



TUBITAK
MAM

FARKLI DONDURMA HIZLARININ PRİMER SIĞIR KAS VE KIKIRDAK HÜCRELERİNİN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ



Gaye Çetinkaya, Arzu Taş, Sezen Arat

TUBITAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü (GMBE), Gebze/Kocaeli.
sezen.arat@mam.gov.tr

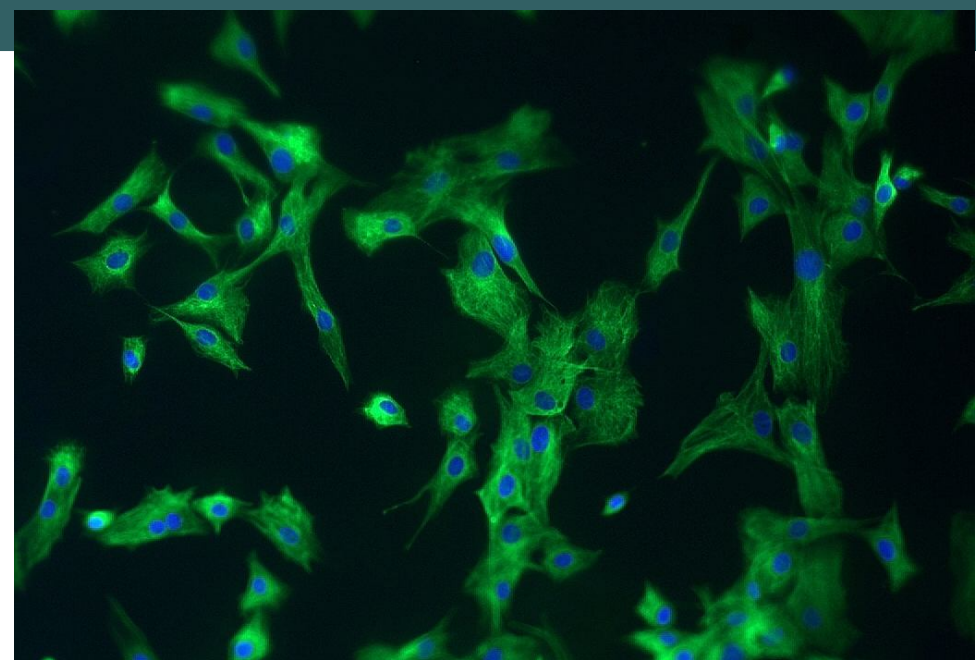
GİRİŞ

Uzun ve zahmetli süreçlerde geliştirilen hücre hatlarının başarılı bir şekilde dondurulup saklanması, biyobankacılık çalışmaları ve aşı üretimi gibi hücre kültürü temelli teknolojiler için oldukça önemlidir. Hücre kültüründe çoğaltılan hücreler için çeşitli dondurma stratejileri içinden tercih edilen yöntem yavaş dondurma tekniğidir. Bu yöntemde sıcaklık değeri düşerken hücre içindeki suyun olabildiğince dışarı çıkması ve kullanılan kriyoprotektanın hücre içine girmesi sağlanır. Farklı hücre kültürlerinin donma ve çözme streslerine toleransları değişkenlik gösterebilir. Dondurma tekniklerinin her hücre kültüründe optimize edilmesi bu yüzden çok önemlidir. Bu çalışmada değişik hızlarda dondurulan hücrelerin canlılık oranları ve fizyolojik aktiviteleri incelenirken, dondurma işlemine tür, hücre tipi ve kriyoprotektan konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL METOD

Siğir kıkırdak ve kas dokularından eksplant ekim yöntemiyle geliştirilen primer hücre kültürleri 2 x 10⁶ hücre/ml olacak şekilde sulandırıldı. Donma medyumuna ile yarı yarıya sulandırılan hücre süspansiyonu payetlere aktarıldı ve payetler 'CL8800 CryoGenesis Standart Freezing Control' dondurma cihazına yerleştirildi. Payetler dakikada 0,5 °C, 1°C ve 2 °C soğutulmuş donduruldu. Dondurulan hücreler sıvı azota aktarıldılar. Vitrifikasyon yönteminde hücre süspansiyonu önce ozmolariteyi dengeleyici bir solusyon (% 20 etilen glikol içeren %20 FBS'li PBS) içerisinde 5 dakika bekletildi. Ardından %40 Etilen glikol, %18 Ficoll 400 ve 0,3 M sukroz içeren vitrifikasyon solusyonuna alınarak hücreler 1 dakika içerisinde payetlere alınıp sıvı azota aktarıldılar. Sıvı azotta bir gün bekledikten sonra payetler 37 °C su banyosunda hızla çözüldüler. Vitrifikasyon yönteminde sırasıyla 0,5 M, 0,25 M ve 0 M sukroz çözeltilerinde beşer dakika bekletilen hücreler santrifürlenip sayıldılar. Dondurulan hücreler sayıldıktan sonra 4 x 10⁶ hücre/ml olacak şekilde sulandırılıp 96 gözlü petrilere uygulandı. Petriler 4 veya 7 gün süreyle kültüre edildikten sonra 5 mgr/ml MTT stoktan 10 µl her kuyuya uygulandı. 3 saat boyunca 37 °C %5 CO₂'de MTT ile inkübe olan sonra hücreler daha sonra 4 mM HCl içeren isopropanol ile 10 dakika bekledi. ELISA okuyucuda 590 nm'de analizler yapıldı. Tüm deneyler 3 kere tekrarlanmıştır.

SONUÇLAR



- Siğir kıkırdağından izole edilen kıkırdak hücreleri morfolojileri ve vimentin pozitif olmaları ile karakterize edilmiştir.

- Yavaş dondurma tekniğinde 1°C/dk soğutma hızının somatik hücrelerin saklanması için en iyi yöntem olduğu gösterilmiştir.

- Hücre tipine göre dondurma hızlarına ve yöntemlerine toleranslar değişmektedir.

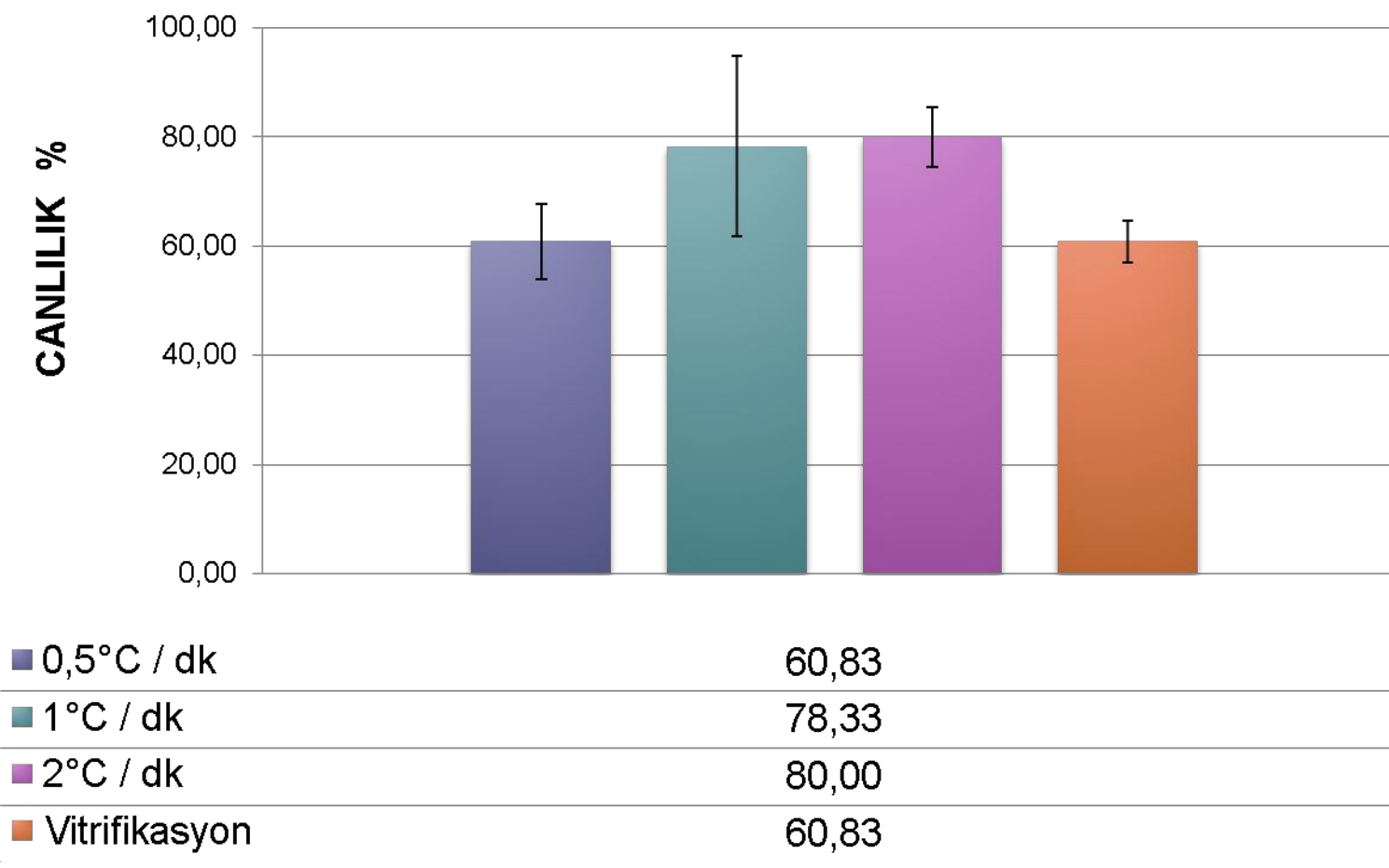
- Vitrifikasyon kıkırdak hücrelerinde %60; kas hücrelerinde %48,5 başarı ile uygulanmıştır. Vitrifikasyon hücrelerin çözüldükten sonra mitotik aktivitelerinin azaldığı tespit edilmiştir.

- Farklı DMSO konsantrasyonlarının karşılaştırıldığı çalışmada %5 ile %10 DMSO konsantrasyonları karşılaştırıldığında dondurma başarısında en iyi sonucun %10 DMSO kullanılan gruplarda elde edildiği görülmüştür.

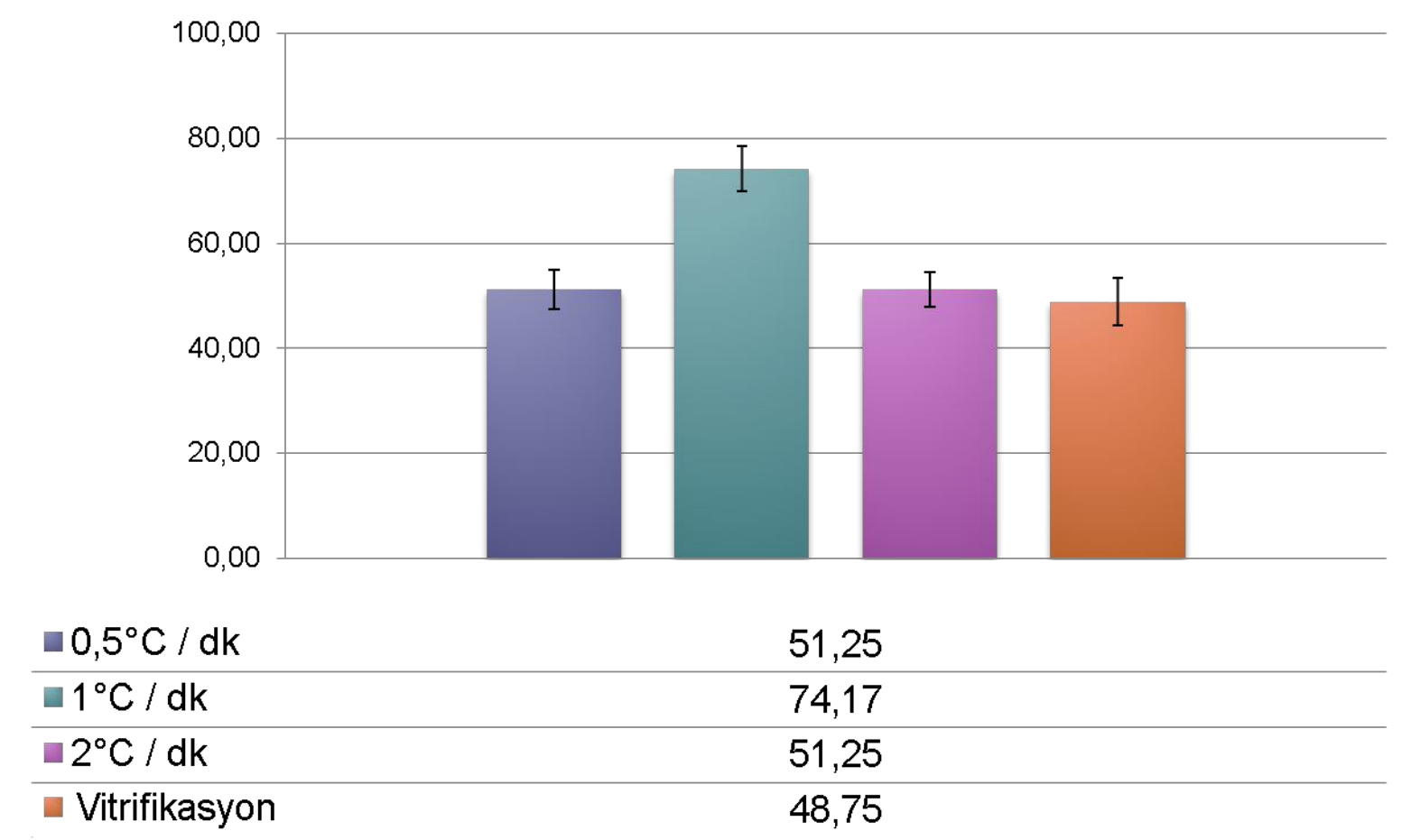
- Koyun ve siğir hücrelerinin karşılaştırmalı dondurulup çözüldüğü çalışmada tür ler arasında bir fark gözlemlenmemiştir.

SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

başarısına etkisi



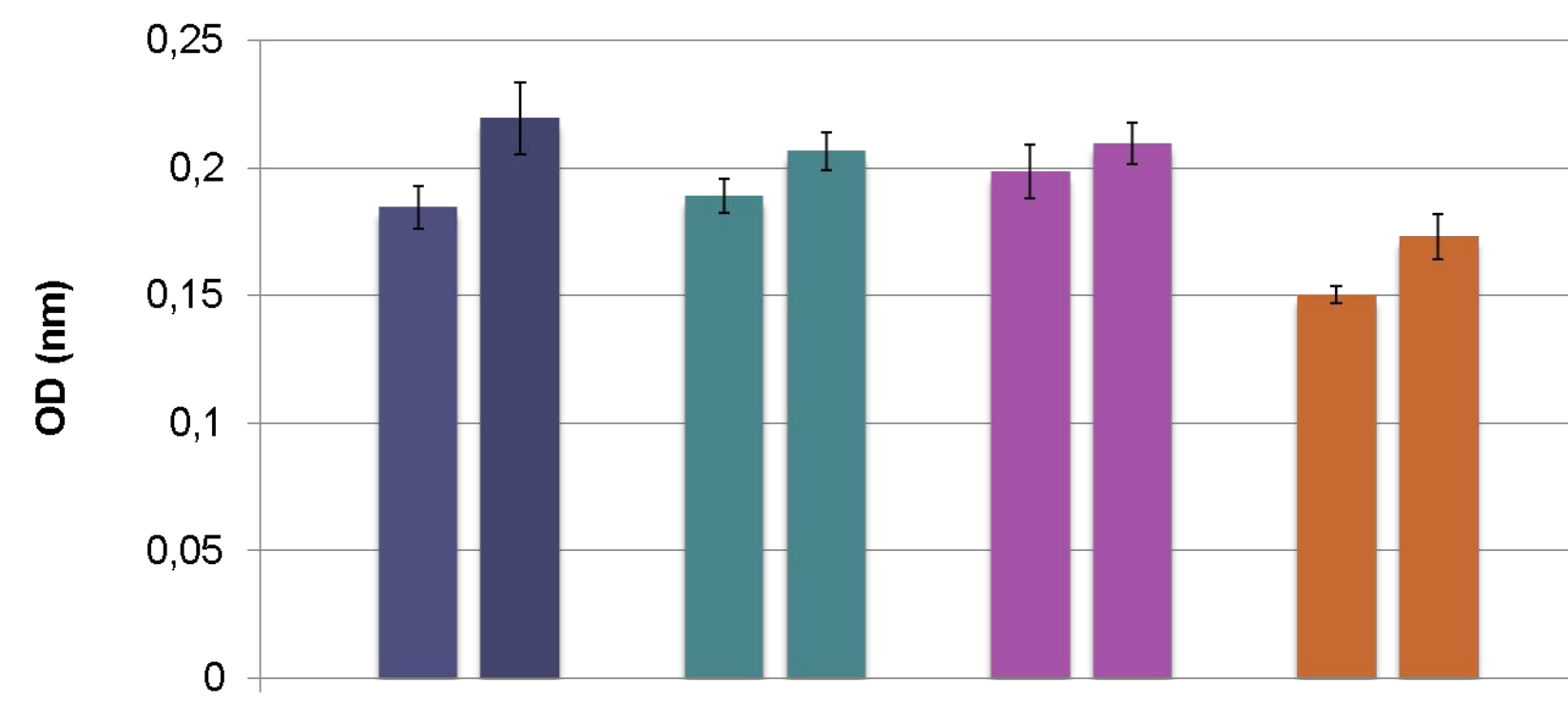
başarısına etkisi



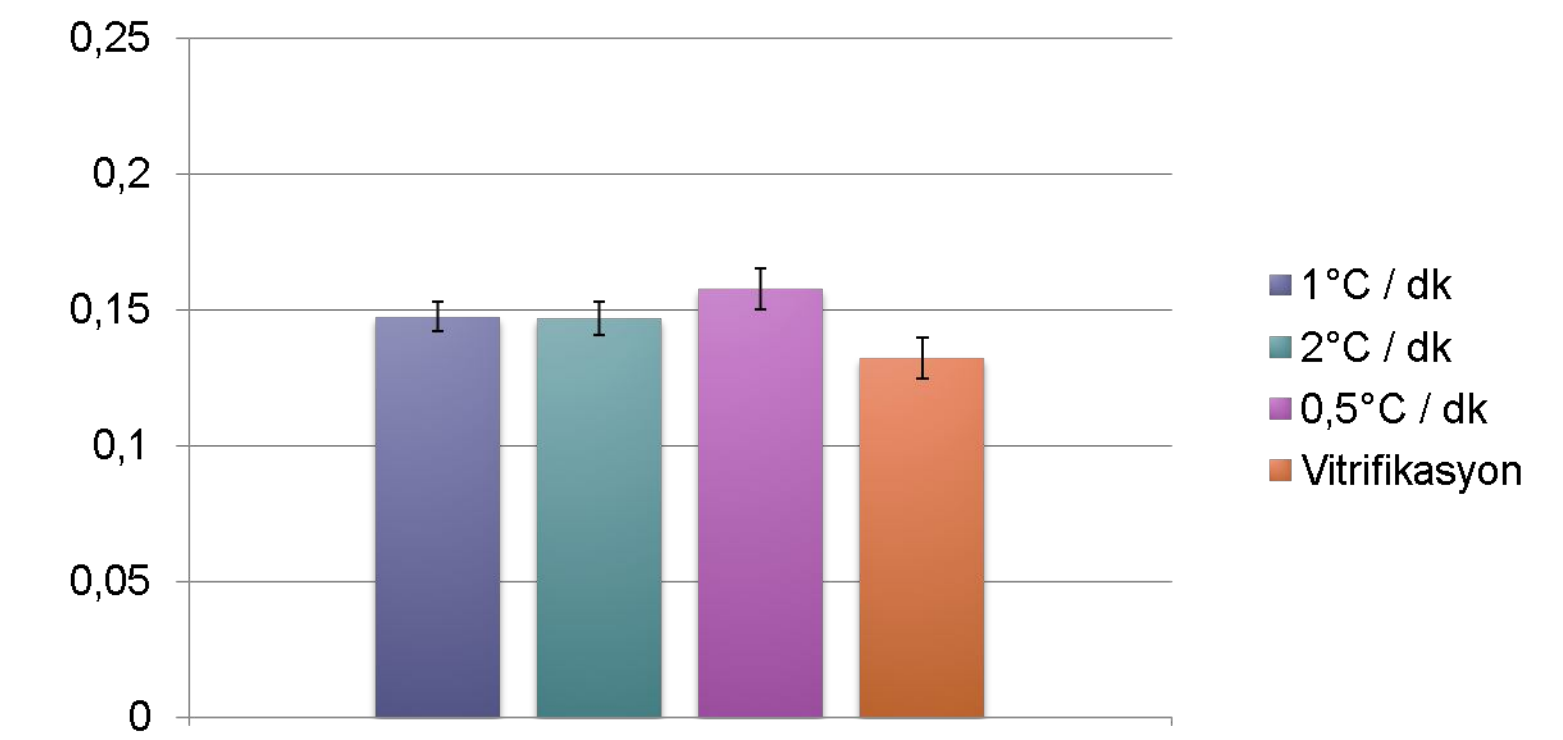
Yavaş dondurmada amaç hücrenin içindeki suyun hücreler arası ortama çıkmasını sağlayarak buz kristallerinin hücreye zarar vermesini engellemektir. Embriyo ve gametlerin saklanmasında tercih edilen vitrifikasyon yöntemi ise, yüksek ozmotik basınca sahip solusyonlar ve bol miktarda kriyoprotektan kullanarak çok hızlı bir şekilde sıcaklığın düşürüldüğü saklama yöntemidir. Vitrifikasyonda su buz kristalleri oluşturmaz, amorf bir yapı kazanır.

Bu çalışmada en iyi sonuç kıkırdak dokusundan elde edilen hücrelerde sıcaklığın dakikada 1°C ve 2°C; kas dokusundan elde edilen hücrelerde sıcaklığın dakikada 1°C düşürüldüğü gruplarda gözlenmiştir. Sonuçlar farklı hücre tiplerine bağlı olarak optimum dondurma hızının değiştiğini göstermektedir. Bu sonucun kas ve kıkırdak hücrelerinin içerdiği olası farklı su miktarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kas hücreleri farklı dondurma hızlarına toleransı kıkırdak hücrelerine kıyasla azdır. Vitrifikasyonun kıkırdak ve kas hücrelerindeki başarısı standart yavaş dondurma tekniğine kıyasla düşüktür. Sonuçlar, dakikada 1°C azalan sıcaklığın yavaş hücre dondurma tekniği için ideal olduğunu ortaya koymuştur. Daha yavaş sıcaklık değişimlerinde dondurma başarısı azalmaktadır. Dondurma hızının iki katı artırılması ise hücre tipine göre değişken sonuçlar vermiştir.

Farklı dondurma hızlarının hücrelerinin üreme kabiliyetleri üzerine etkisi

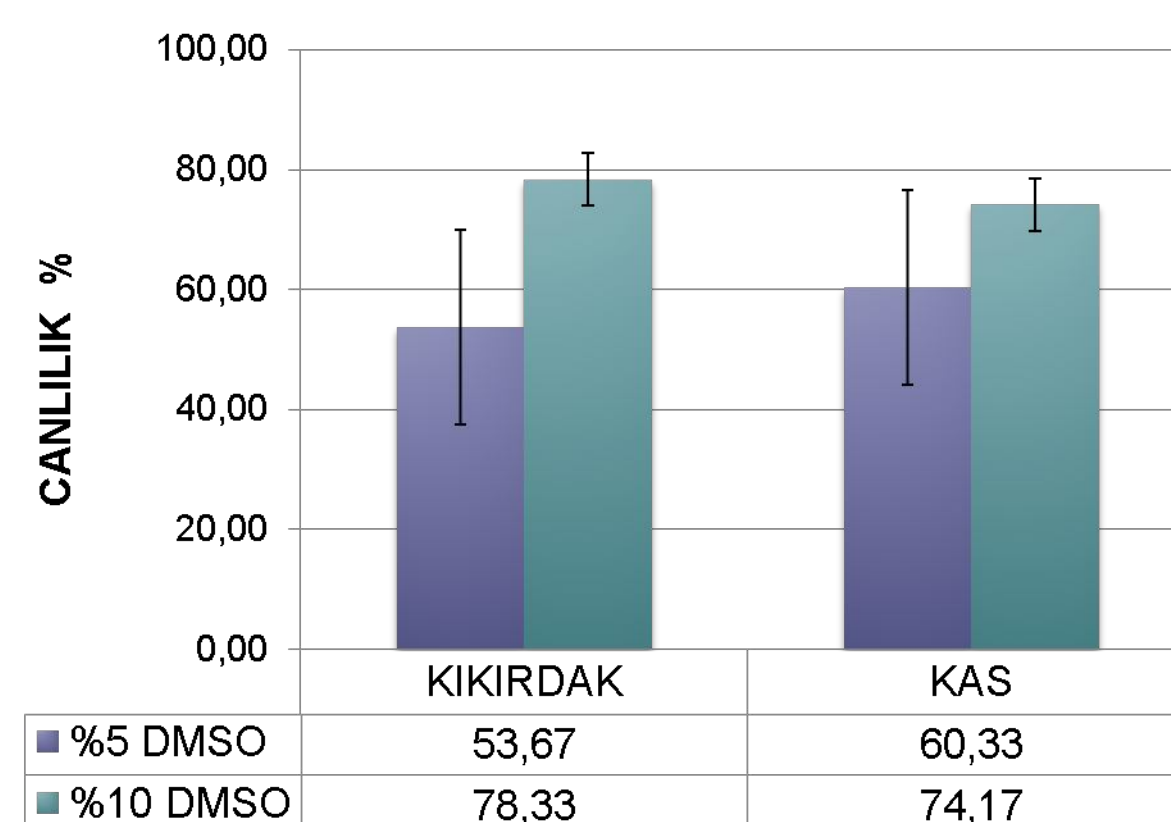


Soğutma hızının kas hücrelerinin mitotik aktiviteleri üzerine etkisi



Farklı yöntemlerle dondurulup çözülen hücrelerin fizyolojik aktivitelerinin tayini için MTT testi yapılmıştır. Kas hücreleri ekildikten 96 saat sonra, kıkırdak hücreleri ekildikten 96 ve 168 saat sonra analiz edilmiştir. Sonuçlar, vitrifikasyonla dondurulan hücrelerin mitotik aktivitelerinin yavaş dondurulan hücrelerden düşük olduğunu ortaya koymuştur. Bunun sebebinin vitrifikasyonda kullanılan yüksek kriyoprotektan konsantrasyonunun hücrelerde yarattığı fizyolojik harabiyet olduğu düşünülmektedir. Kriyoprotektan konsantrasyonunda yapılacak değişikliklerin denemesi ile daha iyi sonuçların alınıp alınmayacağı araştırılmalıdır.

DMSO konsantrasyonunun dondurma başarısı üzerine etkisi



Türler arası dondurma başarısı

