



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KAYNAKLI
OSTEOBLASTLARIN SPONGİOZ ALLOGREFTLE
İNKÜBASYONUNUN OSTEOJENİK
AKTİVİTEYE ETKİSİ
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

**Dr. Korcan YÜKSEL
UZMANLIK TEZİ**

İSTANBUL - 2012



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KAYNAKLI
OSTEOBLASTLARIN SPONGİOZ ALLOGREFTLE
İNKÜBASYONUNUN OSTEOJENİK
AKTİVİTEYE ETKİSİ
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

**Dr. Korcan YÜKSEL
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN:
Doç. Dr. Tahsin BEYZADEOĞLU**

İSTANBUL - 2012

ÖNSÖZ

Ortopedi ve Travmatoloji uzmanlık eğitimim boyunca her konuda desteğini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, bilimsel, hoşgörülü ve yol gösterici yaklaşımıyla yetişmemde katkısı olan hocam Prof. Dr. Faik ALTINTAŞ'a,

Eğitimime, bilgi birikimi ve yeniliklere açık yaklaşımı ile katkıda bulunan, tezimin oluşturulmasında emeğini ve zamanını benden esirgemeyen tez hocam Doç. Dr. Tahsin BEYZADEOĞLU'na, uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşan ve her konuda desteklerini benden esirgemeyen hocalarım Doç. Dr. Melih GÜVEN'e, Yard. Doç. Dr. Çağatay ULUÇAY'a ve Yard. Doç. Dr. Turhan ÖZLER'e,

Tezimin ana fikrinin ve hipotezimin oluşturulmasında katkılarından dolayı Doç. Dr. Alan IVKOVIC'e,

Tezimin oluşturulmasında destek ve yardımlarıyla katkıda bulunan Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Gamze TORUN KÖSE'ye ve Arş. Gör. Özge KARABIYIK'a,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve birçok şeyi paylaştığım Op. Dr. Erkan SERVET, Dr. Onur KOCADAL, Dr. Ayberk ÖNAL ve Dr. Burak Çağrı AKSU'ya,

5 yıl boyunca mesai arkadaşlığı yaptığım 9. Kat sorumlu hemşiresi Fatoş GÜLPÜ ile diğer kat hemşirelerine ve personellerine, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı poliklinik sekreterlerine ve tüm ameliyathane çalışanlarına,

Tezimin tamamlanmasında maddi destek sağlayan Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği'ne (TOTBİD) ve Yeditepe Üniversitesi Bilimsel Komitesi'ne

Emeklerinin karşılığını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim annem Döne YÜKSEL ve babam Bekir YÜKSEL'e, kardeşim Koray YÜKSEL'e

Sonsuz teşekkür ve saygılarımla...

İstanbul / Mayıs-2012

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
KISALTIMA LİSTESİ.....	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kök Hücreler.....	2
2.2. Kök Hücrelerde Temel Kavramlar.....	3
2.2.1. Plastisite (Farklılaşma).....	3
2.2.2. Köklülük (Stemness).....	3
2.3. Kök Hücrelerin Sınıflaması.....	3
2.3.1. Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerine Göre Sınıflaması.....	4
2.3.1.1. Totipotent Kök Hücreler.....	4
2.3.1.2. Pluripotent Kök Hücreler.....	4
2.3.1.3. Multipotent Kök hücreler.....	4
2.3.1.4. Unipotent Kök Hücreler.....	5
2.3.2. Kök Hücrenin Kaynağı Olan Dokuya Göre Sınıflama.....	5
2.3.2.1. Embriyonik Kök Hücreler.....	6
2.3.2.2. Fetal Kök Hücreler.....	8
2.3.2.3. Kordon Kanı Kök Hücreler.....	8
2.3.2.4. Erişkin Kök Hücreler.....	9
2.3.2.4.1. Mezenkimal Kök hücreler.....	9
2.3.2.4.1.1. Mezenkimal Kök hücrelerin diferansiasyonu.....	10
2.3.2.4.1.2. Mezenkimal Kök hücrelerin tanımlanması ve yüzey belirteçleri.....	11
2.3.2.4.1.3. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu.....	12
2.3.2.4.1.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Tedavide Kullanımı.....	12
2.3.2.4.1.4.1. MKH'lerin İmmünomodülatör Olarak Kullanımı....	12
2.3.2.4.1.4.2. MKH'lerin Kıkırdak Hastalıklarında Kullanımı.....	13
2.3.2.4.1.4.3. MKH'lerin Menisküs Onarımında Kullanımı.....	13

2.3.2.4.1.4.4. MKH'lerin Tendon ve Ligament Onarımında Kullanımı.....	14
2.3.2.4.1.4.5. MKH'lerin Spinal Kanal Yaralanmalarında Kullanımı.....	14
2.3.2.4.1.4.6. MKH'lerin Müsküler Distrofiler'de Kullanımı.....	14
2.3.2.4.1.4.7. MKH'lerin Osteogenezis İmperfekta'da Kullanımı..	14
2.3.2.4.1.4.8. MKH'lerin Kemik İyileşmesinde Kullanımı.....	15
2.4. Kemik Doku.....	15
2.4.1. Kemik Doku Hücreleri.....	16
2.4.2. Kemik Matriksi.....	17
2.5. Kırık İyileşmesi.....	19
2.5.1. Primer (Birincil) Kırık İyileşmesi.....	19
2.5.2. Sekonder (İkincil) Kırık İyileşmesi.....	20
2.5.2.1. Enflamatuvar (Hematom, Yangı) Dönemi.....	20
2.5.2.2. Onarım (Reperasyon) Dönemi.....	21
2.5.2.3. Yeniden Şekillenme (Remodeling) Dönemi.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu İçin Kemik İliği Aspirat Örneğinin Alınması.....	24
3.2. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu İçin Adipoz Doku Aspirat Örneğinin Alınması.....	25
3.3. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu.....	25
3.4. Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu.....	26
3.4.1. Kollajenaz Solüsyonu Hazırlanışı.....	27
3.4.2. Eritrosit Parçalama Solüsyonu Hazırlanışı.....	27
3.4.3. Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Büyütmek İçin Kullanılacak Besiyeri.....	27
3.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Pasajlanması.....	28
3.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Dondurularak Saklanması.....	30
3.7. Mezenkimal Kök Hücrelerin Açılması (Çözme).....	30
3.8. Osteojenik Besiyeri Hazırlanması.....	31
3.9. Spongioz Kemik Allogreftlerinin Hazırlanışı.....	31
3.10. Mezenkimal Kök Hücrelerin Ekimi.....	33
3.11. MTS Analizi (Hücrelerin Proliferasyonunun Gösterilmesi).....	34

3.12.	Alkalen Fosfataz Testi.....	34
3.13.	Alizarin Red Boyaması.....	35
3.14.	Von Kossa Boyaması.....	36
3.15.	İstatistiksel Değerlendirme.....	36
4.	BULGULAR.....	37
4.1.	Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojisi.....	37
4.2.	İmmünofenotipik İnceleme.....	38
4.2.1.	Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (BMSC) İmmünofenotipik İncelemesi.....	39
4.2.2.	Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (ADSC) İmmünofenotipik İncelemesi.....	41
4.3.	Mezenkimal Kök Hücrelerin Çoğalmasının Tayini.....	43
4.3.1.	Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Çoğalmasının Tayini.....	44
4.3.2.	Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Çoğalmasının Tayini.....	46
4.4.	Osteojenik Farklılaşmanın Tayini.....	49
4.4.1.	Alkalen Fosfataz (ALP) Düzeyinin Tayini.....	49
4.4.1.1.	Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Kemik Grefti Eklenmeyen Grubundaki ALP Aktivitesinin Ölçümü.....	50
4.4.1.2.	Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Kemik Grefti Eklenen Grubundaki ALP Aktivitesinin Ölçümü.....	52
4.4.1.3.	Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Kemik Grefti Eklenmeyen Grubundaki ALP Aktivitesinin Ölçümü.....	54
4.4.1.4.	Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Kemik Grefti Eklenen Grubundaki ALP Aktivitesinin Ölçümü.....	56
4.4.1.5.	Kemik Grefti İçermeyen ve İçeren Besiyerlerinin Alkalen Fosfataz Aktivitesinin Karşılaştırılması.....	58
4.4.2.	Von Kossa Boyaması.....	59
4.4.2.1.	Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerden Elde Edilen Osteoblastların Von Kossa Boyaması.....	59
4.4.2.2.	Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerden Elde Edilen Osteoblastların Von Kossa Boyaması.....	60
4.4.3.	Alizarin Red Boyaması.....	61
4.4.3.1.	Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerden Elde Edilen Osteoblastların Alizarin Red Boyaması.....	62

4.4.3.2. Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerden Elde Edilen Osteoblastların Alizarin Red Boyaması.....	63
5. TARTIŞMA.....	64
5.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu.....	64
5.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojisi.....	65
5.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünojenotipik İncelemesi.....	66
5.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Çoğalmasının Tayini.....	66
5.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasının Tayini.....	68
6. SONUÇ.....	77
7. KAYNAKLAR.....	79

ÖZET

Amaç: Allogreftler ve mezenkimal kök hücreleri temel alan hücre kaynaklı tedaviler Ortopedi ve Travmatoloji’de sık olarak kullanılmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin genel ortopedik uygulamalarda kullanılmasına ek olarak, kemik greftleme gereksinimi olan hastalarda, mezenkimal kök hücre ve greftleme kombinasyonları da giderek artan sıklıkla uygulanan işlemlerdir. Ancak bu kombine uygulamalarda mezenkimal kök hücre davranışları ile ilgili bilgi birikimi hala kısıtlıdır. Bu çalışmada, kemik iliği ve yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreleri, osteoblastik aktivite açısından birbirleriyle karşılaştırmayı ve bunların taze allogreftlerle inkübasyonu sonrası osteoblastik aktivitelerindeki değişiklikleri bulmayı amaçladık.

Materyal ve Metod: Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler 23 yaşında femur psödoartroz cerrahisi geçiren hastanın iliak kanat aspirasyon materyalinden, adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler 32 yaşında abdominal liposuction cerrahisi geçiren hastanın aspirasyon materyalinden izole edildi. Hücreler izolasyon sonrası ilk 10 gün büyütme besiyerinde çoğaltıldı. Daha sonra kaynağına göre her bir grup kendi içinde 2 gruba ayrıldı. Bir grup sadece osteojenik besiyerinde, diğer grup kemik grefti eklenmiş osteojenik besiyerinde 21 gün inkübe edildi. Elde edilen dört kültür grubunun; 1,7,14,21. günlerde MTS kullanılarak hücre proliferasyonları, 7,14 ve 21. günlerde alkalen fosfataz düzeyleri ölçülerek osteojenik potansiyelleri, 14 ve 21. günlerde uygulanan Von Kossa ve Alizarin Red boyamalarıyla mineralizasyon açısından değerlendirildi.

Sonuç: Kemik grefti eklenmeyen kemik iliği ve adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreleri, proliferasyon düzeyi açısından her bir grubun kendi içinde gün bazında hücre proliferasyon değişiminde istatistiksel anlamlılık bulunmadı ancak iki grubun karşılaştırılmasında 7 ve 21. günlerde hücre proliferasyonunda kemik iliği kaynaklı hücreler lehine istatistiksel anlamlı sonuç bulundu ($p<0.05$). Bu sonuç kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler doğal gelişim çizgisi kemik olduğu için, daha iyi osteoblastik proliferasyon gösterebileceklerini düşündürmüştür. İki grup arasında alkalen fostaz aktivitesinde 7,14,21. günlerde istatistiksel fark görülmemiştir. Von Kossa ve Alizarin Red boyamalarında her ne kadar kantitatif bir ölçüm yapılmamış olsa da mikroskop ile incelemede belirgin fark saptanmamıştır. Kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin kemik grefti eklenmeyen ve eklenen grupları karşılaştırıldığında, greft eklenmeyen grupta özelleşmenin görüldüğü 14. gün dışında 21 gün

boyunca hücre sayılarında artış görülmüştür, greft eklenen grupta hücre sayısı iki kaynak grubunda da 14. günden sonra azalmıştır. Bu azalma 21. günde istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Alkalen fosfataz düzeyleri arasında greft eklenen ve eklenmeyen gruplarda 7,14,21. günlerde istatistiksel fark bulunmamıştır. Von Kossa ve Alizarin Red boyamalarında greft eklenen gruplarda mineralizasyonda belirgin azalma tespit edilmiştir.

Çıkarımlar: Taze spongiöz allogreftler kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik aktivitesini inhibe etmektedir.

İleri Perspektifler: Mezenkimal kök hücrelerin özelleşmesinin geç döneminde MTS analizi ile görülen hücre sayısındaki azalma, ayrı bir çalışmada hücre DNA analizi veya protein analiziyle de tekrarlanarak daha güvenilir sonuçlara ulaşılabilir. Von Kossa ve Alizarin Red boyamalarında greft eklenen mezenkimal kök hücre gruplarında görülen mineralizasyondaki azalma mineralizasyonun kantitatif olarak gösterilebileceği kalsiyum ölçümü ile desteklenebilir. Ayrıca özelleşmenin geç dönemindeki bu inhibisyon osteojenik aktivitenin geç dönem belirteçleri olan Osteonektin, Osteopontin, Osteokalsin gibi geç dönem belirteçlerinin ölçümüyle desteklenebilir. Tüm bunlara ek olarak bu inhibisyonda rol oynayabilecek Sclerostin ve DKK1 gibi muhtemel moleküller ve bu moleküllerin etkin olduğu yollar ayrı bir çalışmayla araştırılabilir.

ABSTRACT

Purpose: Allografts are widely used in Orthopedics. The use of mesenchymal stem cells and combined grafting are increased with the increase use of mesenchymal stem cells in orthopedic surgery. But, there is limited knowledge about behavior of mesenchymal stem cells in combined grafting. Our object was to compare osteoblastic activities of bone marrow and fat derived stem cells and to find the differences of osteoblastic activities after incubation with fresh allografts.

Material and Method: Bone marrow derived stem cells were isolated from a 23 years-old patients iliac crest aspiration materials who undergone pseudoarthrosis surgery of femur, and fat derived stem cells were isolated from a 32 years-old patients aspiration material who undergone abdominal liposuction surgery. After isolation, cells were multiplied in a growing medium for 10 days. After that, each group in respect to their origin were divided into two groups. One group was incubated in an osteogenic medium and the other in an osteogenic medium with bone graft for 21 days. These four culture groups' cell proliferations were evaluated with MTS at 1,7,14 and 21st days, osteogenic potentials were evaluated with the measurement of alkaline phosphatase levels at 7,14 and 21st days, and mineralization were evaluated with Von Kossa and Alizarin Red staining at 14 and 21st days.

Results: There were no statistically significant difference in proliferation levels between days in each group without bone graft, but at 7th and 21st days, there were statistically significant difference in favour of bone marrow derived stem cells ($p < 0.05$). This result preoccupy that, bone marrow derived stem cells have better osteoblastic proliferation due to their natural line. There were no statistically significant difference in alkaline phosphatase levels between each group at 7,14 and 21st days. There were no significant difference in Von Kossa and Alizarin Red stainings with microscopic evaluation even no quantitative measurement made. When groups with and without bone graft were compared, in the group without bone graft, an increase in cell count was observed except 14th day that specification occurs, but in the group with bone graft, cell count was decreased after 14th day at both two groups. At the 21st day the previously described decrease reached to a statistically significant level ($p < 0.05$). There were no statistically significant difference in alkaline phosphatase levels between groups with and without bone graft at 7, 14 and 21st days. There were statistically significant decrease of mineralization with Von Kossa and Alizarin Red stainings at group with bone graft.

Conclusions: Fresh spongiotics allografts inhibits the osteogenic activity of bone marrow and fat derived mesenchymal stem cells

Further Perspectives: The decrease of cell count seen with MTS analysis at the late specification phase of mesenchymal stem cells could be evaluated with another study with DNA or protein analysis for more reliable results. The decrease of mineraliation at the groups with bone graft seen at Von Kossa and Alizarin Red stainings could be also supported with calcium measurement for quantitative evaluation of mineralization. Furthermore, the inhibition at the late phases of specification could be supported with late phase markers of osteogenic activity like; Osteonectine, Osteopontine, Osteocalcine. Some molecules that possibly have role in inhibition like Sclerostin and DKK1 and pathways of these molecules could also been evaluated.

KISALTMA LİSTESİ

ADSC: Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre

ALP: Alkalen fosfataz

α -MEM: Minimal essential medium

BMSC: Kemik kaynaklı mezenkimal kök hücre

BMP: Bone morphogenetic protein

BSA: Bovine serum albumin

COX2. Cyclooxygenase-2

DKK1: Dickkopf 1

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

EKH: Embriyonik kök hücre

FBS: Fetal bovine serum

FGF: Fibroblast growth factor

HEPES: Hidroksietil-piperazin-sülfonik asit

IFN- γ : İnterferon gamma

IL: İnterlökin

IGF: İnsulin growth factor

MTS: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum

Oct-4: Oktamer bağlayıcı protein

ÖÇB: Ön çapraz bağ

PDGF: Platelet-derived growth factor

P-PAR- γ : Peroksizom proliferatör-aktive reseptör gamma

PMNL: Polimorf nüveli lökosit

PBS: Phosphate buffered saline

TGF- β : Transforming growth factor beta

TNF- α : Tumor necrosis factor-alfa

TRAP: Tartarat rezistans asit fosfataz

YKH: Yetişkin kök hücre

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA

Şekil 1: Kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli.....	5
Şekil 2: Kök hücrelerin kaynağı olan dokuya göre sınıflandırılması.....	6
Şekil 3: Embriyonik kök hücre gelişimi.....	7
Şekil 4: Mezenkimal kök hücrelerin değişim potansiyeli.....	11
Şekil 5: Mezenkimal kök hücreden osteosite farklılaşma.....	17
Şekil 6: Sekonder (ikincil) kırık iyileşme dönemleri.....	20
Şekil 7: Laminar air flow cihazı.....	25
Şekil 8: Mezenkimal kök hücrelerin yüzey belirteçlerinin çalışıldığı Facs cihazı.....	29
Şekil 9: Femur başının laminer Air flow cihazı içinde spongioz kısımlarının alınması.....	31
Şekil 10: Spongioz kemik allogreftlerinin inkübasyonu.....	31
Şekil 11: Spongioz kemik allogreftlerin hücre süzücünden geçirililerek toplanması.....	32
Şekil 12: Elde edilen kemik allogrefti materyali.....	32
Şekil 13: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrenin invert mikroskopta 2. gün 10X'lik objektif kullanılarak fotoğraflanması.....	36
Şekil 14: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrenin invert mikroskopta 2.gün 10X'li objektif kullanılarak fotoğraflanması.....	36
Şekil 15: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrenin invert mikroskopta 8. gün 10X'lik objektif kullanılarak fotoğraflanması.....	37
Şekil 16: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrenin invert mikroskopta 8. gün 10X'lik objektif kullanılarak fotoğraflanması.....	37
Şekil 17: BMSC'lerin antikor eklenmeden (negatif kontrol grubu) Flow sitometri histogram data sonucu.....	38
Şekil 18: CD-117 antikorlu işaretli BMSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu.....	38
Şekil 19: CD-24 antikorlu işaretli BMSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu.....	39

Şekil 20: CD-90 antikoru işaretli BMSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu.....	39
Şekil 21: CD-44 antikoru işaretli BMSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu.....	39
Şekil 22: CD-45 antikoru işaretli BMSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu.....	40
Şekil 23: ADSC'lerin antikor eklenmeden (negatif kontrol grubu) Flow sitometri histogram data sonucu.....	40
Şekil 24: CD-117 antikoru işaretli ADSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu.....	41
Şekil 25: CD-24 antikoru işaretli ADSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu.....	41
Şekil 26: CD-90 antikoru işaretli ADSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu.....	41
Şekil 27: CD-44 antikoru işaretli ADSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu.....	42
Şekil 28: CD-45 antikoru işaretli ADSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu.....	42
Şekil 29: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin kalibrasyon eğrisi.....	43
Şekil 30: Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanan ve uygulanmayan gruplarındaki 1. 7. 14. ve 21. Günlerdeki MTS analizini temel alan, hücre sayılarının istatistiksel grafiği.....	44
Şekil 31: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin kalibrasyon eğrisi.....	45
Şekil 32: Adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanan ve uygulanmayan gruplarındaki 1. 7. 14. ve 21. Günlerdeki MTS analizini temel alan, hücre sayılarının istatistiksel grafiği.....	46
Şekil 33: Kemik iliği Kökenli mezenkimal kök hücre kültürünün ALP Aktivitesi açısından kalibrasyon Eğrisi.....	49
Şekil 34: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre kültürünün ALP Aktivitesi açısından hücre başına ALP aktivitesi.....	49
Şekil 35: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre kültürünün ALP aktivitesi açısından hücre başına ALP aktivitesinin istatistiksel grafiği.....	50
Şekil 36: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre + kemik grefti kültürünün ALP Aktivitesi açısından kalibrasyon eğrisi.....	51

Şekil 37: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre + kemik grefti Kültürünün ALP aktivitesi açısından hücre başına ALP aktivitesi.....	51
Şekil 38: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre + kemik grefti kültürünün ALP aktivitesi açısından hücre başına ALP aktivitesinin istatistiksel grafiği.....	52
Şekil 39: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre kültürünün ALP aktivitesi açısından kalibrasyon eğrisi.....	53
Şekil 40: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre kültürünün ALP Aktivitesi açısından hücre başına ALP aktivitesi.....	53
Şekil 41: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre kültürünün ALP aktivitesi açısından hücre başına ALP aktivitesinin istatistiksel grafiği.....	54
Şekil 42: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre + kemik grefti kültürünün ALP aktivitesi açısından kalibrasyon eğrisi.....	55
Şekil 43: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre + kemik grefti kültürünün ALP aktivitesi açısından hücre başına ALP aktivitesi.....	55
Şekil 44: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre + kemik grefti kültürünün ALP aktivitesi açısından hücre başına ALP aktivitesinin istatistiksel grafiği.....	56
Şekil 45: Kemik grefti içermeyen ve içeren besiyerlerinin alkalen fosfataz aktivitesinin karşılaştırılması	57
Şekil 46: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerden elde edilen osteoblastların kemik grefti eklenmeyen grubunun 14. gün Von Kossa boyaması.....	58
Şekil 47: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerden elde edilen osteoblastların kemik grefti eklenen grubunun 14. gün Von Kossa boyaması.....	58
Şekil 48: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerden elde edilen osteoblastların kemik grefti eklenmeyen grubunun 21. gün Von Kossa boyaması.....	59
Şekil 49: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerden elde edilen osteoblastların kemik grefti eklenen grubunun 21. gün Von Kossa boyaması.....	59

Şekil 50: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerden elde edilen osteoblastların kemik grefti eklenmeyen grubunun 14. gün Von Kossa boyaması.....	59
Şekil 51: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerden elde edilen osteoblastların kemik grefti eklenen grubunun 14. gün Von Kossa boyaması.....	59
Şekil 52: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerden elde edilen osteoblastların kemik grefti eklenmeyen grubunun 21. gün Von Kossa boyaması.....	60
Şekil 53: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerden elde edilen osteoblastların kemik grefti eklenen grubunun 21. gün Von Kossa boyaması.....	60
Şekil 54: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerden elde edilen osteoblastların kemik grefti eklenmeyen grubunun 14. gün Alizarin Red boyaması.....	61
Şekil 55: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerden elde edilen osteoblastların kemik grefti eklenen grubunun 14. gün Alizarin Red boyaması.....	61
Şekil 56: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerden elde edilen osteoblastların kemik grefti eklenmeyen grubunun 21. gün Alizarin Red boyaması.....	61
Şekil 57: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerden elde edilen osteoblastların kemik grefti eklenen grubunun 21. gün Alizarin Red boyaması.....	61
Şekil 58: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerden elde edilen osteoblastların kemik grefti eklenmeyen grubunun 14. gün Alizarin Red boyaması.....	62
Şekil 59: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerden elde edilen osteoblastların kemik grefti eklenen grubunun 14. gün Alizarin Red boyaması.....	62
Şekil 60: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerden elde edilen osteoblastların kemik grefti eklenmeyen grubunun 21. gün Alizarin Red boyaması.....	62
Şekil 61: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerden elde edilen osteoblastların kemik grefti eklenen grubunun 21. gün Alizarin Red boyaması.....	62

TABLO LİSTESİ

SAYFA

Tablo 1: Kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri.....	4
Tablo 2: Mezenkimal kök hücrelerin hücre yüzey belirteçleri.....	12

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Kemik greftleri Ortopedi ve Travmatoloji’de kırık, tümör cerrahisi, spinal füzyon ve segmental defektlerin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ülkemiz için henüz net bir rakam olmamakla birlikte Amerika Birleşik Devletleri’nde yılda yaklaşık 500.000-600.000 kemik greftleme prosedürü uygulanmaktadır. Bunlardan % 35-45’i genel ortopedik uygulamalarda kalan kısmı ise spinal füzyonlarda kullanılmaktadır (1).

Kemik greftlemede altın standart osteoindüktif, osteokondüktif ve osteojenik etkilerinden dolayı, halen otojen kemik greftleridir. Otojen kemik greftlerinin miktar olarak yetersiz kaldığı ya da hastada ek morbidite yaratılmak istenmediği koşullarda kemik bankalarından elde edilen allogreftler kullanılabilir.

Kemik greftlerinin kullanımından sonra kimi zaman beklenenden hızlı bir rezorpsiyon görülmesi izlenebilen bir klinik sorun oluşturmaktadır. Ayrıca greftlemeye rağmen kaynamama ve konsolidasyon yetersizlikleri de görülebilmektedir. Bunun üzerinde etkili, cerrahi ve stabilite, kemik kaybı miktarı gibi mekanik birçok faktör olduğu gibi hücresel düzeyde de kemik hasarı alanındaki İnterlökinler, TGF- β , PDGF ve TNF- α gibi hücresel sitokinler ve büyüme faktörlerin de etkilidir. Örneğin TNF- α eksikliğinde encondral ve intramembranöz kemikleşme geciktiği gibi osteo-kondral öncül hücrelerde de indüksiyon ve diferansiasyon azalmaktadır. Yine COX2 enzim inhibisyonu ortamda prostaglandin ve araşidonik asit metabolitlerinde azalmaya ve bu metabolitlerin azalmasının da mezenkimal kök hücrelerin osteoblastik diferansiasyonunu durdurduğu bilinmektedir.

Son yıllarda vücudun çeşitli dokularından kök hücre temini ve gerek bu kök hücrelerden tedavide ihtiyaç duyulan dokuların laboratuvar ortamında üretilerek kullanımı, gerekse bu hücrelerin kendilerinin üreterek ortama saldıkları biyoaktif moleküllerin, hasarlı dokudaki immünoregülatör ve rejeneratif özelliklerinden ötürü kullanımları artmıştır.

Bu çalışmada amacımız kemik iliğinden ve yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerin *in-vitro* ortamdaki osteoblastik aktivitelerinin karşılaştırılması ayrıca kök hücrelerden elde edilen osteoblastların allojenik kemik greftleri ile inkübasyonunun olumlu ya da olumsuz etkilerini araştırmaktır.

2-GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler

Kök hücreler, insan vücudunda her biri yeni özelleşmiş fonksiyonlu hücreler oluşturma yeteneğine sahip olan özelleşmemiş hücrelerdir. Kök hücreler için en iyi örnek kemik iliği kaynaklı özelleşmemiş kök hücrelerdir. Bu hücreler; antikor üretimi, enfeksiyonla mücadele, gaz taşınması gibi özel fonksiyonları bulunan beyaz ve kırmızı kan hücrelerine dönüşürler (2).

Kök hücre teriminin bilimsel literatüre ilk girişi Alman biyolog Ernst Haeckel'in 1868 yılındaki çalışmalarına kadar uzanır. Darwin'in evrim teorisini inceleyen Haeckel, filogenetik ağaçlar geliştirerek bütün çekirdekli organizmalara evrimleşen, ata tek hücreli yapıya 'Stammzelle' (stem cell) adını vermiştir. 1980'lerin başında California üniversitesinden Gail Martin sıçan embriyolarından kök hücre izole ederek 'embriyonik kök hücre' terimini bulmuştur (3).

Kök hücreler; embriyolar, kordon kanı ve erişkin dokulardan elde edilebilir. Embriyodan veya kordon kanından izole edildiklerinde pluripotent blastomerele eşdeğerdirler. Erişkin dokulardan elde edilen kök hücreler ise pluripotentten multipotente geniş bir plastisite gösterirler (4).

Bir kök hücreyi tanımlayabilmek için 5 tane gerekli ölçüt vardır; (5)

1-) Kök hücreler uzun süre bölünebilme ve kendini yenileyebilme (self-renewal) özelliğine sahiptir. Hücrelerin uzun bölünebilmesini belirleyen faktörlerden birisi, kromozomların ucunda yer alan telomer denen ve binlerce kez tekrarlanan kısa DNA tekrar dizileridir. (TTAGGG).

2-) Kök hücreler özelleşmemişlerdir. Bir kök hücre, kalp kasında olduğu gibi kanı vücuda pompalamak için komşu hücrelerle birlikte çalışmaz. Eritrositlerde olduğu gibi oksijeni dokulara taşıyamaz. Ancak özelleşmiş hücrelere dönüşmek için kaynak oluşturabilir.

3-) Kök hücreler, özelleşmemiş hücrelere kaynaklık edebilirler. Bu olaya farklılaşma (diferansiasyon) denir. Kök hücreler birden fazla hücre tipine farklılaşabilirler. En iyi örneği zigottur.

4-) Kök hücreler, hasar gören alıcıya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrar çoğaltabilirler. Hematopoetik kök hücreler, sinir kök hücrelerinde ve karaciğer öncüllerinde gösterilmiştir.

5-) Kök hücreler, *in-vivo* koşullarda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşabilirler. Örnek olarak embriyonik ya da erişkin kök hücrelerin blastokiste enjekte edildiğinde farklı hücrelere dönüşebilmesidir.

2.2. Kök Hücrelerde Temel Kavramlar

2.2.1. Plastisite (Farklanma);

Bir hücrenin köken aldıkları dokuların dışındaki dokulara diferansiye olabilme özelliğini tanımlamaktadır. Bunun örnekleri arasında; endotele, kas hücrelerine, kalp kasına ve hepatositlere dönüşebilen kemik iliği kökenli hücreler ve pürifiye edilmiş hematopoetik kök hücreler bulunmaktadır (6). Bir hücre, farklanma aşamasına girdiğinde genellikle çoğalmayı bırakır. Bu özellik fetal ve embriyonik kök hücreler için devamlı görülebilmekteyken, yetişkin kök hücrelerinde bu özellik sınırlanmıştır.

2.2.2 Köklülük (Stemness)

Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran hücresel ve moleküler özelliklerini tanımlamak için kullanılır. Kök hücrelerin moleküler imzası olarak bilinen bu özellikler, özgün gen ifadeleri veya translasyon sonrası bir dizi değişimler olup, bunlar sayesinde kök hücreler farklılaşmaksızın özgün yapılarını ve işlevlerini korurlar (7).

2.3. Kök Hücrelerin Sınıflaması

Kök hücreleri sınıflamak için kullanılan terminolojiler şaşırtıcı ve karmaşık olabilir. Temel olarak 2 çeşit sınıflama kullanılabilir. Bunlardan en sık kullanılanı kök hücrenin köken aldığı dokuya dayanan sınıflamadır. İkinci sınıflama daha çok fonksiyonel olan ve kök hücrelerin potansiyel gelişimlerini temel alan sınıflamadır (8).

İsim	Hücre Tipi (Yerleşim)	Farklanma Etkinliği	Farklanma Yönü
EKH	Morula aşamasındaki hücreler	Totipotent	Embriyon ve embriyon dışı tabakalar
EKH	Blastosis aşamasındaki iç hücre kitlesi hücreleri	Pluripotent	Embriyon gövdesi (tüm somatik ve germ hücreleri)
EKH	Gastrula aşamasındaki epiblast hücreleri	Pluripotent	Endoderm, mezoderm ve ektoderm hücreleri
EKH	Ektoderm, mezoderm ve endoderm hücreleri	Pluripotent	Tüm somatik hücreler
YKH	Özgün doku hücreleri	Multipotent	Hücrenin bulunduğu dokuya göre bir veya daha fazla türde hücre
YKH	Bir dokudaki yerleşik hücreler	Unipotent	Bir hücre tipi

Tablo 1: Kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri (8)

2.3.1. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyeline göre sınıflandırılması

2.3.1.1. Totipotent kök hücreler

Ovumun döllenmesinden sonraki yaklaşık 4. güne kadar oluşan hücre kitlesidir. Zigot en önemli ve ilk totipotent hücre olarak kabul edilir. Totipotent hücreler farklılaşma kapasitesine bakıldığında, vücuttaki tüm hücre ve dokulara farklılaşabilen hücre tipidir. Bu hücreler embriyonik ve embriyonik olmayan dokulara farklılaşabilirler.

2.3.1.2 Pluripotent kök hücreler

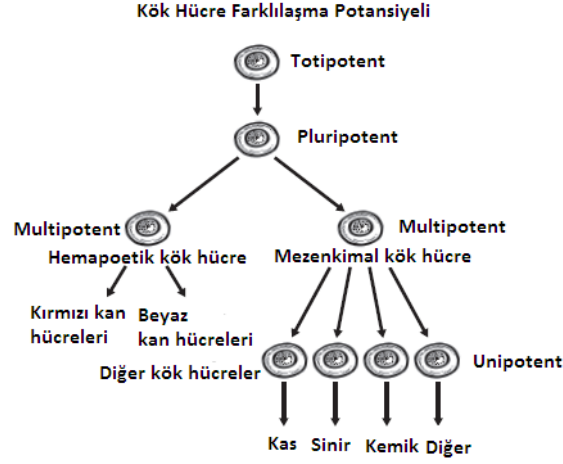
Embriyonik olmayan hücrelere farklılaşamazlar. Bu özellikleriyle totipotent hücrelerden ayrılırlar. Bu hücreler ektoderm, mezoderm ve endoderm aittir tüm hücrelere farklılaşabilirler. Fetusun gonadal hücreleri pluripotent hücrelerdir.

2.3.1.3. Multipotent kök hücreler

Farklılaşma yetenekleri kısıtlıdır. Kendi grubundaki hücre ve doku gruplarına farklılaşabilirler. Hematopoetik hücrelerin sadece yine kan kökenli hücrelere farklılaşması buna örnektir.

2.3.1.4. Unipotent kök hücreler

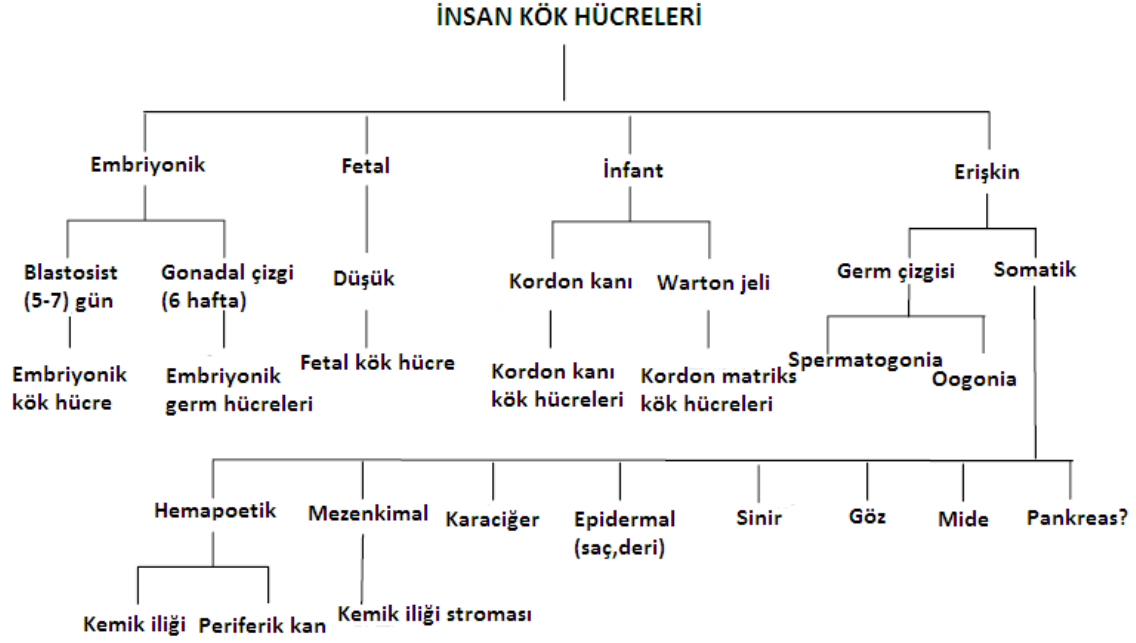
Sadece bir hücre grubuna farklılaşabilen hücrelerdir. Kas dokusundaki uydu hücreler buna örnektir.



Şekil 1: Kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli (9)

2.3.2. Kök Hücrenin Kaynağı Olan Dokuya Göre Sınıflama

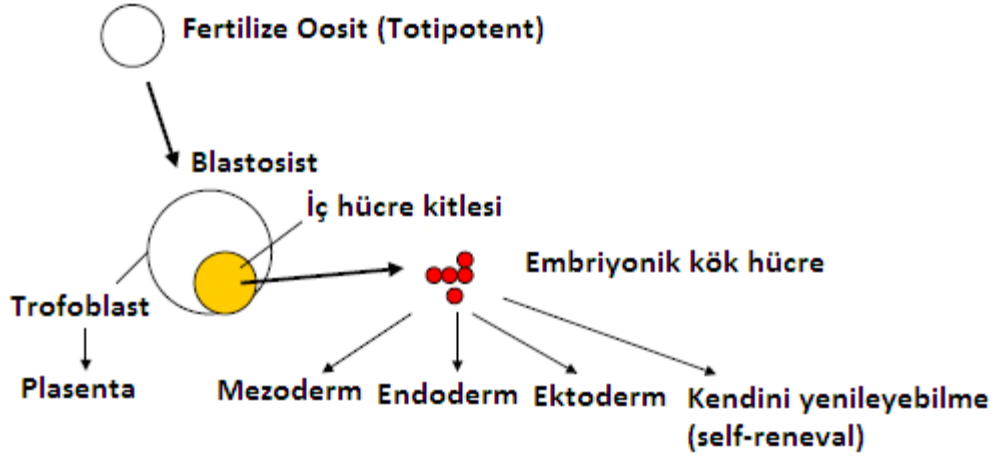
Kök hücreler kaynaklandıkları dokuya göre 4 ana sınıfa ayrılır: embriyonik kök hücreler, erişkin kök hücreleri, fetal kök hücreler, umbilikal kord kök hücreleri. Bu ana gruplar kendi içlerinde alt gruplara ayrılarak isimlendirilirler. Fetal ve erişkin kök hücrelerinin embriyonik kök hücrelerden geliştiğini; erişkin organlarında görülen kök hücrelerin, bu embriyonik kök hücrelerin kalıntıları olduğunu ve doku yaralanmalarının onarımında bu kalıntı kök hücrelerin görev yaptığını düşünenler de vardır (2).



Şekil 2: Kök hücrelerin kaynağı olan dokuya göre sınıflandırılması (2)

2.3.2.1. Embriyonik Kök Hücreler

Memeli embriyoları, bütün omurgalıların embriyoları gibi birbirine benzer görünümdeki blastula (blastosit), gastrula ve nörula evrelerini geçirir. Zigot oluşuktan sonra embriyonik olan ve embriyonik olmayan hücreler blastula evresinde ortaya çıkar. Böylelikle iç hücre topluluğu ve trofoblastlar olmak üzere 2 çeşit hücre tipi oluşur. Embriyonik dokular iç hücre topluluğundan oluşurken, trofoblastlar uterusu implantasyonda rol oynayan plasenta ve koryonik membrana farklılaşır. Embriyonun gelişiminde en önemli özellik hücre-hücre kontağıdır. Bu şekilde hücreler birbirleriyle haberleşir, koordine olur ve farklılaşır.



Şekil 3: Embriyonik kök hücre gelişimi (10)

Embriyonik indüksiyonda denilen embriyonik gelişim; primer, sekonder ve tersiyer induksiyon olmak üzere 3 ana evrede biçimlenir.

a) Primer indüksiyon;

Gastrülasyon ve hücrelerin ektoderm, mezoderm ve endoderm olmak üzere vücuttaki tüm dokuların kaynağı olan 3 germ yaprağının oluştuğu koordineli hareketi kapsar.

b) Sekonder indüksiyon;

Oluşan üç germ tabakasının etkileşimiyle nörolasyonun yani beyin, spinal kord ve periferik sinirlerin oluştuğu aşamayı kapsar.

c) Tersiyer indüksiyon;

Organogenez yani vücuttaki tüm organların oluştuğu aşamayı kapsar (4).

Memelilerde zigot, 2 hücre, 4 hücre, 8 hücre ve morula evreleri totipotent hücreleri içerir. Pluripotent embriyonik kök hücreler iç tabaka hücrelerinden 5 veya 6 günlük blastosistten gelişirler. Embriyogenez süresince iç tabaka hücreleri epiblast ve hipoblast olmak üzere iki

tabakaya ayrılır. Hipoblast yolk-sac kesesini oluştururken, epiblast tabakası üç germ yaprağını oluşturur (2).

Araştırmacılar embriyonik kök hücrelerin farklılaşabilme özelliğini ilk olarak 1980 li yıllarda keşfetmişlerdir. Bir farenin blastosistlerini, diğer bir farenin embriyonik kavitesine transfer ederek, transfer edilen hücrelerden birçok doku ve organın geliştiğini gözlemlemişlerdir (4).

İnsan embriyonik kök hücreleri pluripotent ve farklılaşmamış hücrelerin belirteçleri olan; CD9, CD24, Oktamer bağlayıcı protein (oct-4), Nanog, ALP, LIN 28, Thy-1, SSEA-3 ve 4 antijenlerini sunarlar (5).

2.3.2.2. Fetal Kök Hücreleri

Fetal kan, fetal kemik iliği, karaciğer ve böbrek gibi birçok fetal dokudan elde edilebilirler. Fetal kök hücre, etik olarak embriyonik kök hücrelere göre daha az tartışmalı iken, erişkin kök hücrelerden daha fazla farklılaşma kapasitesine sahiptir. Fetal kök hücreler hücre biyolojisinin aydınlatılmasında çok güçlü bir araç oluştururken, hücre nakli ve gen tedavisi içinde umut oluşturmaktadır.

Fetal kök hücre kullanımı yeni değildir. Kordon kanı hematopoetik kök hücreleri yaklaşık son 20 yıldır kullanılmaktadır. Ayrıca Parkinson hastalığının tedavinde kullanılan fetal nöral dokular ile hastalığın tedavisinde bazı klinik ilerlemeler kaydedilmiştir. Fetal kök hücreler multipotent hücrelerdir (11).

2.3.2.3. Kordon Kanı Kök Hücreleri

Kordon kanında, kemik iliği ve erişkin periferik kanından farklı olarak dolaşımda olan kök hücreler ve hücre elemanları bulunur. Kordon kanı, kemik iliği ile karşılaştırıldığında daha düşük Graft Versus Host reaksiyonu gösterir. Bunun sebebi hücreler tarafından sentezlenen artmış IL-10 seviyeleri ve azalmış β -2-mikroglobulin düzeyleridir.

Kordon kanı hücrelerinin karaciğer ve nöronlara dönüştüğü görülerek multipotent oldukları gösterilmiştir. Kordon kanından kaynaklanan matriks hücrelerinin yararlı kök hücreler olduğu gösterildikten sonra, ilgiler kordon kanına yönelmiş ve kordon kanı kök hücreleri daha sonra kullanılmak üzere depolanmaya başlamıştır. Bu matriks Warton Jeli olarak adlandırılmış ve mezenkimal kök hücre izolasyonunda kullanılmıştır. Kordon kanı hücreleri yüksek telomeraz aktivitesi gösterirler ve tipik kök hücrelere benzer c-kit gibi antijenler taşırlar (2).

2.3.2.4. Erişkin Kök hücreleri

Erişkin kök hücre olarak adlandırılan bir grup hücre, bu hücreleri destekleyen hücreler, mikroçevre olarak adlandırılan bir bölgede ve erişkinde kemik iliği, yağ dokusu, kalp, böbrek, beyin, deri, göz, gastrointestinal sistem, karaciğer, pankreas, akciğer, meme, over, prostat ve testis gibi organlarda tespit edilmiştir. Bunlar, özel mikroçevrelerinde yüksek telomeraz aktivitesine sahip oldukları halde embriyonel kök hücrelerle karşılaştırıldıklarında daha az farklılaşma kapasitesine sahiptirler ve daha kısıtlı sayıda progenitör hücre oluşturabilirler. Bu hücreler sayıca çoğalabilirler yada daha olgun veya dokuya özel hücre tiplerine farklılaşabilirler (5).

2.3.2.4.1 Mezenkimal Kök Hücreler

İnsan mezenkimal kök hücreleri (MKH) yaklaşık 40 yıl önce ilk olarak Friedenstein ve arkadaşları tarafından kemik iliğinde fibroblast prekürsörlerinin içinde hücreler görülmesiyle tanımlanmıştır (12). Mezenkimal kök hücreler, doğum sonrası hematopoetik olmayan kemik stromasında görülürler. Bu stromal yapı osteojenik hücreler, retiküler hücreler, adipositler, endotelial hücreler, makrofajlar ve düz kas hücrelerinden oluşur (13).

Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler sıklıkla iliak kanattan alınan örneklerden elde edilir (14). Femur ve tibia gibi uzun kemiklerin medüller kanalından (15) ve vertebra korpuslarından da elde edilebilir (16). Kemik iliğindeki mezenkimal kök hücrelerin sayıları, doğum sonrasında ortaya çıktıktan sonra yaşın ilerlemesi ile erişkin dönemde giderek azalır. Yenidoğanda aspiratlardaki kök hücre oranı 1/ 10.000 iken, 80 yaşındaki bireyde 1/2.000.000 oranına kadar azalır (17).

2.3.2.4.1.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Diferansiasyonu

İnsan mezenkimal kök hücrelerinin keşfinden sonra yapılan çalışmalar, mezodermal kökenli osteoblast (kemik), kondrosit (kıkırdak), adiposit (yağ), iskelet kası, düz kas, kardiyak kas, endotel hücreleri, nöronlar, hepatosit ve pankreas β hücrelerine dönüşebildiklerini göstermiştir (18).

Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik aktivasyonu için;

- β -glisero fosfat,
- askorbik asit-2 fosfat,
- deksametazon
- FBS gereklidir.

Bu maddelerin varlığında, hücreler ALP aktivitesinde regülasyon artışı ve ekstrasellüler matrikste kalsiyumdan zengin mineralizasyonla osteoblastik morfoloji kazanırlar. Mezenkimal kök hücrelerin fenotipik olarak osteoblast diferansiasyonunu göstermek için ALP ve Alizarin Red S boyaması yapılır.

Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik diferansiasyonu için

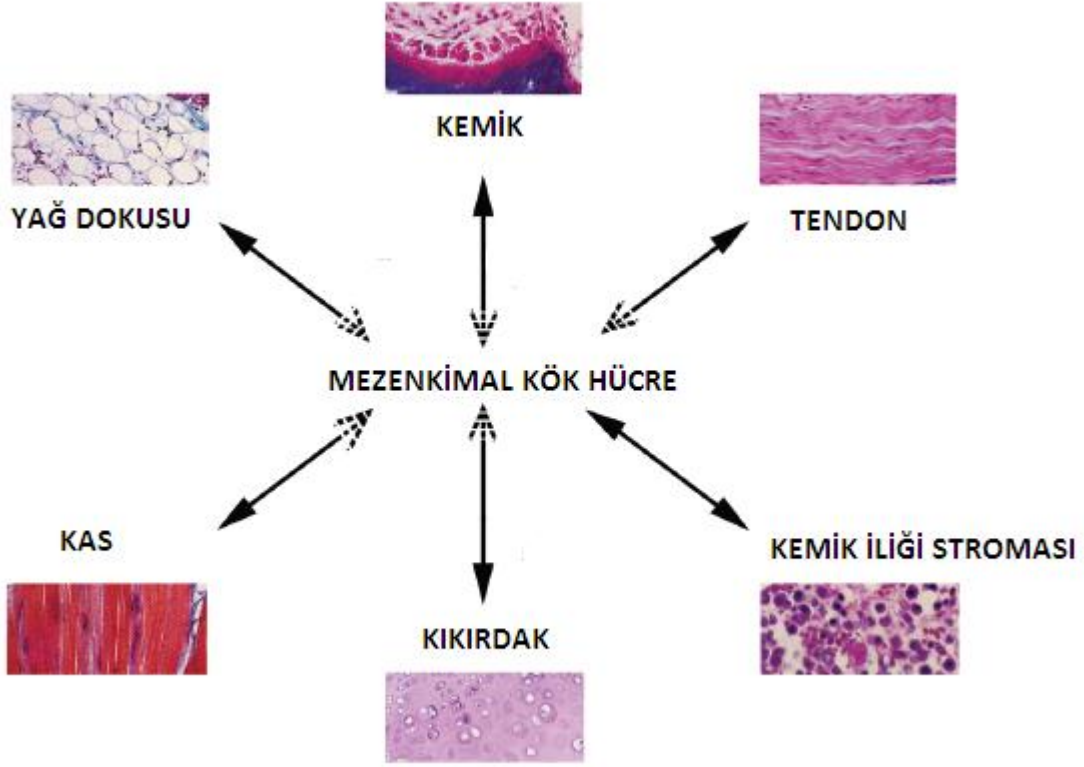
- 3 boyutlu bir kültür ortamı
- Serumsuz besiyeri
- TGF- β süper ailesinin bir üyesi gereklidir.

Şartlar uygun olduğunda hücreler hızlı bir şekilde fibroblastik morfolojilerini kaybederler ve glikozaminoglikan gibi kıkırdak spesifik ekstrasellüler matriks komponentlerini yaparlar. Kondrogenezin erken evresinde kondroitin sülfatın sülfasyonunda artış oluşur. Sonuç olarak 4 ve 6 sülfatlı kondroitin parçaları oluşur. Yaşamın ileri döneminde eklem kıkırdağında bu sülfasyon paterninde minimal değişiklikler olur.

TGF- β 3 varlığında mezenkimal kök hücreler, normal eklem kıkırdağının matriksindeki bağlama proteini, fibromodülün, kıkırdak oligmerik matriks protein, decerin, tip 2 kollajen ve kondroadenin sentezler. Kemik iliğinden üretilen mezenkimal kök hücreler için BMP-2 ile kombine TGF- β 3, en etkili kondrojenik uyarıcı iken, yağ kökenli mezenkimal kök hücreler için en kondrojenik uyarıcı BMP-6 ile kombine edilmiş TGF- β 'dir. Mezenkimal kök hücrelerin fenotipik olarak kondrosit diferansiasyonunu göstermede ise Alcian Blue boyaması yapılır.

Mezenkimal kök hücrelerin adipojenik diferansiasyonu için ise isobutilmetilksantin kullanılır.

Sonuç olarak mezenkimal kök hücreler vukuoller oluşturarak adiposite dönüşürler. Bu lipogenez, nükleer bir reseptör ve transkripsiyon faktörü olan preoksimom proliferatör-aktive reseptör γ (P-PAR- γ) ile aktive olurken, IL-1 ve TNF- α ile bloke olur. Mezenkimal kök hücrelerin fenotipik olarak, adiposit diferansiasyonunu göstermek için Oil Red O boyaması kullanılır (19,20).



Şekil 4: Mezenkimal kök hücrelerin değişim potansiyeli (21)

2.3.2.4.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanması ve Yüzeysel Belirteçleri

İnsan mezenkimal kök hücreleri pozitif yüzeysel belirteç antijenleri; CD73, CD 90, CD 105, ve hematopoetik antijenler olan CD 11b, CD 14, CD 19, CD 34, CD 45, CD 79 ve HLA-DR negatiflikleri ile tanımlanır. Mezenkimal kök hücrelerin, yüzeysel antijenlerine dayalı tanımlamaları için yapılan çalışmalar da, bu antijenlerin mezenkimal kök hücrelerin farklı türlerden izolasyonu, farklı dokulardan üretilmesi ve farklı kültür ortamlarına göre çeşitlilik göstermektedir (18).

Mezenkimal kök hücre Minimal tanımlama kriterleri; (Uluslararası Hücre Tedavi Topluluğu)

- a) Doku kültür kabına standart kültür şartlarında yapışabilme (% 10 FBS içeren besiyeri gibi)
- b) Hücre yüzey karakterizasyonu

Pozitif	Negatif
CD73	CD 11b veya CD 14
CD 90	CD 34
CD 105	CD 45
CD 44	CD 79- α veya CD 19
	HLA DR

Tablo 2: Mezenkimal kök hücrelerin hücre yüzey belirteçleri

- c) *In-vitro* şartlarda 3 tipte mezodermal diferansiasyon gösterebilme (osteoblast, kondrosit, adiposit) (22)

2.3.2.4.1.3. Mezenkimal Kök hücre İzolasyonu

Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, umbilikal kord stroması (Warton jeli), plasenta, adipoz doku, sinovya, süt dişi ve deriden izole edilebilir. Bunların içinde en sık mezenkimal kök hücre izolasyonu için kemik iliği kullanılır. Standart kültür şartlarında (% 10 FBS içeren ortam) herhangi bir kaynaktan elde edilen mezenkimal kök hücreler büyür, sferik şekilden iğsi şekile dönüşürler ve asılı durumdan kültür kabına yapışık hale geçerler (2,18,20).

2.3.2.4.1.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Tedavide Kullanımı

2.3.2.4.1.4.1. MKH'lerin İmmünomodülatör Olarak Kullanımı

Mezenkimal kök hücrelerin romatolojik hastalıklarda kullanım açısından önemli özelliği *in-vitro* ve *in-vivo* kuvvetli immünosupresif ve antienflamatuar etkileridir. Mezenkimal kök hücrelerin hücre-hücre etkileşimi ve çeşitli faktörlerin salınımı ile immün sistemi lokal

baskılayıcı bir çevre yarattığı düşünülse de immünomodülatör etkileri tam olarak anlaşılmamıştır. Ayrıca bu tedavinin sonuçları henüz kesinleşmiş değildir.

Mezenkimal kök hücreler sitokin salınımı değiştirerek ve dentritik hücre, doğal ve efektör T hücre, NK hücre (doğal öldürücü hücre) çağalmasını uyararak daha toleran bir fenotip ve antienflamatuar etkinlik sağlar. Enflamatuar sitokinlerden TNF- α , IFN- γ sekresyonunu azaltırken, antienflamatuar sitokinler olan IL-4, IL-10 sekresyonunu artırırlar. Bu etkilerden ötürü Romatoid Artrit tedavisinde *in-vivo* mezenkimal kök hücre kullanımı umut verici olsa da sonuçları kesin değildir.

Mezenkimal kök hücrelerin tümör büyümesi ve metastaz arttırıcı etkileri ise tartışmalıdır. Mezenkimal kök hücre tümör ilişkisindeki diğer bir konu ise mezenkimal kök hücrelerin bir kaç pasaj sonrası sitogenetik birikime bağlı neoplastik özellik kazanabilmesidir. Bu durum raftan alınarak kullanılan allojenik kullanımlarda dikkatli olunmasını gerektirir (19).

2.3.2.4.1.4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kıkırdak Hastalıklarında Kullanımı

Kıkırdak yapısal olarak avasküler olması sebebiyle kendiliğinden iyileşme yeteneği sınırlıdır. Bu sebeple kıkırdak yaralanması veya osteoartrit gibi hastalıkların tedavisinde mezenkimal kök hücreler, güncel araştırma konusu olmaya devam etmektedir. Elde edildiği doku temel alındığında sinovyadan izole edilmiş mezenkimal kök hücreler en güçlü kondrojenik özelliğe sahiptir (19).

2.3.2.4.1.4.3. MKH'lerin Menisküs Onarımında Kullanımı

Menisküslerin avasküler zonlarındaki yırtıklar potansiyel bir kanama varlığı olmadığı için tamir edilemez. Bir tedavi metodu olarak, menisektominin ise osteoartrit gelişimiyle yakın ilişkisi gösterilmiştir. Son dönemde menisküs yırtıklarında hücre kaynaklı tedaviler denenmektedir. İzole edilen kondrositler meniskal matrikse ekildiğinde, ayrılmış meniskal parçaları bir arada tuttuğu görülmüştür. Biyomekanik ve histolojik çalışmalar, bu şekilde yeni sentezlenen kartilajenöz matriks ile adezyonun güçlendiğini göstermiştir. Bütün bunlar menisküsün avasküler zonundaki yırtıklarda menisektomiye bir alternatif olarak hücre kaynaklı tedavilerin potansiyel iyileştirici etkileri hakkında umut yaratmaktadır (23).

2.3.2.4.1.4.4. MKH'lerin Tendon ve Ligamentlerin Onarımında Kullanımı

Tendon ve bağ yaralanmaları düşük kaliteli doku ile iyileşir. Ototogreftler, allogreftler ve resorbe olabilen biyomateryeller tedavide defektler için kullanılabilir. Greft kullanımı donör morbiditesine, skar oluşumuna ve doku reddine sebep olabilir. 1 cm'lik tavşan aşil tendon defektinde yapılan çalışmada, defekt üzerine mezenkimal kök hücre yerleştirildiğinde, çapraz bağlı ve düzgün uzanımlı kollajen lifleri görülmüş ve kontrol grubuna göre daha iyi sonuç elde edilmiştir.

Ön çapraz bağ (ÖÇB) yırtıkları sonrası yapılan rekonstrüksiyon ameliyatlarından sonra ÖÇB'nin kompleks anatomisini kazanması yaklaşık 6 ayı bulmaktadır. ÖÇB rekonstrüksiyonu sırasında uygulanan mezenkimal kök hücrelerin kemik-tendon iyileşmesi açısından neredeyse sağlam ÖÇB-kemik arasındaki ilişkiye yakın bağlanma geçmişte gösterilmiştir (23).

2.3.2.4.1.4.5. MKH'lerin Spinal Kanal Yaralanmalarında Kullanımı

Mezenkimal kök hücre tedavisinin spinal kanal yaralanmalarında potansiyel bir tedavi metodu olabileceği üzerinde durulmaktadır. Bunun sebebi pluripotent olan bu hücrelerin sinir hücresine de dönüşebilme potansiyelleridir. Hayvan deneylerinde aksonal rejenerasyonu sağladığı, kemik kökenli mezenkimal kök hücrelerin demyelinize sinirlerde tekrar miyelinizasyonu sağladığı, lokal spinal refleks yollarında yeniden yapılanmaya sebep olduğu bildirilmiştir (23).

2.3.2.4.1.4.6. MKH'lerin Müsküler distrofi tedavisi

Müsküler distrofiler, ilerleyici kas güçsüzlüğü ve atrofisi, paralizi bulguları olan bir nöromüsküler hastalık grubudur. İmmün sistemin farmakolojik olarak baskılanması kullanılan bu hastalıkların tedavisinde, kök hücre nakillerinin yararlı olabileceği düşünülmektedir. Mezenkimal kök hücre nakilleri sonrası bu hastalarda, kök hücrelerin miyofibrillere dönüştüğü, kas hasarı olan bölgelerde miyojenik farklılaşma gösterdikleri bildirilmiştir. Tüm bunlar müsküler distrofilerin tedavisinde ilerki döneme ait umut oluşturmaktadır (23).

2.3.2.4.1.4.7. MKH'lerin Osteogenezis İmperfekta'da Kullanımı

Osteogenezis İmperfekta (OI), genetik özellikte Tip 1 kollajen hastalığıdır. Kollajenin bir osteoblast ürünü olması mezenkimal kök hücre tedavisinin bu hastalarda yararlı olabileceğini

düşündürmüştür. Hayvan deneylerinde normal bir fareden alınan mezenkimal kök hücrenin Oİ'li bir fareye nakledilmesiyle Oİ'li farenin kemiklerinde normal özellikte kollajen parçalarına rastlanmıştır (23).

2.3.2.4.1.4.8. MKH'lerin Kemik İyileşmesinde Kullanımı

Travma ve bazı patolojik durumlar büyük miktarda kemik kaybına sebep olabilir. Bu durum defektli alana kemik doku nakli ihtiyacına sebep olabilir. Ancak bunun sonucunda donör saha morbiditesi ve enfeksiyon gibi riskler ortaya çıkmaktadır. Hayvan modelleri üzerinde, kemik iliği kaynaklı osteoprogenitör hücrelerle yapılan çalışmalar, insan kemik doku defektlerinde otojen stromal öncülerin kullanılabilceği konusunda yol gösterici olmuştur.

Başarılı kemik doku mühendisliği osteoprodüksiyon, osteoindüksiyon, osteokondüksiyon ve mekanik uyarımı içerir.

Osteoprodüksiyon, hücrenin kemik ürünleri salınımı tanımlar. Kemik defektlere mezenkimal kök hücre transferiyle iyileşme çalışmalarda gösterilmiştir (23).

Osteoindüksiyon büyüme faktörlerinin osteojenik hücreleri defekt alanına çekmesini tanımlar. TGF- β 3 ve analoglarının, kemik morfojenik proteinlerinin (BMP) kullanılmaya başlamasıyla kemik iyileşmesinde artış gözlenmiştir.

Osteokondüksiyon, kemik hücresi taşıyan yapıların, alıcı bölgede birleşmesidir. Greftler aktarılan ve remodele olan skafoldlar gibi davranırlar.

Mekanik stimülasyonun kemik hücre çoğalmasında ve farklılaşmasında aynı zamanda kemik mineralizasyonunda etkili olduğu geçmiş çalışmalarda göstermiştir (23).

2.4. Kemik doku

Kemik yapı iyi organize olmuş vücudun en önemli destek yapısıdır. Kasların tutunması için sağlam bir yapı oluşturur ve kas kasılmalarını harekete dönüştüren bir kaldıraç kolu gibi iş görür (24).

Kemik mekanik özellikler açısından, gerilme gücü demire yakındır, fakat demirden 3 kez daha hafif ve 10 kez daha esnektir. Kemik matriksi organik ve inorganik bileşenler içerir, iç ve dış yüzeyi hücreler ile kaplanmıştır. Olgun kemik, periost ve kemik doku tarafından çevrilmiş yağlı veya hematopoetik kemik iliği içerir. Kemik iliği kemik hücreleri için kaynak oluşturur ve iliğin kan damarları kemik dolaşımının önemli bir parçasıdır. Kemik iliğinin hastalıkları veya mekanik hasarlanmaları kemik ve periostal hücrelerin aktivitelerini etkiler. Kemik yüksek

miktarda ekstrasellüler matriksle çevrili mezenkimal kök hücreler içerir. Matriksteki mineral yapı dokuya mükemmel güç, sertlik ve eğilme özelliği verir (25).

Kemik dokusu makroskopik olarak kortikal ve spongiöz olmak üzere iki tip kemikten oluşur. Kortikal kemik sıkı kompakt kemik dokusudur. Düşük gözeneklidir ve makroskopik boşluk görünmez. Diafizel bölgede kortikal kemik yük taşır. Metafizler ve epifizer bölgede ise yükün bir kısmını taşır, bu bölgede asıl yükü trabeküler kemik taşır. Kortikal kemik dokusu mikroskopik olarak primer kemik dokusundan oluşur. Kollajen ve mineralizasyon düzensiz ve rastgeledir.

Trabeküler kemik porozite gösteren kemik bölümüdür. Makroskopik gözeneklilik %30 ile % 90 arasında değişir. Osteoporozda makroskopik gözenekler trabeküllerdeki incelmeye bağlı olarak artmıştır. Mikroskopik olarak kortikal kemik dokusunun remodelasyonu sonucu oluşmuş sekonder kemik dokusudur (26).

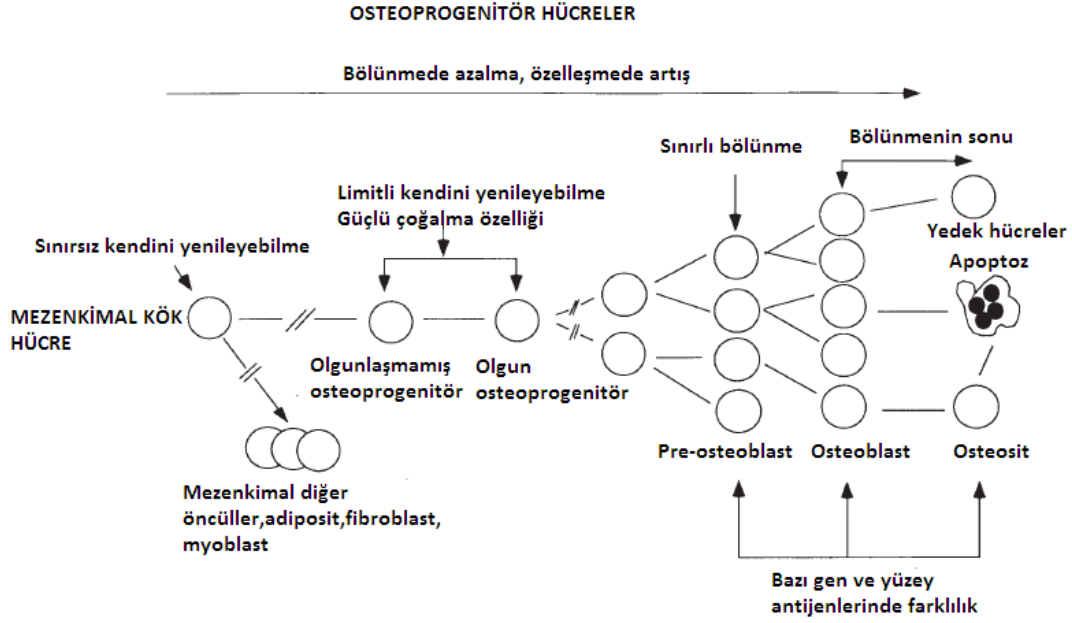
2.4.1. Kemik doku hücreleri

1-) Mezenkimal kökenli hücreler

Bu hücreler osteojenik hücrelerdir. İğsi, uzun bir sitoplazmaları vardır. Kemik hücre prekürsörleridir. Periost ve kemik iliğinde sayıları fazladır.

2-) Osteoblastlar

Matürasyon evreleri açısından pre-osteoblast, osteoblast ve osteosit basamaklarını izler. Olgunlaşmış osteoblastlar kemik metabolizmasında daha sonra mineralize olacak olan kemiğin organik matriks elemanlarının sentezinden sorumludur. Osteoblastlar alkalen fosfataz (ALP) gibi fenotipik belirteçler, kollajenöz ve osteokalsin gibi kollajenöz olmayan matriks proteinlerini üretirler. Osteoblastlar ayrıca diferansiyasyonlarında rol oynayan paratiroid hormon, 1- α ,25-dihidroksivitamin D₃, östrojen ve glukokortikoid reseptörleri taşırlar. Osteoblastlar osteositlere dönüşürken bazı özelliklerini kaybederken, bazı yeni özellikler kazanırlar (24).



Şekil 5: Mezenkimal kök hücreden osteosite farklılaşma (27)

3-) Osteositler

Olgun osteositler satellit şekilli veya dentritik hücrelerdir. Kemik lakunalarında bulunurlar. Osteositler kan kalsiyum metabolizmasında ana role sahiptir. Osteoblastlar mineralize matriks içine gömülerek osteosit haline gelirler. Mitoza uğramayan, düşük metabolik aktiviteli ve sentez kapasitesi düşük olan hücrelerdir. Osteoblastlardan farklı olarak ALP sentezlemezler. Osteositler arasındaki sinyal iletişimi protein komplekslerinden oluşan ‘gap junction’ denilen yapılar tarafından sağlanır (26).

4-) Osteoklastlar

Multinükleer kemik rezorpsiyonundan sorumlu hücrelerdir. Belirteç proteinleri tartarat rezistans asit fosfataz (TRAP), Kalsitonin reseptörü ve Katepsin K’dır. Osteoklastlar monosit/makrofaj kökenli hematopoetik hücrelerdir. Multinükleer oluşları mononükleer öncüllerinin birleşmeleri ile olur. Kemik yüzeyine yapışarak hücrelerin altında bir alan oluştururlar. Bu bölgeden başlayarak rezorpsiyon yaparlar. Bu bölgeden proteaz ve iyonlar salgılayarak organik ve non-organik bileşenleri çözerler. Osteoklastların diferansiasyonu ve aktiviteleri primer olarak RANKL (nükleer faktör kapa B ligand) ve osteoprotegerin ile düzenlenir. RANKL osteoklast aktivasyonuna sebep olurken, osteoprotegerin osteoklastları inhibe eder (26).

2.4.2. Kemik matriksi

Kemik matriksi % 40 organik ve % 60 inorganik bileşenlerden oluşmuştur.

2.4.2.1. Organik matriks

Kuru kemik ağırlığının % 40'ıdır. % 90 Tip 1 kollajen, % 5 diğer kollajenler (Tip 3 ve 4), kollajen olmayan proteinler, büyüme faktörleri ve sudan oluşur.

a) Kollajen

Primer olarak Tip 1 kollajenden oluşur. Ekstrasellüler ana proteindir. kollajen fibrilleri içinde boşluklar mevcuttur. Paralel moleküllerin yan yüzleri porlar içerir. Mineral birikimi yani kalsifikasyon bu boşluklar ve porlarda oluşur. Tip 1 kollajen fibrillerindeki üçlü helikal yapı kemiği gerilme kuvvetlerine karşı güçlü kılar. Küçük miktarlarda Tip 3 ve Tip 4 kollajen görülür.

b) Kollajen dışı matriks proteinleri

1-) Osteokalsin;

K vitaminine bağlı proteindir. Osteoblast diferansiyasyonunun belirteçidir.

2-) Fosfoproteinler;

Negatif yüklü proteinlerdir. Bu sebeple kalsiyumla beraber hareket ederek mineralizasyonda rol oynarlar.

3-) Büyüme faktörleri ve sitokinler;

Kemik diferansiyasyonu ve aktivasyonunda görevlidirler. Kemik morfojenik proteinler (BMP), TGF- β , bFGF, IGFs ve interlökinler bu gruba girer.

4-) Adezyon proteinleri;

Fibronektin ve vitronektin hücrelerin yapışma ve ayrışmalarında rol oynarlar.

5-) Proteoglikanlar;

Protein çekirdek ve glikozaminoglikanlardan oluşur. Dokunun yapısını destekler, büyüme faktörlerine bağlanır, hücresel çoğalmayı regüle eder ve hücre yüzey reseptörü olarak davranırlar.

2.4.2.2. İnorganik matriks

Kompresif strese dayanıklılık sağlar. Primer olarak hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat formunda kalsiyum ve fosfattan oluşur. Magnezyum, sodyum ve karbonat da içerir. Kemiğin mineral bileşeni, kollajen fibrilleriyle yakın ilişkidir (26,28).

2.5. Kırık İyileşmesi

Kıkırdak, kas, tendon, ligament ve sinirler gibi tüm muskulo-skeletal dokular yaralandıklarında fibröz doku ile iyileşir. Bunun tek istisnası kemik dokusudur. Kemiğin iyileşimi skar dokusuyla değil yine kemik ile olur (29). Kemik iyileşmesi organizmanın kullandığı yol göz önüne alındığında primer ve sekonder olarak 2 şekilde olur.

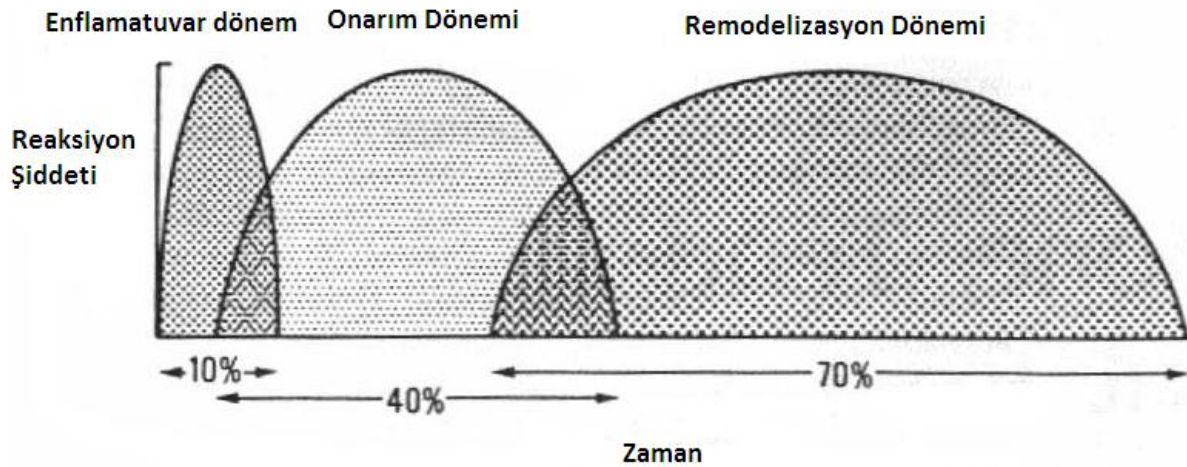
2.5.1 Primer (Birincil) Kemik İyileşmesi

Kırık yüzeyleri sıkıca temasta tutulursa, kırık iyileşmesi büyük çapta gözle görülür kallus olmadan kansellöz veya kortikal kemik içinde oluşabilir. Bu iyileşme biçimine ‘Birincil kemik iyileşmesi’ denir. Kırık uçlarının sıkıca birleştirildiği sıkıca tespit edilmiş çoğu kırıkta, kemik uçlarının temasta olduğu kırık çizgilerinin mevcut olduğu bölgeler ve küçük boşlukların bulunduğu başka alanlar vardır. Kemik uçları arasında temas olan bu bölgelerde lamelli kemik, kırık çizgisi üzerindeki osteon uzantıları tarafından oluşturulabilir. Bir osteoklast kümesi kırık çizgisi boyunca nekrotik alanları yararak ilerler, osteoklastları izleyen osteoblastlar yeni kemiği oluştururlar ve kan damarları da osteoblastları izlerler. Yeni kemik matriksi, çevresindeki osteositler ve kan damarları yeni haversian sistemleri oluştururlar. Osteonların kırık bölgesi boyunca boyunca doğrudan uzanmasını önleyen boşlukları, osteoblastlar örgülü kemik ile doldururlar. Boşluklar örgülü kemikle dolduktan sonra normal kortikal kemik yapısı yeniden sağlanarak, haversian şekillenmesi yeniden başlar (30). Özetle; kırık uçlarında kompresyon olmadan veya kompresyonun olduğu rijid fiksasyon sonrası görülür. Sekonder kırık iyileşmesinden farklı olarak kallus oluşumu görülmez, kıkırdak süreç yoktur. Kırık hattındaki

nekrotik alanlar osteoklastlar tarafından rezorbe olur ve boşaltılan bu alanlarda osteoblastik aktivite ile yeni kemik yapılır (31).

2.5.2. Sekonder (İkincil) Kırık İyileşmesi

Kırık hattında rijid fiksasyonun olmadığı durumlarda spontan kırık iyileşmesini ifade eder. Kırık iyileşmesinin daha sık görülen şeklidir. Kallus oluşumu gerekir. Genellikle iç içe geçmiş dönemler olsada enflamatuar dönem, tamir dönemi ve remodelizasyon dönemi olmak üzere 3 evrede incelenebilir. Bu dönemlerden en uzun süreni remodelasyon dönemidir ve birkaç yıl sürebilir.



Şekil 6: Sekonder (ikincil) kırık iyileşme dönemleri (32)

2.5.2.1 Enflamatuar (Hematom, Yangı) Dönemi

Kırığa sebep olan yaralanma sadece hürelere kan damarlarına, kemik matriksine zarar vermez aynı zamanda sinir ve kaslardan oluşan çevre yumuşak dokuyada zarar verir. Yaralanmayı takiben hemen enflamatuar yanıt başlar. Bu yanıt 48 saat içinde doruk noktasına ulaşır ve yaklaşık 1 hafta içinde sonlanır (31). Yaralanma sırasında kemikteki, kemik iliğindeki, periosttaki ve çevreleyen kan damarlarının yırtılması ile kırık alanında kan damar dışına çıkarak, kan pıhtısı oluşumuna sebep olur. Bu pıhtı oluşumu genellikle kırık onarımının ilk adımında görülür. Hematom kaybının kırık iyileşmesini bozar. Pıhtının kırık iyileşmesini

etkileme sebepleri hala tam anlaşılammıştır. Muhtemel sebep, bozulmamış kırık pıhtısı, iyileşmeyi sağlayan hücrelerin göçünü kolaylaştıran bir fibrin yapı iskelesi sağlamaktadır. Ayrıca pıhtıdaki trombositler ve hücrelerce salıverilen moleküler araçlar kırık onarımının yönetilmesinde rol oynar (30). Kırık onarımın bu döneminde moleküler düzeyde damar endoteli hasarı sonrası kompleman sistemi aktifleşir, trombosit agregasyonu ve sonuçta α granül degradasyonu gerçekleşir. Trombositlerin degradasyonu büyüme faktörlerinin salınımını sağlayarak kemotaktik sinyallere sebep olur. Polimorf nüveli lökositler (PMNL), lenfosit, kan monositleri ve doku makrofajları yaralanma alanına göç eder. Bu hücreler anjiogenez için gerekli olan sitokinleri salgılar.

Kırığın erken dönemlerinde ortam hipoksik ve asidiktir. Bu PMNL ve doku makrofajları için ideal ortamdır. Kırık hematomu bu sayede kırık iyileşmesinde önemli EGF, FGF, PDGF, TGF- β , IL-1 gibi sitokinleri içerir. Enflamatuar reaksiyon sayesinde ayrıca ağrı ve şişlik oluşarak kırık hattının mobilizasyonu kısıtlanır ve iyileşme için ortam sağlanır (31).

2.5.2.2 Onarım (Reperasyon) Dönemi

Enflamasyondan sorumlu hücrelerin nekrotik alanları rezorbe ettiği, fibroblastların tamir dönemini başlattığı evredir. Bu dönemin spesifik olayı ise kırık hematomunun organizasyonudur. Kırık hattının tamirinde asıl rol oynayan hücreler pluripotent mezenkimal kök hücrelerdir. Bu hücreler kırık hattındaki granülasyon dokusundan, yaralanmış dokulardan, periostun iç osteoblastik tabakasından köken alırlar. Bazıları ise yaralanma bölgesine kan damarları yolu ile gelir (31).

Hasarlanan periost, kemik iliği ve yumuşak dokudaki nekrotik hücreler rezorbe olurken, mezenkimal kök hücreler fibroblast, kondroblast ve osteoblastlara farklılaşmaya başlar. Osteoblastlar osteodi, fibroblastlar kollajeni, kondroblastlarda kollajen ve glikozaminoglikanları salgılar. Ayrıca bu hücreler salgıladıkları sitokinlerle kırık hematomunun organizasyonunun başlamasına sebep olurlar. Bu esnada kallus fibröz konnektif doku, kan damarları, kırıkta, örgümsü kemik ve osteoidden oluşur. Bu kallusa fibröz kallus denir. Bu dönem kırığın ortalama ilk haftasında görülür (31).

Kırık iyileşmesinin ilk zamanlarında periostal damarlar, geç dönemde ise nütrisyonel (besleyici) damarlar kılcal damar tomurcuklanmasına yardımcı olur. Fakat kılcal damar artışı osteojenik hücre artışı kadar hızlı olmadığından beslenmenin iyi olduğu kemiğe yakın

kısımlardaki hücreler osteoblasta dönüşür. Kemiğe uzak olan az beslenen hücreler kondroblast ve kondrosite dönüşerek kırık dokuyu oluşturur. Dolaşımın iyi olduğu bölgedeki osteoblastlar kemik trabeküllerini oluşturarak kırık tabakanın üzerini örter. Fibröz kallus içerisinde, zamanla kırık hücrelerinin hakimiyeti artmasıyla meydana gelen kırık kallus oluşumu, damarlanmanın artmasıyla birlikte kemik gelişimine doğru ilerler (32). Tamir ilerledikçe PH önce nötrale sonra hafif bazik hale gelir. Bu durum alkalen fosfataz aktivitesi ve kemik mineralizasyonu için optimum koşulu oluşturur (31). Damarlanma yeterli olduğunda osteoblastlar matriks sentezine başlarlar ve osteodin mineralizasyonu ile birlikte sert (kemik) kallus oluşur.

Mineralizasyonda osteoiddeki matriks vezikülleri ana rolü oynar. Osteoblastlar ve kondroblastlar bu matriks veziküllerini sentezler. Veziküller yüksek düzeyde kalsiyum (Ca) ve fosfat (PO₄) iyonları CAMP, ATP, adenozintrifosfataz, alkalen fosfataz, pirofosfataz, Ca bağlayan protein ve fosfoserin içerir. Vezikül membranı Ca'ı membrandaki pompalarla veziküle taşır, vezikül içinde iyon artışıyla kristalizasyon oluşur, büyüyen kalsiyum hidroksiapatit parçaları vezikülü patlatarak içeriği dışarı çıkar. Alkalen fosfataz, fosfat esterlerinden fosfat ayırarak, kalsiyum fosfat olarak çökmesini sağlar. Kalsifikasyon kemiğin kollajen demetlerinin üzerinde kalsiyum fosfat biriktiği zaman başlar. Bu olay proteoglikanlar ve kalsiyum bağlayan protein olan osteonektin ile uyarılır. Kırık dokuda kalsifikasyon başlamasıyla beraber kalsifiye doku içinde kalan kondrositler ölür ve buldukları yerlerde lakunalar (boşluklar) oluşur. Lakunalar bir yandan genişlerken bu alanlara kılcal damarlar ve kemik hücreleri girmeye başlar. Damarlanma kalsifikasyon yokluğunda ilerleyemez. Son olarak bu alanda trabeküler (süngerimsi) kemik oluşur. Kırıktan kemik oluşumunda FGF rol oynar.

Sonuç olarak kırık uçlarındaki ölü kemik uçları prostaglandinler tarafından uyarılan osteoklastlar tarafından rezorbe (geri emilim) edilirken, bir tarafta osteoblastlar tarafından yeni kemik senteziyle boşluk doldurularak kırık iyileşmesi sağlanır. Yaralanma sonrası kallus oluşumu ve mineralizasyonun sağlanması yaklaşık 4-16 hafta zaman gerektirir (32).

2.5.2.3 Yeniden Şekillenme (Remodeling) Dönemi

En uzun süren evredir. Birkaç yıl sürebilir. Bu evre düzensiz sert kallusun daha düzenli lamellar kemiğe dönüşümüdür (32). Olgunlaşmamış kırık kallusu normal kemikten zayıftır ve tam gücüne ancak yeniden şekillenme evresi sırasında kavuşur. Onarımın son aşamalarında,

onarım dokusunun yeniden şekillenmesi, lamelli kemiğin örgü kemikle (trabeküler) yer değiştirmesiyle ve artık gereksinimi duyulmayan kallusun emilmesiyle başlar. Kırık kallusunun yeniden şekillendirilmesi hücrel ve matriks değişimlerinin çok önemli bir evresi olsada, hasta için önemli sonuç mekanik stabilitedeki artıştır (30). Bu evrede 4 olay gerçekleşir.

- 1- Kalsifiye kırıkta, osteoid dokuyla yer değiştirerek birinci trabeküler yapı oluşturur.
- 2- Lamellar kemik bu yapının yerini alır.
- 3- Kompakt kemik uçlarındaki kallus, lamellar kemikten yapılmış ikincil osteonlara değişir.
- 4- Kemik iliği yeniden şekillenir. Kanal içindeki kallus osteoklastlarca geri emilir.

Wolf kanunu günümüzde kemiğin yeniden şekillenmesinde temel bir kural olarak kabul edilmektedir. Mekanik strese maruz kalan kemiğin konveks yüzü pozitif, konkav yüzü negatif elektrikle yüklendiğinden, osteoklastik aktivitenin hakim olduğu konveks yüzde geri emilim ve osteoblastik aktivitenin hakim olduğu konkav yüzde ise yeni kemik yapımı olmaktadır (32).

Sonuçta kırık oluşmasından sonra, periostal veya periferik kaynaklı mezenkimal kök hücreler, kaynama için gerekli olan osteoblastlara farklılaşarak kırık kaynamasında hücrel düzeyde ana rollerden birini oynar.

3-GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, 15.02.2011 tarihinde Yeditepe Üniversitesi klinik çalışmalar etik kurulunun 079 numaralı onayı alındıktan sonra başlamıştır. Hastalardan örnek alınması öncesi tüm hastalara işlem anlatılmış, çalışma hakkında ayrıntılı bilgi verilmiş ve ayrıntılı gönüllü onam formu, imzalatılarak alınmıştır.

Kök hücre için örnek alınan hasta, 23 yaşında erkek hasta olup, daha önce femur orta 1/3 shaft kırığı sebebiyle kapalı redüksiyon + intramedüller çivi ile tespit işlemi uygulanmış ancak psödoartroz gelişmiş hasta idi. Hastaya femur psödoartrozu için tekrar cerrahi endikasyon koyulmuş ve intramedüller çivi değişimi + otojen iliak allogreft ile grefonaj işlemi planlanmıştır. Dolayısıyla kök hücre için alınan aspirasyon örneği, allogreft alındıktan sonra toplanmış ve hastaya ek morbidite yaratılmamıştır.

Adipoz doku örneği alınan hasta, 32 yaşında bayan hasta olup liposuction operasyonu yapılmıştır. Hastanın lipoaspiratının 60 cc si steril olarak alınmış ve kültür ortamına taşınmıştır. Spongios otojen greftler total kalça protezi yapılan tamamı bayan yaşları 65-71 yaş arasındaki altı hastadan ve femur boyun kırığı sonrası parsiyel kalça protezi yapılan 70 yaşındaki bir bayan hastadan alınmıştır. Yine tüm hastalara operasyon öncesi bilgi verilmiştir ve hastalardan ayrıntılı gönüllü onam formu imzalatılarak alınmıştır. Hastaların ameliyat sırasında femur boyun osteotomisi yapılarak çıkarılan femur başları steril olarak hazırlanan özel besiyeri içinde taşınmıştır. Hastalara ek morbitide yaratılmamıştır.

Alınan tüm örnekler sterilite koşullarına uyularak, Yeditepe Üniversitesi Biyogenetik ve Biyomühendislik Laboratuvarına getirilerek işleme tabi tutulmuştur.

3.1. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu İçin Kemik İliği Aspirat Örneği Alınması

- a. Cerrahi sırasında iliak kanattan alınan otojen allogreft sonrasında heparinli enjektörle 15 cc iliak kaynaklı kan aspiratı steril koşullarda alındı.
- b. Alınan örnek 1 saat içinde işleme tabi tutulmak üzere laboratuvara ulaştırıldı.

3.2. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu İçin Adipoz Doku Aspirat Örneği Alınması

- Abdominal liposuction sırasında, enjektörle 60 cc adipoz doku aspiratı steril koşullarda alındı.
- Alınan örnek 1 saat içinde işleme tabi tutulmak üzere laboratuvara ulaştırıldı.

3.3. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

- Tüm çalışma boyunca kontaminasyonun önlenmesi amacı ile laminar air flow cihazı içinde çalışıldı.



Şekil 7: Laminar air flow cihazı

- İlk olarak heparinli enjektör içinde getirilen örnek 1/10 oranında olacak şekilde serum fizyolojikle dilue edildi.
- Örnek 50 ml lik İsolab falkon tüplerinde 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sırasında ekim için kullanılacak harvest besiyeri hazırlandı. Bu besiyeri için DMEM –high glucose + % 10 FBS + Primocin (1000 Ünite/ mililitre) kullanıldı.
- Santrifüj tamamlandıktan sonra üste gelen süpernatat (sıvı) kısım atıldı.
- Falkon tüpünün dibinde kalan pelletler (hücreler) harvest besiyeri ile çözüldü.
- Falkon tüpünün üstünde kalan sıvı kısım atıldı.

- h. Altta kalan hücreler α -MEM ile çözüldü.
- i. Çözülen hücreler TPP marka T175 flasklara ekildi.
- j. Flasklar % 5 CO₂ içeren 37 °C derece sıcaklıktaki inkübatörde 1 gece inkübasyona bırakıldı.
- k. İnkübatörden çıkarılan T175 flasklara yapışmayan hücreleri uzaklaştırmak için besiyeri döküldü
- l. Flakslara yeniden α -MEM eklendi.
- m. T175 flasklar tekrar 48 saat boyunca inkübatöre yerleştirilerek inkübasyon yapıldı
- n. 48 saat sonra inkübatörden çıkarılan T175 flakslar içindeki besiyeri döküldü
- o. T175 flasklar 2 defa PBS (fosfat bufford saline) ile yıkama yapıldı.
- p. T175 flasklara tekrar α -MEM eklendi.
- q. T175 flasklar tekrar inkübatöre yerleştirilerek inkübasyona devam edildi.
- r. 10. günde T175 flasklar içinde mezenkimal kök hücreler kabı doldurcak şekilde hem makroskopik hemde mikroskopik olarak gözlemlendi.

3.4. Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

İlk olarak hücre izolasyonu için kullanılacak olan kollajenaz solüsyonu ile eritrosit lizis solüsyonu (eritrosit parçalama solüsyonu) ve mezenkimal kök hücre kültüründe kullanılacak besiyeri hazırlandı.

3.4.1. Kollajenaz solüsyonu hazırlanışı

- a) 20 mg/ml lik dana albümin serumu (BSA) hazırlandı
- b) 1.5 mg/ml lik kollajenaz serumu hazırlandı ve belirtilen konsantrasyondaki BSA ile karıştırıldı.
- c) Hazırlanan karışım PBS'te çözüldü.
- d) Karışım 0.2 mikronluk filtreden geçirildi.
- e) Filtreden geçen karışıma 1 molar HEPES eklendi.
- f) Toplam volüm PBS eklenerek 100 ml'ye tamamlandı.

3.4.2. Eritrosit Parçalama Solüsyonu Hazırlanışı

- 154 milimolar amonyum klorür, 10 milimolar potasyum hidrojen karbonat, 0.1 milimolar EDTA karıştırıldı.
- Karışım 50 ml distile suda çözüldü.
- Karışım 0.2 mikronluk filtreden geçirildi.
- Total volüm distile su ile 500 ml'ye tamamlandı

3.4.3. Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Büyütmek İçin Kullanılacak Besiyeri

- Düşük glukozlu DMEM ve Ham's F12 alındı (1:1) olacak şekilde.
- % 10 FBS, %1 L-Glutamin, primocin (antibiyotik), 1 nonogram/mikrolitre FGF koyulup karıştırıldı.

Hazırlanan solüsyonlar alınan örneklere belirtilen sırada uygulandı

- Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücreleri izole etmek için, alınan adipoz doku örnekleri 1 saat içinde işleme alındı.
- Örnekteki 60 ml'lik sarı renkli tabaka (adipoz doku ve konnektif doku) alınarak 500 ml'lik şişeye koyuldu
- 60 ml kollajenaz solüsyonu şişeye eklendi.
- Şişe 37 °C derecede 1 saat boyunca sürekli çalkalanarak doku enzimatik parçalanmaya tabi tutuldu.
- Sonrasında örnek 50 ml lik falkon tüplere aktarılarak 2500 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj yapıldı.
- Süpernatant kısım atıldı ve çöken hücre tabakasına 2 ml eritrosit parçalama solüsyonu eklendi.
- Hücre süspansiyonu 50 ml lik falkon tüpüne aktarıldı.
- Tüpün içindeki hücre süspansiyonu, eritrosit parçalama solüsyonu ile 50 ml'ye tamamlandı.
- Süspansiyon 37 °C derecede 10 dakika boyunca sürekli çalkalandı.
- Süspansiyon 1400 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Süpernatant tabaka atıldı.
- Çöken hücre tabakası 10 ml büyüme besiyeri ile çözüldü.
- Hücreler 100 mikronluk hücre filtresinden geçirildi.
- Hücreler 37 °C derecede, %5 CO2 içeren inkübatöre alındı.

o) Hücreler 3 gün sonra PBS ile yıkanarak besiyeri yenilendi.

3.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Pasajlanması

- a. T175 flasklar içindeki besiyeri döküldü.
- b. T175 flasklara 3 defa PBS ile yıkama yapıldı.
- c. T175 flasklara Tripsin /EDTA eklenerek 5 dakika boyunca flakslar inkübatörde bekletildi.
- d. Tripsin /EDTA ile T175 flasklardan kaldırılan hücreler 2 ye ayrılarak bir kısmı donduruldu.
- e. Dondurulmayan hücreler facs tüplerinde 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- f. Süpernatatlar atıldı.
- g. Hücreler hemositometri ile mikroskop altında sayıldı.
- h. Hücreler her bir facs tüpünde 300.000 adet olacak şekilde bölündü.
- i. Toplam 6 adet facs tüpü elde edildi.
- j. Her bir tüpe 2 ml PBS eklendi ve 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- k. Üstte kalan süpernatantlar atıldı.
- l. Altta kalan hücreler 1 ml PBS ile çözüldü.
- m. Tüpler 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- n. Süpernatantlar atıldı.
- o. Daha sonra karanlık ortama geçilerek pasajlamanın sonuna kadar olan tüm basamaklar karanlık ortamda yapıldı.
- p. 6 facs tüpünden 5 tüpteki hücrelerin üzerine her bir tüpe bir belirteç olacak şekilde kök hücre yüzey belirteçleri olan CD24,CD44,CD45,CD90,CD117(c-kit) eklendi. Bir tüpe belirteç eklenmedi ve negatif kontrol olarak planlandı.
- q. Marker eklenen facs tüpleri her bir tüpün içeriği 100 mikrolite oluncaya kadar PBS ile dolduruldu.
- r. 45 dakika boyunca facs tüpleri oda sıcaklığında inkübe edildi.
- s. Her facs tüpüne 2'şer ml PBS eklendi.
- t. Facs tüpleri 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- u. Süpernatantlar atıldı.

- v. Bütün facs tüpleri içindeki hücreler 400 mikrolitre PBS ile çözüldü.
- w. Tüpler analiz için FACS cihazına yerleştirildi.



Şekil 8: Mezenkimal kök hücrelerin yüzey belirteçlerinin çalışıldığı Facs cihazı

3.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Dondurularak Saklanması

- a) Mezenkimal kök hücrelerin pasajlanmasından önce Tripsin/EDTA karışımıyla T175 flasklardan kaldırılan hücrelerin diğer yarısı dondurularak saklandı.
- b) Öncelikle freze-mix (dondurma karışım sıvısı) hazırlandı.
- c) 1/20 oranında dimetil sülfoksit/FBS (1/20) karıştırarak sıvı elde edildi.
- d) Hücreler 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi.
- e) Tüpte üstte kalan süpernatant kısım atıldı.
- f) Hücreler hazırlanan dondurma karışım sıvısı ile çözüldü.
- g) Her dondurma kabına (criyo-well) için 1ml (yaklaşık 1000.000 hücre/dondurma kabı) hücre-dondurma sıvısı karışımı koyuldu.
- h) Dondurma kapları buz dolabında -20 °C derecede izopropanol içine koyularak 1 saat bekletildi.
- i) Son olarak dondurma kapları izopropanol içinden alınarak – 80 °C derecelik dolaba koyularak saklandı.

3.7. Mezenkimal Kök Hücrelerin Açılması (Çözme)

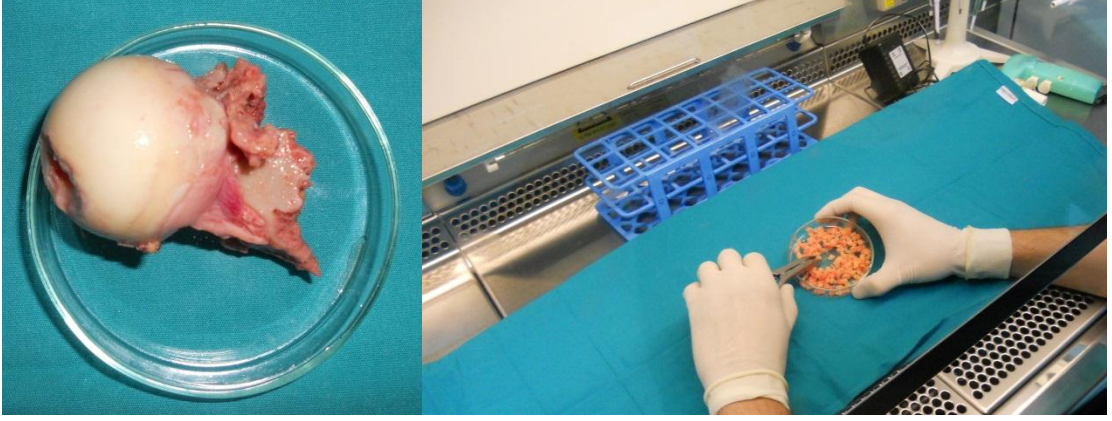
- a) 1 adet dondurma kabı – 80 °C derecelik dolaptan çıkarılarak hızlıca eritildi.
- b) Eriyen 1 ml hücre-sıvı karışımı 15 ml lik falkon tüpe alındı.
- c) Falkon tüpüne 9 ml α -MEM besiyeri eklendi.
- d) Tüp 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- e) Tüpün üstünde kalan süpernatantlar atıldı.
- f) Hücreler 1 ml α -MEM ile çözüldü.
- g) Çözülen hücreler T175 flaska ekildi.

3.8. Osteojenik Besiyeri Hazırlanması

DMEM-düşük glukoz, 0.1 mikromolar deksametazon, 10 milimolar β -gliserofosfat, 0.05 milimolar askorbik asit, % 10 FBS, % 5 Penisilin/ Streptomisin/ Fungisid (PSF) özellikli antibiyotik olacak şekilde eklenerek besiyeri hazırlandı.

3.9. Spongios Kemik Allogreftlerin Hazırlanışı

- a) Total kalça protezi (6 hasta) ve femur boyun kırığı (1 hasta) sebebiyle parsiyel protez yapılan toplam 7 hastanın alınan femur başları harvest besiyeri içinde taşınarak steril koşullarda farklı zamanlarda laboratuvara getirildi.
- b) Femur başlarının içinden spongios kemikler küret ve rongeur ile çıkarıldı.



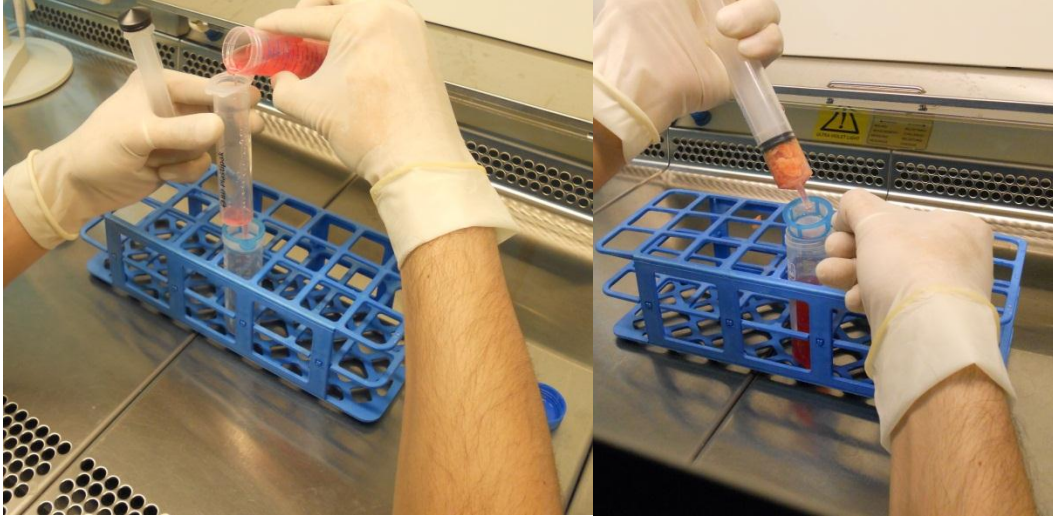
Şekil 9: Femur başının Laminer air flow cihazı içinde spongioz kısımlarının alınması

- c) Her bir femur başından 20 gram spongioz allogreft çıkarılarak falkon tüplere alındı.
- d) Falkon tüplerinin içine 20 ml osteojenik besiyeri (1 gr greft için 1ml besiyeri) eklendi
- e) Tüpler 72 saat inkübatörde bekletildi.



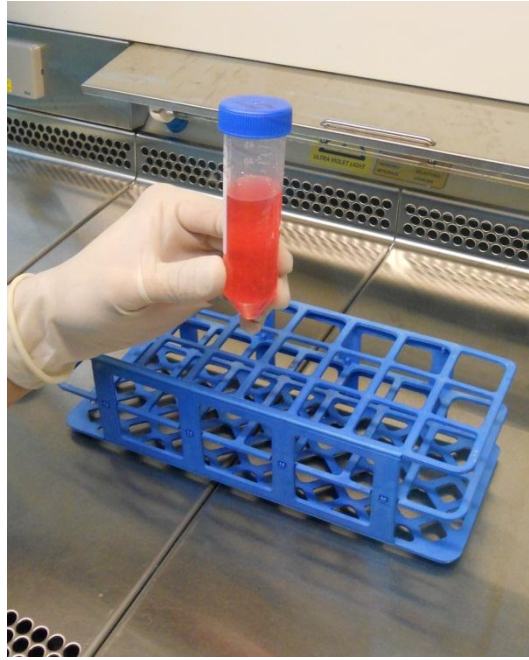
Şekil 10: Spongioz kemik allogreftlerinin inkübasyonu

- f) 72 saat sonra bu karışım 70 mikronluk hücre süzücüden (cell-strainer) geçirildi.



Şekil 11: Spongios kemik allogreftlerin hücre süzücünden geçirililerek toplanması

g) Karışımlar + 4 °C derecelik buzdolabında saklandı.



Şekil 12: Elde edilen kemik allogrefti materyali

3.10. Mezenkimal Kök Hücrelerin Ekimi

- T175 flaska ekilerek inkübatörde bekletilen hücrelerin kaplarından besiyeri döküldü.
- T175 flasklar 3 kere PBS ile yıkandı

- c) Tripsin/ EDTA flasklara eklendi
- d) Flasklar 5 dakika inkübatörde bekletildi.
- e) Kaldırılan hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- f) Süpernatantlar atıldı.
- g) Hücreler hemositometre ile mikroskop altında sayıldı.
- h) Her kuyucuk (well) için 10.000 hücre olacak şekilde sayım yapılarak hücre sayıları ayarlandı.
- i) 24 kuyucuklu kap kullanılarak her bir kuyucuğa 10.000 hücre ekildi.
- j) Üzerine 500 mikrolitre/kuyucuk olacak şekilde kemik greftsiz osteojenik besiyeri ve kemik greftli osteojenik besiyeri olacak şekilde eklendi.

3.11. MTS Analizi (Hücrelerin Proliferasyonunun Gösterilmesi)

1.gün

- a) Bu aşama karanlık ortamda yapıldı.
- b) Öncelikle MTS solüsyonu hazırlandı.
- c) MTS solüsyonu için 1/6 oranında MTS/düşük glukozlu DMEM karışımı yapıldı.
- d) Her kuyucuktaki 500 mikrolitrelik besiyeri çekildi. Kuyucuklarda sadece hücrelerin kalması sağlandı.
- e) Her kuyucuğa 500 mikrolitre MTS solüsyonu koyuldu.
- f) Kaplar 2.5 saat inkübatörde bekletildi.
- g) Sonrasında eklediğimiz 500 mikrolitrelik solüsyonun içinden 100 er mikrolitre alındı ve 96 kuyucuklu kapa koyuldu.
- h) 96 kuyucuklu kap ELİSA okuyucuya 490 nanometrede okutuldu.
- i) MTS protokolü 1.7.14.21. günlerde tekrarlandı ve 4'lü çalışıldı.

3.12. Alkalen Fosfataz Testi

7.gün

- a) Alkalen fosfataz testi için hücre ekimi yapılan 3 kuyucuktan besiyeri çekilerek atıldı.
- b) Kuyucuklar 3 kere PBS ile yıkandı.
- c) Tris çözeltisi (Tris Buffer) hazırlandı. (0.1 molarlık PH 9 olan Tris Çözeltisi hazırlandı)

- d) Her kuyucuğa 500 mikrolitre Tris çözeltisi koyuldu.
- e) Pipetaj yapıldı.
- f) Pipetaj yapılan hücreler 3 adet Appendorf tüpüne koyuldu.
- g) Tüpler -20 °C dereceye koyularak donduruldu.
- h) – 20 °C dereceden alınan tüpler 37 °C derece de çözüldü ve bu dondurma-çözme işlemi 3 defa tekrarlandı.
- i) Her bir örnek için 10 dakika boyunca 30 saniye aralıklarla 10 watt'da buz üzerinde sonikasyon işlemi yapıldı.
- j) Sonikasyon sonrası örnekler 2000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi.
- k) Santrifüjden alınan her bir örneğin süpernatant kısmından (üst kısmı) 100 mikrolitre alındı.
- l) Alınan 100 mikrolitrelik örnek, ALP kitinde (Alkaline Phosphatase Determination Kit – Randox, AP389, UK) bulunan 10 mikromolar/litre'lik p-nitrofenil fosfat solüsyonuna eklendi. Bu işlem oda sıcaklığında 96 kuyucuklu kapta yapıldı ve herbir örnek 3'lü çalışıldı.
- m) ELİSA okuyucuda 405nm'de 0,2,4,6,8,10,12,14 ve 16. dakikaların sonucunda absorbans değerleri ölçüldü.
- n) Ölçülen absorbans değerlerinin zamana bağlı grafiği çizilerek eğimi hesaplandı. (dakikadaki ALP aktivitesini hesaplamak için eğim bulundu)
- o) Hesaplama şu şekilde yapıldı.
Net OD (optik dansite) = OD405örnek-OD405örnek
Kalibrasyon eğrisinin eğimi = NetOD405/p-nitrofenol nmol miktarı.
ALP aktivitesi/örnek = (Net OD405/örnek başı dakika)/(kalibrasyon eğrisinin eğimi)X
(örneğin toplam miktarı/ substrat üzerine eklenen örnek miktarı)
- p) ALP örnekleri 7.14.21. günler için 3'lü örnekler şeklinde çalışıldı.

3.13. Alizarin Red Boyaması

- a. % 1 lik Alizarin Red solüsyonu hazırlandı. Solüsyonun PH'ı 1 olarak ayarlandı.
- b. Absolüt (%100) ve % 60 isopropanol hazırlandı.
- c. Kuyucuklardaki besiyeri çıkarılıp atıldı.
- d. Su ile birer defa yıkama yapıldı.
- e. Alizarin Red solüsyonu koyulup 5 dakika inkübe edildi.
- f. Alizarin Red atılıp kuyucuklara % 60 lık isopropanol 30 saniye olacak şekilde koyuldu.

- g. Takiben % 60 lık isopropanol atılıp absöüt isopropanol koyuldu.
- h. Kuyucuklara distile su eklenip resimler çekildi.
- i. Alizarin Red boyaması yapılan örnekler 14. ve 21. gün ikili olarak çalışıldı.

3.14. Von Kossa Boyaması

- a. Von Kossa kit'i (kalsiyum boyama kit'i) hazırlandı. Kit'in içeriği;
Gümüş nitrat solüsyonu (%5)
Sodyum tiyosülfat solüsyonu (%5)
Nükleer Fast Red solüsyonu
- b. Kuyucuklar üzeri besiyeri çekilip atıldı.
- c. Distile su ile tüm kuyucuklara birer defa yıkama yapıldı.
- d. Gümüş nitrat solüsyonu her kuyucuğa eklendi
- e. 60 dakika UV altında inkübasyon yapıldı.
- f. 3 defa tekrar distile su ile tüm kuyucuklar yıkandı.
- g. Su atılıp yerine sodyum tiyosülfat solüsyonu eklenerek 3 dakika bekletildi.
- h. 3 defa distile su ile yıkama yapıldı.
- i. Nükleer Fast Red solüsyonu eklenerek 5 dakika bekletildi.
- j. 3 defa distile su ile tüm kuyucuklar yıkandı.
- k. 3 kere absöüt (% 100 etanol) ile yıkandı.
- l. Sonra fotoğraflar çekildi.
- m. Von Kossa örnekleri 14. ve 21. günlerde ikili olarak çalışıldı.

3.15. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin sayısının az olmasından verilerin dağılımı normal dağılım varsayımını karşılamadığından parametrik olmayan testlerden faydalanılmıştır. Değerşkenlerin günler içerisindeki değerşimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını test etmek için Friedman testi uygulanmış, farklı iki grupta değerşkenlerin düzeylerinin karşılaştırılmasında ise Mann-Whitney u testinden faydalanılmıştır. $P < 0.05$ değereri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

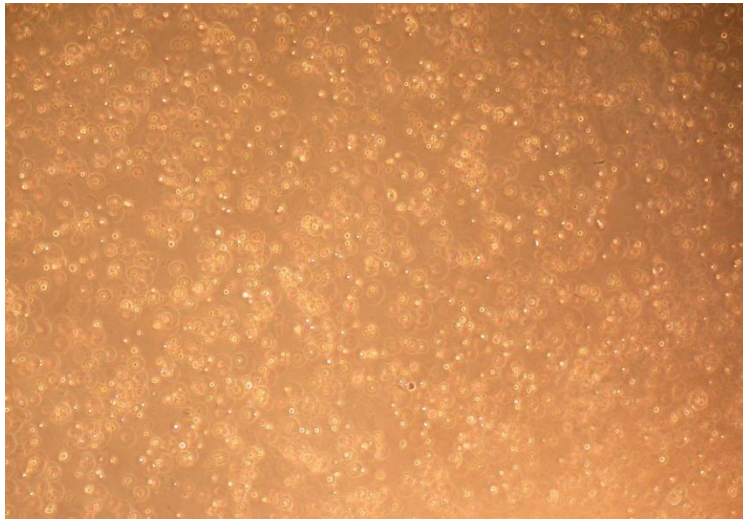
4- BULGULAR

4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojisi

İnsan kemik iliği ve adipoz dokusundan izole edilen kültür kabına tutunan hücrelerin 2. gün invert mikroskoptaki morfolojisi görülmektedir.

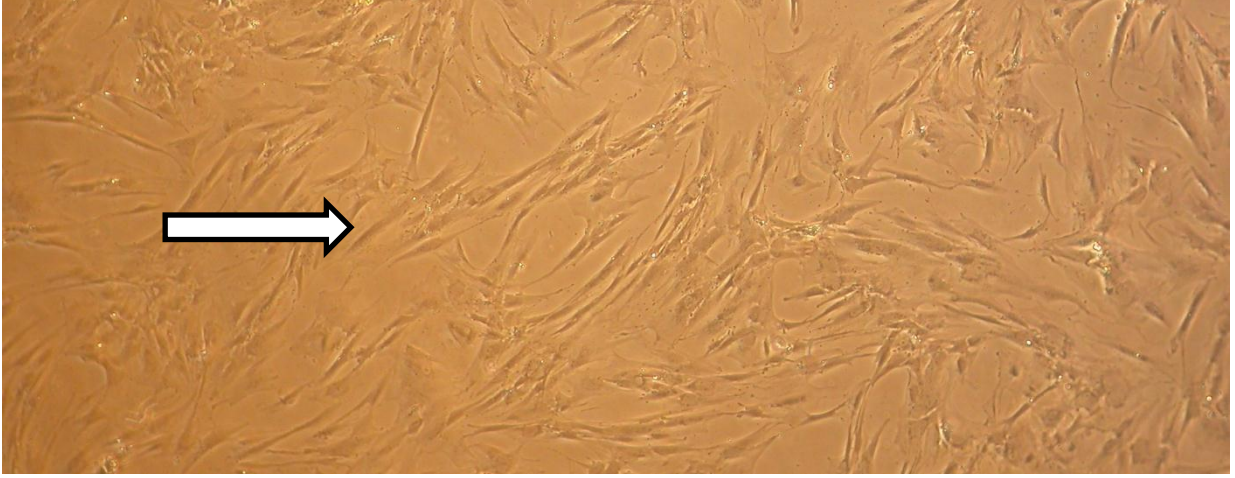


Şekil 13: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrenin invert mikroskopta 2. gün 10X'lik objektif kullanılarak fotoğraflanması

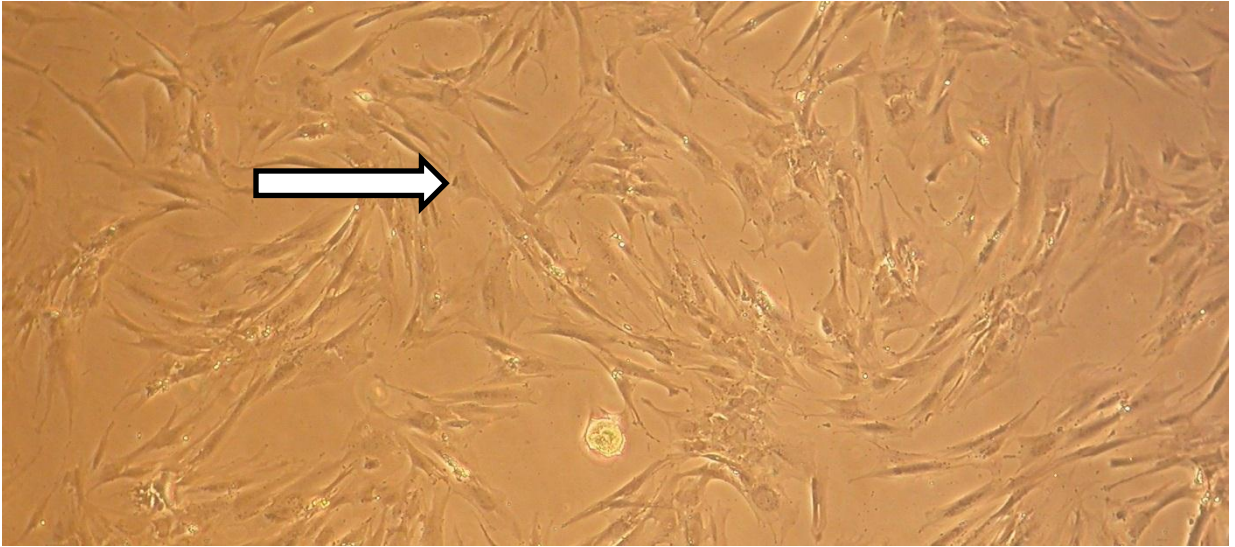


Şekil 14: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrenin invert mikroskopta 2.gün 10X'lik objektif kullanılarak fotoğraflanması

Birinci pasajın 8. gününde invert mikroskopta iğ tarzındaki görünüm gösteren fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin, pasajın ilerleyen günlerinde kolonileştiği görülmüştür.



Şekil 15: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrenin invert mikroskopta 8. gün 10X'lik objektif kullanılarak fotoğraflanması



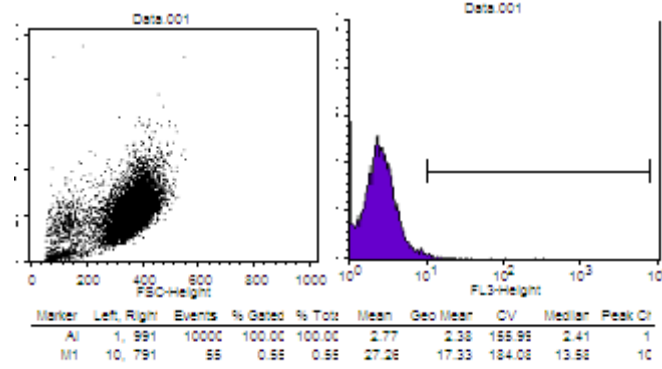
Şekil 16: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrenin invert mikroskopta 8. gün 10X'lik objektif kullanılarak fotoğraflanması

4.2. İmmünofenotipik İnceleme

Ayrılan 300.000/falks tüp, hücre ile yapılan akım sitometri incelemelerinin sonucunda adipoz doku ve kemik iliğinden elde edilen hücrelerin CD24, CD45, CD 117 gibi hematopoetik hücre

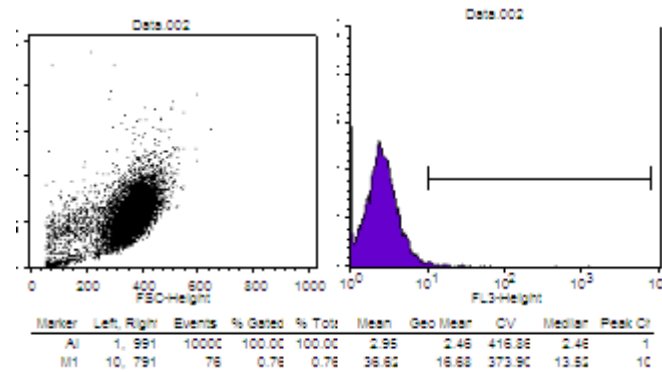
belirteçlerini eksprese etmedikleri, buna karşılık CD44, CD90 gibi mezenkimal kök hücre belirteçlerini eksprese ettikleri yüksek pozitif sonuçlardan görüldü.

4.2.1. Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (BMSC) İmmünofenotipik İncelemesi



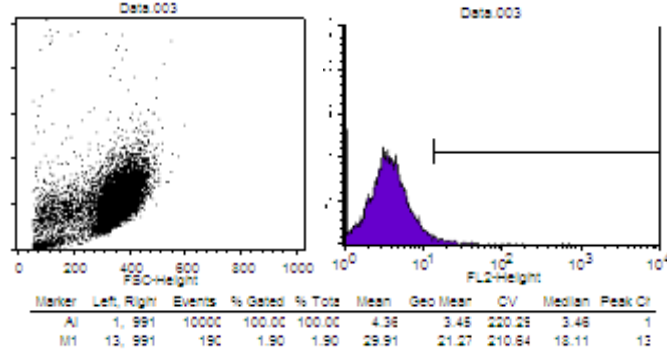
Şekil 17: BMSC'lerin antikor eklenmeden (negatif kontrol grubu) Flow Sitometri histogram data sonucu

İlk histogram grafiğinde FSC (ileri saçılım kanal dedektörü)-yükseklik değeri hücrelerin büyüklüğünü gösterir. % Gate (kapı) değeri kaç hücrelerin ne kadarının pozitif sonuç verdiğini gösterir. Hücre yüzey antijeni-antikor kompleksinin değerlendirildiği ikinci histogram sonuca göre 10^0 ile 10^1 arası değerler negatif kabul edildi.



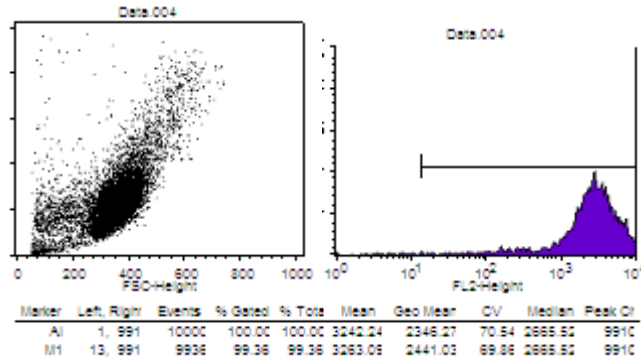
Şekil 18: CD-117 antikorlu işaretli BMSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu

Histogram grafiğine göre hücrelerin sadece % 0.76'sının, mezenkimal kök hücre belirteci olmayan CD-117 antikorlu ile pozitif değer verdiği görülmüştür.



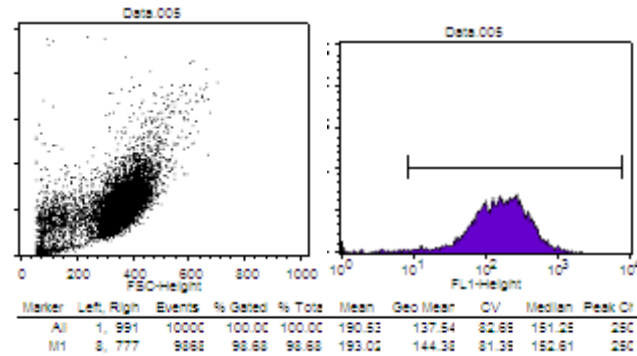
Şekil 19: CD-24 antikorlu işaretli BMSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu

Histogram grafiğine göre hücrelerin sadece % 1.90'ının, mezenkimal kök hücre belirteci olmayan CD-24 antikorlu ile pozitif değer verdiği görülmüştür.



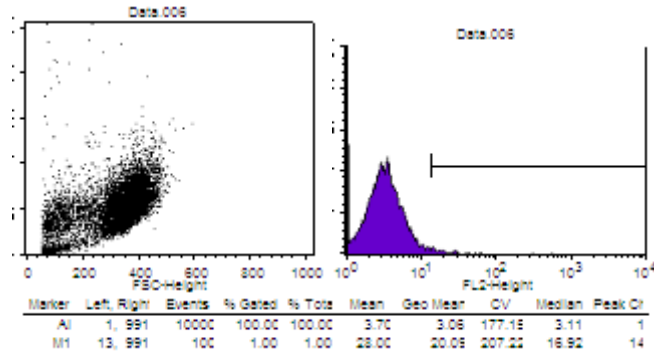
Şekil 20: CD-90 antikorlu işaretli BMSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu

Histogram grafiğine göre hücrelerin % 99.36'sının, mezenkimal kök hücre belirteci olan CD-90 antikorlu ile pozitif değer verdiği görülmüştür.



Şekil 21: CD-44 antikorlu işaretli BMSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu

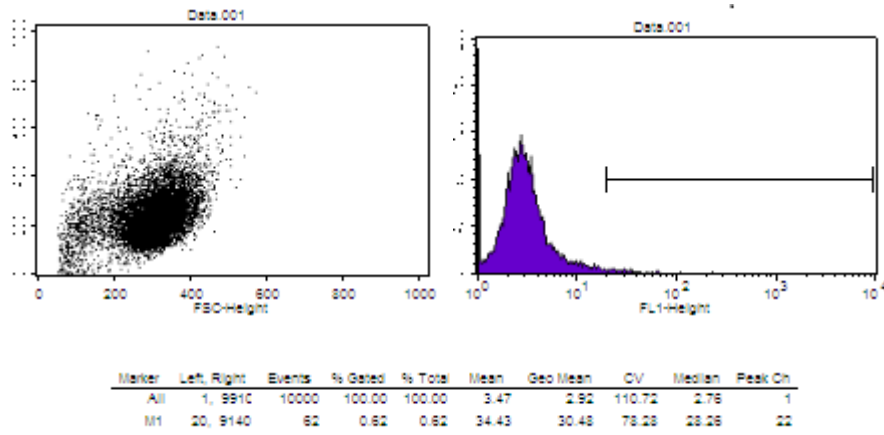
Histogram grafiğine göre hücrelerin % 98.68'inin, mezenkimal kök hücre belirteci olan CD-44 antikorlu ile pozitif değer verdiği görülmüştür.



Şekil 22: CD-45 antikorlu işaretli BMSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu

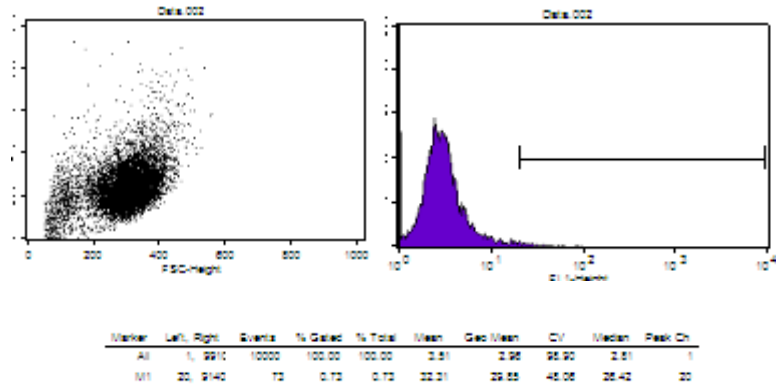
Histogram grafiğine göre hücrelerin sadece % 1'inin, mezenkimal kök hücre belirteci olmayan CD-45 antikorlu ile pozitif değer verdiği görülmüştür.

4.2.2. Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (ADSC) İmmünojenotipik İncelemesi



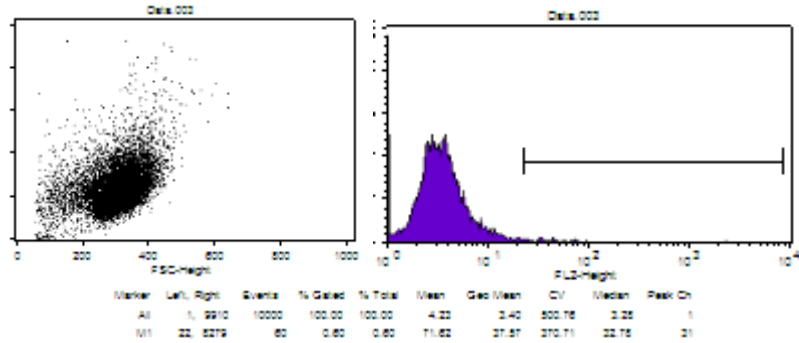
Şekil 23: ADSC'lerin antikor eklenmeden (negatif kontrol grubu) Flow sitometri histogram data sonucu.

Hücre yüzey antijeni-antikor kompleksinin değerlendirildiği ikinci histogram sonuca göre 10^0 ile 10^1 arası değerler negatif kabul edildi.



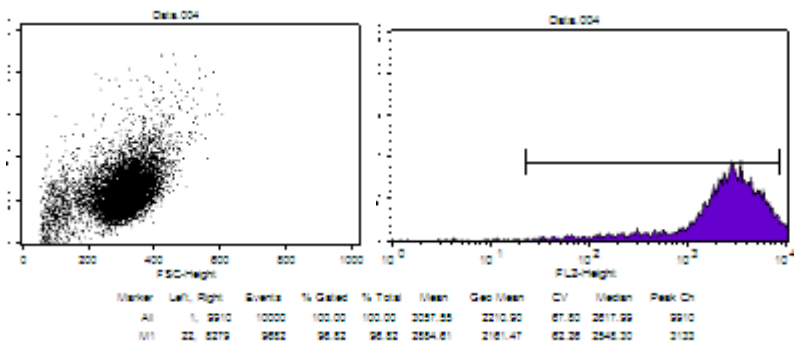
Şekil 24: CD-117 antikorlu işaretli ADSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu

Histogram grafiğine göre hücrelerin sadece % 0.73'ünün, mezenkimal kök hücre belirteci olmayan CD-117 antikorlu ile pozitif değer verdiği görülmüştür.



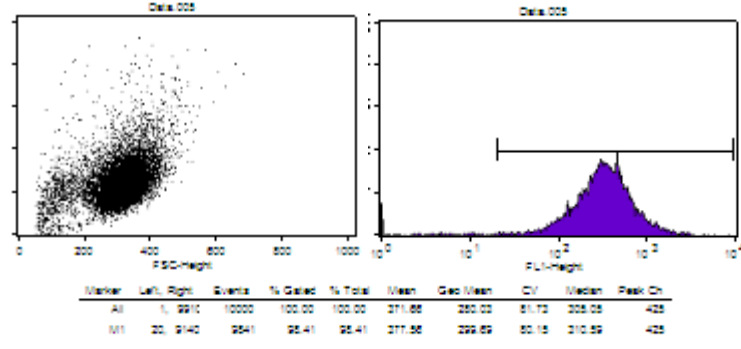
Şekil 25: CD-24 antikorlu işaretli ADSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu

Histogram grafiğine göre hücrelerin sadece % 0.60'ının, mezenkimal kök hücre belirteci olmayan CD-24 antikorlu ile pozitif değer verdiği görülmüştür.



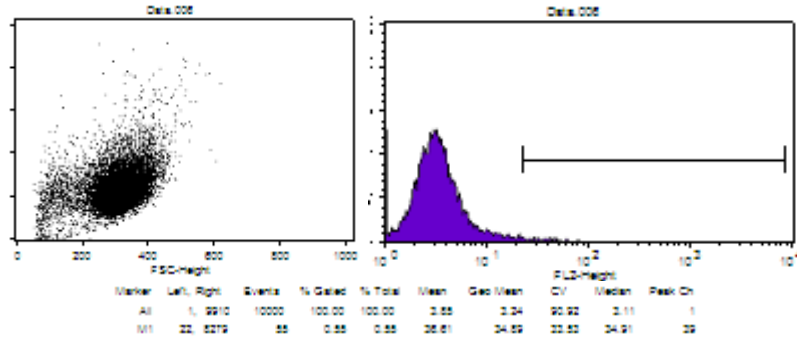
Şekil 26: CD-90 antikorlu işaretli ADSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu

Histogram grafiğine göre hücrelerin % 96.82'sinin, mezenkimal kök hücre belirteci olan CD-90 antikorlu ile pozitif değer verdiği görülmüştür.



Şekil 27: CD-44 antikorlu işaretli ADSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu

Histogram grafiğine göre hücrelerin %98.41'inin, mezenkimal kök hücre belirteci olan CD-44 antikorlu ile pozitif değer verdiği görülmüştür.



Şekil 28: CD-45 antikorlu işaretli ADSC'lerin Flow sitometri histogram data sonucu

Histogram grafiğine göre hücrelerin sadece % 0.55'inin, mezenkimal kök hücre belirteci olmayan CD-45 antikorlu ile pozitif değer verdiği görülmüştür.

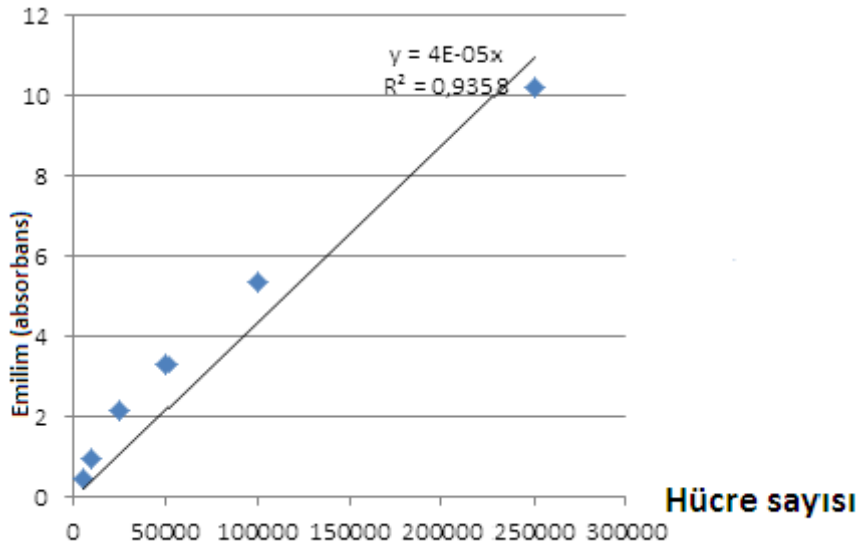
4.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Çoğalmasının Tayini

Kemik iliği kökenli ve adipoz kökenli mezenkimal kök hücre kültürlerinde hücrelerin çoğalmasının tayini için MTS analizi kullanıldı. Ölçümler kültürün 1. 7. 14. 21. günlerinde yapıldı. MTS analiziyle hücre çoğalması tayininde asıl olarak hücrelerin renk değişimi bir başka ifadeyle absorbansını ölçtük. Bunun sayısal olarak açıklanabilmesi içinde bir kalibrasyon eğrisinin çizilmesi gerekir. Kalibrasyon eğrisi çizmek için, hücre kültürü kaplarına daha önceden sayısını belirlediğimiz miktarda hücre ekildi. Bu hücrelerin üzerine MTS uygulanarak çoğalmalarına izin vermeyecek ancak hücrelerin kaba tutunmasında fırsat tanıyacak kadar kısa bir zaman diliminde (ortalama 1 saat) ölçüm yapıldı. Metod kısmındaki MTS protokolü uygulanarak sayısını bizim belirlediğimiz hücrelerin toplam MTS absorbansı ölçüldü. Sonuçta

absorbans-hücre sayısı grafiği çizildi. Bu grafikten elde edilen eğim MTS grafiğindeki absorbans değerlerini hücre sayısına dönüştürmek için kullanıldı. Özetle toplam MTS değeri, sayısını bizim belirlediğimiz hücre sayısına bölünerek hücre başına düşen absorbans değeri bulundu. Bu şekilde 1 hücrenin absorbans değerini bildiğimiz için ölçüm yapılacak diğer kültür kaplarındaki MTS absorbans değerleri bize o kapta kaç hücre olduğunun bilgisini verir.

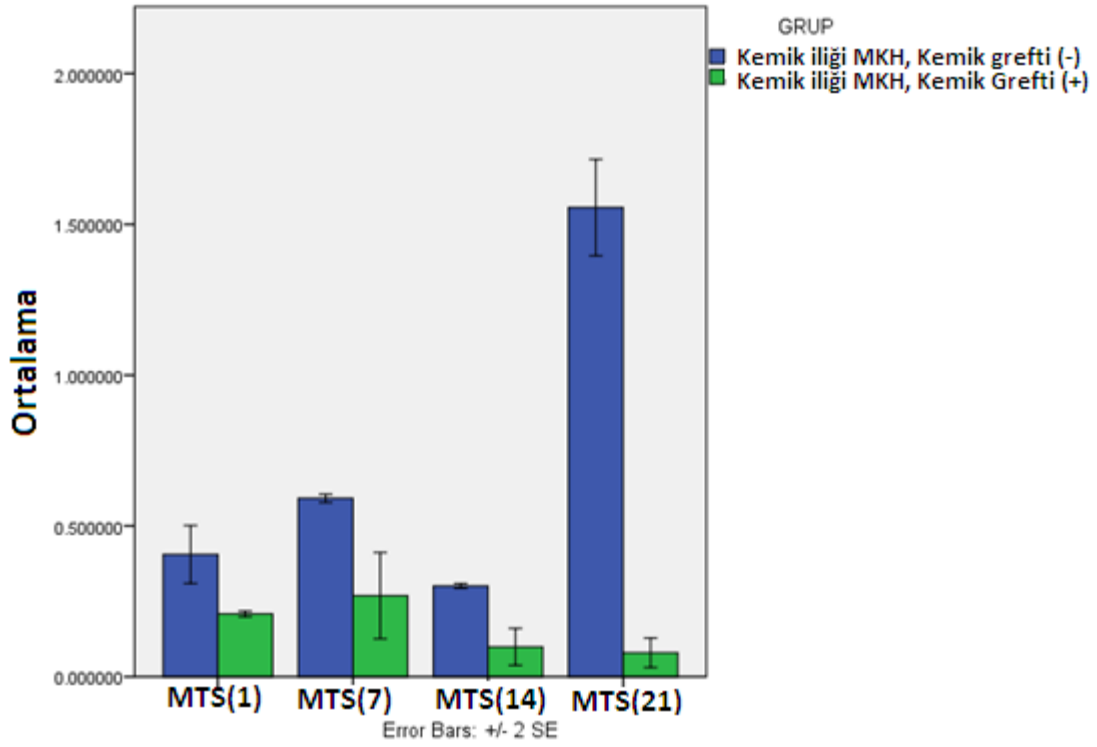
4.3.1. Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Çoğalmasının Tayini

Öncelikle kalibrasyon eğrisi (absorbans-hücre sayısı grafiği) çizildi.



Şekil 29: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin kalibrasyon eğrisi

Kalibrasyon eğrisindeki eğim kullanılarak kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti eklenmeyen ve eklenen gruplarında hücre sayıları hesaplandı ve grafiğe döküldü.



Şekil 30: Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanan ve uygulanmayan gruplarındaki 1. 7. 14. ve 21. günlerdeki MTS analizini temel alan, hücre sayılarının istatistiksel grafiği

Kemik grefti eklenmeyen grupta hücre sayıları 1. ve 7. günler arasında bir artış gösterirken, 14. günde hücre sayılarında bir azalma görüldü. 21. günde ise hücre sayıları 14. güne göre arttı.

Kemik grefti eklenen grupta hücre sayıları 7. günde 1. güne göre hafif bir artış izlenirken, ilerleyen günlerde hücre sayısında bir azalma gözlemlendi.

Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanmayan kültür grubunun, günlere göre hücre proliferasyonu değişiminde, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

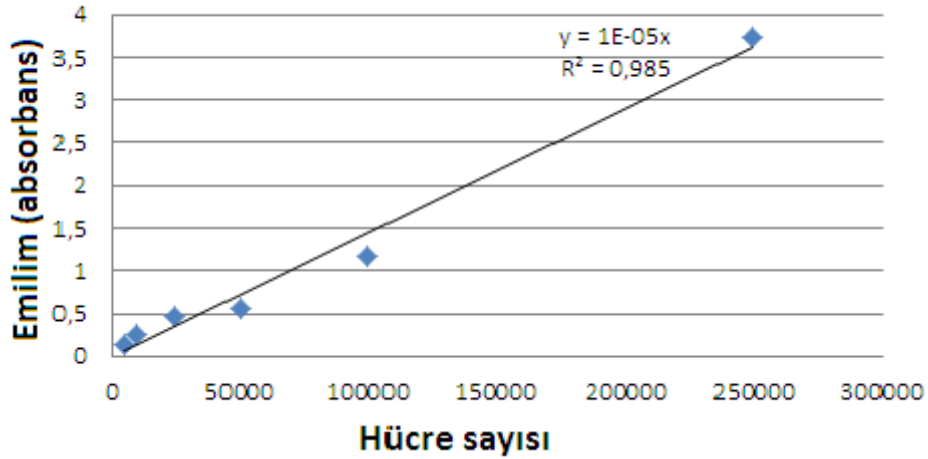
Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanan kültür grubunun, günlere göre hücre proliferasyonu değişiminde, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanan ve uygulanmayan kültür grupları arasında aynı günlere ait hücre proliferasyonunun istatistiksel karşılaştırılmasında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır;

- 1. günlerin karşılaştırılmasında, $p >$ anlamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.
- 7. günlerin karşılaştırılmasında, $p <$ anlamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. Bu fark kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin, kemik grefti eklenmeyen grubunda hücre sayısı ortalamasının, kemik grefti eklenen gruba göre daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır.
- 14. günlerin karşılaştırılmasında, $p >$ anlamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.
- 21. günlerin karşılaştırılmasında, $p <$ anlamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. Bu fark kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin, kemik grefti eklenmeyen grubunda hücre sayısı ortalamasının, kemik grefti eklenen gruba göre daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır.

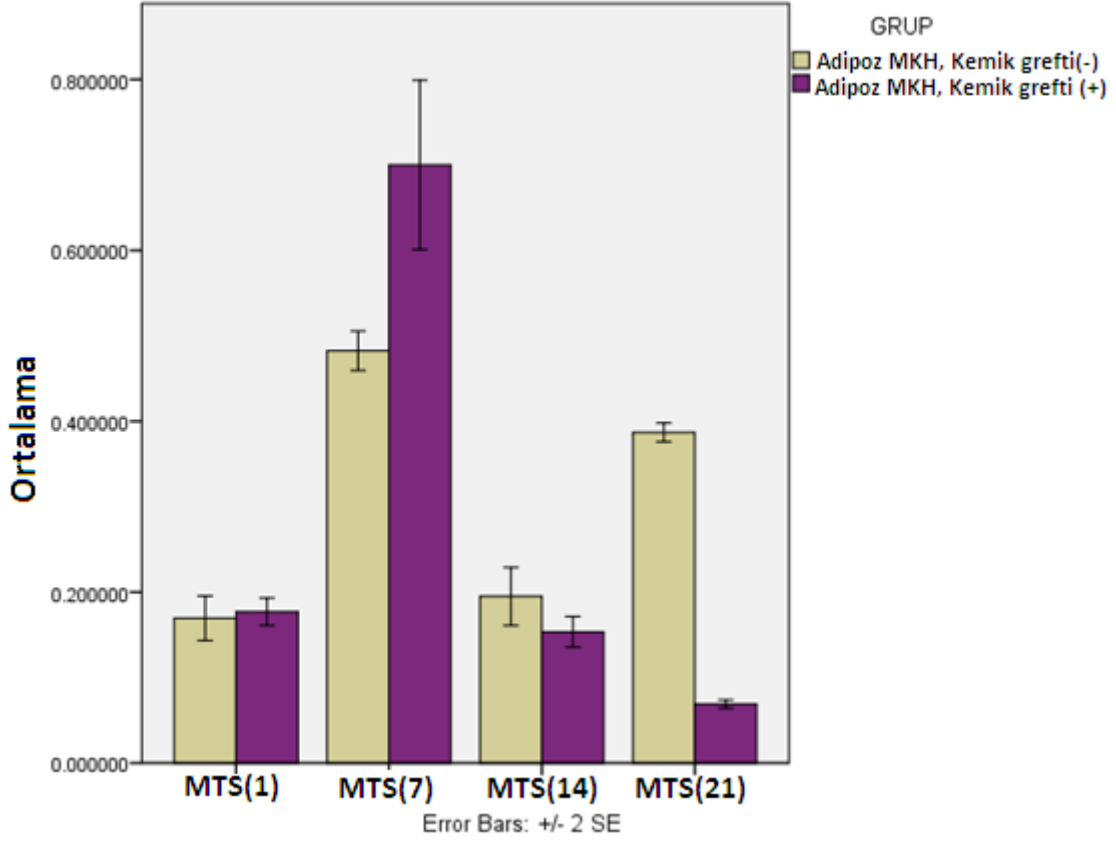
4.3.2. Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Çoğalmasının Tayini

Öncelikle hücre sayısına ulaşmak için kalibrasyon eğrisi çizildi.



Şekil 31: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin kalibrasyon eğrisi

Kalibrasyon eğrisindeki eğim kullanılarak kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti eklenmeyen ve eklenen gruplarında hücre sayıları hesaplandı ve grafiğe döküldü.



Şekil 32: Adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanan ve uygulanmayan gruplarındaki 1. 7. 14. ve 21. Günlerdeki MTS analizini temel alan, hücre sayılarının istatistiksel grafiği

Kemik grefti eklenmeyen grupta hücre sayıları 1. ve 7. günler arasında bir artış gösterirken, 14. günde hücre sayılarında bir azalma görüldü. 21. günde ise hücre sayıları 14. güne göre arttı.

Kemik grefti eklenen grupta hücre sayıları 7. günde 1. güne göre bir artış gösterirken, ilerleyen günlerde hücre sayısında bir azalma gözlemlendi.

Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanmayan kültür grubunun, günlere göre hücre proliferasyonu değişiminde, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanan kültür grubunun, günlere göre hücre proliferasyonu değişiminde, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanan ve uygulanmayan kültür grupları arasında aynı günlere ait hücre proliferasyonunun istatistiksel karşılaştırılmasında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır;

- 1. günlerin karşılaştırılmasında, $p >$ anlamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.
- 7. günlerin karşılaştırılmasında, $p <$ anlamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. Bu fark adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti eklenmeyen grubunda hücre sayısı ortalamasının, kemik grefti eklenen gruba göre daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır.
- 14. günlerin karşılaştırılmasında, $p >$ anlamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.
- 21. günlerin karşılaştırılmasında, $p <$ anlamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. Bu fark adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti eklenmeyen grubunda hücre sayısı ortalamasının, kemik grefti eklenen gruba göre daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır.

Kemik iliği kökenli kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanmayan ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanmayan kültür grupları arasında, aynı günlere ait hücre proliferasyonunun istatistiksel karşılaştırılmasında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır;

- 1. günlerin karşılaştırılmasında, $p >$ anlamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.
- 7. günlerin karşılaştırılmasında, $p <$ anlamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. Bu fark kemik iliği kökenli doku mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti eklenmeyen grubunda hücre sayısı ortalamasının, adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti eklenmeyen grubuna göre daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır.
- 14. günlerin karşılaştırılmasında, $p >$ anlamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.
- 21. günlerin karşılaştırılmasında, $p <$ anlamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. Bu fark kemik iliği kökenli doku mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti eklenmeyen grubunda hücre sayısı ortalamasının, adipoz doku kökenli mezenkimal kök

hücrelerin kemik grefti eklenmeyen grubuna göre daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır.

Kemik iliği kökenli kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanan ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanan kültür grupları arasında, aynı günlere ait hücre proliferasyonunun istatistiksel karşılaştırılmasında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır;

- 1. günlerin karşılaştırılmasında, $p >$ anlamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.
- 7. günlerin karşılaştırılmasında, $p <$ anlamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. Bu fark adipoz doku kökenli doku mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti eklenen grubunda hücre sayısı ortalamasının, kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti eklenen grubuna göre daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır.
- 14. günlerin karşılaştırılmasında, $p >$ anlamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.
- 21. günlerin karşılaştırılmasında, $p <$ anlamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. Bu fark adipoz doku kökenli doku mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti eklenen grubunda hücre sayısı ortalamasının, kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti eklenen grubuna göre daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır.

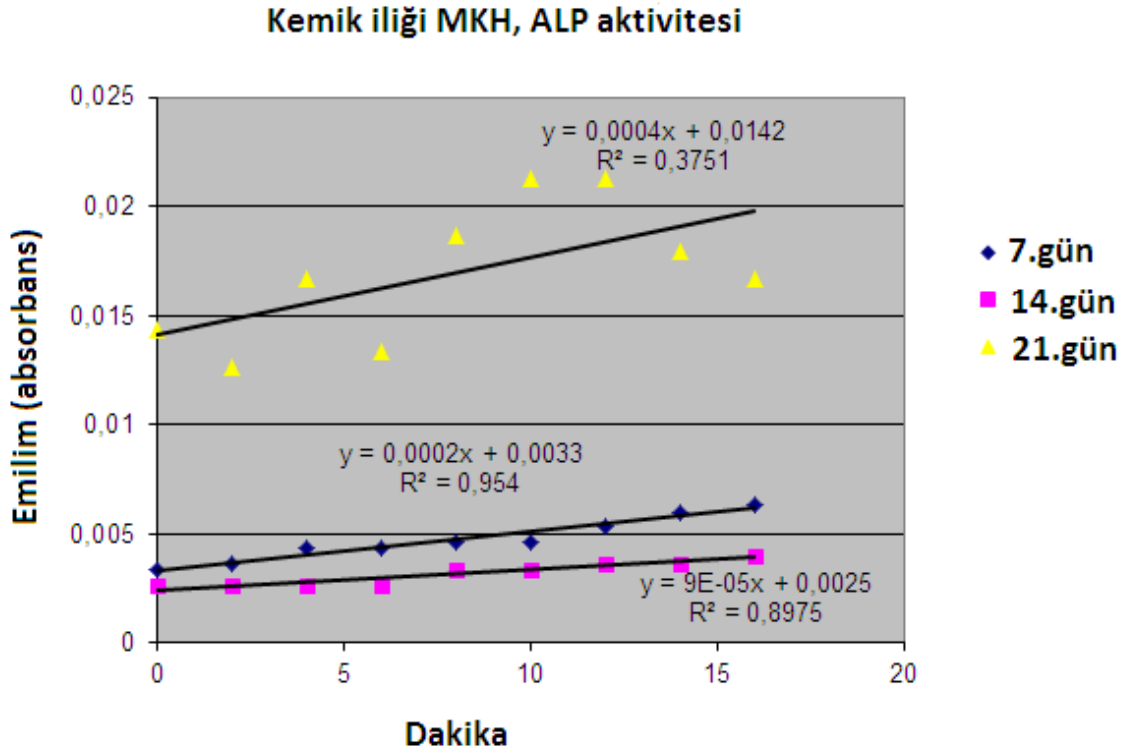
4.4. Osteojenik Farklılaşmanın Tayini

Kemik iliği ve adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin, allogreft eklenmeyen ve eklenen gruptaki *in-vitro* osteojenik dönüşümleri; ALP düzeyinin tayini, Alizarin Red ve Von Kossa boyası ile boyanan kalsiyum mineralizasyonu ile gösterildi.

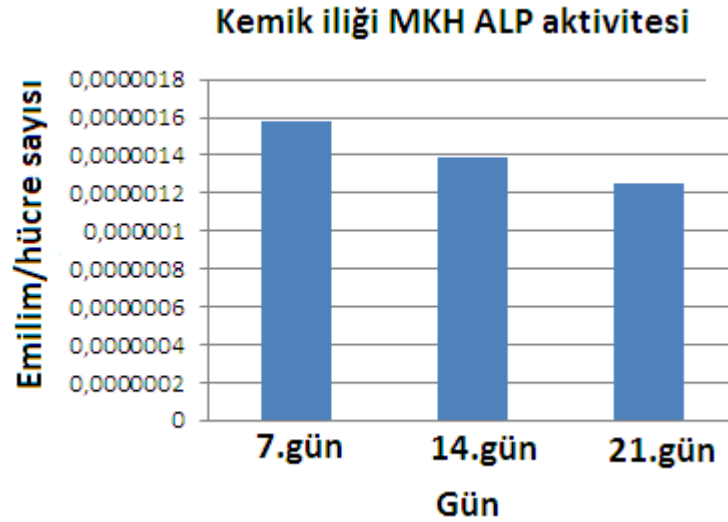
4.4.1 Alkalen Fosfataz (ALP) Düzeyinin Tayini

MTS analizinde olduğu gibi ALP tayini için dakikadaki emilim değerleri hesaplanarak kalibrasyon eğrisi yapıldı. ALP sonuçları ilgili gündeki hücre sayıları MTS analiziyle saptanarak, günlere göre hücre başına emilim değerleri saptandı.

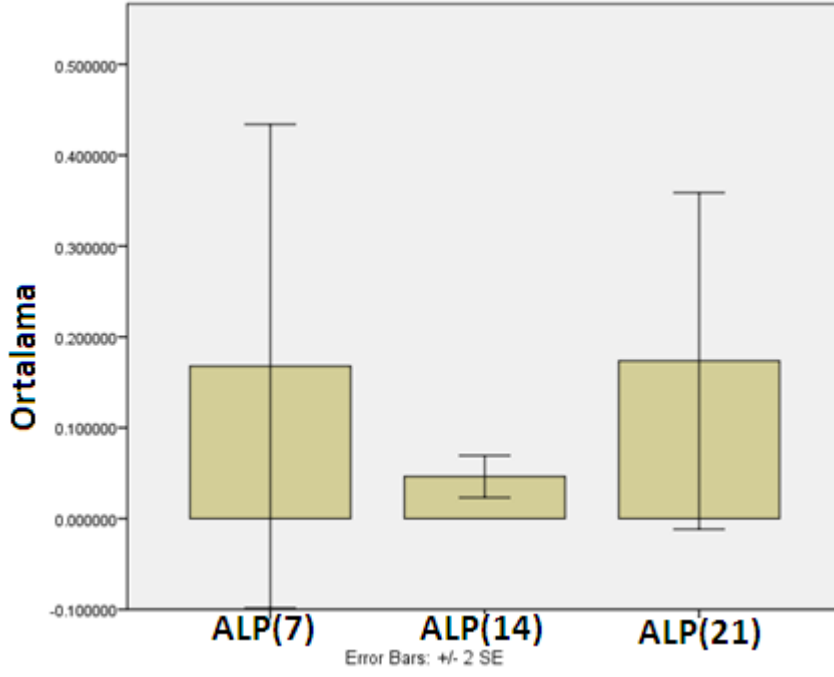
4.4.1.1 Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Kemik Grefti Eklenmeyen Grubundaki ALP Aktivitesinin Ölçümü



Şekil 33: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre kültürünün ALP aktivitesi açısından kalibrasyon eğrisi



Şekil 34: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre kültürünün ALP aktivitesi açısından hücre başına ALP aktivitesi

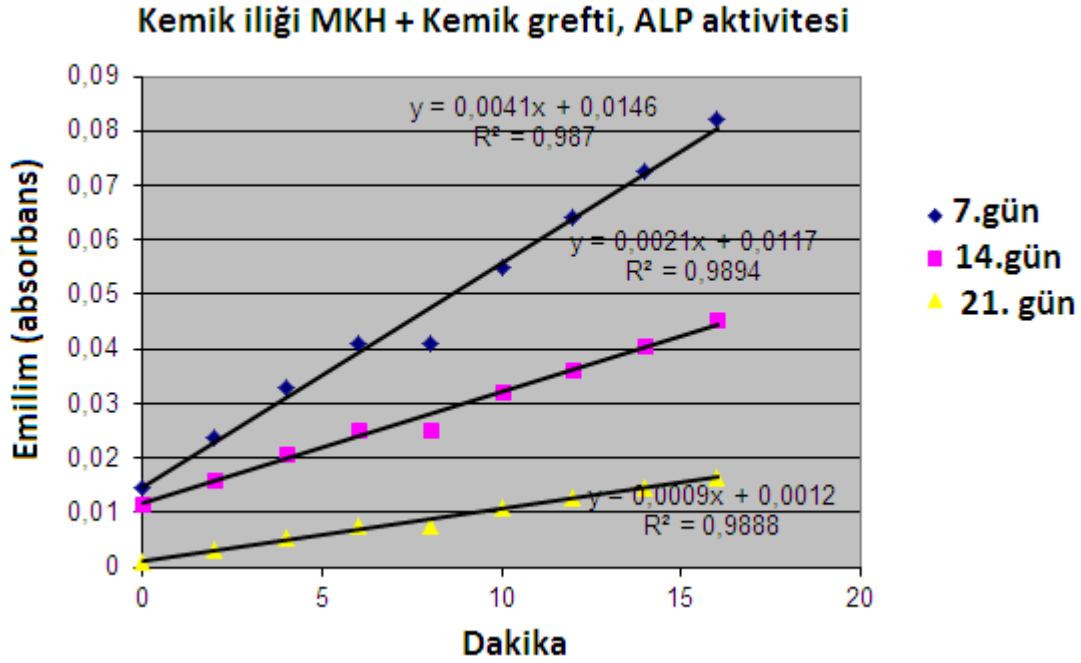


Şekil 35: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre kültürünün ALP aktivitesi açısından hücre başına ALP aktivitesinin istatistiksel grafiği

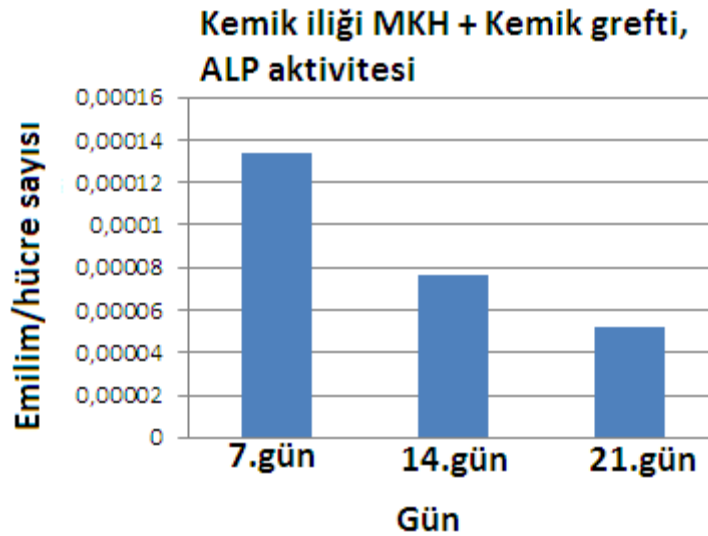
Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin, kemik grefti eklenmeyen kültür grubunda hücre başına günlük ALP düzeylerinde 7. günden 21. güne doğru giderek azalma görüldü.

Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanmayan kültür grubunun, hücre başına gösterdiği alkalin fosfataz aktivitesinin günlere göre değişiminde, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

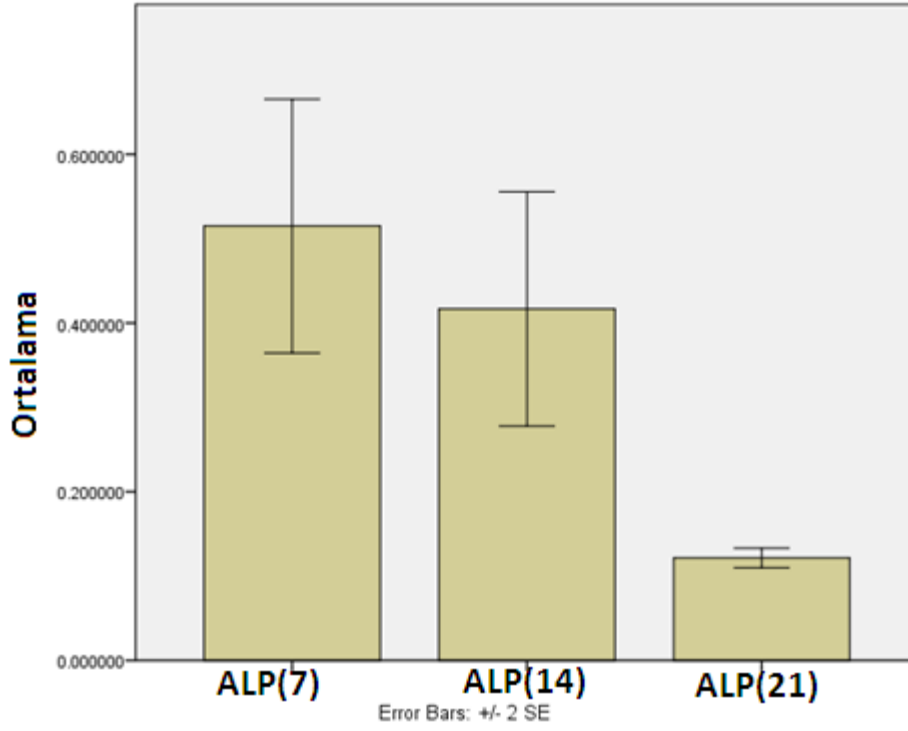
4.4.1.2. Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Kemik Grefti Eklenen Grubundaki ALP Aktivitesinin Ölçümü



Şekil 36: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre + kemik grefti kültürünün ALP aktivitesi açısından kalibrasyon eğrisi



Şekil 37: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre + kemik grefti kültürünün ALP aktivitesi açısından hücre başına ALP aktivitesi



Şekil 38: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre + kemik grefti kültürünün ALP aktivitesi açısından hücre başına ALP aktivitesinin istatistiksel grafiği

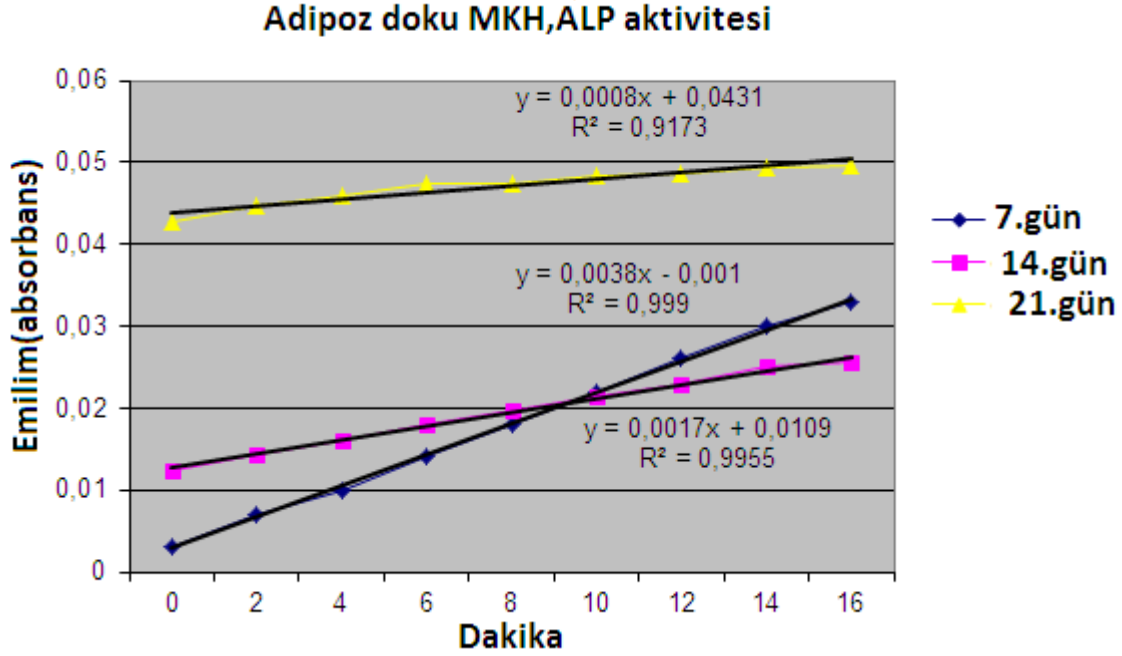
Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin, kemik grefti eklenen kültür grubunda hücre başına günlük ALP düzeylerinde 7. günden 21. güne doğru giderek azalma görüldü.

Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanan kültür grubunun, hücre başına gösterdiği alkalin fosfataz aktivitesinin günlere göre değişiminde, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

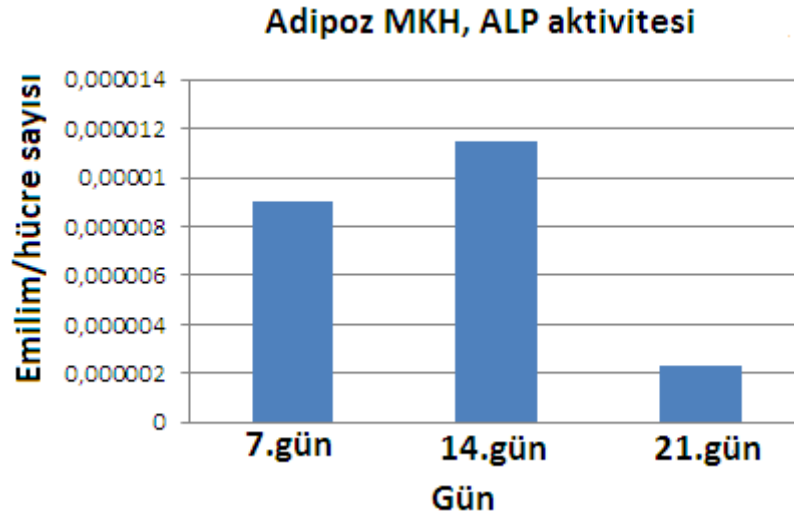
Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanan ve uygulanmayan kültür grupları arasında, aynı günlere ait hücre başına gösterdiği alkalin fosfataz aktivitesinin istatistiksel karşılaştırılmasında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır;

- 7. günlerin karşılaştırılmasında, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.
- 14. günlerin karşılaştırılmasında, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.
- 21. günlerin karşılaştırılmasında, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

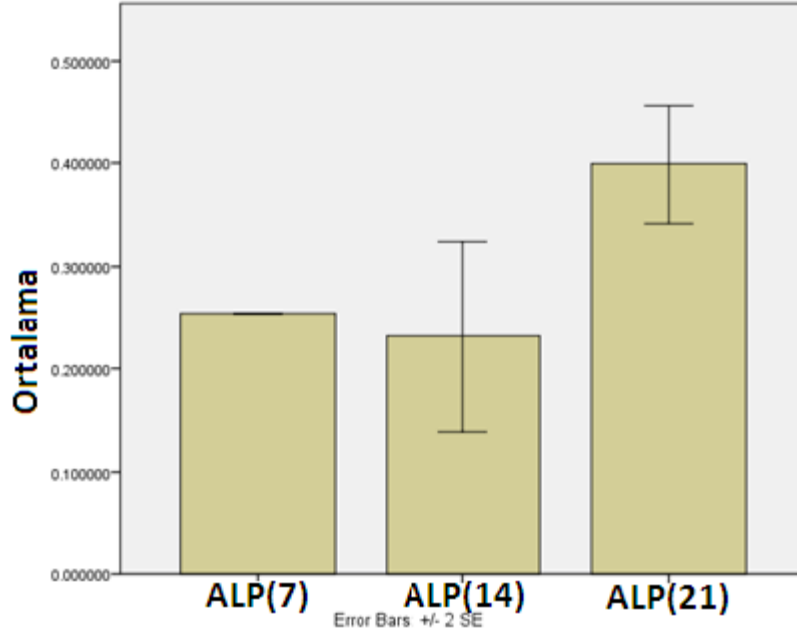
4.4.1.3. Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Kemik Grefti Eklenmeyen Grubundaki ALP Aktivitesinin Ölçümü



Şekil 39: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre kültürünün ALP aktivitesi açısından kalibrasyon eğrisi



Şekil 40: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre kültürünün ALP aktivitesi açısından hücre başına ALP aktivitesi



Şekil 41: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre kültürünün ALP aktivitesi açısından hücre başına ALP aktivitesinin istatistiksel grafiği

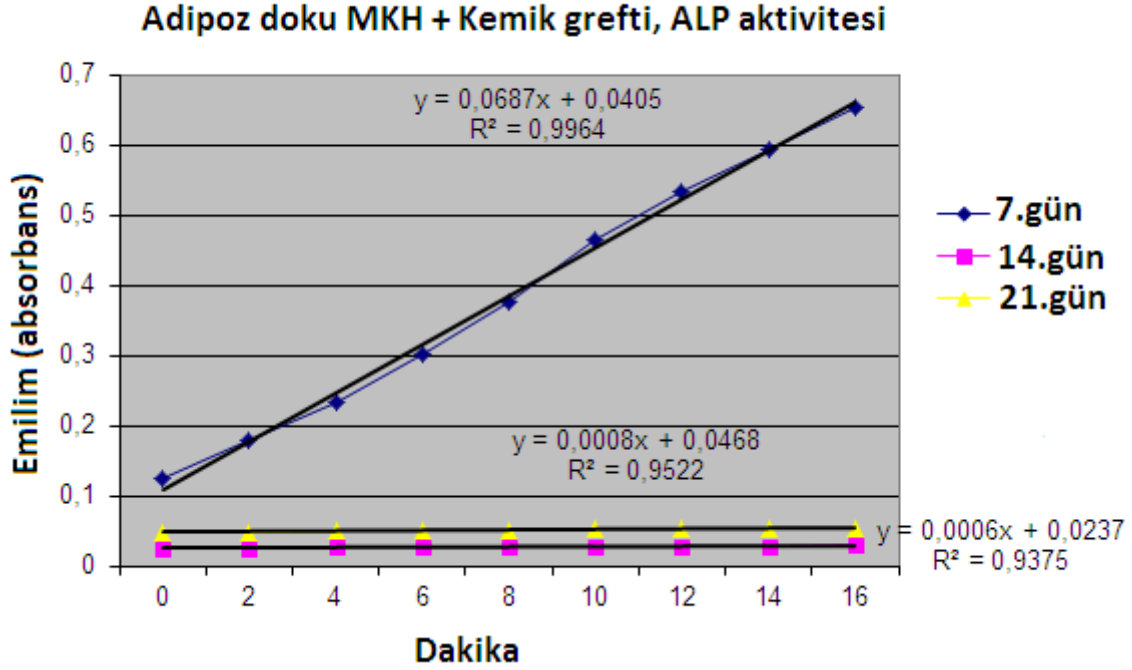
Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin, kemik grefti eklenmeyen kültür grubunda hücre başına günlük ALP düzeylerinde 7. gün-14. gün kıyaslandığında artış, 7.gün-21.gün ve 14.gün-21 gün kıyaslandığında azalma görüldü.

Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanmayan kültür grubunun, hücre başına gösterdiği alkale fosfataz aktivitesinin günlere göre değişiminde, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

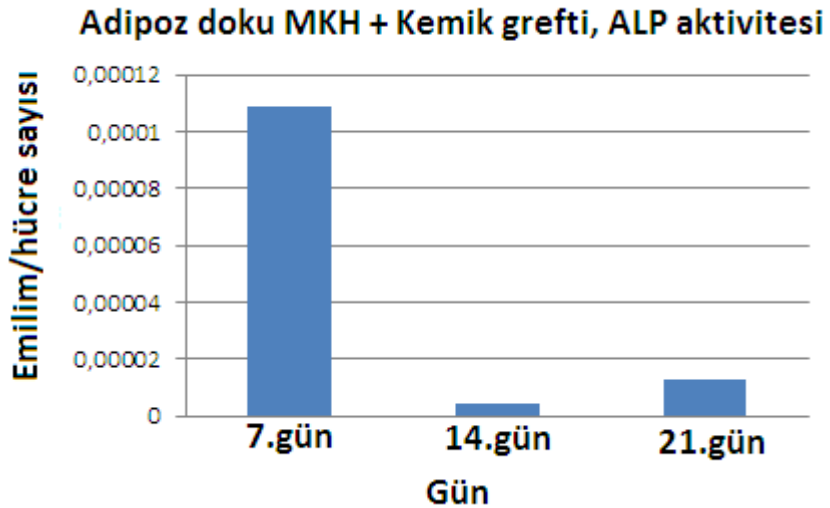
Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanmayan ve adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanmayan kültür grupları arasında, aynı günlere ait hücre başına gösterdiği alkale fosfataz aktivitesinin istatistiksel karşılaştırılmasında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır;

- 7. günlerin karşılaştırılmasında, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.
- 14. günlerin karşılaştırılmasında, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.
- 21. günlerin karşılaştırılmasında, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

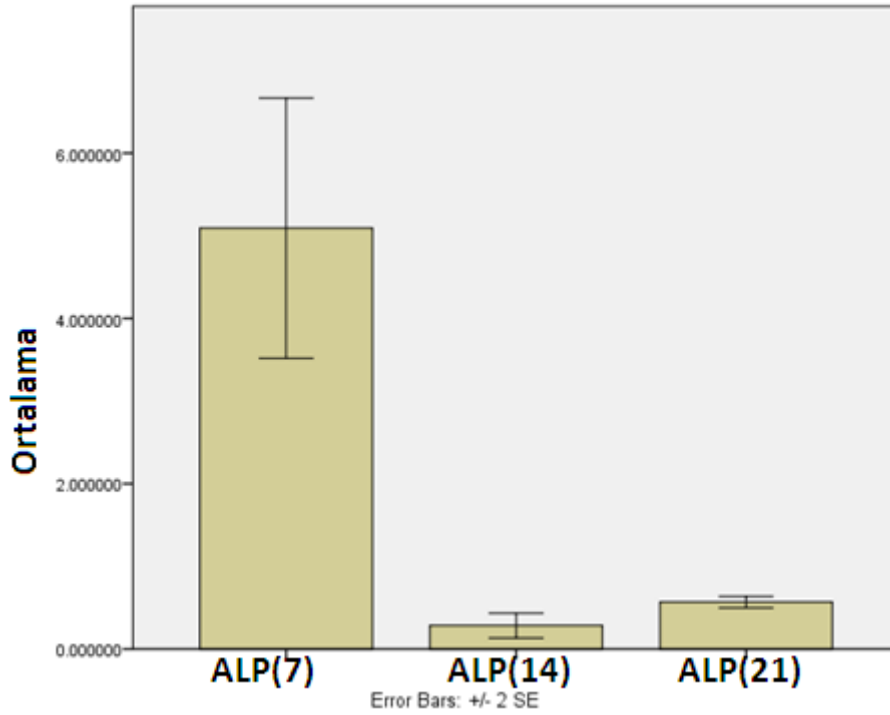
4.4.1.4. Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Kemik Grefti Eklenen Grubundaki ALP Aktivitesinin Ölçümü



Şekil 42: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre + kemik grefti kültürünün ALP aktivitesi açısından kalibrasyon eğrisi



Şekil 43: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre + kemik grefti kültürünün ALP aktivitesi açısından hücre başına ALP aktivitesi



Şekil 44: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre + kemik grefti kültürünün ALP aktivitesi açısından hücre başına ALP aktivitesinin istatistiksel grafiği

Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin, kemik grefti eklenen kültür grubunda hücre başına günlük ALP düzeylerinde 7. gün ile 14. gün arasında keskin bir düşüş, 14. gün 21. gün arasında hafif yükselme görülmüştür.

Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanan kültür grubunun, hücre başına gösterdiği alkale fosfataz aktivitesinin günlere göre değişiminde, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

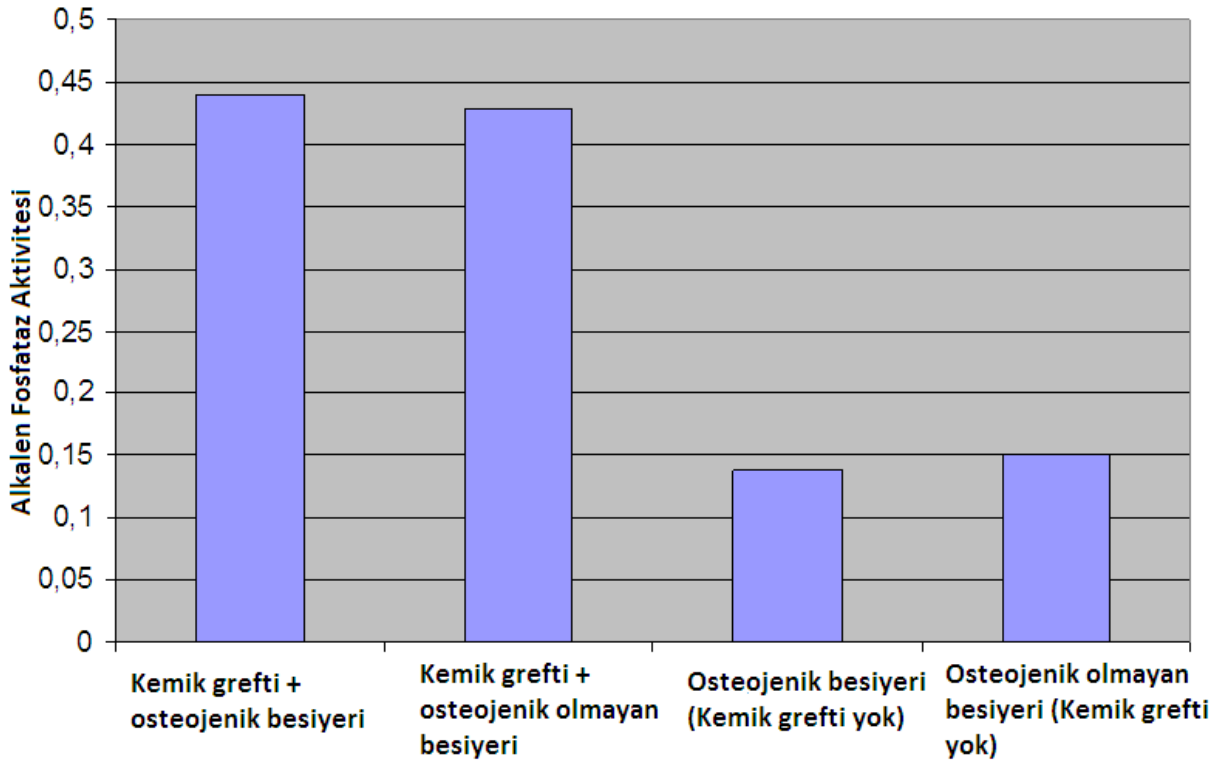
Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanmayan ve uygulanan kültür grupları arasında, aynı günlere ait hücre başına gösterdiği alkale fosfataz aktivitesinin istatistiksel karşılaştırılmasında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır;

- 7. günlerin karşılaştırılmasında, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.
- 14. günlerin karşılaştırılmasında, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.
- 21. günlerin karşılaştırılmasında, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanan ve adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti uygulanan kültür grupları arasında, aynı günlere ait hücre başına gösterdiği alkalen fosfataz aktivitesinin istatistiksel karşılaştırılmasında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır;

- 7. günlerin karşılaştırılmasında, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.
- 14. günlerin karşılaştırılmasında, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.
- 21. günlerin karşılaştırılmasında, p>anamlılık düzeyi ile istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

4.4.1.5. Kemik Grefti İçermeyen ve İçeren Besiyerlerinin Alkalen Fosfataz Aktivitesinin Karşılaştırılması



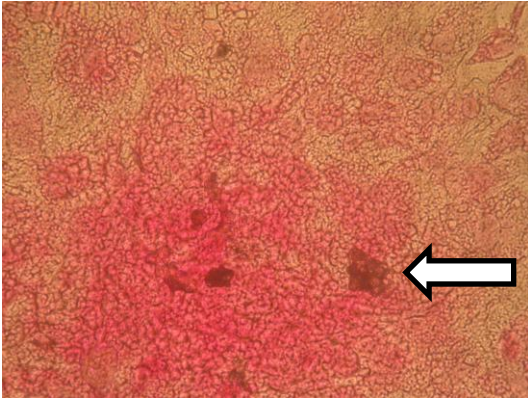
Şekil 45: Kemik grefti içermeyen ve içeren besiyerlerinin alkalen fosfataz aktivitesinin karşılaştırılması

Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti eklenmeyen ve eklenen grupları arasındaki ilk gün alkalen fosfataz aktivitesi sonuçları görülmektedir. Özellikle osteojenik olmayan besiyerlerindeki kemik grefti eklenmeyen ve eklenen gruplar arasındaki alkalen fosfataz aktivitesine bakılacak olursa, kemik grefti eklenen grubun lehine alkalen fosfataz düzeyinde 3 katlık bir fazlalık vardır. Osteojenik olmayan besiyeri içinde hücrelerin osteoblastik farklılaşması aktive edilemeyeceğine göre, bunun kemik greftlerinden kaynaklanan bir alkalen fosfataz yüksekliği olduğu söylenebilir.

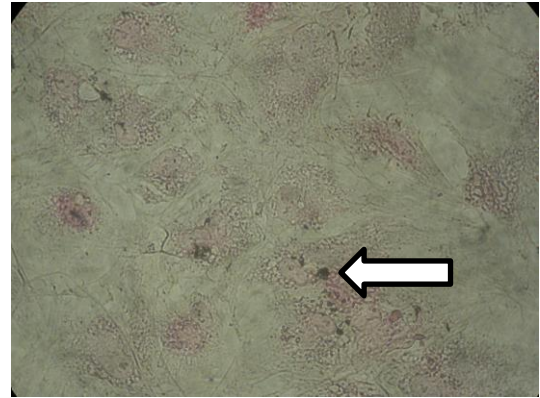
4.4.2 Von Kossa Boyaması

Kemik iliği ve adipoz dokudan elde edilen hücrelerin, kemik grefti eklenen ve eklenmeyen kültürlerinin, 14. ve 21. günlerde Von Kossa boyaması yapılmış ve fotoğraflanarak hücrelerin mineralizasyon düzeyleri değerlendirilmiştir.

4.4.2.1 Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerden Elde Edilen Osteoblastların Von Kossa Boyaması



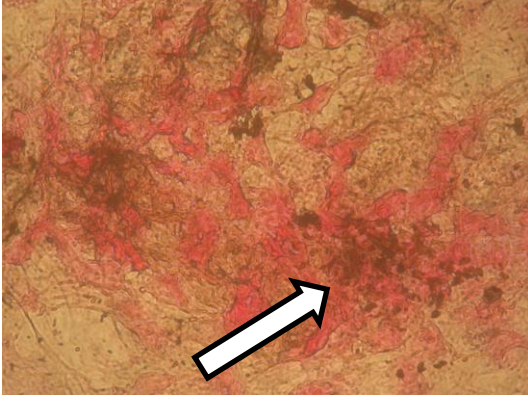
Şekil 46



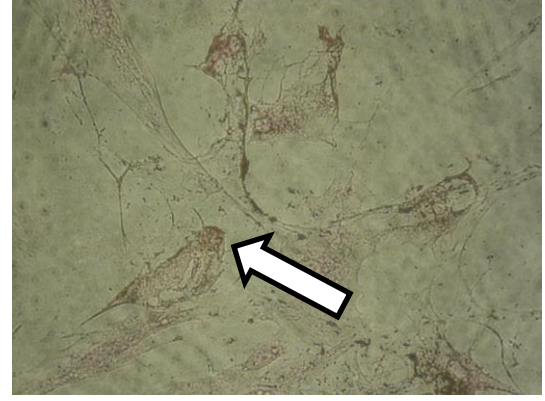
Şekil 47

14. gün Von Kossa boyaması sonrası, kemik iliğinden elde edilen hücreler fotoğraflanmıştır. Şekil 48’de kemik grefti eklenmeyen, şekil 49’da ise kemik grefti eklenen hücre kültürü

görülmektedir. Kemik grefti eklenen grupta, eklenmeyen gruba kıyasla mineralizasyonun düşük olduğu izlenmiştir.



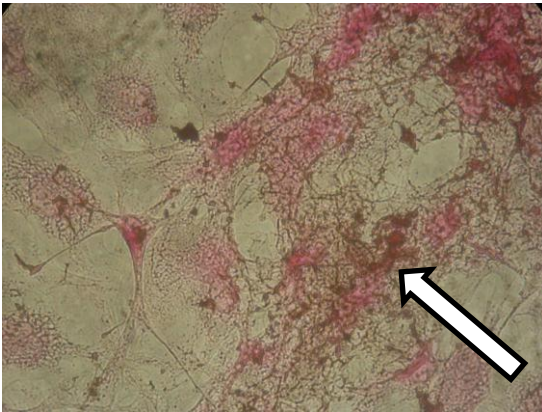
Şekil 48



Şekil 49

21. gün Von Kossa boyaması sonrası, kemik iliğinden elde edilen hücreler fotoğraflanmıştır. Şekil 50'de kemik grefti eklenmeyen, şekil 51'de ise kemik grefti eklenen hücre kültürü görülmektedir. Kemik grefti eklenen grupta, eklenmeyen gruba kıyasla mineralizasyonun düşük olduğu izlenmiştir.

4.4.2.2 Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerden Elde Edilen Osteoblastların Von Kossa Boyaması



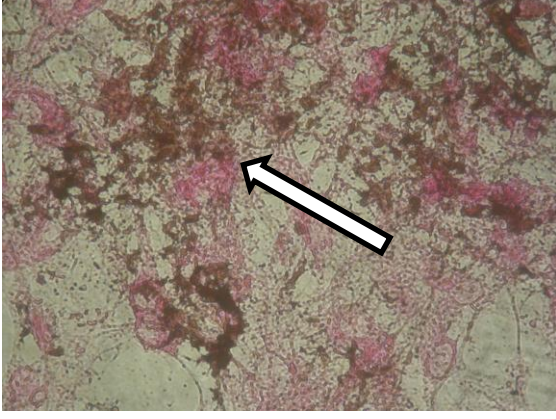
Şekil 50



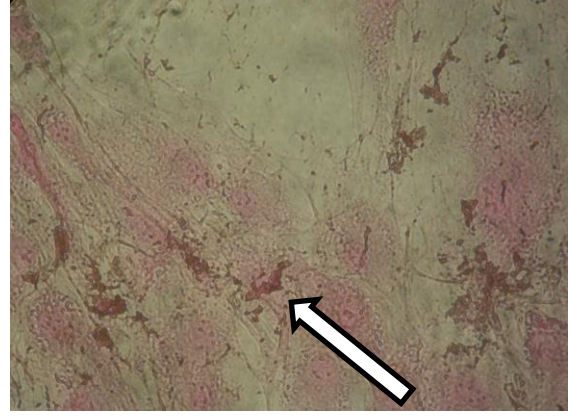
Şekil 51

14. gün Von Kossa boyaması sonrası, adipoz dokudan elde edilen hücreler fotoğraflanmıştır. Şekil 52'de kemik grefti eklenmeyen, şekil 53'de ise kemik grefti eklenen hücre kültürü

görülmektedir. Kemik grefti eklenen grupta, eklenmeyen gruba kıyasla mineralizasyonun düşük olduğu izlenmiştir.



Şekil 52



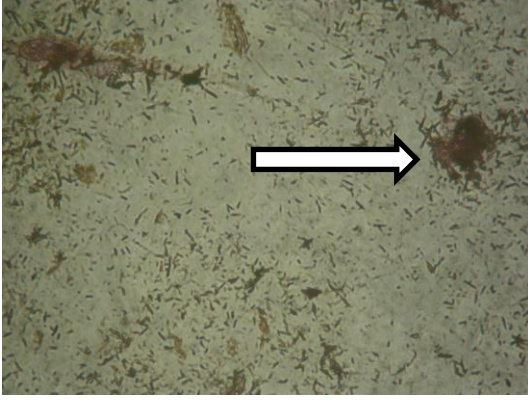
Şekil 53

21. gün Von Kossa boyaması sonrası, adipoz dokudan elde edilen hücreler fotoğraflanmıştır. Şekil 54'de kemik grefti eklenmeyen, şekil 55'de ise kemik grefti eklenen hücre kültürü görülmektedir. Kemik grefti eklenen grupta, eklenmeyen gruba kıyasla mineralizasyonun düşük olduğu izlenmiştir.

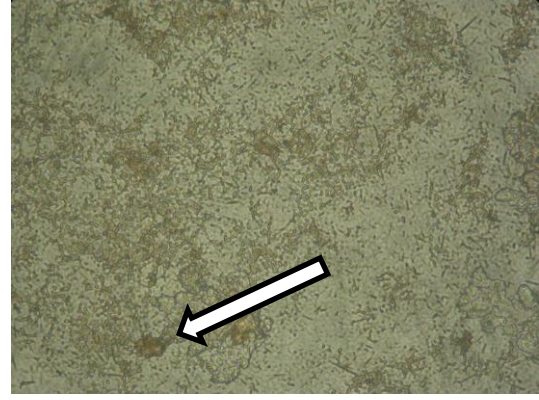
4.4.3 Alizarin Red Boyaması

Kemik iliği ve adipoz dokudan elde edilen hücrelerin, kemik grefti eklenen ve eklenmeyen kültürlerinin, 14. ve 21. günlerde Alizarin Red boyaması yapılmış ve fotoğraflanarak hücrelerin mineralizasyon düzeyleri değerlendirilmiştir.

4.4.3.1 Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerden Elde Edilen Osteoblastların Alizarin Red Boyaması

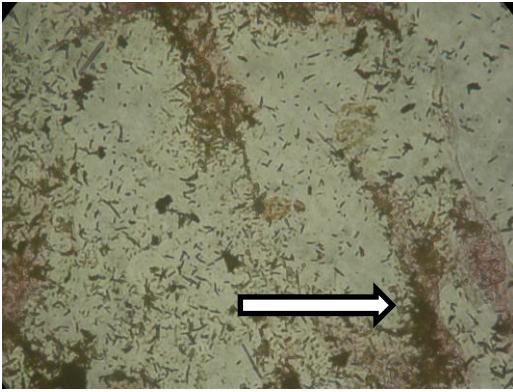


Şekil 54

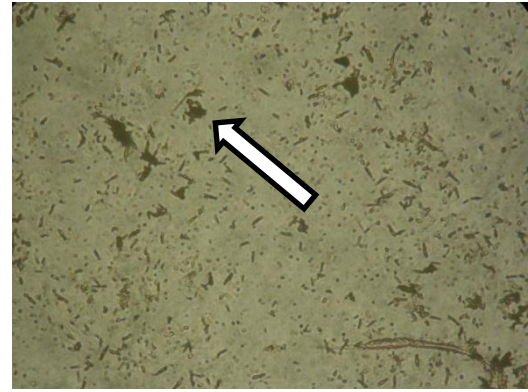


Şekil 55

14. gün Alizarin Red boyaması sonrası, kemik iliğinden elde edilen hücreler fotoğraflanmıştır. Şekil 56’da kemik grefti eklenmeyen, şekil 57’de ise kemik grefti eklenen hücre kültürü görülmektedir. Kemik grefti eklenen grupta, eklenmeyen gruba kıyasla mineralizasyonun düşük olduğu izlenmiştir.



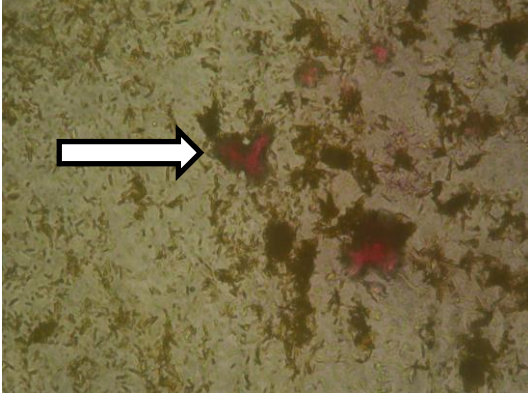
Şekil 56



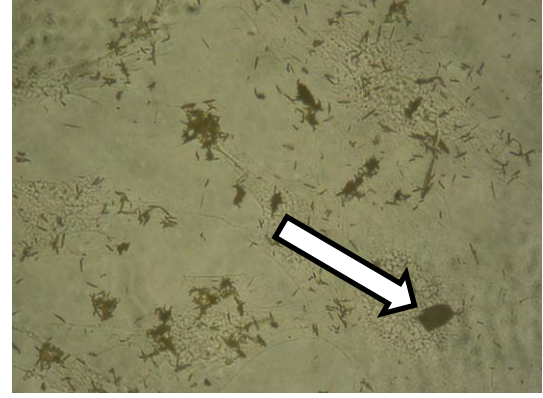
Şekil 57

21. gün Alizarin Red boyaması sonrası, kemik iliğinden elde edilen hücreler fotoğraflanmıştır. Şekil 58’de kemik grefti eklenmeyen, şekil 59’da ise kemik grefti eklenen hücre kültürü görülmektedir. Kemik grefti eklenen grupta, eklenmeyen gruba kıyasla mineralizasyonun 14. gndekine benzer şekilde düşük olduğu izlenmiştir.

4.4.3.2. Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerden Elde Edilen Osteoblastların Alizarin Red Boyaması

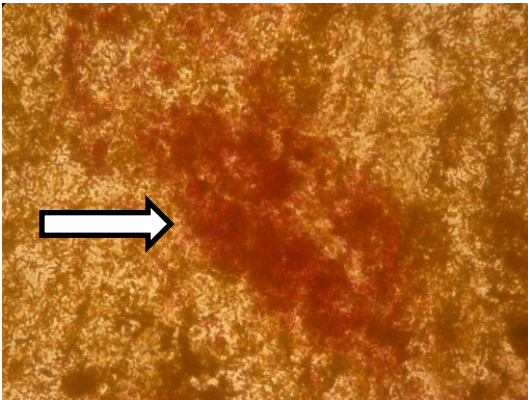


Şekil 58

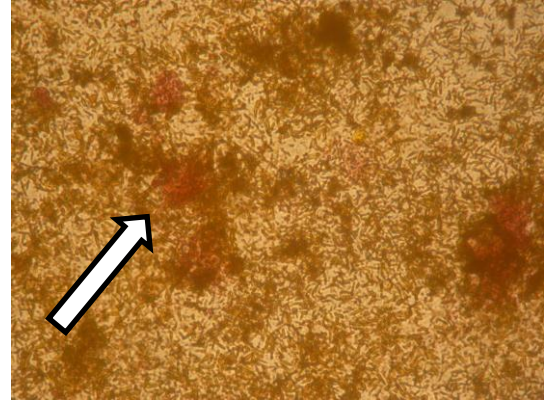


Şekil 59

14. gün Alizarin Red boyaması sonrası, adipoz dokudan elde edilen hücreler fotoğraflanmıştır. Şekil 60'da kemik grefti eklenmeyen, şekil 61'de ise kemik grefti eklenen hücre kültürü görülmektedir. Kemik grefti eklenen grupta, eklenmeyen gruba kıyasla mineralizasyonun düşük olduğu izlenmiştir.



Şekil 60



Şekil 61

21. gün Alizarin Red boyaması sonrası, adipoz dokudan elde edilen hücreler fotoğraflanmıştır. Şekil 62'de kemik grefti eklenmeyen, şekil 63'de ise kemik grefti eklenen hücre kültürü görülmektedir. Kemik grefti eklenen grupta, eklenmeyen gruba kıyasla mineralizasyonun 14. gündekine benzer şekilde düşük olduğu izlenmiştir.

5-TARTIŞMA

Mezenkimal kök hücreler tıbbın bir çok alanında olduğu gibi, Ortopedi ve Travmatoloji'yi ilgilendiren çok sayıda hastalığın tedavisinde ilgi konusu oluşturmaya devam etmektedir. Mezenkimal kök hücre içerikli tedavilerin gelişim sürecine bakıldığında ve bu hücrelerin kendini yenileyebilme, bir çok tipte mezenkimal dokuya dönüşebilme özelliği de göz önüne alınırsa, hücre bazlı tedavilerin gelecekte artan sıklıkta kullanılabilceği söylenebilir. Mezenkimal kök hücreler ilk olarak kemik iliğinden izole edilmiş olsa da daha sonra, adipoz doku, kordon kanı, süngerimsi kemik, sinovya, deri, kas, beyin ve periferik kanda da buldukları gösterilmiştir (33).

Hücre bazlı tedavilerle ilgili bilgi birikimi artıkça ve ameliyathane şartlarında mezenkimal kök hücreleri konsantre şekilde izole edebilen sistemler geliştikçe, kaynamama veya kaynama gecikmesi gibi ikinci bir cerrahi gerektiren durumlarda, mezenkimal kök hücreler ve kemik greftleri tedavide beraber kullanılabilir. Bununla beraber kemik greftlerinin insan vücudundaki davranışı hala bilinmeyenlerle doludur. Kemik allogreftlerinin vücutta harekete geçirdiği immün cevap mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır.

5.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

Osteoblastik aktivite için sıklıkla kullanılan ve karşılaştırmalı çalışmaları yapılmış olan mezenkimal kök hücre kaynakları; kemik iliği, adipoz doku ve kordon kanı mezenkimal kök hücreleridir. Kordon kanı mezenkimal kök hücreleri etik sorunları sebebiyle fazla tercih edilmemekte kemik iliği ve adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücreler laboratuvar ortamında daha sıklıkla çalışılmaktadır (33,34). Bu kaynaklar arasında mezenkimal kök hücrelerin izolasyonunda hala en sık kullanılan kaynak kemik iliğidir (35). Biz de çalışmamızda kemik iliğinden ve adipoz dokudan izole ettiğimiz mezenkimal kök hücreleri kullandık. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında kemik iliğinden ve adipoz dokudan mezenkimal kök hücre izolasyonu için alınan ilk örnekte, hücre izole etme başarısının %100 olduğu sonuçlar mevcuttur (34,36). Bu çalışmada bir hastadan alınan kemik iliği aspirasyon ve başka bir hastadan alınan lipoaspirat sonrası, örneklerinden yüksek sayıda mezenkimal kök hücreler izole edilebilmiştir. Bu sonuç, çalışmamızla aynı yaş grubunun donör olarak kullanıldığı önceki çalışmalara paraleldir. Yaşla beraber özellikle kemik iliğinden elde edilen

mezenkimal kök hücre sayısının azaldığı bildirilmiştir (17). Adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücre izolasyonunda ise örnek alım tekniğine bağlı olarak farklı sonuçlar bildirilmiştir. Oedayrajsingh-Varma ve ark. larının yaptığı çalışmada adipoz doku rezeksiyonu sonrası elde edilen mezenkimal kök hücre sayısını, liposuction materyalinden elde edilen mezenkimal kök hücre sayısına göre daha fazla bulmuşlardır (37). Adipoz doku örneklerinin alındığı bölgeye göre elde edilen mezenkimal kök hücre sayısında da farklılıklar olabilmektedir. Jurgens ve ark. ları yaptıkları çalışmada, abdomen ve kalça bölgesinden alınan adipoz doku örneklerinden izole ettikleri mezenkimal kök hücre sayısını karşılaştırmış ve abdomenden alınan örneklerde daha yüksek oranda mezenkimal kök hücre bulduklarını bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada, farklı bölgelerden alınan bu örneklerden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin osteojenik özelleşme potansiyelinde farklılık olmadığını belirtmişlerdir (38). Bu sonuçlara istinaden bizde çalışmamızda donörleri genç yaş grubundan seçtik. Kemik iliğinden mezenkimal kök hücre izolasyonu için iliak kanat aspirasyon örneği, adipoz dokudan ise abdominal liposuction materyalini kullandık. Donörlerimiz genç yaş grubunda olduğu için kemik iliği ve adipoz doku örneklerinden izole edilen mezenkimal kök hücre sayısı yüksek bulunmuştur.

5.2 Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojisi

Kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonundan sonra ilk günlerde yuvarlak şekilli, yoğun ve homojen bir görünüm izlendiği daha sonraki aşamalarda yine tek tabaka halinde sıralanmış, homojen ve fibroblast şekilli iğsi uzantılar gösteren hücreler oldukları daha önceki bazı çalışmalarda belirtilmiştir (33,36). Çalışmamızda izole edilen hücrelerin 2. ve 8. gündeki invert mikroskobunda çekilen fotoğraflarına bakıldığında, morfolojilerinin 2. günde hem kemik iliği hem de adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerde homojen yuvarlak, kültür kabını tamamen kaplayan bir görünüme sahip oldukları görülmüştür (**şekil 13 ve şekil 14**). 8 günde ise hücrelerin giderek iğsi uzantılar gösteren fibroblast benzeri görünüm kazandıkları izlenmiştir (**şekil 15 ve şekil 16**). Bu morfolojik bulgular diğer çalışmalarda belirtilen morfolojilerle benzerlik göstermektedir.

Rebeletto ve ark.'ları (33) kemik iliği, adipoz ve kordon kanından elde ettikleri mezenkimal kök hücrelerin morfolojilerini karşılaştırmışlar ve flow sitometri ölçümleri sonrası üç tip hücrenin de hücre büyüklüğü açısından istatistiksel fark göstermediğini bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda adipoz ve kemik iliği kökenli hücrelerin, flow sitometri sonrası büyüklüğünü

ölçtüğümüz herhangi bir istatistiksel çalışma yapılmadı. Ancak çalışmamızın flow sitometri verileri hücre büyüklüğü açısından incelendiğinde (FSC-yükseklik değeri) kemik iliği ve adipoz dokudan üretilen mezenkimal kök hücrelerin birbirine yakın hücre büyüklüklerine sahip oldukları gözlemlendi.

5.3 İmmünojenotipik İnceleme

Tarihte ilk flow sitometri cihazı Wallace H. Coulter tarafından 1956 yılında, hızlı kan hücre sayım ve hücre büyüklük analiz cihazı olarak yayınlanmıştır (39). Flow sitometri cihazı ile günümüzde hücrelerin yüzey belirteçleri taranarak, hücre tanımlanması için de kullanılmaktadır. Çalışmamızda mezenkimal kök hücrelerin yüzey belirteçlerini araştırmak üzere flow sitometri cihazı kullanılmıştır. Ancak mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması için herkes tarafından kabul görmüş moleküler belirteçler olmadığını savunanlarda mevcuttur (33). Çalışmamızda, CD44 ve CD90 antikorlarıyla işaretlenen örneklerin flow sitometri incelemelerinde yüksek pozitif sonuç verdikleri bulundu. Bu sonuç, geçmiş çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin bu belirteçleri yüksek oranda sunduklarını gösteren çalışmalarla paraleldir (34,36,40). Çalışmamızda, CD24, CD45 ve CD117 antikorlarıyla işaretlenen örneklerin flow sitometri çalışmasında düşük pozitif değerlerine rastlandı. Mezenkimal kök hücrelerin CD24 ve CD45 belirteci taşımadığını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (33,34,41). Ancak CD117'nin mezenkimal kök hücreler tarafından taşınmadığını söyleyen çalışmalar olduğu gibi (34,42) bazı çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin CD117 açısından orta-yüksek düzeyde pozitif olduğunu belirten çalışmalar da mevcuttur (43,44). Bizim çalışmamızda kemik ve adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin ikisinde de çok düşük pozitif değerde CD117 bulunmuştur (**şekil 18 ve şekil 24**). Çalışmamız sonrasında elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda mezenkimal kök hücrelerin CD117 belirteci taşımadıklarını düşünüyoruz.

5.4. Hücre Çoğalmasının Tayini

Mezenkimal kök hücre kültürlerinde hücre çoğalmasının tayini için Propidium iodide ile DNA tespiti, radyoaktivite, oksijen biyosensörleri gibi tekniklerin yanında Alamar mavisi, MTS gibi hücre metabolizmasında etkili metodlar kullanılmaktadır. Bu çalışmada, hücre çoğalmasının tespiti için, çalıştığımız laboratuvarın oldukça deneyimli olduğu MTS analizi metodunu

kullandık. MTS hücreler tarafından renk veren formazana dönüştürülür. MTS, hücre mitokondrisinde elektron transport zincirine etki ederek renk veren formazana dönüştürülür. Sadece canlı hücreler mitokondriyal aktiviteye sahip olduğu için, kültürdeki canlı hücre sayısı, MTS metodunda kalibrasyon eğrisini kullanılarak elde edilebilir. Shafiee ve ark.'ları kemik iliği ve adipoz doku ve somatik doku kökenli mezenkimal kök hücreleri osteojenik özelleşme açısından karşılaştırdıklarında, kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin proliferasyon kapasitesinin istatistiksel olarak farklılık taşımadığını bildirmişlerdir (41). Bizim çalışmamızda, kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin, osteojenik besiyerindeki proliferasyon kapasitelerine bakıldığında, 21 günlük inkübasyon sonunda, kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonunun, adipoz dokudan elde edilen kök hücrelere göre 7. ve 21. günlerde istatistiksel olarak daha fazla olduğunu bulduk. Bunun sebebinin, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kendi doğal farklılaşma çizgilerinin kemik hücreleri olduğu düşünüldüğünde, bu hücrelerin adipoz doku kaynaklı hücrelere göre daha fazla hücre sayısı üretebilme yeteneğinden kaynaklanabileceğini düşündük. Çalışmamızda, kemik grefti eklenen kemik iliği ve adipoz kökenli mezenkimal kök hücre gruplarına baktığımızda, kök hücre sayısının ilk 7 gün her iki grupta arttığını ancak 14. günden sonra hücre sayılarının azaldığını görüyoruz. Oysa kemik grefti eklenmeyen kemik iliği ve adipoz kökenli mezenkimal kök hücre gruplarında özelleşmenin başladığı 14. gün dışında 21 gün boyunca hücre sayıları artmaktadır. Bu artış istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. Sonuç olarak kemik grefti eklenen kemik iliği ve adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin proliferasyon durumu dikkate alındığında inhibisyonun daha çok özelleşmenin geç evresinde yani mineralizasyon döneminde daha belirgin olduğunu söyleyebiliriz. Bu inhibisyonu geç dönem osteoblastik özelleşme belirteçleri ve kalsiyum seviyesi ölçümleriyle desteklemenin çalışmanın ileri etaplarında daha faydalı olabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca kemik grefti eklenen kemik iliği ve adipoz doku kökenli kök hücrelerin aynı günlere ait istatistiksel karşılaştırılmasında hücre sayısında 7 ve 14. günlerde istatistiksel olarak anlamlılık mevcuttur. Mineralizasyonun başladığı özelleşmenin erken döneminde olan bu fark bize kemik greftlerinin kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerinde adipoz doku kaynaklı hücrelere göre inhibisyon etkisinin daha güçlü olabileceğini düşündürmüştür. Eğer bu durum çalışmanın ileri etaplarında bakılabilecek osteojenik farklılaşmanın geç dönem belirteçleri ve kalsiyum kantitatif düzeyiyle de doğrulanırsa, kemik grefti uygulanan hastalarda osteojenik özelliklerinden yararlanmak için kemik iliği kaynaklı kök hücreler kullanmak yerine, çok miktarda izole edilebilen, hastaya daha az morbidite yaratacak ve inhibisyona daha dirençli adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kullanımı düşünülebilecektir. Kemik iliği ve

adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre kültürlerinin kemik grefti eklenmeyen ve eklenen bu dört grubun, her birinin kendi içindeki günlere göre olan hücre sayılarının değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum bize kemik grefti eklenmeyen gruplarda osteojenik farklılaşmanın erken ve geç dönemlerine göre, hücrelerin proliferasyon veya farklılaşma yolundan bir tanesini daha ağırlıklı olarak seçtiğini düşündürmektedir. Farklılaşmayı seçen hücre grubu proliferasyon hızını azaltacağı için grupların kendi içinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç vermemesi normal karşılanabilir. Kemik grefti eklenen hücre gruplarının kendi içindeki istatistiksel anlamsızlığı kemik greftlerinin kültürün başladığı günden itibaren değil osteojenik farklılaşmanın belirli dönemlerinde inhibisyona yol açıyor olmasından kaynaklanabilir. Bu durum hücre sayısında kültürün başından beri sürekli bir azalmaya değil, belirli dönemlerde artış belirli dönemlerde azalmaya yol açtığı için istatistiksel olarak grubun kendi içinde anlamsız sonuç çıkmasına sebep olabilir.

5.5. Osteojenik Farklılaşmanın Tayini

Kemik doku için hala kesin tek bir belirteç yoktur (45). Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik aktivitesini belirlemede kullanılan belirteçler erken ve geç dönem belirteçleri olarak 2 gruba ayrılabilir. Alkalen fosfataz ve Tip 1 kollajen, osteoblastik aktivitenin erken dönem belirteçleridir (46). Osteonektin, osteopontin ve osteokalsin ise osteoblastik aktivitenin geç dönem belirteçleridir (47,48). Alkalen fosfataz, hücre kültürlerinde mezenkimal kök hücrenin osteoblasta farklılaşmasının erken döneminde artış gösterir ve mineralizasyonun başladığı dönemde düşüş gösterir (49). Bu düşüş, mezenkimal kök hücre kültürlerinde genellikle osteojenik farklılaşmanın maksimum olduğu 2. haftada görülür. Ancak bu farklılaşma sadece ilk 14 günle sınırlı değildir. Mezenkimal kök hücre kültürlerindeki osteojenik farklılaşma daha uzun zaman aralığına da yayılabilir (50).

Daha önce yapılan, kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik potansiyelinin kıyaslandığı karşılaştırmalı bazı çalışmalarda, alkalen fosfataz mezenkimal kök hücre kültürlerinde osteojenik farklılaşmanın belirteci olarak kullanılmıştır (33,36,51). Yine yapılan çalışmalarda mineralizasyonun mezenkimal kök hücre kültürlerinde belirlenmesinde Alizarin Red veya Von Kossa boyamaları kullanılmıştır (36,52). Biz de çalışmamızda, kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre kültürlerimizde osteoblastik aktivitenin ve osteojenik farklılaşmanın göstergesi olarak alkalen fosfatazı kullandık. Mineralizasyonun gösterilmesinde sadece Von Kossa boyamasından yararlanılan çalışmalar mevcuttur (53) ancak

Bonewald ve ark. ları kemik mineralizasyonu üzerinde yaptıkları *in-vitro* çalışmada Von Kossa boyamasının tek başına kemik mineralizasyonunu doğrulamada yeterli olmadığını bildirmişlerdir (54). Bu sebeple çalışmamızda, mezenkimal kök hücre kültürlerinde osteojenik aktivite sonrası oluşan mineralizasyonun gösterilmesi amacıyla Alizarin Red ve Von Kossa boyamasını beraber kullandık. Çalışmamızda, kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti eklenmeyen ve eklenen grupları arasında alkalen fosfataz değerlerini istatistiksel olarak değerlendirerek fark olup olmadığını göstermeye çalıştık.

Alkalen fosfataz, hücrelerde plazma membranının dışında bulunan bir enzimdir. Bazik ortamda pirofosfat gruplarından fosfat iyonu ayırarak matriks mineralizasyonu için gerekli olan kalsiyum-fosfat için fosfat kaynağı oluşturur. Alkalen fosfataz gen oluşumu osteoblastik aktivitenin erken döneminde artarken, osteoblastik farklılaşmanın geç döneminde bunun yerini osteokalsin gibi genlerin artışı izler (55).

Von Kossa yöntemi, gümüş iyonlarının kalsiyum tuzlarındaki fosfat gibi anyonlara bağlanarak, kahverengi veya metalik siyah renk vermesi esasına dayanır. Bu nedenle Von Kossa yönteminde dolaylı olarak kalsiyum ölçümü yapılır. Alizarin Red yönteminde ise kalsiyum iyonları Alizarin Red ile şelat oluşturarak renk verirler. Dolayısıyla bu yöntem ile direkt bir kalsiyum ölçümü yapılır (56)

Kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteoblastik aktivitelerini karşılaştıran sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Im ve ark.'ları kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik ve kondrojenik özelliklerini karşılaştırdıkları çalışmada kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde daha yüksek alkalen fosfataz değerleri, osteojenik potansiyel ve mineralizasyon kapasitesi bildirmişleridir (53). Bunun aksine Rebelatto ve ark.'ları kemik iliği, adipoz doku ve kordon kanı mezenkimal kök hücrelerini karşılaştırdıkları çalışmada, kemik iliği ve adipoz doku mezenkimal kök hücreleri arasında alkalen fosfataz seviyesi ve osteojenik farklılaşma potansiyeli bakımından fark olmadığını bildirmişlerdir (33). Kemik iliği ve adipoz doku mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik potansiyellerinde fark olmadığı farklı çalışmalarda da bildirilmiştir (36,51). Biz de çalışmamızda 7. 14. ve 21. gündeki alkalen fosfataz değerlerini göz önüne aldığımızda, adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerdeki alkalen fosfataz değerlerini, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelere göre biraz daha yüksek olduğunu bulduk. Ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu sonuca göre çalışmamızda kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde birbirine yakın potansiyelde osteojenik aktivite tespit ettiğimizi söyleyebiliriz.

Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre kültürlerinde alkalen fosfataz değerlerinin biraz daha yüksek olmasının sebebi izolasyon besiyerine eklediğimiz FGF olabilir. Bu ekleme adipoz kaynaklı kök hücrelerin kemik dışında diğer mezodermal kökenli hücrelere spontan dönüşümünü engellemek amacıyla yapıldı. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler osteojenik besiyerinin olduğu ortama 10. günden sonra bırakıldı. Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin ise yine ilk 10 günlük büyüme besiyerinde saklandı ancak bu besiyerine FGF eklenmedi. Ito ve ark.'ları FGF-2'nin mezenkimal kök hücreler üzerinde yaptığı etkiyi araştırdıkları çalışmalarında FGF-2'nin besiyerinde kullanımının mezenkimal kök hücre kültürlerinde ALP seviyelerini yükseltici etkisi olduğunu bildirmişlerdir (57). Çalışmamızda adipoz doku kaynaklı kök hücre kültürlerinde alkalen fosfataz seviyesinin yüksek olmasının sebebinin FGF uygulanması olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmanın ileri etaplarında, adipoz doku mezenkimal kök hücrelerine FGF eklenmeyerek alkalen fosfataz değerleri açısından bir kontrol deneyi yapılmasının faydalı olacağını düşünüyoruz.

Hemen hemen aynı osteojenik besiyerinin kullanıldığı karşılaştırmalı çalışmalara bakıldığında, kemik iliği ve adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin osteojenik aktiviteleri hakkında birbirinden farklı sonuçlar bildirildiği görülmektedir. Klinik uygulamalarda kullanılmak üzere mezenkimal kök hücre kaynağı olarak hala sıklıkla kemik iliğinden yararlanılmaktadır. Oysa mezenkimal kök hücrelerin yoğun olarak bulunduğu yağ dokusundan, mezenkimal kök hücrenin cerrahi sırasında alınarak uygulanması donör saha morbiditesini azaltabilecektir. Ugarte ve ark.'ları aynı kişiden alınan kemik iliği ve adipoz doku örneklerinden gram-doku başına elde edilen mezenkimal kök hücre sayısını karşılaştırdıklarında anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir (51). Son yıllarda, ameliyathanede aspire edilmiş materyalden mezenkimal kök hücrelerin konsantre edilip hastaya uygulanması popülerize olmaktadır. Bu ürünlerin kuru dondurulmuş (freeze-dried) kemik greftleri ile beraber veya tek başına kullanılmasının kemik defektlerinde iyileşmeyi ve remodelasyonu hızlandırdığı bildirilmiştir. Piyasada satılan bu sistemlerin mezenkimal kök hücre içeriği tartışılmakla beraber, daha konsantre bulunduğu düşünülmektedir (58). Adipoz dokunun hem sayı olarak hem de osteojenik aktivite yönünden kemik iliğine yakın mezenkimal kök hücre içerdiği düşünülürse ameliyathane ortamında adipoz dokudan mezenkimal kök hücre konsantre edebilecek sistemlerin geliştirilmesi düşünülebilir.

Hücre tabanlı tedaviler kırık iyileşmesinde giderek sık kullanılmasına rağmen Ortopedi ve Travmatoloji'de ameliyathanelerinde hala sık kullanılan bir diğer materyal allogreftlerdir. Allogreftlerin kullanımında çeşitli yöntemler vardır. Büyük masif bir defekt var ise masif

allogreft, kortikal bütünlüğü olan ancak spongiöz alanda boşluk olan defektlerde ise spongiöz allogreft kullanılmaktadır. Allogreft kullanımındaki amaç, kemik boşluğu olan bölgede osteokondüksiyon yapımı ve konsolide olarak defekti kapatmasıdır. Ancak mevcut sistemler içinde freze dried (kuru dondurulmuş), processed (işlem görmüş) veya fresh frozen (taze dondurulmuş) ve fresh (taze dondurulmamış) allogreftlerin iyileşme kapasiteleri arasında da farklılıklar bildirilmiştir. Dört greft tipinin de osteojenik aktivitesi yoktur. Osteoindüktif özellikleri ise birbirine yakındır. Osteokondüktif etkisi en yüksek olan ise taze allogreftlerdir. Taze dondurulmuş, kuru dondurulmuş ve DBM gibi işlem görmüş allogreftlerin osteokondüktif etkisi birbirine yakındır. İmmünijenitesi en yüksek olan taze allogreftlerdir. Bunu taze dondurulmuş ve işlem görmüş allogreftler izler. En az immünijenite kuru dondurulmuş allogreftlerde görülür. Remodelasyon oranı en yüksek olan taze allogreftlerdir. Diğerlerinin remodelasyon oranı düşüktür. Yapısal destek sağlamada en yüksek güç taze ve taze dondurulmuş allogreftlerdedir. İşlem görmüş allogreftlerin ise böyle bir özelliği çok düşüktür veya yoktur (59). Allogreft kullanımında sık karşılaşılan sorunlardan birisi rezorpsiyondur. Rezorpsiyon için alıcının immün cevabı suçlanmaktadır. Bu immün cevap için suçlanan mekanizmalardan bazıları, MHC (major histocompatibility complex) üzerinden T-hücre aracılı yanıt, kimyasal mediyatörlerin aracılık ettiği sitotoksitedir. Ancak allogreft inkorporasyonunu (kaynamasını) engelleyen immün mekanizma hala kesin olarak açıklanamamıştır. Allogreftin osteoindüksiyon fazının başlangıcında, immün cevabın allogreftin enflamatuar hücreler tarafından çevrilmesine sebep olarak, kan damarlarında ve osteoblastik hücrelerde nekroza yol açtığı ve rezorpsiyonu başlattığı düşünülmektedir (60). Tüm bunların ışığında önerilen, hücrelerin yaşadığı veya daha fazla hücrenin olduğu taze veya taze donmuş allogreft kullanımınıdır. Biz de çalışmamızda kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreleri iki gruba ayırarak, bir grubu sadece osteojenik besiyerinde inkübe ederek, ikinci grubu ise osteojenik besiyeri ve taze dondurulmamış allogreft ile beraber inkübe ederek bu iki grubu osteojenik aktivite yönünden karşılaştırdık.

Kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı kök hücre kültürleri alkalen fosfataz aktivitesi açısından değerlendirildiğinde her iki grupta da kemik grefti eklenmeyen ve eklenen grup arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. Alkalen fosfataz düzeyini osteoblastik aktivitenin belirteci olarak kabul eden çalışmalar vardır (33,36,51). Öte yandan, Cordonnier ve ark'larının mezenkimal kök hücrelerin 3 boyutlu özelleşmesini inceledikleri çalışmada sadece alkalen fosfataz düzeyinin osteoblastik aktiviteyi göstermede yeterli olmadığı hatta alkalen fosfataz RNA düzeyiyle de osteoblastik aktivitenin uyumlu olmadığını bildirilmiştir (61). Bunlara ek olarak

Hoemann ve ark.ları alkalen fosfataz aktivitesi ve mineralizasyon üzerinde mezenkimal kök hücre kaynağının etkisini inceledikleri çalışmada, osteojenik aktivitenin geç dönem göstergesi olan mineralizasyonun olmadığı durumlarda bile mezenkimal kök hücrelerin alkalen fosfataz ürettiklerini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da, kemik grefti eklenmeyen kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre kültürlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da özellikle adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerde kemik iliğinden elde edilenlere oranla 10 kat daha fazla alkalen fosfataz aktivitesi bulunmuştur. Bu bize de alkalen fosfatazın osteoblastik aktiviteyi göstermede çok değişken sonuçlar verebileceğini ve tek başına osteoblastik aktiviteyi değerlendirmede yeterli olamayabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda mezenkimal kök hücre kültürlerinin kemik grefti eklenmeyen grup ile eklenen grup arasındaki alkalen fosfataz değerlerinin karşılaştırılmasındaki bir diğer sorunda, kemik grefti eklenen grupta alkalen fosfataz aktivitesinin ne kadarının kemik greftinden geldiğinin bilinmemesidir. Çalışmamızda sadece kemik grefti içeren besiyeri ile kemik grefti içermeyen osteojenik besiyerinin alkalen fosfataz değerlerini ölçtüğümüzde, kemik grefti içeren besiyerinin içermeyene oranla 3 kat daha fazla alkalen fosfataz aktivitesi gösterdiğini bulduk (**şekil 47**). Bu sonuç bize kemik grefti içeren grupta alkalen fosfataz aktivitesinin bir bölümünün kemik greftlerinden kaynaklandığını düşündürmüştür. Çalışmamızda kemik grefti için örnek alınan donörler farklı bireylerdir. Femur başları alındıktan sonra tek tek kemik grefti hazırlanmıştır ve bu greftler ihtiyaç ölçüsünde kullanılmıştır. Dolayısıyla kemik grefti alınan bireyler her ne kadar birbirine yakın yaş grubundan seçildiyse de alınan femur başlarından hazırlanan kemik greftlerinin tek tek alkalen fosfataz düzeyleri ölçülmemiştir. Kişiden kişiye alkalen fosfataz düzeyinin değişebileceği göz önünde bulundurulursa, çalışmanın ileri etaplarında kullanılacak kemik greftlerinin alkalen fosfataz düzeyinin her bir femur başından hazırlanan örnek için ölçülmesi, kemik grefti eklenen grupta sağlıklı bir alkalen fosfataz aktivitesinin saptanması ve bazal alkalen fosfataz düzeyinin belirlenmesi açısından yararlı olacaktır. Bununla beraber çalışmanın ilerleyen etaplarında, osteoblastik aktivitenin değerlendirilmesi için sadece alkalen fosfataz kullanılması yerine osteokalsin, osteopontin, osteonektin ve kalsiyum düzeyi gibi osteoblastik aktivitenin geç belirteçlerinin düzeylerinin belirlenmesi, alkalen fosfataz aktivitesinin daha iyi yorumlanmasına ve osteoblastik aktivitenin daha sağlıklı değerlendirilebilmesine imkan tanıyacaktır.

MTS, alkalen fosfataz aktiviteleri, Alizarin Red ve Von Kossa boyamaları beraber değerlendirildiğinde özellikle 7. günde kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin kemik grefti eklenen gruplarında hücre sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş tespit

edilmiştir. Mezenkimal kök hücre kültüründe osteojenik besiyerinde normalde alkalen fosfataz pikinden sonra hücreler özelleşmeye başlayıp mineralizasyon artışı görülür. Bu ortalama kültürün 14-21. günleri arasındadır (62). Mineralizasyonun başlamasıyla beraber alkalen fosfataz aktivitesi azalmaya başlar (49). Mineralizasyonun başladığı dönemde hücreler daha çok özelleşme yoluna gider ve hücre proliferasyon hızı azalır. Alkalen fosfataz osteoblastik diferansiasyonun belirteci olduğu gibi mineralizasyondada rol oynayan bir enzimdir (49). Kemik grefti eklenen grupta, kemik grefti kaynaklı alkalen fosfataz aktivitesinin mezenkimal kök hücre kültüründeki alkalen fosfataz aktivitesinin üzerine eklenmesi veya kemik greftinin bilinmeyen bir sebeple alkalen fosfataz aktivitesi arttırması, alkalen fosfataz pikini erken döneme çekiyor olabilir. Alkalen fosfatazdaki bu erken pik mezenkimal kök hücre kültüründe erken mineralizasyona sebep olabilir. Ya da alkalen fosfataz seviyelerindeki bu erken dönemdeki yükseklik, osteoblastların normalden erken dönemde özelleşmeye başlayarak erken mineralizasyon göstermelerinin bir belirtisi olabilir.

Kemik matriksinin mineralize olmuş kısımlarına gömülen osteositlerin kemik oluşumu üzerindeki moleküler düzenleyici etkileri son yıllarda araştırma konusu olmuştur. Bu mekanizmanın hala bilinmeyenlerle dolu olması bu alandaki moleküler çalışmaları arttırmaktadır. Sclerostin bunlardan en çok incelenen ancak etkileri ve etki mekanizması hala tamamen aydınlatılmamış proteinlerden biridir.

Sclerostin ve sclerostinin aracılık ettiği moleküler yollar, kemik metabolizması üzerindeki olası etkileri sebebiyle ve osteoporozun alternatif tedavi arayışlarında ilgi konusu olmaya başlamıştır. Sclerostin mineralize matriks içine yeni gömülmüş osteositler tarafından salgılanan bir proteindir. İnsan ve hayvan osteoblastlarında proliferasyon ve özelleşmeyi inhibe ettiği gösterilmiştir. Osteoblastların apoptozlarını arttırarak yaşam sürelerini kısaltır. İnsan kemik metabolizmasının osteoklastlar üzerindeki etkisi ise hala tam olarak anlaşılmamıştır. Hayvan deneylerinde kemik mineral yoğunluğunu, kortikal ve süngerimsi kemik hacmini ve kemik kuvvetini azalttığı gösterilmiştir. Sclerostin aynı zamanda klasik olmayan bir BMP (bone morphogenetic protein) antagonistidir (63,64).

Wnts proteinleri, Frizzled ailesi denilen 7 adet transmembran reseptöründen oluşan komplekse bağlanarak hücre içi β -katenin salgısına sebep olurlar. β -katenin de hücre içindeki transkripsiyon faktörlerini harekete geçirerek kemik oluşumunda pozitif etkiye sebep olur. (63) β -kateninin mezenkimal kök hücrelerde yada erken osteoblastik hücrelerde inaktivasyonu osteoblastik diferansiasyonu engeller (65).

LRP5 ve LRP6 (düşük dansiteli lipoprotein reseptör ilişkili protein) membrana bağlı olan ve canonical Wnt sinyal iletiminde kofaktör olarak rol oynayan proteinlerdir. Sclerostin LRP5 ve LRP6 yı bağlayarak canonical Wnt sinyal iletimini inhibe eder. LRP5 ve LRP6'nın mutasyon veya inhibisyonu osteoporozla ilişkili bulunmuştur (63).

DKK1 (Dickkopf 1) sekrete edilen Wnt antagonistidir. LRP5 ve LRP6 ya bağlanarak Wnt aktivitesini inhibe eder (65). Multipl myelomda yüksek DKK 1 seviyeleri osteolitik lezyonlardan ve osteoblast özelleşmesinin inhibisyonundan sorumlu tutulmuştur (66). DKK 1 anti-inhibitörlerinin osteoblast sayılarını ve süngerimsi kemik miktarını arttırdığı gösterilmiştir. Bu sebeple DKK 1 inhibitörlerinin gelecekte osteoporoz ve kırık kaynamamalarının tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir (67).

Kemik grefti eklenmiş kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerindeki muhtemel erken mineralizasyon sonucu osteositlerin erken dönemde mineralize matriks içine gömülerek sclerostin salgılanmasına, bu erken sclerostin salgısı da osteoblast sayısında ve mineralizasyonda erken dönemde negatif bir geri bildirim yol açarak azalmaya sebep oluyor olabilir. Sonuç olarak mineralizasyonun erken başlaması bir mineralizasyon yetersizliğiyle sonuçlanabilir. Çalışmamızda Alizarin Red ve Von Kossa boyamaları ile kemik grefti eklenen kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde 14. ve 21. gündeki mineralizasyonda azalma tespit edildi (**şekil 49,51,53,55,57,59,61,63**). Elbette sadece Von Kossa ve Alizarin Red boyamasında mineralizasyon azalmasının görülmesi bize istatistiksel bir sonuç vermeyebilir. Ancak çalışmanın ileri etaplarında kantitatif olarak ölçülebilen, kalsiyum gibi mineralizasyon belirteçlerinin miktarının tespitinin çalışmaya dahil edilmesi, inhibisyon düzeyiyle ilgili daha kesin sonuçlar almak için yol gösterici olabilir. Buna ek olarak mineralizasyonda 14. ve 21. günlerde görülen azalmanın normalden erken başlayan bir mineralizasyon kaynaklı olup olmadığını anlamak için çalışmanın ilerleyen etaplarında Von Kossa ve Alizarin Red boyaması ilk olarak 14. gün yerine daha erken dönemlerde yapılarak, kemik grefti eklenmeyen ve eklenen kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre grupları arasındaki mineralizasyonun başlangıç aşamasının tespiti mümkün olabilir.

MTS sonuçlarına bakıldığında kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre kültürlerinin kemik grefti eklenen gruplarında ilk 7 günde hücre sayısının arttığı 14. ve 21. günlerde hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bulunmasada bir azalma olduğu görüldü. Mezenkimal kök hücre kültürlerinde özelleşmenin başladığı ve mineralizasyonun arttığı dönemde hücre proliferasyonunun azalması ve hücrelerin daha çok özelleşmeye yönlendirilmesi zaten

beklenen bir gelişmedir. Çalışmamızda kemik grefti eklenen mezenkimal kök hücre örneklerinde aynı günlerde proliferasyonun azalmaya başlamasının yanısıra mineralizasyonun da azaldığı, Von Kossa ve Alizarin Red boyaması ile gösterildi. Bu iki verinin ışığında kemik greftlerinin mezenkimal kök hücre kültürlerinin proliferasyon aşamasında değil mineralizasyon aşamasında bir inhibisyona yol açtığı düşünülebilir. Bu sebeple matriks mineralizasyonun geç döneminde ortaya çıkan ve mineralize olmuş doku hücreleri tarafından salgılanan osteokalsin gibi (45) belirteçlerin ortamdaki seviyelerinin ölçülmesi mineralizasyon defektinin gösterilmesinde yardımcı olabilir.

Yine çalışmanın ileri etaplarında sclerostin ve DKK1 'in kemik grefti eklenen mezenkimal kök hücre grubundaki seviyeleri ölçülerek, osteojenik aktivitedeki bu inhibisyonda etkili olup olmadıkları, etkili iseler hangi dönemlerde bu inhibisyona yol açtıkları gösterilebilir.

Osteositler üzerinde mekanosensörler mevcuttur ve mekanik yüklenme osteositlerin kemik hemostazını düzenlemesinde tetikleyici rol oynar. *In-vivo* mekanik yüklenmenin sclerostin salımını azalttığı ve bu yolla kemik oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (68). Patel ve ark.ları mekanik yüklenmenin osteoblast öncülleri üzerinde kemik yapımına olan etkisini göstermek için bu hücreler üzerine mekanik yüklenmeyi sağlayan düşük güçte yüksek frekanslı bir mekanik yüklenme platformu kullanmış ve mekanik yüklenmenin osteoblast öncülleri üzerinde kemik oluşumunu artırıcı etkisi olduğunu bildirmişlerdir (69). Çalışmamızın ileri etaplarında kemik grefti eklenmiş mezenkimal kök hücre kültürlerinde mekanik yüklenme yaratarak bu inhibisyonun kalkıp kalkmadığına bakılabilir. Bu sayede kaynamama sebebiyle greftleme yapılmış hastalarda bu inhibitör proteinlerin arttığı dönemde ekstremiteye yük verilerek, eğer var ise sclerostin ve DKK1 aracılı inhibisyonunun ortadan kaldırılması konusunda bize yol gösterici olabilir. Ek olarak kemik grefti eklenmeyen mezenkimal kök hücre kültürlerinde bu inhibitör proteinlerin hangi dönemlerde arttığı gösterebilirse, primer kırık hastalarında bu inhibisyonu mekanik yüklenmeyle kaldırmak için, hangi zaman diliminde kırık ekstremitede yük kısıtlaması olması, hangi zaman diliminde yük verme konusu bize yol gösterici olabilir. Klinik uygulamalar için düşünülecek olursa osteoporozda rol oynadığı gösterilen bu inhibitör proteinlerin inhibisyonuyla osteoporoz tedavisinde yeni ilaçların geliştirilmesi mümkün olabilir.

Allogreftlerin osteojenik aktivite üzerindeki negatif etkilerini *in-vitro* olarak gösteren bu çalışmamızın ileri etaplarında ortamdaki muhtemel inhibitör faktörlerin araştırılması gerektiğini düşünüyor ve planlıyoruz. Çalışmamızın eksik yönleri osteojenik aktivitenin saptanmasında geç

belirteçler olan osteokalsin, osteopontin ve osteonektinin, mezenkimal kök hücre kültüründeki seviyelerinin belirlenmemesi, mineralizasyon konusunda bize daha kantitatif sonuçlar verebilecek kalsiyum miktarının tespit edilmemesi, kemik greftlerindeki alkalen fosfataz düzeyinin ölçülmemiş olması, allogreftin inhibitör etkisinin mekanizmasını veya ortamdaki muhtemel inhibitör faktörlerin neler olabileceğini göstermemesidir. Çalışmanın eksiklikleri ileride tamamlanacaktır.

Günümüzde kemik defektlerinin tedavisinde allogreftler halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Tüm gösterilmiş olumsuz komplikasyonlara rağmen, hiçbir uygulama zamanlaması düşünülmeden, her olguya standart olarak allogreftin planlanabilmektedir. Bizim çalışmamızda ise allogreftlerin kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerle inkübasyonları halinde kemik mineralizasyonunda inhibitör etkileri olduğu *in-vitro* olarak gösterildi. Bu bilgiler ışığında allogreft kullanımının zamanlamasının yeniden değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı zamanda allogreftin inhibitör etkilerinin tam mekanizmasının gösterilmesi için, ortamda mevcut muhtemel inhibitör olabilecek proteinlerin hangilerinin olduğunu ayrı bir çalışmayla araştırılması gerekmektedir.

6-SONUÇ

Kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin taze dondurulmamış spongioz allogreftlerle inkübasyonu ile mezenkimal kök hücrelerin osteojenik aktivitesinde inhibisyon görülmüştür. Bu inhibisyon özellikle osteoblastik aktivitenin geç döneminde görülen mineralizasyonda azalma ile kendini göstermiştir. İnhibisyon bir indirekt bir kalsiyum belirteci olan Von Kossa boyaması ve direkt kalsiyum belirteci olan Alizarin Red boyaması ile gösterildi.

Kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kemik allogreftleri ile inkübasyonu sonrası gözlenen osteoblastik aktivitedeki bu azalma özelleşmenin, geç döneminde hücre sayısında azalma ile de desteklenmiştir. Kemik grefti eklenmeyen kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı kök hücre kültürlerinin özelleşmenin olduğu 14. gün dışında 21 gün boyunca hücre sayısında bir artış görülürken, kemik grefti eklenen kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı kök hücre kültürlerinde 14. günden sonra hücre sayısında bir azalma görüldü. Osteojenik farklılaşmanın geç döneminde görülen hücre sayısındaki bu azalma istatistiksel anlamlılık göstermektedir.

Kemik allogrefti ile inkübe edilen kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre kültürlerinde ilk 7 günde hücre sayısında bir artış görüldü. Bu durum kemik allogreftlerinin, kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre kültürlerindeki osteojenik aktivite inhibisyonunu özelleşmenin erken değil geç döneminde meydana getirdiğini düşündürmektedir.

Osteojenik aktivitenin gruplar arasında kıyaslamasında, kemik greftlerindeki kültür ortamına salınan alkalin fosfataz aktivitesi sebebiyle, alkalin fosfataz tek başına osteojenik aktivitenin göstergesi olamaz.

Çalışmamızın sonucunda taze dondurulmuş spongioz allogreftler ile kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kültürlerinde osteojenik aktivitede azalma tespit ettik. Bu bulgular ışığında allogreft kullanımının, kullanım zamanlamasının yeniden sorgulanması gerektiğini ve ayrıca moleküler düzeyde muhtemel inhibitör yolların araştırılması gerektiğini örnek sayısındaki yetersizlik sebebiyle istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan sonuçların, daha yüksek sayıda örnek ile yapılacak çalışmalarla istatistiksel anlam kazanabileceğini tespit ettik.

Kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin taze spongioz allogreftlerle inkübasyonu sonrası osteoblastik aktivitede inhibisyon görüldü. Hücre proliferasyonunu gösteren MTS analizinde, 7. ve 21. günlerde hem kemik iliği hem adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kemik grefti eklenen grubunda hücre proliferasyonunda istatistiksel anlam ifade eden azalma oldu ($p<0.05$). İki grubun alkalen fosfataz düzeyi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$). Von Kossa ve Alizarin Red Boyamasında kemik grefti eklenen grupta mineralizasyonda azalma tespit edildi. Kemik grefti eklenmeyen kemik iliği ve adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre grupları, arasında hücre proliferasyonunda 7. ve 21. günlerde kemik iliğinden kaynaklı hücrelerin sayısında adipoz doku kaynaklı hücrelere göre anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bu iki grup arasında alkalen fosfataz düzeyinde istatistiksel anlamlı fark tespit edilmedi. ($p>0.05$)

7-KAYNAKLAR

1. Bucholz RW. Nonallograft osteoconductive bonegraft substitutes. Clin.orthop. Relat. Res. 2002. Feb;(395):44-52, Review
2. Bongso A, Lee EH. Stem Cells From Bench to Bedside, Chapter 1, Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources. P; 1-13. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 2005
3. Appasoni K, Apposoni RK, Stem Cell and Regenerative Medicine From Molecular Embryology to Tissue Engineering.Part 1 Stem Cell Biology P: 4, 2011, Humana Press
4. Panno J. Stem Cell Research Medikal Applications and Ethical Controversy, Chapter 1, Stem cells are not all equal P: 1-18, 2005
5. Ural AU, Kök Hücreler, TOTBİD dergisi, cilt 5, sayı 3-4, 2006
6. Sahin F, Saydam G, Omay SB, Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi, Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi, Sayı 1, Cilt 15, 2005, Derleme
7. Can A, Kök Hücre Biyolojisi ve klinik Uygulamalar, Kök Hücre Tanımları, S:19
8. Can A, A concise review on the classification and nomenclature of stem cells, Turk J Hematol 2008; 25: 57-9
9. Alwattar BJ, Scwarzkopf R, Kirsch T. Stem cells in orthopaedics and fracture healing. Bull NYU hosp JT dis 2011;69(1):6-10 Review
10. Friel R, van der Sar S, Mee PJ, Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. Adv Drug Deliv Rev. 2005 Dec 12;57(13):1894-903. Review
11. O'Donoghue K, Fisk NM, Fetal stem cells, Best Pract Res Obstet Gynaecol, Dec 18 (6) : 853-875 , 2004, review
12. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies monolayer cultures of quinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet. 1970. Oct; 3 (4): 393-403
13. Beresford JN, Owen ME, Marrow Stromal Cell Culture, Bianco P, Riminucci M. The bone marrow stroma *in vivo*: Ontogeny structure, cellular composition and changes disease. P 10. Cambridge University Press. 1998
14. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ, Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. Br J Haematol. 1999 Nov; 107(2): 275-81

15. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F, Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* 2002 Mar 46 (3): 704-13
16. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res.* 1999 Jul; 14(7): 1115-22
17. Fibbe WE, Mesenchymal stem cells, A potential source for skeletal repair, *Ann Rheum Dis.* 2002 Nov; 61 Suppl 2: ii29-31 review.
18. Vemuri MC, Chase LG, rao MS, Mesenchymal Stem cell assays and Applications. Chapter 1, P: 3-8, Humana Press, Springer Science and Business, media. 2011
19. Akgün I, Ünlü MC. Türkiye Klinikleri J Orthop & Traumatol-Special Topics 2011; 4(1): 95-101, review
20. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Apr; 36 (4) : 568-84 Review
21. Chen FH, Rousche KT, Tuan RS. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006 Jul;2(7):373-82.
22. Domici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal Criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society For Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8 (4): 315-7 Review
23. Lee EH, Hui JH, The potential of stem cells in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br.* Jul; 88 (7) : 841-851, 2006, review
24. Meyer U, Wiesmann HP, Bone and Cartilage Engineering, Chapter 2, Bone And Cartilage P; 3-46, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006
25. Bucholz RW, Court-Brown CM, Heckman JD, Tornetta III P. Rockwood and Green's Fractures in Adults, 7 th Edition, Volume 1, Buckwalter JA, Einhorn TA, Marsh JL, Gulotta L, Ranavat A, Lane J, Chapter 4, P: 85-103, Wolters Kluver / Lippincott Williams & Wilkins, 2010
26. Lieberman JR, AAOS Comprehensive Orthopaedic Review, Clohisy JC, Lindskog D, Abu-Mayer Y, Chapter 5, P: 41-51, 2009
27. Aubin JE, Heersche JNM, Osteoprogenitor Cell Differentiation to Mature Bone-Forming Osteoblasts, *Drug Development Research*, 49:206-215. 2000 Review
28. Miller MD, Review of Orthopaedics, 4.th Edition, Brinker MR, O'Connor DP, Temel Bilimler, s: 1-44. 2006, Akademi Doktorlar Yayın Evi, Çeviri

29. Nather A, Bone Grafts and Bone Substitutes, Basic Science and Clinical Applications, Nather A, Feng MCB, Aziz Z, Chapter 2, Fracture Healing, P19-29, World Scientific Publishing Co., 2005
30. Bucholz RW, Heckman JD, Court-Brown C, Tonetta III P, Rockwood and Green's Fracture in Adults, 7 th Edition, Volume 1, Buckwalter JA, Einborn TA, Marsh JL, Ranawat A, Lane J, Bone and Joint Healing, p: 85-104, Lippincott Williams & Wilkins. 2010
31. Lieberman JR, Friedlaender GE, Bone Regeneration and Repair, Biology and Clinical Applications, Sfeir C, Ho L, Doll BA et all, Fracture Repair, P: 21-44, Humana Press Inc. 2005
32. Kılıçoğlu SS, Mikroskobi Düzeyinde Kırık İyileşmesi, Ankara Üniv. Tıp Fak. Mecmuası, Cilt 55, Sayı 2, 2002
33. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, Oliveira J, Martins J, Kuligovski C, Mansur F, Christofis A, Amaral VF, BrofmanPS, Goldenberg S, Nakao LS, Correa A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp BiolMed* (Maywood). 2008 Jul;233(7):901-13
34. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005 Nov;33(11):1402-16.
35. Kemp KC, Hows J, Donaldson C. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leuk Lymphoma*. 2005 Nov;46 (11) : 1531-44. Review
36. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006 May;24(5):1294-301
37. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, Ritt MJ, van Milligen FJ. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*. 2006;8(2):166-77.
38. Jurgens WJ, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, Zandiehoulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, Ritt MJ, van Milligen FJ. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res*. 2008 Jun;332(3):415-26.

39. Tanelli F, Flow Sitometri Tekniği ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı, Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 5 (2) : 75-82, 2007
40. Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, Ma K, Zhou C. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 2008 Aug;17(4):761-73.
41. Shafiee A, Seyedjafari E, Soleimani M, Ahmadbeigi N, Dinarvand P, Ghaemi N. A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnol Lett.* 2011 Jun;33(6):1257-64.
42. Yañez R, Lamana ML, García-Castro J, Colmenero I, Ramírez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have *in vivo* immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *StemCells.* 2006 Nov;24(11):2582-91.
43. Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, Jurgens WJ, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, van Ham SM, van Milligen FJ. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007 Feb;16(1):91-104.
44. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 28;97(7):3213-8.
45. John A, Ikada Y, Tabata Y, Tissue Engineered Bone and Adipose Tissue. *Trends Biomater. Artif. Organs*, Vol. 16(1) pp 28-33, 2002
46. Li H, Daculsi R, Grellier M, Bareille R, Bourget C, Amedee J. Role of neural-cadherin in early osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells cocultured with human umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010 Aug;299(2):C422-30.
47. Plant A, Tobias JH. Characterisation of the temporal sequence of osteoblast gene expression during estrogen-induced osteogenesis in female mice. *J Cell Biochem.* 2001;82(4):683-91.
48. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev.* 1993 Aug;14(4):424-42. Review.
49. Vali B, Rao LG, El-Sohemy A. Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. *J Nutr Biochem.* 2007 May;18(5):341-7.

50. Niemeyer P, Kornacker M, Mehlhorn A, Seckinger A, Vohrer J, Schmal H, Kasten P, Eckstein V, Südkamp NP, Krause U. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation *in vitro*. *Tissue Eng.* 2007 Jan;13(1):111-21.
51. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 2003;174(3):101-9.
52. Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hui JH, Lee EH, Lim B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells.* 2007 Mar;25(3):750-60.
53. Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage.* 2005 Oct;13(10):845-53.
54. Bonewald LF, Harris SE, Rosser J, Dallas MR, Dallas SL, Camacho NP, Boyan B, Boskey A. von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization *in vitro* represents bone formation. *Calcif Tissue Int.* 2003 May;72(5):537-47.
55. Golub EE, Boesze-Battaglia K, The role of alkaline phosphatase in mineralization, *Curr. Opin. Orthop.* 18:444-448, 2007, Lippincott Williams & Wilkins
56. Wang YH, Liu Y, Maye P, Rowe DW. Examination of mineralized nodule formation in living osteoblastic cultures using fluorescent dyes. *Biotechnol Prog.* 2006 Nov-Dec;22(6):1697-701.
57. Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Tsuchiya T. FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF-beta signaling. *Cytotechnology.* 2008 Jan;56(1):1-7.
58. Dallari D, Fini M, Stagni C, Torricelli P, Nicoli Aldini N, Giavaresi G, Cenni E, Baldini N, Cenacchi A, Bassi A, Giardino R, Fornasari PM, Giunti A. *In vivo* study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J Orthop Res.* 2006 May;24(5):877-88.
59. Lieberman JR, AAOS Comprehensive Orthopaedic Review, Seo WS, Lee FY, Bone grafting/Bone Graft Substitues Chapter 12, P: 111-116, 2009

60. Lieberman JR, Friedlaender GE, Bone Regeneration and Repair, Biology and Clinical Applications, Goldberg VM, Akhavan S, Biology of Bone Grafts, P: 57-65, Humana Press Inc. 2005
61. Cordonnier T, Layrolle P, Gaillard J, Langonné A, Sensebé L, Rosset P, Sohier J. 3D environment on human mesenchymal stem cells differentiation for bone tissue engineering. J Mater Sci Mater Med. 2010 Mar;21(3):981-7.
62. Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Sanchez-Cabo F, Prokesch A, Paar C, Scheideler M, Windhager R, Preisegger KH, Trajanoski Z. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. BMC Genomics. 2007 Mar 12;8:70
63. Moester MJ, Papapoulos SE, Löwik CW, van Bezooijen RL. Sclerostin: current knowledge and future perspectives. Calcif Tissue Int. 2010 Aug;87(2):99-107.
64. ten Dijke P, Krause C, de Gorter DJ, Löwik CW, van Bezooijen RL. Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling. J Bone Joint Surg Am. 2008 Feb;90 Suppl 1:31-5. Review.
65. Guo J, Liu M, Yang D, Bouxsein ML, Saito H, Galvin RJ, Kuhstoss SA, Thomas CC, Schipani E, Baron R, Bringham FR, Kronenberg HM. Suppression of Wnt signaling by Dkk1 attenuates PTH-mediated stromal cell response and new bone formation. Cell Metab. 2010 Feb 3;11(2):161-71.
66. Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma
67. Gatti D, Viapiana O, Adami S, Idolazzi L, Fracassi E, Rossini M. Bisphosphonate treatment of postmenopausal osteoporosis is associated with a dose dependent increase in serum sclerostin. Bone. 2012 Mar;50(3):739-42. Epub 2011 Dec 10
68. Robling AG, Bellido T, Turner CH. Mechanical stimulation *in vivo* reduces osteocyte expression of sclerostin. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2006 Oct-Dec;6(4):354.
69. Patel MJ, Chang KH, Sykes MC, Talish R, Rubin C, Jo H. Low magnitude and high frequency mechanical loading prevents decreased bone formation responses of 2T3 preosteoblasts. J Cell Biochem. 2009 Feb 1;106(2):306-16.