

İnsan göbek kordonu Wharton jölesinden mezenkimal kök hücrelerin eldesinde izolasyon yöntemlerinin ve antioksidatif kültür koşullarının etkisi

THE EFFECT OF ANTIOXIDANT CULTURE CONDITIONS AND ISOLATION METHODS IN OBTAINING MESENCHYMAL STEM CELLS FROM THE WHARTON'S JELLY OF HUMAN UMBILICAL CORD

Tuğba ŞAN¹, Uğur BORA¹, Özge SAYIN², Mehmet Emin GÜNEŞ³, Deniz ÖZTEKİN⁴, Bekir Uğur ERGÜR⁵, Kemal BAYSAL⁶, Pınar AKAN²

¹Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilimleri Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

³Çiğli Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, İzmir, Türkiye

⁴Bakırçay Üniversitesi, Çiğli Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, İzmir, Türkiye

⁵Girne Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Girne, Kıbrıs

⁶Koç Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Amaç: Günümüzde, insan kök hücrelerin eldesi ve kültür ortamında çoğaltılması rejeneratif tıp uygulamalarının ilk aşamalarından biridir. Terapötik amaçlar için in vitro hücre çoğaltmada, mezenkimal kök hücreleri (MKH) nin muhtemelen oksidatif stresi içeren erken yaşlanmaya hızla girmeleri önemli bir sorundur. Klinikte tedavide en yaygın kullanılan hücreler, kemik iliği MKH (Kİ-MKH) olmakla birlikte, göbek kordonu çevresinde yer alan Wharton jölesi MKH (WJ-MKH) nin invaziv olmayan şekilde elde edilebilmeleri, doku reddine yol açan proteinleri eksprese etmemeleri ve immünosupresif özellikleri nedeni ile Kİ-MKH' nden daha kullanışlı olabilecekleri ileri sürülmektedir. Çalışmamız ile WJ-MKH'nin eldesi ve çoğaltılmasında kullanılan izolasyon yöntemlerinin etkinliğinin karşılaştırılması ve anti-oksidatif kültür koşullarının hücre canlılığı ve kök hücrelere özgü yüzey antijen ekspresyonlarına etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya dahil etme kriterlerine uyan toplam 17 sağlıklı gebeden doğum sonrası kordon örnekleri alındı. Wharton jölesinden enzimatik ve eksplant yöntemi ile kök hücreler elde edilerek, hücre canlılıkları ve proliferasyon kapasiteleri karşılaştırıldı.

Bulgular: Kök hücrelerin, osteoblastlara, kondrositlere ve adipositlere farklılaşma kapasiteleri immunohistokimyasal olarak gösterildi. Hücrelerin çoğaltılması sürecinde CD44, CD73, CD90, CD105 yüzey antijenlerinin dördüncü pasaja kadar anlamlı değişmeden eksprese edildiği saptandı.

Tuğba ŞAN

Dokuz Eylül Üniversitesi,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü,

Sinirbilimleri Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

E-posta: ttugbasan@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-0692-3423>

Antioksidan moleküller N-asetil sistein ve askorbik asit ilavesi ile sağlanan kültür koşullarının hücre canlılığı ve hücre yüzey antijen ekspresyonları üzerine etkisi gösterildi.

Sonuç: Wharton jölesinden MKH'lerin izolasyonunda eksplant yönteminin yüzey antijen ifadeleri anlamlı değişmeksizin, daha kısa zaman diliminde elde edilen toplam hücre sayısı nedeni ile enzimatik yöntemle göre daha avantajlı olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Wharton jeli, izolasyon yöntemleri, antioksidanlar, mezenkimal kök hücre, hücre canlılığı

ABSTRACT

Objective: Obtaining and growing human stem cells are the first stages of regenerative medicine applications. During cell proliferation for therapeutic purposes, mesenchymal stem cells (MSCs) rapidly undergo premature aging, possibly involving oxidative stress. Bone marrow MSCs (BM-MSCs) are the most clinically used cells. It is suggested that Wharton-jelly MSCs (WJ-MSCs) located around the umbilical cord may be more useful than BM-MSCs due to non-invasive acquisition, lack of expression of proteins which cause tissue rejection, and their immunosuppressive properties. It was aimed to compare the efficiency of the isolation methods used in the reproduction of WJ-MSCs and to determine the effect of anti-oxidative culture conditions on cell viability and expression of cell-surface antigens.

Materials and Methods: Postnatal cord samples were obtained from 17 healthy pregnant women who met the inclusion criteria. Stem cells were obtained from Wharton jelly using enzymatic and explant methods and cell viability and proliferation capacities were compared.

Results: The differentiation capacity of stem cells into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes was demonstrated immunohistochemically. The expression of CD44, CD73, CD90, CD105 surface antigens remained unchanged until the fourth passage during the proliferation process. The effect of culture conditions achieved by addition of anti-oxidant molecules N-acetyl cysteine and ascorbic acid on cell viability and cell surface antigen expressions were demonstrated.

Conclusion: The explant method in the isolation of MSCs from Wharton jelly was more advantageous than the enzymatic method due to the total number of cells obtained in a shorter time period, without significantly changing the surface antigen expressions.

Keywords: Wharton jelly, isolation methods, antioxidants, mesenchymal stem cells, cell viability

Kök hücreler, uzun süre devam eden bölünme yeteneğine sahip ve kendini yenileyebilen hücreler olmaları ve çeşitli uyarımlar aracılığı ile vücutta bulunan farklı karakteristiklere sahip özelleşmiş hücrelere farklılaşabilme kapasiteleri ile diğer hücre tiplerinden ayrılırlar (1). Embriyonik kök hücreler pluripotent kök hücrelerdir, rejeneratif tıp için önemli bir potansiyele sahip olmalarına rağmen embriyodan elde ediliyor olması ve kötüye kullanılabilme ihtimali etik kaygılara yol açmaktadır(2, 3). İlk olarak Friedenstein tarafından kemik iliğinde belirlenen yetişkin (somatik) dokulardan köken

alan mezenkimal kök hücreler (MKH), yüzeye tutunup koloni oluşturan ünitelere çoğalabilen, multipotent özellik gösteren, fibroblast benzeri stromal hücrelerdir. Belirli koşullarda farklılaşarak, osteojenik, kondrojenik, myojenik, adipojenik ve diğer hücre türlerine dönüşebildiği, çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (4 - 7). MKH' in plastisite yeteneği, alloreaktivite eksikliği ve akut advers reaksiyonun olmaması gibi faydalı özellikleri sayesinde hücre tedavilerde ve rejeneratif tıpta hücre kaynağı olarak kullanımları giderek artmaktadır (8).

Göbek kordonu çevresinde yer alan Wharton jölesi mezenkimal kök hücreleri (WJ-MKH)'nin ise doku reddine yol açan proteinleri eksprese etmemeleri yanı sıra immün sistem baskılayıcı/düzenleyici fonksiyonları, non-invaziv koşullarda donörden elde edilmeleri ve daha az etik kaygı sunmaları nedenleri ile erişkin kemik iliği mezenkimal kök hücre (Kİ-MKH)'lerine göre üstün olabilecekleri ileri sürülmektedir (9 - 11). Wharton jölesinden elde edilen kök hücre transplantasyonunun intervertebral disk dejenerasyonu gibi klinik durumlarda olumlu etkileri gösterilmiştir (12). Ayrıca WJ- MKH'lerin dopaminerjik ve asetilkolinerjik nöronlar gibi fonksiyonel hücelere farklılaşması için yönetsel çalışmalar araştırmacıların ilgi odağı oluşturmuştur (13 - 16).

İnsan kök hücrelerine dair rejeneratif tıp uygulamalarının önemli aşamalarından biri orijinal dokudan kök hücrelerin izolasyonu ve primer hücre kültürüdür. Genel olarak izolasyon yöntemleri enzimatik yöntemler ve eksplant kültür yöntemi olarak iki ana teknik olarak kategorize edilmektedir. Enzimatik yöntemlerde, hücrelerin dokudan ayrılması için bir, iki veya bazı işlemlerde üç proteolitik enzim kullanılır; tek hücre süspansiyonu daha sonra hücre proliferasyonu için uygun ortamda kültürlenir. Eksplant yönteminde ise enzim kullanılmaz; orijinal doku, kültür kaplarına veya şişelerine yerleştirilecek şekilde küçük parçalar halinde kesilir ve hücre kültür kabına tutunmaları sağlanan doku parçalarından hücreler dışarı çıkmaya ve çoğalmaya başlar (17). Primer kültür için dokuların ayrışmasını sağlayan teknikler, izole edilen hücrelerin miktarını ve kalitesini etkileyebilir. Kök hücre biyolojisi çalışmalarında standardizasyon için karşılaşılan başlıca problemlerden biri, kullanılan hücre kültür ortamları ve hücre dışı sinyal faktörleri nedeni ile homojen elde edilemeyen transkripsiyonel profil farklılıklarıdır (18). Diğer taraftan terapötik amaçlar için in vitro hücre çoğaltmada, MKH'lerin hızla muhtemelen oksidatif stresi içeren erken yaşlanmaya girdikleri ileri sürülmektedir (19). WJ-MKH'lerin eldesinde ve çoğaltılmasında standardize ve sağlıklı hücre verim artırıcı protokollere ihtiyaç vardır.

Biz bu çalışma ile WJ-MKH'inin izolasyonunda kullanılan enzimatik ve eksplant yöntemlerinin kök hücrelerin çoğaltılması ve idamesi sürecinde etkinliğinin

karşılaştırılmasını, kültür ortamına antioksidan moleküllerin eklenmesinin hücrelerin çoğaltılması ve idamesi için gereken pasajlama sürecindeki hücre canlılığı, proliferasyonu ve kök hücreye özel yüzey antijen ifadelerine etkilerini belirlemeyi amaçladık. Ayrıca kendi laboratuvar koşullarımızda uygulanabilir, etkin ve standardize bir protokolün oluşturulmasını hedefledik.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için yapılabilmesi için Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'ndan 17.11.2016 tarihli 2016/28-18 numaralı kararı ile onay alınmıştır. Kök hücre eldesi için çalışmaya T.C. Sağlık Bakanlığı İzmir Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tepecik Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Kadın Doğum Kliniği'ne başvuran 18-40 yaş arası miat (37-40 haftalık) sezeryanla doğum yapan ve gönüllü onam veren 17 gebeden alınan örnekler dâhil edilmiştir.

Donör Dışlama Kriterleri

Çoğul gebelikler, yardımcı üreme teknikleri yoluyla elde edilen gebelikler, bilinen genetik ve yapısal anomalisi olan fetüsler, diyabet, tiroit hastalıkları gibi annenin bilinen ek hastalığı olduğu durumlar ve sürekli ilaç kullanımı gerekli haller, intrauterin gelişme geriliği (fetal ağırlık <2500 gr) olan gebeler çalışma dışı bırakılmıştır.

Göbek Kordonunun Temini

Doğumun gerçekleşip bebeğin doğumunu takiben çocuk doktoruna verilmesinin ardından plasenta ile kordon arasına 3. bir klemp konularak plasenta ile birlikte göbek kordonu uterustan alındı. Operasyon sırasında umbilikal kord, fetal uca yakın bölümünden yaklaşık 10-20 cm uzunluğunda kesildi. Kordonun üzerindeki kan aseptik koşullarda silinerek birkaç dakika içinde steril, 5 g/l glukoz, 50 µg/ml gentamisin, 2.5 µg/ml amfoterisin B, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin eklenmiş, +4°C de bekletilen fosfat tamponuna (PBS) yerleştirildi. Kordonun ~2 saat içinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya hücre kültürü laboratuvarına transferi sağlandı ve bekletilmeden kök hücrelerin enzimatik ve eksplant yöntemleri ile eş zamanlı izolasyonuna başlandı.

Kök Hücrelerin İzolasyonu

Alınan kordonlar örnekleri, steril bir kabın içerisine bir miktar soğuk fosfat buffer saline (PBS) ile birlikte yıkanarak üzerlerindeki pıhtı kalıntıları ve kan tamamen temizlendi. Tüm kordon önce boyuna kesildi ve kordon içerisindeki iki arter ve bir ven özenle disekte edilip Wharton jeli bölgesi ortaya çıkarıldı. Daha sonra aşağıda detayları verilen enzimatik ve eksplant yöntemleri ile mezenkimal kök hücreler izole edildi.

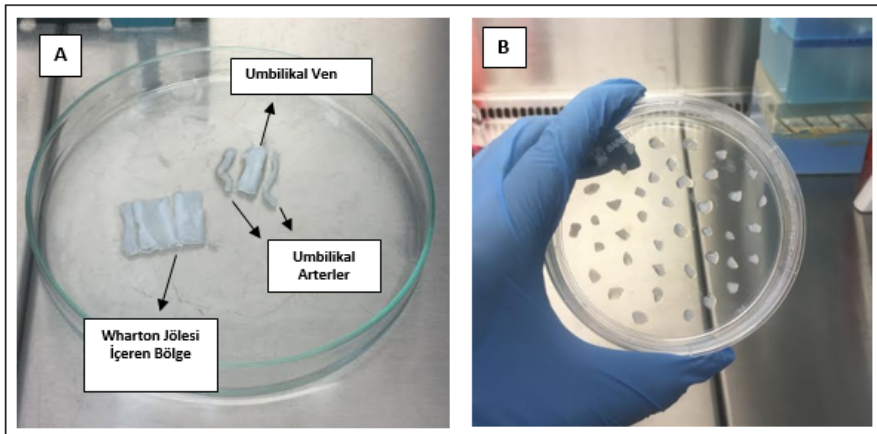
Enzimatik Yöntem

Çalışma kapsamında enzimatik yöntem ile WJ-MKH eldesi için kollajenaz (ThermoFisher Scientific 17104019) ve tripsin (ThermoFisher Scientific 25300-054) enzimleri kullanıldı. Steril taşıma solüsyonu (%0,1 penisilin/streptomisinli PBS) içinde soğuk bir şekilde hücre kültürü laboratuvarına transfer edilen kordonlar, laboratuvar koşullarında steril PBS ile birkaç kez daha yıkanarak etrafındaki ve iç kısmındaki fazla kandan arındırıldı. Kordon steril bistüri yardımıyla boylamasına disseke edilerek damarlarından ayrıştırıldı. Geriye kalan jelatinöz kısım (Wharton jölesi) yaklaşık 0,5 cm³ lük parçalara ayrıldıktan sonra serumsuz DMEM/F12 ile karıştırılıp 250g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra pellet kollajenaz enzimi ile 37°C'de 18 saat muamele edildi.

İnkübasyon sonrası mukoz pellet steril PBS ile yıkandıktan sonra %2,5 tripsin ile 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde enzimli pelletlerin üzerine %10 FBS'li DMEM/F12 büyüme ortamı eklenerek enzimin nötralizasyonu sağlandı. Ardından bu karışım tekrardan santrifüj edilerek oluşturulan süpernatant kısmı steril kültür kaplarına aktarılarak doku parçalarından enzimatik yöntemle ayrıştırılan hücrelerin kültür kabının yüzeyine tutunmaları ve çoğalmaları sağlandı (8).

Eksplant Yöntemi

Wharton jeli içerisinde bulunan mezenkimal doku 0,5 cm³lik parçalara ayrılarak parçalar, petri kabı ve/veya altı kuyucuklu plaklara her kuyucuğuna jel bölümü yüzeyle temas edecek şekilde yerleştirildi. Parçalar kurumaması için PBS içerisinde bırakıldı. Parçalar 30-40 dakika inkübe edilerek yüzeye tutunmaları sağlandı. eksplantlara % 10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS), 100 µg/ml streptomisin, 100 U/ml penisilin ve 2 mM L-Glutamin içeren DMEM/F-12 kültür ortamı eklendi. Hücreler %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de tutularak ve büyüme ortamı haftada iki kez yenilenerek hücrelerin dokudan çıkması ve çoğalmaları beklendi (Şekil 1). Eksplantlar her gün ışık mikroskobu yardımıyla izlenerek hücre çıkışı gözlemlendi 21-23 günden sonra hiçbir şekilde hücre çıkışı gözlemlenmeyen eksplantlar deney dışı bırakıldı (12).



Şekil 1: Göbek kordonundan eksplant yöntemi ile mezenkimal kök hücre izolasyonu Wharton jelini bulunduran fetal bölgeye yakın alınan göbek kordonu içerisinde wharton jölesi içeren bölge, umbilikal arterler ve umbilikal ven görülmektedir (A), Göbek kordonundan elde edilen eksplantlar küçük boyutlarda petri kabına yerleştirilerek kültür kabına tutunmaları sağlandı (B).

Kök Hücre Kültürü ve Antioksidan Molekül Uygulaması

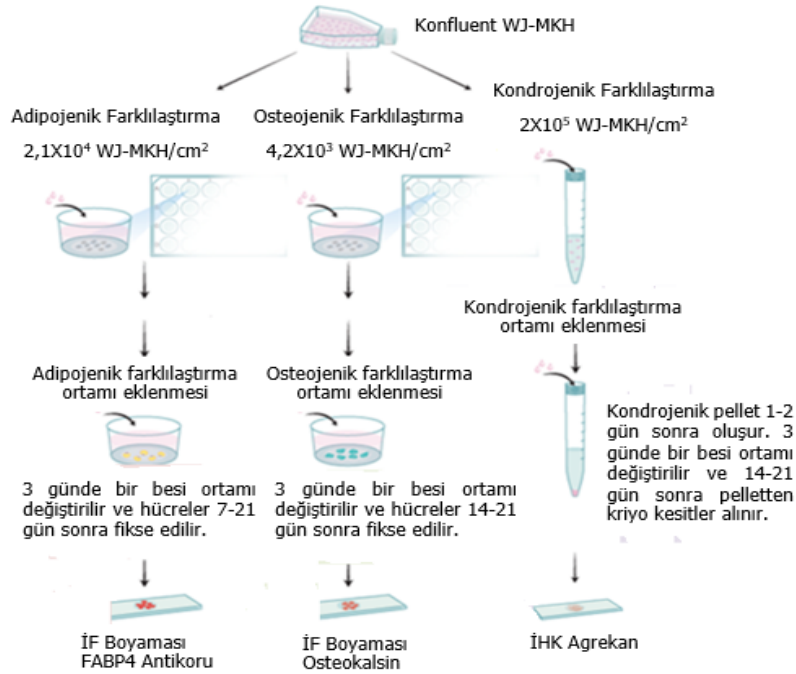
Etrafındaki alanı dolduracak kadar hücre çıkışının gözlemlendiği eksplantlar, akütaz (Sigma A6964) enzimi ile muamele edilerek, WJ-MKH'leri toplandı ve 6 kuyucuklu ve/veya 25 cm²'lik kültür kaplarına pasajlanarak, %10 FBS, 100 µg/ml streptomisin, 100 U/ml penisilin ve 2 mM L-Glutamin içeren komplek DMEM/F-12 kültür ortamı ile %5 CO₂ içeren inkübatörde kök hücre idamesine devam edildi. Her gün hücreler inkübatörden alınarak ışık mikroskobu yardımıyla gözlemlenerek durumları değerlendirildi.

Antioksidan özellikle kimyasal maddelerin hücre canlılığı ve kök hücre yüzey antijeni ekspresyonlarına etkisini belirlemek için, N-asetil sistein (NAC, Sigma A7250), Askorbik Asit-2-Fosfat (AA-2P, Sigma 49752) kullanıldı. Her üç günde bir yenilenmek üzere NAC (0,50-3 mM), AA-2P (100-300 µM) konsantrasyonlarda antioksidan madde içeren taze ortamlar (%10 FBS'li DMEM/F12) ile WJ-MKH'ler 7 gün süresince beslendi. Konsantrasyon grupları kendi içinde en az beş tekrarlı çalışıldı.

Kök Hücre Karakterizasyon Deneyleri

WJ-MKH'LERİN OSTEOJENİK, KONDRÖJENİK VE ADİPOJENİK HÜCRELERE FARKLILAŞTIRILMASI

Araştırmalarımız boyunca izole edilen WJ-MKH'lerin mezenkimal kök hücre kriterlerini sağladıklarını göstermek amacıyla "İnsan MKH fonksiyonel tanımlama kiti(R&D Systems, Cat:SC006)" kullanıldı ve WJ-MKH'ler kemik, kıkırdak ve yağ dokusu hücrelerine farklılaştırıldı. Farklılaştırma prosedürü için erken pasaj numarasında (maksimum 3 pasaj sayısı) kültür edilen WJ-MKH'lerden 12 kuyucuklu kültür plaklarında bulunun poli-D-lisin kaplı lameller üzerine ve 15mL hacim kapasitesine sahip falkon tüplerine kit prosedüründe belirtilen hücre sayıları göre ekim yapıldı. Ekilen hücreler, %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma prosedürleri için kit protokolünde tanımlanan süreler ve koşullara göre inkübe edildi (Şekil 2).



Şekil 2: İnsan WJ-MKH fonksiyonel tanımlama protokolü

Uygulanan protokollerin bitiminde osteojenik ve adipojenik hücrelere farklılaştırılan gruplara buz üzerinde soğutulmuş saf metanol ile fiksasyon işlemi uygulandı. İşlem sonucunda fikse edilmiş hücrelere oil red ve alizarin red histokimyasal boyamaları ve immüno floresan boyama yapıldı. Sonuçlar ışık mikroskobu ve floresan mikroskobu kullanılarak değerlendirildi. Süspanse kültür ortamında inkübasyonu gerçekleştirilen ve pellet formunda bulunan kondrojenik farklılaşma grubu hücreleri ise inkübasyon süresi bitiminde fikse edilip agara gömüldü. Gömülen pelletten kriyo kesitler alınarak alsiyen mavisi boyaması ile histokimyasal olarak boyandı ve ışık mikroskobu ile veriler elde edildi.

İMMÜN FLORESAN (İF) BOYAMA

İzole edilmiş WJ-MKH'lerin kök hücre kriterlerini sağlayıp sağlamadığını belirlemek için CD44 ve CD90 kök hücrelere özgü yüzey antijenleri için antikorlar kullanılarak immüno floresan işaretleme gerçekleştirildi. CD90 birincil antikor Abcam (ab225), CD44 birincil antikor Abcam (ab6124), DAPI CST (8961S), Anti-fare ikincil antikor Jackson Immuno Research (115-095-003), Anti-tavşan ikincil antikor Jackson Immuno Research (111-095-003) kullanıldı.

Öncelikle 12 kuyucuklu hücre plaklarının içerisine steril 18mm çapında lameller yerleştirildi. İşlem sonrasında her kuyucuğa 4×10^3 hücre ekildi ve inkübe edildi. Inkübasyon sonrası fiksasyon için -20°C 'de soğutulmuş metanol kuyucuk başına 1ml olarak eklendi ve plak 30 dakika boyunca -20°C 'de inkübe edildi. Süre sonunda soğuk PBS kullanılarak yıkama yapıldı. Lameller temiz bir pens yardımıyla hücre fikse edilen yüzeyleri yukarıda kalacak şekilde kuyucuklardan alındı. Permeabilizasyon işlemi için her lamel üzerine $80 \mu\text{l}$ %0,2'lik TritonX-100 içeren PBS eklenip 5 dakika bekletildi. PBS solüsyonu ile 3 kez yıkama yapılmasının ardından her lamel üzerine $80 \mu\text{l}$ %1 Bovin Serum Albumin (BSA) içeren PBS eklenerek 30 dakika bekletildi böylece bloklama işlemi gerçekleştirildi. Lameller PBS kullanılarak 3 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından 1:100 oranında bloklama tamponu ile dilüe edilmiş CD90 ve CD44 primer antikorları ile 2 saat boyunca inkübe edildi. Inkübasyon sonrası lameller PBS ile 3 kez

yıkandı. Daha sonra primer antikorlara uygun 1:100 oranında bloklama tamponuyla seyreltilmiş sekonder antikorlarla 1 saat boyunca karanlıkta inkübe edildi. Inkübasyon süresi bitiminde lameller PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra $6 \mu\text{l}$ DAPI boyası damlatılmış temiz lameller üzerine hücre fiksasyonu yapılmış yüzeyler DAPI boyasıyla temas edecek şekilde yerleştirilip 1 gece boyunca karanlıkta bekletilerek kurumaları sağlandı. Olympus DP71 floresan mikroskobunda DP Controller ve DP Manager programları kullanılarak immüno floresans görüntüleri 10X, 20X ve 40X büyütmelemler kullanılarak elde edildi.

AKIŞ SİTOMETRİ ANALİZİ

Akış sitometrisi deneylerinde WJ-MKH'lerin hücre yüzey belirteçlerini değerlendirmek için BD Accuri C6 Cytometer cihazı ve bu cihazla uyumlu BD Stemflow Human MSC Analysis Kit (San Jose, CA, ABD) kullanıldı. Kit protokolüne göre hücreler, bir kazıyıcı yardımıyla kültür plaklarının yüzeyinden kaldırıldı ve hücrelerin peletlenmesi için 1300 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Pelete $600 \mu\text{l}$ PBS eklendi ve yeniden süspanse edildi. Hücreler, kit prosedürlerine göre dört farklı CDH (CD44, CD73, CD90 ve CD105) CD antijen antikorları ile etiketlendi. CD90 FITC (Klon: 5E10), CD105 PerCP-Cy5.5 (Klon: 266), CD73 APC (Klon: AD2) ve CD44 APC (Klon G44-26) ve CD34 APC (Klon 8G12) ile etiketlenen hücreler incelenmiştir. Negatif kontrol olarak herhangi bir antikor içermeyen hücre süspansiyonu kullanıldı. Inkübasyonun sonunda hücreler, bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak için 1300 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatantları çıkarıldı ve aynı hacimde PBS eklenerek yeniden süspanse edildi. Daha sonra, etiketli hücreler sitometre tüplerine aktarıldı (son hacim $500 \mu\text{L}$ olacak şekilde) ve her numunenin CD antijen yüzdesi, negatif kontrol ve izotip kontrolüne göre BD Accuri C6 Sitometre cihazında geçirilerek analiz edildi.

HÜCRE CANLILIK VE PROLİFERASYON TESTİ

Antioksidan moleküllerin (NAC ve AA-2P) hücrelerin proliferasyon kapasiteleri üzerindeki etkisini analiz etmek için WST-1 testi (Dojindo, Cat:W201, Japonya) kiti kullanılarak, üreticinin önerileri doğrultusunda

yapıldı. Bu testler için 96 kuyulu hücre kültürü kaplarına kuyu başına 2×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılarak deney başlatıldı. Deney süresi bitiminde kuyucuk başına 100 μ l DMEM/F12 ortamına 10 μ l WST-1 probu eklenecek şekilde oran hesabı yapılarak deney planlandı. Kuyucuklara WST-1 probu eklendikten sonra kültür kabı ışık görmeyecek şekilde 37°C 'de inkübe edildi. Probun çalışma prensibi kolorimetrik absorbans ölçümüne dayalı olup, inkübasyonun birinci saatinden sonra her saat başı (ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerde) 460 nm dalga boyunda plak okuyucuda absorbans ölçümü yapıldı. Sonuçlar kontrol grubuna %100 denilerek, %canlılık olarak hesaplandı.

NÖTRAL KIRMIZI BOYAMASI (NÖTRAL KIRMIZI TUTULUM DENEYİ)

WST-1 ve MTT gibi hücre canlılık testlerine alternatif olarak WJ-MKH'lerinin kültür şartlarındaki canlılık kapasitelerini ölçmek amacıyla nötral kırmızı tutulum deneyi yapıldı. Nötral kırmızı boyası canlı hücrelerin boyanmasında kullanılan bir boya olup, lizozomlarda tutularak bu hücrelerin kırmızı granüllü bir görünüm almasını sağlamaktadır (20). Farklı konsantrasyonlarda (2, 5 ve 7 mg/ 100 ml) nötral kırmızı çözeltisi hazırlanmış olup, WJ-MKH'leri için en uygun boya konsantrasyonunun 5 mg/100 ml olduğu saptandı. %5 FBS' li DMEM/ F12 ortamında son konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde boya çözeltisi hazırlanarak, 96-kuyucuklu plakta kuyucuk başına 200 μ l boya olacak şekilde hücreler %5 CO_2 'li inkübatörde 37°C 'de ortalama 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi bitiminde PBS ile yıkama basamağından sonra, %4 formaldehitte fiksasyon basamağında hücreler 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası formaldehit ortamdan uzaklaştırılıp, kuyucuklara 200 μ l destain (etil alkol, asetik asit ve distile su içeren) solüsyonu eklenerek, 420 nm'de plate okuyucuda spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS Windows 22.00 paket programı kullanıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasındaki-kare testi ve gerektiğinde Fisher'in kesin ki-kare testi ve sürekli değişkenler bağımsız örneklem t-testi ve Mann-Whitney U testi kullanılarak

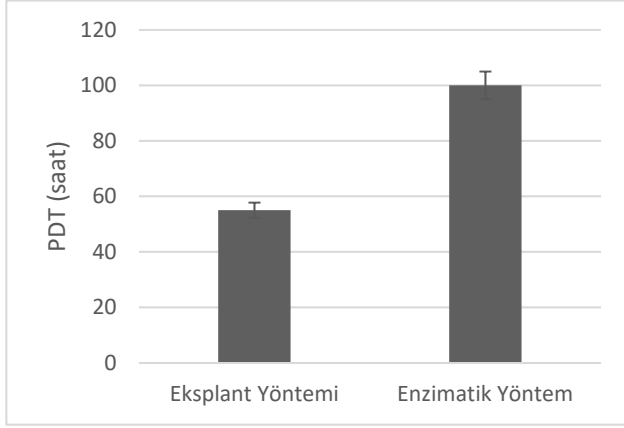
karşılaştırıldı. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma ve SEM, kategorik değişkenler ise yüzde olarak ifade edildi. Tüm analizlerde $p < 0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen veriler, deney içi ve deneyler arası en az 3-9 kez tekrarlanarak elde edildi.

BULGULAR

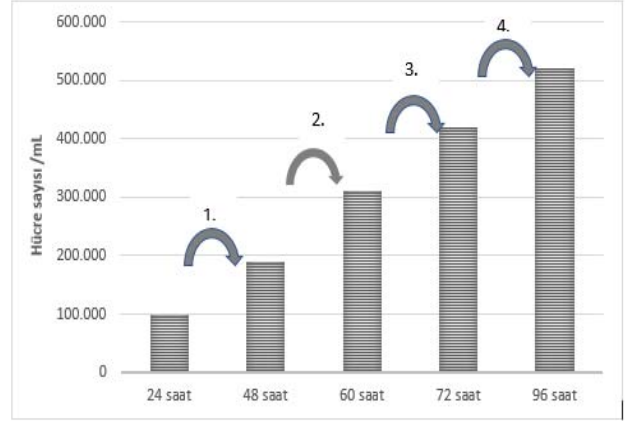
WJ-MKH'lerin İzolasyon Süreleri ve Proliferasyon Hızları

Eksplant yöntemi ve enzimatik yöntemle elde edilen WJ-MKH'lerin proliferasyon kapasiteleri karşılaştırıldığında, öncelikle ters faz ışık mikroskobu ile yaptığımız hücre sayımlarına göre eksplant yönteminin proliferasyon hızının daha yüksek olduğu görüldü. Eksplant yöntemi ile elde edilen WJ-MKH 'lerin iki katına çıkma zamanı (population doubling time; PDT) $\sim 59 \pm 12$ saat iken, enzimatik yöntem ile elde edilen hücrelerde ise $\sim 100 \pm 17$ saati bulduğu belirlendi (Şekil 3). Hücrelerin genel olarak proliferasyon hızının pasaj 2 ve 3'de en yüksek seviyede olduğu, pasaj 3'den sonra ise, proliferasyon hızının azaldığı gözlemlendi (Şekil 4).

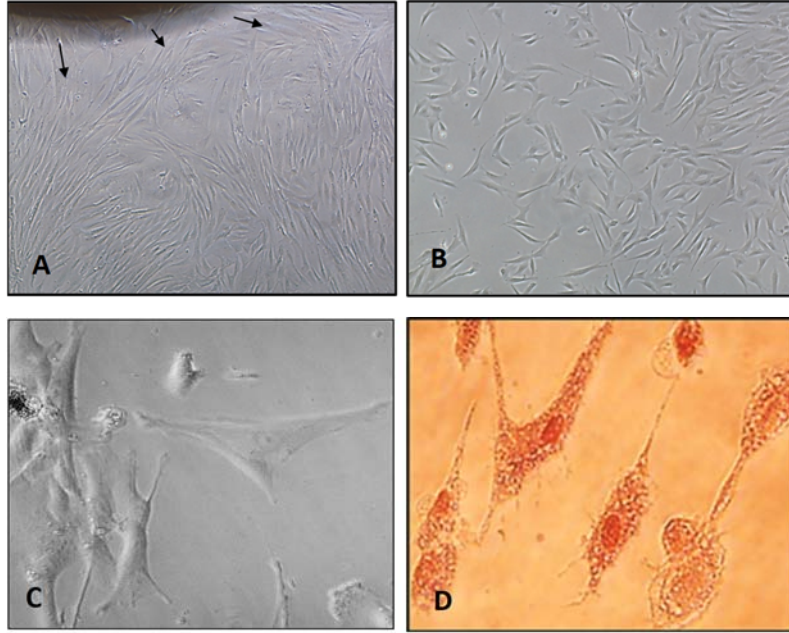
Bu değer enzimatik yöntem ile elde edilen kök hücreler için ortalama yaklaşık 830 hücre/saat olarak bulunmuştur. Eksplant yöntemi ile WJ-MKH'lerinin en erken 6. gün, en geç 21-22. günde eksplantlardan çıkmaya başladıkları gözlemlendi. Şekil 5'de kök hücrelerin 9-10. günde eksplantlardan ilk çıkışlarının ters faz ışık mikroskopik görüntüsü görülmektedir.



Şekil 3: Eksplant ve enzimatik yöntem ile elde edilen WJ-MKH sayılarının in-vitro kültür koşullarında iki katına çıkma zamanı (population doubling time; PDT). (Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir) ($p < 0,05$, $n=7$)



Şekil 4: Eksplant yöntemi ile izole edilen WJ-MKH'lerinin periyodik zaman aralıklarında pasajlanması sonucu hücre sayısındaki değişimler (Her saat dilimi toplam 5 adet olacak şekilde ayrı pasajlardaki hücre sayılarını içermektedir)

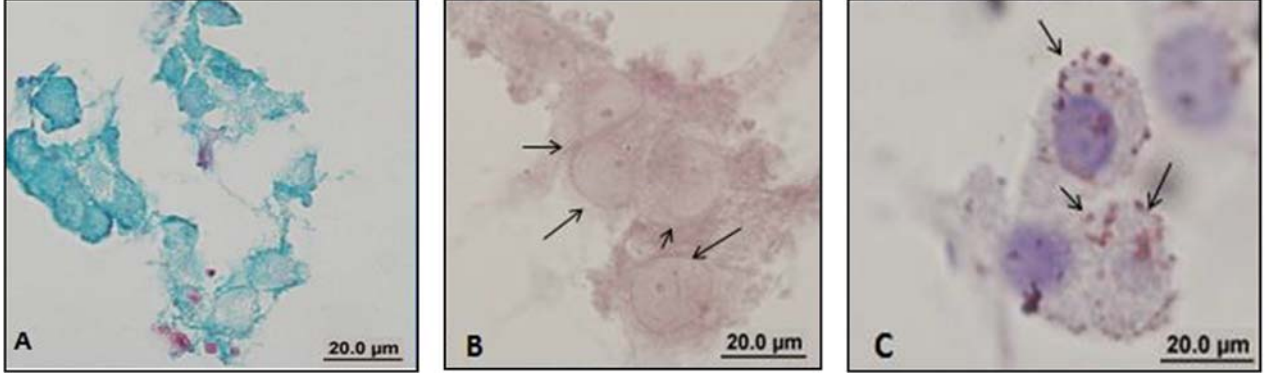


Şekil 5: Eksplant yöntemi ile elde edilen WJ-MKH'lerinin ters faz ışık mikroskopik görüntüsü (pasaj-0,10. Gün) 10X büyütme (A) 20X büyütme (B) 40X büyütme (C) Nötral kırmızı ile boyanan WJ-MKH'lerinin ters faz ışık mikroskopik görüntüsü (20X büyütme) (D) (Olympus Mikroskop, oklar eksplanttan hücre çıkış yönlerini göstermektedir).

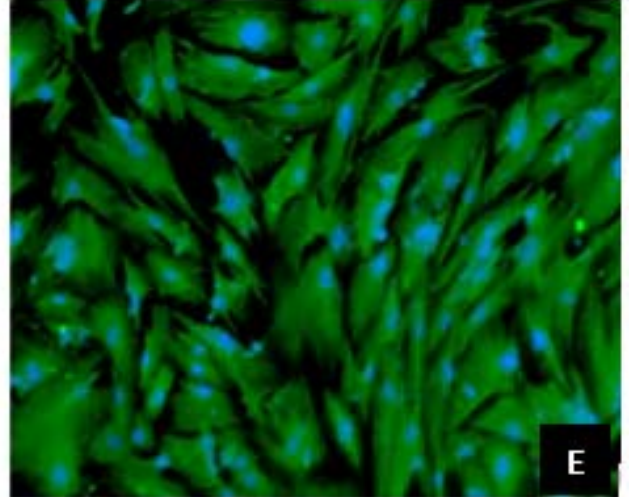
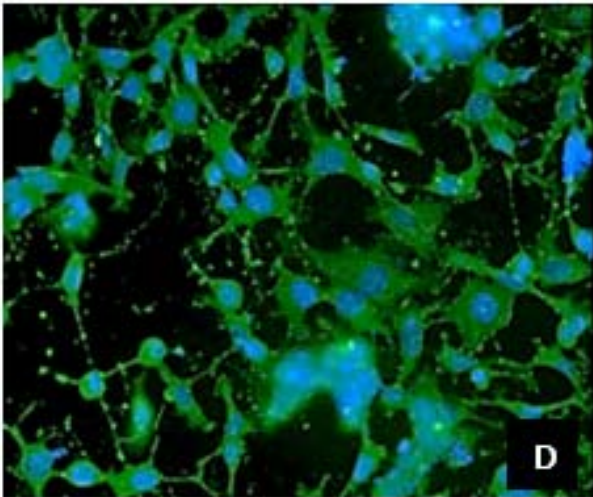
WJ-MKH'ların farklılaşma kapasitesi

Wharton jölesinden elde edilen kök hücrelerin kondrojenik, osteojenik ve adipojenik hücrelere

farklılaşabildiği fenotipik ve immunokimyasal boyama ile gösterilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6 A-B-C. WJ-MKH'lerin insan MKH fonksiyonel tanımlama kiti prosedürüne uygun olarak kondrojenik, osteojenik ve adipojenik farklılaşma indüksiyonu sonrası elde edilen histokimyasal boyama görüntüleri (A: kondrojenik farklılaşma grubu (Alcian mavisi boyama); B: osteojenik farklılaşma grubu (Alizarin kırmızısı boyama); C: adipojenik farklılaşma grubu (Oil red boyama) (100X büyütme) Oklar farklılaşmış hücre grupları için ilgili boya tutulumlarını göstermektedir.

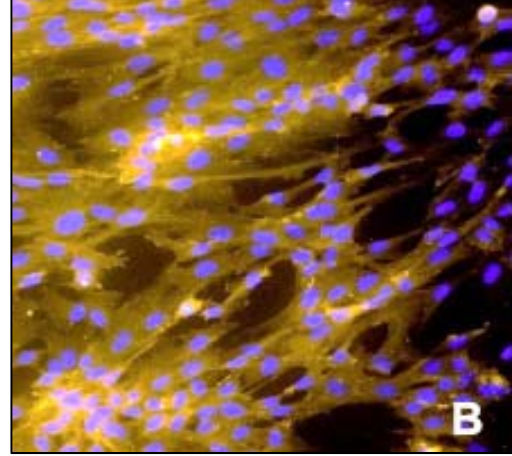
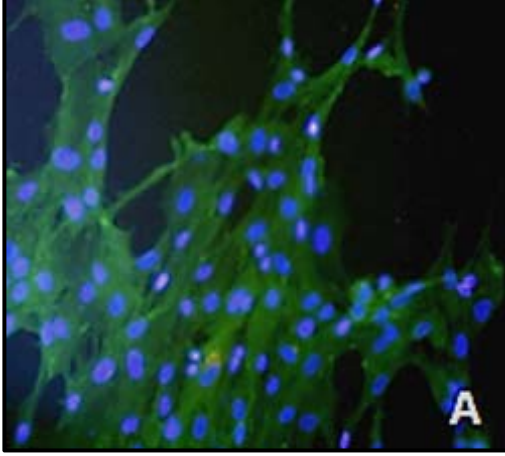


Şekil 6 D-E WJ-MKH farklılaşmasının immünofloresan boyama ile değerlendirilmesi. Osteojenik hücrelerde Florokrom etiketli osteokalsin antikorunun floresan görüntüsü (D), Adipojenik hücrelerde Florokrom etiketli FABP4 antikorunun Floresan ışınlama görüntüsü (E) (20X büyütme, Hücre çekirdekleri DAPI kullanılarak mavi olarak görünmektedir.)

WJ-MKH Karakterizasyonu

MKH karakterizasyonu için erken pasaj ve geç pasaj hücreleriyle farklı deney setleri kurularak oluşturulan preparatların floresan görüntüleri alındı. WJ-MKH'lerinde pasaj sayısı ilerledikçe veya kültür koşulları

yetersizleştikçe kök hücre özelliklerini kademeli olarak kaybettikleri gözlemlendi. Düzenli bir şekilde idamesi yapılan WJ-MKH'lerinde, MKH'lere özgü olan CD90 ve CD44 gibi yüzey antijenlerinin yaptığı floresan ışımaya varlığı gösterilmiştir (Şekil 7).

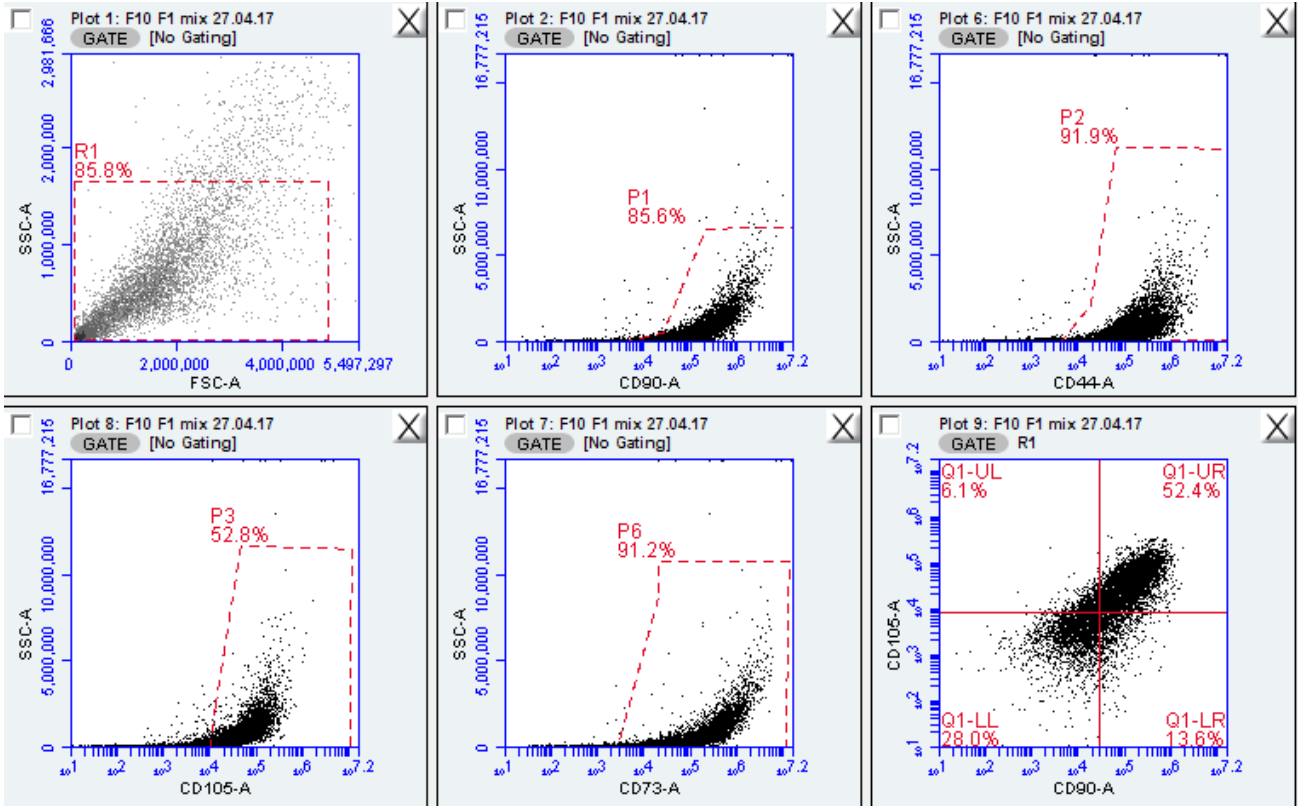


Şekil 7: WJ-MKH'lerinin karakterizasyonu için elde edilen hücre yüzey antijenlerin immunfloresans görüntüleri (A); FITC işaretli (yeşil) CD90 antikoruna ışımaya görüntüsü, nükleus (mavi), (B); Fikoeritrin işaretli (turuncu) CD44 antikoruna ışımaya görüntüsü, nükleus (mavi), (10X'lik büyütme)

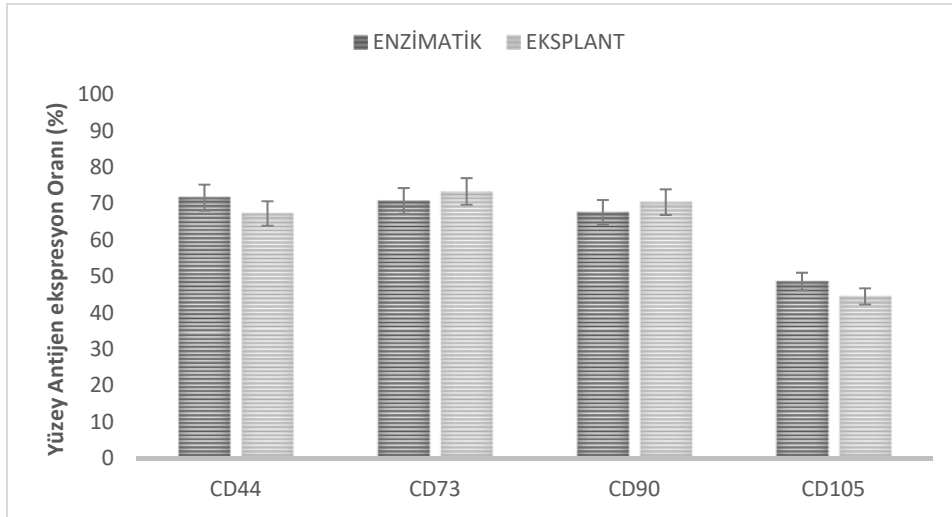
MKH'lere özgü hücre yüzey antijen oranları

MKH'lere özgü hücre yüzey antijen düzeyleri için örnek bir akış sitometri verisi Şekil 8A ve hücre yüzey antijen ekspresyon oranları Şekil 8B'de gösterilmiştir. Wharton jölesinden iki farklı yöntemle izole edilen hücrelerin mezenkimal kök hücrelere özgü CD90, CD73,

CD44 ve CD105 yüzey antijenlerini eksprese edebildikleri, CD34 için düşük ekspresyon sergiledikleri akış sitometrik olarak belirlenmiştir. Ekspant ve enzimatik yöntemi ile elde edilen kök hücrelerin akış sitometri ile değerlendirilen yüzey antijenleri oranlarında istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$, $n=17$).



Şekil 8-A. Örnek bir akış sitometri verisi. Farklılaşmamış bir WJ-MKH örneğinde hücrelerde CD 90; %86, CD105; %56, CD73; %91 ve CD44; %92 oranında eksprese edilmektedir.

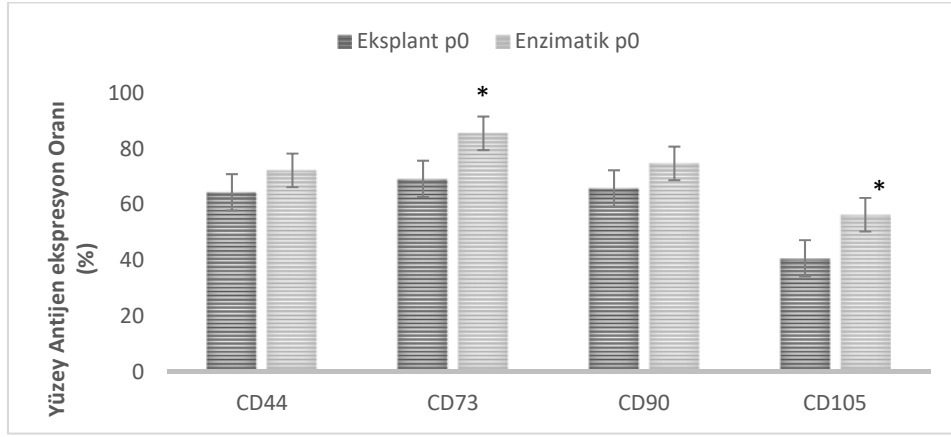


Şekil 8-B. Eksplant ve enzimatik yöntem ile elde edilen kök hücrelerin yüze antijen ekspresyon oranları. Dördüncü pasaja kadar elde edilen tüm hücrelerin yüze antijen ekspresyon oranlarının ortalaması alınarak, sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

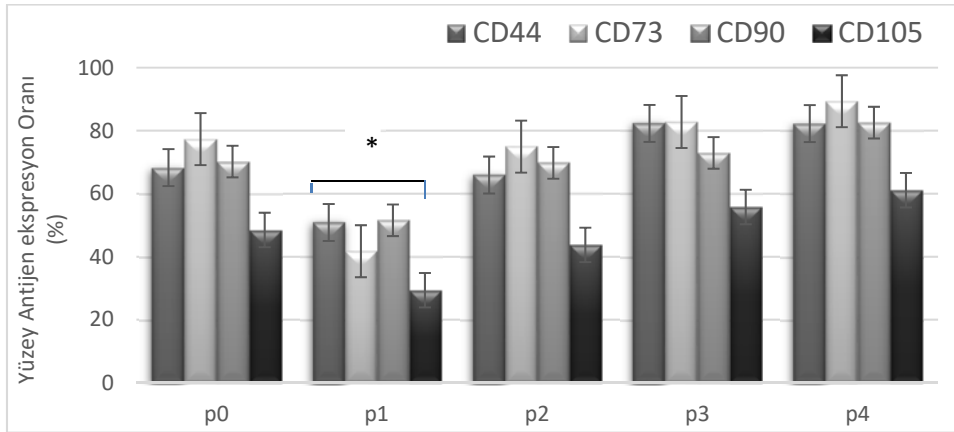
Ayrıca WJ-MKH'lerin kültüre edilerek çoğaltılmaları esnasında, pasajlamanın hücre yüzey antijen ifadelerine etkisi akış sitometri analizi ile değerlendirildi. Şekil 9'da eksplant ve enzimatik yöntem ile elde edilen hücrelerin pasajlanmadan önce (p0), hücre yüzey antijenlerini ifade oranları görülmektedir. Enzimatik yöntem ile elde edilen kök hücrelerin pasaj yapılmadan önce CD44 ve CD90 ifade oranlarının, eksplant yöntemi ile elde edilenlere göre daha yüksek olma eğiliminde oldukları gözlenmekle beraber, istatistiksel anlamlı bir farklılık

saptanmadı. CD73 ve CD 105 oranları ise pasaj yapılmadan önce enzimatik yöntem ile izole edilen hücrelerde daha yüksek bulundu ($p>0,05$).

Her iki izolasyon yönteminde de, ilk pasajlama işleminden sonra genel olarak hücre yüzey antijenlerini ifade oranlarının azaldığı gözlemlendi. Dördüncü pasaja kadar CD105 yüzey antijeni dışında ortalama %80 ve üstü hücre yüzey antijenlerinin eksprese edilebildiği belirlendi (Şekil 10).



Şekil 9: Eksplant ve Enzimatik yöntem ile elde edilen WJ-MKH'lerin pasajlama yapılmadan önce (p0) hücre yüzey antijeni ifade oranları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir (n=7).

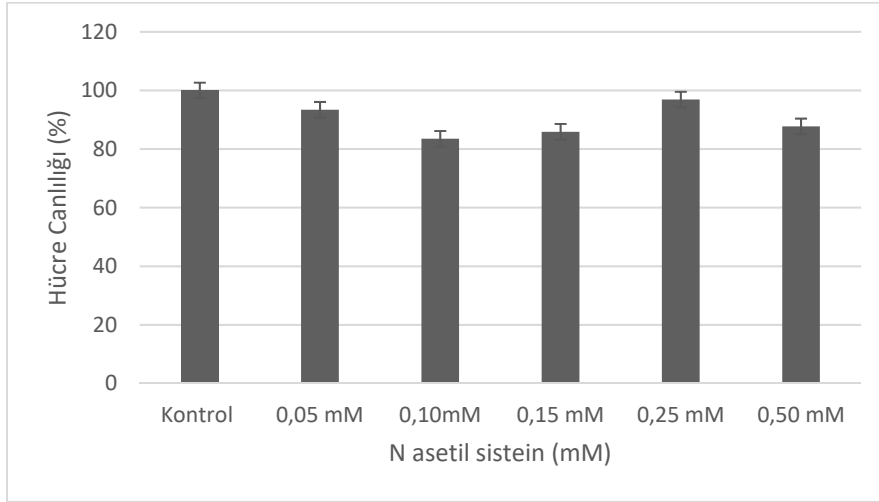


Şekil 10: WJ-MKH'lerinin çoğaltılması esnasında pasajlamanın hücre yüzey antijen ifadelerine etkisi Eksplant yöntemi ile elde edilen WJ-MKH'lerde yüzey antijen oranları ilk pasajlama sonrası (p1), pasajlama yapılmadan öncesine göre (p0) belirgin olarak düşük ifade edildi ($*p<0,05$, n=5). Dördüncü pasaja kadar CD105 yüzey antijeni dışında, diğer hücre yüzey antijenlerinin ~% 70-80 oranında eksprese edilebildiği belirlendi. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

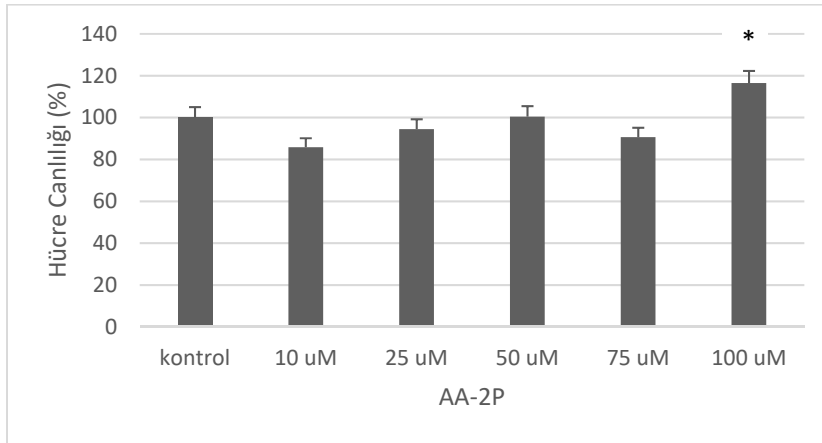
N-Asetil Sistein ve askorbik asit 2-fosfat ilavesi ile sağlanan kültür koşullarının hücre canlılığı üzerine etkisi

Üçüncü (3.) ve dördüncü (4.) pasajlama ile elde edilen kök hücrelerin idamesinde kültür ortamına eklenen antioksidan moleküllerin hücre canlılığı ve

proliferasiyonuna etkisi değerlendirildi. Yedi (7) gün süre ile N asetil sistein (NAC; 0,05-0,5 mM) doz aralığında WJ-MKH kültür ortamına uygulamasının hücrelerin canlılığı üzerine istatistiksel anlamlı bir etkisi saptanamadı ($p>0,05$). Diğer taraftan yedi (7) gün süre ile AA-2P uygulaması (100 μ M) kök hücre canlılığını anlamlı olarak artırdı ($p=0,017$). Hücre canlılık oranları Şekil 11 ve 12'de görülmektedir.



Şekil 11. WJ-MKH'lerinde kültür ortamına yedi (7) gün süre ile N-asetil sistein (NAC) uygulamasının doza bağlı hücre canlılığına etkileri. Nötral kırmızı tutulum deneyi elde edilen sonuçlar (deney grubu / kontrol grubu)x100 formülü ile (%)canlılık olarak hesaplandı ve sonuçlar ortalama± (SEM) olarak verildi (n=17).



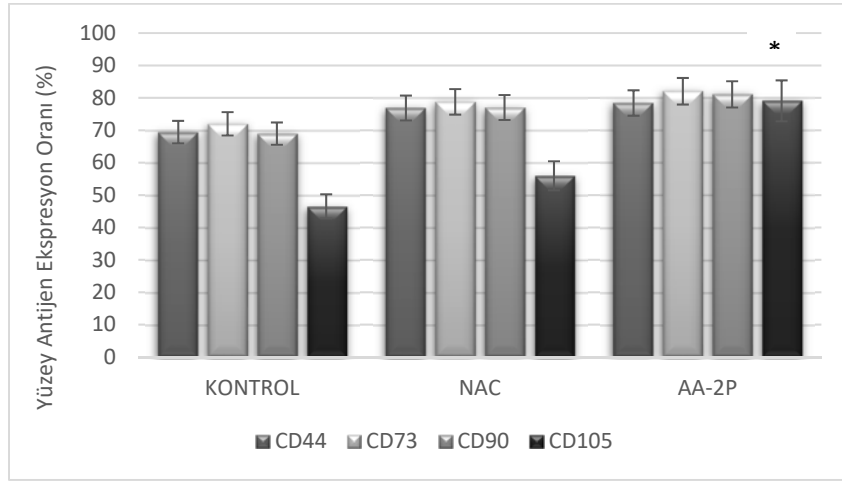
Şekil 12. WJ-MKH'lerinde kültür ortamına yedi (7) gün süre ile askorbik asit 2-fosfat (AA-2P) uygulamasının doza bağlı hücre canlılığına etkileri. Nötral kırmızı tutulum deneyi elde edilen sonuçlar (deney grubu / kontrol grubu)x100 formülü ile canlılık (%) ort± (SEM) olarak verilmiştir.(n=17) 100 uM AA-2P uygulaması kök hücre canlılığını anlamlı olarak artırmıştır (* $p=0,017$)

Kültür ortamına eklenen antioksidan moleküllerin hücre yüzey antijeni ifadeleri üzerine etkisi

Akış sitometri deneylerinden elde edilen verilere göre WJ-MKH'lerde kültürde hücre yoğunluğu %90'a ulaştığında, CD90, CD73 ve C105 protein ekspresyonları önemli ölçüde azaldığı ve daha sonra düşük yoğunluklu pasajlama yapılması bu durumu geri döndürmediği gözlemlendi. WJ-MKH'lerde pasaj 4'ün üzerindeki pasajlarda CD90, CD73 ve C105 protein ekspresyonları önemli ölçüde azaldığı belirlendi. Bu nedenlerle pasaj 4'ün üzerindeki hücreler çalışmaya alınmadı. WJ-MKH'lerde farklılaşma ortamı ile on günlük bir inkübasyon sonucunda CD90,

CD73 ve C105 protein ekspresyonları önemli ölçüde azalmaktadır. Bu azalma, CD105 ekspresyonunun %1'in altına inmesine yol açtığı değerlendirildi.

NAC uygulaması sonrası CD 44, CD73, CD90 ve CD105 yüzey antijenlerinde kontrol grubuna (antioksidan uygulama yapılmayan WJ-MKH göre) istatistiksel anlamlı bir artış olmamakla birlikte ortalama ~%2-5 artma eğilimi gözlemlenmiştir. AA-2P uygulaması da benzer şekilde CD44, CD73 ve CD90 istatistiksel anlamlı bir artış olmamakla birlikte CD105 yüzey antijen ifadesinde ~%25-30 oranında, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 13).



Şekil 13 Antioksidatif kültür koşullarının hücre yüzey antijen ifadeleri üzerine etkisi

Erken pasaj dönemindeki (pasaj-2 ve pasaj-3) WJ-MKH'lerine 0,5 mM NAC ve 100µM askorbik asit 2-fosfat (AA-2P) uygulaması sonrası yüzey antijenlerinin değişimleri (%). AA-2P uygulaması CD105 antijen ekspresyonunu kontrol grubuna göre belirgin olarak artırmıştır ($*p<0,05$). Sonuçlar $\text{ort} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir ($n=12$).

Eksplant yöntemine göre izole edilip 0,5 mM NAC uygulaması yapılan pasaj-2 ve pasaj-3 WJ-MKH grupları kendi kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, CD44, CD73 ve CD90 yüzey antijenlerinin 3. pasajda 2. pasaj hücrelerinde göre ~%20 oranında daha fazla bulunduğu gösterilmiştir. Bunun tam tersi olarak ise CD105 yüzey antijeni oranı önemli ölçüde azalmıştır. Enzimatik yöntem ile izole edilip 0,5 mM NAC uygulaması yapılan pasaj-2 ve pasaj-3 WJ-MKH grupları kendi kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, 2. ve 3. pasaj hücre gruplarında CD105 yüzey antijeni azalmıştır. CD105 yüzey antijeninin oran olarak en düşük

bulduğu grup 2.pasaj kontrol grubu hücreleri olarak gözlemlenmiştir. Eksplant yöntemine göre izole edilip 100 µM AA-2P uygulaması yapılan pasaj-2 ve pasaj-3 WJ-MKH grupları kendi kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, CD44, CD73 ve CD90 yüzey antijenlerinin 3. pasajda 2. pasaj hücrelerinde göre ~%20 oranında daha fazla bulunduğu belirlenmiştir. Enzimatik yöntem ile izole edilip 100 µM AA-2P uygulaması yapılan pasaj-2 ve pasaj-3 WJ-MKH gruplarının ise kendi kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, yüzey antijenlerinin oran olarak en fazla bulunduğu grubun, AA-2P uygulaması yapılan 3. pasaj hücreleri olduğu gözlemlenmiştir (Veriler makalede gösterilmedi).

TARTIŞMA

MKH'ler kemik iliği yanı sıra yağ dokusu, periferik kan gibi yetişkin dokulardan elde edilebilirler (21). MKH karakterizasyon kriterleri olarak farklılaşma kapasitelerinin gösterilmesinin yanı sıra CD105, CD73, CD44 ve CD90 yüzey antijenleri için pozitif ekspresyon ve CD45, CD34, CD14, CD19 ve HLA-DR için negatif ekspresyon olması önerilmiştir (22). İnsan perinatal dokularında bulunan kök hücreler ekstra embriyonik multipotent mezankimal kök hücreler (EE-MKH) olarak tanımlanmışlardır. Bunlar; plasenta, amniyotik sıvı, amniyon, göbek kordonu kanı ve göbek kordonunda yer alabilmektedirler (23). Göbek kordonu kanından elde edilen MKH, hematopoetik kök hücre gereken tedavilerde sıklıkla kullanılmaktadır, ancak bu hücrelerin klinikte kullanılmasında en büyük sınırlamanın, kordondan izole edildiklerinde başlangıç sayılarının az olması nedeniyle, transplantasyon için gerekli toplam sayıya ulaşmadaki zorluk olduğu belirtilmektedir (24).

Göbek kordonundaki iki arter ve bir venin çevresinde koruyucu görevi olan bir doku olan Wharton jölesi (WJ) içinde bulunan MKH'ler ise, embriyolojik gelişim sırasında aort-gonad-mezonefroz bölgesine göç ederken kordon etrafında kalmış olan primitif MKH'lerdir (10)(25). Wharton jölesi ve plasentadan elde edilen hücrelerin genotip ve fenotip olarak fetal özellik gösterdikleri ve International Society for Cellular Therapy tarafından yayınlanan minimal kök hücre kriterlerini taşıdıkları belirtilmektedir (22). Bizim çalışmamızda insan göbek kordonu wharton jölesinden kök hücre elde edilmiş, bu hücrelerin kök hücre karakteri taşıyabildikleri, kemik, adipoz doku ve kırıldak hücrelerine dönüşebilme kabiliyetleri gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin CD90, CD73, CD44 ve CD105 yüzey antijenlerini eksprese edebildikleri, CD34 için düşük ekspresyon sergiledikleri akış sitometrik olarak belirlenmiştir.

Primer kültür için dokuların ayrışmasını sağlayan teknikler, izole edilen hücrelerin miktarını ve kalitesini etkileyebilir. Primer kültür için dokuların ayrışmasını sağlamada çeşitli teknikler günümüze kadar geliştirilmiştir. Uygulanan tekniklerin özellikleri izole edilen hücrelerin miktarını ve kalitesini etkileyebilir. Bizim

çalışmamızda enzimatik yöntem ve eksplant yöntemi ile primer dokudan kök hücre izolasyonunun etkinliği karşılaştırıldı. Salehinejad P.ve arkadaşlarının 2012 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada insan göbek kordonundan mezankimal kök hücrelerinin izolasyonu için dört izolasyon metodunu karşılaştırmışlardır (26). Çalışmada üç enzimatik yöntem; kollajenaz/hiyalüronidaz/tripsin, kollajenaz/tripsin ve tripsin ve eksplant yöntemlerinin sonuçları değerlendirmiştir. Kök hücreler, tüm yöntemler ile başarıyla izole edilmiş olmasına rağmen izolasyon yönteminin, izole edilmiş hücrelerin hücre sayısını ve çoğalma kapasitesini büyük ölçüde değiştirdiği gösterilmiştir. Akış sitometrisi analizi CD44, CD73, CD90 ve CD105'in tüm gruplarda eksprese edildiğini gösterilirken CD34 ve CD45 eksprese edilmediği gösterilmiştir. Enzimatik gruplarda C-kit ekspresyonu eksplant grubundakinden daha yüksek iken, Oct-4 ekspresyonu diğer gruplara kıyasla kollajenaz tripsin grubunda daha yüksek bulunmuştur. Kollajenaz/tripsin hücre izolasyonu yönteminin, diğerlerinden daha yüksek bir hücre yoğunluğu sağladığı ve bu hücrelerin, C-kit ve Oct-4 gibi pluripotent hücre markörlerinin daha yüksek bir oranını ifade ettiği belirlenmiştir. Eksplant yöntemi ise diğer yöntemlere kıyasla daha yüksek bir hücre proliferasyon hızı ve aktivitesi ile sonuçlanmıştır. Deriden keratinosit hücrelerinin elde edildiği bir diğer çalışmada da primer hücre kültür koşulları için eksplant yöntemi, enzimatik yöntemle göre daha verimli bulunmuştur (17). Bizim çalışmamızda da daha önceki çalışmalara benzer şekilde, eksplant yöntemi ile elde edilen hücrelerin proliferasyon hızlarının, kollajenaz/tripsin enzimlerinin kullanıldığı enzimatik yöntemle göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bizim çalışmamızda doubling time eksplant yöntemi ile elde edilen hücrelerde ortalama ~3 gün iken, enzimatik yöntemle elde edilen hücrelerde bu süre ortalama ~5 günü bulmuştur. Eksplant yöntemi ile saatte 1.250 hücre/saat, enzimatik yöntemle elde edilen kök hücreler için ise ortalama ~830 hücre/saat olarak proliferasyon hızı bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, daha önce gerçekleştiren çalışmalara uyumlu olarak wharton jölesinden kök hücre izolasyonu için, eksplant yönteminin daha kısa zaman diliminde elde edilen toplam hücre sayısına göre enzimatik yöntemle göre daha avantajlı olduğu düşünüldü.

İnsan umbilikal kordonu yaklaşık olarak 50-60 cm uzunluğundadır ve literatürdeki mevcut çalışmalar göbek kordonunun hangi bölümü üzerinde çalışıldığına dair bazı bilgiler sağlamıştır. Göbek kordonunun üç anatomik segmentinden elde edilen WJ-KMH'leri karşılaştırmışlardır. Maternal ve fetal segmentlerden izole edilen WJ-MKH'lerin, daha fazla canlılık sergilediğini ve orta segmentten alınan hücrelere kıyasla daha yüksek proliferasyon oranına sahip olduğunu göstermişlerdir (27). Bu çalışmada immünofenotipleme, her üç segmentten türetilen WJ-MKH'lerin, MKH işaretleyicileri CD105, CD73, CD90, CD44, CD13 ve CD29'un yanı sıra HLA-ABC ve HLA-DR'yi ifade ettiğini, ancak hematopoietik işaretleyiciler CD14, CD34 ve CD45 için negatif olduğunu ortaya çıkarmıştır. Aynı zamanda bu çalışmada gerçekleştirilen embriyonik belirteçlerin analizi, her üç bölümün Nanog ve 3/4'ü gösterdiğini, ancak sadece maternal ve fetal segmentlerin SSEA 4 ve TRA-160'ı ifade ettiğini göstermiştir. Her üç segmentten alınan hücreler, diğer iki segmente kıyasla çok daha düşük farklılaşma potansiyeli gösteren orta segmentler ile kondrojenik, osteojenik ve adipojenik soylara farklılaşabilmiştir. Bizim çalışmamızda göbek kordonunun fetal segmentleri kullanılmıştır

MKH'ler, büyüme ortamına yanıt olarak dinamik olarak değişebilir ve izolasyon yöntemi ve çoğaltılmaları esnasında biyolojik işlevleri değişikliklere uğrayabilir (28)(29). Çalışmamızda hücrelerin çoğaltılması sürecinde CD44, CD73, CD90, CD105 yüzey antijen ifadelerinin dördüncü pasaja kadar anlamlı değişmediği akış sitometrik olarak belirlendi. Mezenkimal kök hücrelerde CD73 ifadesinin, elde edildiği dokuya ve kültür koşullarına göre değişebildiği ve anti-enflamatuar aktivitesi yoluyla onarıcı özellikleri belirleyebileceği ileri sürülmüştür. Perikardiyal yağ dokusundan türetilen MKH'lerinin CD73'ün heterojen ekspresyonu gösterilmiş, CD73 ile zenginleştirilmiş MKH'lerin anti-enflamatuar aktivite yoluyla kardiyak onarımı desteklediği gösterilmiştir (30). Bizim çalışmamızda pasajlama öncesi enzimatik yöntemle elde edilen MKH'lerde CD73 ekspresyonu akış sitometrik olarak daha yüksek bulundu. Bununla birlikte MKH'lerin çoğaltılması sırasında 4. pasaja kadar CD73 ifadesinde pasaj grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

Terapötik amaçlar için in vitro hücre çoğaltmada, MKH'lerin hızla muhtemelen oksidatif stresi içeren erken yaşlanmaya girdikleri ileri sürülmektedir (19). NAC ve AA eksojen ve non-enzimatik antioksidanlar olup, kemik eliğinden ve yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin çoğaltılmaları üzerine etkileri çalışılmıştır (31)(32)(33). Bizim çalışmamızda anti-oksidatif özellikleri bilinen NAC ve AA'nin fosfatlı türevi AA-2P hücre kültür ortamına eklenmiş ve hücre proliferasyonuna etkisi değerlendirilmiştir. Yedi (7) gün süre ile hücre kültür ortamına AA-2P (100µM) ilavesinin hücre proliferasyonunu belirgin olarak artırmıştır (p<0,05). Ayrıca CD44, CD73 ve CD90 hücre yüzey antijen oranlarında istatistiksel anlamlı bir artış olmamakla birlikte, AA-2P uygulaması CD105 yüzey antijen ifadesinde ~%25-30 oranında, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir (p<0,05). Yedi (7) gün süre ile NAC uygulaması, hücre proliferasyonunu artırma eğilimi göstermekle beraber, NAC uygulaması yapılmayan WJ-MKH'lere göre istatistiksel anlamlı bir artış elde edilememiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile wharton jölesinden enzimatik ve eksplant yöntemi ile kök hücreler elde edilerek, hücre proliferasyon kapasiteleri karşılaştırıldı. Wharton jölesinden kök hücre izolasyonu için, eksplant yönteminin yüzey antijen ifadeleri anlamlı değişmeksizin daha kısa zaman diliminde elde edilen toplam hücre sayısına göre enzimatik yöntemle göre daha avantajlı olduğu düşünüldü. Diğer taraftan anti oksidan bir molekül olan AA-2P ilavesi ile sağlanan kültür koşullarının kök hücre canlılığını artırdığı gösterildi.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2017.KB.SAG.028 kodu ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell*. 2008;2:313–19.
2. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al.

- Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-47.
3. Gilbert DM. The future of human embryonic stem cell research: Addressing ethical conflict with responsible scientific research. *Med Sci Monit*. 2004;10:RA99-103.
 4. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina LK. The Development of Fibroblast Colonies in Marrow and Spleen Cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3:393-403.
 5. Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): Controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther*. 2009;17:939-46.
 6. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-47.
 7. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. 2004;32:414-25.
 8. Chen G, Yue A, Ruan Z, Yin Y, Wang R, Ren Y, et al. Comparison of biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from maternal-origin placenta and Wharton's jelly. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:228.
 9. Kalaszczynska I, Ferdyn K. Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells: Future of regenerative medicine? Recent findings and clinical significance. *BioMed Res Int*. 2015;2015:430847.
 10. Liao LL, Ruszymah BHI, Ng MH, Law JX. Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells. *Curr Res Transl Med*. 2020;68:5-16.
 11. Bieback K, Brinkmann I. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cells*. 2010;2: 81-92.
 12. Zhang Y, Tao H, Gu T, Zhou M, Jia Z, Jiang G, et al. The effects of human Wharton's jelly cell transplantation on the intervertebral disc in a canine disc degeneration model. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:154.
 13. Paldino E, Cenciarelli C, Giampaolo A, Milazzo L, Pescatori M, Hassan HJ, et al. Induction of Dopaminergic Neurons From Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell by Forskolin. *J Cell Physiol*. 2014;229(2):232-44.
 14. Zhang L, Tan X, Dong C, Zou L, Zhao H, Zhang X, et al. In vitro differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs), derived from Wharton's jelly, into choline acetyltransferase (ChAT)-positive cells. *Int J Dev Neurosci*. 2012;30:471-7.
 15. Liang J, Wu S, Zhao H, Li S lei, Liu Z xin, Wu J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly differentiate into cholinergic-like neurons in vitro. *Neurosci Lett*. 2013;532:59-63.
 16. Fu Y-S, Cheng Y-C, Lin M-YA, Cheng H, Chu P-M, Chou S-C, et al. Conversion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Wharton's Jelly to Dopaminergic Neurons In Vitro: Potential Therapeutic Application for Parkinsonism. *Stem Cells*. 2006;24(1):115-124.
 17. Orazizadeh M, Hashemitabar M, Bahramzadeh S, Dehbashı Fn, Saremy S. Comparison of the enzymatic and explant methods for the culture of keratinocytes isolated from human foreskin. *Biomed Rep*. 2015;3:304-8.
 18. Kozubenko N, Turnovcova K, Kapcalova M, Butenko O, Anderova M, Rusnakova V, et al. Analysis of in vitro and in vivo characteristics of human embryonic stem cell-derived neural precursors. *Cell Transplant*. 2010;19:471-86.
 19. Choo KB, Tai L, Hymavathees KS, Wong CY, Nguyen PNN, Huang CJ, et al. Oxidative stress-induced premature senescence in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci*. 2014;11:1201-7.

20. Jain AK, Singh D, Dubey K, Maurya R, Mittal S, Pandey AK. Models and Methods for In Vitro Toxicity. In: *In Vitro Toxicology*. 2018;3:45-65.
21. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011;9:12.
22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-17.
23. Marcus AJ, Woodbury D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: Do not discard: Stem Cells Review Series. *J Cell Mol Med*. 2008;12:730-42.
24. Kelly SS, Sola CBS, De Lima M, Shpall E. Ex vivo expansion of cord blood. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44:673-81.
25. Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications. *Placenta*. 2011;32:311-315.
26. Salehinejad P, Banu Alitheen N, Ali AM, Omar AR, Mohit M, Janzamin E, et al. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *Vitr Cell Dev Biol Anim*. 2012;48:75-83.
27. Lim J, Razi ZRM, Law J, Nawi AM, Idrus RBH, Ng MH. MSCs can be differentially isolated from maternal, middle and fetal segments of the human umbilical cord. *Cytotherapy*. 2016;18:1493-1502.
28. Tang J, Wang X, Tan K, Zhu H, Zhang Y, Ouyang W, et al. Injury-induced fetal reprogramming imparts multipotency and reparative properties to pericardial adipose stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9:218.
29. Sousa BR, Parreira RC, Fonseca EA, Amaya MJ, Tonelli FMP, Lacerda SMSN, et al. Human adult stem cells from diverse origins: An overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytometry Part A*. 2014;85:43-77.
30. Tan K, Zhu H, Zhang J, Ouyang W, Tang J, Zhang Y, et al. CD73 expression on mesenchymal stem cells dictates the reparative properties via its anti-inflammatory activity. *Stem Cells Int*. 2019;2019:1-12.
31. Guo YL, Chakraborty S, Rajan SS, Wang R, Huang F. Effects of oxidative stress on mouse embryonic stem cell proliferation, apoptosis, senescence, and self-renewal. *Stem Cells Dev*. 2010;19:1321-31.
32. Tan DQ, Suda T. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Homeostasis as Regulators of Stem Cell Fate and Function. *Antioxid Redox Signal*. 2018;29:149-168.
33. Lin TM, Tsai JL, Lin SD, Lai CS, Chang CC. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev*. 2005;14:92-102.