

İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Otolog Serum ile Kültüre Edilmesi

Autologous Serum for Expansion of Human Bone Marrow Derivated Mesenchymal Stem Cell

İlknur KOZANOĞLU,^{1,3} Can BOĞA,³ Erkan MAYTALMAN,² Oktay SÖZER,² Hakan ÖZDOĞU³

¹Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Hematoloji Araştırma Laboratuvarı, Adana

³Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı, Ankara

Başvuru tarihi / Submitted: 25.12.2008 **Kabul tarihi / Accepted:** 27.02.2009

Amaç: Mezenkimal kök hücreler (MKH) en sık kemik iliğinden elde edilen ve bir çok dokuya farklılaşma yeteneğine sahip çok yönelimli öncü hücrelerdir. MKH'ler %10 fetal bovin serumlu (FBS) besiyerinde üretilirler. Bu çalışmada amaç FBS'un olası risklerinden uzaklaştırılması için otolog serum kullanılarak klinik kullanım için uygun MKH üretimini sağlamaktır.

Gereç ve Yöntemler: Yaşları 28-34 arasında değişen 10 kemik iliği donoründen yazılı onamları alınarak 10 mL kemik iliği ve 500 mL periferik kan örneği alındı. Kemik iliğinden fikal yoğunluk derecelendirme yöntemiyle mononükleer hücreler izole edildi. Eşit sayıda hücre (1×10^6 /mL) RPMI-1640 medium kullanılarak %10 FBS, otolog serum (OS), %10, %5, %3 ve %1 konsantrasyonlarında kültüre edildi. Her pasaj arasında morfolojik değerlendirme, hücre sayımı ve akım sitometrik yöntemler kullanılarak immunfenotipik analizler yapıldı. Üçüncü pasaja ulaşan gruplarda yağ dokusuna farklılaştırma gerçekleştirildi.

Bulgular: Hücre sayımı ve izolasyon açısından en iyi grubun %10 OS grubu olduğu gösterildi. Buna ilave olarak %5 OS ve %10 FBS gruplarındaki sonuçların benzer olduğu gözlemlendi. Akım sitometrik sonuçlar değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel fark yoktu. Yağ dokusuna farklılaştırma açısından %3 OS ve %1 OS dışında diğer gruplarda farklılaşma sağlandı.

Sonuç: Sonuç olarak özellikle %10 OS ve %5 OS kullanılarak MKH kültürleri yapılabileceği saptandı.

Anahtar sözcükler: Mezenkimal kök hücre; otolog serum; kemik iliği; fetal buzağı serum.

Objective: Mesenchymal stem cells (MSC), mostly derived from bone marrow, are capable of differentiating into many tissues. In the culture medium consisting of 10% fetal bovine serum (FBS), MSCs can grown easily. To obtain insights into their ex-vivo expansion, the role of the autologous serum (OS) on growth and differentiation capacity of human bone marrow MSCs in comparison to cells grown in FBS was studied.

Material and Methods: MSCs were cultured by using a RPMI-1640 medium consisting of 10% FBS, and OS 10%, 5%, 3% and 1%. Equally, 1×10^6 /mL cells were incubated into each flask. Cell count, viability, and flow cytometry studies were done at every passage after completing detachment in the cultures.

Results: 10% OS group was found to be superior compared to the other study groups as regard to cell count and isolation. In addition, it has been observed that similar results were found in 5% OS and 10% FBS groups. Immunophenotyping analysis of the cells revealed no statistical difference between the groups. MSCs isolated from all study groups were successfully differentiated into adipogenic lineages except 3% and 1% OS groups.

Conclusion: The expansion potency from bone marrow-derived MSCs was maintained in culture media using 10% and 5% OS.

Key words: Mesenchymal stem cell; autologous serum; bone marrow; fetal bovine serum.

GİRİŞ

Kemik iliği hücreleri kültür kaplarında kültüre edildikleri zaman hızla plastik kültür kaplarına yapışan hücrelerin kemik iliği stromal hücreleri olduğu ve kültür kabına yapışmayan hücrelerin ise hematopoietik hücreler olduğu bilinmektedir.^[1-3] İlk kez 1970'li yıllarda Friedenstein ve ark. uzun dönem kemik iliği kültürlerinde kültür kabına yapışan hücreleri tanımlamışlar ve bu hücrelere 'fibroblast koloni oluşturan birim' (CFU-F) adını vermişlerdir.^[4,5] Daha sonraki yıllarda ise bu hücreleri tanımlamak için, kemik iliği stromal fibroblastları ve kemik iliği stromal hücreleri gibi terimler kullanılmışsa da günümüzde en çok mezenkimal kök hücreler (MKH) ve mezenkimal progenitor öncü hücreler (MPH) ifadeleri kullanılmaktadır.^[1,2]

MKH yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri olan çok yönelimli (pluripotent) öncü (progenitor) hücrelerdir. MKH kemik iliğinden kolaylıkla elde edilebilirler ve canlı dışı (*in vitro*) olarak çoğaltılabilirler. Bu hücrelerin kemik fizyolojisinde, kemiğin yeniden yapılanmasında ve hematopoeziste önemli rol oynadıkları gösterilmiştir.^[5-8] MKH'ler kemik iliği dışında kordon kanı, kordon stroması, fetal dokular, plasenta, amniyon sıvısı ve yağ dokusu gibi dokulardan da izole edilerek kültüre edilmektedirler. Kolay çoğalma, yüksek farklılaşma ve bağışıklık sistemini baskılayıcı özelliklerinden dolayı klinikte bu hücrelere duyulan ilgi her geçen gün artmaktadır.^[9-15]

MKH üretiminde değişik protokoller kullanılsa da temel teknik plastiğe yapışma özeliği gösteren kemik iliği mononükleer hücrelerinin 5-7. günde yaptıkları kolonilerin 14.gün toplanarak yeniden pasajlanmasıdır. En sık kullanılan besi yerleri (medium) DMEM- LG, IMDM ve RPMI-1640 olup, %10 fetal buzağı serum (FBS) ile kültür desteklenir.^[1,9,10] Son yıllarda FBS kullanımına bağlı alerji ve bazı prion bulaş riski nedeniyle farklı kültür teknikleri denenmektedir. Serumsuz media kullanımı, trombosit zengin plazma, AB pozitif serum bunlardan bazılarıdır.^[16-25]

Bu çalışmada sağlıklı vericilerden elde edilen MKH'lerin, %10 otolog serum (OS), %5 OS, %3 OS ve %1 OS kullanılarak kültüre edilmesi ve FBS ile kültüre edilen MKH'lerle sayı, görünüm, immunfenotipik özellikler ve yağ dokusuna farklılaşma yönünden karşılaştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hasta seçimi ve örneklerin hazırlanması

Etik kurul onayı alınarak (BÜ KA05/98) Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Hastanesi Kemik İliği Nakil Ünitesi'nde, HLA 6/6 uygun periferik kök hücre vericilerinden, bilgilendirilmiş onam alınarak, 10 ml kemik iliği örneği kemik iliği aspirasyon setleri yardımıyla alındı. Antikoagülan olarak non-prezervatif heparin (Sigma-Aldrich) kullanıldı. Çalışmaya yaşları 28-34 arasında değişen 10 sağlıklı donör katıldı.

Çalışma grupların oluşturulması ve MKH'lerin kültüre edilmesi

Alınan kemik iliği örneğindeki mononükleer hücreler yoğunluk derecelendirmeli ayırışım yöntemiyle elde edildi. Kemik iliği 1:2 oranında PBS (phosphate-buffered saline) ile seyreltildi ve yoğunluğu 1.077 gr/ml olan ficoll üzerine yavaş bir şekilde eklenerek tabakalandırıldı ve 2000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Toplanan hücreler iki kez PBS ile yıkandıktan sonra hücre sayısı, hücre sayım cihazı (Cell Dyn 3700, Chicago, IL, USA) ve thoma lamında (Marienfeld, GmbH and C. Lauda-Königshofen, Germany) sayılarak belirlendi. Daha sonra hücreler T-25 flasklarda (25 cm²'lik tüp) hücre sayısı 1x10⁶/mL olacak şekilde, RPMI-1640 (StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada), %1 penisilin/streptomisin (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) ve L- glutamin (Gibco, Invitrogen) içeren besi yerine ekildi ve 37°C, %5 CO₂ ve nemli ortamda çoğaltıldı.

Kültürler 48 saat sonra ortamı yenilenerek flask tabanına yapışmayan hücreler atıldı. Tüm flasklar her gün düzenli olarak inverted (ters çevrilmiş) ışık mikroskopunda incelendi, fotoğraflar çekildi ve 3-4 günde bir besiyeri değiştirilerek, hücreler çoğaltıldı. Hücreler 14. gün sounda flask tabanının %80'ini kapladığında, %0.25'lik tripsin ile birlikte 0.1mM EDTA (StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada) yardımıyla zeminden kaldırıldı ve yeniden pasajlandılar. Bu şekilde 3 pasaj boyunca hücreler ekilerek çoğaltılmaya çalışıldı. Gruplar, grup 1 klasik %10 inaktive FBS, grup 2 %10 otolog serum (OS), grup 3 %5 OS, grup 4 %3 OS ve grup 5 ise %1 OS içeren serumlu besi yerlerinden oluşturuldu. Tüm gruplarda her pasajda hücre sayısı, morfolojik değerlendirme ve akım sitometrik değerlendirmeler yapıldı. Üçüncü pasaja ulaşan gruplarda yağ dokusuna farklılaştırma gerçekleştirildi.

Serum Eldesi

Tüm donörlerden serum elde etmek amacıyla ve fistül iğnesi yardımıyla üçer ay arayla iki ayrı zamanda yaklaşık 500 mL periferik kan alındı. Örnekler 1500 rpm'de santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve 10 ml'lik porsiyonlara ayrılarak -20°C'de kullanılacakları güne kadar saklandılar.

MKH'lerin immunfenotiplendirilmesi (Akım sitometrik çalışma)

İnsan kemik iliğinden elde edilen MKH'lerin immunfenotipik özelliklerini göstermek amacıyla akım sitometri cihazı ve özgün antikorlar kullanıldı.^[26] Antikor paneline MKH'lere özgü CD105 FITC (Serotec, Oxford, UK), CD73 PE ve CD166 PE (Becton- Dickinson, BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA) antikorları yanında hematopoietik hücrelere özgü CD 45 PC5 ve CD 34 ECD (Beckman Coulter, Marsilia, France) konuldu. İstotopik kontrol amacıyla IgG1 FITC, PE, PC5 ve ECD boyları (Beckman Coulter) kullanıldı.

Çalışma için oluşturulan iki tüpten birincisine CD105/CD73/CD34/CD45 ve ikincisine ise CD105/CD166/CD34/CD45 konuldu, her tüpe 5×10^5 MKH süspansiyonu eklendi. Akım hızı saniyede yaklaşık 200 hücre olacak şekilde her bir örnekten 200.000 hücre sayıldı. Çalışmalar Beckman Coulter Epics XL-MCL cihazı ile yapıldı ve analizler EXPO 32 ADC (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA) yazılımı kullanılarak çözümlendi.

Adipogenik (Yağ Dokusu) Farklılaşma

Her grupta 3. pasaja ulaşan flaksta yağ dokusuna farklılaştırma amacıyla 0.5 mM methyl-isobutylxanthine (Sigma- Aldirch), $10 \mu\text{g/ml}$ insan rekombinant insülin (Lilly France S.A.S, Fegersheim, France) ve $1 \mu\text{M}$ dek-sametazon (Fluka, Deva, İstanbul, Türkiye) kullanıldı. Flakslardaki besi yeri her 3-4 günde bir tazelandı. Yirmi bir gün sonra lipid damlacıklarını görebilmek amacıyla Oil- Red O boyası ile boyandı ve Nikon Eclipse TS 100 inverted mikroskopta incelendi.^[27]

İstatistik

Bütün gruplarda ortalama ve standart sapmalar ($\text{ort} \pm \text{std}$) hesaplandı. Monoklonal antikorların yüzde yüzey ifadeleri z testi ile karşılaştırıldı. Tüm analizler SPSS (Statistical Product and Services Solutions 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı ile çözümlendi.

$p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

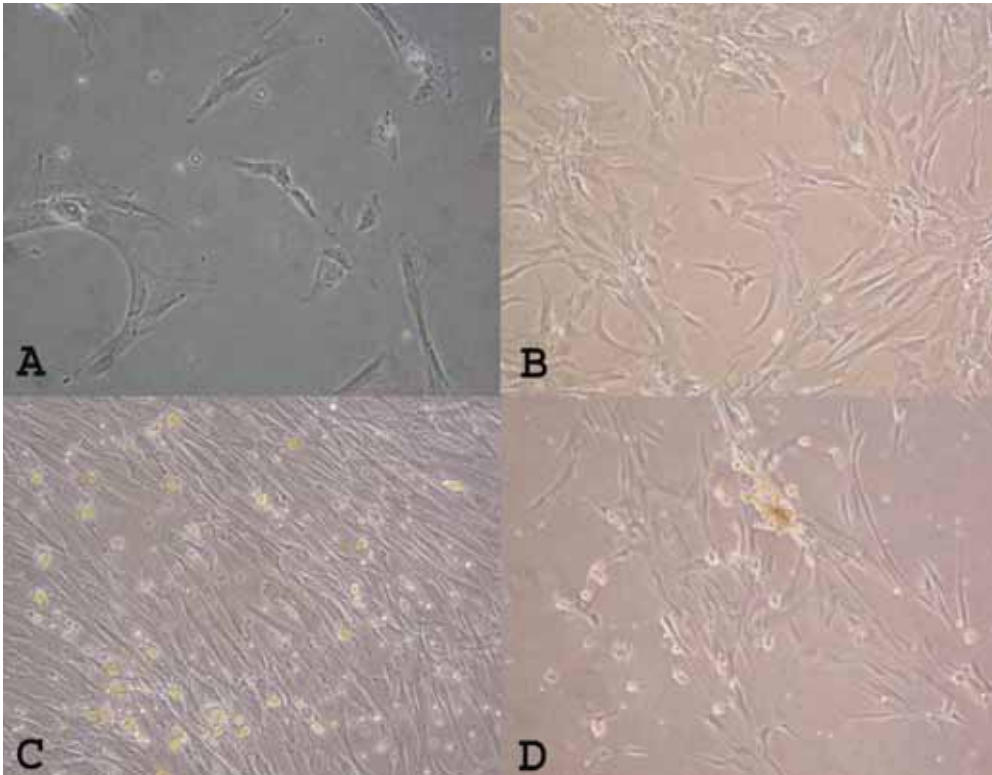
Sayı ve morfoloji

Her üç donörden yoğunluk derecelendirmeli ayrışım yöntemiyle elde edilen mononükleer hücreler eşit sayıda ($1 \times 10^6/\text{ml}$) ancak 5 değişik serum konsantrasyonunda besi yerlerine eklendi. Tüm vakalarda %1 OS ile kültüre edilen flakslarda yapışan hücre olmadığından, bu konsantrasyonda kültüre devam edilemedi. %3 OS ile kültüre edilen grupta hücrelerin klasik görünümünden, iğsi fibroblast benzeri, uzak oldukları gözlemlendi (Şekil 1 A).

Diğer gruplarda ise benzer morfolojik özellikler sergileyen, iğ şeklinde ve fibroblast benzeri, hücre topluluklarının flask tabanına yapışmış oldukları gözlemlendi (Şekil 1B, C ve D). Bu gruplarda 3 pasaj boyunca kültüre devam edildi.

Her üç pasajda çoğaltılan MKH'lerden sayı olarak, %10 OS ile kültüre edilen grupta en yüksek rakamlara ulaşıldı. %10 OS (grup 2) grubunda elde edilen MKH sayısı diğer gruplarla karşılaştırıldığında tüm pasajlarda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.05$; Tablo 1).

%3 OS (grup 4) ile kültüre edilen grup en düşük sayıda hücrenin elde edildiği grup olarak gözlemlendi. %10 FBS ve %5 OS ile kültüre edilen gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p > 0.05$; Tablo 1).



Şekil 1. Mezenkimal kök hücreler A: %3 Otolog serum grubu, B: %10 Fetal buzağı serum grubu, C: %10 Otolog serum grubu, D: %5 Otolog serum grubu

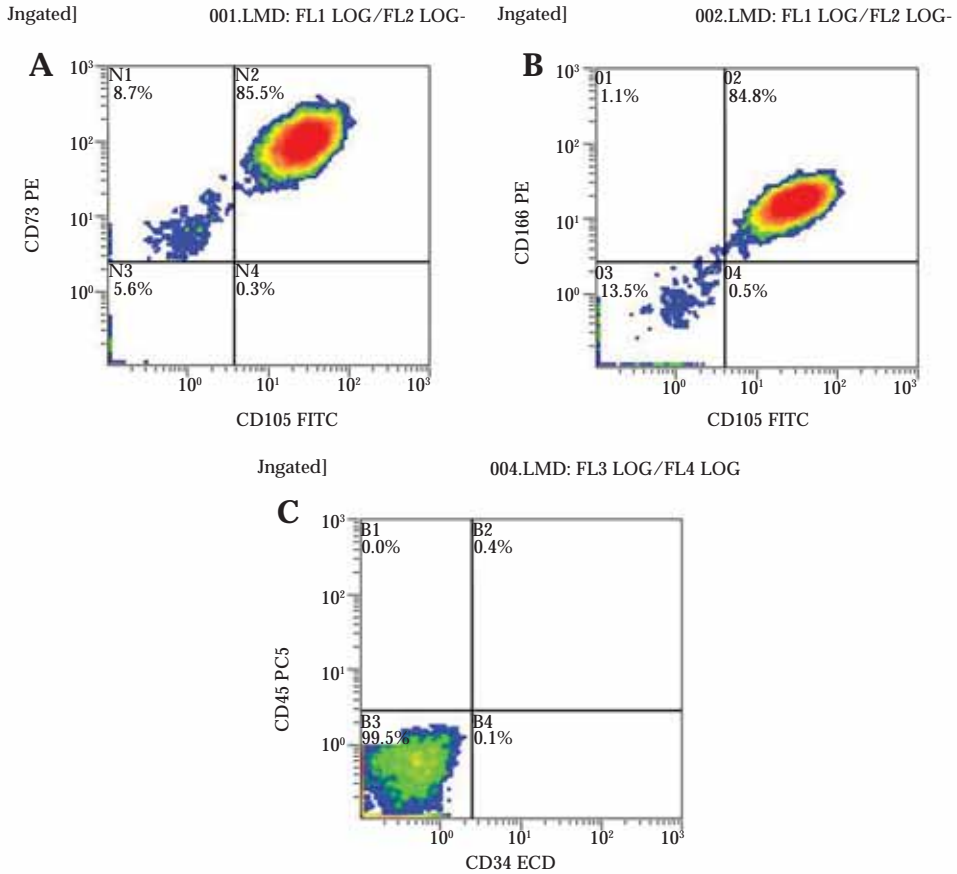
İmmunfenotipik Özellikler

Tüm gruplardaki MKH'lerin akım sitometri ile yüzey antijenleri belirlenmeye çalışıldı. MKH'lerin stromal ve yapışma özelliklerini gösteren CD73, CD105 ve CD166 antikorlarını hücre yüzeylerinde ifade ettikleri ancak hematopoietik hücrelere özgü olan CD45 ve CD34'ü ifade etmedikleri gözlemlendi (Şekil 2A, B ve C).

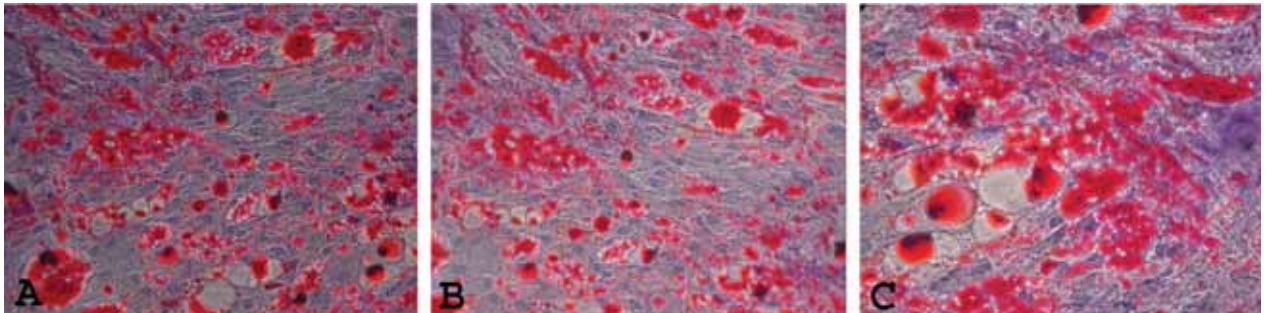
Tüm gruplarda her üç pasajda da yüzey antijenlerinin ifadelerinin yüzdesi yönünden istatistiksel olarak farklılık gözlemlenmedi ($p>0.05$).

Adipojenik Farklılaşma

Adipojenik farklılaşma için her gruptan 3. pasaj hücreleri kullanıldı. MKH'lerin uygun sitokin desteği ile yağ dokusuna farklılaşmaları gözlemlendi. Grup 4 haricinde diğer gruplarda MKH'lerin yağ dokusuna dönüştükleri görüldü. Grup 1, 2 ve 3' de 21 gün sonunda yağ damlacıklarını gösterebilmek amacıyla Oil Red-O boyası ile boyandı. Çekirdekleri kenara itilmiş yağ damlacıklarının kırmızı renge boyandığı gözlemlendi (Şekil 3A, B ve C).



Şekil 2. Mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri ile yüzey antijenlerinin belirlenmesi A: CD73 ve CD105, B: CD166 ve CD105, 2C: CD45 ve CD34



Şekil 3. Yağ dokusuna dönüşümün Oil red O boyası ile gösterilmesi A: %10 Fetal buzağı serum grubu, B: %10 Otolog serum grubu, C: %5 Otolog serum grubu

TARTIŞMA

Klinisyen ve bilim adamları tedavi amacıyla birçok kök hücre tipine ilgi duysa da, bunlar arasında en popüler olanı MKH'lerdir. MKH'ler kolay elde edilebilmeleri, güçlü çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri ile tamir edici tıbbın önemli elemanları haline gelmişlerdir. Bu hücreler bu gün birçok klinik çalışmada denenmektedir. Yara iyileşmesinde, damarsal ve kalp hastalıklarının tedavisinde, osteogenezis imperfecta tedavisinde ve nörolojik hastalıklarda kullanılmaktadırlar.^[1,8-11]

MKH'lerin başta hematopoietik kök hücre nakilleri, doku mühendisliği ve gen tedavileri olmak üzere birçok alanda klinik kullanım potansiyeli olması bu hücrelere duyulan ilgiyi her geçen gün arttırmaktadır. Kardeşten yapılan hematopoietik kök hücre nakillerinde MKH infüzyonu yalnız engraftmanı hızlandırmakla kalmayıp, aynı zamanda akut ve kronik GvHD (graft versus host) sıklığını da azaltmaktadır. Birçok çalışmada MKH'lerin bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde rol oynadığı ve bağışıklık yanıtını baskıladığı kanıtlanmıştır.^[12,28]

MKH'lerin kemik iliği de dahil tüm dokularda çok az sayıda bulunması nedeniyle deneysel veya klinik olarak kullanımı için canlı dışı kültür besi yerine ekilmesi gerekir. MKH'lerin klinik kullanım için yeterli sayıya ulaşmalarını sağlayan en uygun besi yeri %10 veya %20 FBS kullanıldığı kültür ortamlarıdır. Bu hücrelerin klinik kullanımını sınırlayan en önemli etken ise FBS ile kültüre edilmeleridir. Çünkü FBS'un muhtemel bakteriyel, viral ve Creutzfeldt-Jakob hastalığına sebep olan prion efeksiyonlarına yol açabilmesidir. Diğer sorunlar ise FBS'un içerdiği sığırtı proteinleri nedeniyle sistemik veya yerel inflamatuvar reaksiyonlara neden olmasıdır. Bu etkilerin özellikle tekrarlayan uygulamalar sonrası daha sık görüldüğü rapor edilmiştir. Bu nedenle pek çok ülkede FBS kullanımını sınırlayan düzenlemeler yapılmıştır.^[16-22]

Bu problemlerin çözümü için, literatürde MKH'leri kültüre etmek amacıyla AB serum, trombosit zengin plazma, otolog serum ve ya serumsuz besi yerlerinin kullanılması denenmiştir. Shigeno ve Ashton^[29] OS'un FBS'dan daha üstün olduğunu söylerken, Anselme ve Yamamoto^[30,31] OS ve FBS ile kültüre ettikleri MKH'lerde benzer şekilde sonuçlar elde ettiler. Koller, Kuznetsov ve Yamaguchi^[32-34] gibi diğer bazı araştırmacılar ise FBS ile daha iyi sonuçlar rapor ettiler. Yılmaz ve ark. %10 OS ve %10 FBS karşılaştırması yaptıkları çalışmalarında çoğalma kapasitesi açısından otolog serum ile kültüre edilen MKH'lerin daha hızlı çoğaldıklarını gösterdiler.^[21]

Değişik konsantrasyonlarda OS kullanılarak %10 FBS ile karşılaştırılmasının yapıldığı ilk çalışma 2004 yılında Stute ve arkadaşları tarafından sunulmuştur. Stute^[22] %1, %3, %10 OS kullanılarak MKH'leri kültüre etti. Bu çalışmada koloni oluşumu, proliferasyon ve differansiyasyon yetenekleri açısından %10 OS grubunun %10 FBS kadar iyi olduğu rapor edilmiştir.

Tablo 1. Tüm gruplarda 3 pasaj boyunca elde edilen mezenkimal kök hücre sayıları

| GRUP | HÜCRE SAYISI (x10 ⁶) | | |
|---------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 1. PASAJ | 2. PASAJ | 3. PASAJ |
| %10 FBS | 3.8±1.2 ^a | 12.3±2.8 ^a | 23.5±8.1 ^a |
| %10 OS | 5.6±2.2 ^b | 20.4±5.3 ^b | 56.8±6.1 ^b |
| %5 OS | 4.2±1.0 ^a | 12.8±2.3 ^a | 26.2±3.4 ^a |
| %3 OS | 2.8±0.9 ^c | 4.5±1.4 ^c | 4.8±1.0 ^c |
| %1 OS | - | - | - |

%10 FBS ve %5 OS grupları arasında hücre sayıları açısından fark yok (*p>0.05).

%10 OS grubundaki hücre sayısı tüm gruplardan anlamlı derecede yüksek (^bp<0.05).

%3 OS grubunda hücre sayısı tüm gruplardan anlamlı derecede düşük (^bp<0.05).

%1 OS ile yapılan kültürlerde başarı sağladıklarını rapor etseler de, %1 OS ve %3 OS grubundaki sonuçların %10 FBS grubuna göre daha kötü olduğunu bildirdiler (Şekil 3 A, B, C).

Bizim çalışmamızda, tüm donörlerde %1 OS ile yapılan deneylerde yapışan hücre ve koloni oluşumuna rastlanmadı. Hücre sayısı açısından en iyi grubun %10 OS grubu olduğu, %5 OS ve %10 FBS'un benzer sonuçlar içerdiği gözlemlendi. Sırasıyla %3 OS ve %1 OS gruplarının en kötü gruplar olduğu söylenebilir (Tablo1). Yağ dokusuna dönüşümleri açısından %10 OS, %10 FBS, %5 OS benzer olduğu ancak %1 ve %3 OS gruplarında yağ dokusuna farklılaşma olmadığı gözlemlendi (Şekil 1).

FBS'un olası risklerinden uzaklaşmak için, MKH'lerin OS kullanılarak kültüre edilmesi ve çoğaltılmaya çalışılması uygun bir yol olarak dikkati çekmektedir. Ancak %10 OS elde edilebilmesi için yaklaşık 200-300 mL venöz tam kana ihtiyaç vardır ve pasaj sayıları arttıkça bu miktar daha da artacaktır. Bu nedenle kullanılan OS yüzdesi önem kazanmaktadır. Literatürde ulaşılabilen kaynaklarda, %5 OS kullanılarak yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Çalışmamızda en iyi sonuçları %10 OS kullanılan gruplarda elde etmiş olsak da %5 OS kullanımının, gerek %10 FBS ile benzer sonuçlar içermesi ve gerekse daha az seruma ihtiyaç duyulması açısından, daha uygun olacağı kanısındayız.

Sonuç olarak otolog serum kullanılarak MKH'lerin elde edilmesi ve differansiyasyonları mümkün olabilir. Ancak en uygun konsantrasyonun belirlenmesi önemlidir. MKH'lerin üretim standardizasyonu, kalite kontrolünün yapılması ve klinikte kullanımı ile ilgili hala pek çok sorun vardır. Bu sorunların aşılması ve standart uygulamalara geçilebilmesi ancak prelinik çalışmaların validasyonu ile mümkündür.

Teşekkür

Bu çalışmada sağladığı teknik desteklerden ötürü Sayın Ömer Keleş'e teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, herhangi bir çıkar çatışmasının söz konusu olmadığını bildirmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9:641-50.
2. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: Hype and reality. *Hematology* 2002;369-91.
3. Dazzi F, Horwood NJ. Potential of mesenchymal stem cell therapy. *Curr Opin Oncol.* 2007;19:650-5.
4. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV, Petrakova, Osteogenesis in transplants of bone marrow cells, *J Embryol Exp Morphol* 1996;16:381-90.
5. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes, *Int Rev Cytol* 1976; 47: 327-59.
6. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.* 2006;20:161-71.
7. Valtieri M, Sorrentino A. The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *J Cell Physiol.* 2008;217:296-300.
8. Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J Cell Physiol.* 2008;15;218:237-45.
9. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use, *Bone Marrow Transplant* 1995;16:557-64.
10. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* 2000;28:875-84.
11. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al., Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 2002;99:8932-7.
12. K. Le Blanc, C. Tammik, K. Rosendahl, E. Zetterberg and O. Ringden, HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells, *Exp Hematol* 2003;31:890-6.
13. Psaltis PJ, Zannettino AC, Worthley SG, Gronthos S. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells.* 2008;26:2201-10.
14. Verfaillie CM, Schwartz R, Reyes M, Jiang Y. Unexpected potential of adult stem cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;996:231-4.
15. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-7.
16. L. Tuschong SL, Soenen RM, Blaese F, Candotti and LM. Muul, Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy, *Hum Gene Ther* 2002;13:1605-10.
17. Mackensen A, Dräger R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A. Lindemann, Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells, *Cancer Immunol Immunother* 2000;49:152-6.
18. Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Fleisher, Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions, *Blood* 1997;89:776-9.
19. MacDermott RP, Bragdon MJ. Fetal calf serum augmentation during cell separation procedures accounts for the majority of human autologous mixed leukocyte reactivity, *Behring Inst Mitt* 1983;122-8.
20. Yamamoto N, Isobe M, Negishi A, Yoshimasu H, Shimokawa H, Ohya K et al. Effects of autologous serum on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells, *J Med Dent Sci* 2003;50:63-9.
21. Yilmaz M, Ovali E, Akdogan E, Durmus A, Sonmez M, Dikmen T, et al. Autologous serum is more effective than fetal bovine serum on proliferation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *Saudi Med J.* 2008;29:306-9.
22. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F and Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Experimental Hematology* 2004;32:1212-25.
23. Vogel JP, Szalay K, Geiger F, Kramer M, Richter W, Kasten P. Platelet- rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. *Platelets* 2006;17:462-9.
24. Klein R, Dumble RJ. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion *Lancet* 1993;341:768.
25. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A et al. A new variant Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996;347:921-5.
26. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies, *Bone* 1992;13:69-80.
27. Lillie RD. Various oil soluble dyes as fat stains in the supersaturated isopropanol technic. *Stain Technol.* 1944;19:55-8.
28. Fibbe WE, Noort WA. Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;996:235-44.
29. Shigeno Y, Ashton BA. Human bone-cell proliferation in vitro decreases with human donor age. *J Bone Joint Surg BR.* 1995;77:139-42.
30. Yamamoto N, Isobe M, Negishi A, Yoshimasu H, Shimokawa H, Ohya K, et al. In vitro control of human bone marrow stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng.* 2002;8:941-53.
31. Yamamoto N, Isobe M, Negishi A, Yoshimasu H, Shimokawa H, Ohya K, et al. Effects of autologous serum on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells. *J Med Dent Sci.* 2003;50:63-9.
32. Koller MR, Maher RJ, Manchel I, Oxender M, Smith AK. Alternatives to animal sera for human bone marrow cell expansion: human serum and serum-free media. *J Hematother.* 1998;7:413-23.
33. Kuznetsov SA, Mnakani MH, Robey PG. Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation.* 2000;70:1780-7.
34. Yamaguchi M, Hirayama F, Wakamoto S, Fujihara M, Murahashi H, Sato N, et al. Bone marrow stromal cells prepared using AB serum and bFGF for hematopoietic stem cells expansion. *Transfusion* 2002;42:921-7.