



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp.Derg.
2020; 34 (3): 221 - 227
http://www.fusabil.org

Gülsem ÇİÇEK^{1, a}
Emine UTLU ÖZEN^{2, b}
Fatma ÖZ BAĞCI^{3, c}
Selçuk DUMAN^{3, d}
Tahsin Murad AKTAN^{3, e}

¹ Kanuni Sultan Süleyman
Eğitim ve Araştırma
Hastanesi,
Histoloji ve Embriyoloji
Laboratuvarı,
İstanbul, TÜRKİYE

² Etlük Zübeyde Hanım
Kadın Hastalıkları Eğitim ve
Araştırma Hastanesi,
Histoloji ve Embriyoloji
Laboratuvarı,
Ankara, TÜRKİYE

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

^a ORCID: 0000-0003-2399-6755

^b ORCID: 0000-0002-7397-8769

^c ORCID: 0000-0002-5507-9639

^d ORCID: 0000-0001-5416-5204

^e ORCID: 0000-0002-9378-7644

Geliş Tarihi : 31.03.2020

Kabul Tarihi : 11.11.2020

Yazışma Adresi Correspondence

Gülsem ÇİÇEK
Kanuni Sultan Süleyman
Eğitim ve Araştırma
Hastanesi,
Histoloji ve Embriyoloji
Laboratuvarı,
İstanbul - TÜRKİYE

gulseminyuksel@gmail.com

Adipoz Doku ve Wharton Jeli Kaynaklı Kök Hücrelerde Embriyonik Antijen Ekspresyonlarının 3D Kültürde Araştırılması *

Amaç: Yağ dokusu ve Wharton Jeli (WJ), prelinik ve klinik çalışmalarda kullanılan iki önemli mezenkimal kök hücre (MKH) kaynağıdır. Gelecekte rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanında büyük potansiyele sahip kök hücreler iki boyutlu olarak hücre kültürlerinde üretilmektedir. Büyük ölçekli MKH'lerin üretiminde kullanılan mikro taşıyıcı 3D kültür sistemleri ile embriyonik döneme ait pluripotentlik özelliği gösteren hücre yüzey antijenlerinin klinik kullanımda yeri olan MKH'lerde araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Bu çalışmada, WJ ve adipoz doku kökenli iki farklı MKH grubu kullanıldı. Hillex-II ve Pronectin-F mikrotaşıyıcıları ile MKH grupları kültürlendi. TRA1-60, Sox-2, Nanog, Oct-4, SSEA-4 hücre antijenlerinin akış sitometrisi ile ekspresyonları değerlendirildi.

Bulgular: WJ kaynaklı MKH'lerde özellikle SSEA4 işaretleyicisi yüksek miktarda pozitif olarak saptanırken; adipoz doku kaynaklı MKH'lerde daha düşük seviyelerde eksprese edildiği gözlemlendi. Adipoz doku kaynaklı MKH 'lerde hillex-II mikrotaşıyıcı ile yapılan kültürde daha yüksek olan hücre yüzey işaretleyicisi; WJK-MKH grubunda da benzer olarak daha yüksek oranda olduğu görüldü.

Sonuç: Embriyonik kök hücre antijenlerinin farklı oranlarda iki farklı hücre grubunda eksprese edildiği gözlemlendi. WJ kaynaklı MKH'lerde SSEA4 yüzey antijeninin daha fazla miktarda eksprese edildiği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, hücre akış sitometrisi, pluripotentlik, multipotentlik, mikrotaşıyıcı

Investigation of Embryonic Antigen Expressions in 3D Culture of Stem Cells Derived from Adipose Tissue and Wharton Jelly

Objective: Adipose tissue and Wharton Jelly (WJ) are two important sources of mesenchymal stem cells (MSCs) used in preclinical and clinical studies. Stem cells, which have great potential in the field of regenerative medicine and tissue engineering in the future, can be produced in cell cultures in two dimensions. It is aimed to investigate the cell surface antigens showing pluripotency of the embryonic period in MSCs with micro-carrier 3D culture systems used in the production of large-scale MSCs.

Materials and methods: In this study, two different MSC groups of WJ and adipose tissue origin were used. MSC groups were cultured with Hillex-II and Pronectin-F microcarriers. It was aimed to investigate the expression of TRA1-60, Sox-2, Nanog, Oct-4, SSEA-4 cell antigens by flow cytometry.

Results: Especially SSEA4 marker was found to be highly positive in WJ-derived MSCs while their expression was observed at lower levels in MSCs originating from adipose tissue. The higher cell surface marker in culture with hillex-II microcarrier in adipose tissue derived-MSCs was similarly found with a higher rate in the WJ derived-MSC group.

Conclusion: It was observed that embryonic stem cell antigens were expressed at different rates in two different cell groups. It was observed that SSEA4 surface antigen was expressed more in WJ-derived MSCs.

Key words: Mesenchymal stem cell, flow cytometry, pluripotency, multipotency, microcarrier

Giriş

Mezenkimal kök hücreler (MKH) çok yönlü farklılaşabilme, kendi kendini yenileme ve kültürde çoğalabilme özelliklerine sahiptir. Rejeneratif ve immünomodülatör özellikleri ile birçok prelinik ve klinik çalışmada kullanılmaktadır (1, 2). Kardiyovasküler hastalıklar, otoimmün hastalıklar, osteoartrit, cilt hastalıkları, Graft Versus Host Hastalığı (GVHH), spinal kord hasarı, böbrek ve karaciğer hastalıkları ve Alzheimer hastalığında; deneysel ve klinik kullanım alanları mevcuttur (3-6). Yaşlanmada ve birçok hastalıkta kök hücre nakil tedavilerinin rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanlarında kullanılıyor olması ile birlikte kök hücre araştırmalarına olan ilgi artmaya devam etmektedir. Araştırmalarda kök hücrelerin temel fenotipik özellikleri, klinik kullanımları ve in vitro çoğalma aşaması ile ilgili yapılan çalışma alanları mevcuttur. MKH'ler kemik iliği, yağ

* Uluslararası Marmara Fen Bilimleri Kongresi, 19-20 Haziran 2020, Kocaeli / Türkiye

dokusu, göbek kordonu, plasenta, sinovyum, endometriyum, diş pulpası, fetal karaciğer ve kas dokusundan izole edilebilir (7, 8).

Göbek kordonu; müköz bağ dokusu ile çevrelenmiş iki arter ve bir damardan oluşur (9). Wharton jeli (WJ) adı verilen bu müköz bağ dokusundan MKH'ler elde edilir ve yüksek proliferasyon ve kendi kendini yenileme kapasitesine sahiptirler (10, 11). WJ kaynaklı MKH'ler daha ilkel hücre karakteri gösterirler. İlkel hücre karakterleri sebebiyle pluripotent hücreler için karakteristik olan SSEA3, SSEA4, Nanog gibi belirteçler eksprese edilebilirler (12). Embriyonik kök hücrelere benzer olmasına rağmen, tümörojenik değildirler. Ayrıca kardiyak nöral ve hepatik hattın belirteçlerini eksprese ederler. Düşük immünojenik kapasiteleri ile allojenik transplantasyonlar da önemli hale gelmektedirler. WJ'den toplanan MKH'ler, kemik iliği veya adipoz doku gibi daha yaşlı, erişkin doku kaynaklarından izole edilenlere göre daha proliferatif, immünosüpresif ve hatta terapötik olarak kabul edilirler (13).

Hem WJ kaynaklı hem de adipoz doku kaynaklı MKH'ler fibroblast morfolojisine sahiptir ve spesifik MKH belirteçlerini eksprese ederler; fakat kendini yenileme ve farklılaşma potansiyellerinde farklılıklar gözlenebilir.

Embriyonik kök hücre ilişkili hücre yüzey işaretleyicilerinin erişkin kök hücre popülasyonlarında bulunup bulunmadığı ve bunların farklı doku kaynaklarıyla ilişkili olup olmadığı tartışmalıdır. Hücre yüzeyi ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalar, MKH'lerin Nanog, Sox2, Oct-4 gibi embriyonik belirteçleri de eksprese edebildiğini göstermiştir (14). MKH'lerin hücre yüzeyi antijeni kapsamlı bir şekilde incelenmesine rağmen, benzersiz kök hücre özelliği göstermezler ve pluripotentlik antijenlerinin bu yetişkin hücrelerle ilişkili olduğuna dair kesin bir kanıt yoktur.

Kök hücre tedavilerinin başarılı olması için çok sayıda hücre gereklidir. Bu nedenle 2D hücre kültürlerinde çok sayıda pasajlama yapılması gerekebilir ve bu da hücre yaşlanması gibi olumsuz etkilere yol açar (15). Bu nedenle karıştırılmış süspansiyon, döner hücre kültürü sistemleri gibi 3D kültür sistemleri geliştirilmiştir. Başlangıçta aşı üretimi amacıyla Van Wezel ve ark. (16) tarafından geliştirilen süspansiyon mikro taşıyıcı kültür sistemi büyük miktarlarda MKH üretimi için etkili bir kullanım olarak kabul edilmiştir. MKH'ler yapılan hücreler olarak tek bir katmanda büyürler. Mevcut 2 boyutlu doku kültürü platformu, düşük hücre dozları gerektiğinde kullanılabilir ve 50 milyonun üzerinde dozlar gerektiğinde pratik olmaz. MKH'leri mikrotaşıyıcılara adapte etme çalışmaları hızla ilerlemektedir. Mikrotaşıyıcı yüzeylerinde fonksiyonel bağlantı ve büyüme destek elemanları bulunması önemlidir. Bir mikrotaşıyıcının yüzeyi, pozitif yüklü tersiyer kuarterner veya primer aminler, jelatin, kollajen, diğer hücre dışı matriks proteinleri ve peptitleri gibi fonksiyonel gruplar ile türetilebilir. Pozitif yüklü mikrotaşıyıcılar elektrostatik kuvvetlerle negatif yüklü hücreleri çeker. Mikrotaşıyıcılar, en yaygın olarak küresel olan çeşitli şekil ve boyutlarda üretilebilir. Mikrotaşıyıcılar hücre büyümesini kolaylaştırabilecek boyutlara sahip olmalıdır. Bu şekilde

hücre büyümesinin sonunda, her mikrotaşıyıcı yüzeyinde birkaç yüz hücreyi destekleyecektir. Küresel mikrotaşıyıcılar için 100–230 µm çapları tercih edilen boyut olarak bildirilmiştir (17). Mikrotaşıyıcılarda hücrelerin eşit olmayan dağılımını önlemek için küresel boyut dağılımları düşük olmalıdır (± 25 µm). Mikrotaşıyıcının matriksi, hücre yayılmasını desteklemek ve hücre ekimi sırasında karşılaşılan mekanik kuvvetlere dayanmak için yeterince sağlam olmalıdır (18, 19). Mikrotaşıyıcılar; solid veya likid formda olmalarına, yapıldıkları materyale, yüzeylerinin gözenekli veya düz oluşuna ve şekillerine göre çeşitlere ayrılır. Yüzeylerinde kollajen, polistren kaplı veya pozitif şarjlı şekilde tasarlanmış olan çeşitleri mevcuttur. Gözeneksiz (Polisitren kaplı-plastik, Hillelex; polisitren kaplı ve pozitif şarjlı-Plastik Plus) ve mikrogözenekli olanlar, kollajen kaplı olanlar (FACT-3), ekstarselüler matriks kaplı olanlar (Pronektin-F), yüksüz olanlar ve makrogözenekli olanlar sıklıkla kullanılan mikrotaşıyıcılardır (20).

Çalışmamızda, iki farklı mikro taşıyıcı kültür ortamında adipoz dokudan elde edilen adipoz doku ve WJ türevi MKH'lerin embriyonik kök hücre belirteçlerinin ekspresyonu karşılaştırmalı olarak incelendi.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma için, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi'nden etik kurul izni alınmıştır (Etik kurul no: 2018/1380).

Kök Hücrelerin İzolasyonu ve 3D Hücre Kültürü

Adipoz Doku Kaynaklı MKH Elde Edilmesi:

Abdominal veya meme cerrahisi girişimlerinde elde edilen aydınlatılmış onamı alınmış insan subkutan yağ dokusu kullanıldı. 10-20 g yağ malzemesi tuzlu su ile yıkandıktan sonra, oda sıcaklığında kollajenaz enzimi ile muamele edildi.

Wharton Jelly Kaynaklı MKH Elde Edilmesi:

Satın alınan hücre hattı insan umbilikal kord türevi mezenkimal kök hücre (ATTC PCS 500-010, ABD) kullanıldı.

Bu çalışmada iki tip mikrotaşıyıcı kullanıldı:

Hillelex II (Solohill): Mikrotaşıyıcılar amin ile işleme tabi tutulmuş bir yüzeye sahiptir ve yoğunlukları 160-200 µm arasında 1090-1150 kg/m³ arasında değişen parçacıklardan oluşur.

Pronectin F (Solohill): 1022-1030 kg/m³ ve partikül büyüklüğü 125-212 µm arasında değişen kaplamalı stiren mikro taşıyıcıdır.

Mikrotaşıyıcılar 10 cm²/mL yüzey alanı sağlayacak miktarlarda hassas terazi ile tartılarak 60 mm'lik hücre kültür kaplarına ilave edildi. 3×10^5 adet/cm² olacak şekilde mikrotaşıyıcı yüzey alanı ve kültür kabı yüzey alanı toplamı miktarında ekildi. Hücrelerin çoğalma ortamında DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) F-12 bazal medyuma; %7,5 trombosit lizat, penisilin-streptomisin ve L-glutamin katkı maddeleri kullanıldı. Hücre ekimi 3×10^5 adet/cm² olacak şekilde %5 CO₂-%5 O₂-%90 N (azot) ortamında ve 37°C'de yapıldı.

Dakikada 50 tur dönen bir orbital çalkalayıcı (Nüve SL-350) saatte 10 dakika çalıştırılacak şekilde 24 saat kültürlendi.

MKH Karakterizasyonu

Adipoz doku kaynaklı ve WJ kaynaklı kök hücreler; eksprese edilen temel yüzey antijenlerinin analizi ve 3 farklı hücre grubuna farklılaşma için kültürlendi.

Flow Sitometri: Kök hücre karakterizasyonu amacıyla her iki hücre grubunda 3D hücre kültüründe CD44, CD90, CD73 ve CD19 antijenleri (Human Mesenchymal Stem Cell Flow Cytometry Kit, Novus Bio, USA) hücre akış sitometrisi cihazı (FACSDiva Version 6.1.3) ile analiz edildi.

Adipojenik Farklılaşma: Hücreler 96 kuyucuklu kültür kabına ekildi (3×10^2 cells/cm²). Kültür kabında hücre yoğunluğu %80 doluluğa ulaştığında, adipojenik farklılaşma medyumuna (MSCgo Adipogenic XF, Biological Industries, USA) eklendi ve 21 gün inkübe edildi. Boyama öncesi %10 formalin ile 30 dk inkübe edildi. Daha sonra %60 isopropanol ile inkübe edilip; oil red O solüsyonu uygulandı. Lipit depolanması ışık mikroskopunda kırmızı renkte gözlemlendi.

Osteojenik Farklılaşma: Hücreler 96 kuyucuklu kültür kabına ekildi (3×10^2 cells/cm²). Kültür kabında hücre yoğunluğu %80 doluluğa ulaştığında, osteojenik farklılaşma medyumuna (MSCgo Osteogenic XF, Biological Industries, USA) eklendi ve 21 gün inkübe edildi. Boyama öncesi fiksasyon amacıyla %70 etanolde 4°C'de 1 saat inkübe edildi. 10 dk oda ısısında Alizarin Red boyası ile boyandıktan sonra, ışık mikroskopunda mineral depolanması gözlemlendi.

Kondrojenik Farklılaşma: Hücreler 96 kuyucuklu kültür kabına ekildi (3×10^2 cells/cm²). Kültür kabında hücre yoğunluğu %80 doluluğa ulaştığında, kondrojenik farklılaşma medyumuna (MSCgo Chondrogenic XF, Biological Industries, USA) eklendi ve 21 gün inkübe edildi. Boyama öncesi fiksasyon amacıyla %4 formaldehit ile oda ısısında 30 dk inkübe edildi. Proteoglikan protein Acian Blue boyası ile ışık mikroskopunda mavi renkte gözlemlendi.

Flow Sitometri ile Embriyonik Hücre Yüzey İşaretleyici Analizi

Hücre yüzeyi antijenleri adipoz doku ve WJ'den türetilen MKH'ler için incelenmiştir. Akış sitometrik analizi için, kültürdeki hücreler tripsinizasyon ile ayrıldı. Mikro taşıyıcı ve hücreleri ayırmak için filtre kullanıldı. Hücreler daha sonra kültür medyumundan uzaklaştırmak için santrifüj ile yeniden süspansiyon haline getirildi.

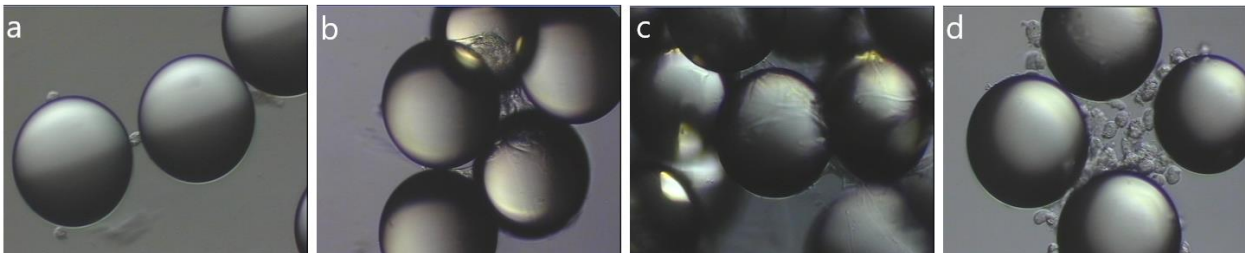
SSEA-4, Nanog, Sox2, TRA1-60 ve Oct4 embriyonik yüzey işaretleyicileri (Abcam) kullanıldı. Hücre Akış Sitometrisi cihazı (FACSDiva Version 6.1.3) ile süspansiyon halindeki hücreler analiz edildi.

Bulgular

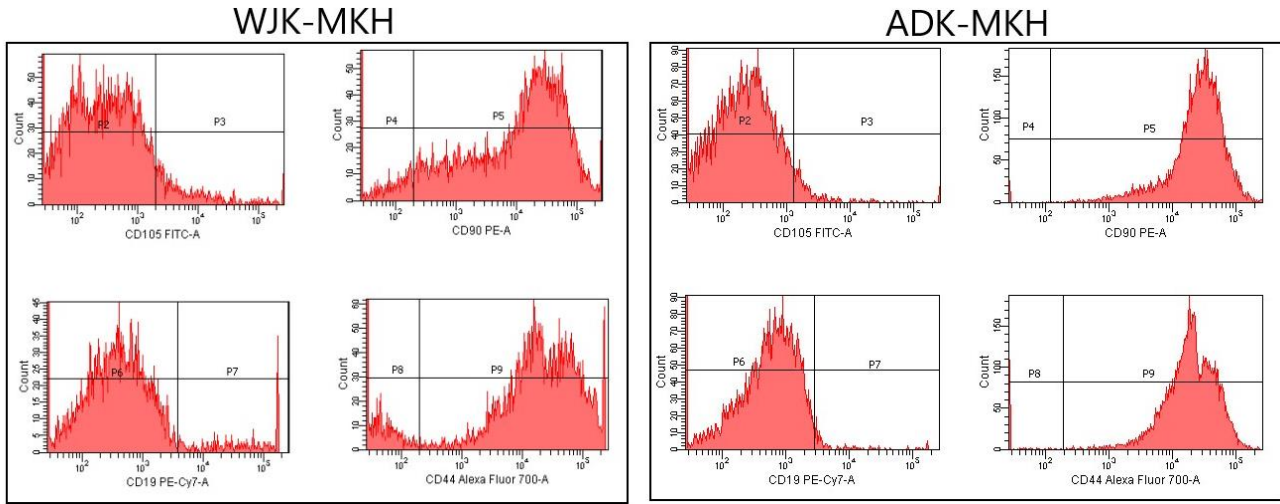
Her iki hücre grubu ekimden 24 saat sonra gözlemlendi. Mikrotaşıyıcıların yüzeyine yapışabilen iğsi formda hücreler gözlemlendi (Şekil 1). Ortalama 5-6. günlerde kültür kabı doluluk seviyesi %75-80'e ulaştıktan sonra kök hücre karakterizasyonu amacıyla hücre akış sitometrisi ile pozitif ve negatif MKH yüzey işaretleyicileri gösterildi (Şekil 2).

Hücreler, MKH'lerin farklılaşma kapasitesini incelemek için spesifik indüksiyon ortamı kullanılarak adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmaları gözlemlendi. Adipojenik farklılaşma Oil Red O boyası, osteojenik farklılaşma alizarin kırmızısı, kondrojenik farklılaşma alcian mavisi boyaması ile 96 kuyucuklu kültür kaplarında farklılaşma gösterilmiştir (Şekil 3).

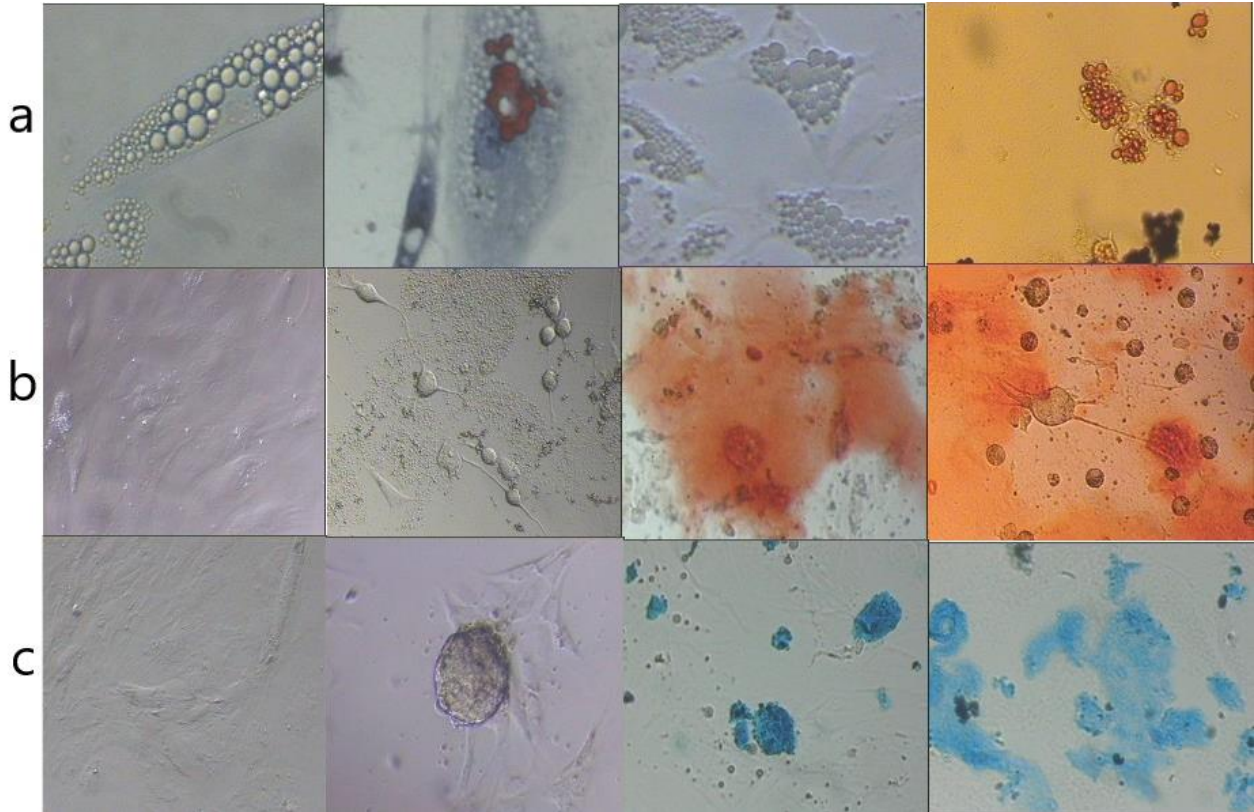
Flow sitometri ile yapılan embriyonik hücre yüzey işaretleyici sonuçları Tablo 1'de gösterildi. 3D mikrotaşıyıcı ile yapılan hücre kültüründe beş farklı embriyonik kök hücre belirteçleri analiz edildi (Şekil 4). WJK-MKH'lerde özellikle SSEA4 işaretleyicisi yüksek miktarda pozitif olarak saptanırken, ADK-MKH'lerde daha düşük seviyelerde eksprese edildiği gözlemlendi. Hillex2 ve pronektin mikrotaşıyıcıları açısından farklı bir sonuç gözlenmezken, ADK-MKH 'lerde hillex2 mikrotaşıyıcı ile yapılan kültürde daha yüksek olan hücre yüzey işaretleyicisi; WJK-MKH grubunda da benzer olarak daha yüksek oranda saptandı (Tablo 1).



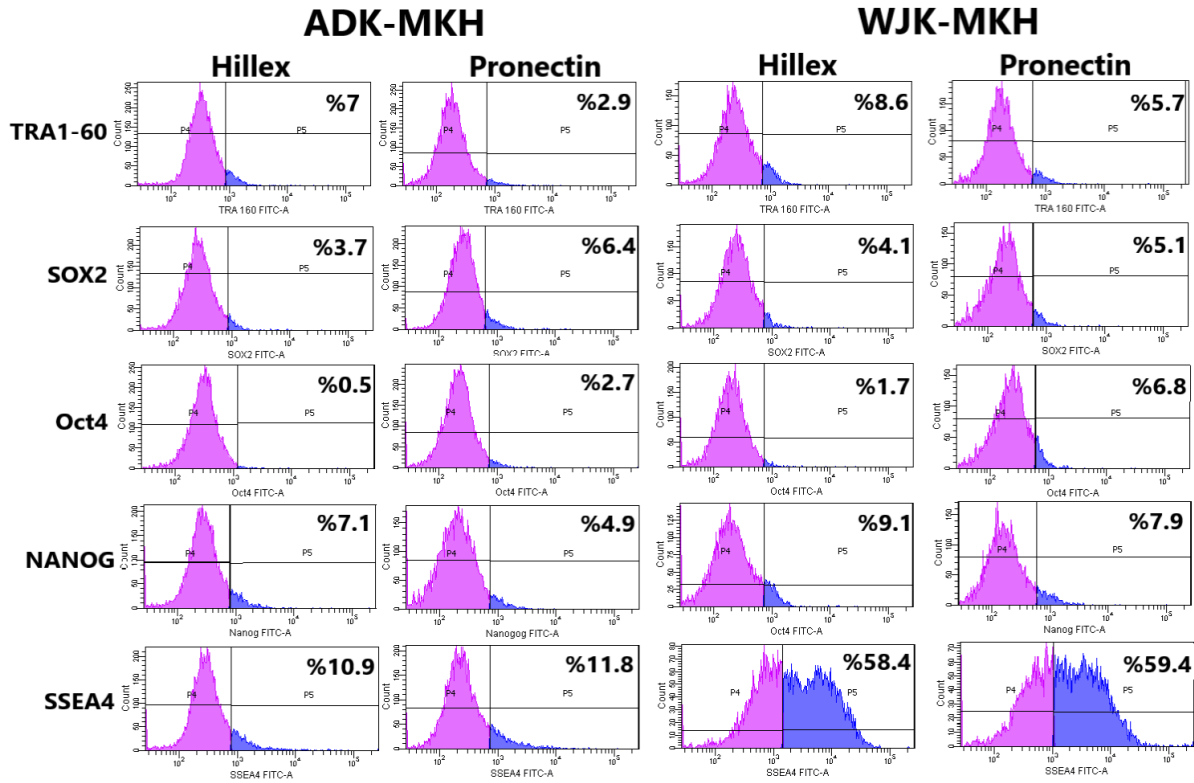
Şekil 1. a) İlk 24 saatte mikrotaşıyıcıya yapışmış kök hücreler, b) Mikrotaşıyıcı yüzeyinde iğsi formda kök hücreler, c) Tam doluluğa ulaşmış mikrotaşıyıcılar, d) Tripsinizasyon sonrası yüzeyden kalkan kök hücreler



Şekil 2. Flow sitometri ile mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu (CD90, CD44, CD105 ve CD19 hücre yüzey işaretleyicileri analizi) WJK-MKH: Wharton Jeli Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre, ADK-MKH:Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre



Şekil 3. Mezenkimal kök hücrelerin: (a) Adipojenik farklılaşması , (b) Osteojenik farklılaşması, (c) Kondrojenik farklılaşması



Şekil.4 Flow Sitometri ile TRA1-60, SOX2, Oct4, NANOG ve SSEA4'ün gösterilmesi. WJK-MKH: Wharton Jeli Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre, ADK-MKH:Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre

Tablo 1. Emrionik hücre yüzey işaretleyici (TRA1-60 , SOX2 , Oct4 , NANOG ve SSEA4) ekspresyon yüzdeleri

	Adipoz Doku Kaynaklı MKH		Wharton Jeli Kaynaklı MKH	
	Hillex (%)	Pronectin (%)	Hillex (%)	Pronectin (%)
TRA-1-60	7	2.9	8.6	4.6
SOX2	3.7	6.4	4.1	3.1
OCT4	0.5	2.7	1.7	1.5
NANOG	7.5	4.9	9.1	4.8
SSEA4	10.9	11.8	58.4	58.1

Tartışma

Stromal kök hücreler rejeneratif tıp ve doku mühendisliği uygulamalarında biyoteknolojide değerli bir kaynak oluşturmaktadır ve gelecekte büyük potansiyel taşımaktadır. MKH 'ler kemik iliği, yağ doku, kas dokusu, endometrium ve plasenta gibi birçok dokudan elde edilmektedir (21, 22). Klinik pratikte kolay elde edilebilmesi ve en çok kullanılan hücre grubu olması nedeniyle adipoz doku kaynaklı-MKH ve daha ilkel embriyonik kök hücrelere daha yakın olduğu ileri sürülen WJ kaynaklı-MKH'ler kullanıldı. Aynı kültür koşullarını sağlandığı hücre gruplarında embriyonik antijenlerin benzerlikleri ve farklılıklarını incelendi.

Pluripotensiyel özelliği farklılaşmamış embriyonik kök hücrelere ait Oct4, Nanog ve Sox2 gibi transkripsiyon faktörleri ve SSEA3 ve 4 gibi embriyonik kök hücreleri tanımlayan hücre yüzey antijenleri ile belirlenmektedir

(23, 24). Yetişkin kök hücrelerinde ise bu pluripotensiyel belirteçlerinin varlığı ve fonksiyonel rolü araştırılmaya devam etmektedir. Erişkin dokularda bulunan MKH'lerin gelişim sırasında dokularda biriken pluripotensiyel kök hücreler olabileceği düşünülmektedir. Bu yüzden embriyonik belirteçlere sahip olabilmesi söz konusudur (25). Daha önce yapılan çalışmalarda (26, 27) SSEA4 yüzey antijeninin kemik iliği kökenli MKH'lerde gösterilmiştir. 2D hücre kültürlerinde daha önce yapılan çalışmalarda (26, 28) bazı embriyonik antijenlerin MKH'lerde ifade edebildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada WJ kaynaklı MKH'lerde SSEA4 yüzey antijenini eksprese edildiği gösterildi. Yeni yapılan bir çalışmada (29) yağ doku kaynaklı MKH'lerde SSEA4 düşük miktarda iken, WJ kaynaklı MKH'lerde yüksek miktarda eksprese edildiği klasik iki boyutlu kültürde gösterilmiştir. Mikrotarıyıcı kullanarak yapılan bu çalışma ile uyumlu bulunmuştur. Geleneksel tek tabakalı kültür yöntemi,

pasaj sırasında hücrelerin karakteristik morfolojisini ve in-vivo mikro-ortam koşullarını kaybetme ve hücreye özgü hücre dışı matriks sekresyonunun değiştirilmesi nedeniyle iyi bir in vivo model değildir. Bu nedenle, bu durumun hücre performansı ve biyolojik testlerin sonuçları üzerinde önemli etkileri gibi birçok dezavantajı vardır. 2D tek tabakalı hücre kültürleriyle karşılaştırıldığında, 3D modeller son zamanlarda hücre biyolojisinde önemli bir role sahiptir. Çünkü 3D modeller, optimal hücre büyümesi, farklılaşması ve fonksiyonu için uygun mikro ortam sağlar ve karmaşık hücrenel

etkileşimleri 2D'den daha iyi in-vivo koşullarda daha yakın taklit eder (30, 31).

Sonuç olarak; WJ kaynaklı MKH'lerde SSEA4 antijeni yüksek miktarda ekspresyon edilirken, SSEA4 dışındaki diğer 4 embriyonik kök hücre yüzey işaretleyicileri düşük yüzdelerde pozitiflik göstermiştir. Yağ dokusu kaynaklı MKH'lerde ise embriyonik antijen ekspresyonları göstermemektedir. Ayrıca belli antijenleri ekspresyon eden kök hücreler ayrıştırılarak analiz edilebilir. MKH'lerde pluripotenslik belirteçlerinin tek bir hücrede aynı anda ifade edilip edilmeyeceğini saptamanın faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Palomares Cabeza V, Hoogduijn MJ, Kraaijeveld R, et al. Pediatric mesenchymal stem cells exhibit immunomodulatory properties towards allogeneic T and B cells under inflammatory conditions. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2019; 7: 142.
2. Baksh D, Song L, Tuan R. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2004; 8: 301-316.
3. Cotter EJ, Wang KC, Yanke AB, Chubinskaya SJC. Bone marrow aspirate concentrate for cartilage defects of the knee: from bench to bedside evidence. *Cartilage* 2018; 9: 161-170.
4. Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI, et al. Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal™) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2011; 17: 534-541.
5. Tsuji O, Sugai K, Yamaguchi R, et al. Concise review: Laying the Groundwork for a First-In-Human Study of an Induced Pluripotent Stem Cell-Based Intervention for Spinal Cord Injury. *Stem Cells* 2019; 37: 6-13.
6. White IA, Sanina C, Balkan W, Hare JM. Mesenchymal stem cells in cardiology. In: Gneocchi M. (Editor). *Mesenchymal Stem Cells*. 2nd Edition, Humana Press 2016: 55-87.
7. Ding D-C, Shyu W-C, Lin S-Z. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation* 2011; 20: 5-14.
8. Abbas OL, Özatik O, Gönen ZB, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and dental pulp as sources of cell therapy for zone of stasis burns. *Journal of Investigative Surgery* 2019; 32: 477-490.
9. Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004; 22: 1330-1337.
10. Nekanti U, Dastidar S, Venugopal P, Totey S, Ta M. Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia. *International Journal of Biological Sciences* 2010; 6: 499.
11. Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004; 22: 1330-1337.
12. Szepesi Á, Matula Z, Szigeti A, et al. In vitro characterization of human mesenchymal stem cells isolated from different tissues with a potential to promote complex bone regeneration. *Stem Cells International* 2016; 2016: 9.
13. Ding, Dah-Ching, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplantation* 2015; 24: 339-347.
14. Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, et al. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Reviews and Reports* 2009; 5: 378-386.
15. Książek KJR. A comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence. *Rejuvenation Research* 2009; 12: 105-116.
16. Van Wezel A. Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. *Nature* 1967; 216: 64-65.
17. Tavassoli H, Alhosseini SN, Tay A, et al. Large-scale production of stem cells utilizing microcarriers: A biomaterials engineering perspective from academic research to commercialized products. *Biomaterials* 2018; 181: 333-346.
18. Badenes S, Fernandes-Platzgummer A, Rodrigues C, Microcarrier culture systems for stem cell manufacturing. In: Cabral JMS, Chase LG. (Editors). *Stem Cell Manufacturing*: Elsevier 2016; 77-104.
19. Haycock JW. 3D cell culture: A review of current approaches and techniques. In: *3D cell culture*. Humana Press 2011; 1-15.
20. Chen AK-L, Reuveny S, Oh SKWJBa. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: Achievements and future direction. *Biotechnology Advances* 2013; 31: 1032-1046.
21. Çiçek G, Duman S, Aktan TMJE. Mesenchymal Stem Cell Signaling Pathway and Interaction Factors. 9:120-9.
22. Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna DJT. Mesenchymal stem or stromal cells: A review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion* 2014; 54:1418-1437.
23. He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, et al. Stage-Specific embryonic antigen 4 in wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation

- and multipotency. *Tissue Engineering Part A* 2014;20:1314-1324.
24. Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 24731-24737.
 25. Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, et al. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Reviews and Reports* 2009; 5: 378-386.
 26. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RCJB. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 2007; 109: 1743-1751.
 27. Zeddou M, Briquet A, Relic B, et al. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. *Cell Biology International* 2010; 34: 693-701.
 28. Guo X, Tang Y, Zhang P, et al. Effect of ectopic high expression of transcription factor OCT4 on the "stemness" characteristics of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy* 2019;10:160.
 29. Petrenko Y, Vackova I, Kekulova K, et al. A comparative analysis of multipotent mesenchymal stromal cells derived from different sources, with a focus on neuroregenerative potential. *Scientific Reports* 2020; 10: 1-15.
 30. Knight E, Przyborski SJJoa. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of Anatomy* 2015; 227: 746-756.
 31. Lv D, Hu Z, Lu L, Lu H, Xu XJOI. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncology Letters* 2017; 14: 6999-7010.