



Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü Isolation and Culture of Vascular Smooth Muscle Cells

Zehra Gül Koçaklı¹, Kübra Akıllıoğlu¹, Ayşe Doğan¹

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı, Adana, Turkey

ABSTRACT

Smooth muscle cells is the major component of the vascular structures such as artery and vein. The main task of these cells is to provide vascular tone by vasoconstriction and vasodilation. The culturing of these cells is important to study smooth muscle cell function and various cardiovascular diseases at cellular levels. The aim of this article was to review current general information on isolation and culture of vascular smooth muscle cells.

Key words: Vascular smooth muscle, cell culture, nutrient medium, culture types, cell viability

ÖZET

Düz kas hücreleri, arter ve ven gibi vasküler yapılarının en önemli kısmını oluşturmaktadır. Bu hücrelerin temel görevi, vazokonstriksiyon ve vazodilatasyon yaparak vasküler tonusu sağlamaktır. Düz kas hücresi fonksiyonlarının ve çeşitli kardiyovasküler hastalıkların hücre düzeyinde araştırılabilmesi açısından bu hücrelerinin kültüre edilmesi önemlidir. Bu derlemenin amacı güncel çalışmalar ışığında vasküler düz kas hücrelerinin izolasyonu ve kültüre edilmesi hakkındaki genel bilgilerin gözden geçirilmesidir.

Anahtar kelimeler: Vasküler düz kas, hücre kültürü, besi ortamı, kültür tipleri, hücre canlılığı

Giriş

Homeostazın devam ettirilmesi ve insan vücuduna gerekli besin maddelerinin sağlanması için vasküler yapının normal ve sağlıklı olması oldukça önemlidir. Kan damarlarının bütünlüğünde meydana gelen herhangi bir hasarlanma, çeşitli komplikasyonlara yol açmaktadır. Kardiyak ve periferik damar hasarları, dünyada ölüm ve hastalıkların önemli nedenlerindedir. Bu



hastalıklar için yapılan tedaviler hasarlı damarın iyileşmesi için yeterli olmamaktadır. Günümüzde bilim ve teknolojinin giderek artan avantajları, tedavilerin geliştirilmesinde yeni yöntemleri de beraberinde getirmektedir. Hücre düzeyinde yapılan çalışmalar ise bu hastalıkların önlenmesi ya da tedavisi için etkili yöntemlerin bulunmasına yardımcı olacaktır. Ayrıca mekanik ve biyolojik olarak damar özelliklerini yerine getirebilme yeteneği olan yapıların elde edilmesi tedavi için yeni bir yaklaşım olarak düşünülmektedir^{1,2}.

Vasküler yapının önemli bir parçasını oluşturan düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol eden mekanizmaların daha iyi anlaşılması, vasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde oldukça önemli olacaktır. Ayrıca, *in vitro* yapılan çalışmalarda, hücre farklılaşma süreci ve bu sürecin sinyal yollarının aydınlatılması, hasarlı damarın onarımına katkı sağlayacaktır^{1,2}.

Hücre Kültürünün Tarihi

Hayvan hücrelerinin, canlı vücudunun dışında incelenebilmesi amacıyla Harisson tarafından 1907 yılında hücre kültürü keşfedilmiştir. Hücrenin vücut dışında kültüre edilmesi, vücudun normal homeostazisi nedeniyle ortaya çıkacak sistemik değişikliklere yol açmasından ve bunların deney üzerinde olumsuz etkilerinden bağımsız olarak, hücreyi inceleme imkânı sağlamıştır³. Harrison hayvan modeli olarak, öncelikle kurbağayı seçmiş ve doku parçalarının vücut dışında canlılığını koruyabilmesini amaçlamıştır. Harison'dan sonra bu çalışmalar farklı araştırmacılar tarafından da devam ettirilmiştir. Earle ve arkadaşları 1943 yılında farelerde tümör hücrelerini izole edebilmeyi başarmış ve 1961 yılında Leonard Hayflick hücrelerin, kültür ortamında sınırlı yaşam süresine sahip olduklarını rapor etmiştir³. Bu konu üzerine yapılan çalışmaların giderek ilerlemesiyle, hücre içerisinde gerçekleşen aktiviteleri, hücrenin bulunduğu ortam, hücrelerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve bunlara karşı verilen tepkileri hücresel boyutta inceleme ve değerlendirebilme imkânı sağlamıştır.

Hücre Kültürüne Etki Eden Faktörler

Araştırmalara olanak sağlamak amacıyla, vücut dışında hücrenin canlılığını devam ettirilmesinin çeşitli avantajları ile birlikte dezavantajları da mevcuttur. *In vitro* hücre kültürünün en önemli avantajı sıcaklık, osmotik basınç, pH, O₂ ve CO₂ yoğunluğu gibi fizikokimyasal koşulların kültür ortamında kontrolünün sağlanabilmesi ve buna bağlı olarak fizyolojik koşulların sabit tutulabilmesidir. Bu şartların sağlanabilmesi için besiyerlerinde

çeşitli maddelere gereksinim duyulmaktadır. Hormon, serum ve aminoasit gibi çeşitli maddelerin, hücre tipinin ihtiyacına göre gerekli miktarlarda kültür ortamına verilmesi oldukça önemlidir³. Hücre kültürünün bir diğer önemli avantajı, araştırmacının özel bir hücre tipi üzerinde çalışmasına olanak sağlamasıdır. Dokular çok çeşitli hücre tiplerini içerebilmektedirler. Dokudan elde edilen hücrelerden, zaman içerisinde tekrarlanan pasajlama işlemleri ile istenilen asıl homojen hücre elde edilebilmektedir. Hedeflenen hücreye ulaşıldıktan sonra, hücreler başka araştırmalar için ve tekrarlı deneylerde kullanılmak üzere uygun şartlar altında uzun yıllar saklanabilmektedir.

Hücrelerin kültüre edilmesinin oldukça önemli olan bu avantajlarının yanı sıra, ne yazık ki bazı dezavantajları da mevcuttur. Kültür çalışmaları sırasında meydana gelen kontaminasyon, çalışma verimliliğinde azalmaya neden olan en önemli problemdir. Kültür ortamında bakteri ve mantar bulunması, hücrelerin gelişmesini ve çoğalmasını oldukça yavaşlatmaktadır. Bu problemi en aza indirmek için çalışmaların, uygun steril koşullar altında gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bir diğer önemli problem ise, hücrelerin uzun süre pasajlanması durumunda, hücrelerin farklılaşma kapasiteleri ve heterojenite oranları artmaktadır. Bu nedenle, çalışmalar sırasında ilk birkaç kuşak hücrelerinin kullanılması oldukça önemlidir³.

Besiyeri

Hücrelerin *in vitro* çalışma koşulları altında yaşamlarını devam ettirebilmeleri için normal fizyolojik çevrelerinin sağlanması gerekmektedir. İdeal kültür ortamının sağlanmasında besiyeri önemlidir. Hücre kültür besiyerleri, hücrelerin normal metabolik aktivitelerini yerine getirebilmeleri için gerekli olan ortam koşullarını sağlamak üzere hazırlanmış besleyici solüsyonlardır⁴.

Besiyeri içeriğindeki aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlar hücrenin gelişimini desteklerken, bazı iyonlar da hücrelerin çoğalabilmesi için uygun osmolarite ve pH'ın sağlanmasında önemlidir. Besiyeri seçimi sırasında farklı hücrelerin farklı besin ihtiyaçları olacağı mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır. Bu sebeple tek bir hücre serisinin gelişmesine yönelik bir çalışma yapılacaksa bu özellikleri taşıyan besiyeri seçilmelidir⁵.

Harry Eagle tarafından 1955'de hücre kültür ortamı olarak Eagle'ın Temel Besiyeri (Eagle's Minimal Essential Medium, EMEM) geliştirilmiştir. Sığır, insan veya embriyo özütleri ile desteklenerek hazırlanan ve ticari olarak kullanılan ilk besiyeridir⁶. Bu besiyerinin içeriğinde

aminoasitler, tuzlar (CaCl_2 , KCl , MgSO_4 , NaCl ve monosodyum fosfat), glukoz ve vitaminler (folik asit, nikotinamid, riboflavin, B_{12}) bulunmaktadır.

Günümüzde tek bir hücre serisinin geliştirilmesine yönelik en çok kullanılan Eagle'ın Temel Besiyeri (1959) ve Dulbecco tarafından modifiye edilen Eagle Besiyeri'dir (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM). Dulbecco's Modified Eagle's Medium, EMEM'in bir çeşididir ve orjinal formundan dört kat daha fazla vitamin ve aminoasit ile iki kat daha fazla glukoz içermektedir. Ayrıca, demir ve fenol kırmızısı da bulunmaktadır⁶. İnsan, maymun, hamster, sıçan, fare ve tavuk gibi pek çok hücre tipi için DMEM kullanılmaktadır.

Besiyerine eklenen serum, hücre çoğalmasını ve tutunmasını etkileyen çok sayıda büyüme faktörü, mineral, lipit ve hormonları içermektedir. Yetişkin sığır serumu, fetal sığır serumu, dana, at ve insan serumları doku kültürlerinde kullanılan temel serum tipleridir. Rutin çalışmalarda en fazla fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS) kullanılmaktadır. Diğer serum tipleri daha çok, özel koşul sağlanması gereken hücre kültürlerinde tercih edilmektedir⁵.

Fetal sığır serumu, bir sığır fetüsünden alınan kanın doğal pıhtılaşmasından arıtılan kısmından hazırlanmaktadır. *In vitro* hücre kültüründe serum kullanılan çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu protein çözeltisinin içinde hormonlar, enzimler, hücrenin büyümesi ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan hücrelerarası matris proteinleri bulunmaktadır. Hücre çeşidine ve uygulama alanlarına göre besiyerindeki serum oranı değişebilmektedir. Standart bir somatik hücre kültüründe serum oranı %10'dur. Farklı hücre kültürü uygulamalarında, pek çok büyüme faktörü ve az miktarda antikor da bulunabilmektedir. İçerdiği büyüme faktörleri ile hücrelerin çoğalmasını arttırırken çeşitli proteinler ile hücrelerin kültür ortamında daha kolay tutunması için olarak sağlamaktadır⁷.

Büyük miktarlarda protein ve nükleik asit sentezinin gerçekleştiği ve enerji ihtiyacının en fazla olduğu dönemde, hücrelerin gelişimine destek amacıyla glukoz yanında glutamin de gerekmektedir. Zira hücreler nükleotid, aminoasit, amino şeker ve vitamin gibi bazı moleküllerin sentezi için azota ihtiyaç duymaktadır. Glutamin ise bu moleküllerin ve diğer azot içeren bileşiklerin sentezinde azot kaynağı olarak rol oynamaktadır. Hızlı bölünen hücrelerde, kültür ortamında glukoz miktarı azalmakta ve enerji ihtiyacı artmaktadır. Bu

durumda daha fazla enerji elde etmek için aminoasitler metabolize edilmektedir. Glutamin bu enerjinin elde edilmesinde en çok kullanılan aminoasitlerden birisidir⁸.

Hücre kültür ortamının sağlanmasında kullanılan, dengeli tuz çözeltisi (Balanced Salt Solution, BSS) fizyolojik pH'ı ve tuz konsantrasyonunu sağlayan bir solüsyondur. Dengeli tuz çözeltisi çoğunlukla sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum ve klor içermektedir. Bu çözelti dokuları ve hücreleri yıkamak için kullanılmakla birlikte fizyolojik pH'ı ve osmotik basıncı sağlamaktadır. Bazı durumlarda bu çözeltiye enerji kaynağı olarak glukoz eklenmekte ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısı kullanılmaktadır⁹.

Dengeli tuz çözeltisini, mikrobiyolog John H. Hanks 1940 yılında formüle ederek, bikarbonat iyonlarınca zengin Hanks'in dengeli tuz çözeltisini (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS) kullanmıştır. Bu solüsyon aynı zamanda hücrelerin gelişimi için bir tamponlama sistemi olarak hücre kültürü ortamını ve uygun fizyolojik pH'ı (7.0-7.4) sağlamaktadır¹⁰.

Kültür çalışmalarında fizyolojik pH stabilitesini sağlamak üzere HEPES kullanımı oldukça yaygındır. Özellikle protein çözeltilerin dondurulmasında kullanılır. Birçok tamponda gözlenen donma sonucundaki asitlik artışı HEPES tamponu varlığında, ihmal edilebilir düzeye düşmektedir. Enzim ve koenzimleri denatürasyon ve inaktivasyondan korumaktadır. Bununla birlikte, belirli hücre serilerinin gelişimini teşvik ettiği bildirilmektedir¹¹.

Kültür ortamında meydana gelebilecek kontaminasyonları engellemek amacıyla antibiyotikler kullanılmaktadır. Bakterilerin gram +/- özelliklerine bağlı olarak farklı etki mekanizmalarına sahip antibiyotikler tercih edilebilmektedir. Çalışma sırasında, laminar akım kabin kullanımı ve steril koşulların sağlanması kontaminasyon riskinin azalmasına katkıda bulunmaktadır⁵.

Fizikokimyasal Faktörler

Kültür çalışmalarında, uygun fizikokimyasal şartların sağlanması durumunda hücrelerin vücut dışında canlılığını devam ettirebilmesine olanak sağlanmaktadır.

pH

Çoğu hücreler için en verimli gelişim pH 7,2-7,4 aralığında gerçekleşmektedir. Kültür ortamındaki hidrojen iyonu konsantrasyonunda meydana gelecek değişiklikler, hücrelerin çoğalmasını olumsuz yönde etkilemektedir⁴. Bu nedenle çalışma öncesi, kullanılacak olan dokuya uygun pH'ın belirlenmesi, çalışmanın ilerlemesi açısından oldukça önemlidir.

Sıcaklık

Hücreler için gerekli uygun sıcaklık canlının ve hücrelerin köken aldığı dokunun vücut içi sıcaklığına bağlıdır. Bu nedenle, sıcakkanlı canlılardan kültüre edilen hücreler için gerekli uygun sıcaklık genellikle 37°C'dir. Sıcaklığın hücreler üzerindeki direkt etkisinin yanında, düşük sıcaklıkta CO₂ çözünürlüğünün artması pH değişikliğine neden olmakta ve pH'daki değişimler ise hücre çoğalmasını baskılamaktadır.

CO₂ ve O₂

Kültür besiyeri içerisinde CO₂ ile HCO₃⁻'in dengede olmasıyla pH'ın düşük kalması sağlanmaktadır. Hücre kültürü için gerekli olan pH'ın 7,4'de sabit bir şekilde kalabilmesi için CO₂'e ihtiyaç vardır ve hücre tipine göre değişmekle birlikte %2-5 arasında olmalıdır. Bu nedenle kültüre edilmiş hücreler, karbondioksit bulunmayan ortamda inkübe edilmemelidir.

Kültürde bir diğer önemli gaz oksijendir. Kültür hücreleri oksijensiz solunum yapmasından dolayı oksijene tam olarak bağımlı değillerdir. Hücre tiplerine göre, ihtiyaç duyulan oksijen miktarı farklı olmaktadır. Çoğu hücreler için, atmosfer basıncı ya da düşük oksijen basıncı gerekirken¹³, geç dönem embriyoları oksijenden zengin ortama ihtiyaç duymaktadırlar¹⁴.

Hücre Kültür Tipleri

Dokulardan hücre kültürü yapılabilmesi için üç temel yol bulunmaktadır. Bunlar organ kültürü, primer eksplant ve hücre kültürüdür⁵.

Organ Kültürü

İn vivo yapısal özelliklerini taşıyan dokunun kültür ortamında, in vitro olarak gerekli koşullar altında yaşatılmasını amaçlayan kültür tipidir.

Primer Eksplant Kültür

Bu kültür tekniği, organizmadan alınan küçük bir doku parçası üzerine plazma sıvısı ve embriyo özütlerinin eklenmesi ile geliştirilen kültür tipidir. Dokunun kültür yüzeyine yapışması plazma tarafından sağlanırken, embriyo özütü hücrelerin gereksinim duyduğu besin maddelerini ortama vermektedir. İçerisinde sıvı besiyeri bulunan plastik veya cam kültür kabına küçük doku parçaları yerleştirildikten sonra yüzeye tutunan doku parçalarından hücrelerin ayrılarak çoğalmalarının sağlandığı bir yöntemdir¹⁵.

Hücre Kültürü

Kültüre edilmek istenilen dokunun mekanik veya enzimatik olarak parçalanması ile elde edilen süspansiyonun kültür kabına ekimi yapılarak hücrelerin tek tabakalı olarak çoğalmasını amaçlayan kültür tipidir^{5,15}.

Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu, Hücrelerin Kültüre Edilmesi ve Pasajlanması

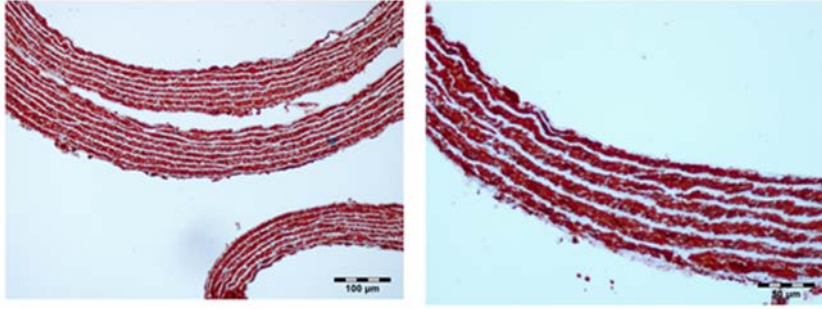
Düz kas hücresi, kan damar duvarını oluşturan önemli hücrelerden biridir. Düz kas hücreleri, endotelial hücreler tarafından salgılanan mediatörlerin etkisi altındaki mezenkimal hücrelerin diferansiyasyonu ile oluşmuştur. Anjiyogenezde, vasküler düz kas hücreleri, bu yolla veya mevcut bulunan vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu ile oluşabilmektedir¹⁶.

Canlı organizmalarda, vasküler düz kas hücrelerinin kontraktıl ve sentetik tip vasküler düz kas hücreleri olmak üzere iki fenotipi bulunmaktadır. Genelde, olgun vasküler düz kas hücreleri, kontraktıl özelliktedir. Bu vasküler düz kas hücrenin temel fonksiyonu, vasküler tonusu sağlamaktır¹⁶. Kontraktıl vasküler düz kas hücreleri sitoplazmalarının %75'ni kontraktıl proteinler oluşturmaktadır. Ancak kültüre edilmiş vasküler düz kas hücrelerinde kontraktıl fenotip, sentetik fenotip vasküler düz kas hücrelerine dönüşebilmektedir. Sentetik fenotipteki hücreler normalde gelişim devresindeki ve emriyodaki genç damarlarda bulunmaktadır. Bu proliferatif hücreler, elastin ve kollojen gibi ekstraselüler matriks komponentlerini sentezlemektedir. Sentetik fenotipteki hücrelerin sitoplazmasında büyük miktarda endoplazmik retikulum, golgi aparatı ve az miktarda kontraktıl pteoinler bulunmaktadır¹⁶.

Vasküler düz kas hücresinin kontraktıl fenotipten, sentetik tipe değişimi aterogenezde oldukça önemlidir. Zira miyoendotelde kalınlaşmaya ve arter tıkanmasına neden olur. Endoteldeki hasara bağlı olarak düz kas hücrelerinin kanla karşılaşmasından kaynaklanabilir. Bu fenotipler, vasküler düz kas hücrelerinin izolasyonu ve kültüre edilmesi ile gösterilebilmektedir. Vasküler düz kas hücresinin izolasyonunda iki temel teknik kullanılmaktadır. Bu teknikler, enzimatik ayrıştırma ve ekplantasyondur. Enzimatik ayrıştırmada, kontraktıl fenotipte hücre kolaylıkla fakat az sayıda elde edilirken, ekplantasyonda 1-2 hafta içerisinde daha fazla sayıda sentetik tipte hücre elde edilmektedir¹⁶.

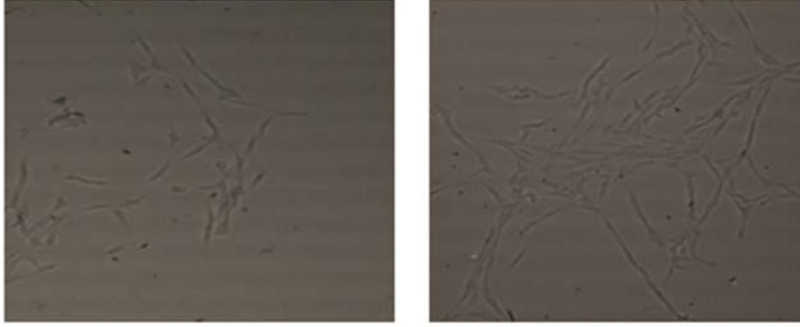
Hücrelerin Pasajlanması

İnsan ya da hayvandan alınan dokulardan elde edilmiş kültür, primer kültür olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1). Primer kültür hücreleri genelde heterojen tiptedir yani birden fazla hücre çeşidini içerebilmektedir. Pasajlama sonrası elde edilen kültür ise alt kültür olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2,3). Alt kültür ile elde edilen hücreler alındıkları dokunun yapısal özelliklerini ve farklılaşma yeteneğini zaman içerisinde yitirmektedirler⁵.

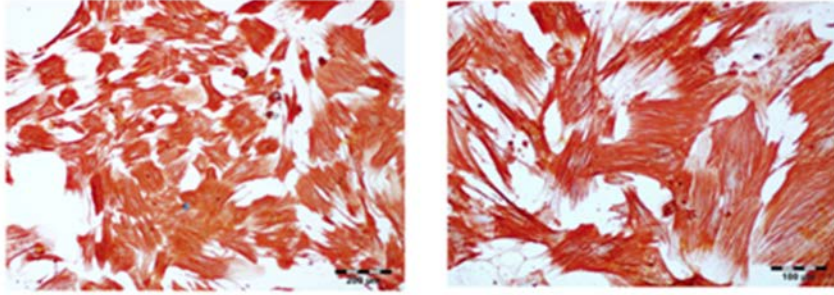


Şekil 1. Düz Kas Aktin İle Boyanan Sıçan Torasik Aortasına Ait Vasküler Düz Kas Dokusu¹⁷.

Hücreler, kültür kabı yüzeyini tamamen kaplayacak yoğunluğa ulaştığı zaman hücrelerin birbirleriyle olan etkileşiminin artması ve metabolik aktiviteleri sonucu ortamda atıkların birikmesi, hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını büyük oranda azaltmaktadır⁵. Bu durumda, kültür hücrelerinin yeni kültür kaplarına daha az yoğunlukta hücre içerecek şekilde aktarılması gerekmektedir. Kültür kabı içerisinde hücreler birbirlerine ve kap yüzeyine tutunmuş halde bulunmaktadır. Hücrelerin tutunması, ekstraselüler sıvıdaki Mg^{++} ve Ca^{++} iyonları ile sağlanmaktadır. Pasajlama esnasında, hücrelerin birbirleri ve yüzey ile olan bu bağlantılarının yıkılması gerekmektedir⁵. Bağlantıların yıkılmasıyla hücrelerin besiyeri içerisinde süspanse halde yüzüyor görüntüsü mikroskop altında incelenebilmektedir. Pasajlama esnasında hücrelerin yüzeyden kaldırılması tripsin adı verilen ve peptit bağlarının hidrolizine neden olan bir enzim tarafından gerçekleştirilmektedir. Ancak adezyonu sağlayan Mg^{++} ve Ca^{++} iyonlarının ortamda bulunması enzim aktivitesini düşürmektedir. Ortamdan Mg^{++} ve Ca^{++} iyonlarını uzaklaştırılması EDTA ile sağlanmaktadır. Divalent katyonların şelatörü olan EDTA, tripsin solüsyonunun aktivitesini artırmaktadır¹⁸.



Şekil 2. Sıçan Torasik Aortasından İzole Edilen Düz Kas Dokusunun Kültürü¹⁷. a) Kültüre edilmesinin 5. gününde, b) 8. gününde düz kas hücreleri.



Şekil 3. Düz Kas Aktin İle Boyanan Vasküler Düz Kas Hücreleri¹⁷.

Hücre Sayımı

Kültüre edilen hücrelerin sayısının belirlenmesi, yapılan deneyde hücrenin aktivitesi ve deney koşullarının hücre üzerindeki etkisi hakkında bilgi vermektedir. Bu amaçla hücre sayısının belirlenmesi için bazı kantitatif değerlendirmeler yapılmaktadır.

Hücre sayımının kantitatif analizi için hemositometre ya da dijital hücre sayım cihazları kullanılmaktadır. Hemositometre ile sayımda, derinliği ve hacmi bilinen özel lamplar kullanılmaktadır. Hazırlanılan hücre süspansiyonu lam üzerine bir damla alınmakta ve mikroskop altında, birim hacimde ne kadar hücre olduğu sayılmaktadır⁵.

Kullanılan bir protokole göre 0,1 mL örnek alınıp 2 mL'ye seyreltilen süspansiyondan hemositometre lamının her dış köşesindeki karelere 1'er damla damlatılmakta ve ışık mikroskobu altında dört dış karedeki hücreler sayılmaktadır. Her bir karedeki ortalama sayıyı belirlemek için ise bulunan değer 4'e bölünerek sonuç, hücre sayısı $\times 10^4$ olarak ifade edilmektedir. Bu sonuç da 20 ile (seyreltme faktörü) çarpılarak mililitre süspansiyon başına düşen hücre sayısı elde edilmektedir¹⁹.

Dijital hücre sayım cihazları ile sayımda ise, cihaza ait özel bir tüp içerisine hücre süspansiyonu yerleştirilmektedir. Tüp içerisindeki hücrelerin elektrik geçirgenliğinin artırılması ile dalgalar oluşmakta ve oluşan bu dalgaların sayımı ile hücre sayısı belirlenmektedir⁵.

Hücre Canlılığı

Hücre canlılığının belirlenmesinde hemositometre ile birlikte vital bir boya (tripan mavisi) kullanılmaktadır¹⁹. Bu yöntemde hazırlanan hücre süspansiyonuna tripan mavisi eklenerek ışık mikroskobu altında hücrelerin canlılığı incelenebilmektedir. Tripan mavisinin etkisi ile ölü hücreler koyu mavi renkte boyanırken, canlı hücreler parlak ve boyanmadan kalmaktadır.

Sonuç

Hücre kültürü üzerine yapılmış çalışmalarda özgün büyüme faktörleri kullanılarak çeşitli dokulardan vasküler düz kas hücreleri çoğaltılmaktadır. Bu çalışmalarda vasküler düz kas hücreleri için alternatif kaynaklar olarak, deriden elde edilmiş öncül hücreler, emrionik kök hücreler ve pluripotent kök hücreler kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu ile damar oluşumunun geliştirilmesi, damar mühendisliği ve hastaya özgü nakil çalışmaları üzerinde ilerleme sağlamaktadır. Literatürde farklı dokulardan, hatta aynı dokunun farklı segmentlerinden vasküler düz kas hücrelerinin çoğaltıldığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır¹. Nanoteknoloji alanından yararlanılarak vasküler düz kas kültür hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda vasküler hastalığı önleyecek genetik bilginin hücrelere aktarılmasının başarıyla gerçekleştirildiği ileri sürülmektedir²⁰. Bu durum nanoteknolojiden yararlanılarak hücre kültürü üzerinde önemli adımlar atılabileceğini göstermektedir.

Vasküler düz kas hücre kültürü üzerinden yürütülen tüm bu çalışmalar vasküler hastalıkları hücre düzeyinde inceleme imkanı sunmakta ve tedavi süreci üzerine önemli katkılar

sağlamaktadır. Ayrıca Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından TF2012BAP28 No'lu proje kapsamında desteklenen ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen vasküler düz kas hücre kültürü çalışmaları başarılı bir şekilde devam etmektedir.

Teşekkür

Hücre kültürü laboratuvar imkanlarından faydalanmamızı sağlayan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nurten Dikmen'e, düz kas aktin boyama olanağı sağlayan Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Suzan Zorludemir'e teşekkürlerimizi sunarız.

Kaynaklar

1. Chen YE, Xie C, Hamblin M. Smooth muscle cells for vascular engineering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:2772-4.
2. Xie C, Ritchie RP, Huang H, Zhang J, Chen YE. Smooth muscle cell differentiation in vitro models and underlying molecular mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:1485-94.
3. Harrison RG. Observations on the living developing nevre fibers. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1907;4:140-3.
4. Butler M, Christie A. Adaptation of mammalian cells to non-ammoniogenic media. *Cytotechnology.* 1994;15:87-94.
5. Yaylalı C. Tendon kılıfı fibroblastlarının hücre kültüründe tenositlere farklılaşması ve tenositlerin sentezlediği kollajen tiplerinin belirlenmesi (Yüksek lisans tezi). Ankara, Hacettepe Üniversitesi, 2007.
6. Pombinho AR, Laizé V, Molha DM, Marques SM, Cancela ML. Development of two bone-derived cell lines from the marine teleost *sparus aurata*, evidence for extracellular matrix mineralization and cell-type-specific expression of matrix gla protein and osteocalcin. *Cell Tissue Res.* 2004;315:393-406.
7. Jochems CE, Valk JB, Stafleu FR, Baumans V. The use of fetal bovine serum, ethical or scientific problem. *Altern Lab Anim.* 2002;30:219-27.
8. Sigmaaldrich. Erişim tarihi: 02.05.2014. Erişim: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-expert/glutamine.html>.
9. Jakoby W, Pastan I. *Methods in Enzymology.* San Diego, Academic Press. 1979.
10. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 2006;27:3675-83.

11. Oktar N. K562 hücre dizisinde fosfin bileşiklerinin sitotoksik etkisinin MTT (3-[4,5 dimethylthiazole-2-YL]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) ile araştırılması (Yüksek lisans tezi). Adana, Çukurova Üniversitesi, 2009.
12. Hanks JH, Wallace RE. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1949;71:196-200.
13. Baicu SC, Taylor MJ. Acid-base buffering in organ preservation solutions as a function of temperature, new parameters for comparing buffer capacity and efficiency. *Cryobiology.* 2002;45:33-48.
14. Laken HA, Leonard MW. Understanding and modulating apoptosis in industrial cell culture. *Curr Opin Biotechnol.* 2001;12:175-9.
15. Cooper PD, Burt AM, Wilson JN. Critical effect of oxygen tension on rate of growth of animal cells in continuous suspended culture. *Nature.* 1958;182:1508-9.
16. De Ridder L, Mareel M. Morphology and 125I-concentration of embryonic chick thyroids cultured in an atmosphere of oxygen. *Cell Biol Int Rep.* 1978;2:189-94.
17. Arıkan H. İnsan korpus kavernozum hücre kültürü oluşturma (Uzmanlık tezi). İzmir, Dokuz Eylül Üniversitesi, 2008.
18. Morgan J. *Methods in Molecular Medicine Angiogenesis Protocols.* New Jersey, Humana Press, 2001.
19. Kocaklı ZG, Akıllıoğlu K, Doğan A. Sıçanda aort düz kas izolasyonu ve kültürü. *Kırkıncı Ulusal Fizyoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı.* 2014.
20. Türkoğlu N, Güven G, Kutsal T, Bişkin E. Polikationik nanopartiküller kullanılarak primer düz kas hücrelerinin transfeksiyonu. *Yedinci Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi Bildiri Özet Kitabı,* 2006.

Correspondence Address / Yazışma Adresi

Zehra Gül Koçaklı
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı
Adana, Turkey
e-mail: zkocakli34mail.com