

Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması

Measurement Methods of Cell Proliferation and a Comparison of Various Commercial Proliferation Kits

Gökhan Terzioğlu,¹ Ali Ümit Keskin,² Gülderen Yanıkkaya Demirel³

¹Yeditepe Üniversitesi Hastanesi, Doku Tipleme Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

²Yeditepe Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği, İstanbul, Türkiye

³Yeditepe Üniversitesi Hastanesi, İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

İletişim adresi:

MSc. Gökhan Terzioğlu
Yeditepe Üniversitesi Hastanesi, Doku Tipleme Laboratuvarı, 34752 Kozyatağı, İstanbul, Türkiye
Tel: +90 537 - 892 80 66
e-posta: gokhanterzioglu@yahoo.com

©2013 Turkish Journal of Immunology. All rights reserved.

doi: 10.5606/tji.2013.267

Geliş tarihi: 26 Kasım 2013
Kabul tarihi: 21 Aralık 2013

Hücre proliferasyon hızının belirlenmesi, tümör biyolojisinin temel parametrelerinin anlaşılması için önemlidir. Bu, hücre proliferasyon testlerinin karşılaştırmalı olarak analizini gerektirmektedir. Mevcut hücre proliferasyon testleri Deoxyribonucleic acid (DNA) sentezi, metabolik aktivite, proliferasyon işaretçileri ve ATP içeriğinin ölçümüne dayalı testler olmak üzere dört ana grup altında sınıflandırılabilir. DNA sentezinin belirlenmesine dayalı hücre proliferasyon testlerinde başlıca radyoaktif (3H timidin) veya floresan özellikli (BrdU, EdU ve benzeri) olmak üzere timidin analogları kullanılmaktadır; böylece hücre proliferasyonu timidin analoglarının yeni sentezlenen DNA'ya katılımı üzerinden izlenebilmektedir. Metabolik aktivite temelli proliferasyon testleri ise, genel olarak WTS ve MTT gibi tetrazolyum tuzlarının hücre tarafından kullanımına dayanmaktadır. Proliferasyon işaretçisi temelli testlerde başlıca proliferasyon hücre çekirdek antijeni (PCNA) ve fosfohiston H3 için olmak üzere antikorlar kullanılmaktadır. ATP temelli testler de hücre proliferasyonunu belirlemek için bir diğer alternatif olup, hücre popülasyonundaki artan ATP miktarına göre proliferasyon belirlenir. Bu makalede, doğa bilimciler ve konu ile ilgili klinik araştırmacılar deney tasarımı yardımcı olunması amacıyla çeşitli ticari proliferasyon kitleri karşılaştırıldı. Ayrıca bu testler maliyet parametresinin de dahil olduğu parametrelere göre karşılaştırmalı tablolar halinde verildi.

Anahtar sözcükler: Akım sitometri; hücre bölünmesi; hücre proliferasyon kiti; hücre proliferasyonu.

Determination of cell proliferation rate is the key to understand the basic parameters of tumor biology. It requires a comparative analysis of proliferation assays. Current cell proliferation assays can be classified in four main groups based on deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis, metabolic activity, proliferation markers and ATP content. DNA synthesis-based cell proliferation assays mainly use radioactive (3H thymidine) or fluorescent (BrdU, EdU, etc.) thymidine analogues; thus, cell proliferation can be monitored through incorporation of thymidine into newly synthesized DNA. Metabolic activity-based proliferation tests are usually relies on the utilization of tetrazolium salts such as WTS and MTT by cells. Proliferation marker-based assays mainly use antibodies against proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and phospho histone H3, in particular. ATP-based tests are another alternative for determination of cell proliferation, which rely on the increased ATP content in the population of the cells. In this article, various commercial proliferation kits were compared to assist to the life science researchers and the subject-related clinical researchers for experiment design. In addition, these tests were compared in comprehensive tables according to different parameters including their costs.

Key words: Flow cytometry; cell division; cell proliferation kit; cell proliferation.

Hücrelerin çoğalması ya da proliferasyonu hücre bölünmesi üzerinden gerçekleşmekte ve hücrelerin iki yavru hücreye bölünmesi işlemi hücre bölünmesi olarak adlandırılmaktadır. Çoğu hücrede, hücre bölünmesi dört farklı aşamadan meydana gelmekte ve bu evreler sırası

ile G₁, S, G₂ ve M olarak adlandırılmaktadır, ek olarak gerekli hücre dışı sinyalleri almadıkları için bölünmeyen hücrelerin bulunduğu faz ise G₀ olarak adlandırılmaktadır.^[1] G₁, S ve G₂ evreleri birlikte interfaz olarak adlandırılır ve interfazda mitoz için gerekli hazırlıklar yapılır,

M ise bölünmenin gerçekleştiği evredir.^[1] Bu evrelerde gerçekleşen hücresel olaylar Tablo 1’de verilmiştir.

Hücre bölünmesi evreler boyunca çeşitli noktalarda kontrol edilir. S evresindeki deoksiribonükleik asit (DNA) replikasyonundan önce G₁ evresinde DNA bütünlüğü, G₂ evresinde S evresindeki DNA replikasyonunun doğruluğu, M evresinde ise bütün kromozomların mitotik iğlere bağlanması ve düzgün şekilde ayrılarak yavru hücrelere dağılması kontrol edilir.^[2] Mitozun devam etmesinde siklin bağımlı kinaz (CDK)’lar ve onları aktive eden siklinler ve inhibe eden CDK inhibitörleri ile CDK etkileşimli protein/kinaz inhibitörü protein (CIP/KIP) ailesinden inhibitörler görev almaktadır.^[2] Hücre döngüsü kontrol noktaları ve düzenleyicileri Şekil 1’de gösterilmiştir.^[2]

Hücre bölünme hızının tespiti, özellikle kanser gibi hastalıklarda önemlidir, böylece tümör ikilenme zamanı gibi parametreler belirlenebilir.^[3] Kanser oluşumuna neden olan mutasyonların bir kısmı da hücre bölünmesini kontrol eden sinyal yollarında gerçekleşmektedir.^[4] Retinoblastoma (Rb), protein 53 (p53) gibi hücre döngüsünü baskılayan düzenleyicilerin kaybı ve sıçan sarkoma onkogeni (Ras), miyelositomatoz onkogeni (Myc) gibi bölünmeyi artıran düzenleyicilerdeki artış hücre proliferasyon döngüsünün bozulmasına ve kontrolsüz hücre çoğalmasına, sonuç olarak da kansere neden olur.^[4]

Günümüzde kullanılan hücre proliferasyon testlerinde, proliferasyon yaygın şekilde yeni DNA sentez hızı üzerinden ölçülmekte, bunun için floresan veya radyoaktif ışımaya özelliği gösteren nükleotid analoglarının yeni sentezlenen DNA zincirine eklenme hızı izlenmektedir. Bölünme döngüsüne giren hücrelerde metabolik aktivitede de artış görülmektedir, bu neden ile metabolik aktivitenin ölçülmesi de sık kullanılan bir başka proliferasyon tespit yöntemidir.^[5] Prolifere hücre çekirdek antijeni (PCNA) gibi hücre döngüsü ile ilgili faktörlerin hücre içerisindeki miktarlarındaki değişiklik üzerinden de proliferasyon tayini yapılabilmektedir. Bu testlere ek olarak, hücre bölünmesinin yüksek miktarda enerji, adenosin trifosfat (ATP) gerektiren bir süreç olduğu bilinmektedir,

TABLO 1

Mitoz bölünme evrelerinde hücrede gerçekleşen değişimler^[1]

G ₁ evresi	Metabolizma açısından aktif olan hücre, hacimce büyür.
S evresi	Deoksiribonükleik asitin kopyalanması, replikasyonu gerçekleşir.
G ₂ evresi	Mitoz için gerekli olan proteinler sentezlenir ve hücre büyümesi gerçekleşir.
M evresi	Hücrenin bölünerek iki eş yavru hücre oluşturduğu evredir.
G ₀ evresi	Metabolik aktivitelerini sürdürmekte olan hücrelerdir, fakat bölünme görülmez.

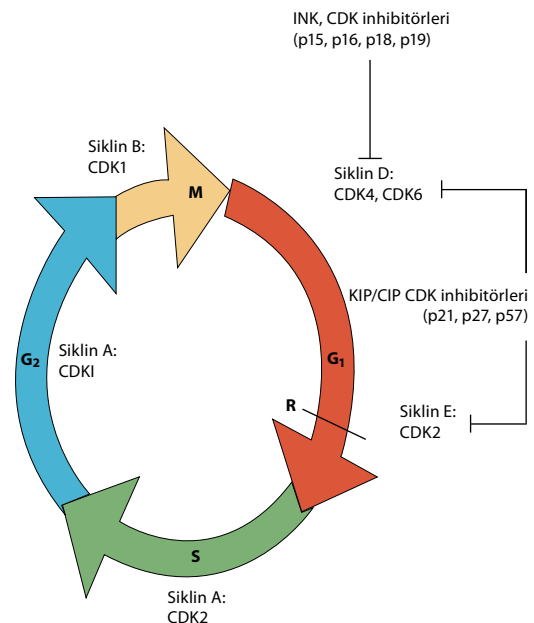
buradan hareket ile hücre içerisindeki ATP miktarı da hücre proliferasyonu ile ilişkilendirilebilmektedir.^[6]

Proliferasyon ölçüm testlerini aşağıda sıralandığı şekilde dört ana başlık altında sınıflandırmak mümkündür.

1. Deoksiribonükleik asit sentez hızının ölçülmesine dayalı testler.
2. Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı testler.
3. Proliferasyon işaretleyicilerinin (marker) ölçümüne dayalı testler.
4. Hücrelerdeki ATP miktarının ölçümüne dayalı testler.

DEOKSİRİBONÜKLEİK ASİT SENTEZ HIZININ ÖLÇÜLMESİNE DAYALI PROLİFERASYON TESTLERİ

Bölünmeye giden hücreler M bölünme fazından önce G₁, S ve G₂ fazlarından geçer ve DNA ikilenmesi işlemi de S fazında gerçekleşir.^[7] S fazındaki hücrelere dışarıdan işaretli nükleotid analogları verilerek, hücrelerin yeni DNA sentezinde bu nükleotidleri kullanması sağlanır ve böylece hangi hücrelerin bölünme döngüsü içerisinde olduğu belirlenebilir.^[8] Radyoaktif analoglar antikor gerektirmeden otoradyografi ile tespit edilebilir, diğer kitlerde kullanılan çeşitli timidin analogları ise yeni sentezlenen DNA zincirlerine yerleşir ve antikor kullanılarak bu analoglar ve yeni sentezlenen



Şekil 1. Ökaryot hücre döngüsü kontrol noktaları ve hücre döngüsü düzenleyici molekülleri^[2] INK: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü; CDK: Siklin bağımlı kinaz; KIP: Kinaz inhibitörü protein; CIP: Siprofloksasin.

DNA'lar, dolayısı ile hücre proliferasyonu tespit edilmiş olur.^[9] DNA sentez hızının ölçülmesi için kullanılan hücre proliferasyon kitlerinde radyoaktif ³H timidin ve radyoaktif olmayan 5-Bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) ve 5-etinil-2'-deoksiüridin (EdU) gibi timidin nükleotid analoglarının kullanıldığı görülmektedir.^[10] Kitlerin bir kısmı *in situ* sonuç verir iken, bir kısmı hücre nüfusu hakkında genel bilgi vermektedir. Radyoaktif analogların kullanımı sağlık açısından taşıdığı risk, daha kontrollü bir çalışma ortamı ve film ile çalışmayı gerektirmesi nedeni ile günümüzde fazla tercih edilmemektedir, bundan dolayı çoğu araştırmacı radyoaktif olmayan nükleotid analoglarını tercih etmektedir.

Ticari firmaların BrdUve ³H timidin nükleotid analoglarının kullanımına dayalı proliferasyon kitleri

Roche firmasının (Roche Diagnostik, İstanbul Türkiye), hücre bazında *in situ* proliferasyon gözlemi için "5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I" ve "5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II" ismi ile kullanıma sunmuş olduğu mikroskop altında çalışılabilecek iki farklı kit bulunmaktadır.^[10] Kit I ile çalışmak için floresan mikroskopu gerekir iken, Kit II kullanılarak hücreler ışık mikroskopu altında gözlemlenebilmektedir.^[10] Her iki kit için de BrdU işaretli DNA, anti BrdU antikoruna bağlanmaktadır, sonraki aşamada BrdU işaretli DNA'yı görüntülemek için kullanılan sekonder anti fare immünooglobulin (Ig)G antikoruna Kit I'de floresan ve Kit II'de alkalın fosfataz etiketli olmak üzere farklılık göstermektedir.^[10] Her iki kit ile de hem *in vitro* hücre kültüründe hem de *in vivo* işaretlendikten sonra, dondurulmuş ve parafinlenmiş doku kesitlerinde gözlem yapılabilmektedir. Anti BrdU, 5-iodo-2'-deoxy-uridine (%10) dışında çapraz reaktivite göstermemektedir.^[11] Her iki kit de 100 teste kadar kullanılabilir.

Birinci nesil kitlere ek olarak piyasada Roche firması tarafından üretilen FLUOS'un kullanıldığı ikinci nesil *in situ* kitler de bulunmaktadır.^[12] Bu kitler kullanıldığında hayvan dokusu ya da hücreleri *in vitro* büyütülerek BrdU ile işaretlenmekte ya da BrdU *in vivo* olarak hayvana enjekte edilmekte ve hayvan kurbanı edildikten sonra doku kesitleri alınmaktadır, bir sonraki adımda FLUOS konjuge monoklonal fare anti-BrdU antikoruna kullanılmaktadır.^[12] Sekonder antikor gerektirmemesi birinci nesil yöntemlere göre en önemli avantajdır. Floresan mikroskop kullanılması gerekmekte ve bir kit 100 teste kadar kullanılabilir.^[12] Akan hücre ölçer uygulaması da yapılmaktadır, akan hücre ölçer için hücreler lam yerine kültür flasksında büyütülür ve tripsin kullanılarak hücreler tek hücre süspansiyonu haline getirilir.^[13]

Roche firması BrdU ile tek tek hücrelerin değil, hücre gruplarının proliferasyonunun incelendiği ve enzim bağlı immün assay (ELISA) yönteminin kullanıldığı kitler de üretmektedir.^[14] "5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III" ELISA temelli bir kittir ve 96 kuyulu mikropak ile kullanılmaktadır. Doksan altı kuyulu plak ile çalışıldığı için aynı anda çok sayıda örnek ile çalışılabilmesine izin veren bir yöntemdir, doğruluğu ve hassasiyetinin ³H timidin ile aynı düzeyde olduğu gösterilmiştir.^[14] Standart ELISA okuyucu ile absorbans ölçülmekte ve bir kit ile 1000 test yapılabilir.^[14]

Roche firmasının ELISA temelli kemilunesans ve kolorimetrik ölçüme dayanan iki farklı proliferasyon kiti daha vardır. "Cell Proliferation ELISA BrdU Kemiluminesans Kiti", Kit III gibi ELISA temelli bir yöntemdir. Emisyonların ölçümü için çoklu kuyulu bir luminometer (luminesans ELISA okuyucu) ve özel plak gerekmektedir.^[15] Kolorimetrik kit, standart plak ve standart ELISA okuyucu ile kullanılabilir.^[16]

ELISA temelli her üç Roche proliferasyon kitini karşılaştırdığımızda, Kit III'de anti BrdU uygulamasından önce BrdU işaretlenmiş DNA nükleaz ile muamele edilir, kolorimetrik ve kemiluminesans kitlerde ise aynı aşamada DNA fix-denat ile denature edilmektedir.^[14-16] Kemiluminesans yöntemin diğerlerine göre en önemli dezavantajı luminesans ELISA okuyucu ve özel plak (plate) gerektirmesidir. Bunlara ek olarak, kemiluminesans ve kolorimetrik kitlerde her lotun fonksiyonu master lota göre kontrol edilmiştir.^[15,16]

Perkin Elmer firmasının (Perkin Elmer Sağlık ve Çevre Bilimleri, İstanbul Türkiye) Delfia RUO (sadece araştırma amaçlı) hücre proliferasyon kitlerinde yeni sentezlenen DNA zincirlerine katılan BrdU, Europium (Eu) konjuge monoklonal antikor ile bağlanır, sonra ilave edilen indükleyici ile ayrışan olan Eu iyonları etkileşerek kuvvetli floresan verir, plağın okunabilmesi için "Time resolved floresans" özellikli bir plak okuyucu gerekmektedir.^[17] Bir ila beş gün süren hücre kültüründen (37 °C'de) sonra BrdU işaretleme (37 °C'de) 2-24 saat içerisinde gerçekleştirilebilmektedir, protokol toplam süresi ise 28 saati bulabilmektedir.^[17] Elde edilen sinyal, eksitasyon-emisyon dalga boyu farkı ve emisyon pikinin darlığı ile sinyal/gürültü oranını artırır. Ek olarak, spesifik bağlanma sonucu oluşan sinyalin ömrü arka plan floresandan daha uzun ömürlüdür.^[18] Eu DNA problemlerinde da kullanılmaktadır.^[19]

Merck Milipore firması (Merck İlaç Ecza ve Kimya, İstanbul Türkiye) immünohistokimyasal boyama ve ELISA temelli "BrdU IHC Kit", "BrdU Cell Proliferation Kit" adlı 2 farklı BrdU kiti üretmektedir ve her iki kit de RUO kategorisindedir. Proliferasyon kitinde BrdU inkübasyon süresi 2-24 saat, toplam protokol süresi 27 saat kadar sürmektedir.^[20]

Becton Dickinson (BD) firmasının (Becton Dickinson, İstanbul Türkiye) Pharmingen markası altındaki “FITC BrdU flow kit” akan hücre ölçer (flow cytometry) kiti de akan hücre ölçer kullanan laboratuvarlar için uygun bir alternatif sunmaktadır, kitin RUO kategorisinde olduğu unutulmamalıdır.^[21] Mevcut kitte BrdU’ya ek olarak total DNA’ya bağlanan aminoaktinomisin D (7-AAD) boyası kullanılmaktadır, böylece iki renkli akan hücre ölçer analizi yapılarak aktif olarak DNA sentezleyen (BrdU içeren DNA) hücreler hücre döngüsünde yer aldıkları aşamaya (G₀/G₁, G₂/M, S) göre sayılabilmekte ve sınıflandırılabilir.^[22] Uzatılmış BrdU uygulaması ile aktif olarak bölünme döngüsünde olan hücreler ile döngüde olmayanlar ayrılabilir, farklı zamanlarda BrdU işaretleme yapılarak kinetik araştırma yapılabilir.^[22] Akan hücre ölçer kiti DNA denatürasyon işlemi gerektirmedikinden, eş zamanlı olarak farklı antikolar kullanılarak sitokinler gibi başka moleküllerin de akan hücre ölçer ile analizi yapılabilmektedir.^[22] *In vitro* hücre kültüründe kullanılabileceği gibi, BrdU enjeksiyon ya da içecek karıştırılmak sureti ile *in vivo* çalışmalarda da kullanılabilir.^[22] Protokol üç saat kadar sürmektedir. Becton Dickinson “BrdU *in situ* Detection Kit” kullanıldığında, *in situ* sonuç alınabilmektedir. İmmünohistokimyasal amaçlı kit ile dondurulmuş ve parafinlenmiş doku kesitleri ile veya kültüre edilmiş ve izole edilmiş hücreler lam üzerine yayılarak çalışılabilir.^[23] Kitin en önemli avantajı doku morfolojisine zarar vermeden, doku kesiti alımı sırasında oluşan çapraz protein bağlarını kıran BD Retrivate A çözeltisi içermesidir.^[23]

³H timidin radyonükleotid ile çalışabilmek için özel laboratuvar şartları gerekmekte ve radyoaktif atıkların uzaklaştırılması gerekliliği sorun teşkil etmektedir. Buna karşın, Perkin Elmer firmasının NEN ticari ismi altında kullanıma sunmuş olduğu ³H timidin ürünleri bulunmaktadır.^[24] Ek olarak literatürde, ³H timidin radyonükleotidlerin hücrede DNA sentezini önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir,^[25] ancak bu durumun da hatalı sonuçlara neden olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

EdU timidin analoglarının kullanımı esaslı ticari kitler

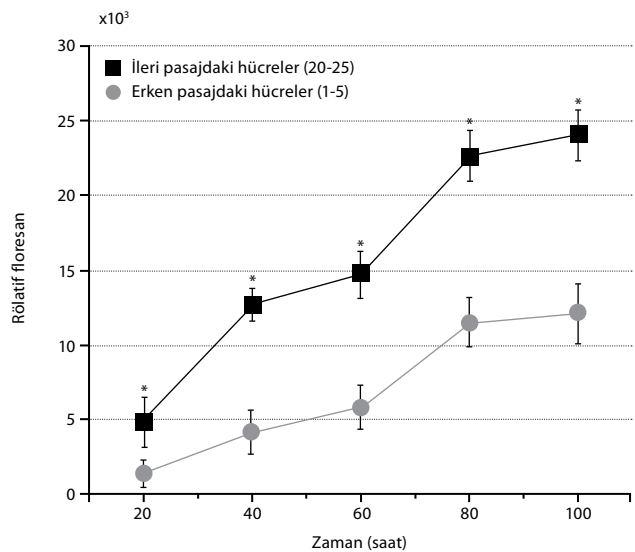
Invitrogen firması (Invitrogen, New York, USA) “ClickIT” hücre proliferasyon kitlerinde BrdU’ya alternatif bir timidin analogu olan EdU AlexaFluor 488, AlexaFluor 647 veya Pacific Blue boya ile konjuge olarak kullanılmaktadır, EdU kullanımında antikor gerektirmediği için BrdU temelli yöntemlerin aksine DNA’nın denatüre edilmesi gerekmemektedir.^[26] Böylece daha az adımda ve daha kısa sürede yeni sentezlenen DNA üzerinden hücre proliferasyonu analiz edilebilmektedir.^[27] Click-iT® EdU kitlerinin floresan mikroskop, akan hücre

ölçer ve yeşil floresan Oregon Green kullanılan mikrop-lak formunda seçenekleri vardır.^[27]

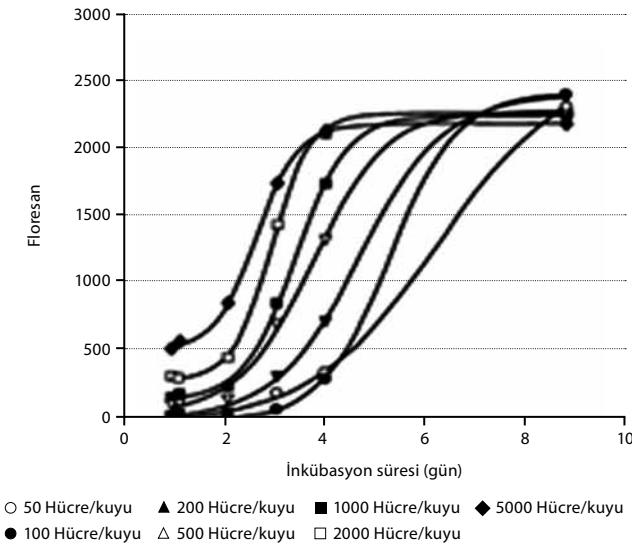
Diğer ticari kitler

Invitrogen firmasının “CyQUANT® NF Cell Proliferation Assay Kit” ve “CyQUANT® Direct Cell Proliferation Assay” olmak üzere iki farklı DNA boyanması temelli proliferasyon kiti vardır. Bu kitlerin en önemli özelliği mikrop-lakta 30-60 dakikalık kısa bir inkübasyon süresi sonrası ölçümlerin (480/520 nm) yapılabilmesidir. Antikor, enzim v.b ek işlem gerektirmeyen bu kitlerden NF hücre proliferasyon kitinde hücre permeabilitesini sağlama özelliği DNA boyasına entegre edilmiştir. NF hücre proliferasyon kitinde yapılması gereken tek ek işlem adherent kültürler ile çalışıldığında, kültür ortamının aspire edilmesidir. NF hücre proliferasyon kiti 200 ve 1000 testlik olmak üzere iki farklı ticari şekilde temin edilebilmektedir.^[28] NF hücre proliferasyon kiti ile yapılan örnek çalışma sonuçları Şekil 2’de verilmiştir.^[29]

Invitrogen “CyQUANT® Direct Cell Proliferation” RUO kitini NF kiti ile karşılaştırdığımızda, kitin içine bir bloklayıcı DNA boyasının eklendiğini görmekteyiz, esas DNA boyası canlı hücrelerin zarlarından geçebilir iken, bloklayıcı DNA boyası hücre zarından geçememektedir.^[30] Dolayısı ile bloklayıcı kullanılarak, esas DNA boyasının sadece canlı hücrelerin DNA’sına bağlanması ve bağlanma özgüllüğü sağlanmış olur. Sitotoksikite çalışılacak ise CyQUANT® uygulanmadan önce hücrelerin 24-96 saat test bileşenleri ile inkübe edilmesi gerekir.^[30] CyQUANT® ile elde edilmiş örnek büyüme eğrileri Şekil 3’de gösterilmiştir.^[31]



Şekil 2. CyQUANT® NF kiti ile kemik iliği mononükleer hücre kaynaklı Schwann hücrelerinin büyüme hızlarının pasajlarına göre karşılaştırılması. * Anlamlı fark.^[29]

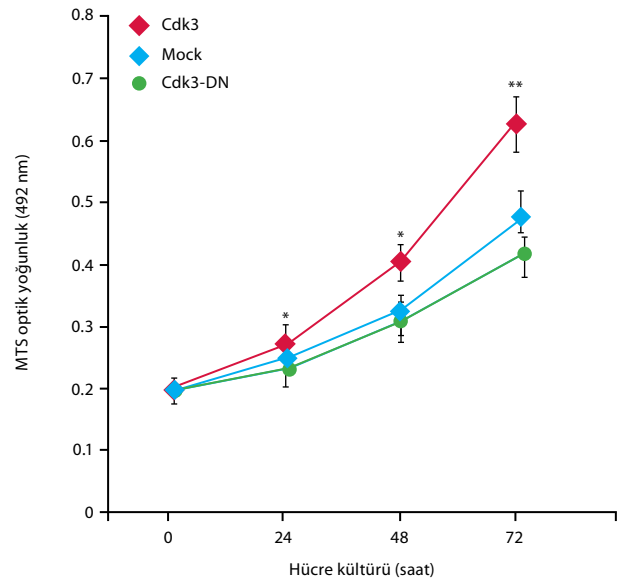


Şekil 3. CyQUANT® kiti ile elde edilmiş örnek büyüme eğrileri, her eğri başlangıçta farklı sayıda çıkan bazofilik lösemi hücresi ile yapılmış ekim ile elde edilmiştir.^[31]

METABOLİK AKTİVİTENİN ÖLÇÜMÜNE DAYALI TESTLER

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT), 2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (XTT), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS), 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum (WST1) gibi tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. Çalışma prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (MTT: sarı, WST1: kırmızı) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır.^[32,33] Tetrazolyum türlerini karşılaştırdığımızda en iyi alternatif WST1 gibi görünmektedir, diğer tuzlara göre daha verimli tüketilmekte ve daha çabuk renk değişimi göstermektedir.^[32] XTT kullanımı tercih edildiğinde XTT'nin hücreler tarafından yavaş indirgenişi ve ekstra faktörlerin ilave edilmesi gerekebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.^[32] MTT ise kültür ortamında çözünmez ve ek olarak indirgenme ürünlerini çözmek için dimetil sülfoksit (DMSO) gibi çözücülerin kullanılmasını gerektirir.^[32]

MTT türevlerini kullanan kitlerin dışında violet, alamar mavisi ve karboksifloresan süksinimidil ester (CFSE) kullanan metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı proliferasyon kitleri de vardır.



Şekil 4. Transfekte hücrelerle yapılmış örnek MTS testi grafiği.^[38]
* p<0.05, ** p<0.001.

MTT türevi kullanan ticari proliferasyon kitleri

Roche firmasının "Cell Proliferation Kit I (MTT)", "Cell Proliferation Kit II (XTT)", "Cell Proliferation Reagent (WST-1)" olmak üzere tetrazolyum temelli üç farklı kiti vardır. XTT ve WST1 kitlelerinde elektron eşleyici reaktif bulunmaktadır, bu iki kitten farklı olarak MTT'nin kit içeriğinde elektron eşleyici ajan bulunmaz ve tetrazolyum çözünmemiş halde çözücüsü ile beraber gelmektedir.^[34-36] Doksan altı mikrokuyucuklu plakta büyütülen (24-96 saat, 37 °C) hücrelerin işaretleme "labeling" çözeltisindeki inkübasyon (%5 CO₂, 37 °C) süreleri karşılaştırıldığında WST1 30 dakika ile 4 saat, MTT yaklaşık 4 saat ve XTT için inkübasyon süresi 2 ile 20 saat arasındadır. Her üç ürün de 2500 test kadar kullanılabilirlikle birlikte, XTT kit 800 testlik kit olarak da temin edilebilmektedir.^[34-36]

Promega firmasının (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) "CellTiter96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)" kolorimetrik kitinde tetrazolyum (MTS), elektron eşleyici reaktif olarak kimyasal stabiliteyi artıran fenazin etasülfat ile bir arada gelmektedir, işaretleme inkübasyonu (%5 CO₂, 37 °C)'de 1-4 saat sürmektedir ve ölçümler 490 nm dalga boyunda yapılmaktadır.^[37] Örnek grafik Şekil 4'de verilmiştir.^[38]

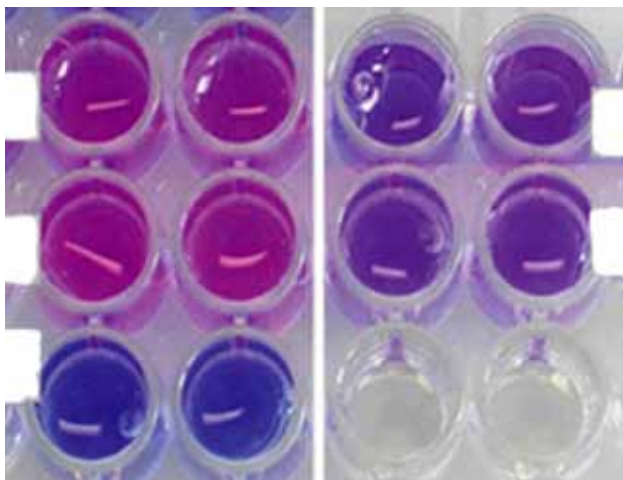
Clontech (Clontech Laboratories, Inc, California, USA) "WST-1 Cell Proliferation Assay Kiti" ya da Biovision (BioVision, Inc, California, USA) "Ready-to-use Cell Proliferation Reagent, WST-1" gibi farklı firmaların benzer kitleri de vardır.^[39,40] Her iki kit de tetrazolyum ile inkübasyon (37 °C'de 30 dakika ile 4 saat) öncesi plakta 24-96 saat kültür gerektirir.

Invitrogen “Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit”, sadece mikropalak absorban okuyucu (570 nm) gerektiren kalorimetrik ölçüme dayalı bir kittedir.^[41] Genelde MTT inkübasyonundan önce hücreler, kuyucuklarda 5000-10000 hücre olacak şekilde plaklara ekilir ve 48-72 saat kültür yapılır. MTT inkübasyon süresi 37 °C’de dört saattir.^[41]

Metabolik aktivite ölçümüne dayalı diğer ticari proliferasyon kitleri

Invitrogen “CellTrace Violet Cell Proliferation Kit” (180 testlik), akan hücre ölçer ile kullanılmaktadır.^[40] Violet stok solüsyonu dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözüldükten sonra hücreler ile oda sıcaklığında (T ve B hücreleri için optimize edilmiş olan protokolde) 20 dakika inkübe edilerek boyanma sağlanır, yıkamalar ve okuma öncesi inkübasyon süresi toplamı bir saatten daha kısa sürmektedir.^[42] Violet hücre zarından kolaylıkla geçer, hücre içinde esterazlar tarafından kesilerek floresan ışımaya Eksitasyon/Emisyon (Eks./Em.: 405/450 nm) yayan bileşenler oluşturur ve hücre içindeki aminlere bağlanır, bağlanmayanlar difüzyon yolu ile hücre dışına çıkar ve yıkama ile kolayca uzaklaştırılır.^[42]

Invitrogen “Alamar Blue Assay”ın aktif bileşeni hücre zarından geçebilen ve toksik olmayan mavi renkli, floresan özellik göstermeyen resazurindir, resazurin hücre içine girdikten sonra kuvvetli kırmızı floresan veren resofurine indirgenir.^[43] Floresan Eks./Em.: 560/590 nm, absorban ise 570 nm dalga boyunda ölçülebilir. Çoklu kuyucuklu plaka ekilen hücreler (genelde 10000 hücre/ml),^[44] reaktif ekledikten sonra 37 °C’de 1-4 saat inkübe edilir ve ardından ölçüm alınır. Literatürde Alamar mavisi testinin, MTT testine göre daha hassas ve performanslı olduğu gösterilmiştir.^[45] Abcam “Cell Proliferation Assay Kit



Şekil 5. Alamar mavisinin indirgenmesi ile medyumdaki rengin maviden (okside) pembeye (indirgenmiş) dönüşümü.^[47]

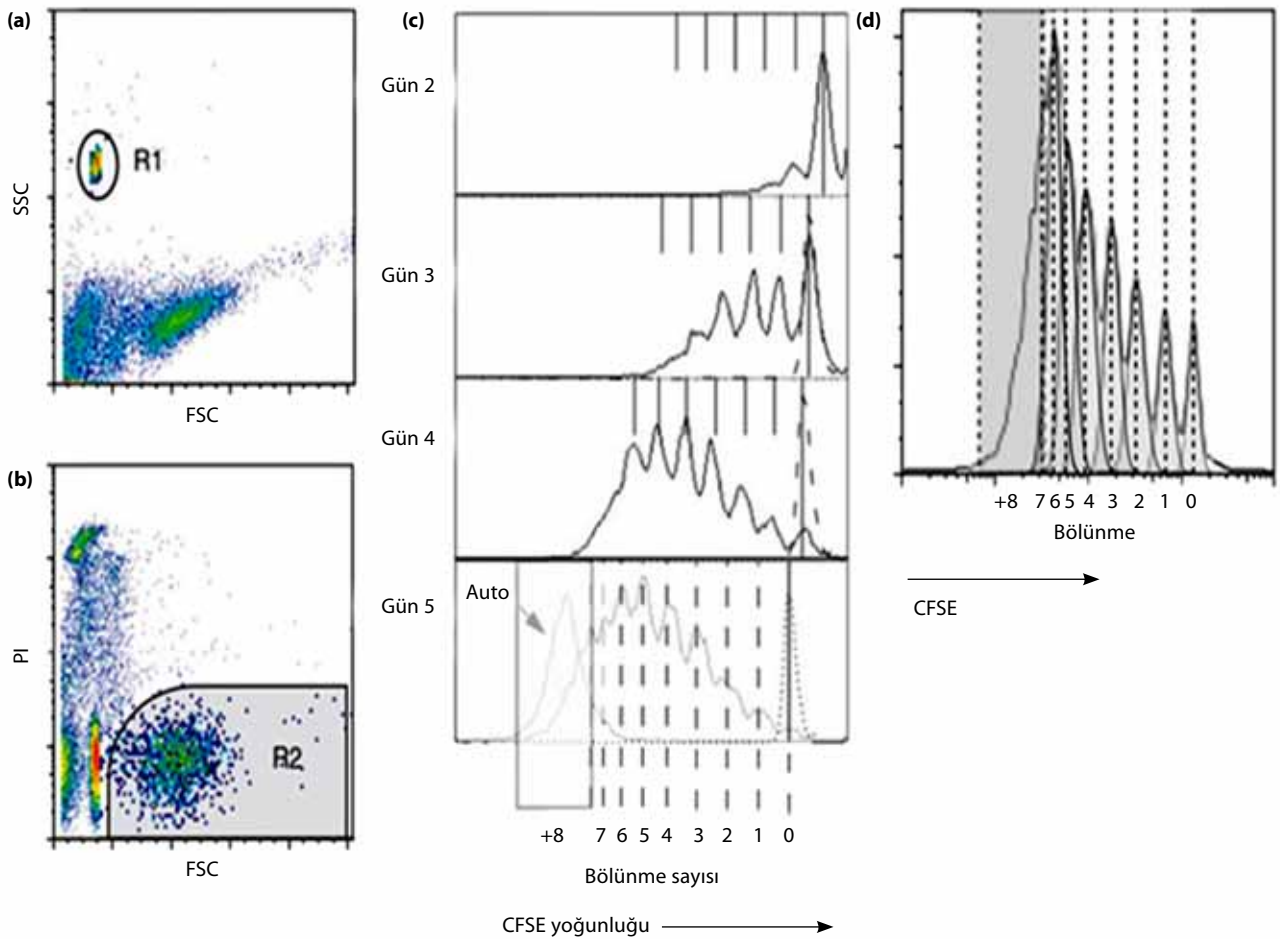
(Fluorometric-Blue)” kiti de aynı şekilde kullanılabilir, fakat hassasiyeti daha düşüktür.^[46] Alamar mavisi testinde görülen renk değişimi Şekil 5’de gösterilmiştir.^[47]

Bu saydığımız kitlere ek olarak CFSE kitleri de bulunmaktadır. CFSE, floresan ve süksinimid fonksiyonel grup olmak üzere iki gruptan oluşur. Karboksifloresan süksinimidil ester hücre zarından geçebilir, hücre içine girdikten sonra esteraz aktivitesi ile floresan grubun asetatları kesilir, sonuç olarak floresan ışımaya ortaya çıkar, fakat hücre zarından geçebilme özelliği yitirir.^[48] Akan hücre ölçer için Invitrogen “CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit” (Eks./Em.: 492/517 nm), Floresan mikroskop için Abcam “CFSE Cell Labeling Kit”, eBioscience CFSE hücre proliferasyon kitleri bulunmaktadır.^[49-51] CFSE kullanılarak hücreler 10 nesile kadar izlenebilmektedir (Şekil 6).^[52]

eBioscience firmasının (eBioscience, Inc. California, USA) sunduğu eFluor 670, hücre içindeki proteinlerin aminlerine bağlanır ve her bölünme ile yavru hücrelere geçer, bazı çalışmalarda dokuz nesile kadar takip edilebilmiş ise de üreticisine göre altı nesile kadar hücrelerin takip edilmesine izin vermektedir,^[53] eksitasyonu için kırmızı lazer gerekmektedir, yüksek dalga boyunda emisyon oluşturduğu için CFSE’nin aksine floresan izotiyosiyanat (FITC) kanalındaki diğer boyalar ile sinyal karışmalarının önüne geçilebilir.^[54] Pik ayırımının CFSE ve Violetteki kadar net olmadığı unutulmamalıdır, örnek proliferasyon grafiği Şekil 7’de gösterilmiştir.^[53]

PROLİFERASYON İŞARETÇİLERİNİN HÜCRELERDE BELİRLENMESİNE DAYALI TESTLER

Hücre proliferasyon sürecinde hücrelerde bazı özel antijenler görülür, bu antijenler proliferasyon yapan hücrelerde görülmemektedir. Histon H3’ün 10. konumdaki serin aminoasidi üzerinden fosforillenmesi, bölünme esnasındaki kromozom yoğunlaşması ile kuvvetli korelasyon göstermektedir.^[55] Prolifere hücre çekirdek antijeni (PCNA) ekspresyonu üzerinden hücrelerin bölünme döngüsündeki konumları belirlenebilir, PCNA ekspresyonu G fazında artıp, DNA’nın ikilendiği S fazında maksimuma ulaşır iken, bölünmenin M evresine geçiş sırasında PCNA ekspresyonunda düşüş görülür.^[56] Benzer şekilde, Ki67 ekspresyonu hücre bölünmesi ile sınırlı olan bir nükleer proteindir.^[57] Aynı şekilde Aurora A, B ve C serin treonin kinaz gibi işaretçilerin hücredeki miktarı G₂/M fazında belirgin şekilde artmaktadır, böylece bu işaretçilere bakılarak hücrenin bulunduğu bölünme fazı ya da aşaması belirlenebilir. Aurora kinaz A, mitotik iğ oluşumunun düzenlenmesinde ve sentrozomun yapısal oluşumunda görev alır ve tümör hücrelerinde aşırı ekspresyonu görülür,



Şekil 6. Örnek CFSE akan hücre ölçer sonucu (a) R1 kapısı boncukların konumunu gösterir. (b) Propidyum iyodür (PI)/FSC grafiğinden ölü hücreler ayrılır. R2 kapısı canlı lenfositleri göstermektedir. (c) uyarılmış T hücrelerin zamana göre CFSE grafiği, (d) R2 kapısına göre CFSE profili.^[52] CFSE: Karboksifloresan süksinimidil ester.

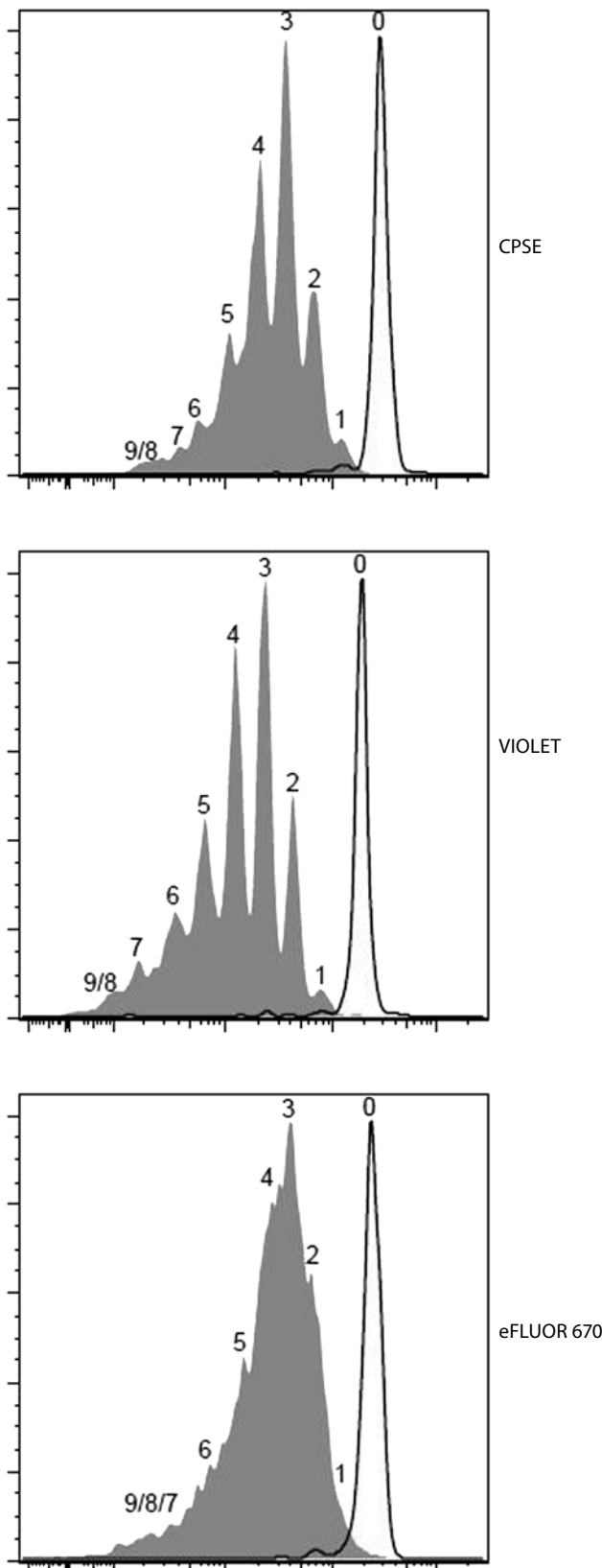
Aurora B kromozomların ayrılmasında kinetokor mikrotübül bağlantısını düzenleyerek görev alır, Aurora C ekspresyonu ise kanserli hücrelerde ve eşey hücrelerinde görülür.^[58-60] Buna göre, Ki-67, PCNA, fosfohiston H3, topoisomerase IIB ya da Aurora kinaz gibi proliferasyon spesifik işaretçilere özgün antikorlar kullanılarak hücre döngüsü incelenebilir.

Proliferasyon işaretçilerinin hücrelerde belirlenmesine dayalı ticari proliferasyon kitleri

Günümüzde Abcam firması (Abcam®, Cambridge, UK) gibi bazı firmalar fare, sıçan ve insan PCNA, Ki-67, topoisomerase IIB spesifik immünohistokimyasal boyama, western blot, ELISA ve akan hücre ölçerlerde kullanıma uygun monoklonal ve poliklonal antikorları üretmektedirler.^[61] Söz konusu klinik çalışma olduğunda, Roche bünyesindeki Ventana (Ventana Medical Systems, Inc. Arizona, USA) ya da Cell Marque (Cell Marque Corporation, California, USA) gibi firmalar immünohistokimyasal boyamada kullanılacak *in vitro* tanı (IVD) düzeyinde insan Ki-67, fosfohis-

ton H3 antikorları üretmektedirler.^[62,63] Akan hücre ölçer için analit spesifik reaktif (ASR) Ki-67 antikorunu Invitrogen firmasından temin edilebilmektedir.^[64] Aynı şekilde, immünohistokimyasal boyamada kullanılacak insan PCNA IVD antikorları Epitomics, ThermoScientific gibi firmalardan^[65,66] akan hücre ölçerde kullanılacak insan IVD PCNA antikorunu ise Invitrogen firmasından temin edilebilmektedir.^[67]

Invitrogen "PCNA staining kit" biotin ile işaretlenmiş monoklonal PCNA antikorunu kullanıldığı için türe özgü sekonder antikor gerektirmez ve fare, sıçan ve tavşanda çapraz etkileşim görülmez. Kromojen olarak kullanılan 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), PCNA içeren çekirdekleri kahverengiye boyar. Parafinlenmiş dokular, kültüre hücreler ve hücre süspansiyonları için kullanılacak immünohistokimyasal bir testtir, parafinlenmiş dokular için protokol dört saat kadar sürebilir iken, hücre kültürleri ve süspansiyonları için 100 dakika kadar sürmektedir.^[68] Örnek boyama Şekil 8'de verilmiştir.^[69]



Şekil 7. Akan hücre ölçerde lenfoponik farelere transfer edilen CD8+ T hücreler için üç farklı proliferasyon boyası kullanılarak elde edilen proliferasyon eğrileri.^[53]

Roche "Phosphohiston H3 Imaging Kit" kitinde AlexaFluor 488 konjuge fare anti insan fosfohiston H3 (Eks./maks.: 495 nm, Em./maks.: 519 nm) antikor kullanılır, ek olarak bütün hücrelerin sayısını belirleyebilmek amacı ile çekirdeği boyayan (Eks./maks.: 361 nm, Em./maks.: 486 nm) bir floresan boya kullanılır.^[70] Ölçümler floresan mikroskop veya 96 kuyucuklu plak için taramayı üç dakika içerisinde tamamlayabilen Roche Cellavista^[71] otomasyon sistemi ile yapılır. Kit ile 5x96 test yapılabilir ve 96 plak için yaklaşık 90 dakika sürmektedir.^[70] Örnek boyama Şekil 9'da verilmiştir.^[70]

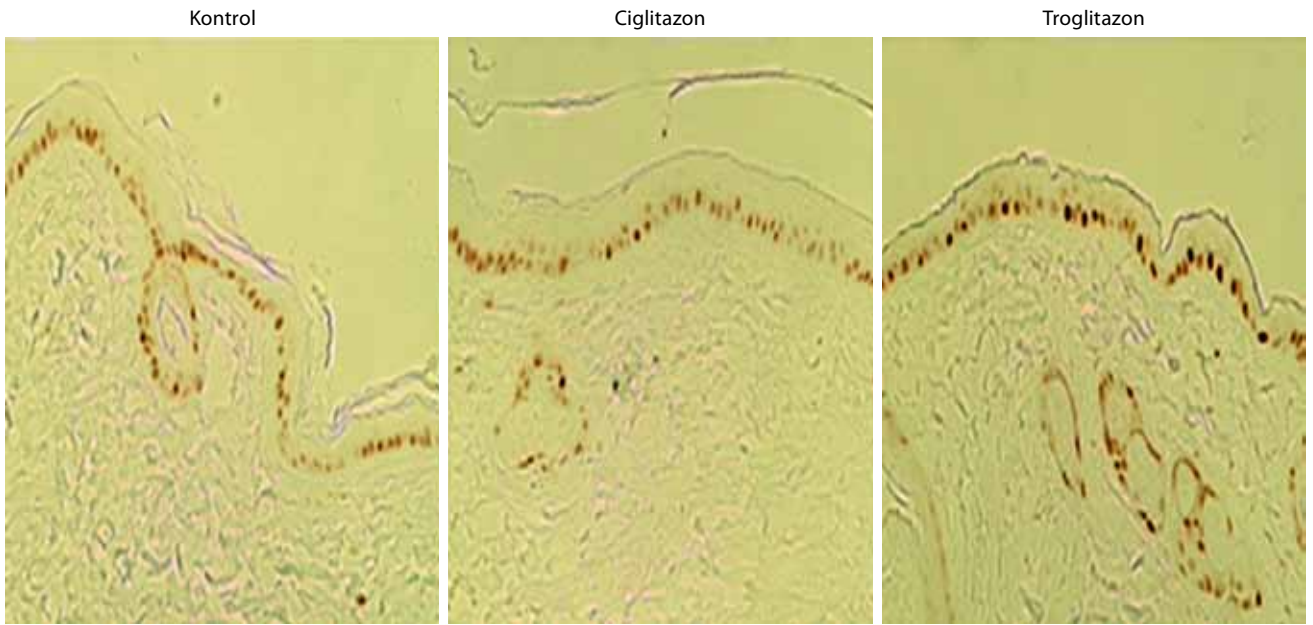
Aurora A, B, C üzerinden proliferasyon çalışmak istenildiğinde Life Technologies firmasının (Life Technologies Corporation, New York, USA) insan örnekleri ile çalışmaya imkan veren Aurora antikor örneklemesi ile detaylı bir çalışma yapmak mümkündür,^[72] kit iki farklı Aurora A antikorunu içermektedir, antikorlardan biri hücre içerisindeki toplam Aurora A miktarını belirler iken diğer Aurora A antikorunu ise sadece Thr288'den fosforillenmiş aktif formdaki Aurora A'ya bağlanmaktadır.^[73,74] Aurora B antikorunu hücre içerisindeki toplam Aurora B miktarını belirlemek için kullanılır.^[75] Ek olarak Aurora A, B ve C'nin fosforillenmiş aktif formlarını bir arada çalışabilmek için sırası ile Thr288, Thr232 ve Thr198 fosforillenmeleri durumunda bağlanan bir antikor seti de sunulmaktadır.^[76] Antikorlar farklı oranlarda dilüe edilerek akan hücre ölçer, western blot vb. gibi farklı uygulamalar için kullanılabilir, antikorların boya (florokrom) konjugasyonu yapılmıştır, ikincil, antikor kullanımı gerekmektedir. Western blot'lama için yaban turbu peroksidaz bağlı IgG kite dahil edilmiştir.^[77]

HÜCRELERDEKİ ATP MİKTARININ ÖLÇÜMÜNE DAYALI TESTLER

Hücre içerisindeki ATP miktarının ölçülmesi ile hücre proliferasyonu tayin edilebilir, proliferatif hücrelerde ATP biyosentezindeki (bioluminesans) artış, yeni DNA zinciri sentezleyen proliferatif hücreler tarafından kullanılan ³H timidin miktarı ile korelasyon göstermektedir (Şekil 10).^[78]

Adenozin trifosfat ölçümüne dayalı ticari proliferasyon kitleri

Perkin Elmer firması, ATP ölçümüne dayalı proliferasyon testlerini araştırmacılara sunmaktadır.^[79] Test uygulanır iken lusiferin ve lusiferini oksitleyen lusiferaz (Photinus pyralis) enzimi eklenir, lusiferaz enzimi bu oksidasyon işlemi için ATP kullanmaktadır, dolayısı ile lusiferinin oksidasyonu sırasında ortaya çıkan ışımının (luminesans) düzeyi ölçüldüğünde, bu düzey hücredeki ATP miktarı ile paralellik gösterecektir.^[79]

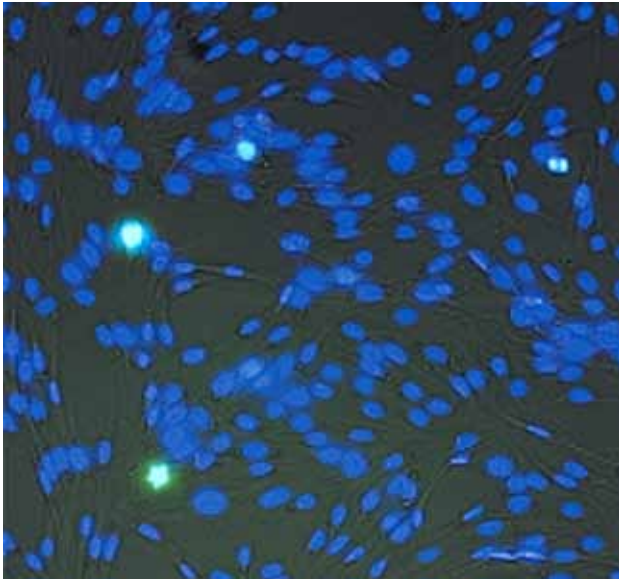


Şekil 8. Prolifere hücre çekirdek antijen boyama ile peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör gama aktivatörlerin epidermal proliferasyon ve apoptoz üzerine etkisinin gösterimi (Farede).^[69]

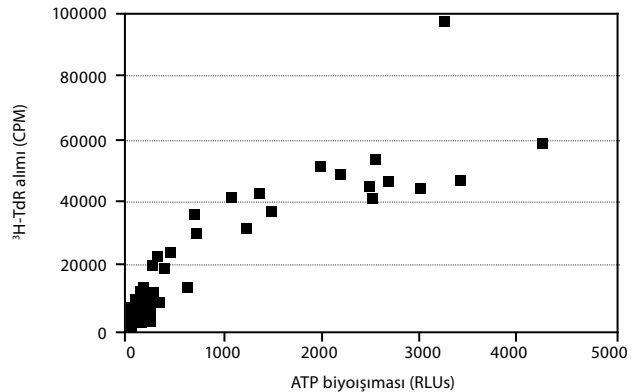
Perkin Elmer “ATPLite” ve “ATPLiteStep” kitleri bu düşünce üzerine tasarlanmıştır. Santrifüj, ayırma gerektirmeyen ve kısa sürede sonuç alınan bir yöntem olmasına rağmen ışın yarı ömrünün ATPLite için beş saat olduğu unutulmamalıdır, aynı şekilde tek adımlık kit için ışın ilk 30 dakika içerisinde %15 azalmaktadır.^[79,80] Biotium (Biotium Inc. New York, USA) gibi bazı firmaların “ATP-GloBioluminescent Cell Viability Assay Kit” ismi ile satışa sundukları aynı mekanizma üzerine kurulu testleri vardır. Biotium kiti 1000 teste kadar kullanılabilir.

mektedir ve ölçüm için luminometer gerektirmektedir, kit ile minimum 0.01 pikomol kadar olan ATP miktarları tespit edilebilmektedir, fakat luminesans stabilitesi bir dakika ile sınırlıdır.^[81] Benzer şekilde, Invitrogen firması da 0.1 pikomol kadar ATP’yi tespit edebilen (560 nm, pH7.8) “ATP Determination Kit” isimli kiti 200-1000 deneylik paketler halinde satışa sunmuştur.^[82] Roche kitleri kullanım amacına göre tercih edilmelidir, eğer uzun süreli stabil luminesans almak ve kolay kullanım isteniliyorsa “ATP Bioluminescent Assay CLS II Kit”, daha düşük miktarlardaki ATP tespit edilmek isteniyorsa “HS II” kiti kullanılmalıdır.^[83,84]

Lusiferazın aktivitesini hızla kaybetmesi nedeniyle Biovision firması, “Staybrite Highly Stable



Şekil 9. Maviler hücre çekirdekleri iken parlak yeşil görülenler bölünmekte olan hücrelerdir.^[70]



Şekil 10. Hücrelerin timidin kullanımı ile adenozin trifosfat biyoışması arasındaki ilişki.^[78] CPM: Dakika başına sayım; ³H-TdR: Trityumlu timidin; ATP: Adenozin trifosfat.

ATP Assay kit” adlı kitinde Photinus pyralis yerine Diaphanes pectinealis türü ateş böceklerinin genetik olarak modifiye edilen rLucHS lusiferazını kullanmaktadır.^[85] Böylece pH 8.2 altında oda sıcaklığında 10 saat, 37 °C’de ise 60 dakika kadar stabil luminesans sağlandığı belirtilmektedir.^[85] Kitler 100 ve 1000 testlik olarak iki ticari şekilde bulunmaktadır ve basit protokol 20-30 dakika kadar sürmektedir, hücre ve doku kültürü homojenatlarında 10 femtomole kadar olan ATP miktarları tespit edilebilmektedir.^[85] Biovision firmasının “ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit” kiti ise hücre-doku lizatları, kültür mediyumu, idrar, plazma ve serum gibi biyolojik sıvılarda 50 pikomole kadar olan ATP miktarlarını tespit edebilmektedir ve basit deney işlemi bir saatten daha kısa sürmektedir.^[86] Lusiferaz kullanılmadığı için stabilite sorunu yoktur. Absorbans (570 nm) veya Floresans (Eks./Em.: 535/587 nm)’de ölçülür.^[86]

SONUÇ VE TARTIŞMA

Sonuç olarak, dört ana başlık altında topladığımız hücre proliferasyon kitlerini, metabolizma ve ATP ölçümüne dayalı daha dolaylı yoldan hücre proliferasyonu hakkında bilgi veren kitler ve bölünmede görev alan proliferasyon işaretleyicilerinin ve yeni sentezlenen

DNA’nın ölçülmesi üzerinden proliferasyon ile ilgili daha doğrudan bilgi veren kitler olmak üzere ikiye ayırabiliriz.

Kit tercihi yapılır iken ilk olarak araştırmanın hedefleri belirlenmeli, araştırmada proliferasyon hücrelerin doku kesitindeki yeri tespit edilmek isteniyor ise immünohistokimyasal kitler tercih edilmelidir. Proliferasyon işaretçileri için antikor kullanılacak ise antikor bağlanma ve tür özgüllüğüne dikkat edilmelidir. Çalışmanın *in vivo* ya da *in vitro* olacağı, *in situ* sonucun gerekip gerekmediği göz önünde bulundurulmalıdır. Örnek sayısı kit seçiminde bir diğer önemli kriterdir, örnek sayısı fazla ise çoklu kuyulu plaklara dayalı yöntemlerin tercih edilmesi önerilebilir. Akan hücre ölçerlerde tek tüpte çok renkli çalışılacak ise çalışmada kullanılacak olan diğer antikorların floresan kanalları dikkate alınmalıdır. Bunlardan da önce kit seçimi yapılır iken laboratuvarın teknik olanakları ve maliyet de göz önünde bulundurulmalıdır. Örnek olarak laboratuvarında luminometre mevcut değil ise lusiferaz aktivitesine dayalı bir kiti, akan hücre ölçer mevcut değil ise akan hücre ölçer için üretilmiş bir kiti tercih etmek, cihaz alımını gerektireceğinden büyük artı maliyete neden olacaktır. Bu neden ile ekte verilmiş olan karşılaştırmalı tabloların araştırmacılara kit seçiminde birçok yönden yardımcı olacağını düşünüyoruz.

EK-1

Deoksiribonükleik asit sentezi temelli ticari hücre proliferasyon kiti

Kit (DNA sentez)	Kullanım kolaylığı-zorluğu	Performans hassasiyet	Test sayısı/kit	Maliyet *, **, ***
BD BrdU <i>In situ</i> Detection Kit	Fare dokusunda sekonder antikor gerekli değil. <i>In situ</i> sonuç verir. <i>In vivo, in vitro</i> .	İçerdiği Retrieven A çözeltisi parafinize doku kesitlerinin morfolojisini bozmadan çapraz protein bağlarını kırarak antikor bağlanmasını kolaylaştırır.	50 test	-
Roche5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I	Floresans mikroskobu gerektirir. <i>In situ</i> sonuç verir. Sekonder antikor kullanımını gerektirir. DNA denatürasyonu gerekir. <i>In vivo ve in vitro</i>	Hızlı (30 dakika BrdU inkübasyonu) İçerdiği spesifik nükleazlar ile hücre yapısını, morfolojisini bozmadan antikorun bağlanması sağlanır.	100 test	C
Roche5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II	Işık mikroskobu yeterlidir. <i>In situ</i> sonuç verir. Sekonder antikor kullanımını gerektirir. DNA denatürasyonu gerektirir. <i>In vivo ve in vitro</i>	Hızlı (30 dakika BrdU inkübasyonu) İçerdiği spesifik nükleazlar ile hücre yapısını, morfolojisini bozmadan antikorun bağlanması sağlanır.	100 test	C
Roche Insitu FLUOS Cell Proliferation Kit	Floresan mikroskobu ya da akan hücre ölçer ile kullanılır. <i>In situ</i> sonuç verir. Sekonder antikor kullanımını gerektirmez. DNA denatürasyonu gerektirir. <i>In vivo ve in vitro</i>	Hızlı (30 dakika BrdU inkübasyonu) Sekonder antikor gerektirmedikinden daha hızlıdır. Denatürasyon için HCl kullanıldığı için morfoloji bozulur.	100 test	D
Roche5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III	Standart ELISA okuyucu ve çoklu kuyulu plak gerektirir. Hücre popülasyonu için sonuç verir. DNA denatürasyonu gerektirir.	Aynı anda çok sayıda örnek ile çalışılmasına izin verir. Sonuçlar ve hassasiyet ³ H timidin ile korelasyon gösterir.	1000 test	D
RocheCell Proliferation ELISA BrdU Kemilüminesans Kiti	Lüminesans ELISA okuyucu ve özel plak gerektirir. Hücre popülasyonu için sonuç verir. DNA denatürasyonu gerekir.		1000 test	D
RocheCell Proliferation ELISA BrdU Kalorimetrik Kiti	Standart ELISA okuyucu ve plak gerektirir. Hücre popülasyonu için sonuç verir. DNA denatürasyonu gerekir. Çoklu örnekle çalışma		1000 test	D
Perkin Elmer Delfia Proliferasyon Kiti	Time resolved floresan özellikli bir ölçer gerektirir. BrdU temelli. DNA denatürasyonu gerektirir. Çoklu örnek ile çalışma. Sekonder antikor gerektirmez.	Yüksek hassasiyetli, femtogram düzeyde Uzun ömürlü sinyal Sinyalin gürültüye oranı yüksek	10x96	C
Merck Milipore BrdU IHC Kit	Parafin kesit almayı gerektirir. <i>In vitro</i> . BrdU kit içinde mevcut değildir. Sekonder antikor gerektirmez.		50 ea	B
Merck Milipore BrdU Cell Proliferation Kit	Sekonder antikor gerektirir. <i>In vitro</i> . BrdU kit içinde gelmektedir. 450-540, 450-595 dalgaboyunda çalışan ya da tek 450 nm dalgaboyu için filtresi olan 96 mikrokuyulu plak okuyucu gerektirir.		1000 test 200 test	C B
BD FITC BrdU flow kit	488 nm lazerli akan hücre ölçer gerektirir. 7AAD kit içerisinde gelmekte, böylece iki renkli boyama yapılabilmektedir. <i>In vitro ve in vivo</i>	Fiksatif olarak paraformaldehit kullanıldığı için bazı antikorlarda bağlanma sorunu ortaya çıkabilir	50 test	-
Perkin Elmer NET027250UC 3H timidin	Radyoaktivite, film ile çalışılması gerekli, DNA sentezini baskıladığı gösterilmiştir.		250 µCi	B
Invitrogen ClickIT Edu Cell Proliferation Assay	Antikor kullanımını gerektirmez, DNA denatürasyonu gerekmez. Akan hücre ölçer, mikroplak okuyucu ve floresan mikroskop ile kullanılacak farklı seçenekleri vardır.	Sinyal parlaklığı BrdU'dan daha yüksek, daha hızlı. Kolay.	Alexa Fluor 488 Flow Cytometry kit	C
Invitrogen Cyquant Direct Cell Proliferation	NF kite ek olarak hassasiyeti artırmak için bloklayıcı DNA boyası da içerir. Yıkama işlemi gerektirmez. Süspansiyon hücrelerin ölçümünden önce kuyucuk zeminine çökmesi gereklidir.	1536 kuyucuklu plaklar ile kullanılabilirliği için büyük çalışmalara izin verir. Hızlı.	1000 test	B
Invitrogen Cyquant NF Cell Proliferation Assay Kit	NF kite permeabilite sağlama özelliği DNA boyasına eklenmiştir. Yıkama işlemi gerektirmez.	1536 kuyucuklu plaklar ile kullanılabilirliği için yüksek işlem hacmine izin verir. Hızlı.	1000 test 200 test	B A (2011)

* Maliyet listesinde sıralanan fiyatlar ABD satış fiyatlarına göre olup, karşılaştırma amacı ile verilmiştir. Türkiye satış fiyatları listedekinden farklılık gösterebilir; ** Maliyet listesinde sıralanan rakamlara sadece kitlerin maliyeti dahildir, cihaz, tüp, diğer çözeltiler, plak v.b. masraflar ek olarak hesaplanmalıdır; *** Kit içeriklerine kaynaklarda verilen site bağlantılarından ulaşılabilir; BD: Becton Dickinson; DNA: Deoksiribonükleik asit; HCl: Hidroklorik asit; ELISA: Enzim bağlı immün assay; FITC: Floresan izotiyosiyanat. Maliyet skalası şu şekildedir. A: <200 USD; B: 200-400 USD; C: 400-600 USD; D: 600-1000 USD; E: 1000-1500 USD; F: 1500-2000 USD; G: >2000 USD

EK-2

Metabolizma ölçümüne dayalı ticari hücre proliferasyon kitleri

Kit (metabolizma)	Kullanım kolaylığı-zorluğu	Performans hassasiyeti	Test sayısı/kit	Maliyet *, **, ***
RocheCell Proliferation Kit I (MTT)	Öncesi 96 kuyulu mikropakta hücre kültürü (37 °C %6.5 CO ₂) 24-96 saat. Tetrazolyumun çözülmesi gerekir, MTT kesim ürünleri suda çözünmez, DMSO ile çözülmesi gerekir. 550-600 nm'de okuma yapabilen plak okuyucu gerekir.	Düşük hücre sayıları tespit edilebilir. Absorbans-hücre sayısı korelasyonu yüksektir.	2500 test	B
RocheCell Proliferation Kit II (XTT)	Öncesi 96 kuyulu mikropakta hücre kültürü (37 °C %6.5 CO ₂) 24-96 saat. XTT kesim ürünleri suda çözünebilir, ek çözme adımı gerekmez. XTT ile inkübasyon süresi MTT ve WST1'e göre daha uzun (≤24 saat) 450-500 nm'de okuma yapabilen plak okuyucu gerekir.	Düşük hücre sayıları tespit edilebilir. Absorbans-hücre sayısı korelasyonu yüksektir.	2500 test	C
RocheCell Proliferation Reagent (WST-1)	Öncesi 96 kuyulu mikropakta hücre (0.1-5 x 10 ⁴ hücre/kuyu) kültürü (37 °C %5 CO ₂) 24-96 saat WST1 inkübasyon 30 dak ile 4 saat arasında sürer. 420-480 nm'de okuma yapabilen plak okuyucu gerekir.	Düşük hücre sayıları tespit edilebilir. Absorbans-hücre sayısı korelasyonu yüksektir. WST-1 daha verimli ve daha parlak sinyal verir.	8 ml 800 test 25 ml 2500 test	A C
PromegaCellTiter96 AQueousOne Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Öncesi 96 kuyulu mikropakta hücre (0.1-5 x 10 ⁴ hücre/kuyu) kültürü (37 °C %5 CO ₂) 24-96 saat sürmektedir. Tek bir çözelti olarak gelir. MTT'deki gibi ek çözme adımı gerektirmez. Yıkama yok. 490 nm'de okuma yapabilen plak okuyucu gerekir.	MTT'den daha hızlı	200 test 1000 test 5000 test	A B C
Clontech WST-1 Cell Proliferation Assay Kiti	Öncesi 96 kuyucuklu mikropakta hücre (0.3-5 x 10 ⁴ hücre/kuyu) kültürü (37 °C %5 CO ₂) 24-96 saat Protokol min. 1 saat sürmektedir. WST1 inkübasyon 30 dak ile 4 saat arasında sürer. Yıkama adımı ve ek reaktifler yok. 420-480 nm'de okuma yapabilen plak okuyucu gerekir.	WST-1 daha verimli ve daha parlak sinyal verir.	2500 reaksiyon	B
BiovisionReady-to-use Cell Proliferation Reagent, WST-1	Öncesi 96 kuyulu mikropakta hücre kültürü (37 °C %5 CO ₂) 24-96 saat WST1 inkübasyon 30 dak ile 4 saat arasında sürer. 420-480 nm'de okuma yapabilen plak okuyucu gerekir.	WST-1 daha verimli ve daha parlak sinyal verir	2500 test	B
Invitrogen Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit	Öncesi 5000-10000 hücre/kuyu 48-72 saat kültür. Tetrazolyumun çözülmesi gerekir, MTT kesim ürünleri suda çözünmez, DMSO ile çözülmesi gerekir. 570 nm'de okuma yapabilen plak okuyucu gerekir.		100 test	B (2011)
Invitrogen Cell Trace Violet Cell Proliferation Kit	<i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> işaretleme yapılarak, boyadaki dilüsyon üzerinden çoklu nesil tespitine izin verir. Eks./Em.: 405/450 nm. Akan hücre ölçer ile kullanım. Tetrazol-yum kitlerden daha kısa inkübasyon süresi.	Hızlı	1 Kit	B (2011)
Invitrogen Alamar Blue Assay	Suda çözünebilir, yıkama, fiksasyon, ekstraksiyon adımı gerektirmez. Floresan 530-560 nm, absorbans 570-600 nm.	≥50 hücre	100 ml 25 ml	C A (2011)
Abcam Cell Proliferation Assay Kit (Fluorometric-Blue)	Resazürin temelli Ex= 530-570 nm; Em= 590-620 nm Yıkama, çözme adımı yok.	≥100 hücre	1 Kit-500 test	B
Invitrogen CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit	Akan hücre ölçer, Eks.: 492 nm Em.: 517		1 Kit	A (2011)
Abcam CFSE Cell Labeling Kit	Akan hücre ölçer, Floresan mikroskop Eks.: 492/Em.: 517		1000 test	B
eBioscience CFSE	Akan hücre ölçer, floresan mikroskop Eks.: 494 nm/Em.: 521 nm	Hücreleri 10 nesile kadar takip edebilme imkanı	5x500 µg	A
eBioscience Cell Proliferation Dye eFluor® 670	Akan hücre ölçer, Eks.: 633 nm kırmızı lazer, Em.: 660 nm FITC kanalında farklı antikorların kullanılmasına izin verir.	Hücreleri 6 nesile kadar takip edebilme imkanı	500 µg	A

* Maliyet listesinde sıralanan fiyatlar ABD satış fiyatlarına göre olup, karşılaştırma amacı ile verilmiştir. Türkiye satış fiyatları listedekinden farklılık gösterebilir; ** Maliyet listesinde sıralanan rakamlara sadece kitlerin maliyeti dahildir, cihaz, tüp, diğer çözelti, plak v.b. masraflar ek olarak hesaplanmalıdır; *** Kit içeriklerine kaynaklarda verilen site bağlantılarından ulaşılabilir; MTT: Metiltiazol difenil tetrazolyum; DMSO: Dimetil Sülfoksit; XTT: Tetrazolyum; WST: 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfenil)-2H-tetrazolyum; CFSE: Karboksifloresan süksinimidil ester; FITC: Floresan izotiyosyanat. Maliyet skalası şu şekildedir. A: <200 USD; B: 200-400 USD; C: 400-600 USD; D: 600-1000 USD; E: 1000-1500 USD; F: 1500-2000 USD; G: >2000 USD

EK-3

Proliferasyon işaretçilerinin (marker) belirlenmesine dayalı hücre proliferasyon kitleri

Kit (proliferasyon işaretçileri)	Kullanım kolaylığı-zorluğu	Performans hassasiyet	Test sayısı/kit	Maliyet *, **, ***
Invitrogen PCNA Staining Kit	Fare, insan, sıçan, maya. Dondurulmuş, parafinlenmiş doku kesitlerinde, yeni hazırlanmış lenfositlerde, fikse hücre kültürlerinde kullanılır. Sekonder antikor gerektirmez.	IVD	1 kit	C (2011)
Roche Phosphohiston H3 Imaging Kit	İnsan. Total hücre popülasyonunda bölünen hücrelerin görüntülenmesine izin verir. Sekonder antikor gerektirmez.	RUO, 96 kuyulu plak 90 dakika Cellavista ile çok hızlı. Az sayıdaki mitotik hücre tespiti	Mikroplak 5x96 reaksiyon	-
Epitomics PCNA Monoklonal Antikor	İnsan formalin fikse parafin doku kesidi için	IVD	1 ml (konsantre)	-
Milipore Anti-phospho-Histone H3 (Ser10)	Fare, insan immün hücre kimyası, immün çöktürme ve western blot	RUO	200 µl (1 mg/ml)	B
Invitrogen Ki67 Monoklonal Antikor	İnsan FITC Akan hücre ölçer	ASR	0.5 ml	B (2011)
Abcam Topoisomerase 2B Antikor	İnsan poliklonal western blot, immün çöktürme, immünhistokimyasal	RUO	100 µl (0.2 mg/ml)	B
Cell Signaling Technology Aurora Antibody Sampler Kit (3875)	Western blot, kit içerisindeki her antikor için yapılabilecek ek uygulamalar kaynakçada verilmiş olan internet bağlantısı üzerinden incelenebilir.	RUO	4x40 µl	B (2013)

* Maliyet listesinde sıralanan fiyatlar ABD satış fiyatlarına göre olup, karşılaştırma amacı ile verilmiştir. Türkiye satış fiyatları listedekinden farklılık gösterebilir; ** Maliyet listesinde sıralanan rakamlara sadece kitlerin maliyeti dahildir, cihaz, tüp, diğer çözümler, plak v.b. masraflar ek olarak hesaplanmalıdır; *** Kit içeriklerine kaynaklarda verilen site bağlantılarından ulaşılabilir; PCNA: Prolifere hücre çekirdek antijeni; IVD: *In vitro* tanı; RUO: Sadece araştırma amaçlı kullanım; FITC: Floresan izotiyosyanat. Maliyet skalası şu şekildedir. A: <200 USD; B: 200-400 USD; C: 400-600 USD; D: 600-1000 USD; E: 1000-1500 USD; F: 1500-2000 USD; G: >2000 USD

EK-4

Adenozin trifosfat ölçümüne dayalı hücre proliferasyon kitleri

Kit (adenozin trifosfat)	Kullanım kolaylığı-zorluğu	Performans hassasiyet	Test sayısı/kit	Maliyet *, **, ***
Perkin Elmer ATP Lite Assay Kit	İşima yarılanma süresi 5 saat. Luminometre (ışım ölçer) gerekli. Santrifüj gerektirmez. 15-25 dakika arası uygulama süresi. Hücre lizis çözeltisi içerir.	Hızlı 100 µl için 5 hücreye kadar hassasiyet	10000 test 5000 test 1000 test 300 test	G E B A
Perkin Elmer ATP Lite 1 step Assay Kit	30 dakikada işimada (%15 azalma). Kolay uygulama. Santrifüj gerektirmez. Luminometre gerekli. Protokol tek adımdan oluşur. Hücre lizis çözeltisi içerir. 96 (maks. 50000 hücre) veya 384 (maks. 12500 hücre) kuyulu plak	Hızlı Yüksek hassasiyet Yüksek hacimli işlemler için uygun	1000 ml 100 ml 10 ml	G C A
Biotium ATP-GloBioluminometric Cell Viability Assay Kit	Luminometre gerekli. 96 kuyucuklu plak ya da tek	Hızlı 1 hücreye ya da 0.01 pikomol ATP'ye kadar	1000 test	C-B
Invitrogen ATP Determination Kit	Lusiferin-lusiferaze ayrı paketlenmiş. Luminometre gerekli Em. maks 560 nm	Hızlı 0.1 pikomol ATP'ye kadar	200-1000 test	B (2011)
Biovision Staybrite Highly Stable ATP Assay kit	Hücre ve doku kültürü homojenatlarında Luminometre gerekir.	Hızlı (0.5 saat) 10 femtomole kadar ATP pH 8.2 altında oda sıcaklığında 10 saat, 37 °C'de ise 60 dakika kadar stabil luminesans	100 test	A
Biovision ATP Colorimetric/ Fluorometric Assay Kit	Luminesans kaynaklı sinyal stabilite sorunu yok. Hücre-doku lizatları, kültür medyumları, idrar, plazma ve serum gibi biyolojik sıvılarda. Absorbans (570 nm) veya Floresans (Ex/Em 535/587 nm)'de ölçülür	Hızlı (1 saat) 50 pikomole kadar ATP	100 test	B
Roche ATP Bioluminescence Assay Kit HS II	Lizis reaktif ve dilüsyon tamponu ile gelir.	CILS II kite göre daha hassas	Mikroplak 1000 test Tüp 500 test	C
Roche ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II	Kolay kullanım için optimize edilmiştir.	Sinyal stabilitesi CLSII'ye göre çok daha uzun süreli	Mikroplak 1600 test Tüp 800 test	C

* Maliyet listesinde sıralanan fiyatlar ABD satış fiyatlarına göre olup, karşılaştırma amacı ile verilmiştir. Türkiye satış fiyatları listedekinden farklılık gösterebilir; ** Maliyet listesinde sıralanan rakamlara sadece kitlerin maliyeti dahildir, cihaz, tüp, diğer çözümler, plak v.b. masraflar ek olarak hesaplanmalıdır; *** Kit içeriklerine kaynaklarda verilen site bağlantılarından ulaşılabilir; ATP: Adenozin trifosfat; HS: En yüksek hassasiyet; CLS: Sabit ışık sinyali. Maliyet skalası şu şekildedir. A: <200 USD; B: 200-400 USD; C: 400-600 USD; D: 600-1000 USD; E: 1000-1500 USD; F: 1500-2000 USD; G: >2000 USD

KAYNAKLAR

1. Cooper GM, Hausman RE. The cell: a molecular approach. 3rd ed. Washington: Sinauer Associates; 2003. p. 591-625.
2. Dehay C, Kennedy H. Cell-cycle control and cortical development. *Nature Reviews Neuroscience* 2007;8:438-50.
3. Cho KG, Hoshino T, Nagashima T, Murovic JA, Wilson CB. Prediction of tumour doubling time in recurrent meningiomas. Cell kinetics studies with bromodeoxyuridine labeling. *Journal of Neurosurgery* 1986;65:790-4.
4. Longo D. Harrison's Hematology and oncology. 1th ed. 2. Hong Kong: McGrawHill Professional; 2010. p. 294-317.
5. Rode HJ. Apoptosis, cytotoxicity and cell proliferation. 4th ed. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH; 2008.
6. Marcussen M, Larsen PJ. Cell cycle-dependent regulation of cellular ATP concentration, and depolymerization of the interphase microtubular network induced by elevated cellular ATP concentration in whole fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton* 1996;35:94-9.
7. Cabadak H. Hücre siklusu ve kanser. *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2008;9:51-61.
8. Cavanagh BL, Walker T, Norazit A, Meedeniya ACB. Thymidine analogues for tracking DNA synthesis. *Molecules* 2011;16:7980-93.
9. Perkin Elmer Millipore. http://www.millipore.com/images/xl/apt115_p001w%5Bapt115_p001_w-ALL%5D.jpg [Access date: November 11, 2012]
10. Roche Applied Science. http://www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/index.jsp?id=cellproliferation_products_overview&fol=products&pageid=brdu_labeling_and_detection_kit_iuii [Access date: November 04, 2012]
11. Roche Applied Science. [https://www.roche-applied-science.com/\(5-Bromo-2'-deoxy-uridine LabelingandDetection Kit\)](https://www.roche-applied-science.com/(5-Bromo-2'-deoxy-uridine LabelingandDetection Kit)) [Access date: November 04, 2012]
12. Roche Applied Science. [https://www.roche-applied-science.com/\(InSitu Cell Proliferation Kit, FLUOS\)](https://www.roche-applied-science.com/(InSitu Cell Proliferation Kit, FLUOS)) [Access date: November 03, 2012]
13. Roche Applied Science. https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11810740001_en_06.pdf [Access date: November 04, 2012]
14. Roche Applied Science. <https://www.roche-applied-science.com/servlet/new/CatDisplay.jsp?categoryId=49760> [Access date: November 02, 2012]
15. Roche Applied Science. [https://www.roche-applied-science.com/\(Cell Proliferation ELISA, BrdU \(chemi luminescent\)\)](https://www.roche-applied-science.com/(Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemi luminescent))) [Access date: November 02, 2012]
16. Roche Applied Science. <https://www.roche-appliedscience.com/servlet/RCPProductDisplay?storeId=10151&catalogId=10151&langId=1&countryId=tr&forCountryId=tr&productId=3.5.3.21.1.8> [Access date: November 02, 2012]
17. Perkin Elmer. <http://perkinelmerreagents.onconf luence.com/display/ts/DELFLA+cell+proliferation+assays> [Access date: November 11, 2012]
18. J&H Technology Co. Ltd. http://www.jnhitech.com.tw/comm/upfile/p_041104_09338.pdf [Access date: November 05, 2012]
19. Hurskainen P, Dahlén P, Ylikoski J, Kwiatkowski M, Siitari H, Lövgren T. Preparation of europium-labelled DNA probes and their properties. *Nucleic Acids Res* 1991;19:1057-61.
20. Perkin Elmer Millipore. <http://www.millipore.com/catalogue/item/2752> [Access date: November 10, 2012]
21. Becton Dickinson. <http://www.bdbiosciences.com/ptProduct.jsp?prodId=8332> [Access date: November 08, 2012]
22. Becton Dickinson. http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/manuals/live/web_enabled/23-1272_1-00.pdf [Access date: November 10, 2012]
23. <http://www.bdj.co.jp/reagent/datasheets/551321.pdf> [November 13, 2012]
24. Perkin Elmer. http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-96369BRO_Radio metricDetection Guide.pdf [Access date: November 08, 2012]
25. Hu VW, Black GE, Torres-Duarte A, Abramson FP. 3H-thymidine is a defective tool with which to measure rates of DNA synthesis. *FASEB J* 2002;16:1456-7.
26. Chehrehasa F, Meedeniya AC, Dwyer P, Abrahamsen G, Mackay-Sim A. EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *J Neurosci Methods* 2009;177:122-30.
27. Invitrogen. <http://products.invitrogen.com/> (Clickit EdU) [Access date: November 11, 2012]
28. Invitrogen. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp35006.pdf> [Access date: November 12, 2012]
29. Rutten MJ, Janes MA, Chang IR, Gregory CR, Gregory KW. Development of a functional schwann cell phenotype from autologous porcine bone marrow mononuclear cells for nerve repair. *Stem Cells Int* 2012;2012:738484.
30. Invitrogen. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp35011.pdf> [Access date: November 12, 2012]
31. Jones LJ, Gray M, Yue ST, Haugland RP, Singer VL. Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay. *J Immunol Methods* 2001;254:85-98.
32. Biocompare.com. <http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/117892-Cell-Proliferation-Assays/> [Access date: November 05, 2012]
33. ATCC. <http://www.atcc.org/attachments/2273.pdf> [Access date: November 14, 2012]
34. Roche Applied Science. [https://www.roche-applied-science.com/\(Cell Proliferation Kit I \(MTT\)\)](https://www.roche-applied-science.com/(Cell Proliferation Kit I (MTT))) [Access date: November 09, 2012]
35. Roche Applied Science. [https://www.roche-applied-science.com/\(Cell Proliferation Kit II \(XTT\)\)](https://www.roche-applied-science.com/(Cell Proliferation Kit II (XTT))) [Access date: November 09, 2012]
36. Roche Applied Science. [https://www.roche-applied-science.com/\(Cell Proliferation Reagent \(WST-1\)\)](https://www.roche-applied-science.com/(Cell Proliferation Reagent (WST-1))) [Access date: November 09, 2012]
37. Promega. <http://www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol/> [Access date: November 09, 2012]
38. Cho YY, Tang F, Yao K, Lu C, Zhu F, Zheng D, et al. Cyclin-dependent kinase-3-mediated c-Jun phosphorylation at Ser63 and Ser73 enhances cell transformation. *Cancer Res* 2009;69:272-81.
39. Biovision. <http://www.biovision.com/ready-to-use-cell-proliferation-reagent-wst-1-5637.html> [Access date: November 10, 2012]

40. Clontech. http://www.clontech.com/US/Products/Cell_Biology_and_Epigenetics/Cell_Biology_Kits/Premixed_WST-1_cell_proliferation_assay_kit [Access date: November 10, 2012]
41. Invitrogen. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp13154.pdf> [Access date: November 10, 2012]
42. Invitrogen. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp34557.pdf> [Access date: November 10, 2012]
43. AbD Serotec. <http://www.abdserotec.com/catalog/alamarblue/alamarblue-faqs.html> [Access date: November 13, 2012]
44. Invitrogen. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/PI-DAL1025-1100_TI%20Alamar%20Blue%20Rev%201.1.pdf [Access date: November 12, 2012]
45. Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamarblue and MTT assays for high throughput screening. *Toxicology In Vitro* 2004;18:703-10.
46. Abcam. <http://www.abcam.com/Cell-Proliferation-Assay-Kit-Fluorometric-Blue-ab102501.pdf> [Access date: November 20, 2012]
47. Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human Reproduction* 2007;22:1304-9.
48. Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of Immunological Methods* 2000;243:147-54.
49. Invitrogen. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp34554.pdf> [Access date: December 04, 2012]
50. Abcam. <http://www.abcam.com/CFSE-Cell-Labeling-Kit-ab113853.pdf> [Access date: December 04, 2012]
51. eBioscience. <http://www.ebioscience.com/media/pdf/tds/65/65-0850.pdf> [Access date: December 05, 2012]
52. Hawkins ED, Hommel M, Turner ML, Battye FL, Markham JF, Hodgkin PD. Measuring Lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time series data. *Nature Protocols* 2007;2:2057-67.
53. Martin CE, Frimpong-Boateng K, Spasova DS, Stone JC, Surh CD. Homeostatic proliferation of mature T cells. *Methods Mol Biol* 2013;979:81-106.
54. eBioscience. <http://www.ebioscience.com/cell-proliferation-dye-efluor-670.htm> [Access date: December 25, 2013]
55. Nowak SJ, Corces VG. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* 2004;20:214-20.
56. Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J Histochem Cytochem* 2003;51:1681-8.
57. Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993;123:513-22.
58. Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Okano Y. Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. *J Biol Chem* 1999;274:7334-40.
59. Hauf S, Cole RW, LaTerra S, Zimmer C, Schnapp G, Walter R, et al. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* 2003;161:281-94.
60. Katayama H, Brinkley WR, Sen S. The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22:451-64.
61. Abcam. <http://www.abcam.com/PCNA-antibody-PC10-Proliferation-Marker-ab29.html> [Access date: November 09, 2012]
62. Ventana. <http://www.ventana.com/product/1563?type=2026> [Access date: November 09, 2012]
63. Cellmarque. http://www.cellmarque.com/cmc/P_antibodydetail.php?id=2110 [Access date: November 09, 2012]
64. Invitrogen. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/L11604%20-%20AntiHuman%20Ki%2067%20FITC%20Conjugate%20Rev%201208.pdf> [Access date November 09, 2012]
65. Epitomics. <http://www.epitomics.com/pdf/IVD/AC-0087%20PCNA%20IVD%20Rev%2001.pdf> [Access date: November 09, 2012]
66. Thermo Scientific. <https://static.thermoscientific.com/images/D12501~.pdf> [Access date: November 09, 2012]
67. Invitrogen. <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/PCNA01?CID=1dbc> [Access date: November 09, 2012]
68. Invitrogen. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/PI931143_PCNA%20STAINING%20KIT%20Rev%201208.pdf [Access date: November 10, 2012]
69. Mao-Qiang M, Fowler AJ, Schmuth M, Lau P, Chang S, Brown BE, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma activation stimulates keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 2004;123:305-12.
70. Roche Applied Science. http://www.roche-applied-science.com/sis/innovatis/innovatis_docs/PhosphoHistoneH3_Kit_Flyer_HR.pdf [Access date: November 13, 2012]
71. Roche Applied Science. http://www.roche-applied-science.com/sis/innovatis/index.jsp?id=innovatis_020501 [Access date: November 14, 2012]
72. Cell Signaling Technology. <http://www.cellsignal.com/pdf/3875.pdf> [Access date: November 26, 2013]
73. Cell Signaling Technology. <http://www.cellsignal.com/pdf/4718.pdf> [Access date: November 26, 2013]
74. Cell Signaling Technology. <http://www.cellsignal.com/pdf/3079.pdf> [Access date: November 26, 2013]
75. Cell Signaling Technology. <http://www.cellsignal.com/pdf/3094.pdf> [Access date: November 26, 2013]
76. Cell Signaling Technology. <http://www.cellsignal.com/pdf/2914.pdf> [Access date: November 26, 2013]
77. Cell Signaling Technology. <http://www.cellsignal.com/pdf/7074.pdf> [Access date: November 26, 2013]
78. Crouch SP, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1993;160:81-8.
79. Perkin Elmer. http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-73201BRO_ATP_lite.pdf [Access date: November 12, 2012]
80. Perkin Elmer. http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-73575MAN_ATP_Lite1step.pdf [Access date: November 11, 2012]

81. Biotium. http://www.biotium.com/product/product_info/Protocol/30020.pdf [Access date: November 12, 2012]
82. Invitrogen. <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp22066.pdf> [Access date: November 13, 2012]
83. Roche. https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11699709001_en_08.pdf [Access date: November 14, 2012]
84. Roche. https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11699695001_en_05.pdf [Access date: November 13, 2012]
85. Biovision. <http://www.biovision.com/manuals/K791-100.pdf> [Access date: November 13, 2012]
86. Biovision. <http://www.biovision.com/manuals/K354.pdf> [Access date: November 13, 2012]