

Primer nöron kültürü tekniği

Primary neuronal cultures

Dr. Erdiñ Dursun / İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Dr. Duygu Gezen-Ak / İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
Dr. Selma Yılmaz / İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

İletişim adresi: Prof.Dr.Selma Yılmaz, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, Türkiye
drselmayilmazer@gmail.com
Tel. 0212 4143000-21627

ÖZET

Çeşitli dokulardan izole edilen hücreler ile hazırlanan hücre kültürleri müşterek bazı özellikler gösterir. Kültürdeki hücreler önce büyüme fazı denilen hızlı bir bölünme sürecine girerler. Daha sonra birbirine yaklaşarak temas eden hücreler bölünmeyi yavaşlatır ve alındıkları dokunun karakteristik özelliklerini kazanmak üzere farklılaşma sürecine girerler. Örneğin, böbrek veya barsak epitel hücreleri aralarında bağlantılar oluşturarak birbirleriyle ilişki kurarlar ve iyonların bir hücreden diğerine taşınmasını sağlarlar; kalp kası hücreleri kendi kendilerine kasılmaya başlarlar. Nöronlar için durum oldukça farklıdır. Embriyonik beyinden elde edilen sinir hücreleri kültüre edildiğinde, bölünmeyi tamamen durdururlar. Bu hücreler nöritlerini uzatıp birbirleri ile temas eder ve sinaps oluştururlar böylece elektriksel olarak aktif duruma geçerler. Bu özellikler nöron kültürünü diğer hücre kültürlerinden farklı kılar. Bu hücrelerden köken alan hücre soyları nöron özelliklerini tam olarak gösteremezler. Bu yüzden özellikle nörodejenerasyon mekanizmalarının araştırılmasında primer nöron kültürlerinin kullanılması önem taşımaktadır. Biz bu yazımızda primer nöron kültürü hazırlanması konusunda bilgi ve deneyimlerimizi aktararak benzer konularda nöron kültürleri ile çalışmak isteyen araştırmacılara katkıda bulunmayı amaçlamaktayız.

Anahtar kelimeler: primer kültür, nöron kültürü, korteks, hippocampus, nörodejenerasyon

ABSTRACT

Cell cultures that are prepared from the isolated cells of different tissues share common features. Cultured cells first enter a fast proliferation process that is called growth phase. Later, the cells that contact each other slow down the proliferation and enter differentiation process in order to gain the characteristic features of the tissue that they were harvested. For example kidney or intestine epithelial cells communicate with connections and allow ion transportation; heart muscle cells contract by themselves. The situation is different for neurons. The neurons that gathered from embryonic brain completely stop proliferating when they are cultured. These neurons contact to each other by the neurites that they grow, form synapses and become electrically active. These properties distinguish neuronal cultures from other cell cultures. The cell lines that are originated from these cultures do not show the characteristic features of the neurons completely. Thus it is important to use primary neuronal cultures while investigating the mechanisms of neurodegeneration. In this article our aim is to contribute to the researchers that are interested in similar subjects by sharing our knowledge and experience about preparing primary neuronal cultures.

Key words: primary cultures, neuronal cultures, cortex, hippocampus, neurodegeneration

Primer Hücre Kültürleri

Bir deney hayvanından veya herhangi bir canlı organizmada alınan hücre veya dokulardan hazırlanan kültürler "primer kültür" denir. Kültürdeki hücreler alındığı dokunun özelliğine göre bölünür veya bölünmez, farklılaşır ve ölürler. Bir sonraki deney için ihtiyaç duyulan dokunun yeniden alınması ve yeni bir kültür oluşturulması gerekir.

Bölünen hücrelerden hazırlanan kültürler pasajlanıp tekrar büyüme fazına girmeleri sağlanarak sayıları artırılabilir. Fakat zamanla bu kültürlerdeki farklılaşmış hücre sayısı artar, bölünme hızı yavaşlar ve sonuçta hücreler ölürler. Glia hücreleri en azından bir kaç jenerasyona kadar pasajlanabilirken, nöronlar gibi bölünmeyen postmitotik hücreler için bu söz konusu değildir.

Sonsuz sayıda pasajlanabilen ve sabit bir fenotip gösteren hücreler ise "devamlı hücre soyları" olarak isimlendirilirler. Bu hücre soyları pasajlama sırasında kendiliğinden oluşan mutasyonlar sonucu ortaya çıkarken, bir çoğu da tümör hücrelerinin kültüre edilmesi ile elde edilir. Devamlı hücre soyları ölümsüz olmalarının yanısıra, normal hücrelerden farklı bazı özelliklere de sahiptir: çok hızlı bölünürler, normal hücrelerde görülen kontakt inhibisyon özelliklerini kaybetmişlerdir ve alındıkları hayvana geri verilirlerse tümör oluştururlar. Bu tip hücreler "dönüşmüş (transforme) hücreler" olarak da isimlendirilirler. Devamlı hücre soylarının bir çok avantajları vardır. Bu hücreler uzun süre sıvı nitrojende dondurularak saklanabilir ve bu sayede farklı ülkelerdeki laboratuvarlar arasında nakledilebilir ve paylaşılabilirler. Uygun koşullarda saklandıklarında yıllarca kullanılabilirler.

Nörobiyolojik araştırmalarda kullanılmak üzere geliştirilen devamlı hücre soylarının kullanılmasında ortaya çıkan bir problem ise, bu hücrelerin nöronal farklılaşmanın bazı temel olaylarını gerçekleştirememesidir. Bunlar farklılaşmış nöronların karakteristik özelliği olan nörotransmitterleri, iyon kanallarını, reseptörleri ve nöronlara özgü proteinleri sentezleyen hücre soyları olmalarına rağmen, özgün bir nöron fenotipi üzerinde çalışmak için iyi bir model değildirler. Farklılaşmış bir sinir hücresine en yakın olan PC12 hücre soyu bile düzgün akson ve dendritler oluşturamaz ve sinaptik bağlantılar kuramaz. Bu yüzden halen bilinen hücre soyları merkezi sinir sistemi (MSS) üzerindeki çalışmalar için sınırlı ölçüde kaynak sağlar (1).

Primer Nöron Kültürünün Hazırlanması

Omurgalı veya omurgasız organizmaların, periferik

veya merkezi sinir sisteminin, nöron veya glia hücrelerinden primer hücre kültürü hazırlamak için bazı özel aşamalar vardır (1,2):

1-İlgilenilen nöron veya glia hücrelerinin bulunduğu dokunun elde edilmesi. 2-Hücrelerin uygun bir substrat üzerine ekilmesi. 3-Hücrelerin uygun bir kültür medyumunda içerisinde yaşatılması. 4-Steril koşulların sağlanması.

Primer nöron kültürü hazırlamak için kullanılan canlı türleri

Sıçan ve fare gibi memeli türleri nöron kültürü için gerekli dokuları sağlamak üzere en çok kullanılan laboratuvar hayvanlarıdır. Nöron kültürleri embriyonik veya neonatal dokulardan elde edildiğinden, hızla üreyen sıçan ve fareler, nöron kültürü için vazgeçilmez bir kaynak oluşturur. Ayrıca memeli olmaları nedeniyle insana yakın olan genetik özellikleri ile bakım ve üretimlerinin ucuz olması onları avantajlı hale getirmiştir.

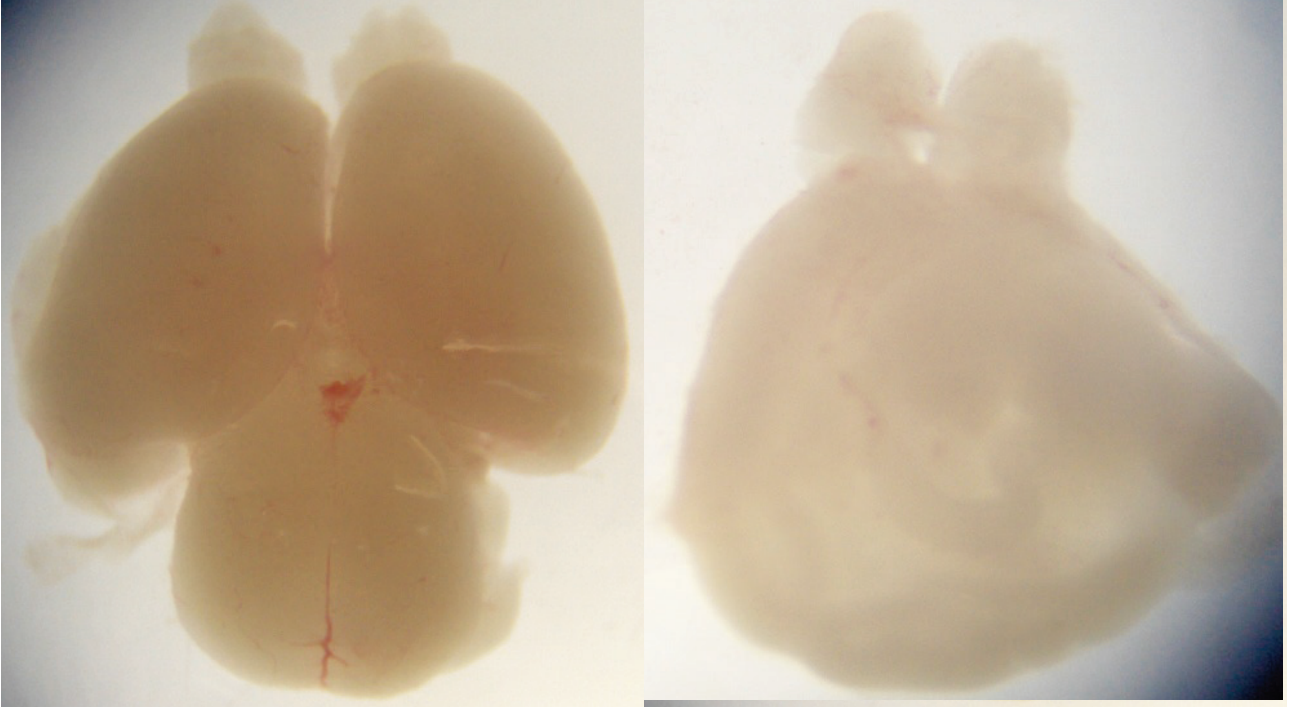
Bunun dışında diğer memeliler, memeli olmayan omurgalılar, omurgasızlar, tavuk embriyoları, Drozofila, kısacası sinir hücresi içeren tüm canlılar nöron kültürü yapmak için kullanılabilir (1).

Primer nöron kültürünün hazırlanacağı canlı türünün yaşı

Nöronlar henüz perikaryonları küçük, akson ve dendritleri yeterince gelişmemiş olduğu erken evrelerde hasara karşı daha dayanıklıdır. Ayrıca erken evrelerde trofik faktörlere de fazla bağımlı değildirler. Bu yüzden, nöron ve glia kültürleri genellikle embriyonik veya erken postnatal hayvan dokularından hazırlanır.

Primer nöron kültürü hazırlarken önemli olan husus, söz konusu nöronların postmitotik evreye girerek oluştuğu gelişim döneminin bilinmesidir. Örneğin serebellumun Purkinje hücreleri doğumdan hemen önce, granüler hücreleri ise doğumdan iki hafta sonra oluşurlar. Bu yüzden Purkinje hücre kültürü embriyonik hayvanlardan, granüler hücre kültürü ise postnatal hayvanlardan hazırlanmaktadır.

Serebral kortekse ait nöron kültürü 15. veya 16. embriyonik günde (E15-16) alınan serebral korteksten, hipokampusu ait nöron kültürü ise E18-19'da alınan hipokampusdan yapılır. Hipokampal kültür çalışmaları, bu nöronların E15'te oluşmaya başladığını ve E18-19'da göç ederek hipokampusu oluşturdukları ve postmitotik evreye geçtiklerini göstermiştir (1-3). Hipokampal nöronlar E19'da, kortikal nöronlar E16'da alındığında başarılı ve sağlıklı nöron kültürleri elde edil-



Şekil 1: Embriyodan elde edilen total beynin (A) ve hippocampusun (B) stereo mikroskop altındaki görüntüsü. Ok, hippocampusu göstermektedir

mektedir (4-8).

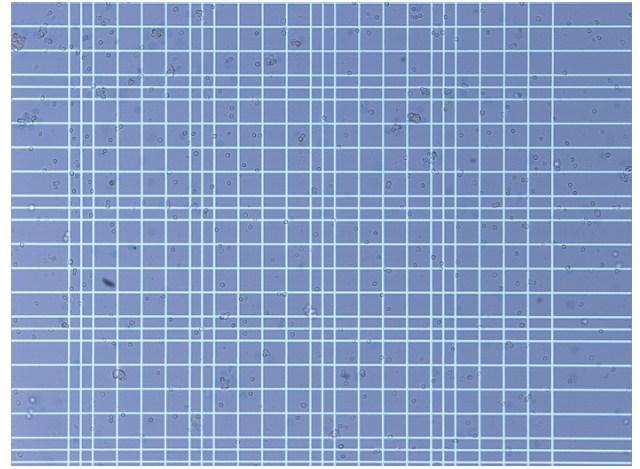
Embriyonik gün tayini için çiftleşmeye bırakılan dişi sıçanlardan vajinal yayma preparatı hazırlanarak fekdasyon kontrolü yapılır. Yayma preparatında sperm bulunan dişi sıçanlar hamileliğin 0. gününde kabul edilir (0. embriyonik gün; E0) (6).

Disseksiyon

Primer kültür hazırlanmasının ilk adımı gerekli dokunun disseksiyonla çıkarılmasıdır. Doğru embriyonik veya neonatal günde disseksiyon yapılması önemlidir (Şekil 1). Disseksiyon biyolojik güvenlik kabini altında yapılır ve doku aseptik koşullarda çıkarılır. İşlemler sırasında doku soğuk ortamda ve tuz ile dengelenmiş bir solusyon içinde tutulur (2,3). Disseksiyon işlemi genelde stereo mikroskop altında gerçekleştirilir. Kültüre edilecek nöronları içeren dokuların meningeal membranlardan temizlenmiş olması istenmeyen glia çoğalmasını önlemek üzere önemlidir (3).

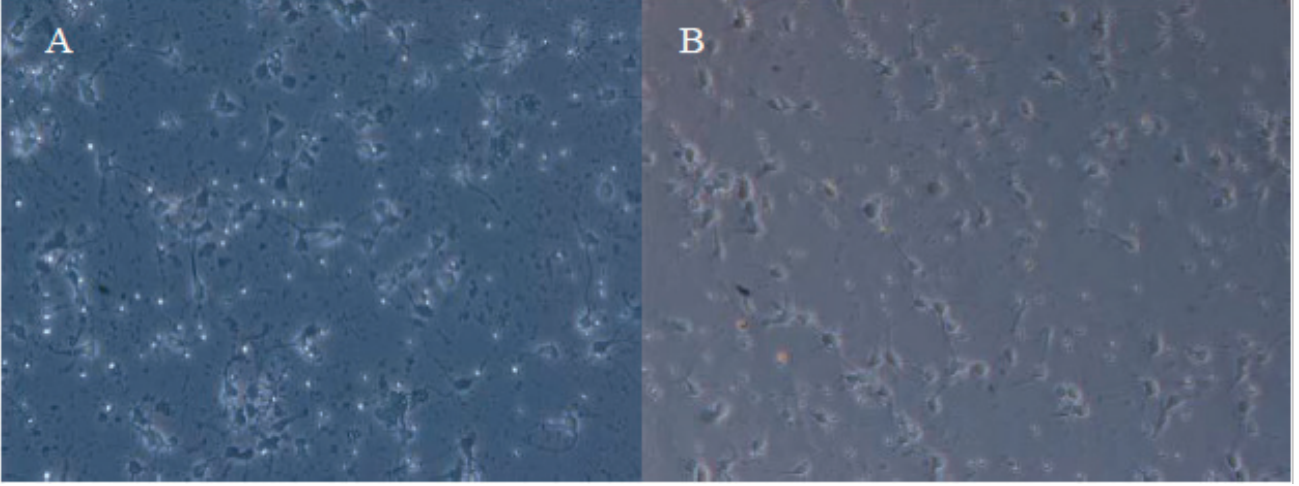
Dokunun hücreler halinde ayrılması

Disseksiyondan sonra doku tek tek hücreler halinde ayrılır. Güçlü hücre-hücre bağlantıları ve çok sayıdaki sinaps bu işi zorlaştırır. Sinapslar doku homojenize edildiğinde bile genellikle bozulmaz. Bu yüzden olgun beyin



Şekil 2: Hemositometreye yüklenen hücrelerin invert mikroskop altındaki görüntüsü

dokusundan primer kültür yapmak oldukça zordur. Genellikle dokular kalsiyum veya magnezyum içermeyen tuz ile dengelenmiş solusyonlar içinde parçalanır. Bazı durumlarda mekanik parçalama yeterli olurken hücre-hücre bağlantılarını ve sinapsları ortadan kaldırmak için genellikle proteazlar kullanılır. Kullanılan proteazlar hücre yüzey proteinlerini ve ekstraselüler matris proteinlerini hücrelere fazla zarar vermeden parçalarlar. Fakat bu işlem sırasında diğer hücre yüzey reseptörleri de etkilenebilir. Örneğin, tripsin uygulaması nörotrans-



Şekil 3: 3 günlük primer hipokampal (A) ve kortikal (B) nöronların faz-kontrast mikroskobu ile görünüşü, büyütme 20x

mitter reseptörlerinin bazılarını yok eder, bu reseptörler ancak kültürün birinci gününden sonra tekrar oluşabilir (1). Bu yüzden özellikle RNA ve protein izolasyonları yapılacaksa hücreleri yapıştırdıkları yüzeyden enzim yerine kazıyıcı aletler kullanarak kaldırmak gayet başarılı sonuçlar vermektedir (4-8).

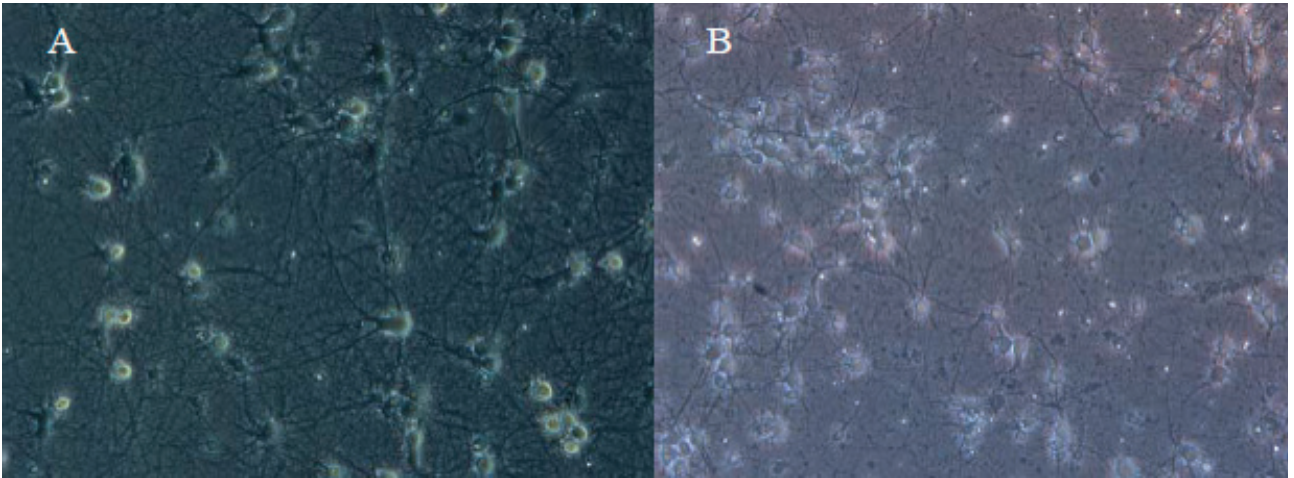
Kültürü yapılacak özel hücre popülasyonlarının eldesi

Dokunun parçalanmasından sonraki aşama, kültürü yapılmak istenilen hücre tipinin yaşatılması, istenilmeyenlerin ise yok edilmesidir. En basit yöntemlerden biri farklı adezyon özelliklerine göre hücreleri ayırmaktır. Nöronlar ve bazı glia hücre tipleri herhangi bir substrat uygulanmamış olan cam veya plastik yüzeye oldukça

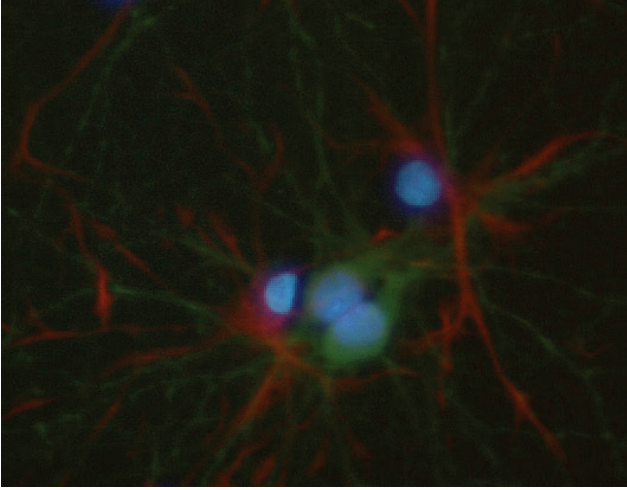
zayıf bir şekilde bağlanırken, fibroblast gibi nöron olmayan bazı hücreler hızlıca tutunurlar. Bu şekilde karışık bir hücre süspansiyonu substrat uygulanmamış petri- lekilip kısa bir süre beklenirse zemine bağlanmamış hücreler (nöronlar) ortamdaki uygun bir substrat üzerine tekrar ekilebilir.

Hücrelerin ayrılması için kullanılan diğer bir yöntem gradyan santrifüjlemesidir. Örneğin, metrizamide ile yapılan santrifüjleme embriyonik omurilikten hazırlanan hücre süspansiyonundan motor nöronların ayrımını sağlar.

Bu yöntemler hızlı ve daha basit ayırmalar için uygundur. Fakat MSS'de oldukça fazla sayıda ve farklı tipte nöron bulunur. Nöronların tek bir tipi incelenmek isteniyorsa immün yöntemlerle seçim yapılmalıdır. "Flo-



Şekil 4: 7 günlük primer hipokampal (A) ve kortikal (B) nöronların faz-kontrast mikroskobu ile görünüşü. Büyütme 20x



Şekil 5: 14 günlük primer hipokampal nöron kültürü görülmektedir.

Yaşlanmasına ve glia üremesine izin verilen 14 günlük primer hipokampal nöron kültürü. Floresan izotiyosiyanat (FITC) işaretli Pan Neuronal Marker, Teksas kırmızısı (TR) işaretli GFAP antikoları ve 4',6-diamidin-2-fenilindol (DAPI) ile üçlü immün boyama. Nöronlar, Yeşil (FITC); glia hücreleri, kırmızı (TR); nukleuslar, mavi (DAPI). Büyütme 40x.

resan ile aktive olan hücre ayırma" yöntemi spesifik nöronların elde edilmesini sağlar. Bu yöntemde ayırmak istenen hücre tipinin yüzey proteinleri, onlara özel olan primer antikolar kullanılarak floresan bir boya taşıyan sekonder antikolar ile işaretlenir. Böylece istenilen nöron tipi elde edilebilir (1).

Canlı hücrelerin belirlenmesi ve hücre sayımı

Ekim yapılacak hücrelerin sayılması, kültürdeki hücre yoğunluğunu belirlemek, uygulanacak deneylerin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini sağlamak açısından önemlidir. Hücre sayımı genellikle hemositometre kullanılarak yapılır (Şekil 2). Tripsin mavisini, eritrozini, nigrasini gibi boyalar kullanılarak canlı ve ölü hücreler ayırılır. Bu boyalar canlı hücrelere giremezken hasarlı hücrelerin içine girerler. Bu şekilde tanınan canlı hücrelerin sayımı yapılır ve her petride aynı sayıda hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirilir (2,3).

Nöronların Ekimi

Nöron kültürü için en uygunu 35mm çapında olmakla beraber 6, 12 veya 24 kuyulu plakalar kullanılabilir. Ekim yapılacak petriye poly-L-ornithine veya poly-L-lysine ile kaplanarak hazırlanmalıdır (4,6). Sayımı takiben örneğin 35mm çapındaki petrilere ekilen hücre

sayısı 6×10^5 olmalıdır.

Nöronların kültür ortamında beslenmesi ve yaşatılması;

Kültür Medyumu

Kültüre edilen tüm hücreler için kullanılan temel kültür medyumları serumdakine benzer konsantrasyonda aminoasitler, vitaminler ve gerekli diğer besinleri içerir. En çok kullanılan kültür medyumları olan Eagle'ın Minimum Esansiyel Medyumu (MEM) 13 temel aminoasit ve 8 vitamin; Ham'ın F-12 medyumuna ise temel olmayan amino asitleri ve çeşitli vitaminleri içerir. İki medyumun yarı yarıya içeren MEM/F-12 en çok kullanılan medyumlardan biridir. Dulbecco tarafından değiştirilen MEM (D-MEM) hızlı büyüyen hücreler için geliştirilmiştir ve MEM'de bulunan maddeleri 2 ila 4 kat daha yüksek konsantrasyonda içerir.

Brewer ve arkadaşları 1993 yılında primer nöronlar için yeni bir temel medyum geliştirmişlerdir. Nörobazal medyum (NBM) olarak adlandırılan bu medyum D-MEM değiştirilerek oluşturulmuştur. Fakat D-MEM'e göre ozmolaritesi düşüktür ve temel olmayan bazı aminoasitleri ve B12 vitaminini içerir.

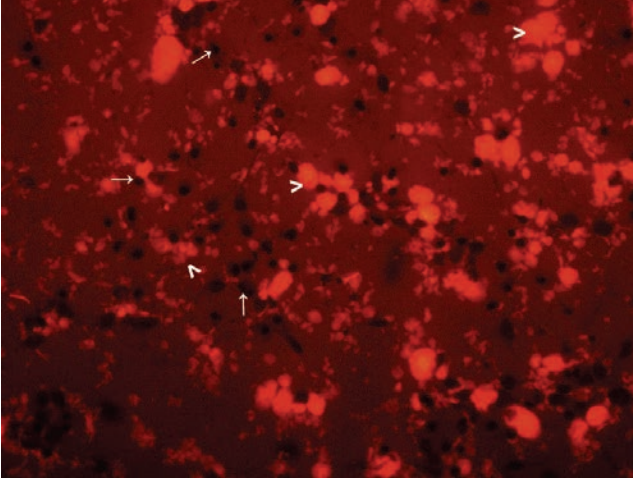
Serum

Hücreler sadece temel medyumların içinde yaşamalarını sürdürmezler, bu yüzden %5-20 oranında serum ile desteklenmeleri gerekir. At serumu ve fetal buzağı serumu en çok kullanılan serumlardır. Bu serumlar yüksek oranda mitojenik faktörler içerir. Çoğalan hücreler, hücre soyları, primer nöron veya glia kültürlerinde genellikle fetal buzağı serumu kullanılırken, postmitotik nöronlar için at serumu, sinir dokularının organotrofik kültürlerinde ise insan plasental serumu kullanılır.

Serum içermeyen medyum

1979 yılında Bottenstein ve Sato tarafından nöronal hücrelerin serum desteği olmadan yaşayabilmelerini sağlayan N2 medyumuna (9) ve 1993 yılında Brewer tarafından N2'yi değiştirilerek oluşturulan B27 medyumları (10) geliştirilmiştir. NBM ile birlikte kullanılan B27 medyumuna hipokampus ve diğer beyin bölgelerine ait primer nöronların uzun süre yaşamalarına izin verir ve nöron olmayan hücrelerin bölünmesini yüksek oranda engeller. Primer kortikal ve hipokampal nöronların ilk elde edildikleri günden 18-24 saat sonrasına kadar Leobovitz's 15 medyumunun içinde bekletilmesi, ardından B27 içeren NBM içerisine alınması oldukça başarılı sonuç veren yöntemlerdendir (4-7).

Serum içermeyen medyum kullanılarak yaşatılan primer nöronlar, nöron gelişimi, nöronal sinyal yolları, elektrofizyoloji, farmakoloji, plastisite, gen ifadesi ve nörotoksisite çalışmaları için uygundur.



Şekil 6: Primer kortikal nöron kültürüne yapılan beta amiloid 1-42 uygulaması ile Alzheimer hastalığı benzeri bir hastalık modelinin oluşturulması.

Beta Amiloid 1-42 uygulanmış olan primer nöron kültürünün floresan mikroskopik görüntüsü. Perikaryonlar ve nöron uzantıları üzerinde beta amiloid kümeleri belirgin olarak görülmektedir. Ok: nukleus, ok ucu: beta amiloid birikimi, Boyama: Kongo kırmızısı ve Mayer Hematoksilin, TX2 filtre, Büyütme x20.

Antibiyotikler

Hücre kültürlerinde mikroorganizma kontaminasyonlarına karşı penisilin ve streptomisin antibiyotikleri genellikle birarada kullanılır. Gentamicin ise düşük seviyede kontaminasyon farkedildiğinde tercih edilen bir antibiyotiktir. Bu ajanlar küf ve mayalara karşı etkili değildir.

Kültürün korunması

Nöronlar 37°C'de %5 CO₂ içeren bir ortamda yaşatılır ve 3-4 günde bir medyumlarının yarısı veya üçde biri değiştirilerek beslenirler. Tüm medyumun değiştirilmesi diğer tip hücrelerin aksine nöronların ürettikleri trofik faktörlerin ortamdaki alınmasına ve hücrelerin ölümüne sebep olmaktadır (3).

Nöronların olgunlaşması

Primer hipokampal ve kortikal nöron kültüründe-

ki hücreler ekimden sonraki 7 gün içerisinde akson ve dendritlerini uzatarak olgun nöronlar haline gelirler (Şekil 3 ve 4).

Primer nöron kültürlerinde sonraki uygulamalara başlamadan önce kültürdeki nöron/glia oranının belirlenmesi gerekir. Bunun için nöronlara ve glia hücrelerine özel flüoresan işaretli antikorlar kullanılır (Şekil 5).

Hazırlanan primer nöron kültürlerine çeşitli kimyasal ajanlar, hastalık ilişkili özel peptidler uygulanarak, gen transfeksiyonu veya susturucu RNA'lar (siRNA) kullanılarak özel gen fonksiyonları araştırılabilir, hastalıkların hücre model oluşturulabilir ya da tedavi uygulamaları gerçekleştirilebilir (Şekil 6). Nöronlar diğer birçok hücreden farklı olarak kendilerinden köken alan hücre soylarında özelliklerini tam olarak gösteremezler. Bu yüzden özellikle nörodejenerasyon mekanizmalarının çalışılmasında primer nöron kültürleri değerli bilgiler sunmaktadır.

Kaynaklar

1. Higgins D, Banker G.: Primary dissociated cell cultures; in Banker G, Goslin K (ed): Culturing nerve cells. MIT Press, Cambridge, 1998, P 37-79.
2. Price P, Brewer GJ.: Serum-free media for neural cell cultures; in Fedoroff S, Richardson A (ed): Protocols for neural cell culture. Humana Press, New Jersey, 1998, P 255-264.
3. Goslin K, Asmussen H, Banker G.: Rat hippocampal neurons in low-density culture; in Banker G, Goslin K (ed): Culturing nerve cells. MIT Press, Cambridge, 1998, P 339-371.
4. Dursun E, Gezen-Ak D, Yilmazer S.: A novel perspective for alzheimer's disease: Vitamin D receptor suppression by amyloid and preventing the amyloid induced alterations by vitamin D in cortical neurons. J Alzheimers Dis 2011;23:207-219.
5. Dursun E, Gezen-Ak D, Yilmazer S.: Beta amyloid suppresses the expression of the vitamin D receptor gene and induces the expression of the vitamin D catabolic enzyme gene in hippocampal neurons. Dement Geriatr Cogn Disord 2013;DOI: 10.1159/000350319.
6. Gezen-Ak D, Dursun E, Yilmazer S.: The effects of vitamin D receptor silencing on the expression of LVSCC-A1C and LVSCC-A1D and the release of NGF in cortical neurons. PLOS ONE 2011;6(3): e17553. DOI: 10.1371/journal.

pone.0017553.

7. Gezen-Ak D, Dursun E, Yilmazer S.: Vitamin D inquiry in hippocampal neurons: Consequences of vitamin D-VDR pathway disruption on calcium channel and the vitamin D requirement. *Neurol Sci* 2012;DOI: 10.1007/s10072-10012-11268-10076.
8. Gezen-Ak D, Dursun E, Yilmazer S.: The effect of vitamin D treatment on nerve growth factor release (NGF) in hippocampal neurons. *Arch Neuropsych* 2013;DOI:10.4274/npa.y7076.
9. Bottenstein JE, Sato GH.: Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979 76:514-517.
10. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, et al.: Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 1993;35:567-576.