

DETACHMENT OF PRIMARY FETAL CHONDROCYTES FROM CYTODEX-1 MICROCARRIERS BY USING TRYPSIN, COLLAGENASE AND PRONASE

Gaye Çetinkaya¹, Menemşe Gümüşderelioğlu², Mehmet Ali Onur³, Sezen Arat^{1*}

¹TUBITAK MRC-Genetic Engineering Biotechnology Institute (GEBI), Gebze/Kocaeli.

²Hacettepe University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering, Ankara.

³Hacettepe University, Faculty of Science, Department of Biology, Ankara.

Microcarrier technology has been applied successfully in the cultivation of mammalian anchorage-dependent cells for decades. The principal obstacle of microcarrier systems has been the difficulty in detaching cells from the microcarriers in a viable and functional condition, which is a prerequisite if the culture is to serve as an inoculum for a subsequent larger-scale batch. In this study we have used 3 different enzymes to harvest primary fetal bovine chondrocytes from Cytodex-1 microcarriers in suspension culture system. After washing two times with Ca⁺² and Mg⁺² free PBS including 0,02 % EDTA (pH 8), cells were incubated with 0,25% trypsin-EDTA in the first group; 500 µg/ml collagenase type 2 in the second group; 100 µg/ml pronase in the third group for 15 minutes at 37°C, 5% CO₂. Detached cells were stained with trypan blue and were counted by hemocytometer. In addition they were analysed by MTT assay to show their proliferative activities. Pronase and trypsin gave better results than collagenase in detached cell amount. Collagenase treated cells gave lower absorbance compared to trypsin and pronase treated cell in 590 nm with MTT (p<0,05). Collagenase, pronase and trypsin treated cells from microcarriers gave lower absorbance compared to control groups which were harvested from Petri dishes by 5 min of trypsin treatment (p<0,05). Results showed that, pronase and trypsin is better in harvesting chondrocytes from microcarriers. Enzymatic cell harvesting techniques should be optimised in microcarrier systems to obtain a viable and functional cell population with less physiological damage.

This study was supported by a grant from TUBITAK KAMAG, Turkey (106G005).

Correspondence.sezen.arat@mam.gov.tr

Keywords: Cytodex-1, trypsin, pronase, collagenase.

CYTODEX-1 MİKROTAŞIYICILAR ÜZERİNDE KÜLTÜRE EDİLEN PRİMER FETAL KONDROSİTLERİN TRİPSİN, PRONAZ ve KOLLAJENAZ KULLANILARAK GERİ KAZANILMASI

Gaye Çetinkaya¹, Menemşe Gümüşderelioğlu², Mehmet Ali Onur³, Sezen Arat^{1*}

¹ TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü (GMBE), Gebze/Kocaeli.

² Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara.

³ Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara.

Mikrotaşıyıcılar memeli hücre kültürlerinde uzun süredir kullanılmaktadır. Birim hacimdeki yüzey alanını artıran mikrotaşıyıcılar ile iki boyutlu hücre kültür kaplarına oranla daha az iş gücü ve maliyetle çok daha fazla sayıda hücre üretmek mümkündür. Mikrotaşıyıcı sistemlerdeki başlıca sorunlardan biri, fiziksel veya fizyolojik harabiyet verilmeden hücrelerin polimerik kürelerden kaldırılmalarıdır. Bu çalışmada, primer fetal sıgır kıkırdak hücreleri Cytodex-1 tipi mikrotaşıyıcılardan durgun kültürde 3 farklı enzim kullanılarak kaldırılmıştır. Hücre taşıyan mikrotaşıyıcılar, Ca⁺² and Mg⁺² içermeyen 0,02 % EDTA'lı PBS (pH 8) ile iki kere yıkandıktan sonra birinci grupta 0,25 % trypsin-EDTA (pH 8) ile; ikinci grupta 500 µg/ml collagenase tip 2 ile; üçüncü grupta 100 µg/ml pronase ile 15 dakika boyunca 37 °C ve 5 % CO₂'li ortamda inkübe edilmişlerdir. Kaldırılan hücreler trypan blue ile boyandıktan sonra hemositometrik olarak sayılmışlar ve ayrıca MTT testi ile hücresel aktiviteleri belirlenmiştir. Pronaz ve tripsin kullanılarak kaldırılan hücrelerin sayısı kollajenaz uygulanarak kaldırılan hücrelerin sayısından fazladır. Kollajenaz ile kaldırılan hücreler, pronaz ve tripsin ile kaldırılan hücrelerle kıyaslandığında MTT ile 590 nm'de daha düşük absorbans vermişlerdir (p<0,05). Mikrotaşıyıcılardan pronaz, kollajenaz ve tripsinle kaldırılan hücrelerin absorbansı, Petri kaplarından 5 dakika tripsin uygulamasıyla kaldırılan kontrol hücre grubunun absorbansından düşüktür (p<0,05). Bu çalışmada, mikrotaşıyıcı sistemlerde pronaz ve tripsinin kollajenaza göre daha avantajlı olduğu gösterilmiştir. Mikrotaşıyıcılardan çok sayıda sağlıklı ve fonksiyonel hücrelerin eldesi için enzimatik yöntemlerin optimize edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışma TÜBİTAK KAMAG 106G005 nolu projesi tarafından desteklenmiştir.

Yazışma adresi. Sezen.Arat@mam.gov.tr

Anahtar kelimeler: Cytodex-1, tripsin, pronaz, kollajenaz