



SAKLAMA KOŞULLARININ İZOLE LENFOSİT CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ

THE EFFECT OF STORAGE CONDITIONS ON ISOLATED LYMPHOCYTE VIABILITY

Seniha KERİMOĞLU² , Seda TEKNECİ^{1,2} , Aylin ÜSTÜNDAĞ^{1*} ,
Yalçın DUYDU¹

¹Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı, 06560, Ankara, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 06110, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Saklama koşullarının izole lenfosit canlılığı üzerindeki etkisi, hücrelerin uzun süreli saklanabilmesi için kritik bir faktördür. Lenfositler, bağışıklık sisteminin önemli hücreleri olup, çoğunlukla kanser gibi kronik hastalıkların değerlendirilmesi veya farklı araştırma konularında kullanılmak üzere laboratuvar ortamında izole edilip saklanırlar. Bu saklama işlemi, hücrelerin fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini koruyabilmesi için uygun koşullarda yapılmalıdır. Bu bağlamda, saklama koşullarının izole lenfositlerin canlılığı üzerindeki etkileri belirlemek, yapılacak araştırmalarda doğru sonuç alabilmek için çok önemlidir.

Gereç ve Yöntem: Bu makalede, insan lenfosit örneklerinde saklama koşullarının DNA hasarını etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. Tam kan ve İzole lenfositler 1, 3, 6 ve 12 aylık süreler boyunca 2 farklı sıcaklık (-20°C ve -80°C) altında saklanmıştır. Ayrıca, her bir zaman aralığı için farklı sıcaklık koşullarında saklanan lenfositlerin bir kısmı %10 DMSO içeren kriyoprezervasyon çözeltisinde, diğer bir kısmı ise doğrudan saklanmıştır. Bu çalışmayla, farklı sürelerde ve farklı saklama koşulları altında lenfosit canlılıklarını değerlendirerek insan biyoizleme çalışmaları gibi lenfositlerin kullanıldığı farklı çalışma alanlarına elde ettiğimiz veriler ile katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre lenfositlerin hayatta kalma oranı -80°C'deki saklama koşullarında daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, lenfositlerin -80°C'de kriyoprezervasyon çözeltisi ile (%10 DMSO) saklanması lenfosit bütünlüğünü korumak için daha uygun bir strateji sağladığı söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Canlılık, DNA hasarı, lenfosit, saklama koşulları

ABSTRACT

Objective: The effect of storage conditions on isolated lymphocyte viability is a critical factor for the long-term preservation of cells. Lymphocytes are essential cells of the immune system and are often isolated and stored in laboratory environments for different research topics such as chronic diseases, including cancer. This storage process must be conducted under suitable conditions to preserve the cells' physiological and biochemical properties. In this context, determining the effects of storage conditions on the viability of isolated lymphocytes is crucial for obtaining accurate results in research.

Material and Method: This research investigates whether storage conditions affect DNA damage in human lymphocyte samples. Whole blood and isolated lymphocytes were stored at two different

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Aylin Üstündağ
e-posta / e-mail: dur@pharmacy.ankara.edu.tr, Tel. / Phone: +903122033114

temperatures (-20°C and -80°C) for 1, 3, 6, and 12 months. Additionally, for each time point, some of the lymphocytes stored under different temperature conditions were preserved in a cryopreservation solution containing 10% DMSO, while others were stored directly. The aim of this study is to contribute to various research areas, such as human biomonitoring studies, where lymphocytes are used, by evaluating lymphocyte viability under different storage conditions and time periods.

Result and Discussion: According to the findings of our study, the survival rate of lymphocytes was higher under storage conditions at -80°C. Additionally, it can be stated that storing lymphocytes at -80°C with a cryopreservation solution (10% DMSO) provides a more suitable strategy for preserving lymphocyte integrity.

Keywords: DNA damage, lymphocyte, storage conditions, viability

GİRİŞ

Kanser gibi kronik hastalıkların toksikolojik yönden değerlendirilmesinde epidemiyolojik ve *in vitro* araştırmalar önemli bir yer tutmaktadır. Bu araştırma türlerinde biyolojik örnekler kullanılmaktadır. En çok kullanılan ve tercih edilen biyolojik örnek ise insan kanıdır. İnsan kanı venöz kandan kolaylıkla alınmakta ve tam kandan izole edilen lenfositler insan biyoizlem çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Biyoizlem çalışmalarında organizmanın oksidatif stres düzeyinin belirlenmesinde, enfeksiyonel hastalıklarda tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde, aşı geliştirme çalışmalarında lenfositlerin kullanılması, bu hücrelerin saklama koşulları ve saklama sürecindeki ve sonrasındaki adımların değerlendirilmesini, lenfositlerin kullanıldığı çalışmalardan elde edilen sonuçların doğru bir şekilde yorumlanması açısından önemli hale getirmektedir [1,2].

Yapılacak olan çalışmanın amacına göre katılımcılardan alınan kan; tam kan, serum, plazma ve lenfosit şeklinde oda sıcaklığında, +4°C’de veya -80°C sıcaklıkta dondurularak saklanabilir [3]. Ancak bu hücrelerin çalışmanın kapsamına göre aynı gün toplanması ve aynı gün içerisinde saklanması her zaman mümkün olmamaktadır [4].

Tam kandan izole edilen lenfositlerin saklanmaları laboratuvarlar arası deneyler arası farklılığı azaltmak için tercih edilen bir prosedürdür. Ancak bu yöntem lenfositlerde yapısal ve/veya fonksiyonel önemli değişikliklere neden olabilmektedir [5]. Lenfositler saklama süresi boyunca apoptozis sürecine girebilmekte ve bu durum saklama süresine ve sıcaklık koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir [3,4]. Lenfositlerin izolasyonundan itibaren başlayan saklama koşulları lenfosit DNA bütünlüğünde de olumsuz sonuçlar oluşturabilmektedir [1,6,7]. Saklama koşullarına bağlı olarak gelişebilecek etkiler DNA hasarının değerlendirildiği çalışmalarda, klinik araştırmalarda veya biyoizleme çalışmalarında sonuçların yanlış yorumlanmasına neden olmaktadır. Lenfositlerdeki DNA hasarının değerlendirilmesi organizmanın oksidatif stres düzeyi hakkında önemli bilgi sağlamaktadır. Ancak lenfositleri saklama sürecindeki izolasyon, kriyoprezervasyon, saklama, saklama sonrası hücreleri çözme ve yıkama işlemleri, saklama sonrasındaki DNA hasar seviyesinin saklama öncesindeki DNA hasar seviyesini tam olarak temsil etmemesi ile sonuçlanabilmektedir [1]. Ancak lenfositlerde saklama koşullarının DNA hasarı üzerine etkisinin değerlendirilmesi çalışmamızın kapsamı dışında olup, DNA hasarının öncesinde hücre canlılığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Farklı saklama koşullarının lenfositlerin hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkisi olduğu bilinmektedir [3,8,9,10]. Özellikle uzun süreli saklama için kullanılan kriyoprezervasyon yönteminde hücrelerin donması sırasında meydana gelen buz kristallerinin neden olabileceği ekstra hücre hasarını önlemeye yönelik kullanılan dimetil sülfoksitin (DMSO) hücrelerin çözünmesi sırasında sitotoksositeye neden olabileceği belirtilmiştir [11].

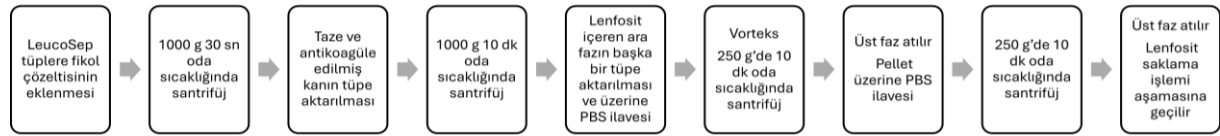
Tam kandan izole edilen lenfositlerin saklama koşullarının hücre sayısı ve canlılığı üzerine etkisi kanser araştırmaları, biyoizlem çalışmaları, enfeksiyonel hastalıklarda tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi, aşı çalışmaları gibi önemli ve kapsamlı araştırmalarda sonuçların yanlış şekilde değerlendirilmesine ve DNA hasarının belirlendiği durumlarda da hücrelerin IC₅₀ (inhibitör konsantrasyon) değerinin üzerinde olması gerektiği göz önünde bulundurularak çalışmamızda farklı sürelerde ve saklama koşulları altında lenfosit canlılıklarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

34 yaşında sağlıklı ve ilaç kullanmayan 1 kadın gönüllüden toplam 10 ml kan örneği heparinli bir tüpe alınarak çalışmamıza başlanmıştır. 10 ml kanın 5 ml'si ile LeucoSep (Greiner bio-one, 12 ml) tüpler kullanılarak lenfosit izolasyonu yapılmıştır. Hücrelerin sayım işlemi TC20 Otomatik Hücre Sayım Cihazı (Bio-Rad TC20, Singapur) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Alınan kanın diğer 5 ml'si tam kan çalışmasında kullanılmıştır.

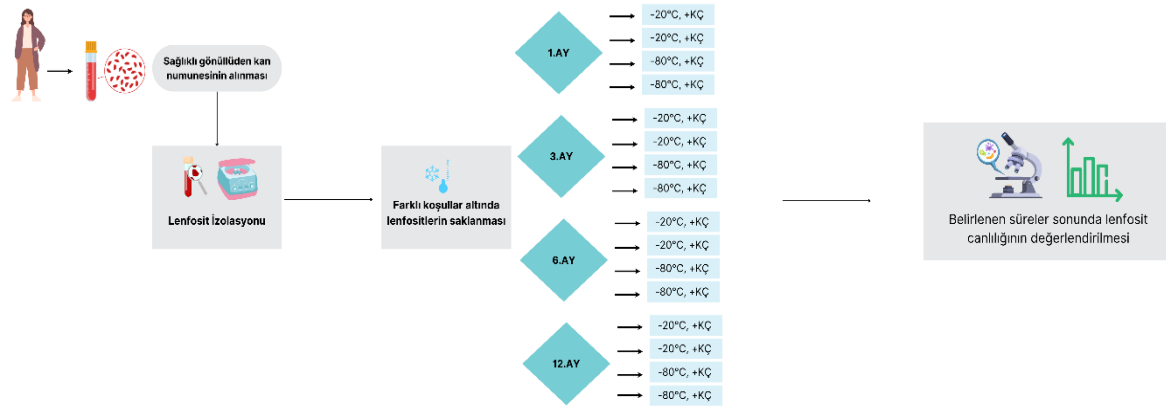
Lenfosit İzolasyonu ve Saklanması

Lenfositlerin izolasyon işlemi Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Lenfosit izolasyon aşamaları

İzole lenfositler 1, 3, 6 ve 12 aylık süreler boyunca 2 farklı sıcaklık (-20°C ve -80°C) altında saklanmıştır. Ayrıca, her bir zaman aralığı için farklı sıcaklık koşullarında saklanan lenfositlerin bir kısmı %10 DMSO içeren kriyoprezervasyon çözeltisinde, diğer bir kısmı ise kriyoprezervasyon çözeltisi olmadan doğrudan saklanmıştır. Farklı koşulları altında saklanan lenfositlerin canlılığını değerlendirmek için izlenen süreç ve yöntem Şekil 2'de gösterilmiştir.

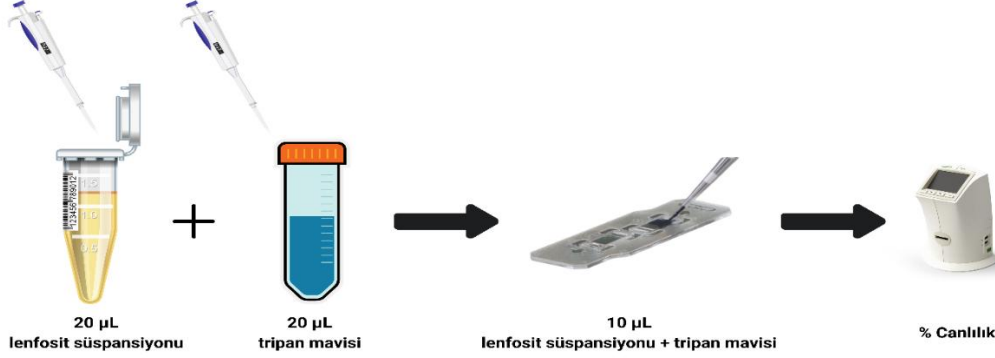


Şekil 2. Lenfosit canlılığının değerlendirilmesi için izlenen yöntem ve süreç (KÇ: %10 DMSO içeren kriyoprezervasyon çözeltisi). Sağlıklı gönüllüden alınan tam kandan lenfosit izolasyonu Şekil 1'e göre gerçekleştirilmiştir. Lenfositlerin saklanması farklı koşullar olarak süre (1, 3, 6 ve 12 ay), sıcaklık (-20°C ve -80°C) ve %10 DMSO içeren kriyoprezervasyon çözeltisi ve doğrudan saklama lenfosit canlılığının değerlendirilmesi için seçilen parametrelerdir

Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Sitotoksosite test yöntemlerinden biri olan boyama yöntemi hücre canlılığını belirlemede uygulama kolaylığı ve hızlı sonuç vermesi açısından tercih edilen yöntemlerden biridir. Bu yöntem içerisinde tripan mavisini ile hücre canlılığının belirlenmesi, bir azo boyası olan tripan mavisinin hücre zarı bütünlüğü korunan canlı hücrelerin zarından geçememesi, zar bütünlüğünü bozulan hücreleri ise boyaması prensibine dayanmaktadır. Çalışmamızda lenfositlerin canlılığını belirlenen süreler sonunda değerlendirmek için bir sitotoksosite test yöntemi olan tripan mavisini ile boyama yöntemi kullanılmıştır.

Tripan mavisi yönteminde, 20 µl lenfosit süspansiyonu 20 µl tripan mavisi çözeltisi içerisine ilave edilmiştir. Hazırlanan tripan mavisi + lenfosit süspansiyonundan 10 µl alınarak hücre sayım lamı üzerine yayılmıştır. Hücre sayım lamı TC20 Otomatik Hücre Sayım Cihazına yerleştirildikten sonra % canlı hücre sayısı cihaz ekranında okunan değer ile belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Tripan mavisi yöntemi ile hücre canlılığının belirlenmesi. TC20 otomatik hücre sayım cihazı ile, cihaza özgü hücre sayım lamı yerleştirilerek hücre süspansiyonundaki % canlılık değerleri elde edilmiştir. Sayım cihazının ekranında 1 ml’deki toplam hücre sayısı, canlı hücre sayısı ve % canlılık verileri gösterilmektedir

İstatiksel Analiz

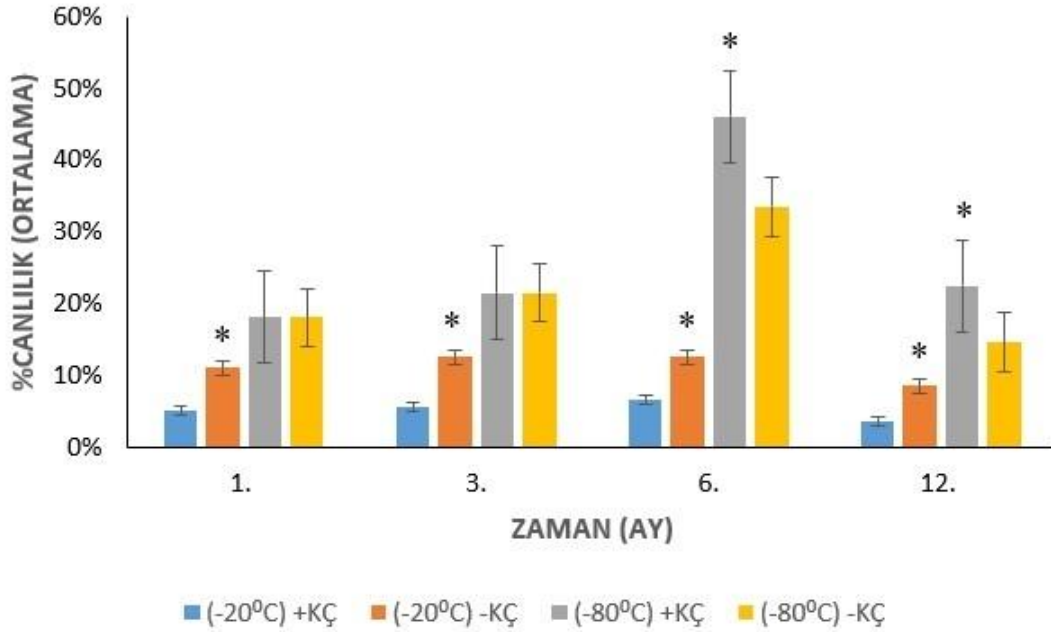
Çalışmamızda lenfositlerin canlılık değerleri bir sitotoksikite test yöntemi olan tripan mavisi yöntemi ile belirlenmiş ve istatiksel analizi IBM SPSS programı (SPSS programı (SPSS Windows Release 22.0) *t-test* kullanılarak yapılmıştır. İstatiksel olarak anlamlılık sınırı $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Tam kan ya da kan fraksiyonları (serum, plazma, lenfosit) popülasyon bazlı farklı çalışma amaçları için sıklıkla kullanılan biyolojik bir materyaldir. Kan/fraksiyonları yapılacak olan çalışmanın amacına göre farklı koşullar altında saklanmaktadır. Uygun bir saklama ortamı; analiz türü, amacı ve süresi gibi birçok faktöre bağlıdır [8]. Farklı saklama koşulları ve süreleri altında lenfositlerin canlılığının değerlendirilmesi ise planlanan çalışmanın amacına uygun sonuçların elde edilmesi ve yorumlanması açısından önem taşımaktadır. Ayrıca, lenfosit canlılıklarının değerlendirilmesi özellikle izole lenfositlerin bir yerden bir yere gönderilmesi ve saklanması ile ilgili prosedürlere katkı sağlaması açısından önemlidir [6].

Farklı saklama koşulları ve sürelerinde lenfosit canlılığını değerlendirdiğimiz çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre, belirlenen her bir sürede lenfosit canlılığında azalma görülmüş ve bu azalma -20°C ve %10 DMSO içeren kriyoprezervasyon çözeltisi ile saklanan lenfositlerde daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4). -20°C’de doğrudan saklanan lenfositlerin aynı sıcaklıkta kriyoprezervasyon çözeltisi içerisinde saklanan lenfositlere göre hücre canlılığı istatiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$; *t-test*). Her iki saklama koşulları altında 12. ayda lenfosit canlılığında azalma meydana gelmiştir (Şekil 4).

Şekil 4’te verilen zaman - % canlılık grafiğine göre -80°C sıcaklık altında %10 DMSO içeren kriyoprezervasyon çözeltisinde saklanan ve aynı sıcaklıkta bir kriyoprezervasyon çözeltisi olmadan saklanan lenfositlerin canlılıkları 1. ve 3. ayda eşit olarak bulunmuştur. 6. ve 12. ayda ise kriyoprezervasyon çözeltisi içerisinde saklanan lenfositlerin canlılık yüzdesi daha yüksek olarak tespit edilmiştir ($p < 0.05$; *t-test*).



Şekil 4. Aylara ve saklama koşullarına göre lenfosit canlılığı grafiği. Mavi bar -20°C’de %10 DMSO içeren kriyoprezervasyon çözeltisinde saklanan lenfositleri, turuncu bar -20°C’de saklama çözeltisi olmadan doğrudan saklanan lenfositleri, gri bar -80°C’de %10 DMSO içeren kriyoprezervasyon çözeltisinde saklanan lenfositleri, sarı bar ise -80°C’de doğrudan saklanan lenfositlerin % canlılık değerlerini göstermektedir. * % canlılık değerleri istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$; t-test)

Konu ile ilişkin literatür çalışmaları tarandığında Belloni ve arkadaşlarının (2008) gerçekleştirdiği bir çalışmada artan sıcaklık ve saklama sürelerinde lenfosit canlılığında azalma meydana gelmiş ve saklama sürecinde lenfositlerin apoptozise uğradıkları belirtilmiştir. Yaptıkları çalışmada lenfosit canlılığının ve proliferasyonun saklama koşullarına bağlı olduğu gösterilmiştir. Hücrelerin stimülasyonunu sağlayan fitohemagglütinin kullanılması ve 96 saat boyunca +4°C sıcaklıkta saklanması lenfosit canlılığının korunması için uygun bir koşul olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde, yapılan bir çalışmada, izole lenfositlerin 24 saate kadar olan kısa sürelerde oda sıcaklığında saklanabileceğini, daha uzun süreli çalışmalar için ise soğukta saklamanın tercih edilmesi gerektiği belirtilmiştir [8]. Belirtilen çalışmalarda artan sıcaklık ve saklama sürelerinde lenfosit canlılığında azalma meydana gelmesi bizim de çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuç ile benzerlik göstermektedir. -20°C sıcaklık altında kriyoprezervasyon çözeltisi olsun ya da olmasın saklanan lenfositlerin canlılıkları -80°C’de saklananlara göre daha düşük bulunmuştur. Bir başka çalışmada lenfosit alt türlerinin (T-hücreleri, B-hücreleri ve doğal katil hücreler) canlılığı saklama sıcaklığı ve süresine göre değerlendirilmiştir. HIV pozitif hastalardan alınan kan örneklerinden elde edilen lenfosit alt türlerinin 21°C sıcaklıkta önemli ölçüde canlılığını kaybettiği ve inflamasyon sürecinde görevli olan CD8+ ve CD3+ hücre canlılıklarında da azalma olduğu belirtilmiştir [12]. Radyasyonun neden olduğu kromozomal hasarın insan lenfosit hücreleri üzerinde doğru bir şekilde değerlendirilmesi için fitohemagglütinin varlığında 48 saat boyunca lenfositlerin +4°C’de saklanması, lenfositleri apoptozise karşı koruduğu belirtilerek, kromozomal hasarın doğru bir şekilde değerlendirilebileceği belirtilmiştir [7].

Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre lenfositlerin hayatta kalma oranı -80°C’deki saklama koşullarının test edilen tüm zaman aralıklarında istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$; t-test) (Şekil 4). Saklama süresi uzadığında (6. ve 12. aylarda) -80°C’de saklanan numunelerin lenfositlerin kriyoprezervasyon çözeltisi ile (%10 DMSO) saklandığında istatistiksel olarak canlılıklarının daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0.05$; t-test). Çalışmamızdan elde ettiğimiz tüm sonuçlar değerlendirildiğinde lenfositlerin bütünlüğünü korumak için -80°C’de saklamanın -20°C’ye göre daha uygun olduğu, -80°C’de de lenfositleri direkt saklamak yerine kriyoprezervasyon çözeltisi ile

saklamanın lenfosit bütünlüğünün daha uzun süre korunması için daha uygun bir strateji sağladığı söylenebilir.

Saklama süresi ve koşullarına göre lenfosit canlılığının değerlendirildiği literatür çalışmaları az sayıda olup, farklı saklama koşulları altında konu ile ilgili yapılacak olan daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sayede insan biyoizlem çalışmaları gibi birçok alanda en çok tercih edilen biyolojik materyallerden biri olan kan numunesinin ve fraksiyonlarının gerçekleştirilecek olan çalışmanın amacına göre saklanması, depolanması, transfer edilmesi gibi süreçlerine katkı sağlayacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Seniha Kerimoğlu'nun doktora tezi olarak Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde yapılmış ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (TDK-2022-2701).

YAZAR KATKILARI

Kavram: A.Ü.; Tasarım: S.K., S.T., A.Ü.; Denetim: A.Ü., Y.D.; Kaynaklar: A.Ü., Y.D.; Malzemeler: S.K., A.Ü.; Veri Toplama ve/veya İşleme: S.K., S.T., A.Ü.; Analiz ve/veya Yorumlama: S.K., S.T., A.Ü.; Literatür Taraması: S.K., S.T., A.Ü.; Makalenin Yazılması: S.K., S.T., A.Ü.; Kritik İnceleme: S.K., A.Ü., Y.D.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

ETİK KURUL ONAYI

Çalışmanın yapılması için gerekli onay 09.06.2022 tarihinde Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alınmıştır. Onay numarası: 2022000325-1(2022/325).

KAYNAKLAR

1. Ho, C.K., Choi, S.W., Siu, P.M., Benzie, I.F. (2011). Cryopreservation and storage effects on cell numbers and DNA damage in human lymphocytes. *Biopreservation and Biobanking*, 9(4), 343-347. [\[CrossRef\]](#)
2. Germann, A., Oh, Y.J., Schmidt, T., Schön, U., Zimmermann, H., von Briesen, H. (2013). Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function. *Cryobiology*, 67(2), 193-200. [\[CrossRef\]](#)
3. Belloni, P., Meschini, R., Palitti, F. (2008). Effects of storage conditions of human whole blood on the viability of lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 84(7), 613-619. [\[CrossRef\]](#)
4. Allione, A., Porcedda, P., Russo, A., Ricceri, F., Simonelli, V., Minoprio, A., Guarrera, S., Pardini, B., Mazzei, F., Dogliotti, E., Giachino, C., Matullo, G. (2013). Effect of blood storage conditions on DNA repair capacity measurements in peripheral blood mononuclear cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 749(1-2), 73-79. [\[CrossRef\]](#)
5. Jalla, S., Sazawal, S., Deb, S., Black, R. E., Das, S.N., Sarkar, A., Bhan, M.K. (2004). Enumeration of lymphocyte subsets using flow cytometry: Effect of storage before and after staining in a developing country setting. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 19, 95-99. [\[CrossRef\]](#)
6. Duthie, S.J., Pirie, L., Jenkinson, A.M., Narayanan, S. (2002). Cryopreserved versus freshly isolated lymphocytes in human biomonitoring: Endogenous and induced DNA damage, antioxidant status and repair capability. *Mutagenesis*, 17(3), 211-214. [\[CrossRef\]](#)
7. Belloni, P., Pepe, G., Palitti, F. (2010). Effect of storage conditions of blood on radiation-induced chromosomal aberrations and apoptosis in human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 695(1-2), 35-39. [\[CrossRef\]](#)
8. Park, M.S., Terasaki, P.I. (1974). Storage of human lymphocytes at room temperature. *Transplantation*, 18(6), 520-524. [\[CrossRef\]](#)
9. Stopford, C.R., Macqueen, J.M., Amos, D.B., Ward, F.E. (1972). Some variations in lymphocyte freezing methods which do not affect cell viability. *Tissue Antigens*, 2(1), 20-26. [\[CrossRef\]](#)

10. Vaught, J.B. (2006). Blood collection, shipment, processing, and storage. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15(9), 1582-1584. [\[CrossRef\]](#)
11. Ladeira, C., Koppen, G., Scavone, F., Giovannelli, L. (2019). The comet assay for human biomonitoring: effect of cryopreservation on DNA damage in different blood cell preparations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 843, 11-17. [\[CrossRef\]](#)
12. Ekong, T., Kupek, E., Hill, A., Clark, C., Davies, A., Pinching, A. (1993). Technical influences on immunophenotyping by flow cytometry the effect of time and temperature of storage on the viability of lymphocyte subsets. *Journal of Immunological Methods*, 164(2), 263-273. [\[CrossRef\]](#)