, Tagami M, Muneta T, Sekiya I. Morphological examination during in vitro cartilage formation by human mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 2005; 322:217-26.
14. Bilir A, Ceyhan T, Altinoz AM, Guneri DA, Bayrak I, Altug T. Culturability of osteoblast cells extracted from mature and fetal Balb/c mice calvaria. [Article in Turkish] *Acta Orthop Traumatol Turc* 2000;34:389-95.
15. Ceyhan T, Bilir A, Karaca C. Culturability of rat bone marrow stromal cells and evaluation for osteoblastic formation. [Article in Turkish] *Acta Orthop Traumatol Turc* 2006;40:67-71.
16. Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg [Am]* 1997; 79:1699-709.
17. Becerra J, Andrades JA, Ertl DC, Sorgente N, Nimni ME. Demineralized bone matrix mediates differentiation of bone marrow stromal cells in vitro: effect of age of cell donor. *J Bone Miner Res* 1996;11:1703-14.
18. Ohgushi H, Caplan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res* 1999;48:913-27.
19. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res* 1999;14:700-9.
20. Butler PE, Lee WP, Sims CD, Randolph MA, Vacanti CA, Yaremchuk MJ. Cell transplantation from limb allografts. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:161-8.
21. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-7.
22. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004;95:209-14.
23. Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol* 1988;106:2139-51.
24. Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, Panoskaltis Mortari A, McElmurry RT, Bell S, et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007;25:371-9.
25. Kindler V, Suva D, Soulas C, Chapuis B. Haematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells as tools for present and future cellular therapies. *Swiss Med Wkly* 2006;136:333-7.
26. Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest* 1995;95:881-7.
27. Long MW, Williams JL, Mann KG. Expression of human bone-related proteins in the hematopoietic microenvironment. *J Clin Invest* 1990;86:1387-95.
28. Encina NR, Billotte WG, Hofmann MC. Immunomagnetic isolation of osteoprogenitors from human bone marrow stroma. *Lab Invest* 1999;79:449-57.
29. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991;78:55-62.
30. Gray C, Boyde A, Jones SJ. Topographically induced bone formation in vitro: implications for bone implants and bone grafts. *Bone* 1996;18:115-23.
31. Gotoh Y, Fujisawa K, Satomura K, Nagayama M. Osteogenesis by human osteoblastic cells in diffusion chamber in vivo. *Calcif Tissue Int* 1995;56:246-51.
32. Yamamoto T, Ecarot B, Glorieux FH. In vivo osteogenic activity of isolated human bone cells. *J Bone Miner Res* 1991;6:45-51.
33. Aybar B, Bilir A, Akcakaya H, Ceyhan T. Effects of tricalcium phosphate bone graft materials on primary cultures of osteoblast cells in vitro. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:119-25.
34. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5:309-13.