



Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanması ve Proliferasyon Özellikleri

● Ece ÇERÇİ¹ ● Hatice ERDOST^{1*}

¹ Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
16059, Görükle, Bursa, Turkey

Received 16-12-2019 Accepted 12-10-2020

Özet

Mezenkimal kök hücreler (MKH), canlılarda diğer kök hücrelere oranla yüksek oranda bulunan ve terapötik etkinliğe sahip farklılaşmamış hücrelerdir. Bu çalışmada, yağ dokudan izole edilen pasaj 3 hücrelerinde, MKH özelliklerinin tanımlanması, Ki-67 antikorunun immunokalizasyonu, hücre gelişim analizi ile proliferasyonun değerlendirilmesi amaçlandı.

Pasaj 3 hücreleri adiposit, osteoblast ve kondroblastlara farklılaştırılarak Oil Red O, Alizarin Red ve Alcian Blue teknikleri ile boyandı. MKH karakterizasyonu; kök hücre yüzey işaretleyicilerinden CD90 ve CD105 ile pozitif; CD45 ve CD11b ile negatif ekspresyonu tanımlandı.

Sonuç olarak çalışmada; yağ doku kökenli pasaj 3 hücrelerinin; immünofenotipik karakterizasyonu, osteojenik, kondrojenik, adipojenik yönde farklılaşma yetenekleri saptanarak, Ki-67 immunpozitif hücrelerde optimal hücrel hemostaza sahip olduğu ve terapötik açıdan sağlıklı mezenkimal kök hücre proliferasyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kök Hücre Farklılaşması, İmmünofenotiplendirme, Ki-67, Hücre Gelişim Analizi.

Identification of Mesenchymal Stem Cells and Proliferation Properties Abstract

Mesenchymal stem cells(MSCs) are undifferentiated cells that have a therapeutic efficacy compared to other stem cells. The aim of this study was to determine the MSC characteristics of passage 3 cells isolated from adipose tissue, immunocalization of Ki-67 antibody, and to evaluate proliferation by cell growth analysis.

Passage 3 cells were differentiated into adipocytes, osteoblasts and chondroblasts and stained with Oil Red O, Alizarin Red and Alcian Blue techniques. MSCs characterization was identified by stem cell surface markers positive expression of CD90 and CD105 negative expression of CD45 and CD11b.

As a result; fat tissue origin passage in 3 cells have been shown that immunophenotypic characterization, differentiation in osteogenic, chondrogenic, adipogenic aspects have been described as also in preserving optimal cellular hemostasis by Ki-67 positive immunopositive cells; it has been shown that optimal cellular hemostasis is maintained.

Keywords: Stem Cell Differentiation, Immunophenotyping, Ki-67, Analyse of Cell Development.

Giriş

Kök hücreler; canlı organizmadaki doku ve organları oluşturan aynı zamanda büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar gibi parakrin etki yapan hücrelerdir. Kök hücreler; vasküler endotel büyüme faktörünün (VEGF), trombosit

kaynaklı büyüme faktörünün (PDGF), anjiyopietin-1'in (ANG-1), interlökin-11'in (IL-11), prostaglandin'in (PGF-2), stromal faktör-1'in (SDF-1), hepatosit büyüme faktörünün (HGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1'in (IGF-1) salgılanmasını ve hücre füzyonu ile hücrel rejenerasyonu indüklemektedirler. Kök hücreler; çoğalma ve

* Corresponding author: Hatice ERDOST Telefon: +90224 294 12 62 Fax: +90224 294 12 02 e-posta adresi: edost@uludag.edu.tr

çok yönlü farklılaşma potansiyeline sahip olan özelleşmiş hücrelerdir.¹⁻²

Kök hücreler, farklılaşma (plastisite) yetenekleri açısından; totipotent, pluripotent ve multipotent olarak sınıflandırılmaktadır.³ Totipotent özelliğine sahip olduğu bilinen tek kök hücre tipi, embriyonel hücrelerdir ve canlıdaki bütün hücrelere farklılaşabilirler. Pluripotent kök hücreler ise, mezodermal (kemik, kas, kırık, kan gibi), ektodermal (nöron, deri, saç gibi) ve endodermal (hepatositler, pankreatik beta hücreleri, sindirim sistemi hücreleri gibi) kökenli, vücuttaki farklılaşmış tüm hücre tiplerini oluşturabilme potansiyeline sahip hücrelerdir. Erişkin kök hücreler de; multipotent kök hücre özelliğindedir ancak farklılaşma kapasitesi embriyonik kök hücrelere göre çok daha sınırlıdır.⁴

MKH ilk olarak; Friedenstein ve ark. (1976) tarafından kemik iliğinden izole edilmiştir ve yağ doku kökenli MKH ise ilk kez Zuk ve ark. (2001) tarafından izole edilmiş ve bu hücreler (ADSCs) olarak tanımlanmıştır.⁵⁻⁷

Günümüzde MKH kaynakları olarak; kemik iliği, yağ dokusu, sinoviyal membran, iskelet kası, dermis, perisit, kırık, tendon, trabeküler kemik, göbek kordonu, akciğer, diş pulpası, amniotik sıvı, fetal karaciğer ve periferik kan gibi dokular kullanılmaktadır.⁷⁻¹² Bir gram yağ dokusu, preadipositler olarak adlandırılan yaklaşık 350.000 multipotent hücre ve yaklaşık 5000 kök hücre içerir. Bu sayı, kemik iliğinde bulunan kök hücre sayısından 35 kat daha fazladır. Başka bir deyişle, yağ dokusu kemik iliğinden çok daha fazla sayıda kök hücre içerir. Aynı zamanda yağ dokusundan yapılan izolasyon yöntemi kemik iliğine göre minimal invaziftir.¹³ Yağ dokudaki kök hücreler; laboratuvar ortamında subkültür denilen pasajlama protokolleri kullanılarak ileri pasajlar ile çoğaltılabilir ve canlı kalabilirler. Primer kültür tekniği ile dokudan direk izole edilen kök hücreler; in-vitro koşullar altında çoğaltılabilirler. MKH'ler çeşitli gelişme faktörlerinin etkisi ile in-vitro ve in-vivo ortamda farklılaşabilme kapasitesine sahiptirler.¹⁴ Hücre döngüsü dört ayrı fazdan oluşur: Gap1 (G1), sentez (S), Gap2 (G2) ve mitoz (M) fazıdır.¹⁵ Sobecki ve ark. (2017) Ki-67 monoklonal antikörünün mitotik evrede tüm omurgalı hücrelerinde eksprese edilen bir nükleer protein olduğunu bildirmektedir.¹⁶ Sobecki ve ark. (2017) normal hücrelerde Ki-67'nin; hücre döngüsü başlangıcında, proliferasyonun göstergesi olduğunu; hücre bölünmesinin G2 evresinde en yüksek seviyede salındığını ve hücre döngüsü boyunca arttığını, mitozda zirveye ulaştığını belirtmektedir.¹⁶ Landberg ve ark. (1990) hücre proliferasyonu Ki-67 ile değerlendirerek ve G0/G1 evresinde Ki-67'nin ekspresyonunun görülmediğini; S ve G2/M evresinde çekirdekte pozitif reaksiyon olduğunu saptamışlardır.¹⁷ Gronthos ve ark. (2001) ise; mezenkimal kök hücrelerdeki

proliferasyon aşamasında Ki-67 antikoru için G2/M fazında hücre çekirdeğinde pozitif reaksiyon gösterdiğini belirtmişlerdir.¹⁸

Bu çalışmada yağ dokudan izole edilen pasaj 3 hücrelerinin, MKH özelliklerini tanımlamak için adipojenik, osteojenik ve kondrojenik yönde farklılaştırılması, kök hücre yüzey işaretleyicileri ile fenotipik karakterizasyonun saptanması, Ki-67 antikörünün immunlokalizasyonu ve hücre gelişim analizinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Hayvan Modeli ve Doku İzolasyonu

Çalışmada standart diyet ile beslenen 300 g canlı ağırlıkta, 12 haftalık yaşta, erkek Sprague Dawley ırkı sıçanlar (n=5) kullanıldı. Çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar No: 2017-12/01). Asepsi-antisepsi kurallarına uygun olarak; di-eter anestezisi altında servikal dislokasyon sonrasında sıçanlardan steril koşullar altında 5 g abdominal yağ dokusu toplandı. Takiben yağ doku örnekleri steril 50 ml falkonlar içerisinde Ca ve Mg içermeyen phosphate-buffered saline (DPBS) (Millipore, BSS-1006, Almanya) ile hücre kültür laboratuvarına transfer edildi.

Hücre İzolasyonu

MKH'ler adipoz dokulardan non-enzimatik yöntem kullanılarak izole edildi.¹³ Yağ doku örnekleri steril 50 ml hacimli deionized phosphate buffered saline (DPBS) içeren falkonlara aktarıldı. Örnekler hücre kültür laboratuvarında laminar kabin içerisine transfer edildi. Steril 60 mm steril hücre kültürü petriplerinde yoğun bir şekilde DPBS ile durulandı. Yağ dokusu; steril iki adet bistüri ucu ile yaklaşık 3 mm çapında mins işlemi yapıldı ve steril enjektör ucu ile T25 plastik hücre kültür flasklarının yüzeyine implante edildi. Daha sonra primer hücre izolasyonu için; taze besiyeri (Cyagen, RAXMD-03011-440, China) içeriğine 100 ünite/ml penicillin-100 µg/ml streptomycin (Gibco, TMS-AB2-C, USA), 2 mM L-glutamine (Gibco, G7513, USA) %20 heat-inactivated Fetal Bovine Serum(FBS) (Gibco, TMS-013-B, USA) ilave edilerek flasklara 5'er ml besiyeri eklendi. Flasklara ekilen örnekler %96 nem, %5 CO2 içeren 37° C etüv ortamında inkube edildi.

Hücre Gelişim Analizi (Cell Growth Curve)

35 mm plastik hücre kültür petriplerine 3×10⁵ oranında hücre ekildi. Proliferasyon potansiyelinin kontrolü için 7 gün süre ile her gün 6'şar petriye (n=42) subkültür sonrası hücre sayımı (HS) uygulandı. Total HS sonuçları ile popülasyonun iki katına çıkma süresi (PDT) ve sayısı (PDN) analiz edildi. Bu amaçla; N0 başlangıçta ekilen hücre sayısını ve N ise ekim sonrası ulaşılan son hücre sayısını ifade

etmektedir. PDT hesaplanması için; $PDT = \text{Hücre kültürü zamanı (CT)} / \text{Popülasyonun dublikasyon oranı ile PDN} = \log N / N_0 \times 3.31$ formülasyonları kullanıldı.¹⁹

Ki-67 Antikörünün İmmunhistokimyasal Lokalizasyonu Pasaj 3 hücrelerde Ki-67 monoklonal antikörünün (Thermo Fisher Scientific, # MA5-14520, USA) immunohistokimyasal lokalizasyonunun saptanması için; T25 flasklardaki %70 konfluense ulaşan hücreler %0.25 Tripsin/EDTA (PAN-Biotech, P10-019100, Almanya) solusyonu ile subkültüre edildi. Hücreler; 24 kuyucuklu plastik hücre kültürü plakalarındaki (n=7) ilk 6 kuyucuğa; 4x10⁴ hücre/kuyucuk oranında ekildi. 1 ve 7 gün arasında takip edilerek her gün için bir hücre kültür kabına fizkasyon işlemi uygulandı.

Canlı hücrelerin tespiti için; -20°C'de 15 dakika süre ile metanolle (Merck Millipore; M106009.2500, Almanya) fizkasyon yapıldı. 4 kez DPBS ile yıkandı ve Triton-X 100 (Sigma; T8787,USA) ile 10 dakika permeabilizasyon sağlandı. Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma; P4417-100TAB, USA) ile yıkanan hücreler, endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için % 3'lük hidrojen peroksit içinde bekletildi ve oda sıcaklığında 5 dakika blocking uygulaması yapıldı. Ki-67 için 1:100 oranında hazırlanan primer antikör (Thermo Fischer Scientific; #MA5-14520, USA) ile +4°C'de 18 saat inkubasyon gerçekleştirildi. Streptavidin peroksidaz reaksiyonu için; sekonder antikör (Thermo Scientific™, TP-125-HL, USA) ile 10 dakika inkubasyon yapıldı. Diaminobenzidin (DAB) (Abcam, ab6428, İngiltere) kromojen 5 dakika uygulandı. Çekirdek boyaması için preparatlara Harris Hematoksilin uygulandı ve preparatlar araştırma mikroskopunda (Nikon Eclipse 80i, Japon) incelendi; 7 gün süre ile rastgele, beş mikroskopik alanda her bir grup için 500 hücre 20X'lik objektifte sayıldı.²⁰

Adipojenik farklılaştırma

Pasaj 3 hücreler; 24 kuyucuklu hücre kültürü kabına (1x10⁵ cells/cm²) ekildikten sonra Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) ile %80 konfluense ulaştırıldı. Hücrelere adipojenik farklılaşma besiyeri (BI, 05-200-1 and 05-201-1, İsrail), (100 uM indometazin, 10 ug / ml insülin, 500 uM 3-izobutilmetilksantin ve 1 uM deksametazon ilave edilen) eklendi ve 3 gün ara ile besiyeri tazeleterek 2 hafta sonrasında hücreler Oil Red O ile boyandı.²¹

Osteojenik farklılaştırma

Pasaj 3 hücreler; 24 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına (1x10⁵ cells/cm²) ekildi. Hücreler DMEM ile %80 konfluense ulaştırıldı. Daha sonra bu hücrelere; DMEM yerine osteojenik farklılaşma besiyeri (BI, 05-440-1B, İsrail), (250 uM askorbik asit, 10 mM P-gliserofosfat ve 100 nM deksametazon ile takviye edilmiş besiyeri) ilave edildi ve 3 gün

ara ile besiyeri tazelendi. 21 gün sonra hücreler Alizarin Red ile boyandı.²²

Kondrojenik farklılaştırma

Pasaj 3 hücreler; 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına (1x10⁶ cells/cm²) ekilen hücreler standart besiyeri ile %80 konfluense ulaştırıldı. Hücrelere kondrojenik besiyeri (BI, 05-220-1 ve 05-220-1, İsrail), (4.5 g / l D-glukoz, 350 pM L-prolin, 100 nM deksametazon ve 10 ng / ml TGF-p3 takviye edilmiş besiyeri) eklenerek 3 gün ara ile besiyeri tazelendi ve 21 gün sonunda hücreler Alcian Blue ile boyandı.²¹

MKH'lerin Fenotiplendirilmesi

Pasaj 3 hücrelerin MKH karakterinin belirlenmesi amacıyla; 24 kuyucuklu plastik hücre kültürü kaplarına 4x10⁴ hücre/kuyucuk oranında hücre ekildi. Standart immunohistokimyasal protokol uygulandı. Mezenkimal kök hücre yüzey markırı olan primer antikörler; CD90 (1/500 antikör dilusyonu Abcam, İngiltere, ab225) ile CD105 (1/50 antikör dilusyonu Abcam, İngiltere, ab156756) ve CD11b (1/100 antikör dilusyonu Abcam, İngiltere, ab8879) ile hematopoetik markır olan; CD45 (1/100 antikör dilusyonu Abcam, İngiltere, ab10558) kullanıldı. Primer antikör inkübasyon aşaması +4°C'de 18 saat uygulanarak devamında immunohistokimyasal kit (Thermo Scientific™, TP-125-HL, Amerika) protokolü uygulandı. Koromojen olarak DAB (Abcam, ab64238, İngiltere) ve çekirdek boyaması için Harris Hematoksilin kullanıldı.

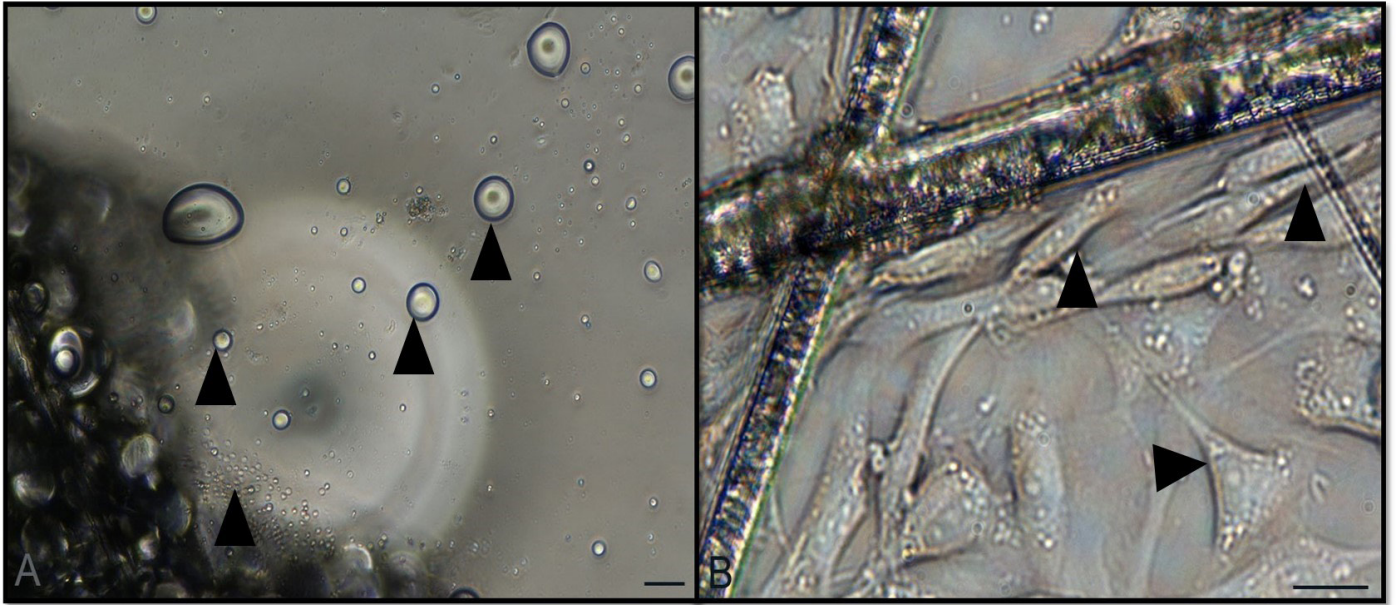
İstatistiksel Analiz

Pasaj 3 hücrelerin proliferasyonu Ki-67 ekspresyonun sayısal değerleri, PDN, PDT değerleri arasındaki farklılıklar için one way ANOVA testleri uygulandı. İstatistiksel farklılığının tanımlanması için SPSS 23 programı kullanıldı (SPSS version 23, IBM Corporation, USA).

Bulgular

Non-enzimatik yöntemle yağ dokudan izole edilen hücrelerin; ilk 24 saatte plastik yüzeye tutundukları, göç fazına geçtikleri ve fibroblastoid görünüme sahip oldukları gözlemlendi(Şekil 1 A-B). Fibroblastoid forma sahip hücrelerden oluşan homojen hücre popülasyonu 2. ve 3. pasajda da yoğun olarak saptandı.

Biz de çalışmamızda izolasyon aşamasından sonra %5-10 konfluente T25 flasklara ekilen Pasaj 1 hücreleri, 5 günde %50 konfluense ulaştı. Pasaj 2 hücreleri 4 günde %70 konfluense ulaştı. Pasaj 3 hücreleri 7 günde %70 konfluense ulaştı. Pasaj 3 hücrelerinin, hücre canlılığı açısından homojen dağılım gösterdiği saptandı (Tablo 1, Şekil 2A). Canlı hücrelerin proliferasyon bulgularında; 1. gün ile karşılaştırıldığında; 3-6. günlerde P < 0.001 düzeyinde



Şekil 1 A. Primer hücre izolasyon aşamasında bulunan göç fazındaki hücreler (ok başları), B. Fibroblastoid yapıdaki plastik yüzeye tutunan hücreler (ok başları) (Bar 25µ).

farklılık bulunuyorken; 7. gün $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel anlamda önem saptandı. PDN değerleri için; 1. gün ile karşılaştırılınca 2, 7. günlerde $P < 0.05$ düzeyinde farklılık bulunuyorken; 3-6. günlerde ise $P < 0.001$ düzeyinde is-

lık göstermekteyken, 4, 5, 6. günlerde $P < 0.001$ düzeyinde istatistiksel önem arz ettiği saptandı (Tablo 1, Şekil 4).

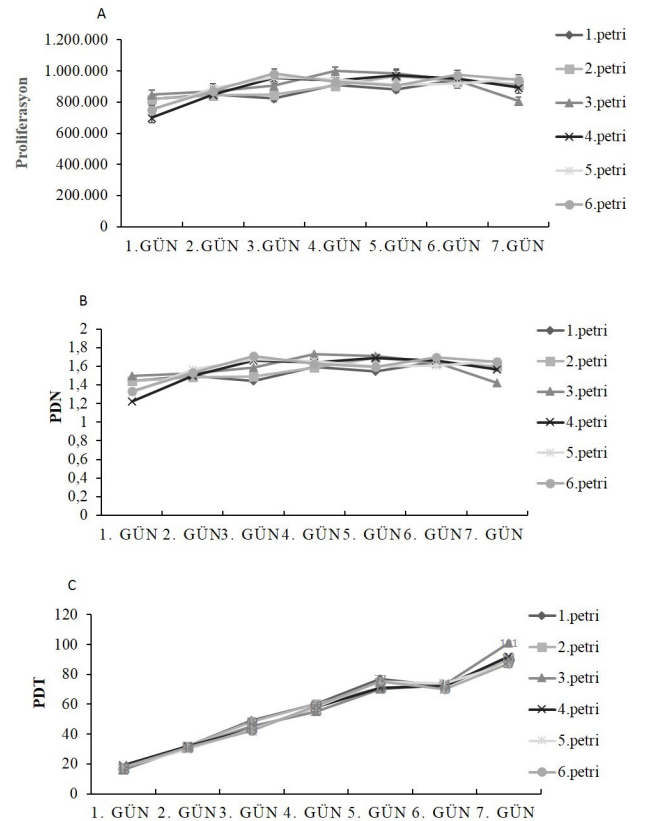
Tablo 1. Pasaj 3 Hücre Sayısı (HS), hücre popülasyonunun iki katına çıkma sayısı (PDN), hücre proliferasyonunun iki katına çıkma süresi (PDT) ve Ki-67 ekspresyonu (%) Ortalama \pm SE değerleri.

	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün	6. gün	7. gün
Pasaj 3 HS	783.50 \pm 22.7*	862.50 \pm 72.5	912.50 \pm 26.8**	938.50 \pm 14**	937.50 \pm 17.5**	944.00 \pm 7.95**	902.16 \pm 21.1*
PDN	1.37 \pm 0.04*	1.51 \pm 0.01*	1.59 \pm 0.04**	1.63 \pm 0.02**	1.63 \pm 0.02**	1.64 \pm 0.01**	1.57 \pm 0.03*
PDT	17.16 \pm 0.54**	31.33 \pm 0.33**	45.0 \pm 1.18**	58.33 \pm 0.76**	73.16 \pm 1.16**	72.33 \pm 0.55	91.16 \pm 2.12**
Ki-67	58.60 \pm 0.50	62.20 \pm 0.86*	63.40 \pm 0.70*	64.00 \pm 0.70**	63.40 \pm 0.74**	63.60 \pm 0.74**	61.00 \pm 0.70

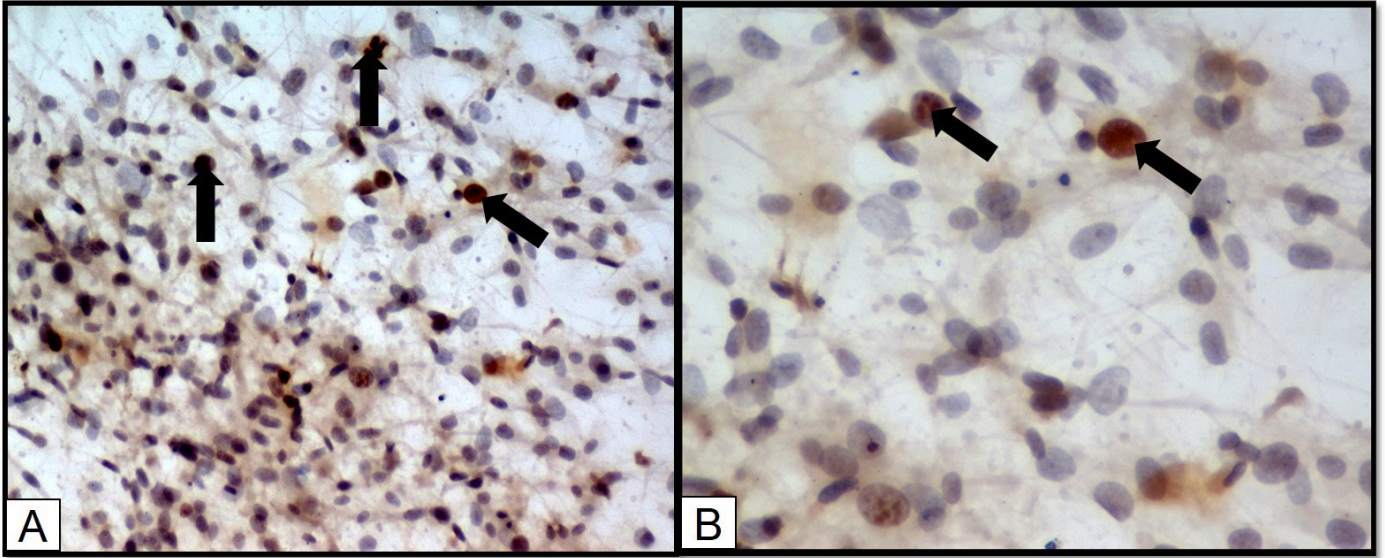
Farklı günler için gruplar arasında istatistiksel anlamda farklılıklar aynı satırda * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ olarak gösterilmektedir.

tatistiksel anlamda farklılıklar belirlendi (Tablo 1, Şekil 2B). PDT bulgularında ise; 6. günde farklılık gözlenmezken; 1, 2, 3, 4, 5 ve 7. günlerde $P < 0.001$ düzeyinde istatistiksel anlamda farklılıklar saptandı. PDT sayısının 7 gün boyunca düzenli artış gösterdiği belirlendi (Tablo 1, Şekil 2C).

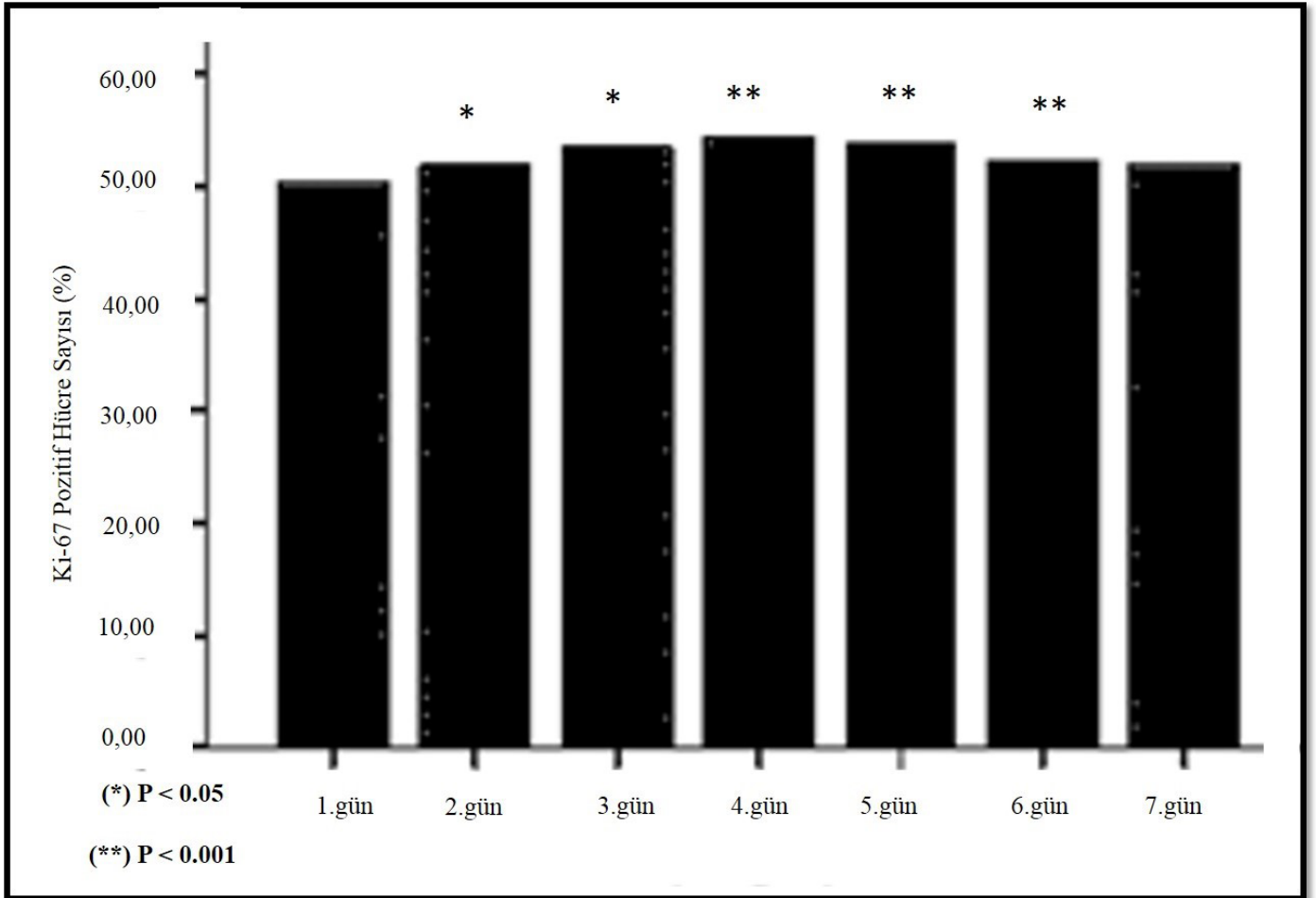
Pasaj 3 hücrelerde Ki-67 antikorunun nükleer alanda, nükleoplazmik sahanın tümünde ve özellikle nükleolus bölgesinde pozitif reaksiyonu gösterdiği belirlendi (Şekil 3 A-B). Proliferasyonun arttığı mitotik fazda Ki-67 antikorunun immunolokalizasyonu istatistiksel anlamda değerlendirildiğinde; 2 ve 3. günlerde $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel farklı-



7 gün süresince pasaj 3 hücrelerin sayısı (HS / Proliferasyon) ve hücre gelişimi (PDN ve PDT).



Şekil 3 A-B. Pasaj 3 MKH'lerdeki Ki-67'nin yoğun olarak nukleolus bölgesinde olmak üzere tüm nukleuslarda (ok) immunpozitif reaksiyonu (Bar 25µ).

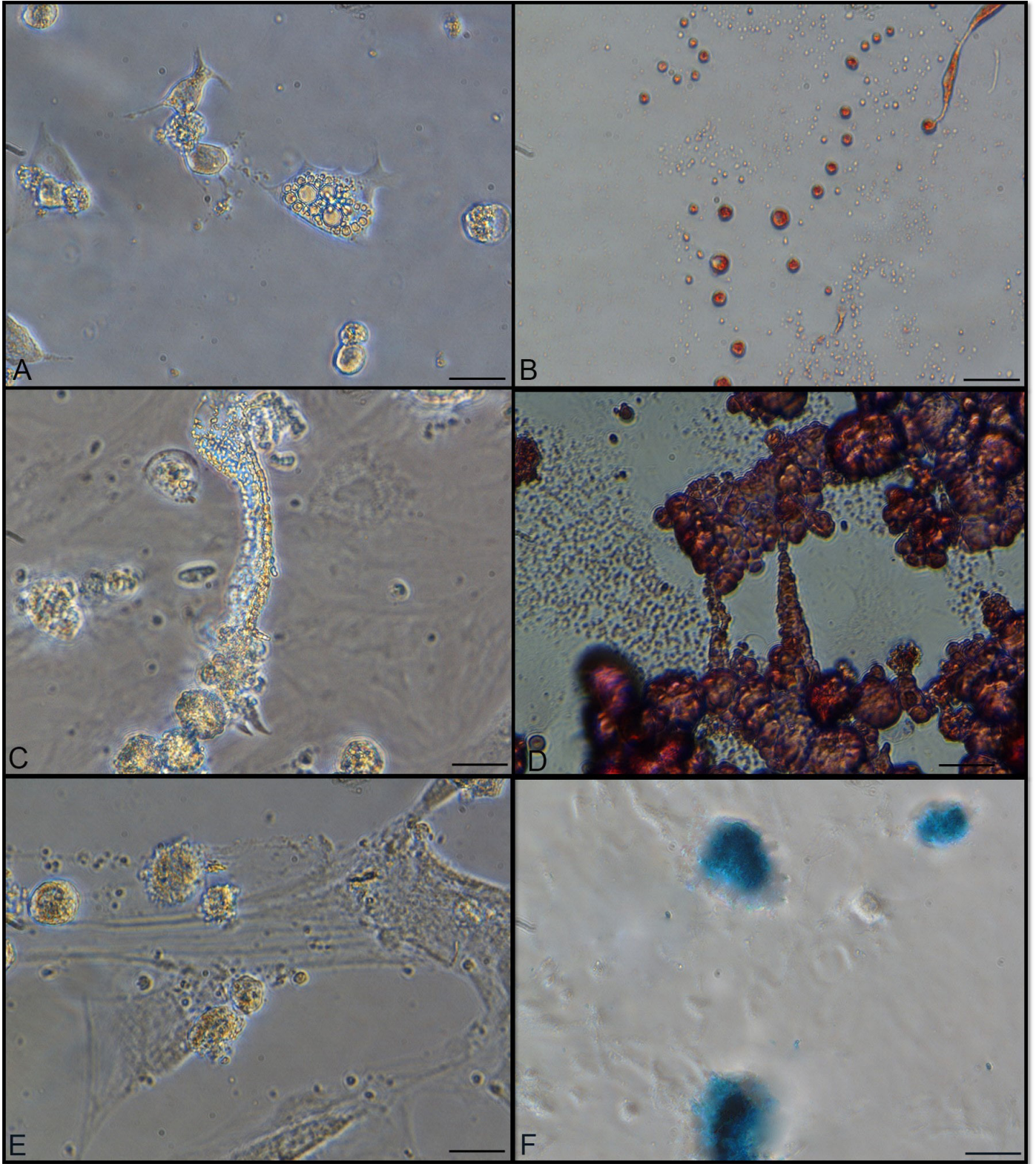


Şekil 4. Ki-67 ekspresyonu; 4-6. günler arasında 2 ile 3. günlere oranla proliferasyonun daha fazla olduğu görülmektedir.

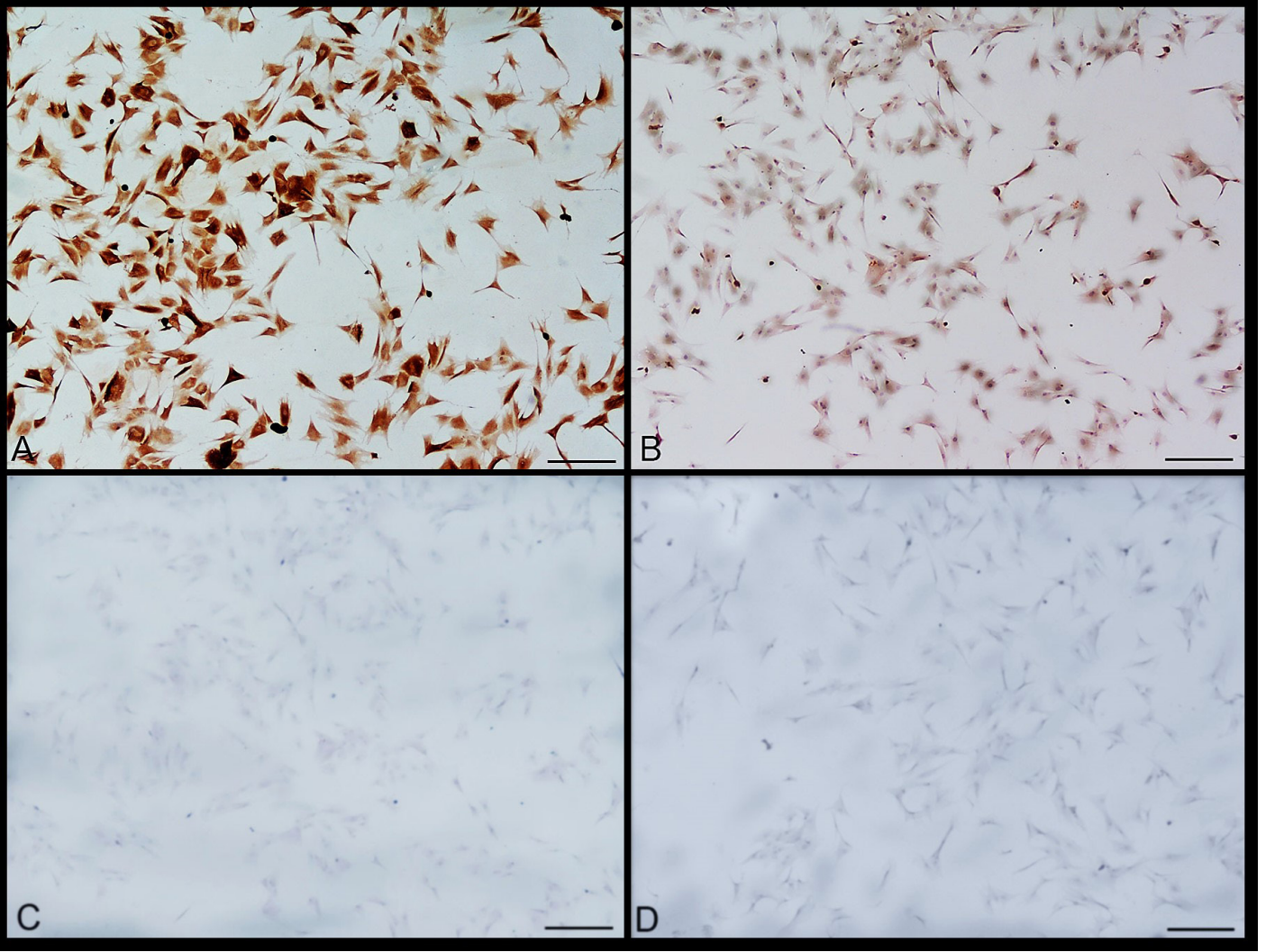
Pasaj 3 hücrelerinin 7. günde adipositlere farklılaştığı, Oil red O pozitif lipid damlacıklarının varlığı ile belirlendi (Şekil 5 A-B). Aynı zamanda Pasaj 3 hücreleri osteoblastlara farklılaştırıldı; osteoblast hücre morfolojisi özellikle 28. günde gözlemlendi ve Alizarin Red boyama metodu ile osteoblast farklılaşması tespit edildi (Şekil 5 C-D). Kondroblast hücrelerine farklılaştırılan 3. pasaj hücreleri yaklaşık

28 günde sferoidal yapıda gözlemlendi ve Alcian Blue ile boyanarak kondroblast hücreleri saptandı (Şekil 5).

Pasaj 3 hücrelerinde; CD90 ile CD105'te pozitif ekspresyon saptanırken (Şekil 6 A-B); CD11b ile CD45'in negatif reaksiyon verdiği gözlemlendi (Şekil 6 C - D).



Şekil 5. A. Pasaj adipositlere farklılaştırılmış hücreler B. Oil Red O ile boyanan yağ hücreleri C. 3. Pasaj osteoblastlara farklılaştırılmış hücreler D. Alizarin Red ile boyanan osteoblast hücreleri E. 3. Pasaj kondroblastlara farklılaştırılmış hücreler F. Alcian Blue ile boyanan kondroblast hücreleri (Bar 25 µm).



Şekil 6 A - B. Pasaj 3 hücrelerdeki CD 90 ile CD 105'in sitoplazma membranında pozitif; C - D. CD 11b ile CD 45'in negatif immu- nolokalizasyon (Bar 100 µm).

Tartışma ve Sonuç

Birçok çalışmada, uzun süre hücrelerin kültüre edilmesi- nin stres sinyalleri oluşumuna ve stres faktörlerinin indük- sionu ile hücrelerin canlılığının azalmasına sebep olduğu belirtilmektedir.²³⁻²⁵ Gronthos ve ark. (2001) ile Osnes-Rin- gen ve ark. (2016); uzun süre subkültüre edilen MKH'lerde sitogenetik bozukluk, telomer kısalması ile hücre yaş- lanma, aktin kümülasyonu ve adezyonun azalması gibi be- lirtileri tanımlayarak, 3'ten fazla pasajın doğru olmayaca- ğını bildirmektedirler.^{18,26} Bu açıdan tümör supressor aktif ve kronik yolakların etkinliğinin, aşırı differensiasyonun, aşırı proliferasyonun, hücre yaşlanmasının, oksidatif stre- sin ve apoptozis indüksiyonunun oluşmaması için çalışma- mızda hücre poliferasyonu pasaj 3 ile sınırlandırıldı.

Osnes-Ringen ve ark. (2016) ile Ross ve Hall (1995) Ki-67 ekspresyonunun; hücre proliferasyonunu tanımlamada uy- gun bir antikor olduğunu belirtmektedirler.²⁶⁻²⁷ Heidari ve ark. (2013) yağ dokusu kökenli mezenkimal kök hücreler- de 7. günde plato fazının oluştuğunu ve hücrelerdeki geli- şme eğrisinin artış göstermediğini saptamışlardır.²⁸ Biz de çalışmamızda Ki-67 immunpozitif pasaj 3 hücre hattının

plato fazından sonraki 6 ve 7. günlerde konfluens sonrası mitotik faaliyetin dengeli olarak azalması ile PDT arasında zıt bir ilişki olduğunu saptadık. Hücre proliferasyonunun maksimum seviyeye ulaşmasından sonra mitozun yavaşla- dığı ve proliferasyon süresinin uzadığı görüldü. Bu durum; hücre popülasyonunun optimal canlılığını koruduğunu, hücre sağ-kalım yanıtının dengelenmiş olduğunu ve hücre hemostazisin sağlandığını göstermektedir.

Gronthos ve ark. (2017) yapmış olduğu çalışmada Ki-67 immunpozitif MKH'lerde; kök hücre farklılaşma kapasite- sinin arttığı ve kök hücre potansiyelinin korunduğunu belirtenlenmiştir.¹⁸ Yapmış olduğumuz çalışmada ise pasaj 3 kök hücrelerinde Ki-67 immunpozitif MKH'lerde hü- cre hemostazisin korunmasının ve optimal kök hücre proliferasyonunun kök farklılaşmasını olumlu etkilediğini gözlemledik.

Heidari ve ark. (2013) yağ doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin başlangıç ekimi sonrasında; 3-6. günler arasın- da pasaj 3 hücre gelişiminde devamlı artış saptandığını, 6. günde hücre proliferasyonunun plato fazına ulaştığını, 7. günde proliferasyonun stabil seviyesini koruduğunu

belirtmişlerdir.²⁸ Çalışmamızda da Heidari ve ark. (2013) çalışmasında olduğu gibi hücrelerin 4-6. günler arasında 2-3. günlere oranla daha fazla Ki-67 immunpozitif hücrelerin varlığının gözlenmesi proliferasyonun daha fazla olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda; logaritmik hücre gelişim eğrisinde de benzer bulguların saptanması hücre- sel proliferasyonu tanımlamaktadır. PDT değerlerinin 1. günden 7. güne kadar optimal aralıktaki artışı; kök hücre bölünme siklusunun pasaj sonuna kadar normal düzeyde ilerlediğini göstermektedir.

İdeal MKH fenotipinin sağlanabilmesi için Dominici ve ark. (2006) ile Peng ve ark. (2008) kritik ölçütleri; fibroblast benzeri kök hücre formasyonu, kök hücre adezyonu, kök hücre migrasyonu, kök hücre plastisitesi, kök hücre yüzey işaretleyicilerinin pozitif ekspresyonu veya negatif reaksiyonu olarak tanımlamışlardır.²⁹⁻³⁰ Çalışmamızda bu kriterler doğrultusunda fenotipik kök hücre yüzey işaretleyicileri olarak kullandığımız CD90 ile CD105'in pozitif ve CD45 ile CD11b'nin negatif immunolokalizasyonu ile hücreler tanımlanmıştır. Kök hücrelerin proliferasyon siklusu boyunca taşımış olduğu Ki-67 protein ekspresyonu, hücrelerdeki mitotik potansiyel ile hücre- sel rejenerasyonu göstermektedir. Ki-67 varlığı ise, terapötik etkinin ve kök hücre fenotipinin korunmasında etkindir.^{16,18,29-30} Çünkü terapötik açıdan transplantasyon sonrası Ki-67 immunpozitif kök hücrelerin proliferasyonunun optimal seviyede olması sayesinde dokuya enjekte edilen kök hücre sayısının azalmaması, hücre- sel göç sırasında terapötik anlamda etki edeceği bölgeye hücrelerin ulaşabilmesi, transplante edilecek kök hücrelerin hücre- sel sağ kalım düzeyinin azalmaması ve hücre yoğunluğunun korunabilmesi açısından da önemli olabileceğini düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak çalışmada; yağ doku kökenli pasaj 3 hücrelerinin; immünofenotipik karakterizasyonu, osteojenik, kondrojenik, adipojenik yönde farklılaşma yetenekleri saptanarak, Ki-67 immunpozitif hücrelerinin PDT bulgularında optimal hücre- sel hemostaza sahip olduğu ve terapötik açıdan sağlıklı mezenkimal kök hücre proliferasyonunun gerçekleştiği gösterildi.

Kaynaklar

- Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):125.
- Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, et al. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):68.
- Murray PE, Hargreaves KM. Regenerative Endodontics: A Review of Current Status and a Call for Action. *J Endod.* 2007;33:377-390.
- Gardner RL. Stem Cells: Potency, plasticity and public perception. *J Anat.* 2002;200:277-282.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN, et al. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976;4(5):267-274.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research: J Orthop Res* 1991;9(5):641-650.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-228.
- Rosen ED, Hsu CH, Wang X, et al. EBP alpha induces adipogenesis through PPARgamma: A unified pathway. *Genes Dev.* 2002;16(1):22-26.
- Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy.* 2013;15(6):641-648.
- Liu L, Cheung TH, Charville GW, et al. Isolation of skeletal muscle stem cells by fluorescence-activated cell sorting. *Nat. Protoc.* 2015;10:1612-1624.
- Marx C, Silveira M, Nardi N, et al. Adipose-Derived Stem Cells in Veterinary Medicine: Characterization and Therapeutic Applications. *Stem Cells Dev.* 2015;24(7):803-813.
- Pelttari K, Steck E, Richer W, et al. The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis; *Injury. Int. J. Care Injured.* 2008;39S1: 58-65.
- Özen A., Gül Sancak İ., Caylan A., Özgenç Ö. 2016. "Isolation of adipose tissue-derived stem cells". *Turk J Vet Anim Sci.* 40 (2): 137-141.
- Gimble JM, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy.* 2003;5(5): 362-369.
- Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach.* 2nd ed. United States, USA: Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
- Sobecki M, Mrouj K, Colinge J, et al. Cell cycle regulation accounts for variability in Ki-67 expression levels. *Cancer Res.* 2017;10.
- Landberg G, Tan EM, Roos G. Flow cytometric multiparameter analysis of proliferating cell nuclear antigen/cyclin and Ki-67 antigen: a new view of the cell cycle. *Exp Cell Res.* 1990;187:111-118.
- Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol.* 2001;189(1):54-63.
- Eslaminejad B., Fallah N. Effects of BIO on prolifera-

- tion and chondrogenic differentiation of mouse marrow-derived mesenchymal stem cells *Vet Res Forum*. 2013; 4 (2):69-76.
20. Pınarbaşı E. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü). Ed.: Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B, Moleküler Biyoloji, 2. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, 425-470, 2010.
 21. Chiericato K, Castegnaro S, Madeo D, et al. Epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-bb can substitute for fetal bovine serum and compete with human platelet-rich plasma in the ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue. *Cytotherapy*. 2011;13(8):933-943.
 22. Zheng H, Ziyou Yu Z, Deng M, et al. Fat extract improves fat graft survival via proangiogenic, anti-apoptotic and pro-proliferative activities. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10:174.
 23. Kim HJ. Stem cell potential in Parkinson's disease and molecular factors for the generation of dopamine neurons. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1812(1):1-11.
 24. Hass R, Kasper C, Böhm S, et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *J Cell Commun Signal*. 2011;9(12):1-14.
 25. Varga I, Miko M, Oravcová L et al. Ultra-structural morphology of long-term cultivated white adipose tissue-derived stem cells. *Cell Tissue Bank*. 2015;16(4):639-647.
 26. Osnes-Ringen Ø, Berg KH, Moe MC et al. Cell death pattern in lens epithelium of cataract patients. *Acta Ophthalmol*. 2016; 94(5): 514–520.
 27. Ross W and Hall PA. Ki-67 from antibody to molecule to understanding? *Clin. Mol. Pathol*.1995;48:113-117.
 28. Heidari B, Shirazi A, Akhondi MM., et al. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of sheep mesenchymal stem cells derived from bone marrow, liver, and adipose tissue. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2013;5(2):104-117.
 29. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8: 315-317.
 30. Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, Ma K, Zhou C. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev*. 2008;17: 761–773.