

## HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE İZOLASYONUNDA ALDH ETKİNLİĞİNİN ÖNEMİ

### IMPORTANCE OF ALDH ACTIVITY IN HEMATOPOIETIC STEM CELL ISOLATION

Leyla TÜRKER ŞENER\*, Aycan BAŞ\*\*, İbrahim KALELLİOĞLU\*\*\*,  
Suzan ADIN ÇINAR\*\*\*\*, Işıl ALBENİZ\*

#### ÖZET

**Amaç:** Kan hücrelerine kolaylıkla farklılaşabilen hematopoetik kök hücrelerin (HKH) saflaştırmasında tercih edilen yöntem, flow sitometrik veya magnetik ayırım sistemi ile CD34<sup>+</sup> hücrelerin seçimidir. İnsan kök hücrelerini tamamen fenotipik hücre yüzey belirteçlerine dayanmadan etkin olarak saptayan metodlara ihtiyaç vardır. Bu metodlardan biri retinoid metabolizması ve HKH'lerin siklofosamid gibi alkilleyici ajanlara direncinde rol oynayan sitozolik aldehid dehidrogenaz (ALDH)'dır. Farklı fonksiyonları olan kordon kanından klinik uygulamalarda kullanılabilen en primitif insan hematopoetik kök ve progenitor hücrelerin daha yüksek saflıkta eldesinin CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> yüzey belirteçlerinin yanı sıra ALDH ile de işaretlenerek akım sitometri analizi sonrası ALDH<sup>+</sup> hücrelerin diğer hücrelerden ayrılarak olabileceğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Hematopoetik hücre serilerine farklılaştırılma çalışmaları için sadece CD34<sup>+</sup> hücrelerin seçilmesinin yeterli olmadığı ALDH<sup>+</sup> ve CD38<sup>-</sup> negatifliğin de analiz edilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve yöntemler:** Biz çalışmamızda CD34 yüzey belirteci olan hücreleri kordon kanından magnetik nanopartiküller kullanarak ayırdıktan sonra flow sitometre cihazıyla, bu hücrelerin içerisinde ALDH etkinliği olup CD38 yüzey antijeni-olmayan hücreleri saflaştırdık. Bu hücre gruplarını floresan mikroskopu ile görüntüledik.

**Bulgular:** Yaptığımız bu çalışmada kordon kanından saflaştırdığımız CD34<sup>+</sup> hücrelerin ALDH-FITC işaretlenmeleri sonucunda aldığımız floresan mikroskop ve flow sitometrik (facs) analizinde CD34<sup>+</sup> olan hücrelerin ALDH<sup>+</sup> olduğu görüldü.

**Sonuç:** Bu çalışmamızın sonucunda kordon kanından hematopoetik kök hücre izolasyonunda ALDH<sup>+</sup> hücre grubu CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> hücrelerden zengin olduğu ve hücre kültüründe koloni oluşturma özelliğine sahip olduğu görülmüştür. Kordon kanından hematopoetik kök hücre izolasyonunda yalnızca CD34<sup>+</sup> olmasının yeterli olmadığı ALDH<sup>+</sup> ve CD38<sup>-</sup> negatifliğin de analiz edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Hematopoetik kök hücre; kordon kanı; ALDH; CD34.

#### ABSTRACT

**Objective:** The preferred method for the purification of hematopoietic stem cells (HSCs), which can easily differentiate into blood cells, is the selection of CD34<sup>+</sup> cells by flow cytometry or magnetic discrimination. Methods are needed that effectively determine human stem cells without entirely relying on phenotypic cell surface markers. One of these methods is cytosolic aldehyde dehydrogenase (ALDH), which plays a role in retinoid metabolism and resistance of HSCs to alkylating agents such as cyclophosphamide. The prospective isolation of human hematopoietic stem and progenitor cells with different functions, as well as surface markers, are also recommended by ALDH and flow cytometry. In the above findings, ALDH<sup>+</sup> cells can be isolated from other cells and the most primitive hematopoietic stem cells can be isolated and used in clinical applications.

**Materials and methods:** In our study, we separated the CD34 surface marker cells from cord blood using magnetic nanoparticles and then purified the cells with ALDH activity and non-CD38 surface antigen by flow cytometer. We visualized these cell groups with fluorescence microscopy.

**Results:** We observed that the majority of CD34<sup>+</sup> cells were ALDH<sup>+</sup> in fluorescence microscopy and flow cytometry (FACS) analysis of CD34<sup>+</sup> cells purified from cord blood as a result of ALDH-FITC markings.

**Date received/Dergiye geldiği tarih: 13.03.2017 – Date accepted/Dergiye kabul edildiği tarih: 03.05.2017**

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, \* Biyofizik Anabilim Dalı, \*\* \*Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, \*\*\*\* Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, \*\*Altınbaş Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Odiometri Bölümü, İstanbul, TÜRKİYE

(Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: leylasen@istanbul.edu.tr)

Conclusion: As a result of this study, it was found that the ALDH<sup>+</sup> cells group is rich in CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> cells in hematopoietic stem cells isolated from cord blood, and is capable of colony formation in cell culture. It is suggested that in hematopoietic stem cell isolation from cord blood, only CD34<sup>+</sup> cells are not sufficient and ALDH<sup>+</sup> and CD38<sup>-</sup> negativity should also be analyzed.

**Keywords:** Hematopoietic stem cells; cord blood; ALDH; CD34.

## GİRİŞ

Kök hücreler kendilerini yenileyebilme, proliferasyon ve çeşitli hücre tiplerine (kemik, kıvırdak, kas, yağ, v.b.) farklılaşma potansiyeline sahip; eritroid seri, miyeloid seri ve megakaryositik seri ile lenfoid serilerin her biri için birer unipotansiyel farklılaşmamış hücrelerdir (1). Erişkin kök hücreler mezenkimal ve hematopoetik kök hücreler olmak üzere ikiye ayrılırlar. HKH'ler kendi kendini yenileyebilme ve tüm kan hücrelerine farklılaşabilme özellikleri ile kan hücreleri öncülleridir. Farklılaşabildikleri kan hücreleri: myeloid hücreler (monositler, makrofajlar, bazofiller, eosinofiller, eritrositler, megakaryositler/ plateletler ve bazı dendritik hücreler) ve lenfositler (T-hücreleri, B-hücreleri, NK-hücreler, bazı dendritik hücreler)'dir. Bu hücreler periferik kana 3-4 günlük bir süre içerisinde mobilize olmaktadır. İnsan kordon kanında CD34<sup>+</sup> kök ve progenitör hücre kompartmanlarını ayırmada ALDH aktivitesini ilk kullanan Storm ve arkadaşlarıdır (2). ALDH<sup>+</sup> hücrelerin çoğunda CD34<sup>+</sup>ün de pozitif olduğunu ancak bazı hücrelerin ya CD34 ya da ALDH ekspresine ettiğini Fallon ve arkadaşları (4) yaptıkları çalışmada gösterdiler. Bulgularına göre; farklı serilere gelişim sağlayabilen ilkel progenitör hücrelerin birçoğu ALDH<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> hücre grubundaydı ve kısa süreli miyeloid progenitörlerden zengindi, ALDH<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> hücrelerde ise ilkel progenitör sayısı ve kısa süreli miyeloid potansiyel az olduğunu bildirmişlerdir. Lacombe ve arkadaşları (5) yaptıkları hayvan çalışmasında ALDH<sup>+</sup> hücrelerin tipik primitif hematopoetik öncül hücreler olduğunu ve in vitro hematopoetik progenitör fonksiyonun ALDH<sup>+</sup> grupta, ALDH gruptan daha yüksek olduğunu ve daha yüksek telomeraz aktivitesine sahip olduğunu göstermişlerdir. Aldefluor, kendisi ALDH'nın substratı olmayan bodipy-aminoasetaldehit dietil asetal (BAAA-DA) şeklindedir. BAAA-DA, dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözünür ve ALDH için floresan bir substrat olan bodipy-aminoasetaldehite (BAAA) dönüştürülmek için asite maruz bırakılır. BAAA yüksüzdür ve intakt canlı hücreleri plazma membranlarından serbestçe difüzyona uğrar. İntraselüler ALDH, BAAA'yı serbest difüzyona izin vermeyen negatif yükü nedeniyle hücre içinde biriken bodipyaminoasetata (BAA) dönüştürür (Şekil 1) (7).

Aldefluor kiti içinde bulunan buffer BAA'nın hücrelerden dışarı çıkmasını engelleyen bir transport inhibitörü içerir. Sonuç olarak, yüksek miktarda ALDH sentezleyen hücrelerde BAA ve böylece floresans birikir. Bu floresans standart akım sitometri ile ölçülebilmektedir. BAAA'lı hücrelerin 10 kat daha fazla miktarda ALDH inhibitörü dietil amino benzaldehit (DEAB) ile

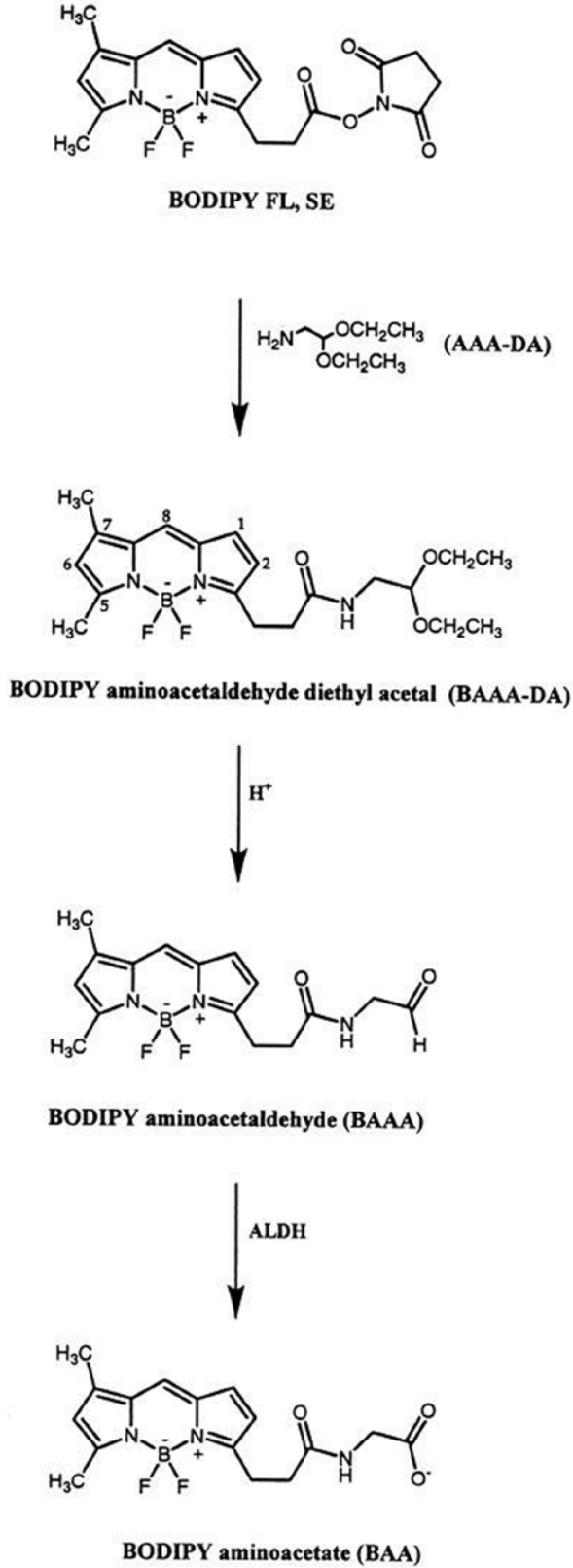
inkübasyonu ALDH<sup>br</sup> (Aldehit dehidrogenaz bright) hücrelerin floresans yoğunluğunda önemli azalmayla sonuçlanır ve negatif kontrol olarak kullanılır. Mobilize periferik kan hücrelerindeki ALDH sıklığı %3.1±4.8 olarak bildirilmiştir. Kordon kanında ALDH<sup>br</sup> hücre sıklığı ise yaklaşık %1 olarak bulunmuştur. Çeşitli çalışmalarda CD34 ekspresine eden ALDH<sup>br</sup> hücrelerin sıklığı kordon kanı ve mobilize periferik kan hücreleri arasında küçük farkla %73-95 olarak bildirilmiştir. CD34 anlatımı olan ALDH<sup>br</sup> insan kemik iliği hücrelerinin sıklığı ise daha azdır (%49-59). ALDH<sup>br</sup> kordon kanı ve kemik iliği hücrelerinin büyük çoğunluğu, ALDH'nın ilkel hematopoetik hücrelerde anlatımı ile uyumlu olarak, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-/lo</sup> fenotipindedir. CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-/lo</sup> olan ALDH<sup>br</sup> hücrelerin mobilize periferik kandaki sıklığı sadece %0.75±1.2 olarak bildirilmiştir. ALDH<sup>br</sup> hücrelerin büyük kısmı ilkel hematopoetik hücrelerin karakteristik fenotipik özelliklerine de sahiptir (örneğin CD117 ve CD133). ALDH<sup>br</sup> hücrelerin %63'ünde lineage antijenler azdır veya bulunmaz. Lin- ALDH<sup>br</sup> hücrelerin çoğu CD34<sup>+</sup>tir. CD34<sup>-</sup>ALDH<sup>br</sup> hücreler lineage antijen anlatımı açısından heterojendir.

Hess ve ark (8) otooloji mobilize periferik kan kök hücre graflarıyla verilen ALDH<sup>br</sup> hücre sayısı ile nötrofil ve trombosit düzelmesine kadar geçen süre arasında korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçlar ALDH<sup>br</sup> hücre sayımının CD34<sup>+</sup> hücre ölçümüne bir alternatif olabileceğini yani HKH'lerin fenotip yerine fonksiyonel özelliklere dayalı olarak tanımlanıp sayılabileceğini gösterir (9).

Daha önce ALDH<sup>br</sup> hücrelerle yapılan tüm çalışmalarda ALDH<sup>br</sup> kordon kanı ve mobilize periferik kanın CD34<sup>+</sup> ve CD38<sup>-</sup> hücrelerden zengin olduğu gösterilmiştir (10,11,12). ALDH<sup>br</sup>CD34<sup>+</sup> hücreler en ilkel hematopoetik progenitörlerden zengindir. ALDH ve CD34 anlatımı insan hematopoezinin gelişimsel aşamalarını ayırmada da kullanılabilir. En ilkel hematopoetik hücreler ALDH ve CD34 sentezler.

İnsan hücrelerine toksik olmayan Aldefluor substratı; insan hücrelerinin çoğalma fonksiyonunu değiştirmez. Deoksiribonükleik asit (DNA) arasına girmez. Sonuç olarak ALDH aktivitesine bağlı izolasyon DNA'ya bağlanan boyalarla seçime kıyasla relatif olarak daha güvenli olarak gözükmektedir. Değişken hücre yüzey molekülleri kullanmadan kök hücreleri diğer dokulardan ayırmada standart bir yöntem sağlayabilir (13).

BAAA ile boyama yüksek oranda tekrarlanabilen basit bir işlemdir. BAAA'nın emisyon spektrumu diğer florokromlarla önemli ölçüde çakışmaz böylece çok parametrelili FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) analizi ile ilave belirteçlerin kullanılmasına izin verir.



**Şekil 1: BAAA-DA (Bodipy aminoasetaldehyit dietilasetal), BAAA (Bodipy aminoasetaldehyit) ve BAA (Bodipy aminoasetat)'nın yapısı(7)**

BAAA'nın hücrenin canlılığını gösteren bir boya olması onu kriyoprezervasyon uygulanan hücrelerin ve canlılığı bozulmuş diğer örneklerin boyanmasında da yararlı kılar. CD34'e dayalı yöntemler canlı ve cansız hücreleri

ayırılmaz (14). BAAA boyası hem lineage negatif CD34<sup>+</sup> hücreleri hem de CD34<sup>-</sup> hücreleri kapsar. ALDH<sup>br</sup> popülasyonun bir alt grubu olan lineage negatif CD34 yüzey antijeninin hücrelerdeki biyolojik önemi halen bilinmemektedir.

ALDH<sup>+</sup> hücrelerin izolasyonu tümör hücreleriyle kontaminasyonun temizlenmesinde de yararlı olabilir. Kordon kanının dondurulması ve çözülmesi türü işlemler sırasında membran hasarına uğrayan hücreler ALDH reaksiyonuna ait ürünü kaybeder ve sonuçta tüm ALDH<sup>+</sup> hücreler saptanamayabilir. Bu sebepten dolayı kordon kanından progenitor hücre saflaştırması yapılırken çalışmalarda taze kordon kanı ile çalışılması verimi artırır.

Son olarak, birçok dokudaki kök hücreler yüksek miktarda ALDH ekspresine edebileceğinden ALDH<sup>br</sup> hücrelerin tanımlanması hematopoetik sistem dışındaki barsak, karaciğer ya da deri gibi diğer dokulardan kök hücrelerin izole edilmesinde yararlı bir yöntem olabilir (15,16).

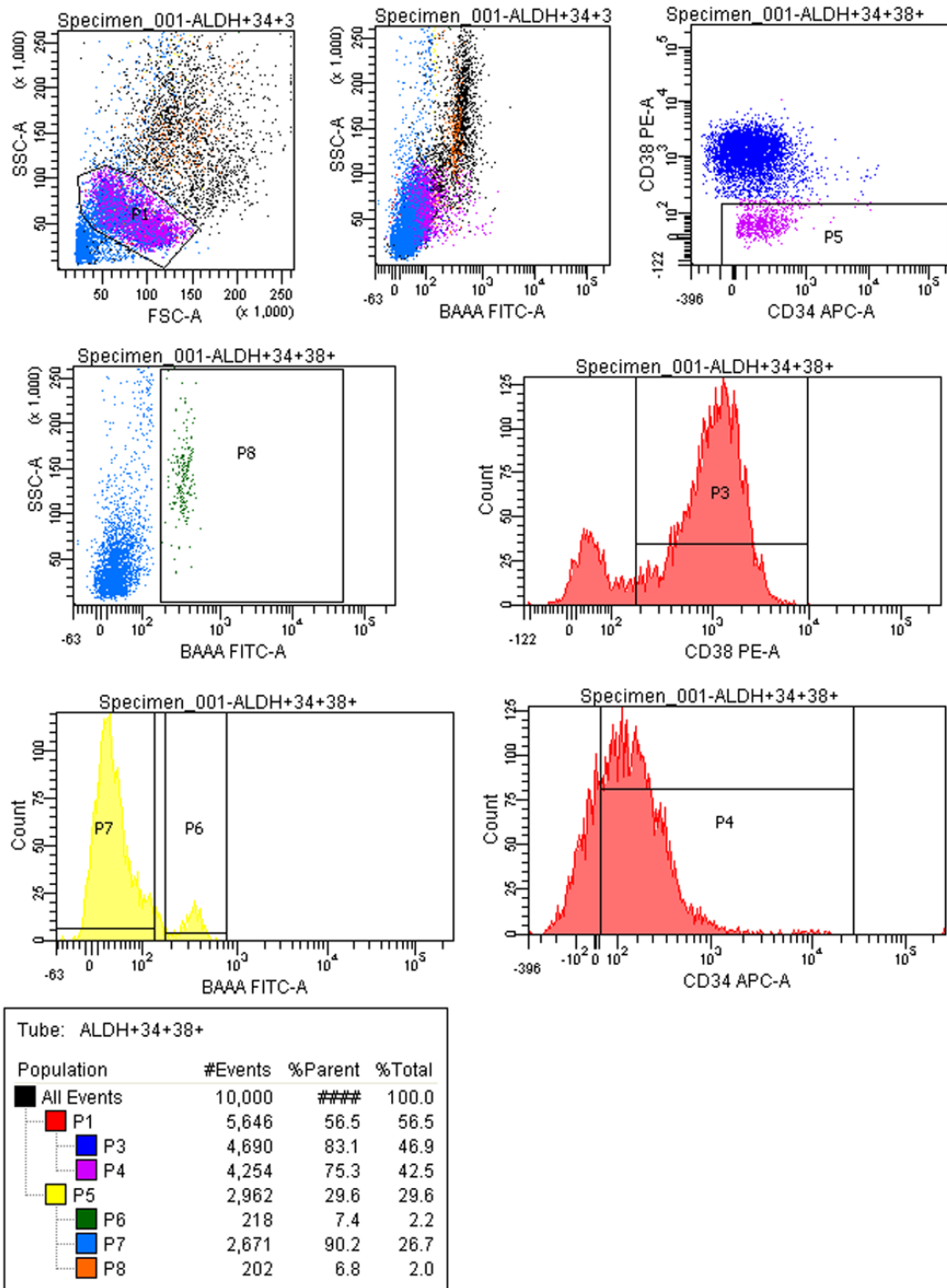
## MATERYAL VE METOD

### Kordon Kanından CD34<sup>+</sup> Hücre İzolasyonu

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Doğum Anabilim Dalı tarafından K2EDTA'lı tüplere alınan 10 ml kordon kanı 1:1 oranda PBS ile seyreltildi. Ficoll üzerine seyreltilmiş olan kordon kanı yavaşça tabakalandırıldı. 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj yapıldı. Buffy coat polistrenli tüpe alındı ve 1 ml medyum (%2 FBS+ 1mM EDTA içeren PBS) eklendi. Sırası ile EasySep™ Human CD34 Positive Selection Kit (Stemcell Technology, Vancouver, Canada) içerisindeki 100 µl kokteyl eklendi; pipetaj yapıldı ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Ardından magnetik nanopartikül içeren karışımdan 50 µl eklendi; 4-5 kez çekip bıraktıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Toplam hacmin medyuma 2500 µl olması sağlandı ve magnet içerisine alınan tüp 5 dakika burada bekletildi. Magnetten çıkarmadan tüp içeriği 2-3 sn beklenerek boşaltıldı. Tüp magnetten çıkartıldı ve tekrar 2,5 ml PBS eklenerek 4 kez daha yıkandı. Tüp içeriği (CD34<sup>+</sup> hücreler) saflaştırılmış oldu.

### Kordon Kanından CD34<sup>+</sup> Hücrelerin Seçiminden Sonra (ALDH)<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> Hücrelerin Seçilmesi

ALDECOUNT RUO Assay Kit + Buffer (Stemcell Technology) kullanılarak, belirteç tüpüne (reagent tube) 50 µl aktivatör eklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüpe 1,5 ml nötralizasyon tamponu eklendi. Aynı anda kontrol tüpüne 5 µl DEAB eklendi. 500 µl hacimde bulunan hücre örneği (kordon kanından elde edilen) belirteç tüpüne aktarıldı. 2 ml olan tüpten 500 µl kontrol tüpüne aktarıldı. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Belirteç tüpünden 1 ml örnek ayrı bir flow tüpüne alındı. 5 µl CD34 APC ve 5 µl CD38 PE eklendi. DEAB kontrol tüpünden 250 µl örnek ayrı bir flow tüpüne alındı. 5 µl CD34 APC ve 5 µl CD38 PE eklendi. Tüm tüpler 37°C'de 20 dakika karanlıkta inkübe edildi. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak üst sıvısı alındı. 0,5 ml ölçüm tamponu eklenerek



Şekil 2: Kök hücrelerin seçildiği tüp. APC işaretli CD34<sup>+</sup> hücrelerin FITC işaretli Bodipy-aminoasetaldehyd (BAAA), PE işaretli CD38 antikorlarıyla muamele edildiği tüpün analizi ve toplanacak hücrelerin seçimi.

Becton Dickinson (USA) firmasının BD FACS Aria II cihazına geçildi. Veriler (Becton Dickinson) FACS Diva Software 6.1.2 program kullanılarak elde edildi.

#### İmmü Floresan Mikroskopisi

İzole edilen hücre örnekleri polylizine kaplı lam üzerine yayılarak oda sıcaklığında 2 saat kurutuldu. Hücreleri sabitlemek amacıyla lam %2 paraformaldehitli PBS içerisinde +4°C'de 1 saat bekletildikten sonra 2 kez PBS ile yıkandı ve PBS içerisinde +4°C'de 12 saat bekletildi. Hücreler çeşitli renkte FITC, PE antikorları ile işaretlendi. Sonrasında lam üzerine hücre çekirdeğinin

belirlenmesi için DAPI damlatılarak lamel ile kapatıldı ve floresan mikroskopunda (Olympus BX51) incelendi. Görüntüler Olympus DP-72 kamera sistemi ve DP2-TWAIN yazılım programı ile fotoğrafları çekildi. Çalışmada kullanılan floroforların uyarılma-salınım değerlerine karşılık floresan mikroskopta Olympus U-25ND25 ve U-25ND6 filtreleri kullanıldı. Bu değerler; DAPI için uyarılma 345 nm – yayılım 458 nm, FITC için uyarılma 494 nm – yayılım 518 nm olarak belirlendi.

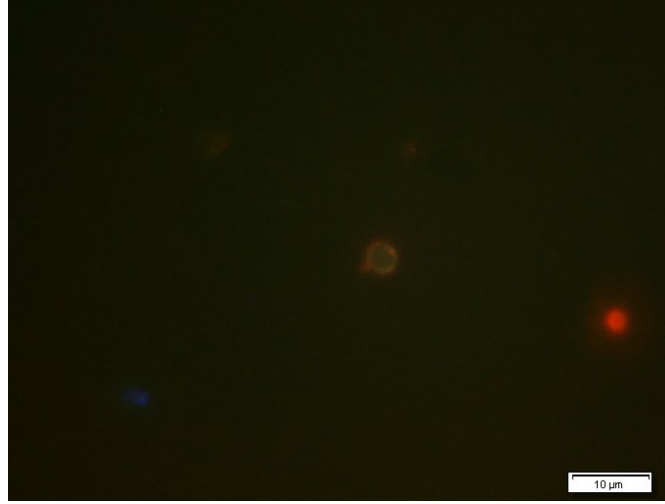
## BULGULAR

### Kordon Kanından CD34<sup>+</sup> Hücrelerin Seçiminden Sonra (ALDH)<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> Hücrelerin Seçilmesi

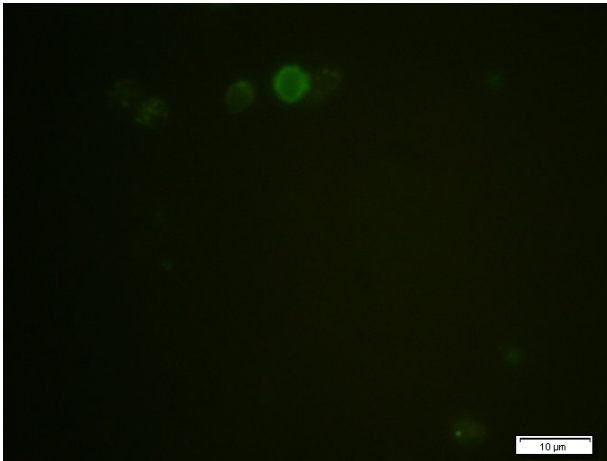
ALDH etkinliği olan hücrelerin seçimi materyal-metod kısmında anlatıldığı şekilde gerçekleştirilip ardından CD38 antijeni için CD38<sup>PE</sup> işaretli antikorla işaretlendi. Magnetik ayırım sistemi ile CD34<sup>+</sup> olan seçilmiş hücrelerden, bu işaretli antikorlar aracılığıyla CD38<sup>-</sup>ALDH<sup>+</sup> hücreler seçildi (Şekil-1). Becton Dickinson (USA) firmasının BD FACS Aria II cihazıyla bu seçilen hücreler toplandı. 1 nolu dot plotta CD34 hücrelerinden lenfosit kapısını alındı. Daha sonra seçmiş olduğumuz kapıdaki hücreleri CD34 (P4) ve CD38 (P3) parametrelerinde okundu. CD34/CD38 parametresinden CD34(+)/CD38(-) olan hücre grubunu kapılayarak (P5) bu hücre grubu içerisindeki ALDH oranını okundu. ALDH(+) (P6) ve ALDH(-) (P7) olarak gördüğümüz popülasyonlardan ALDH(+) (P8) olan kısmı sort ederek ayrıldı (Şekil 2).

### Kordon Kanından Saflaştırılan Hematopoetik Progenitor Hücre ve Önceki Aşamalarının Floresan Mikroskopunda Görüntülenmesi

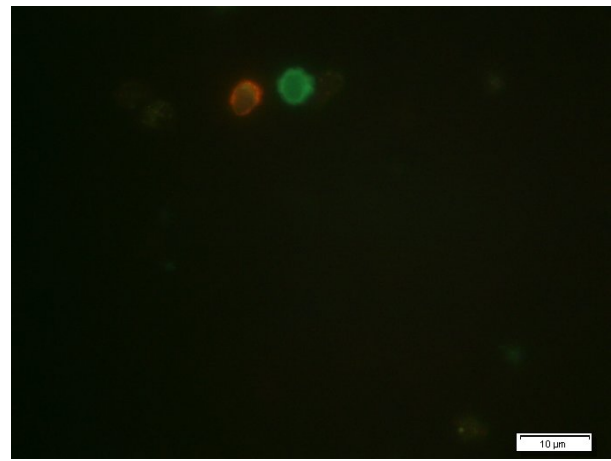
Magnetik ayırım sistemi ile izole edilen CD34<sup>+</sup> hücreler ile BD FACS Aria II cihazıyla ile seçilip toplanan CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>ALDH<sup>+</sup> hücreler, CD38<sup>PE</sup> ve ALDH-FITC ile işaretlenerek Olympus BX51 floresan mikroskopunda görüntüldü. Magnetik ayırım sistemi ile sadece CD34<sup>+</sup> olan hücrelerin CD38<sup>PE</sup> ile boyanması sonucu elde edilen Şekil 3'de verilmiştir. ALDH ve CD38 işaretlenmeleri sonucu alınan görüntülerde, bu hücrelerin tamamının kök hücre olmadığı görüldü (Şekil 4a-4b). ALDH(+)/CD34(+)/CD38(-) belirteçlerine sahip olan kök hücrelerin toplanması sırasında lazer ışığı kullanıldığından uyarılma sonrası toplanırken BAAA-FITC sönmüldü. Dolayısıyla FACS ile toplanmış olan kök hücreler floresan mikroskopunda, DAPI ile boyanmış çekirdekleri mavi renkte olan hücreler olarak görüntüldüler (Şekil 5).



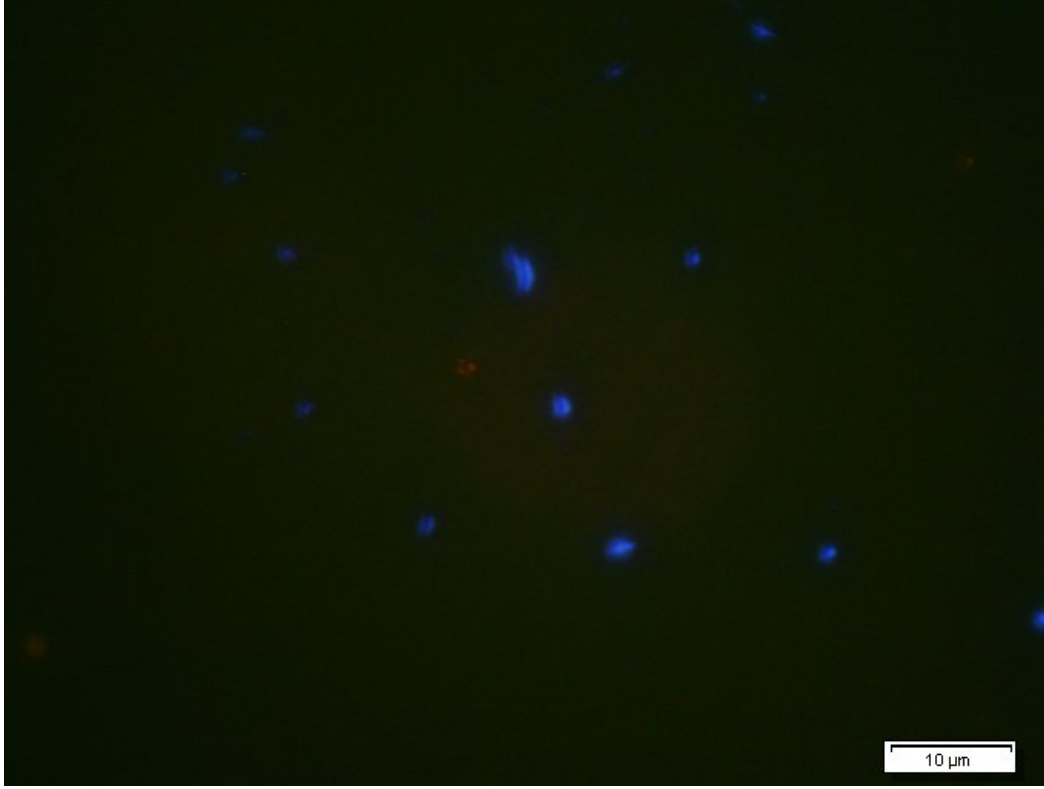
Şekil 3: CD34<sup>+</sup> hücrelerin CD38<sup>PE</sup> ile işaretlenmiş hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü.



Şekil 4: a- CD34<sup>+</sup> hücreler seçildikten sonra ALDH enzimatik etkinliğinin ve CD38 yüzey antijenine sahip hücrelerin incelendiği floresan mikroskop görüntüsü



Şekil 4: b- CD34<sup>+</sup> hücreler seçildikten sonra ALDH enzimatik etkinliğinin ve CD38 yüzey antijenine sahip hücrelerin incelendiği floresan mikroskop görüntüsü



Şekil 5: CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>ALDH<sup>+</sup> hücrelerin FACS ile toplanması aşamasından sonra hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü.

#### SONUÇ

Çalışmamızda insan kordon kanı kökenli hematopoetik kök hücre saflaştırılmasında öncelikle magnetik ayırım sistemi kullanılarak CD34<sup>+</sup> hücreler toplanmış; ardından ALDH işaretlemesi sonrası FACS ile CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>ALDH<sup>+</sup> hücreler toplanmıştır. Biz çalışmamızda CD34, CD38, ALDH antikorlarını işaretlemeye kullandık ve ardışık kapılar alırken monositleri kapı olarak analiz dışı bıraktık. CD34<sup>+</sup> seleksiyon aşamasından sonra ALDH seçimine gidildiği için arada zamandan ve ortamdan kaynaklanan canlılığı bozulmuş hücreler görülmüştür. BAAA sayesinde bu canlılığı bozulmuş hücreler saflaştırma dışı bırakılmıştır. ALDH ölü hücreleri boyamaması özelliğinden dolayı dondurulup çözülen veya izolasyon sırasında kök hücrelere canlılık boyası olan 7-aminoaktinomisin D (7-AAD) testinin yapılmasına gerek kalmamaktadır. Floresan mikroskopta magnetik ayırım sistemiyle toplanan CD34<sup>+</sup> hücreler incelendiğinde bu hücrelerin tümünün ALDH etkinliğine sahip olmadığı; ayrıca hematopoetik kök hücrelerin CD38<sup>-</sup> olması gerekirken bu CD34<sup>+</sup> hücre popülasyonunun içerisinde CD38<sup>+</sup> olan hücrelerin de bulunduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla kordon kanında hematopoetik kök hücre izolasyonunda CD34<sup>+</sup> pozitifliğin yeterli olmadığı ALDH etkinliği de önemli olduğu görülmektedir.

ALDH<sup>+</sup> hücre grubu CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> hücrelerden zengindir ve kültürde koloni oluşturma özelliğine sahiptir. Bu da mobilize periferik kandaki ALDH<sup>+</sup> hücrelerin ilkel hematopoetik hücrelerin fenotipik özelliklerine sahip oldukları sonucuna vardırırdı. Kordon kanından elde edilen CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>ALDH<sup>+</sup> hematopoetik kök hücrelerin eritroid seriyeye

farklılaşmaları aşamaları esnasında CD38<sup>+</sup> hücrelerin varlığı tespit edilmiştir. (17). Hematopoetik kök hücreler CD38<sup>-</sup> iken farklılaşmaya başladığında yüzeylerinde CD38 belirteçleri oluşmaktadır. Buna göre de hücrelerin CD38 yüzey belirteçlerinin negatif ve pozitif olması kordon kanı hematopoetik kök hücre izolasyonu açısından önemlidir.

ALDH<sup>+</sup> hücrelerin çoğunda CD34<sup>+</sup>ün de pozitif olduğunu ancak bazı hücrelerin ya CD34 ya da ALDH ekspresye ettiğini Storms ve arkadaşları (18) yaptıkları çalışmada gösterdiler. Bulgularına göre; farklı serilere gelişim sağlayabilen ilkel progenitör hücrelerin birçoğu ALDH<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> hücre grubundaydı ve kısa süreli miyeloid progenitörlerden zengindi, ALDH<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> hücrelerde ise ilkel progenitör sayısı ve kısa süreli miyeloid potansiyel azdı. Bizim yaptığımız kordon kanından saflaştırılan CD34<sup>+</sup> hücrelerin ALDH-FITC işaretlenmeleri sonucunda aldığımız floresan mikroskop ve flow sitometrik analizinde CD34<sup>+</sup> olan hücrelerin birçoğunun ALDH<sup>+</sup> olduğu görüldü. Armstrong ve arkadaşları (19) yaptıkları hayvan çalışmasında ALDH<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> hücrelerin tipik primitif hematopoetik öncül hücreler olduğunu ve in vitro hematopoetik progenitör fonksiyonun Lin<sup>-</sup> ALDH<sup>+</sup> grupta ALDH<sup>-</sup> gruptan daha yüksek olduğunu gösterdiler. Bu hücreler daha yüksek telomerez aktivitesi ve S fazında en az hücreye sahipti. Araştırmacılar yukarıda saptanan bulgular ışığında ALDH<sup>+</sup> hücrelerin diğer hücrelerden ayrılarak izole edilebileceğini ve klinik uygulamalarda kullanılabilirliğini belirttiler (20). Analiz için kullanılan çok renkli flow sitometre ve saflaştırmada kullanılan yüksek hızlı hücre saflaştırma

cihazı bu alandaki çalışmalarda kullanılan başlıca cihazlar olmuştur.

### **TARTIŞMA**

Yapılan bu çalışmanın sonucunda kordon kanından hematopoetik kök hücre izolasyonunda yalnızca CD34<sup>+</sup> olmasının yeterli olmadığı ALDH<sup>+</sup> ve CD38<sup>-</sup> negatifliğin de analiz edilmesi gerektiği düşünülmektedir. ALDH etkinliğinin analiz sistemi hücreler açısından toksik olmaması ve en ilkel hematopoetik kök hücrelerin dahi ALDH etkinliğine sahip olmasından dolayı hematopoetik kök hücre ayırımında oldukça önemlidir (21,22). Bu teknik ile kordon kanından kök hücre izolasyonu gerçekleştirilmesi ile hematopoetik hücre serilerine farklılaştırılmak sureti ile kullanımı sağlanabilir.

### **KAYNAKLAR**

1. Akel S., Perrow S.C., Laughlin J.M., Ruscett W. Neutralization of Aytocrine Transforming Growth $\beta$  Factor- $\beta$ in Human Cord Blood CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup> Cell Promotes Stem Cell Factor-Mediated Erythropoietin-Independend Early Erythroid Progenitor Development and Reduces Terminal Differentiation. *Stem Cells* 2003;21:557-67.
2. Storms R.W., Green P.D., Saford K.M., Niedzwiecki D., Cogle C.R., Colvin O.M., Chao N.J., Rice H.E., Smith C.A. Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34. *Blood* 2005; 106: 95-102.
3. Jones R.J., Zuehlsdorf M., Rowley S.D., Hilton J., Santos G.W., Sensenbrenner L.L., Colvin O.M. Variability in 4- hydroperoxycyclophosphamide activity during clinical purging for autologous bone marrow transplantation. *Blood* 1987; 70: 1490-4.
4. Fallon P., Gentry T., Balber A.E., Boulware D., Janssen W.E., Smilee R., Storms R.W., Smith C. Mobilized peripheral blood SSClo ALDHbr cells have the phenotypic and functional properties of primitive haematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation. *Br J Haematol* 2003; 122: 99- 108.
5. Lacombe C., Mayeux P. Biology of erythropoietin *Haematologica* 1998; 83:724-32.
6. Yalcintepe L., Albeniz I., Cinar S., Tiryaki D., Bermek E., Lee H.C. Nuclear CD38 in retinoic acid-induced HL-60 cells. *Exp Cell Res* 2005;303(1):14-21.
7. Russo J., Hilton J., Colvin O. The role of aldehyde dehydrogenase isozymes in cellular resistance to the alkylating agent cyclophosphamide. In: *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*. H.Weiner & T. Flynn, editors. p.65. New York.
8. Hess D.A., Meyerrose T.E., Wirthin L., Craft T.P., Herrbrich P.E., Creer M.H., Nolta J.A. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood*. 2004; 104: 1648-55.

9. Williams O., Demirer T., Lilleby K., Buckner C.D. Bensinger W.I. Tempo of hematologic recovery correlates with peripheral blood CD34<sup>+</sup> cell level in patients undergoing stem cell mobilization. *J Clin Apher*. 1998; 13: 1-6.
10. Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X., Finegold M., Weissman I.L., Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*. 2000; 6: 1229-34.
11. Armstrong L., Stojkovic M., Dimmick I., Ahmad S., Stojkovic P., Hole N., Lako M. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*. 2004; 22: 1142-51.
12. Gacar G. Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonunda flow sitometri. Temel kök hücre teknikleri ve moleküler biyolojide uygulamaları kursu. 2010.
13. Dunphy C.H. Applications of Flow Cytometry and immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology. *Arch. Pathol. Lab. Med* 2004;128:9,1004-22.
14. Laane E., Tani E., Bjorklund E., Elmberger G., Everaus H., Skoog L., Porwit-MacDonald A. Flow cytometric immunophenotyping including Bcl-2 detection on fine needle aspirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non-Hodgkin's lymphoma. *Cytometry Part B Clinical Cytometry* 2005;64:34-42.
15. Luider J., Cyfra M., Johnson P., Auer, I. Impact of the New Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-Color Flow Cytometer on a Regional Flow Cytometry Clinical Laboratory Service. *Laboratory Hematology* 2004;10:102-8.
16. Stewart C.C., Woodring M.L., Podnieszinski E., Gray E. Flow Cytometer in the Infrared: Inexpensive Modifications to a Commercial Instrument. *International Society for Analytical Cytology* 2005; 67:104-11.
17. Albeniz I, Türker-Şener L, Baş A, Kalelioğlu I, Nurten R. Isolation of hematopoietic stem cells and the effect of CD38 expression during the early erythroid progenitor cell development process. *Oncol Lett* 2012 ;3(1):55-60.
18. Storms R.W., Green P.D., Saford K.M., Niedzwiecki D., Cogle C.R., Colvin O.M., Chao N.J., Rice H.E., Smith C.A. Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34. *Blood* 2005; 106: 95-102.
19. Armstrong L., Stojkovic M., Dimmick I., Ahmad S., Stojkovic P., Hole N., Lako M. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells* 2004; 22: 1142-51.
20. Mitchell S., Cairo and John E. Wagner Placental and/or Umbilical Cord Blood: An Alternative Source of Hematopoietic Stem Cells for Transplantation. *Blood The American Society of Hematology* 1997; 90, 12.

21. Moreb J.S. Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2008; 3(4):237-46.
22. David M. Putman, Tyler T. Cooper, Stephen E. Sherman, Ayesh K. Seneviratne, Mark Hewitt, Gillian I. Bell, David A. Hess, Expansion of Umbilical Cord Blood Aldehyde Dehydrogenase Expressing Cells Generates Myeloid Progenitor Cells that Stimulate Limb Revascularization, *Stem cells translational medicine,* 2017; DOI: 10.1002/sctm.16-0472.