



## Ergin ve fetal BALB/c cinsi farelerin kalvaryum kemiklerinden elde edilen osteoblastların kültüre edilebilirliği

### *Culturability of osteoblast cells extracted from mature and fetal BALB/c mice calvaria*

Ayhan BİLİR,<sup>1</sup> Taşkın CEYHAN,<sup>2</sup> Meriç A. ALTINÖZ,<sup>3</sup> Ayşe D. GÜNERİ,<sup>1</sup>  
İbrahim BAYRAK,<sup>4</sup> Tuncay ALTUĞ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Istanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı, <sup>2</sup>Mecidiyeköy Özel Çevre Hastanesi, <sup>3</sup>Istanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İntern Dr., <sup>4</sup>Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı

**Amaç:** Primer hücre kültürü bir model sistem olarak, kaynak doku benzerinin in vitro şartlarda çoğaltılmasıdır. Bu çalışmada, kaynak olarak kullanılan BALB/c soyu ergin fare ve fetal fare kalvaryumundan sağlanan iki grup osteoblast hücrelerinin kültür tekniğini standart hale getirmek, çoğaltılan kemik hücrelerini histomorfolojik olarak incelemek, histokimyasal tekniklerle hücresel elemanları tanımlamak ve kültüre edilebilirlik oranlarını belirlemek amaçlandı.

**Çalışma planı:** On adet genç erişkin, sekiz adet gebe farenin 6-9 arası değişen fetal kalvaryumu kullanıldı. Hava akımlı steril ortam içinde mekanik ayırma yapılarak fetal ve dört ergin kalvaryum için DME-F12, diğer 6 ergin kalvaryum için de RPMI-1640 medyum kullanılarak flasklara ekildi. Yirmi dört saatte bir, mikroskop altında hücrelerin yapışma özellikleri gözlemlendi. Başarılı kültürler picro-thionin boyama tekniği ile tespit edilip boyanarak fotoğraf ataçmanlı mikroskop ile incelendi ve fotoğraflandı.

**Sonuçlar:** Genç ergin kalvaryumların RPMI-1640 medyumunda kültüre edilen 4'ü başarısız olarak değerlendirildi. Buna karşılık DME-F12 medyumunda kültür edilen altı ergin kalvaryumdan ikisi kısmen, dördü başarılı olarak değerlendirildi. Fetal kalvaryumların ise aynı medyumda bir tanesi başarısız, biri kısmen, altısı ise tam başarılı bulundu.

**Çıkarımlar:** Sonuçlarımız, embriyonik dokuların daha yüksek oranlarda kültüre edilebildiğini ve kültür ortamlarının kemik hücre kültürlerinin başarısında önemli rol oynadığını göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** Hayvan; fare; kemik iliği/fizyoloji/sitoloji; hücre diferensiyasyonu/fizyoloji; hücre kültürü; kültür ortamı/farmakoloji; osteoblast/fizyoloji/metabolizma; kafatası.

**Objectives:** The primary cell culture, as a model system, is the multiplication of a replica of the resource tissue under in vitro conditions. This study was designed to standardize the culture technique of two groups of osteoblast cells extracted from the calvaria of mature and fetal BALB/c mice, to examine the cultured cells histomorphologically, to define cellular elements through histochemical techniques, and to determine the rate of culturability.

**Methods:** Calvaria from 10 young mature mice and 6 to 9 fetal calvaria from each of the eight pregnant mice were obtained. A mechanical separation was conducted in sterile environment with a laminar air flow. The cells from four mature calvaria and all fetal calvaria were cultured in DME-F12 medium, while those of the remaining six mature calvaria were planted in RPMI-1640 medium. Cell confluence was monitored at every 24 hours. Successful specimens were stained with picro-thionin and photographed with invert photo-microscope.

**Results:** Of the young mature calvaria cultivated in RPMI-1640, four were unsuccessful, whereas, of the six mature calvaria in DME-F12, two were partially successful and four were successful. In DME-F12, successful, partially successful, and unsuccessful results were obtained in six, one, and one fetal calvaria, respectively.

**Conclusion:** Our results suggest that embryonic tissues can be cultivated at a higher rate than mature tissues and that the quality of the cultivation medium has a significant role in the cultivation process.

**Key words:** Animal; bone marrow/physiology/cytology; cell differentiation/physiology; cells, cultured; culture media/pharmacology; osteoblasts/physiology/metabolism; mice; skull.

Otojen kemik greftleri, kemik defektlerinin tamirinde standart olarak kullanılıyor olsa da, kemik greftinin alındığı sahada meydana gelen problemler yeni arayışlara yol açmış titanyum,<sup>[1]</sup> kalsiyum fosfat tozu,<sup>[2]</sup> seramik ve coral<sup>[3]</sup> gibi kemik hücrelerinin tutunacağı kalıplar geliştirilmiştir. Bu amaçla, kemik dokusunun sadece hücrelerinin transferi gündeme gelmiş,<sup>[4]</sup> kemik dokusunun bütün olarak nakledilmesi sonucu birçok farklı dokunun birarada bulunmasıyla meydana gelebilecek antijenik bir yük yerine, tek tipte bir hücrenin transferi ile, kullanılması gereken immunosüpressif ilaç miktarının, dolayısıyla yan etkilerinin düşürülmesi olasılığı doğmuştur.<sup>[4]</sup> Kemik dokusunu oluşturacak osteoblast hücrelerin elde edilmesi ve doku kültürlerinde üretilmesi farklı yollarla gerçekleştirilebilmektedir. Neonatal canlıdan alınan kemik dokusunun küçük parçalar halinde kültüre edilmesi sonucu bu parçalardan dışarıya doğru uzanarak bölünen hücrelerin pasajı,<sup>[4]</sup> enzimatik proteolitik ayrıştırma yöntemi<sup>[5]</sup> ile meydana getirilen tek hücre suspansiyonunun kullanımı, osteoprogenitor mezenşimal hücre kaynağı bulunan kemik iliğinin kullanımı,<sup>[6]</sup> deksametazon ilavesiyle kemik periostu kültürlerinin kullanılması<sup>[7]</sup> ümit verici arayışlardır. Ayrıca, prelinik çalışmalarda beyaz tavşanlardan sağlanan periosteum,<sup>[8]</sup> 21 günlük fetal Wistar tipi sıçan<sup>[7]</sup> ve Sprague-Dawley<sup>[9]</sup> ve yeni doğmuş CD-1 fare<sup>[7]</sup> kalvaryumu başarıyla kullanılmaktadır. Bu gelişmelere rağmen, standart kültür yöntemlerinin halen geliştirilememesi önemli bir sorun olarak önümüzde durmaktadır.

Çalışmamızda, BALB/c soyu genç ergin ve fetus fare kalvaryumundan sağlanan osteoblast hücrelerini doku kültüründe üretmeyi, histokimyasal tetkiklerle hücresel komponentlerini tanımlamayı, kültüre edilebilirlik oranlarını saptamayı ve birbirlerine olan üstünlük derecelerini araştırmayı amaçladık.

## Gereç ve yöntem

*Fetal kalvaryum kemiği elde edilmesi:* Vajinal smear ile hamilelik günleri belirlenen altı adet BALB/c soyu fare embriyoları kullanıldı. Hamileliğin 18-19. günlerinde yüksek doz eter anestezisi ile hayvanların yaşamları sonlandırıldı. Betadin ile deri sterilizasyonu sağlanıp steril ortamda, cerrahi aletlerle karın cildinden 1.5 cm'lik vertikal deri kesisi ile, abdominal organlara zarar vermeden embriyolara ve plasentalara ulaşıldı. Gebe farelerin her birinden 6-9 arasında çıkarılan embriyonun baş kı-

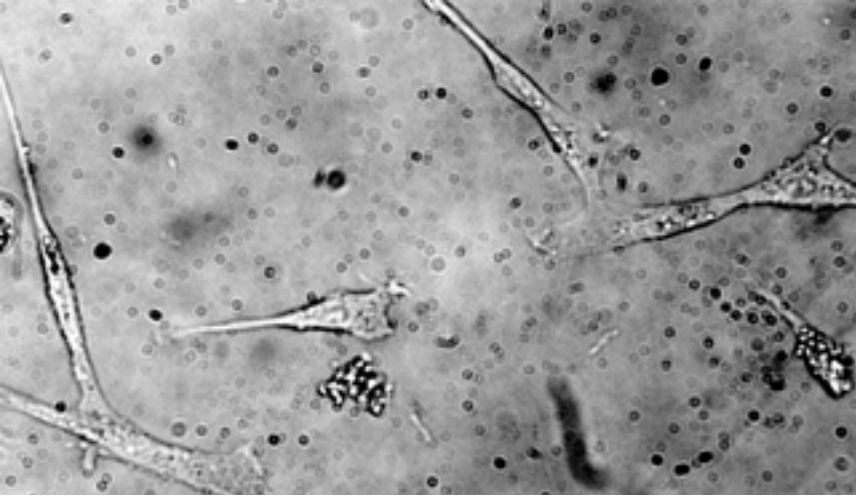
sımları, servikal üst seviyeden kesildi. Bir bistüri ve ufak küret ile beyin dokusu dışarı alındı. Kalan doku serum ile yıkandıktan sonra %10 serumlu (Heat inactivated faetal calf serum, Biological Industries, Israel) steril medyum 199'da (Medium-199, Biological Industries, Israel) alınarak kültür ortamına alındı.

*Genç ergin kalvaryum elde edilmesi:* On adet BALB/c soyu farenin yüksek doz eter anestezisi ile yaşamlarına son verildi. Steril ortamda, cerrahi aletler kullanılarak dorsal boyun bölgesi üst servikal seviye cildinde transvers bir kesi yapıldı. Küçük bir diseksiyon makası ile cilt, kalvaryumun burnuna kadar sıyrıldı. Ciltteki kesi yerinden burna kadar vertikal kesi yapılarak, her iki cilt kanadı üst taraftan alt çeneye doğru sıyrılarak soyuldu. Kalvaryum üst servikal seviyeden kesilerek gövdeden ayrıldı. Maseter grup adale ve mandibula kesilerek deney dışına alındı. Daha sonra maksilla tabanı vertikal olarak kesilerek, bir küret ile beyin dokusu dışarı alındı. Serum fizyolojik ile yıkanan kemikler %10 serum içeren Medyum-199 içerisinde doku kültür laboratuvarına nakledildi.

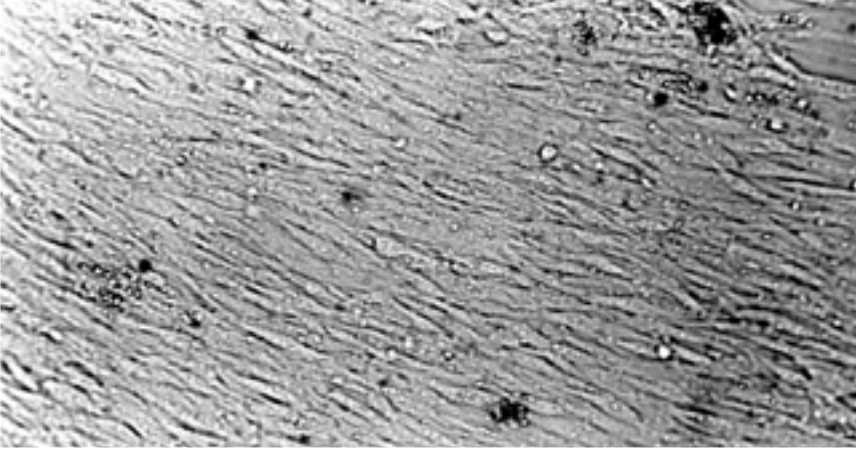
*Laboratuvar tekniği - osteoblast hücre kültürü:* Steril laminar-flow kabinde propilen petri kaplarına alınan kemik parçaları bistüri ucu ile kesilerek kıyma işlemi ile yaklaşık 1 mm<sup>3</sup>lük ufak parçalara ayrıldı ve üzerlerine 4 ml yeni hazırlanmış serumlu medyum eklendi. Medyum içindeki kemik parçaları, steril silikonlu cam havan içinde mekanik olarak jel halini alıncaya kadar ezildi. Bu hücre suspansiyonu üzerine 5 ml taze medyum ilave edildikten sonra, 18 kat steril gazlı bezden süzülerek hücrelerin debris ve mikro-doku artıklarından ayrıştırılması sağlandı. Hücre suspansiyonu ,iki kez 3 ml taze medyum içerisinde 1500 rpm'de beş dakika süre ile santrifüj edilerek yıkandı. Hücreler, Thoma Sayma lamında sayılarak, her flask'a 3.5x10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde, 5 ml medyum içine ekim yapıldı. Fetal kalvaryumların tamamı ile dört genç ergin kalvaryumundan elde edilen hücreler DME-F12 (Biological Industries, Israel) karışımında; altı adet ergin kalvaryumundan elde edilen hücreler ise RPMI-1640 medyumunun içinde kültüre edildi. Hücreler, 37° C'de ve %5 karbondioksit içeren nemli atmosfer ortamda elektronik enkübatörde (Sanyo®) 48 saat süreyle, hiç hareket ettirilmeden bekletilerek kültüre edildi. Bu sürenin sonunda flasklar invert mikroskop ile kontrol edilerek, her 24 saatte medyumları yeni hazırlanmış serumlu

medyumlarla değiştirilip hücrelerin gelişme potansiyelleri izlendi. Hücrelerin flasklara ekiminden sonraki 4-7. günler arasında semi veya tam konfluensi gösterenler başarılı, tek tek hücreler halinde veya küçük gruplar halinde dağılım gösterenler kısmen başarılı, hiç yapışma göstermeyen kültürler ise başarısız olarak değerlendirildi.

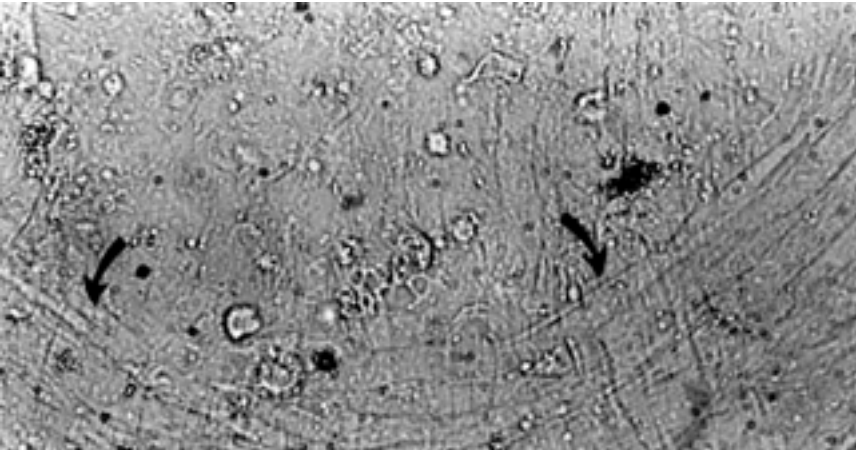
*Histokimyasal fiksasyon:* Başarılı olan kültürlerde, Schmorl tarafından 1934'de geliştirilen frozen veya celloidin fiksasyonlu dokuların boyanmasında başarı ile uygulanan picro-thionin boyama tekniği uygulandı. Bu amaçla, başarılı kültürler fosfat tamponlu %10 formalin ile 15 dakika fikse edildikten sonra, thionin-pikrik asit yöntemi ile boyandı. Bu işlem-



**Şekil 1.** Genç ergin fare kalvaryumundan mekanik ayrıştırma yöntemi ile elde edilen osteoblast hücre kültüründen invert mikroskop ile çekilmiş mikrofotoğraf (x160).



**Şekil 2.** Genç ergin fare kalvaryumundan mekanik ayrıştırma yöntemiyle DME-12 medyumunda elde edilmiş ve invert mikroskop ile vital olarak çekilmiş konfluent osteoblast hücreleri (x160).



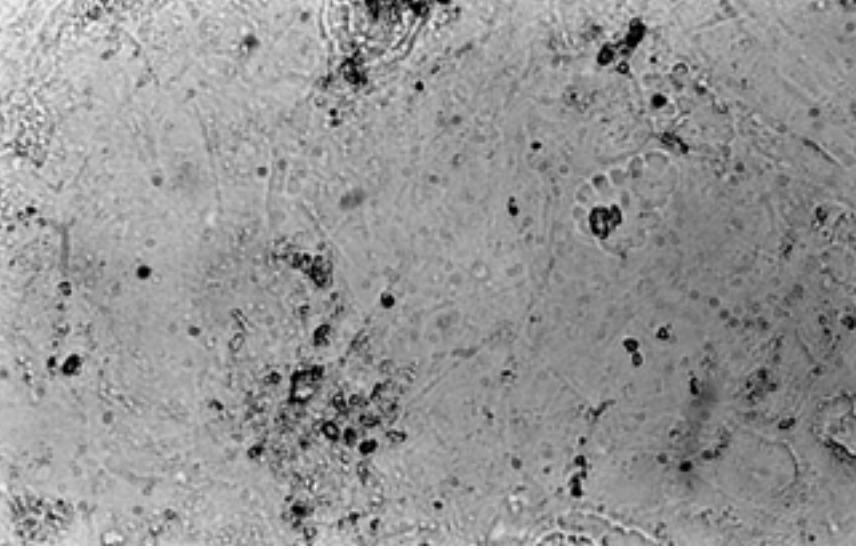
**Şekil 3.** Fetal fare kalvaryumundan DME-F12 medyumunda mekanik ayrıştırma yöntemi ile elde edilen başarılı tam konfluent hücre kültürlerinden invert mikroskop ile çekilmiş mikrofotoğraf. Havers sistemi yapısını çağrıştıran lamel oluşumu gözlenmekte (ok işaretleri altındaki alan) (x160).

de önce %0.125'lik sıvı thionin solüsyonunun her 100 ml'sine bir damla konsantre amonyak damlatıldı. Bu solüsyon, distile su ile hafifçe yıkanmış flasklara konarak 15 dakika kadar bekletildi; sonra solüsyon dökülüp tekrar distile su ile iki dakika süreyle hafifçe yıkama yapıldı. Daha sonra flasklar %1.22'lik satüre aköz pikrik asit solüsyonunda, 0.5-1 dakika arasında bekletildi. Oluşan fazla mavi boya %70 alkolde 5-10 dakika arasında tutularak uzaklaştırıldıktan sonra iki kere distile su ile çalkalanıp fotoğraf ataçmanlı inverted mikroskop altında incelemeye alındı.

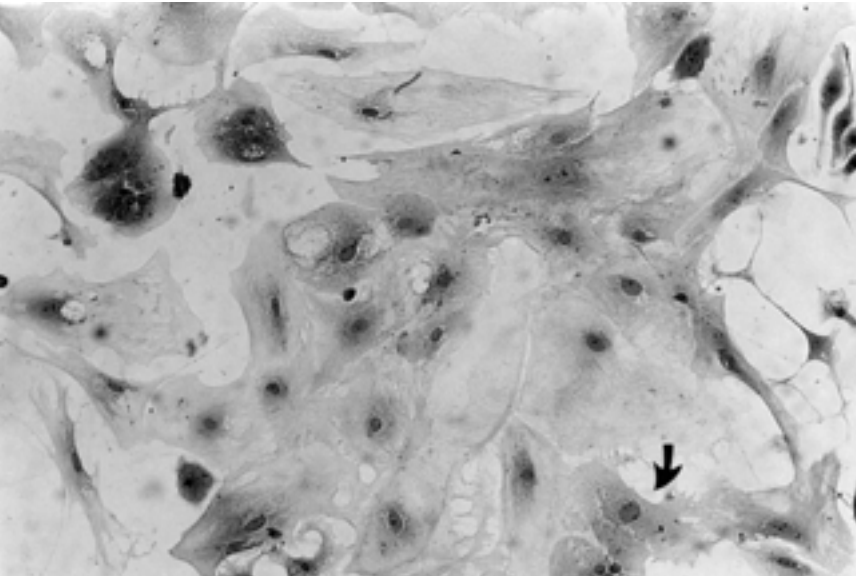
### Bulgular

Genç ergin on kalvaryumdan elde edilen hücrelerin DME-F12 medyumunda kültüre edilenlerden iki-

sinde kısmen (Şekil 1), dördünde de başarılı üreme gözlemlendi (Şekil 2). RPMI-1640 medyumuna ekilen dört ergin kalvaryum hücre kültürleri başarısız olarak değerlendirildi. Başarılı kültürlerin ikisinde tam konfluens gözlenirken (Şekil 2), diğer ikisinde yarı-konfluens gözlemlendi. Ancak embriyonik kültürler gerek hücre morfolojisi, gerekse konfluensiye ulaşma açısından çok daha başarılıydı; sekiz kültür denemesinden altısı tam (Şekil 3, 4 ve 5), biri kısmen başarılı, biri ise başarısız olarak değerlendirildi. Başarılı kültürlerde, embriyonik osteoblastik hücrelerin in vitro ortamda, neredeyse kemikteki Haversiyen sistem yapısını andıracak şekilde dizilim gösterdikleri gözlemlendi (Şekil 3). Thionin-pikrik asit boyası ile boyanmış flasklarda osteoblastik morfolojiyi çağrıştıran



**Şekil 4.** Fetal fare kalvaryumundan DME-F12 medyumunda mekanik ayrıştırma yöntemiyle elde edilen yedi günlük başarılı osteoblast hücre kültürlerinden vital olarak çekilmiş mikrofotograf (x160).



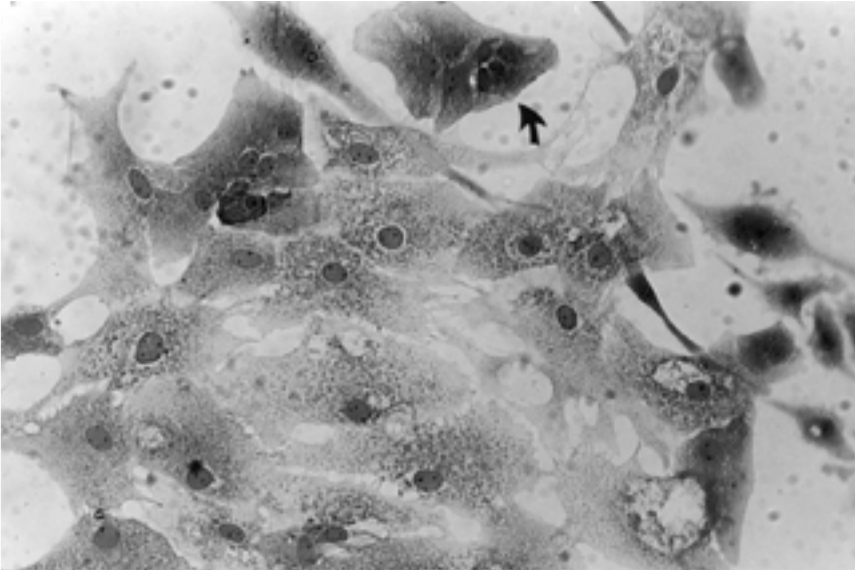
**Şekil 5.** Fetal fare kalvaryumundan mekanik ayrıştırma yöntemiyle elde edilmiş ve DME-F12 medyumunda kültür edilerek thionin-pikrik asit boyası ile boyanmış başarılı osteoblast hücre kültürlerinde ait mikrofotograf (x170).

hücreler de göze çarpıyordu (Şekil 6). Fiksasyon yapılmış dokuda viyoleto kırmızı, çok geniş sitoplazmalı, yüksek protein sentezi ve bölünme faaliyetine iştirak edecek tarzda çekirdeğinde çok sayıda nukleolus bulunan osteoblastik karakterde hücreler belirgindi (Şekil 7, 8); büyük büyütmede bu hücrelerin sitoplazmasında gözlenen “ağ” tarzında pencereler ilginç bulundu.

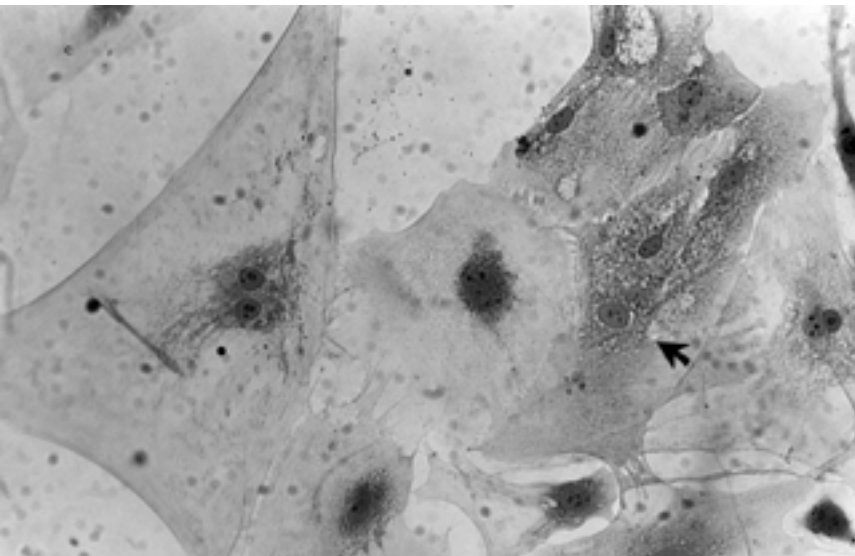
### Tartışma

Non-antijenik polimer yapı<sup>[8]</sup> üzerinde kültürlenen osteoblastların kemik tamirinde kullanılabileceği belirtilmiş; osteoblastik karakteristiği tanımlamak için alkalin fosfat aktivitesi, tip-1 kollajen oluşturma, parathormon ile uyarılabilen adenil-

siklaz aktivitesi, D<sub>3</sub> vitamini ile uyarılan kemik-gla-proteini veya osteokalsin gibi parametrelerin kullanılabileceği bildirilmiştir.<sup>[10]</sup> Deney hayvanlarından elde edilen osteoblastlarda 21 günlük Wistar sıçan fetus kalvaryumu ve 2-5 günlük yeni doğmuş fare kalvaryumu kabul görmektedir.<sup>[7]</sup> Kemik ve periost kültürlerinde osteogenezisi arttırmak için, prostoglandin E<sub>2</sub>, bir fosfat donörü olan b-gliserofosfat ve kemik morfogenetik protein (BMP-2) kullanılabileceği belirtilmektedir.<sup>[6]</sup> Kültür tekniği sayesinde topoğrafik olarak hücrelerin yerleştikleri yüzeyin, tek tek osteoblastik hücre davranışını ve birbirleriyle yaptıkları bağlantıları kontrol eden connexin-43 gen aktifliğini değiştirdiği bildirilmiştir.<sup>[9]</sup>



**Şekil 6.** Fetal fare kalvaryumundan DME-F12 medyumunda kültüre edilmiş başarılı osteoblast hücrelerinin thionin-pikrik asit boyası ile boyanmış mikrofotografı. Hem nukleus ve hem de sitoplazmada sentez aktivasyonunun işaretleri sayılan granülasyonlar içeren osteoblastlar yanında, geniş sitoplazmalı ve çok nukleoluslu osteoklast (ok işaretli) hücre morfolojisini yansıtan hücreler görülmekte (x170).



**Şekil 7.** Fetal fare kalvaryumundan elde edilerek DME-12 medyumunda kültür edilen thionin-pikrik asit boyası ile boyanmış osteoblast hücreleri geniş sitoplazmalı çok nukleolus içeren osteoblast hücreleri (ok işaretli) görülmekte (x170).

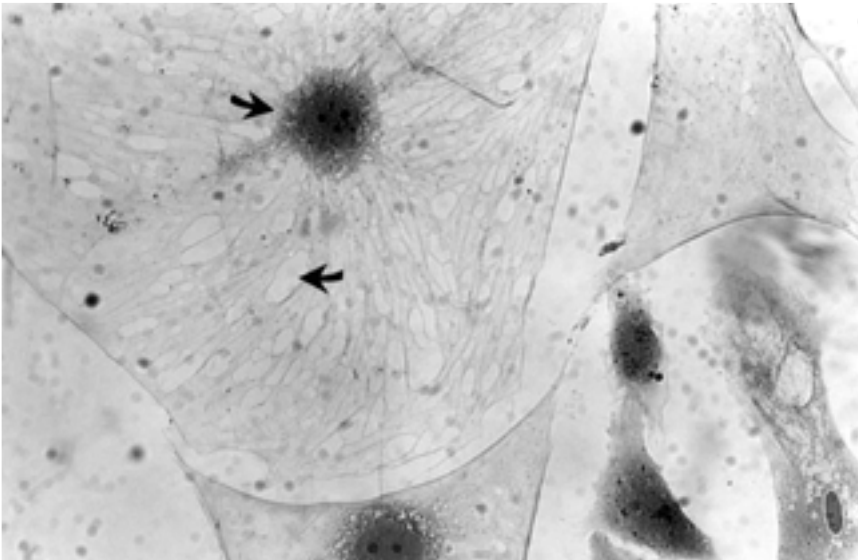
Deneysel çalışmalarda fare ve sıçanların tercih edilmesinde göz önüne alınması gereken farklılıklar vardır. Bir steroid olan deksametazonun 10 nM seviyesindeki dozu hem insan hem de sıçan osteoblast kültürlerinde proliferasyonu indükleyici etkiye sahip iken, farede osteoblast proliferasyonunu inhibe eder.<sup>[7]</sup> Ayrıca, osteokalsin ekspresyonu üzerine D<sub>3</sub> vitamini, insan ve sıçanda hücre proliferasyonunu artırırken, farede azaltıcı etki yapmaktadır.<sup>[7]</sup> Bu nedenle, deksametazon gibi steroidler kullanmaksızın kültür yapılacaksa fare osteoblastları en uygundur. Çalışmamızda fare kalvaryumunun kullanılması bu nedenlere dayanmaktadır. İn vivo uygulamalarda, enflamatuar etkileri hafifletmek gibi olumlu etkilere sahip olsa da deksametazonun anjiyogenez üzerine baskılayıcı olduğu gözden uzak tutulmamalıdır.

“Genç ergin mi, yoksa fetal mi olmalı?” sorusunun cevabı da serumdaki lipid solübl steroid konsantrasyonu ile ilgili görünmektedir.<sup>[11]</sup> Progesteron hormonu osteoblast hücre formasyonunu uyarmaktadır; bu uyarı ergin osteoblastlarda serum büyüme faktörlerine bağlı iken, fetal osteoblastların, uyarım için ek faktörlere hemen hemen gereksinimleri yok gibidir.<sup>[11]</sup> Fetal hücreler büyüme faktörlerine daha az ihtiyaç duyar. Çalışmamızda da gözlemediğimiz gibi, bu durum fetal hücrelerin ergin fetal hücrelere oranla daha yüksek oranda kültüre edilebilme nedenini açıklamaktadır. Sekiz embriyonal kalvaryumun altısında (%75) tam başarı sağlanmıştır. Bu bulgu, solid tümörlerin kültüre edilebilme oranlarının %35-80 arasında değiştiği dikkate alınırsa oldukça önemlidir.

Son yıllarda kemik kırıklarında uyarıcı etkisi olduğu iddia edilen elektrik akımlarının, bu etkiyi nasıl gerçekleştirdiği bile hücre kültürü sayesinde açığa kavuşmuştur; 100 µA/cm<sup>2</sup> elektrik akımına maruz bırakılan hücrelerde L tipi yavaş kalsiyum kanallarından, hücre çoğalmasını uyarabilecek kalsiyum girişinin başlatıldığı anlaşılmıştır.<sup>[12]</sup> Hücrelerin çoğalmalarını artıran bir diğer faktör olarak demineralize kemik matriksi gösterilmiş; kemik iliği kaynaklı, hem genç hem de yaşlı osteoblastların matriks etkisiyle çoğaltılabildiği,<sup>[6]</sup> ancak bifazik ve genç faz hücre çoğalması ve alkalen fosfatase aktivasyonunun ancak genç hücrelerde olduğu belirtilmiştir.

Osteoblastların medyuma, kemik iliğindeki hücre progenitorlarını yine osteoblasta dönüştürecek 10 ila 30 kDa büyüklüğünde pozitif feed-back sağlayıcı protein faktörler salgıladığı iddia edilmektedir.<sup>[13]</sup> Klinikte kemik öncül hücrelerini sağlamak için uygun kemik aspiratı miktarının optimum 1-2 ml düzeyinde kalması gerektiği, daha fazla alınan aspiratta oran olarak ilik yerine kan miktarının arttığı, bunun da progenitor miktarını düşürdüğü belirtilmektedir.<sup>[14]</sup> Kültür ortamı olarak RPMI-1640 medyumuna oranla daha zengin olan DME-F12 medyumunda daha başarılı olunması, kullanılan medyum içeriğinin başarılı bir kültür için ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Ostelolojik progenitor hücrelerin iki tür olduğu, bunlardan az differansiye ama çok sayıda hücre oluşturan koloni meydana getirici hücrelerin, bazik-fibroblastik büyüme faktörü (BFGF) ve transforme edi-



**Şekil 8.** Fetal fare kalvaryumundan DME-12 medyumunda kültür edilen osteoblast hücreleri. Geniş sitoplazmalı çok nukleolus içeren bu hücrelerin sitoplazmalarında ağ tarzında değişen büyüklüklerde pencere yapıları dikkati çekmekte. Perinükleer alanda yüksek oranda protein sentezine işaret eden viyolete kırmızısı renginde granülasyonlar izlenmekte (x170).

ci büyüme faktörü- $\beta$  ve D<sub>3</sub> vitaminine cevap vererek arttığı; sayıca daha az ama daha çok differansiye küme oluşturan hücrelerde BFGF cevabının ortadan kalktığı gösterilmiştir.<sup>[15]</sup>

Kültür tekniklerinin gelişmesi ve standart hale gelmesiyle, tüm kemik iliğini baştan oluşturabilecek CD34+ hematolojik kök hücre olduğunu tanımlama gibi, tam bir kemik dokusu oluşturabilecek osteoprogenitör antijenin tanımlanması da mümkün olacaktır. Buradan hareketle, standartlaştırılan osteoblast hücre kültürleri yoluyla, membran yüzeyinde stro+ adında bir protein antijenin bulunarak, bu proteine bağlı antikolar ve immünomanyetik teknikle izole edilebilmekte,<sup>[16]</sup> aynı zamanda osteogenezis imperfektalı hastalar kemik iliği progenitörleri kullanılarak tedavi edilebilmektedir.<sup>[17]</sup> Öte yandan, osteoblast hücre kültürlerinin doğru ve standart teknikle yapılı hale gelmesi mümkün görülmektedir. Bu sayede gelecekte her türlü kemik kayıplarının tamiri için gerekli kaynak dokunun seri üretimi sağlanmış olacak, dolayısıyla klinik uygulamalarda kullanılabilir olacaktır.

## Kaynaklar

1. Davies JE, Lowenberg B, Shiga A. The bone-titanium interface in vitro. *J Biomed Mater Res* 1990;24:1289-306.
2. Gregoire M, Orly I, Menanteau J. The influence of calcium phosphate biomaterials on human bone cell activities. An in vitro approach. *J Biomed Mater Res* 1990;24:165-77.
3. Guillemin G, Patat JL, Fournie J, Chetail M. The use of coral as a bone graft substitute. *J Biomed Mater Res* 1987; 21:557-67.
4. Butler PE, Lee WP, Sims CD, Randolph MA, Vacanti CA, Yaremchuk MJ. Cell transplantation from limb allografts. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:161-70.
5. Wong GL, Cohn DV. Target cells in bone for parathormone and calcitonin are different: enrichment for each cell type by sequential digestion of mouse calvaria and selective adhesion to polymeric surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72:3167-71.
6. Becerra J, Andrades JA, Ertl DC, Sorgente N, Nimni ME. Demineralized bone matrix mediates differentiation of bone marrow stromal cells in vitro: effect of age of cell donor. *J Bone Miner Res* 1996;11:1703-14.
7. Bellows CG, Ciaccia A, Heersche JN. Osteoprogenitor cells in cell populations derived from mouse and rat calvaria differ in their response to corticosterone, cortisol, and cortisone. *Bone* 1998;23:119-25.
8. Breitbart AS, Grande DA, Kessler R, Ryaby JT, Fitzsimmons RJ, Grant RT. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg* 1998;101:567-76.
9. Gray C, Boyde A, Jones SJ. Topographically induced bone formation in vitro: implications for bone implants and bone grafts. *Bone* 1996;18:115-23.
10. Yamamoto T, Ecarot B, Glorieux FH. In vivo osteogenic activity of isolated human bone cells. *J Bone Miner Res* 1991;6:45-51.
11. Ishida Y, Bellows CG, Tertinegg I, Heersche JN. Progesterone-mediated stimulation of osteoprogenitor proliferation and differentiation in cell populations derived from adult or fetal rat bone tissue depends on the serum component of the culture media. *Osteoporos Int* 1997; 7:323-30.
12. Wang Q, Zhong S, Ouyang J, Jiang L, Zhang Z, Xie Y, et al. Osteogenesis of electrically stimulated bone cells mediated in part by calcium ions. *Clin Orthop* 1998;(348):259-68.
13. Hughes FJ, McCulloch CA. Stimulation of the differentiation of osteogenic rat bone marrow stromal cells by osteoblast cultures. *Lab Invest* 1991;64:617-22.
14. Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume [published erratum appears in *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:302]. *J Bone Joint Surg [Am]* 1997;79:1699-709.
15. Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors [Published erratum appears in *J Clin Invest* 1995;96:2541]. *J Clin Invest* 1995; 95:881-7.
16. Encina NR, Billotte WG, Hofmann MC. Immunomagnetic isolation of osteoprogenitors from human bone marrow stroma. *Lab Invest* 1999;79:449-57.
17. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5: 309-13.