

Kemik İliği Kök Hücreleri ve Bu Hücrelerde Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

Bone Marrow Stem Cells and Genotoxicity Studies in These Cells: Review

Tuğbagül ÇAL,^a
Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT^a

^aFarmasötik Toksikoloji AD,
Hacettepe Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi, Ankara

Geliş Tarihi/Received: 30.06.2016
Kabul Tarihi/Accepted: 05.09.2016

Yazışma Adresi/Correspondence:
Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT
Hacettepe Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Toksikoloji AD, Ankara,
TÜRKİYE/TURKEY
uundeger@hacettepe.edu.tr

ÖZET Kök hücreler; uzun süre bölünebilme, kendini yenileme ve farklılaşma özellikleri nedeni ile kimyasal maddelerin insan üzerindeki olası toksik etkilerinin değerlendirilmesinde alternatif bir çalışma alanı hâline gelmiştir. Kemik iliği, hematopoietik ve mezenkimal kök hücreleri tedavisindeki kullanımının yanı sıra ilaç geliştirme ve toksikolojik analizler açısından da önemli bir yere sahiptir. Çeşitli kemik iliği hastalıklarının mekanizmalarının anlaşılması, kimyasal maddelerin toksik etkilerinin belirlenmesi ve ilaç etkinliğinin uygun mikroçevrelerde incelenmesi amacıyla hematopoietik ve mezenkimal kök hücrelerde gerçekleştirilmiş çok sayıda genotoksisite çalışması bulunmaktadır. Hematopoietik kök hücrelerde yapılmış çalışmalarda çoğunlukla, katekol ve kinon gibi metabolitleri aracılığıyla hematopoietik dokulara zarar verdiği bilinen benzenin toksik etkileri incelenmiştir. Bu çalışmalarda, DNA hasarı ve apoptoz belirteci genlerin ekspresyonlarında artış olduğu ve p53/p21 hiperaktivasyonunun DNA hasar mekanizmasından sorumlu olduğu belirlenmiştir. Kemoterapide kullanılan melfalan ve Sisplatinin hematopoietik kök hücrelerdeki etkileri incelendiğinde, CD34+ hücrelerinde CD34- hücrelerine kıyasla daha fazla DNA tek zincir kırıkları gözlenmiştir. Hücre kültür ortamının etkileri mezenkimal kök hücreleri kullanılan çalışmalarda incelenmiş, geç dönem pasajlarında artan atipik ve apoptotik hücreler, DNA bütünlüğünün korunmasında kültür koşullarının önemini göstermiştir. Mezenkimal kök hücrelerinde yapılan diğer çalışmalarda, demir oksit nanopartikülleri ve kobalt çinko ferrit nanopartikülleri DNA hasarına yol açar iken SiO₂ nanopartikülleri sitotoksik ve genotoksik etkiler göstermiştir. Ancak, kök hücrelerle gerçekleştirilen az sayıda genotoksisite çalışması bulunmaktadır. Genotoksik maddelerin sebep olduğu DNA hasar mekanizmalarının aydınlatılması ve kemik iliği kök hücrelerinin toksikoloji alanındaki in vitro/in vivo yöntemlere geçerli ve güvenilir alternatif olabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Kök hücreler; hematopoietik kök hücreler; mutajenlik testleri

ABSTRACT Stem cells has become an alternative field of study to assess possible toxic effects of chemicals on human with long term division, self renewal and multi-lineage differentiation properties. Bone marrow hematopoietic and mesenchymal stem cells as well as their use for medical treatment, also have an important place in drug development and toxicological analyzes. There are many genotoxicity studies performed with the purpose of understanding the bone marrow disease mechanisms, determining toxic effects of chemicals and investigating drug efficiency in suitable microenvironment. In studies performed in hematopoietic stem cells ordinarily toxic effects of benzene were examined, such as catechol and quinone which known to cause damage to the hematopoietic tissue through metabolites. In these studies, the expression of DNA damage and apoptosis marker genes are increased and p53/p21 activation was found to be responsible for DNA damage mechanism. When, hematopoietic effects of chemotherapy used melfalan and cisplatin on stem cells investigated, more DNA single strand breaks were observed in CD34+ cells compared to CD34- cells. The effects of cell culture environment are investigated in the studies which are used mesenchymal stem cells, increase of atypic and apoptotic cells in late term passages indicated the importance of cell culture environment for DNA integrity. In other studies of mesenchymal stem cells, iron oxide nanoparticles and cobalt-zinc ferrite nanoparticles led to DNA damage, but SiO₂ nanoparticles have revealed that the cytotoxic and genotoxic effects. But, there are few genotoxicity studies conducted in stem cells, so future studies are needed to elucidate genotoxic substances based DNA damage mechanisms and use the bone marrow stem cells as valid and reliable alternatives of in vivo/in vitro toxicological methods.

Key Words: Stem cells; hematopoietic stem cells; mutagenicity tests

Kök hücreler, organogenez ve doku oluşumundaki rollerine bağlı olarak yenileyici tedavideki kullanımlarının yanı sıra ilaç ve kimyasalların güvenilirlik araştırmalarında da önemli bir yere sahiptir.^{1,2} Olgunlaşmamış kök hücrelerin çoğaltılması ve farklılaşmış hücrelerin elde edilmesi, özellikle insan embriyonik ve sinir kök hücrelerinin izolasyonu ile indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin keşfedilmesinden sonra yoğun bir çalışma alanı hâline gelmiştir.¹

Ksenobiyotiklerin insandaki toksik etkilerinin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu değerlendirmeler, ksenobiyotik vücuda alındıktan sonra doğrudan ya da dolaylı olarak etkileştiği üç tip hücre (erişkin kök hücreleri, geçici çoğalan hücreler ve terminal olarak farklılaşmış hücreler) ve immün sistem hücreleri ile yapılmaktadır. Ayrıca, in vitro ve deney hayvanlarında gerçekleştirilen in vivo toksisite testleri ile elde edilen bilgilerin insana uyarlanmasında çeşitli zorluklar bulunmaktadır. Bu nedenlerle, insan kök hücreleri ve 3D kültür sistemleri alternatif hâline gelmiştir.³

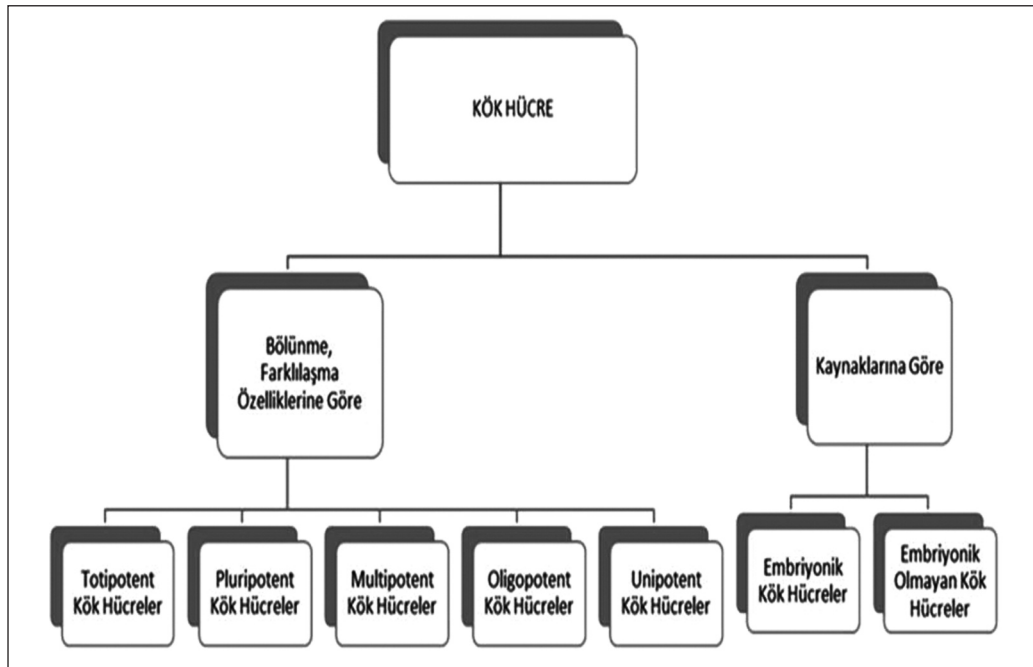
Kemik iliği kök hücrelerindeki çalışmalar tıp alanındaki kullanımları sebebiyle 20. yy'de hız kazanmıştır. Kemik iliğindeki kompleks mikroçevre

ve kök hücre çeşitliliği, mikroanalizler ve transgenik fare modelleri kullanılarak hücre yüzey antijenlerinin tanımlanmasıyla aydınlatılmaya çalışılmaktadır.⁴ Hematopoietik ve mezenkimal kök hücreler bu çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kan hücrelerine kaynaklık eden hematopoietik kök hücrelerinin ve osteosit, kondrosit, adiposit gibi hücrelere farklılaşan mezenkimal kök hücrelerinin toksisite çalışmalarında kullanılması test materyalinin farklılaşma süreci üzerine etkisinin belirlenmesinde önem taşımaktadır.³

KÖK HÜCRE TANIMI VE SINIFLANDIRMASI

Kök hücreler; aktif telomeraz enzim aktivitesi sayesinde uzun süre bölünebilen hücrelerdir. Diğer hücrelerden farklı olarak başlangıçtaki hücrenin karakteristik özelliklerini taşıyan, en az bir benzer hücre oluşturabilme (self renewal) yeteneğindedir. Uygun sinyaller aldıklarında bir veya birden fazla hücre serisine farklılaşabilmekte (multi-lineage differentiation) ve işlevsel olarak bir dokuyu yeniden yapılandırabilmektedir.⁵⁻⁸

Kök hücreler; bölünme, farklılaşma özellikleri ve kaynaklarına göre olmak üzere temel olarak iki şekilde sınıflandırılabilir (Şekil 1).



ŞEKİL 1: Kök hücre sınıflandırması.

BÖLÜNME, FARKLIŞMA ÖZELLİKLERİNE GÖRE KÖK HÜCRE SINIFLANDIRMASI

Bölünme, farklılaşma özelliklerine göre kök hücreler; totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olmak üzere beş grup altında toplanabilir.

Totipotent kök hücreler; embriyo, embriyo sonrası bütün doku ve organlar ile embriyo dışı membranları ve organları oluşturan, sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme yeteneğine sahip kök hücrelerdir.⁹ Zigot ve erken embriyo döneminde 8 hücreye kadar olan tüm blastomerler totipotent özelliktedir.^{6,10} Memelilerde bir totipotent kök hücre yaklaşık 200 özelleşmiş somatik hücre tipini içeren kompleks bir organizmayı oluşturma yeteneğine sahiptir.¹¹

Pluripotent kök hücreler; fertilizasyonun 5. gününde oluşan blastosist evresindeki embriyoda bulunan ve blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen hücrelerdir.⁵ Bu hücreler işlev gören bir organizmayı oluşturamazlar; fakat gerekli ortam sağlandığında ektoderm, mezoderm ve endodermden köken alan farklı hücre çeşitlerine farklılaşabilmektedir.^{5,12}

Multipotent kök hücreler; embriyonik gelişmenin ilerleyen evrelerine ait hücrelerdir. Özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler ve yer aldıkları dokunun hücre tipini üreten erişkin kök hücrelerine dönüşürler.^{5,12} Kas, kemik, kıkırdak, yağ, bağ ve destek dokularını oluşturma kapasitesine sahip olan mezenkimal kök hücreler spesifik bir multipotent kök hücre tipidir.¹¹

Oligopotent kök hücreler, bir doku içindeki iki ya da daha fazla hücre dizisini oluşturabilen kök hücrelerdir. Beyindeki bir nöron alt dizisini oluşturabilen nöral kök hücreler veya miyeloid kök hücreler oligopotent kök hücrelere örnek olarak verilebilmektedir.^{10,13}

Unipotent kök hücreler ise sadece bir seriye ait hücreleri oluşturabilen kök hücrelerdir ve kas kök hücreleri ile hematopoietik kök hücreler tipik örnekleridir.^{10,14}

KAYNAKLARINA GÖRE KÖK HÜCRE SINIFLANDIRMASI

Kaynaklarına göre kök hücre sınıflandırması temel olarak embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler (erişkin kök hücresi) şeklinde iki grup altında toplanmaktadır.¹⁵

Embriyonik kök hücreler, blastosist evresindeki 5-6 günlük memeli embriyosunun iç hücre kitlesinden elde edilen ve embriyodaki bütün hücre tiplerine farklılaşma kapasitesine sahip, pluripotent özellikteki hücrelerdir.¹⁵⁻¹⁹ Blastosist; trofektoderm denilen ve sonrasında plasenta ile destek dokuları meydana getiren dış hücre tabakasını, fetal yapıyı oluşturan iç hücre kitlesini içermektedir.^{6,20} Teratokarsinomlardan elde edilen embriyonik karsinoma ile primordiyal germ hücrelerinden elde edilen embriyonik germ hücreleri bu hücre grubunda yer almaktadır.^{21,22}

Embriyonik olmayan ya da erişkin kök hücreleri; bir doku veya organdaki farklılaşmış hücrelerin çevresinde bulunan, kendini yenileme ve köken aldıkları dokunun çeşitli hücrelerine farklılaşma yeteneğindeki multipotent veya unipotent özellikteki hücrelerdir.²³ Bazı çalışmalarda erişkin kök hücrelerinin pluripotent özelliğe de sahip olabilecekleri görülmüştür.^{24,25} En çok bilinen örnekleri hematopoietik kök hücreler olmakla birlikte, karaciğer, gastrointestinal sistem, deri, kan damarları gibi bölgelerde buldukları belirlenmiş olan bu hücreler, hasarlı dokunun onarımından ve doku homeostazının sürdürülmesinden sorumludur.²⁶⁻²⁸

KEMİK İLİĞİ YAPISI VE KEMİK İLİĞİ KÖK HÜCRELERİ

Kemik iliği, uzun ve aksiyel kemiklerin merkezindeki boşluklarda yer almakta ve trabeküler kemikteki vasküler sinüslerin çevrelediği adipoz hücreleri ile hematopoietik doku adalarını içermektedir.²⁹ Kemik iliği mikroçevresinde makrofaj, adiposit, fibroblast, retiküler endotelial hücreler ve osteojenik prekürsör hücreler bulunmaktadır.³⁰

Kemik iliği kök hücreleri; miyokard, kalp kapakçığı, damar, hasarlı kemik, tendon, kıkırdak,

menisküs ve deri gibi dokuların onarım ve yenilenmesine katkıda bulunmaktadır. Bu hücreler hematopoietik ve mezenkimal kök hücreleri olmak üzere iki grup kök hücre içermektedir.³¹ Kemik iliğindeki hematopoietik kök hücreler stromal hücrelerle çevrili hâlde ve trabeküler bölgede bulunmaktadır. Olgunlaştıklarında vasküler sisteme geçmekte; mezenkimal kök hücreler de kemik boşluğunda yer almakta ve kondrosit, osteoblast, fibroblast ve adiposit gibi stromal hücreleri meydana getirmektedir.³²⁻³⁴

HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRE

Hematopoez, organizmanın embriyonik ve erişkin düzeyde kan hücresi oluşturması ve hematopoietik kök hücrenin gelişim, kendini yenileme ve farklılaşma süreçlerini kapsamaktadır.³⁵ Erişkin kök hücre tiplerinden biri olan hematopoietik kök hücreler bütün kan hücrelerine kaynaklık etmektedir.³⁶ Kök hücreler; progenitör ve farklılaşmış hücrelerden oluşan hematopoietik sistem günde 2×10^{11} ve ortalama bir insan ömrü boyunca 5×10^{15} 'dan fazla eritrosit üretmektedir.³⁷ Hematopoietik kök hücrelerin kan hücreleri dışında endotel hücreleri, düz kas hücreleri, kardiyak miyositler ve hepatositler gibi hücrelere de farklılaşabileceğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır, ancak daha sonra yapılan bazı çalışmalarda ise hematopoietik kök hücrelerdeki değişimin sadece hücre füzyonundan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.³⁸⁻⁴¹

Hematopoietik kök hücreler gelişimsel olarak aorta-gonad-mezonefroz bölgesinden köken alır ve fetüs karaciğerine göç eder. Kemik boşlukları oluştuğunda kemik iliğini oluşturmak üzere endosteuma göç etmeye başlar ve bireyin geri kalan yaşamında özelleşmiş nişlerde yer alır.⁴² Kök hücrelerin kendini yenilemesi, farklılaşması gibi süreçler niş adı verilen mikroçevrelerde gerçekleşir.⁴³ Nişlerde kemik iliğine özgül hücreler, stromal hücreler ve hücre-dışı matriks bileşenleri ile hematopoietik kök hücreler arasındaki bazı moleküller, faktörler ve sinyaller aracılığıyla gerçekleşen yüksek düzey etkileşimler hücre fonksiyonlarını ve karakteristiklerini düzenleyerek erişkin hematopoezinin dengede kalmasını sağlar.³⁵ Bu süreçteki mekanizmalardan biri asimetrik ve simetrik hücre bö-

lünmesi arasındaki dengenin sağlanmasıdır. Simetrik hücre bölünmesi, kök hücrenin benzer iki hücreye bölünmesi ve bu hücrelerin nişte kalması, asimetrik hücre bölünmesi ise kök hücre bölünmesiyle meydana gelen hücrelerden birinin nişte kalırken, diğerinin yeni hücreler oluşturmak üzere nişi terk etmesidir.^{44,45}

Kemik iliğinde osteoblastik (endotel) ve vasküler (endotelial) niş olmak üzere iki farklı niş bulunmaktadır.^{32,35} Hematopoietik kök hücreler farklı koşullar altında, fiziksel olarak tamamen ayrı olmayıp, bağlantılı olan bu iki nişten birini kullanırlar. Vasküler nişteki hematopoietik kök hücreler ve hematopoietik progenitör hücreler daha olgun, çoğalabilen, farklılaşmaya yatkın hücreler iken, osteoblastik nişteki hematopoietik kök hücreler siklusun G_0 evresinde olan, kendini yenileme yeteneğinde hücrelerdir ve sayıları vasküler niş kök hücrelerinden daha azdır.³⁵

OSTEOBLASTİK NİŞ

Uzun kemiklerin trabeküler alanında kemik ve kemik iliğini birbirinden ayıran endosteum, kemiğin medüller kavitesine bakan kısım üzerinde osteojenik özellikteki tek sıralı hücreleri içermektedir. Hematopoietik kök hücreler, kemik oluşumunda rol alan osteoblastlar ve kemik rezorpsiyonunu sağlayan osteoklastlar bu bölgede yer almaktadır.³⁵ Hücre siklusu yavaş şekilde devam eden, uzun ömürlü hematopoietik kök hücreler ve aktif hücre döngüsüne sahip kısa ömürlü hematopoietik kök hücreler olmak üzere iki çeşit hematopoietik kök hücre bulunmaktadır. Uzun ömürlü hematopoietik kök hücreler aylarca hematopoeze katkıda bulunurken, kısa ömürlü hematopoietik kök hücreler için bu süre birkaç hafta ile sınırlıdır.^{46,47}

VASKÜLER NİŞ

Vasküler niş; kemik iliği sinüzoidleri bölgesinde yer alan ve içerdiği sinüzoidal endotelial hücrelerce hematopoietik kök hücrelerin çoğalma, farklılaşma ve devamlılığının sağlandığı mikroçevredir. Hemanjiyoblastlardan köken alan hematopoietik ve endotelial hücreler arasındaki yakın ilişki

yoksa, aorta-gonad-mezonefroz ve plasenta aşamalarından itibaren kemik iliğinde devam etmektedir.⁴⁸ Osteoblastik nişte pasif durumda bulunan hematopoietik kök hücreler vasküler nişteki endotelial hücrelere penetre olarak çeşitli kan hücrelerine farklılaşırlar ve bu süreçte nişteki büyüme faktörleri ile yüksek oksijen miktarı etkilidir.⁴⁹

MEZENKİMAL KÖK HÜCRE

Kemik iliği stromal hücreleri olarak da bilinen mezenkimal kök hücreleri; yağ, kas, kırıldak ve kemik dokularına farklılaşabilen progenitör özellikte adherent, fibroblast benzeri heterojen hücre popülasyonudur.⁵⁰⁻⁵³ Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, kordon kanı, trabeküler kemik ve adipoz dokulardan izole edilebilmektedir.⁵³⁻⁵⁵

İn vitro ortamda adiposit, osteoblast ve kondroblastlara farklılaşma özellikleri bulunmaktadır.⁵⁴ Mezenkimal kök hücrelerin belirlenmesinde farklılaşma potansiyellerinin yanında; CD29, CD44, CD90 (Thy-1), CD49a-f, CD51, CD73 (SH3), CD105 (SH2), CD106, CD166, CD13, Stro-1 yüzey moleküllerinin varlığı ve CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, HLA-DR yüzey moleküllerinin bulunmamasından yararlanılmaktadır.^{55,56}

Mezenkimal kök hücreler, salgıladıkları sitokinler ve büyüme faktörleriyle hematopoietik kök hücreler için gerekli olan mikroçevre devamlılığının sağlanmasında, kan damarı oluşumu ve damar fonksiyonunun kazanılmasında önemlidir.^{57,58}

GENOTOKSİK ETKİ TANIMI VE KEMİK İLİĞİ KÖK HÜCRELERİ AÇISINDAN ÖNEMİ

Genotoksik etki (genotoksisite); ksenobiyotikler, radyasyon gibi ekzojen ve serbest radikaller gibi endojen etmenlerin DNA molekülünde yaptığı kalıcı nitelikteki değişikliklerdir. Somatik hücrelerde, germ hücrelerinde ve kök hücrelerde oluşan genetik değişiklikler önemli sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar, proto-onkogenlerde, tümör süpresör genlerde ve/veya DNA hasarından sorumlu genlerde oluşmuşlarsa kanser gelişimine neden olabilmektedir. Somatik hücrelerde DNA hasarı

birikimi; yaşlanmanın hızlanmasında, immün bozuklukların, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasında rol oynamaktadır. Germ hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar ise düşük sayısında artışa, kısırılık ve yavruya ya da daha sonraki nesillere aktarılabilen kusurlara neden olabilmektedir.⁵⁹

Kök hücrelerin genotoksik etmenlerle karşılaşması durumunda da hücre sağlığı bozulmaktadır. Endojen ve ekzojen genotoksik maddelere maruziyet kemik iliği hücreleri üzerinde hücre yaşlanma, kanser (lösemi, lenfoma) anemi gibi sonuçlara yol açabilmektedir. Progenitör ve olgun kan hücrelerinde genotoksikan maddelerin etkisi apoptoz ve hücre ölümü ile sonuçlanır iken; uzun ömürlü ve durgun fazdaki hematopoietik kök hücrelerde devam eden genotoksik stresin kemik iliği yetmezliğine yol açabileceği belirlenmiştir.^{60,61}

Dokuda bulunan kök hücreler; doku gelişimi ile onarımından ve doku homeostazının sürdürülmesinden sorumlu oldukları için kök hücrelerin organizma yaşamı boyunca korunması önemlidir. Kök hücrenin sınırsız bölünme kabiliyeti ve farklılaşma özelliği bu hücreleri tümör oluşumu için potansiyel kaynak hâline getirmekte; bu nedenle genotoksik stresin ve genetik onarım mekanizmalarının anlaşılması gerekmektedir.⁶² Bu amaçla, tedavide kullanımları açısından da önemli olan mezenkimal ve hematopoietik kemik iliği kök hücrelerinde yapılmış genotoksisite çalışmaları hücre çeşidine göre gruplandırılmıştır.

HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRELERDEKİ GENOTOKSİSİTE ÇALIŞMALARI

Hematopoietik kök hücrelerdeki nükleotid ekzizyon onarımı, telomer devamlılığı gibi genomik yapının korunmasındaki yollarda meydana gelen hasarlar kök hücrelerin çoğalma, kendini yenileme gibi işlevlerinin kaybına neden olmaktadır. Sonuçta, kök hücre yaşlanmakta ve doku homeostazı olumsuz etkilenmektedir.⁶³

Benzenin indüklediği kemik iliği toksisitesinin fare hematopoietik progenitör hücrelerinde incelendiği bir çalışmada, hematopoietik hücre proliferasyonu

erasyonun baskılandığı; DNA hasarı ve apoptoz belirteci genlerin ekspresyonlarında artış olduğu, Recio ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda da benzen detoksikasyonunda görev alan kinon oksidoredüktaz-1 ve mikrozomal epoksit redüktaz enzimlerinin hematotoksosite ve genotoksosite oluşumunda belirleyici oldukları görülmüştür.^{64,65} İnhalasyon yolu ile benzen maruz bırakılan farelerdeki hematopoietik kök hücre ve kemik iliği incelemesinde ise, benzenin kemik iliği hücrelerinde p21 mRNA indüksiyonu yaparken hematopoietik kök hücrelerde değişikliğe neden olmadığı, fankoni anemisindeki DNA hasar mekanizmasında da p53/p21 hiperaktivasyonunun sorumlu olduğu belirlenmiştir.^{66,67}

Zhang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, fare hematopoietik kök hücrelerindeki DNA hasar onarım yollarının aktivasyonunda, DNA bağımlı protein kinaz katalitik alt birimi (DNA-PKcs) fosforilasyonunun görev aldığı sonucuna varılmıştır.⁶⁸

Kadın ve erkek donörlerden alınan insan CD34⁺ hematopoietik progenitör hücrelerinde benzenin kemik iliği bozuklukları ile ilişkisinin incelendiği bir çalışmada, 1,4-benzokinonun sitotoksik, genotoksik etkileri ve hücrelerin DNA hasar yanıtları belirlenmiştir. Uygulanan 1,4-benzokinon konsantrasyonuyla orantılı olarak, kontrol grubuna göre sitotoksitede, mikronükleus taşıyan CD34⁺ hücrelerinde ve p21 mRNA düzeylerinde artış gözlenmiştir. Benzenin indüklediği DNA hasar onarımında p53 yolağının görev aldığı sonucuna varılmış, bu sonuç Yoon ve ark. tarafından fare hematopoietik kök hücrelerinde yapılmış bir başka çalışmada da elde edilmiştir.^{69,70}

Buschfort-Papewalis ve ark. tarafından insan kemik iliği ve kordon kanı hücrelerinde yapılan bir çalışmada etil nitröz üre uygulamasının ardından CD34⁺ hücrelerinde CD34⁻ hücrelerine kıyasla DNA tek zincir kırıklarının iki kat fazla olduğu görülmüş, melfalan (Sigma, Deisenhofen, Almanya) ve sisplatin (Platinex; Bristol Medicine, Münih, Almanya) uygulamalarında da DNA tek zincir kırıklarının onarım mekanizmalarında azalma belirlenmiştir.⁷¹ İnsan CD34⁺ hücrelerinde

ultraviyole (UV) radyasyonun indüklediği tek zincir kırıklarında ise nükleotid eksizyon onarım mekanizmasının CD34⁺ hücrelere göre daha fazla aktive olduğu saptanmıştır.⁷²

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDEKİ GENOTOKSİSİTE ÇALIŞMALARI

Nikitina ve ark.nın, fare kemik iliği hücreleri ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde DNA hasarını COMET yöntemi ile değerlendirdikleri bir çalışmada, farklı kültür dönemlerindeki (pasaj 3-11) hücreler karşılaştırılmış; DNA hasar düzeyinin kültür süresince kemik iliği hücreleri ve mezenkimal hücrelerde değişmediği görülmüştür. Kemik iliği hücrelerinde gözlenen %10-28 oranındaki atipik hücreler ve mezenkimal hücrelerde geç dönem pasajlarında artan apoptotik hücreler, DNA bütünlüğünün korunmasındaki kültür koşullarının önemini göstermiştir. Mezenkimal kök hücrelerin uzun dönem kültürlerinde (5-106 hafta) de hücrelerin morfolojik ve fenotipik özelliklerinde değişiklikler, çoğalma yeteneğinde artış ve malign hücrelerde farklılaşma görülmüştür.^{73,74}

Fare mezenkimal kök hücrelerinde formaldehitin çeşitli dozlarda uygulamasının yapıldığı in vitro bir çalışmada, 125 m ve üzeri dozlarda DNA-protein çapraz bağlanmaları, zincir kırıkları ve DNA hasar yanıtında rol alan Brca2, Rad51, Xrcc2, Xpa, Xpc, Chek1 ve Hus1 düzeylerinde artma görülmüştür.⁷⁵

Tümör oluşumunun kök hücrelerdeki spontan mutasyonlardan kaynaklandığı hipotezinin araştırıldığı bir çalışmada fare kemik iliği mezenkimal kök hücreleri, in vitro kültür ile çok sayıda pasajı yapılarak, malign hücrelere dönüşüm aşamasında farelere enjekte edilmiş ve fibrosarkom oluşumu gözlenmiştir. Mezenkimal hücrelerin malign hücrelere dönüşümünün kromozom anormallikleri, artan telomeraz aktivitesi ve c-myc ekspresyonuna bağlı olarak gerçekleştiği sonucuna varılmıştır.⁷⁶

Foudah ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, sıçan hücrelerinin kültür koşullarından bağımsız olarak anöloid özellikte olmalarının ve kromozom kararsızlığının belirlenmesiyle kemik

iliği mezenkimal kök hücrelerindeki çalışmalarda doğru bir model olmayabileceği düşünülmüştür.⁷⁷ Diğer taraftan, Gallina ve ark. tarafından sıçan modeli kullanılarak yapılmış bir çalışma ile yenileyici tedavide kontrast madde olarak kullanılan SiO₂ nanopartiküllerinin mezenkimal kök hücrelerde sitotoksik ve genotoksik etkiler göstermediği belirlenmiş, kobalt çinko ferrit nanopartiküllerinin ise yüksek dozda uygulanmasının DNA zincir kırıkları ve oksitlenmiş DNA bazlarına neden olduğu saptanmıştır.^{78,79}

Bir çevresel kirletici olan p-nonil fenolün sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, hücre canlılığındaki azalmanın membran bütünlüğünün bozulması, çekirdek ve kaspaz-3 aktivasyonuna bağlı kromatin hasarı ile reseptör genlerindeki mutasyonla ilişkili olabileceği, kadmiyum ve sodyum arsenik ile yapılan benzer bir çalışmada da mezenkimal kök hücrelerinde DNA hasarı saptanmıştır.⁸⁰⁻⁸³ Sarvestani ve ark. tarafından yapılmış bir çalışmada ise statik manyetik alan etkisinin sıçan mezenkimal kök hücrelerinde DNA hasar yanıtı olan G2/M fazındaki hücre sayısını artırdığı görülmüştür.⁸⁴

Ueyama ve ark. tarafından, insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde yapılan bir çalışmada, kültür koşullarındaki oksijen miktarının hücre stabilitesinde önemli olduğu, hipoksik koşulların (%5 oksijen) normoksik koşullara göre (%20 oksijen) hücre çoğalmasını hızlandırdığı ve erken dönem pasajlarında kromozomal anormalliklerin ortaya çıkmasına sebep olduğu belirlenmiştir.⁸⁵ Benzer bir çalışma daha sonra Lee ve ark. tarafından da yapılmış ve hipoksik (%1 oksijen), normoksik (%21 oksijen) koşulların hücre kültüründeki etkileri incelendiğinde, mezenkimal kök hücrelerin hipoksik koşullarda çoğalma potansiyellerinin ve koloni oluşturma etkinliklerinin azaldığı, hücrenin hipoksik koşullara adaptasyonunda görevli HIF-1 α 'nın azalmasına yol açan miR-155-5p'nin arttığı görülmüştür.⁸⁶

Arsenik trioksitin de insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde endoplazmik retikulum stresi ve kaspaz bağımlı mitokondriyal yolağın aracı olduğu apoptotik hücre ölümleri ile DNA hasarına neden olduğu King ve ark. tarafından yapılmış bir çalışma ile belirlenmiştir.⁸⁷

Demir oksit nanopartiküllerinin biyomedikal uygulamalardaki güvenliğinin incelendiği insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise oksidatif hasara bağlı lipid, protein ve DNA hasarı görülmüş, gümüş nanopartiküllerinin kullanıldığı başka bir çalışmada da DNA tek ve çift zincir kırıkları belirlenmiştir.^{88,89}

SONUÇ

Kimyasal maddelerin toksisite değerlendirmeleri ve ilaç güvenlik analizlerinde kullanılan in vitro ve in vivo yöntemler insandaki olası toksik etkilerin değerlendirilmesinde yetersiz kalmaktadır. Kök hücreler ile yapılan toksikolojik incelemelerde, kök hücre mikroçevresinde gerçekleşen farklılaşma, çoğalma, apoptoz gibi süreçlerin göz önünde bulundurulması sağlanmaktadır. Kemik iliği kök hücreleri de kimyasal maddelerin hematopoietik sisteme etkilerinin belirlenmesi ve tedavide güvenli kullanımlarının sağlanması açısından genotoksisite çalışmalarında önemli bir yere sahiptir. Sonuç olarak, kök hücreler ile gerçekleştirilecek toksikoloji çalışmaları, kimyasal maddelerin insanlar üzerindeki olası toksik etkilerinin saptanması ve değerlendirilmesi için büyük fayda sağlayacaktır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması veya finansal destek bildirmemiştir.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Ülkü Ündeğer Bucurgat ve Tuğbagül Çal; **Kaynak Taraması:** Ülkü Ündeğer Bucurgat ve Tuğbagül Çal; **Makalenin Yazımı:** Ülkü Ündeğer Bucurgat ve Tuğbagül Çal.

KAYNAKLAR

- Mori H, Hara M. Cultured stem cells as tools for toxicological assays. *J Biosci Bioeng* 2013;116(6):647-52.
- Wobus AM, Löser P. Present state and future perspectives of using pluripotent stem cells in toxicology research. *Arch Toxicol* 2011;85(2):79-117.
- Kang KS, Trosko JE. Stem cells in toxicology: fundamental biology and practical considerations. *Toxicol Sci* 2011;120 Suppl 1:S269-89.
- Edwards RG. Stem cells today: B1. Bone marrow stem cells. *Reprod Biomed Online* 2004;9(5):541-83.
- İnan S, Özbilgin K. 3Biology of stem cells. *Sağlıkta Birikim Derg* 2009;1:11-23.
- Karavaşin T. 3Embryonic stem cells. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2012;9(1):65-71.
- Gundry RL, Burridge PW, Boheler KR. Pluripotent stem cell heterogeneity and the evolving role of proteomic technologies in stem cell biology. *Proteomics* 2011;11(20):3947-61.
- Simara P, Motl JA, Kaufman DS. Pluripotent stem cells and gene therapy. *Transl Res* 2013;161(4):284-92.
- Kansu E. 3Current concepts of stem cell biology and plasticity. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2005;36:191-7.
- Kalra K, Tomar PC. Stem cell: basics, classification and applications. *Am J Phytomed Clin Ther* 2014;2(7):919-30.
- Yılmaz O, Uçar M. 3Stem cell studies and therapeutic cloning. *Hayvancılık Araştırma Dergisi* 2006;16(1):26-31.
- Ural AU. [Stem cell]. *TOTBİD Derg* 2006;5:3-4.
- Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature* 2006;44(7097):1060.
- Beksaç M. [Stem cell]. *Bilim ve Teknik* 2010;36-41.
- Davila JC, Cezar GG, Thiede M, Strom S, Miki T, Trosko J. Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicol Sci* 2004;79(2):214-23.
- Bongso A, Lee EH. Stem cells: their definition, classification and sources. *Stem Cells: From Bench to Bedside*. 1sted. Singapore: World Scientific; 2005. p.1-13.
- Maynard S, Swistowska AM, Lee JW, Liu Y, Liu ST, Da Cruz AB, et al. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells* 2008;26(9):2266-74.
- zur Nieden NI, Ruf LJ, Kempka G, Hildebrand H, Ahr HJ. Molecular markers in embryonic stem cells. *Toxicol In Vitro* 2001;15(4):455-61.
- Xing Y, Xiong W, Zhu L, Osawa E, Hussin S, Dai L. DNA damage in embryonic stem cells caused by nanodiamonds. *ACS Nano* 2011;5(3):2376-84.
- Özel HB, Enver O, Dabak DÖ. [Embryonic stem cells: Review]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2008;28(3):333-41.
- Rohwedel J, Guan K, Hegert C, Wobus AM. Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects. *Toxicol In Vitro* 2001;15(6):741-53.
- Kerr CL, Gearhart JD, Elliott AM, Donovan PJ. Embryonic germ cells: when germ cells become stem cells. *Sem Reprod Med* 2006;24(5):304-13.
- Prochazkova M, Chavez MG, Prochazka J, Fely H, Mushegyan V, Kelin OD. Embryonic versus adult stem cells. In: Vishwakarma A, Sharpe P, Shi S, Ramalingam M, eds. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. 1sted. London: Academic Press; 2014. p.249-59.
- Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AB, Deans R, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nature Med* 2000;6(11):1282-6.
- Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlström H, et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000;288(5471):1660-3.
- Fiegel HC, Lange C, Kneser U, Lambrecht W, Zander AR, Rogiers X, et al. Fetal and adult liver stem cells for liver regeneration and tissue engineering. *J Cell Mol Med* 2006;10(3):577-87.
- Poulsom R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. Adult stem cell plasticity. *J Pathol* 2002;197(4):441-56.
- Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 2001;105(7):829-41.
- Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol* 2006;34(5):548-65.
- 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(1):57-66.
- Wu Y, Wang J, Scott PG, Tredget EE. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair Regen* 2007;15 Suppl 1:S18-26.
- Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* 2006;116(5):1195-201.
- Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, et al. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood* 2006;107(5):1878-87.
- Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 2005;121(7):1109-21.
- Çamurdanoğlu BZ, Kansu E. [Adult and hematopoietic stem cells] *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar*. Ankara: Türkiye Bilimler Akademisi; 2009.p.113.
- Erden S. [Stem cells and clinical applications]. *J New Result Enginer Nat Sci* 2014;(3):1-8.
- Suda T, Takubo K, Semenza GL. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 2011;9(4):298-310.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410(6829):701-5.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Med* 2006;11(12):229-34.
- Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Säwén P, Röhl W, Hescheler J, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nature Med* 2004;10(5):494-501.
- Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428(6983):668-73.
- Smith JN, Calvi LM. Concise review: Current concepts in bone marrow microenvironmental regulation of hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells* 2013;31(6):1044-50.
- Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 2008;132(4):631-44.
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 2004;116(6):769-78.
- Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000;287(5457):1427-30.
- Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(25):14541-6.

47. Passegué E, Wagers AJ, Giuriato S, Anderson WC, Weissman IL. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med* 2005;202(11):1599-611.
48. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem Sci* 2006;31(10):589-95.
49. He N, Zhang L, Cui J, Li Z. Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Res* 2014;2014:128436.
50. Roobrouck VD, Clavel C, Jacobs SA, Ulloa-Montoya F, Crippa S, Sohni A, et al. Differentiation potential of human postnatal mesenchymal stem cells, mesoangioblasts, and multipotent adult progenitor cells reflected in their transcriptome and partially influenced by the culture conditions. *Stem Cells* 2011;29(5):871-82.
51. Kundrotas G, Gasperskaja E, Slapsyte G, Gudleviciene Z, Krasko J, Stumbryte A, et al. Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells isolated from low volume of human bone marrow. *Oncotarget* 2016;7(10):10788-802.
52. Healy ME, Bergin R, Mahon BP, English K. Mesenchymal stromal cells protect against caspase 3-mediated apoptosis of CD19+ pPeripheral B Cells through contact-dependent upregulation of VEGF. *Stem Cells Dev* 2015;24(20):2391-402.
53. Arnulf B, Lecourt S, Soulier J, Ternaux B, Lacassagne MN, Crinquette A, et al. Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia* 2007;21(1):158-63.
54. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.
55. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 2007;67(19):9142-9.
56. Maleki M, Ghanbarvand F, Reza Behvarz M, Ejtemaei M, Ghadirkhoni E. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *Int J Stem Cells* 2014;7(2):118-26.
57. Watt SM, Gullo F, van der Garde M, Markeson D, Camicia R, Khoo CP, et al. The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. *Br Med Bull* 2013;108(1):25-53.
58. Orbay H, Tobita M, Mizuno H. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem Cells Int* 2012;2012:1-8.
59. Amdur Mary O, John D, Klaassen Curtis D, Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. *J Occup Environ Med* 1993;35(1):76.
60. Parmar K, D'Andrea AD. Stressed out: endogenous aldehydes damage hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2012;11(5):583-4.
61. Shao L, Feng W, Lee KJ, Chen BP, Zhou D. A sensitive and quantitative polymerase chain reaction-based cell free in vitro non-homologous end joining assay for hematopoietic stem cells. *PLoS One* 2012;7(3):33499-508.
62. Niedernhofer LJ. DNA repair is crucial for maintaining hematopoietic stem cell function. *DNA Repair (Amst)* 2008;7(3):523-9.
63. Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* 2007;447(7145):725-9.
64. Nwosu VC, Kissling GE, Trempus CS, Honeycutt H, French JE. Exposure of Tg. AC transgenic mice to benzene suppresses hematopoietic progenitor cells and alters gene expression in critical signaling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;196(1):37-46.
65. Recio L, Bauer A, Faiola B. Use of genetically modified mouse models to assess pathways of benzene-induced bone marrow cytotoxicity and genotoxicity. *Chem Biol Interact* 2005;153:159-64.
66. Faiola B, Fuller ES, Wong VA, Recio L. Gene expression profile in bone marrow and hematopoietic stem cells in mice exposed to inhaled benzene. *Mutat Res* 2004;549(1-2):195-212.
67. Ceccaldi R, Parmar K, Mouly E, Delord M, Kim JM, Regairaz M, et al. Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* 2012;11(1):36-49.
68. Zhang S, Yajima H, Huynh H, Zheng J, Callen E, Chen HT, et al. Congenital bone marrow failure in DNA-PKcs mutant mice associated with deficiencies in DNA repair. *J Cell Biol* 2011;193(2):295-305.
69. Abernethy DJ, Kleyменова EV, Rose J, Recio L, Faiola B. Human CD34+ hematopoietic progenitor cells are sensitive targets for toxicity induced by 1,4-benzoquinone. *Toxicol Sci* 2004;79(1):82-9.
70. Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Kodama Y, Kaneko T, Kim DY, et al. Mechanism of action of benzene toxicity: cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells (CFU-GM). *Exp Hematol* 2001;29(3):278-85.
71. Buschfort-Papewalis C, Moritz T, Liedert B, Thomale J. Down-regulation of DNA repair in human CD34(+) progenitor cells corresponds to increased drug sensitivity and apoptotic response. *Blood* 2002;100(3):845-53.
72. Myllyperkiö MH, Vilpo JA. Increased DNA single-strand break joining activity in UV-irradiated CD34+ versus CD34- bone marrow cells. *Mutat Res* 1999;425(1):169-76.
73. Nikitina VA, Chausheva AI, Zhanataev AK, Osipova EY, Durnev AD, Bochkov NP. Assessment of DNA damage in human bone marrow cells and multipotent mesenchymal stromal cells. *Bull Exp Biol Med* 2011;151(4):550-2.
74. Røsland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, et al. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res* 2009;69(13):5331-9.
75. She Y, Li Y, Liu Y, Asai G, Sun S, He J, et al. Formaldehyde induces toxic effects and regulates the expression of damage response genes in BM-MSCs. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2013;45(12):1011-20.
76. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 2006;24(4):1095-103.
77. Foudah D, Redaelli S, Donzelli E, Bentivegna A, Miloso M, Dalprà L, et al. Monitoring the genomic stability of in vitro cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chromosome Res* 2009;17(8):1025-39.
78. Gallina C, Capelôa T, Saviozzi S, Accomasso L, Catalano F, Tullio F, et al. Human mesenchymal stem cells labelled with dye-loaded amorphous silica nanoparticles: long-term biosafety, stemness preservation and traceability in the beating heart. *J Nanobiotechnology* 2015;13(1):77-90.
79. Novotna B, Turnovcova K, Veverka P, Rössner P Jr, Bagryantseva Y, Herynek V, et al. The impact of silica encapsulated cobalt zinc ferrite nanoparticles on DNA, lipids and proteins of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Nanotoxicology* 2016;10(6):662-70.
80. Abnosi MH, Shojafar E. Biochemical and morphological changes in bone marrow mesenchymal stem cells induced by treatment of rats with p-Nonylphenol. *Iran J Basic Med Sci* 2015;18(4):317-24.
81. Abnosi MH, Jafari Yazdi Z. Sodium arsenite caused mineralization impairment in rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiating to osteoblasts. *Iran J Toxicol* 2012;6(16):577-87.

82. Hussein AM, Hasan S. Cadmium affects viability of bone marrow mesenchymal stem cells through membrane impairment, intracellular calcium elevation and DNA breakage. *Indian J Med Sci* 2010;64(4):177-86.
83. Abnosi MH, Mehranjani MS, Momeni HR, Najafabadi MM, Barati M, Shojafar E. The induction of apoptosis and autophagy in rats bone Marrow mesenchymal stem cells following in vitro treatment with p-Nonylphenol. *IJST* 2012;36(A3):239-44.
84. Sarvestani AS, Abdolmaleki P, Mowla SJ, Ghanati F, Heshmati E, Tavasoli Z, et al. Static magnetic fields aggravate the effects of ionizing radiation on cell cycle progression in bone marrow stem cells. *Micron* 2010;41(2):101-4.
85. Ueyama H, Horibe T, Hinotsu S, Tanaka T, Inoue T, Urushihara H, et al. Chromosomal variability of human mesenchymal stem cells cultured under hypoxic conditions. *J Cell Mol Med* 2012;16(1):72-82.
86. Lee JS, Park JC, Kim TW, Jung BJ, Lee Y, Shim EK, et al. Human bone marrow stem cells cultured under hypoxic conditions present altered characteristics and enhanced in vivo tissue regeneration. *Bone* 2015;78:34-45.
87. King YA, Chiu YJ, Chen HP, Kuo DH, Lu CC, Yang JS. Endoplasmic reticulum stress contributes to arsenic trioxide-induced intrinsic apoptosis in human umbilical and bone marrow mesenchymal stem cells. *Environ Toxicol* 2016;31(3):314-28.
88. Novotna B, Jendelova P, Kapcalova M, Rossner P Jr, Turnovcova K, Bagryantseva Y, et al. Oxidative damage to biological macromolecules in human bone marrow mesenchymal stromal cells labeled with various types of iron oxide nanoparticles. *Toxicol Lett* 2012;210(1):53-63.
89. Hackenberg S, Scherzed A, Kessler M, Hummel S, Technau A, Froelich K, et al. Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicol Lett* 2011;201(1):27-33.