



## Sıçan kemik iliği stromal hücrelerinin kültüre edilebilirliği ve osteoblastik formasyonun değerlendirilmesi

### *Culturability of rat bone marrow stromal cells and evaluation for osteoblastic formation*

Taşkın CEYHAN,<sup>1</sup> Ayhan BİLİR,<sup>2</sup> Çetin KARACA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Özel Çevre Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Bölümü; <sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı; <sup>3</sup>İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi

**Amaç:** Bu çalışmada, genç yetişkin sıçan kemik iliği stromal hücrelerinin kültüre edilebilirliği ve kültür hücrelerinin genel histomorfolojik ve osteoblastik formasyon yönünden değerlendirilmesi amaçlandı.

**Çalışma planı:** Yüksek doz eter ile yaşamları sonlandırılan 16 adet 2.5 aylık Wistar cinsi genç erkek sıçanın arka femur ve tibiaları çıkarıldı, metafiz ve medullaları taşıyıcı serumla yıkandı ve toplanan aspirat DME/F12 serumuyla kültüre edildi. Kültür flasklarında medium içindeki ve tabandaki hücreler, fotoğraf ataçmanlı invert mikroskopla incelenerek görüntüledi. Pikro-tionin boyama tekniğiyle boyanan flask tabanındaki hücreler ışık mikroskopuyla incelenerek resimleri çekildi. Yapışık kültür hücreleri tripsinize edilerek çözüldü ve yayma preparatlar hazırlanarak stromal hücrelerin genel histomorfolojik yapıları incelendi.

**Sonuçlar:** Sıçan kemik iliği hücrelerinin kültürde üreme yüzdesi %93.8 (15/16) oranında yüksek bulundu. Kültür flasklarında, zamanla birbirine yapışarak çoğalan farklı morfolojide stromal hücreler ve aralarında pikro-tionin ile boyanan çok nükleoluslu büyük çekirdekli osteoblastlara benzeyen hücreler saptandı.

**Çıkarımlar:** Bulgularımız, kemik iliği hücre kültürlerinde, elde edilen hücrelerin osteoblastlara çok benzediği ve bu hücrelerin çok yönlü farklılaşma yeteneği olan osteoprogenitör hücrelerden köken alabileceği öngörüsünü desteklemektedir.

**Anahtar sözcükler:** Kemik iliği hücresi/sitoloji; hücre kültürü; osteoblast/sitoloji; sıçan; kök hücre/sitoloji.

**Objectives:** We investigated culturability of bone marrow stromal cells of young mature rats and evaluated cultured cells with regard to histomorphologic features and osteoblastic formation.

**Methods:** Sixteen mature Wistar rats were sacrificed under high dose of ether anesthesia. Their femurs and tibias were removed, medullas and metaphyses were washed with carrier serum and the collected material was cultured in DME/F12 serum. The cells in the test medium and at the bottom of Petri dishes were studied under inverted microscope and were photographed. Then, the cells at the bottom were stained with the picro-thionin technique, examined under light microscope, and photographed. Following trypsinizing, cluster cells were dissolved and smears were prepared for histomorphologic evaluation of stromal cells.

**Results:** Rat bone marrow cells in the culture showed a high percentage of reproducibility (93.8%; 15/16). The stromal cells in Petri dishes were of different morphology, and were interspersed with large multinucleated osteoblast-like cells following staining with the picro-thionin technique.

**Conclusion:** Our findings favor the opinion that cells harvested in bone marrow cell culture are very similar to osteoblastic cells and that they may stem from osteoprogenitor cells which have multifacet differentiation ability.

**Key words:** Bone marrow cells/cytology; cells, cultured; osteoblasts/cytology; rats; stem cells/cytology.

İnsanlarda kemik dokusu hücrelerinin *in vitro* şartlarda üretilmesi için ileri çalışmalar yapılmaktadır. Hedeflerden biri, osteoblastların kemikle biyoyumlu kalıplar üzerinde çoğaltılarak aynı canlıdaki geniş kemik doku defektlerinin kapatılmasında kullanılmasıdır. Alıcı canlı kemik dokusunun da bu kalıp üzerindeki hücrelerle kaynaşarak, defekt sahasında yeterli ve kısa zamanda kemik hücresi üretebileceği düşünülmektedir. Bazı çalışmalarda<sup>[1]</sup> fetal fare kalvaryumundan başarılı kültür yapılabileceği belirtilmekle beraber, hazırlanmasının zor oluşu başka kaynak doku arayışlarını gündeme getirmiştir. Kemik iliği plüripotent mezenşimal hücreler içermektedir ve bu hücrelerin osteoblast yönünde değişme potansiyelleri vardır. Çalışmamızda, sıçan kemik iliği hücrelerinin kültüre edilebilirliği incelendi ve hücrelerin osteoblastlara benzerliklerinin olup olmadığı morfolojik açıdan değerlendirildi.

## Gereç ve yöntem

Çalışmamızda 2.5 aylık 16 adet Wistar tipi erkek sıçan kullanıldı. Yüksek doz eter ile öldürülen sıçanların arka ekstremitelerinin femur ve tibia kemikleri steril şartlarda cerrahi olarak çıkartıldı. Enjektörle %10 fetal sıçır serumu (FCS®) içeren DME-F12® (Biological Industries, Israil) medyumunu kullanılarak subkondral bölgesinden transvers olarak kesilen kemiklerin metafiz ve medullar bölgeleri, medyum içinde yıkanarak korumaya alındı. Kemik iliği hücresel elemanlarını içeren hücre süspansiyonu, doku kültürü laboratuvarlarında iki kez serumlu medyum ile beş dakika süreyle santrifüj edilerek yıkandı. Hücreler sayıldı ve  $1 \times 10^6$  hücre 5 ml medyum içinde olacak şekilde 25 cm<sup>2</sup>'lik steril flaslara ekim yapıldı. Hücrelerin gelişme ve çoğalması 24 saatte bir invert mikroskopla kontrol edildi. Medyumları taze serumlu medyum ile değiştirilerek, yapışmayan bazı hücreler ve kırmızı kan hücreleri ortamdaki ayrıldı. Medyum içinde ve flaslarda zemine yapışarak çoğalan hücrelerin değişik zamanlardaki gelişimleri invert mikroskopla incelenerek görüntülendi.

**Histokimyasal fiksasyon:** Flask yüzeyinin yaklaşık %75'ini kaplayan kültürler başarılı kabul edilerek, histokimyasal inceleme üzere fosfat tamponlu %10 formalin solüsyonuyla 15 dakika tespit edildi.

Başarılı kültürler, Schmorl tarafından 1934'de geliştirilen frozen veya celloidin fiksasyonlu dokuların boyanmasında kullanılan pikro-tionin tekniğiyle

boyandı. Bu işlemlerden önce %0.125'lik sıvı tionin solüsyonunun her 100 ml'sine bir damla konsantre amonyak damlatıldı. Bu solüsyondan, distile suyla hafifçe yıkanmış flaslara 5 ml konarak 15 dakika kadar bekletildi; sonra solüsyon dökülüp tekrar distile suyla iki dakika süreyle hafifçe yıkama yapıldı. Daha sonra flasklar %0 1.22'lik satüre aköz pikrik asit solüsyonunda, 0.5-1 dakika kadar bekletildi. Oluşan fazla mavi boya %70 alkolde 5-10 dakika tutularak uzaklaştırıldıktan sonra, iki kere distile suyla çalkalanıp fotoğraf ataçmanlı inverted mikroskop altında incelemeye alındı. Başarılı kültürlerin bir bölümü ise %25 kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tamponunda hazırlanmış tripsin ile muamele edilerek, santrifüj ve yıkama işlemlerinden sonra hazırlandı, Giemza boyasıyla boyandı ve ışık mikroskopla incelenerek değişik büyüklüklerde fotoğrafları çekildi.

## Sonuçlar

On altı adet Wistar tipi sıçanın arka tibia ve femur kemiklerinden elde edilen kemik iliği hücre süspansiyonlarından 15'i (%93.8) DME medyumunda başarıyla kültüre edildi. Birinde enfeksiyon gelişti ve başarısız olarak değerlendirilip çalışma dışı bırakıldı.

Kültür flasklarında hücreler 24 saatte çoğalmaya başladı; genelde yedi günde yarım, dokuz günde tam konfluens gözlemlendi (Şekil 1a-c). Yedi günlük hücre kültürlerinden alınan fotoğraflarda değişik morfolojideki hücreler saptandı (Şekil 2, 3).

Kültüre edilen flask tabanına yapışan hücrelerden tripsinize edilerek hazırlanan yayma preparatlarında görülen hücrelerin daha yuvarlak olduğu, çekirdek ve çekirdekçik yapısı bakımından osteoblastlara benzedikleri görüldü (Şekil 4a, b).

Tionin-pikrik asit boyasıyla boyanan flaslarda düzgün, çok köşeli osteoblastlara çok benzeyen tionin-pikrik pozitif hücreler saptandı (Şekil 5a). Bunlar geniş sitoplazmalı, çok köşeli, çok nükleoluslu, hiperaktif iri hücrelerdi (Şekil 5b).

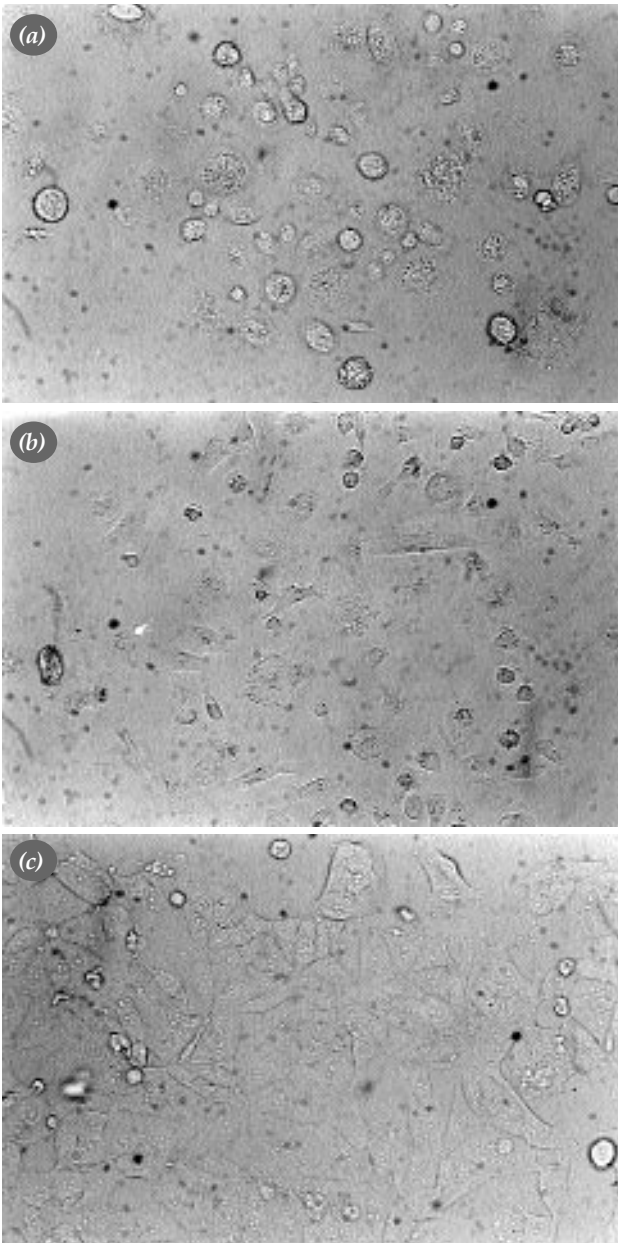
## Tartışma

Çalışmamızda deney hayvanı olarak sıçan seçmemizin nedenlerinden biri, sıçan üzerinde cerrahi çalışmanın kolay oluşu, diğeri ise doku kültürü çalışmalarında en fazla kullanılan hayvan olmasıdır. Kemik kültür çalışmalarında, en yaygın olarak 21 günlük sı-

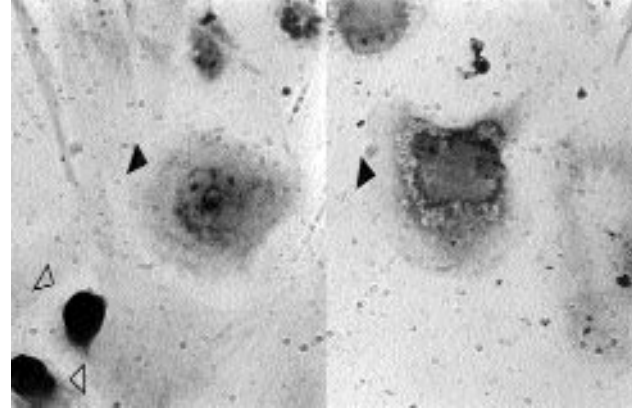
çanların fetus kalvaryumları kullanılmıştır.<sup>[2]</sup> Çalışmamızda, çeşitliliğinden dolayı izolasyonu ve histomorfolojik tanımlanması daha güç olan sıçan kemik iliği hücrelerinin kültüre edilebilirliğini inceledik. Fetal olmayan doku kültürlerinin daha az başarılı olduğu konusunda yayınlar<sup>[1]</sup> olmasına karşın, yüksek oranda başarılı kültür elde ettik.

Kemik iliği hücre süspansiyonunun sıçanları öldürmeden alınıp alınmayacağına dair bir bilgiye rastlamamıza karşın, geliştirilecek cerrahi teknik-

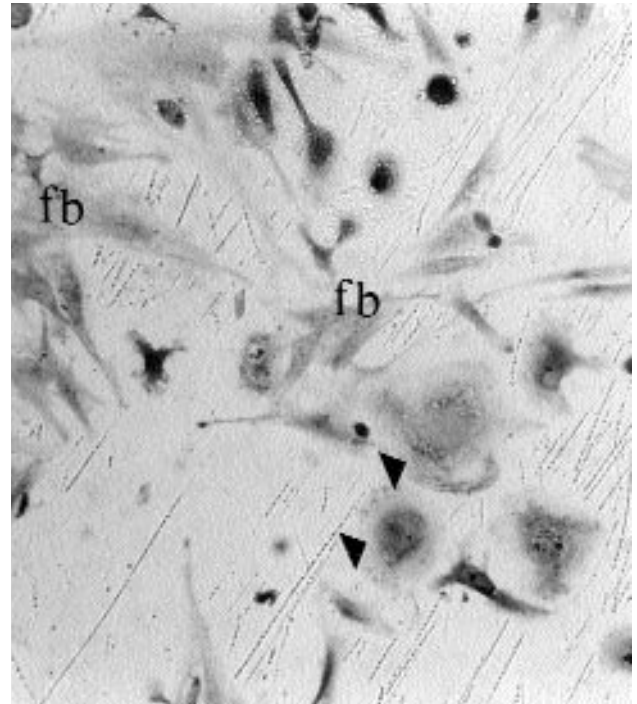
le bunun mümkün olabileceğini düşünüyoruz. Daha sonraki deneysel çalışmalarda, kültür için hücre süspansiyonu alındıktan sonra yaşamaya bırakılan hayvanda oluşturulacak kemik defektinin kendisinden alınan kültür hücreleriyle kapatılabilmesini göstermek belki de mümkün olabilecektir.



**Şekil 1.** Kültür flasklarında çoğalan (a) bir günlük, (b) üç günlük, (c) yedi günlük sağlıklı hücre kültürlerinin invert mikroskop ile çekilmiş mikrofotografı x 90.



**Şekil 2.** Yedi günlük kültür kemik iliği hücrelerinin ışık mikroskobu ile çekilmiş mikrofotografı. Solda aktif mitoz bölünme yapan hücreler (boş ok başı işaretli) yanında, çok nükleus ve nükleoluslu geniş sitoplazmalı hücreler (ok başı işaretli) görülmekte (Giemza x 175).



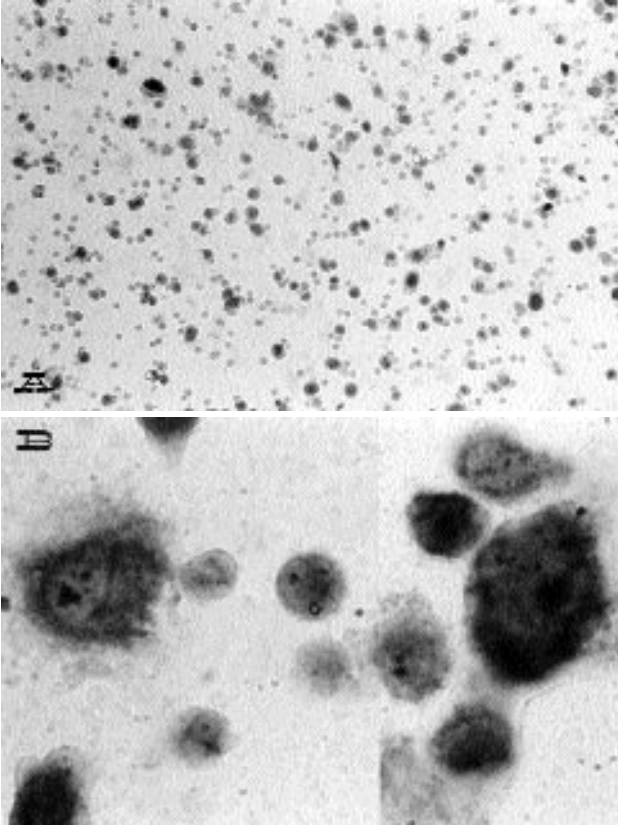
**Şekil 3.** Yedi günlük başarılı kemik iliği kültürlerinden mikrofotograf. Değişik morfolojik görünümleri ile fibroblast benzeri (fb işaretli) hücreler yanında geniş sitoplazmalı yuvarlak multipotent olduğu düşünülen hücreler (ok başı işaretli) görülmekte (Giemza x 90).

Kemik iliği hücre süspansiyonu miktarının optimum 1-2 ml düzeyinde kalması gerektiği, fazla olduğunda, içinde bulunan kan hücrelerinin oran olarak arttığı, bunun da kültürdeki progenitör hücreleri azalttığı bildirilmiştir.<sup>[3]</sup> Deneyde hayvanlardan aldığımız hücre süspansiyonu miktarını bu sınırın altında tuttuk. Kültür flasklarında özelliklerini tanımlayamadığımız hücreler, bağ dokusunun osteoblast haricindeki diğer elemanlarıydı (Şekil 2-4).

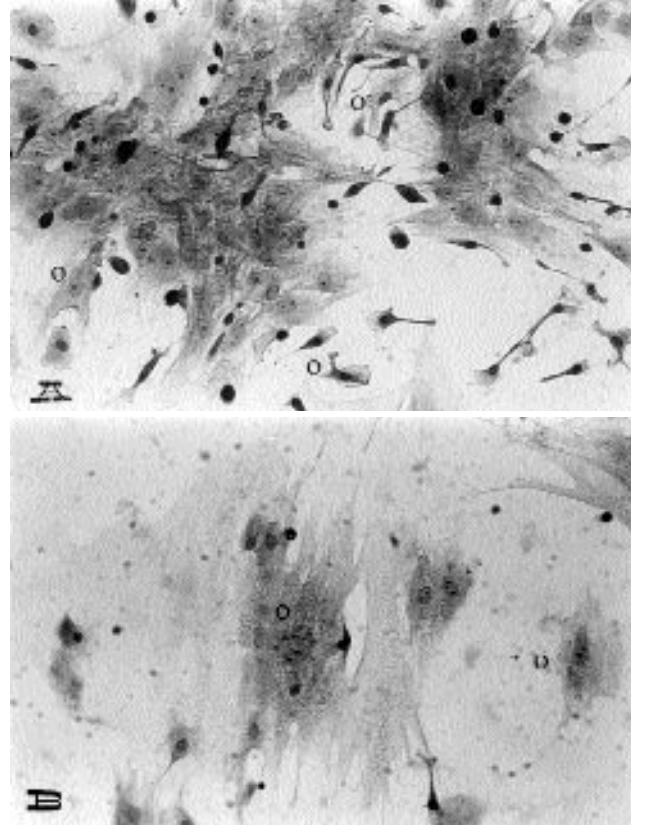
Yetişkin fare kemik iliğinin, kondrosit, adiposit, stroma (osteoklast formasyonunu destekleyen) ve osteoblastlar olmak üzere dört farklı fenotipe değişim özelliği gösteren mezenşimal progenitör hücreler içerdiği gösterilmiştir.<sup>[4]</sup> Yine, kemik iliği stromal hücrelerinin kırık dahil olmak üzere birçok bağ dokusu hücresi oluşturma potansiyeli olduğu saptanmıştır.<sup>[5]</sup> Deksametazon kullanılarak yapılan kültürlerde, 9-10. günde çok çekirdekli kas hücreleri, 12.

günde lipid içeren adipositler, 16. günde kondrosit nodülleri ve 21. günde mineralize kemik nodülleri saptanmıştır.<sup>[6]</sup> Osteoblastlar, fibroblast ve kondroblastlar birbirine yakın hücrelerdir. Kültür hücreleri arasında kırmızı kan hücrelerinin olması mümkün değildir. Birbirine yapışma özelliği olmaması nedeniyle, yıkamalar sırasında kültür ortamından uzaklaştırılırlar.

Endosteal hücreler (osteoprogenitörler), canlıda embriyonal dönemde farklılaşmamış mezenşimal hücre olarak kabul edilmektedir.<sup>[7-9]</sup> Osteoprogenitörler, dinlenmekte olan, kondroblast, fibroblast veya osteoblast hücrelerine dönüşme potansiyeli olan hücrelerdir ve geçiş safhaları hakkındaki bilgilerimiz tam değildir. Buradaki sıranın, önce koloni oluşturan hücrelerin (CFC) oluşması, daha sonra da özelleşmiş koloni oluşturan hücrelerin (SCFC) gelişmesi şeklinde olması muhtemeldir. Gelecekte, bu



**Şekil 4.** Yedi günlük kültüre edilmiş kemik iliği hücrelerinden tripsinize edilerek hazırlanmış yayma preparatlardan farklı boyutlarda çekilmiş mikrofotografar. (a) Kültüre edilmiş kemik iliği hücrelerinin genel görünümü (Giemza x 46). (b) Sitoplazmaları koyu boyanmış değişik morfolojideki hücreler izlenmekte (Giemza x 435).



**Şekil 5.** (a) Yedi günlük sıçan kemiğinden elde edilen başarılı kemik iliği kültürlerinde düzgün, çok köşeli, osteoblast morfolojisine benzeyen thionin-pikrik asit pozitif hücreler (o işaretli) görünmekte (x 20). (b) Geniş sitoplazmalı, çok köşeli ve çok nükleoluslu hiperaktif iri hücreler (o işaretli) izlenmekte (Thionin-pikrik asit x 85).

safhaları ileri histolojik teknikler kullanarak göstermek mümkün olacaktır. Koloni oluşturan hücreler lenfositlere benzeyen, kemik iliğinde nadir bulunan, periferik dolaşımında ise daha az olan pluripotent kök hücrelerdir. Özelleşmiş koloni oluşturan hücreler ise periostium, peritrabeküler doku ve vasküler perisit olarak çeşitli dokularda bulunur. Bir grup SCFC ise osteoblast oluşturmakla planlanmıştır.<sup>[2]</sup> Osteoblast SCFC'lerin en fazla bulunduğu ve kolaylıkla alınabileceği kaynak ise kemik iliğidir.<sup>[2]</sup> Çalışmamızda bu nedenle kemik iliği kullanılmıştır.

Kültüre edilen stromal hücreler, üreme medyumuna içine osteojenik indükleyiciler eklendiğinde osteoblastik değişime uğramaktadır. Pluripotent hücrelerin osteoblastik yönde farklılaşması için beslenme medyumuna içine deksametazon, beta-gliserofosfat (b-GP) ve b-FGF gibi mitojenik etki gösteren kimyasalların konması gerekir.<sup>[10]</sup> Ayrıca, kültür ortamına eklenen olgun osteoblastların, osteoprogenitörlerden osteoblastik hücre oluşmasını stimüle eden parakrin büyüme faktörleri salgıladıkları belirtilmiştir.<sup>[11]</sup> Çalışmamızın osteojenik indükleyici olmadan yapılması farklı özelliğini oluşturmaktadır.

Osteoblastik özelliği tanımlamak için histokimyasal fiksasyon, pikro-tionin boyama tekniği kullanılmıştır. Literatürde, osteoblastik karakteristiği tanımlamak için alkalin fosfataz aktivitesi, tip 1 kolla-jen oluşturma, parathormonla uyarılabilen adenil-siklaz aktivitesi, D3 vitaminiyle uyarılan kemik gla-proteini veya osteokalsin parametrelerinin kullanılabilceği belirtilmiştir.<sup>[12]</sup>

İleride yapacağımız çalışmalarda, bahsedilen osteojenik indükörleri kullanıp osteoblastları poly (L-laktik asit) ve polietilen kalıplar üzerinde çoğaltıp yaymak, daha sonra da oluşturulan kemik defektlerine transfer ederek biyolojik tamirde kullanmak istiyoruz.

Sonuç olarak bulgularımız, histokimyasal tespit ve boyama yöntemiyle elde edilen hücrelerin daha önceki çalışmamızda<sup>[1]</sup> belirtilen osteoblast hücrele-

rine çok benzedikleri ve bu hücrelerin çok yönlü farklılaşma yeteneğine sahip osteoprogenitör hücrelerden köken alabileceği fikrini desteklemektedir. Ortopedik kullanım amaçlı biyomateryallerin biyolojik etkisinin *in vitro* incelenmesinde, tanımlanan bu hücrelerle çalışmak mümkündür.

## Kaynaklar

1. Bilir A, Ceyhan T, Altınöz MA, Guneri AD, Bayrak I, Altug T. Culturability of osteoblast cells extracted from mature and fetal BALB/c mice calvaria. [Article in Turkish] Acta Orthop Traumatol Turc 2000;34:389-95.
2. Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI, editors. Histology: a text and atlas. 3rd ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 1995.
3. Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. J Bone Joint Surg [Am] 1998; 80:302.
4. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. J Bone Miner Res 1999;14:700-9.
5. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. J Cell Physiol 1998;176:57-66.
6. Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. J Cell Biol 1988;106:2139-51.
7. Encina NR, Billotte WG, Hofmann MC. Immunomagnetic isolation of osteoprogenitors from human bone marrow stroma. Lab Invest 1999;79:449-57.
8. Islam A, Steiner R. Primary culture of marrow core in collagen gels: modulation and transformation of endosteal cells. I. Morphologic observations. J Med 1989;20:241-50.
9. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. J Bone Joint Surg [Am] 1998;80:985-96.
10. 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.
11. Hughes FJ, McCulloch CA. Stimulation of the differentiation of osteogenic rat bone marrow stromal cells by osteoblast cultures. Lab Invest 1991;64:617-22.
12. Yamamoto T, Ecarot B, Glorieux FH. In vivo osteogenic activity of isolated human bone cells. J Bone Miner Res 1991;6:45-51.