

## BÜYÜK HACIMDA SÜSPANSE HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN STOKLANMASI ÜZERİNDE UYGULAMALAR

S. İsmet GÜRHAN (1) Aysun ÖZTÜRKMEN (2) Tamer ERGÜÇ (3)

### GİRİŞ

Farklı organlardan orijinini alan hücrelerin invivo üretimleri ve uzun süreli stoklanmaları için farklı kültür ortamlarına ihtiyaç vardır. Hücre kültürlerinin düşük ısı derecelerinde inkubasyonu, metabolik faaliyetleri dolayısı ile taze vasat takviye etmek veya subkültür yapmak ihtiyacını azaltır. Böylece hücrelerin muhafazası yoluna gidilebilir. Hücrelerin oda derecesinde ya da +4°C'de muhafazası kısa süreler için geçerli bir çözümdür. Uzun süreli muhafaza için eksi derecelerin kullanılması gerekir.

Hücreler liyofilizasyona ve —25°C'nin üzerindeki donma derecelerine dayanıklı değildirler. —140°C hatta —70°C'lerde hücreler 6-12 ay kadar zarar görmeksizin muhafaza edilebilirler. Ortamdaki fiziko-kimyasal değişiklikler ancak —130°C'nin altındaki sıcaklıklarda ihmal edilebilir düzeydedir. —196°C'de bu aktivite tamamen durur (1, 2, 3). Bu nedenle hücre muhafazası için en uygun sıcaklık —196°C'dir.

Dondurulan hücrelerin hayatiyetlerini ve üreme aktivitelerini muhafaza etmeleri dondurma ve eritme süratine bağlıdır. Her ne kadar dondurma hızını ayarlayıcı cihazlar üretilmiş ise de birçok labora-

Bu proje T.O.K. Bakanlığı K.K. Gen. Md. Araştırma Dairesi desteği ile yürütülmüştür (KKG-HS-10-V-01).

(1) Uzm. Vet. Hek., Şap Ens., Hücre Kontrol ve Geliştirme Lab. Şefi, P.K. 714, 06044 Ankara-TÜRKİYE

(2) Uzm. Vet. Hek., Şap Ens. Hücre Kontrol ve Geliştirme Lab.

(3) Vet. Hek., Şap Ens., Uz. Adayı

tuvar bu sorunu, ampulleri kuru buz termosları içinde veya  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece bekleterek çözümlenmektedir (5).

Aynı şekilde donmuş hücrelerin kullanılacağı zaman çözündürülme sürati de önemli bir faktördür. Bu amaçla en uygun işlem, ampulü  $37^{\circ}\text{C}$ 'lik su banyosunda hızla çözdürmektir.

1975'de (Jensen, M. 1975), 100 ml hacimli şişelerdeki hücre kültürlerini  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de 6 ay süre ile muhafaza edilebildiğini bildirmiştir. Bazı laboratuvarlarda daha düşük ısı derecelerinde benzer stoklar üzerinde çalışmalar yapılmaktadır.

Büyük hacimde stoklanan hücre kültürleri ile ara pasajlara gerek kalmaksızın 30 veya 100 litre kapasiteli süspanse kültür hazırlamak mümkün olacaktır ki, böylece hücrenin pasaj adedi azalacağı gibi üretimdeki herhangi bir aksaklığın ardından normal düzeye ulaşmak için gereken zaman da kısaltılmış olacaktır.

## MATERYAL ve METOT

### Materyal :

**Hücre :** BHK21 C 13 süspanse hücre kültürleri kullanıldı.

**Vasat :** Hücre üretme vasatı olarak % 10 siğir serumlu 6M, hücre stoklama vasatı olarak % 20-30 siğir serumlu ve % 10 DMSO'lu 6M vasatı kullanıldı.

**Dimethylsulfoxid (DMSO) :** Merck, Art. 2951 kullanıldı.

**Hücre Dondurma Kapları :**  $-156^{\circ}$ 'ye kadar bozulmadan dayanabilen, hücre kültürleri için nontoksik, 250 ml hacimli, polikarbonat yapısında biberon tipi kaplar (Chicco, ARTSANA, cod. 60003), ağızları biri paslanmaz çelik, diğeri silikon iki conta ile kapatılarak kullanıldı.

**Sıvı Azot Kabı :** 300 litre total hacimli, Union Carbide, sıvı azot kapları, biberonlar sıvıya değmeyecek şekilde modifiye edildikten ve seviye göstergesi ilave edildikten sonra kullanıldı.

### Metot :

#### a — Hücre kültürlerinin konsantrasyonu ve dondurulması :

30 ya da 150 litrelik fermentörlerdeki 24 saatlik hücre kültürleri 5 litrelik steril cam kaplara alınarak  $4^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece sedimentasyona terk edildi. Bu süre sonunda her şişedeki süpernatant, hücre sayı-

mı yapıldıktan sonra atıldı ve sedimente 4°C'deki 100 ml muhafaza vasatı ilave edilerek homojenize edildikten sonra 250 ml kapasiteli santrifüj godesine transfer edildi. 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. (1000 rpm). Süpernatant atıldı, her godedeki hücre süspansiyonu bir biberona konularak donduruldu.

Bu çalışmada ilk 6 ay içerisinde toplam 15 seri hücre stoklaması yapıldı.

Burada sedimentasyon öncesi ortalama hücre konsantrasyonu  $2,5 \times 10^6$  hücre/ml, her biberonda nihai hücre yoğunluğu ortalama  $1 \times 10^{10}$  hücre/ml idi.

#### **b — Dondurulan hücrelerle yeni kültürlerin hazırlanması :**

Üretim vasatı 37°C'ye kadar ısıtıldıktan sonra her 8 litre vasat için 1 biberon —130°C'den çıkartılarak süratle, 37°C su banyosunda çözdürüldü ve sıcak (37°C) üretim vasatına boşaltıldı. Burada geçen süre ortalama 15 dakika idi.

Taze vasat içerisindeki hücreler iyice homojenize edildikten sonra sayım için numune alındı ve mikroskopik olarak morfolojik yapı incelendi, sayım yapıldı. Daha sonra fermentöre transfer edilen hücrelerin 48 saat sonundaki üreme ve canlılık durumları tekrar alınan numuneler ile tespit edildi.

### **B U L G U L A R**

**a — Hücre sedimentasyonu :** 4°C'de bir gece sedimentasyona terk edilen hücre kültürlerinin süpernatantından yapılan sayımlarda halen sedimente olmamış ortalama  $1,5 \times 10^5$  hücre/ml bulunduğu tespit edilmiştir. Başlangıçtaki hücre konsantrasyonunun  $2,6 \times 10^6$  hücre/ml civarında olduğu gözönüne alınırsa, yaklaşık % 6 oranında hücre kaybının olduğu ortaya çıkmaktadır.

**b — Dondurulan hücrelerle yeni kültürlerin hazırlanması :** Dondurulan hücrelerin çözdürülmesi işlemi her biberon için 15 dakika kadar bir zamana ihtiyaç göstermiştir. Çözdürülen ve 37°C'deki üretim vasatında süspansiyon edilen hücrelerin yeni ortamdan alınan numunelerinde ölüm oranının % 10 civarında olduğu tespit edilmiştir. Ancak 48 saat inkubasyon sonrası ölü oranında azalmanın yanında üremenin de normal düzeye ulaştığı gözlenmiştir (Tablo 1).

## TARTIŞMA

Hücre kültürlerinin düşük ısı derecelerinde dondurularak muhafazası uzun yıllardan beri bilinen bir yöntemdir. Bu amaçla genelde  $-70^{\circ}\text{C}$  ve  $-196^{\circ}$  derin donduruculardan yararlanılmaktadır.  $-70^{\circ}\text{C}$  de hücrelerin en fazla 6 ay muhafaza edilebileceği bildirilmektedir (1).

Gerçekte bizim gözlemlerimize göre ise  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de hücreler bir yıldan daha uzun süre muhafaza edilebilmektedir. Ancak burada önemli olan, derin dondurucunun ısısının sabit tutulabilmesidir. En uzun süreli ve güvenli hücre muhafazası  $-196^{\circ}\text{C}$  sıvı azot içerisinde gerçekleştirilebilir. Bu ısıya dayanıklı ampuller ticarete en fazla 5 ml hacıma kadar üretilmektedir. Oysa polikarbonat yapısındaki kaplar  $-150^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar bozulmadan kalabilmektedir. Hücre kültürlerinin en az 1 yıl süre ile ve güvenle muhafaza edilebilmesi için bu çalışmada 250 ml hacımlı polikarbonat kaplar kullanılarak  $-130^{\circ}\text{C}$  sıvı azot buharında stoklanması denenmiştir.

Dondurma işlemi sırasında ısının düşüş hızının olumsuz etkileri hücre türüne göre değişmektedir (7). Fibroblastik hücreler için ortalama en uygun ısı düşme hızı  $1^{\circ} - 3^{\circ}\text{C}/\text{dak.}$  olarak bildirilmektedir (3, 5). Tablo 1 incelendiğinde görülen % 10 oranındaki hücre ölümlerinin nedenlerinden biri hücre hacminin 100 ml gibi büyük bir miktarda ve dolayısı ile çepelerdeki soğuma hızı ile orta kısımdaki soğuma hızının farklı olmasıdır.

Hücre kaybının ikinci nedeni de kullanılacağı zaman hücrenin çözdürülmesi için geçen sürenin 15 dakika olmasıdır. Hücre stoklanmasında başarıda en önemli faktörlerden birisi donmuş hücrenin süratle (1-5 dakika) inkıbasyon için gerekli optimal ısı derecesine ulaşmasıdır. Süre uzadıkça ortamda bulunan kriyoprotektan maddelerin etkileri görülmeye başlar ki bu da membranda kısmen onarılabılır tahribat ve hücre ölümleri ile sonuçlanır (3).

Bu çalışmanın amacının ana hücre stoku yapmak değil üretimi destekleyici hücre stoku yapmak olduğu dikkate alınınca görülen % 10 ölümün sonuca fazla olumsuz bir etki yapmayacağı ortaya çıkacaktır. Gene de ilerideki çalışmalarda bu oranın düşürülmesine yönelik önlemler alınmalıdır.

Hücre muhafazası işleminde kaybı önlemek için, hücre üretme vasatının mebran koruyucu maddeler ile takviye edilmesi önerilmektedir (3). Laboratuvarımızda ise gene aynı amaçla, rutin hücre stoklamalarında, dondurma vasatındaki serum miktarı arttırılmış (% 90) ve böylece hücre kaybı % 10'a indirgenmiştir. Küçük ampullere uygulanan bu yöntem büyük hacımdaki stoklara da uygulanabilir.

## Ö Z E T

Büyük hacımdaki hücrelerin uzun süreli muhafazası için  $-130^{\circ}\text{C}$  nin altındaki sıcaklıklara ihtiyaç vardır.  $-196^{\circ}\text{C}$ 'ye dayanıklı hücre dondurma ampullerinin maksimum kapasitesi 5 ml'dir. 100 ml hacımdaki hücrelerin dondurularak muhafazası için ticarete sadece polikarbonat ampuller bulunmaktadır ki bunlar da ancak  $-150^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar bozulmadan kalabilmektedirler. Bu nedenle denemeler sıvı azot gazında hücre muhafazası konusunda yoğunlaştırılmıştır.

Bu çalışmada 15 seri hücre kültürü 100 ml hacımda dondurulmuştur. Bu hücrelerin çözdürüldükten sonraki üreyebilirlik oranının ortalama % 90 olduğu tespit edilmiştir.

## S U M M A R Y

For long term storage of so large quantities of cells it is necessary to keep them below minus  $130^{\circ}\text{C}$ . The maximum capacity of the ampoules which are not damaged in minus  $196^{\circ}\text{C}$  is limited with 5 ml' To freeze the cells in at least 100 ml volume only polycarbonate ampoules are commercially available. Those are resistant to steam sterilisation and freezing untill minus  $156^{\circ}\text{C}$ . For that reason the experiment is realised in the gas phase of liquid nitrogen.

## T E Ş E K K Ü R

Bizlere bu çalışmayı yapma fırsatını veren Bakanlık Araştırma Dairesi'ne ve Şap Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- 1 — CORIELL, L. (1979) : Preservation, Storage and Shipment. Methods in Enzymology, Vol. LVIII, eds. William B. Jakoby and Ira H. Pastan, Acd. Press.
- 2 — DOYLE, A., MORRIS, C.B., ARMITAGE, W.J. : Cryopreservation of Animal Cells. Upstream Processes: Equipment and Techniques, pp. 1-7, 1988 Alan R. Liss, Inc.
- 3 — GRIFFITHS, J.B. Cell Biology : Experimental Aspects, Animal Cell Biotechnology, eds. Ray E. Spier and J.B. Griffiths, vol. 1, 1985 Acad Press.
- 4 — JENSEN, M. (1975) : Storage of Large Volumes of Cells. Report of the Meeting of the Research Group of the Stand. Tech. Comm. Eur. Comm. Cont. FMD. Brescia/Padua, Sep. 1975.
- 5 — KASTEN, F.H. and YIP, D.K., : A Simple Device and Procedure for Successful Freezing of Cells in Liquid Nitrogen Vapor. Methods in Cell Biology, ed. David M. Prescott, vol. XIV, 1976 Acad Press.
- 6 — MAREL, P., : Concentration. Animal Cell Biotechnology Vol. 2, eds. Ray E. Spier and J.B. Griffiths, 1985 Acad. Press.
- 7 — SHARP, R.J. (1984) : The Preservation of Genetically Unstable Microorganisms and the Cryopreservation of Fermentation Seed Cultures in Advances in Biotechnological Processes 3, eds. Alan R. Liss, Inc., 81-109., New York.

**TABLO 1 : Stoktan çıkartılan hücrelerin ilk süspans kültüründe 0 ve 48'inci saatlerdeki canlı ve ölü hücre konsantrasyonları (hücre/ml olarak).**

Kültür No.	0 saat		48 saat	
	Canlı hücre	Ölü hücre	Canlı hücre	Ölü hücre
1	1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>5</sup>	2,8x10 <sup>5</sup>	—
2	8x10 <sup>5</sup>	7,8x10 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>4</sup>
3	9x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>	2,4x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>4</sup>
4	1x10 <sup>6</sup>	9x10 <sup>4</sup>	3x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>4</sup>
5	7,5x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>5</sup>	—
6	1x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>5</sup>	2,9x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>4</sup>
7	1,2x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	2,9x10 <sup>5</sup>	—
8	6x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>4</sup>	1,8x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>4</sup>
9	1,1x10 <sup>5</sup>	7x10 <sup>4</sup>	2,9x10 <sup>5</sup>	—
10	9x10 <sup>5</sup>	9x10 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>4</sup>
11	1,3x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>4</sup>	kontamine	
12	1x10 <sup>6</sup>	9,5x10 <sup>4</sup>	2,7x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>4</sup>
13	9,5x10 <sup>5</sup>	8x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>4</sup>
14	8,8x10 <sup>5</sup>	9x10 <sup>4</sup>	2,4x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>4</sup>
15	1,1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>5</sup>	2,9x10 <sup>5</sup>	—