

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
HEMATOLOJİ BİLİM DALI

**KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İZOLASYONU,
İN VİTRO PROLİFERASYONU VE FARKLILAŞMASI**

**ISOLATION, IN VITRO PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF THE
BONE MARROW DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Dr. Mustafa YILMAZ

TRABZON – 2004

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
HEMATOLOJİ BİLİM DALI

**KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İZOLASYONU,
İN VİTRO PROLİFERASYONU VE FARKLILAŞMASI**

**ISOLATION, IN VITRO PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF THE
BONE MARROW DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Dr. Mustafa YILMAZ

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Ercüment OVALI

TRABZON – 2004

İÇİNDEKİLER

1- GİRİŞ ve AMAÇ	1-2
2- GENEL BİLGİLER	3-13
3- MATERYAL ve METOT	14-20
4- BULGULAR	21-30
5- TARTIŞMA	31-35
6- SONUÇLAR ve ÖNERİLER	36
7- TÜRKÇE ÖZET	37
8- İNGİLİZCE ÖZET	38
9- KAYNAKLAR	39-44

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Mezenkimal kök hücreler başlıca kemik iliğinde bulunup; kemik, kas, kıkırdak, tendon, yağ, sinir ve kemik iliği stromal hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olan pluripotent progenitor hücrelerdir. Bu hücreler bir çok dokuda bulunmakla birlikte, nisbeten bol miktarlarda bulunması ve kolay izole edilebilmesi nedeniyle ana kaynağı kemik iliğidir. Kemik iliğinden izole edilen ve kültür ortamına ekilen mezenkimal kök hücreler, hızlı plastik adezyon yeteneği ile yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitelerine sahiptirler. Kültür ortamlarında morfolojik olarak incelendiklerinde fusiform şekilli, fibroblast benzeri görünüm arz ederler. İmmunofenotipik özellikleri itibarıyla CD34, CD45, HLA DR ve CD14 gibi tipik hematopoietik belirteçleri göstermezler, buna karşın CD105 (SH2), CD73 (SH3) gibi non-hematopoietik hücre yüzey belirteçlerini ekspres ederler. Mezenkimal kök hücrelerin bir çok mezenkimal dokuya farklılaşabileceği in vivo ve in vitro çalışmalarda gösterilmiştir.

Mezenkimal kök hücrelerin, başta hematopoietik kök hücre nakilleri, doku mühendisliği ve gen tedavileri olmak üzere bir çok alanda klinik kullanım potansiyeli olması bu hücrelere olan ilgiyi giderek artırmaktadır. Doku mühendisliği ve doku rejenerasyonu alanlarında bu hücrelerin farklılaşma potansiyellerinden yararlanılmaktadır. Mezenkimal kök hücre üretimi, çoğaltımı ve farklılaşmasında kültür medyumuna fetal bovine serum konmaktadır. Fetal bovine serum kullanımı klinik uygulamalarda prion bulaşı ve allerjik reaksiyonlar gibi sorunlarla karşılaşılmasına neden olabilmektedir. Bu tür sorunların üstesinden gelinebilmesi amacıyla fetal bovine serum yerine kültür medyumuna otolog serum ilavesi alternatif bir yaklaşım olabilir.

Bu çalışmada kemik iliği kaynaklı mononükleer hücrelerden mezenkimal kök hücre elde edilmesinde kullanılan metodun optimizasyonu ve otolog serum kullanımının proliferasyon ve farklılaşma üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Otolog serum ve fetal bovine serumun mezenkimal kök hücre proliferasyonu üzerine olan etkileri plastik kaplarda hücrelerin çoğalma hızlarının morfolojik olarak analizi ve MTT testi ile, farklılaşma üzerine olan etkileri ise yağ hücrelerine farklılaşma oranları ile test edilecek ve karşılaştırılacaktır.

Otolog serumun, fetal bovine serum kadar veya daha etkin bir mezenkimal kök hücre proliferasyonu ve farklılaşması sağlayabileceğinin gösterilmesi konu ile ilgili daha kapsamlı çalışmalar için uyarıcı olacak ve klinik pratikte daha güvenilir uygulamalara olanak sağlayabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Mezenkimal Kök Hücreler

Bu hücreler ilk olarak 1976 yılında Fridenstein tarafından tanımlanmışlardır. Fridenstein, fetal buzağı serumu içeren kemik iliği materyalinin ortama yayılması sonucunda, adezyon yeteneği olan, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen, kemik hücreleri ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip hücre kolonilerinin varlığını bildirmiştir (1). Takip eden yıllarda yapılan in vivo çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin her üç germ yaprağından köken alan hücre ve/veya dokulara farklılaşabilen non-hematopoitik pluripotent kök hücreler oldukları anlaşılmıştır (2-6). Günümüze kadar bu hücreleri temsilen bir çok isimlendirme yapılmıştır. Önceleri “Koloni Oluşturma Birim Fibroblast” (Colony Forming Unit Fibroblast; CFU-F) ya da “Kemik İliği Stromal Fibroblast” adlandırmaları kullanılmış; daha sonraları kemik iliği stromal hücreleri, mezenkimal kök hücre ve mezenkimal progenitor öncül hücreler olarak isimlendirilmişlerdir. Son olarak Minnesota Üniversitesi’nden Catherine Verfaillie bu hücrelerin bir alt grubunu “Multipotent Adult Progenitor Hücreler” (MAPC) olarak tanımlamıştır. Catherine Verfaillie mezenkimal kök hücrelerin homojen olmadığını, kemik iliğinden CD45 ve CD119 negatif seleksiyonla izole edilen mezenkimal kök hücrelerin bir alt grup hücreye sahip olduğunu göstererek bu hücrelere MAPC adını vermiştir. Aynı ekip MAPC’in endotel, endoderm ve ektoderm hücrelerine de farklılaşabildiğini; in vitro kültür koşullarında embriyonal kök hücre özellikleri taşıdığını, hatta blastosist içine enjekte edilen multipotent erişkin progenitor hücrelerin bütün organların gelişimine katkıda bulunduğunu rapor etmiştir (7,8). Mezenkimal kök hücreler %10 fetal bovine serumlu besiyerlerinde hızlı plastik adezyon yeteneği, yüksek proliferasyon ve diferensiyasyon kapasitelerine sahiptirler. Mezenkimal kök hücrelerin başta hematopoitik kök hücre nakilleri, doku mühendisliği ve gen tedavileri olmak üzere bir çok alanda klinik kullanım potansiyeli olması bu hücrelere olan ilgiyi giderek artırmaktadır.

2.2.Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları

Mezenkimal kök hücre için ana kaynak kemik iliği olmakla beraber bir çok dokudan izole edilebileceği bilinmektedir. Bu dokuların başlıcaları periost, kas dokusu, fetal kemik iliği, karaciğer, kord kanı, yağ dokusu ve periferik kandır (9). Nakahara ve arkadaşları tavuk tibiasından enzimatik ayrıştırma yöntemi ile izole ettikleri hücreleri kültür ortamına koyduklarında adezyon yeteneği olan fibroblast benzeri hücrelerin varlığını tespit etmişler ve bu hücrelerin uygun in vitro koşullarda osteojenik ve kondrojenik hücelere farklılaştıklarını göstermişlerdir (10). Bir başka araştırmada Campagnoli ilk trimesterde fetal kandan, fetal karaciğerden ve fetal kemik iliğinden mezenkimal kök hücreleri izole etmiş ve uygun besiyeri ortamında adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücelere dönüşebildiklerini kanıtlamıştır (11). Periferik kanda mezenkimal kök hücrelerin bulunup bulunmadığı hakkında kesin bir kanı mevcut değildir. Bazı araştırmacılar periferik kanda bu hücrelerin bulunduğunu ancak son derece düşük oranlarda olduğunu tespit etmiştir (12). Zvaifler, periferik kandan elde edilen mononükleer hücreleri plastik flaklarda DMEM ve %20 fetal bovine serum ile enkübe ederek adere olan hücrelerin; fibroblast benzeri ve stromal morfolojide, immunofenotipik olarak CD34, CD3, CD14 negatif, osteojenetik farklılaşma yeteneği olan mezenkimal kök hücre karakterinde olduklarını göstermiştir (12). Sitokinlerle mobilizasyon sonucu mezenkimal kök hücrelerin periferik kana geçip geçmediği tartışmalıdır. Fernandez ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada büyüme faktörü ile mobilizasyon sonrası elde edilen periferik kan progenitor hücrelerin; kültür ortamında adezyon yeteneği olan, morfolojik ve immunofenotipik olarak mezenkimal kök hücre özellikleri taşıyan hücreler içerdiğini rapor ederken, başka bir çalışmada ise periferik kandan izole edilerek kültüre edilen mononükleer hücrelerin zayıf adezyon yeteneği olan ve immunofenotipik olarak CD45, CD14 pozitif hematopoietik kökenli hücreler oldukları ve mezenkimal kök hücre karakteri taşımadıkları gösterilmiştir (13,14). Periferik kanda olduğu gibi kordon kanında da bu hücrelerin varlığı ile ilişkili farklı çalışma sonuçları mevcuttur. Bazı çalışmalar kordon kanının mezenkimal kök hücre için iyi bir kaynak olduğunu iddia ederken başka çalışmalar kordon kanında yeterli sayıda mezenkimal kök hücre olmadığını ileri sürmektedir (15-17). Erişkinlerde mezenkimal kök hücre için en iyi kaynak kemik iliğidir.

Kemik iliği aspiratında her 1×10^6 mononükleer hücreye karşı ortalama 2-5 mezenkimal kök hücre mevcuttur (18). Bazı yayınlarda da kemik iliği aspiratında 10^4 - 10^5 mononükleer hücreye karşı bir mezenkimal kök hücre olduğu belirtilmektedir (8, 9). Kemik iliği aspiratı nisbeten bol miktarda mezenkimal kök hücre içermesi ve kolay elde edilebilmesi nedeniyle günümüzde başlıca kaynak olarak kullanılmaktadır. Elde edilen hücreler izolasyon ve in vitro çoğaltım esnasında proliferasyon ve farklılaşma yeteneklerini koruyabilmektedir.

2.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Özellikleri ve Çoğalma

Potansiyeli

Mezenkimal kök hücre morfolojileri, ışık veya faz kontrast mikroskopi ile incelendiğinde iğ şeklinde ve fibroblast benzeri hücre toplulukları oldukları gözlenmiştir. Morfolojik özellikleri fibroblastlara benzemekle birlikte en önemli farkları nükleus yerleşiminin fibroblastlarda asimetric olmasına karşın bu hücrelerde simetric olmalarıdır. Fetal bovine serum içeren kültür ortamlarında bu hücreler oldukça değişken çoğalma potansiyellerine sahiptirler ve ortalama ikiye katlanma zamanları 33 saattir (19). Yapılan hücre döngüsü çalışmalarında mezenkimal kök hücrelerin %10' luk bir kısmının çoğalmada etkin bir şekilde yer aldığı, geriye kalan büyük çoğunluğunun ise hücre döngüsünün G_0/G_1 fazında beklediği tespit edilmiştir. G_0/G_1 fazında bekleyen hücrelerin yüksek oranda olması mezenkimal kök hücrelerin yüksek oranda bir farklılaşma potansiyeline sahip olduklarına işaret etmektedir (8). Mezenkimal öncül hücreler alt kültürleme sonrasında geniş fakat son derece değişken bir çoğalm potansiyeli sergilerler. Bazı hücre toplulukları 15' ten fazla ikiye katlanma potansiyeline sahip iken, diğerleri yaklaşık 4 defa ikiye katlanma bölünmesini takiben çoğalmayı kesmektedirler (20,21). Bu durum kemik iliği toplanmasında kullanılan yöntem, toplanan numunelerdeki hücre sayısının azlığı ve vericinin yaşı gibi bazı unsurlardan kaynaklanabilir. Mezenkimal kök hücrelerin telomer boyu kısa olmasına rağmen yüksek telomeraz aktivitesine sahiptirler (22). Bu nedenle in-vitro ortamlardaki yüksek çoğalm kapasitelerine rağmen normal karyotiplerini ve telomeraz etkinliklerini kaybetmezler.

2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmunofenotipik Özellikleri

Mezenkimal kök hücrelerin immunofenotipik özellikleri ile ilgili çalışmalar genellikle primer hücreden ziyade kültürde çoğaltılmış hücrelerde araştırılmıştır. Primer mezenkimal kök hücrelerin immunofenotipik özellikleri hakkında sınırlı sayıda çalışma vardır. Fetal akciğer gibi bazı dokularda bu hücrelerin yoğunluğu önemli oranda yüksektir ve primer hücrenin antijenik yapısını incelemeye olanak sağlar. Kültürde çoğaltılmış hücrelerde CD34 negatif olduğu halde, fetal akciğer dokusundan izole edilen primer hücrelerde CD34 pozitif kök hücre oranının CD34 negatif kök hücre oranından daha fazla olduğu saptanmıştır (23). Ayrıca insan fetal karaciğer hücrelerinden izole edilen kök hücrelerde yapılan akım sitometrik analizlerde CD50 pozitif, CD34 pozitif hücreler hematopoietik; CD50 negatif CD34 pozitif hücreler mezenkimal kök hücreler olarak tanımlanmıştır (24). Bu bulgular aslında primer mezenkimal kök hücrenin CD34 ekspres ettiğini ancak kültür ortamında *in vitro* koşullarda bu özelliğini kaybettiğini düşündürmektedir. Kültürde çoğaltılmış mezenkimal kök hücrelerin antijenik özelliklerine bakıldığında kendilerine has bir belirteç ekspres etmedikleri; endotel, epitel ve kas hücrelere benzer immunofenotipik özellikler taşıdıkları görülmektedir (2,4,25). Kültürde çoğaltılmış mezenkimal kök hücreler CD34, CD14, CD45 gibi hematopoietik markerler ekspres etmezler. Mezenkimal kök hücre için tipik olarak kabul edilen belirteçler SH2 (CD105), SH3 (CD73) ve SH4 (CD73)'dür. Fibroblast yüzey markeri olan STRO-1 mezenkimal kök hücreler tarafından da ekspres edilmektedir (26). Ayrıca mezenkimal kök hücreler CD71 (transferin reseptör) ve CD90 (thy-1) ekspres ederler (Tablo 1). Mezenkimal kök hücreler ve hematopoietik kök hücreler bir çok adezyon molekülünü ortak olarak bulundurlar. Bunların başlıcaları fibronektin, laminin ve kollojene bağlanmadan sorumlu olan integrin ailesi ve L-Selektindir (27) (Tablo 2).

Mezenkimal kök hücrelerin bir çok sitokin, kemokin ve ekstraselüler matriks proteinlerini sentezleme yeteneği vardır. Sekrete ettikleri başlıca sitokinler Interleukin-6 (IL-6), IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), Flt-3 ligand ve stem cell faktör'dür (SCF). Ayrıca kültür ortamlarına IL-1 alfa ilave edildiğinde granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) sekrete etme yeteneği kazanırlar (Tablo 3).

Tablo 1. Mezenkimal kök hücrelerin immunofenotipik özellikleri

Antijen	CD numarası	Ekspresyon
Hematopoitik kök hücre belirteci	CD34	Negatif
Leukocyte common antigen	CD45	Negatif
LPS reseptör	CD14	Negatif
T lenfosit belirteci	CD3	Negatif
B lenfosit belirteci	CD19	Negatif
HLA DR		Negatif
Lewis X	CD15	Negatif
T6	CD1a	Negatif
Endoglin (SH2)	CD105	Pozitif
5' terminal nükleotidaz (SH3)	CD73	Pozitif
SH4	CD73	Pozitif
Thy-1	CD90	Pozitif
Büyüme faktörü ve sitokin reseptörleri		
Interleukin-1 reseptör	CD121	Pozitif
Interleukin-2 reseptör	CD25	Negatif
Interleukin-3 reseptör	CD123	Pozitif
Interleukin-4 reseptör	CD124	Pozitif
Interleukin-6 reseptör	CD126	Pozitif
Interleukin-7 reseptör	CD127	Pozitif
Interferon γ reseptör	CDw119	Pozitif
Tümör nekroz faktör alfa reseptör	CD120	Pozitif
Fibroblast growth faktör reseptör		Pozitif
Platelet kaynaklı growth faktör reseptör	CD140a	Pozitif
Transferrin reseptörü	CD71	Pozitif

Tablo 2. Mezenkimal kök hücrelerin taşıdıkları adezyon molekülleri

Adezyon molekülü	CD numarası	Ekspresyon
ALCAM	CD166	Pozitif
ICAM-1	CD54	Pozitif
ICAM-2	CD102	Pozitif
E-Selektin	CD62E	Negatif
P-Selektin	CD62P	Negatif
L-Selektin	CD62L	Pozitif
VCAM	CD106	Pozitif
Hyaluronate Reseptör	CD44	Pozitif
NCAM	CD56	Pozitif
LFA-3	CD58	Pozitif
LFA-1 α	CD11a	Negatif
LFA-1 β	CD18	Negatif
Cadherin 5	CD144	Negatif
PECAM-1	CD31	Negatif
VLA- α 1	CD49a	Pozitif
VLA- α 2	CD49b	Pozitif
VLA- α 3	CD49c	Pozitif
VLA- α 4	CD49d	Negatif
VLA- β	CD29	Pozitif
Beta 4 integrin	CD104	Pozitif

- ALCAM : Activated leukocyte cell adhesion molecule
 ICAM : Intercellular adhesion molecule
 VCAM : Vascular cell adhesion molecule
 VLA : Very late antigen
 LFA : Lymphocyte function-associated antigen-1
 PECAM : Platelet endothelial cell adhesion molecule
 NCAM : Neural cell adhesion molecule

Tablo 3. Mezenkimal kök hücrelerin salgıladıkları sitokinler ve büyüme faktörleri**1. In vitro indüksiyon olmaksızın salgıladıkları sitokinler ve büyüme faktörleri**

Interleukin-6
 Interleukin-7
 Interleukin-8
 Interleukin-11
 Interleukin-12
 Interleukin-14
 Interleukin-15
 Leukemia inhibitory faktör (LIF)
 Macrophage-colony stimulating faktör
 Flt-3 ligand
 Stem cell faktör

2. IL-1 ile indüklendiğinde salgılanan sitokinler ve büyüme faktörleri

Interleukin-1
 Granulocyte-colony stimulating faktör
 Granulocyte-macrophage colony-stimulating faktör

3. Mezenkimal kök hücrelerin eksprese etmedikleri sitokinler

Interleukin-2
 Interleukin-3
 Interleukin-4
 Interleukin-10
 Interleukin-13

2.5.Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli

Mezenkimal kök hücrelerin bir çok mezenkimal dokuya farklılaşabileceği in vivo ve in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. İlk in vivo diferensiasyon 1983 yılında Sale tarafından tanımlanmıştır. Sale, allojeneik kemik iliği kaynaklı hematopoietik kök hücre nakli yapılan bir köpekte beklenmeyen bir fenomen olarak solunum yetmezliği tablosu geliştiğini tespit etmiş ve yapılan biopsilerde akciğerlerde yaygın ossifikasyon saptamıştır (28). Takip eden yıllarda hayvan modellerinde mezenkimal kök hücrenin kemik dokusu, kas dokusu, kıkırdak dokusu, tendon, sinir hücresi ve hematopoietik stromal mikroçevreye diferensiye olabileceği gösterilmiştir (29-33) (Tablo 4). Mezenkimal kök hücrelerin in vivo transfüzyonu ya da transplantasyonu sonucu yapılan analizlerde uygulandığı lezyonlu dokulardaki (kalp, beyin, karaciğer gibi) olumlu etkilerinin yalnız hücre replasmanı veya farklılaşmasına bağlı olmadığı bunun yanında muhtemelen füzyon etkisinin daha ön planda olduğu ileri sürülmektedir. Çeşitli santral sinir sistemi hastalıklarında beyin dokusuna implante edilen kemik iliği kaynaklı non-neural kök hücrelerin, nöral hücrelere farklılaşmamalarına karşın bazı terapötik moleküller üreterek yararlı etkiler gösterebildiği izlenmiştir. Bu moleküller muhtemelen koruyucu, rejeneratif, anti-apoptotik, anjiyogenik, antiinflamatuvar ve natriüretik özelliklere sahiptirler. Böylece hasarlı dokulardaki rezerv hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarını düzenleyebilir, bu hücrelerin ömrünü uzatabilir, anjiyogenik faktörlerle doku kanlanmasını artırabilir, antiinflamatuvar sitokinlerle skar formasyonunu inhibe edebilir ve natriüretik faktörlerle serebral ödem azaltabilirler. Fare deneylerinde karaciğer fonksiyonları defektif farelere mezenkimal kök hücre infüzyonu yapılması sonrasında karaciğer fonksiyonlarında düzelme olmasına rağmen farelerin ancak üçte birinde hepatositlere farklılaştıkları saptanmıştır. Bu bulgular, mezenkimal kök hücre infüzyonlarının transdiferensiasyondan ziyade füzyon veya rezerv hücreleri koruma/kurtarma etkilerinin ön planda olduğunu telkin etmektedir (34).

Mezenkimal kök hücrelerin in vitro farklılaşma potansiyeli ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur. İlk olarak Caplan ve arkadaşları bu hücrelerin in vitro koşullarda uygun uyarıcılarla osteositlere, myoblastlara, kondrositlere ve hematopoietik stromaya farklılaştığını göstermiştir (35,36). Yağ hücrelerine farklılaşma için deksametazon ve insülin, kondrositlere farklılaşma için Transforming growth faktör beta 3 (TGF- β 3) ve

askorbik asit, kas hücrelerine farklılaşma için 5-Azasitidin, sinir hücrelerine farklılaşma için retinoik asit, pankres beta hücrelerine farklılaşma için retinoik asit, tenositlere farklılaşma için BMP-12, osteoblastlara farklılaşma için deksametazon, beta-gliserofosfat ve askorbik asit kullanılmıştır (Tablo 5).

Tablo 4. Mezenkimal kök hücrelerin in vivo farklılaşma potansiyeli

Hücre türü	Terminal fenotip belirteçleri
Tip 1 alveolar epitel hücresi	T1 alfa ve aquaporin-5 (29)
Astrofitler	Glial fibriler asidik protein (30)
İskelet kası hücreleri	Dystrophin (31)
Kalp kası hücreleri	Kardiyak troponin-I ve TO-Protein-3 (7)
Hepatosit	β -gal ⁺ CK18 ⁺ , CD45 ⁻ ve β -gal ⁺ albumin ⁺ (32)
İnce barsak epitel hücreleri	β -gal ⁺ pan-CK ⁺ CD45 ⁻ (33)

2.6.Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanım Alanları

Mezenkimal kök hücrelerin bir çok alanda klinik kullanım potansiyeli mevcuttur. Kemik dokularının tamiri, osteoporoz, kırık dokusu tamiri, iskemik kalpte kardiyak rejenerasyonun sağlanması, kemik iliği transplantasyonlarında graft versus host hastalığının önlenmesi ve engraftmanın artırılması ve konjenital genetik hastalıklar bu alanların başlıcalarıdır. Allojeneik ve otolog hematopoietik kök hücre nakillerinde bu hücrelerin infüzyonunun nötrofil ve trombosit engraftmanını hızlandırdığı (Nötrofil > 500/ μ l 8 gün, Trombosit >20.000/ μ l 8,5 gün) gösterilmiştir (18). Bu veriler başka çalışmalarla da desteklenmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin bu etkilerinin; hematopoietik kök hücrenin homing, proliferasyon ve differensiasyonunu hızlandıran bazı sitokinleri sentez ve sekrete etmesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu sitokinlerin başlıcaları GM-CSF, G-CSF, SCF ve IL-6'dır. Allojeneik hematopoietik kök hücre nakillerinde mezenkimal kök hücre infüzyonu, yalnız engraftmanı hızlandırmakla kalmayıp aynı zamanda akut ve kronik graft versus host hastalığı insidansını da azaltmaktadır.

Tablo 5. Mezenkimal kök hücrelerin invitro farklılaşma potansiyeli

Hücre türü	Farklılaşmayı sağlayan ajanlar
Adiposit	Deksametazon + İzobutilmetilksantin (37) Deksametazon 1×10^{-7} M + İnsülin 1×10^{-9} M 3 hafta (38)
Kondrosit	TGF-B3 + Askorbik asit (39) TGF-B1 1 ng/ml + askorbik asit 2×10^{-4} M 1 hafta (38)
Osteoblast	Deksametazon 100nM+ B-Gliserofosfat 10nM + Askorbik asit 0.05mM (40)
Tenosit	BMP-12 (41)
Hematopoitik Stroma	Hidrokortizon 1 mM + at serumu %12.5 (42)
İskelet kas hücresi	5-Azasitidin 3mM 3-4gün (43)
Myoblast	Amfoterisin B 1.5mikro/ml (20)
Astrosit	Fibronektin + bFGF 100 ng/ml^{-1} 7 gün (31)
Sinir hücresi	Retinoik asit (9)
Glia Hücreler	Retinoik asit (9)
Pankreas Beta Hücreleri	Retinoik asit (9)
Endotel Hücreleri	VEGF 10ng/ml + Fibronektin $+10^{-8}$ M deksametazon + 10^{-4} M askorbik asid 2-fosfat 14 gün (44)
Epiteloid Hücreler + Hepatosit	FGF4 5-50 ng/ml + HGF 5-50 ng/ml (45)

TGF-B3 : Transforming growth factor Beta3
TGF-B1 : Transforming growth factor Beta1
BMP-12 : Bone morphogenetic protein-12
bFGF : Basic Fibroblast Growth Factor
VEGF : Vascular endothelial growth factor
HGF : Hepatocyte Growth Factor

Bu etkilerinin muhtemelen düşük MHC klas II ekspresyonuna bağlı zayıf antijenik cevap oluşturma yeteneğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Mikst lenfosit reaksiyonunda ortama vericinin mezenkimal kök hücrelerinin ilave edilmesi ile birlikte alloreaktif T-lenfosit cevabın baskılandığı, allojeneik hematopoietik kök hücre nakillerinde eş zamanlı olarak $1-5 \times 10^6$ /kg miktarında infüze edilen mezenkimal kök hücrelerin pozitif etkilerinin olduğu ve veto hücrelerine benzer özellik gösterdiği saptanmıştır (46). İnsan kaynaklı mezenkimal kök hücreler çok sayıda lizozomal enzim eksprese edebildiklerinden dolayı bir çok enzim eksikliği ile seyreden depo hastalığında potansiyel kullanım alanı mevcuttur. İn vitro ortamda ekspanse edilen mezenkimal kök hücreler mükemmel bir taşıyıcı olarak gen tedavilerinde umut vaat etmektedir. Hayvan deneylerinde köpek ve fare kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin insan kaynaklı büyüme hormonu ve IL-3 gibi genlerle transdüse edilmesinden sonra tekrar hayvanlara infüze edilmesi ile birlikte birkaç ay içinde bu hormon ve sitokinlerin plazmada eksprese edilmeye başlandığı izlenmiştir. İskemik kalp hastalıkları, kardiyomyopatiler, Parkinson hastalığı, stroke, amyotrofik lateral skleroz (ALS), Alzheimer, son dönem karaciğer yetersizlikleri ve diabet mellitus mezenkimal kök hücrelerin tedavi etkinliğinin araştırıldığı hastalıklardır (47-55). Bu alanda en geniş çalışmalar, myokard rejenerasyonu ile ilgilidir ve yayınlanmış 18 klinik çalışma kök hücrelerin hasarlı myokard fonksiyonlarının düzeltilmesinde önemli rol oynayabileceğini göstermektedir (47-50). İnsanlarda diğer önemli bir araştırma alanı nöron rejenerasyonu olup ALS'li hastalarda otolog mezenkimal kök hücre infüzyonunun güvenilir ve iyi tolere edilebilen bir işlem olduğu bildirilirken, Metakromik lökodistrofi ve Hurler sendromlu hastalarda mezenkimal kök hücre infüzyonunun hastaların sinir ileti hızında artışlara, mental ve fiziksel durumlarında anlamlı düzelmelere yol açtığı bildirilmiştir (51, 52).

Mezenkimal kök hücre ile ilgili araştırmalar hematopoietik kök hücre nakillerinde engraftmanın hızlandırılması ve artırılması, graft versus host hastalığının önlenmesi ve/veya iyileştirilmesi, metabolik hastalıkların gen tedavileri ile iyileştirilmesi ve başta myokard rejenerasyonu olmak üzere doku rejenerasyonu konularında yoğunlaşmıştır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Gerekli Malzemeler:

Demirbaş malzemeler:

Akımsitometri (Epics XL Beckman Coulter), soğutmalı santrifüj (Rotina 35 R), klas II hücre kültür kabini (Holten Laminair), invert mikroskop (Olympus), CO₂ inkübatörü (Binder), pipet (Rainin), ELISA okuyucu (Anthos reader 2001).

Sarf malzemeleri:

Hücre kültür kabı (Cellstar greiner bio-one), pipet ucu, T 25 plastik flask, 24 kuyucuklu hücre kültür kabı (Orange scientific), 96 kuyucuklu hücre kültür kabı (Orange scientific), ficollü tüp (Vacutainer CPT), fetal bovine serum (Heat inaktif Gibco), MTT solusyonu (Sigma kat. no:m.5655), RPMI 1640 medium (Stem cell kat. no:36750), CD45-FITC (Beckman Coulter), CD34-PE (Beckman Coulter), CD14-PE (Beckman Coulter), CD11C-FITC (Beckman Coulter), HLA-DR-FITC (Beckman Coulter), CD49-FITC (Beckman Coulter), CD29-FITC (Beckman Coulter), CD166-PE (Beckman Coulter), CD3-PE (Beckman Coulter), CD19-FITC (Beckman Coulter), CD44-PE (Beckman Coulter), CD105-FITC (Beckman Coulter).

3.2 Metot:

Bu çalışmada, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu, proliferasyonu ve yağ hücrelerine farklılaşması ve bu aşamalarda otolog serum ile fetal bovine serumun etkilerinin karşılaştırılması amaçlandı. Üç sağlıklı gönüllü allojeneik kemik iliği transplantasyonu donör adayından lokal etik kurul onayı ve yazılı onay belgesi alındıktan sonra rutin olarak yapılan kemik iliği muayenesi esnasında 20'şer cc heparinize kemik iliği aspiratı alınarak aşağıda tarif edildiği şekilde mononükleer hücreler izole edildi. Donörlerin üçü de erkek ve yaşları 27, 38, 24 idi. İşlemler sırasında vericilerde herhangi bir komplikasyon ortaya çıkmadı.

3.2.1 Kemik iliği kaynaklı mononükleer hücre izolasyonu:

Gönüllü donörlerden posterior iliak kemikten aspirasyonla alınan ve heparinize edilen (50 ü/ml heparin) kemik iliği ürünü steril serum fizyolojik ile 1:2 oranında dilüe edildi. Dilüe edilen kemik iliği aspiratı 15 ml'lik konik tüplerde 1:3'ü kadar Ficoll üzerine yayıldı. Ficoll ve kemik iliğini içeren tüpler oda ısısında 400G' de 30 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası en üstte plazma, ortada mononükleer hücreler, altta ficoll ve en altta eritrosit ve granülositler kümeleşti. Diğer kısımlar atılarak mononükleer hücreler toplandı. Toplanan hücreler 5 katı volümde serum free kültür medyumu ile en az iki kez santrifüj edilerek, kültüre edilen hücreler için toksik olabileceğinden dolayı ficollün uzaklaştırılması sağlandı. Bu işlemlerden sonra hazırlanan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreden zengin mononükleer hücre süspansiyonu çalışma için hazır hale getirildi. Otolog serum için kemik iliği alınan donörlerden 50'şer cc periferik kan alınarak santrifüj edildikten sonra serumu ayırdı ve 2 cc'lik plastik tüplerde -20 °C'de donduruldu. Dondurulan otolog serum gerektiği zaman 37 °C'de inkübatörde çözülerek kullanıldı. Aşağıda belirtilen çalışma planına uygun olarak her bir aşama üç farklı kemik iliği aspiratı ile üçer kez tekrarlandı.

3.2.2. Mezenkimal kök hücre çoğaltımında kültür şartları:

Primer kültür: İzole edilen kemik iliği kaynaklı mononükleer hücrelerden iki ayrı plastik 25 cm² flaska 1x10⁷'şer hücre konarak primer kültür işlemlerine başlandı. Birinci flaska kültür medyumu olarak RPMI-1640 + %10 otolog serum, ikinci flaska ise RPMI-1640 + %10 fetal bovine serum ilave edildi. Böylece mezenkimal kök hücrelerin (MKH) proliferasyonu üzerine otolog serum ve fetal bovine serumun etkilerinin karşılaştırılması amaçlandı. Kültürün üçüncü gününden itibaren flaskta adere olan hücrelerin beslenmesine haftada ikişer kez olmak üzere devam edildi. Hücreler kültür kabının tabanının tamamını kapladıktan sonra primer kültür tamamlanarak proliferasyon oranları değerlendirildi. Tripsinizasyondan sonra elde edilen hücrelerin immünofenotipik analizleri yapıldı ve birinci pasaj kültür işlemlerine geçildi.

Birinci pasaj kültür: Primer kültür işleminden sonra tripsinizasyonla hücrelerin plastik flasklardan ayrıştırılmasından sonra birinci pasaj kültür işlemlerine başlandı. Birinci pasaj kültür için aynı boyutta iki plastik flaska otolog serum ve fetal bovine serumla beslenmek üzere 1×10^6 mezenkimal kök hücre kondu ve hücreler yine haftada ikişer kez beslenerek flask tabanını kaplayıncaya kadar çoğalmaları beklendi. Hücreler flask tabanının tamamını kapladıktan sonra birinci pasaj sonlandırıldı.

3.2.3. Tripsinizasyon metodu:

Tripsinizasyon işlemi aşağıda maddeler halinde sıralandığı üzere gerçekleştirildi.

1. Plastik kaplardaki (flask) adere olmayan hücreler ve besiyeri atılarak adere olan hücre tabakası Phosphate Buffered Saline (PBS) ile iki kez yıkandı.

2. Her 25 cm^2 flask alanı için 5 ml %0.25 konsantrasyonda tripsin ilave edilerek 37 C° de 10 dakika inkübe edildi.

3. On dakikalık süre sonunda adere olan hücrelerin çoğu ayrılır, fakat hala kalabilecek adere hücre olasılığına karşı flasklar pipetle nazikçe karıştırıldı. Daha sonra tripsini inaktive etmek için ortama fetal bovine serum/otolog serum ilave edildi.

4. Elde edilen mezenkimal kök hücre süspansiyonu 800 g° de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek ve kültür medyumunu ile iki kez yıkanarak analizler ve/veya bir sonraki pasaj kültür işlemi için hazır hale getirildi.

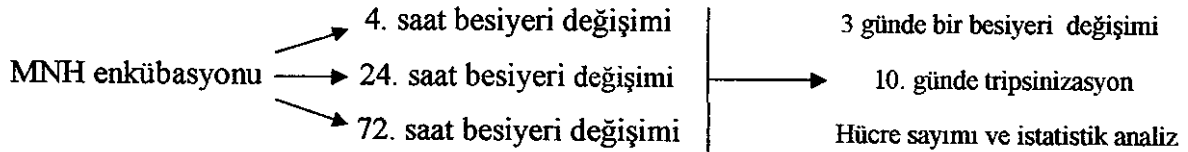
3.2.4. Deney planı

Çalışma 4 basamaklı bir süreç sonucu gerçekleştirilmiştir. Bunlar:

1. Başlangıç adezyon sürelerinin mezenkimal kök hücre çoğaltımına etkisi:

Mezenkimal kök hücre çoğaltımında başlangıç aşamasından itibaren birinci besiyeri değişimine kadar geçen sürenin optimizasyonu için 4, 24 ve 72 saatlik enkübasyon sürelerinin yeterliliği araştırıldı. Fetal bovine serum ve otolog serum gruplarında, izole edilen kemik iliği kaynaklı mononükleer hücreler üçer guruba bölünerek 4, 24 ve 72 saatlik enkübasyon süreleri uygulandı. Primer kültür sonunda tripsinizasyon

sonrası elde edilen hücreler otoanalizör ile sayılarak başlangıç besiyeri değişim sürelerinin mezenkimal kök hücre çoğaltımına etkileri analiz edildi (Şema 1).



Şema 1. Çalışmanın birinci aşamasında MKH çoğaltımında başlangıç besiyeri değişim sürelerinin etkilerinin analiz planı

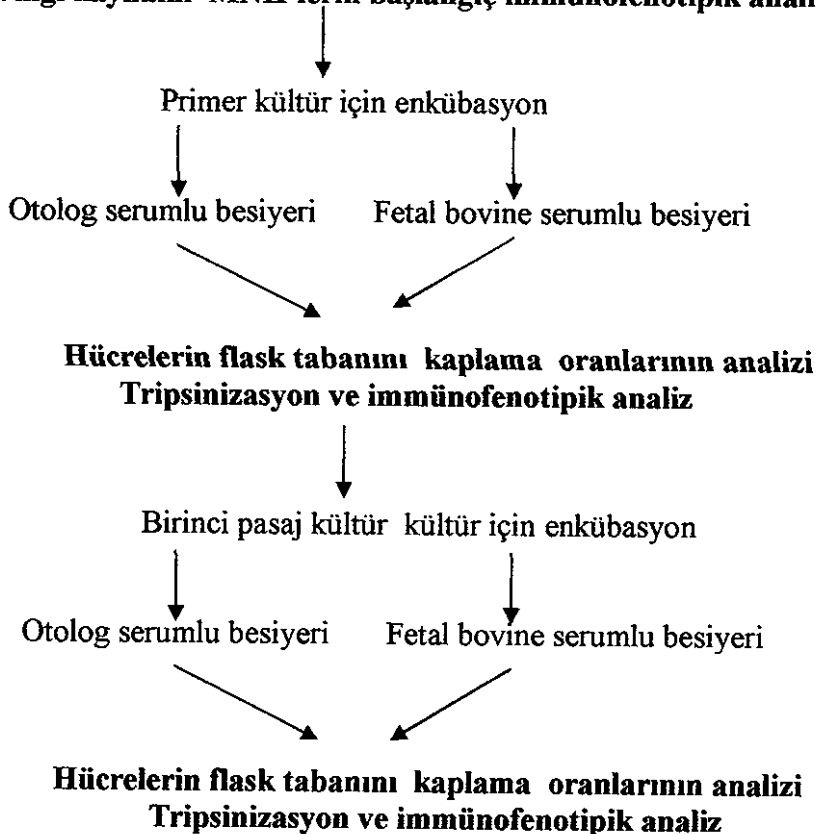
2.Mezenkimal kök hücre proliferasyonu ve immünofenotipik özelliklerinin analizi:

Çalışmanın ikinci aşamasında mezenkimal kök hücre proliferasyonuna otolog ve fetal bovine serumun etkileri morfolojik olarak değerlendirildi. Ayrıca kültür pasajları esnasında çoğaltılan mezenkimal kök hücrelerde ortaya çıkan antijenik değişimler akım sitometri ile analiz edildi.

Mezenkimal kök hücre proliferasyonuna otolog ve fetal bovine serumun etkilerinin invert mikroskopta morfolojik analiz: Otolog serum ve fetal bovine serum ile beslenen hücre gruplarında primer kültür ve birinci pasaj kültür sonunda flask tabanını kaplayan hücre oranları birbirinden bağımsız üç kişi tarafından invert mikroskopla belirlenerek (% olarak) ortalamaları alındı ve değerler karşılaştırıldı (Şema 2).

Mezenkimal kök hücre çoğaltımı esnasında ortaya çıkan antijenik değişimlerin analizi: Kültüre edilmeden önce, primer kültür ve birinci pasaj sonrası hücrelerin immünofenotipik özelliklerinin tanımı için CD45, CD34, CD14, CD11c, HLADR, CD49, CD29, CD3, CD19, CD44, CD105 (SH2), CD166 antijen ekspresyonları akım sitometri ile analiz edildi. Böylece invitro ortamda kültür sürecinde mezenkimal kök hücrelerde gelişen antijenik değişim incelendi ve bu değişim üzerine otolog serumun ve fetal bovine serumun etkileri karşılaştırıldı.

Kemik iliği kaynaklı MNH'lerin başlangıç immünofenotipik analizi

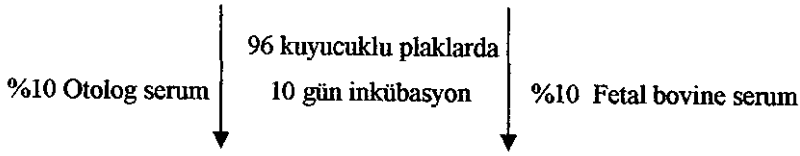


Şema 2. MKH proliferasyonu ve immunofenotipik özellikleri üzerine otolog serum ve fetal bovine serumun etkilerinin karşılaştırılması için çizilen çalışma planı

3. Mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonu üzerine otolog serum ve fetal bovine serumun etkilerinin MTT testi ile karşılaştırılması.

Bu aşamada otolog serum ve fetal bovine serumun mezenkimal kök hücre proliferasyonuna etkilerinin karşılaştırılması için MTT testi yapıldı. Bu amaçla primer kültürden sonra tripsinizasyonla elde edilen mezenkimal kök hücreler 96 kuyucuklu plastik plaklara her bir kuyucukta 1×10^4 hücre olacak şekilde ekildi. On kuyucuklu iki grup oluşturularak bir grup RPMI+%10 fetal bovine serum, diğer grup RPMI+%10 otolog serum ile 10 gün süreyle enkübe edildi. İnkübasyon sonucu hücre yoğunlukları MTT testi ile analiz edilerek veriler karşılaştırıldı (Şema 3).

Primer pasajdan elde edilen mezenkimal kök hücreler



MTT testi ile hücre sayılarının analizi

Şema 3. Otolog serum ve fetal bovine serum gruplarında proliferasyon olan hücre miktarlarının karşılaştırılması (MTT testi).

MTT testinin gerçekleştirilmesi:

MTT testinin nasıl gerçekleştirildiği aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır:

1. Her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre düşecek şekilde mikropipet aracılığı ile hücreler dağıtıldı.
2. Hücrelerin üzerine fetal bovine serum ve otolog serumlu kültür medyumu toplam volüm 300 mikrolitre olacak şekilde ilave edildi.
3. Plaklar 37°C ' de $\%5 \text{CO}_2$ ' li ortamda 10 gün süreyle inkübe edilerek mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonu sağlandı.
4. İnkübasyon periyodu sonunda kuyucuklara 10'ar mikrolitre daha önceden hazırlanmış olan MTT solüsyonundan eklendi ve 37°C ' de $\%5 \text{CO}_2$ ' li 4 saat daha inkübasyona devam edilerek formazan kristallerinin oluşumu sağlandı.
5. Formazan kristalleri oluşuktan sonra kuyucuklara $200 \mu\text{l}$ DMSO4, etanol (1:1) karışımı ilave edilerek kültür kabı karıştırıcı üzerine yerleştirildi.
6. Plak karıştırıcıda 10-20 dakika ajite edilerek kristallerin tümünün çözünüp çözünmediği kontrol edildikten sonra optik okuyucuya yerleştirilerek okutuldu.
7. Test edilen hücrelerin (Otolog serum ve fetal bovine serum gruplarında) proliferasyonu optik dansiteleri temel alınarak karşılaştırıldı.

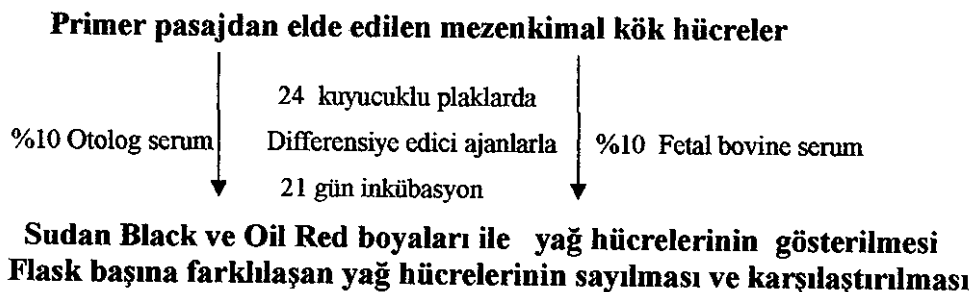
4. Mezenkimal kök hücrelerin yağ hücrelerine farklılaşması

Birinci pasaj kültür işleminden sonra elde edilen yüksek oranda saflaştırılmış mezenkimal kök hücrelerin diferensiyasyon amaçlı inkübasyonu planlandı. Farklılaşma aşamalarında 24 kuyucuklu plastik plaklar kullanıldı. Her bir kuyucuğa 5×10^4 mezenkimal kök hücre konularak hücrelerin plak tabanını kaplayıncaya kadar proliferasyon bekledikten sonra yağ hücrelerine diferansiyasyon edildi.

Yağ hücrelerine diferensiasyon için aşağıdaki prosedürler uygulandı:

1-Mezenkimal kök hücrelerin yağ hücrelerine farklılaşması: Bu amaçla deksametazon ve insülin kombinasyonu kullanıldı (8,9,38). Otolog ve fetal bovine serumlu besiyerlerine 1×10^{-9} M konsantrasyonda deksametazon ve 5 μ g/ml insülin ilave edilerek 3 hafta süreyle inkübe edildi. Üç haftalık süre içerisinde haftada iki kez besiyeri değişimi ile birlikte diferensiyeye edici ajanlar ortama yeniden ilave edildi. Üç haftalık süre sonunda yağ hücrelerine diferansiyasyon sudan black ve oil red boyaları kullanılarak yağ hücrelerinin boyanması ile gösterildi (Şema 4).

2-Diferensiasyon analizi: Her bir plakta farklılaşan hücre oranları birbirinden bağımsız üç kişi tarafından sayılarak ortalamaları alındı. Besiyerine otolog serum ve fetal bovine serum konulan gruplarda sonuçlar karşılaştırılarak yağ hücrelerine farklılaşma üzerine olan etkileri değerlendirildi.



Şema 4. Yağ hücrelerine farklılaşma metodu

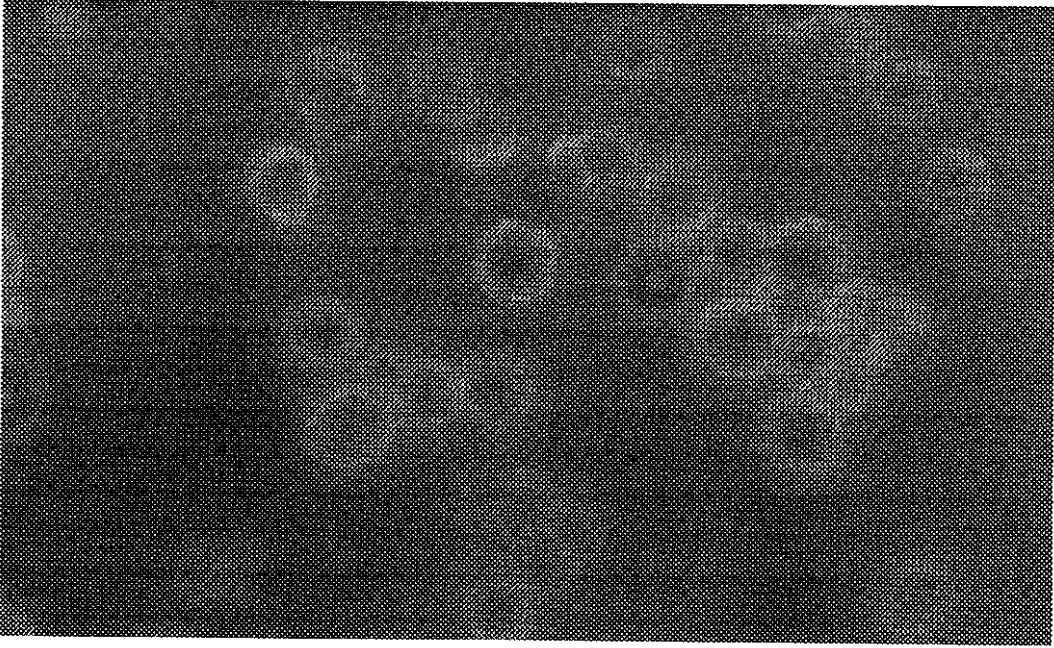
3.3 İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler, ortalama±standart sapma olarak sunuldu. Gruplar arası karşılaştırmalar için Mann Whitney-U testi kullanıldı ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

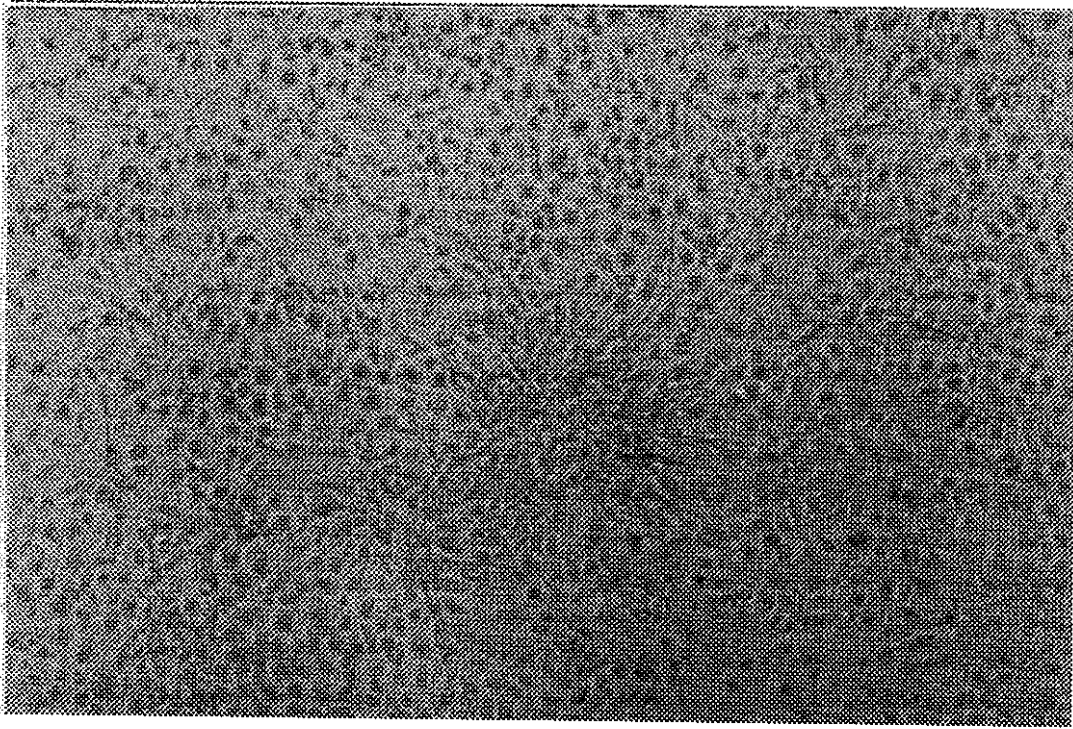
4. BULGULAR

Kemik iliğinden, mezenkimal kök hücre üretimi için izole edilen ve plastik flaslara konan mononükleer hücreler %10 fetal bovine serum ve %10 otolog serum içeren RPMI 1640 kültür medyumuna ilave edilerek fotoğraflandı ve primer kültür işlemine başlandı (Resim 1). İlk aşamada başlangıç adezyon sürelerinin mezenkimal kök hücre çoğaltımına etkilerine bakıldığında, otolog serum grubunda primer kültür sonrası 4, 24 ve 72 saatlik adezyon sürelerini takiben elde edilen hücre sayıları sırasıyla 766 ± 57 , 1133 ± 57 ve 1700 ± 100 olarak tesbit edildi. Yetmişiki saatlik adezyon süresi uygulanan hücrelerden çoğaltılan mezenkimal kök hücre sayısının, 4 ve 24 saate göre anlamlı oranda yüksek olduğu saptandı ($p < 0.05$). Fetal bovine serum grubunda da bulgular benzerdi. Dört, 24 ve 72 saatlik başlangıç inkübasyon sürelerini takiben primer kültür sonunda elde edilen mezenkimal kök hücre sayıları 233 ± 57 , 400 ± 100 , 733 ± 115 olarak sayıldı. Yetmişiki saatlik grupta mezenkimal kök hücre sayıları diğer gruplara oranla anlamlı oranda yüksek bulundu ($p < 0.05$) (Grafik 1). Bulgular, mezenkimal kök hücre çoğaltımında başlangıç inkübasyonu için optimal sürenin 72 saat olduğunu göstermektedir.

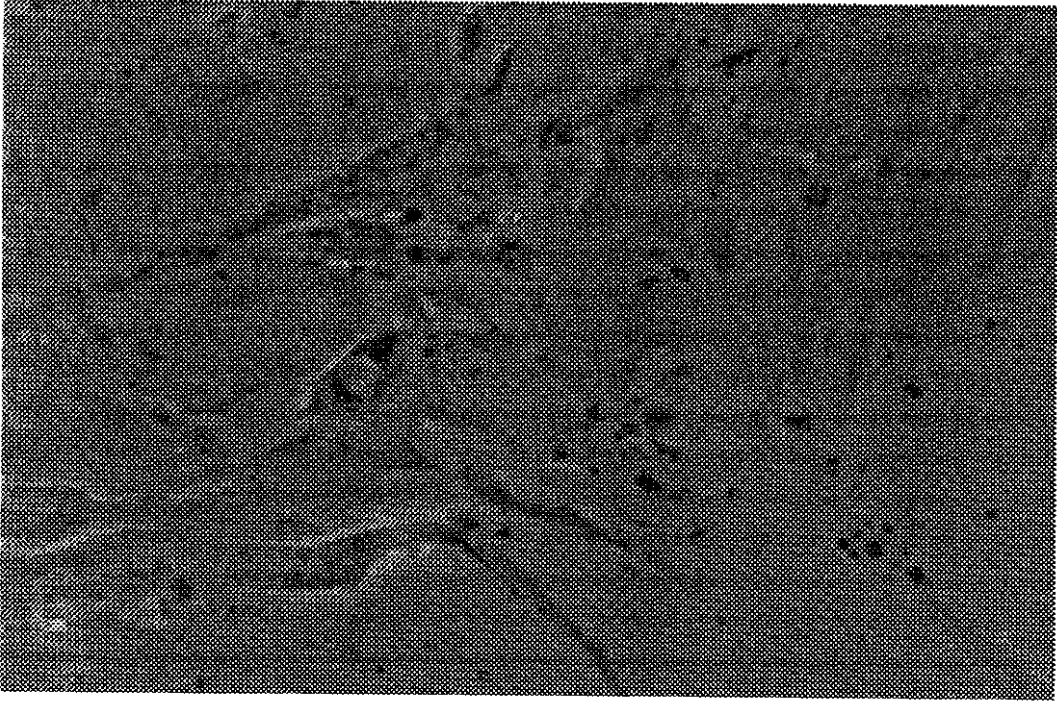
Kültür sürecinin 4. gününde hem otolog serum hem de fetal bovine serum kullanılan hücre gruplarında plastik flaslara adere olan fibroblast benzeri hücrelerin varlığı gözlemlendi. Yedinci günde flaslarda adere olan fibroblast benzeri hücrelerin koloni oluşturduğu saptandı (Resim 2). Onuncu günde otolog serum içeren medyumla inkübe edilen hücreler flask tabanının tamamını kapladığı halde (Resim 3), fetal bovine serum ile inkübe edilen hücrelerin flask tabanının %50'sini kaplayacak miktarda proliferasyon olduğu gözlemlendi. Hücreler tripsinize edilerek birinci pasaj kültür işlemlerine başlandı. On gün süreyle devam eden birinci pasaj kültür işlemleri sonucunda elde edilen bulgular primer kültür sonuçlarına benzerdi. Birinci pasaj sonunda otolog serumla inkübe edilen hücreler flask tabanının tamamını kapladığı halde (Resim 4), fetal bovine serum ile inkübe edilen hücrelerin flask tabanının yarıya yakınını kaplayacak kadar proliferasyon olduğu saptandı (Grafik 2). Bulgular, kemik iliği kaynaklı mononükleer hücrelerden, mezenkimal kök hücre üretimi için otolog serumun fetal bovine serumdan daha etkili bir proliferasyon sağladığını göstermektedir.



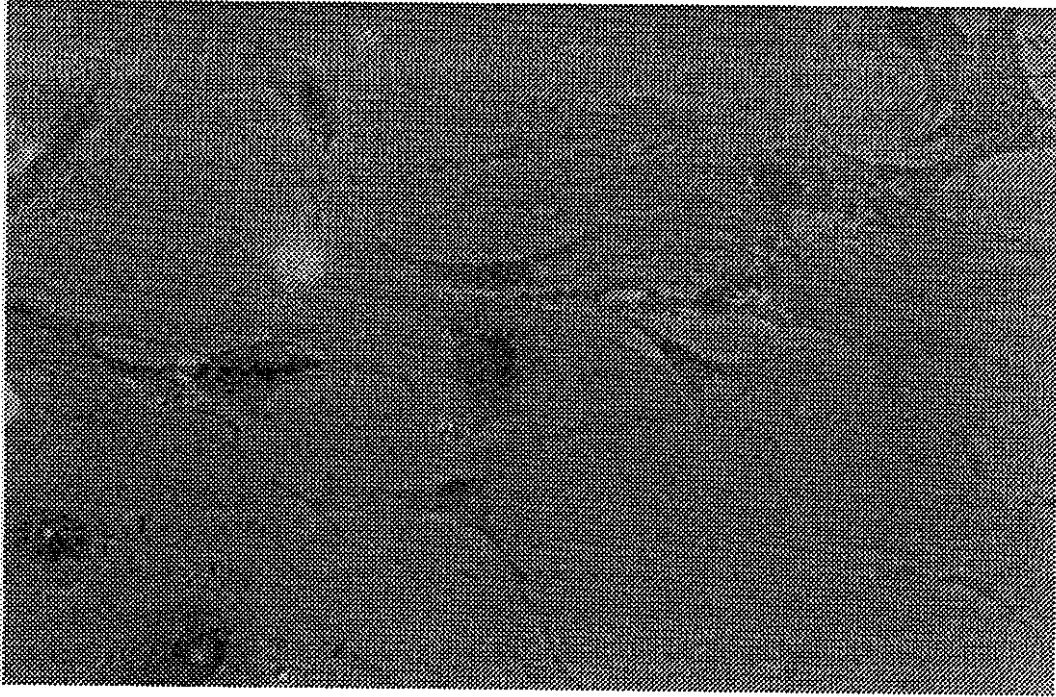
Resim1. Mezenkimal kök hücre üretiminde kemik iliği kaynaklı mononükleer hücrelerin kültür ortamında mikroskopik görünümü (1.gün) (X 40)



Resim 2. Primer kültürün 7. gününde fibroblast benzeri hücrelerin oluşturmuş olduğu koloniler (X20)



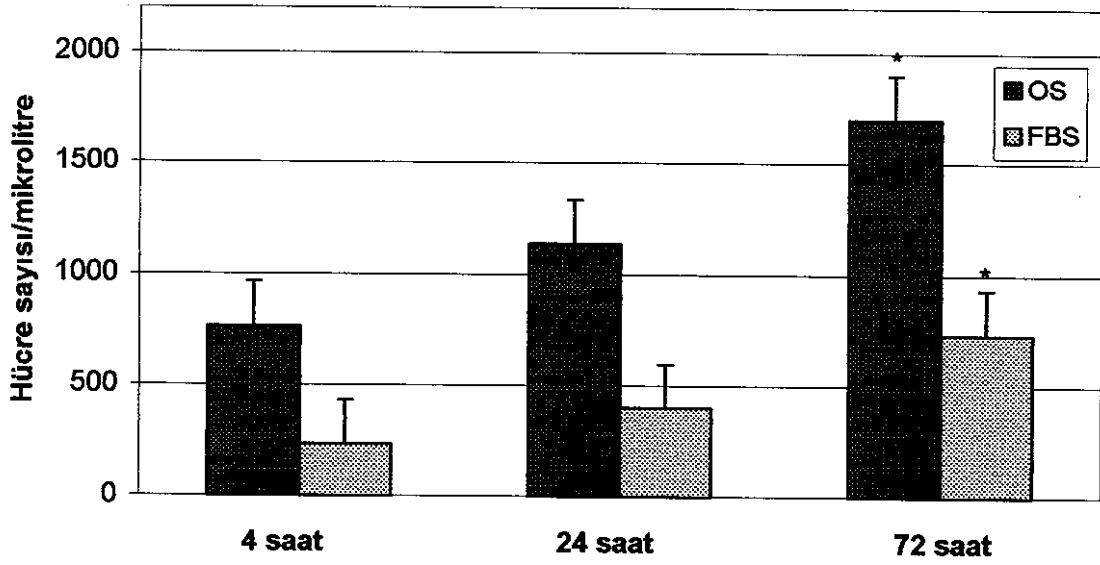
Resim 3. Primer kültürün 10. gününde plastik flask tabanına adere olan fibroblast benzeri hücreler (X40)



Resim 4. Birinci pasaj kültürün 10. gününde Trichrom mason boyası ile boyanan mezenkimal kök hücre topluluğu (X40)

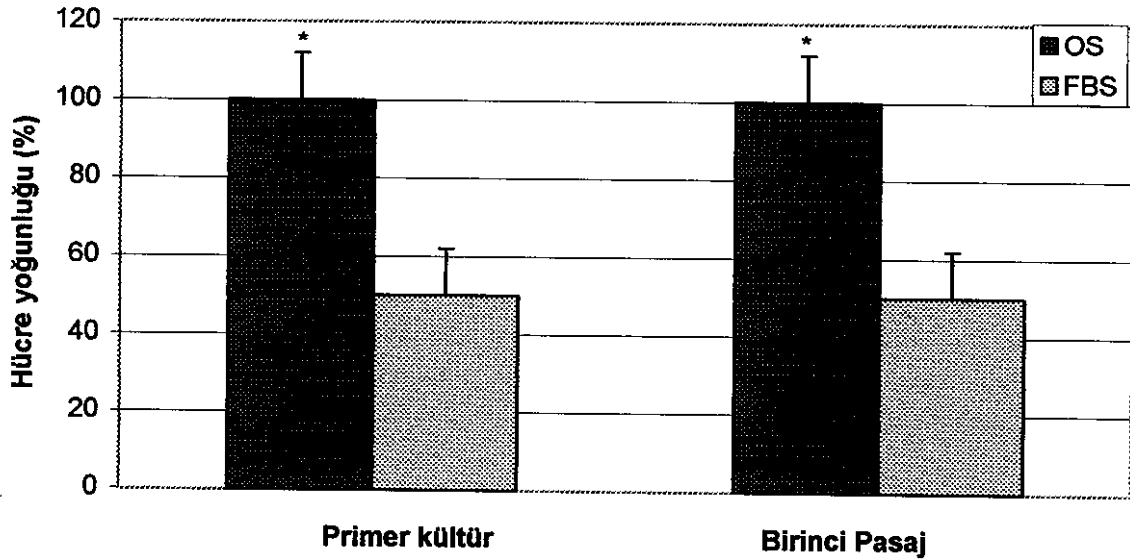
Hücrelerin immünofenotipik özelliklerine bakıldığında kemik iliğinden izole edilen mononükleer hücrelerin yüksek oranda CD45, CD3 ve daha düşük oranlarda CD19, HLA-DR, CD34 gibi hematopoietik yüzey belirteçleri eksprese ettikleri görülmektedir. Mezenkimal kök hücre belirleyicilerinden biri olan CD105 ekspresyonunun ise % 28 gibi düşük bir oranda olduğu saptanmıştır. Kültür işleminin ilerleyen süreçlerinde otolog ve fetal bovine serum gruplarında hematopoietik hücre göstergelerinin giderek negatifleştiği, mezenkimal kök hücre göstergelerinin ise pozitifleştiği dikkati çekmektedir. Başlangıç değerleri ile kıyaslandığında CD45, CD3, CD19, HLA DR gibi lökosit yüzey antijen ekspresyonlarının primer kültür ve birinci pasaj işlemleri sonunda pasaj sayısı ile orantılı olarak azaldığı; CD29, CD166 ve CD105 gibi mezenkimal kök hücre yüzey antijenlerinin ise pozitiflik oranının arttığı saptandı (Tablo 6). Diğer dikkat çekici bir bulgu ise, besiyerine fetal bovine serum ilave edilen gruplarda otolog serum ilave edilen gruplara göre CD45, CD14 ve HLA DR ekspresyonlarının hem primer kültür hem de birinci pasaj sonunda daha yüksek oranlarda olması idi. Ancak iki grup arasındaki farklılıkların sadece birinci pasaj sonunda istatistiksel olarak anlamlı olacak boyutta belirginleştiği saptandı (Tablo 6). Ayrıca fetal bovine serum ile inkübe edilen hücrelerde CD105, CD166 ve CD29 gibi mezenkimal kök hücre belirteç ekspresyonları daha düşük oranlarda pozitif bulundu. Ancak gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Otolog serum ve fetal bovine serumun mezenkimal kök hücre proliferasyonu üzerine olan etkilerini karşılaştırmak amacıyla MTT testi yapıldı. Otolog serum grubunda hücrelerin optik dansitesi 257 ± 29.7 iken, fetal bovine serum grubunda 140 ± 19.7 olarak tesbit edildi (Tablo 7). Gruplar arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$). Bulgular morfolojik değerlendirmede olduğu gibi MTT testinde de otolog serumun fetal bovine seruma göre daha iyi bir mezenkimal kök hücre proliferasyonu sağladığını göstermektedir.



* $p < 0.05$: 72 saat - 4 ve 24 saat

Grafik 1. Otolog serum (OS) ve fetal bovine serum (FBS) gruplarında başlangıç adezyon sürelerinin primer kültür sonrası elde edilen mezenkimal kök hücre sayısına etkileri



* $p < 0.001$: Otolog serum - Fetal bovine serum

Grafik 2. Otolog serum (OS) ve fetal bovine serumlu (FBS) kültür medyumları ile beslenen mezenkimal kök hücrelerin plastik flakslardaki proliferasyon oranları

Tablo 6. Kültür başlangıcı, primer kültür ve birinci pasaj sonunda çoğaltılan mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik özellikleri

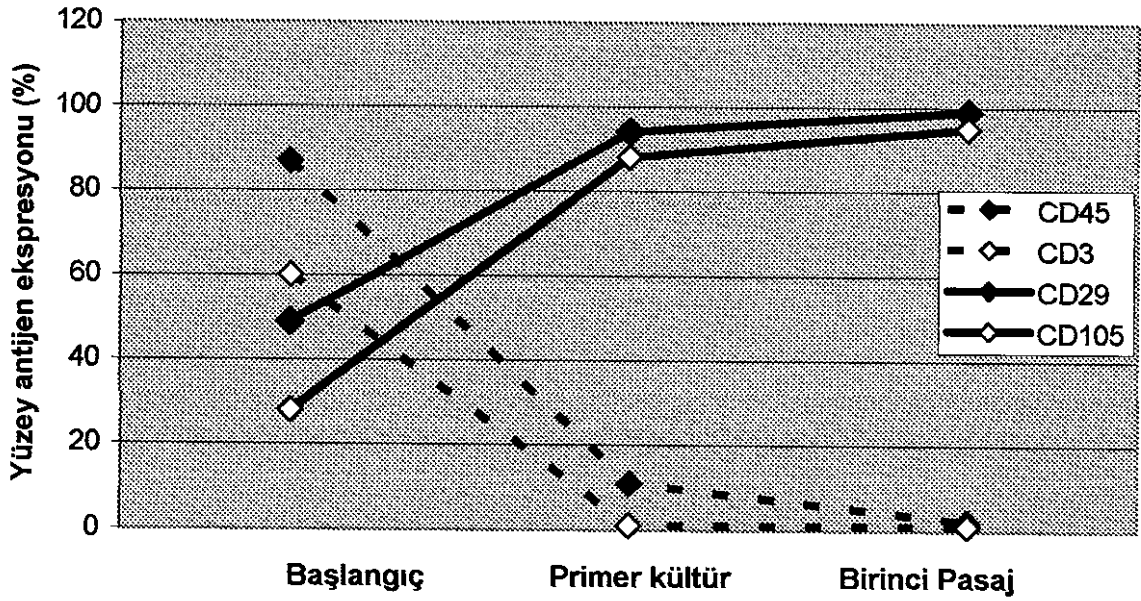
Yüzey belirteci	0. gün	OS Pr. Kültür	FBS Pr. Kültür	OS 1. Pasaj	FBS 1. Pasaj
CD45	87.3±9.5	11.9±4.2 *	19.2±5.2 *	1.7±1.6* ^a	9.1±3.5*
HLA-DR	40.1±12.8	28.5±13.2	47.3±14	1.7±2.2* ^b	10.9±7.6 *
CD3	60.4±3.8	0.6±0.2 *	1.3±0.8 *	0.3±0.2 *	0.8±0.4*
CD19	15.6±3.1	2.4±1.2*	1.8±1.2 *	1.0±0.9*	1.4±0.2*
CD11	32±3.6	41.3±13	45.8±8.1	8.7±2.1*	15.2±1.2*
CD34	21.3±2	11.7±6.5*	15.2±3.4 *	5.2±3.8 *	9.2±6.8*
CD49	60.1±21.9	17.8±3.6 *	17.7±4.5*	15.5±11.4*	19.4±1.9*
CD14	1.3±0.8	14.1±1.8*	18.6±5.6*	1.4±0.8 * ^c	5.2±3.6*
CD29	49.3±10.2	94.1±5.2 *	84.6±4.7*	99.3±0.4*	92.3±4.5*
CD166	57.9±26.4	81.7±9.6	82.2±1.2	98.0±1.3 *	90.9±5.4*
CD44	86.9±13.1	98±1.5	97.3±2.9	99.5±0.3	93.9±0.3
CD105	28.3±11.5	88.5±9.8*	84.6±6.4*	95.6±4.0*	89.4±4.5*

* : p<0.05: Otolog serum (OS) ve fetal bovine serum (FBS)- Başlangıç değerleri (0.gün)

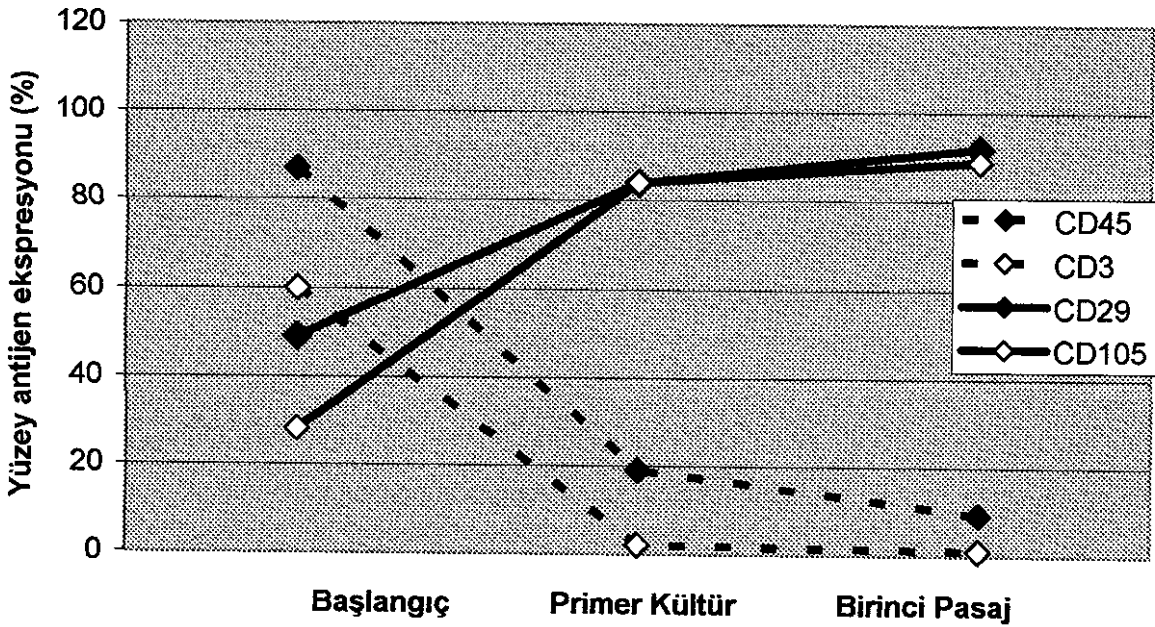
a,b,c : p<0.05: OS birinci pasaj – FBS birinci pasaj

Tablo 7. Otolog serum ve fetal bovine serum ile inkübe edilen hücre gruplarında proliferen hücre miktarları (MTT testi).

	Otolog Serum	Fetal Bovine Serum	p
Optik Dansite (nm)	257±29.7	140±19.7	<0.05

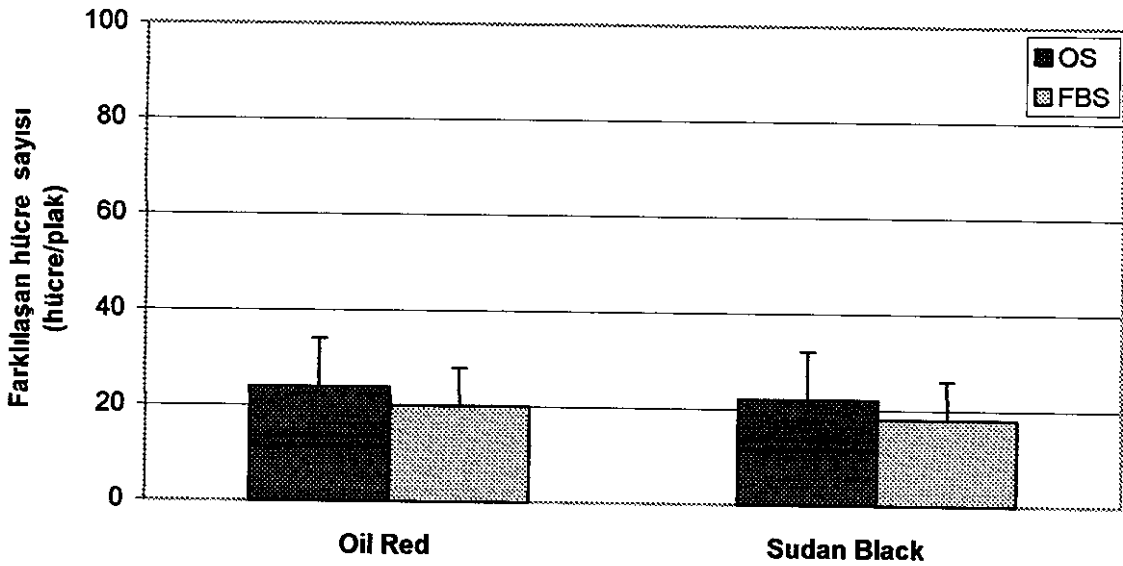


Grafik 3. Otolog serum ile inkübe edilen hücre gruplarında kültür süresi boyunca hücrelerin CD45, CD3, CD29 ve CD105 antijen yüzey ekspresyonları

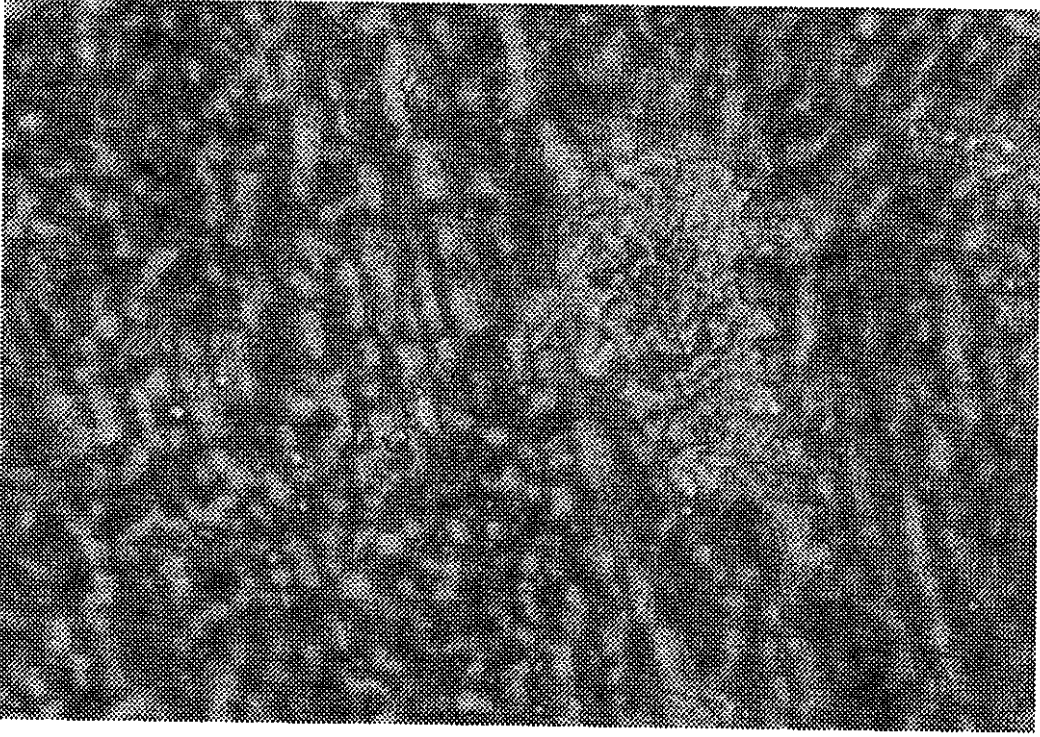


Grafik 4. Fetal bovine serum ile inkübe edilen hücre gruplarında kültür süresi boyunca hücrelerin CD45, CD3, CD29 ve CD105 antijen yüzey ekspresyonları

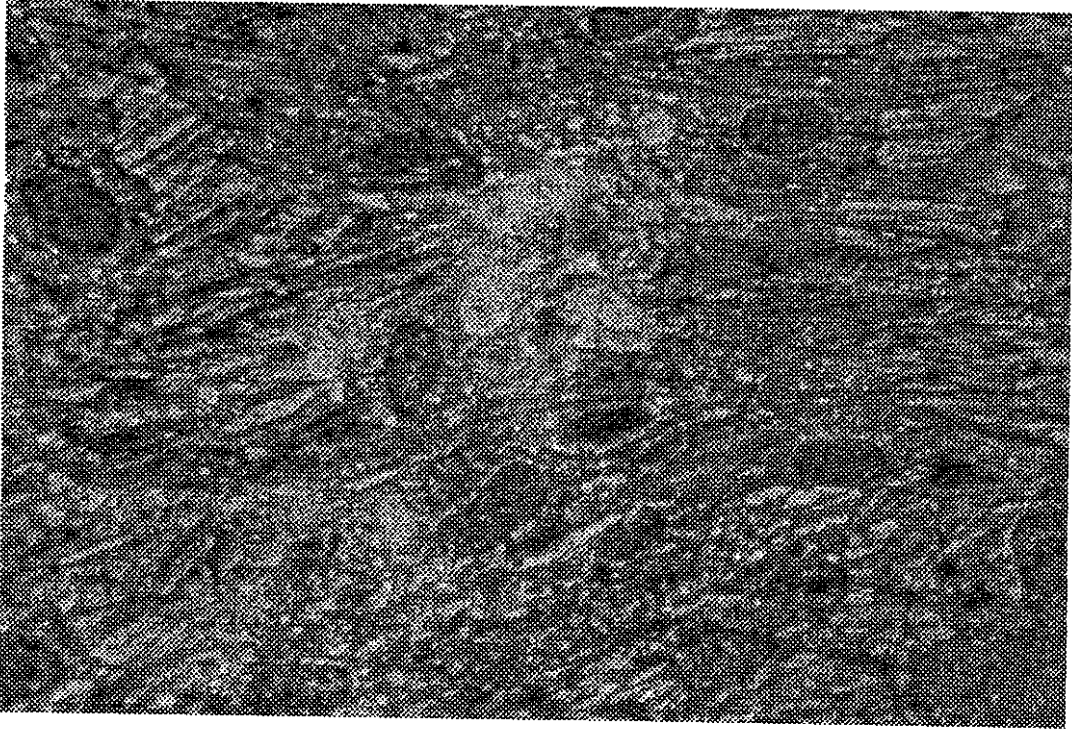
Mezenkimal kök hücrelerin yağ hücrelerine farklılaşması için deksametazon ve insülin kombinasyonu kullanıldı. Farklılaşan hücre sayıları, besiyerine otolog serum ve fetal bovine serum konulan gruplarda ayrı ayrı değerlendirilerek farklılaşma üzerine olan etkileri karşılaştırıldı. Üç haftalık süre sonunda plakalarda yapılan morfolojik değerlendirmede yağ hücrelerine farklılaşan hücrelerin sayısının otolog serum ve fetal bovine serum gruplarında benzer oranlarda olduğu saptandı. Sudan Black ile boyanan plaklarda otolog serum grubunda yağ hücrelerine farklılaşan mezenkimal kök hücre sayısı 25 ± 10 iken, bu oran fetal bovine serum grubunda 20 ± 8 olarak saptandı (Resim 5,6; Grafik 4). Oil Red ile boyanan plaklarda ise otolog serum grubunda yağ hücrelerine farklılaşan mezenkimal kök hücre sayısı 28 ± 9 iken fetal bovine serum grubunda 23 ± 5 idi (Resim 7,8; Grafik 4). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.



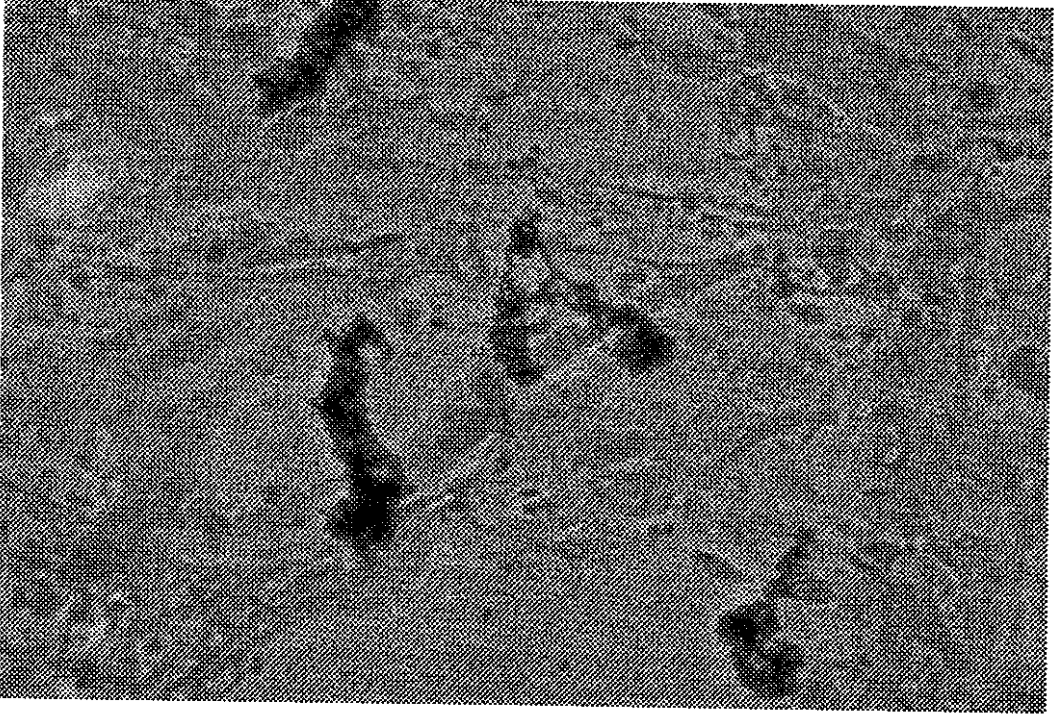
Grafik 5. Otolog serum (OS) ve fetal bovine serum (FBS) ile inkübe edilen mezenkimal kök hücrelerin yağ hücrelerine farklılaşma oranları ($p > 0.05$)



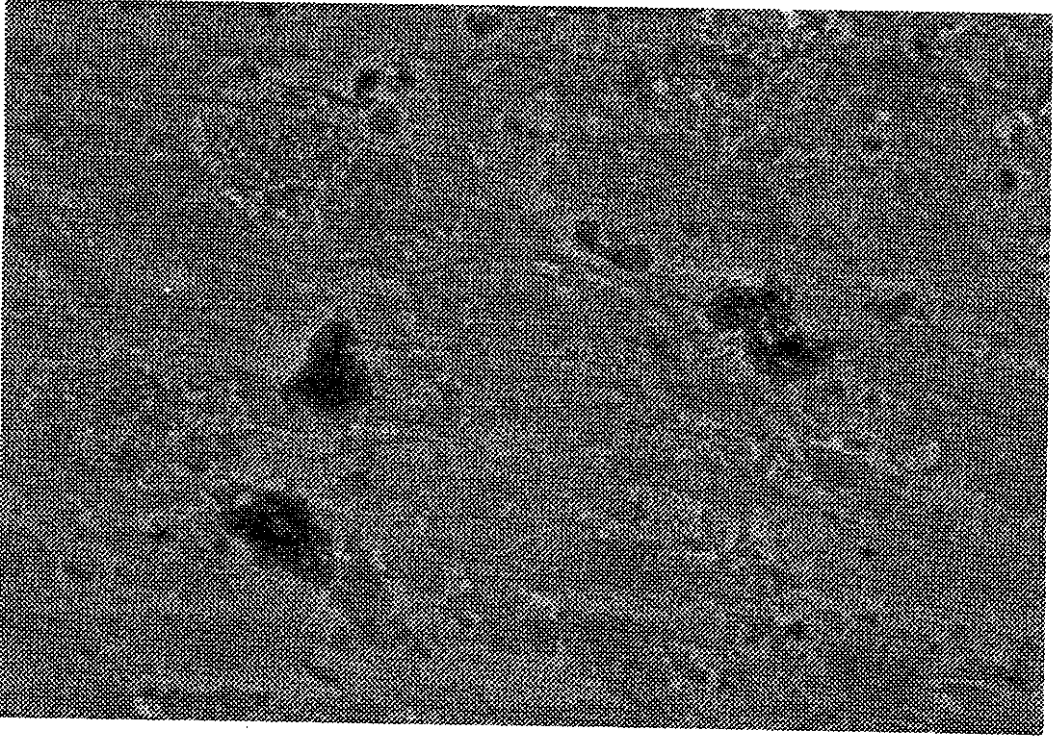
Resim 5. Otolog serum içeren besiyerinde, yağ hücrelerine farklılaşan mezenkimal kök hücreler (Sudan Black boyası x 20)



Resim 6. Fetal bovine serum içeren besiyerinde, yağ hücrelerine farklılaşan mezenkimal kök hücreler (Sudan Black boyası x 20)



Resim 7. Otolog serum içeren besiyerinde, yağ hücrelerine farklılaşan mezenkimal kök hücreler (Oil Red boyası x 20)



Resim 8. Fetal bovine serum içeren besiyerinde, yağ hücrelerine farklılaşan mezenkimal kök hücreler (Oil Red boyası x 20)

4. TARTIŞMA

Mezenkimal kök hücreler birçok dokuda bulunmaktadır. Ancak kolay izole edilebilmesi ve nisbeten bol miktarda bulunması nedeniyle deneysel çalışmalar ve klinik uygulamalarda bizim çalışmamızda olduğu gibi kemik iliği kaynaklı kök hücreler kullanılmaktadır. Kemik iliği aspirasyon materyalinde her 1×10^6 mononükleer hücreye karşı 2-5 tane mezenkimal kök hücre mevcuttur (18). Bu miktar planlanan çalışma veya uygulama için yeterli sayıda mezenkimal kök hücre elde edilmesine olanak sağlar. Literatürde yayınlanan çalışmalara bakıldığında izole edilen mezenkimal kök hücrelerin plastik flaklarda çoğaltılması amacıyla %10 fetal bovin serum içeren Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) kullanıldığı görülmektedir (17,42,47,48). Yayınlanan pek çok çalışmada mezenkimal kök hücre çoğaltımında başlangıç adezyon süreleri 72 saat olarak önerilmektedir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular da benzerdir. Primer kültür süresi sonunda başlangıç enkübasyon süreleri 4 ve 24 saat olan hücre gruplarında 72 saatlik enkübasyon süresi uygulanan hücre gruplarına göre çok daha düşük sayılarda mezenkimal kök hücre elde edilebilmiş olması optimal sürenin 72 olması, ilk besiyeri değiştirme süresinin 72 saatten daha kısa olmaması gerektiğini göstermektedir. Son yıllarda mezenkimal kök hücre ile ilgili çalışmaların deneysel araştırmaları aşan boyutlara ulaşması ve klinik uygulamalarda daha yaygın kullanım alanı bulması kültür medyumlarına fetal bovine serum ilave edilmesinin potansiyel bazı yan etki veya tehlikelere yol açabileceğini düşündürmektedir. Örneğin Creutzfeldt-Jakob hastalığı veya varyant formu, prion diye bilinen proteinimsi partiküllerin neden olduğu bir hastalıktır. Avrupa'da yakın geçmişte rastlanan Deli Dana hastalığının etkeninin de aynı partiküller olması, fetal bovine serum kullanımında güvenilirlik sorununu beraberinde getirmiştir. Ayrıca fetal bovine serum insan organizması için yabancı bir antijenik yapıdır ve alerjik reaksiyonlara neden olma ihtimali mevcuttur. Bahsedilen riskler göz önüne alındığında fetal bovine serumun insan uygulamaları için risk taşıyabileceği veya daha güvenilir kültür medyumlarına ihtiyaç duyulabileceği düşünülebilir. Ototolog serum, fetal bovine seruma bir alternatif olabilir. Çalışmamızda fetal bovine serum ve otolog serumun mezenkimal kök hücre proliferasyonu üzerine olan etkilerini araştırdık. Elde edilen verilere baktığımızda

besiyerine % 10 otolog serum ilave edilen hücre gruplarında izlenen mezenkimal kök hücre proliferasyonunun, % 10 fetal bovine serum ilave edilen gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı oranda hızlı olduğunu saptadık. Morfolojik olarak değerlendirildiğinde, primer kültür ve birinci pasaj kültürün 10. gününde otolog serum grubunda hücreler flask tabanının tamamını kapladığı halde fetal bovine serum grubunda flask tabanının yalnızca yarısını kaplamış olduğu izlendi. MTT testi ile bakıldığında da aynı sonuçlar elde edildi. On günlük inkübasyon periyodu sonunda otolog serum grubunda canlı hücre oranları fetal bovine serum grubuna göre yaklaşık iki kat daha fazla saptandı. Çeşitli çalışmalarda fetal bovine serum kullanılan mezenkimal kök hücre kültürlerinde primer kültür ve birinci pasaj kültür sürelerinin 12-16 gün arasında değiştiği görülmektedir (56). Bizim çalışmamızda ise aynı süreler otolog serum grubunda 10 gün olarak saptandı. İlk aşamada elde edilen bulgular aynı oranlardaki otolog serumun, fetal bovine seruma göre daha hızlı bir mezenkimal kök hücre proliferasyonu sağladığını göstermekteydi. Mezenkimal kök hücrelerin in vitro ortamda koloni oluşturabilmesi ve proliferere olabilmesi için serumla birlikte en az dört büyüme faktörüne ihtiyaçları vardır. Bu büyüme faktörlerinin başlıcaları platelet derived growth faktör (PDGF), basic fibroblast growth faktör (bFGF), transforming growth faktör-Beta (TGF- β) ve epidermal growth faktördür (EGF) (57-59). Otolog serumun, fetal bovine seruma göre daha hızlı bir mezenkimal kök hücre proliferasyonuna neden olması insan serumunun TGF- β dışındaki diğer büyüme faktörleri olan PDGF, bFGF ve EGF içeriği açısından daha zengin olmasına bağlı olabilir. Literatürde mezenkimal kök hücre proliferasyonu üzerine otolog serumun etkilerini araştıran veya otolog serum ile fetal bovine serumun etkilerini karşılaştıran bir çalışma yoktur. Bulgularımız otolog serumun fetal bovine serumdan daha iyi bir mezenkimal kök hücre proliferasyonu sağladığını göstermekte olup, konuyla ilgili gerçekleştirilen ilk çalışmalardan biridir.

Kemik iliği kaynaklı, kültür ortamında çoğaltılmış mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik özellikleri hakkında pek çok veri mevcuttur. Kültürde çoğaltılan mezenkimal kök hücreler CD34, CD14, CD45 gibi hematopoietik belirteçler eksprese etmezler. Mezenkimal kök hücre için tipik olarak kabul edilen belirteçler SH2 (CD105), SH3 (CD73) ve SH4 (CD73)'dür. Fibroblast yüzey markeri olan STRO-1 mezenkimal kök hücreler tarafından da eksprese edilmektedir (24). Pittenger ve Azizi yaptıkları

çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin antijenik özelliklerini ayrıntılı olarak tanımlamışlardır. Bu makalelerde mezenkimal kök hücrelerin CD105 (SH2), CD73 (SH3), CD166 (ALCAM), CD54 (ICAM-1), CD62L (L-Selektin), CD44 (Hyaluronat reseptör), CD106 (VCAM), CD29 (VLA- β), CD58 (LFA-3) eksprese ettiklerini; CD45 (LCA), CD3 (CD3 kompleks), CD19, HLA DR, CD11a (LFA-1 α), CD34, CD14 (LPS reseptör), CD49d (VLA- α 4), CD31 (PECAM-1), CD62E (E-Selektin), CD62P (P-Selektin) eksprese etmediklerini saptamıştır (4,58). Otolog serum ve fetal bovine serum gruplarında yüzey antijenik yapılarını analiz ettiğimiz mezenkimal kök hücrelerin CD29, CD44, CD166 ve CD105 pozitif; CD45, HLA DR, CD3, CD19, CD11a, CD34, CD49d ve CD14 negatif olduğu saptandı. Elde ettiğimiz bulgular literatür verileri ile uyumlu idi. Otolog ve fetal bovine serum gruplarında çoğaltılan mezenkimal kök hücrelerin antijenik özelliklerini karşılaştırdığımızda mezenkimal kök hücreler için en tipik markerlerden biri olarak tarif edilen CD105 ekspresyonunun hem primer kültür hem de birinci pasaj sonunda otolog serum grubunda daha yüksek oranda eksprese edildiğini görmekteyiz. İki grup arasındaki farklılık muhtemelen deney sayısının az olması (üç deney) nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşamamıştır. Fetal bovine serum grubunda ise otolog serum grubuna göre hem primer kültür hem de birinci pasaj sonunda CD34, CD14, CD45 ve HLA-DR gibi hematopoietik kökenli hücre belirteçlerinin daha yüksek oranlarda eksprese edildiği saptandı. Özellikle birinci pasaj sonunda çoğaltılan hücrelerde CD14, CD45 ve HLA-DR ekspresyonları fetal bovine serumla beslenen hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksekti. Otolog serum ve fetal bovine serum gruplarında CD105 pozitif hücrelerin oranı benzer iken; CD34, CD14, CD45 ve HLA-DR ekspresyonlarının fetal bovine serum grubunda yüksek olması fetal bovine serumla gelişen mezenkimal kök hücrelerin homojenliğinin otolog serumu göre daha düşük olduğunu, hematopoietik hücrelerin daha yüksek oranlarda varlığını devam ettirdiğini göstermekteydi. Bu bulgu, fetal bovine serumun büyüme faktör ve sitokin içeriğinin farklılığından kaynaklanabileceği gibi, yabancı antijenik proteinler içermesi nedeniyle daha fazla hematopoietik hücre proliferasyonuna neden oluşuna bağlı olabilir. Bir başka varsayım ise fetal bovine serum içindeki yabancı antijenik uyarıların mezenkimal kök hücrelerden hematopoietik hücre farklılaşmasını indükleyebileceği olasılığıdır. Otolog serum grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da CD105 ekspresyonunun fazla; CD34, CD14, CD45 ve HLA-DR

ekspresyonlarının düşük oranlarda saptanması mezenkimal kök hücre çoğaltımında otolog serumun fetal bovine serumdan daha uygun olduğunu düşündürmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin in vitro koşullarda uygun uyaranlarla osteositlere, miyoblastlara, kondrositlere ve hematopoietik stromaya diferansiye olduğunu gösterilmiştir. Yağ hücrelerine farklılaşma için deksametazon ve insülin, kondrositlere farklılaşma için Transforming growth faktör beta 3 (TGF- β 3) ve askorbik asit, kas hücrelerine farklılaşma için 5-Azasitidin, sinir hücrelerine farklılaşma için retinoik asit, pankres beta hücrelerine farklılaşma için retinoik asit, tenositlere farklılaşma için BMP-12, ve osteoblastlara farklılaşma için deksametazon, beta-gliserofosfat ve askorbik asit kullanılmıştır. Farklılaşma yolağının hücresele ve moleküler süreçleri çok iyi anlaşılammış olmakla beraber, osteo-kondrojenik farklılaşma için Cbfa-1 ve adipojenik farklılaşma için peroxisome proliferator activated reseptör γ (PPR γ) ekspresyonlarının gerekli olduğu bilinmektedir (60,61). Mezenkimal kök hücre farklılaşmasında rol oynayan önemli faktörlerden biri de TGF- β 'dir. TGF- β , mezenkimal kök hücrelerin kemik ve kıkırdağa farklılaşmasını stimüle ederken yağ hücrelerine farklılaşmasını inhibe etmektedir (62). TGF- β 'nin bu etkisini adiposit transkripsiyon faktör enhancer-binding protein (C/EBP) ile ilişkili bir protein olan smad3 aracılığıyla gerçekleştirdiği bilinmektedir. Smad proteinleri intraselüler sinyal ileti reseptörlerinin aktivasyonunu sağlarlar. Smad3 proteinin inhibisyonu C/EBP'nin transaktivasyon kapasitesini baskılayarak yağ hücrelerine farklılaşmanın duraklamasına neden olur (62). Ayrıca TGF- β , PPR γ ekspresyonunu baskılayarakta yağ hücrelerine farklılaşmayı engelleyebilir. Çünkü C/EBP, PPR γ ekspresyonunu aktive eder. Muhtemelen TGF- β 'nin PPR γ sunumu üzerindeki baskılayıcı etkisi C/EBP aktivitesini inhibe edici etkisine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (63,64).

Tıbbi literatürde mezenkimal kök hücrelerin yağ hücrelerine farklılaşması üzerine otolog serum ve fetal bovine serumun etkilerini karşılaştıran bir çalışma henüz yayınlanmamıştır. Elde ettiğimiz veriler otolog serum grubunda yağ hücrelerine farklılaşan hücre oranlarının daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ancak gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Fetal bovine serum grubunda yağ hücrelerine farklılaşan mezenkimal kök hücre oranının daha düşük olması yüksek TGF- β içeriğine bağlı olabilir. Bu çalışma, istatistiksel olarak anlamlı fark olmamakla beraber yağ

hücrelerine diferansiyasyonda aynı oranlardaki otolog serumun en az fetal bovine serum kadar, hatta daha iyi bir diferansiyasyon sağladığına işaret etmektedir.

Sonuç olarak, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre üretiminde 72 saatlik başlangıç adezyon süresinin ve fetal bovine serum yerine otolog serum kullanımının daha hızlı bir proliferasyona yol açabileceği saptanmış olup yağ hücrelerine diferansiyasyon bulguları da bunu destekler niteliktedir. Otolog serum ve fetal bovine serumun, mezenkimal kök hücrelerin diğer serilere (kas, kıkırdak, kemik gibi) farklılaşması üzerine olan etkilerinin karşılaştırılması ve sitokin-büyüme faktörü içeriklerinin araştırılması için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sonuçlar:

1- Mezenkimal kök hücre çoğaltımında başlangıç aşamasından birinci besiyeri değişimine kadar geçen süre en az 72 saat olmalıdır.

2- Otolog serum, fetal bovine seruma göre daha hızlı bir mezenkimal kök hücre proliferasyonu sağlamaktadır.

3-Primer kültür ve birinci pasaj kültür sonunda elde edilen bulgular otolog serumun daha pür mezenkimal kök hücre üretim ve çoğaltımına olanak sağladığını işaret etmektedir.

4-Birinci pasaj kültürden sonra mezenkimal kök hücrelerin yağ hücrelerine farklılaşmasında otolog serumun en az fetal bovine serum kadar etkin olduğu saptanmıştır.

Öneriler:

1-Otolog serumla beslenen mezenkimal kök hücreler, birinci pasaj sonunda fetal bovine serumla beslenerek hematopoitik (monosit-makrofaj) hücrelere diferansiye olup olmadıkları test edilmelidir.

2-Diferansiyasyon analizinde en az bir seri daha çalışılmalıdır.

3-Başlangıç adezyon süreleri 4, 24 ve 72 saat olan hücrelerden çoğaltılan mezenkimal kök hücre gruplarında diferansiyasyon kapasiteleri açısından fark olup olmadığı analiz edilmelidir

4-Otolog serum ve fetal bovine serumun mezenkimal kök hücre proliferasyonu ve farklılaşması üzerine olan farklı etkilerinin nedenleri araştırılmalıdır. Bu amaçla otolog serum ve fetal bovine serumun sitokin ve büyüme faktörü içerikleri analiz edilmelidir.

5-Mezenkimal kök hücre üretimi için serum-free medyumla çalışmalar yapılmalıdır. Otolog serum ve fetal bovine serumla çoğaltılan mezenkimal kök hücrelerin bir pasaj sonrası sitokin sekresyonları serum-free ortamlarda karşılaştırılmalıdır.

ÖZET

Mezenkimal kök hücreler başlıca kemik iliğinde lokalize olup; kemik, kas, kıkırdak, tendon, yağ, sinir ve kemik iliği stromal hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip pluripotent progenitor hücrelerdir. Kültür ortamlarında fusiform fibroblast benzeri görünüm arz ederler. CD34, CD45 ve CD14 gibi tipik hematopoietik belirteçler göstermezler, buna karşın CD105 (SH2), CD73 (SH3) gibi non-hematopoietik hücre yüzey belirteçleri eksprese ederler. Başta hematopoietik kök hücre nakilleri, doku mühendisliği ve gen tedavileri olmak üzere bir çok alanda klinik kullanım potansiyeli olması bu hücrelere olan ilgiyi giderek artırmaktadır. Klinik kullanım amaçlı izole edilen kemik iliği kaynaklı hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması için kültür ortamına ilave edilecek fetal bovine serum, prion bulaşı ve alerjik reaksiyonlara yol açma potansiyeli taşımaktadır. Fetal bovine serum yerine kültür medyumuna otolog serum ilavesi alternatif bir yaklaşım olarak düşünülebilir. Bu çalışmada başlangıç besiyeri değiştirme zamanının mezenkimal kök hücre çoğaltımına etkileri ve fetal bovine serum ile otolog serumun mezenkimal kök hücre proliferasyonu ve farklılaşması üzerine etkilerini karşılaştırmayı planladık. Birinci aşamada kemik iliği kaynaklı mononükleer hücreler izole edilerek primer kültür ve birinci pasaj kültür işlemleri ile mezenkimal kök hücre çoğaltımı sağlandı. Primer kültürde başlangıç enkübasyon sürelerinin mezenkimal kök hücre üretimi üzerine etkileri araştırıldı. Birinci pasaj kültürden sonra mezenkimal kök hücreler deksametazon-insülin ile yağ hücrelerine diferansiye edildi. Primer kültür esnasında başlangıç besiyeri değiştirme süreleri açısından en uygun zamanın 72 saat olduğu saptandı. Dört ve 24 saatlik inkübasyonla yeterli sayıda mezenkimal kök hücrenin çoğaltılamadığı görüldü. Primer kültür ve birinci pasaj kültür sonunda invert mikroskopla yapılan morfolojik değerlendirmede mezenkimal kök hücre proliferasyonunda otolog serumun fetal bovine serumdan daha etkin olduğu görüldü. Otolog serum grubunda hücrelerin tamamı flask tabanını kapladığı halde bu oran fetal bovine serum grubunda %50 idi. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu sonuç MTT testi ile de doğrulandı. On günlük inkübasyon sonucu otolog serum grubunda hücrelerin optik dansitesi 257 ± 29.7 nm iken fetal bovine serum grubunda 140 ± 19.7 nm olarak tesbit edildi. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Primer kültür ve birinci pasaj kültür sonunda elde edilen mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik analizine bakıldığında, otolog serum grubunda mezenkimal kök hücre göstergesi olan CD105 daha yüksek oranda pozitif iken, fetal bovine serum grubunda CD45, CD14 ve HLA-DR gibi mezenkimal kök hücre tarafından eksprese edilmeyen hematopoietik hücre göstergeleri daha yüksekti. Bulgular otolog serumun daha pür mezenkimal kök hücre çoğaltımına olanak sağladığını göstermektedir. Son aşamada mezenkimal kök hücrelerin yağ hücrelerine farklılaşması üzerine otolog serum ve fetal bovine serumun benzer etki gösterdiği saptandı. Bulgular mezenkimal kök hücre proliferasyonu ve bu hücrelerin yağ hücrelerine farklılaşmasında otolog serum kullanımının fetal bovine serumdan daha üstün olabileceğini göstermektedir.

SUMMARY

Mesenchymal stem cells, primarily localized in the bone marrow, are the pluripotent cells which have the ability to differentiate to bone, muscle, adipose, nerve and bone marrow stromal cells. They look like fusiform fibroblasts in culture media. They do not express hematopoietic markers such as CD34, CD45 or CD14. On the other hand, non-hemopoietic markers as CD105 (SH2) and CD73 (SH3) are expressed on their surface. Researches on mesenchymal stem cells are increasing since they may be used in hematopoietic stem cell transplantation, tissue engineering and gene therapy. The ability of mesenchymal stem cells to differentiate to various tissues is an important speciality, which is used in tissue engineering. Fetal bovine serum, that is added to the culture media for the proliferation and differentiation of the bone marrow derived mesenchymal stem cells, may cause problems such as prion contamination and allergic reactions. Instead of fetal bovine serum, autologous serum may be used to prevent such complications. In this study we compared the effects of fetal bovine serum and autologous serum on the proliferation and differentiation of the mesenchymal stem cells. Bone marrow derived mononuclear cells were isolated with ficol density gradient method and after the primary culture and the first passage culture the mesenchymal stem cells were differentiated to adipocytes with dexametasone and insulin combination. Additionally, on the stage of primary culture the effect of adhesion duration on the production of mesenchymal stem cells was investigated. The most suitable time for the adhesion duration was found to be 72 hours during the primary culture. We observed that 4 and 24 hours of incubation periods were not sufficient to produce sufficient mesenchymal stem cells. On the tenth day of the primary culture and first passage evaluation of the mesenchymal stem cells proliferation under the inverted microscope revealed that autologous serum was more effective than the fetal bovine serum in the proliferation of the mesenchymal stem cells. In the autologous serum group the bases of the flasks were completely covered with mesenchymal stem cells, while in the fetal bovine serum group this ratio was 50%. The difference in between two groups was statistically significant and this result was supported by MTT test. On the 10th day of the incubation, optical density of the autologous serum and fetal bovine serum incubated cells were found to be 257 ± 29.7 nm and 140 ± 19.7 nm, respectively. The difference was statistically significant. Immunophenotypical analysis of the cells produced at the end of primary culture and primary passage revealed that in CD105 expression was higher on the cells incubated with autologous serum, while CD45, CD14 and HLA-DR expression was higher on the cells incubated with fetal bovine serum. These results indicate that autologous serum is more convenient in comparison to fetal bovine serum for production and proliferation of the mesenchymal stem cells. Autologous serum is as effective as fetal bovine serum in the differentiation of the mesenchymal stem cells to adipocytes. This study showed that autologous serum is favorable when compared to the fetal bovine serum in the production and proliferation of the mesenchymal stem cells and differentiation of mesenchymal stem cells to adipose tissue.

9. KAYNAKLAR

1. Friedenstein AJ, Gorskaja JF and Kulagina NN: Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 4:267-74, 1976.
2. Haynesworth SE, Baber MA and Caplan AI: Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone.* 13:69-80, 1992.
3. Bianco P, Costantini M, Dearden LC and Bonucci E: Alkaline phosphatase positive precursors of adipocytes in the human bone marrow. *Br J Haematol.* 68:401-3, 1988.
4. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284:143-7, 1999.
5. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM and Johnstone B: The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am.* 80:1745-57, 1998.
6. Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 276:71-4, 1997.
7. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA and Verfaillie CM: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 418:41-9, 2002.
8. Karaöz E and Ovalı E: Kök Hücreler. Birinci baskı, ATİ teknoloji A.Ş., Trabzon, 2004, s.106-107.
9. Karaöz E and Ovalı E: Uygulamalı hücre kültür teknikleri kurs kitabı. Birinci baskı, Isparta, 2003, s.135-155.
10. Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP and Caplan AI: In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res.* 195:492-503, 1991.
11. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I and Fisk NM: Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* 98:2396-402, 2001.

12. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA and Maini RN: Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2:477-88, 2000.
13. Fernandez M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H and Minguell JJ: Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant.* 20:265-71, 1997.
14. Sarah A. Wexler, Craig Donaldson, Patricia Denning-Kendall, Claire Rice, Ben Bradley and Jill M: Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not Hoes. *Br J Haematol* 121: 368-374, 2003.
15. Erices A, Conget P and Minguell JJ: Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 109:235-42, 2000.
16. Gutierrez-Rodriguez M, Reyes-Maldonado E and Mayani H: Characterization of the adherent cells developed in Dexter-type long-term cultures from human umbilical cord blood. *Stem Cells.* 18:46-52, 2000.
17. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E and Fagioli F: Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica.* 86:1099-1100, 2001.
18. Koç O and Lazarus HM: Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplantat.* 27:235-239, 2001.
19. Conget PA and Minguell JJ: Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 181:67-73, 1999.
20. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL and Prockop DJ: Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem.* 15:570-85, 1999.
21. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R and 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.* 107:275-81, 1999.
22. Parsch D, Fellenberg J, Brummendorf TH, Eschlbeck AM and Richter W: Telomere length and telomerase activity during expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *J Mol Med.* 82:49-55, 2004.
23. In 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH and Fibbe WE: Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar

- immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*. 88:845-52, 2003.
24. Waller EK, Olweus J, Lund-Johansen F, Huang S, Nguyen M, Guo GR, Terstappen L: The "common stem cell" hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood*. 1;85:2422-35, 1995.
25. Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J, Herve P, Charbord P: Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*. 1:66-76, 1993.
26. Simmons PJ and Torok-Storb B: Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1:55-62, 1991.
27. Verfaillie CM: Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process. *Blood*. 15:2609-12, 1998.
28. Sale GE and Storb R: Bilateral diffuse pulmonary ectopic ossification after marrow allograft in a dog. Evidence for allotransplantation of hemopoietic and mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 11:961-6, 1983.
29. Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC and Fine A: Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development*. 128:5181-8, 2001.
30. Kopen GC, Prockop DJ and Phinney DG: Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:10711-6, 1999.
31. Gussoni E, Bennett RR, Muskiewicz KR, Meyerrose T, Nolte JA, Gilgoff I, Stein J, Chan YM, Lidov HG, Bonnemant CG, Von Moers A, Morris GE, Den Dunnen JT, Chamberlain JS, Kunkel LM and Weinberg K: Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J Clin Invest*. 110:807-14, 2002.
32. Caplan AI: The mesengenic process. *Clin Plast Surg*. 21:429-35, 1994.
33. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B and Caplan AI: A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res*. 14:700-9, 1999.
34. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S and Grompe M: Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*. 422:897-901, 2003.

35. Wakitani S, Saito T and Caplan AI: Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*. 18:1417-26, 1995.
36. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI and Bruder SP: Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 64:295-312, 1997.
37. Nuttall ME, Patton AJ, Olivera DL, Nadeau DP and Gowen M: Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J Bone Miner Res*. 13:371-82, 1998.
38. Muraglia A, Cancedda R and Quarto R: Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*. 113 :1161-6, 2000.
39. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO and Pittenger MF: Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*. 4:415-28, 1998.
40. Bruder SP, Jaiswal N and Haynesworth SE: Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*. 64:278-94, 1997.
41. Lou J, Tu Y, Ludwig FJ, Zhang J and Manske PR: Effect of bone morphogenetic protein-12 gene transfer on mesenchymal progenitor cells. *Clin Orthop*. 369:333-9, 1999.
42. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M and Gerson SL: Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*. 176:57-66, 1998.
43. Wakitani S, Saito T and Caplan AI: Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*. 18:1417-26, 1995.
44. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH and Verfaillie CM: Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*. 109:337-46, 2002.
45. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS and Verfaillie CM: Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 109:1291-302, 2002.
46. Klyushnenkova E, Mosca JD and McIntosh KR: Human mesenchymal stem cells suppress allogeneic T cell responses in vitro: implications for allogeneic transplantation. *Blood*. 92:642a, 1998.
47. Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schachinger V, Dimmeler S and Zeiher AM: Infarct remodeling after

- intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*. 108:2212-8, 2003.
- 48.Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A and Anversa P: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 410:701-5, 2001.
- 49.Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A and Anversa P: Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant*. 3:86-8, 2003.
- 50.Gerlach M, Braak H, Hartmann A, Jost WH, Odin P, Priller J and Schwarz J: Current state of stem cell research for the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol*. 249 Suppl 3:III/33-5, 2002.
- 51.Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM and Krivit W: Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant*. 30:215-22, 2002.
- 52.Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R, Mareschi K, Oliveri G, Olivieri C, Pastore I, Marasso R and Madon E: Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 4:158-61, 2003.
- 53.Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS and Verfaillie CM: Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 109:1291-302, 2002.
- 54.Korbling M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, Champlin RE and Estrov Z: Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med*. 346:738-46, 2002.
- 55.Lechner A and Habener JF: Stem/progenitor cells derived from adult tissues: potential for the treatment of diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 284:259-66, 2003.
- 56.Deans RJ and Moseley AB: Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 28:875-84, 2000.
57. Barry FP: Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res Part C Embryo Today*. 69:250-6, 2003.
- 58.Kuznetsov SA, Friedenstein AJ and Robey PG: Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol*. 97:561-70, 1997.

59. Van den Bos C, Mosca JD, Winkles J, Kerrigan L, Burgess WH and Marshak DR: Human mesenchymal stem cells respond to fibroblast growth factors. *Hum Cell*. 10:45-50, 1997.
60. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C and Prockop DJ: Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:3908-13, 1998.
61. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL and Karsenty G: *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 89:747-54, 1997.
62. Tontonoz P, Hu E and Spiegelman BM: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 79:1147-56, 1994.
63. Choy L, Skillington J and Derynck R: Roles of autocrine TGF-beta receptor and Smad signaling in adipocyte differentiation. *J Cell Biol*. 149:667-82, 2000.
64. Choy L and Derynck R: Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function. *J Biol Chem*. 278:9609-19, 2003.