

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN FARKLI ÇÖZELTİ VE SICAKLIKLARDA SAKLANMASI

STORAGE OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN DIFFERENT SOLUTIONS AND TEMPERATURES

Mehmet BERKER¹ , Emine UTLU ÖZEN² , Fatma ÖZ BAĞCI² 

¹İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Etilik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları ve Doğum Hastanesi, Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

³Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

ORCID ID: M.B. 0000-0003-4755-023X; E.U.Ö. 0000-0002-7397-8769; F.Ö.B. 0000-0002-5507-9639

Atıf/Citation: Berker M, Utlü Ozen E, Oz Bagci F. Storage of mesenchymal stem cells in different solutions and temperatures. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2022;5(1):20-24. <https://doi.org/10.26650/JARHS2022-991485>

ÖZ

Amaç: Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) kendi kendini yenileme ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptir. Rejeneratif tıpta kullanımları günümüzde yaygın hale gelmiştir. Bununla birlikte, başarılı bir klinik uygulama için, MKH'lerin canlılığının ve potansiyelinin transplantasyon öncesi hazırlık ve nakliye sırasında korunması gerekmektedir. Bu çalışmanın amacı; yeterince araştırılmamış olan bu konuda klinik olarak amaçlanan MKH etkinliğini korumak için önemli olan saklama koşulları ile ilgili literatüre katkı sağlamaktır.

Gereç ve Yöntem: 4°C'de ve oda sıcaklığında (24°C), Phosphate Buffered Saline (PBS) ve Serum Fizyolojik(SF) solüsyonunda kısa süreli in vitro depolamada MKH'lerin canlılığı ve CD73, CD90, CD105, CD19 yüzey antijenleri değerlendirildi.

Sonuç: 4°C ve 24°C'de PBS ve SF solüsyonunda canlılık oranları ve yüzey antijenleri açısından sonuçlar benzer olsa da, PBS'te ve 4°C'de daha yüksek oranlar elde edilmiştir. Farklı ortam şartlarında MKH'lerin farklılaşma, yaşlanma ve çoğalma kapasiteleri analiz edilerek ileri araştırmalar yapılabilir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal Kök Hücre, Flow Sitometri, Canlılık

ABSTRACT

Objective: Mesenchymal Stem Cells (MSCs) have the ability to self-renew and differentiate into various cell types. Their use in regenerative medicine is widespread today. However, for successful clinical application, the viability and potency of MSCs must be maintained during pre-transplant preparation and transportation. The aim of this study (an area which has not been adequately researched), is to contribute to the literature on storage conditions, which is important for maintaining the effectiveness of MSCs.

Material and Method: The viability of MSCs and CD73, CD90, CD105, CD19 surface antigens were evaluated in short-term in vitro storage in Phosphate Buffered Saline (PBS) and Serum Physiological solution at 4°C and room temperature (24°C).

Conclusion: Although MSCs are similar in terms of viability and surface antigens in PBS and SF solution at 4°C and 24°C, higher results were obtained in cells kept in PBS at 4°C. Further research can be conducted by analyzing the differentiation, aging and proliferation capacities of MSCs under different environmental conditions.

Keywords: Mesenchymal Stem Cell, Flow Cytometry, Vitality

GİRİŞ

Mezenkimal kök hücreler; çoğalabilen, farklılaşabilen ve kendi kendini yenileyebilen hücrelerdir. Antiinflamatuvar ve immunmodulator etkileri yoluyla prelinik ve klinik çalışmalarda, hücresel terapilerde kullanılmaktadırlar. Otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, cilt hastalıkları klinik kullanım alanlarındandır (1-4). MKH'ler pratikte

en çok kemik iliği, yağ dokusu ve Wharton Jelinden elde edilirler (5, 6).

MKH'lerin klinik uygulamalarda kullanımının artışı ile birlikte; hücrelerin bakımı ve taşınmasının pratikleşmeye ihtiyacı doğmuştur. Hücre kültürü esnasındaki ortam koşulları ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve kültür şartları optimize edilmeye çalışılmıştır (7, 8). Ancak çok önemli olan bir konu da; kök hücrelerin hasta-

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mehmet BERKER E-mail: drberker@gmail.com

Başvuru/Submitted: 05.09.2021 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 04.01.2021 • **Son Revizyon/Last Revision Received:** 16.09.2021 • **Kabul/Accepted:** 23.09.2021 • **Online Yayın/Published Online:** 27.01.2022



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

Tablo 1: İstatistiksel analiz sonuçları

MKH Yüzey Antijenleri	Gruplar				P (KW)
	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup	
	Min-Max	Min-Max	Min-Max	Min-Max	
7AAD	85,0-89,4	71,5-83,0	75,0-85,0	83,0-96,0	0,004*
CD73	97,0-98,8	93,5-96,3	96,5-99,6	95,8-98,0	0,011*
CD90	94,7-98,0	94,8-98,2	94,8-99,0	96,7-98,2	0,386
CD105	64,8-70,0	44,0-50,0	64,0-75,0	59,0-67,0	0,002*
CD19	1,2-3,0	0,0-0,9	0,0-0,0	0,0-0,2	0,002*

*p<0,05

ya nakli öncesindeki işlemlerde hücrelerin saklanması sırasında kullanılan ortamın sıcaklığı, çözelti çeşidi ve saklanma süresi gibi faktörlerin etkisidir (9).

Bu çalışmada PBS ve Serum fizyolojik sıvısında farklı sıcaklıkta depolanan MKH'lerin canlılık değerleri ve temel hücre yüzey antijenleri değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kök hücrelerin kültürlenmesi

Umbilikal kord türevi, wharton jeli kaynaklı satın alınmış mezenekimal kök hücre hattı kullanıldı(ATTC PCS 500-010, ABD). Kök hücreler %10 fetal sığır serumu (FBS)(Wisent, Kanada), penisilin (100 µg/ml)/streptomisin (100 µg/ml)/Glutamin(Capricorn) ile desteklenmiş Dulbecco'nun modifiye Eagle's ortamı (DMEM) (Gibco) içeren medyuma 25 cm²lik flasklara ekildi ve nemlendirilmiş bir CO₂ inkübatöründe 37°C'de inkübe edildi. Wharton Jeli kaynaklı MKH'ler 25 cm²lik kültür kaplarında yaklaşık 8-10 gün boyunca kültürlendi, Kültürlerde, her 3-4 günde bir %10 FBS/DMEM değişikliği yapıldı. Hücreler %70-80 doluluğa ulaştığında, PBS(PAN Biotech) ile durulandı, %0,25 tripsin-EDTA (Wisent, Kanada) ile kültür kabı yüzeyinden kaldırıldı ve PBS ile süspansiyon edildi. Daha sonra süspansiyon halindeki kök hücreler konik tabanlı santrifüj tüpüne alınarak santrifüj edildi ve sıvı kısım uzaklaştırıldı. Her gruptaki kök hücreler ayrı ayrı PBS ve serum fizyolojik ile resüspansiyon edildi.

Gruplar

4 ayrı grup oluşturuldu: PBS: Fosfat Tamponlu Salin, SF: %0,9 Serum Fizyolojik

1. grup: PBS'te 4°C sıcaklıkta bir gece bekletme
2. grup: SF'te 4°C sıcaklıkta bir gece bekletme
3. grup: SF'te 24°C sıcaklıkta bir gece bekletme
4. grup: PBS'te 24°C sıcaklıkta bir gece bekletme

Flow sitometri analizleri

Flow sitometrik analiz için her bir hücre grubu konik tabanlı santrifüj tüpüne alınarak 800 devirde 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldı ve Flow Sitometri Kiti (RD) kullanılarak analiz edildi. 7AAD(BD) ile canlılık analizleri ile CD73, CD90, CD105 ve CD19 yüzey antijenleri analizleri hücre akış sitometri cihazı (BD Canto) ile yapıldı. Analiz öncesi yuvarlak tabanlı santrifüj tüpüne alınacak hücreler tekrar santrifüj edilerek resüspansiyon edildi. Deneyler 5'er kez tekrarlandı.

İstatistiksel analiz

Tanımlayıcı istatistiklerde sürekli veriler ortanca, minimum ve maksimum değerleriyle birlikte verilmiştir. Verilerin istatistiksel karşılaştırmasında sürekli veriler için normal dağılıma uygunluk Kolmogorov Smirnov analizi ile değerlendirilmiştir. Bağımsız grupta sürekli verilerin karşılaştırılmasında 2'den fazla bağımsız grupta gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis Testi kullanılarak yapılmıştır. Çoklu grupta saptanan farklılığın ikili grupta karşılaştırılması bonferroni düzeltmesi ile Mann Whitney U testi kullanılarak yapılmıştır.

İstatistiksel anlamlılık için %95 güven aralığında 0,05 in altındaki p değeri (p<0,05) anlamlı olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler için, İstanbul Üniversitesi tarafından lisanslı olan SPSS v 21,0 programı kullanılmıştır.

BULGULAR

Hücre akış sitometrisi ile yapılan analizler sonucunda elde edilen veriler:

7AAD ile yapılan flow sitometri analizinde canlılık oranı: Birinci grupta ortalama %87,2; ikinci grupta ortalama %77,8; üçüncü grupta ortalama %81,1 ve dördüncü grupta ortalama %88,6 olarak ölçüldü (Resim 1).

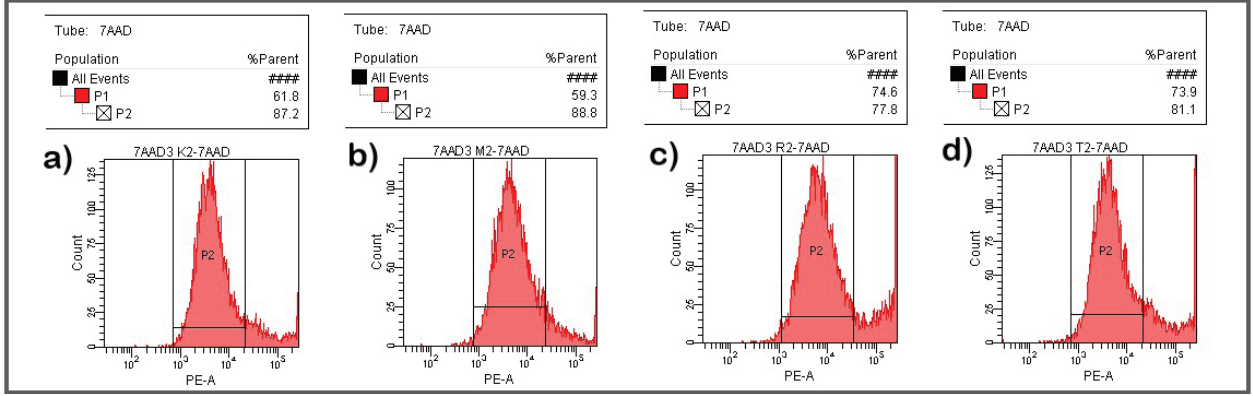
Kök hücrelerin karakterizasyonu amacıyla CD73, CD90, CD105 ve CD19 içeren antijenlerle yapılan flow sitometrik analizde: Birinci grupta sırasıyla ortalama %98, %96,7, %68, %2,4; ikinci grupta sırasıyla ortalama %94, %97, %47, %0,4; üçüncü grupta sırasıyla ortalama %98, %98, %71, %0,0; ve dördüncü grupta sırasıyla ortalama %97,5, %98, %62, %0,1 olarak ölçüldü (Resim 2).

7AAD (%): (p=0,004), CD73(%): (p=0,011), CD105(%): (p=0,002) ve CD19(%): (p=0,002) değeri sıcaklık (4°C ve 24°C) ve çözelti (PBS ve SF) koşullarının değiştiği dört grup arasında istatistiksel ve anlamlı olarak farklılık göstermektedir.

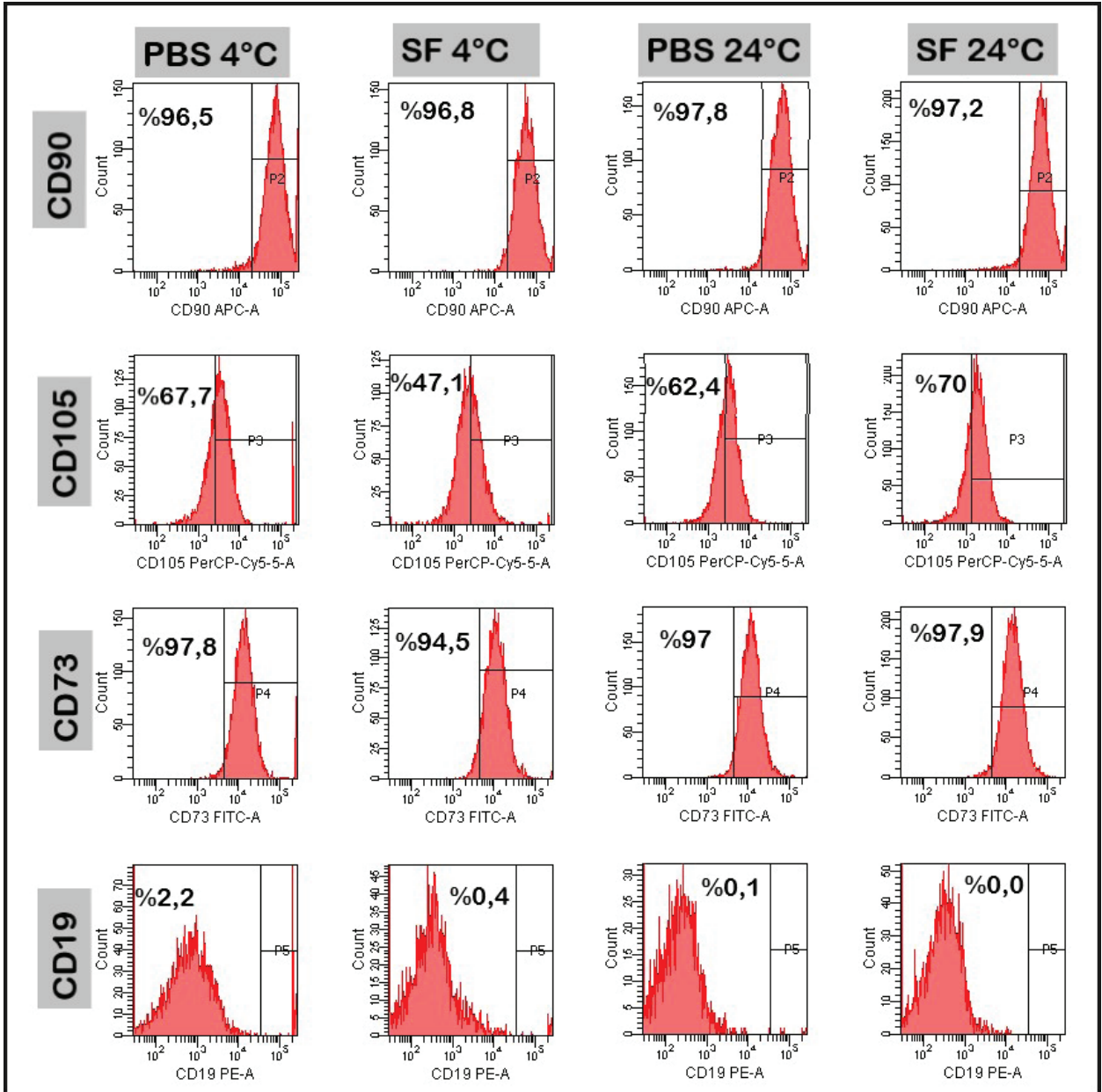
7AAD(% için; farklılığın ikili karşılaştırmalarına bakıldığında 1. grupta ve 4. grupta değerler 2. gruptan istatistiksel ve anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (sırasıyla p=0,035, p=0,018).

CD73(% için; farklılığın ikili karşılaştırmalarına bakıldığında 1. grupta ve 3. grupta değerler 2. gruptan istatistiksel ve anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (sırasıyla p=0,023, p=0,023).

CD105(% için; farklılığın ikili karşılaştırmalarına bakıldığında 1. grupta ve 3. grupta değerler 2. gruptan istatistiksel ve anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (sırasıyla p=0,017, p=0,003).



Resim 1: Mezenkimal Kök Hücre çalışma gruplarında Flow Sitometri canlılık analizi sonuçları: a) 1.grup, b) 4.grup, c) 2.grup, d) 3.grup



Resim 2: Mezenkimal Kök Hücre çalışma gruplarında Flow Sitometri ile karakterizasyon sonuçları

CD19(%) için; farklılığın ikili karşılaştırmalarına bakıldığında 1. Grupta, 3. ve 4. gruptan istatistiksel ve anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,034$).

CD90(%) değeri ($p=0,386$) sıcaklık ve çözelti koşullarının değiştiği dört grup arasında istatistiksel ve anlamlı olarak farklılık göstermemektedir.

Bizim çalışmamızda; elde ettiğimiz sonuçlara göre PBS'te ve 4°C'de (1. grup) bekletilen MKH'ler diğer gruplara göre daha iyi korunmuştur.

TARTIŞMA

Rejeneratif tıpta ve doku mühendisliğinde MKH'lerin kullanım potansiyeli gittikçe artmaktadır. MKH'lerin klinik uygulamaları göz önüne alındığında, çeşitli dokulardan elde edilen MKH'lerin sayısı düşüktür ve bu nedenle MKH'lerin çoğaltılması için birçok aşama gereklidir (8). Kök hücrelerin kültürde çoğaltılması ile ilgili gerekli bütün prosedürlerde ortam şartları optimum olmalıdır ve herhangi bir bakteri veya mantar enfeksiyonu olmamalıdır. Bu nedenle oldukça maliyetli laboratuvarlarda hassas ortamlarda işlemler gerçekleştirilmektedir (10). Biyolojik olarak güvenilirlik sağlamak için her merkezin ve hastanenin kültür laboratuvarları kurması oldukça maliyetlidir. Bu nedenle farklı hastanelerden ihtiyaç durumunda kök hücre kültürlenen merkezlerden MKH talep edilebilmektedir. Bu aşamada MKH'lerin bir merkezden başka bir merkeze taşınması veya yoğun merkezlerde hastaya nakil öncesi hazırlanıp bekletilmesi gerekebilmektedir. Gerekli olan belirli süre içerisinde (birkaç saat veya bir gece) hücrelerin canlılığının ve farklılaşma özelliklerinin korunduğundan emin olunması gerekmektedir (11).

MKH'lerin 4°C'de depolandığı ve farklı solüsyonlarda bekletildiği bir çalışmada kök hücrelerin 4°C'de depolanarak 6 saat içinde nakledilmesi gerektiği belirtilmiştir (12). Çalışmamızda her ne kadar hücre canlılıkları ve fenotipleri korunmuş olsa da daha geniş hücre gruplarında ve farklı kaynaktan elde edilen hücrelerde farklılaşma kapasiteleri de çalışılmalıdır. Adipoz dokudan elde edilen MKH'lerle yapılan başka bir çalışmada 4°C'de 48 saat boyunca %20 albümin içeren Laktatlı Ringer Solüsyonunda bekletilen kök hücrelerin canlılığını %80 oranında koruduğu gösterilmiştir (13). Bir diğer çalışmada ise PBS'te 4°C'de 24 saate kadar hücrelerin bekletilebileceği gösterilmiştir (14). Daha önceki çalışmalardaki bu verilerin sonuçları, bizim çalışmamızdaki verilerle uyumlu bulunmuştur. Çalışmamızda PBS'te ve 4°C'de bekletilen MKH'lerin canlılık ve yüzey işaretleyicileri daha iyi korunmuştur.

SONUÇ

Yaptığımız bu ön çalışma niteliğindeki makalemizde daha iyi imkanlarla grup sayısı artırılarak geniş bir şekilde ele alınıp anlamlı sonuçlar elde edilebilecek ileri çalışmalar yapılabilir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- M.B., E.U.Ö., F.Ö.B.; Yazı Taslağı- M.B; Son Onay ve Sorumluluk- M.B., E.U.Ö., F.Ö.B.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- M.B., E.U.Ö., F.Ö.B.; Drafting Manuscript-M.B Final Approval and Accountability- M.B., E.U.Ö., F.Ö.B.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

REFERANSLAR

- Shen T, Xia L, Dong W, Wang J, Su F, Niu S, Fang Y. A systematic review and meta-analysis: safety and efficacy of mesenchymal stem cells therapy for heart failure. *Curr Stem Cell Res Ther* 2021;16(3):354-65.
- Lavorato A, Raimondo S, Boido M, Muratori L, Durante G, Cofano F, Garbossa D. Mesenchymal stem cell treatment perspectives in peripheral nerve regeneration: systematic review. *Int J Mol Sci* 2021; 2(2):572.
- Gentile P, Garcovich S. Systematic review: adipose-derived mesenchymal stem cells, platelet-rich plasma and biomaterials as new regenerative strategies in chronic skin wounds and soft tissue defects. *Int J Mol Sci* 2021;22(4):1538.
- Wang LT, Liu KJ, Sytwu HK, Yen ML, Yen BL. Advances in mesenchymal stem cell therapy for immune and inflammatory diseases: Use of cell-free products and human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2021; 10(9):1288-1303.
- Wang YH, Tao YC, Wu DB, Wang ML, Tang H, Chen EQ. Cell heterogeneity, rather than the cell storage solution, affects the behavior of mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cell Res Ther* 2021;12(1):1-11.
- Çiçek G, Duman S, Aktan TMJE. Mesenchymal Stem Cell Signaling Pathway and Interaction Factors. *Experimed* 2020;9(3):120-9.
- Jung Y, Bauer G, Nolte JA. Concise review: induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells: progress toward safe clinical products. *Stem Cells* 2012;30(1):42-7.
- Çiçek G, Ozen EU, Bağcı FO, Duman S, Aktan TM, Gundeslioglu AO, et al. Examination of Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cell Surface Markers in a Hypoxic Environment. *Cell Tissue Biology Journal* 2020;14(5):325-31.
- Ścieżnyńska A, Soszyńska M, Szpak P, Krzeńskiak N, Malejczyk J, Kalaszczynska I. Influence of Hypothermic Storage Fluids on Mesenchymal Stem Cell Stability: A Comprehensive Review and Personal Experience. *Cells* 2021;10(5):1043.
- Hoang VT, Trinh QM, Phuong DTM, Bui HTH, Ngan NTH, Anh NTT, Hoang DM. Standardized xeno-and serum-free culture platform enables large-scale expansion of high-quality mesenchymal stem/stromal cells from perinatal and adult tissue sources. *Cytotherapy* 2021;23(1):88-99.
- Cui LL, Kinnunen T, Boltze J, Nystedt, J, Jolkonen J. Clumping and viability of bone marrow derived mesenchymal stromal cells under different preparation procedures: a flow cytometry-based in vitro study. *Stem Cells Int* 2016; 1764938. doi.org/10.1155/2016/1764938.

12. Chen Y, Yu B, Xue G, Zhao J, Li R-K, Liu Z et al. Effects of storage solutions on the viability of human umbilical cord mesenchymal stem cells for transplantation. *Cell Transplant* 2013;22(6):1075-86.
13. Gálvez-Martín P, Hmadcha A, Soria B, Calpena-Campmany AC, Clares-Naveros B. Study of the stability of packaging and storage conditions of human mesenchymal stem cell for intra-arterial clinical application in patient with critical limb ischemia. *Eur J Pharm Biopharm* 2014;86(3):459-68.
14. Muraki K, Hirose M, Kotobuki N, Kato Y, Machida H, Takakura Y, et al. Technical report: Assessment of viability and osteogenic ability of human mesenchymal stem cells after being stored in suspension for clinical transplantation. *Tissue Eng* 2006;12(6):1711-9.