

Periferik kandan izole edilen hematopoietik kök hücrelerin megakaryosite farklılaştırılması

[Differentiation of hematopoietic stem cells isolated from peripheral blood to megakaryocyte]

Özlem Bingöl Özakpınar¹,
Anne-marie Maurer²,
Cafer Adıgüzel³,
Özlem Tuğçe Çilingir³,
Muzaffer Demir⁴,
Fikriye Uras¹

¹Marmara Üniversitesi, ²Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi,
³Hematoloji Bilim Dalı, ⁴Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
⁴Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Edirne

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Dr. Özlem Bingöl Özakpınar

Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
Tıbbiye Cad. No: 49 Haydarpaşa Kampüsü Üsküdar-İstanbul
Tel. 216 414 29 63- 1125
E-posta. ozlem.bingol@marmara.edu.tr

ÖZET

Amaç: Yüksek doz kemoterapi veya hematopoietik kök hücre (HKH) transplantasyonu sonrası oluşan şiddetli trombositopeni çok ciddi klinik sorunlara yol açmaktadır. Son zamanlarda, trombositopeni ve benzer durumların tedavisi için *ex vivo* olarak farklılaştırılmış megakaryosit-progenitör hücrelerin (MPH) hastalara verilmesi üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Çeşitli kaynaklardan elde edilen HKH'lerin MPH ve megakaryositlere farklılaştırılmasıyla ilgili yeni tekniklerin geliştirilmesi temel ve klinik çalışmalar bakımından büyük bir önem taşımaktadır. Bu çalışmada, periferik kandan izole edilen HKH'lerin *ex vivo* iki aşamalı likit kültür yöntemiyle megakaryosite kadar farklılaştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Sağlıklı 3 donörden izole edilen mononükleer hücrelerden CD34+ HKH'ler elde edildi. Kök hücreler, önce 12 gün boyunca trombopoietin (TPO) (50 ng/ml), interlökin-3 (IL-3) (20 ng/ml) ve interlökin 6 (IL-6) (20 ng/ml) içeren serumsuz medyumda, daha sonra 9 gün boyunca IL-6 (20 ng/ml) ve TPO (50 ng/ml) içeren serumsuz medyumda inkübe edildi. Megakaryositlerin farklılaşması, % CD34/41 oranlarına bakılarak akım sitometrik yöntemle izlendi. Hücrelerin morfolojik incelemeleri ise ışık, elektron ve floresans mikroskopla yapıldı.

Bulgular: Morfolojik değerlendirmeler sonucunda kültürün 7. gününden itibaren megakaryositlerin oluşmaya başladığı; kültürün 21. gününde oluşan megakaryosit oranının ise >%70 olduğu saptandı.

Sonuç: Elde edilen sonuçlar, uygulanan iki aşamalı hücre kültür yönteminin megakaryositleri yüksek oranda elde etmede etkin bir yöntem olabileceğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, ümit vadeden bu metodun klinik uygulamalar açısından geliştirilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: hematopoietik kök hücre, iki aşamalı likit kültür, megakaryosit, trombosit

Çıkar Çatışması: Yazarların çıkar çatışması bulunmamaktadır.

ABSTRACT

Objective: Thrombocytopenia remains a serious problem in patients treated with high-dose chemotherapy and bone marrow transplantation. In recent years, infusion of *ex vivo* expanded megakaryocytes (Mk) progenitors into patients has been proposed as a strategy for shortening the time of platelet engraftment. The development of *in vitro* culture methods to obtain sufficient numbers of Mks from haematopoietic stem cells (HSC) is an important target in basic and clinical research projects. The aim of this study was to develop a two-step *ex vivo* expansion culture system of Mk progenitors from peripheral blood stem cells (PBSC).

Methods: PBSC were harvested from three healthy adult donors. CD34+ cells were isolated and cultured in serum free media supplemented with thrombopoietin (TPO) (50 ng/ml), Interleukin 3 (IL-3) (20 ng/ml) and Interleukin 6 (IL-6) (20 ng/ml) for 12 days followed by an incubation with IL-6 (20 ng/ml) and TPO (50 ng/ml) for another 9 days. The differentiation of Mks was monitored by flow cytometry (% of CD34+/41+ cells). The morphology of the cells was studied by light, electron and fluorescence microscopy.

Results: Morphological analysis of cells generated after 7 days of culture showed typical aspects of developing Mks. The percentage of CD41+ cells was higher than 70 on day 21.

Conclusion: The results obtained in this study demonstrated that this two-step culture system is an effective method to obtain high rates of megakaryocytes. It is obvious that this promising method needs further development for clinical applications.

Key Words: hematopoietic stem cell, megakaryocytes, platelets, two-step liquid culture

Conflict of Interest: Authors have no conflict of interest.

Kayıt Tarihi: 5 Haziran 2012; Kabul Tarihi: 24 Ocak 2013
[Registered: 5 June 2012; Accepted: 24 January 2013]

Giriş

Yüksek doz kemoterapi veya hematopoietik kök hücre (HKH) transplantasyonu sonrası oluşan şiddetli trombositopeni durumlarında hastalara trombosit süspansiyonu verilmesinde önemli zorluklar yaşanmaktadır. Trombositlerin yaşam ömürleri oldukça kısa olduğundan, onların kan merkezlerinde uzun süre saklanması mümkün değildir ve bu nedenle trombositopeni tedavisi günümüzde ciddi bir sorun olmaya devam etmektedir. Böyle durumların tedavisi için standart protokoller dışında *ex vivo* olarak farklılaştırılmış megakaryosit-progenitör hücrelerin (MPH) hastalara verilmesi stratejisi üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır [1,2]. Çok kısa sürede vücutta trombosit dönüştükleri için trombositopeniyi düzeltmede etkili olabilecekleri düşünülmektedir.

Megakaryositlerin öncül hücreleri olan pluripotent HKH'lerin çoğalıp farklılaşması sonucunda, olgun megakaryositlerin oluşmasına megakaryopoez adı verilir. HKH'ler yüksek çoğalma kapasitesine, kendini yenileyebilme ve en az 10 farklı kan hücresine dönüşebilme yeteneğine sahip ve sayıları oldukça az olan özelleşmiş hücrelerdir [3]. Oldukça aktif olan hematopoietik sistem sayesinde sağlıklı bir yetişkinde, HKH'lerden günde yaklaşık bir trilyon yeni kan hücresi üretilir. Bu hücrelerin karakterizasyonunda çeşitli hücre yüzey antijenleri kullanılmaktadır. İnsan HKH'nin yüzeyinde yüksek oranlarda CD 34, düşük oranlarda c-kit, HLA-DR, CD 4, CD 90, CD 133 ve CD 45 antijenleri bulunur [4-6]. HKH'ler, kademeli olarak gelişme potansiyellerini kaybederek, megakaryosit ve trombositlerin de üretildiği özgül kan hücre dizilerini oluştururlar.

Megakaryopoez çeşitli sitokin, kemokin ve transkripsiyon faktörlerinin rol aldığı, oldukça karmaşık yapıdaki kemik iliği mikro-çevresinde gerçekleşmektedir. 1994 yılında megakaryopoezin düzenlenmesinden sorumlu en önemli sitokin olan trombopoietin (TPO)'ün saflaştırılması ve klonlanması, bu hücrelerin biyolojileri hakkında detaylı sonuçlar elde edilmesine olanak sağlamıştır [7,8]. Karaciğerde sürekli olarak üretilen TPO, aynı zamanda HKH'lerin proliferasyonu ve canlılığından sorumlu olan fizyolojik bir büyüme faktörüdür [9]. Megakaryopoezde primer düzenleyici olan TPO, interlökin-3 (IL-3), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-11 (IL-11) gibi çeşitli hematopoietik sitokinlerle sinerjistik etki göstermektedir. Bu etkisinden yararlanılarak çeşitli sitokin kombinasyonlarıyla kemik iliği, kordon kanı, periferik kan gibi farklı kaynaklar kullanılarak yapılan çalışmalarda, megakaryosit ve trombositlerin elde edilebildiği gösterilmiştir [10-12]. Bununla birlikte, megakaryosit ve trombositleri daha yüksek oranlarda elde etmeye yönelik daha verimli yöntemlere ihtiyaç olduğundan bu konuyla ilgili araştırmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Literatürde IL-3'ün megakaryopoezdeki rolüyle ilgili birbiriyle çelişkili çalışmalar bulunmaktadır. Bazı yazarlara göre IL-3, MPH'lerin proliferasyonunu artırırken, megakaryositlerde farklılaşmayı ve endomitozu

inhibe etmektedir [13-15]. Buna karşın, Qudenrijin ve ark (2001), TPO ve IL-3 ile kültüre ettikleri CD 34+ hücrelerden oldukça yüksek oranlarda megakaryosit elde etmişlerdir [16]. IL-6 ise MPH'lerin proliferasyonunda ve endomitozda rol oynamaktadır [17]. Buna ek olarak, IL-6 ile IL-3'ün sinerjistik etki göstererek HKH'lerin proliferasyonunu sağladığı da bildirilmiştir [18]. Bu bilgiler ışığında, periferik kandan izole ettiğimiz HKH'leri, megakaryositlere farklılaştırmak için "iki aşamalı likit kültür" yöntemi geliştirmeyi hedefledik. Bu yöntemde, megakaryopoezin erken döneminde TPO, IL-3 ve IL-6'nın sinerjistik etkilerinden; geç dönemde ise TPO ve IL-6'nın sinerjistik etkilerinden yararlanmayı planladık.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Komite Başkanlığı'ndan izin alınmıştır (06.06.208 tarih ve MAR-YÇ-2008-0086 protokol numarası). Allojenik kemik iliği transplantasyonu yapılacak hastaların sağlıklı donörlerinden alınan kanın bir bölümü bu çalışmada kullanıldı. Donörlerin yazılı onayları alındı. Allojenik kemik iliği transplantasyonu yapılacak hastaların sağlıklı donörlerine (n=3), mononüklear hücrelerin mobilizasyonunu sağlamak amacıyla 5 gün boyunca 5 µg/kg G-CSF (Granülosit koloni uyarıcı faktör) verildi. 5. günde aferez cihazı kullanılarak mononüklear hücrelerin izolasyonu yapıldı.

HKH İzolasyonu: Mononüklear hücrelerden CD 34+ HKH'lerin izolasyonu, "Easy Sep CD 34+ izolasyonu" kiti (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Kanada) kullanılarak üreticinin önerileri doğrultusunda manyetik ayırıştırma yöntemiyle gerçekleştirildi. Yöntemin esası, insana karşı farede geliştirilmiş olan iki CD 34 monoklonal antikoru ile manyetik nanopartiküller arasında bir mıknatıs yardımıyla özel bir çapraz bağ oluşturulmasına dayanmaktadır.

Hücre Saflığının ve Farklılaşmasının Akım Sitometrik Analizi: İzole edilen kök hücrelerin hematopoietik kökenli olup olmadıklarının belirlenmesi için insana karşı farede geliştirilmiş olan farklı fluorokrom işaretli CD 34, CD 41 ve CD 45 monoklonal antikorları kullanıldı. Boyama işlemlerinin ardından hücre süspansiyonu "Cell Quest" programı içeren FACS Calibur akım sitometre cihazında (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) okunarak değerlendirildi. Hücre farklılaşmasının takibinde ise % CD34-CD41 oranı kullanıldı.

Hematopoietik Kök Hücrelerin ve Hücre Farklılaşmanın Morfolojik İncelenmesi: İzolasyonu yapılan CD 34+ kök hücreler, sito-santrifüj kullanılarak 800 rpm'de 5 dakika süresince çevrilerek lamlara yapıştırıldı. Metanolle fikse edilmiş preparat üzerine May-Grünwald çözeltisi konularak 10 dakika bekletildi. Daha sonra Giemsa boyası ile 10 dakika boyandı ve mikroskop altında incelendi. Megakaryositlerin farklılaşması hücre kültürünün 7, 14 ve 21. günlerinde alınan hücrelerin ışık mikroskopik incelenmesiyle takip edildi.

Kök Hücre Farklılaşmasının İmmünolojik Olarak İnce-

lenmesi: İmmünolojik inceleme için öncelikle sito-sant-rifügasyonla lamlara çöktürülmüş olan hücrelere, %4 'lük paraformaldehit çözeltisi eklenip 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra lamlar fosfat tamponu (PBS) ile iki kere yıkandı. Yıkama işlemini takiben hücreler, özgül olmayan bağlanma bölgelerini kapatmak için %5 sığır serum albümin (BSA) içeren PBS ile 1 saat süresince blokladı. Süre sonunda yıkama işlemleri tekrarlandı. Daha sonra floreseyn izotiyosiyanat (FITC)- işaretli CD 41 antikoru ile hücreler 2 saat boyunca inkübe edildi ve Olympus marka floresans mikroskopta incelendi.

Elektron Mikroskopu ile İnceleme: Kültürden alınan örnekler, %2.5 fosfat ile tamponlanmış glutaraldehid solüsyonu ile bir gece süresince fiksasyona bırakıldı. Postfiksasyon içinse %1 osmiyum tetraoksit solüsyonu kullanıldı. Dereceli alkol serilerinden geçirilen örnekler Epon 812 içine gömüldükten sonra kesitler, JEOL (Tokyo, Japan) 1200 SX marka transmisyon elektron mikroskopta incelendi.

İki Aşamalı Likit Kültür Yöntemi: Pozitif ayırma yöntemiyle izolasyonu yapılan CD 34+ kök hücreler, %1 BSA, glutamin ve 100 ünite/ml streptomisin-penisilin içeren Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) ile süspansiyon haline getirildikten sonra, laboratuvarımızda geliştirilen iki aşamalı likit kültür yöntemiyle megakaryositlere kadar farklılaştırıldı. Farklılaştırma için hücreler önce 12 gün süresince IL-3 (20 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml) ve TPO (50 ng/ml) içeren serumsuz ortamda inkübe edildi. Daha sonraki 9 gün boyunca sadece IL-6 (20 ng/ml) ve TPO (50 ng/ml) içeren serumsuz ortamda inkübe edildi. Yöntem, farklı zamanlarda ve birbirinden bağımsız olarak 3 defa tekrarlandı.

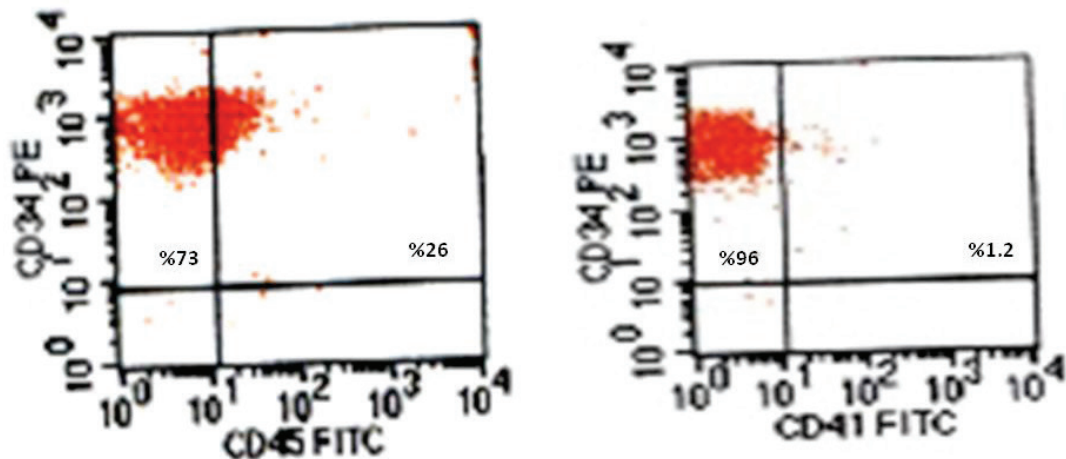
Megakaryosit DNA İçeriğinin (Poliploidi) Belirlenmesi: Megakaryositlerin DNA içeriğini belirlemek için, kültürün 14. ve 21. günlerinde alınan örnekler kullanıldı. Bütün işlemler 4 °C'de gerçekleştirildi. 15 ml'lik Falcon tüplerine 500 µl hücre süspansiyonu (5x10⁵ hücre içeren) pipetlendi ve 1300 rpm'de 10 dakika santrifüjlendirek üst faz atıldı. Hücre çökeltisi içeren tüplere, 95 µl %1 PBS-BSA ve 5 µl FITC-işaretli IgG1 antikoru veya

5 µl FITC-işaretli CD 41 antikoru eklendikten sonra tüpler iyice karıştırıldı ve buzdolabında 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her bir tübe %1'lik paraformaldehit çözeltisinden eklenerek buzdolabında 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Yıkama işlemlerinin ardından üst faz atılarak hücre çökeltisi üzerine 2mM MgCl₂, %0.05 Saponin, 0.01 mg/ml propidyum iyodür ve 10 U/ml RNaz A'dan oluşan DNA boyama çözeltisinden eklenerek bir gece buzdolabında bekletildi ve ertesi gün akım sitometreye ölçülerek değerlendirildi.

Bulgular

HKH'lerin Karakterizasyonu: Mononüklear hücrelerden izole edilen CD 34+ hematopoietik kök hücreler, FITC ve fikoeritrin (PE) işaretli CD 34, CD 41 ve CD 45 antikorları ile ikili boyama yapılarak akım sitometresiyle analiz edildi. İzole edilen CD 34+ kök hücre oranının %85-90 arasında değiştiği saptandı. Bilindiği gibi, CD 41 megakaryosit ve trombositlere özgül bir yüzey antijenidir. Kök hücrelerin megakaryositlere farklılaştığını izlemek için CD 41+ 'liği gözleneceği için başlangıç hücrelerinin CD 41 içermediğini tespit etmek önemliydi. İzolasyon sonrası yapılan analizlerde CD 41+'lığının %1'in altında olduğu belirlendi. Şekil 1'de manyetik izolasyon sonrası yapılan HKH'lerin CD 34/ CD 45 ve CD 34 / CD 41 boyamalarına ait akım sitometrik dot plot diyagramları verilmiştir.

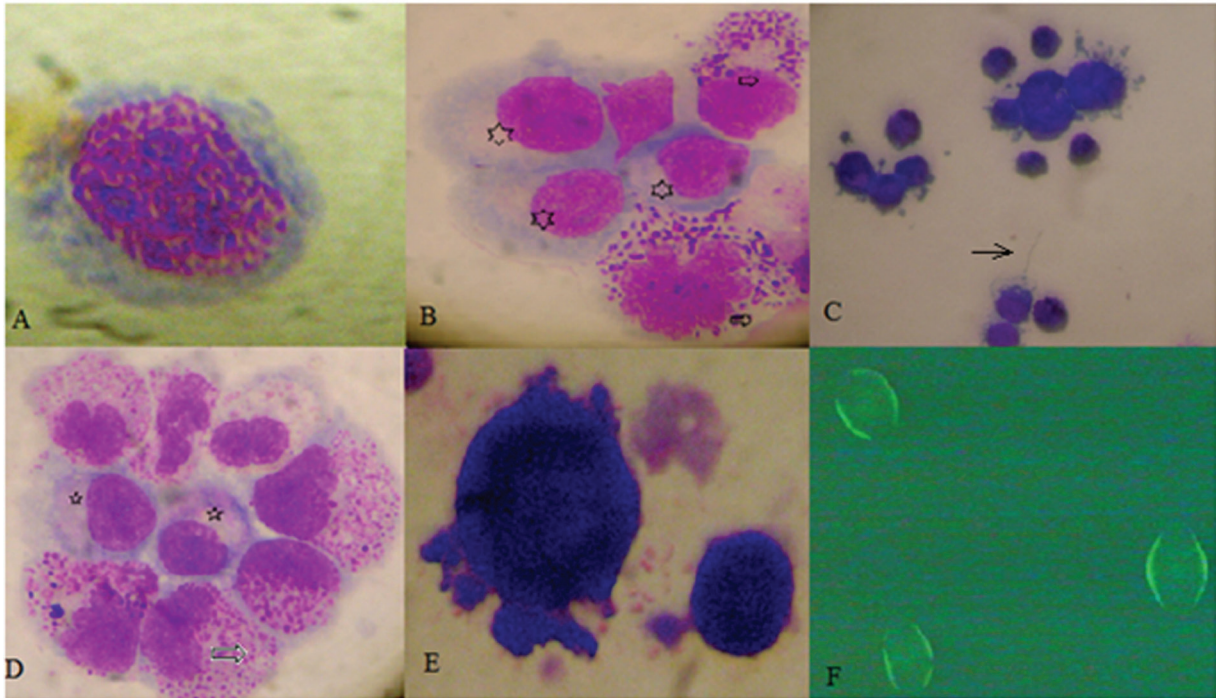
Diğer taraftan HKH'lerin karakterizasyonunda kullanılan yüzey antijenlerinden biri de CD 45'dir. CD 45 antijeni aynı zamanda lökosit ortak antijeni olarak da isimlendirilir. Eritrositler hariç olmak üzere hematopoietik hücre serilerinin tümünde sentezlenmektedir. Yapılan analizlerde, izole kök hücrelerin CD 34+' lığı ile birlikte, CD 45 pozitifliğine de sahip olduğu belirlendi (Şekil 1). *HKH'lerin Morfolojik Bulguları:* Hücre izolasyonu sonucu elde edilen ve May Grünwald-Giemsa ile boyanan CD 34+ HKH'ler ışık mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekildi. Şekil 2A'da yüksek nükleus / sitoplazma oranına sahip, oval (ya da ovale benzeyen) kök hücre görülmektedir. Sitoplazması bazofilik boyanmıştır.



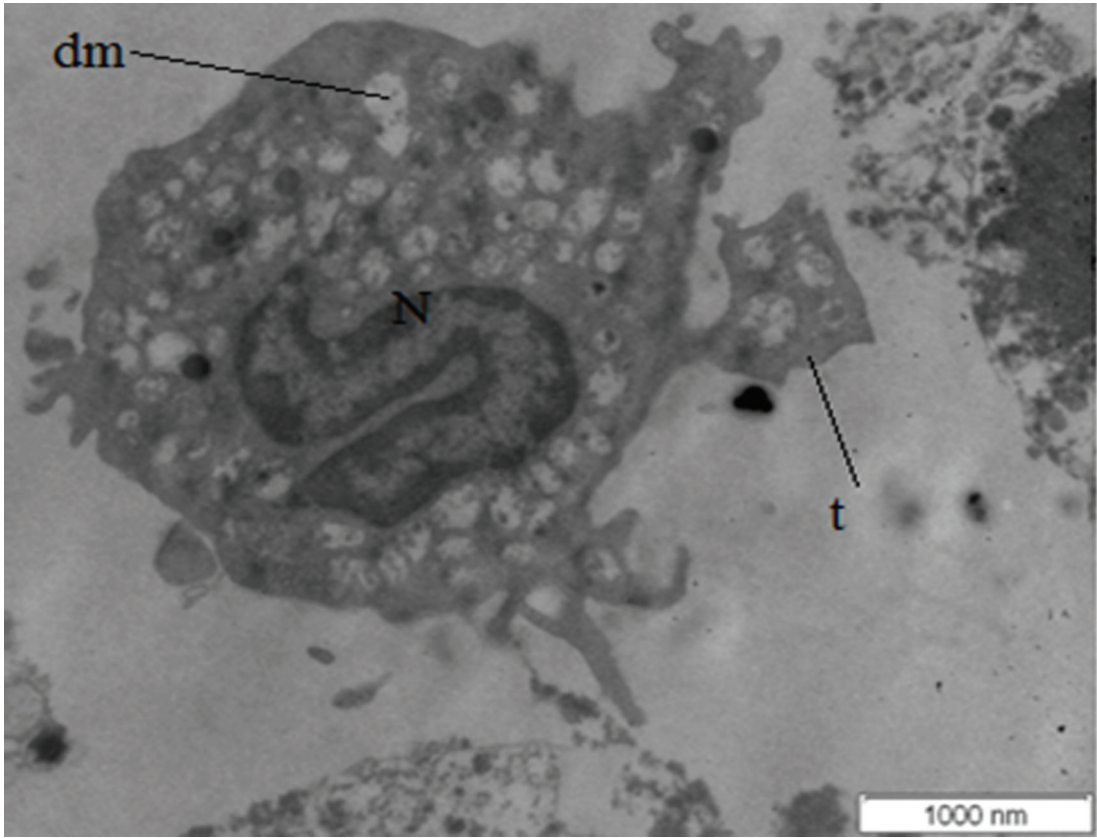
Şekil 1. Hematopoietik kök hücre izolasyonu sonrası hücrelere ait akım sitometrik dot plot diyagramları.

Hücre Farklılaşmasının Morfolojik Bulguları: İki aşamalı likit kültür yöntemiyle farklılaşan hücrelere ait örnekler 7, 14 ve 21. günlerde alınarak May Grünwald- Giemsa boyası ile boyandı ve ışık mikroskopuyla incelendi. Yapılan akım sitometri analizleri sonucunda, kültürün 7. gününden 21. gününe kadar CD 41+ hücre sayısının kademeli olarak arttığı belirlendi. CD 41 yüzey antijeni, sadece trombosit ve megakaryositik hücre serisinde (megakaryoblast, premegakaryosit ve megakaryosit) bulunduğu için akım sitometresiyle bu serideki hücreler tek tek ayırt edilememiştir. Bu nedenle hücrelerin morfolojik özelliklerine dayalı gözlemler yapıldı [19]. Kültürün 7. günde alınan örneklerde megakaryoblast hücrelerin daha baskın olduğu gözlemlendi. Bu hücreler, yüksek bir nükleus/ sitoplazma oranına, az ve bazofilik bir sitoplazmaya sahiptirler. Sitoplazmalarında trombositlere özgü granül oluşumu yoktur. Megakaryoblastlara ek olarak daha seyrek olmakla birlikte olgun megakaryositlerin de kültür ortamında bulunduğu belirlendi (Şekil 2B). Ayrıca yaptığımız incelemelerde olgun megakaryositlerin “proplatelet” adı verilen sitoplazmik uzantılarının oluştuğu ve bu uzantılardan ortama trombosit salınımının gerçekleştiği de gözlemlendi (Şekil 2C). İki aşamalı yöntemle yapılan kültürünün 14. gününde hazırlanan ışık mikroskobu preparatlarında ise premegakaryosit hücreler ile olgunlaşmış megakaryositlerin daha baskın olduğu gözlemlendi. Premegakaryositlerde sitoplazma hacmi artmış, hücre membran bütünlüğü henüz bozulmamış ve granüller oluşmaya başlamıştır. Olgun megakaryositler ise loblara ayrılmış bir nükleu-

sa ve sitoplazmalarında çok sayıda granüllere sahiptir (Şekil 2D). Kültürün 21. gününde hazırlanan preparatlarda, hücrelerin çok sayıda sitoplazmik uzantılara sahip olduğu ve bütünlüklerinin kaybolduğu belirlendi (Şekil 2E). Ayrıca immünohistokimyasal boyama metoduyla, kültür ortamında bulunan hücreler floresan işaretli CD 41 antikoruyla etiketlendi ve floresan mikroskopuyla incelendi. Şekil 2F’de görülen floresan ışımlar, hücrelerin CD 41 antikoruyla kuvvetli pozitif bir reaksiyon verdiğini ve kültür ortamında megakaryositlerin oluştuğunu göstermektedir. Yapılan ince yapısal incelemede de kültürde farklılaştırılan HKH’lerden olgun megakaryositlerin oluştuğu ve ortama trombositlerin salındığı belirlenmiştir (Şekil 3). **Megakaryositlerin DNA İçeriklerine Ait Bulgular:** Megakaryositlerin olgunlaşmasının temel göstergelerinden biri, yine bu hücrelere özgü endomitoz olayıdır. Endomitoz ile 4n veya daha fazla DNA içeriğine sahip olan, tek ve/veya loblu nükleuslu oldukça büyük megakaryositlerin oluşumu sağlanır. Bu çalışmada, kültür ortamında farklılaşmaya başlayan megakaryositlerin olgunlaşmalarını belirlemek için DNA içeriği de ölçüldü. Kültürün 14. ve 21. günlerinde alınan örnekler, akım sitometresiyle analiz edildi. Yapılan değerlendirmeler sonucu, kültürün 14. gününde 2n megakaryositlerin oranı %71,45±2,47; 4n megakaryositlerin oranı %19,9±4,76 ve ≥8n megakaryositlerin ise %8,65±2,45 olduğu belirlendi. 21. günde 2n megakaryositler %85±3,18 4n megakaryositler %12,1±2,42 ve ≥8n megakaryositler %3,4±1,25 oranında bulundu.



Şekil 2. A. İzolasyon sonrası henüz farklılaştırılmamış CD 34+ hematopoietik kök hücrenin ışık mikroskobu görüntüsü (Gün 0). B. Kültürün 7. gününe ait hücrelerin görüntüsü. * işareti megakaryoblastları; → işareti olgunlaşmış megakaryositleri göstermektedir. C. Olgunlaşan megakaryositlerde “proplatelet” (→) adı verilen sitoplazmik uzantıların oluştuğu görülmektedir. D. Kültürün 14. gününde olgun megakaryositlerin () baskın olduğu dikkat çekmektedir. E. Kültürün 21. gününe ait hücre görüntüsü. Boya: May Grünwald- Giemsa, 100X büyütme. F. Kültür ortamında FITC işaretli CD 41 antikoruna kuvvetli pozitif reaksiyon veren megakaryositler, 40X büyütme.



Şekil 3. Kültürde farklılaştırılan megakaryositlerin elektron mikroskopundaki görüntüsü. Olgunlaşan megakaryositlerden trombositlerin (t) salındığı görülmektedir. N: Nukleus, dm: demarkasyon membranı.

Tartışma

DeneySEL ve klinik hematolojinin üzerinde en çok çalışılan konuları, transplantasyonla hastalara verilecek olan HKH'lerin *ex vivo* olarak çoğalmasını sağlayan koşulların ve mekanizmaların aydınlatılmasıdır. Kemik iliği veya mobilize edilmiş periferik kandan izole edilen HKH'lerin transplantasyonu, kanser tedavisi ve kemik iliği transplantasyonu tedavisi durumlarında kullanılan standart bir tedavi yöntemidir [20]. Diğer taraftan, HKH transplantasyonu veya yüksek doz kemoterapi sonrası oluşan şiddetli trombositopeni hastalar için çok ciddi sorun oluşturmaktadır. Trombositopeninin tedavisi konusunda iki farklı yaklaşım ileri sürülmüştür [21]. Birincisi; trombosit üretimini arttırmak için megakaryopoezin endojen olarak çeşitli ajanlarla uyarımıdır. Diğer bir yaklaşım ise trombosit veya trombosit öncül ürünlerinin hastaya transplantasyonudur. Bu iki yaklaşımdan sonuncusu daha çok ilgi çekmiştir. Trombositlerin yaşam ömürlerinin kısa olması ve kan bankalarında uzun süre saklanamamalarından dolayı bu hücrelerin öncülleri olan MPH'lerin hastalara verilmesi çok daha etkin bir yöntem olarak görülmektedir.

Megakaryositler ve megakaryositik hücre serisini oluşturacak olan HKH'ler esas olarak kemik iliğinde konumlanmış olmakla birlikte çok az miktarlarda periferik kanda da bulunmaktadır. Periferik kandan MPH'lerin

izolasyonunun en önemli risklerinden biri, dolaşımdaki aktive trombositlerin veya trombosit mikropartiküllerinin CD 34+ HKH'lere yapışarak artefaktlar oluşturmalarıdır [22]. Yukarıda açıklanan nedenlerin yanında, kültürde farklılaştırılmaya çalışılan megakaryositlerin oluşumunu takip edebilmek için, CD34 ve CD45 boyamalarına ek olarak, trombosit ve megakaryositlere özgül yüzey antijeni olan CD 41 boyaması da uygulanmıştır. Akım sitometre analiz sonuçları, başlangıçtaki CD 34+ hücre oranının oldukça yüksek (%85-90), CD 41 hücre oranının ise negatif olduğunu gösterdi.

Megakaryopoez sitokin, kemokin ve ekstrasellüler matris proteinlerinin de içerisinde bulunduğu karmaşık bir mikroçevrede gerçekleşmektedir. Sitokinler, megakaryositlerin olgunlaşmasında ve trombositlerin salınımında önemli bir role sahiptirler. Fakat bu rolleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmalarda sitokinlerin kombinasyon ve dozlarının, uygulanan stratejilerin ve HKH kaynaklarının farklı olması bu sorunun temelini oluşturmaktadır. Örneğin, megakaryopoezde primer düzenleyici olan TPO'nun düşük dozlarda megakaryositlerin olgunlaşmasını uyarırken; 200 ng/ml ve daha yüksek dozlarda ise inhibe edici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [23,24]. IL-6 ve IL-3'ün de megakaryopoezdeki rolleriyle ilgili birbiriyle çelişkili çalışmalar bulunmaktadır [13, 15, 25, 26].

Bu bilgiler ışığında geliştirilen iki aşamalı likit kültür metodunda TPO, IL-3 ve IL-6 sitokin kombinasyonunu kullanılmıştır. Bu çalışmanın amacı, megakaryopoezin erken döneminde IL-3, IL-6 ve TPO'nun sinerjistik etkisi ile MPH sayısını arttırmak; geç dönemde ise TPO ve IL-6'nın megakaryositlerin olgunlaşmasına olan etkisinden yararlanıp yüksek oranlarda megakaryosit elde edebilmektir. Bu yöntemle CD 34+ hücreleri farklılaştırırken, kültürün 7, 14 ve 21. günlerinde alınan örnekler kantitatif olarak akım sitometrik yöntemle; morfolojik olarak ışık ve elektron mikroskopuyla ve immünolojik olarak floresan mikroskopuyla analiz edilmiştir. CD 34 ve CD 41 antikoru kullanılarak yapılan ikili boyamayla, kültürdeki CD 34+ hücre oranının zamana bağlı olarak azaldığı, CD 41+ hücre oranının ise arttığı belirlenmiştir. 21 günlük farklılaştırma sonucunda CD 41+ hücre oranının ortalama % 74,01±12,3 olduğu saptandı (n=3). Megakaryopoezin erken döneminde IL-3 ve TPO'nun sinerjistik etkilerinden yararlanılan iki aşamalı kültür yönteminin kullanıldığı bir başka çalışmada da yeterli sayıda fonksiyonel insan megakaryositleri elde edilmiştir [27]. Bizim yöntemimizden farklı olarak, bu çalışmada ilk 11 gün süresince TPO ve IL-3'den oluşan serumsuz ortamda, sonraki 7 günde ise sadece TPO içeren serumsuz ortamda inkübe etmişlerdir. Chen ve arkadaşları da kordon kanından izole ettikleri HKH'leri TPO, IL-6, IL-9, GM-CSF (Granülosit-monosit koloni uyarıcı faktör), SCF (kök hücre faktörü), Flt-3 ligand ve IL-3'den oluşan serumsuz ortamda iki aşamalı olarak farklılaştırmışlardır [28]. Bizim yöntemimizden farklı sitokin kombinasyonları, dozları ve zaman aralıklarının kullanıldığı bu çalışmada da yüksek verimlilikte fonksiyonel megakaryositlerin elde edildiği rapor edilmiştir. Sun ve arkadaşları da kordon kanı kökenli CD 34+ hücreleri, bizimkinden farklı sitokin kombinasyonları ve zaman aralıkları kullanarak iki aşamalı yöntemle > %70'den fazla bir oranda megakaryosite farklılaştırmışlardır [23]. Yapılan başka bir çalışmada ise IL-3, IL-6, SCF ve TPO sitokin kombinasyonu kullanılan tek aşamalı yöntemle, periferik kandan izole edilen kök hücrelerin, kemik iliği kökenli hücrelere göre daha yüksek bir oranda megakaryosite farklılaştığı rapor edilmiştir [25]. Megakaryositlerin karakterizasyonu için kullanılan özelliklerinden biri de bu hücrelerin poliploidizasyonudur [29]. Yapılan çalışmalarda sadece 4N ve daha fazla DNA içeriğine sahip olan megakaryositlerin trombosit üretebileceği ileri sürülmüştür [30]. Fakat daha düşük ploidi seviyesine (2N ve 4N) sahip megakaryositlerin de trombosit üretebildikleri ve periferik kandan farklılaştırılan megakaryositlerin, kordon kanından elde edilen megakaryositlerden daha yüksek bir ploidiye sahip oldukları *in vitro* olarak gösterilmiştir [31]. Maltia ve ark (2002) da periferik kandan kültüre edilen megakaryositlerin 14. günde %60 oranında 2N ve %40 oranında ≥4N ploidi gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Yine bu çalışmada kordon kanından farklılaştırılan megakaryositlerin ise %80 oranında 2N ve %20 oranında ≥4N ploidiye sahip oldukları gösterilmiştir [32]. Bu çalışmada da iki

aşamalı kültür yöntemiyle farklılaştırılan megakaryositlerin kültürün 14. gününde %70 oranında 2N ve yaklaşık %30 oranında ≥4N ploidi gösterdikleri akım sitometre-siyle belirlenmiştir.

Çalışmadan elde edilen veriler ve literatür bilgileri ışığında IL-3'ün megakaryopoezin erken evrelerinde HKH ve MPH'lerin proliferasyonunu artırıcı etkisi olduğunu; megakaryositlerin olgunlaşması aşamalarında inhibitör etkisi olduğu söylenebilir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara dayanarak, iki aşamalı yöntemin, periferik kandan izole edilen hematopoietik kök hücrelerin megakaryosit ve trombosit farklılaştırılması için verimli bir yöntem olduğu söylenebilir. Çeşitli kaynaklardan elde edilen hematopoietik kök hücrelerin MPH ve megakaryositlere farklılaştırılmasıyla ilgili yeni *in vitro* tekniklerin geliştirilmesinin, temel ve klinik çalışmalar bakımından büyük bir önem taşıdığını düşünüyoruz. Diğer taraftan, geliştirilen iki aşamalı bu yöntemin bir biyoteknoloji "proses"ine çevrilerek insan sağlığını destekleyecek bir ürün oluşturmak üzere geliştirilebilmesi için yeni teknolojik gelişmelere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu doğrultuda geliştirilecek olan biyoreaktörler ile megakaryositlerin tüm gelişim aşamalarında uygulanan kültür koşullarının optimizasyonu sağlanarak klinik uygulamalar için yeterli sayıda ve fonksiyonel megakaryosit veya trombositlerin üretimi sağlanmış olacaktır.

Bilgi ve Teşekkür

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Başkanlığı (SAG-C-DRP- 070808-0196) tarafından projelendirilmiş olup doktora tezi kaynaklı makedir.

Etik Konular: Çalışma için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan 06.06.208 tarih ve MAR-YÇ-2008-0086 protokol numarası ile etik kurul onayı alınmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarların çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynaklar

- [1] Decaudin D, Vantelon JM, Bourhis JH, Farace F, Bonnet ML et al. *Ex vivo* expansion of megakaryocyte precursor cells in autologous stem cell transplantation for relapsed malignant lymphoma. Bone Marrow Transplantation 2004; 34:1089-93.
- [2] Prince HM, Simmons PJ, Whitty G, Wall DP, Barber L et al. Improved haematopoietic recovery following transplantation with *ex vivo*-expanded mobilized blood cells. Br J Haematol 2004; 126:536-45.
- [3] Huang H and Cantor AB. Common features of megakaryocytes and hematopoietic stem cells: What's the connection? J Cell Biochem 2009; 107: 857-64.
- [4] Caux C, Favre C, Saeland S, Duvert V, Mannoni P et al. Sequential loss of CD 34 and class II MHC antigens on purified cord blood hematopoietic pro-genitors cultured with IL-3: characterization of CD 34-HLA-DR+ cells. Blood 1989; 4:1287-94.
- [5] Zauli G, Vitale M, Falcieri E, Gibellini D, Bassini A et al. In vitro senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes. Blood 1997; 90 (6):2234-43.

- [6] Möhle R, Bautz F, Rafii S, Moore MA, Brugger W et al. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD 34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* 1998; 91(12):4523-30.
- [7] de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994; 369:533-38.
- [8] Kaushansky K. The mpl ligand: molecular and cellular biology of the critical regulator of megakaryocyte. *Stem Cells* 1994; 12:91-6.
- [9] Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest* 2005; 115 (12):3339-47.
- [10] Su RJ, Yang M, Zhang XB, Tsang KS, Fok TF et al. Platelet derived growth factor enhances ex vivo expansion of megakaryocytic progenitors from human cord blood. *Bone Marrow Transplantation* 2001; 27: 1075-80.
- [11] Ungerer M, Peluso M, Gillitzer A, Massberg S, Heinzmann U et al. Generation of functional culture-derived platelets from CD34+ progenitor cells to study transgenes in the platelet environment. *Circ Res* 2004; 95(5):36-44.
- [12] Boyer L, Robert A, Proulx C, Pineault N. Increased production of megakaryocytes near purity from cord blood CD34+ cells using a short two-phase culture system. *J Immunol. Methods* 2008; 332 (1-2): 82-91.
- [13] Navarro S, Debili N, Le Couedic JP, Klein B, Breton-Gorius J et al. Interleukin-6 and its receptor are expressed by human megakaryocytes: in vitro effects on proliferation and endoreplication. *Blood* 1991; 77(3): 461-71.
- [14] Dolzhanskiy A, Basch RS, Karparkin S. The development of human megakaryocytes: III. Development of mature megakaryocytes from highly purified committed progenitors in synthetic culture media and inhibition of thrombopoietin-induced polyploidization by interleukin-3. *Blood* 1997; 89 (2):426-34.
- [15] Lazzari L, Henschler R, Lecchi L, Rebulla P, Mertelsmann R et al. Interleukin-6 and interleukin-11 act synergistically with thrombopoietin and stem cell factor to modulate ex vivo expansion of human CD 41+ and CD61+ megakaryocytic cells. *Haematologica* 2000; 85 (1):25-30.
- [16] van den Oudenrijn S, von dem Borne AE, de Haas M. Influence of medium components on ex vivo megakaryocyte expansion. *J. Hematother Stem Cell Res* 2001;10 (1):193-200.
- [17] Debili N, Hegyi E, Navarro S, Katz A, Mouthon MA et al. In vitro effects of hematopoietic growth factors on the proliferation, endoreplication, and maturation of human megakaryocytes. *Blood* 1991; 77(11): 2326-38.
- [18] Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Ihle JN, Hirai Y et al. Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9035-44.
- [19] Italiano J and Hartwig H. Megakaryocyte development and platelet formation. In (Ed. Michelson AD) *Platelets* 2007; pp 23-44, Elsevier, USA.
- [20] ordignon C, Roncarolo MG Therapeutic application for hematopoietic stem cell gene transfer. *Nature Immunol* 2002; 3: 318.
- [21] Battinelli EM, Hartwig JH, Italiano JE Delivering new insight into the biology of megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Curr Opin Hematol* 2007; 14: 419-26.
- [22] Dercksen MW, Weimar IS, Richel DJ, Breton-Gorius J, Vainchenker W et al. The value of flow cytometric analysis of platelet glycoprotein expression of CD 34+ cells measured under conditions that prevent P-selectin-mediated binding of platelets. *Blood* 1995; 97: 2023-30.
- [23] Sun L, Tan P, Yap C, Hwang W, Koh L Pet al. In vitro biological characteristics of human cord blood-derived megakaryocytes. *Ann Acad Med Singapore* 2004; 33(5): 570-5.
- [24] Choi ES, Hokom MM, Chen JL, Skrine J, Faust J et al. The role of megakaryocyte growth and development factor in terminal stages of thrombopoiesis. *Br J Haematol* 1996; 95(2): 227-33.
- [25] Norol F, Vitrat N, Cramer E, Guichard J, Burstein SA et al. Effects of cytokines on platelet production from blood and marrow CD34+ cells. *Blood* 1998; 91(3): 830-43.
- [26] Vitrat N, Cohen-Solal K, Norol F, Guichard J, Cramer E et al. Compared effects of Mpl ligand and other cytokines on human MK differentiation. *Stem Cells* 1998; 2: 37-51.
- [27] Majka M, Baj-Krzyworzeka M, Kijowski J, Reca R, Ratajczak J et al. In vitro expansion of human megakaryocytes as a tool for studying megakaryocytic development and function. *Platelets* 2001; 12(6): 325-32.
- [28] Chen TW, Hwang SM, Chu IM, Hsu SC, Hsieh TB et al. Characterization and transplantation of induced megakaryocytes from hematopoietic stem cells for rapid platelet recovery by a two-step serum-free procedure. *Exp Hematol* 2009; 37(11):1330-39.
- [29] Hancock V, Martin JF, Lelchuk R. The relationship between human megakaryocyte nuclear DNA content and gene expression. *Br. J. Haematol* 1993; 85: 692-97.
- [30] Chang Y, Bluteau D, Debili N and Vainchenker W. From hematopoietic stem cells to platelets. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 318-27.
- [31] Bornstein R, García-Vela J, Gilsanz F, Auray C, Calés C. Cord blood megakaryocytes do not complete maturation, as indicated by impaired establishment of endomitosis and low expression of G1/S cyclins upon thrombopoietin-induced differentiation. *Br J Haematol* 2001; 114 (2): 458-65.
- [32] Mattia G, Vulcano F, Milazzo L, Barca A, Macioce G et al. Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD 34+ cells are correlated with different levels of platelet release. *Blood* 2002; 99 (3):888-97.